



HAL
open science

Conception de nouvelles formulations pour l'encapsulation des molécules BCS III

Florence Dumas Giteau

► **To cite this version:**

Florence Dumas Giteau. Conception de nouvelles formulations pour l'encapsulation des molécules BCS III. Médecine humaine et pathologie. Université d'Angers, 2020. Français. NNT : 2020ANGE0061 . tel-03935816

HAL Id: tel-03935816

<https://theses.hal.science/tel-03935816>

Submitted on 12 Jan 2023

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

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

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE D'ANGERS

ECOLE DOCTORALE N° 605
Biologie Santé
Spécialité : Sciences Pharmaceutiques

Par

Florence DUMAS

Conception de nouvelles formulations pour l'encapsulation des molécules BCS III

Thèse présentée et soutenue à Angers, le 1^{er} décembre 2020
Unité de recherche : Laboratoire MINT, INSERM U1066 / CNRS 6021

Rapporteurs avant soutenance :

Anne AUBERT-POUËSSEL *Maitre de Conférences des Universités, HDR, Université de Montpellier*
Stéphanie BRIANÇON *Professeur des Universités, Université Claude Bernard, Lyon 1*

Composition du Jury :

Président : Lazhar BENYAHIA *Professeur des Universités, Le Mans Université*
Examineurs : Anne AUBERT-POUËSSEL *Maitre de Conférences des Universités, HDR, Université de Montpellier*
Stéphanie BRIANÇON *Professeur des Universités, Université Claude Bernard, Lyon 1*
Dir. de thèse : Jean-Pierre BENOIT *Professeur des Universités-Praticien Hospitalier, Université d'Angers*
Co-dir. de thèse : Émilie ROGER *Maitre de Conférences des Universités, HDR, Université d'Angers*

L'auteur du présent document vous autorise à le partager, reproduire, distribuer et communiquer selon les conditions suivantes :



- Vous devez le citer en l'attribuant de la manière indiquée par l'auteur (mais pas d'une manière qui suggérerait qu'il approuve votre utilisation de l'œuvre).
- Vous n'avez pas le droit d'utiliser ce document à des fins commerciales.
- Vous n'avez pas le droit de le modifier, de le transformer ou de l'adapter.

Ces conditions d'utilisation (attribution, pas d'utilisation commerciale, pas de modification) sont symbolisées par les icônes positionnées en pied de page.



Je tiens à remercier chaleureusement :

Monsieur **Jean-Pierre BENOIT**, pour avoir accepté la direction cette thèse, pour votre soutien, vos encouragements, nos discussions, sources de réflexions, de questionnements et de remises en question, enrichissant perpétuellement le projet pour le faire progresser, et qui ont toujours permis d'ouvrir de nouvelles perspectives à explorer, pour m'avoir fait évoluer et permis de gagner en autonomie et en confiance.

Madame **Émilie ROGER**, pour avoir accepté le co-encadrement de cette thèse, pour ton engagement et ta disponibilité tout au long de ce projet, pour m'avoir permis de développer mes capacités tout en m'accordant ta confiance et me soutenant dans mes choix. Pour nos nombreux échanges mais aussi pour m'avoir permis une ouverture d'esprit enrichissante et bénéfique par la découverte de projets de Recherche différents. Enfin, pour ton aide et tes nombreux conseils à la rédaction de ce manuscrit de thèse.

Monsieur **Lazhar BENYAHIA** pour votre aide précieuse et pour m'avoir permis de bénéficier de votre expertise physico-chimique, pour votre accueil et votre bienveillance. Enfin, pour le temps que vous avez consacré à ce projet de Recherche et pour avoir accepté de participer à ce jury.

Mesdames **Anne AUBERT-POUËSSEL** et **Stéphanie BRIANÇON**, pour avoir accepté de participer à ce jury, pour l'intérêt que vous avez porté à ce projet de Recherche, et pour le temps que vous consacrez à l'évaluation de ce travail.

Tous les membres du **laboratoire MINT**, pour leur accueil chaleureux, permettant de travailler avec plaisir dans un environnement agréable et convivial. A toutes les belles rencontres qui ont fait de cette expérience une formidable aventure humaine.

Je remercie également ceux en particulier qui m'ont apportée leur aide de près ou de loin dans ce projet :

Johanna, Alexandra, Océane & Camille, qui par leurs stages, ont participé à ce projet de Recherche avec motivation et enthousiasme, et qui m'ont également permis de développer des compétences en pédagogie.

Madame **Nolwenn LAUTRAM**, pour ton énergie et ta bonne humeur, pour l'aide apportée aux analyses chromatographiques.

REMERCIEMENTS

La plateforme d'analyse SCIAM et en particulier Monsieur **Rodolphe PERROT**, pour ta patience et pour l'aide apportée aux analyses de microscopie confocale.

Monsieur **Patrick SAULNIER**, pour l'enthousiasme que vous avez montré à l'égard de ce projet et pour votre expertise physico-chimique.

Madame **Élise LEPELTIER**, pour ta disponibilité et ton expertise en chimie.

Monsieur **Jean-Christophe GIMEL**, pour ton expertise physico-chimique et l'aide apportée à la formation du Nanosight.

Monsieur **Franck LETOURNEL**, pour l'aide apportée à l'utilisation des microscopes.

Monsieur **Olivier THOMAS**, pour ta gaieté et ta gentillesse, et pour l'aide mutuelle apportée dans notre découverte commune des fonctionnalités du Turbiscan.

Madame **Édith GRELEAU**, pour ta disponibilité et ton efficacité dans l'ensemble de la gestion administrative.

Monsieur **Frédéric LAGARCE**, pour votre soutien et votre accompagnement dans l'initiation de ce projet.

Merci à tous ceux qui, au fil du temps sont devenus bien plus que des collègues, aux amitiés qui en sont nées :

En particulier, **Ting** et **Thomas**, pour votre bienveillance et votre bonne humeur, pour tous les bons moments que nous avons partagés ensemble, pour tous les beaux souvenirs qui resteront, pour tous nos fous-rires, et surtout pour votre aide et votre soutien encore aujourd'hui. A notre prochain voyage au Laos !...

Aux membres des bureaux que j'ai partagés (autant que ceux d'à côté ...) depuis ces quelques années maintenant ; merci pour ces pauses détentes et pour tous ces agréables moments de convivialité.

*Enfin, je remercie mes proches, **Nicolas, Adèle, mes parents** et **Maxime** pour votre soutien tout au long de ce parcours universitaire, m'assurant un plein épanouissement professionnel.*

Sommaire

INTRODUCTION GENERALE	1
Administration de molécules thérapeutiques par voie orale	2
Les ATPS : des émulsions particulières	15
Description du projet de Recherche	20
Références	29
ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE	
DES EMULSIONS AUX MICRO & NANOMEDECINES	41
« <i>From emulsions to micro & nanomedicines</i> »	
Introduction	42
Emulsions	49
Emulsion-based micro and nanomedicines	55
Conclusion	68
References	69
PARTIE I	
SYSTEMES DIPHASIQUES AQUEUX : PROCEDE DE FORMULATION SIMPLE EN UNE SEULE ETAPE ET CARACTERISATION PAR DIAGRAMME DE PHASE	84
« <i>Aqueous Two-Phase Systems: simple one-step process formulation and phase diagram for characterization</i> »	
Introduction	87
Material & Methods	91
Results & Discussion	94
Conclusion	101
Supporting Information	103
References	108
PARTIE II	
DES SYSTEMES DIPHASIQUES AQUEUX AUX MICROPARTICULES	112
« <i>From Aqueous Two-Phase System to microparticles</i> »	
Introduction	115
Material & Methods	117
Results & Discussion	121
Conclusion	131
Supporting Information	132
References	134

PARTIE III	
ENCAPSULATION DE L'INSULINE DANS LES MICROPARTICULES & DEVELOPPEMENT D'UNE METHODE DE DOSAGE PAR UHPLC	139
Introduction	141
Développement d'une méthode de dosage de l'insuline par UHPLC	146
Matériel & Méthodes	147
Résultats & Discussion	150
Conclusion	162
Encapsulation de l'insuline	163
Matériel & Méthodes	164
Résultats & Discussion	167
Conclusion	176
Références	177
DISCUSSION GENERALE	182
Formulation et caractérisation des ATPS	184
Formulation des microparticules	189
Encapsulation de l'insuline dans les microparticules	193
Évaluation de la stabilité des microparticules	200
Évaluation de l'efficacité des microparticules d'insuline	204
Bilan	204
Références	207
CONCLUSION	211

Abréviations

ACN	Acétonitrile
ATC	Classification Anatomique Thérapeutique et Chimique
ATPS	Aqueous Two-Phase System / système diphasique aqueux
BCS	Biopharmaceutics Classification System / classification biopharmaceutique
BDDCS	Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System / classification biopharmaceutique élimination du médicament
CS	Chitosane
CPP	Cell Penetrating Peptide / peptide pénétrant
DiD	1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'- Tetramethylindodicarbocyanine Perchlorate
DSC	Differential Scanning Calorimetry / calorimétrie différentielle à balayage
EMA	European Medicines Agency / agence européenne des médicaments
EP	European Pharmacopoeia / Pharmacopée Européenne
EPPH	Effet de Premier Passage Hépatique
FDA	Food and Drug Administration
FITC	Fluorescéine isothiocyanate
GRAS	Generally Recognized As Safe / Généralement considéré comme non toxique
HCl	Acide chlorhydrique
HPLC	Chromatographie Liquide Haute Performance
ICH	International Conference on Harmonization
INPI	Institut National de la Propriété Industrielle
IV	Voie Intraveineuse
LC-MS/MS	Chromatographie Liquide couplée à la Spectrométrie de Masse en tandem

LD	Limite de Détection
LNC	Lipid Nanocapsules / nanocapsules lipidiques
LQ	Limite de Quantification
MECC	Chromatographie Électrocinétique Micellaire
MM	Masse molaire
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PLA	Poly(acide lactique)
PLGA	Poly (acide lactique co-acide glycolique)
QbD	Quality by Design
S/B	Rapport signal sur bruit
TFA	Acide Trifluoroacétique
TRITC	Tétraméthylrhodamine isothiocyanate
TSI	Indice de Stabilité du Turbiscan
UFC	Unité Formant Colonie
UHPLC	Chromatographie Liquide Ultra Haute Performance
USP	Pharmacopée Américaine
UV	Ultraviolet
USP	United State Pharmacopoeia / Pharmacopée Américaine

ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT

Je, soussignée Florence DUMAS
déclare être pleinement conscient(e) que le plagiat de documents ou d'une
partie d'un document publiée sur toutes formes de support, y compris l'internet,
constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée.
En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées
pour écrire ce rapport ou mémoire.

signé par l'étudiante le **10/10/2020**



**Cet engagement de non plagiat doit être signé et joint
à tous les rapports, dossiers, mémoires.**

Présidence de l'université
40 rue de rennes - BP 73532
49035 Angers cedex

Tél. 02 41 96 23 23 | Fax 02 41 96 23 00



INTRODUCTION

I Introduction

Administration de molécules thérapeutiques par voie orale

Intérêts et limites de la voie orale

Parmi les voies d'administration des médicaments, les voies dites « entérales » désignent les voies digestives, elles peuvent être rectale ou orale.¹ En 2014, l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé a publié un rapport d'analyse des ventes de médicaments en France. La consommation de médicaments pour la voie orale (formes sèches et liquides) représentait 78,6% du marché officinal (en pourcentage du nombre de conditionnements vendus).² L'utilisation de formes pharmaceutiques pour la voie orale est donc largement prépondérante en France (hors systèmes hospitaliers pour lesquels les formes injectables sont les plus consommées).² La voie orale est en effet très attractive de par ses nombreux avantages : facilité d'utilisation, confort pour le patient, possibilité d'administration de fortes doses en prise unique.³ La voie orale est également intéressante financièrement car elle permet une administration en ambulatoire et ne nécessite pas d'intervention de personnels de soins qualifiés. Ses utilisations sont multiples, dans l'objectif d'une efficacité thérapeutique systémique (après absorption gastrique ou intestinale des principes actifs) ou locale (au niveau du tube digestif)¹.

Cependant, la biodisponibilité orale parfois très limitée de nombreuses molécules limite leurs développements pharmaceutiques pour cette voie d'administration. Le paramètre pharmacocinétique qui caractérise cette absorption

dans l'organisme s'appelle la **biodisponibilité**.¹ La biodisponibilité d'un principe actif correspond à la fraction de la dose administrée qui atteint, sous forme inchangée, la circulation générale, et la vitesse à laquelle elle l'atteint. La biodisponibilité dite « absolue » d'un médicament est calculée en comparaison à la voie intraveineuse (IV), pour laquelle la biodisponibilité est maximale (100%). La biodisponibilité d'un médicament administré par voie orale est limitée du fait des barrières physiologiques du tractus gastro-intestinal. En effet, après son administration orale, le médicament est premièrement soumis à un pH gastrique acide (compris entre 1,5 à jeun et 5 en postprandial)⁴ à l'origine d'une dégradation potentielle du principe actif. Passée cette première barrière chimique, l'absorption des médicaments a lieu principalement au niveau de l'intestin grêle³ ; or de par sa structure complexe, le franchissement de la barrière intestinale peut se révéler extrêmement limité voire impossible pour certaines molécules. La **Figure 1** présente les différentes barrières à contourner afin d'améliorer la biodisponibilité par voie orale.

Afin de mieux comprendre les obstacles que le médicament devra surmonter pour franchir la barrière intestinale, il est important d'en connaître sa structure, son rôle et son fonctionnement.

La fonction principale de la barrière intestinale est de permettre l'absorption de nutriments du bol alimentaire vers la circulation sanguine, tout en assurant un rôle protecteur contre les agents pathogènes, la nourriture non assimilable ou l'environnement biologique hostile.⁵ Elle est composée d'un épithélium intestinal recouvert d'une couche de mucus.

Plusieurs des caractéristiques inhérentes à une molécule influent sur sa capacité à franchir la barrière intestinale (poids moléculaire, lipophilie, degré d'ionisation).⁶

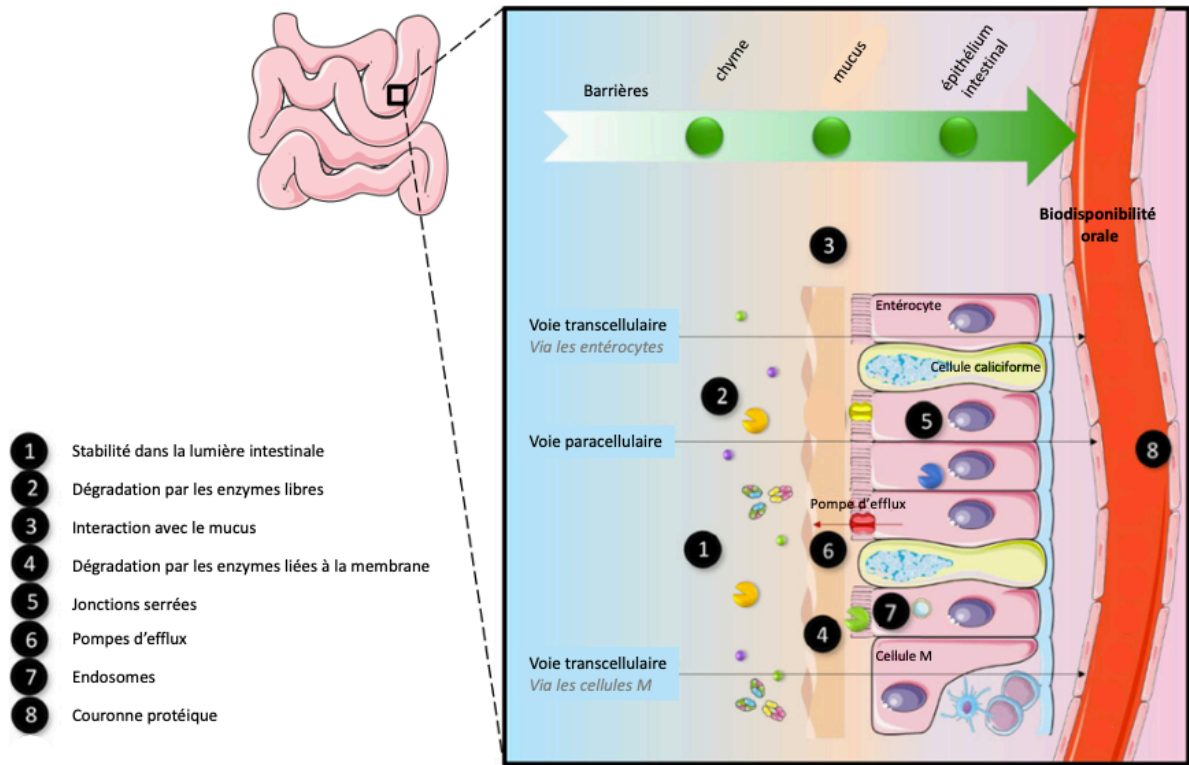


Figure 1. Différentes barrières à l'absorption orale d'une molécule. Figure adaptée de Malhaire, et al.⁵

Une fois arrivée dans la lumière intestinale, une molécule doit d'abord traverser le mucus tout en conservant ses propriétés (Figure 1.1 et 1.3). La molécule doit ensuite franchir l'épithélium intestinal, composé de cellules épithéliales (dont les entérocytes, les cellules caliciformes et les cellules M) scellées entre elles par des jonctions serrées (Figure 1.5). Deux mécanismes physiologiques permettent de transporter les nutriments jusqu'à la circulation sanguine, il s'agit de transports passifs ou actifs. Les molécules thérapeutiques peuvent traverser l'épithélium intestinal via l'un ou l'autre de ces mécanismes.⁷ Les transports **passifs** correspondent au passage de molécules entre les cellules épithéliales (voie paracellulaire) ou à travers les entérocytes ou les cellules M⁴ (voie transcellulaire) par diffusion, sans nécessiter d'énergie. Les transports **actifs** permettent le passage de molécules à travers l'épithélium intestinal via des transporteurs spécifiques nécessitant de l'énergie. L'absorption des molécules est

donc impactée par la qualité de l'épithélium (surface, perméabilité, vascularisation) et par le temps de contact avec la surface d'échange.⁶ La molécule à administrer doit également échapper aux mécanismes de dégradation tels que le métabolisme par les enzymes entérocytaires, par exemple les peptidases⁸ libres dans la lumière intestinale, liées à la membrane de la bordure en brosse ou encore cytolytiques des entérocytes⁵ (**Figure 1.2** et **1.4**). Des mécanismes de rejet notamment par les pompes d'efflux comme les P-glycoprotéines (**Figure 1.6**) constituent également une limite à la biodisponibilité. Enfin, même après son passage dans la circulation sanguine, une molécule thérapeutique doit encore faire face à de nombreux obstacles tels que l'adsorption par les protéines plasmatiques (**Figure 1.8**) ou encore l'effet de premier passage hépatique (EPPH) à l'origine d'une biotransformation de la molécule par les hépatocytes et d'une excrétion biliaire^{3,6}. Ainsi, de nombreuses molécules ne peuvent être administrées par voie orale en raison d'une faible absorption, limitant ou supprimant leur activité thérapeutique.

Différents systèmes de classification ont été établis en fonction des indications thérapeutiques des molécules ou encore selon leurs voies d'administration, dans l'objectif de prédire leur comportement à partir de propriétés telles que la solubilité, la perméabilité ou le métabolisme.

Classifications des molécules thérapeutiques

Classification Anatomique, Thérapeutique et Chimique (ATC)

La classification usuelle des molécules thérapeutiques est définie par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) via le système de classification ATC.⁹ Elle est hiérarchisée sur cinq niveaux, basés selon des critères anatomiques, pharmacologiques, thérapeutiques ou chimiques. L'insuline étant la molécule modèle

utilisée dans ce travail, le **Tableau 1** présente l'exemple de la classification ATC pour l'insuline humaine.

Tableau 1. Classification de l'insuline humaine recombinante en solution selon la classification ATC¹⁰

Niveau	Code	Groupe
Niveau 1	A	Voies digestives et métabolisme
Niveau 2	A10	Médicaments du diabète
Niveau 3	A10A	Insulines et analogues
Niveau 4	A10AB	Insulines et analogues pour injection d'action rapide
Niveau 5	A10AB01	Insuline humaine

Outre cette classification générale, d'autres classifications ont été créées spécifiquement pour la voie orale. C'est le cas des classifications BCS et BDDCS.

Classification Biopharmaceutique (BCS)

Instaurée en 1995, la classification **BCS** (Biopharmaceutics Classification System) permet de classer les nouvelles entités pharmaceutiques¹¹ et de prédire leur biodisponibilité¹² pour une administration par voie orale. Les molécules thérapeutiques sont ainsi classées en quatre groupes en fonction de leur perméabilité à travers la membrane intestinale et de leur solubilité dans le milieu gastro-intestinal. Ces différentes catégories sont présentées dans le **Tableau 2**.

Cette classification est reconnue par les organisations internationales telles que la FDA (Food and Drug Administration), l'EMA (European Medicines Agency) ou l'OMS.¹³ Les molécules les plus facilement administrables par voie orale sont les molécules appartenant à la classe I car elles sont hautement solubles et hautement perméables. Pour les trois autres classes de molécules, il faudra développer des stratégies afin d'améliorer leur solubilité et/ou leur perméabilité en vue de leur administration par voie orale.

Tableau 2. Classification BCS ¹⁴

	Haute solubilité*	Basse solubilité
Haute perméabilité**	Classe BCS I	Classe BCS II
Basse perméabilité	Classe BCS III	Classe BCS IV

*molécule soluble dans un volume ≤ 250 mL de solution aqueuse dont le pH est compris entre 1 et 7

**molécule dont l'absorption à travers la membrane intestinale $\geq 90\%$

Dans ce travail de thèse, nous nous intéresserons plus particulièrement à la classe BCS III. Les indications de ces molécules sont variées comme le présente le **Tableau 4**. Parmi celles-ci, certaines molécules antidiabétiques appartiennent à la classe BCS III, et notamment l'insuline¹⁵ dont l'administration par voie orale constituerait une avancée majeure dans la prise en charge du diabète.

Quelques-unes des molécules BCS III, considérées comme essentielles par l'OMS sont toutefois administrées par voie orale. En effet, certaines de ces molécules présentent une perméabilité intestinale limitée ($<90\%$ - classe BCS III) mais néanmoins supérieure à 80% .¹¹ C'est par exemple le cas de molécules couramment administrées par voie orale telles que l'acide acétylsalicylique, l'acide ascorbique (vitamine C) ou encore le paracétamol.¹¹ D'autres molécules de la classe BCS III, sont également administrées mais à fortes doses¹⁶ pouvant induire une toxicité ou des effets indésirables importants. Par exemple la metformine, utilisée comme antidiabétique oral dans la prise en charge du diabète de type 2, appartient à la classe BCS III du fait de son importante solubilité dans l'eau et de sa biodisponibilité orale limitée (50% à 60%).¹⁷ La dose généralement administrée par voie orale est de 250 à 500 mg trois fois par jour jusqu'à une dose maximale de 3 g par jour.¹⁸ L'administration de ces

DUMAS Florence | Conception de nouvelles formulations pour l'encapsulation des molécules BCS III

doses est responsable d'effets indésirables associés tels que des troubles gastro-intestinaux, mais également des acidoses lactiques sévères.^{18,19} Ainsi, de nouvelles stratégies de formulations basées sur des systèmes de rétention gastrique sont développées et permettent d'améliorer la biodisponibilité de la metformine.^{17,20} De nombreuses molécules BCS III doivent ainsi encore bénéficier d'un développement spécifique pour permettre leur administration par voie orale.²¹ Le développement de nouvelles stratégies constitue donc un enjeu majeur pour l'administration par voie orale de ces molécules.

Classification Biopharmaceutique Élimination du Médicament (BDDCS)

Enfin, depuis 2004, la classification BDDCS (Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System) permet de spécifier davantage la classification des molécules pour une administration par voie orale en fonction de leur solubilité et de leur métabolisme.¹⁴ Ainsi, cette classification a pour objectif de prédire l'élimination d'une molécule et ses interactions médicamenteuses dans l'intestin et le foie.²² Elle comporte quatre classes principales, présentées dans le **Tableau 3**.

Tableau 3. Classification BDDCS¹⁴

	Haute solubilité	Basse solubilité
Fort métabolisme	Classe BDDCS 1	Classe BDDCS 2
Faible métabolisme	Classe BDDCS 3	Classe BDDCS 4

Cette nouvelle classification reprend les critères de solubilité définis dans la classification BCS.²² Le métabolisme, quant à lui, est défini comme important si plus de 70% de la dose est métabolisée ; il est considéré comme faible si moins de 30%

de la dose est métabolisée.²² Peu de molécules ont un métabolisme compris entre 30% et 70%.²¹ Une classe 0 a également été définie pour les molécules ne pouvant pas être affectées à l'une des quatre classes de BDDCS précédentes.²¹

Le **Tableau 4** présente des exemples de molécules BCS III utilisées pour de multiples indications thérapeutiques (selon la classification ATC) appartenant aux différentes classes BDDCS.

Tableau 4. Exemples de molécules BCS III dans les classifications ATC²³ et BDDCS²¹

	Classes ATC	Molécules	Classes BDDCS
Voies digestives et métabolisme (A)	Antiacides (A02)	Cimétidine (A02BA01)	3
	Antidiabétiques (A10)	Metformine (A10BA02)	3
	Vitamines (A11)	Acide ascorbique (A11GA01)	0
Thiamine (A11DA01)		3	
Système cardio-vasculaire (C)	Antihypertenseurs (C02)	Hydralazine (C02DB02)	1
		Méthylidopa (C02AB)	3
	Diurétiques (C03)	Hydrochlorothiazide (C03AA03)	3
	Bêtabloquants (C07)	Aténolol (C07AB03)	3
	Acteurs du régime rénine-angiotensine (C09)	Captopril (C09AA01)	3
Hormones (H)	Traitements de la thyroïde (H03)	Lévothyroxine (H03AA01)	2
		Propylthiouracil (H03BA02)	1

Anti-infectieux (J)	Antibactériens (J01)	Chloramphénicol (J01BA01)	1
		Cloxacilline (J01CF02)	4
	Antiviraux (J05)	Abacavir (J05AF06)	1
		Aciclovir (J05AB01)	4
Système musculo- squelettique (M)	Anti-inflammatoires et antirhumatismaux (M01)	Pénicillamine (M01CC01)	3
	Anti-gouttes (M04)	Allopurinol (M04AA01)	2
		Colchicine (M04AC01)	1
Système nerveux (N)	Antalgiques (N02)	Acide acétylsalicylique (N02BA01)	1
		Ergotamine (N02CA02)	1
		Paracétamol (N02BE01)	1
	Autres (N07)	Pyridostigmine (N07AA02)	3
Système respiratoire (R)	Antitussifs (R05)	Codéine (R05DA04)	1
	Antihistaminiques (R06)	Prométhazine (R06AD02)	1

On peut alors remarquer que les classifications BCS et BDDCS ne sont pas transposables puisque les molécules BCS III peuvent être affectées à toutes les classes BDDCS. En effet, la corrélation entre le métabolisme (BDDCS) et la perméabilité (BCS) serait meilleure pour les molécules lipophiles²⁴, ce qui n'est pas le cas des molécules BCS III caractérisées par leur hydrosolubilité. La majorité des molécules BCS III sont éliminées dans les urines et/ou la bile sous forme inchangée.²⁴

L'insuline n'est pas répertoriée dans la classification BDDCS, mais elle est sujette au métabolisme par dégradations enzymatiques gastro-intestinales et dans la circulation sanguine. De plus, elle est également métabolisée par le foie à l'origine d'une diminution de sa biodisponibilité orale.²⁵

Stratégies développées pour l'administration des molécules BCS III par voie orale

La voie d'administration et la forme pharmaceutique d'un médicament (incluant sa composition (excipients) et son procédé de fabrication) sont déterminées au cours du développement pharmaceutique.²⁶ Afin d'améliorer la biodisponibilité orale des molécules, des stratégies de formulation doivent être développées.

Stratégies conventionnelles

Ces stratégies peuvent être de différentes natures en fonction des barrières physiologiques qui impactent les molécules.

Protection contre les dégradations enzymatiques

Les molécules administrées par voie orale sont susceptibles de subir des dégradations par les enzymes présentes dans le tractus gastro-intestinal, à l'origine d'une potentielle inactivation. Les protéines sont particulièrement sensibles à ces enzymes. Il est possible d'utiliser des **inhibiteurs enzymatiques**, et notamment des inhibiteurs de protéases tels que l'aprotinine (inhibiteur de trypsine et chymotrypsine), ou la puromycine (inhibiteur d'aminopeptidase).⁷ La co-administration de diisopropylfluorophosphate (inhibiteur de protéase) a, par exemple, permis d'améliorer la biodisponibilité orale de l'insuline.²⁷ Cependant leur utilisation est limitée du fait de leur toxicité chronique et de leur activité non spécifique à l'origine de l'absorption inattendue d'autres protéines.⁷

La formulation de **systèmes muco-adhésifs**, formés de polymères adhérant à la couche de mucus gastro-intestinal, offre également une protection contre les dégradations enzymatiques.⁷ L'utilisation de Carbopol® a ainsi permis de limiter la dégradation de l'insuline par la trypsine ou la chymotrypsine du fait de la libération de protons par le polymère, à l'origine d'une diminution du pH auquel les enzymes ne sont plus actives.²⁸

Amélioration de la perméabilité intestinale

La structure de l'épithélium intestinal ainsi que la présence de protéines d'efflux sont autant d'obstacles à franchir pour qu'une molécule active administrée par voie orale puisse atteindre la circulation sanguine.

Il est alors possible d'utiliser des **promoteurs d'absorption** qui augmentent temporairement la perméabilité de l'épithélium intestinal.²⁹ Il peut s'agir de **promoteurs de pénétration** tels que des tensioactifs, des agents de chélation, des sels biliaires, des acides gras³⁰ ou encore des polymères anioniques et cationiques⁷. Ces molécules induisent des modifications de la viscosité du mucus, de la fluidité de la membrane intestinale ou l'ouverture des jonctions serrées.³⁰ L'utilisation de polymères thiolés avec du glutathion réduit a, par exemple, permis d'améliorer le transport paracellulaire de l'insuline à travers l'épithélium intestinal du rat.³¹ Cependant, l'altération de la barrière intestinale (bien que souvent réversible) par ces promoteurs peut faciliter le passage de molécules toxiques, d'agents pathogènes ou encore de virus.

L'utilisation de **peptides pénétrants** ou CPP (*cell penetrating peptides*) a également permis d'améliorer la biodisponibilité orale de certaines molécules notamment issues des biotechnologies. Par exemple, l'absorption intestinale de l'insuline a été améliorée *in vitro* après greffage de CPP à l'insuline.³² Les CPP tels que

le peptide TAT (issu du VIH), l'oligoarginine ou la pénétratine facilitent la pénétration de la molécule dans le cytoplasme cellulaire par endocytose ou par modification de la bicouche lipidique de la membrane cellulaire.⁷

Les **hydrogels**, constitués d'un réseau de polymères hydrophiles⁷ peuvent également être utilisés. Il a, par exemple, été démontré que l'utilisation de microparticules à base d'hydrogel de poly (acide méthacrylique-polyéthylène-glycol) a permis d'améliorer *in vitro* le transport de l'insuline dans les cellules épithéliales intestinales.³³

Il est enfin possible d'inhiber les protéines d'efflux par l'utilisation **d'inhibiteurs de la glycoprotéine-P**.³⁴ Par exemple, le vérapamil et ses analogues ont été largement étudiés pour l'amélioration de la biodisponibilité orale du paclitaxel. Certains tensioactifs comme le Solutol[®]HS 15 (ou Kolliphor[®]HS 15, mélange de polyéthylène glycol (PEG) 660 et hydroxystéarate de PEG 660) inhibent également la glycoprotéine-P.³⁴ Cette propriété du Solutol[®]HS 15 améliorerait la biodisponibilité orale du paclitaxel encapsulé dans des nanocapsules lipidiques.³⁵

Protection contre l'Effet de Premier Passage Hépatique (EPPH)

Après son passage à travers la barrière intestinale, une molécule est dirigée vers le foie via la veine porte avant d'atteindre la circulation sanguine générale.⁶ L'EPPH correspond au métabolisme qu'une molécule subit dans le foie, et peut donc être responsable d'une faible biodisponibilité orale.³⁴ Une stratégie envisagée consiste à formuler des **prodrogues**, hydrolysées en molécules actives après leur passage par les sites de métabolisation.³⁴ Par exemple, le meptazinol, analgésique opioïde présente une faible biodisponibilité orale (8,69%) en raison d'un important EPPH.³⁶ Lu, *et al*, ont synthétisé un dérivé de cette molécule (ester de l'acide benzoïque), dont

l'utilisation en tant que prodrogue permet d'améliorer la biodisponibilité relative du meptazinol de 146,22% (\pm 21,56%).³⁶

Stratégies innovantes : les systèmes nano et microparticulaires

D'autres stratégies sont basées sur l'utilisation de systèmes de délivrance **micro et nanoparticulaires**.³⁷ En effet, ces systèmes permettent de protéger le principe actif vis-à-vis des éventuelles dégradations gastro-intestinales, d'améliorer leur perméabilité et ainsi leur biodisponibilité.^{4,38-40} Le **Tableau 5** résume les différents systèmes nanoparticulaires et microparticulaires développés ainsi que les avantages majeurs de ces formulations.

Tableau 5. Stratégies de formulations nano et microparticulaires

Formulations	Systèmes concernés
Nanosuspensions	Dispensions de particules de principe actif de taille nanométrique stabilisées par des tensioactifs ^{34,41}
Systèmes d'émulsions	Micro-émulsions, nano-émulsions et systèmes auto-émulsionnables ^{34,42}
Vecteurs particuliers lipidiques	Microsphères, microcapsules, liposomes, nanosphères ou nanocapsules ²⁹
Vecteurs particuliers polymériques	Microsphères, microcapsules, nanosphères ou nanocapsules de polymères ²⁹
Exemples d'intérêts des systèmes particuliers pour la voie orale	
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Administration de molécules hydrophiles et/ou lipophiles ▪ Amélioration de l'absorption²⁹ ▪ Protection (dégradations chimiques et enzymatiques)⁵ ▪ Libération contrôlée³⁶ ▪ Ciblage thérapeutique (fonctionnalisation)⁴³ 	

Plusieurs de ces systèmes ont, par exemple, été développés pour encapsuler l'insuline en vue d'une administration orale. Des vecteurs **lipidiques** ont notamment été formulés tels que des liposomes, des niosomes, des micelles ou encore des

particules lipidiques.^{44,45} Des nanoparticules **inorganiques** de carbone ont aussi été développées.^{44,45} L'insuline a également été encapsulée dans des nanoparticules formulées à partir de différents **polymères** tels que le poly(acide lactique) (PLA), le poly(acide lactique co- acide glycolique), le poly(ϵ -caprolactone), le poly(acide γ - glutamique), le polyallylamine (PAA), ou encore à partir de dextrane, de chitosane ou d'alginate.^{44,46} Plusieurs études ont également porté sur l'encapsulation de l'insuline dans des **microgels** (hydrogels de taille micrométrique) à base d'alginate/chitosane, d'alginate/dextrane, d'alginate/calcium, de tripolyphosphate/chitosane ou encore d'hydroxypropyl cellulose -co- poly(acide glutamique).^{45,47} Enfin, des recherches ont porté sur l'encapsulation de l'insuline dans des systèmes **auto-émulsionnables**.⁴⁵ Ces systèmes, composés de mélanges d'huile et de tensioactifs, forment spontanément des émulsions de type « huile dans eau » lorsqu'ils sont administrés par voie orale dans les fluides gastro-intestinaux (phases aqueuses).⁴²

Les ATPS : des émulsions particulières

Définition

Les systèmes aqueux diphasiques ou **ATPS** (Aqueous Two-Phase System) sont également appelés émulsions dites « eau dans eau ». Comme leur nom l'indique, ces systèmes résultent d'un mélange de deux phases aqueuses non miscibles entre elles, dont les gouttelettes d'une des phases sont dispersées dans l'autre phase qui, elle, est continue.⁴⁸

La formation de phases aqueuses co-existantes dans un même système nécessite des interactions moléculaires⁴⁹ soit entre deux polymères hydrosolubles et thermodynamiquement incompatibles en solution aqueuse, soit entre un polymère et

un autre composant.^{50,51} Le **Tableau 6** présente quelques exemples de composants utilisés dans différentes associations pour la formation d'ATPS.

Tableau 6. Exemples de composants utilisés dans la formation d'ATPS⁵¹

Système	Exemple de composants associés	
Polymère-polymère	Dextrane (40, T40, T500, 2000, 500000)	PEG (600, 1450, 3350, 6000, 8000, 10000)
		Valéryle dextrane (T500)
Sel-polymère	Phosphate de potassium	PEG (300, 1500, 4000, 6000, 8000)
Autres	Gomme guar	PES (hydroxypropyl amidon) (200)
	Tween® (polysorbate) (20)	Dextrane (500)

Intérêt des ATPS

Des applications très diverses sont décrites pour l'utilisation des ATPS. Ces systèmes sont utilisés pour la séparation de métaux, d'ions métalliques ou de colorants textiles dans les eaux de lavage mais aussi pour l'extraction de produits issus de la fermentation de micro-organismes.⁵² Ils sont également utilisés pour de nombreuses applications biomédicales (**Tableau 7**). Du fait de leur capacité à compartimenter les molécules dans des conditions douces avec des procédés rapides et industrialisables, les ATPS présentent de nombreux intérêts dans le domaine de la biologie, notamment pour la purification des matériaux biologiques.^{53,54} De fait, les ATPS sont utilisés pour la séparation et la purification des biomolécules^{55,56} et notamment des protéines^{52,57}. Ainsi, les ATPS permettent d'étudier la répartition des protéines dans ces systèmes⁵³, leurs coefficients de partage⁵⁸ et même la détermination de structures tridimensionnelles entre les protéines.⁵⁹ Quelques études se sont intéressées à la distribution de l'insuline dans les ATPS.^{60,61} Par exemple dans des systèmes composés de dextrane 500 et de PEG 6000, respectivement concentrés

à 12% et 6% (m/m), un coefficient de partage de 1,8 a été déterminé pour l'insuline avec une répartition préférentielle dans la phase de PEG.⁶⁰

Tableau 7. Applications des ATPS dans le domaine biomédical⁵²

Applications		Exemples
Thérapie conventionnelle	Enzymes	<i>Purification des laccases qui interviennent dans la production d'antibiotiques, d'anti-cancéreux ou d'anesthésiants</i>
	Cellules entières	<i>Purification de cellules sanguines (utilisation des facteurs de croissance des plaquettes)</i>
Vaccination	Virus	<i>Purification de rotavirus ou de parvovirus B19 humain</i>
Diagnostic	Organites	<i>Purification d'exosomes ou de microvésicules</i>
Thérapie ciblée	Anticorps monoclonaux	<i>Purification IgG, anti-CD34</i>
Thérapie génique	ADN et acides nucléiques	<i>Purification d'ADN plasmidique</i>
Sanitaire	Molécules de bas poids moléculaires	<i>Purification de molécules phytochimiques ou de métabolites secondaires</i>
	Résidus médicamenteux	<i>Purification de chloramphénicol ou de roxithromycine dans l'eau ou la nourriture d'origine animale (même à faibles concentrations)</i>

La formulation des ATPS permettant la formation de compartiments aqueux sans utilisation de solvant organique serait donc adaptée au **développement pharmaceutique** de systèmes de délivrance pour les molécules hydrophiles, tout en s'inscrivant dans une démarche actuelle plus respectueuse de **l'environnement**.^{62,63} Ces systèmes sont d'autant plus attrayants qu'ils sont adaptés aux échelles de production industrielles à faible coût.⁵¹

Limites des ATPS

Les ATPS sont des systèmes dynamiques⁵⁰. Leurs structures dépendent de multiples facteurs tels que la viscosité, la tension ainsi que la perméabilité interfaciales.⁶⁴ Ces caractéristiques propres à chaque ATPS influent sur la déformation des gouttelettes de phase dispersée⁵⁰ et sont à l'origine des phénomènes de séparation de phase⁶⁴. L'étude et la compréhension de ces facteurs sont donc essentielles pour le développement des ATPS. Par ailleurs, il est intéressant de rechercher des méthodes de stabilisation qui limiteront les phénomènes de séparation de phases.

Stabilisation des ATPS

Différentes méthodes peuvent être utilisées pour la stabilisation des ATPS telles que l'utilisation de blocs de copolymères, la complexation interfaciale ou encore la méthode Pickering (Figure 2).⁶⁵

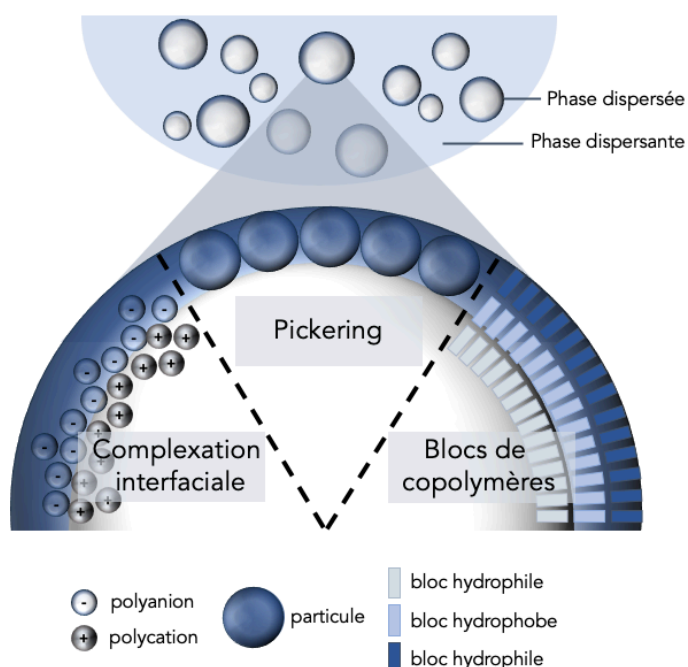


Figure 2. Schématisation des méthodes de stabilisation des ATPS, focus sur une gouttelette stabilisée.

DUMAS Florence | Conception de nouvelles formulations pour l'encapsulation des molécules BCS III

A l'interface entre la phase dispersée et la phase dispersante, la complexation interfaciale repose sur l'interaction électrostatique de polyélectrolytes de charges opposées tandis que les blocs de copolymères, de par leur longueur et leur nature amphiphile se localisent sur toute l'épaisseur de l'interface.⁶⁵ Dans ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés à la méthode Pickering. Au début du 20^e siècle, Ramsden et Pickering ont découvert cette méthode de stabilisation des émulsions par les particules solides.^{66,67} Ces particules se localisent aux interfaces entre les gouttelettes de phase dispersée et la phase dispersante, à l'origine de la formation d'une coque rigide.⁶⁸ Cette méthode a ensuite été longtemps oubliée jusqu'à récemment, où il a été démontré sa grande résistance à la coalescence en comparaison de l'utilisation de tensioactifs.⁶⁹ Plusieurs études se sont alors portées sur l'utilisation de la méthode Pickering pour la stabilisation des ATPS.⁷⁰⁻⁷²

Afin de caractériser ces émulsions de Pickering, différents paramètres sont couramment étudiés, et notamment les propriétés physico-chimiques des particules solides utilisées pour leur stabilisation. La nature des particules (silice, latex, magnétite)^{73,74} est étudiée, mais également leur taille car ce paramètre influence la taille des gouttelettes d'émulsion (du micromètre au millimètre)⁷⁵ ou encore leurs charges⁷⁶. Leurs formes (particules sphériques, ellipsoïdales, cubes, microbols, Janus, fibres, cacahuètes)⁷⁶ sont également étudiées, ainsi que leur mouillabilité qui peut être déterminée par la mesure de l'angle de contact (par technique de « gel trapping » par exemple)^{77,78}.

Description du projet de recherche

Contexte et problématique

Dans le contexte actuel, l'administration par voie orale de nombreux principes actifs reste encore un défi à relever. Cela est notamment le cas des molécules hydrosolubles mais faiblement perméables à la barrière intestinale, classées BCS III.

La problématique de ce projet de recherche est donc de développer un nouveau système de délivrance administré par voie orale pour les molécules BCS III.

Les paramètres clés de ce projet reposent donc sur la conception d'un système respectant les réglementations appliquées au domaine **pharmaceutique**, permettant l'administration de **molécules hydrosolubles** en tenant compte des contraintes liées à une administration par **voie orale**. Les composants utilisés devront avoir démontrés leur **biocompatibilité**. Enfin, un procédé de formulation « **vert** », c'est-à-dire sans utilisation de solvant organique, sera développé, permettant à la fois une **sécurité** pharmaceutique et s'inscrivant dans une démarche actuelle respectueuse de l'environnement.

Afin de répondre à ces objectifs, ce projet de recherche s'est orienté sur une formulation à partir des ATPS. Chao, *et al.* ont très récemment détaillé les nombreuses applications biomédicales des ATPS; or à l'heure actuelle aucun médicament n'a été développé à partir de ces systèmes⁶⁵ malgré leur fort potentiel pour l'encapsulation de molécules thérapeutiques. Le développement de tels systèmes de délivrance constitue une activité pionnière au sein de notre laboratoire.

DUMAS Florence | *Conception de nouvelles formulations pour l'encapsulation des molécules BCS III*

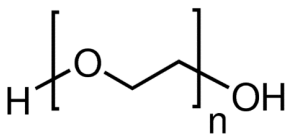
Formulation et caractérisation des ATPS dextrane/PEO

Dans la première partie de ce travail, une étude approfondie de la caractérisation des ATPS formulés a été menée. L'impact de paramètres tels que la pureté et l'état (solide ou liquide) des polymères sur ces systèmes a été évalué et discuté en s'appuyant sur la construction et l'interprétation de diagrammes de phases. En effet, les diagrammes de phases⁷⁹ permettent de caractériser les ATPS^{70,71} en déterminant les conditions de formation de ces systèmes. Il est donc important de connaître et de maîtriser l'ensemble des paramètres nécessaires au développement de ces systèmes.

Dans ce travail, l'ATPS est composé de dextrane et de PEG.⁸⁰ En effet, ces deux polymères hydrosolubles et biocompatibles présentent des propriétés intéressantes pour l'amélioration de la perméabilité intestinale.

Le **PEG** est un polyéther linéaire dont les variations de tailles de la chaîne de monomères d'éthylène glycol sont à l'origine d'une large gamme de poids moléculaires différents. Les PEG dont le poids moléculaire est supérieur à 20 000 g.mol⁻¹ sont appelés Poly Ethylene Oxide (ou PEO). Leurs caractéristiques physico-chimiques sont présentées dans le **Tableau 8**.

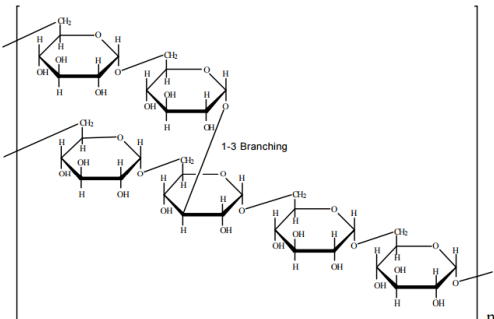
Tableau 8. Caractéristiques du PEG

Formule	Structure ⁸¹	Propriétés
$(-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-)_n$		<ul style="list-style-type: none">▪ Hydrosolubilité▪ Amélioration de l'absorption et de la biodisponibilité⁸²▪ Faible toxicité

Il s'agit d'un polymère approuvé par la FDA pour le développement pharmaceutique. En France, le PEG (3 000 à 4 000 g.mol⁻¹) est commercialisé comme médicament laxatif osmotique (MACROGOL®) par administration orale.⁸³

Le **dextrane** est un polymère polysaccharidique naturellement produit par des bactéries telles que les *Leuconostoc mesenteroides*. Ses caractéristiques physico-chimiques et thérapeutiques sont présentées dans le **Tableau 9**.

Tableau 9. Caractéristiques du dextrane

Formule	Structure ⁸⁴	Propriétés
$(-C_6H_{10}O_5-)_n$		<ul style="list-style-type: none">▪ Hydrosolubilité▪ Bioadhésion dans le tractus gastro-intestinal ^{85,86}▪ GRAS* classe 2⁸⁷

*La base de données GRAS (Generally Recognized As Safe) permet déterminer la dangerosité de substances telles que les excipients sur 5 niveaux. Le niveau 2 considère un excipient sans danger pour une consommation normale.

Formulation de microparticules à partir d'ATPS stabilisés par la méthode Pickering

La seconde partie de ce projet a consisté à stabiliser les ATPS formulés en se basant sur l'utilisation de la méthode Pickering. Cette technique a été expérimentée avec des particules non solides que sont les nanocapsules lipidiques (LNCs). Développées dans les années 2000 au laboratoire MINT, les LNCs possèdent un cœur huileux constitué de triglycérides et une couronne composée de deux molécules tensioactives : du Kolliphor® HS 15 (mélange de PEG 660 et hydroxystéarate de PEG 660) et du Lipoïd® (phosphatidylcholine et phosphatidyléthanolamine)(Figure 3).⁸⁸

DUMAS Florence | Conception de nouvelles formulations pour l'encapsulation des molécules BCS III

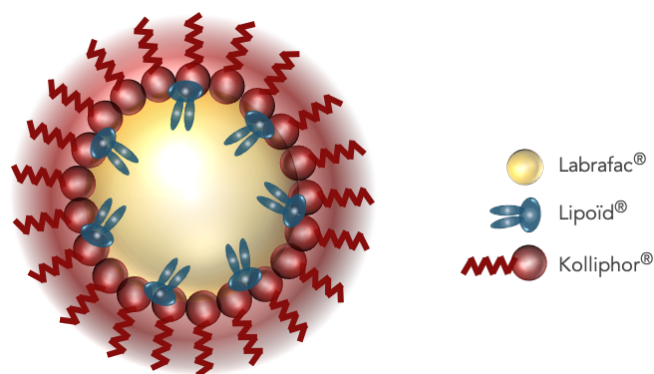


Figure 3. Représentation schématique des LNCs

Ces particules, en suspension dans l'eau, ont suscité un intérêt particulier pour ce projet car elles possèdent des propriétés filmogènes^{89,90} susceptibles d'optimiser la stabilisation obtenue par méthode Pickering. Ces particules, de par leur formulation, répondent également aux exigences de biocompatibilité et de procédé « vert ». La formulation des ATPS stabilisés par LNCs a ensuite été optimisée afin d'obtenir des microparticules via un processus de gélification.

Encapsulation de l'insuline dans les systèmes microparticulaires formulés

Enfin, l'ultime étape de ce projet a résidé en l'évaluation de la capacité des microparticules formulées à encapsuler des molécules de type BCS III. D'après les enjeux thérapeutiques actuels, le choix de cette étude s'est porté sur **l'insuline**.

En effet, d'après la classification ATC précédemment citée, l'insuline est utilisée pour le traitement de la prise en charge du diabète (en 2019, on estime à 463 millions le nombre de personnes (20-79 ans) dans le monde atteintes de diabète – types 1 & 2)⁹¹. En effet, l'insulinothérapie constitue le traitement de référence du diabète de type 1 dont sont atteints 10% des patients diabétiques⁹². De plus, l'insuline est également utilisée dans la prise en charge de certains diabètes de type 2.

DUMAS Florence | Conception de nouvelles formulations pour l'encapsulation des molécules BCS III

La biodisponibilité orale des protéines est généralement inférieure à 2%.⁹³ L'insuline est non seulement dégradée dans le tube digestif par des enzymes protéolytiques mais également faiblement perméable vis-à-vis de l'épithélium intestinal.^{6,94} De par son hydrosolubilité et sa faible biodisponibilité orale, l'insuline fait donc partie des molécules BCS III.

Du fait de sa faible biodisponibilité orale ($-0,3\% \pm 0,4\%$ pour une solution orale concentrée à 50 UI/kg)⁹⁵, l'insuline n'est aujourd'hui administrée que par voie **parentérale**. Actuellement, les médicaments à base d'insuline sont commercialisés en France sous les spécialités suivantes⁹⁶ :

- Insuline aspartate : FIASP[®], NOVOMIX[®], NOVORAPID[®]
- Insuline degludec : TRESIBA[®], XULTOPHY[®]
- Insuline detemir : LEVEMIR[®]
- Insuline glargine : ABASAGLAR[®], LANTUS[®], TOUJEO[®]
- Insuline glulisine : APIDRA[®]
- Insuline lispro : HUMALOG[®]
- Insuline humaine recombinante isophane : INSULATARD[®], MIXTARD[®], UMULINE[®]
- Insuline humaine recombinante solution : ACTRAPID[®], HUMULIN[®], INSUMAN[®], MIXTARD[®], UMULINE[®]

Depuis quelques années, l'administration par voie orale de traitements antidiabétiques pour la prise en charge du diabète suscite un grand intérêt en recherche pharmaceutique. D'après la base de données des essais cliniques européens, 582 essais cliniques ont été réalisés dans l'Union Européenne (dont 78 en France), d'après la recherche suivante : « insulin AND diabetes AND « oral use » » dont le statut est identifié comme « complété ».^{97,98} Actuellement, parmi les essais

cliniques en cours en Europe, 4 d'entre eux sont en phase I, 84 sont en phase II, 151 en phase III et 92 en phase IV.

Le **Tableau 10** présente les différentes molécules étudiées dans les essais complétés depuis le 1^{er} janvier 2015, ainsi que leur répartition dans les différentes phases. Les essais recensés par cette requête incluent les études effectuées sur des molécules pour la prise en charge du diabète *versus* insuline, ce qui explique pourquoi de nombreux essais ne portent pas directement sur l'insuline administrée par voie orale. La majorité des formulations utilisées dans ces essais sont des comprimés (enrobés ou non), mais des capsules ou encore des formes liquides sont également retrouvées.

Tableau 10. Axes de recherche développés en essais cliniques au cours des cinq dernières années dans la prise en charge du diabète par voie orale

Molécules	Phase I	Phase II	Phase III	Phase IV
Famille des glifozines	•	•	•	•
Metformine		•	•	•
Analogues de la GLP-1		•	•	•
Inhibiteurs de la DPP-4		•	•	•
Famille des sulfonylurés		•		
Insuline		•		
Autres catégories		•		
Nombre d'essais	2	38	41	15

GLP-1 : Glucagon-like peptide 1

DPP-4 : Dipeptidyl peptidase 4

D'après ces recherches, on peut s'apercevoir que la grande majorité des essais cliniques visent à développer des thérapeutiques orales dont les molécules peuvent être combinées entre elles et/ou associées à une insulinothérapie classique. Dans le secteur de recherche de la prise en charge du diabète par voie orale, il est intéressant

de noter l'attrait pour de nouvelles classes d'antidiabétiques telles que les glifozines. Les analogues de la GLP-1, actuellement commercialisés uniquement sous forme injectable, font également partis des axes de recherche pour le développement de formes orales. Les recherches sur ces deux familles de molécules semblent prometteuses puisqu'elles atteignent les essais de phase IV. Ces molécules sont néanmoins principalement développées pour le diabète de type II et ne se substituent pas à l'administration d'insuline.

Sur l'ensemble de ces essais, seuls deux concernent l'administration d'une forme orale d'insuline. Le premier est un essai pédiatrique allemand étudiant la prévention du diabète de type 1 chez des enfants présentant un risque génétique (administration orale d'insuline *versus* placebo), arrêté en phase II en raison de données inexploitable.⁹⁹ L'autre essai concerné a été réalisé en 2015 par le groupe pharmaceutique Novo Nordisk et conduit sur deux sites en Allemagne. Un analogue de l'insuline, l'insuline 338 administré une fois par jour par voie orale sous forme de comprimé a été testé jusqu'en phase II *versus* l'insuline glargine de référence (LANTUS®) administrée par voie sous-cutanée pendant 8 semaines.¹⁰⁰ L'insuline 338 s'est révélée aussi efficace et sûre que l'insuline de référence, pourtant l'essai clinique a été arrêté du fait d'une production non commercialement viable.¹⁰¹ L'efficacité de cette administration orale de l'insuline repose sur l'utilisation du système breveté par les laboratoires Merrion Pharmaceuticals GIPET® (Gastro Intestinal Permeation Enhancement Technology). Cette technologie permet l'amélioration de la biodisponibilité par voie orale via les transports para et transcellulaires (**Figure 4**). La formulation spécifique de ces comprimés se compose d'excipients activateurs du transport et de l'absorption des principes actifs par la formation de micelles.²⁰

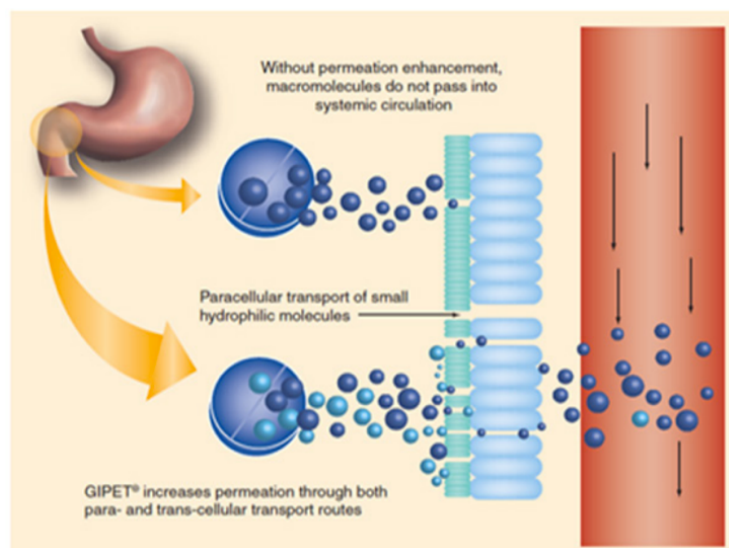


Figure 4. Principe d'action de la technologie GIPET® permettant l'amélioration de la biodisponibilité par voie orale de molécules thérapeutiques faiblement perméables²⁰

D'autres formulations de l'insuline pour la voie orale ont été testées en essais précliniques ou cliniques. Ces formulations reposent sur l'utilisation de nanotechnologies telles que CobOral™, TrabiOral™ ou encore NOD Tech.¹⁰² La technologie CobOral™ utilise des nanoparticules polymériques sur lesquelles de la vitamine B12 a été greffée permettant ainsi l'amélioration de l'absorption intestinale de l'insuline.¹⁰³ La technologie NOD Tech est basée sur l'encapsulation de nanoparticules d'insuline dans des capsules de phosphate de calcium bioadhésives à l'origine du produit Nodlin.¹⁰² Cependant, à l'heure actuelle, aucun traitement par insuline pour la voie orale n'a été développé jusqu'à la mise sur le marché.

Synthèse du projet de recherche

La **Figure 5** présente les grandes étapes du développement de ce projet.

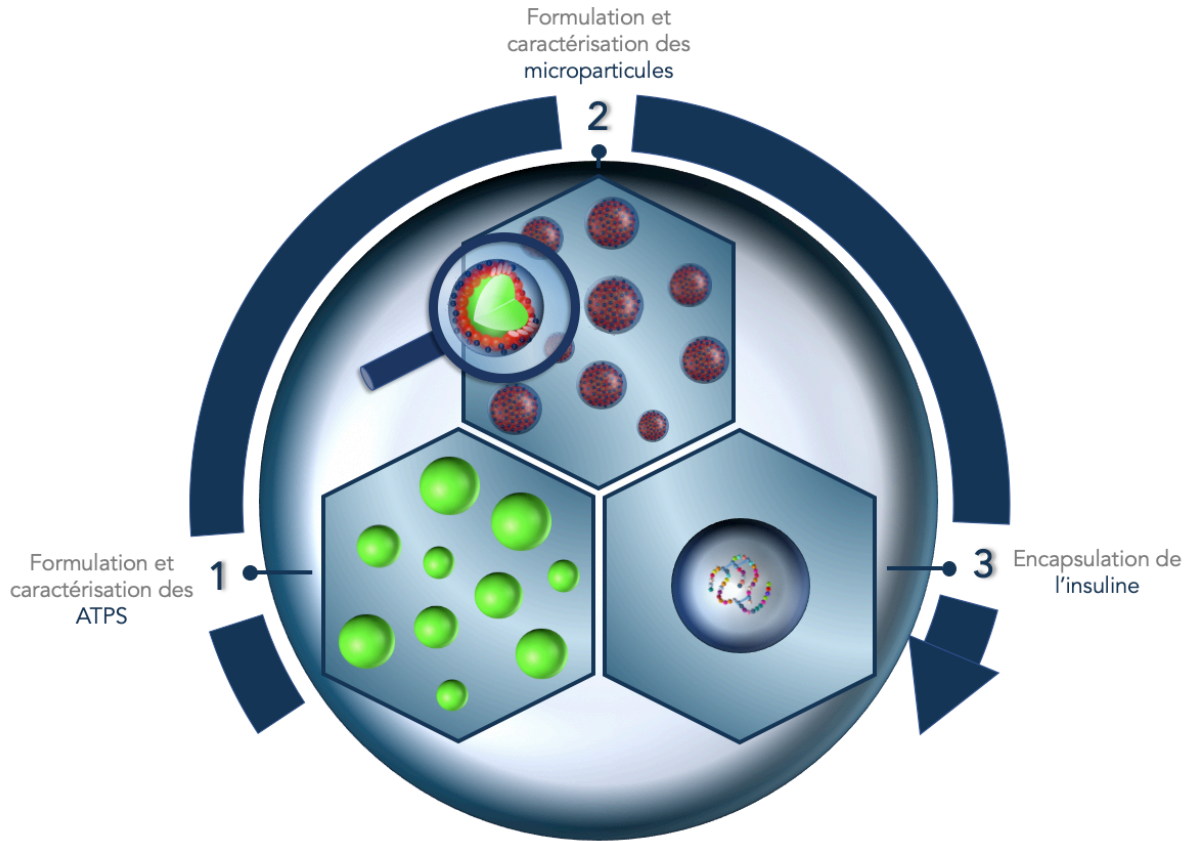


Figure 5. Représentation schématique des trois grandes étapes de développement du projet

REFERENCES

- 1 Y. Landry, *Initiation à la connaissance du médicament*, Paris, 1st edn., 2010.
- 2 Analyse des ventes de médicaments en France en 2013. [En ligne]. http://ansm.sante.fr/var/ansm_site/storage/original/application/7b8a53c5219badcd6d0c100edc891a8c.pdf. Consulté le 25 février 2020.
- 3 Yvan Touitou, in *Pharmacologie et thérapeutiques*, ed. Elsevier Masson, 1st edn., 2013, pp. 19–22.
- 4 E. Roger, F. Lagarce, E. Garcion and J.-P. Benoit, Biopharmaceutical parameters to consider in order to alter the fate of nanocarriers after oral delivery., *Nanomedicine (Lond)*, 2010, **5**, 287–306.
- 5 H. Malhaire, J.-C. Gimel, E. Roger, J.-P. Benoît and F. Lagarce, How to design the surface of peptide-loaded nanoparticles for efficient oral bioavailability?, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2016, **106**, 320–336.
- 6 Collège National de Pharmacologie Médicale, *Initiation à la connaissance du médicament*, Paris, 2nd edn., 2011.
- 7 J. Renukuntla, A. D. Vadlapudi, A. Patel, S. H. S. Boddu and A. K. Mitra, Approaches for enhancing oral bioavailability of peptides and proteins, *Int. J. Pharm.*, 2013, **447**, 75–93.
- 8 Y. S. Kim and R. H. Erickson, Role of Peptidases of the Human Small Intestine in Protein Digestion, *Gastroenterology*, 1985, **88**, 1071–1073.
- 9 WHO - ATC - Structure and principles. [En ligne]. https://www.whocc.no/atc/structure_and_principles/. Consulté le 23 février 2020.
- 10 Thériaque - Monographie de l'insuline humaine recombinante en solution. [En ligne].

<http://www.theriaque.org/apps/monographie/index.php?type=SAC&id=2324>.
Consulté le 25 février 2020.

- 11 M. Lindenberg, S. Kopp and J. B. Dressman, 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**, 265–278.
- 12 G. L. Amidon, H. Lennernäs, V. P. Shah and J. R. Crison, A Theoretical Basis for a Biopharmaceutic Drug Classification: The Correlation of in Vitro Drug Product Dissolution and in Vivo Bioavailability, *Pharm. Res. An Off. J. Am. Assoc. Pharm. Sci.*, 1995, **12**, 413–420.
- 13 A. Dahan, J. M. Miller and G. L. Amidon, Prediction of solubility and permeability class membership: provisional BCS classification of the world's top oral drugs., *AAPS J.*, 2009, **11**, 740–746.
- 14 C. Y. Wu and L. Z. Benet, Predicting drug disposition via application of BCS: Transport/absorption/ elimination interplay and development of a biopharmaceutics drug disposition classification system, *Pharm. Res.*, 2005, **22**, 11–23.
- 15 G. Poovi and N. Damodharan, Lipid nanoparticles: A challenging approach for oral delivery of BCS Class-II drugs, *Futur. J. Pharm. Sci.*, 2018, **4**, 191–205.
- 16 J. B. Dressman and C. Reppas, *Oral Drug Absorption: Prediction and Assessment, Second Edition*, CRC Press, 2016.
- 17 T.-O. Oh, J.-Y. Kim, J.-M. Ha, S.-C. Chi, Y.-S. Rhee, C.-W. Park and E.-S. Park, Preparation of highly porous gastroretentive metformin tablets using a sublimation method, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2013, **83**, 460–467.
- 18 C. L. Cheng, L. X. Yu, H. L. Lee, C. Y. Yang, C. S. Lue and C. H. Chou, Biowaiver extension potential to BCS Class III high solubility-low permeability drugs:

- Bridging evidence for metformin immediate-release tablet, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2004, **22**, 297–304.
- 19 J. R. Suchard and T. A. Grotsky, Fatal metformin overdose presenting with progressive hyperglycemia., *West. J. Emerg. Med.*, 2008, **9**, 160–4.
- 20 V. S Chudiwal, Innovative Technologies for Gastro-Retentive Drug Delivery Systems, *Glob. J. Pharm. Pharm. Sci.*, , DOI:10.19080/GJPPS.2018.04.555650.
- 21 L. Z. Benet, F. Broccatelli and T. I. Oprea, BDDCS applied to over 900 drugs., *AAPS J.*, 2011, **13**, 519–47.
- 22 L. Z. Benet, C. M. Hosey, O. Ursu and T. I. Oprea, BDDCS, the Rule of 5 and drugability, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2016, **101**, 89–98.
- 23 WHO - ATC/DDD Index 2020. [En ligne]. https://www.whocc.no/atc_ddd_index/. Consulté le 25 juin 2020.
- 24 M.-L. Chen, G. L. Amidon, L. Z. Benet, H. Lennernas and L. X. Yu, The BCS, BDDCS, and Regulatory Guidances, *Pharm. Res.*, 2011, **28**, 1774–1778.
- 25 C. Y. Wong, J. Martinez and C. R. Dass, Oral delivery of insulin for treatment of diabetes: status quo, challenges and opportunities, *J. Pharm. Pharmacol.*, 2016, **68**, 1093–1108.
- 26 C. Viault. Développement galénique d'un médicament générique: de la préformulation à la formulation d'un comprimé à libération immédiate. Thèse d'exercice de Pharmacie, Université de Nantes. 2006; 138 p.
- 27 E. DANFORTH and R. O. MOORE, Intestinal absorption of insulin in the rat, *Endocrinology*, 1959, **65**, 118–123.
- 28 J. P. F. Bai, L. L. Chang and J. H. Guo, Effects of Polyacrylic Polymers on the Degradation of Insulin and Peptide Drugs by Chymotrypsin and Trypsin, *J. Pharm. Pharmacol.*, 1996, **48**, 17–21.
- 29 A. Wawrezynieck, J. M. Péan, P. Wüthrich and J. P. Benoit, Biodisponibilité et

- vecteurs particuliers pour la voie orale, *Medecine/Sciences*, 2008, **24**, 659–664.
- 30 V. K. Pawar, J. G. Meher, Y. Singh, M. Chaurasia, B. Surendar Reddy and M. K. Chourasia, Targeting of gastrointestinal tract for amended delivery of protein/peptide therapeutics: Strategies and industrial perspectives, *J. Control. Release*, 2014, **196**, 168–183.
- 31 A. Bernkop-Schnürch, Permeation enhancing polymers in oral delivery of hydrophilic macromolecules: thiomers/GSH systems, *J. Control. Release*, 2003, **93**, 95–103.
- 32 J. F. Liang and V. C. Yang, Insulin-cell penetrating peptide hybrids with improved intestinal absorption efficiency, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2005, **335**, 734–738.
- 33 H. Ichikawa and N. A. Peppas, Novel complexation hydrogels for oral peptide delivery: In vitro evaluation of their cytocompatibility and insulin-transport enhancing effects using Caco-2 cell monolayers, *J. Biomed. Mater. Res.*, 2003, **67A**, 609–617.
- 34 T. Hetal, P. Bindesh and T. Sneha, A review on techniques for oral bioavailability enhancement of drugs, *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.*, 2010, **4**, 203–223.
- 35 A.-C. Groo, M. Bossière, L. Trichard, P. Legras, J.-P. Benoit and F. Lagarce, In vivo evaluation of paclitaxel-loaded lipid nanocapsules after intravenous and oral administration on resistant tumor, *Nanomedicine (Lond)*, 2015, **10**, 589–601.
- 36 M. Lu, C. Zhang, J. Hao and Z. Qiu, Synthesis and relative bioavailability of meptazinol benzoyl esters as prodrugs, *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, 2005, **15**, 2607–2609.
- 37 K. Oehlke, M. Adamiuk, D. Behnlian, V. Gräf, E. Mayer-Miebach, E. Walz and

- R. Greiner, Potential bioavailability enhancement of bioactive compounds using food-grade engineered nanomaterials: a review of the existing evidence., *Food Funct.*, 2014, **5**, 1341–59.
- 38 D. J. McClements, Encapsulation, protection, and release of hydrophilic active components: Potential and limitations of colloidal delivery systems, *Adv. Colloid Interface Sci.*, 2015, **219**, 27–53.
- 39 L. Plapied, N. Duhem, A. des Rieux and V. Pr at, Fate of polymeric nanocarriers for oral drug delivery, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, 2011, **16**, 228–237.
- 40 A. Bernkop-Schn urch, Reprint of: Nanocarrier systems for oral drug delivery: Do we really need them?, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2013, **50**, 2–7.
- 41 Y. Agrawal and V. Patel, Nanosuspension: An approach to enhance solubility of drugs, *J. Adv. Pharm. Technol. Res.*, 2011, **2**, 81.
- 42 S. Gupta, R. Kesarla and A. Omri, Formulation strategies to improve the bioavailability of poorly absorbed drugs with special emphasis on self-emulsifying systems., *ISRN Pharm.*, 2013, **2013**, 16.
- 43 E. Roger, S. Kalscheuer, A. Kirtane, B. R. Guru, A. E. Grill, J. Whittum-hudson and J. Panyam, Folic acid-Functionalized Nanoparticles for Enhanced Oral Drug Delivery, 2013, **9**, 612–626.
- 44 E. B. Souto, S. B. Souto, J. R. Campos, P. Severino, T. N. Pashirova, L. Y. Zakharova, A. M. Silva, A. Durazzo, M. Lucarini, A. A. Izzo and A. Santini, Nanoparticle Delivery Systems in the Treatment of Diabetes Complications, *Molecules*, 2019, **24**, 4209.
- 45 S. L. Perry and D. J. McClements, Recent Advances in Encapsulation, Protection, and Oral Delivery of Bioactive Proteins and Peptides using Colloidal Systems, *Molecules*, 2020, **25**, 1161.
- 46 A. Gedawy, J. Martinez, H. Al-Salami and C. R. Dass, Oral insulin delivery:

- existing barriers and current counter-strategies, *J. Pharm. Pharmacol.*, 2018, **70**, 197–213.
- 47 N. Sahiner, W. T. Godbey, G. L. McPherson and V. T. John, Microgel, nanogel and hydrogel–hydrogel semi-IPN composites for biomedical applications: synthesis and characterization, *Colloid Polym. Sci.*, 2006, **284**, 1121–1129.
- 48 L. M. C. Sagis, Dynamics of encapsulation and controlled release systems based on water-in-water emulsions: Liposomes and polymersomes, *Phys. A Stat. Mech. its Appl.*, 2009, **388**, 2579–2587.
- 49 K. A. Simon, P. Sejwal, R. B. Gerecht and Y. Y. Luk, Water-in-water emulsions stabilized by non-amphiphilic interactions: Polymer-dispersed lyotropic liquid crystals, *Langmuir*, 2007, **23**, 1453–1458.
- 50 L. M. C. Sagis, Dynamics of controlled release systems based on water-in-water emulsions: A general theory, *J. Control. Release*, 2008, **131**, 5–13.
- 51 F. Ruiz-Ruiz, J. Benavides, O. Aguilar and M. Rito-Palomares, Aqueous two-phase affinity partitioning systems: Current applications and trends, *J. Chromatogr. A*, 2012, **1244**, 1–13.
- 52 M. Iqbal, Y. Tao, S. Xie, Y. Zhu, D. Chen, X. Wang, L. Huang, D. Peng, A. Sattar, M. A. B. Shabbir, H. I. Hussain, S. Ahmed and Z. Yuan, Aqueous two-phase system (ATPS): an overview and advances in its applications, *Biol. Proced. Online*, 2016, **18**, 18.
- 53 W. . G. Fan CE., Charged protein partitioning in aqueous polyethylene glycol-dextran two-phase systems: salt effects., *Sep. Sci. Technol.*, 1999, **34**, 423–438.
- 54 W. Fan, U. Bakir and C. E. Glatz, Contribution of protein charge to partitioning in aqueous two-phase systems, *Biotechnol. Bioeng.*, 1998, **59**, 461–470.
- 55 J. Jiang and J. M. Prausnitz, Molecular Thermodynamics for Partitioning of Native and Denatured Proteins in Aqueous Two-Phase Systems, *J. Phys. Chem.*

- B*, 2000, **104**, 7197–7205.
- 56 H.-O. Johansson, J. Persson and F. Tjerneld, Thermoseparating water/polymer system: A novel one-polymer aqueous two-phase system for protein purification, *Biotechnol. Bioeng.*, 1999, **66**, 247–257.
- 57 M. W. Edelman, E. Van Der Linden and R. H. Tromp, Phase separation of aqueous mixtures of poly(ethylene oxide) and dextran, *Macromolecules*, 2003, **36**, 7783–7790.
- 58 L. Fele and M. Fermeiglia, Partition Coefficients of Proteins in Poly(ethylene glycol) + Dextran + Water at 298 K, *J. Chem. Eng. Data*, 1996, **41**, 331–334.
- 59 A. Zaslavsky, P. Madeira, L. Breydo, V. N. Uversky, A. Chait and B. Zaslavsky, High throughput characterization of structural differences between closely related proteins in solution, *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics*, 2013, **1834**, 583–592.
- 60 B. Desbuquois and G. D. Aurbach, Distribution of free and antibody-bound peptide hormones in two-phase aqueous polymer systems., *Biochem. J.*, 1972, **126**, 717–726.
- 61 B. Desbuquois and G. D. Aurbach, Effects of iodination on the distribution of peptide hormones in aqueous two phase polymer systems, *Biochem. J.*, 1974, **143**, 83–91.
- 62 D. M. A. Buzza, P. D. I. Fletcher, T. K. Georgiou and N. Ghasdian, Water-in-water emulsions based on incompatible polymers and stabilized by triblock copolymers-templated polymersomes, *Langmuir*, 2013, **29**, 14804–14814.
- 63 R. J. H. Stenekes, O. Franssen, E. M. G. van Bommel, D. J. A. Crommelin and W. E. Hennink, The use of aqueous PEG/dextran phase separation for the preparation of dextran microspheres, *Int. J. Pharm.*, 1999, **183**, 29–32.
- 64 E. Scholten, L. M. C. Sagis and E. van der Linden, Effect of bending rigidity and

- interfacial permeability on the dynamical behavior of water-in-water emulsions, *J. Phys. Chem. B*, 2006, **110**, 3250–3256.
- 65 Y. Chao and H. C. Shum, Emerging aqueous two-phase systems: from fundamentals of interfaces to biomedical applications, *Chem. Soc. Rev.*, 2020, **49**, 114–142.
- 66 W. Ramsden, Separation of Solids in the Surface-Layers of Solutions and 'Suspensions' (Observations on Surface-Membranes, Bubbles, Emulsions, and Mechanical Coagulation). -- Preliminary Account, *Proc. R. Soc. London*, 1903, **72**, 156–164.
- 67 S. U. Pickering, CXCVI.—Emulsions, *J. Chem. Soc., Trans.*, 1907, **91**, 2001–2021.
- 68 P. E. Ruiz-Rodriguez, D. Meshulam and U. Lesmes, Characterization of Pickering O/W Emulsions Stabilized by Silica Nanoparticles and Their Responsiveness to In vitro Digestion Conditions, *Food Biophys.*, 2014, **9**, 406–415.
- 69 Y. Chevalier and M. A. Bolzinger, Emulsions stabilized with solid nanoparticles: Pickering emulsions, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, 2013, **439**, 23–34.
- 70 B. T. Nguyen, T. Nicolai and L. Benyahia, Stabilization of water-in-water emulsions by addition of protein particles, *Langmuir*, 2013, **29**, 10658–10664.
- 71 G. Balakrishnan, T. Nicolai, L. Benyahia and D. Durand, Particles trapped at the droplet interface in water-in-water emulsions, *Langmuir*, 2012, **28**, 5921–5926.
- 72 B. T. Nguyen, W. Wang, B. R. Saunders, L. Benyahia and T. Nicolai, pH-responsive water-in-water pickering emulsions, *Langmuir*, 2015, **31**, 3605–3611.
- 73 A. Vilchez, C. Rodriguez-Abreu, A. Menner, A. Bismarck and J. Esquena, Antagonistic effects between magnetite nanoparticles and a hydrophobic surfactant in highly concentrated pickering emulsions, *Langmuir*, 2014, **30**,

- 5064–5074.
- 74 H. Ou, Q. Chen, J. Pan, Y. Zhang, Y. Huang and X. Qi, Selective removal of erythromycin by magnetic imprinted polymers synthesized from chitosan-stabilized Pickering emulsion., *J. Hazard. Mater.*, 2015, **289**, 28–37.
- 75 S. Arditty, C. P. Whitby, B. P. Binks, V. Schmitt and F. Leal-Calderon, Some general features of limited coalescence in solid-stabilized emulsions, *Eur. Phys. J. E*, 2003, **11**, 273–281.
- 76 C. Albert, M. Beladjine, N. Tsapis, E. Fattal, F. Agnely and N. Huang, Pickering emulsions: Preparation processes, key parameters governing their properties and potential for pharmaceutical applications, *J. Control. Release*, 2019, **309**, 302–332.
- 77 H. Al-Shehri, T. S. Horozov and V. N. Paunov, Adsorption of carboxylic modified latex particles at liquid interfaces studied by the gel trapping technique., *Soft Matter*, 2014, **10**, 6433–6441.
- 78 M. Destribats, S. Gineste, E. Laurichesse, H. Tanner, F. Leal-Calderon, V. Héroguez and V. Schmitt, Pickering emulsions: What are the main parameters determining the emulsion type and interfacial properties?, *Langmuir*, 2014, **30**, 9313–9326.
- 79 A. Kaul, The Phase Diagram, *Methods Biotechnol.*, 2000, **11**, 11–21.
- 80 S. Ghosh, R. Vijayalakshmi and T. Swaminathan, Evaluation of an alternative source of dextran as a phase forming polymer for aqueous two-phase extractive system, *Biochem. Eng. J.*, 2004, **21**, 241–252.
- 81 PEO - Sigma Aldrich. [En ligne]
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/181994?lang=fr®ion=FR>. Consulté le 21 mai 2016.
- 82 R. P. Gullapalli and C. L. Mazzitelli, Polyethylene glycols in oral and parenteral

- formulations-A critical review, *Int. J. Pharm.*, 2015, **496**, 219–239.
- 83 D. Candy and J. Belsey, Macrogol (polyethylene glycol) laxatives in children with functional constipation and faecal impaction: a systematic review., *Arch. Dis. Child.*, 2009, **94**, 156–160.
- 84 Dextran - Sigma Aldrich. [En ligne]
http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/d1037pis.pdf. Consulté le 29 octobre 2016.
- 85 A. S. Porfire, V. Zabaleta, C. Gamazo, S. E. Leucuta and J. M. Irache, Influence of dextran on the bioadhesive properties of poly(anhydride) nanoparticles, *Int. J. Pharm.*, 2010, **390**, 37–44.
- 86 J. Varshosaz, Dextran conjugates in drug delivery, *Expert Opin. Drug Deliv.*, 2012, **9**, 509–523.
- 87 FDA - Select Committee on GRAS Substances: dextran. [En ligne].
<https://www.accessdata.fda.gov/scripts/fdcc/?set=SCOGS&sort=Sortsubstance&order=ASC&startrow=1&type=basic&search=dextran>. Consulté le 24 juin 2020.
- 88 N. T. Huynh, C. Passirani, P. Saulnier and J. P. Benoit, Lipid nanocapsules: A new platform for nanomedicine, *Int. J. Pharm.*, 2009, **379**, 201–209.
- 89 I. Minkov, T. Ivanova, I. Panaiotov, J. Proust and P. Saulnier, Reorganization of lipid nanocapsules at air-water interface: I. Kinetics of surface film formation, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, 2005, **45**, 14–23.
- 90 I. Minkov, T. Ivanova, I. Panaiotov, J. Proust and P. Saulnier, Reorganization of lipid nanocapsules at air-water interface: Part 2. Properties of the formed surface film., *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, 2005, **44**, 197–203.
- 91 Fédération Internationale du Diabète, *Atlas du diabète de la FID, 9ème édition*,

- 2019.
- 92 INSERM - Diabète de type 1. [En ligne]. <https://www.inserm.fr/information-en-sante/dossiers-information/diabete-type-1>. Consulté le 10 juin 2020.
- 93 G. P. Carino and E. Mathiowitz, Oral insulin delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 1999, **35**, 249–257.
- 94 P. Fonte, F. Araújo, S. Reis and B. Sarmento, Oral Insulin Delivery: How Far are We?, *J. Diabetes Sci. Technol.*, 2013, **7**, 520–531.
- 95 A. Viehof, L. Javot, A. Béduneau, Y. Pellequer and A. Lamprecht, Oral insulin delivery in rats by nanoparticles prepared with non-toxic solvents, *Int. J. Pharm.*, 2013, **443**, 169–174.
- 96 Thériaque - Liste des spécialités ayant pour substance active l'insuline. [En ligne]. http://www.theriaque.org/apps/recherche/rch_simple.php. Consulté le 26 février 2020.
- 97 EU Clinical Trials - [En ligne]. <https://www.clinicaltrialsregister.eu/ctr-search/search?query=insulin+AND+diabetes+AND+%22oral+use%22&country=fr&status=completed>. Consulté le 11 octobre 2020.
- 98 EU Clinical Trials - [En ligne]. <https://www.clinicaltrialsregister.eu/ctr-search/search?query=insulin+AND+diabetes+AND+%22oral+use%22&status=completed>. Consulté le 11 octobre 2020.
- 99 EU Clinical Trials - 2014-005287-15. [En ligne]. <https://www.clinicaltrialsregister.eu/ctr-search/trial/2014-005287-15/results>. Consulté le 12 octobre 2020.
- 100 EU Clinical Trials - 2014-002716-16. [En ligne]. <https://www.clinicaltrialsregister.eu/ctr-search/trial/2014-002716-16/results>. Consulté le 26 février 2020.
- 101 I. B. Halberg, K. Lyby, K. Wassermann, T. Heise, E. Zijlstra and L. Plum-Mörschel,

Efficacy and safety of oral basal insulin versus subcutaneous insulin glargine in type 2 diabetes: a randomised, double-blind, phase 2 trial, *Lancet Diabetes Endocrinol.*, 2019, **7**, 179–188.

- 102 E. Zijlstra, L. Heinemann and L. Plum-Mörschel, Oral Insulin Reloaded: a structured approach, *J. Diabetes Sci. Technol.*, 2014, **8**, 458–465.
- 103 A. M. Grumezescu, Ed., *Nanoparticles in Pharmacotherapy*, Elsevier, 2019.

ETUDE
BIBLIOGRAPHIQUE

Bibliography

FROM EMULSIONS TO MICRO & NANOMEDICINES

Introduction

Since the 2000s, micro and nanomedicines have aroused considerable interest in medical advances. Micro and nanomedicines will be both discussed in this bibliographic study. According to the Food and Drug Administration (FDA), nanoparticles usually refers as particles with a size ranging from 1 to 100 nm. Microparticles have a size from 1 μm to 1 mm, whereas particles with intermediate size (100 nm – 1 μm) are submicron particles.¹ The scale of size of those systems confer them specific physico-chemical properties interesting for diagnostic and therapeutic applications such as the improvement of the therapeutic index of many drugs.^{2,3} Interest of using nano and micro drug delivery systems is based on their ability to encapsulate and/or graft molecules in order to target them on specific anatomical sites or to control drug release.⁴ They cover a large range of biomedical applications such as analytical and imaging tools, theranostics, tissue engineering and regenerative medicine, or to deliver drug therapeutic.⁴ For instance, micro and nanomedicines were widespread studied in cancer therapy, improving antitumor efficiency, drug bioavailability, ensuring drug delivery and reducing side effects.⁵⁻⁷

DUMAS Florence | *Conception de nouvelles formulations pour l'encapsulation des molécules BCS III*

Thus, new pharmaceutical micro and nanomedicines were developed for most of the routes of administration. For example, oral nano-delivery systems used in inflammatory bowel-disease treatment allow inflammation-specific targeting, improve bioavailability and enhance uptake.⁸ For systemic application, chitosan microparticles studied as oral vaccine delivery system showed *in vivo* absorption in Peyer's patches in mice.⁹ Nano-drug delivery systems were also developed for dermal applications such as skin wounds or burns treatment, demonstrating efficiency enhancement, sustained drug release or side effects reduction.¹⁰ For ocular applications as infections, inflammation, dry eye, glaucoma or retinopathies treatments, micro and nanomedicines can for instance improved bioavailability, penetration or residence time acting as a reservoir.¹¹⁻¹³ Nasal micro and nanomedicines demonstrated interests for glioblastoma treatment for instance, targeting central nervous system, bypassing blood brain barrier or side effects reduction.¹⁴ Many applications were reported for parenteral routes. For example, subcutaneous administration of PLGA/chitosan based nano-complex for insulin delivery in diabetes treatments achieved glycemic control (up to 98h after administration), reduced complications and allowed closed-loop drug delivery.¹⁵ While FDA had already approved a substantial number of micro and nanotechnology-based products and clinical trials for drug delivery systems, one of the major drawbacks for the development of those systems remain in their potential toxicity.^{4,16} There is a wide variety of micro and nanomedicines well-described in the Literature. Commonly used structures are illustrated in **Figure 1**.

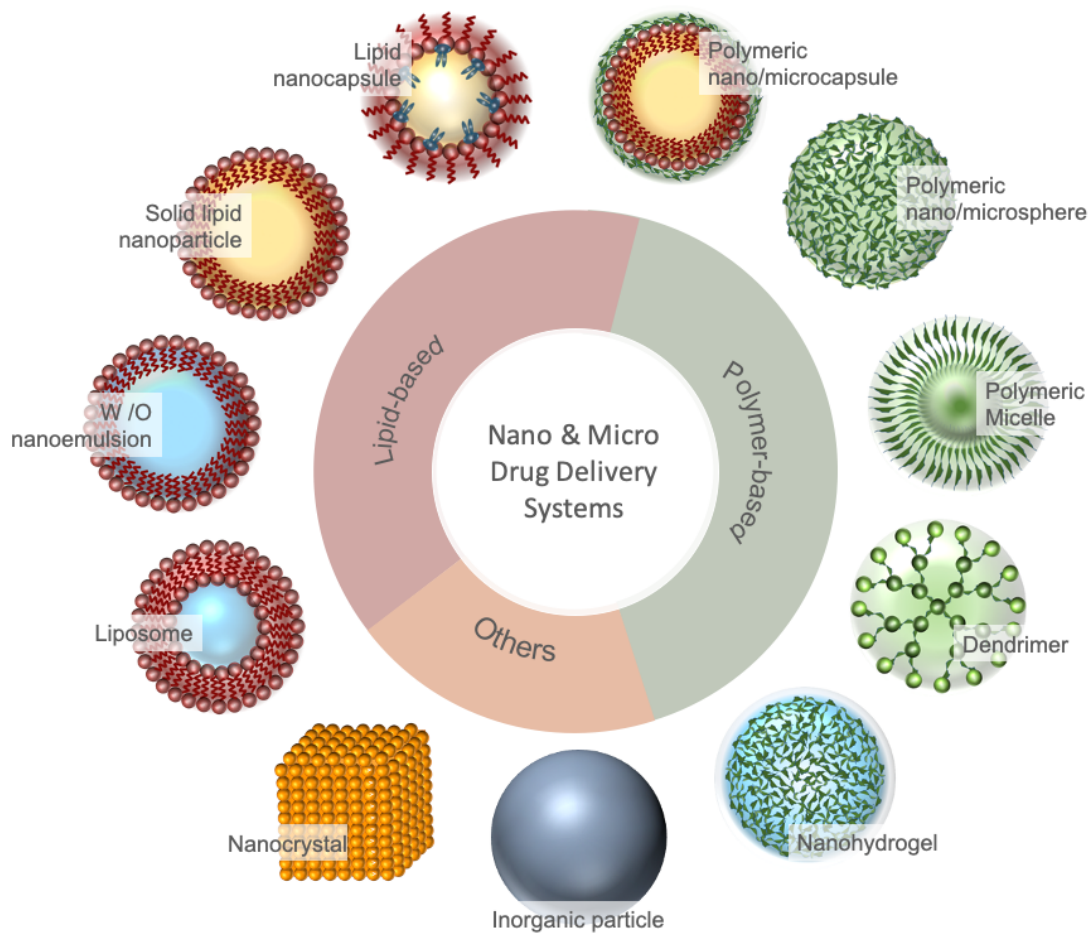


Figure 1. Schematic representation of micro and nanomedicines

The most straightforward nanomedicine system consists of nanocrystals which are specific nanosized structures of drug, and inorganic particles. For micro and nanoparticles, the term “particles” includes both systems with capsule or sphere structures. Capsules are core-shell structures whereas spheres are matrix ones.¹⁷ Different systems can be formulated depending on their composition (lipid or polymer-based). Thus, lipid-based systems may contain oily core such as lipid nanoparticles / microparticles, solid lipid nanoparticles/microparticles and nanoemulsions (oily phase dispersed); or aqueous core such as nanoemulsions (aqueous phase dispersed) and liposomes. These systems are suitable to encapsulate

DUMAS Florence | Conception de nouvelles formulations pour l'encapsulation des molécules BCS III

hydrophilic or lipophilic drugs and even both. For example, a lipophilic drug, can be encapsulated in the oily core of lipid nanocapsule but also be adsorbed or grafted at the surface. Nevertheless, in this last option, the drug, unprotected by the system, is exposed to degradations.¹⁸ Other systems are polymer-based such as polymeric nanoparticles / microparticles, polymer micelles, dendrimers and nanohydrogels. Those systems are often suitable for only one kind of drugs (either lipophilic or hydrophilic). The main characteristics of micro and nanomedicines mentioned are reported in **Table 1**, illustrated by some examples of applications. For further information on applications, the lector may refer to the review of Farjadian, *et al*, describing nanomedicines currently on the market.¹⁹ Various processes are used to formulate micro and nanomedicines, which many of them involving an emulsion step.^{17,20-22} The present bibliography work will focus on emulsion techniques for the formulation of micro and nanomedicines. Recent studies (2019-2020) with emulsion-based formulation processes for manufacturing micro and nanomedicines will be then overviewed.

Table 1. Description, main characteristics and examples of applications of mostly common micro and nanomedicines for drug delivery

	System	Description	Main characteristics	Examples of applications	Ref.
<i>Lipid-based</i>	Liposome	Aqueous core Lipid bilayer (cholesterol and phospholipids)	Suitable for both hydrophilic and lipophilic molecules. Biocompatibility and biodegradability.	Doxorubicin (Doxil®/Caelyx®) indicated in Kaposi's sarcoma, ovarian and breast cancer	7,20,23
	Lipid nanocapsules	Hydrophobic core (medium chain triglycerides) Mixture of lecithin and pegylated surfactant membrane	Mainly suitable for lipophilic molecules. Solvent-free process. High stability.	Many drugs like for example anticancer such as etoposide, paclitaxel, docetaxel or more recently decitabine which is indicated in acute myeloid leukemia	24,25
	Solid lipid nanoparticles and microparticles	Solid lipid core Phospholipid monolayer	Suitable for both hydrophilic and lipophilic molecules. Biocompatibility and biodegradability.	Olmesartan medoxomil indicated in hypertension (bioavailability increased 2.3 folds compared to marketed formulation).	26-28
	Nanoemulsions	Biphasic dispersion stabilized by amphiphilic surfactant	Suitable for both hydrophilic and lipophilic molecules.	Cyclosporine (Norvir®) indicated in HIV infection and kidney transplantation rejection	29,30

	System	Description	Main characteristics	Examples of applications	Ref.
<i>Polymer-based</i>	Polymeric nanoparticles and microparticles	Nano/microsphere: polymer matrix system Nano/microcapsule: vesicular system with polymer membrane	Mainly suitable for poorly water-soluble molecules. Biocompatibility. Controlled and sustained release.	Triptorelin (Decapeptyl®) indicated either in men prostate cancer and women infertility	16,17,31,32
	Polymer micelles	Amphiphilic copolymers self-assembling (hydrophobic core)	Suitable for poorly soluble molecules. Biocompatibility. High stability <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> .	Paclitaxel (Genexol-PM) indicated in breast, lung and ovarian cancer	33
	Dendrimers	Branched nanomolecules forming tree-like architecture	Mainly suitable for poorly water-soluble molecules. High drug loading capacity.	SPL7013 (VivaGel®) indicated in prevention of sexually transmitted infections (genital herpes, HIV etc.)	34
	Nanohydrogels	Hydrophilic polymeric network	Mainly suitable for hydrophilic molecules. Controlled release. Biocompatibility.	5-fluorouracil indicated in head and neck cancer	35-37

	System	Description	Main characteristics	Examples of applications	Ref.
<i>Others</i>	Nanocrystals	Nanosopic crystals of drug without excipient	Mainly suitable for poorly water-soluble molecules.	Olanzapine (Zypadhera®) indicated in schizophrenia	29,38
	Inorganic particles	Inorganic core: iron oxide, gold, silica or quantum dots	Superparamagnetism, surface plasmon resonance or luminescence properties.	Iron oxide (Resovist) indicated as MRI contrast agent	21,39

Emulsions

Different types of micro- and nanodrug delivery systems are based on an emulsion-based process. Thus, this work will firstly describe the characteristics and properties of emulsions.

An **emulsion** is defined as a system composed of two immiscible liquids resulting in colloidal dispersion which is thermodynamically unstable.¹⁸ This dispersion consist of droplets of one phase dispersed in the other continuous phase.⁴⁰ Liquids used are usually water and oil or organic phase (such as or dichloromethane) forming “oil-in-water” (O/W) or “water-in-oil” (W/O) emulsions. “Water-in-water” (W/W) emulsions, or aqueous two-phase systems (ATPS) can also be formed based on the mixture of two hydrophilic polymers incompatible in certain proportions (usually polyethylene glycol and dextran), or a mixture of a polymer and a salt (such as potassium phosphate).^{41,42} **Figure 2** represents the different types of emulsions. The formulation of an emulsion is easy, based on mixing. Moreover, they are suitable for drug delivery regardless of the molecule polarity due to the presence of hydrophilic, hydrophobic and amphiphilic (interface) areas.⁴³ Depending on applications aimed, their rheological properties can be controlled, as well as their structures (e.g. interface) in order to ensure drug chemical stability for example.⁴³ Emulsions with droplets diameter lower than 400 nm are called nanoemulsions⁴⁴ but also mini-emulsion or submicron emulsion³⁰.

A **multiple emulsion** is defined as a complex multiphase dispersion in which dispersed droplets (inner droplets) are themselves included in larger dispersed droplets (outer droplets) (**Figure 2**).⁴⁵ Double emulsions can be formed by two aqueous phases for (W₁/O/W₂) or two oily phases for (O₁/W/O₂).⁴⁵ The formulation process requires two homogenization steps and involve two emulsifiers.⁴⁶ Similarly,

high-order multiple emulsions can also be formulated such as triple, quadruple or quintuple emulsions.⁴⁵ Outer droplets formed are generally within the micrometer range.⁴⁷

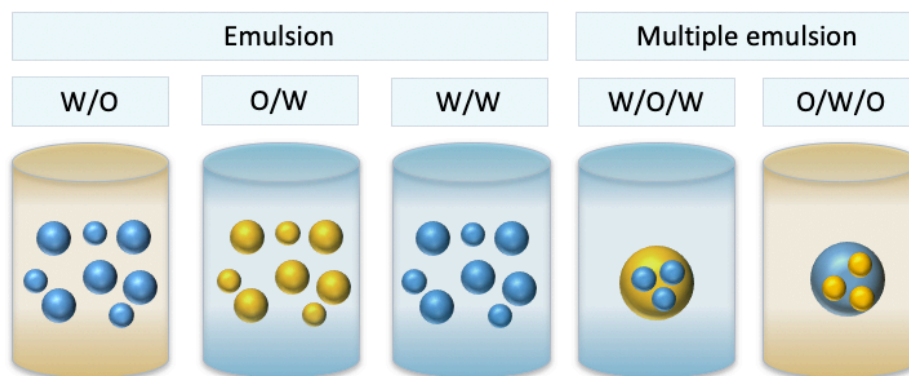


Figure 2. Schematic representation of emulsions and multiple emulsions. Aqueous and oily phases are represented in blue and yellow, respectively.

A summary of main characteristics of emulsions is reported in **Table 2**.

Table 2. Characteristics of emulsion systems^{44,47}

	Composition	Type	Aspect	Droplet size	Stability
Emulsion	polar and/or non-polar solvents	O/W, W/O or W/W	Turbid	> 400 nm	unstable
Nanoemulsion	polar and non-polar solvents	O/W or W/O	Blue-white to semi-opaque	100 – 400 nm	unstable
Multiple emulsion	polar and non-polar solvents / emulsifiers	W/O/W or O/W/O	Turbid	> 1 μ m	unstable

Emulsion formation relies on either low-energy or high-energy emulsification methods. The *spontaneous emulsification* is a low-energy method of emulsion formation allowing the spontaneous formation of an emulsion depending on temperature or system composition.⁴⁸ An organic or oily phase containing a lipophilic surfactant and a water-soluble organic solvent added dropwise to an aqueous phase

containing a hydrophilic surfactant under stirring lead to the formation of a nanoemulsion.³⁰

High energy emulsification methods require the use of homogenizers such as high shear mixers, high-pressure homogenizers, colloid mills, ultrasonic homogenizers or membrane homogenizers.⁴³ Belonging to high-energy methods of emulsion formation (based on mechanical forces)⁴⁸, **high-pressure homogenization** is also the most frequently employed. **Figure 3** represents a high-pressure (up to 100 MPa)⁴⁹ homogenization process by the formation of a coarse emulsion from high-shear mixer (i) and then a fine emulsion with a high-pressure valve homogenizer (ii).

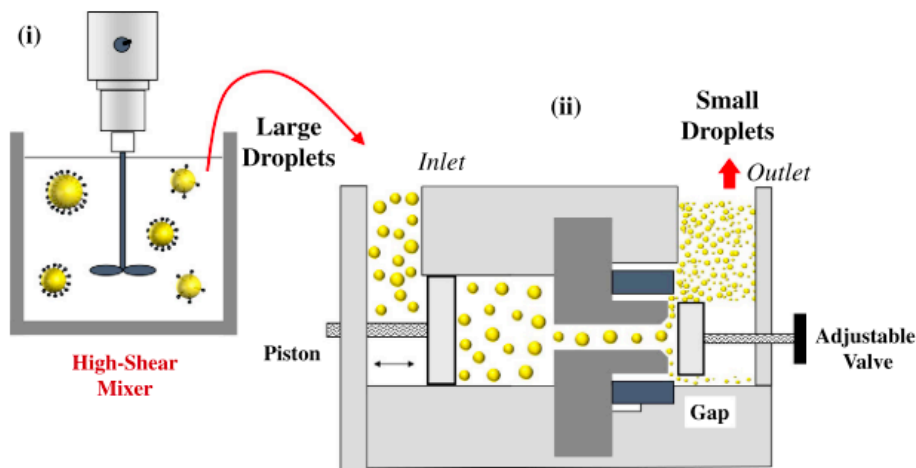


Figure 3. schematic representation of high-pressure homogenization process forming emulsions (McClements, *et al.*⁴⁸)

This method is used for conventional emulsion formation from aqueous and oily phase in presence of emulsifier. Multiple emulsions can also be formed adding an additional homogenization step with a third phase containing an emulsifier. This last homogenization are generally performed in milder conditions avoiding disruption or expulsion of inner droplets.⁴³ High-pressure homogenization is a relatively simple process. The droplets size can be controlled by homogenization pressure, number of cycles, emulsifier types and concentration.^{43,50} However, some limitations are

associated such as the risk of homogenizer fouling in case of crystallization of molecules, or degradation of molecules especially due to high operational temperatures.^{30,43}

One major drawback associated with emulsions relies on their thermodynamical instability. That leads to the observation of several instability mechanisms such as flocculation, creaming or sedimentation, coalescence, Ostwald ripening and phase inversion.^{48,51} Those phenomena are illustrated in **Figure 4**.

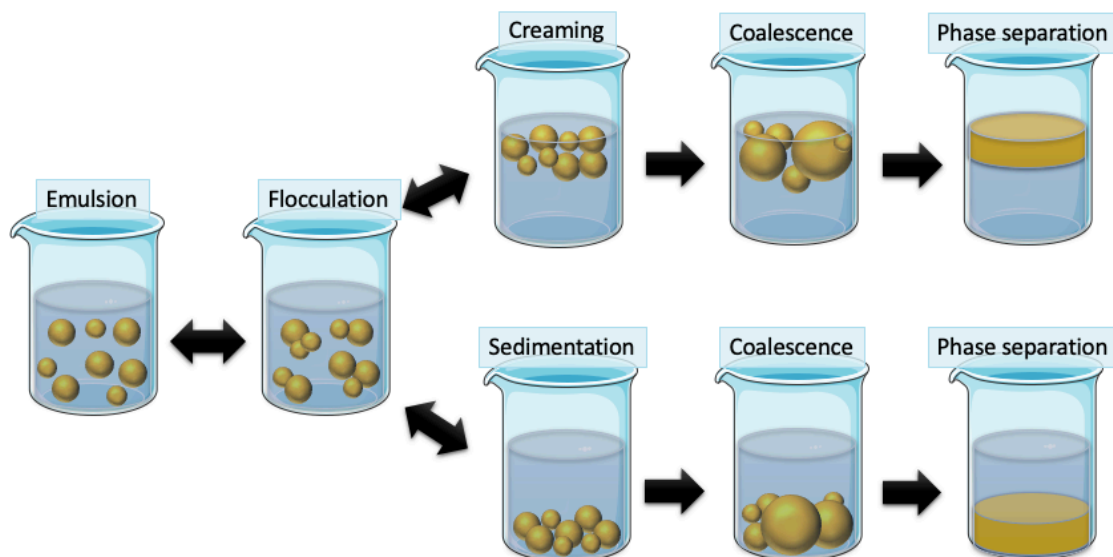


Figure 4. Schematic representation of mechanisms occurring in emulsions instability

Flocculation corresponds to the aggregation of droplets without merging.⁵¹ Flocculation occurs when the balance between attractive (van der Waals or hydrophobic) and repulsive (steric or electrostatic) interactions is disrupted in favor of attractive ones.⁴⁸ *Creaming and sedimentation* both correspond to a gravitational separation process resulting in droplets upward and downward movements, respectively, due to the difference of density between dispersed and continuous phases.⁵¹ Stokes's law indicates that, besides density contrast, gravitation separation

is accelerated by the increase of the droplet size and the decrease of the continuous phase viscosity.⁴⁸ *Coalescence* corresponds to the droplets fusion resulting in bigger droplets.⁵¹ This phenomenon occurs in two steps : firstly, a droplets convergence due to the predominance of attractive forces compared to repulsive forces between droplets; followed by a droplets fusion.⁴⁸ Instability mechanisms can lead to phase separation destroying emulsion. Wilhelm Ostwald observed that in solution containing small and large crystals, the large ones grow and supersaturate compared to small ones.⁵² Applied to emulsions, *Ostwald ripening* corresponds to the growth of larger droplets at the expense of smaller ones.⁵¹ *Phase inversion* corresponds to the reversal of dispersed and continuous phases of an emulsion, which may occur due to modification of composition or environment, such as temperature.⁵¹ Due to their small droplets size, the kinetic stability of nanoemulsions is better than emulsions.³⁰ However, nanoemulsions are still affected by instability phenomena previously mentioned.³⁰ In addition, it can be noticed a specific instability behavior of multiple emulsions due to the expulsion of the innermost droplets in the outer phase.⁴³ Thus, widespread stabilization methods will be now described.

Stabilization by molecular surfactants

This method, widely used to stabilize emulsions, consist in using amphiphilic surfactants positioned at the interface between dispersed and continuous phases. Surfactants present many properties involved in emulsion stability, such as reducing interfacial tension, density differences at interface, generating electrostatic and/or steric repulsive interactions or forming rigid shell.⁵³ That allows to limit destabilization phenomena like gravitational separation, aggregation or Ostwald ripening. However, some limitations are associated to side effects caused by many surfactants (such as

skin irritation, hemolysis or protein denaturation)^{54,55} that are in addition non environmentally-friendly for some of them⁵⁶.

Stabilization by block copolymers

Block copolymers can also stabilize emulsion interfaces. Those amphiphilic block copolymers, due to their specific affinities for inner and outer phases, cover all the thickness emulsion interfaces, coating it, and allow to stabilize even w/w emulsions.⁵⁷ This method had also find applications for multiple emulsions by the discovery of Hong, *et al*, of a single step process preparation, showing stabilization up to 6 months.^{58,59}

Stabilization by interfacial complexation

Interfacial complexation relies on the interaction between two oppositely charged molecules at the emulsion interface. Different types of interactions may be involved such as electrostatic, hydrophobic, hydrogen or disulfide bonding.⁴⁸ Variety of different molecules can be involved, usually ionic polysaccharides and oppositely charged surfactants.⁴⁸ Interfacial complexation also finds application for the formation of artificial membrane-like materials from w/w emulsion for example.⁶⁰ This method can also be used for the formation of shell structure stabilizing emulsion and generating polyelectrolyte microcapsules.⁶¹

Stabilization by solid particles

In the early 20th century, Ramsden and Pickering discovered how to improve emulsions stabilization by solid particles.^{62,63} Also called "Pickering", this method consists in stabilizing emulsions by solid particles (such as silica, hydroxyapatite, clay, magnetic nanoparticles, etc.) adsorbed at the interface between dispersed and

continuous phases leading to steric barrier formation.^{64,65} This method was then long forgotten until recently, when it was demonstrated its high resistance to coalescence.⁵⁵ For example, Sadeghpour, *et al*, demonstrated that modified silica particles (by oleic acid) used for stabilizing submicrometer-sized Pickering emulsion improved the stability compared to untreated silica particles, for which phase separation was observed under a week.⁶⁶ While maximum adsorption energy is smaller for W/W than for O/W interface (due to low interfacial tension in W/W), the Pickering method had also shown interest for W/W emulsions stabilization.⁵⁷ The Pickering method has even been extended to multiple emulsions.⁴⁷

Emulsion-based micro and nanomedicines

Among micro and nanomedicines aforementioned, numerous of them involve emulsion formation in their formulation process.

Emulsification

Based on emulsification methods previously described, drug delivery systems such as Self-Emulsifying and Self-Nanoemulsifying Drug Delivery Systems (SEDDS, SNEDDS) or nanoemulsions can be formulated. SEDDS is defined as an isotropic mixture of oils and surfactants or hydrophilic solvents and co-solvents/surfactants⁶⁷ spontaneously forming emulsions under mild agitation in aqueous media.⁶⁸ SNEDDS lead to emulsion formation with a droplets size ranging from 20 to 200 nm.⁶⁸ They are generally used as poorly-water soluble drug delivery systems. Due to spontaneous emulsification in gastrointestinal fluids, SEDDS are particularly adapted to improve oral absorption of lipophilic drugs.⁶⁷ For example, Jianxian, *et al*, recently developed a gastro-protective SEDDS for the oral administration of aceclofenac, a commonly used nonsteroidal anti-inflammatory drug.⁶⁹ It was reported that SEDDS provide

protection against enzymatic degradation and sulfhydryl barrier, may have mucoadhesive (incorporating mucoadhesive polymers like thiomers), mucus permeating and cell penetrating properties.⁷⁰ Limitations associated to SEDDS concern the selection of excipients; which have to be able to self-emulsify the system, solubilizing drug and being approved for oral use.⁷¹ The difficulty to conduct *in vivo* studies in small animals due to small gastrointestinal fluid volumes was also notified.⁷¹ Also based on emulsification-based processes, nanoemulsions are used as drug delivery systems, for oral administration for example, expecting to improve the oral bioavailability of certain drugs, avoiding the first pass metabolism.³⁰ Other routes of administration were explored for nanoemulsions, for example, Jiang, *et al*, recently formulated nanoemulsions in order to deliver Huperzine A to the central nervous system via the intranasal route, for the treatment of Alzheimer's disease.⁷² However, high production cost and the use of toxic surfactants (e.g. renal toxicity of poloxamer 188) may impede any pharmaceutical application of such nanoemulsions.^{30,73}

Emulsion stabilization

Based on stabilization methods previously described, stabilized emulsions may be used as drug delivery systems. Thus, for example, Douliez, *et al*, stabilized W/W emulsions with Pickering method for the preparation of hydrogels.⁷⁴ The use of Pickering emulsions as oral drug delivery systems may also improve bioavailability, gastrointestinal stability and controlled drug release.⁷⁵ For example, Zhang, *et al*, used puerarin nanocrystals to stabilize O/W emulsion by the Pickering method, increasing puerarin relative bioavailability up to 262.43% compared to coarse powder in suspension.⁷⁶ Furthermore, Khaledian, *et al*, recently used PLA-PEG-FA (PLA: Poly Lactic Acid, PEG: Poly Ethylene Glycol, FA: Folic Acid) block copolymers for the

preparation of magnetic nanoparticles formulated from double emulsion for anticancer application.⁷⁷ The polymeric shell formed was expected to protect the magnetic core, to prevent protein adsorption and to reduce toxicity of nanoparticles.⁷⁷

Formulation processes need sometimes more complex techniques than those previously described to obtain micro and nanomedicines. The most widespread methods consist of hot homogenization, solvent evaporation, polymerization, but also coacervation, salting out or phase inversion.

Hot homogenization

Hot homogenization is a particularly widespread high-energy emulsification method for solid lipid nanoparticles formulation. This process consist in forming emulsion or nanoemulsion (from water and oily phase in the presence of an emulsifier) at a temperature above the melting point of the oily phase and to cool down for droplets crystallization.^{50,78} **Figure 5** represents a schematic process for the formulation of solid lipid nanoparticles by the hot homogenization technique. Structure and spatial organization can be controlled by the system composition and cooling conditions, that may impact protection behavior of particles and release of drugs.⁴³ The major drawback of this method is that it is unsuitable for heat-sensitive molecules.¹⁸ Homogenizer blockage was also reported in case of crystallization during the homogenization process.⁴³ Hot homogenization was widely employed in the formulation of solid lipid nanoparticles. For example, Pandya, *et al*, formulated solid lipid nanoparticles for the administration of olmesartan medoxomil indicated in the treatment of hypertension.²⁸ Based on a fairly similar process, Yang, *et al*, recently formulated microspheres using the water-in-water emulsion method.⁷⁹ Briefly, a starch and a PEG hot aqueous phases were mixed at 55°C and then, the emulsion obtained

was cooled down (4°C / 28h) to solidify droplets of dispersed starch phase.⁷⁹ This study demonstrated an almost 2.3 folds increased of relative bioavailability compared to the marketed formulation.⁷⁹

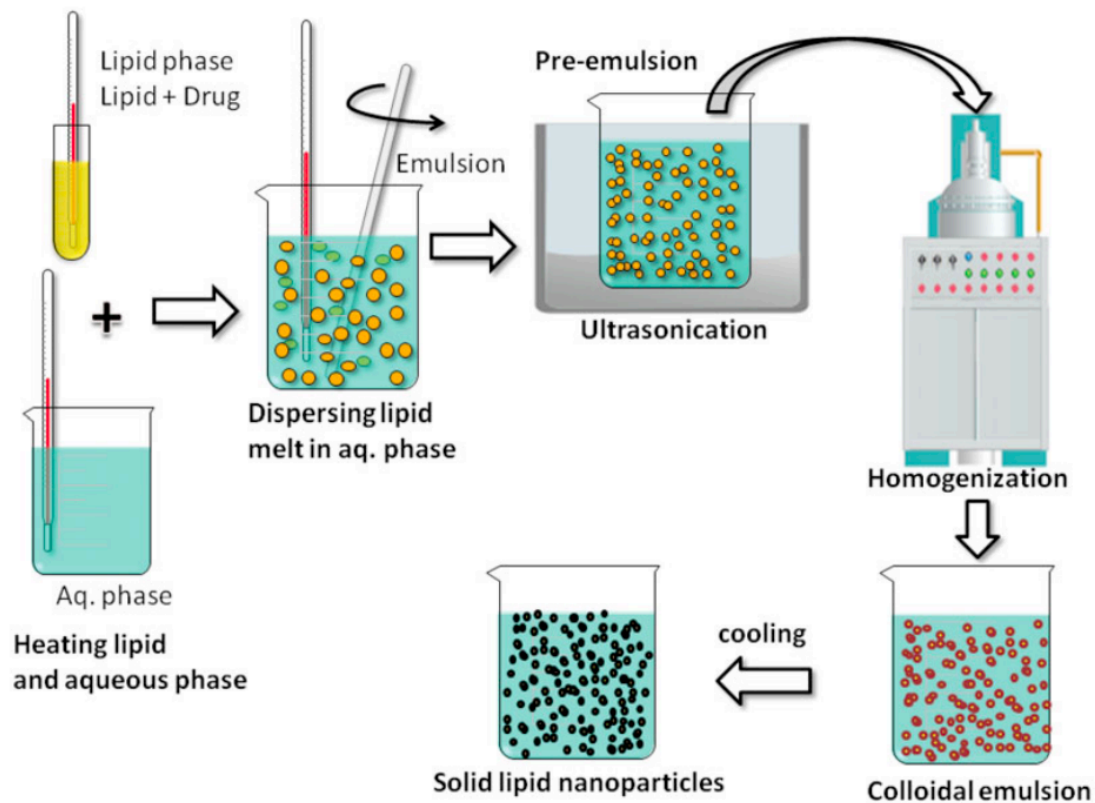


Figure 5. Schematic representation of hot homogenization method for solid lipid nanoparticles formulation⁸⁰

Solvent evaporation

The solvent evaporation method could be applied to single and multiple emulsions such as double emulsions. This technique consists in firstly emulsifying an organic polymer solution in an aqueous phase, then in proceeding to a solvent evaporation and polymer precipitation allowing the hardening of particles.⁸¹ Organic solvents such as methylene chloride (dichloromethane) are commonly used.^{82,83} **Figure 6** schematically represents an emulsification-solvent evaporation process. By this method (mainly used for lipophilic drugs encapsulation), particles size can be

controlled, but the scale up is difficult.⁸² Many nanoparticles and microparticles formulation are based on the solvent evaporation process; among them, for example in 2020, Ameeduzzafar, *et al*, formulated chitosan-coated PLGA nanoparticles for the ophthalmic administration of levofloxacin indicated in the treatment of bacterial conjunctivitis for instance.⁸⁴ Microparticles can also be formulated by the solvent evaporation method, for example, Huang, *et al*, successfully formulated PLGA microparticles carrying tranexamic acid (anti-fibrinolytic molecule) from a double emulsion (W/O/W).⁸⁵ Based on this technique, PLGA-microspheres of leuprolide acetate were commercialized under the name of Lupron Depot[®], indicated in the prostate cancer.⁸⁶

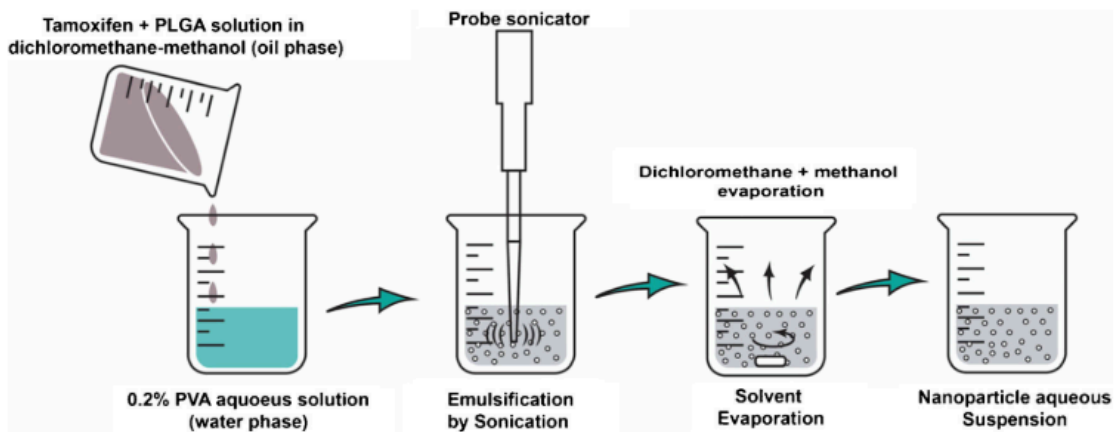


Figure 6. Schematic representation of the emulsification-solvent evaporation process for tamoxifen-loaded nanoparticles formation (Paswan, *et al*.⁸⁷)

Emulsion polymerization

The emulsion polymerization corresponds to the polymerization of monomers of dispersed phase emulsified in the continuous phase.⁸⁸ **Figure 7** schematically represents the emulsion polymerization process with surface active monomers (molecules combining surface activity functions, polymerizability and reactive groups).⁸⁹ This is a fast and scalable method but solvent and monomers toxicities were reported.⁸² This technique has, for instance, already been used for the formation of

dextran microspheres from W/W emulsion composed of PEG and methacrylated dextran.⁹⁰ For biomedical applications, the emulsion polymerization technique was recently used by Vashist, *et al*, for example, in the development of auto-fluorescent micro and nanogels from W/O emulsion.⁹¹

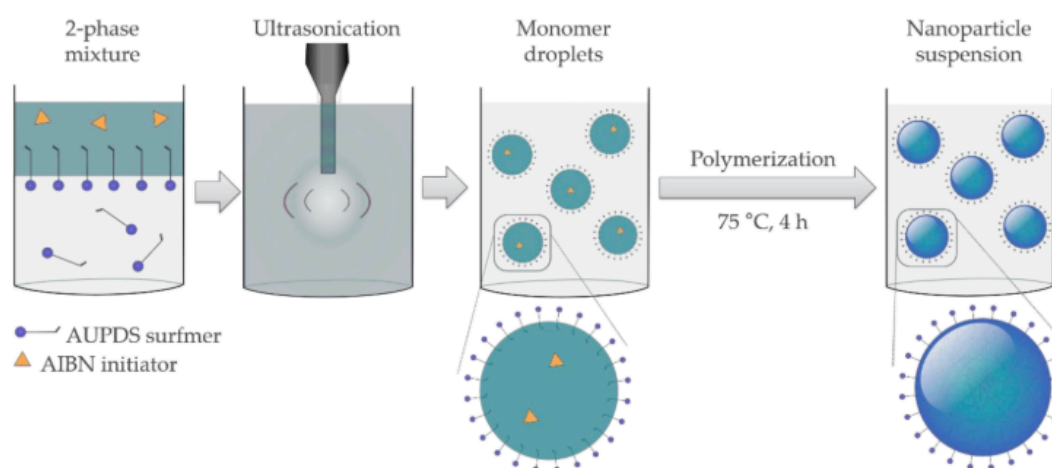


Figure 7. Schematic representation of direct mini-emulsion polymerization from O/W emulsion with *p*-(11-acrylamido) undecanoyloxyphenyl dimethylsulfonium methyl sulfate (AUDPS) functional surface active monomers (surfmers) and azobisisobutyronitrile (AIBN) initiator (Albernaz, *et al.*⁸⁹)

Salting out

In this method, an organic solution containing a drug and an aqueous solution containing a salt are firstly emulsified, then water addition leads to the formation of particles due to the diffusion of the organic solvent into the aqueous phase.⁹² **Figure 8** schematically represents the salting out method. This technique, easily scalable, allows high loading of lipophilic drugs and is suitable for thermosensitive molecules, however, an extensive washing step is required.⁸² Based on this method, Song, *et al*, for example, formulated PLGA nanoparticles co-encapsulating vincristine (anticancer) and verapamil (chemosensitizer) for the treatment of drug resistant cancers.⁹³

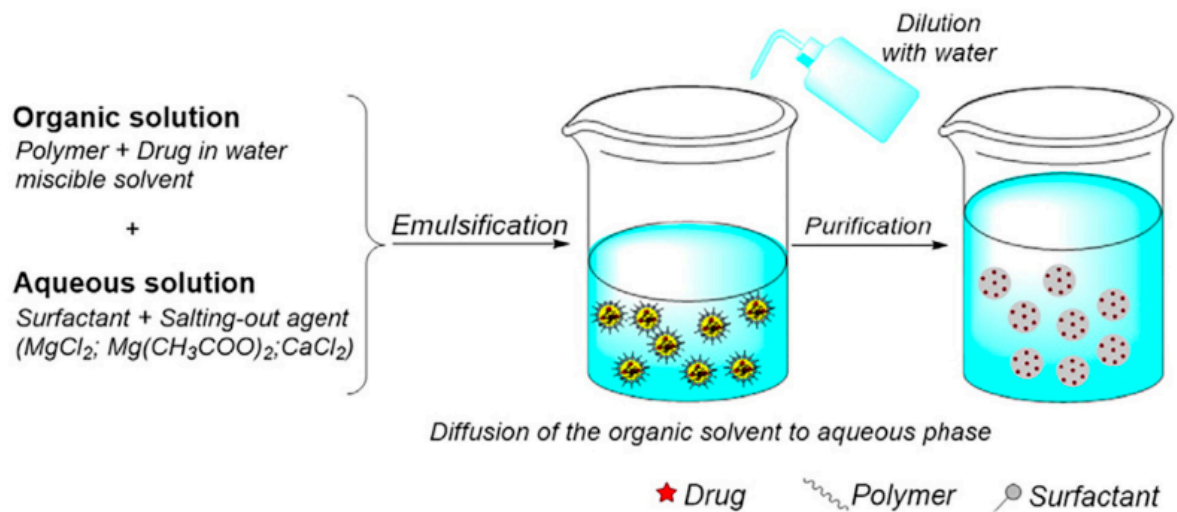


Figure 8. Schematic representation of salting out method (Essa, et al.⁹²)

Coacervation

This chemical method includes simple and complex (emulsion-based) coacervation and allows the encapsulation of molecules. Complex coacervation consists of a first emulsification step, followed by coacervation (electrostatic interactions between polymer charges due to decrease of pH), a droplets gelation by polymers, then hardening (cross-linking).⁹⁴ Schematic formulation process is represented in **Figure 9**. This unexpensive method may allow the control of shape and size of particles and the encapsulation of thermosensitive molecules, but is limited by the sensitivity of components under acidic pH.⁸² Based on this process, Diop, et al, formulated for example, insulin-chitosan nanoparticles for oral administration, showing that combining cross-linking and freeze-drying treatments improve stability and bioefficiency of nanoparticles.⁹⁵

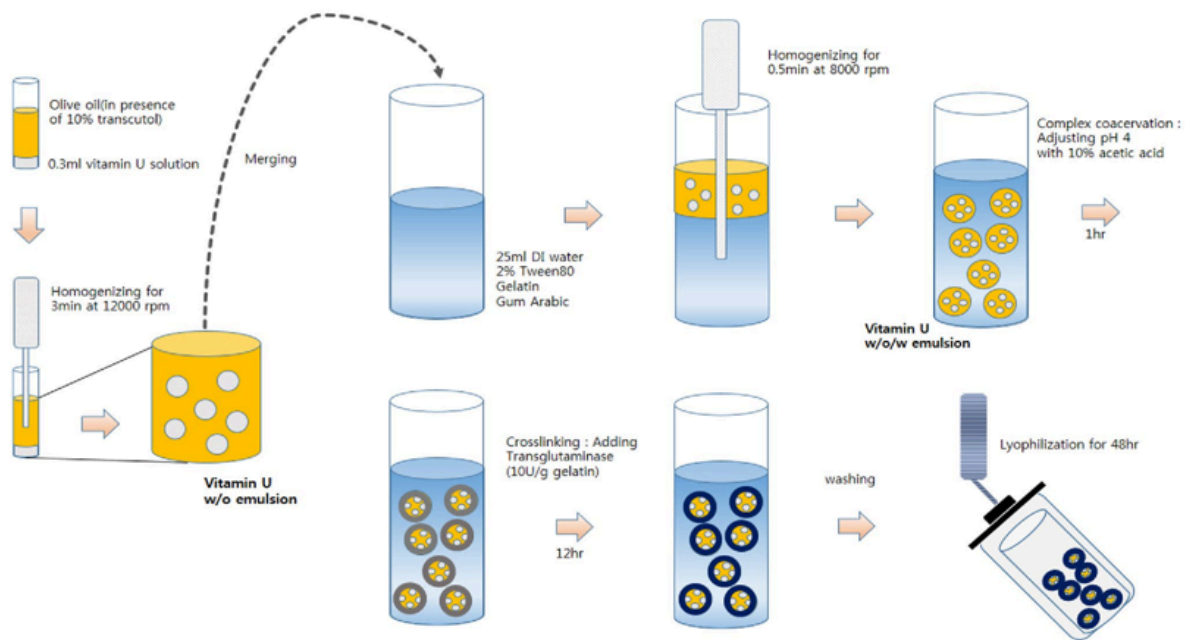


Figure 9. Schematic representation of complex coacervation method for the preparation of complex coacervate microcapsules of vitamin U by multiple emulsion (Kim, *et al.*⁹⁶)

Phase Inversion Temperature

Systems such as lipid nanocapsules are formulated from the Phase Inversion Temperature method.⁹⁷ Indeed, from spontaneous formation of O/W emulsion at low temperature, an inversion phase occurs under heating.²⁴ **Figure 10** schematically represents this process. This solvent-free process allows the formulation of greatly stable nanocapsules in suspension, from which particle size can be adjusted.²⁴ Based on this method, Fressinaud, *et al*, recently formulated lipid with NFL Peptide to target oligodendrocytes in order to promote remyelination in multiple sclerosis treatment.⁹⁸

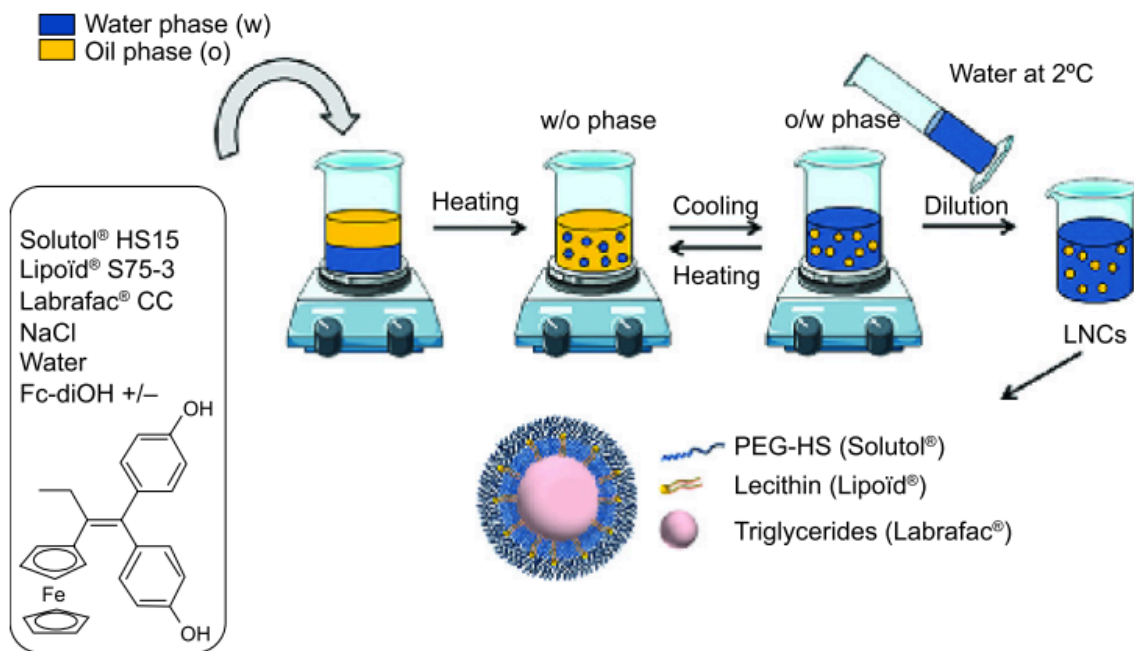


Figure 10. Schematic representation of phase inversion temperature method involved in the formulation of ferrociphenol (Fc-diOH)-loaded lipid nanocapsules (LNCs)(Clavreul, *et al.*⁹⁹)

Finally, **Table 3** reviews recent studies (2019-2020) involving micro and nanomedicines formulations from emulsion-based process.

Table 3. Examples of recent nano and micro drug delivery systems formulation from emulsion-based process

PLGA: Poly(Lactic-co-Glycolic Acid), PLA: Poly Lactic Acid, PCL: Polycaprolactone, PEG: Poly Ethylene Glycol, FA: Folic Acid, DL: Drug Loading, EE: Encapsulation Efficiency, N/A: Not Applicable

	Drug	System	Process	Emulsion type	Size	DL	EE	Administration route	Applications	Ref.
Microparticles	Tranexamic Acid	PLGA microparticles	Double emulsion solvent evaporation	W/O/W	54 - 59 µm	5.38 - 5.67%	N/A	N/A	Hemorrhage and inflammation	85
	Paclitaxel	Aerosol nanocomposite microparticles	Single emulsion solvent evaporation (for NP formulation)	O/W	NP: 200 nm MP: 2.17 µm	3.57%	71.00%	pulmonary	Lung cancer	100
	Diltiazem	Eudragit-based microspheres	Emulsion solvent evaporation	W/O	500 -610 µm	N/A	82% - 92%	oral	Hypertension and angina pectoris	101
	Exenatide	Lecithin nanoparticles in composite PLGA microspheres	Solid-in-oil-in-water multi-emulsion technique	solid/O/W	5.29 µm	0.66%	66.33%	injectable	Type 2 diabetes	102
	Rifapentine	PLA microsphere	Emulsion solvent evaporation	O/W	27.67 µm	35.57%	78.11%	implants	Osteoarticular tuberculosis	103
	BSA & lysozyme	Starch microspheres	w/w emulsion Hot homogenization Solidification by cooling	W/W	10 - 40 µm	0.9-1.4% lysozyme & 10.5-11.7% BSA	6.2 - 10.2% lysozyme & 83.6 - 86.6% BSA	N/A	Protein drug delivery	79
	N/A	Solid particles	Emulsion, phase separation, polymerization by UV irradiation	Complex emulsion	N/A	N/A	N/A	N/A	Drug delivery	104

- Étude bibliographique -

	Drug	System	Process	Emulsion type	Size	DL	EE	Administration route	Applications	Ref.
Gels	N/A	Chitosan-Hydroxyethyl Cellulose nano and microgels	Emulsion polymerization	W/O	100 nm – 300 µm	N/A	N/A	cerebral	Drug delivery in Central Nervous System and image-guided therapy	91
	Fusidic acid & Sodium fusidate	Nanoparticles incorporated in pine oil nanoemulgel	Self-nanoemulsifying technique	O/W	140.58 – 151.86 nm	N/A	N/A	topical	Antibacterial activity	105
	N/A	Microporous annealed particle hydrogel	Emulsion Gelation	W/O	38 µm	N/A	N/A	injectable	Vocal fold augmentation in dysphonia and dysphagia	106
Nanoparticles	Catechin	Chitosan-PLGA nanoparticles	Emulsion solvent evaporation	W/O/W	150.81 nm	8.76%	76.48%	intranasal	Lung cancer	107
	Uncaria Tomentosa Extract	PCL & PLGA nanoparticles	Emulsion solvent evaporation	O/W	107.4 – 247.3 nm	0.76 - 1.56%	64.6 - 81.6%	N/A	Cancer	108
	Levofloxacin	Chitosan-coated PLGA nanoparticles	Single emulsion solvent evaporation	O/W	169.968 nm	11.29%	49.54%	ophthalmic	Bacterial conjunctivitis	84
	Levofloxacin	PLGA nanoparticles	Emulsion solvent evaporation technique with high speed homogenization, probe sonication and lyophilization	N/A	146 nm	N/A	89.83%	pulmonary	Tuberculosis	109
	Resveratrol & Puerarin	PLGA nanoparticles	Emulsion by sonication Solvent evaporation	O/W	238 - 274 nm	7.78 - 21.91%	54.24 - 74.85%	oral	Spinal cord injury / ischemia	110

- Étude bibliographique -

	Drug	System	Process	Emulsion type	Size	DL	EE	Administration route	Applications	Ref.
Nanoparticles	Doxorubicin & Tetrahydro-curcumin	PEG-PLGA nanoparticles	Double emulsion by sonication Solvent evaporation	W/O/W	255.77 nm	6.56%	N/A	N/A	Glioma	111
	Curcumin	Chitosan /carboxymethyl-cellulose PLGA nanoparticles	Emulsion solvent evaporation	O/W	484 - 705 nm	10 %wt de PLGA	98.80%	N/A	Drug delivery	83
	N/A	Poly(3-hexylthiophene) nanoparticles	Emulsion by sonication Nanoprecipitation	O/W	5 - 30 nm	N/A	N/A	N/A	Drug delivery	112
	Quercetin	PLGA nanoparticles	Single emulsion solvent evaporation	O/W	262.6 – 869.7 nm	N/A	93.8 - 95.5%	IV	Ischemic heart disease, atherosclerosis, liver fibrosis, renal injury	113
	Flurbiprofen	Chitosan-Hydroxypropyl-cellulose nanospheres	Cross-linking emulsion	O/W	894 – 1140 nm	N/A	22.50% - 42.53%	oral	Inflammation	114
	Doxorubicin	PLA-PEG-FA magnetic nanoparticles	Double emulsion Solvent polymerization	W/O/W	71.13 – 257.1 nm	0.2 - 0.6%	50.4 - 79.6%	N/A	Cancer	77
	Cisplatin	β -cyclodextrin-sodium alginate grafted magnetic nanospheres	Co-precipitation Double emulsion by sonication	N/A	65 nm	N/A	N/A	N/A	Cancer	115

- Étude bibliographique -

	Drug	System	Process	Emulsion type	Size	DL	EE	Administration route	Applications	Ref.
Nanoparticles	Betaxolol	Montmorillonite-loaded solid lipid nanoparticles	Melt-emulsion sonication and low temperature solidification	W/O/W	149.5 nm	N/A	79.27%	ophthalmic	Glaucoma	116
	Amphotericin B	Solid lipid nanoparticles coated with vitamin B12-stearic acid conjugate	Double emulsion solvent evaporation and thermal sensitive hydrogel	gel/O/W	306.66 nm	38.5%	97.99%	oral	Leishmaniasis	117
	Lidocaine	Lipid nanocarrier	Emulsion Extrusion	N/A	24.9 nm	N/A	N/A	topical	Drug delivery	118
Nanoemulsions	N/A	Nanoemulsion	Self-emulsification	O/W	20 -200 nm	N/A	N/A	injectable	Vaccine adjuvant	119
	Zataria multiflora & Mentha piperita essential oils	Nanoemulsion	Stirring	O/W	129 nm (ZM) 160 nm (MP)	N/A	N/A	N/A	Bacterial infections	120
	Huperzine A	Nanoemulsion	Magnetic stirring	O/W	16.78 nm	N/A	N/A	intranasal	Alzheimer disease	72
	Plai extract	Positively charged nanoemulsion coated with quaternized chitosan	Low-energy emulsification	O/W	202 nm	N/A	N/A	transdermal	Cancer inflammation	121
	Aceclofenac	SEDDS	Self-emulsification	O/W	111.3 – 470.9 nm	6.6% - 7.33%	73.1% - 76%	oral	Inflammation	69
Crystals	Glicazide	PLGA based nanocrystal	Emulsion diffusion, high-pressure homogenization and solvent evaporation	O/W	106.3 nm	N/A	86.27%	oral	Type-2 diabetes	122

Conclusion

Micro and nanomedicines were developed for many applications such as oral, dermal, ocular, nasal or injectable administration covering a large range of diseases treatment. Their structures varying depending on their compositions, allow to deliver molecules of different nature, hydrophilic as well as hydrophobic. Many of those delivery systems were developed from emulsion-based formulation processes including usual homogenization, stabilization methods of emulsions such as Pickering, solvent evaporation method, emulsion polymerization, salting out, coacervation or phase inversion temperature. Each method offers advantages depending on the drug to encapsulate and the route of administration aimed. Recent studies reviewed demonstrated that methods as solvent-evaporation, emulsion polymerization or homogenization are widespread in this study domain. Emulsion-based formulation processes are suitable for many further biomedical applications.

REFERENCES

- 1 M. Bolzinger, S. Briançon and Y. Chevalier, Nanoparticles through the skin: managing conflicting results of inorganic and organic particles in cosmetics and pharmaceuticals, *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomedicine Nanobiotechnology*, 2011, **3**, 463–478.
- 2 P. Couvreur, Nanoparticles in drug delivery: Past, present and future, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2013, **65**, 21–23.
- 3 B. Y. S. Kim, J. T. Rutka and W. C. W. Chan, Nanomedicine, *N. Engl. J. Med.*, 2010, **363**, 2434–2443.
- 4 J. K. Patra, G. Das, L. F. Fraceto, E. V. R. Campos, M. del P. Rodriguez-Torres, L. S. Acosta-Torres, L. A. Diaz-Torres, R. Grillo, M. K. Swamy, S. Sharma, S. Habtemariam and H.-S. Shin, Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects, *J. Nanobiotechnology*, 2018, **16**, 71.
- 5 P. Huang, X. Wang, X. Liang, J. Yang, C. Zhang, D. Kong and W. Wang, Nano-, micro-, and macroscale drug delivery systems for cancer immunotherapy, *Acta Biomater.*, 2019, **85**, 1–26.
- 6 F. Zhou, F. Teng, P. Deng, N. Meng, Z. Song and R. Feng, Recent Progress of Nano-drug Delivery System for Liver Cancer Treatment, *Anticancer. Agents Med. Chem.*, 2018, **17**, 1884–1897.
- 7 Z. Li, S. Tan, S. Li, Q. Shen and K. Wang, Cancer drug delivery in the nano era: An overview and perspectives, *Oncol. Rep.*, 2017, **38**, 611–624.
- 8 S. Hua, E. Marks, J. J. Schneider and S. Keely, Advances in oral nano-delivery systems for colon targeted drug delivery in inflammatory bowel disease: Selective targeting to diseased versus healthy tissue, *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.*, 2015, **11**, 1117–1132.

- 9 I. van der Lubben, Chitosan microparticles for oral vaccination: preparation, characterization and preliminary in vivo uptake studies in murine Peyer's patches, *Biomaterials*, 2001, **22**, 687–694.
- 10 W. Wang, K. Lu, C. Yu, Q. Huang and Y.-Z. Du, Nano-drug delivery systems in wound treatment and skin regeneration, *J. Nanobiotechnology*, 2019, **17**, 82.
- 11 Z. Qamar, F. F. Qizilbash, M. K. Iqbal, A. Ali, J. K. Narang, J. Ali and S. Baboota, Nano-Based Drug Delivery System: Recent Strategies for the Treatment of Ocular Disease and Future Perspective, *Recent Pat. Drug Deliv. Formul.*, 2020, **13**, 246–254.
- 12 S. Reimondez-Troitiño, N. Csaba, M. J. Alonso and M. De La Fuente, Nanotherapies for the treatment of ocular diseases, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2015, **95**, 279–293.
- 13 E. Eljarrat-Binstock, J. Pe'er and A. J. Domb, New Techniques for Drug Delivery to the Posterior Eye Segment, *Pharm. Res.*, 2010, **27**, 530–543.
- 14 F. A. Bruinsmann, G. Richter Vaz, A. de Cristo Soares Alves, T. Aguirre, A. Raffin Pohlmann, S. Stanisçuaski Guterres and F. Sonvico, Nasal Drug Delivery of Anticancer Drugs for the Treatment of Glioblastoma: Preclinical and Clinical Trials, *Molecules*, 2019, **24**, 4312.
- 15 F. Mohammadpour, F. Hadizadeh, M. Tafaghodi, K. Sadri, A. H. Mohammadpour, M. R. Kalani, L. Gholami, A. Mahmoudi and J. Chamani, Preparation, in vitro and in vivo evaluation of PLGA/Chitosan based nano-complex as a novel insulin delivery formulation, *Int. J. Pharm.*, 2019, **572**, 118710.
- 16 H. Zhong, G. Chan, Y. Hu, H. Hu and D. Ouyang, A Comprehensive Map of FDA-Approved Pharmaceutical Products, *Pharmaceutics*, 2018, **10**, 263.
- 17 B. V. N. Nagavarma, H. K. S. Yadav, A. Ayaz, L. S. Vasudha and H. G.

- Shivakumar, Different techniques for preparation of polymeric nanoparticles- A review, *Asian J. Pharm. Clin. Res.*, 2012, **5**, 16–23.
- 18 D. J. McClements, Encapsulation, protection, and delivery of bioactive proteins and peptides using nanoparticle and microparticle systems: A review, *Adv. Colloid Interface Sci.*, 2018, **253**, 1–22.
- 19 F. Farjadian, A. Ghasemi, O. Gohari, A. Roointan, M. Karimi and M. R. Hamblin, Nanopharmaceuticals and nanomedicines currently on the market: challenges and opportunities, *Nanomedicine*, 2019, **14**, 93–126.
- 20 T. M. Allen and P. R. Cullis, Liposomal drug delivery systems: From concept to clinical applications, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2013, **65**, 36–48.
- 21 M. Jiao, P. Zhang, J. Meng, Y. Li, C. Liu, X. Luo and M. Gao, Recent advancements in biocompatible inorganic nanoparticles towards biomedical applications, *Biomater. Sci.*, 2018, **6**, 726–745.
- 22 A. Puri, K. Loomis, B. Smith, J.-H. Lee, A. Yavlovich, E. Heldman and R. Blumenthal, Lipid-Based Nanoparticles as Pharmaceutical Drug Carriers: From Concepts to Clinic, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, 2009, **26**, 523–580.
- 23 A. S. A. Lila and T. Ishida, Liposomal delivery systems: Design optimization and current applications, *Biol. Pharm. Bull.*, 2017, **40**, 1–10.
- 24 N. T. Huynh, C. Passirani, P. Saulnier and J. P. Benoit, Lipid nanocapsules: A new platform for nanomedicine, *Int. J. Pharm.*, 2009, **379**, 201–209.
- 25 T. Briot, E. Roger, S. Thépot, S. Legeay and F. Lagarce, Di- O -lauroyl-decitabine-lipid nanocapsules: toward extending decitabine activity, 2019, 2091–2102.
- 26 A. Gordillo-Galeano and C. E. Mora-Huertas, Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: A review emphasizing on particle structure and drug release, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2018, **133**, 285–308.

- 27 S. U. Bagul, V. V. Pisal, V. N. Solanki and A. Karnavat, Current status of solid lipid nanoparticles: a review, *Mod. Appl. Bioequivalence Bioavailab.*, 2018, **3**, 1–9.
- 28 N. T. Pandya, P. Jani, J. Vanza and H. Tandel, Solid lipid nanoparticles as an efficient drug delivery system of olmesartan medoxomil for the treatment of hypertension, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, 2018, **165**, 37–44.
- 29 Y. H. Choi and H.-K. Han, Nanomedicines: current status and future perspectives in aspect of drug delivery and pharmacokinetics, *J. Pharm. Investig.*, 2018, **48**, 43–60.
- 30 Y. Singh, J. G. Meher, K. Raval, F. A. Khan, M. Chaurasia, N. K. Jain and M. K. Chourasia, Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery, *J. Control. Release*, 2017, **252**, 28–49.
- 31 S. Benita, *Microencapsulation: Methods and Industrial Applications, Second Edition*, CRC Press, 2005.
- 32 L. Plapied, N. Duhem, A. des Rieux and V. Pr at, Fate of polymeric nanocarriers for oral drug delivery, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, 2011, **16**, 228–237.
- 33 S. Movassaghian, O. M. Merkel and V. P. Torchilin, Applications of polymer micelles for imaging and drug delivery, *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomedicine Nanobiotechnology*, 2015, **7**, 691–707.
- 34 Y. Kim, E. J. Park and D. H. Na, Recent progress in dendrimer-based nanomedicine development, *Arch. Pharm. Res.*, 2018, **41**, 571–582.
- 35 R. Narayanaswamy and V. P. Torchilin, Hydrogels and Their Applications in Targeted Drug Delivery, *Molecules*, 2019, **24**, 603.
- 36 C. Dalwadi and G. Patel, Thermosensitive nanohydrogel of 5-fluorouracil for head and neck cancer: preparation, characterization and cytotoxicity assay, *Int. J. Nanomedicine*, 2018, **Volume 13**, 31–33.

- 37 S. A. ÖZKAN, A. DEDEOĞLU, N. KARADAŞ BAKIRHAN and Y. ÖZKAN, Nanocarriers Used Most in Drug Delivery and Drug Release: Nanohydrogel, Chitosan, Graphene, and Solid Lipid, *Turkish J. Pharm. Sci.*, 2019, **16**, 481–492.
- 38 K. Joshi, A. Chandra, K. Jain and S. Talegaonkar, Nanocrystallization: An Emerging Technology to Enhance the Bioavailability of Poorly Soluble Drugs, *Pharm. Nanotechnol.*, 2019, **7**, 259–278.
- 39 W. Jin and J. D. Brennan, Properties and applications of proteins encapsulated within sol–gel derived materials, *Anal. Chim. Acta*, 2002, **461**, 1–36.
- 40 D. J. McClements, *Food Emulsions: Principles, Practices, and Techniques, Third Edition*, CRC Press, 2015.
- 41 D. M. A. Buzza, P. D. I. Fletcher, T. K. Georgiou and N. Ghasdian, Water-in-water emulsions based on incompatible polymers and stabilized by triblock copolymers-templated polymersomes, *Langmuir*, 2013, **29**, 14804–14814.
- 42 M. Iqbal, Y. Tao, S. Xie, Y. Zhu, D. Chen, X. Wang, L. Huang, D. Peng, A. Sattar, M. A. B. Shabbir, H. I. Hussain, S. Ahmed and Z. Yuan, Aqueous two-phase system (ATPS): an overview and advances in its applications, *Biol. Proced. Online*, 2016, **18**, 18.
- 43 D. J. McClements, E. A. Decker and J. Weiss, Emulsion-Based Delivery Systems for Lipophilic Bioactive Components, *J. Food Sci.*, 2007, **72**, R109–R124.
- 44 S. P. Callender, J. A. Mathews, K. Kobernyk and S. D. Wettig, Microemulsion utility in pharmaceuticals: Implications for multi-drug delivery, *Int. J. Pharm.*, 2017, **526**, 425–442.
- 45 G. Vladislavjević, R. Al Nuamani and S. Nabavi, Microfluidic Production of Multiple Emulsions, *Micromachines*, 2017, **8**, 75.
- 46 S. L. Perry and D. J. McClements, Recent Advances in Encapsulation, Protection, and Oral Delivery of Bioactive Proteins and Peptides using Colloidal Systems,

- Molecules*, 2020, **25**, 1161.
- 47 B. F. B. Silva, C. Rodríguez-Abreu and N. Vilanova, Recent advances in multiple emulsions and their application as templates, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, 2016, **25**, 98–108.
- 48 D. J. McClements and S. M. Jafari, Improving emulsion formation, stability and performance using mixed emulsifiers: A review, *Adv. Colloid Interface Sci.*, 2018, **251**, 55–79.
- 49 R. H. Belmiro, A. A. L. Tribst and M. Cristianini, Application of high-pressure homogenization on gums, *J. Sci. Food Agric.*, 2018, **98**, 2060–2069.
- 50 D. J. McClements, Encapsulation, protection, and release of hydrophilic active components: Potential and limitations of colloidal delivery systems, *Adv. Colloid Interface Sci.*, 2015, **219**, 27–53.
- 51 D. J. McClements, Critical Review of Techniques and Methodologies for Characterization of Emulsion Stability, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 2007, **47**, 611–649.
- 52 W. L. Noorduin, E. Vlieg, R. M. Kellogg and B. Kaptein, From Ostwald Ripening to Single Chirality, *Angew. Chemie Int. Ed.*, 2009, **48**, 9600–9606.
- 53 D. J. McClements and C. E. Gumus, Natural emulsifiers — Biosurfactants, phospholipids, biopolymers, and colloidal particles: Molecular and physicochemical basis of functional performance, *Adv. Colloid Interface Sci.*, 2016, **234**, 3–26.
- 54 L. Leclercq and V. Nardello-Rataj, Pickering emulsions based on cyclodextrins: A smart solution for antifungal azole derivatives topical delivery, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2016, **82**, 126–137.
- 55 Y. Chevalier and M. A. Bolzinger, Emulsions stabilized with solid nanoparticles: Pickering emulsions, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, 2013, **439**,

- 23–34.
- 56 M. J. Scott and M. N. Jones, The biodegradation of surfactants in the environment, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, 2000, **1508**, 235–251.
- 57 Y. Chao and H. C. Shum, Emerging aqueous two-phase systems: from fundamentals of interfaces to biomedical applications, *Chem. Soc. Rev.*, 2020, **49**, 114–142.
- 58 P. S. Clegg, J. W. Tavecchi and P. J. Wilde, One-step production of multiple emulsions: microfluidic, polymer-stabilized and particle-stabilized approaches, *Soft Matter*, 2016, **12**, 998–1008.
- 59 L. Hong, G. Sun, J. Cai and T. Ngai, One-Step Formation of W/O/W Multiple Emulsions Stabilized by Single Amphiphilic Block Copolymers, *Langmuir*, 2012, **28**, 2332–2336.
- 60 S. D. Hann, K. J. Stebe and D. Lee, All-Aqueous Assemblies via Interfacial Complexation: Toward Artificial Cell and Microniche Development, *Langmuir*, 2017, **33**, 10107–10117.
- 61 M. Kim, S. J. Yeo, C. B. Highley, J. A. Burdick, P. J. Yoo, J. Doh and D. Lee, One-Step Generation of Multifunctional Polyelectrolyte Microcapsules via Nanoscale Interfacial Complexation in Emulsion (NICE), *ACS Nano*, 2015, **9**, 8269–8278.
- 62 W. Ramsden, Separation of Solids in the Surface-Layers of Solutions and 'Suspensions' (Observations on Surface-Membranes, Bubbles, Emulsions, and Mechanical Coagulation). -- Preliminary Account, *Proc. R. Soc. London*, 1903, **72**, 156–164.
- 63 S. U. Pickering, CXCVI.—Emulsions, *J. Chem. Soc., Trans.*, 1907, **91**, 2001–2021.
- 64 P. E. Ruiz-Rodriguez, D. Meshulam and U. Lesmes, Characterization of Pickering

- O/W Emulsions Stabilized by Silica Nanoparticles and Their Responsiveness to In vitro Digestion Conditions, *Food Biophys.*, 2014, **9**, 406–415.
- 65 Y. Yang, Z. Fang, X. Chen, W. Zhang, Y. Xie, Y. Chen, Z. Liu and W. Yuan, An overview of pickering emulsions: Solid-particle materials, classification, morphology, and applications, *Front. Pharmacol.*, 2017, **8**, 1–20.
- 66 A. Sadeghpour, F. Pirolt and O. Glatter, Submicrometer-sized pickering emulsions stabilized by silica nanoparticles with adsorbed oleic acid, *Langmuir*, 2013, **29**, 6004–6012.
- 67 R. Neslihan Gursoy and S. Benita, Self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) for improved oral delivery of lipophilic drugs, *Biomed. Pharmacother.*, 2004, **58**, 173–182.
- 68 M. Kazi, M. Al-Swairi, A. Ahmad, M. Raish, F. K. Alanazi, M. M. Badran, A. A. Khan, A. M. Alanazi and M. D. Hussain, Evaluation of self-nanoemulsifying drug delivery systems (SNEDDS) for poorly water-soluble talinolol: Preparation, in vitro and in vivo Assessment, *Front. Pharmacol.*, 2019, **10**, 1–13.
- 69 C. Jianxian, K. Saleem, M. Ijaz, M. Ur-Rehman, G. Murtaza and M. H. Asim, Development and in vitro Evaluation of Gastro-protective Aceclofenac-loaded Self-emulsifying Drug Delivery System, *Int. J. Nanomedicine*, 2020, **Volume 15**, 5217–5226.
- 70 A. Mahmood and A. Bernkop-Schnürch, SEDDS: A game changing approach for the oral administration of hydrophilic macromolecular drugs, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2019, **142**, 91–101.
- 71 S. Gupta, R. Kesarla and A. Omri, Formulation strategies to improve the bioavailability of poorly absorbed drugs with special emphasis on self-emulsifying systems., *ISRN Pharm.*, 2013, **2013**, 16.
- 72 Y. Jiang, C. Liu, W. Zhai, N. Zhuang, T. Han and Z. Ding, The Optimization

- Design Of Lactoferrin Loaded HupA Nanoemulsion For Targeted Drug Transport Via Intranasal Route, *Int. J. Nanomedicine*, 2019, **Volume 14**, 9217–9234.
- 73 M. Emanuele and B. Balasubramaniam, Differential Effects of Commercial-Grade and Purified Poloxamer 188 on Renal Function, *Drugs R. D.*, 2014, **14**, 73–83.
- 74 J.-P. Douliez, N. Martin, T. Beneyton, J.-C. Eloi, J.-P. Chapel, L. Navailles, J.-C. Baret, S. Mann and L. Béven, Preparation of Swellable Hydrogel-Containing Colloidosomes from Aqueous Two-Phase Pickering Emulsion Droplets, *Angew. Chemie Int. Ed.*, 2018, **57**, 7780–7784.
- 75 Z. Tai, Y. Huang, Q. Zhu, W. Wu, T. Yi, Z. Chen and Y. Lu, Utility of Pickering emulsions in improved oral drug delivery, *Drug Discov. Today*, , DOI:10.1016/j.drudis.2020.09.012.
- 76 J. Zhang, J. Zhang, S. Wang and T. Yi, Development of an oral compound pickering emulsion composed of nanocrystals of poorly soluble ingredient and volatile oils from traditional chinese medicine, *Pharmaceutics*, 2018, **10**, 1. – 13.
- 77 M. Khaledian, M. S. Nourbakhsh, R. Saber, H. Hashemzadeh and M. H. Darvishi, Preparation and Evaluation of Doxorubicin-Loaded PLA–PEG–FA Copolymer Containing Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles (SPIONs) for Cancer Treatment: Combination Therapy with Hyperthermia and Chemotherapy, *Int. J. Nanomedicine*, 2020, **Volume 15**, 6167–6182.
- 78 D. J. McClements, Advances in nanoparticle and microparticle delivery systems for increasing the dispersibility, stability, and bioactivity of phytochemicals, *Biotechnol. Adv.*, 2020, **38**, 107287.
- 79 H. Yang, Y. Yang, B.-Z. Li, B. Adhikari, Y. Wang, H.-L. Huang and D. Chen, Production of protein-loaded starch microspheres using water-in-water

- emulsion method, *Carbohydr. Polym.*, 2020, **231**, 115692.
- 80 A. K. Jain and S. Thareja, In vitro and in vivo characterization of pharmaceutical nanocarriers used for drug delivery, *Artif. Cells, Nanomedicine, Biotechnol.*, 2019, **47**, 524–539.
- 81 I. D. Rosca, F. Watari and M. Uo, Microparticle formation and its mechanism in single and double emulsion solvent evaporation, *J. Control. Release*, 2004, **99**, 271–280.
- 82 M. Iqbal, N. Zafar, H. Fessi and A. Elaissari, Double emulsion solvent evaporation techniques used for drug encapsulation, *Int. J. Pharm.*, 2015, **496**, 173–190.
- 83 S. Inphonlek, P. Sunintaboon, M. Léonard and A. Durand, Chitosan/carboxymethylcellulose-stabilized poly(lactide-co-glycolide) particles as bio-based drug delivery carriers, *Carbohydr. Polym.*, 2020, **242**, 116417.
- 84 Aameeduzzafar, N. Khan, N. K. Alruwaili, S. N. A. Bukhari, B. Alsuwayt, M. Afzal, S. Akhter, M. Yasir, M. Elmowafy, K. Shalaby and A. Ali, Improvement of ocular efficacy of levofloxacin by bioadhesive Chitosan coated PLGA nanoparticles: Box-behnken design, in-vitro characterization, antibacterial evaluation and scintigraphy study, *Iran. J. Pharm. Res.*, 2020, **19**, 292–311.
- 85 M.-H. Huang, S.-Y. Huang, Y.-X. Chen, C.-Y. Chen and Y.-S. Lin, Elaboration of Charged Poly(Lactic-co-Glycolic Acid) Microparticles for Effective Release of Tranexamic Acid, *Polymers (Basel)*, 2020, **12**, 808.
- 86 N. T. Hwisa, P. Katakam, B. R. Chandu and S. K. Adiki, Solvent Evaporation Techniques as Promising Advancement in Microencapsulation, *Vedic Res. Int. Biol. Med. Chem.*, 2013, **1**, 8.
- 87 S. K. Paswan and T. R. Saini, Purification of Drug Loaded PLGA Nanoparticles Prepared by Emulsification Solvent Evaporation Using Stirred Cell Ultrafiltration

- Technique, *Pharm. Res.*, 2017, **34**, 2779–2786.
- 88 R. Jenjob, T. Phakkeeree, F. Seidi, M. Theerasilp and D. Crespy, Emulsion Techniques for the Production of Pharmacological Nanoparticles, *Macromol. Biosci.*, 2019, **19**, 1900063.
- 89 V. Albernaz, M. Bach, A. Weber, A. Southan and G. Tovar, Active Ester Containing Surfmer for One-Stage Polymer Nanoparticle Surface Functionalization in Mini-Emulsion Polymerization, *Polymers (Basel)*., 2018, **10**, 408.
- 90 R. J. H. Stenekes, O. Franssen, E. M. G. van Bommel, D. J. A. Crommelin and W. E. Hennink, The use of aqueous PEG/dextran phase separation for the preparation of dextran microspheres, *Int. J. Pharm.*, 1999, **183**, 29–32.
- 91 A. Vashist, V. Atluri, A. Raymond, A. Kaushik, T. Parira, Z. Huang, A. Durygin, A. Tomitaka, R. Nikkhah-Moshaie, A. Vashist, M. Agudelo, H. S. Chand, I. Saytashev, J. C. Ramella-Roman and M. Nair, Development of Multifunctional Biopolymeric Auto-Fluorescent Micro- and Nanogels as a Platform for Biomedical Applications, *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 2020, **8**, 1–16.
- 92 D. Essa, P. P. D. Kondiah, Y. E. Choonara and V. Pillay, The Design of Poly(lactide-co-glycolide) Nanocarriers for Medical Applications, *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 2020, **8**, 1–20.
- 93 X. R. Song, Z. Cai, Y. Zheng, G. He, F. Y. Cui, D. Q. Gong, S. X. Hou, S. J. Xiong, X. J. Lei and Y. Q. Wei, Reversion of multidrug resistance by co-encapsulation of vincristine and verapamil in PLGA nanoparticles, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2009, **37**, 300–305.
- 94 J. Jayanudin, R. Rochmadi, M. Fahrurrozi and S. Wirawan, Microencapsulation Technology of Ginger Oleoresin With Chitosan as Wall Material: A review, *J. Appl. Pharm. Sci.*, 2016, **6**, 209–223.

- 95 M. Diop, N. Auberval, A. Viciglio, A. Langlois, W. Bietiger, C. Mura, C. Peronet, A. Bekel, D. Julien David, M. Zhao, M. Pinget, N. Jeandidier, C. Vauthier, E. Marchioni, Y. Frere and S. Sigrist, Design, characterisation, and bioefficiency of insulin-chitosan nanoparticles after stabilisation by freeze-drying or cross-linking, *Int. J. Pharm.*, 2015, **491**, 402–408.
- 96 J.-S. Kim, K.-T. Kim, J.-H. Park, J.-Y. Lee, M. Kim, H. G. Min, I.-H. Moon, C.-Y. Choi, B. H. Kim and D.-D. Kim, Coacervate microcapsules of vitamin U optimized by central composite design (CCD), *J. Pharm. Investig.*, 2019, **49**, 313–321.
- 97 N. Anton, P. Gayet, J.-P. Benoit and P. Saulnier, Nano-emulsions and nanocapsules by the PIT method: An investigation on the role of the temperature cycling on the emulsion phase inversion, *Int. J. Pharm.*, 2007, **344**, 44–52.
- 98 C. Fressinaud, O. Thomas, A. M. Umerska and P. Saulnier, Lipid Nanoparticles Vectorized with NFL-TBS.40-63 Peptide Target Oligodendrocytes and Promote Neurotrophin-3 Effects After Demyelination In Vitro, *Neurochem. Res.*, 2020, **45**, 2732–2748.
- 99 A. Clavreul, A. Montagu, A. L. Lainé, C. Tétaud, N. Lautram, F. Franconi, C. Passirani, A. Vessières, C. N. Montero-Menei and P. Menei, Targeting and treatment of glioblastomas with human mesenchymal stem cells carrying ferrociphenol lipid nanocapsules, *Int. J. Nanomedicine*, 2015, **10**, 1259–1271.
- 100 E. A. Torrico Guzmán, Q. Sun and S. A. Meenach, Development and Evaluation of Paclitaxel-Loaded Aerosol Nanocomposite Microparticles and Their Efficacy Against Air-Grown Lung Cancer Tumor Spheroids, *ACS Biomater. Sci. Eng.*, 2019, **5**, 6570–6580.
- 101 N. BOLOURCHIAN and M. BAHJAT, Design and *In Vitro* Evaluation of Eudragit-

- Based Extended Release Diltiazem Microspheres for Once- and Twice-Daily Administration: The Effect of Coating on Drug Release Behavior, *Turkish J. Pharm. Sci.*, 2019, **16**, 340–347.
- 102 N. Dong, C. Zhu, J. Jiang, D. Huang, X. Li, G. Quan, Y. Liu, W. Tan, X. Pan and C. Wu, Development of composite PLGA microspheres containing exenatide-encapsulated lecithin nanoparticles for sustained drug release, *Asian J. Pharm. Sci.*, 2020, **15**, 347–355.
- 103 Z. Wang, X. Song, H. Yang, A. Maimaitiali and T. Wang, Development and in vitro characterization of rifapentine microsphere-loaded bone implants: a sustained drug delivery system, *Ann. Palliat. Med.*, 2020, **9**, 375–387.
- 104 F. Zhang, L. Jiang, C. Zeng, C. Wang, J. Wang, X. Ke and L. Zhang, Complex emulsions for shape control based on mass transfer and phase separation, *Soft Matter*, 2020, **16**, 5981–5989.
- 105 A. M. Eid, I. Istateyeh, N. Salhi and T. Istateyeh, Antibacterial Activity of Fusidic Acid and Sodium Fusidate Nanoparticles Incorporated in Pine Oil Nanoemulgel, *Int. J. Nanomedicine*, 2019, **Volume 14**, 9411–9421.
- 106 L. Pruet, H. Koehn, T. Martz, I. Churnin, S. Ferrante, L. Salopek, P. Cottler, D. R. Griffin and J. J. Daniero, Development of a microporous annealed particle hydrogel for long-term vocal fold augmentation, *Laryngoscope*, 2019, lary.28442.
- 107 N. Ahmad, R. Ahmad, R. A. Alrasheed, H. M. A. Almatar, A. S. Al-Ramadan, T. M. Buhezah, H. S. AlHomoud, H. A. Al-Nasif and M. A. Alam, A Chitosan-PLGA based catechin hydrate nanoparticles used in targeting of lungs and cancer treatment, *Saudi J. Biol. Sci.*, 2020, **27**, 2344–2357.
- 108 A. F. RIBEIRO, J. F. SANTOS, R. R. MATTOS, E. G. O. BARROS, L. E. NASCIUTTI, L. M. CABRAL and V. P. DE SOUSA, Characterization and in vitro

- antitumor activity of polymeric nanoparticles loaded with *Uncaria tomentosa* extract, *An. Acad. Bras. Cienc.*, 2020, **92**, 1–16.
- 109 S. R. Shah, H. R. Prajapati, D. B. Sheth, E. M. Gondaliya, A. J. Vyas, M. M. Soniwala and J. R. Chavda, Pharmacokinetics and in vivo distribution of optimized PLGA nanoparticles for pulmonary delivery of levofloxacin, *J. Pharm. Pharmacol.*, 2020, **72**, 1026–1037.
- 110 W. Chen, Z. Zhao, S. Zhao, L. Zhang and Q. Song, Resveratrol and Puerarin loaded polymeric nanoparticles to enhance the chemotherapeutic efficacy in spinal cord injury, *Biomed. Microdevices*, 2020, **22**, 69.
- 111 X. Zhang, L. Zhao, G. Zhai, J. Ji and A. Liu, Multifunctional Polyethylene Glycol (PEG)-Poly (Lactic-Co-Glycolic Acid) (PLGA)-Based Nanoparticles Loading Doxorubicin and Tetrahydrocurcumin for Combined Chemoradiotherapy of Glioma, *Med. Sci. Monit.*, 2019, **25**, 9737–9751.
- 112 J. Liu, A. Wang, X. Liu, W. Huang and M. Nagai, Ultrasmall Polymer Nanoparticles Formed by Instantaneous Nanosplitting of Surfactant-Free Emulsion, *Langmuir*, 2020, **36**, 7933–7942.
- 113 S. Derman, D. Uzunoglu, T. Acar, T. Arasoglu, S. Ucak, V. Cengiz Ozalp and B. Mansuroglu, Antioxidant activity and hemocompatibility study of quercetin loaded plga nanoparticles, *Iran. J. Pharm. Res.*, 2020, **19**, 424–435.
- 114 N. Işıklan and Ü. H. Erol, Design and evaluation of temperature-responsive chitosan/hydroxypropyl cellulose blend nanospheres for sustainable flurbiprofen release, *Int. J. Biol. Macromol.*, 2020, **159**, 751–762.
- 115 A. Darini, T. Eslaminejad, S. N. Nematollahi Mahani and M. Ansari, Magnetogel Nanospheres Composed of Cisplatin-Loaded Alginate/B-Cyclodextrin as Controlled Release Drug Delivery, *Adv. Pharm. Bull.*, 2019, **9**, 571–577.
- 116 S. Liu, X. Han, H. Liu, Y. Zhao, H. Li, I. D. Rupenthal, Z. Lv, Y. Chen, F. Yang, Q.

- Ping, Y. Pan and D. Hou, Incorporation of ion exchange functionalized-montmorillonite into solid lipid nanoparticles with low irritation enhances drug bioavailability for glaucoma treatment, *Drug Deliv.*, 2020, **27**, 652–661.
- 117 A. Singh, G. Yadagiri, S. Parvez, O. P. Singh, A. Verma, S. Sundar and S. L. Mudavath, Formulation, characterization and in vitro anti-leishmanial evaluation of amphotericin B loaded solid lipid nanoparticles coated with vitamin B12-stearic acid conjugate, *Mater. Sci. Eng. C*, 2020, **117**, 111279.
- 118 M. Guo, Y. Wei, H. Lee, J. Maia and E. Morrison, One-step extrusion of concentrated lidocaine lipid nanocarrier (LNC) dispersions, *Int. J. Pharm.*, 2020, **589**, 119817.
- 119 L. Zhao, Z. Zhu, L. Ma and Y. Li, O/W nanoemulsion as an adjuvant for an inactivated H3N2 influenza vaccine: Based on particle properties and mode of carrying, *Int. J. Nanomedicine*, 2020, **15**, 2071–2083.
- 120 M. Osanloo, A. Abdollahi, A. Valizadeh and N. Abedinpour, Antibacterial potential of essential oils of *Zataria multiflora* and *Mentha piperita*, micro- and nano-formulated forms, *Iran. J. Microbiol.*, 2020, **12**, 43–51.
- 121 U. Luesakul, S. Puthong, K. Sansanaphongpricha and N. Muangsin, Quaternized chitosan-coated nanoemulsions: A novel platform for improving the stability, anti-inflammatory, anti-cancer and transdermal properties of Plai extract, *Carbohydr. Polym.*, 2020, **230**, 115625.
- 122 B. P. Panda, R. Krishnamoorthy, S. K. Bhattamisra, N. K. H. Shivashekaregowda, L. Bin Seng and S. Patnaik, Fabrication of Second Generation Smarter PLGA Based Nanocrystal Carriers for Improvement of Drug Delivery and Therapeutic Efficacy of Gliclazide in Type-2 Diabetes Rat Model, *Sci. Rep.*, 2019, **9**, 17331.

PARTIE I

PARTIE I

Systemes diphasiques aqueux : procede de formulation simple en une seule etape et caracterisation par diagramme de phase

CONTEXTE

L'utilisation de systemes diphasiques aqueux en vue d'une application pharmaceutique necessite une caracterisation prealable approfondie de leurs proprietes. En effet, les conditions de formulation seront determinees par des parametres tels que les concentrations en polymeres utilises ou leur degre de purete par exemple.

OBJECTIF

L'objectif de cette etude a consiste en la caracterisation des systemes diphasiques aqueux composés de dextrane et de PEO par l'utilisation d'une methode manuelle et de deux methodes automatiques (LUMiSizer® et Turbiscan) pour la construction de diagrammes de phase.

Ce travail est publie dans *Colloid and Polymer Science*. (F. Dumas, E. Roger, J. Rodriguez, L. Benyahia and J.-P. Benoit, Aqueous Two-Phase Systems: simple one-step process formulation and phase diagram for characterisation, *Colloid Polym. Sci.*,2020.)

AQUEOUS TWO-PHASE SYSTEMS: SIMPLE ONE-STEP PROCESS FORMULATION AND PHASE DIAGRAM FOR CHARACTERISATION

Abstract

Aqueous two-phase system (ATPS), also called “water-in-water” emulsion, is a multi-component system (aqueous droplets dispersed in a continuous aqueous phase), formed after gently mixing two aqueous solutions of immiscible polymers. It allows the formation of different compartments without adding any organic solvent, according to a green process. Nevertheless, the kinetic stability of ATPS is generally difficult to control. Phase diagrams, which express the concentration of a polymer as a function of that of the other in solution, are used to characterise ATPS and to determine conditions for preparing emulsions from selected polymers. In this study, dextran and polyethylene oxide aqueous mixtures with different processing parameters are investigated. Phase diagrams are generated through two automatic methods (Turbiscan and LUMiSizer® technologies) and a manual one. With the diagrams obtained, it is concluded that the purity of polyethylene oxide affects the ATPS, whereas the use of polymers in powder or in solution form has no effect. In view of this result, it is allowed to prepare ATPS formulation by a simple one-step process from polymers in powder form.

Keywords: Aqueous two-phase system, Phase diagram, Dextran, Polyethylene oxide

Introduction

Aqueous two-phase systems (ATPS), also known as “water-in-water” emulsions, are mixtures of hydrosoluble but incompatible polymers in water. In these systems, droplets (in general in the micrometer range) of an aqueous solution of one of the polymers are dispersed in a continuous phase consisting of an aqueous solution of the other polymer ¹. Such systems can be scaled up easily and they are cheap to formulate ². Given the mild conditions used and the rapidity of the process ^{3,4}, ATPS are particularly useful for the separation and purification of biomolecules ^{5,6}, such as proteins, enzymes (e.g. fungal laccases used in the production of antibiotics, anti-cancer or anaesthetic molecules), monoclonal antibodies (e.g. IgG, anti-CD34)⁷ and even cells ⁸ (platelets isolated from blood ⁹, confinement of cells to form 3D culture of cancer cells (spheroids) ¹⁰). Some differences between the three-dimensional structures of closely related proteins can also be identified by exploring their partitioning in ATPS with different ionic compositions ¹¹. In medicine, ATPS are used in gene therapy (for the isolation of DNA or nucleic acids) and vaccination (purification and concentration of viruses) ⁷. ATPS are formed by a “green” process without adding any organic solvent ^{12,13}. This is a particularly attractive characteristic for the agrofood sector, for the detection or extraction of low-molecular weight molecules and residues of medicinal products in water, even at very low concentrations (e.g., residues of antibiotics, pesticides or herbicides) ⁷. Various other applications have been developed for ATPS, including uses in the separation of metals or metal ions, textile dyes in washing water, and the extraction of products of fermentation by micro-organisms ⁷.

ATPS can be formulated by mixing at least two thermodynamically incompatible polymers in aqueous solution ¹⁴. Aqueous phases including a polymer and a salt (e.g. PEG/phosphate), respectively, can also form ATPS ². Other systems

use different compounds, such as guar gum, hydroxypropyl starch, polysorbate, ethylene or propylene oxide copolymers (EOPO) ². Many of the most frequently studied ATPS are based on pairs of dextran and polyethylene oxide polymers of different molecular weights (polyethylene glycol (PEG) or polyethylene oxide (PEO)). These two different types of polymers are immiscible in certain proportions, in which their mixture results in ATPS ¹⁵. PEG polymers, with the formula $(-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-)_n$, are linear polyethers composed of ethylene glycol monomers. Their chain length is variable, making it possible to adjust their molecular weight for diverse possibilities. A PEG is often referred as "PEO" if its molecular weight exceeds $20 \text{ kg}\cdot\text{mol}^{-1}$. Dextran is a natural polysaccharide polymer produced by bacteria. The use of dextran/PEG polymer combinations to create ATPS presents several advantages for the separation of biomolecules, such as proteins ¹⁶. However, such emulsions are restricted by their dynamic behaviour, which leads to droplet deformation ¹⁴. The Quality-by-Design approach ensures high-quality formulation through the use of a well-designed process. It has already been used to improve our understanding of novel formulation processes, for drug-loaded nanoparticles for example ¹⁷. In this context, many characterisation studies are required during the development of ATPS. Emulsion structure has been shown to depend on viscosity, interfacial tensions, resistance to bending and interfacial permeability ¹⁸. All these properties affect the phase separation process ¹⁸. Many characterisation methods are based on the study of the interfacial tension between the dispersed and continuous phases ^{14,19-21}. Theories and models have been developed to explain the deformation/relaxation behaviour of ATPS ^{1,22}. The main problem with such formulations is the strong destabilisation displayed by emulsions, in which rapid droplet deformation causes significant instability. Some studies ^{19,20} have characterised emulsions with phase diagrams ²³, to

determine the optimal formulation conditions. Phase diagrams express the concentration of a polymer as function of that of another polymer in solution (Fig.1).

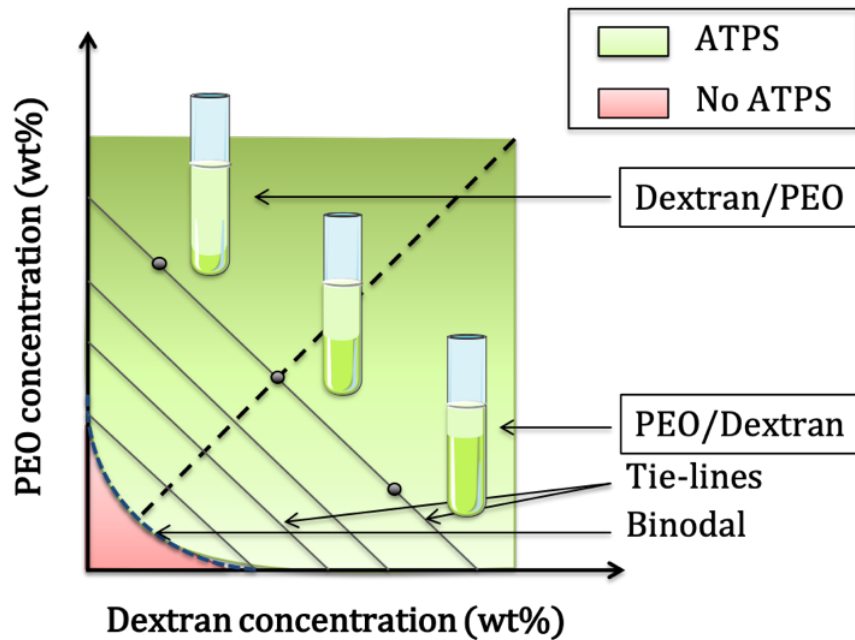


Figure 1. Schematic representation of phase diagram with binodal curve separating ATPS from no ATPS region, and tie-lines obtained for the couple of polymers PEO and dextran

They present “tie-lines”, which connect two points corresponding to the concentrations of the totally separated phases. They also show the binodal curve, which defines the limits of the multiphase system. Below this curve, the polymers are miscible. Phase diagrams can be used to evaluate the effects of temperature and polymer molecular weight on the composition of the aqueous phases of emulsions, for example. At higher polymer molecular weights, the binodal curves are pushed down to lower polymer concentrations ²⁴. These diagrams can be used to determine the conditions required for the formation of emulsions from given polymers as function as their concentrations. For biomedical applications, ATPS containing less than 5 wt% of either PEG (25 to 45 kg.mol⁻¹) and dextran (450 to 650 kg.mol⁻¹) are

more suitable due to short dissolution time and low interfacial tension ²⁵. However, ATPS composed of PEG (8 kg.mol⁻¹) and dextran (500 kg.mol⁻¹ or 66.9 kg.mol⁻¹), with concentrations of 9.6 wt % of PEG and 1.0 wt % of dextran (500 kg.mol⁻¹), or concentrations of 4.2 wt % of PEG and 9.8 wt % of dextran (66.9 kg.mol⁻¹) provided the best conditions for lipase or lutein extraction, respectively ^{26,27}. Finally, for the couple of PEO (200 kg.mol⁻¹) and dextran (500 kg.mol⁻¹), Balakrishnan, *et al.* determined phase diagram studying concentrations up to 8 wt% of PEO and 4 wt% of dextran ¹⁹. Thus, in this study, the phase diagrams of PEO (molecular weight 200 kg.mol⁻¹) and dextran (molecular weight 500 kg.mol⁻¹) mixtures as a means of characterising ATPS were explored in this last range of concentration. A workability area was identified for this pair of polymers, and a binodal curve and phase diagram were generated. One manual and two automatic methods of characterisation (Turbiscan and LUMiSizer[®] technologies) were compared. LUMiSizer[®] uses cutting-edge STEP- (space and time-resolved extinction profiles) technology whereas Turbiscan TOWER uses S-MLS (static multiple light scattering). Both these technologies involve optical methods for the characterisation of concentrated liquid dispersions without the need for dilution. Near-infrared light source extinction profiles are obtained from transmission detectors that recover signals by scanning from the bottom to the top of the sample. The main difference between these two technologies is the destabilisation process, which is accelerated by centrifugal force in the LUMiSizer[®] technique. The impacts of polymer state (solid or solution) and PEO purity on the phase diagrams were evaluated.

Material & Methods

Materials

Dextran from *Leuconostoc mesenteroides* (Mw: 500 kg.mol⁻¹), and polyethylene oxide (PEO) (Mw: 200 kg.mol⁻¹) were provided by Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Water purified with the MilliQ filtration system (Millipore, Paris, France) was used for all formulations.

Methods

PEO purification process

Impurities present in the PEO were removed by dissolving the PEO in water and centrifuging (5810R centrifuge, Eppendorf AG Hamburg, Germany) for 5 minutes at 4,000 rpm. The impurities were removed as the pellet. The supernatant was centrifuged several times under the same conditions until no impurities pellet was obtained. The supernatant containing PEO was then freeze-dried (Lyovac GT2 (Steris, Germany)/CC-505 (Huber, Germany)) to obtain a purified PEO powder.

Preparation of aqueous mixtures of dextran and PEO (at room temperature)

For mixtures of polymers in solutions (liquid state), aqueous stock solutions of 100 mg/mL dextran and 200 mg/mL PEO were first prepared. These two solutions were then mixed in different proportions.

For mixtures of polymers in powder form (solid state), the dextran and PEO powders were weighed directly and dissolved in water.

Binodal determination

The binodal curve was determined by the visual method. Different concentrations of PEO and dextran mixtures (ranging from 0.0 wt% to 2.0 and

4.0 wt%, respectively) were studied, with the polymers in powder form or in aqueous solution. The binodal points were determined by visual for signs of phase separation (interface observation) after three days at room temperature. If phase separation occurred, two phases were observed, corresponding to an emulsion. If no phase separation occurred, there was only a single phase, corresponding to a solution. Obtained results were reported on a map constructed with initial concentration of each polymer. Thus, a first global workability map was designed based on formulations from polymers in powder form with non-purified PEO. The edges of the binodal curve were then studied under different conditions (PEO purified and non-purified, and polymers in solution or in powder form).

Phase diagram generation

Phase diagrams were obtained by mixing polymers to obtain final concentrations of 2.0 wt% dextran and 1.0 to 8.0 wt% PEO. The effects of the initial state of the polymers (solution or powder) and PEO purity were studied. Phase separation was investigated with one manual and two automatic methods.

Manual method: aqueous mixtures were stored at room temperature for 5 days and the height of each phase was measured manually.

Turbiscan automatic method: in a 4 mL cylindrical cell, aqueous mixtures were stored at room temperature for 5 days and analysed with a Turbiscan TOWER (Formulation, Toulouse, France). Analyses were performed for 4 hours (1 scan every 5 minutes) at 25°C and the height of each phase was measured graphically with Turbisoft software. Further details of this method are provided in the Supporting Information (Fig. S3).

LUMiSizer® automatic method: in a rectangular cell (10 mm-diameter round top), aqueous mixtures were centrifuged in a LUMiSizer® (LUM GmbH, Berlin,

Germany) at 4,000 rpm for 5 minutes at room temperature. The two forming phases were clear and the height of each phase was measured graphically with SEView® software.

An abacus was set up with water in the glassware used to correlate the height and volume of a phase. From obtained equation, the volume of total aqueous mixture (V_{total}) and the volume of each phase ($V_{\text{polymer phase}}$) were determined and the mass of water in the polymer-rich phase ($m_{\text{water phase}}$) were calculated according to Eq. 1, assuming a homogeneous distribution of water in the samples. Then, in each polymer-rich phase, experimental polymer concentrations were calculated according to Eq. 2.

$$(1) \quad m_{\text{water phase}} \text{ (g)} = \frac{m_{\text{water total}} \text{ (g)} \times V_{\text{polymer phase}} \text{ (mL)}}{V_{\text{total}} \text{ (mL)}}$$

$$(2) \quad \text{Experimental polymer concentration (wt\%)} = \frac{m_{\text{polymer}} \text{ (g)}}{m_{\text{polymer}} \text{ (g)} + m_{\text{water phase}} \text{ (g)}}$$

(where m_{polymer} and $m_{\text{water total}}$ are the initial mass (g) of polymer and water in the total aqueous mixture).

Finally, phase diagrams were generated with the experimental polymer concentrations, and tie-lines were then normalised by bringing the slopes down to theoretical initial concentrations.

Results & Discussion

Binodal

The binodal, separating the solution from the emulsion of an aqueous mixture of dextran and PEO, is shown **Fig. 2**. In the studied area, from a dextran concentration of 2.0 wt%, the experimental binodal was found below 2.0 wt% of PEO. For aqueous mixtures containing 2.0 wt% dextran (corresponding to the experimental dextran concentration for subsequent phase diagram construction), the experimental binodal was located above 2.0 wt% of PEO. Similar results were found for the studied areas described in the Supporting Information (**Table S1**), whatever the conditions tested: purified and unpurified PEO, and polymers in solution or powder form. The degree of purity of the PEO and the physical state of the polymers therefore had no impact on the binodal for the concentrations tested. However, the binodal obtained here was higher than that reported in the literature ¹⁹. Indeed, at 2.0 wt% dextran, the binodal curve was determined for a PEO concentration of between 1.75 wt% and 2.0 wt% (**Fig. 2**), whereas Balakrishnan, *et al.*¹⁹ obtained the binodal for a PEO concentration below 1.0 wt%. This highlights the margin of error imputed to operator variability for the manual method.

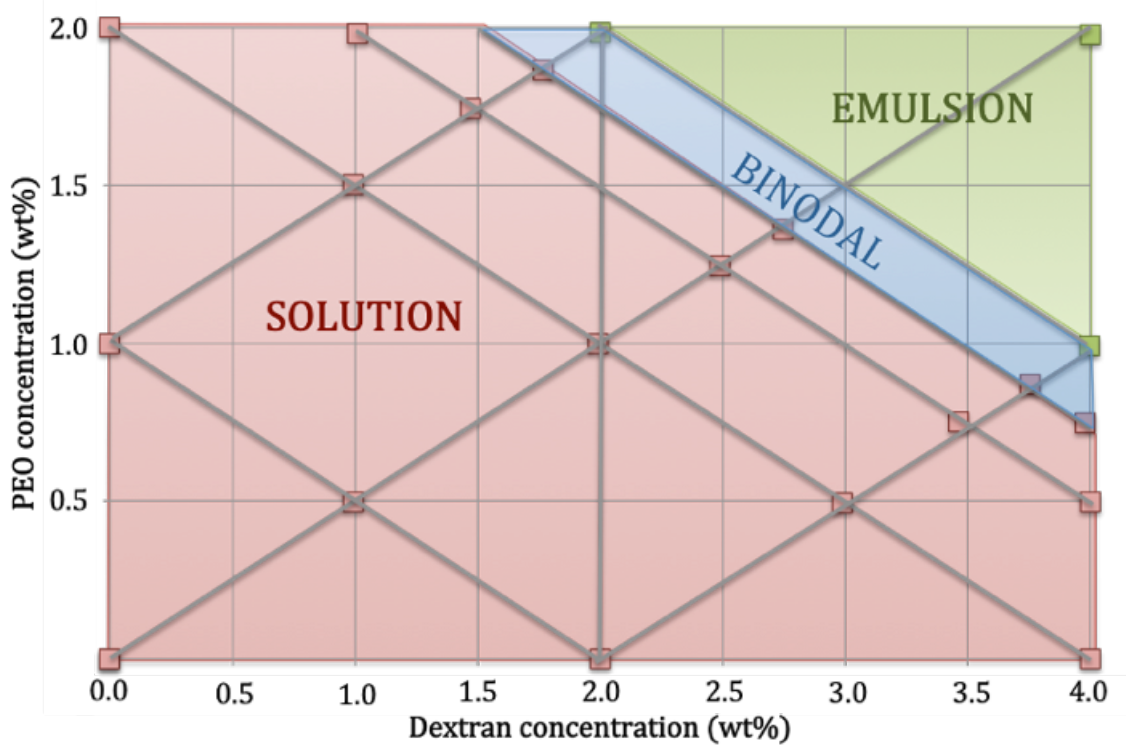


Figure 2. Map representing the binodal (blue area) for the aqueous dextran and PEO system separating the one-phase region (solution, red area) from the two-phase region (emulsion, green area). Aqueous systems were prepared from PEO (unpurified) and dextran in powder form, with concentrations ranging from 0.0 wt% to 2.0 and 4.0 wt%, respectively.

Phase diagram

Table 1 shows the equations and linear correlation coefficients obtained with the water abacus for each method. These equations were used to calculate the polymer concentration in each phase to define the tie-line slopes and to construct the phase diagram. However, a relative error must be imputed to the calculation due to the approximation of polymer density, which is significantly different from water density, especially for high concentrations. Similarly, Amrhein, *et al.* also highlighted the impact of neglecting density in phase diagram construction²⁸. For each method, phase diagrams were generated for PEO (from 1.0 to 8.0 wt%) and dextran (at 2.0 wt%).

Experimental results used to determine tie-lines were presented **Table S2**. Based on these experimental results, the phase diagrams were normalized to fit theoretical polymer concentrations. Phase diagrams were compared by superimposition and the interpretation of the results was based on differences in tie-line slopes at the same polymer concentrations. For all the conditions tested, at 2.0 wt% dextran, the aqueous phase system had a single phase with 1.0 wt% and 1.5 wt% PEO.

Table 1. Equations and correlation coefficients for the abacus for the manual and automatic methods, with Y representing the volume of water (in mL) and X the height of the phase (in mm) in the vial used

	Method	
	Manual and Turbiscan	LUMiSizer®
Equation	$Y = 0.1336 X$	$Y = 0.0682 X$
Correlation coefficient	$R^2 = 0.9990$	$R^2 = 0.9998$

Indeed, according to the experimental binodal line obtained, polymer concentrations were too low for the formation of an emulsion. Below the binodal line, the studied system formed a stable homogeneous mixture²⁹. Whatever the experimental conditions, for 2.0 wt% PEO, two phases were observed after emulsion destabilisation. Weight percent values are indicated in **Table S2**, but tie-lines are not presented here. For points for which polymer concentrations were close to the binodal, the tie-lines crossed the tie-lines of high-concentration points. This pattern of behaviour has been reported before, particularly for polymer-salt ATPS, and can be explained by changes in phase density with compound concentration³⁰. Moreover, the measurement at this point was not considered accurate because the refractive indices for light scattering changed on passage through the glassware and the meniscus at the interface between the two phases. At this point, very close to the binodal concentration, there was probably also a commingling of polymers, with

incomplete phase separation, even if not visible by eye. Ferreira, *et al.* described the binodal in terms of saturation or space occupation by polymers²⁹. The impact of the physical state of the polymer (solid or solution) was then evaluated by superimposing phase diagrams for the different methods used. The phase diagrams obtained are presented in **Fig. 3** and **Fig. 4** for experimental concentrations of 2.0 wt% dextran and 1.0 wt% to 8.0 wt% PEO, to focus on the emulsion area. These concentrations were chosen because they are already studied in the literature from polymers in solution¹⁹. Results with unpurified PEO were presented in Supporting Information (**Fig. S1**). The phase diagram in **Fig. 3A** was established with the manual method (method used for binodal determination) and shows the results obtained for polymers in powder or solution form. Following the superimposition of tie-lines for the 2.0 wt% dextran points, no difference in the PEO concentration in the PEO-rich phase was observed with polymers in either powder or solution form and whatever the method used (**Fig. 3A, Fig. 3B and Fig. 3C**). For the manual method, the dextran-rich phase seemed to be more concentrated in ATPS formed from polymers in powder form than in those formed from polymers in solution (**Fig. 3A**). However, automatic methods identified no differences in the dextran-rich phases (**Fig. 3B and Fig. 3C**). The manual method appeared less accurate for determining phase heights, and consequently volumes. In **Fig. 4A**, showing phase diagrams established with the manual method, differences were observed when tie-lines for 2.0 wt% dextran were superimposed. However, as discussed above, the inaccuracy of the manual method made it impossible to draw any firm conclusions about these results. The analyses performed with the automatic methods revealed no effect of PEO purity on PEO concentration in the PEO-rich phase (**Fig. 4B and Fig. 4C**). By contrast, dextran concentration tended to increase in the dextran-rich phase after PEO purification (**Fig. 4B and Fig. 4C**). Impurities in PEO raw material was identified in the literature as silica particles¹⁹.

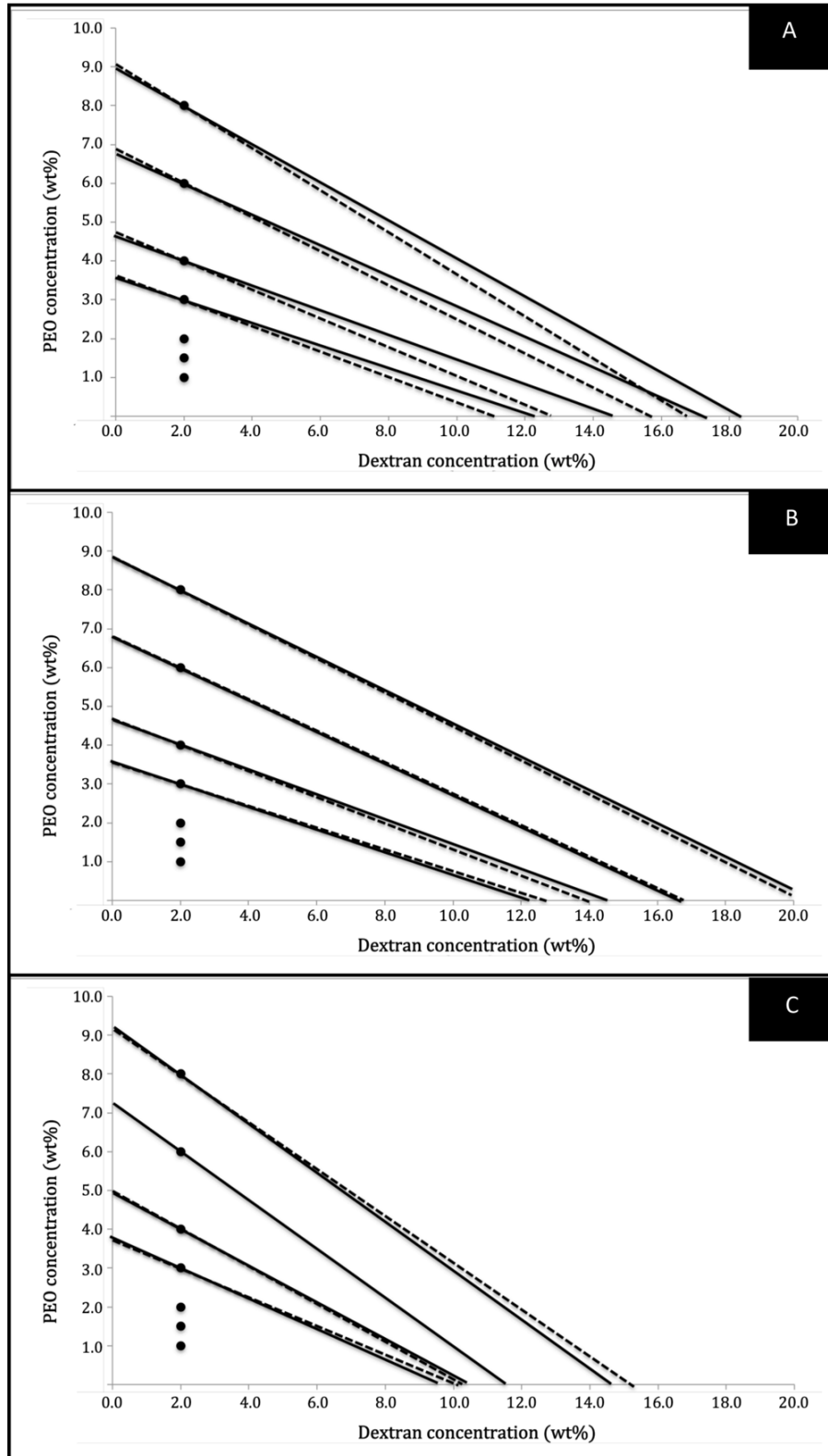


Figure 3. Normalised phase diagrams obtained with purified PEO from polymers in powder (solid line) and solution (dotted line) form, with three different methods: A – Manual method, B – Turbiscan, C – LUMiSizer®

DUMAS Florence | Conception de nouvelles formulations pour l'encapsulation des molécules BCS III

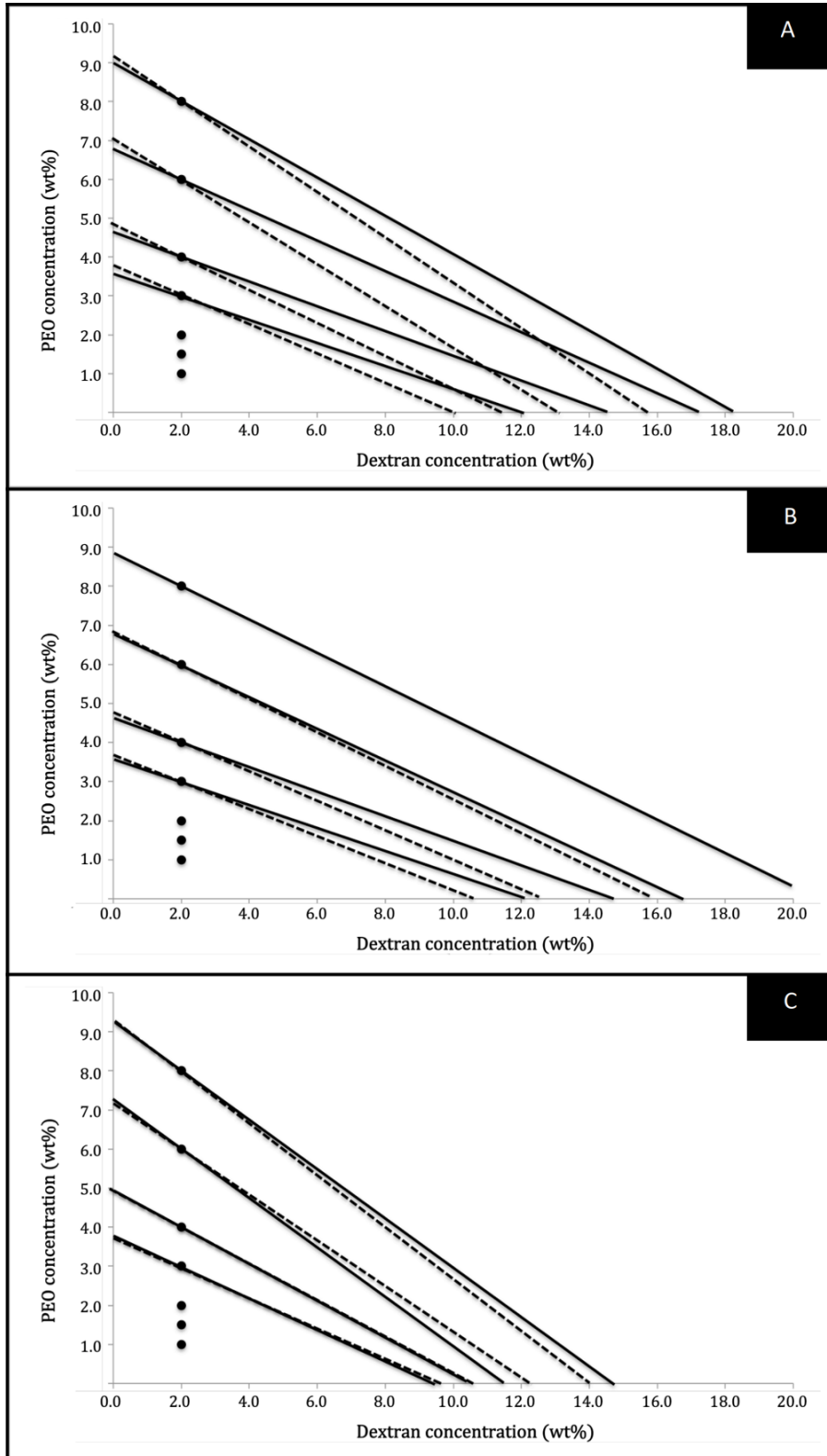


Figure 4. Normalised phase diagrams obtained with polymers in powder form, with purified (solid line) and unpurified (dotted line) PEO, for the three different methods tested: A – Manual method, B – Turbiscan, C – LUMiSizer®

Silica impurities present in the emulsion can sediment out during the separation process, as silica has a higher density (approximately 2 g.cm^{-3}) than PEO and dextran ones (close to 1 g.cm^{-3})³¹. The resulting error on the final concentrations in each phase led to imprecision in the diagram. These findings are consistent with those of a previous study highlighting the utility of automatic methods for the accurate characterisation of ATPS²⁸. Thus, the greater reliability of automatic methods results in an absence of difference between phase diagrams generated with powders and phase diagrams generated with solutions. Thus, these results demonstrate that, both powder and solution forms of polymers can be used indiscriminately to prepare ATPS in these range of polymers concentration. The impact of polymer purity for polymers in powder form was also investigated. Phase diagrams for the various methods with and without purification of PEO were superimposed (**Fig. 4**) (Results for polymers in solution were reported in Supporting Information (**Fig. S2**)). Silica would therefore have been found in the bottom dextran phase, resulting in an overestimation of the height and volume of the dextran-rich phase and a lower estimation of concentration than for purified PEO. The concentration of PEO in the PEO-rich phase would probably be unaffected in the phase diagram, because adding low-solubility compounds such as silica would modify the total volume of the ATPS, the apparent volume of bottom phase (the dextran-rich phase), but not that of the top phase (PEO-rich phase). The degree of polymer purity therefore had an impact on the phase diagram. For all conditions (purified and unpurified PEO, polymers in solution or in powder form) the information provided by phase diagrams differed with the method used. Finally, a comparison of the manual method with the Turbiscan and LUMiSizer[®] methods showed that the automatic methods were more reliable for ATPS characterisation. Optimisation of the accuracy of phase diagram construction required complete phase separation. In the system studied, phase separation occurred at low

polymer concentrations because of large sizes of the molecules³². Interactions with water increased with the molecular size of the polymers. However, this configuration, with a continuous top phase (continuous phase located on top after separation, as for PEO in this case), was not optimal for phase separation. Indeed, it has already been shown that partitioning is faster for a continuous bottom phase³³. The application of a centrifugal force to accelerate phase separation, as with the LUMiSizer® method, may be useful for overcoming viscosity or molecular size parameters, which affect the duration of phase separation. In any case, the centrifugal force parameters must be optimised for the system, to prevent potential losses of the product of interest³⁴. The use of gravitational force for partitioning, as in the Turbiscan method, is also potentially useful, for phase separation in mild conditions. However, this method is more time-consuming. These two automatic methods provided equivalent results. The choice of equipment should therefore be based on the desired application.

Conclusion

Many applications for ATPS have been described. However, understanding phase separation behaviour remains a challenge that must be resolved before this formulation process can be scaled up according to a Quality by Design approach. ATPS prepared with dextran and polyethylene oxide were characterised through phase diagrams obtained by three different methods. A workability area was defined by determining the binodal and tie-lines composing the phase diagram for this pair of polymers. The physical state (in solution or solid) of the polymers had no effect on the phase diagram. The impact of polymer (PEO) purity was also investigated and PEO purification was found to result in a higher concentration of dextran in the dextran-rich phase, highlighting the importance of using high-purity raw materials.

In conclusion, automatic methods were more accurate, faster and reliable than the manual method for characterising ATPS. Due to approximations in height determinations from the profiles obtained, assays remain the most accurate method of phase diagram construction. Nevertheless, automatic methods, such as the Turbiscan and LUMiSizer® methods, are very easy to use and to quickly generate phase diagrams. So they have a great interest for the comparison of different experimental conditions and for scale up processes. In this study, the results obtained with these methods highlighted the importance of the degree of purity of the polymer. Finally, the most attractive results were obtained by comparing polymers forms. Thus, a simple one-step process, easily scalable in industrial process, from a mixture of polymers in powder form with adding water can be proposed to prepare ATPS formulation.

Abbreviations: ATPS: aqueous two-phase system; Dex: dextran; PEO: polyethylene oxide; Wt%: mass concentration as a percentage.

Supporting Information

Table S1. Results obtained for binodal determination, by comparing polymers in powder and solution form, and purified and unpurified PEO. Concentrations ranged from 1 to 2 wt% for dextran and 2 to 4 wt% for PEO

Polymer form	Powder				Solution				Results
	Purified PEO		Unpurified PEO		Purified PEO		Unpurified PEO		
	PEO	Dextran	PEO	Dextran	PEO	Dextran	PEO	Dextran	
Experimental data	1.0%	1.9%	1.0%	2.1%	1.2%	2.0%	1.1%	2.0%	Solution
	1.5%	2.0%	1.5%	2.0%	1.7%	2.0%	1.5%	1.8%	Solution
	2.1%	2.0%	2.0%	2.0%	2.2%	2.0%	2.2%	2.0%	Emulsion
	1.0%	3.0%	1.0%	3.0%	0.9%	3.2%	1.2%	3.0%	Solution
	1.5%	3.0%	1.5%	3.0%	1.5%	3.1%	1.9%	3.1%	Emulsion
	2.1%	3.0%	2.0%	3.0%	2.1%	3.1%	2.4%	3.1%	Emulsion
	1.0%	4.0%	1.0%	4.0%	1.1%	4.1%	1.2%	4.2%	Emulsion
	1.5%	4.0%	1.6%	4.0%	1.4%	4.3%	1.8%	4.1%	Emulsion
	2.1%	4.0%	2.0%	4.0%	2.0%	4.3%	2.3%	4.2%	Emulsion

Table S2. Polymer concentrations (%wt) determined under different conditions of purity (purified and unpurified PEO) and polymer state (solution or powder), with the manual method and two automatic methods: Turbiscan and LUMiSizer®

Form	Purity	Theoretical Concentrations (%)		Manual Experimental Concentrations (%)				Turbiscan Experimental Concentrations (%)				LUMiSizer® Experimental Concentrations (%)				
		Dex initial	PEO initial	Dex initial	PEO initial	Dex in Dex-rich phase	PEO in PEO-rich phase	Dex initial	PEO initial	Dex in Dex-rich phase	PEO in PEO-rich phase	Dex initial	PEO initial	Dex in Dex-rich phase	PEO in PEO-rich phase	
		Powders														
Purified PEO		2.0	1.0	1.9	1.0	N/A	N/A	1.9	1.0	N/A	N/A	2.0	1.0	N/A	N/A	
		2.0	1.5	2.0	1.5	N/A	N/A	2.0	1.5	N/A	N/A	2.0	1.5	N/A	N/A	
		2.0	2.0	2.0	2.1	12.6	2.4	2.0	2.1	13.4	2.4	2.0	2.1	10.7	2.6	
		2.0	3.0	2.0	3.1	12.7	3.6	2.0	3.1	12.2	3.7	2.0	3.0	9.5	3.8	
		2.0	4.0	2.0	4.0	14.5	4.7	2.0	4.0	14.5	4.7	2.0	4.0	10.5	5.0	
		2.0	6.0	2.0	6.0	17.1	6.8	2.0	6.0	16.6	6.8	2.0	6.0	11.5	7.3	
		2.0	8.0	2.0	8.1	18.6	9.2	2.0	8.1	21.0	9.0	2.0	8.0	14.8	9.3	
	Unpurified PEO		2.0	1.0	2.0	1.0	N/A	N/A	2.0	1.0	N/A	N/A	2.1	1.0	N/A	N/A
			2.0	1.5	2.0	1.5	N/A	N/A	2.0	1.5	N/A	N/A	2.0	1.5	N/A	N/A
			2.0	2.0	2.0	2.0	10.4	2.5	2.0	2.0	11.2	2.5	2.0	2.0	10.7	2.5
			2.0	3.0	2.0	3.0	10.0	3.8	2.0	3.0	10.5	3.7	2.0	3.0	9.4	3.8
			2.0	4.0	2.0	4.0	11.4	4.9	2.0	4.0	12.5	4.8	2.0	4.0	10.4	4.9
			2.0	6.0	2.0	6.0	13.1	7.1	2.0	6.0	15.8	6.9	2.0	6.0	12.1	7.2
			2.0	8.0	2.0	8.0	15.5	9.2	2.0	8.0	N/A	N/A	2.0	8.0	13.9	9.3
Solutions																
Purified PEO		2.0	1.0	1.8	1.0	N/A	N/A	1.8	1.0	N/A	N/A	1.9	0.8	N/A	N/A	
		2.0	1.5	1.9	1.2	N/A	N/A	1.9	1.2	N/A	N/A	1.9	1.4	N/A	N/A	
		2.0	2.0	1.8	1.8	21.2	2.0	1.8	1.8	27.7	2.0	1.9	2.0	35.8	2.1	
		2.0	3.0	1.9	2.8	10.2	3.5	1.9	2.8	11.6	3.4	1.9	2.8	9.4	3.5	
		2.0	4.0	1.9	3.6	11.4	4.3	1.9	3.6	12.2	4.2	2.0	3.8	9.6	4.8	
		2.0	6.0	2.0	5.4	14.1	6.3	2.0	5.4	15.1	6.2	1.9	5.9	87.6	6.0	
		2.0	8.0	2.0	7.5	15.7	8.6	2.0	7.5	18.9	8.4	2.0	8.0	15.3	9.2	
	Unpurified PEO		2.0	1.0	1.9	0.9	N/A	N/A	1.9	0.9	N/A	N/A	1.9	0.9	N/A	N/A
			2.0	1.5	1.6	1.3	N/A	N/A	1.6	1.3	N/A	N/A	1.9	1.5	N/A	N/A
			2.0	2.0	1.9	1.8	16.9	2.1	1.9	1.8	16.9	2.1	1.9	2.0	57.6	2.1
			2.0	3.0	1.9	2.7	10.6	3.3	1.9	2.7	10.4	3.4	1.9	3.1	9.2	3.9
			2.0	4.0	2.0	3.6	12.4	4.2	2.0	3.6	11.0	4.3	1.9	4.1	9.9	5.1
			2.0	6.0	1.9	5.6	17.3	6.3	1.9	5.6	14.6	6.4	2.0	6.1	12.2	7.3
			2.0	8.0	2.0	7.5	17.2	8.4	2.0	7.5	18.5	8.4	2.1	8.3	14.8	9.7

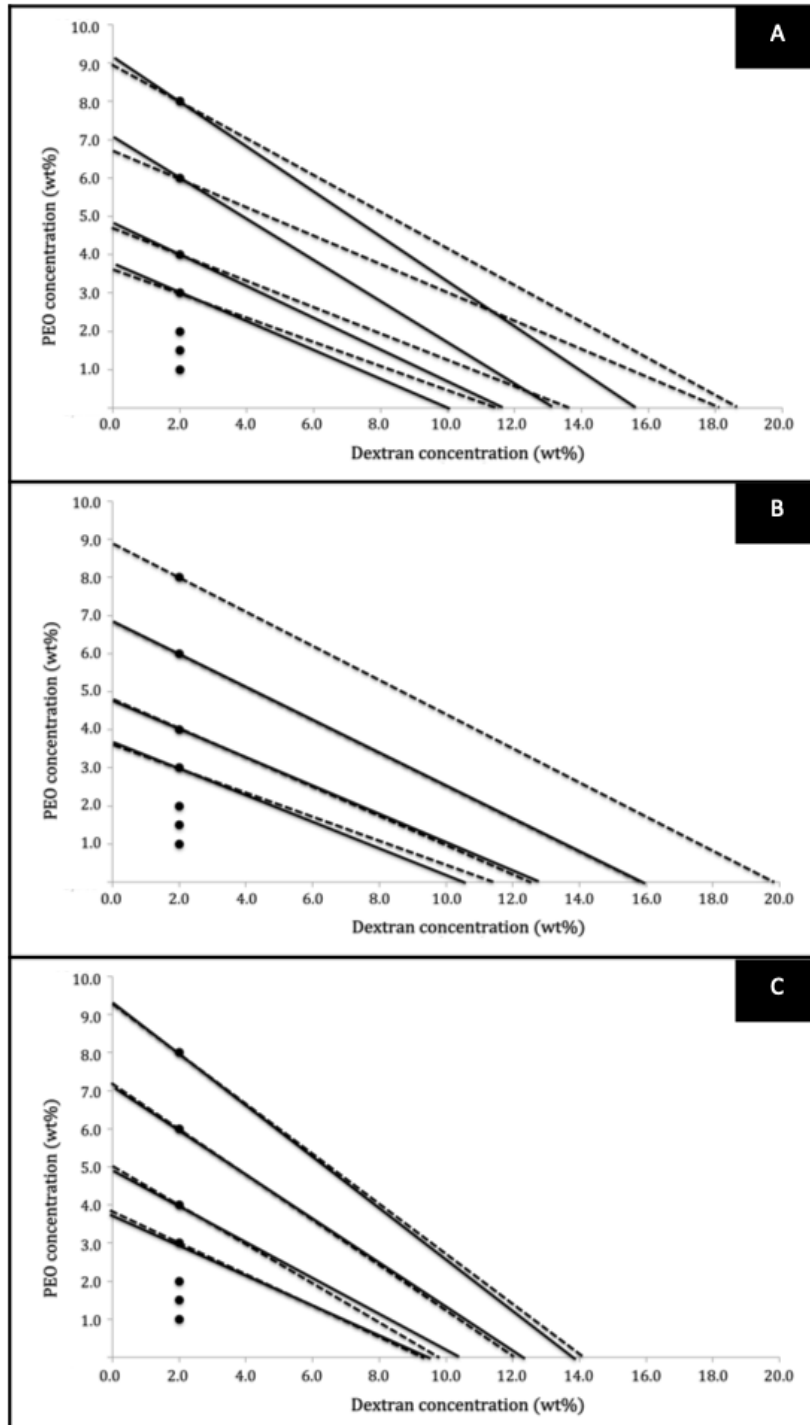


Figure S1. Normalised phase diagrams obtained with unpurified PEO, from polymers in powder form (solid line) and polymers in solution (dotted line), for the three different methods tested: A – Manual method, B – Turbiscan, C – LUMiSizer®) - The tie-line at 8.0 wt% PEO was not determined with the Turbiscan method, due to the impossibility to determine the height of the sample accurately from the transmission profile obtained (B)

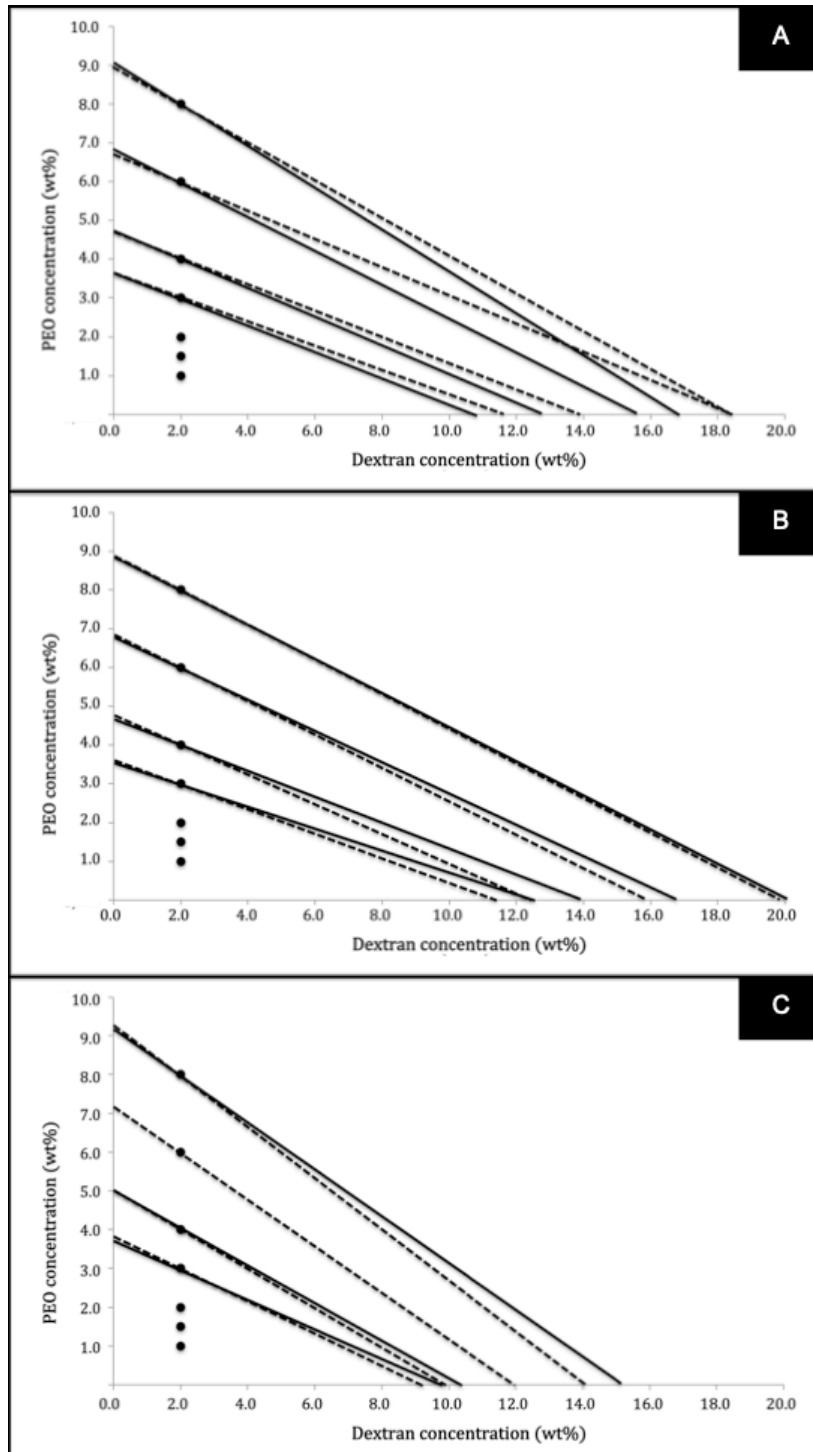


Figure S2. (Normalised phase diagrams obtained with polymers in solution, with purified (solid line) and unpurified (dotted line) PEO, for the three different methods tested: A – Manual method, B – Turbiscan, C – LUMiSizer®)

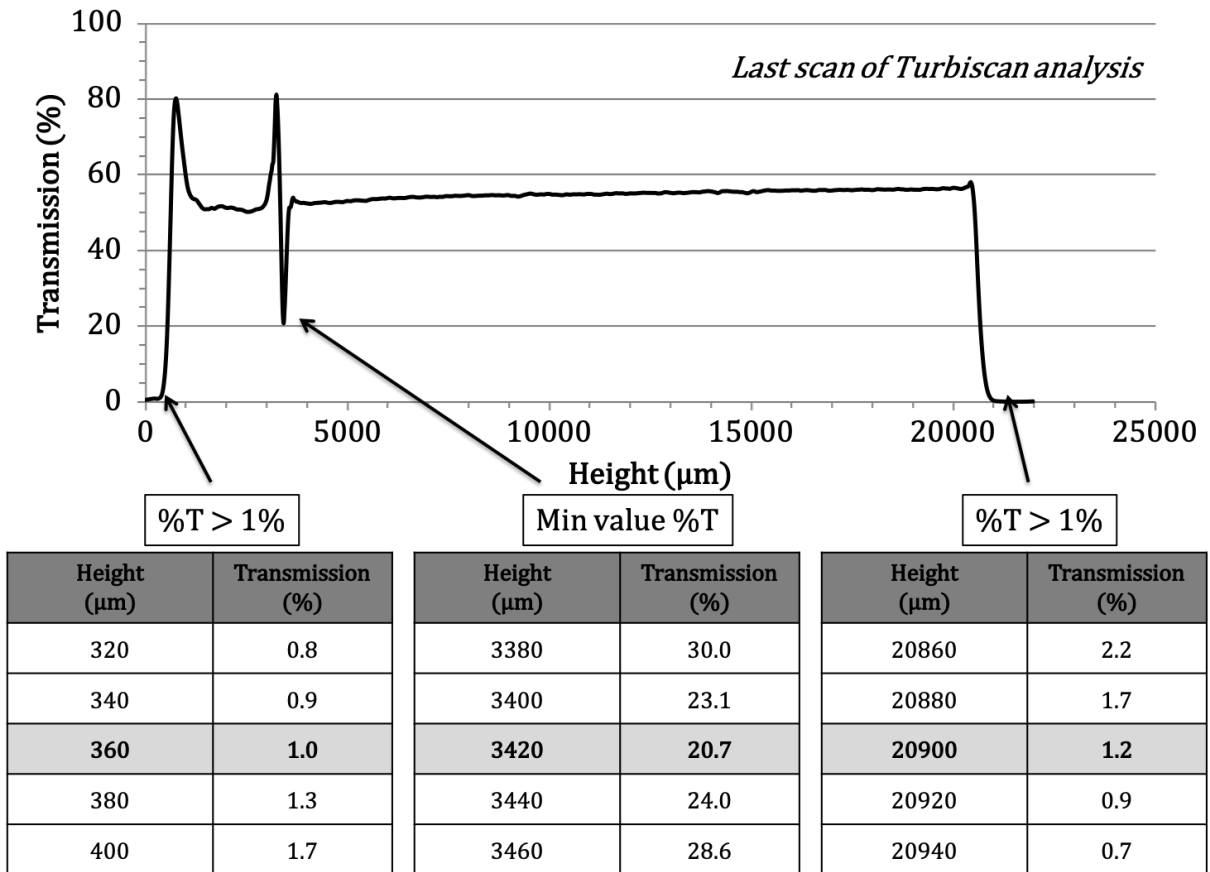


Figure S3. Method for determining height from Turbiscan transmission profiles – example for the transmission profile obtained with polymers in powder form and purified PEO at a concentration of 3 wt%

REFERENCES

- 1 L. M. C. Sagis, Dynamics of encapsulation and controlled release systems based on water-in-water emulsions: Liposomes and polymersomes, *Phys. A Stat. Mech. its Appl.*, 2009, **388**, 2579–2587.
- 2 F. Ruiz-Ruiz, J. Benavides, O. Aguilar and M. Rito-Palomares, Aqueous two-phase affinity partitioning systems: Current applications and trends, *J. Chromatogr. A*, 2012, **1244**, 1–13.
- 3 W. . G. Fan CE., Charged protein partitioning in aqueous polyethylene glycol-dextran two-phase systems: salt effects., *Sep. Sci. Technol.*, 1999, **34**, 423–438.
- 4 W. Fan, U. Bakir and C. E. Glatz, Contribution of protein charge to partitioning in aqueous two-phase systems, *Biotechnol. Bioeng.*, 1998, **59**, 461–470.
- 5 J. Jiang and J. M. Prausnitz, Molecular Thermodynamics for Partitioning of Native and Denatured Proteins in Aqueous Two-Phase Systems, *J. Phys. Chem. B*, 2000, **104**, 7197–7205.
- 6 H.-O. Johansson, J. Persson and F. Tjerneld, Thermoseparating water/polymer system: A novel one-polymer aqueous two-phase system for protein purification, *Biotechnol. Bioeng.*, 1999, **66**, 247–257.
- 7 M. Iqbal, Y. Tao, S. Xie, Y. Zhu, D. Chen, X. Wang, L. Huang, D. Peng, A. Sattar, M. A. B. Shabbir, H. I. Hussain, S. Ahmed and Z. Yuan, Aqueous two-phase system (ATPS): an overview and advances in its applications, *Biol. Proced. Online*, 2016, **18**, 18.
- 8 E. Atefi, R. Joshi and H. Tavana, Effect of Molecular Weight of Phase Polymers on Partition of Cells in Aqueous Two-Phase Systems, *MRS Adv.*, 2017, **2**, 2415–2426.
- 9 E. Sumida, Y. Iwasaki, K. Akiyoshi and S. Kasugai, Platelet Separation From

- Whole Blood in an Aqueous Two-Phase System With Water-Soluble Polymers, *J. Pharmacol. Sci.*, 2006, **101**, 91–97.
- 10 E. Atefi, S. Lemmo, D. Fyffe, G. D. Luker and H. Tavana, High throughput, polymeric aqueous two-phase printing of tumor spheroids, *Adv. Funct. Mater.*, 2014, **24**, 6509–6515.
 - 11 A. Zaslavsky, P. Madeira, L. Breydo, V. N. Uversky, A. Chait and B. Zaslavsky, High throughput characterization of structural differences between closely related proteins in solution, *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics*, 2013, **1834**, 583–592.
 - 12 D. M. A. Buzza, P. D. I. Fletcher, T. K. Georgiou and N. Ghasdian, Water-in-water emulsions based on incompatible polymers and stabilized by triblock copolymers-templated polymersomes, *Langmuir*, 2013, **29**, 14804–14814.
 - 13 R. J. H. Stenekes, O. Franssen, E. M. G. van Bommel, D. J. A. Crommelin and W. E. Hennink, The use of aqueous PEG/dextran phase separation for the preparation of dextran microspheres, *Int. J. Pharm.*, 1999, **183**, 29–32.
 - 14 L. M. C. Sagis, Dynamics of controlled release systems based on water-in-water emulsions: A general theory, *J. Control. Release*, 2008, **131**, 5–13.
 - 15 S. Ghosh, R. Vijayalakshmi and T. Swaminathan, Evaluation of an alternative source of dextran as a phase forming polymer for aqueous two-phase extractive system, *Biochem. Eng. J.*, 2004, **21**, 241–252.
 - 16 M. W. Edelman, E. Van Der Linden and R. H. Tromp, Phase separation of aqueous mixtures of poly(ethylene oxide) and dextran, *Macromolecules*, 2003, **36**, 7783–7790.
 - 17 D. Leng, K. Thanki, E. Fattal, C. Foged and M. Yang, Engineering of budesonide-loaded lipid-polymer hybrid nanoparticles using a quality-by-design approach, *Int. J. Pharm.*, 2018, **548**, 740–746.

- 18 E. Scholten, L. M. C. Sagis and E. van der Linden, Effect of bending rigidity and interfacial permeability on the dynamical behavior of water-in-water emulsions, *J. Phys. Chem. B*, 2006, **110**, 3250–3256.
- 19 G. Balakrishnan, T. Nicolai, L. Benyahia and D. Durand, Particles trapped at the droplet interface in water-in-water emulsions, *Langmuir*, 2012, **28**, 5921–5926.
- 20 B. T. Nguyen, T. Nicolai and L. Benyahia, Stabilization of water-in-water emulsions by addition of protein particles, *Langmuir*, 2013, **29**, 10658–10664.
- 21 E. Atefi, J. A. Mann and H. Tavana, Ultralow Interfacial Tensions of Aqueous Two-Phase Systems Measured Using Drop Shape, *Langmuir*, 2014, **30**, 9691–9699.
- 22 L. M. C. Sagis, Dynamics of Encapsulation and Controlled Release Systems Based on Water-in-Water Emulsions: Negligible Surface Rheology, *J. Phys. Chem. B*, 2008, **112**, 13503–13508.
- 23 A. Kaul, The Phase Diagram, *Methods Biotechnol.*, 2000, **11**, 11–21.
- 24 D. Forciniti, C. K. Hall and M.-R. Kula, Influence of polymer molecular weight and temperature on phase composition in aqueous two-phase systems, *Fluid Phase Equilib.*, 1991, **61**, 243–262.
- 25 H. Shin, C. Han, J. M. Labuz, J. Kim, J. Kim, S. Cho, Y. S. Gho, S. Takayama and J. Park, High-yield isolation of extracellular vesicles using aqueous two-phase system, *Sci. Rep.*, 2015, **5**, 13103.
- 26 C. W. Ooi, S. L. Hii, S. M. M. Kamal, A. Ariff and T. C. Ling, Extractive fermentation using aqueous two-phase systems for integrated production and purification of extracellular lipase derived from *Burkholderia pseudomallei*, *Process Biochem.*, 2011, **46**, 68–73.
- 27 A. Chavez-Santoscoy, J. Benavides, W. Vermaas and M. Rito-Palomares, Application of Aqueous Two-Phase Systems for the Potential Extractive

- Fermentation of Cyanobacterial Products, *Chem. Eng. Technol.*, 2010, **33**, 177–182.
- 28 S. Amrhein, M. L. Schwab, M. Hoffmann and J. Hubbuch, Characterization of aqueous two phase systems by combining lab-on-a-chip technology with robotic liquid handling stations, *J. Chromatogr. A*, 2014, **1367**, 68–77.
- 29 L. A. Ferreira, V. N. Uversky and B. Y. Zaslavsky, Modified binodal model describes phase separation in aqueous two-phase systems in terms of the effects of phase-forming components on the solvent features of water, *J. Chromatogr. A*, 2018, **1567**, 226–232.
- 30 W. Rao, Y. Wang, J. Han, L. Wang, T. Chen, Y. Liu and L. Ni, Cloud Point and Liquid-Liquid Equilibrium Behavior of Thermosensitive Polymer L61 and Salt Aqueous Two-Phase System, *J. Phys. Chem. B*, 2015, **119**, 8201–8208.
- 31 L. Fele and M. Fermeiglia, Partition Coefficients of Proteins in Poly(ethylene glycol) + Dextran + Water at 298 K, *J. Chem. Eng. Data*, 1996, **41**, 331–334.
- 32 R. Hatti-Kaul, Aqueous Two-Phase Systems: A General Overview, *Mol. Biotechnol.*, 2001, **19**, 269–278.
- 33 J. A. Asenjo and B. A. Andrews, Aqueous two-phase systems for protein separation: Phase separation and applications, *J. Chromatogr. A*, 2012, **1238**, 1–10.
- 34 M. A. Torres-Acosta, K. Mayolo-Deloisa, J. González-Valdez and M. Rito-Palomares, Aqueous Two-Phase Systems at Large Scale: Challenges and Opportunities, *Biotechnol. J.*, 2018, **1800117**, 1800117.

PARTIE II

PARTIE II

Des systèmes diphasiques aqueux aux microparticules

CONTEXTE

Afin de développer un système de formulation innovant pour l'encapsulation de molécules BCS III, nous nous sommes orientés vers les systèmes diphasiques aqueux. Ces systèmes permettent la formation de compartiments aqueux adaptés à l'encapsulation de molécules hydrosolubles telles que les BCS III. De plus, leur procédé simple et sans utilisation de solvant organique présente un intérêt majeur en vue d'un développement pharmaceutique. Le principal enjeu concernant ces systèmes repose sur leur stabilisation.

OBJECTIF

L'objectif de cette étude a consisté à stabiliser les systèmes diphasiques aqueux composés de dextrane/PEO pour formuler des microparticules.

Ce travail fera prochainement l'objet d'une soumission à un Journal pour publication scientifique.



FROM AQUEOUS TWO-PHASE SYSTEM TO MICROPARTICLES

Abstract

Aqueous Two-Phase Systems (ATPS) are described as “water-in-water” emulsions because they formed aqueous droplets dispersed in aqueous phase. That specific behavior is due to interactions between at least two water-soluble entities such as thermodynamically incompatible polymers, depending on experimental conditions, including polymers concentration. Easy, quick and “green” formulation process of ATPS allows the formation of aqueous compartments very interesting for food, veterinary, pharmaceutical or cosmetic fields. Quick destabilisation of ATPS represents the main issue for ATPS uses. Stabilizing those systems still remains a challenge to overcome. Nowadays, there has been a resurgence of interest in Pickering technique in the aim of ATPS stabilisation. Pickering technique consists of strong adsorption of solid particles at the interface between the two aqueous phases. Herein, a formulation process was studied in order to develop a delivery system from ATPS composed of dextran and polyethylene oxide (PEO). Based on Pickering technique, the use of chitosan-grafted lipid nanocapsules (LNCs) leads to ATPS stabilisation. A final step of gelation was processed to obtain a gelled shell that strengthens the formulation against shear stress and improves storage stability.

Keywords: Aqueous Two-Phase System, microparticles, dextran, polyethylene oxide, lipid nanocapsules, chitosan, Pickering method, gelled shell.

Introduction

Aqueous Two-Phase Systems (ATPS) are formed by combining a pair of incompatible hydrophilic polymer-polymer or polymer-salt in water, leading to a partitioning of each polymer (or salt) in each one of the aqueous phases¹. From its historical discovery by Martinus Beijerinck in 1896, ATPS have widely been studied for many applications. Defined as a liquid-liquid fractionation technique², ATPS were mainly used for purification and separation of biomolecules such as proteins, monoclonal antibodies, enzymes, DNA and nucleic acids, virus, cells and organelles, low molecular weight compounds or drug residues in food and water². ATPS have a great interest in biomedical applications especially for the purification of expensive proteins³. Due to their biodegradability^{4,5}, the couple of polymers Polyethylene Glycol (PEG) and dextran is one of the most usually used for ATPS formation². In the literature, PEG-dextran ATPS were also reported for the purification or isolation of biomolecules such as formate dehydrogenase⁶, IgG⁷ or monoclonal antibodies^{2,8}. In some cases, ATPS were optimised by chemical modification of PEG and/or dextran for the recovery and purification of bioproducts leading to aqueous-two phase affinity partitioning (ATPAP)⁹. ATPS were also extensively studied for the partitioning of enzymes such as pectinase (adding sulfate salts)⁷ or chitinase², of tissue plasminogen activator from CHO cell culture³, or of thaumatin from *E. coli*². Others applications were developed from PEG-dextran ATPS like cell micropatterning techniques, biochemical analysis such as ATPS-ELISA or Alphalisa⁷, blood cells separation², microfluidic applications^{7,10}, extractive fermentation optimising the production yield of bioproducts (lipase, alkaline phosphatase, beta-carotene or lutein)². Finally, from PEG and methacrylated dextran ATPS, dextran microspheres were formulated through a polymerization process¹¹. And more recently, microcapsules were

formulated from PEG-dextran ATPS by interfacial complexation¹². These last systems were developed for biomedical applications such as encapsulation of cells or bacteria.

A well understanding of the partition process involved in ATPS remains a challenge^{2,8}. Thus, phase diagram of ATPS formulated from the couple of polymers dextran and Polyethylene Oxide (PEO, a high molecular weight PEG) were widely described in the literature. ATPS formation concentration conditions were determined. For example, in a previous study, the importance of using purified PEO (removal of silica impurities present in the raw product) was highlighted and the interest of using polymers in powders allowing a simple one-step process for ATPS formulation was demonstrated.¹³

Nevertheless, the main challenge to overcome is the stabilisation of ATPS to design¹⁰. A strategy developed for stabilizing emulsions is called the Pickering method, consisting in adsorbing solid particles at the interfaces of emulsion phases¹⁴. Based on the Pickering technique, ATPS stabilisation was studied with different kinds of particles such as silica¹⁵, latex¹⁶, or carboxylated particles¹⁷ but also with proteins such as β -lactoglobulin¹⁸, whey protein¹⁹ or zein-based nanoparticles²⁰. The present work describes how to formulate microparticles from ATPS based on PEO (molecular weight 200 kg.mol⁻¹) and dextran (molecular weight 500 kg.mol⁻¹) mixtures. In order to stabilize this system, a Pickering-like technique was used with lipid nanocapsules (LNCs). LNCs are non-solid particles and their formulation and composition lead to 20 to 100 nm nanocapsules with an oily core and a surfactant shell²¹. More particularly, LNCs display film-forming properties^{22,23}. The formulation of microparticles from ATPS using modified LNCs for Pickering-like technique was studied.

Material & Methods

Materials

Chitosan oligosaccharide lactate 5,000 Da, polyethylene oxide (PEO) (Mw: 200 kg.mol⁻¹), alginate sodium salt from brown algae (low viscosity), calcium chloride dihydrate, dextran and fluorescein isothiocyanate (FITC) dextran (Mw: 500 kg.mol⁻¹) from *Leuconostoc mesenteroides* were provided by Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Labrafac® WL 1349 (caprylic-capric acid triglycerides) was kindly provided by Gattefossé S.A. (Saint-Priest, France). Lipoïd S75-3 (soybean lecithin at 69% of phosphatidylcholine) was provided by Lipoïd GmbH (Ludwigshafen, Germany). Kolliphor® HS 15 (mixture of free polyethylene glycol 660 and polyethylene glycol 660 hydroxystearate) was provided from BASF (Ludwigshafen, Germany). 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindodicarbocyanine 4-chlorobenzenesulfonate (DiD) was provided by Molecular probes® (Eugene, OR, USA). MilliQ water obtained from a MilliQ filtration system (Millipore, Paris, France) was used for the formulations.

Methods

Formulation of LNCs labelled with DiD dye

The formulation of 50 nm diameter LNCs was based on the phase inversion process defined by Heurtault, *et al.*²⁴ Briefly, lipophilic fluorescent dye DiD was first dissolved in Labrafac®WL1349 (at 3 mg.g⁻¹ weight ratio dye/Labrafac®). Then, DiD-Labrafac®, Lipoïd®S75-3, Kolliphor®HS15, NaCl and water (800, 67, 600, 75 and 2,300 mg, respectively) were mixed under magnetic stirring. The mixture was heated up to 90°C and cooling down to 60°C for three cycles. During the last cycle, the formulation was snappily diluted with 5 mL of 4°C water. LNCs suspension obtained was then filtered on 0.22 µm Clearline® filter with PES membrane (Biosigma S.r.l., Cona, Italy).

Formulation of chitosan-grafted LNCs (LNCs-CS)

Chitosan was grafted on the terminal hydroxy group of Kolliphor®HS15 covering the LNCs by a transacylation process already described in the literature ²⁵. Briefly, chitosan was dissolved in NaOH 10M, then LNCs were added in order to obtain a final concentration of chitosan of 1.2 mg/mL and 5% (v/v) for NaOH. The mixture reacted under magnetic stirring for 15 minutes at 25°C. The transacylation reaction was then stopped by adding glycine buffer 0.05M / pH 2.2 with a ratio buffer:LNCs of 1:1 (v/v). Then, LNCs-CS suspension was purified by dialysis with a 100 kDa molecular weight cut-off point dialysis membrane provided by Spectrum Laboratories (Rancho Dominguez, USA) against water for 24h to remove free chitosan. LNCs-CS suspension was finally filtered (0.22 µm).

LNCs characterization

Suspensions of LNCs and LNCs-CS were characterised by dynamic light scattering (DLS) analysis on a Zetasizer® Nano series (Malvern Instruments S.A., Worcestershire, UK), to determine their size distribution, polydispersity index (PDI) and their charge. Each measurement was run in triplicate. Suspensions of LNCs and LNCs-CS were previously diluted at 1:60 (v/v) and 1:30 (v/v) in water, respectively. The concentrations of particles were determined by nanoparticle tracking analysis (NTA) using a NS300 NanoSight (Malvern Instrument, Worcestershire, UK) with a low-volume flow cell plate and a 405 nm laser. The nanoparticle suspensions were injected directly into the chamber using a 1 mL syringe installed on a syringe pump. To analyse video images, the NTA analytical software, version 3.2, was used. The measurements were made at room temperature, and each video sequence was captured over 60 seconds. Each analysis was replicated five times for each sample. Concentrations inferior to

5 particles/frame were considered as unreliable, and corresponding samples were considered as being without particles. LNCs and LNCs-CS suspensions were diluted in ultrapure water by factor 1 000 000 or 500 000 and (v/v) before analysis.

PEO purification process

Impurities contained in the PEO were removed by dissolving the polymer in water and centrifugation (centrifuge 5810R, Eppendorf AG Hamburg, Germany) for 5 minutes at 4,000 rpm. The supernatant was separated from the impurities pellet, and then centrifuged under the same conditions until no pellet was formed. To obtain a purified PEO powder, the supernatant was finally freeze-dried (Lyovac GT2 (Steris, Germany)/CC-505 (Huber, Germany)).

Preparation of ATPS

Dextran and purified PEO powders were weighted and gathered. Labelled dextran, water and eventually LNCs (LNCs or LNCs-CS) were then added and the mixture was stirred until complete dissolution of polymers. Systems were mixed under magnetic stirring for 15 minutes at room temperature. Final concentrations were reported in **Table 1**.

Preparation of microparticles

ATPS were prepared as described previously, but the previous stirring step was done in ice-bath. Alginate then calcium chloride solutions were added from aqueous stock solutions under the same conditions (concentrations were reported **Table 1**). The stirring was carried on (still in ice-bath) for 30 minutes after each addition, respectively. Finally, stirring was stopped, and the formulation was let to gel at 4°C.

Table 1. Composition of formulations

	Dextran (wt%)	PEO (wt%)	LNCs (particles.mL ⁻¹)	LNCs-CS (particles.mL ⁻¹)	Alginate (mg.mL ⁻¹)	CaCl ₂ (mg.mL ⁻¹)
ATPS	0.5*	4.0	-	-	-	-
ATPS with LNCs	0.5*	4.0	1.10 ¹⁴	-	-	-
ATPS with LNCs-CS	0.5*	4.0	-	1.10 ¹⁴	-	-
Microparticles	0.5*	4.0	-	1.10 ¹⁴	2.19	0.44

* including 4.2% FITC-labelled

Characterisation of ATPS

ATPS were analysed by confocal microscopy with a Leica TCS SP8 laser-scanning confocal microscope (Leica Microsystems, Heidelberg, Germany) with a x63 PL APO (N.A. 1.4) objective and ×3 zoom. Excitation wavelengths were set at 488 nm, 561 nm and 633 nm respectively for FITC, TRITC and DiD, whereas fluorescence was collected between 491-565 nm, 564–618 nm and 636-686 nm for each dye, respectively.

Characterization of microparticles

Gelled ATPS were characterized under confocal microscopy and by Transmission Electron Microscopy (TEM) with a transmission electron microscope JEOL JEM-1400 (JEOL, Croissy-sur-Seine, France).

Stability studies of ATPS and microparticles

Stability assays were performed on ATPS (without LNCs, with LNCs and LNCs-CS) and microparticles by two methods: Multiple Light Scattering (Turbiscan measurement) and confocal microscopy.

Using a Turbiscan TOWER (Formulaction®, Toulouse, France): samples were analysed in 4 mL cells at 4°C for 8 days according to this schedule: 1 scan every 10 minutes for the 12 first hours of analysis, then 1 scan every 15 minutes for the next

36 hours, then 1 scan every 35 minutes for 6 days and finally, 1 scan at day 14, 21 and 28. For each sample analysed, Turbiscan Stability Indexes (TSI) were determined by the Turbisoft software. TSI were calculated from transmission and backscattering data according to the **Eq. 1**.

$$(1) \quad \text{TSI} = \frac{\sum |\text{scan}_i(h) - \text{scan}_{i-1}(h)|}{H}$$

(where scan_i and scan_{i-1} are two consecutive scans for one sample analysis, h is all the measured positions and H is the total sample height).

All the raw profiles obtained by Turbiscan analysis from transmission and backscattering signals are available in Supporting Information.

Under confocal microscopy, samples were analysed for 28 days (at 0, 7, 14 and 28 days). They were also analysed after dilution in water (at 1:2 (v/v) ratio) and after centrifugation (at 10,000 rpm for 15 minutes) at day 0. After centrifugation, the supernatant was evacuated, and the pellet resuspended in the same volume of water.

Results & Discussion

ATPS were usually characterised with phase diagrams, which express the concentration of a polymer as a function of the other polymer used. Phase diagram showed the binodal line separating ATPS and no ATPS areas and tie-lines²⁶ determined for a couple of polymers. Based on a previous study, a dextran / PEO ATPS was formulated from polymers in powder form with purified PEO¹³. In **Figure 1**, the formulation concentrations studied (0.5% (w/v) of dextran and 4.0% (w/v) of PEO) was pinpointed on the phase diagram and ATPS formulated characterised under confocal microscopy. Polymers concentrations used in this study were relatively close to the binodal line. Indeed, the nearer to the binodal the concentrations are, the less

stable the system is. As a consequence, studying an ATPS at those polymers' concentration (naturally poorly stable) is interesting to find stabilisation strategies as much efficient as possible.

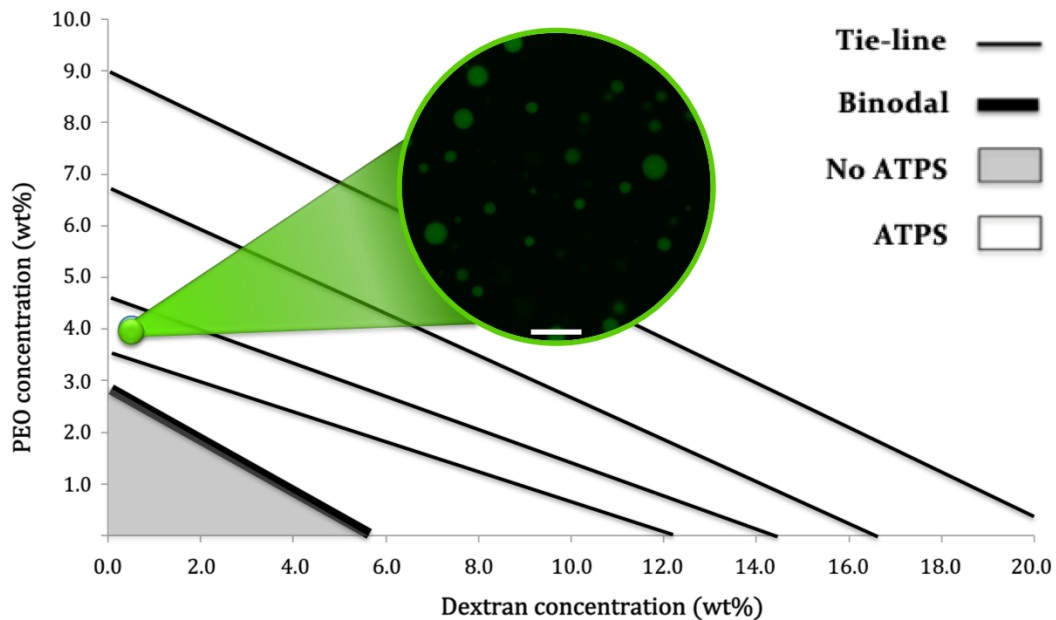


Figure 1. Observation of ATPS under confocal microscopy, FITC-labeled dextran appeared in green (scale bar: 10 μm) located in phase diagram obtained from literature (Dumas, *et al.* 2020) for dextran and purified PEO polymers in water from Turbiscan analysis.¹³ The green point represents the polymers concentration used for ATPS formulation.

As shown in **Figure 1**, dextran droplets (in green) were dispersed in PEO (unlabeled). According to the phase diagram, the confocal microscopy analysis confirmed that ATPS formulated were composed of a dextran discontinuous phase and a PEO continuous phase. The stability of this ATPS at these concentrations were studied under confocal microscopy analysis over 28 days (time stability) and after dilution and centrifugation (**Figure 2**).

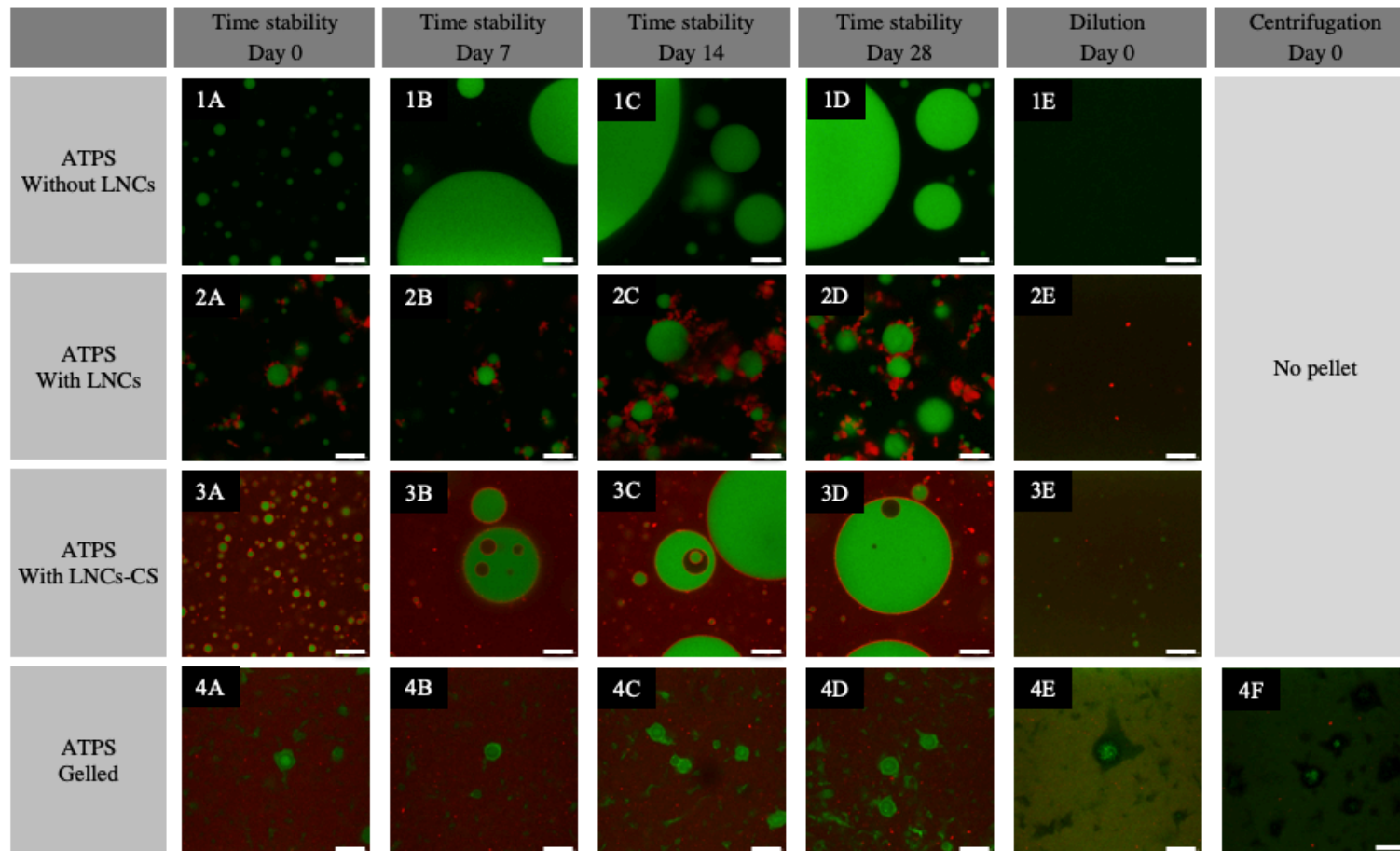


Figure 2. ATPS without LNCs (1), with LNCs (2), with LNCs-CS (3) and gelled (4) : at day 0 (A), day 7 (B), day 14 (C) and day 28 (D), and stabilities against dilution in water (E) and centrifugation (F). Observations under confocal microscopy. FITC-labeled dextran appeared in green and DiD-labeled LNCs appeared in red. Scale bar: 10 μ m.

Dilution in pure water²⁷ or applying a centrifugal force are two methods widely used to evaluate the stability of emulsions. After centrifugation of non-stabilised ATPS, no pellet was observed. A phase separation with dextran FITC-labelled on the bottom phase occurred and ATPS structure could not have been observed under confocal microscopy (**Figure 2-1F**). After dilution, no dextran droplets were observed (**Figure 2-1E**) meaning that dextran droplets were completely destabilized. Thus, in accordance with previous expectation from the phase diagram shown in **Figure 1**, stability studies demonstrated the entire destabilisation of this system. After dilution, ATPS crossed the binodal line resulting in phase separation.

Finally, time stability under confocal microscopy showed an important coalescence phenomenon affecting dextran droplets from day 7 (**Figure 2-1B, C and D**). This result was also confirmed with the Turbiscan TOWER analysis. Indeed, the Turbiscan Stability Index (TSI) calculated allows to evaluate the stability of a sample versus time. Results obtained for ATPS stability from transmission profile were reported in **Figure 3** (orange line).

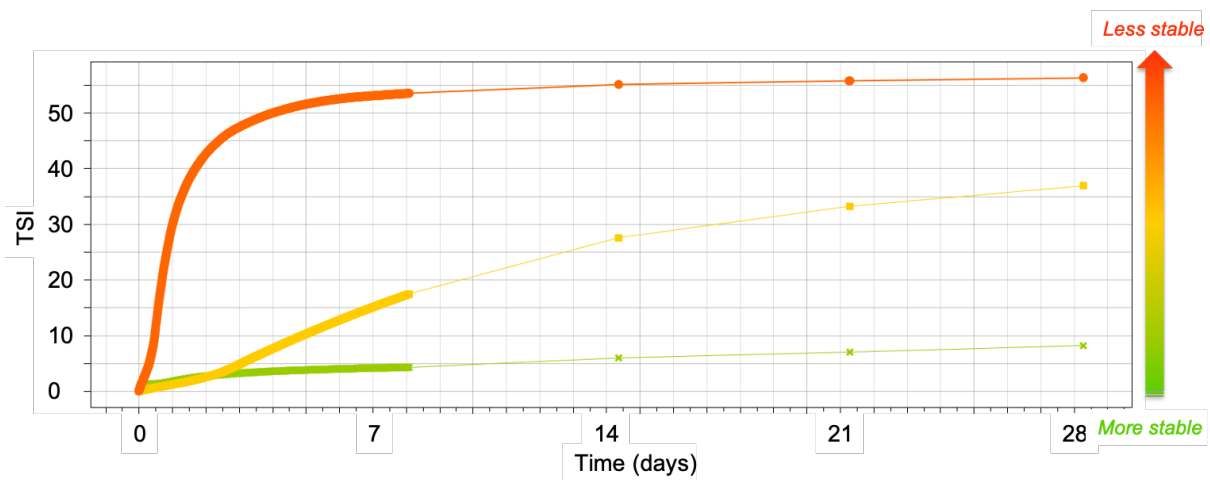


Figure 3. TSI comparison from ATPS at 4°C obtained from transmission profiles of FITC-dextran/PEO ATPS (in orange), FITC-dextran/PEO + LNCs-CS ATPS (in yellow) and FITC-dextran/PEO + LNCs-CS gelled ATPS (in green) for 28 days.

A quick (TSI at 10 before 12 hours of analysis) and strong (TSI reached up to more than 55) destabilisation of non-stabilised ATPS was shown. To conclude, a strong destabilisation phenomenon was observed for non-stabilised ATPS. Accordingly, the stability of ATPS had to be improved to envisage the design of a drug delivery system.

Pickering technique consists in using solid particles to stabilise the interface of emulsion droplets²⁸. Particles such as latex or proteins have already been studied for this purpose with ATPS formed by dextran and PEO polymers^{18,29}. In this work the potential of Pickering-like technique for stabilizing ATPS with non-solid particles was studied. Lipid nanocapsules (LNCs), developed by our group, were chosen for this purpose because of their film-layer properties^{22,23,30}. Moreover due to the chitosan properties for network stabilisation of emulsions by electrostatic interactions³¹, chitosan was grafted onto LNCs surface. Impact on ATPS structure was evaluated under both conditions: LNCs or LNCs-CS.

LNCs were formulated as described in the literature and then characterised by DLS and NTA in order to determine their size (hydrodynamic diameter), PDI, zeta potential and concentration of particles. **Table 2** summarized the characteristics of the LNCs formulations.

Table 1. Characterisation of LNCs and LNCs-CS suspensions. Size, PDI, zeta potential and concentration were obtained from 6 measurements (in triplicate each).

	LNCs	LNCs-CS
Size (nm)	56.8 ± 1.8	63.4 ± 1.3
PDI	0.061 ± 0.018	0.133 ± 0.023
Zeta Potential (mV)	-4.1 ± 0.5	-21.9 ± 3.5
Concentration (10 ¹⁴ particles.mL ⁻¹)	8.38 ± 2.18	2.50 ± 1.13

LNCs had a size close to 50 nm, with a slightly negative zeta potential, and PDI of 0.06 indicated a narrow distribution of particles. Grafting chitosan onto the LNCs

slightly increased the hydrodynamic diameter as well as the polydispersity. Nevertheless, the PDI was still below 0.2 demonstrating the monodispersity of the suspension. Concentration was decreased adding chitosan due to the dialysis that diluted the samples. Zeta potential was globally neutral for LNCs and negative for LNCs-CS. In the literature²⁵, for the same conditions and CS concentration, zeta potential was found at 24.7 ± 2.1 mV. Indeed, it was expected to form positively charged LNCs-CS grafting positively charged CS onto the LNCs surface. However, it has been assumed that the negative charge of LNCs-CS was imputed to highly basic conditions (NaOH 10M) used in transacylation reaction, compared to milder conditions found in literature³². To confirm this hypothesis, control in the same reaction conditions, without chitosan grafted onto LNCs, demonstrated the decreasing of LNCs global charge (-21,6 mV, n=1) (results not presented). An ionisation of polyethylene glycol hydroxystearate presents in Kolliphor® HS 15 during the transacylation process could explain this modification. Based on those results, it was assumed that the transacylation process led to a negative global charge of LNCs.

LNCs or LNCs-CS were added to the ATPS formulation process and their impact on stability was studied. Obtained systems were tracked by confocal microscopy analysis.

LNCs and LNCs-CS were observed surrounding dextran droplets, in clusters (**Figure 2-2A**) or uniformly spread out (**Figure 2-3A**), respectively. In both cases, this behaviour demonstrated their clear-cut affinity for interfaces between PEO and dextran. For Pickering technique, similar coating behaviour was observed by using solid particles such as latex, which are trapped at the interface of dextran droplet in PEO continuous aqueous phase²⁹. Especially with LNCs-CS, a shell-structure was formed by LNCs (**Figure 2-3A**). The formation of a chitosan network between LNCs-CS at the interface of dextran droplets can be assumed.

The stability of ATPS with LNCs and LNCs-CS was then evaluated. As ATPS without LNCs, applying a centrifugal force to the ATPS with LNCs and LNCs-CS did not form any pellet (**Figure 2**). After dilution, in the same way as ATPS without LNCs (**Figure 2-1E**), no dextran droplet was observed for ATPS with LNCs (**Figure 2-2E**). Thus, even with LNCs, ATPS were destabilised. However, in **Figure 2-3E** (ATPS with LNCs-CS after dilution), small dextran droplets were observed. An effect of Pickering-like stabilisation by LNCs-CS onto ATPS was obtained. LNCs-CS coating helped retaining dextran inside droplets under conditions where ATPS should normally be destabilized, under the binodal line (**Figure 1**). It was assumed that the huge droplet size decrease may be explained by the permeability of the shell.

The stability over 28 days was also studied for the ATPS formulated with LNCs and LNCs-CS. **Figure 2-2C** of ATPS with LNCs showed an increased droplet size only from day 14 (comparing to day 7 for ATPS without LNCs – **Figure 2-1B**). Comparing **Figure 2-1** and **Figure 2-2**, adding LNCs onto ATPS improves its stabilisation. By contrast, for ATPS with LNCs-CS, coalescence was observed from day 7 (**Figure 2-3B**). Thus, grafting chitosan onto the LNCs did not improve the system stability.

Interestingly, after adding LNCs-CS onto ATPS, the formation of multiple emulsions such as PEO/dex/PEO and even dex/PEO/dex/PEO (**Figure 2-3B, C and D**) was observed from day 7. The formation of multiple emulsions from ATPS composed of dextran and PEG, was already reported in the literature in presence of SiO₂ nanoparticles.³³ Authors explained this behaviour by the osmotic pressure imbalance imputed to the concentration of nanoparticles in the PEG phase.³³

Stability assays were also performed by Turbiscan Tower. The profile corresponding to ATPS with LNCs was obtained in backscattering signal due to the opacity of the sample analysed. Because it was not possible to compare TSI obtained from transmission and backscattering profiles, TSI graph for ATPS with LNCs was not

presented here. Result obtained for ATPS with LNCs (available in Supporting Information) was consistent with the relative stability observed under confocal microscopy (**Figure 2-2**). Result obtained for ATPS with LNCs-CS was reported in **Figure 3** (yellow line). Adding LNCs-CS improved the ATPS stability compared to ATPS without LNCs (orange line), nevertheless, a destabilisation was observed with a TSI at 10 reached before day 5 of analysis.

At this stage, ATPS with LNCs and LNCs-CS were still facing their own limits of stability. Consequently, to consolidate LNCs coating, the formulation process was optimized. Hann, *et al*, formed a rigid shell by complexation of polyelectrolytes at the outer interface between PEG phase with negatively charged SiO₂ nanoparticles and dextran phase with positively charged polyelectrolyte³³. In order to improve the ATPS stability with LNCs-CS, the well-defined polyelectrolyte complexation properties of chitosan will be used by coupling it with alginate to form a gel.³⁴ **Figure 2-4A** showed the impact of the gelation process on ATPS. Thick shells were observed surrounding dextran droplets. Green colour observed was not imputed to alginate autofluorescence, thus it was assumed corresponding to dextran-FITC escape from dextran droplets. Dextran core combined with alginate shell structures were formed by the gelation process. Indeed, electrostatic interactions between cationic chitosan and anionic alginate polyelectrolytes are widely described in the literature³⁵. Based on this reactivity, it was suggested that negatively charged alginate interacts with the positively charged sites of chitosan grafted onto LNCs in order to consolidate the preformed chitosan network. The gelation process involved was based on polyelectrolyte complexation reaction between alginate and chitosan leading to the shell formation³⁴.

As previously, the stability of the gelled system was evaluated. After centrifugation, gelled ATPS produced pellet. The supernatant was removed and

replaced by water to obtain the same concentration without dilution. This system was then analysed, and dextran droplets were observed (**Figure 2-4F**). After dilution, dextran droplets were also observed (**Figure 2-4E**). By contrast with previous ATPS formulated, submitting gelled ATPS to half dilution in water did not impact the structure. Those results highlighted the interest of strengthening the shell by a gelation process for applications in diluted conditions. Finally, stability over time was studied for gelled ATPS formulated. In **Figure 2-4B** and **C**, no sign of destabilisation was observed until 28 days for gelled ATPS. At day 28, a few dextran droplet clusters were observed but no coalescence phenomenon was noticed (**Figure 2-4D**). Moreover, by Turbiscan Tower analysis, a stability was shown for 28 days during which TSI remained below 10 (**Figure 3**, green line). These results confirmed the stability of gelled ATPS over 28 days.

Because of their stability, TEM analysis of gelled ATPS formulated was performed after 2 days of gelation. In **Figure 4**, roughly 3 μm diameter spherical structures were observed. Shape and size of structures observed were consistent with the presence of dextran droplets observed in gelled ATPS under confocal microscopy analysis (**Figure 2-4A**).

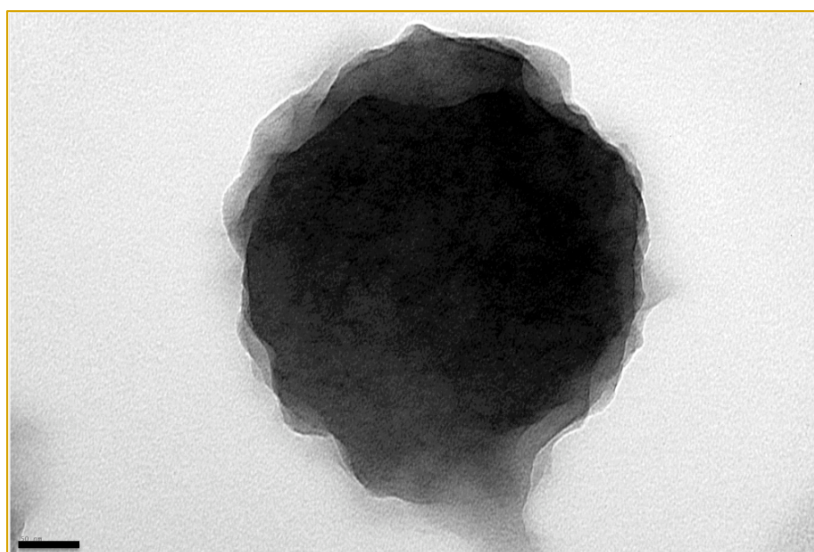


Figure 4. TEM micrographs of gelled ATPS. Scale bar: 50 nm.

With this result, the formation of microparticles was suggested and a schematic representation was proposed in **Figure 5**. It was expected that the rugged microparticle surface observed in **Figure 4** could fit the proposed model designed in **Figure 5**, with a LNCs coating onto dextran droplets surface, surrounded by a gelled chitosan network.

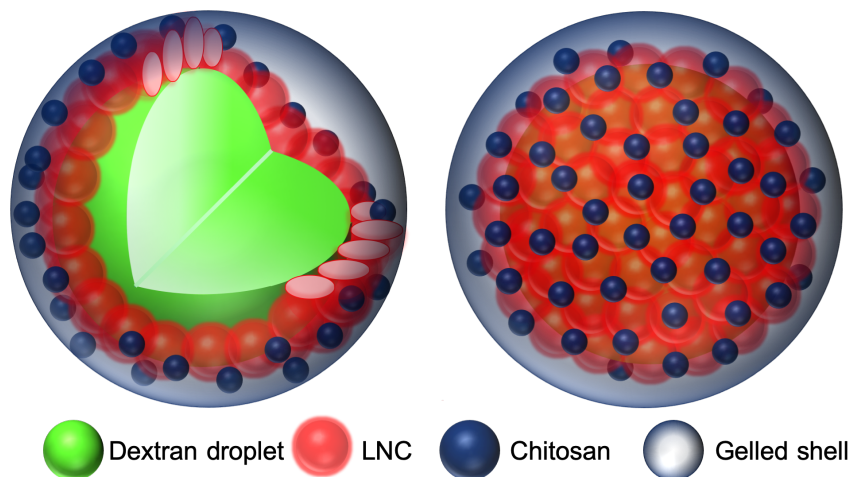


Figure 5. Schematic representation of obtained microparticles with chitosan (in blue) grafted LNCs (in red) surrounding dextran droplets (in green) forming an alginate gelled shell by gelation process with calcium chloride.

Ma, *et al*, developed microcapsules from ATPS by polyelectrolyte complexation adjusting the shell thickness by adding polyelectrolyte layers.³⁶ In the same way, microparticles herein formulated were also based on polyelectrolyte complexation, by a process that could be tailored (such as consolidating the shell) depending on applications targeted. However, a smaller size was obtained compared to microparticles formulated by Ma, *et al*, with a size above 100 μm . Formulation of small-size systems should take advantage of microscale carriers properties for drug delivery such as improving oral bioavailability.³⁷ To this end, a large range of applications could be considered for those biocompatible microparticles, especially for encapsulation of hydrophilic drugs like peptides or proteins.

Conclusion

Due to their biocompatibility, easy and ecological-friendly formulation process, ATPS have a great potential for many applications, especially in the biomedical field. However, the poor stability of those systems remains the major obstacle to overcome for the ATPS development. A gelation process was developed based on a Pickering-like technique from chitosan grafted lipid nanocapsules, and microparticles were obtained. These microparticles were stable up to 28 days after formulation and upon dilution and centrifugation. Further characterizations of microparticles need to be performed, but their formulation from ATPS by an innovative process constitutes a first step to encapsulate numerous hydrophilic drugs, what still remains a technological challenge in the drug delivery field.

Acknowledgment

We gratefully thank the SCIAM, especially Rodolphe Perrot for confocal microscopy imaging and Romain Mallet for TEM imaging.

Abbreviations: ATPS: Aqueous Two-Phase System; CS: chitosan; DLS: dynamic light scattering; Dex: dextran; DiD: 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethyl-indodicarbocyanine 4-chlorobenzenesulfonate; FITC: fluorescein isothiocyanate; LNCs: lipid nanocapsules; NTA: nanoparticle tracking analysis; PDI: polydispersity index; PEG: polyethylene glycol; PEO: polyethylene oxide; TEM: Transmission Electron Microscopy; TSI: Turbiscan Stability Index; v/v: volume / volume concentration in percentage; Wt%: mass concentration in percentage; W/v: weight / volume concentration in percentage.

Supporting Information

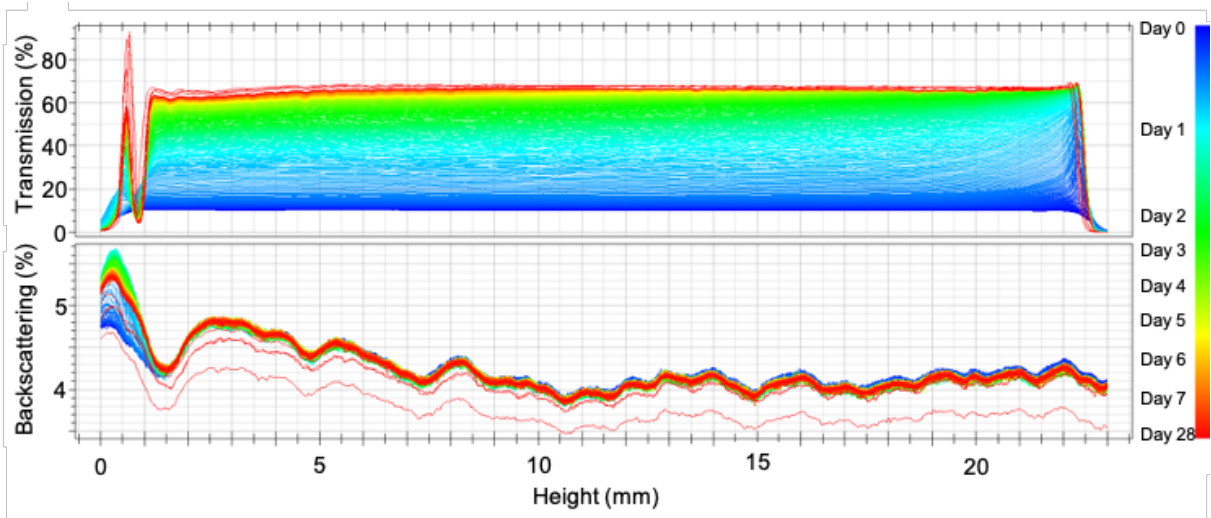


Figure S1. Transmission and backscattering profiles obtained from Turbiscan Tower analysis of ATPS for 28 days

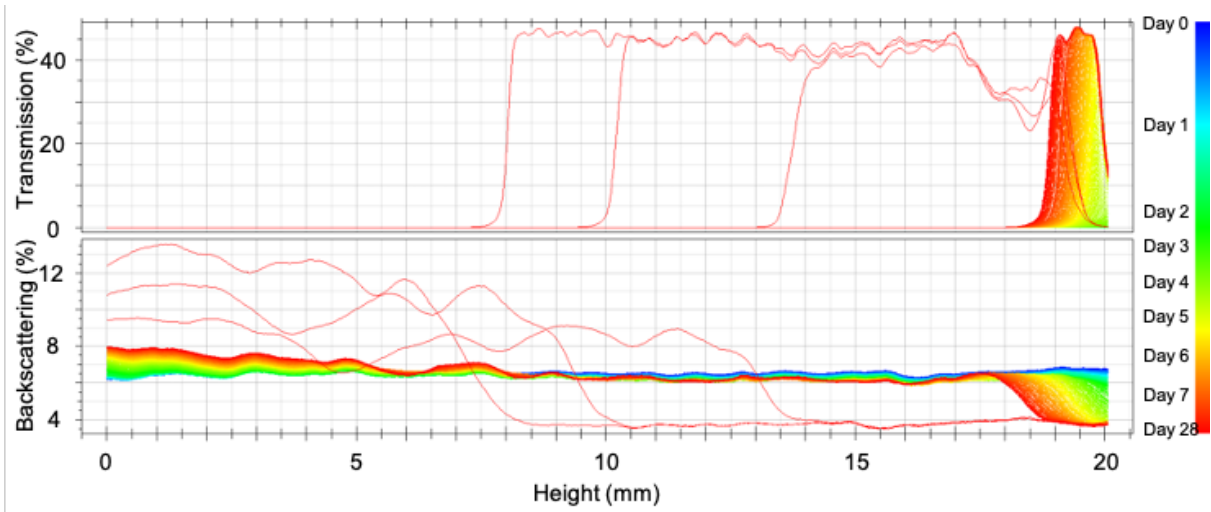


Figure S2. Transmission and backscattering profiles obtained from Turbiscan Tower analysis of ATPS with LNCs for 28 days

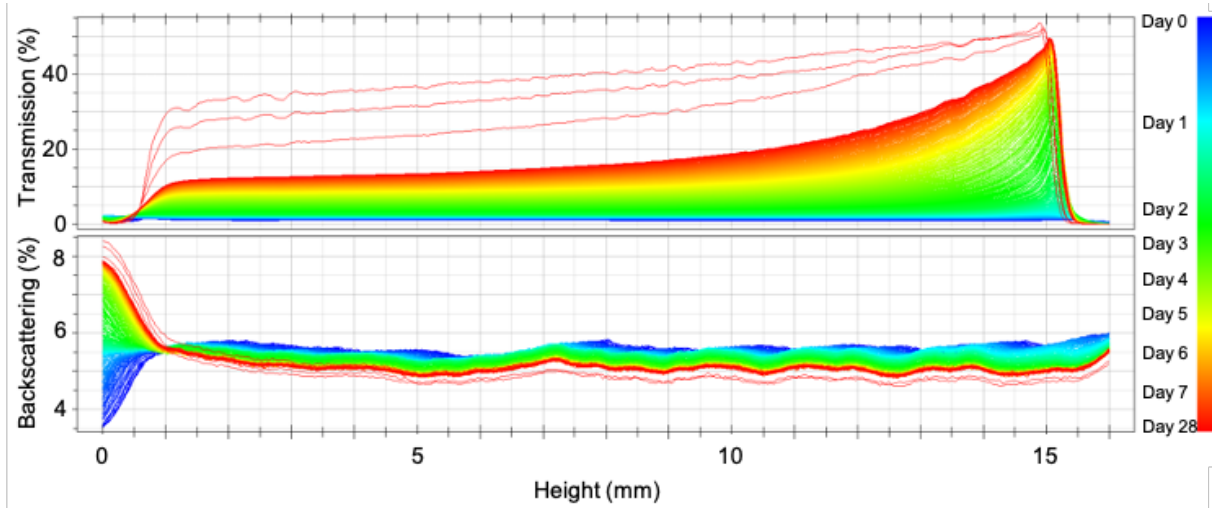


Figure S3. Transmission and backscattering profiles obtained from Turbiscan Tower analysis of ATPS with LNCs-CS for 28 days

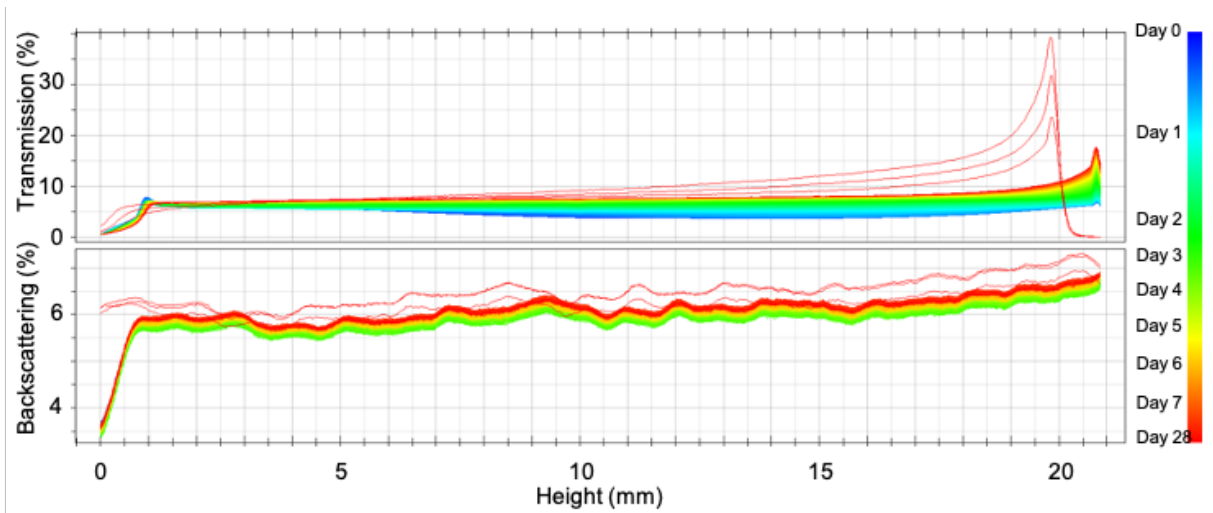


Figure S4. Transmission and backscattering profiles obtained from Turbiscan Tower analysis of microparticles for 28 days

REFERENCES

- 1 R. Hatti-Kaul, Aqueous Two-Phase Systems: A General Overview, *Mol. Biotechnol.*, 2001, **19**, 269–278.
- 2 M. Iqbal, Y. Tao, S. Xie, Y. Zhu, D. Chen, X. Wang, L. Huang, D. Peng, A. Sattar, M. A. B. Shabbir, H. I. Hussain, S. Ahmed and Z. Yuan, Aqueous two-phase system (ATPS): an overview and advances in its applications, *Biol. Proced. Online*, 2016, **18**, 18.
- 3 J. A. Asenjo and B. A. Andrews, Aqueous two-phase systems for protein separation: Phase separation and applications, *J. Chromatogr. A*, 2012, **1238**, 1–10.
- 4 M. E. Ali and A. Lamprecht, Polyethylene glycol as an alternative polymer solvent for nanoparticle preparation, *Int. J. Pharm.*, 2013, **456**, 135–142.
- 5 A. George, P. A. Shah and P. S. Shrivastav, Natural biodegradable polymers based nano-formulations for drug delivery: A review, *Int. J. Pharm.*, 2019, **561**, 244–264.
- 6 M. A. Torres-Acosta, K. Mayolo-Deloisa, J. González-Valdez and M. Rito-Palomares, Aqueous Two-Phase Systems at Large Scale: Challenges and Opportunities, *Biotechnol. J.*, 2018, **1800117**, 1800117.
- 7 A. G. Teixeira, R. Agarwal, K. R. Ko, J. Grant-Burt, B. M. Leung and J. P. Frampton, Emerging Biotechnology Applications of Aqueous Two-Phase Systems, *Adv. Healthc. Mater.*, 2018, **7**, 1–19.
- 8 R. R. G. Soares, A. M. Azevedo, J. M. Van Alstine and M. R. Aires-Barros, Partitioning in aqueous two-phase systems: Analysis of strengths, weaknesses, opportunities and threats, *Biotechnol. J.*, 2015, **10**, 1158–1169.
- 9 F. Ruiz-Ruiz, J. Benavides, O. Aguilar and M. Rito-Palomares, Aqueous two-

- phase affinity partitioning systems: Current applications and trends, *J. Chromatogr. A*, 2012, **1244**, 1–13.
- 10 Y. Chao and H. C. Shum, Emerging aqueous two-phase systems: from fundamentals of interfaces to biomedical applications, *Chem. Soc. Rev.*, 2020, **49**, 114–142.
 - 11 R. J. H. Stenekes, O. Franssen, E. M. G. van Bommel, D. J. A. Crommelin and W. E. Hennink, The use of aqueous PEG/dextran phase separation for the preparation of dextran microspheres, *Int. J. Pharm.*, 1999, **183**, 29–32.
 - 12 S. D. Hann, K. J. Stebe and D. Lee, All-Aqueous Assemblies via Interfacial Complexation: Toward Artificial Cell and Microniche Development, *Langmuir*, 2017, **33**, 10107–10117.
 - 13 F. Dumas, E. Roger, J. Rodriguez, L. Benyahia and J.-P. Benoit, Aqueous Two-Phase Systems: simple one-step process formulation and phase diagram for characterisation, *Colloid Polym. Sci.*, , DOI:10.1007/s00396-020-04748-8.
 - 14 M. Destribats, S. Gineste, E. Laurichesse, H. Tanner, F. Leal-Calderon, V. Héroguez and V. Schmitt, Pickering emulsions: What are the main parameters determining the emulsion type and interfacial properties?, *Langmuir*, 2014, **30**, 9313–9326.
 - 15 B. P. Binks and H. Shi, Phase Inversion of Silica Particle-Stabilized Water-in-Water Emulsions, *Langmuir*, 2019, **35**, 4046–4057.
 - 16 K. Golemanov, S. Tcholakova, P. A. Kralchevsky, K. P. Ananthapadmanabhan and A. Lips, Latex-Particle-Stabilized Emulsions of Anti-Bancroft Type, *Langmuir*, 2006, **22**, 4968–4977.
 - 17 N. Abbasi, M. Navi and S. S. H. Tsai, Microfluidic Generation of Particle-Stabilized Water-in-Water Emulsions, *Langmuir*, 2018, **34**, 213–218.
 - 18 B. T. Nguyen, T. Nicolai and L. Benyahia, Stabilization of water-in-water

- emulsions by addition of protein particles, *Langmuir*, 2013, **29**, 10658–10664.
- 19 A. A. K. Das, B. W. Filby, D. A. Geddes, D. Legrande and V. N. Paunov, High throughput fabrication of cell spheroids by templating water-in-water Pickering emulsions, *Mater. Horizons*, 2017, **4**, 2017.
- 20 H. Liang, B. Zhou, J. Li, Y. He, Y. Pei and B. Li, Engineering functional alginate beads for encapsulation of Pickering emulsions stabilized by colloidal particles, *RSC Adv.*, 2016, **6**, 101267–101276.
- 21 N. Matougui, L. Boge, A.-C. Groo, A. Umerska, L. Ringstad, H. Bysell and P. Saulnier, Lipid-based nanoformulations for peptide delivery, *Int. J. Pharm.*, 2016, **502**, 80–97.
- 22 I. Minkov, T. Ivanova, I. Panaiotov, J. Proust and P. Saulnier, Reorganization of lipid nanocapsules at air-water interface: I. Kinetics of surface film formation, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, 2005, **45**, 14–23.
- 23 I. Minkov, T. Ivanova, I. Panaiotov, J. Proust and P. Saulnier, Reorganization of lipid nanocapsules at air-water interface: Part 2. Properties of the formed surface film., *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, 2005, **44**, 197–203.
- 24 B. Heurtault, P. Saulnier, B. Pech, J. E. Proust and J. P. Benoit, A novel phase inversion -based process for the preparation of lipid nanocarrier, *Pharm. Res.*, 2002, **19**, 875–880.
- 25 K. Messaoudi, P. Saulnier, K. Boesen, J.-P. Benoit and F. Lagarce, Anti-epidermal growth factor receptor siRNA carried by chitosan-transacylated lipid nanocapsules increases sensitivity of glioblastoma cells to temozolomide., *Int. J. Nanomedicine*, 2014, **9**, 1479–90.
- 26 A. Kaul, The Phase Diagram, *Methods Biotechnol.*, 2000, **11**, 11–21.
- 27 J.-P. Douliez, N. Martin, T. Beneyton, J.-C. Eloi, J.-P. Chapel, L. Navailles, J.-C. Baret, S. Mann and L. Béven, Preparation of Swellable Hydrogel-Containing

- Colloidosomes from Aqueous Two-Phase Pickering Emulsion Droplets, *Angew. Chemie Int. Ed.*, 2018, **57**, 7780–7784.
- 28 S. U. Pickering, CXCVI.—Emulsions, *J. Chem. Soc., Trans.*, 1907, **91**, 2001–2021.
- 29 G. Balakrishnan, T. Nicolai, L. Benyahia and D. Durand, Particles trapped at the droplet interface in water-in-water emulsions, *Langmuir*, 2012, **28**, 5921–5926.
- 30 S. Hirsjärvi, S. Dufort, G. Bastiat, P. Saulnier, C. Passirani, J.-L. Coll and J.-P. Benoît, Surface modification of lipid nanocapsules with polysaccharides: from physicochemical characteristics to in vivo aspects., *Acta Biomater.*, 2013, **9**, 6686–93.
- 31 L. Alison, P. A. Rühls, E. Tervoort, A. Teleki, M. Zanini, L. Isa and A. R. Studart, Pickering and Network Stabilization of Biocompatible Emulsions Using Chitosan-Modified Silica Nanoparticles, *Langmuir*, 2016, **32**, 13446–13457.
- 32 N. Skandrani, A. Barras, D. Legrand, T. Gharbi, H. Boulahdour and R. Boukherroub, Lipid nanocapsules functionalized with polyethyleneimine for plasmid DNA and drug co-delivery and cell imaging, *Nanoscale*, 2014, **6**, 7379.
- 33 S. D. Hann, K. J. Stebe and D. Lee, AWE-somes: All Water Emulsion Bodies with Permeable Shells and Selective Compartments, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2017, **9**, 25023–25028.
- 34 P. Liu and X. Zhao, Facile preparation of well-defined near-monodisperse chitosan/sodium alginate polyelectrolyte complex nanoparticles (CS/SAL NPs) via ionotropic gelification: A suitable technique for drug delivery systems, *Biotechnol. J.*, 2013, **8**, 847–854.
- 35 J. Y. Seo, B. Lee, T. W. Kang, J. H. Noh, M. J. Kim, Y. B. Ji, H. J. Ju, B. H. Min and M. S. Kim, Electrostatically Interactive Injectable Hydrogels for Drug Delivery, *Tissue Eng. Regen. Med.*, 2018, **15**, 513–520.

- 36 Q. Ma, Y. Song, J. W. Kim, H. S. Choi and H. C. Shum, Affinity Partitioning-Induced Self-Assembly in Aqueous Two-Phase Systems: Templating for Polyelectrolyte Microcapsules, *ACS Macro Lett.*, 2016, **5**, 666–670.
- 37 J. D. Schulz, M. A. Gauthier and J.-C. Leroux, Improving oral drug bioavailability with polycations?, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2015, **97**, 427–437.

PARTIE III

PARTIE III

Encapsulation de l'insuline dans les microparticules & développement d'une méthode de dosage par UHPLC

CONTEXTE

Les microparticules formulées en Partie II présentent les caractéristiques nécessaires pour un système de délivrance thérapeutique. Afin de valider ce potentiel thérapeutique, il est nécessaire de s'assurer qu'une molécule de type BCS III puisse se concentrer dans le cœur aqueux (phase de dextrane) des microparticules. Les systèmes microparticulaires devront également retenir la molécule thérapeutique et assurer sa protection jusqu'à sa libération intestinale.

L'administration orale de l'insuline représentant un enjeu actuel majeur dans la prise en charge du diabète, cette molécule sera utilisée comme modèle afin d'évaluer la capacité des microparticules à encapsuler un principe actif.

OBJECTIFS

Les objectifs de cette partie concernent premièrement le développement d'une méthode de dosage par UHPLC selon les recommandations internationales ICH-Q2. Le second objectif consiste à évaluer le potentiel des microparticules à encapsuler l'insuline à une concentration de $75 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

INTRODUCTION

L'insuline humaine est une hormone naturellement constitutive de l'organisme dont la structure (représentée **Figure 1**) se compose de deux chaînes d'acides aminés, une chaîne A de 21 acides aminés et une chaîne B de 30 acides aminés.¹ Trois liaisons disulfures entre des cystéines sont à l'origine de la conformation de l'insuline, une liaison intra-chaîne (sur la chaîne A) et deux liaisons inter-chaînes.

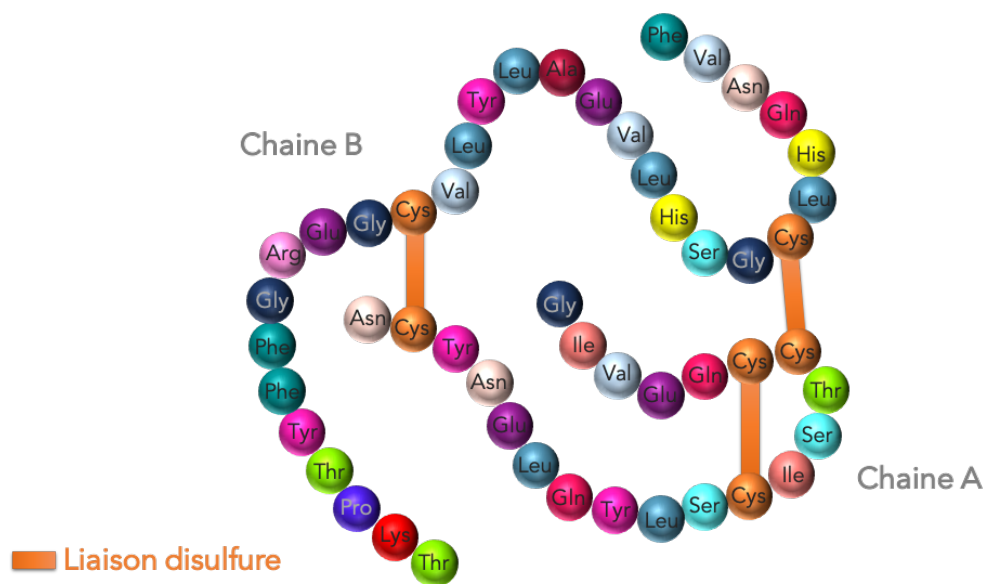


Figure 1. Représentation schématique de la structure de l'insuline

Il s'agit d'une hormone endogène, synthétisée par les cellules bêta-pancréatiques sous la forme de pro-insuline. Après clivage du peptide C, l'insuline sous forme mature est impliquée dans la régulation de la glycémie, la circulation du

glucose dans le sang.¹ L'impact physiologique de mutations dans la séquence de l'insuline a démontré l'importance de la structure de l'insuline pour son activité.² Une déficience en insuline ou des dysfonctions de son activité sont à l'origine du diabète, caractérisé par une hyperglycémie³ (une concentration anormalement élevée de glucose dans la circulation sanguine).

De nos jours le diabète est l'une des pathologies chroniques les plus répandues au monde. Selon une prévision de l'OMS, elle sera responsable de la 7^e cause de mortalité d'ici 2030.⁴ En fonction des phénomènes physiologiques impliqués, différents types de diabètes sont définis.

- Le diabète dit de **type I** est lié à une destruction des cellules bêta-pancréatiques entraînant une déficience en insuline.
- Le diabète dit de **type II** résulte quant à lui d'une résistance, c'est-à-dire une diminution de la réponse des cellules⁵, à l'insuline.
- Enfin, le diabète dit **gestationnel** peut également être observé au cours de la grossesse.³ L'origine du diabète gestationnel n'est pas clairement identifiée mais ce diabète pourrait résulter d'une interférence des hormones de la grossesse sur l'activité de l'insuline.⁶

L'insulinothérapie est le traitement de référence du diabète de type I et est également utilisée dans la prise en charge de certains diabètes de type II.⁷ Elle repose sur l'injection quotidienne d'insuline ou de ses analogues par voie sous-cutanée à l'aide de stylos à insuline ou de pompes à insuline. Ces injections comportent de nombreux désagréments réduisant l'observance des patients, tels que la douleur, le stress, l'hypertrophie locale aux sites d'injection, etc. De plus, cette voie d'administration invasive présente un réel risque d'infection. De nombreuses études s'intéressent à la recherche de stratégies pour l'administration de l'insuline par de nouvelles voies d'administration : pulmonaire, cutanée ou orale.⁷

Cette dernière voie est la voie d'administration privilégiée des médicaments. Cependant l'insuline, qui est une molécule de classe III selon la classification BCS, possède une faible biodisponibilité par voie orale (déterminée à $-0,3\% \pm 0,4\%$ pour une solution orale d'insuline concentrée à 50 UI/kg)⁸. L'administration de l'insuline *per os* reste donc un défi à relever. Le développement des microparticules formulées dans ce projet s'inscrit dans cette perspective. En effet, l'encapsulation de l'insuline dans les systèmes nano et microparticulaires fait partie des stratégies innovantes proposées pour répondre à cette problématique. Récemment, Guo, et *al.*⁹ ont démontré un effet hypoglycémiant (c'est à dire capable de diminuer la concentration de glucose dans le sang) après administration orale de nanoparticules avec un taux d'encapsulation de l'insuline à 1,5% (m/m). Basée sur ces travaux, la quantité d'insuline théorique à encapsuler dans le système microparticulaire formulé dans ce travail a été déterminée. Un taux d'encapsulation à 1,5% (m/m) correspond à 1,5 g d'insuline pour 100 g de microparticules (matière sèche). Or si on évalue la masse des microparticules à la masse du dextrane (concentré à 0,5% (m/m) dans la formulation), et si on émet l'hypothèse que la densité de la formulation est proche de 1 (donc que 100g équivaut à 100 mL), il y aurait 0,5 g de particules dans 100 mL de formulation. Il faut donc $0,5 \times (1,5/100) = 7,5 \cdot 10^{-3}$ g d'insuline pour 100 mL de formulation, soit une concentration finale en insuline de **75 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$** de formulation. Le taux d'encapsulation expérimental sera déterminé par dosage de l'insuline.

Développer une méthode de quantification de l'insuline présente un réel intérêt en vue de l'émergence des nouvelles applications diagnostiques et thérapeutiques du diabète. Le développement de nouvelles formulations, telles que les nanoparticules par exemple^{10,11}, nécessite des méthodes fiables pour la quantification de l'insuline, permettant ainsi d'évaluer leur efficacité. Dans cet objectif, une méthode analytique doit être validée d'après la ligne directrice **Q2 (R1)** du Conseil International d'Harmonisation des exigences techniques pour

l'enregistrement des médicaments à usage humain (« International Conference Harmonization » ou ICH) concernant la validation des procédures analytiques.¹² Cette procédure détermine plusieurs critères de validation tels que l'exactitude, la précision, la spécificité, la linéarité et les limites de détection ou de quantification.¹²

Depuis la découverte de la thérapie par l'insuline, de nombreuses méthodes de quantification de l'insuline humaine ont été développées. Initialement, ces méthodes servaient à la compréhension des mécanismes physiologiques de l'insuline.¹³ Elles ont ensuite été progressivement optimisées. Par exemple, des étalons externes (comme de l'insuline porcine) ont été utilisés afin de limiter les variations de mesures entre les laboratoires.¹³ Puis, simultanément à la production d'insuline recombinante et aux analogues de synthèse (obtenus par modification de la séquence de l'insuline humaine)¹⁴, des méthodes analytiques ont été développées.¹⁵ Parmi les méthodes analytiques développées, différentes méthodes chromatographiques peuvent être utilisées pour l'analyse de l'insuline:

- la chromatographie électrocinétique micellaire (MECC) : utilisée pour le dosage de l'insuline dans des formulations pharmaceutiques,^{16,17}
- la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS/MS) : généralement utilisée pour les dosages sanguins (à partir d'échantillons de sang, de sérum ou de plasma);¹⁸⁻²¹ cette méthode a été largement utilisée pour la détection et la quantification des analogues de l'insuline,^{18,22} elle permet également la détection de l'insuline recombinante dans l'urine humaine²³,
- la chromatographie liquide haute performance (HPLC) : généralement utilisée pour les dosages plasmatiques (HPLC-UV)^{24,25},
- la chromatographie liquide à ultra haute performance (UHPLC) : récemment utilisée pour la caractérisation de la pureté de conjugués

oligosaccharides utilisés dans le développement d'insulines sensibles au glucose par exemple (UHPLC-UV).²⁶ Cette méthode possède de nombreux avantages par rapport aux méthodes de chromatographies conventionnelles en termes de résolution, de sensibilité et de faible consommation de solvants.

La méthode chromatographique par UHPLC permettrait donc d'analyser l'insuline humaine de manière fiable et éco-responsable.

DEVELOPPEMENT D'UNE METHODE DE DOSAGE DE L'INSULINE PAR UHPLC

Afin de déterminer le taux d'encapsulation d'insuline dans les microparticules formulées, une méthode de dosage de l'insuline humaine par UHPLC a été développée selon les recommandations des ICH Q2(R1). Dans un premier temps, la qualité des solvants utilisés ainsi que le mode d'élution ont été étudiés. La validation de la méthode selon les ICH-Q2 a ensuite été initiée. Les résultats présentés dans cette partie font état d'un travail réalisé avec la collaboration de Nolwenn LAUTRAM, assistante ingénieure spécialisée en chimie analytique, et deux étudiantes qui ont effectué leurs stages au laboratoire : Alexandra RICHARD, étudiante en Master 1 et Océane GAUTHIER, étudiante en 2^e année de BTS Métiers de la Chimie.

Matériel & Méthodes

Matériel

L'eau de grade LC-MS HPLC et l'acétonitrile de grade LC-MS ont été achetés chez Honeywell (Charlotte, États-Unis). L'acide chlorhydrique 0,1M, l'acétonitrile de grade LC-MS (série A et série B) et l'acide trifluoroacétique de grade HPLC ont été achetés chez Fischer Scientific (Illkirch, France). L'acétonitrile de grades HPLC-S, LC-MS et ULC-MS a été acheté chez Biosolve (Dieuze, France). L'insuline recombinante humaine a été achetée chez Sigma (Saint Quentin-Fallavier, France). L'eau MilliQ a été fournie par un système de filtration MilliQ (Merck-Millipore, Darmstadt, Allemagne).

Instrumentation

Les analyses chromatographiques ont été effectuées avec un système ACQUITY® UPLC H-Class (Waters Corporation, Milford, USA) équipé d'un injecteur manuel avec une boucle d'injection, un four à 40°C, une pompe de 18 000 psi (1241bar), une colonne ACQUITY® UPLC BEH C18 (1,7 μm – 2,1 mm x 50,0 mm) et une pré-colonne VanGuard ACQUITY® UPLC BEH C18 (1,7 μm – 2,1 mm x 5,0 mm). Le logiciel Empower™ 3 software a été utilisé pour l'acquisition et le traitement des données. La détection a été réalisée par un détecteur à fluorescence ($\lambda_{\text{émission}}$: 277 nm $\lambda_{\text{excitation}}$: 303 nm) et un détecteur UV (280 nm). Les échantillons sont conservés à 8°C. Le volume d'injection est de 10 μL .

Préparation des échantillons

Une solution de HCl (0,005M) à pH 2,2 a été préparée puis filtrée à travers un filtre Anotop™ 25 plus de 0,1 μm (Whatman™, GE Healthcare Life Science, Buckinghamshire, Angleterre). Une solution d'insuline concentrée à 2 mg.mL⁻¹ dans l' HCl 0,005M a été préparée. Les échantillons à 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ou 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ d'insuline

ont ensuite été préparés à partir de la solution d'insuline concentrée, puis filtrés sur un filtre Millex® LG 13 mm de 0,2 µm (Merck Millipore Ltd., Tullagreen, Carrigtwohill, Co. Cork, Irlande) et insérés directement dans des inserts en verre désactivés ou dans des flacons de type QuanRecovery (Waters Corporation, Milford, USA).

Détermination du mode d'élution

Des modes d'élutions isocratiques et gradients ont été testés. La phase mobile est composée d'une phase mobile A (95% eau et 5% acétonitrile avec 0,05% d'acide trifluoroacétique) et d'une phase mobile B (100% acétonitrile avec 0,05% d'acide trifluoroacétique).

En mode isocratique, les essais ont été réalisés avec des variations de phases mobiles de 10% à 90% de phase mobile A.

Différents essais ont ensuite été réalisés en mode gradient en faisant varier les proportions de phases mobiles, la durée de l'analyse et le débit dans les conditions indiquées **Tableau 1**.

Tableau 1. Paramètres étudiés pour la détermination du mode gradient

Paramètres	Minimum	Maximum
Phases mobiles		
▪ <i>Conditions initiales :</i>		
▪ % phase mobile A	50%	100%
▪ % phase mobile B	0%	50%
▪ <i>En cours d'analyses :</i>		
▪ % phase mobile A	0%	100%
▪ % phase mobile B	0%	100%
Durée de l'analyse	8 min	15 min
Débit	0,1 mL.min ⁻¹	0,2 mL.min ⁻¹

Grade des solvants

Différents grades de pureté de l'eau et de l'acétonitrile entrant dans la composition des phases mobiles ont été testés et comparés. L'intensité du signal obtenu pour chaque solvant a été déterminée, puis classée en fonction d'une valeur arbitraire de 5 unités d'émission de fluorescence.

Flaconnage

Des comparaisons de deux types de flacons (verre désactivé ou QuanRecovery) ont été effectuées.

Limites de détection et de quantification

Les limites de détection et de quantification ont été déterminées grâce au logiciel Empower™ 3, à partir du rapport signal (S) sur bruit (B) selon l'équation suivante ²⁷:

$$\frac{S}{B} = \frac{2 H}{h}$$

Avec H la hauteur du pic, mesurée du sommet à la ligne de base extrapolée sur une distance supérieure ou égale à cinq fois la largeur du pic à sa mi-hauteur ; et h la différence entre les valeurs de bruit les plus grandes et les plus petites observées sur une distance égale à cinq fois la largeur à mi-hauteur du pic et si possible à égale distance du pic considéré.

Linéarité

La linéarité a été déterminée par l'intégration des aires du signal d'insuline à cinq concentrations différentes : 20, 40, 60, 80 et 100 µg.mL⁻¹. Elle a été évaluée par détermination de la droite de régression linéaire et de son coefficient de corrélation (R²).

Résultats & Discussion

Détermination des conditions chromatographiques

Détermination du mode d'élution

Afin de développer une méthode chromatographique pour quantifier l'insuline, un mode d'élution optimal a été défini. Les résultats obtenus ont été analysés en UV à 280 nm car cette détection s'est révélée être beaucoup plus spécifique que la fluorescence. Il existe deux modes d'élutions différents : de type isocratique (les proportions de phases mobiles sont constantes au cours du temps) ou de type gradient (les proportions de phases mobiles varient au cours du temps).

Mode isocratique

Dans les conditions testées en mode isocratique, des pics larges et/ou asymétriques ont été obtenus, et des temps de rétention similaires ou proches du signal d'injection ont également été observés. Par exemple, la **Figure 2** montre un chromatogramme obtenu en mode isocratique (70%A/30%B) pour lequel le pic de l'insuline est large, asymétrique et confondu au signal d'injection. Le mode isocratique n'a donc pas été retenu. Dans la littérature, le mode isocratique est couramment utilisé pour l'analyse de l'insuline par HPLC-UV, mais en utilisant fréquemment une phase mobile A constituée d'une solution tampon de sulfate de sodium Na₂SO₄.^{24,25,28}

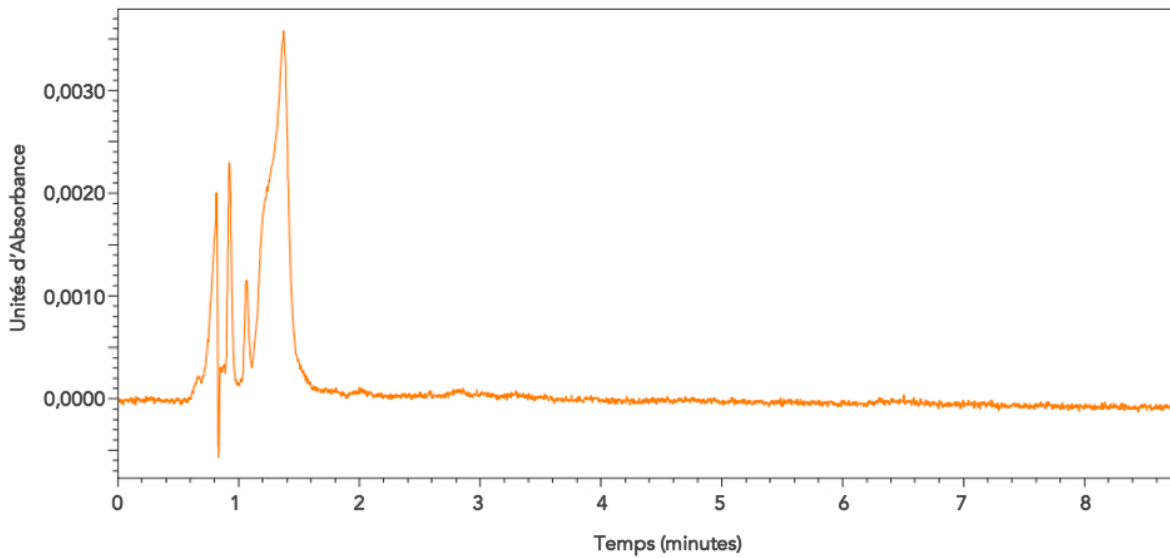


Figure 2. Chromatogramme obtenu pour une analyse en mode isocratique avec un rapport de phase mobile %A/%B de 70/30, concentration en insuline à 20 µg.mL⁻¹, détection en UV à 280 nm

Mode gradient

Le mode gradient est le plus fréquemment utilisé pour les analyses de l'insuline par LC-MS/MS.^{18,19,22,29} Différents gradients ont été testés et comparés entre eux en fonction de la sensibilité, de la résolution et de la symétrie des pics d'insuline obtenus. Le **Tableau 2** présente quelques-unes des conditions testées.

Tableau 2. Exemples de conditions de gradients testés en pourcentages de phases mobiles (A/B, v/v)

Gradient A	Gradient B	Gradient C	Gradient D
0 min : 72%/28%	0min : 80%/20%	0 min : 100%/0%	0 min : 90%/10%
1 min : 10%/90%	3 min : 70%/30%	0,5 min : 100%/0%	3 min : 60%/40%
3 min : 10%/90%	10 min : 70%/30%	1,5 min : 10%/90%	8 min : 60%/40%
4 min : 72%/28%	10,5 min : 80%/20%	3,5 min : 0%/100%	8,5 min : 90%/10%
8 min : 72%/28%	15 min : 80%/20%	4,5 min : 100%/0%	15 min : 90%/10%

La **Figure 3** compare différents exemples de gradients testés dont les conditions sont détaillées dans le **Tableau 2**. Avec le gradient A on observe un pic

asymétrique et avec le gradient B on observe une mauvaise résolution du pic. Par conséquent, ces gradients n'ont pas été retenus.

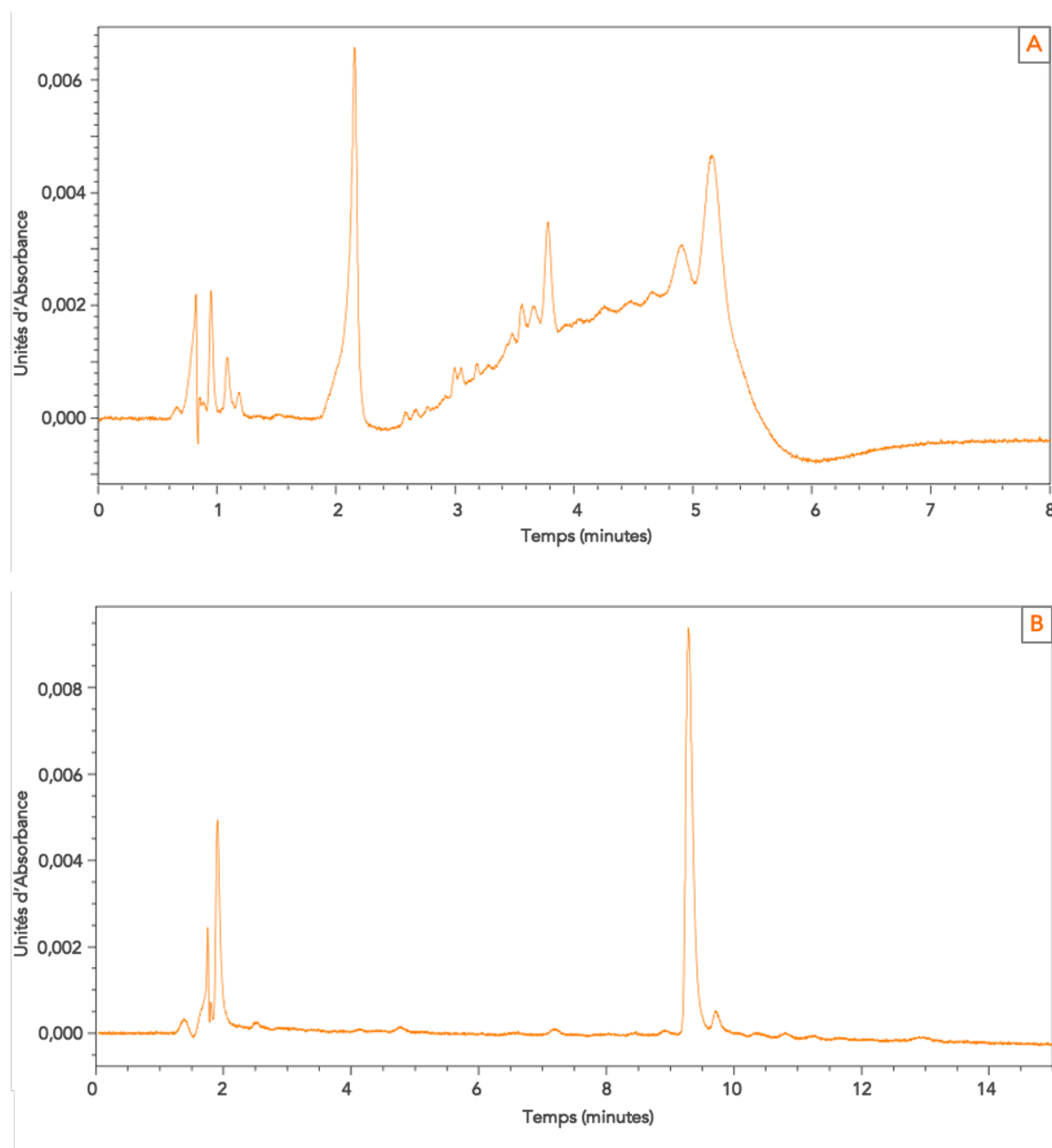


Figure 3. Chromatogrammes obtenus pour une analyse en mode gradient dans les conditions A (A) et B (B) définies dans le **Tableau 2**, pour des concentrations en insuline à $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$, détection en UV à 280 nm

Optimisation du débit du gradient

L'impact du débit a également été évalué afin d'optimiser les conditions de gradient. La **Figure 4** compare deux analyses réalisées dans des conditions de gradients identiques présentées **Tableau 2**, mais dont le débit a été fixé à $0,1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ou $0,2 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

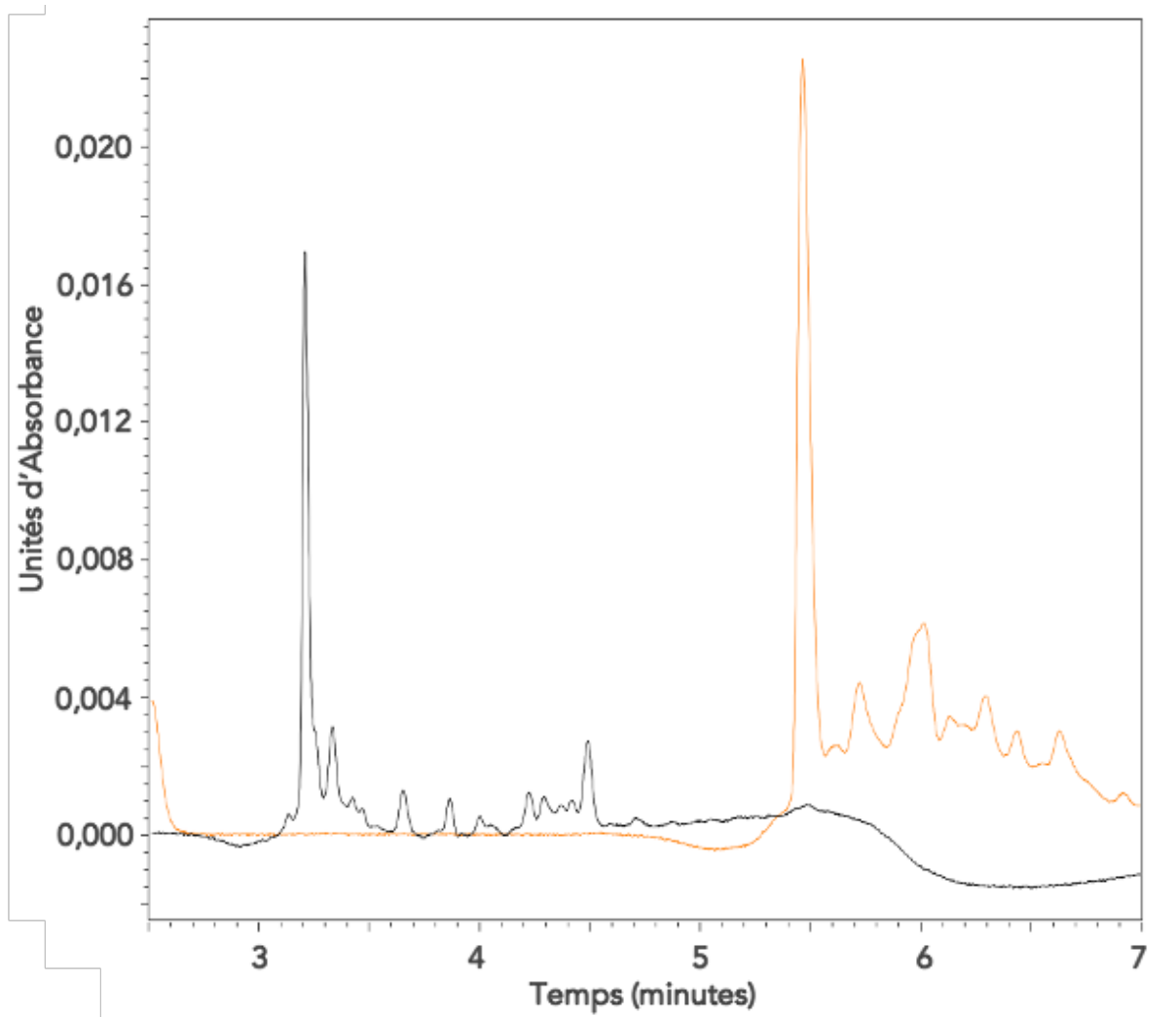


Figure 4. Superposition des chromatogrammes obtenus pour une analyse en mode gradient (gradient C) avec un débit de $0,1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ (tracé orange) ou $0,2 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ (tracé noir), pour des concentrations en insuline à $20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, détection en UV à 280 nm

Avec le débit de $0,1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, la symétrie du pic est améliorée par rapport à celui obtenu avec un débit de $0,2 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Le débit de $0,1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ a donc été

retenu. Ce débit est jusqu'à quinze fois moins important que ceux utilisés en HPLC.³⁰ Il est également moins important que pour d'autres méthodes UHPLC. Par exemple, une récente étude utilisant l'UHPLC pour la séparation d'impuretés d'un analogue de l'insuline applique un débit de $0,3 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.²⁶

Avec un débit de $0,1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, les conditions ont encore été optimisées jusqu'au mode gradient D (**Tableau 2**), pour lequel on observe un pic symétrique avec une bonne résolution (**Figure 5**). Suite aux analyses réalisées, les conditions du gradient D ont donc été retenues pour la méthode de quantification de l'insuline.

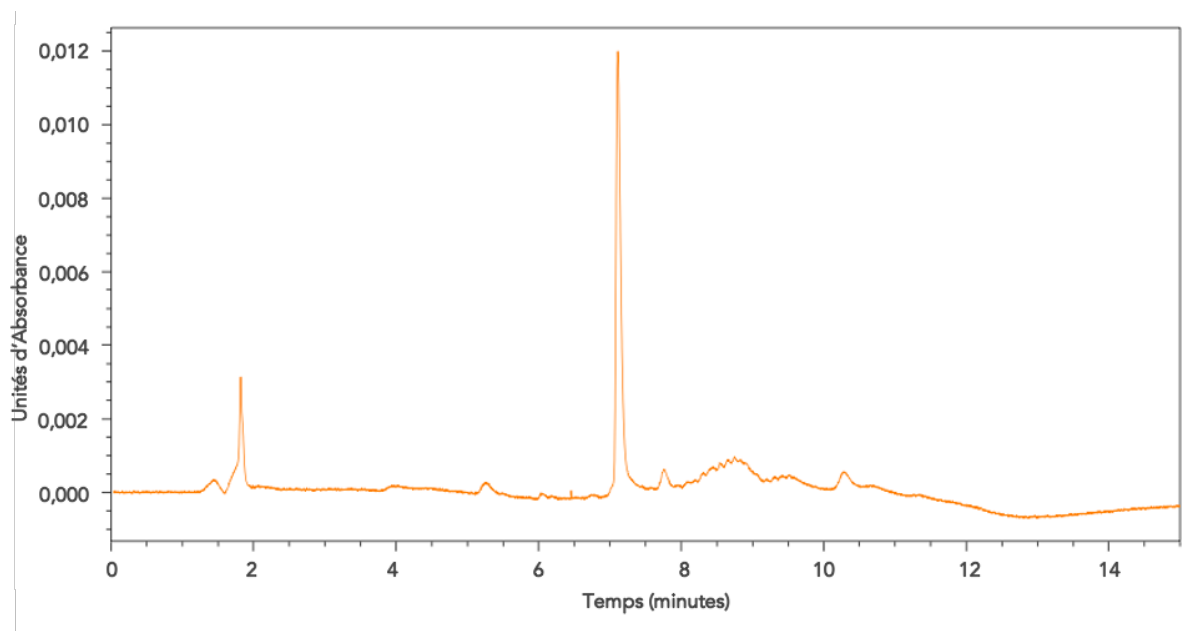


Figure 5. Chromatogramme obtenu pour une analyse en mode gradient dans les conditions D définies dans le **Tableau 2**, pour une concentration en insuline à $20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, détection en UV à 280 nm

Les détecteurs (UV et fluorescence) étant en série sur l'UHPLC, le temps de rétention a été observé avec chacun d'eux. Avec une détection UV le temps de rétention de l'insuline est compris entre 7,0 et 7,5 minutes alors qu'en fluorescence il est compris entre 7,2 et 7,7 minutes. Ces temps de rétention sont compris dans les

intervalles retrouvés dans la Littérature avec les méthodes HPLC qui sont variables entre 3,8 minutes³⁰ et 16,8 minutes³¹.

Optimisation des solvants

Afin de minimiser le bruit de fond des solvants et améliorer ainsi la spécificité de la méthode, l'impact de la pureté de l'eau et de l'acétonitrile utilisés pour préparer les phases mobiles a été étudié. Le **Tableau 3** présente les résultats des essais réalisés sur les différents solvants testés. Les résultats ont été interprétés en fluorescence du fait de la meilleure sensibilité de ce détecteur en comparaison au détecteur UV.

Tableau 3. Comparaison de la pureté des solvants étudiés (eau et acétonitrile), détection en fluorescence ($\lambda_{\text{émission}}$: 277 nm $\lambda_{\text{excitation}}$: 303 nm)

Solvant	Grade	Fournisseur	Intensité du signal
Eau	MilliQ	Millipore	< 5 UE
	LC-MS / HPLC	Honeywell	< 5 UE
ACN <i>Acétonitrile</i>	LC-MS (série A)	Fisher	> 5 UE
	LC-MS (série B)	Fisher	> 5 UE
	LC-MS	Honeywell	> 5 UE
	HPLC-S*	Biosolve	< 5 UE
	LC-MS	Biosolve	< 5 UE
	ULC-MS	Biosolve	< 5 UE

(UE : Unité d'Émission)

*HPLC-S pour grade HPLC « gradient »

Des signaux de bruit de fond plus ou moins intenses ont été observés selon les solvants utilisés. Parmi les solvants présentant une faible intensité de signal (< 5 unités d'émission), l'eau MilliQ (Millipore) et l'ACN de grade ULC-MS (Biosolve)

ont été choisis pour la suite de l'étude en raison respectivement de leur coût et de leur plus grande pureté.

Choix des flacons

L'impact des flacons utilisés sur le pic d'insuline a été évalué. En effet, il a été démontré que certains traitements de surface des flacons utilisés pour le dosage des protéines permettent de limiter leur adsorption et ainsi d'améliorer la précision de l'analyse.³² Des flacons en verre désactivé et des flacons QuanRecovery ont été comparés. Les flacons en verre désactivé possèdent un traitement de surface afin de limiter l'adsorption des molécules hautement polaires. Les flacons en polypropylène QuanRecovery sont spécifiquement conçus pour réduire la perte des peptides et protéines due aux interactions ioniques et liaisons non spécifiques. D'après la **Figure 6** et le **Tableau 4**, un signal deux fois plus important a été obtenu avec l'utilisation des flacons QuanRecovery en comparaison aux inserts en verre désactivé.

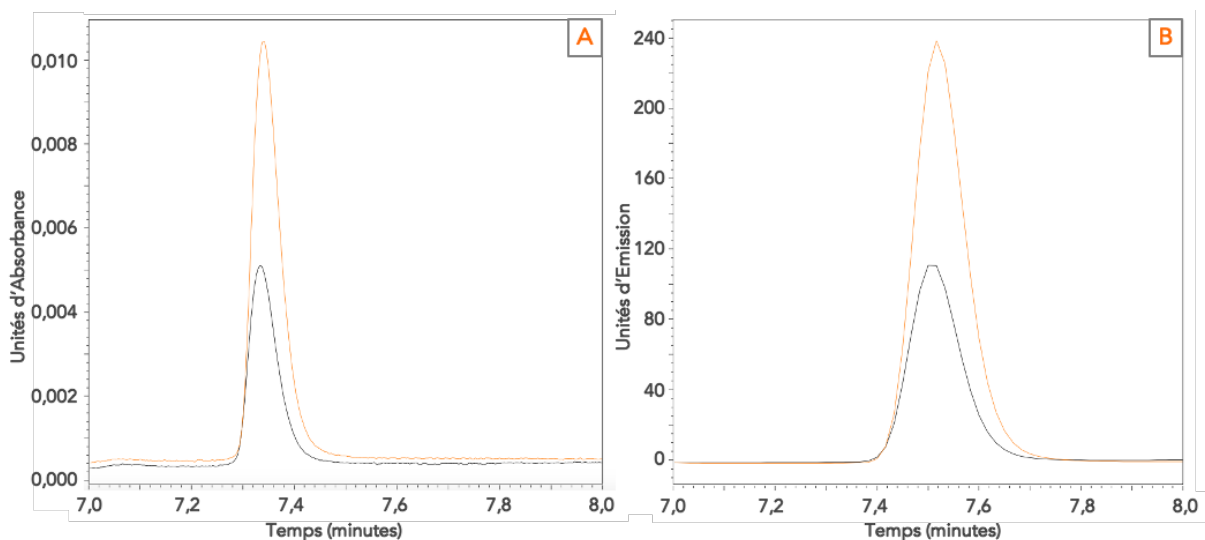


Figure 6. Superposition des chromatogrammes obtenus pour l'analyse de l'insuline concentrée à $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ dans un insert en verre désactivé (tracé noir) et dans un flacon QuanRecovery (tracé orange) par détection en UV à 280 nm (A) et en fluorescence (B)

Tableau 4. Aires des pics d'insuline concentrée à 10 µg.mL⁻¹ à partir des analyses réalisées dans un insert en verre désactivé et dans un flacon QuanRecovery par détection en UV et en fluorescence

	Détection UV	Détection fluorescence
Flacon en verre désactivé	19 717 µV.s	8 181 602 µV.s
Flacon QuanRecovery	40 223 µV.s	17 338 028 µV.s

Ces différences sont expliquées par des interactions ioniques entre l'insuline et le verre.³³ L'utilisation des flacons QuanRecovery a donc été conservée pour la validation de la méthode analytique.

Suite à ces différents essais, les conditions chromatographiques retenues pour la validation de la méthode sont résumées dans le **Tableau 5**.

Tableau 5. Conditions chromatographiques optimisées

Flacon	QuanRecovery
Détecteur	UV à 280 nm
Solvants	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Eau: MilliQ ▪ ACN: grade ULC-MS (Biosolve) ▪ TFA: grade HPLC (Fisher)
Débit	0,1 mL.min ⁻¹
Gradient (A/B, v/v)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ A 0 min : 90%/10% ▪ A 3 min : 60%/40% ▪ A 8 min : 60%/40% ▪ A 8,5 min : 90%/10% ▪ A 15 min : 90%/10%

Ces conditions chromatographiques ont permis d'obtenir des chromatogrammes tels que celui présenté **Figure 7**.

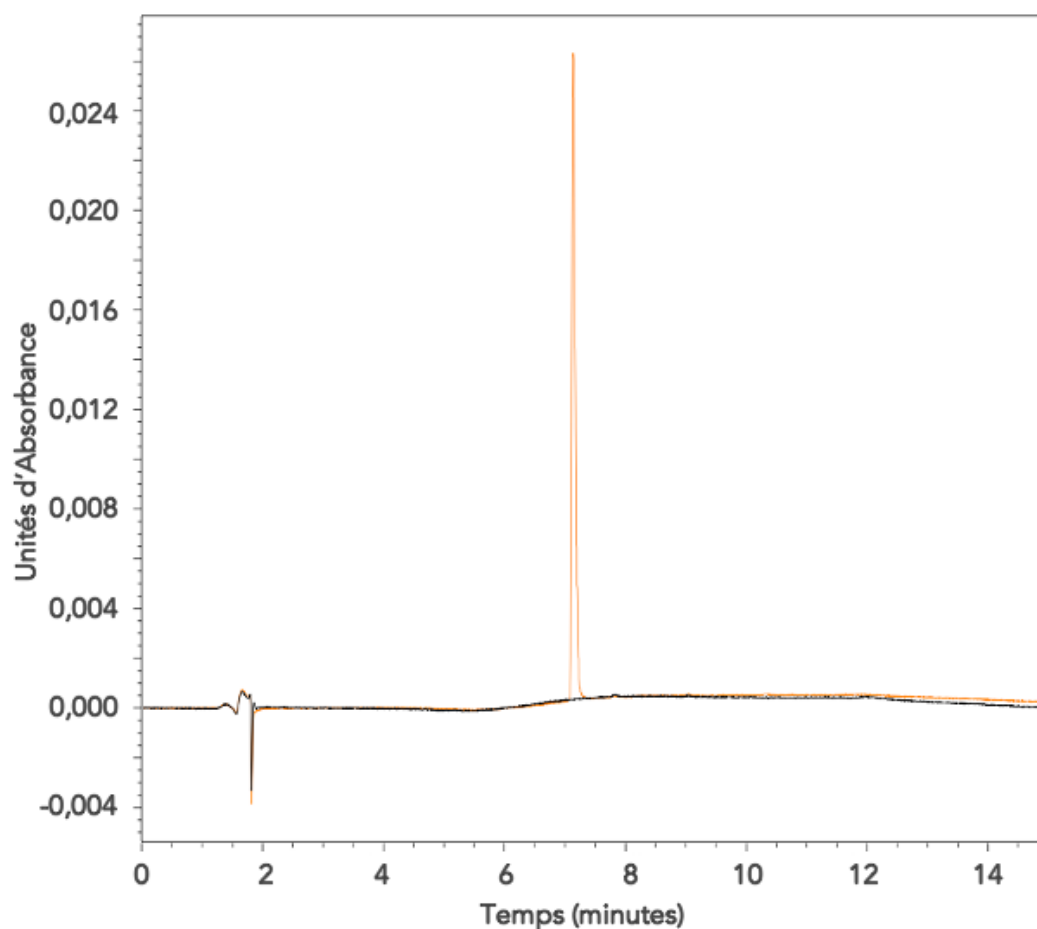


Figure 7. Chromatogramme obtenu par superposition de la ligne de base (HCl) (tracé noir) et du signal de l'insuline concentrée à 20 µg.mL⁻¹ (tracé orange), détection en UV à 280 nm

Validation selon la ligne directrice ICH Q2 (R1)

Dans l'objectif de valider la méthode développée, les recommandations ICH Q2 ont été suivies. A ce stade, la méthode est encore en cours de validation, la spécificité, les limites de détection et quantification ainsi que la linéarité ont cependant été validées.

Spécificité

La **spécificité** correspond à la capacité de la méthode à évaluer sans équivoque la présence de la substance à analyser parmi d'autres composants (impuretés, produits de dégradation, matrice etc.).¹²

Dans les conditions optimisées précédemment établies, aucun signal n'est observé entre 7,0 et 8,0 minutes (temps de rétention de l'insuline) pour l'HCl (solvant de préparation des échantillons) (**Figure 8**). La méthode est donc spécifique.

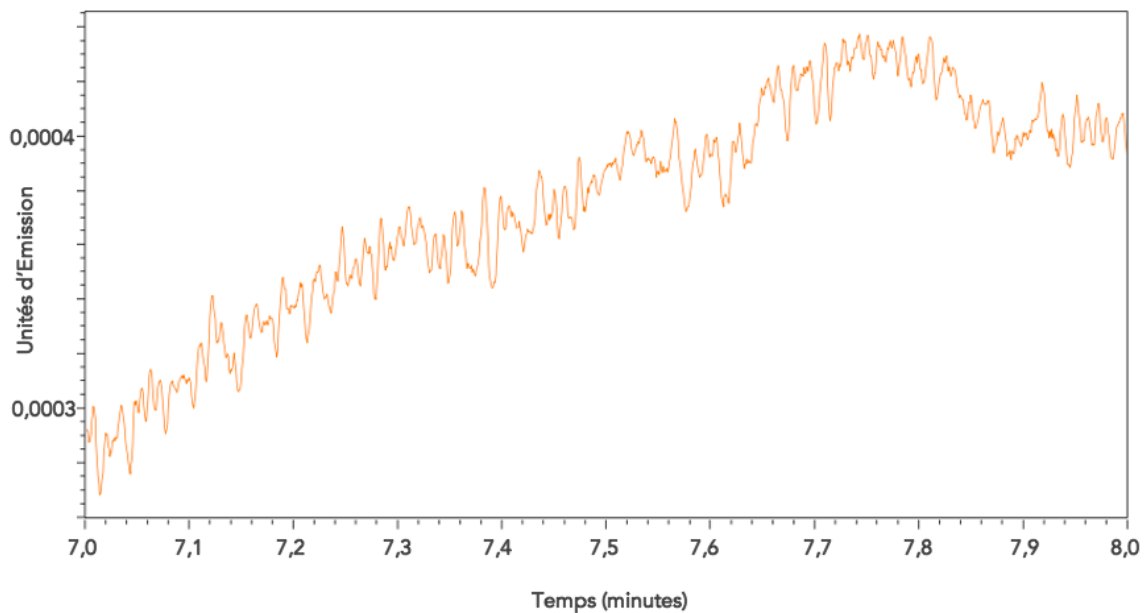


Figure 8. Chromatogramme de l'HCl entre 7 et 8 min, détection en UV à 280 nm

Cependant, dans le cadre du dosage de l'insuline encapsulée, il sera nécessaire de réévaluer la spécificité en présence des excipients composant la formulation.

Limites de détection et de quantification

Selon les ICH, la détermination de ces limites n'est pas indispensable à la validation d'une méthode analytique en vue d'un dosage ; cependant, dans une

démarche rigoureuse pour la suite de la validation, ces essais ont néanmoins été réalisés.

La **limite de détection** (LD) correspond à la plus petite concentration d'insuline pouvant être détectée mais non nécessairement quantifiée par la méthode.

La **limite de quantification** (LQ) correspond à la plus petite concentration d'insuline pouvant être quantifiée avec une précision et une exactitude appropriée par la méthode.

Les critères d'acceptabilités de ces limites définis par la ligne directrice ICH Q2(R1) sont de 2:1 à 3:1 pour la LD et de 10:1 pour la LQ. Les valeurs de signal sur bruit obtenues des concentrations testées sont présentées dans le **Tableau 6**.

Tableau 6. Valeurs de signal sur bruit (S/B) pour des concentrations en insuline de 0,5 à 2,0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (détection UV à 280 nm)

Concentration en insuline	S/B
0,50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	2,9
0,75 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	3,8
1,00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	11,4
2,00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	55,0

La méthode développée a permis de déterminer un S/B entre 2:1 et 3:1 pour une concentration de 0,5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ d'insuline déterminant la LD et un S/B proche de 10:1 pour une concentration de 1,0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ déterminant la LQ. Ces valeurs sont proches de celles déterminées dans la Littérature pour des analyses par HPLC en mode gradient avec une détection UV (LD de 0,63 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ et LQ de 2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).³⁰ En revanche, des valeurs plus faibles sont obtenues pour des analyses par HPLC en mode isocratique et avec une détection en fluorescence (LD de 0,03 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ et de LQ de 0,10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).³⁴

Linéarité & gamme

La **linéarité** correspond à la capacité de la méthode à obtenir des résultats proportionnels à la concentration de l'insuline dans un échantillon analysé. Les ICH spécifient un minimum de cinq points de concentrations à tester pour évaluer la linéarité de la méthode pour une gamme de concentration donnée. Concernant le dosage d'une substance active ou d'un produit fini, les ICH spécifient que cette **gamme** doit couvrir au minimum entre 80% et 120% de la concentration cible. La linéarité est généralement validée pour un coefficient de régression linéaire R^2 supérieur à 0,998.³⁵ Cinq points de concentrations ont été testés comprenant les concentrations de 80% à 120% de la concentration cible de $75 \mu\text{g.mL}^{-1}$ d'insuline (soit $60 \mu\text{g.mL}^{-1}$ à $90 \mu\text{g.mL}^{-1}$). La droite de régression linéaire déterminée est présentée **Figure 9**. Dans ces conditions, un R^2 de 0,9995 a été obtenu la linéarité est donc validée pour cette gamme de concentration.

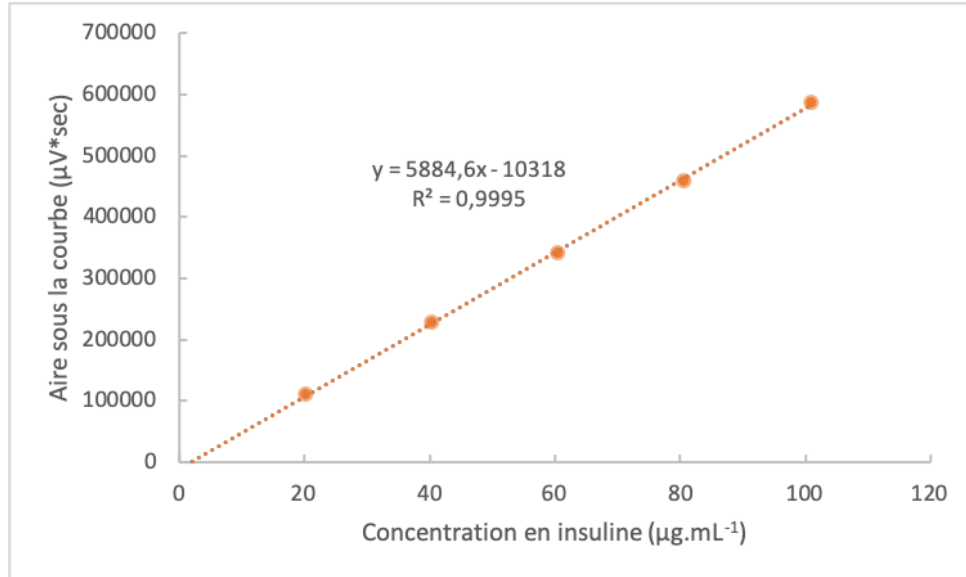


Figure 9. Courbe de régression de l'insuline sur une gamme de concentration de $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ à $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$, détection en UV à 280 nm

Les autres critères d'acceptabilités définis par les ICH Q2 (R1) devront être évalués afin de valider la méthode développée : l'**exactitude**, la **précision** et la **robustesse**.

Conclusion

Une méthode de quantification de l'insuline humaine solubilisée dans le HCl 0,005M par UHPLC est en cours de développement. Les solvants utilisés ont été sélectionnés en fonction leur pureté afin d'optimiser l'utilisation de l'équipement. Le mode d'élution en mode gradient a été déterminé avec un débit de 0,1 mL.min⁻¹. L'intérêt de l'utilisation de flacons QuanRecovery a été démontré. Ces conditions chromatographiques ont démontré la spécificité de la méthode et ont permis de déterminer des LD et LQ à 0,5 µg.mL⁻¹ et 1 µg.mL⁻¹ d'insuline respectivement. La linéarité de la méthode a enfin été validée sur la gamme de concentrations testées (entre 20 et 100 µg.mL⁻¹) selon les ICH Q2 (R1).

ENCAPSULATION DE L'INSULINE

Dans les premières parties de ce manuscrit, une stratégie de formulation a été développée afin d'améliorer la biodisponibilité de molécules BCS III. L'objectif de cette partie est d'évaluer la capacité des microparticules à encapsuler l'insuline. Dans un premier temps, afin d'évaluer le potentiel d'encapsulation de l'insuline par les systèmes formulés, des essais de solubilité de l'insuline ont été réalisés dans l'eau et en milieu acide. Le comportement des microparticules a ensuite été évalué en milieu acide. Enfin, des essais de localisation de l'insuline marquée au FITC ont été menés dans les ATPS et les microparticules formulés dans l'eau.

Matériel & Méthodes

Matériel

L'insuline recombinante humaine, l'insuline recombinante humaine fluorescéine isothiocyanate (FITC), le dextrane (Mm : 500 kg.mol⁻¹) issu de *Leuconostoc mesenteroides* et le dextrane tétraméthylrhodamine isothiocyanate (TRITC), le PEO (Mm : 200 kg.mol⁻¹), le chitosane (5,000 Da), l'alginate de sodium issu d'algues brunes (faible viscosité : 4-12 cP) ainsi que le chlorure de calcium dihydraté ont été achetés chez Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). L'acide chlorhydrique 0,1M a été acheté chez Fischer Scientific (Illkirch, France). Le Labrafac® WL 1349 lipophile a été fourni par Gattefossé S.A. (Saint-Priest, France). Le Lipoid S75-3 provient de Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Allemagne). Le Kolliphor® HS 15 provient de BASF (Ludwigshafen, Allemagne). Le 1,1'-dioctadécyl-3,3',3',3'-tétraméthylindodicarbocyanine 4-chlorobenzènesulfonate (DiD) a été acheté chez Molecular probes® (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). L'eau MilliQ a été fournie par un système de filtration MilliQ (Merck-Millipore, Darmstadt, Allemagne).

Étude de la solubilité de l'insuline

L'insuline humaine a été préparée à une concentration finale de 2 mg.mL⁻¹ dans l'eau MilliQ (pH 6,4) ou l'HCl 0,005M à pH 2,2. La mise en solution a été évaluée par turbidimétrie. La turbidité des échantillons a été analysée visuellement et avec un Turbiscan Tower (Formulation, Toulouse, France). L'analyse au Turbiscan a été effectuée à 8°C, en comparaison avec l'eau et l'HCl 0,005M.

A partir des données obtenues en transmission (et en rétrodiffusion) pour chaque échantillon, des indices de stabilité des échantillons (TSI) au cours du temps ont été calculés par le logiciel Turbisoft selon la formule suivante :

$$TSI = \frac{\sum |scan_i(h) - scan_{i-1}(h)|}{H}$$

Le TSI est calculé par la somme des différences entre deux scans consécutifs à toutes les positions mesurées (h), divisée par la hauteur totale (H).

Formulation des microparticules à pH 2,2

Des microparticules ont été formulées d'après le protocole détaillé en partie II dont la composition est présentée dans le **Tableau 7**. Une formulation réalisée dans l'HCl 0,005M (pH 2,2) a été comparée avec une formulation contrôle réalisée dans l'eau. Une fraction du dextrane (correspondant à 0,004% ou 0,02% de la masse totale de la formulation dans l'eau et dans l'HCl respectivement) est marquée au TRITC.

Encapsulation de l'insuline dans les ATPS et les microparticules

Différentes formulations ont été réalisées dans l'eau. Des ATPS et des microparticules dont les compositions sont présentées **Tableau 7** ont été formulés avec et sans insuline.

L'insuline utilisée a été préalablement solubilisée dans une solution de HCl 0,005M à pH 2,2 à une concentration de 2 mg.mL⁻¹, puis intégrée dans le processus de formulation pour obtenir une concentration finale de 75 µg.mL⁻¹. Une fraction de l'insuline utilisée (correspondant à 0,002% de la masse totale de la formulation) est une insuline marquée au FITC. Une fraction du dextrane (correspondant à 0,004% de la masse totale de la formulation) est marquée au TRITC.

Compositions des formulations

Tableau 7. Composition des ATPS et des microparticules

Composants	ATPS	Microparticules
Dextrane	0,5% (m/m)	0,5% (m/m)
PEO	4,0% (m/m)	4,0% (m/m)
LNCs-DiD-CS	-	1.10 ¹⁴ particules.mL ⁻¹
Alginate de sodium	-	2,19 mg.mL ⁻¹
Chlorure de calcium	-	0,44 mg.mL ⁻¹

En présence d'insuline, le volume de solution d'insuline ajouté a remplacé un volume de solvant (eau ou HCl) égal dans la formulation. Le volume total des formulations avec ou sans insuline est donc identique.

Caractérisation microscopique

Les formulations ont été observées en microscopie confocale (Leica TCS SP8 laser-scanning confocal microscope, Leica Microsystems, Heidelberg, Allemagne) aux longueurs d'ondes correspondantes aux différents fluorophores : TRITC et FITC (Tableau 8).

Tableau 8. Longueurs d'ondes d'excitation et d'émission utilisées pour l'analyse en microscopie confocale

Fluorophore	Longueurs d'ondes d'excitation	Longueurs d'ondes d'émission
FITC <i>Fluorescéine Isothiocyanate</i>	488 nm	491 nm - 565 nm
TRITC <i>Tétraméthylrhodamine Isothiocyanate</i>	561nm	564 nm - 618 nm

Analyse granulométrique

Une analyse granulométrique des microparticules (en présence ou non d'insuline) a été réalisée par Zêtasizer® Nano series (Malvern Instruments S.A.,

Worcestershire, Royaume-Uni) et par un granulomètre laser MS 300 (Malvern Instruments S.A., Worcestershire, Royaume-Uni).

Étude de stabilité

Une étude de stabilité des différentes formulations a été réalisée au Turbiscan Tower à 4°C sur 6 jours consécutifs.

Résultats & Discussion

Étude de la solubilité de l'insuline

L'insuline étant composée d'acides aminés, sa solubilité est dépendante du pH. En effet, un point isoélectrique est déterminé pour les peptides ou les protéines, correspondant à une valeur de pH spécifique pour laquelle la charge globale de la molécule est neutre. Autour de ce point isoélectrique, la solubilité de la molécule est faible. Le point isoélectrique de l'insuline se situe autour du pH 5,5.³⁶ Par conséquent, la solubilité de l'insuline a été évaluée à deux pH : 2, 2 (solution d'HCl) et 6,4 (eau).

Après analyse visuelle des échantillons d'insuline concentrés à 2 mg.mL⁻¹, dans l'eau à pH 6,4 un trouble a été observé alors qu'une solution limpide et homogène est observée dans une solution aqueuse d'HCl à pH 2,2.

Ces mêmes échantillons ont également été analysés au Turbiscan. La **Figure 10** présente le pourcentage de transmission en fonction de la hauteur du tube de l'échantillon pour chaque condition testée (eau, HCL, insuline dans l'eau et insuline dans l'HCl dilué). La gamme de couleur en légende correspond à la succession des analyses d'un même échantillon au cours du temps. L'analyse a été réalisée sur 7 jours.

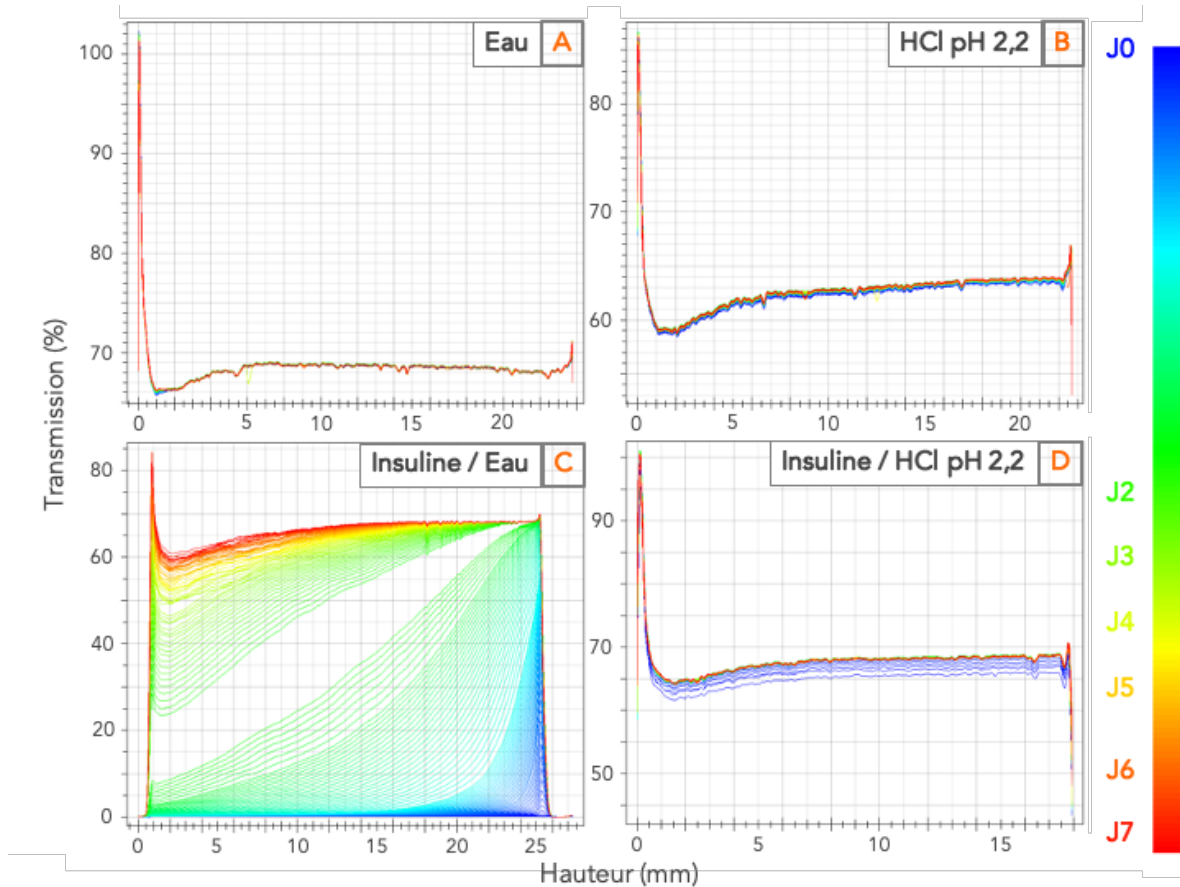


Figure 10. Profils de transmission obtenus au Turbiscan Tower pour l'eau (A), la solution de HCl à pH 2,2 (B) et l'insuline dans l'eau (C) et dans l'HCl pH 2,2 (D) concentrée à 2 mg.mL⁻¹. L'analyse a été réalisée sur 7 jours (n=1)

Dans la **Figure 10**, on observe des profils superposables de transmission pour les échantillons d'eau (**Figure 10.A**) et d'HCl (**Figure 10.B**). Le profil de transmission observé pour l'insuline dans l'eau varie tout au long de l'analyse (**Figure 10.C**). En revanche, pour l'échantillon d'insuline dans l'HCl à pH 2,2, on observe une augmentation de la transmission de manière uniforme sur les premières heures d'analyses (tracés bleus) correspondant à la solubilisation de l'insuline, puis une superposition des profils sur les sept jours suivants d'analyse (**Figure 10.D**). Ces résultats montrent la plus grande stabilité de l'insuline dans l'HCl dilué que dans l'eau.

La cinétique de déstabilisation obtenue pour ces échantillons est présentée **Figure 11**. Elle présente les valeurs de TSI calculées à partir des données brutes de l'analyse obtenues en transmission en fonction du temps. Plus le TSI est faible, plus l'échantillon est stable. La cinétique de stabilité obtenue pour l'insuline dans l'eau montre une augmentation initiale brutale du TSI avec une valeur de 5 atteinte avant les 6 premières heures d'analyse. Cette cinétique indique une instabilité de l'insuline dans l'eau, en adéquation avec les observations visuelles précédemment obtenues. En milieu acide à pH 2,2 dans le HCl 0,005M, la cinétique de l'insuline observée indique une stabilité (TSI < 5) sur toute la durée de l'analyse (7 jours).

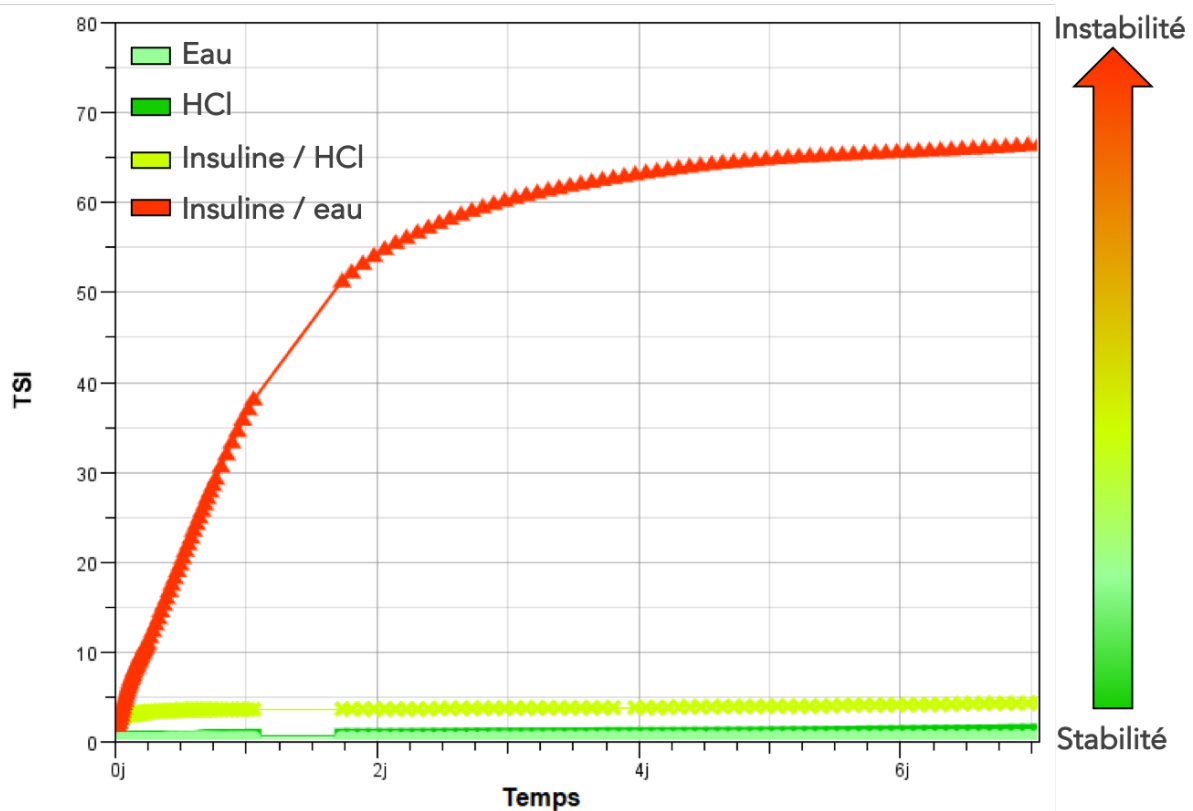


Figure 11. Profils cinétiques de stabilité des échantillons (eau, HCl à pH 2,2, insuline dans l'eau et insuline dans l'HCl à pH 2,2) obtenus à partir des valeurs de TSI calculées par analyse au Turbiscan Tower en fonction du temps (sur 7 jours) (n=1)

A la concentration de 2 mg.mL⁻¹, l'insuline n'est donc pas soluble dans l'eau à pH 6,4 mais soluble et stable au moins 7 jours dans l'HCl à pH 2,2. Ce résultat

corrobore les caractéristiques techniques de l'insuline³⁷ qui spécifient une solubilité à 10 mg.mL⁻¹ pour un pH compris entre 2,0 et 2,5. Des études comparant le comportement de l'insuline milieu acide et neutre ont également démontré une agrégation de l'insuline à pH neutre, d'autant plus intense dans des conditions d'incubation et d'agitation.³⁸

Formulation de microparticules à pH 2,2

D'après les résultats précédents, l'insuline n'est pas soluble dans l'eau (pH 6,4). Or les microparticules précédemment formulées ont été préparées dans l'eau. Des essais ont donc été réalisés afin d'évaluer l'impact du pH sur la formulation des microparticules. Les microparticules ont alors été formulées à deux pH différents : dans l'eau à pH neutre (6,4) et dans une solution de HCl à pH acide (2,2), et leurs structures ont été comparées (Figure 12).

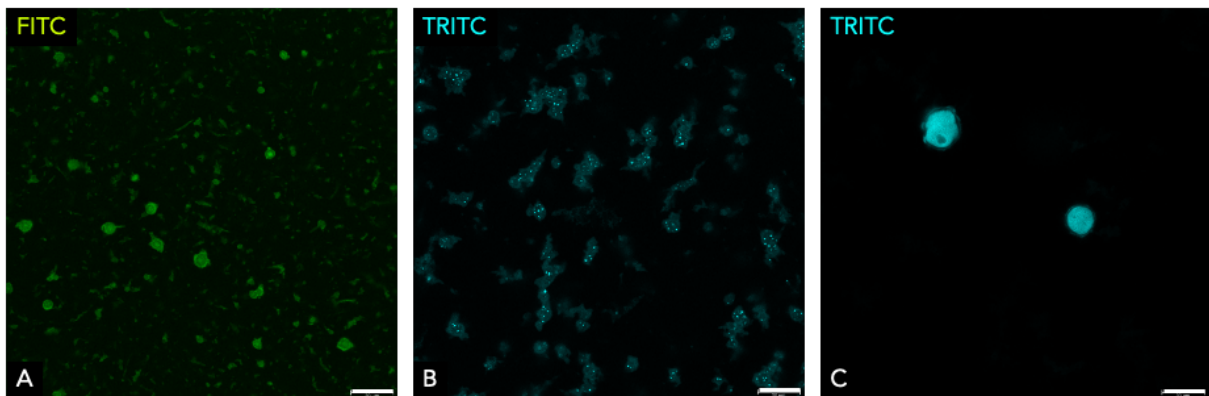


Figure 12. Observations en microscopie confocale des microparticules composées de PEO et de dextrane-FITC (A) ou dextrane-TRITC (B et C), dans l'eau à pH 6,4 (A et B) et dans l'HCl à pH 2,2 (C). Échelles à 20 µm

Les microparticules formulées dans l'eau présentent des structures similaires que le dextrane soit marqué au FITC (en vert sur les images) (Figure 12.A - condition d'observation en Partie II) ou au TRITC (en bleu sur les images) (Figure 12.B).

En revanche, les structures observées en milieu acide à pH 2,2 (**Figure 12.C**) sont de taille plus importante (une vingtaine de micromètres) et moins nombreuses qu'à pH 6,4. La structure des microparticules formulées est donc modifiée à pH 2,2, pH pour lequel l'insuline est soluble.

La formulation des microparticules à pH 2,2 a modifié leur structure. Par conséquent, un mode de préparation avec une étape de pré-solubilisation de l'insuline-FITC dans une solution de HCl 0,005M à pH 2,2 avant son intégration à la formulation dans l'eau a été testé. La localisation de l'insuline a été étudiée dans les ATPS et les microparticules formulés.

Encapsulation de l'insuline dans les ATPS

Analyse de localisation de l'insuline dans les ATPS en microscopie confocale

La **Figure 13** présente les résultats obtenus pour l'analyse en microscopie confocale des ATPS en présence ou non d'insuline-FITC (en vert sur les images). Dans la **Figure 13.A3**, on observe que l'insuline-FITC, bien que pré-solubilisée dans l'HCl dilué, se concentre majoritairement sous forme d'agrégats (coloration verte intense sur l'image) en milieu aqueux à pH neutre et notamment aux interfaces entre la phase dispersée de dextrane et la phase dispersante de PEO. En effet, il a déjà été démontré que les protéines (de type β -lactoglobulines) pouvaient se localiser aux interfaces des ATPS dextrane/PEO.³⁹

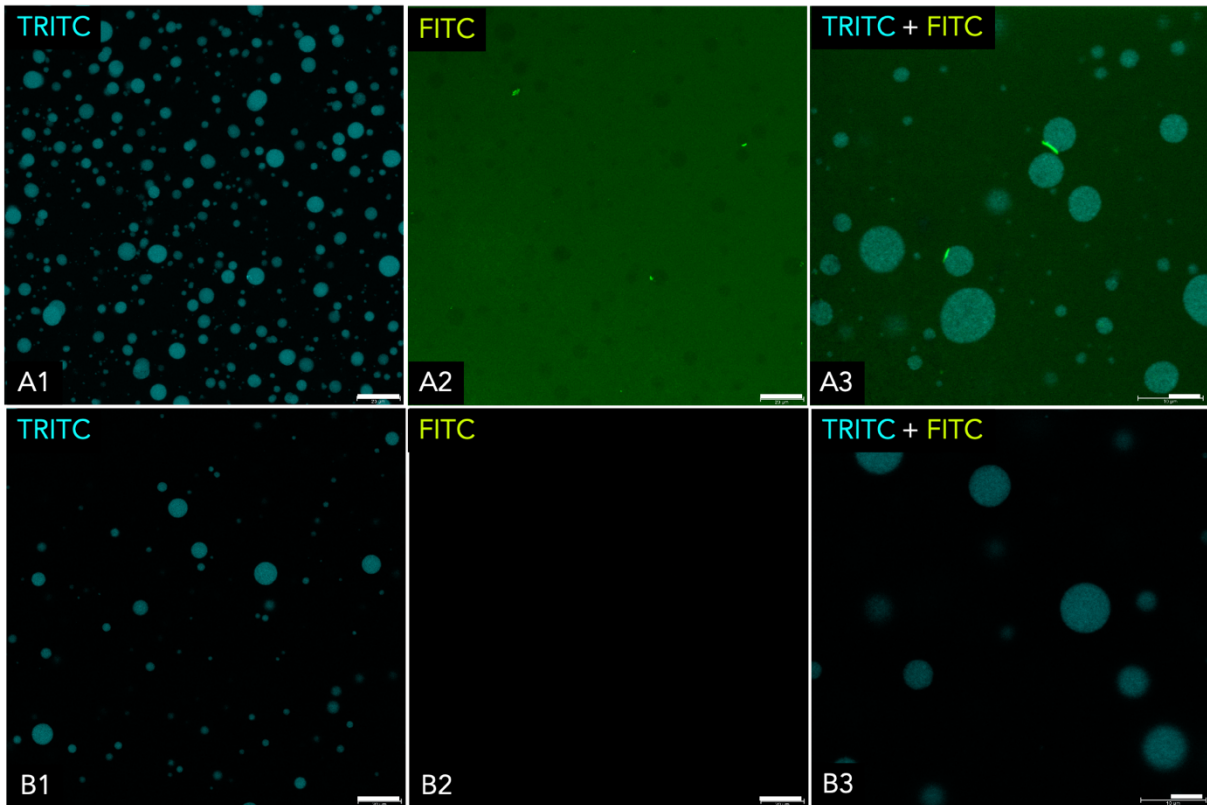


Figure 13. Observations en microscopie confocale des ATPS de dextrane-TRITC / PEO dans l'eau, avec (A) ou sans (B) insuline-FITC à une concentration de $75 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Échelles à $20 \mu\text{m}$

Encapsulation de l'insuline dans les microparticules

Analyse de localisation de l'insuline dans les microparticules en microscopie confocale

La **Figure 14** présente les résultats obtenus pour l'analyse en microscopie confocale des microparticules en présence ou non d'insuline-FITC. Avec ou sans insuline, des structures de type microparticules de dextrane-TRITC sont observées. En présence d'insuline, leurs tailles, bien que non homogènes sont plus petites (**Figure 14. A1**) que sans insuline (**Figure 14.B1**). Des agrégats d'insuline-FITC dispersés parmi les microparticules sont également observés (**Figure 14.A2**). En effet, il a été supposé que 48 heures après formulation, la faible solubilité de l'insuline à pH neutre pourrait induire sa précipitation dans ces conditions. Ce signal

est également observé **Figure 14.A1**, possiblement lié à la forte intensité de fluorescence émise par le FITC à l'origine d'une potentielle excitation du TRITC.

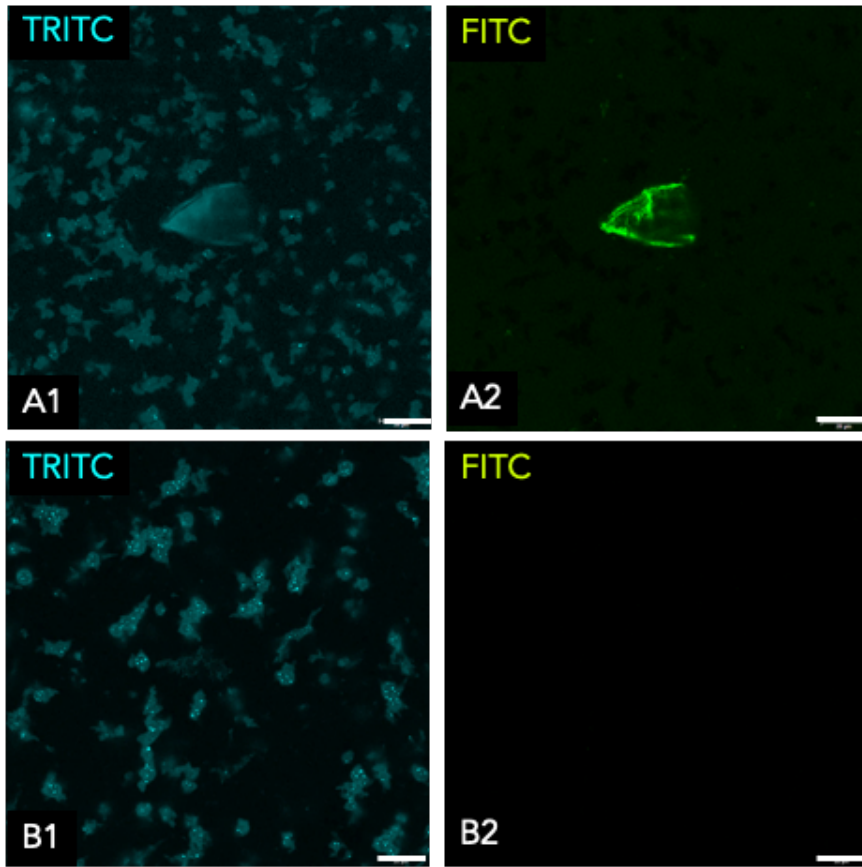


Figure 14. Observations en microscopie confocale des microparticules composées de dextrane-TRITC / PEO dans l'eau, avec (A) ou sans (B) insuline-FITC à une concentration de $75 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Échelles à $20 \mu\text{m}$

Analyse granulométrique

L'analyse granulométrique des microparticules a montré deux populations de particules, une population de l'ordre du nanomètre, et une autre population de l'ordre du micromètre (**Tableau 9**).

Tableau 9. Tailles obtenues par analyses granulométriques, déterminées par diffusion dynamique de la lumière (Zetasizer) et diffraction laser (granulomètre), en volume du pic de la population étudiée

Formulation	Taille au Zetasizer <i>particules de faibles tailles</i>	Taille au Granulomètre <i>particules de grandes tailles</i>
Microparticules Sans insuline	66,21 nm	22,49 μm
Microparticules Avec insuline	75,43 nm	12,21 μm

Les résultats obtenus par diffusion dynamique ont permis de déterminer une population majoritaire de particules de petites tailles de l'ordre de 70 nm identifiées comme correspondantes aux LNCs libres en suspension dans la formulation. Les résultats obtenus par diffraction laser ont permis d'analyser la seconde population de particules, faiblement représentée en volume (< 2% d'après la **Figure 15**) mais de taille plus importante. Ces particules correspondraient aux microparticules formulées avec une taille qui varie entre 2 μm et 120 μm comme le montre la **Figure 15**. Pour cette population de particules, une différence de taille est observée en présence ou non d'insuline. Une taille des microparticules plus faible est obtenue en présence d'insuline.

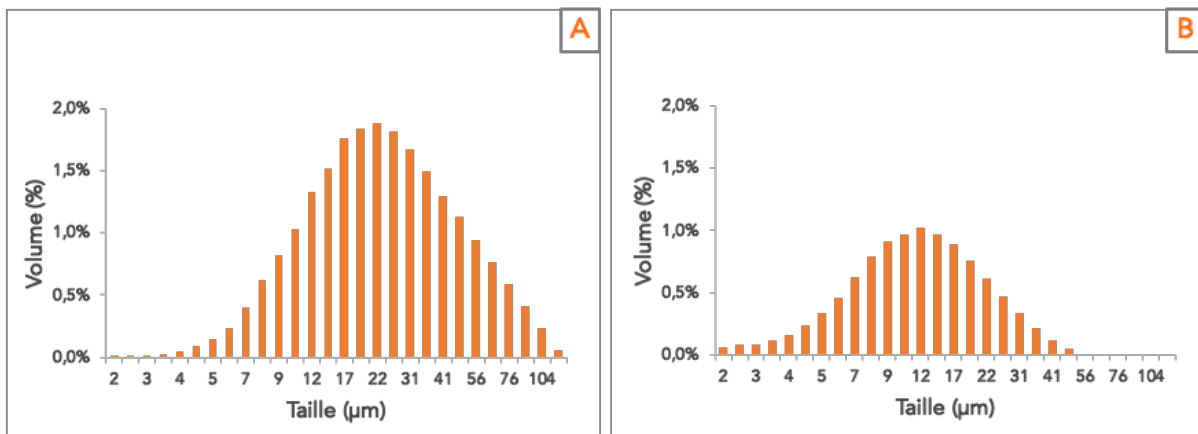


Figure 15. Distributions de tailles des microparticules obtenues par analyse granulométrique au granulomètre laser Mastersizer en présence (B) ou non (A) d'insuline

Étude de stabilité

Enfin, la stabilité des ATPS et des microparticules a été analysée au Turbiscan Tower pendant 6 jours. Les résultats obtenus sont présentés **Figure 16** par l'évolution du TSI des systèmes formulés au cours du temps.

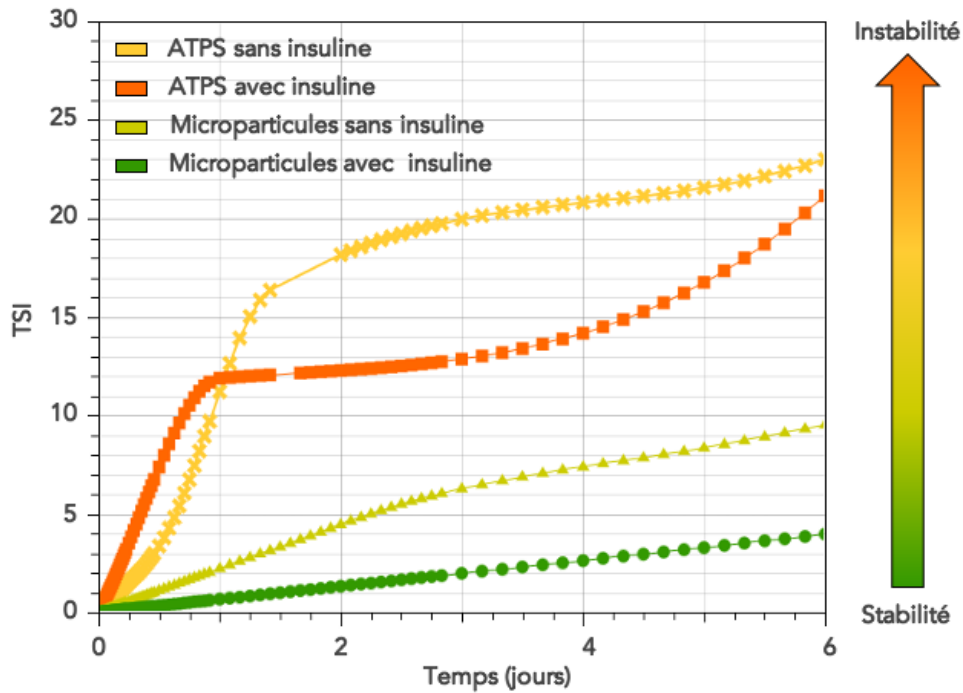


Figure 16. Cinétique de déstabilisation comparant la stabilité des ATPS et des microparticules formulés dans l'eau, en présence ou non d'insuline obtenue à partir des données brutes en transmission de l'analyse au Turbiscan Tower sur 6 jours

D'après les profils cinétiques de stabilité présentés **Figure 16**, les ATPS, avec ou sans insuline se déstabilisent très rapidement avec des valeurs de TSI égales à 5 atteintes en moins de 24h. Aucun effet de l'insuline n'a donc été observé sur la stabilité des ATPS. En revanche, pour les microparticules, on observe une déstabilisation plus tardive sans insuline, avec une valeur de TSI de 5 atteinte en approximativement 2 jours, alors que cette même valeur de TSI n'est pas atteinte sur les 6 jours d'analyse en présence d'insuline. L'insuline semble donc améliorer la stabilité des microparticules.

Basée sur la méthode Pickering, l'utilisation de protéines dans les ATPS permet de ralentir la séparation de phase, sans pour autant pouvoir l'éviter.³⁹ L'utilisation de l'insuline n'aurait donc pas d'impact sur la stabilité des ATPS formulés pour lesquels un phénomène de coalescence interviendrait très rapidement. En revanche, pour les microparticules, il est supposé que l'étape précoce de gélification au cours du procédé de formulation permettrait de figer les structures dans une configuration où l'insuline, localisée aux interfaces, limite la coalescence. Cela expliquerait alors la diminution de la taille ainsi que l'amélioration de la stabilité des microparticules en présence d'insuline déterminées dans cette étude.

Conclusion

Dans l'objectif d'évaluer la capacité des microparticules formulées à encapsuler un principe actif de classe BCS III, des essais d'encapsulation de l'insuline à une concentration de $75 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ont été réalisés. D'après les premiers résultats obtenus, il est difficile de localiser avec précision l'insuline même s'il semble qu'elle se localise préférentiellement aux interfaces de ces systèmes. Le principal obstacle à cette étude repose sur l'insolubilité de l'insuline à pH neutre, pH utilisé dans le procédé de préparation des microparticules. Une des perspectives serait de déterminer un domaine de faisabilité du pH de formulation, à savoir une gamme de pH pour laquelle l'insuline serait soluble et les microparticules pourraient être formulées sans altérer leurs propriétés.

REFERENCES

- 1 K. Ahmad, Insulin sources and types: a review of insulin in terms of its mode on diabetes mellitus, *J. Tradit. Chinese Med.*, 2014, **34**, 234–237.
- 2 J. P. Mayer, F. Zhang and R. D. DiMarchi, Insulin structure and function, *Biopolymers*, 2007, **88**, 687–713.
- 3 A. M. Schmidt, Highlighting Diabetes Mellitus, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2018, **38**, e1–e8.
- 4 OMS - Diabète. [En ligne]. <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/diabetes>. Consulté le 3 mars 2020.
- 5 INSERM - La résistance à l'insuline, une histoire de communication. [En ligne]. <https://www.inserm.fr/actualites-et-evenements/actualites/resistance-insuline-histoire-communication>. Consulté le 17 avril 2020.
- 6 OMS - Mieux connaître le diabète. [En ligne]. https://www.who.int/diabetes/action_online/basics/fr/index1.html. Consulté le 17 avril 2020.
- 7 E. Cichocka, A. Wietchy, K. Nabrdalik and J. Gumprecht, Insulin therapy — new directions of research, *Endokrynol. Pol.*, 2016, **67**, 314–324.
- 8 A. Viehof, L. Javot, A. Béduneau, Y. Pellequer and A. Lamprecht, Oral insulin delivery in rats by nanoparticles prepared with non-toxic solvents, *Int. J. Pharm.*, 2013, **443**, 169–174.
- 9 F. Guo, T. Ouyang, T. Peng, X. Zhang, B. Xie, X. Yang, D. Liang and H. Zhong, Enhanced oral absorption of insulin using colon-specific nanoparticles co-modified with amphiphilic chitosan derivatives and cell-penetrating peptides, *Biomater. Sci.*, 2019, 1493–1506.
- 10 C. Y. Wong, H. Al-Salami and C. R. Dass, Potential of insulin nanoparticle formulations for oral delivery and diabetes treatment, *J. Control. Release*, 2017, **264**, 247–275.

- 11 C. P. Reis, F. J. Veiga, A. J. Ribeiro, R. J. Neufeld and C. Damgé, Nanoparticulate biopolymers deliver insulin orally eliciting pharmacological response, *J. Pharm. Sci.*, 2008, **97**, 5290–5305.
- 12 *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH), Q2 (R1): Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*, 1995.
- 13 D. D. De León and C. A. Stanley, Determination of insulin for the diagnosis of hyperinsulinemic hypoglycemia, *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2013, **27**, 763–769.
- 14 R. J. Qasem, A. S. Aldawsari, F. E. Almutairi and A. S. Alsadoon, Identification of recombinant human insulin and biosynthetic insulin analogues by multiplexed targeted unlabeled mass spectrometry of proteotypic tryptic peptides, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2019, **172**, 357–363.
- 15 Y. Shen, W. Prinyawiwatkul and Z. Xu, Insulin: a review of analytical methods, *Analyst*, 2019, **144**, 4139–4148.
- 16 B. Deng, Z. Liu, G. Luo, H. Ma and M. Duan, Rapid quantitative determination and assessment of insulin in oil formulation by micellar electrokinetic capillary chromatography, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2002, **27**, 73–80.
- 17 C. Lamalle, A. C. Servais, R. P. Radermecker, J. Crommen and M. Fillet, Simultaneous determination of insulin and its analogues in pharmaceutical formulations by micellar electrokinetic chromatography, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2015, **111**, 344–350.
- 18 E. E. Chambers, K. J. Fountain, N. Smith, L. Ashraf, J. Karalliedde, D. Cowan and C. Legido-Quigley, Multidimensional LC-MS/MS Enables Simultaneous Quantification of Intact Human Insulin and Five Recombinant Analogs in Human Plasma, *Anal. Chem.*, 2014, **86**, 694–702.
- 19 Z. Chen, M. P. Caulfield, M. J. McPhaul, R. E. Reitz, S. W. Taylor and N. J.

- Clarke, Quantitative Insulin Analysis Using Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry in a High-Throughput Clinical Laboratory, *Clin. Chem.*, 2013, **59**, 1349–1356.
- 20 S. M. Darby, M. L. Miller, R. O. Allen and M. LeBeau, A mass spectrometric method for quantitation of intact insulin in blood samples, *J. Anal. Toxicol.*, 2001, **25**, 8–14.
- 21 S. W. Taylor, N. J. Clarke, Z. Chen and M. J. McPhaul, A high-throughput mass spectrometry assay to simultaneously measure intact insulin and C-peptide, *Clin. Chim. Acta*, 2016, **455**, 202–208.
- 22 K. M. Legg, L. M. Labay, S. S. Aiken and B. K. Logan, Validation of a Fully Automated Immunoaffinity Workflow for the Detection and Quantification of Insulin Analogs by LC–MS–MS in Postmortem Vitreous Humor, *J. Anal. Toxicol.*, 2019, **43**, 505–511.
- 23 M. Mazzarino, M. Senofonte, F. Martinelli, X. de la Torre and F. Botrè, Detection of recombinant insulins in human urine by liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry after immunoaffinity purification based on monolithic microcolumns, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2019, **411**, 8153–8162.
- 24 S. Ravi, K. K. Peh, Y. Darwis, B. Krishna Murthy and T. Raghu Raj Singh, Development and Validation of an HPLC–UV Method for the Determination of Insulin in Rat Plasma: Application to Pharmacokinetic Study, *Chromatographia*, 2007, **66**, 805–809.
- 25 B. Yilmaz and Y. Kadioglu, Determination of Insulin in Rabbit Plasma Using High-Performance Liquid Chromatography, *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg.*, 2009, **18**, 31–36.
- 26 X. Jia, F. Meng, C. J. Pickens, D. Thaisrivongs, L. Yan, P. Huo, K. M. Maloney and S. Lin, Ultrahigh performance liquid chromatography methods facilitate

- the development of glucose-responsive insulin therapeutics, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2020, **412**, 377–388.
- 27 Waters - USP Signal-to-Noise in Empower 2 [En ligne] https://www.waters.com/webassets/cms/support/docs/tecn10123052_01.pdf. Consulté le 20 février 2020.
- 28 T. Pal, Ds. Rajan, Kv. Gowda, U. Mandal, M. Ganesan, A. Bose and A. Sarkar, Development of RP-HPLC for analysis of human insulin, *Indian J. Pharm. Sci.*, 2006, **68**, 662.
- 29 M. Thevis, A. Thomas, P. Delahaut, A. Bosseloir and W. Schänzer, Qualitative Determination of Synthetic Analogues of Insulin in Human Plasma by Immunoaffinity Purification and Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry for Doping Control Purposes, *Anal. Chem.*, 2005, **77**, 3579–3585.
- 30 A. Iyire, C. Russell, T. Dennison, R. Rajoli, I. Saleem, A. Rahman and A. Mohammed, Development, Optimisation, Validation and Inter-Laboratory Verification of a Reversed Phase HPLC Method for Quantification of Human Recombinant Insulin, *J. Adv. Biotechnol.*, 2018, **7**, 984–998.
- 31 P. Moslemi, A. R. Najafabadi and H. Tajerzadeh, A rapid and sensitive method for simultaneous determination of insulin and A21-desamido insulin by high-performance liquid chromatography, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2003, **33**, 45–51.
- 32 T. Becherer, C. Grunewald, V. Engelschalt, G. Multhaup, T. Risse and R. Haag, Polyglycerol based coatings to reduce non-specific protein adsorption in sample vials and on SPR sensors, *Anal. Chim. Acta*, 2015, **867**, 47–55.
- 33 Waters - Flacons et plaques QuanRecovery dotés de la technologie MaxPeak HPS. [En ligne]. https://www.waters.com/waters/fr_FR/LC-MS-sample-vials-and-plates-to-minimize-NSB/nav.htm?cid=135010283&locale=fr_FR. Consulté

le 14 juin 2020.

- 34 L. Mercolini, A. Musenga, B. Saladini, F. Bigucci, B. Luppi, V. Zecchi and M. A. Raggi, Determination of insulin in innovative formulations by means of LC coupled to fluorescence detection, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2008, **48**, 1303–1309.
- 35 G. A. Shabir, A Practical Approach to Validation of HPLC Methods Under Current Good Manufacturing Practices, *J. Valid. Technol.*, 2004, **10**, 210–218.
- 36 O. Wintersteiner and H. A. Abramson, The isoelectric point of insulin, *J. Biol. Chem.*, 1933, **99**, 741–753.
- 37 Insulin, recombinant human - Product Information. [En ligne]. https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/p91077.pdf. Consulté le 5 mars 2020.
- 38 M. T. Mawhinney, T. L. Williams, J. L. Hart, M. L. Taheri and B. Urbanc, Elucidation of insulin assembly at acidic and neutral pH: Characterization of low molecular weight oligomers, *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.*, 2017, **85**, 2096–2110.
- 39 G. Balakrishnan, T. Nicolai, L. Benyahia and D. Durand, Particles trapped at the droplet interface in water-in-water emulsions, *Langmuir*, 2012, **28**, 5921–5926.

DISCUSSION

Discussion

De nombreuses molécules thérapeutiques ne sont actuellement pas administrables par voie orale en raison de leur faible biodisponibilité. L'objectif de ce projet consiste à développer un système de délivrance innovant pour l'administration orale des molécules BCS III (dont la biodisponibilité est limitée par une faible perméabilité).

Dans ce contexte, ce projet avait pour objectif d'utiliser les systèmes diphasiques aqueux (ATPS) pour l'encapsulation de ces molécules. La biocompatibilité de ces systèmes (notamment en raison de l'absence de solvant organique dans leur procédé de formulation), permet d'assurer leur qualité et leur sécurité en vue d'une future administration. Récemment, Chao, *et al*, ont publié une revue sur les nombreuses applications biomédicales de ces systèmes. Le potentiel de ces systèmes pour l'encapsulation de molécules actives y a été évoqué en perspectives, mais reste encore à démontrer.¹ Des ATPS ont donc été formulés puis caractérisés. Une formulation a ensuite été développée dans l'objectif d'obtenir des microparticules formées à partir de ces ATPS. Enfin, la capacité de ces systèmes à encapsuler l'insuline (utilisée comme molécule BCS III modèle) a été étudiée.

Formulation et caractérisation des ATPS

Détermination des diagrammes de phase

La première partie de ce projet a eu pour objectif de déterminer les conditions de formulation des ATPS composés de deux polymères : le dextrane et le PEO. La caractérisation de ces systèmes a reposé sur l'élaboration de diagrammes de phases obtenus à partir de deux méthodes différentes : une méthode visuelle et deux méthodes automatiques (LUMiSizer® et Turbiscan).

Les résultats de cette étude ont premièrement permis d'obtenir des diagrammes de phases des ATPS sous différentes conditions. La détermination de la binodale est particulièrement importante dans la caractérisation des ATPS car elle permet de définir les concentrations nécessaires pour leur formulation. La **binodale** a été déterminée ici par la séparation de phases observée après déphasage d'un ATPS, pour des concentrations comprises entre 0,0% et 4,0% (m/m) de dextrane et entre 0,0% et 2,0% (m/m) de PEO. Pour approfondir cette étude, il serait important de déterminer les limites de la binodale à proximité des axes du diagramme de phase, c'est-à-dire pour des concentrations en dextrane et en PEO respectivement supérieures à 4,0% (m/m) et 2,0% (m/m). En effet, d'après la Littérature, l'évolution de la binodale à proximité des axes n'est pas linéaire.² Ces études complémentaires permettraient alors d'affiner les conditions nécessaires pour la formulation des ATPS en présence d'un polymère très faiblement concentré, par exemple pour une concentration de PEO inférieure à 0,75% (m/m). Les résultats obtenus pourraient également être comparés avec d'autres techniques plus couramment utilisées pour la détermination de la binodale comme le titrage turbidimétrique ou la méthode du point de trouble.²

Les technologies LUMiSizer® et Turbiscan ont démontré être des méthodes simples et précises de caractérisation des ATPS pour la détermination des

diagrammes de phases. Les résultats obtenus ont permis d'établir que les ATPS pouvaient être formulés par un procédé en une seule étape, à partir d'un simple mélange de polymères sous forme de poudre. En effet, jusqu'alors, la formation des ATPS nécessitait une étape préalable de mise en solution de chacun des polymères séparément.³ Cette simplification du procédé faciliterait une transposition industrielle par une production plus rapide, plus simple à contrôler et donc plus économique. L'influence de la pureté du PEO sur le diagramme de phase a également été démontrée. En effet, le PEO commercial présente des impuretés identifiées dans la littérature comme la silice.⁴ Afin d'approfondir cette étude de caractérisation, il serait intéressant de confirmer la nature de ces impuretés, par résonance magnétique nucléaire par exemple.⁵ Il faudrait également étudier la corrélation entre le pourcentage massique de silice présent dans les ATPS et son impact sur les diagrammes de phase. La concentration en silice présente dans le PEO commercial est suffisante pour avoir un impact sur les « tie-lines », en revanche aucun impact sur la binodale n'a été observé (aux concentrations en polymères testées) (cf. Table S1 de la Partie I). Or un impact sur la binodale pouvait être attendu car les particules de silice sont connues pour stabiliser les interfaces des ATPS.⁶ Enfin, afin de s'assurer d'une pureté totale du système, il serait pertinent de s'intéresser également à la pureté du dextrane en effectuant ces mêmes caractérisations.

Influence du pH et de la température sur les ATPS

Afin de caractériser davantage ces ATPS, et notamment par rapport aux résultats obtenus à la suite de ce projet, les effets de plusieurs paramètres sur les diagrammes de phase nécessiteraient d'être étudiés tels que le **pH** ou la **température**. En effet, en vue d'une administration chez l'Homme dont la température corporelle est régulée à 37°C et dont le pH varie le long du tractus

gastro-intestinal de 1,5 (dans l'estomac) à 7 (dans l'intestin grêle), l'étude de l'influence de tels paramètres sur les ATPS serait pertinente.⁷ D'après une étude de Nguyen, *et al*, le diagramme de phase ne serait pas dépendant du pH,⁸ il serait intéressant de le confirmer par l'utilisation des méthodes de caractérisation automatiques telles que par l'utilisation du Turbiscan Tower ou du LUMiSizer®. Par ailleurs, l'impact de la température sur les ATPS a clairement été démontré, par une diminution de la longueur des « tie-lines » lorsque la température augmente.⁹ De même, des premiers résultats ont été observés au cours de ce travail de thèse avec différentes cinétiques de déstabilisation (**Tableau 1**). La température aurait donc bien un impact sur la stabilité des systèmes. Ainsi, il serait judicieux d'approfondir cette étude et de comparer les diagrammes de phases obtenus à 25°C avec des diagrammes obtenus à 4°C (température de formulation et de conservation des systèmes étudiés dans cette étude) et à 37°C dans l'objectif d'une administration chez l'Homme.

Tableau 1. Durées nécessaires pour atteindre une valeur de TSI (indice de stabilité au Turbiscan) de 5 indiquant une déstabilisation des ATPS, à différentes températures testées.

Température de formulation	Temps nécessaire pour atteindre un TSI de 5
4°C	12h
25°C	4h
37°C	1h30

Optimisation de la formulation d'ATPS

La **composition** des ATPS qui ont été formulés dans cette étude est proche de la binodale. Les systèmes formulés sont donc relativement instables, à l'origine d'une séparation de phase précoce. Cette composition « peu stable » est néanmoins pertinente dans cette étude car elle permet d'évaluer rapidement l'efficacité de la stratégie de stabilisation développée.

Cependant, dans l'objectif de développer des systèmes pharmaceutiques, il pourrait être nécessaire d'optimiser les concentrations en polymères des ATPS formulés. Un juste équilibre devra alors être recherché afin d'assurer à la fois une stabilité suffisante pour conserver la structure des ATPS, tout en garantissant la libération du principe actif encapsulé. Pour cela, il pourra être envisagé d'augmenter les concentrations en polymères des ATPS afin de s'éloigner de la binodale pour gagner en *stabilité*. Les concentrations de saturation des polymères utilisés devront également être déterminées afin de délimiter le domaine d'étude.

Toujours dans cette optique, la *taille des gouttelettes* de phase dispersée pourra éventuellement également être réduite afin de bénéficier des propriétés des systèmes nanoparticulaires. En effet, il a été démontré que ces systèmes peuvent interagir avec les cellules épithéliales et favoriser l'absorption intestinale à l'origine d'une amélioration de la biodisponibilité orale de principes actifs encapsulés.¹⁰ Ainsi, dans le système étudié, des gouttelettes nanométriques de phase dispersée pourraient permettre d'améliorer la biodisponibilité orale de molécules BCS III encapsulées. Dans le contexte des ATPS, plus la concentration en phase dispersée est diminuée, plus la taille des gouttelettes sera réduite. Cette amélioration sera de moindre mesure dans notre système car la concentration en phase dispersée est déjà très faible, donc la taille des gouttelettes relativement bien optimisée. De plus, pour la suite du projet, l'intérêt n'est pas de réduire drastiquement la taille des gouttelettes. En effet, dans la méthode Pickering, les plus petites gouttelettes de la phase dispersée doivent être substantiellement plus grandes (c'est-à-dire au moins un ordre de grandeur, soit 10^{n+1}) que le diamètre des particules utilisées pour stabiliser l'ATPS.¹¹ Partant de ce principe, si des particules de 50 nm ($5,0 \cdot 10^{-8}$ m) sont utilisées pour stabiliser les ATPS, la taille de la plus petite gouttelette de phase dispersée devrait donc être supérieure ou égale à 0,5 μm ($5,0 \cdot 10^{-7}$ m) (**Figure 1**), ce qui correspond au système étudié dans ce projet.

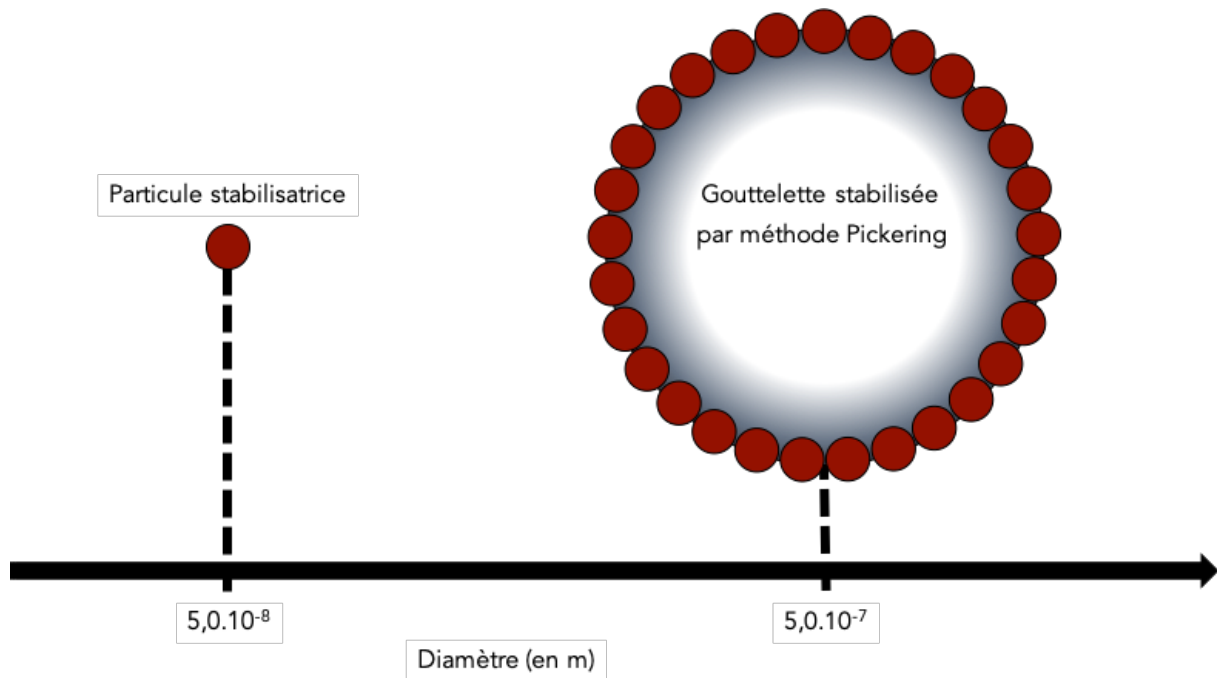


Figure 1. Représentation schématique du rapport des diamètres entre la particule stabilisatrice et la gouttelette à stabiliser par méthode Pickering

Enfin, il pourra être envisagé une *inversion de phase*, consistant en la formulation d'un nouveau système dont les phases dispersante et dispersée sont inversées. Un système localisé sur la même « tie-line » (dont les concentrations en polymères dans chacune des phases après déphasage sont identiques) pourra donc être testé à la fois dans une configuration dex/PEO et PEO/dex. Cela permettra d'adapter les concentrations en polymères à utiliser pour encapsuler une molécule donnée (en fonction de son affinité pour l'une ou l'autre des phases), et ainsi d'optimiser l'efficacité du système.

Ces trois axes d'optimisation sont représentés sur le diagramme de phase **Figure 2.**

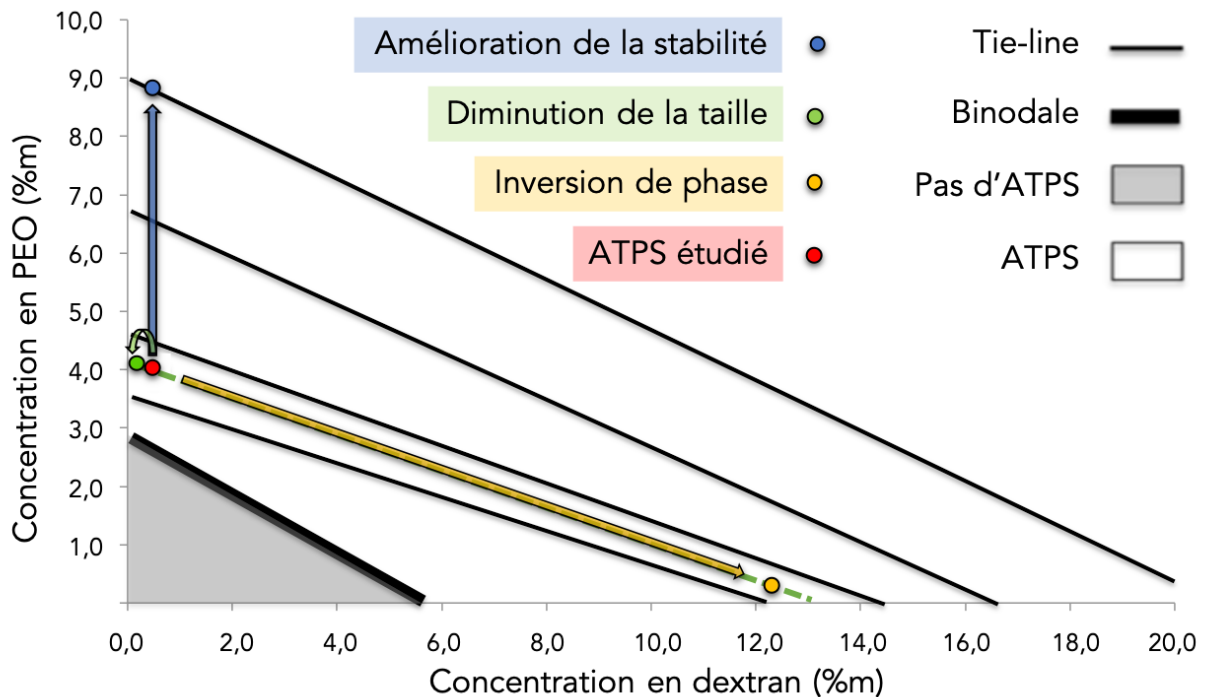


Figure 2. Présentation des stratégies de modifications de l'ATPS étudié : amélioration de la stabilité (en bleu), diminution de la taille (en vert) et inversion de phase (en jaune).

Formulation des microparticules

A partir de l'ATPS étudié dans la première partie et dont la composition est identifiée sur la **Figure 2**, une méthode de stabilisation a été développée dans l'objectif de former des microparticules.

Stabilisation des ATPS par méthode Pickering

La première étape a consisté à utiliser la méthode Pickering pour stabiliser les gouttelettes de la phase dispersée de l'ATPS. Pour cela, des nanocapsules lipidiques (LNCs) ont été utilisées. Il a été démontré que bien que les LNCs soient des particules colloïdales non solides, ces particules se localisent aux interfaces des phases dispersée et dispersante de l'ATPS. Cette méthode améliore ainsi la stabilité dans le temps de l'ATPS contre les phénomènes de coalescence.

Formation d'une coque gélifiée

Du chitosane a ensuite été greffé aux LNCs dans l'objectif d'aboutir à une complexation de polyélectrolytes par interaction entre le chitosane greffé et l'alginate. Une coque gélifiée à l'interface des gouttelettes a ainsi été formée et son efficacité protectrice a été démontrée. En effet, les particules formées présentent une résistance à la centrifugation et à la dilution dans l'eau.

Afin d'approfondir ce développement galénique, il serait nécessaire d'évaluer l'impact de plusieurs **paramètres du processus de formulation** tels que la température à chaque étape ou le type d'agitation. Ces analyses permettraient de définir un domaine de faisabilité du système formulé. Les paramètres de formulation pourraient alors être adaptés en fonction de la molécule à encapsuler.

Discussion sur l'étape de transacylation

Une étape du procédé s'est révélée particulièrement critique pour la formulation, il s'agit du greffage du chitosane sur les LNCs (cf. Partie II). En effet, l'obtention d'une charge apparente négative des LNCs après greffage du chitosane (entité chargée positivement) est inattendue. Plusieurs essais ont été réalisés afin d'expliquer ce résultat. Les analyses réalisées au Zêtasizer® NanoZS ont été réitérées avec un Zêtasizer® 2000 afin d'éliminer un éventuel biais de mesure. Ces appareils, équipés de cellules de mesure différentes, permettent tous les deux de déterminer le potentiel zêta de la suspension analysée. Des résultats similaires ont été obtenus, une charge négative des LNCs-CS a été mesurée. L'impact des conditions de dialyse et du pH sur la charge des LNCs a alors été évalué. Un lien a été démontré entre le pH du milieu réactionnel de transacylation et la charge des LNCs. Des essais complémentaires ont en effet permis de confirmer que la charge négative des LNCs (sans chitosane) est bien due aux conditions de pH de la réaction de transacylation.

Ce phénomène serait lié à une ionisation des groupements hydroxystéarates des PEG présents dans un des composants des LNCs : le Kolliphor® HS 15.

Deux méthodes différentes ont néanmoins permis d'obtenir des LNCs-CS chargées positivement :

- Dans le premier cas, le pH des LNCs-CS après réaction de transacylation a été drastiquement diminué par ajout de HCl concentré (pH mesuré à -0,22). Cependant, avec cette nouvelle méthode, une augmentation de la taille et du PDI des LNCs-CS a été observée, et l'ajout de ces LNCs-CS aux ATPS n'a pas permis de les stabiliser, contrairement aux LNCs-CS présentant une charge négative. Cette méthode n'a donc pas pu être exploitée.
- Dans le second cas, les conditions de transacylation ont été modifiées ; d'après le protocole de Skandrani, *et al*,¹² la concentration en soude utilisée a été diminuée de 10M à 1M. Des LNCs-CS avec un potentiel zêta de +20 mV ont ainsi été obtenues. Cependant, dans ces conditions, le comportement de ces LNCs-CS dans les ATPS formulés est très différent de celui observé pour les LNCs-CS chargées négativement. En effet, comme l'illustre la **Figure 3**, à la différence des LNCs-CS chargées négativement, les LNCs-CS chargées positivement ne forment pas de film régulier à la surface des gouttelettes de dextrane.

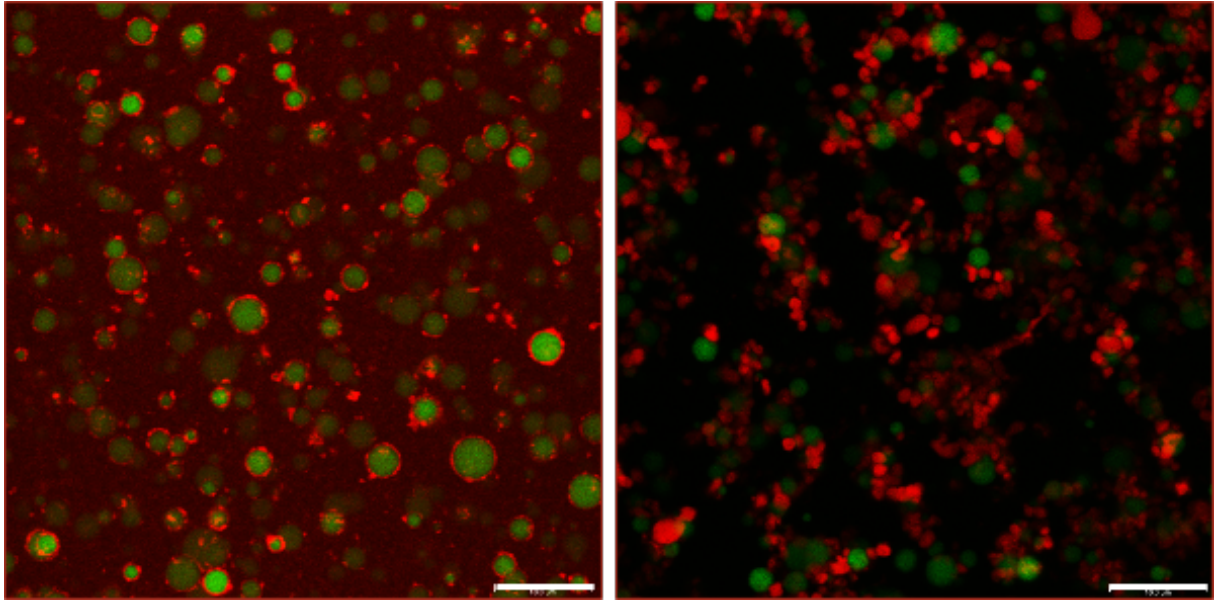


Figure 3. Observations en microscopie confocale des ATPS dex/PEO (non gélifiés) en présence de LNCs-CS chargées négativement (à gauche) et positivement (à droite). La concentration en LNCs est de 1.10^{14} particules.mL⁻¹. Le dextrane est marqué au FITC (coloration verte - $\lambda_{\text{excitation}}$: 475 nm / $\lambda_{\text{émission}}$: 530 nm) et les LNCs au DiD (coloration rouge - $\lambda_{\text{excitation}}$: 640 nm / $\lambda_{\text{émission}}$: 690 nm). Échelle : 10 μm

L'objectif étant de former une coque protectrice autour des gouttelettes de dextrane, les LNCs-CS chargées négativement ont donc été conservées pour la suite des expériences. Il serait néanmoins pertinent de caractériser davantage l'étape de greffage du chitosane, d'étudier l'influence du pH sur la formulation des LNCs-CS et sur l'interaction entre les LNCs-CS et l'alginate. En effet, il a été supposé que la coque gélifiée formée repose sur l'interaction entre les groupements positifs du chitosane greffé et les groupements négatifs de l'alginate.¹³ L'influence du pH sur ce complexe a déjà été démontrée dans une étude sur les propriétés de gonflements d'hydrogels.¹⁴ Dans notre système, il est supposé que plus cette interaction est forte, plus la coque formée sera solide et résistante à la déformation.

Pour la suite de ce projet, il sera nécessaire de caractériser ces interactions et notamment de déterminer la quantité de chitosane greffé à la surface des LNCs par fluorescence via la méthode o-phthalaldehyde par exemple.¹⁵ Cette technique permet, après purification des LNCs-CS par dialyse, de détecter les amines

primaires dont la réaction produit des produits fluorescents.¹⁶ De la même manière, il serait intéressant de quantifier le nombre de liaisons chitosane-alginate afin de confirmer l'hypothèse de ces interactions en dépit de la charge globale négative des LNCs. Gåserød, *et al.* ont par exemple utilisé une technique de radiomarquage du chitosane afin de mesurer quantitativement les interactions du chitosane avec des billes d'alginate.¹⁷

Encapsulation de l'insuline dans les microparticules

L'objectif final de ce projet a été d'évaluer la capacité des microparticules formulées à encapsuler une molécule thérapeutique appartenant à la classe BCS III. Les essais réalisés ont porté sur l'encapsulation de l'insuline humaine dans l'objectif de proposer un nouveau système de délivrance par voie orale pour cette molécule d'intérêt thérapeutique majeur dans la prise en charge du diabète.

Objectifs

Les principales limites à l'absorption gastro-intestinale de l'insuline sont physiques (structure épithéliale, mucus, pH) et enzymatiques (dégradation par les protéases) démontrant l'intérêt d'une protection de la molécule jusqu'à son absorption intestinale.^{18,19}

Wong, *et al.*, ont établi les critères suivants permettant de définir un système nanoparticulaire idéal pour la délivrance orale de l'insuline²⁰ :

- Biocompatibilité et sécurité
- Importante capacité d'encapsulation
- Résistance gastrique et intestinale (pH, dégradations enzymatiques)
- Augmentation du temps de résidence intestinal de l'insuline

- Amélioration de la perméabilité du tractus gastro-intestinal et de l'absorption de l'insuline
- Délivrance d'insuline intacte et biologiquement active dans la circulation sanguine

Détermination d'un domaine de faisabilité

Les résultats obtenus dans ce travail ont démontré une incompatibilité entre les conditions de formulation des microparticules et les conditions de solubilisation de l'insuline. En effet, l'insuline est insoluble dans l'eau, au pH neutre de formulation des microparticules. La structure des microparticules, quant à elle, est altérée à pH 2,2, pH pour lequel l'insuline est soluble. Dans la continuité de ce projet, il serait nécessaire de déterminer les conditions optimales de formulation des microparticules pour l'encapsulation de l'insuline. Cette étude devrait déterminer un domaine de faisabilité pour la formulation des ATPS et des microparticules en fonction du **pH**. Parallèlement, une étude de solubilité de l'insuline sur une plus large gamme de pH devrait être effectuée. Il serait alors possible de définir l'existence éventuelle d'une zone de pH compatible à la formulation des microparticules et à la solubilité de l'insuline.

Détermination de la dose d'insuline à encapsuler

Évaluation de la dose thérapeutique

Un autre aspect à considérer concerne la **dose** d'insuline à encapsuler dans les microparticules. En effet, d'après la Littérature²¹, une concentration de 75 µg.mL⁻¹ d'insuline dans la formulation des microparticules a été déterminée. Cette valeur est à corréler à la dose théorique d'insuline à encapsuler nécessaire à une activité thérapeutique. L'insuline est actuellement administrée par voie injectable dont la dose est déterminée en unités (UI). L'OMS définit un facteur de conversion

permettant d'établir qu'en Europe, une unité (1 UI) correspond à 0,0347 mg d'insuline.²² Les doses d'insuline doivent être adaptées à chaque patient, notamment en fonction de son poids corporel et de ses besoins en insuline. Dans la prise en charge d'un patient s'alimentant normalement, un schéma thérapeutique classique est proposé selon le **Tableau 2** et représenté **Figure 4**.

Tableau 2. Schéma thérapeutique proposé à l'instauration de l'insulinothérapie dans la prise en charge des patients diabétiques de type 1 ou 2 dans le cadre d'une alimentation normale.²³

Type d'administration	Heures d'administration	Doses initiales administrées (par kg/24h)
Basale	8h	Type 1 : 0,2-0,3 UI Type 2 : 0,4 UI
Prandiale* (bolus)	8h, 12h, 18h	0,2 UI

Une insuline basale, lente ou ultra-lente (de type glargine par exemple Lantus®, Abasaglar® ou Toujeo®) est administrée une fois par jour, elle permet de maintenir un niveau d'insuline de base constant tout au long de la journée.

A chaque repas, une insuline ultrarapide (Novorapid®, Humalog® ou Apidra® par exemple) est administrée en bolus, c'est-à-dire une dose unique, permettant de réguler l'hyperglycémie provoquée par l'ingestion de nutriments dans l'organisme au cours du repas.

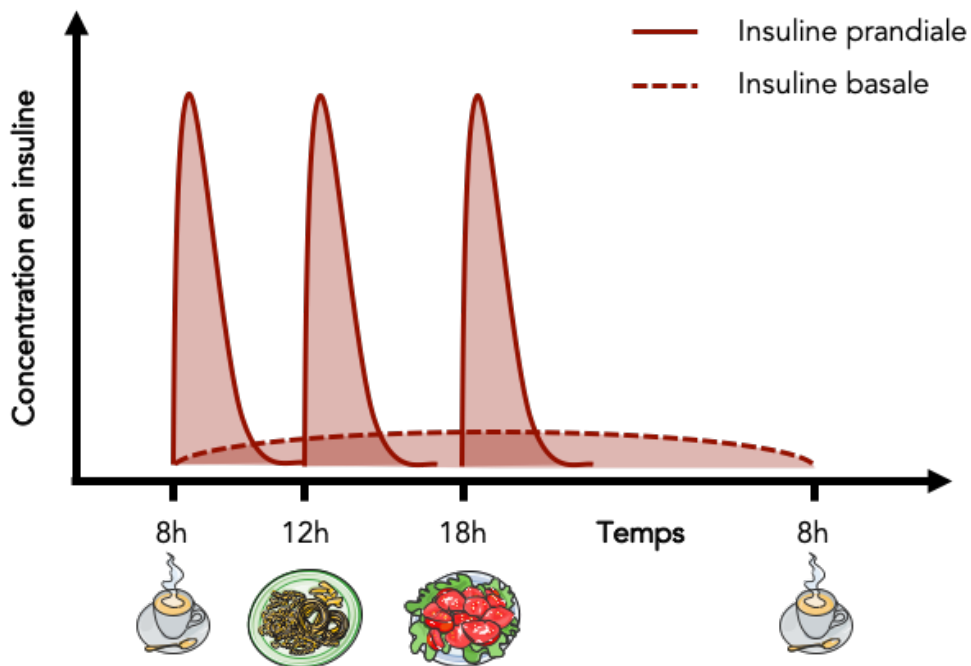


Figure 4. Représentation schématique de la prise en charge d'un patient diabétique par insulinothérapie. Évolution de la concentration en insuline suite aux administrations d'insulines basale et prandiale en fonction du temps

Afin d'illustrer la présente étude, prenons l'exemple d'un patient type de 70 kg. Si l'on se réfère aux données du **Tableau 2**, il est alors possible de calculer la dose quotidienne nécessaire d'insuline prandiale d'après la formule suivante :

$$\begin{aligned}\text{Quantité d'insuline (/24h)} &= \text{poids corporel} \times \text{dose d'insuline (/24h)} \\ &= 70 \times 0,2 \\ &= 14 \text{ UI}\end{aligned}$$

Sachant que cette dose est répartie en trois prises quotidiennes, la quantité nécessaire d'insuline par prise se calcule de la façon suivante :

$$\begin{aligned}\text{Quantité d'insuline (/prise)} &= \text{quantité d'insuline (/24h)} / \text{nombre de prises (/24h)} \\ &= 14 / 3 \\ &= 4,7 \text{ UI}\end{aligned}$$

Ainsi, pour la prise en charge de ce patient par insulinothérapie, 4,7 UI soit 0,16 mg d'insuline devront être administrés par prise.

Rapporté aux microparticules formulées avec une concentration en insuline à $75 \mu\text{g.mL}^{-1}$, cela correspond à 2,1 mL de formulation, soit à peine une demi cuillère-à-café de suspension de microparticules à chaque repas.

L'encapsulation d'insuline dans les microparticules permettrait ainsi l'administration par voie orale des bolus d'insuline sous forme de suspension, ce qui constituerait une avancée majeure dans le confort des patients diabétiques. Il est également envisageable d'adapter cette formulation à d'autres types d'insulines voire de combiner l'encapsulation de différentes insulines (basales, par exemple) afin de limiter le nombre de prises et ainsi d'améliorer l'observance.

Par ailleurs, il est envisageable d'augmenter le taux d'encapsulation de l'insuline dans les microparticules. En effet, la concentration de $75 \mu\text{g.mL}^{-1}$ a été calculée par rapport à un taux d'encapsulation de 1,5% (m/m). Une transposition rapide permet de déterminer une concentration en insuline à 5g.mL^{-1} pour un taux d'encapsulation théorique maximal de 100%. Ce degré d'adaptabilité permet ainsi d'assurer une dose d'insuline optimale en fonction de sa biodisponibilité et du rendement d'encapsulation déterminés pour cette formulation.

Surdosage et erreurs d'administration

Du fait des grandes variabilités inter-individuelles, il est difficile de déterminer une dose maximale d'insuline administrable. Une revue s'intéressant aux surdosages d'insuline a identifié des cas de surdosage à partir de 26 UI d'insuline.²⁴ Si l'on suppose cette dose comme dose minimale induisant un effet toxique, cela correspond à une prise de 12 mL de formulation de microparticules, soit un volume inférieur à une cuillère-à-soupe. En corrélation avec cette étude, ce calcul met également en évidence le risque non négligeable de surdosage pour une formulation destinée à la voie orale sous forme de suspension par rapport à une

formulation injectable. Cependant, en raison de l'intérêt majeur apporté par une administration orale de l'insuline, des réflexions sur la sécurité d'administration devront donc être menées à ce sujet lors du développement du médicament. Une formulation moins concentrée permettrait par exemple de limiter les risques de surdosage. En effet, d'après le **Tableau 3**, suivant les doses à administrer précédemment définies, et si l'on suppose une administration par pipette-doseuse de 10 mL, en cas d'erreur, la dose maximale administrée (une pipette entière, soit 10 mL) :

- correspond quasiment à la dose toxique (83,3%) dans le cas d'une formulation concentrée à $75 \mu\text{g.mL}^{-1}$ d'insuline,
- correspond à moins de la moitié de la dose toxique (41,7%) pour une formulation deux fois moins concentrée ($37,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ d'insuline).

Tableau 3. Exemple des doses thérapeutiques et toxiques d'insuline à administrer par le système microparticulaire formulé à deux dosages différents.

	Formulation à $75 \mu\text{g.mL}^{-1}$	Formulation à $37,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$
Dose toxique (26 UI)	12 mL = 100% tox	24 mL = 100% tox
Dose thérapeutique (4,7 UI)	2,1 mL = 17,5% tox	4,2 mL = 17,5% tox
Dose maximale en cas d'erreur	10 mL = 83,3% tox	10 mL = 41,7% tox

% tox correspond au pourcentage de la dose toxique

Limites du raisonnement

Hormis les risques liés au surdosage accidentel, la concentration de $75 \mu\text{g.mL}^{-1}$ sélectionnée correspondant à un taux d'encapsulation de 1,5% (m/m) est en adéquation avec une activité thérapeutique usuelle, couvrant une large gamme de dosages. Cependant cette concentration reflète une concentration théorique basée sur des conditions idéales de *rendement d'encapsulation* et de *biodisponibilité*.

En d'autres termes, pour un rendement d'encapsulation de 100%, l'effet hypoglycémiant obtenu avec l'encapsulation de l'insuline dans les microparticules sera identique :

- à celui observé avec les nanoparticules formulées par Guo, *et al.*²¹ (à partir desquelles le taux d'encapsulation de 1,5% a été extrapolé) si la biodisponibilité de l'insuline encapsulée dans les microparticules est comparable à celle encapsulée dans les nanoparticules,
- à celui obtenu par l'administration IV d'insuline si la biodisponibilité de l'insuline encapsulée dans les microparticules est idéale, c'est-à-dire de 100%.

La dose d'insuline à administrer par voie orale dans le système microparticulaire formulé devra donc être adaptée en fonction :

- du rendement d'encapsulation
- de la biodisponibilité de l'insuline
- de l'effet hypoglycémiant recherché.

Le rendement d'encapsulation, doit être déterminé par le dosage de l'insuline encapsulée et/ou non encapsulée. Les concentrations en insuline peuvent être déterminées par analyse chromatographique. C'est pourquoi une méthode de quantification de l'insuline par *UHPLC* a été développée sur une gamme de concentrations comprises entre 20 et 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Plusieurs critères tels que l'exactitude, la précision ou la robustesse nécessitent encore d'être évalués afin de valider la méthode selon les ICH Q2 (R1). La validation de cette méthode de dosage devra également être effectuée en présence des excipients de la formulation afin de s'assurer notamment de sa spécificité.

Évaluation de la stabilité des microparticules

Un autre axe majeur du développement des systèmes microparticulaires formulés consisterait à étudier de manière plus approfondie leur **stabilité**, à la température, au pH et dans le temps, dans l'objectif d'une future administration.

Influence de la température

Similairement aux ATPS non stabilisés, il serait judicieux d'évaluer la stabilité des microparticules en fonction de la **température** et notamment à 37°C dans l'optique d'une administration chez l'Homme. Dans l'objectif d'une administration d'insuline prandiale (en bolus), une stabilité du système à 37°C de quelques heures serait suffisante. En vue d'une administration basale d'insuline, une stabilité d'au moins une journée serait alors nécessaire. Ces essais n'ont pas été réalisés, cependant dans une étude annexe de stabilité au Turbiscan Tower, il a été démontré que pour les microparticules formulées (sans insuline), après centrifugation et remise en suspension dans l'eau, un TSI de 5 est atteint en environ une journée à 37°C (**Tableau 4**). Par comparaison, à 4°C, cette même valeur de TSI est atteinte en environ 10 jours (cf. Partie II).

Tableau 4. Durée nécessaire pour atteindre une valeur de TSI (indice de stabilité au Turbiscan) de 5 indiquant une déstabilisation des microparticules, à différentes températures testées.

Température de formulation	Temps nécessaire pour atteindre un TSI de 5
4°C	10 jours
37°C	1 jour

Bien que les conditions soient différentes entre ces essais, la tendance d'une déstabilisation plus rapide à 37°C qu'à 4°C se profile, ce qui est cohérent avec les résultats de stabilité à la température obtenus pour les ATPS. Une stabilité d'une

journée est suffisante pour une administration orale d'insuline (prandiale ou basale). Cependant, ce résultat est évidemment à nuancer en tenant compte des propriétés physico-chimiques de l'environnement physiologique du tractus gastro-intestinal.

Influence du pH

Le *pH* par exemple, dans cet essai dans l'eau est proche de 7 alors que physiologiquement, il varie de 1,5 à 5 dans l'estomac puis de 5,5 à 7 dans l'intestin.⁷ C'est pourquoi des essais préliminaires ont été réalisés sur des microparticules dans des milieux de FaSSGF et FaSSIF-V2 simulant respectivement les milieux gastriques et intestinaux.²⁵ La composition de ces milieux étant complexe (**Tableau 5**), les analyses en TEM n'ont pas permis d'identifier les microparticules parmi la structure qui compose les milieux. Il sera donc nécessaire de réitérer cette expérience après séparation ou extraction des microparticules du milieu.

Tableau 5. Composition des milieux gastrique (FaSSGF) et intestinal (FaSSIF-V2) simulés.²⁶

	FaSSGF	FaSSIF-V2
Taurocholate de sodium	80 μ M	3 mM
Chlorure de sodium	34,2 mM	68,62 mM
Lécithine	20 μ M	0,2 mM
Pepsine	0,1 mg/mL	-
Acide chlorhydrique	QSP pH 1,6	-
Acide maléique	-	19,12 mM
Hydroxyde de sodium	-	34,8 mM

QSP : quantité suffisante pour

Une analyse de stabilité des microparticules au Turbiscan a montré une instabilité très précoce en milieu gastrique à 37°C, avec une valeur de TSI > 5 obtenue en quelques minutes alors qu'en milieu intestinal cette même valeur est atteinte en 3h (**Tableau 6**).

Tableau 6. Durée nécessaire pour atteindre une valeur de TSI (indice de stabilité au Turbiscan) de 5 indiquant une déstabilisation des microparticules, à 37°C dans différents milieux.

Milieu	Temps nécessaire pour atteindre un TSI de 5
Eau	1 jour
FaSSIF-V2	3h
FaSSGF	< 1h

Ces résultats corroborent les précédentes observations concernant l'instabilité des ATPS à pH acide, et appuient l'intérêt de mener une étude approfondie de stabilité des systèmes formulés en fonction du pH. Par ailleurs, il serait envisageable d'assurer la protection gastrique des microparticules par l'utilisation d'un système de type gélule gastro-résistante. Cela nécessiterait une étape préalable de lyophilisation afin d'obtenir des microparticules sous forme de poudre.

Conditions de conservation des microparticules

Durée de conservation

Il serait également intéressant d'étudier la stabilité en cours de *conservation* des systèmes microparticulaires. Pour cela, il faudrait poursuivre l'étude menée en Partie II sur les ATPS gélifiés à 4°C au-delà de 28 jours, afin d'observer des signes concrets de déstabilisation. Des conditions précises de conservation des microparticules pourraient ainsi être définies.

Stabilité microbiologique et bactériologique

Un autre aspect de la conservation qui n'a pas du tout été abordé dans ce projet mais néanmoins indispensable dans l'objectif d'un tel développement pharmaceutique serait l'évaluation de la stabilité microbiologique de la formulation. Pour les préparations aqueuses non stériles destinées à la voie orale, l'OMS

recommande les critères d'acceptabilité suivants afin d'assurer une qualité microbiologique²⁷ :

- taux de bactéries aérobies total : 10^2 (soit <200) UFC/g ou UFC/mL,
- taux de levures / moisissures total : 10^1 (soit <20) UFC/g ou UFC/mL
- absence d'*Escherichia coli*

(UFC signifiant « Unité Formant Colonie »).

Dans le cas où les résultats de stabilité à la conservation ne seraient pas acceptables, il pourrait être envisagé de lyophiliser les microparticules puis de les remettre en suspension extemporanément.

Stabilité des microparticules à la lyophilisation

Des analyses ont été menées pour la caractérisation au microscope électronique à transmission des microparticules. La **Figure 5** présente les résultats de ces analyses. Une étape supplémentaire de lyophilisation (cycle de 18h) puis de remise en suspension dans l'eau a été opérée pour la figure de droite.

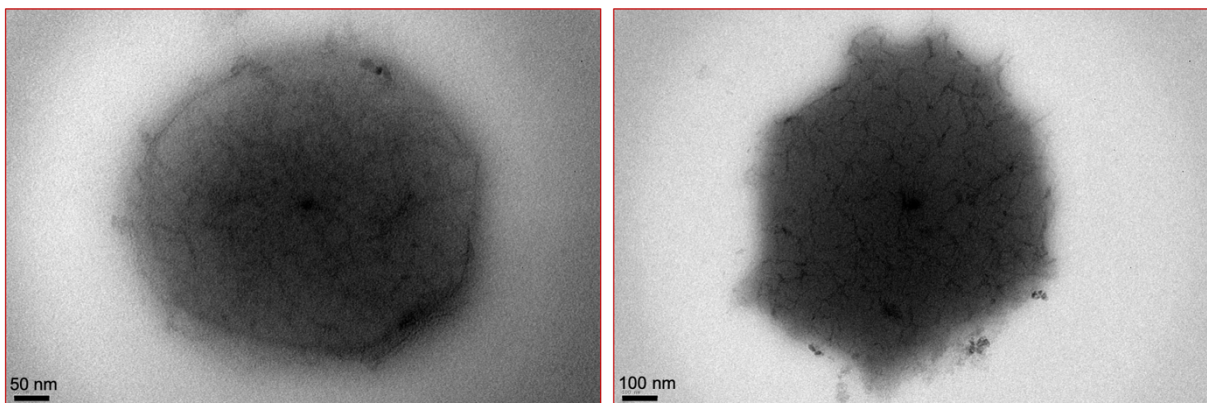


Figure 5. Observations en microscopie électronique à transmission des microparticules avec (image de droite) ou sans (image de gauche) lyophilisation.

La structure des microparticules observées au TEM est similaire avec ou sans lyophilisation. On peut donc présager d'une stabilité de ces systèmes à la lyophilisation.

Dans la continuité de cette étude, il faudrait s'assurer de la stabilité et de l'efficacité de l'insuline après une étape de lyophilisation. Une récente étude visant à développer des nanoparticules pour l'administration orale d'insuline a mis en évidence l'importance du choix d'un cryoprotecteur à utiliser lors de la lyophilisation (par exemple 7% de mannitol) notamment pour la conservation de l'activité biologique de l'insuline.²⁸ Dans le cadre de la présente étude, il sera également nécessaire de déterminer la durée minimale de gélification nécessaire pour la formulation des microparticules. Idéalement, la lyophilisation devrait avoir lieu après un temps de gélification suffisant pour la formation de coques protectrices et avant une éventuelle agrégation de l'insuline.

Évaluation de l'efficacité des microparticules d'insuline

Une évaluation de l'**efficacité** *in vitro* et *in vivo* des microparticules d'insuline (ainsi que des microparticules sans insuline) doit enfin être menée. D'après les résultats de stabilité des microparticules en milieux gastro-intestinaux (FaSSGF et FaSSIF-V2) précédemment évoqués, il semblerait que le milieu gastrique induise une déstabilisation très rapide des microparticules. En supposant que les microparticules d'insuline puissent subir une étape de lyophilisation (conservation de la structure et des propriétés à la fois des microparticules et de l'insuline), il serait alors éventuellement envisageable de les protéger, sous forme de poudre, dans des gélules gastro-résistantes. Cela permettrait alors une protection gastrique des microparticules pour leur libération intestinale.

Bilan

Si l'on se base sur le cahier des charges précédemment défini pour l'administration orale de l'insuline, le système proposé dans ce projet est une solution prometteuse pour répondre à cette problématique (**Tableau 7**).

Tableau 7. Tableau comparatif des propriétés attendues pour un système optimal de délivrance de l'insuline par voie orale, des solutions apportées par le projet de recherche (appuyées par des propriétés étudiées dans la littérature scientifique) et des perspectives envisageables pour approfondir cette étude.

Propriétés idéales	Solutions apportées par le système	Perspectives
Biocompatibilité et sécurité	Composants biocompatibles	Études de toxicité cellulaire à mener
Importante capacité d'encapsulation	Taux d'encapsulation théorique de 1,5%	Taux d'encapsulation réel à déterminer par UHPLC
Résistance gastrique (pH acide et dégradations enzymatiques)	Le système actuel n'est pas résistant en milieu gastrique	Évaluation de la stabilité à la lyophilisation Protection par une gélule gastro-résistante Modification de la formulation
Résistance intestinale (pH et dégradations enzymatiques)	Système microparticulaire protecteur Protection contre les dégradations par l'association alginate/chitosane ²⁹	Étude plus approfondie de la stabilité en milieux simulés (FaSSiF/FeSSiF), et <i>in vivo</i>
Augmentation du temps de résidence intestinal de l'insuline	Libération contrôlée par la coque protectrice. Des nanoparticules de dextrane/chitosane ont démontré une libération pH-dépendante de l'insuline ³⁰	Cinétique de libération à étudier Modulation possible de l'épaisseur de la coque
Amélioration de la perméabilité du tractus gastro-intestinal et de l'absorption de l'insuline	Système de taille micrométrique Ouverture des jonctions serrées et muco-adhésion par le chitosane ³¹	Diminution de la taille des particules
Délivrance d'insuline intacte et biologiquement active dans la circulation sanguine	Système devant permettre d'assurer la protection de l'insuline jusqu'à la circulation sanguine	Efficacité biologique à déterminer <i>in vivo</i> Dosage sanguin de l'insuline à déterminer par UHPLC

Enfin, il serait également intéressant d'ouvrir ces essais d'encapsulation à d'autres molécules BCS III. La grande adaptabilité de ce système permet en effet d'inverser le sens de l'émulsion afin d'obtenir des ATPS de type dex/PEO ou PEO/dex d'après les caractérisations physico-chimiques déterminées en Partie I. Cela permet d'ajuster la structure des microparticules en fonction de l'affinité de la molécule active pour l'une ou l'autre des phases aqueuses. Par ces études, le potentiel universel de ces nouveaux systèmes de délivrance pourrait alors être confirmé.

REFERENCES

- 1 Y. Chao and H. C. Shum, Emerging aqueous two-phase systems: from fundamentals of interfaces to biomedical applications, *Chem. Soc. Rev.*, 2020, **49**, 114–142.
- 2 A. Kaul, The Phase Diagram, *Methods Biotechnol.*, 2000, **11**, 11–21.
- 3 G. Balakrishnan, T. Nicolai, L. Benyahia and D. Durand, Particles trapped at the droplet interface in water-in-water emulsions, *Langmuir*, 2012, **28**, 5921–5926.
- 4 B. T. Nguyen, T. Nicolai and L. Benyahia, Stabilization of water-in-water emulsions by addition of protein particles, *Langmuir*, 2013, **29**, 10658–10664.
- 5 T. Benamor. Synthèse et caractérisation de silices mésoporeuses hydrophobes à porosité contrôlée. Thèse doctorale Chimie des Matériaux, Université de Haute Alsace. 2012; 189 p.
- 6 B. P. Binks and H. Shi, Phase Inversion of Silica Particle-Stabilized Water-in-Water Emulsions, *Langmuir*, 2019, **35**, 4046–4057.
- 7 E. Roger, F. Lagarce, E. Garcion and J.-P. Benoit, Biopharmaceutical parameters to consider in order to alter the fate of nanocarriers after oral delivery., *Nanomedicine (Lond)*, 2010, **5**, 287–306.
- 8 B. T. Nguyen, W. Wang, B. R. Saunders, L. Benyahia and T. Nicolai, pH-responsive water-in-water pickering emulsions, *Langmuir*, 2015, **31**, 3605–3611.
- 9 D. Forciniti, C. K. Hall and M.-R. Kula, Influence of polymer molecular weight and temperature on phase composition in aqueous two-phase systems, *Fluid Phase Equilib.*, 1991, **61**, 243–262.
- 10 H. Malhaire, J.-C. Gimel, E. Roger, J.-P. Benoît and F. Lagarce, How to design the surface of peptide-loaded nanoparticles for efficient oral bioavailability?,

- Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2016, **106**, 320–336.
- 11 C. Albert, M. Beladjine, N. Tsapis, E. Fattal, F. Agnely and N. Huang, Pickering emulsions: Preparation processes, key parameters governing their properties and potential for pharmaceutical applications, *J. Control. Release*, 2019, **309**, 302–332.
 - 12 N. Skandrani, A. Barras, D. Legrand, T. Gharbi, H. Boulahdour and R. Boukherroub, Lipid nanocapsules functionalized with polyethyleneimine for plasmid DNA and drug co-delivery and cell imaging, *Nanoscale*, 2014, **6**, 7379.
 - 13 J. Y. Seo, B. Lee, T. W. Kang, J. H. Noh, M. J. Kim, Y. B. Ji, H. J. Ju, B. H. Min and M. S. Kim, Electrostatically Interactive Injectable Hydrogels for Drug Delivery, *Tissue Eng. Regen. Med.*, 2018, **15**, 513–520.
 - 14 M. Gierszewska, J. Ostrowska-Czubenko and E. Chrzanowska, pH-responsive chitosan/alginate polyelectrolyte complex membranes reinforced by tripolyphosphate, *Eur. Polym. J.*, 2018, **101**, 282–290.
 - 15 K. Messaoudi, P. Saulnier, K. Boesen, J.-P. Benoit and F. Lagarce, Anti-epidermal growth factor receptor siRNA carried by chitosan-transacylated lipid nanocapsules increases sensitivity of glioblastoma cells to temozolomide., *Int. J. Nanomedicine*, 2014, **9**, 1479–90.
 - 16 J. R. Benson and P. E. Hare, O-phthalaldehyde: fluorogenic detection of primary amines in the picomole range. Comparison with fluorescamine and ninhydrin., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1975, **72**, 619–622.
 - 17 O. Gåserød, O. Smidsrød and G. Skjåk-Bræk, Microcapsules of alginate-chitosan – I A quantitative study of the interaction between alginate and chitosan Olav, *Biomaterials*, 1998, **19**, 1815–1825.
 - 18 T. Delair, Colloidal polyelectrolyte complexes of chitosan and dextran sulfate towards versatile nanocarriers of bioactive molecules, *Eur. J. Pharm.*

- Biopharm.*, 2011, **78**, 10–18.
- 19 G. P. Carino and E. Mathiowitz, Oral insulin delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 1999, **35**, 249–257.
 - 20 C. Y. Wong, H. Al-Salami and C. R. Dass, Potential of insulin nanoparticle formulations for oral delivery and diabetes treatment, *J. Control. Release*, 2017, **264**, 247–275.
 - 21 F. Guo, T. Ouyang, T. Peng, X. Zhang, B. Xie, X. Yang, D. Liang and H. Zhong, Enhanced oral absorption of insulin using colon-specific nanoparticles co-modified with amphiphilic chitosan derivatives and cell-penetrating peptides, *Biomater. Sci.*, 2019, 1493–1506.
 - 22 C. Burns, T. Morris, B. Jones, W. Koch, M. Borer, U. Riber and A. Bristow, EXPERT Committee on Biological Standardization; Expert Committee on Specification For Pharmaceutical Preparation, *World Health Organ. Tech. Rep. Ser.*, 2010, **96**, 1–19.
 - 23 P. J. Philippe, G. Gastaldi and F. R. Jornayvaz, Guide médical de prise en charge du diabète en milieu intra-hospitalier, 2017, 1–28.
 - 24 N. J. Johansen and M. B. Christensen, A Systematic Review on Insulin Overdose Cases: Clinical Course, Complications and Treatment Options, *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*, 2018, **122**, 650–659.
 - 25 C. Markopoulos, C. J. Andreas, M. Vertzoni, J. Dressman and C. Reppas, In-vitro simulation of luminal conditions for evaluation of performance of oral drug products: Choosing the appropriate test media, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2015, **93**, 173–182.
 - 26 E. Jantratid, N. Janssen, C. Reppas and J. B. Dressman, Dissolution Media Simulating Conditions in the Proximal Human Gastrointestinal Tract: An Update, *Pharm. Res.*, 2008, **25**, 1663–1676.
 - 27 World Health Organization, *SUPPLEMENTARY INFORMATION* , S . 3 . 7

MICROBIOLOGICAL QUALITY OF NON-STERILE PRODUCTS: RECOMMENDED ACCEPTANCE CRITERIA FOR PHARMACEUTICAL PREPARATIONS: Final text for revision of The International Pharmacopoeia, 2012.

- 28 C. Y. Wong, H. Al-Salami and C. R. Dass, Lyophilisation Improves Bioactivity and Stability of Insulin-Loaded Polymeric-Oligonucleotide Nanoparticles for Diabetes Treatment, *AAPS PharmSciTech*, 2020, **21**, 108.
- 29 P. Fonte, F. Araújo, S. Reis and B. Sarmento, Oral Insulin Delivery: How Far are We?, *J. Diabetes Sci. Technol.*, 2013, **7**, 520–531.
- 30 B. Sarmento, A. Ribeiro, F. Veiga, D. Ferreira and R. Neufeld, Oral Bioavailability of Insulin Contained in Polysaccharide Nanoparticles, *Biomacromolecules*, 2007, **8**, 3054–3060.
- 31 T. A. Sonia, M. R. Rekha and C. P. Sharma, Bioadhesive hydrophobic chitosan microparticles for oral delivery of insulin: In vitro characterization and in vivo uptake studies, *J. Appl. Polym. Sci.*, 2011, **119**, 2902–2910.

CONCLUSION

C Conclusion

Ce projet de thèse a porté sur le développement de formulations innovantes pour l'administration de molécules BCS III par voie orale. Pour cela, des microparticules ont été formulées à partir de systèmes diphasiques aqueux composés d'une phase aqueuse de dextrane dispersée dans une phase aqueuse continue de PEO. Ces systèmes ont premièrement été stabilisés par méthode Pickering via l'utilisation de nanocapsules lipidiques sur lesquelles du chitosane a été greffé. Une coque gélifiée a ensuite été formée par l'interaction entre les charges positives du chitosane et les charges négatives de l'alginate utilisé pour cette étape de gélification. La **Figure 1** représente schématiquement les microparticules obtenues. L'insuline a été étudiée comme molécule BCS III modèle à encapsuler car son administration orale représenterait une avancée majeure dans la prise en charge des patients diabétiques.

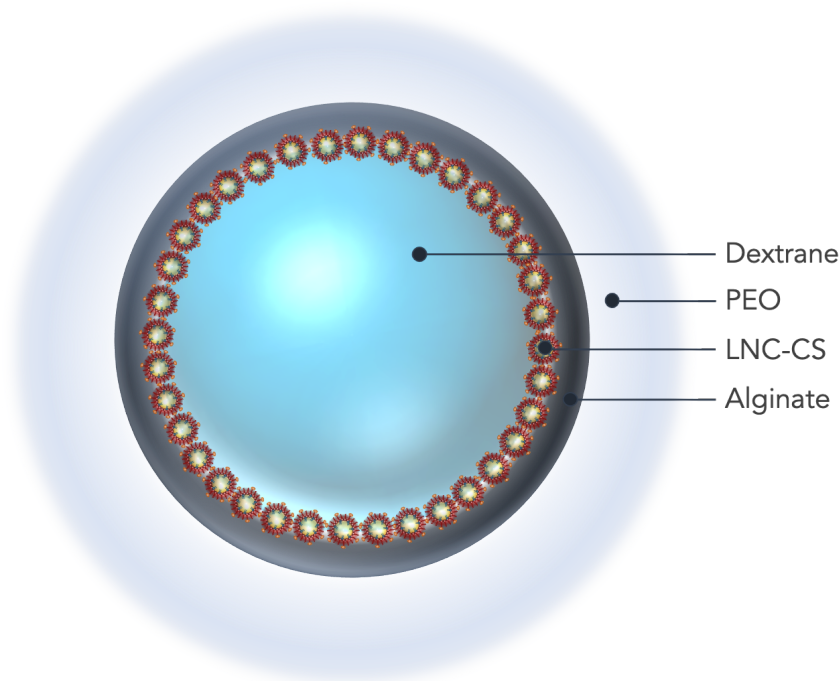


Figure 1. Représentation schématique de la structure des microparticules

Ce travail a premièrement consisté à caractériser les ATPS par la construction de diagrammes de phases. Grâce à ces résultats, un procédé de formulation simplifié des ATPS en une seule étape à partir d'un mélange de polymères sous forme de poudre a pu être établi.

Les microparticules ensuite formulées à partir de ces ATPS ont démontré une stabilité à 28 jours, ainsi qu'une résistance à la dilution et à la centrifugation. Ces essais devront être poursuivis afin d'étudier notamment la stabilité à la lyophilisation en vue d'une intégration sous forme de poudre dans un système de type gélule gastro-résistante.

Enfin, des essais d'encapsulation ont été menés avec de l'insuline humaine à une concentration de $75 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Le développement de la méthode de dosage de l'insuline par UHPLC initié devra être finalisé afin de déterminer le taux d'encapsulation de la molécule. Actuellement, cette méthode a été optimisée en mode gradient et a permis de déterminer des limites de détection et de quantification respectivement de $0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ et $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Enfin, la linéarité d'une gamme comprise entre 20 et $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ a été validée selon les ICH-Q2.

Une incompatibilité entre le pH de solubilisation de l'insuline et celui de formation des microparticules a été détectée. L'encapsulation de l'insuline dans les microparticules nécessite donc d'être encore optimisée. La prochaine étude consistera donc à déterminer une gamme de pH pour laquelle la formulation des microparticules est compatible avec la solubilisation de l'insuline.

Dans la continuité de ce projet, les principaux travaux restant à effectuer devront s'orienter sur l'amélioration de la stabilité des systèmes dans les milieux physiologiques et notamment dans le milieu gastrique afin de permettre une protection des microparticules jusqu'à la libération intestinale du principe actif.

La principale perspective de ce projet repose sur l'universalité de ces systèmes de formulation pour encapsuler des molécules BCS III de caractéristiques et les propriétés variées. En effet, les paramètres de formulation tels que le sens de l'émulsion sont ajustables et permettent d'optimiser la formulation pour une molécule donnée en fonction de son affinité préférentielle pour l'une ou l'autre des phases (dextrane ou PEO). Dans cet objectif, il sera pertinent d'étudier la faisabilité de la formulation des microparticules en inversant le sens de l'émulsion. Le potentiel universel de ces formulations serait défini en répondant à ces différentes interrogations :

- Où se localisent les LNCs-CS dans un système PEO/dextrane ?
- Dans cette configuration, obtient-on une structure avec une coque gélifiée ?
- La stabilité des systèmes est-elle comparable quel que soit le sens de l'émulsion ?
- Les propriétés pharmacocinétiques observées sont-elles équivalentes ?

Pour conclure, les microparticules à cœur aqueux sont compatibles avec l'administration de molécules hydrosolubles, les composants utilisés sont biocompatibles et présentent des propriétés intéressantes pour l'administration orale ; enfin, le procédé de formulation est « vert ». L'ensemble de ces critères permet de répondre aux spécifications attendues pour ce projet. Ainsi, le développement de ces systèmes microparticulaires constitue une stratégie de formulation prometteuse pour l'administration orale de molécules BCS III.

Titre : Conception de nouvelles formulations pour l'encapsulation des molécules BCS III

Mots clés : BCS III, microparticules, voie orale, systèmes diphasiques aqueux, insuline, Pickering

Résumé : Ces travaux de thèse ont porté sur le développement d'une nouvelle formulation microparticulaire destinée à améliorer la biodisponibilité orale des molécules appartenant à la classe BCS III de la classification biopharmaceutique. Cette formulation est basée sur les systèmes diphasiques aqueux (ATPS). Le premier axe de Recherche a permis de caractériser les ATPS composés de dextrane et d'oxyde de polyéthylène, en déterminant des diagrammes de phase en fonction de la pureté et de l'état (liquide ou sous forme de poudre) des polymères. Une simplification du procédé de formulation à une seule étape, reposant sur la dissolution d'un mélange de polymères sous forme de poudre a été proposé. Une formulation microparticulaire à partir des ATPS a ensuite été développée.

Une première étape de stabilisation des ATPS s'est basée sur la méthode Pickering à partir de nanocapsules lipidiques sur lesquelles du chitosane a été greffé. Puis, par complexation de polyélectrolytes, une coque d'alginate gélifiée a été formée. Les systèmes obtenus ont démontré une stabilité dans le temps (28 jours), à la dilution et à la centrifugation. Enfin, l'étude de l'encapsulation de l'insuline dans ces microparticules a été initiée. Cependant, la faible solubilité de l'insuline au pH de formulation des microparticules (pH neutre) n'a pas permis d'évaluer efficacement leur potentiel d'encapsulation. Malgré les axes d'optimisation qui restent à développer (permettant notamment son adaptation aux molécules à encapsuler telles que l'insuline), le système formulé dans ce projet semble prometteur pour une future administration orale de molécules BCS III.

Title : Design of new formulations for BCS III drugs encapsulation

Keywords : BCS III, microparticles, oral administration, aqueous two-phase systems, insulin, Pickering

Abstract : This work of thesis concerned the development of new microparticle formulation, enhancing the oral bioavailability of class III of biopharmaceutical classification system (BCS) drugs. This formulation is based on aqueous two-phase systems (ATPS), for oral administration. In the first part, ATPS composed of dextran and polyethylene oxide were characterized by phase diagram construction depending on polymers purity and form (liquid or powder). An easy one-step formulation process by dissolving a polymer mixture in powder form was suggested. Microparticles formulation was then developed from ATPS. ATPS were firstly stabilized based on Pickering method with chitosan-grafted lipid nanocapsules.

A gelled alginate shell was then formed by polyelectrolyte complexation. Systems obtained showed time stability (for 28 days) and withstood dilution and centrifugation. Finally, the study of insulin encapsulation in microparticles was initiated. However, due to low solubility of insulin at pH value for which microparticles are formulated (neutral pH), their encapsulation potential was not effectively evaluated. Despite the optimization opportunities remaining to be developed (especially for fitting them to molecules to encapsulate such as insulin), the systems formulated in this project appear promising for further BCS III oral administration.