

THESE

présentée par

Florence BOURDON

en vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LILLE 2

**Développement de formes transdermiques à usage hospitalier, à
partir de véhicules prêts à l'emploi, pour le traitement des
nausées et vomissements chimio-induits**

Le 29 Septembre 2015

Membres du jury :

Rapporteurs :

Marie-Alexandrine BOLZINGER Professeur des Universités - Université Lyon 1

Patrice PROGNON Professeur des Universités et Praticien Hospitalier - Université de Paris 11

Examineurs :

Cécile LAUGEL Maître de Conférences, HDR - Université de Paris 11

Pascal ODOU Professeur des Universités et Praticien Hospitalier - Université de Lille 2

Directrice de thèse :

Catherine FOULON Maître de Conférences, HDR - Université de Lille 2

Co-encadrante :

Marie LECOEUR Maître de Conférences - Université de Lille 2

THESE

présentée par

Florence BOURDON

en vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LILLE 2

**Développement de formes transdermiques à usage hospitalier, à
partir de véhicules prêts à l'emploi, pour le traitement des
nausées et vomissements chimio-induits**

Le 29 Septembre 2015

Membres du jury :

Rapporteurs :

Marie-Alexandrine BOLZINGER Professeur des Universités - Université Lyon 1

Patrice PROGNON Professeur des Universités et Praticien Hospitalier - Université de Paris 11

Examineurs :

Cécile LAUGEL Maître de Conférences, HDR - Université de Paris 11

Pascal ODOU Professeur des Universités et Praticien Hospitalier - Université de Lille 2

Directrice de thèse :

Catherine FOULON Maître de Conférences, HDR - Université de Lille 2

Co-encadrante :

Marie LECOEUR Maître de Conférences - Université de Lille 2

Remerciements

Les travaux présentés dans ce manuscrit ont été réalisés au laboratoire de Chimie Analytique de la Faculté de Pharmacie de Lille, en parallèle de mon internat en pharmacie hospitalière.

Je tiens à remercier les membres du jury, Madame Marie-Alexandrine Bolzinger et Monsieur Patrice Prognon qui ont accepté de rapporter ce travail, ainsi que Madame Cécile Laugel et Monsieur Pascal Odou, membres examinateurs.

Je remercie Monsieur Jean-Paul Bonte et Monsieur Claude Vaccher, respectivement ancien et actuel Directeur du laboratoire de Chimie Analytique de m'avoir accueillie dans leur laboratoire, et m'avoir permis de préparer mon doctorat.

Cette thèse a été dirigée par le Docteur Catherine Foulon. Un immense merci pour avoir accepté de diriger ces travaux et m'avoir fait confiance pendant ces quatre années. Son savoir, sa pédagogie, sa rigueur, sa disponibilité, ses qualités humaines, son humilité ou encore son soutien, sont autant de qualités qui m'ont permis d'avancer et de me faire grandir.

Ce travail a été encadré par le Docteur Marie Lecoer. Un immense merci pour m'avoir initiée à la recherche analytique et m'avoir ouvert les portes de ce domaine passionnant. Sa disponibilité, son savoir, sa pédagogie, son sens de l'organisation, son soutien et sa rigueur m'ont permis de réaliser ce travail.

Merci à Vincent Ultré pour m'avoir éclairée en électricité et m'avoir fait découvrir sa partie imaginaire.

Merci également à Mostapha Kaouach (Centre Universitaire de Mesures et d'Analyses) pour avoir mis au point l'analyse de l'aprépitant en LC-MS.

Je souhaite remercier le Dr Guerreschi pour m'avoir initiée au dermatome de Lagrot sur les oreilles de cochon ainsi qu'Arnold et Martin pour leur accueil chaleureux à l'animalerie du CHRU de Lille. Je souhaite remercier également les Abattoires de Valenciennes.

Merci à la société Fagron pour nous avoir fourni gracieusement les véhicules prêts à l'emploi.

Un grand merci à Aurélie, Amandine, Hishda et Louise, étudiants en master qui m'ont beaucoup aidée dans la réalisation de ce travail.

Merci à toute l'équipe de Chimie Analytique, Cécile Danel, Jean-François Goossens, Emmanuelle Lipka, Nadège Schifano et Fathia Sherik pour leur accueil si chaleureux, leur écoute, leur soutien et les discussions scientifiques enrichissantes. Merci à Tiphaine, ma co-doctorante qui m'a beaucoup soutenue et en qui, j'ai trouvé une amie.

Enfin, un énorme merci à ma famille, sans qui mon parcours n'aurait jamais pu exister. Leur aide et leur amour sans faille me donnent la force d'avancer au quotidien et de réaliser de nouveaux projets. Merci aux deux hommes de ma vie qui me comblent de bonheur et m'inondent d'amour et de joie. Guillaume, merci pour ton amour, ta confiance, ta patience et de m'avoir donné un cadeau inestimable, Gabriel.

SOMMAIRE

Liste des abréviations	I
Introduction générale	1
Chapitre 1: Bibliographie	3
I Nausées et vomissements chimio-induits.....	3
I.1 La physiopathologie	3
I.2 La stratégie thérapeutique	4
<i>I.2.1 Facteurs déterminants dans la stratégie antiémétisante</i>	<i>4</i>
<i>I.2.2 Traitements des NVCI au cours de chimiothérapies hautement émétisantes</i>	<i>4</i>
I.2.2.a Protocoles recommandés.....	5
I.2.2.b Mode d'action et effets secondaires des antagonistes des récepteurs 5-HT3 et NK1 et des corticoïdes.....	5
I.2.2.c Spécialités pharmaceutiques commercialisées	6
II La voie transdermique	8
II.1 La peau	8
<i>II.1.1 Structure de l'épiderme.....</i>	<i>9</i>
II.1.1.a Le stratum corneum	9
II.1.1.b L'épiderme vivant.....	10
<i>II.1.2 Structure du derme</i>	<i>11</i>
<i>II.1.3 Structure de l'hypoderme.....</i>	<i>11</i>
<i>II.1.4 Annexes cutanées.....</i>	<i>11</i>
II.2 Mécanisme d'absorption percutanée.....	12
<i>II.2.1 Le mode d'absorption percutanée</i>	<i>12</i>
<i>II.2.2 Les approches permettant de promouvoir l'absorption.....</i>	<i>14</i>
II.2.2.a Les systèmes passifs	15
II.2.2.b Les systèmes actifs	19
II.2.2.c Autres procédés pour promouvoir l'absorption.....	20
II.3 Les formes galéniques transdermiques	26
<i>II.3.1 Les spécialités pharmaceutiques transdermiques commercialisées.....</i>	<i>26</i>
II.3.1.a L'ensemble des classes thérapeutiques	26
II.3.1.b Les antiémétiques recommandés pour traiter les NVCI.....	28
<i>II.3.2 Les formes transdermiques en développement incluant les PA ciblés.....</i>	<i>28</i>
<i>II.3.3 Les formes transdermiques prêtes à l'emploi développées par la société Fagron.....</i>	<i>29</i>
<i>II.3.4 Relevé bibliographique des formulations réalisées avec les véhicules Fagron</i>	<i>30</i>
III Les méthodes d'évaluation des formes transdermiques semi-solides	31

III.1 Les méthodes <i>in vivo</i>	32
III.1.1 Le « <i>tape stripping</i> »	32
III.1.2 La <i>microdialyse cutanée</i>	32
III.1.3 La <i>spectroscopie ATR-FTIR et Raman</i>	33
III.1.4 <i>Méthode d'évaluation des paramètres pharmacocinétiques</i>	33
III.2 Méthodes <i>in vitro</i>	34
III.2.1 <i>Appareillage : cellules de diffusion</i>	34
III.2.2 <i>Les membranes</i>	36
III.2.2.a Membranes synthétiques.....	36
III.2.2.b Membranes reconstruites	36
III.2.2.c Membranes naturelles	37
III.2.2.d Contrôle de l'intégrité des membranes naturelles.....	39
III.2.3 <i>Composition du milieu receveur</i>	41
III.2.4 <i>Le compartiment donneur</i>	41
III.2.5 <i>Autres paramètres</i>	43
IV Références Bibliographiques	44
Chapitre 2: Développement et validation de méthodes analytiques pour la quantification de l'ondansétron, de la dexaméthasone et de l'aprépitant	49
<hr/>	
I Introduction	49
II Méthodes analytiques pour le contrôle qualité de la préparation	51
II.1 CLHP/UV	51
II.1.1 <i>Matériel et Méthodes</i>	51
II.1.1.a Réactifs et Solvants.....	51
II.1.1.b Instrumentation et protocoles opératoires.....	52
II.1.1.c Validation de la méthode CLHP/UV.....	53
II.1.2 <i>Résultats et Discussion</i>	54
II.1.2.a Optimisation de la méthode séparative	54
II.1.2.b Validation de la méthode de dosage.....	59
II.2 L'UV/PLS	63
II.2.1 <i>Intérêt de la régression UV/PLS</i>	63
II.2.1.a Construction du modèle de régression UV/PLS et évaluation de sa qualité prédictive	65
II.2.2 <i>Matériel et Méthodes</i>	67
II.2.2.a Instrumentation.....	67
II.2.2.b Préparation des standards de calibration et de validation	68
II.2.2.c Validation de la méthode de dosage en UV/PLS	70
II.2.3 <i>Résultats et Discussion</i>	70
II.2.3.a Optimisation : Détermination de la bande spectrale et du nombre de composantes.....	70

II.2.3.b	Validation de la méthode	72
II.3	Application des méthodes CLHP/UV – UV/PLS pour le dosage d’une formulation à base d’Ond, de la Dex et de l’Apt dans le PLO®	74
III	Méthodes analytiques pour les études de passage transmembranaire	75
III.1	CLHP/UV	76
III.2	CLHP/SM-SM.....	76
III.2.1	<i>Matériel et méthodes</i>	76
III.2.1.a	Réactifs et Solvants.....	76
III.2.1.b	Instrumentation et protocole opératoire.....	76
III.2.1.c	Pré-validation de la méthode	77
III.2.2	<i>Résultats</i>	77
III.2.2.a	Optimisation de la méthode CLHP/SM-SM	77
III.2.2.b	Pré-validation de la méthode de dosage par CLHP/SM-SM.	80
IV	Conclusion.....	82
V	Références Bibliographiques	83
Chapitre 3: Evaluation in vitro des véhicules prêts à l'emploi pour l'administration de l'aprépitant, de la dexaméthasone et de l'ondansétron par voie transdermiques.....85		
I	Introduction.....	85
II	Matériels et méthodes	86
II.1	Réactifs et solvants.....	86
II.1.1	<i>Principes actifs</i>	86
II.1.2	<i>Excipients</i>	86
II.1.3	<i>Réactifs et solvants</i>	87
II.1.4	<i>Préparation de la solution de SBF</i>	87
II.2	Préparation et contrôle des formes galéniques	87
II.2.1	<i>Protocole de formulation</i>	87
II.2.2	<i>Contrôle des formes galéniques.....</i>	88
II.2.2.a	Evaluation de la teneur en PA	88
II.2.2.a	Détermination du pH.....	88
II.2.2.b	Observation morphologique	88
II.3	Etude cinétique de la libération des PA.....	88
II.3.1	<i>Détermination de la solubilité des PA</i>	88
II.3.2	<i>Cellule de diffusion de Franz</i>	89
II.3.3	<i>Préparation de la membrane synthétique</i>	90
II.3.4	<i>Protocole expérimental d’étude de la cinétique de libération</i>	90
II.3.5	<i>Dosage des prélèvements</i>	90

II.3.6	<i>Exploitation des résultats</i>	91
II.3.6.a	Détermination des quantités cumulées	91
II.3.6.b	Calcul du flux	91
II.3.6.c	Modélisation des cinétiques.....	91
II.3.6.d	Comparaison des cinétiques de libération	92
II.4	Etude cinétique de la perméation des PA	93
II.4.1	<i>Préparation des épidermes</i>	93
II.4.2	<i>Vérification de l'intégrité des épidermes</i>	94
II.4.3	<i>Protocole expérimental de la cinétique de perméation</i>	94
II.4.4	<i>Dosage</i>	95
II.4.5	<i>Exploitation des résultats</i>	95
II.4.5.a	Détermination des quantités cumulées	95
II.4.5.b	Détermination des paramètres cinétiques.....	95
II.4.5.c	Analyses statistiques	96
III	Résultats	97
III.1	Développement du protocole de formulation	97
III.2	Contrôle des formes galéniques	98
III.2.1	<i>Teneur en PA</i>	98
III.2.2	<i>Caractéristiques physico-chimiques</i>	99
III.3	Etude de la cinétique de libération des principes actifs	100
III.3.1	<i>Etude préliminaire : choix du milieu receveur</i>	100
III.3.2	<i>Profils cinétiques de libération</i>	101
III.3.3	<i>Modélisation des profils cinétiques de libération</i>	105
III.3.3.a	Démarche expérimentale	106
III.3.3.b	Illustration de cette démarche : cas de la dexaméthasone formulée dans le PLO®	107
III.3.3.c	Application de l'approche à la dexaméthasone formulée dans chaque véhicule	111
III.3.3.d	Généralisation à l'ensemble des principes actifs	111
III.3.4	<i>Comparaison des véhicules</i>	114
III.3.5	<i>Discussion</i>	115
III.3.6	<i>Conclusion</i>	117
III.4	Etude cinétique de la perméation des principes actifs	117
III.4.1	<i>Etude préliminaire : choix du milieu receveur</i>	117
III.4.2	<i>Préparation des membranes naturelles</i>	119
III.4.2.a	Evaluation de la méthode mécanique.....	119
III.4.2.b	Evaluation de la méthode thermique.....	119
III.4.3	<i>Vérification de l'intégrité des épidermes</i>	120
III.4.3.a	Appareillage pour mesurer l'intégrité des membranes	120

III.4.3.b	Choix des paramètres de mesure	121
III.4.3.c	Conclusion	126
III.4.4	<i>Profils cinétiques de perméation</i>	126
III.4.4.a	Cas de l'ondansétron	126
III.4.4.b	Cas de la dexaméthasone	128
III.4.4.c	Cas de l'aprépitant.....	130
III.4.4.d	Discussion	131
III.4.5	<i>Choix du véhicule</i>	133
III.4.5.a	Impact du mélange des deux PA sur le flux et la quantité cumulée à 23 h.	134
III.4.5.b	Impact du promoteur d'absorption sur le flux et la quantité cumulée à 23 h.	135
III.4.6	<i>Discussion</i>	139
IV	Références Bibliographiques	145
	Conclusion générale.....	147

Liste des Abréviations

2-P	2-Pyrrolidone
5-HT	5-HydroxyTryptamine
AAPS/FDA	Association of Pharmaceutical Scientists / Food and Drug Administration
ACN	ACétoNitrile
ACP	Analyse en Composante Principale
ANSM	Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé
AMM	Autorisation de Mise sur le Marché
Apt	Aprépitant
ARS	Agence Régionale de Santé
ASCO	American Society of Clinical Oncology
ATR-FTIR	Attenuated Total Reflectance - Fourier Transform Infrared Spectroscopy
ATU	Autorisation Temporaire d'Utilisation
AUC	Area Under the Curve – Aire sous la courbe
BPP	Bonnes Pratiques de Préparation
BPPH	Bonnes Pratiques de Pharmacie Hospitalière
CD	CycloDextrine
CHRU	Centre Hospitalier Régional Universitaire
CLHP	Chromatographie Liquide Haute Performance
COLIPA	European Cosmetic toiletry and Perfumery Association
CSP	Code de la Santé Publique
CTZ	Center Trigger Zone - Zone gâchette chémoréceptrice
CV	Coefficient de Variation
Dex	Dexaméthasone
DMAC	DiMéthylACétamide
DMF	DiMéthylFormamide
DModx	Distance au Modèle des observations dans l'espace X
DMSO	DiMéthylSufOxyde
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
EC	Ethyl Cellulose
ECVAM	European Centre for Validation of Alternative Methods
EG	Ethylène Glycol
EMA	European Medicine Agency
ESMO	European Society for Medical Oncology

EtOH	Ethanol
EVA	Ethylène Vinyl Acétate
EXETOC	European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals
GBF	Générateur de Basses Fréquences
HAS	Haute Autorité de Santé
HEC	HydroxyEthyl Cellulose
HP- β -CD	Hydroxypropyl- β -cyclodextrine
HPC	HydroxyPropylCellulose
HRE	Human Reconstructed Epidermis – Epiderme reconstruit humain
Hyd	Hydrocortisone
IPM	IsoPropyl Myristate
iPrOH	Isopropanol
IR	Infra-Rouge
IVRT	<i>In Vitro</i> Release Test
LCR	Liquide CéphaloRachidien
LCR databridge	Inductance (L), Capacitance (C), Resistance (R) databridge
Lop	Lopéramide
LOQ	Limite de quantification
LSE	Living Skin Equivalent
MAPE	Mean Absolute Percentage Error
Met	Métoclopramide
MRM	Multiple Reaction Monitoring
NCCN	National Comprehensive Cancer Network
NK1	Neurokinine 1
NMP	N-Méthyl-2-Pyrrolidone
NVCI	Nausées et Vomissements Chimio-Induits
OCDE	Organisation de Coopération et de Développement Economiques
OECD	Organization for Economic Cooperation and Development
Ond	Ondansétron
PA	Principe Actif
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Principal Components Regression – Régression en Composante Principale
PEG	PolyEthylène Glycol
PIE	Perte Insensible en Eau
PH	Préparation Hospitalière

PIC/S	Pharmaceutical Inspection Convention and Pharmaceutical Inspection Co-operation Scheme
PL	PhosphoLipide
PLO	Pluronic Lecithin Organogel
PLS	Partial Least Square
PM	Préparation Magistrale
PRESS	Predicted Error Sum of Square
PTFE	PolyTetraFluoroEthylène
PUI	Pharmacie à Usage Intérieur
PVP	PolyVinyl Pyrrolidone
RCP	Régression en Composante Principale - Principal Components Regression
REP	Relative Error of Prediction
SBF	Simulated Body Fluid
SC	Stratum Corneum
SFPC	Société Française de Pharmacie Clinique
SFSTP	Société Française des Sciences Techniques et Pharmaceutiques
SM	Spectrométrie de Masse
SUPAC-SS	Scale-Up and Post Approval Change Semisolids
T 20	Tween 20
T 80	Tween 80
TEWL	TransEpidermal Water Loss – Perte d’eau transépidermique
US	Ultrason
UV	UltraViolet
VIP	Variable Importance for Projection

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

Malgré le nombre important de spécialités pharmaceutiques commercialisées (11 000 en 2013), il arrive qu'un patient nécessite un traitement pour lequel aucun dosage et/ou forme pharmaceutique ne soit disponible. Dans ce cas, une pharmacie à usage intérieur (PUI) peut réaliser, sous l'autorisation de l'Agence Régionale de Santé (ARS), et conformément à la réglementation en vigueur, des préparations magistrales (PM) et hospitalières (PH). Les services à l'origine de ces demandes sont principalement la pédiatrie (50%) et la gériatrie (10,5%). La voie orale est privilégiée et appréciée notamment pour sa facilité d'utilisation et dans la mesure où elle permet l'administration de fortes doses de principe actif (PA). Toutefois, elle présente des inconvénients et ne convient pas à toutes les populations (personnes âgées, nouveau-nés) et à tous les états physiopathologiques (maladies neurodégénératives, dysphagie, nausées et vomissements).

Le but de ces travaux de recherche est de proposer à la population hospitalisée qui ne peut bénéficier de la voie orale (troubles de dysphagie) et de la voie parentérale (défaillance des abords veineux), une alternative non invasive et facile d'utilisation : la voie transdermique. En effet, cette voie permet le passage du principe actif à travers la peau pour atteindre la circulation systémique. Elle suscite beaucoup d'intérêts car, à l'inverse de la voie orale, elle évite l'absorption gastro-intestinale, elle contourne le premier passage hépatique, elle minimise les effets secondaires induits par les pics plasmatiques du principe actif et améliore la compliance du patient.

L'objectif de ce travail de thèse a été de réaliser une préparation transdermique, à usage hospitalier, contenant trois principes actifs (PA) antiémétisants, à savoir l'ondansétron (Ond), l'aprépitant (Apt) et la dexaméthasone (Dex), pour le traitement des nausées et vomissements induits par la chimiothérapie. A ce jour, l'association de ces trois PA dans une même forme galénique n'a jamais été réalisée.

Pour que la préparation de cette forme transdermique soit facilement réalisable à l'hôpital, nous avons choisi d'évaluer cinq véhicules transdermiques « prêts à l'emploi » (le PLO[®], le Pentravan[®], le Pentravan[®] Plus, le Lipovan[®] et le Phytobase[®]), commercialisés par la société Fagron. Bien que ces cinq véhicules soient commercialisés aux Etats-Unis et trois d'entre eux sur le marché français (PLO[®], Pentravan[®] et Pentravan[®] Plus), rares sont les données publiées sur leur réelle efficacité concernant l'administration de PA par voie transdermique. Par ailleurs, les données fournies dans les quelques articles parus restent insuffisantes pour assurer la faisabilité des préparations dans une PUI. Nous nous sommes donc intéressés à évaluer ces différents véhicules pour l'administration percutanée des trois PA à l'étude.

Dans un premier chapitre, après avoir rappelé la physiopathologie des nausées et vomissements chimio-induits (NVCI) et la stratégie thérapeutique mise en place afin d'en minimiser leur survenue, les fondamentaux relatifs au passage transdermique ainsi que les différentes stratégies mises en œuvre afin de promouvoir l'absorption percutanée d'un PA seront exposés. Puis, une revue de la littérature présentera, d'une part les formes transdermiques sur le marché pharmaceutique et d'autre part, celles en développement incluant les PA ciblés et/ou les véhicules transdermiques à l'étude. Enfin, nous aborderons les différentes méthodes *in vivo* et *in vitro* pour évaluer la diffusion des PA à partir de formes transdermiques semi-solides.

Dans un deuxième chapitre, le développement et la validation de méthodes analytiques pour doser simultanément l'Ond, la Dex et l'Apt seront détaillés. Dans un premier temps, deux méthodes analytiques orthogonales ont été mises au point pour le contrôle qualité des formulations préparées : une méthode utilisant la chromatographie en phase liquide couplée à une détection UV (CLHP/UV) et une méthode spectroscopique UV qui met en œuvre un algorithme issu d'un traitement mathématique par régression linéaire multiple (UV/PLS). La méthode séparative sera, par la suite, appliquée pour quantifier les PA lors des études de diffusion *in vitro*. Enfin, la méthode séparative a été adaptée pour doser l'aprépitant par couplage à un spectromètre de masse.

Dans un troisième et dernier chapitre, le véhicule transdermique le plus performant pour l'administration transdermique des PA sera sélectionné. Tout d'abord, un protocole de formulation simple et robuste sera présenté afin d'incorporer les PA dans les véhicules « prêts à l'emploi ». Puis, la capacité des véhicules à libérer et à promouvoir l'absorption de chaque PA, formulé individuellement dans chacun des cinq véhicules, sera étudiée à l'aide de cellules de diffusion de Franz, au moyen, respectivement, de membranes synthétique et biologique. Après avoir formulé les PA en mélange dans le véhicule le plus prometteur, l'influence de différents promoteurs d'absorption sur le passage transcutané des PA sera discutée.

CHAPITRE 1 : Bibliographie

CHAPITRE 1 : Bibliographie

I Nausées et vomissements chimio-induits

L'incidence des nausées et vomissements chimio-induits (NVCi) est estimée à 80%. Même si la prise en charge des vomissements s'est nettement améliorée ces dernières années (Jordan, 2007), les nausées restent encore difficiles à éradiquer. Ces effets secondaires altèrent lourdement la qualité de vie des patients et sont, de ce fait, très redoutés, d'autant plus chez les enfants plus prédisposés aux nausées et vomissements et dont les cancers différant de ceux de l'adulte nécessitent des doses de chimiothérapie plus agressives (Marquis, 2006). Pour pallier à ces phénomènes, des protocoles antiémétiques sont recommandés par les sociétés savantes d'oncologie telles que l'European Society for Medical Oncology (ESMO) (Roila, 2010), l'American Society of Clinical Oncology (ASCO) (Basch, 2011) ou encore le National Comprehensive Cancer Network (NCCN) (Ettinger, 1997) et par des experts de pédiatrie (Dupuis, 2013 ; Dupuis, 2014).

I.1 La physiopathologie

Les vomissements sont définis comme un rejet actif par la bouche du contenu gastrique et les nausées comme un état de malaise général accompagné d'une envie de vomir, d'un dégoût de l'alimentation et de crampes épigastriques.

Le réflexe de vomissement est un mécanisme complexe de protection de l'organisme déclenché par différentes zones neuronales interconnectées au niveau du rhombencéphale. Le centre du vomissement localisé dans le noyau du tractus solitaire déclenche les messages efférents après avoir été stimulé par des voies afférentes d'origine périphérique ou centrale. Nous détaillerons dans ce paragraphe, les principales afférences impliquées dans les nausées et vomissements chimio-induits à savoir la zone gâchette chémoréceptrice (CTZ), les stimuli périphériques intestinaux et le système limbique.

La CTZ située en dehors de la barrière hémato-encéphalique dans l'area postrema sous le plancher du 4^{ème} ventricule (Durand, 2009) présente des chimiorécepteurs, activés directement par la molécule anti-cancéreuse et ses métabolites présents dans le sang ou le liquide céphalorachidien (LCR), ainsi que des récepteurs 5-HT₃ à la 5-hydroxytryptamine (5-HT), NK1, à la substance P et D₂ à la dopamine. Ces stimuli conduisent à un message afférent au centre du vomissement. Au niveau périphérique, la chimiothérapie induit une libération de 5-HT par les cellules entérochromaffines de

la muqueuse intestinale. En se liant aux récepteurs spécifiques du nerf vague, la 5-HT va ainsi pouvoir stimuler directement le centre du vomissement ou indirectement par l'intermédiaire de la CTZ. Enfin, sous l'effet d'une émotion ou d'un effet mémoire, le système limbique est responsable des NVCI anticipatoires. Les neurotransmetteurs responsables des influx inter-neuronaux dans les NVCI sont principalement la dopamine, la 5-HT et la substance P. Ainsi l'objectif des traitements est de bloquer la liaison de ces neuromédiateurs à leur récepteur.

I.2 La stratégie thérapeutique

I.2.1 Facteurs déterminants dans la stratégie antiémétisante

La stratégie prophylactique antiémétisante mise en place lors d'une cure de chimiothérapie est fonction de différents paramètres tels que (Jordan, 2005) :

- le pouvoir émétisant des cytotoxiques : très faiblement émétisant (< 10% de risque d'apparition) à hautement émétisant (> 90% de risque d'apparition),
- la voie d'administration (pouvoir émétisant voie per os < voie injectable),
- la durée d'administration (pouvoir émétisant d'une perfusion continue < bolus),
- le patient (pouvoir émétisant plus important chez la femme, l'enfant, lors d'état d'anxiété, de consommation d'alcool et de tabac),
- le délai d'apparition des NVCI : 1) NVCI anticipatoires avant la chimiothérapie provoqués par le niveau d'anxiété et d'appréhension face au traitement induits par des NVCI apparus lors de cures ; 2) NVCI aigus au cours des 24 premières heures de la chimiothérapie dépendant de la nature de l'agent anticancéreux ; 3) NVCI retardés qui débutent dans les 24 heures suivant la chimiothérapie dus à une mauvaise prise en charge des NVCI en début de traitement et dépendant fortement de la nature et de la durée de la chimiothérapie.

I.2.2 Traitements des NVCI au cours de chimiothérapies hautement émétisantes

L'efficacité du traitement en première ligne est fondamentale. En effet, une mauvaise prise en charge augmente le risque de survenue des nausées et vomissements anticipatoires lors des cures de chimiothérapie suivantes et les antiémétiques sont plus efficaces quand ils sont utilisés de façon prophylactique que lorsque les vomissements sont installés.

1.2.2.a Protocoles recommandés

Chez l'adulte, on retrouve principalement trois classes thérapeutiques à savoir les antagonistes des récepteurs de type 5-HT₃, les antagonistes des récepteurs de la substance P et les corticoïdes. Leur association est recommandée par les sociétés savantes d'oncologie pour prévenir et/ou traiter les nausées et vomissements aigus et retardés induits par la chimiothérapie hautement émétisante.

Chez l'enfant, comme chez l'adulte, l'association d'un antagoniste des récepteurs 5-HT₃ (sétron) et d'un corticoïde (la dexaméthasone), a démontré sa supériorité par rapport à l'administration unique d'un antagoniste des récepteurs 5-HT₃ (Olver, 1996). De ce fait, les sétrons et les corticoïdes sont recommandés pour prévenir et traiter les NVCI en pédiatrie et la posologie est adaptée au poids ou à la surface corporelle de l'enfant (Alvarez, 1995). Comme pour de nombreuses spécialités pharmaceutiques, le manque de données d'efficacité et de sécurité chez l'enfant (Hébert, 2014) explique l'absence d'une AMM pédiatrique pour l'aprépitant. Cela s'explique, en partie, par l'étroitesse du marché pédiatrique qui n'incite pas l'industrie pharmaceutique à développer des spécialités adaptées à l'enfant. De plus, la réalisation d'essais thérapeutiques sur ce terrain est difficile en raison de problèmes méthodologiques, de limitations juridiques et de contraintes éthiques (Autret-Leca, 2006). Pourtant, pour obtenir des données fondées sur les preuves en pédiatrie, il est nécessaire de mener des essais cliniques chez les enfants (Winterfeld, 2009). Une étude rétrospective (Duggin, 2014) et un essai clinique de phase III (Kang, 2015) récents, montrent l'efficacité et l'intérêt de l'aprépitant respectivement pour traiter les nausées et vomissements induits par la radiothérapie chez les enfants et les NVCI chez des patients âgés de 6 mois à 17 ans. Deux autres essais cliniques de phase III « Efficacy of Aprepitant (Emend®) in children » et « Study to Evaluate Anti-emetic Effect of Aprepitant Versus Placebo in Children and Adolescent Receiving Chemotherapy » sont actuellement en cours chez l'enfant pour évaluer l'efficacité de l'aprépitant associé à l'ondansétron et la dexaméthasone pour traiter les NVCI.

1.2.2.b Mode d'action et effets secondaires des antagonistes des récepteurs 5-HT₃ et NK1 et des corticoïdes.

➤ **Les antagonistes des récepteurs 5-HT₃**

Cette famille appelée sétron, présente une action périphérique et centrale bloquant l'accès de la sérotonine (5-HT) aux récepteurs 5-HT₃ présents au niveau de la CTZ, du centre du vomissement mais aussi au niveau intestinal. En France, quatre molécules sont présentes dans des spécialités pharmaceutiques, à savoir le palonosétron (Aloxi®), le tropisétron (Navoban®), le granisétron (Kytril®) et l'ondansétron (Zophren®). Selon l'indication, elles préviennent et/ou traitent les nausées et vomissements retardés ou aigus dans les formes modérées ou sévères. Les principaux effets

secondaires des sétrons sont la constipation, les céphalées, les bouffées de chaleur ou encore les réactions au point d'injection.

➤ **Les corticoïdes**

Le mode d'action des glucocorticoïdes dans les NVCI est à ce jour encore mal connu. Il semblerait qu'ils soient utilisés essentiellement pour leur action anti-inflammatoire et leur pouvoir à potentialiser l'effet des autres antiémétiques et en particulier, celui des sétrons (Roila, 2010). Parmi les glucocorticoïdes, on peut citer la dexaméthasone (Dectancyl®), la méthylprednisolone (Medrol®, Solumédrol®), la prednisolone (Solupred®) ou la prednisone (Cortancyl®) comme traitement antiémétisant au cours de chimiothérapie antinéoplasique. Les effets secondaires apparaissent lors de fortes doses ou de traitements prolongés sur plusieurs mois et peuvent induire des troubles cutanés, endocriniens, hydroélectrolytiques, musculosquelettiques, neuropsychiques ou encore digestifs.

➤ **Les antagonistes des récepteurs NK1**

Le chef de file des antagonistes des récepteurs NK1 est l'aprépitant. Il s'agit d'un antagoniste sélectif à haute affinité pour les récepteurs de la substance P. Ces récepteurs ont principalement une action centrale au niveau du centre du vomissement. Indiqué dans les NVCI aigus et retardés, l'aprépitant est toujours associé au premier jour de la chimiothérapie à la dexaméthasone et l'ondansétron. En inhibant les iso-enzymes CYP3A4, il diminue le métabolisme de la dexaméthasone et potentialise l'efficacité de l'association corticoïde/sétron (Warr, 2005). Les principaux effets secondaires sont les céphalées, les hoquets, la fatigue, la perte d'appétit ou encore la constipation.

1.2.2.c Spécialités pharmaceutiques commercialisées

Alors que l'aprépitant et la dexaméthasone sont des molécules recommandées par les experts, il ne semble pas y avoir de préférence sur le sétron à administrer même si dernièrement des études de supériorité du palonosétron (Aloxi®) semblent prometteuses (Rey, 2012). Ainsi, au CHRU de Lille le sétron référencé et intégré au protocole de chimiothérapie est l'ondansétron. Dans le tableau 1.1, sont présentées les formes galéniques commercialisées de l'ondansétron, de la dexaméthasone et de l'aprépitant ainsi que leurs posologies recommandées pour traiter les NVCI hautement émétisants et leur biodisponibilité absolue.

Tableau I.1: Présentation des spécialités pharmaceutiques antiémétiques: Zophren®, Dectancyl® et Emend®.

Principe actif	Spécialité pharmaceutique	Forme	Dosage	Posologie* chez adulte	Biodisponibilité absolue*	Référencement au CHRU de Lille
Ondansétron	Zophren®	Comprimé pelliculé	4 mg 8 mg	16 à 32 mg/j à J1	≈60%	Non
		Ampoule injectable (intraveineux)	8 mg/4 mL 4 mg/2 mL		100%	Oui
		Sirop	4 mg/5 mL		≈60%	Oui
		Suppositoires	16 mg		≈ 60% de 29 à 97%	Non
		Lyophilisat oral	4 mg - 8 mg		≈60%	Oui
		Solution injectable en seringue pré-remplie	2 mg/mL		100%	Non
Dexaméthasone acétate	Dectancyl®	Comprimé	0,5 mg	12 mg de J1 à J4	NR*	Oui
Aprépitant	Emend®	Gélule	80 mg 125 mg	125 mg à J1 80 mg de J2 à J3	67% 59%	Oui

*issu de la monographie du Vidal 2015, NR : non renseigné

On peut remarquer que deux voies d'administration prédominent sur le marché français à savoir, les voies orale et injectable. La voie orale est très utilisée de par sa facilité d'administration, son faible coût de fabrication ou encore sa capacité à contenir de grande quantité de PA. Toutefois, elle présente quelques inconvénients tels que l'altération de certains PA par les sucs digestifs, un effet de premier passage hépatique diminuant la biodisponibilité absolue à 60% pour l'aprépitant et l'ondansétron ([tableau I.1](#)), une impossibilité de prise lors des troubles de la déglutition ou de conscience ainsi qu'un rejet lors de vomissements. La voie injectable intraveineuse présente une biodisponibilité de 100% et une rapidité d'action ce qui explique qu'elle soit la voie de référence en cas d'urgence. Néanmoins, son administration est douloureuse et son caractère invasif présente des risques d'infection. De plus, des erreurs d'administration telles que des surdosages peuvent avoir de graves conséquences sur l'état de santé du malade, réservant les injections aux personnels soignants qualifiés mais compliquant son administration à domicile. La voie transdermique pourrait être plus avantageuse pour traiter les nausées et vomissements chimio-induits. En effet, non douloureuse, elle permet une action en continue sans fluctuation plasmatique du PA réduisant ainsi les effets secondaires et diminuant la fréquence d'administration. Elle présente, toutefois, quelques inconvénients à envisager lors du développement d'une forme transdermique. En effet, même si cette voie non entérale évite le premier passage hépatique (Selvam, 2010), elle présente de faibles taux plasmatiques en PA, un délai d'action, nécessite d'être appliquée sur une peau saine et peut

présenter des risques d'irritation (Dass, 2013). Les caractères physico-chimiques du PA sont primordiaux pour présager d'un passage percutané par diffusion passive.

II La voie transdermique

Une forme transdermique est administrée sur la peau afin de libérer et de diffuser le ou les principes actifs dans la circulation générale après son passage transcutané. Dans ce chapitre un rappel anatomique et fonctionnel de la peau ainsi que des phénomènes d'absorption cutanée sera fait. Les approches permettant de promouvoir l'absorption seront abordées. Enfin, un dernier point sera réservé à la description des différents véhicules sélectionnés dans notre étude.

II.1 La peau

La peau est l'organe le plus étendu chez l'homme avec une surface d'environ 2 m² (Dréno, 2009). A l'interface avec le milieu extérieur, elle constitue une barrière vitale pour l'organisme vis à vis de l'environnement. Outre ses nombreuses propriétés de protection contre les agressions extérieures (chocs, rayonnements solaires et agents pathogènes), elle participe au maintien de l'homéostasie thermique et hydrique, à la transmission sensorielle ainsi qu'à la synthèse de la vitamine D (Crickx, 2005). C'est donc un organe complexe qui se subdivise en trois régions superposées de la plus superficielle vers la plus profonde : l'épiderme, le derme et l'hypoderme (figure I.1).

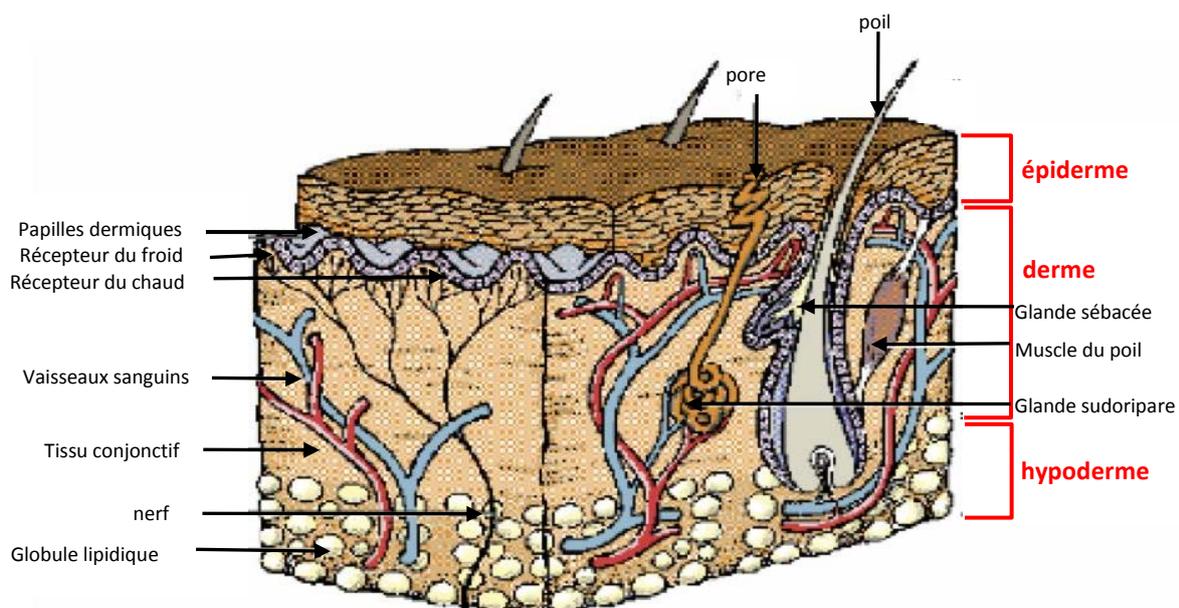


Figure I.1: Schéma d'une coupe transversale de la peau : épiderme, derme et hypoderme

(*extrait et adapté du schéma édité sur www.recherche-pierre-fabre.com*)

A ces différentes régions sont annexées les glandes cutanées (glandes sudoripares et pilosébacées) criblant la peau de multiples petits orifices appelés ostiums pilaires et pores sudoraux. La surface de la peau présente un pH acide voisin de 5 et une température superficielle de 32°C.

II.1.1 Structure de l'épiderme

L'épiderme est un épithélium avascularisé composé à 80% de kératinocytes et à 20% d'autres cellules telles que les mélanocytes, les cellules immunocompétentes ou encore les cellules de Merkel. L'épiderme est une structure en renouvellement constant. De la couche basale (la plus profonde) à la couche cornée (la plus superficielle), les kératinocytes migrent et se différencient en deux à trois semaines pour aboutir au phénomène de desquamation des cellules mortes. Dans cette région, on distingue l'épiderme mort constitué de la couche cornée appelée également stratum corneum (SC), de l'épiderme vivant (figure I.2).

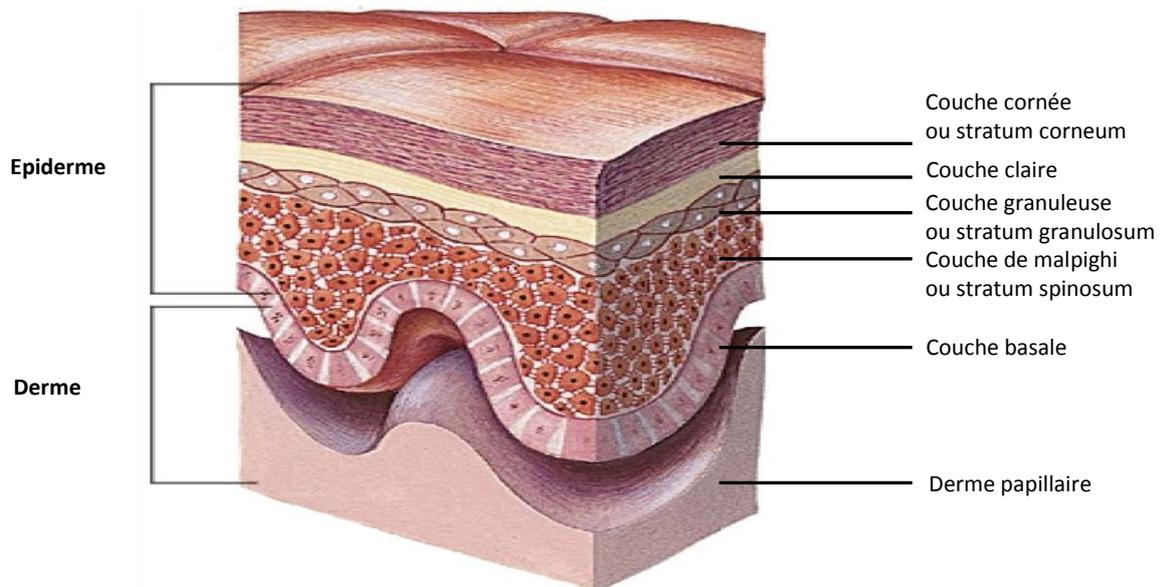


Figure I.2 : Schéma d'une coupe de l'épiderme

(extrait et adapté du schéma édité sur <http://www.larousse.fr/encyclopedie/medical/%C3%A9piderme/12850>)

II.1.1.a **Le stratum corneum**

De 10 à 20 μm d'épaisseur, le stratum corneum est un ensemble d'une vingtaine de couches de cellules mortes, plates et dénuées de noyau (cornéocytes) réunies par un ciment (matrice extracellulaire). La cohésion des cornéocytes est maintenue d'une part, par des ponts protéiques appelés conéodesmosomes, dont la dégradation est responsable du phénomène de desquamation, et d'autre part par les lipides intercellulaires qui sont issus des corps lamellaires expulsés dans le milieu extracellulaire lors du processus de kératinisation. Sous l'action d'enzymes telles que les

lipases ou glycosidases (Prausnitz, 2012), ces lipides initialement polaires tels que les stérols libres, les phospholipides et les glycosphingolipides vont devenir apolaires (cholestérol, acides gras libres, céramides) et créer des structures lamellaires. En outre, la présence de sébum provenant de la sécrétion des glandes sébacées et des granules lamellées des kératinocytes consolide l'« effet barrière » imperméable de la peau et fait du SC, le principal facteur limitant le passage d'agents exogènes. Ainsi, le SC contenant seulement 15% d'eau, peut être apparenté à un mur dont les briques représentent les cornéocytes riches en kératine et le ciment représente la structure lamellaire lipidique intercellulaire (figure I.3).

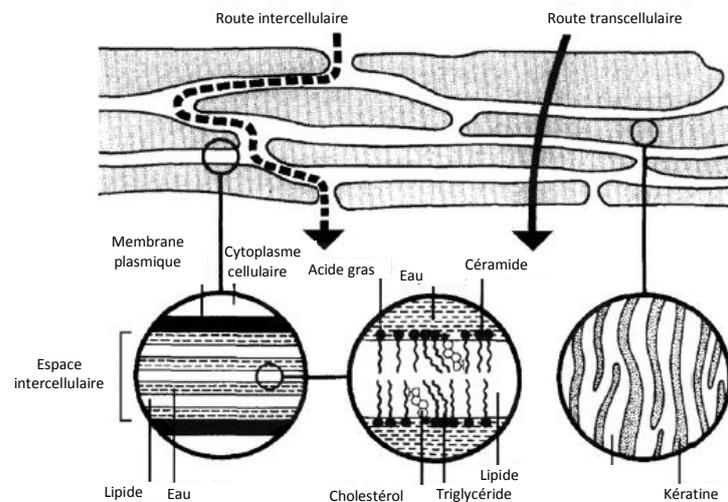


Figure I.3 : Schéma du modèle de briques et mortier du stratum corneum (Barry, 1991)

II.1.1.b L'épiderme vivant

L'épiderme vivant se compose de trois ou quatre couches selon la partie anatomique du corps. De la plus superficielle à la plus profonde, on distingue la couche claire (uniquement présente au niveau de la plante et de la face palmaire des mains), la couche granuleuse, la couche spinocellulaire et la couche basale. Il est très riche en kératinocytes, qui représentent 90% des cellules épidermiques et sont riches en kératine. Il se compose à moindre taux, de :

- Mélanocytes : grandes cellules insérées dans la couche basale germinative entourant les kératinocytes par leurs dendrites (prolongement cytoplasmique) et protégeant l'organisme des rayonnements solaires absorbés par la mélanine (stockée dans leurs mélanosomes).
- Cellules de Langerhans : cellules étoilées, en mouvance entre le derme et l'épiderme, apparentées à des macrophages intraépidermiques ; elles interviennent dans la défense

immunitaire, dans les phénomènes de maturation des cellules épithéliales ou encore dans la kératinisation.

- Cellules de Merkel : récepteur sensoriel du toucher participant à l'innervation de la peau.

II.1.2 Structure du derme

Le derme est un tissu très épais, de l'ordre 1 à 5 mm d'épaisseur séparé de l'épiderme par la jonction dermo-épidermique. Trois régions peuvent être distinguées, à savoir, le derme papillaire (échanges nutritifs avec l'épiderme), réticulaire (charpente de soutien compressible, extensible), et profond se continuant dans l'hypoderme. Il se compose :

- d'un tissu conjonctif constitué de fibres de collagène, de fibres élastiques réparties dans une matrice extracellulaire riche en protéoglycanes et glycoprotéines.
- d'un réseau nerveux et vasculaire très important, ce dernier permettant les apports nutritionnels et en oxygène nécessaires à l'épiderme et l'élimination de produits toxiques.
- de cellules en nombre restreint et clairsemées. Parmi elles, les fibroblastes à l'origine du tissu conjonctif, les mastocytes, cellules dendritiques et les leucocytes (cellules immunitaires).
- d'annexes cutanées (glandes sudorales ou sudoripares).

II.1.3 Structure de l'hypoderme

C'est un tissu conjonctif lâche, composé d'adipocytes regroupés en globules graisseux, de vaisseaux, de nerfs, de muscles, de glandes sudoripares et de racines des follicules pileux. Il joue un rôle d'isolant thermique, de protection mécanique et de réservoir énergétique.

II.1.4 Annexes cutanées

On entend par annexes cutanées les phanères (poil et ongle) et les glandes sébacées et sudorales prenant naissance dans l'hypoderme ou le derme et dont le contenu est déversé au niveau épidermique.

➤ Poil

On distingue les poils fins (duvet), des poils longs et foncés (poils adultes). En fonction des sites anatomiques, la vitesse de pousse s'effectue selon des cycles plus ou moins rapides. Le poil est produit par le follicule pileux présent dans le derme ou l'hypoderme émergent jusqu'à l'épiderme. Il a un rôle principalement sensoriel.

➤ **Glandes annexielles**

On distingue des glandes sudoripares et sébacées qui se différencient par leur localisation, leur abouchement et les substances qu'elles secrètent répondant ainsi à différentes fonctions (tableau I.2).

Tableau I.2 : Les différentes glandes annexielles

	Glandes sudoripares		Glandes sébacées
Type	Glandes eccrines	Glandes apocrines	Glandes exocrines halocrines
Localisation	Totalité du corps humain excepté les mamelons et certaines régions des organes génitaux	Aisselles et périnée	Totalité du corps humain exceptées les paumes des mains et les plantes des pieds
Abouchement	Débouchent au niveau des pores à la surface de la peau	Débouchent dans le follicule pileux	Associées à un follicule pileux
Substance sécrétée	Sueur : filtrat hypotonique au sang, qui au contact du sébum à la surface de la peau, forme une émulsion	Sueur (identique aux glandes eccrines) + lipides + protéines	Sébum : substance lipophile sécrétée sous contrôle hormonal
Propriétés	Thermorégulation	Thermorégulation	- lubrifient les poils et la peau - assurent un effet bactéricide - limitent l'évaporation de l'eau

II.2 Mécanisme d'absorption percutanée

Pour qu'un PA puisse pénétrer la peau, il doit d'abord franchir la barrière épidermique avant d'atteindre la circulation sanguine dans le derme. La fonction barrière n'est pas absolue, et c'est cette perméabilité relative qui est mise à profit pour le passage des médicaments à travers la peau (Naik, 2000).

II.2.1 Le mode d'absorption percutanée

Lorsqu'une préparation pharmaceutique est en contact avec la peau, elle peut se mélanger au film hydrolipidique du SC et y libérer ses principes actifs qui selon leurs propriétés physico-chimiques et leur affinité avec le véhicule emprunteront différents chemins pour atteindre la circulation générale.

Pour pénétrer au sein du SC, le PA emprunte majoritairement la voie transépidermique. L'absorption à travers la peau se fait alors en trois étapes :

1) Pénétration dans le stratum corneum (SC)

La pénétration du PA dans le SC est principalement régie par une diffusion passive. On distingue deux phénomènes : le passage intercellulaire au cours duquel le PA arpente un chemin tortueux au sein de la matrice lipidique du SC et le passage intracellulaire du PA dans les cornéocytes et à travers la matrice lipidique (Morrow, 2007).

2) Perméation

La perméation représente la migration du PA du SC vers les couches plus profondes de la peau. Le SC se remplit du PA par concentration décroissante vers la profondeur créant un gradient de concentration et un flux constant. Ce flux qui est proportionnel à la différence de concentration du PA de part et d'autre du SC est caractérisé par le coefficient de perméabilité (K_p).

3) Résorption

Une fois le tissu vivant atteint, le PA peut atteindre la circulation sanguine dans le derme superficiel, puis la circulation générale où il sera distribué pour atteindre sa cible thérapeutique.

Notons que certains PA peuvent emprunter la voie transannexielle afin de rejoindre la circulation systémique. Elle permet au PA de pénétrer par les orifices des glandes sudorales et les glandes pilosébacées. Bien que cette voie d'absorption ait longtemps été négligée, de récentes études ont montré un intérêt notamment pour l'absorption de PA hydrophiles, ionisés ou véhiculés par les liposomes (Knorr, 2009 ; Otberg, 2008, Trauer 2010 ; Trauer 2014).

L'absorption percutanée est influencée par, l'état de la peau, les caractéristiques physicochimiques du principe actif et la composition de la formulation appliquée. Les facteurs favorables à un passage percutané sont présentés dans le tableau I.3.

Tableau I.3 : Facteurs favorables à la pénétration percutanée (↑ : augmentation ; ↓ : diminution)

Propriétés de la peau	Propriétés physico-chimiques du PA	Formulation
↓ Epaisseur	↓ Poids moléculaire (< 800 Da, optimal < 500 Da)	↓ affinité pour le PA
↓ Vitesse de renouvellement	Etat neutre, non ionisé	Ajout d'artifices pour promouvoir l'absorption (Cf paragraphe suivant)
↑ Degré d'hydratation	Caractère amphiphile	
↓ ou ↑ Age	↑ K Coefficient de partage (affinité SC > véhicule)	
↑ Température	$1 < \log P < 4$	
↑ Flux sanguin	↓ point de fusion	
↓ ou ↑ Site anatomique (ex : cou)	↑ [PA] dans le véhicule	
↓ ou ↑ Métabolisme		
↓ Intégrité		

Ainsi, une molécule neutre, amphiphile, de poids moléculaire < 500 Da (Naik, 2000) et en grande concentration dans le véhicule pour laquelle elle a peu d'affinité aura plus de chance de pénétrer la peau. Toutefois, il est difficile pour un principe actif de répondre à l'ensemble de ces critères, c'est pourquoi différentes stratégies doivent être mises en œuvre afin de faciliter son passage percutané.

II.2.2 Les approches permettant de promouvoir l'absorption

Pour promouvoir l'absorption de substances actives, on distingue différentes approches telles que la potentialisation de la diffusion passive, la mise en place d'une diffusion forcée par l'apport exogène d'énergie ou encore la vectorisation du PA par des systèmes colloïdaux (figure I.4) (Barry, 2001 ; Thong, 2007 ; Mathur, 2010 ; Hussain, 2014).

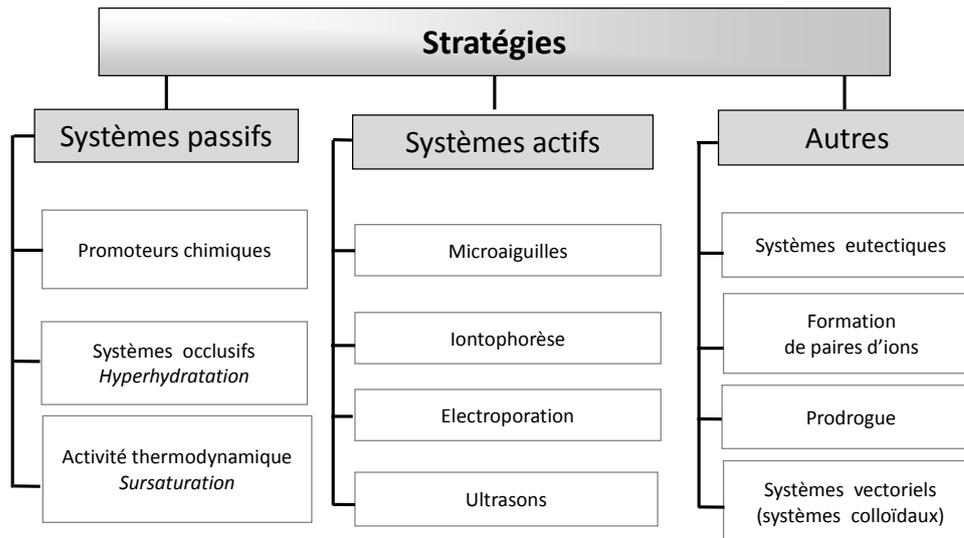


Figure I.4 : Classification des stratégies permettant de promouvoir l'absorption

II.2.2.a Les systèmes passifs

Il s'agit de systèmes qui facilitent la diffusion passive du PA à travers la peau sans qu'aucune énergie ne soit apportée (Moser, 2001 ; Hadgraft, 1999).

On sait que la diffusion passive d'un PA au travers du SC peut être décrite par le flux (J) qui est régi par la 1^{ère} loi de Fick (Moser, 2001 ; Zillich, 2013) et qui exprime la quantité de PA pénétrant la peau par unité de temps ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) :

$$J = K_p \cdot C_v \quad (\text{équation I.1})$$

avec : K_p : coefficient de perméabilité ($\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$), traduisant la vitesse de diffusion

C_v : concentration du PA dans la formulation déposée ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)

Sachant que le coefficient de perméabilité s'exprime selon :

$$K_p = \frac{D_m \cdot K}{L} \quad (\text{équation I.2})$$

avec : D_m : coefficient de diffusion ($\text{cm}^2\cdot\text{s}^{-1}$), traduisant la mobilité du PA diffusant

K : coefficient de partage du PA entre le SC et le véhicule

L : épaisseur de la membrane du SC (cm)

Alors le flux peut être exprimé par la relation :

$$J = \frac{D_m \cdot K \cdot C_v}{L} \quad (\text{équation I.3})$$

K étant lui-même exprimé selon le rapport :

$$K = \frac{C_{s,m}}{C_{s,v}} \quad (\text{équation I.4})$$

Avec : $C_{s,m}$: concentration du PA solubilisé dans le SC ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)

$C_{s,v}$: concentration du PA solubilisé dans le véhicule ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)

Ainsi, en désorganisant la matrice lipidique intercellulaire du SC, le coefficient de diffusion D_m sera augmenté, et le flux sera plus important. Il est en de même si l'on augmente le pouvoir solubilisant de la peau (coefficient de partage K supérieur). L'augmentation de la concentration de PA introduite dans le véhicule permettra également d'améliorer l'absorption. Enfin, par action kératolytique, il sera possible de diminuer l'épaisseur L du SC et donc de favoriser la diffusion.

Parmi les systèmes passifs, on peut citer l'ajout de promoteurs chimiques, l'application d'un système occlusif ou encore l'utilisation de solutions sursaturées (Marwah, 2014 ; Prausnitz, 2012 ; Förster, 2009).

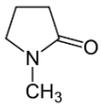
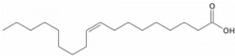
➤ Les promoteurs chimiques

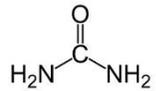
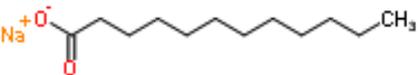
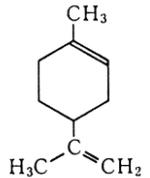
L'ajout dans la formulation de promoteurs chimiques tels que les solvants, les kératolytiques, les surfactants favorise l'absorption cutanée (Karande, 2009). Selon leur nature, ils désorganisent la matrice lipidique intercellulaire, dénaturent la kératine intracellulaire, modifient les propriétés de solubilité de la membrane ou encore diminuent l'épaisseur de la membrane. Ces artifices doivent idéalement (Saini, 2014) :

- être non toxiques, non irritants, non allergènes
- être d'action rapide, avec une activité et durée d'action reproductible et prévisible
- être sans activité pharmacologique
- permettre l'entrée du PA sans perdre du matériel endogène de l'organisme
- modifier de façon réversible la barrière cutanée
- être compatible avec les autres excipients et PA
- avoir des propriétés organoleptiques agréables, plaisantes.

Malheureusement, aucun promoteur chimique ne répond à tous ces critères. Ils diffèrent par leurs avantages et inconvénients ainsi que par leur mode d'action détaillés dans le tableau I.4.

Tableau I.4 : Les promoteurs chimiques – modes d'action, avantages et inconvénients (Chen 2014 ; Williams 2012)

Promoteurs chimiques	Modes d'action	Avantages	Inconvénients
DMSO (Diméthylsulfoxyde) DMAC (Diméthylacétamide) DMF (Diméthylformamide)	- dénaturent les protéines - interagissent avec les lipides intercellulaires - désorganisent les bicouches lipidiques	- augmentent l'absorption de molécules lipophiles et hydrophiles - co-solvant	- nécessitent des concentrations élevées (> 60%) - érythèmes - métabolites nauséabondes - dommages irréversibles
Azone 	- interagit avec les lipides du SC	- peu irritant - peu toxique - soluble avec l'alcool - augmente l'absorption de molécules lipophile et hydrophile` - efficace à faible concentration (0,1-5%)	- variation de l'efficacité en fonction du véhicule
Pyrrolidones Ex : -NMP (N-méthyl-pyrrolidone)  - 2P (2-pyrrolidone)	- augmentent le coefficient de partage des PA hydrophiles	- effet réservoir - permettent une libération continue	- pas adaptées aux PA lipophiles - erythèmes
Acides gras Ex : acide oléique 	- désorganisent les lipides intercellulaires - séparent les bicouches lipidiques à haute concentration	- efficaces à basse concentration < 10% - agissent pour des PA hydrophiles et lipophiles - action différente selon la nature des chaines acylées	- pour les composés insaturés, la configuration trans est moins efficace que la configuration cis

Promoteurs chimiques	Modes d'action	Avantages	Inconvénients
Alcools Ex : éthanol	<ul style="list-style-type: none"> - changent la nature de solvant du SC (augmente K) - modifient l'activité thermodynamique - extraction de fractions lipidiques du SC à haute concentration et pendant une application prolongée 	<ul style="list-style-type: none"> - co-solvant avec l'eau - bonne pénétration dans le SC - synergie d'action avec les autres promoteurs 	<ul style="list-style-type: none"> - solvants volatils - de fortes concentrations peuvent déshydrater la membrane biologique
Urée 	<ul style="list-style-type: none"> - hydrate le SC - agit comme un agent kératolytique - crée des canaux hydrophiles 	<ul style="list-style-type: none"> - synergie d'action avec le propylène glycol 	<ul style="list-style-type: none"> - faible pouvoir de promoteur d'absorption
Surfactants Ex : Sodium laurate (surfactant anionique) 	<p>selon la charge, la longueur de la chaîne hydrocarbonnée, ils :</p> <ul style="list-style-type: none"> - émulsifient le sébum - solubilisent les lipides du SC 	<ul style="list-style-type: none"> - solubilisent les PA lipophiles 	<ul style="list-style-type: none"> - peuvent être très irritants
Huiles essentielles, terpènes Ex : limonène 	<ul style="list-style-type: none"> - changent la nature de solvant du SC (augmente K) - rapidement absorbés, ils modifient l'activité thermodynamique - augmentent le coefficient de diffusion - réduisent le lag time 	<ul style="list-style-type: none"> - selon le terpène, ils peuvent solubiliser les PA lipophiles ou hydrophiles 	<ul style="list-style-type: none"> - action pharmacologique de certains terpènes - allergènes

➤ **Les systèmes occlusifs**

Ils permettent d'augmenter l'état d'hydratation du SC par diminution des échanges hydriques cutanés avec l'extérieur et d'augmenter la température cutanée favorisant ainsi l'absorption des PA. Le gonflement du SC désorganise les domaines lipidiques intercellulaires et crée des canaux continus poreux issus de la fusion des lacunes, augmentant respectivement la pénétration de principes actifs lipophiles et hydrophiles. L'occlusion n'est toutefois pas adaptée à toutes les galéniques, car efficace pour les dispositifs transdermiques et pommades, elle freine l'absorption percutanée de PA présents dans des systèmes vésiculaires tels les transférosomes qui nécessitent un gradient d'hydratation pour pénétrer (Trauer, 2014).

➤ **Les solutions sursaturées**

L'augmentation de l'activité thermodynamique grâce à des solutions sursaturées qui contiennent plus de solutés qu'elles ne peuvent en dissoudre normalement (Moser, 2001), favorise les forces de passage percutané. L'état métastable de ces solutions peut toutefois conduire à la précipitation du soluté et à la formation de cristaux à la moindre perturbation. De ce fait, ces solutions sont souvent préparées extemporanément, par évaporation du solvant présent dans le véhicule. Au cours de leur préparation, elles peuvent être additionnées de polymères pour augmenter leur stabilité.

II.2.2.b Les systèmes actifs

Les systèmes actifs font appel à un mode de diffusion reposant sur des méthodes de pénétration plus ou moins invasives qui nécessitent un apport d'énergie extérieur par une action mécanique, électrique ou par ultrasons (Schuetz, 2005). On distingue les systèmes suivants :

➤ **Les micro-aiguilles**

Ces dispositifs ont l'aspect d'un patch recouvert de microaiguilles aux nombres 150 à 650 /cm² et de longueurs allant de 200 à 750 µm, pénétrant avec une force d'insertion de l'ordre de 0,06 N (Marwah, 2014). Le matériau qui les constitue peut-être en métal, en silicone ou en polymère dégradable (Kim, 2015). Ces aiguilles de l'ordre du micromètre n'atteignent pas les terminaisons nerveuses et pénètrent donc l'épiderme sans douleur. Les dispositifs à base de microaiguilles commercialisés à ce jour présentent l'aspect d'un patch traditionnel, le PA à délivrer étant contenu dans le corps du patch ou déposé à la surface des aiguilles (système macroflux® ou microneedle®).

Ils sont utilisés pour la libération continue de PA ainsi qu'en remplacement des injections intradermiques de vaccin.

➤ **L'iontophorèse**

Il s'agit d'une technique qui consiste à transporter des ions à travers la peau sous l'effet d'une différence de potentiel grâce à l'application d'un courant de l'ordre de 0,5 mA/cm². Elle est adaptée aux substances ionisées dont l'absorption par voie passive est généralement faible, mais elle permet également de faire pénétrer des substances neutres sous l'influence d'un flux électrique par électro-osmose. La durée d'application est en général de 10 min. Les principaux effets indésirables, liés à l'intensité du courant délivré, sont des sensations de fourmillements, et de chaleur, des prurits, des érythèmes et rarement des brûlures. Cette technique coûteuse (électrode à usage unique), peut être appliquée aux molécules de poids moléculaire inférieur à 7000 Da. Elle est notamment utilisée pour la prise en charge de la douleur (administration d'anesthésiques : Phoresor[®] ou de morphiniques : Ionsys[®]) (Sharma, 2015).

➤ **L'électroporation**

Elle consiste en l'application de brèves décharges électriques (ordre de la milliseconde) sous l'action d'un haut potentiel électrique (> 100 V) créant des pores réversibles dans les cornéocytes et les bicouches lipidiques.

➤ **La phonophorèse ou sonophorèse**

Cette technique repose sur l'utilisation d'ultrasons de fréquence supérieure à 20 kHz qui déstructurent le stratum corneum notamment par un phénomène de cavitation, ce qui favorise le passage transcellulaire en particulier des molécules de hauts poids moléculaires (protéine, vaccin). Le principal problème de cette technique est la transmission de chaleur énergétique sur le tissu cutané par atténuation des ondes causant irritation et brûlure (Marwah, 2014).

II.2.2.c Autres procédés pour promouvoir l'absorption

D'autres moyens pour optimiser l'absorption percutanée font appel à des stratégies modifiant les propriétés physico-chimiques du PA (utilisation de systèmes eutectiques ou faisant appel à la formation de paires d'ions ou de prodrogues) ou véhiculant celui-ci dans des systèmes colloïdaux.

➤ **Les systèmes eutectiques**

La solubilité du PA dans les bicouches lipidiques de la peau affecte son passage transdermique. Or plus le point de fusion d'un PA sera bas, meilleures seront sa solubilité et sa pénétration dans le stratum corneum (Marwah, 2014 ; Karande, 2009). Ainsi, le mélange du PA à une seconde molécule pour obtenir un système eutectique caractérisé par point de fusion plus bas, permettra d'augmenter la perméation du PA. Pour rappel un système eutectique est composé d'un mélange de deux corps purs, dont les proportions sont particulières, ne formant au final qu'un seul corps caractérisé par un point de fusion. On peut citer pour exemple, le patch Emla® composé de lidocaïne et prilocaïne qui repose sur cette stratégie pour promouvoir l'absorption cutanée des anesthésiques.

➤ **Les paires d'ions**

Les PA ionisés possèdent une faible capacité à franchir la couche lipidique hydrophobe du SC. La formation de paires d'ions améliore donc la pénétration des PA ionisés par neutralisation de leur charge. Après franchissement de la couche hydrophobe du SC, la paire d'ions se dissocie permettant la diffusion du PA dans l'épiderme (Förster, 2009).

➤ **Les prodrogues**

Une prodrogue désigne toute molécule qui doit subir une biotransformation, après son administration dans l'organisme, pour que s'exerce une activité pharmacologique. Elle est obtenue par condensation de la structure active, en général par liaison covalente, à un groupement temporaire, qui doit être clivable *in vivo* pour libérer le PA. Cette approche permet de contourner les limitations du passage transdermique liées aux faibles coefficients de partition et aux faibles solubilités du PA d'intérêt.

➤ **Les systèmes colloïdaux**

Les systèmes colloïdaux sont des dispersions homogènes d'une ou plusieurs substances dans une autre substance formant deux phases séparées. Selon la nature des phases, ils peuvent former des systèmes particuliers de 10 nm à 1 mm permettant de disperser, protéger, stabiliser et contrôler la libération du principe actif, jouant ainsi le rôle de systèmes de vectorisation. Le PA est libéré par diffusion et/ou dégradation du vecteur dans lequel il a été introduit. Nous citerons les microémulsions, les nanoparticules et détaillerons plus précisément les vésicules de structure liposomale et phytosomale.

- **Les microémulsions** résultent d'une dispersion de deux liquides non miscibles stabilisée par une grande quantité de tensioactif. Elles présentent l'aspect d'un liquide contenant des gouttelettes aqueuses ou huileuses de l'ordre de 10 à 100 nm non visibles à l'œil nu. Ce sont des systèmes colloïdaux thermodynamiquement stables, transparents et optiquement isotropiques (Kogan, 2006). Elles présentent une faible viscosité et une forte capacité à solubiliser des PA lipophiles ou hydrophiles selon la nature aqueuse ou huileuse de la phase externe.
- **Les nanoparticules** permettent d'obtenir des systèmes colloïdaux de taille comprise entre 1 et 100 nm. Elles sont à base de polymères généralement biodégradables, ou de lipides capables de retenir par séquestration et/ou absorption le PA. On distingue notamment deux formes sphéroïdes à savoir les nanosphères et les nanocapsules. Dans les nanosphères, le PA est soit dispersé soit dissout au sein de celles-ci. Dans les nanocapsules, qui présentent un réservoir comme une coquille à cœur lipophile ou aqueux entouré d'une fine membrane de polymère (nm), le PA sera encapsulé. Les nanoparticules polymériques sont une alternative aux liposomes présentant une meilleure stabilité *in vivo* et durant le stockage. Elles peuvent pénétrer dans les follicules si un massage est réalisé (Neubert, 2011).
- **Les liposomes** ont été découverts par Bangham (Bangham, 1965) et s'apparentent à la structure lamellaire de la matrice lipidique du stratum corneum par biomimétisme (Moser, 2001). Il s'agit de vésicules thermodynamiquement stables composées d'au moins une bicouche lipidique qui délimite deux compartiments aqueux, respectivement les phases externe et interne. Les vésicules se trouvent en suspension dans la phase aqueuse externe et peuvent transporter aussi bien des PA hydrophiles au sein de leur cavité, que des PA amphiphiles, lipophiles et hydrophiles chargés qui s'intercalent dans la bicouche par des interactions hydrophobes et/ou électrostatiques (Honeywell-Nguyen, 2005) ([figure I.5](#)).

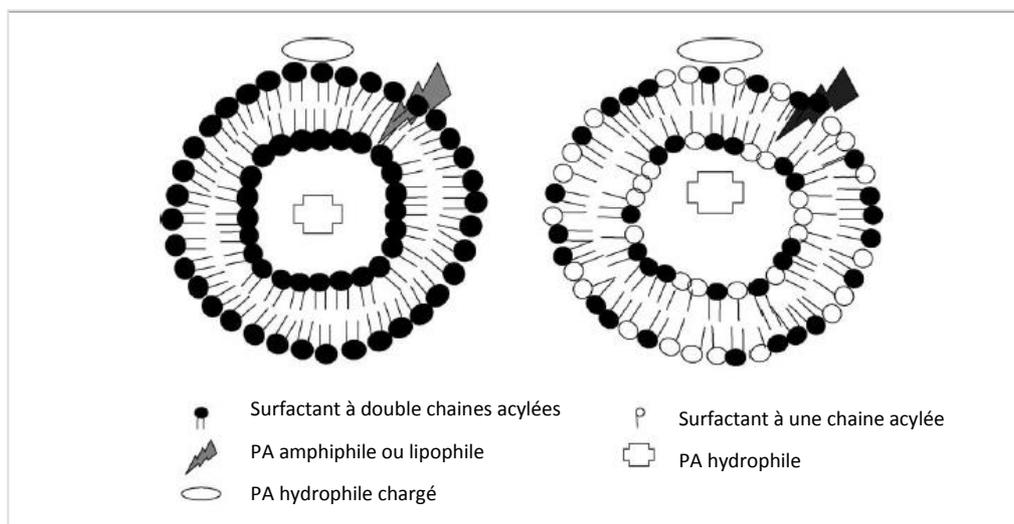


Figure I.5 : Zone d'inclusion des principes actifs dans les liposomes en fonction de leurs propriétés physico-chimiques (Honeywell-Nguyen, 2005)

Ils peuvent être utilisés comme des systèmes de vectorisation de molécules à haut poids moléculaire mais aussi comme promoteur afin de perturber l'organisation architecturale des lipides du SC et favoriser ainsi la perméation des molécules de bas poids moléculaire.

Il existe différents types de liposomes selon leur taille, le nombre de bicouches, leur composition, leur procédé de fabrication, leur charge, ou encore leur élasticité. On peut classer les liposomes en fonction de leurs tailles (petits, larges ou géants), du nombre de bicouches et selon qu'ils soient unis ou multilamellaires (figure I.6).

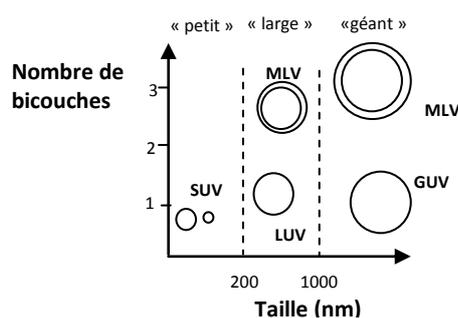


Figure I.6 : Classification des liposomes en fonction de leur taille et du nombre de bicouches (Lorin, 2004)

S : small ; L : large ; G : giant ; U : unilamellaire ; M : multilamellaire ; V : vesicule

Les liposomes conventionnels se composent de phospholipides (PL) issus de sphingolipides ou de glycérophospholipides naturels ou synthétiques et de chaînes acylées saturées ou insaturées. Différentes molécules pourront être ajoutées à ces PL telles que :

- le cholestérol qui permet de stabiliser et rigidifier le liposome (Elsayed, 2007). En augmentant la microviscosité, il réduit la perméation des membranes aux petits solutés hydrophiles,
- des antioxydants tels que l' α -tocophérol ou le butylhydroxytoluène pour éviter l'oxydation des chaînes acylées insaturées,
- des PL chargés négativement afin d'éviter le phénomène d'agrégation entre les liposomes,
- des lipides sensibles au pH (diolelphosphatidyléthanolamine),
- des gangliosides ou du polyéthylène glycol (PEG) permettant de diminuer leur dégradation par les macrophages et augmentant ainsi le temps de circulation dans le sang (Lorin 2004).

La capacité d'encapsulation des liposomes diminue fortement lorsque la taille de liposome diminue (Torchilin, 2005). Elle est fonction du procédé de fabrication. On distingue l'encapsulation passive qui consiste à incorporer le PA pendant le processus de formation du liposome, de l'encapsulation active qui consiste à incorporer le PA dans des liposomes préformés.

Il existe d'autres systèmes vésiculaires (Elnaggar, 2014) apparentés aux liposomes tels que :

- les niosomes : analogues liposomaux où les PL sont remplacés par un auto-assemblage de surfactants non-ioniques (lipo-polyglycérol) constitués d'une seule chaîne carbonée (C12-C18),
- les éthosomes : systèmes vésiculaires phospholipidiques contenant de l'éthanol à haute concentration,
- les transférosomes : systèmes ultra-déformables et élastiques grâce à l'ajout d'un « edge activator » tel que le sodium cholate qui déstabilise les bicouches lipidiques de la vésicule et augmente sa capacité à se déformer en diminuant sa tension interfaciale. Ces systèmes sont capables de diffuser à travers le SC sans être dégradés contrairement aux vésicules rigides et gélifiées (Honeywell-Nguyen 2005). Elles peuvent également passer par les pores.
- Les phytosomes : systèmes vésiculaires dans lesquels des phytoconstituants d'extraits végétaux se lient aux phosphatidylcholines de la membrane (Pawar, 2015 ; Karimi, 2015).

Alors qu'une substance hydrophile se trouve dans la cavité liposomale (El Maghraby, 2008 ; Gillet 2011) sous forme libre dans les liposomes, ce qui nécessite des centaines voire des milliers de

PL, celle-ci fait partie intégrante des membranes du phytosome (Awasthi, 2011 ; Semalty, 2010) par des liaisons chimiques avec les têtes polaires des PL, nécessitant l'interaction entre un phyto-constituant polyphénolique et un ou quelques PL (figure I.7).

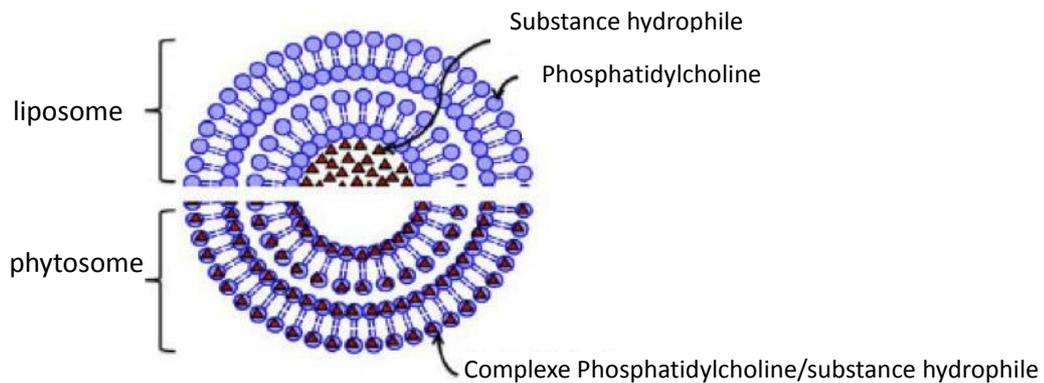


Figure I.7 : Intégration des molécules hydrophiles dans les liposomes et les phytosomes.

Il semblerait que les phytosomes soient mieux absorbés que les liposomes (Pawar, 2015). Chacune des petites particules de lipide qui interagissent avec le SC entraîne par la même occasion la libération d'une substance active, alors que l'assimilation d'une substance active provenant d'un liposome nécessite l'absorption d'un grand nombre de particules de lipide.

Plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer les mécanismes d'action des liposomes comme systèmes de délivrance des PA (El Maghraby, 2008). Elles sont schématisées sur la figure I.8.

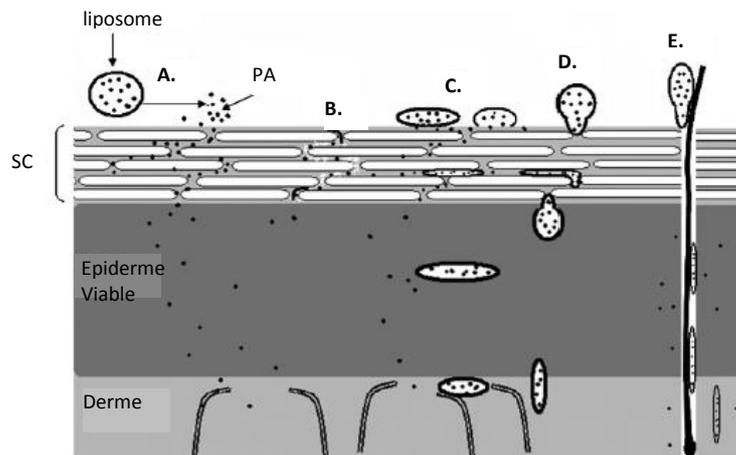


Figure I.8 : Mécanismes d'action des liposomes comme systèmes de délivrance des principes actifs (El Maghraby, 2008).

On peut ainsi considérer qu'il y a :

- A. pénétration du PA seul après libération par la vésicule liposomale,
- B. désorganisation des lipides matriciels du SC grâce aux PL qui jouent un rôle de promoteur chimique,
- C. fusion de la vésicule avec les lipides du SC permettant ainsi la libération du PA contenu dans la vésicule,
- D. passage de la vésicule intacte à travers le SC, puis l'épiderme viable pour atteindre le derme,
- E. passage de la vésicule par la voie transannexielle.

II.3 Les formes galéniques transdermiques

II.3.1 Les spécialités pharmaceutiques transdermiques commercialisées

Le marché pharmaceutique dispose de nombreuses formes galéniques destinées à une application cutanée principalement d'action topique. On ne dénombre qu'une vingtaine (Paudel, 2010) de PA véhiculés par les formes transdermiques nécessitant des systèmes galéniques plus sophistiqués. Nous aborderons dans cette sous-partie, les formes transdermiques commercialisées qui reposent exclusivement sur un phénomène de diffusion passive.

II.3.1.a L'ensemble des classes thérapeutiques

Depuis les années 80, la voie transdermique a montré un réel intérêt et a déjà prouvé son efficacité avec la commercialisation de patchs transdermiques pour le traitement de fond de l'angor (trinitrine - Discotrine[®]), pour la substitution hormonale (estradiol hémihydrate – Climara[®]), pour la

prise en charge de la douleur (fentanyl - Durogésic®) ou encore pour le sevrage tabagique (nicotine - Nicopatch®). Le tableau I.5 présente la liste des patchs transdermiques sur le marché, depuis ces 30 dernières années (Wiedersberg, 2014). On peut noter que les doses journalières sont comprises entre 0,1 (clonidine) à 80 mg (méthylphénidate), que les masses moléculaires varient de 162 (nicotine) à 468 g.mol⁻¹ pour la buprénorphine et que ces PA sont souvent des bases faibles. Il existe, d'autres formes galéniques telles que les gels. Par exemple, l'Androgel® qui est composé de testostérone est commercialisé pour le traitement de substitution hormonale lors d'hypogonadisme masculin. Toutefois, ces formes semi-solides restent en nombre négligeable comparées aux patchs.

Tableau I.5 : Evolution du marché mondial des patchs transdermiques durant ces 30 dernières années

PA (année d'autorisation)	Indication thérapeutique	Dose journalière (mg)	MM (Da)	Log P	pKa
scopolamine (1979)	mal des transports – rôles agoniques en soins palliatifs	0,3	303	0,98	7,75
trinitrate de glycéryle (1981)	angor	2,4 - 15	227	1,62	5,6
clonidine (1984)	hypertension artérielle essentielle	0,1 - 0,3	230	2,42	8,05
estradiol (1986)	traitement hormonal substitutif chez la femme ménopausée	0,025 - 0,100	272	4,01	10,33
fentanyl (1990)	douleurs chroniques	0,288 - 2,400	337	4,05	8,77
nicotine (1991)	sevrage tabagique	7 - 21	162	1,17	8,86
testostérone (1993)	traitement substitutif d'un hypogonadisme masculin	0,3 - 5	288	3,32	10,09
estradiol & acétate de norethisterine (1998)	traitement hormonal substitutif chez la femme ménopausée	0,025 - 0,050 & 0,125 - 0,250	272 & 340	4,01 & 3,99	n.d
norelgestromin & ethinyl estradiol (2001)	contraception hormonale féminine	0,2 & 0,034	327 & 296	3,90 & 3,67	n.d
estradiol & levonorgestrel (2003)	contraception hormonale féminine	0,050 & 0,007 - 0,015	272 & 312	4,01 & 3,72	n.d
oxybutinine (2003)	incontinence urinaire	3,9	357	4,02	8,77-11,53
sélégiline (2006)	maladie de Parkinson	6 - 12	187	2,90	6,67
méthylphénidate (2006)	trouble de l'attention - hyperactivité	26 - 80	233	2,15	8,77
rotigotine (2007)	syndrome des jambes sans repos – maladie de Parkinson	1 - 3	315	4,58	10,03
rivastigmine (2007)	Alzheimer – maladie de Parkinson	4,6 – 9,5	250	2,34	n.d
granisétron (2008)	NVCI	3,1	312	2,55	n.d
buprénorphine (2010)	douleurs chroniques	0,12 - 1,68	468	4,98	n.d

(extrait et modifié de S.Wiedersberg. R.H. Guy 2014 ; n.d = non déterminé)

II.3.1.b Les antiémétiques recommandés pour traiter les NVCI

A ce jour, il n'existe qu'une seule spécialité pharmaceutique (Sancuso®) ayant reçu une autorisation de mise sur la marché par l'European Medicine Agency (EMA) en 2012, pour prendre en charge les NVCI par voie transdermique. Toutefois, ce patch transdermique composé de granisétron indiqué dans les NVCI chez des patients présentant des troubles de déglutition n'est toujours pas commercialisé en France.

II.3.2 Les formes transdermiques en développement incluant les PA ciblés

Les propriétés physico-chimiques des sétrons sont favorables à leur passage percutané. Ils présentent en effet des masses molaires et des log P respectivement compris entre 284 - 324 g.mol⁻¹ et 2,1 - 3,55, compatibles avec une diffusion cutanée passive. Le succès du patch de granisétron et les propriétés physico-chimiques de l'ondansétron ont encouragé les chercheurs à développer de nouvelles formulations transdermiques contenant ce sétron, le plus couramment administré. Afin d'évaluer sa libération lors d'études menées *in vitro*, l'ondansétron a été formulé dans des microémulsions (Malakar, 2012 ; Al Abood, 2013), des patchs (Rajabalaya, 2012; Swain, 2009), un hydrogel (Obata, 2010) ou encore dans une préparation semi-solide (Gwak, 2004). Des formes transdermiques ont également fait l'objet d'études *in vivo* permettant d'apprécier un passage systémique de l'ondansétron. Parmi elles, on peut citer une microémulsion (Al Abood, 2013), un gel à base de Klucel® (Patel, 2015) ou encore un patch réservoir (Krishnaiah, 2009) administrés respectivement chez le lapin, le rat et l'homme. Nous détaillerons l'essai clinique du patch réservoir (Krishnaiah, 2009) administré chez des hommes sains. Dans cette étude, deux groupes d'individus (n=6) ont reçu respectivement le patch composé d'un hydrogel contenant 3% d'ondansétron et des comprimés oraux d'ondansétron. Après dosage plasmatique, les paramètres pharmacocinétiques de l'ondansétron formulé dans le patch ont montré une aire sous la courbe (AUC) et un temps de demi-vie, respectivement 3 et 4 fois plus importants que ceux de la voie orale. De même, les concentrations plasmatiques de l'ondansétron ($C_{\max, \text{patch}} = 65,0 \pm 0,5 \text{ ng.mL}^{-1}$) mesurées se sont avérées supérieures aux concentrations plasmatiques efficaces chez l'homme (26 ng.mL⁻¹). Ces résultats ainsi que la biodisponibilité relative $\frac{\text{transdermique}}{\text{orale}}$ égale à 150% sont encourageants pour la perméation de l'ondansétron par diffusion passive.

Concernant la dexaméthasone, différentes études *in vitro* ont été entreprises et menées sur un patch (Mukherjee, 2005), sur un hydrogel (Lopez, 2000) ou encore une microémulsion (Chandra, 2009). Une étude pharmacocinétique *in vivo* a été menée chez le chat avec un organogel à base

pluronique (PLO) commercialisé par un autre fournisseur que Fagron donnant des concentrations plasmiques insuffisantes pour une prise en charge thérapeutique (Willis-Goulet, 2003).

Enfin, concernant l'aprépitant, aucune forme transdermique n'a été rapportée dans la littérature.

II.3.3 Les formes transdermiques prêtes à l'emploi développées par la société Fagron

Principalement sous la forme de patch, les systèmes transdermiques commercialisés sont coûteux et de mise en forme fastidieuse réservée à une production industrielle. Des véhicules transdermiques semi-solides prêts à l'emploi ont donc été développés et commercialisés par des industriels, notamment par la société Fagron, pour incorporer les PA et faciliter la formulation transdermique de préparations magistrales pour l'usage hospitalier. Ces véhicules sont au nombre de cinq : le PLO® (organogel pluronique à base de lécithine), le Pentravan®, le Pentravan® Plus, le Phytobase® et le Lipovan®.

Il s'agit de systèmes colloïdaux composés de phospholipides et d'une phase externe hydrophile. Ils diffèrent par leur structure vésiculaire qui peut être liposomale ou phytosomale et par leurs propriétés organoleptiques comme l'illustre le tableau I.6 :

Tableau I.6: Propriétés des véhicules transdermiques commercialisés par la société Fagron
(<https://us.fagron.com/en-us>, consulté en 2015)

Véhicules	Type	Propriétés organoleptiques	Composition*
PLO®	Gel « Organogel »	Jaune Dense ± pH 4-5	Liposomale (Jones, 2003) Phospholipides (lécithine), isopropyle palmitate, Pluronic® F127
PENTRAVAN®	Crème hydrophile	Jaune Dense+++ pH 4-5,5	Liposomale Phospholipides (lécithine), isopropyle palmitate, alcools, acides gras, carbomer
PENTRAVAN® PLUS	Crème hydrophile	Jaune Dense+++ pH 4-5,5	Liposomale Phospholipides (lécithine), isopropyle palmitate, alcools, acides gras, carbomer
PHYTOBASE®	Crème hydrophile	Blanche Dense ± pH 3,5-5,5	Phytosomale (Fagron, 2013) Phospholipides, triglycérides à base d'acide linoléique et oléique, polymères
LIPOVAN®	Crème hydrophile	Vanillée Dense++ pH 4-6,5	Liposomale Phospholipides (lécithine), alcools, acides gras, esters d'acides gras

* principaux excipients ; composition confidentielle ne pouvant être divulguée

Toutes les formes liposomales se composent de lécithine qui est une molécule amphiphile appartenant à la classe des phospholipides et qui joue le rôle de tensioactif et promoteurs d'absorption (Murdan, 2005 ; Kumar 2005). Le PLO[®], le Pentravan[®] et le Pentravan[®] Plus possèdent le même système liposomal, le Lipoil[®], composé d'un mélange de lécithine de synthèse et d'isopropyle palmitate. Ce mélange est associé, respectivement, à un gel Pluronic[®] F127 (poloxamère 407) ou à une crème. Contrairement au Pentravan[®] et au Pentravan[®] Plus, le PLO[®] est préparé extemporanément en mélangeant du Lipoil[®] avec un gel de Pluronic[®] F127 (Lehman, 2012). Le Pentravan[®] et le Pentravan[®] Plus ont une composition quasi-similaire. Le Pentravan[®] Plus, dont la viscosité est supérieure à celle du Pentravan[®] diffèrerait de celui-ci par l'ajout d'émulsifiants qui permettraient l'incorporation de PA et de solvant en plus grande quantité. Enfin, le Lipovan[®] se distingue des autres véhicules par une composition enrichie en liposomes.

A l'exception du PLO[®], le protocole de formulation est identique pour tous les véhicules et nécessite une première étape de mise en suspension du PA dans un solvant, avant d'y incorporer le véhicule (Jones, 2003). Concernant le PLO[®], il est nécessaire, dans un premier temps, de mélanger le Lipoil[®] à la suspension constituée du PA dans le solvant avant d'ajouter le gel Pluronic[®] F127.

II.3.4 Relevé bibliographique des formulations réalisées avec les véhicules Fagron

A notre connaissance, peu de travaux ont été publiés sur les véhicules commercialisés par la société Fagron. Concernant le Pentravan[®], trois études réalisées *in vitro* ont été publiées. Les deux premières ont porté sur l'évaluation de la libération d'hormones stéroïdes (Polonini, 2014 a et b), la troisième comparant la perméation de la testostérone et du kétoprofène à travers de la peau humaine (Lehman, 2012) et montrant une supériorité du Pentravan[®] par rapport au PLO[®].

Toutefois d'autres études *in vitro* et *in vivo*, portant sur des organogels contenant le poloxamère 407 sont répertoriées. Ainsi le gel « ABH », contenant du lorazepam, de la diphenhydramine et de l'halopéridol a été préparé dans les pharmacies hospitalières américaines pour traiter les nausées et les vomissements de 8500 patients hospitalisés en soins palliatifs (Weschules, 2005). En 2008, des études cliniques réalisées chez l'homme ont montré une diminution significative des symptômes (Bleicher, 2008). En 2014, un nouvel essai clinique mené en double aveugle et en « crossover » a été réalisé en incluant un groupe contrôle placebo (Fletcher, 2014). Les conclusions présentées étaient en parfait désaccord avec celles émises en 2008 puisque les résultats montraient que la formulation de ces trois PA dans le PLO ne permettait pas de réduire le nombre d'épisodes vomitifs par rapport au groupe placebo. Ces résultats ont été confirmés lors d'une étude pharmacocinétique chez l'homme (Smith, 2012) montrant qu'une seule application de ce gel (1 mL)

était insuffisante pour détecter le lorazepam et l'halopéridol dans le plasma. Bien que la diphenhydramine ait été retrouvée chez 5 patients, les concentrations plasmatiques ne dépassaient pas le seuil d'efficacité thérapeutique.

Seules quelques études ont porté sur la préparation de formes transdermiques à base de Pluronic Lecithin Organogel (PLO) contenant l'ondansétron (Allen Loyd, 2000 a) ou la dexaméthasone (Allen Loyd, 2000 b).

Une seule publication sur le Phytobase® présente la libération du thé vert (Campos Alves, 2014). A ce jour, aucune étude portant sur l'évaluation du Lipovan® et du Pentravan® Plus n'a été publiée.

En conclusion, différentes études visant au développement de formes transdermiques pour l'administration d'un des PA ciblées ont été menées sans que ces travaux n'aboutissent à ce jour à une spécialité pharmaceutique commerciale. Les travaux réalisés démontrent l'intérêt de la communauté scientifique pour la problématique de l'administration d'antiémétiques par voie transdermique pour le traitement de NVCI. Aucune étude n'a porté sur l'association de ces antiémétiques dans une forme transdermique. Les véhicules prêts à l'emploi commercialisés par la société Fagron ont par ailleurs démontré leur intérêt pour l'administration d'au moins deux PA, mais le nombre d'études réalisées reste limité. L'objectif de notre étude a donc été de comparer les performances de ces véhicules pour l'administration simultanée de l'aprépitant, de la dexaméthasone et de l'ondansétron.

III Les méthodes d'évaluation des formes transdermiques semi-solides

Les domaines cosmétologique et pharmaceutique développent chaque année de nombreuses formes galéniques d'application cutanée, dont la qualité et l'efficacité peuvent être évaluées par des méthodes *in vitro* au moyen de supports synthétiques, de cultures cellulaires, de tissus reconstruits ou d'explants cutanés non viables, *ex vivo* sur des organes ou des tissus vivants isolés et/ou *in vivo* sur l'ensemble de l'organisme vivant, selon leur champ d'application. Ces méthodes visent notamment à évaluer l'innocuité des formes galéniques, la libération des PA et leur absorption percutanée, ainsi que les paramètres pharmacocinétiques ou encore de bioéquivalence.

Dans le cadre de cette étude, nous nous sommes attachés en première approche à l'évaluation de la libération des PA par les formes galéniques et de leur perméation. Seules les méthodes répondant à cette problématique seront de ce fait présentées dans les paragraphes suivants.

III.1 Les méthodes *in vivo*

L'Homme est bien sûr le modèle le plus prédictif pour évaluer une forme transdermique. Toutefois, les contraintes éthiques, les différences interindividuelles (sexe, âge, ethnie, site anatomique) et l'impossibilité d'évaluer des produits toxiques, limitent son utilisation. Le recours aux animaux de laboratoire est donc plus aisé et permet de standardiser les résultats même si, depuis quelques années, il est recommandé de limiter leur utilisation.

Parmi les animaux en expérimentation et les nombreuses espèces disponibles, les primates et le cochon sont les espèces qui se rapprochent le plus de l'homme d'un point de vue anatomologique. Toutefois, ces deux espèces étant difficile d'accès, le rat est l'espèce animale la plus souvent étudiée même si celle-ci surestime l'absorption cutanée et que ses différences anatomologiques et métaboliques par rapport à l'homme sont plus importantes.

Parmi les méthodes *in vivo* développées pour évaluer les quantités de PA présentes dans les différentes couches de la peau ainsi que celles de leurs métabolites éventuels, on peut citer le « tape stripping », la microdialyse cutanée, la spectroscopie ATR-FTIR ou Raman ou encore les méthodes d'évaluation des paramètres pharmacocinétiques.

III.1.1 Le « tape stripping »

C'est une technique qui est de plus en plus utilisée pour déterminer la concentration du PA et obtenir son profil de répartition au travers du stratum corneum (Escobar-Chavez, 2008). Elle consiste à appliquer la formulation sur la peau pendant un temps défini, puis de retirer l'excédent, avant de réaliser une quinzaine d'applications successives d'adhésifs sur la surface cutanée. Le PA est ensuite dosé dans les différents rubans afin de déterminer la quantité de principe actif présente dans les couches du SC. A partir de la concentration présente dans le véhicule et celle retrouvée dans la couche du SC, il est ainsi possible d'évaluer la quantité de PA ayant diffusé et de déterminer le coefficient de partage (K) (Herkenne, 2006).

III.1.2 La microdialyse cutanée

La microdialyse cutanée (Benfeldt, 1999 ; Herkenne, 2008) est une technique mini-invasive permettant de déterminer en continu la quantité de PA et de ses éventuels métabolites qui ont atteint le derme. Elle consiste à insérer sous le derme une sonde, à savoir un fin cathéter, constituée d'une membrane de dialyse perfusée par une solution physiologique. Après application cutanée, le principe actif traverse l'épiderme avant de se retrouver dans le milieu extracellulaire du derme où il

va se mélanger à la solution physiologique qui va être recueillie et quantifiée, permettant de déterminer la biodisponibilité du PA.

III.1.3 La spectroscopie ATR-FTIR et Raman

La spectroscopie d'absorption Infra-Rouge (IR) et la spectroscopie de diffusion Raman peuvent être mises à profit dans le but d'étudier la perméation des PA *in vivo* car ce sont des techniques non invasives. Dans les deux cas, il est nécessaire que le composé à examiner possède une signature IR ou Raman unique qui permette de le différencier du spectre des constituants de la peau. Il faut par ailleurs qu'il soit présent à une concentration suffisante et possède des caractéristiques spectrales d'intensité suffisante.

Les méthodes couramment utilisées sont (Förster, 2011) :

- la spectroscopie IR en réflexion totale atténuée (ATR-FTIR), dont la résolution spatiale est très limitée et qui ne s'applique qu'à des mesures au sein de la couche la plus externe du SC compte tenu de la faible profondeur de pénétration du rayonnement,
- la spectroscopie confocale Raman qui permet une localisation spatiale en 3 dimensions de l'ordre du micron et l'obtention d'informations avec une profondeur de champ sur plusieurs centaines de microns en dessous de la surface de la peau (Caspers, 2001).

Ainsi, la spectroscopie confocale Raman permet d'établir directement le profil de perméation d'un PA *in vivo* (concentration *versus* profondeur), alors que l'ATR-FTIR doit être associée à la méthode de « tape stripping » (Higo, 1993 ; Tsai, 2003 ; Potard, 2000).

III.1.4 Méthode d'évaluation des paramètres pharmacocinétiques

Pour évaluer les paramètres pharmacocinétiques d'absorption, de distribution, de métabolisme et d'élimination, une quantité connue de forme galénique est déposée sur un site anatomique cutané d'un animal pendant une durée et un nombre d'applications bien définis. Celui-ci est ensuite placé en cage à métabolisme pendant toute la durée de l'expérimentation au cours de laquelle des prélèvements réitérés des liquides biologiques (plasma, urines et fèces) sont effectués. Après sacrifice, la quantification des PA et métabolites dans les différents organes de distribution doit être réalisée par une méthode analytique sensible. Dans ce but, l'OCDE recommande d'administrer des PA radiomarqués pour permettre leur dosage par une mesure de radioactivité sans traitement préalable de l'échantillon. Toutefois, cette technique requière des précautions particulières et des autorisations de manipulations.

III.2 Méthodes *in vitro*

De nombreuses méthodes peuvent être utilisées afin d'évaluer la diffusion des PA *in vitro*. Parmi elles on distingue notamment des méthodes spectroscopiques faisant appel à l'IR et au Raman, telles que celles utilisées à l'échelle *in vivo* (l'ATR-FTIR, la spectroscopie confocale Raman), ou encore la microscopie IR (Xiao, 2005 a et b ; Mendelsohn, 2006 ; Kazarian, 2006), mais aussi des méthodes basées sur des mesures de fluorescence telles que la microscopie de fluorescence confocale.

On distingue également des méthodes basées sur la mesure de la quantité de PA ayant diffusé à travers des membranes synthétiques ou naturelles. Leurs modalités d'utilisation sont recommandées par diverses sociétés savantes telles que l'Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), l'European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals (EXETOC), l'European Cosmetic toiletry and Perfumery Association (COLIPA), l'Association of Pharmaceutical Scientists/Food and Drug Administration (AAPS/FDA) ou encore la FDA «SUPAC-SS » (Baert, 2010). Ces méthodes permettent d'évaluer l'innocuité, la libération du PA ou l'absorption percutanée de PA en sélectionnant au préalable un modèle parmi ceux disponibles (membrane synthétique, peau humaine reconstruite ou explant animal et humain). En fonction de la membrane étudiée, la diffusion d'un PA pourra être évaluée à partir de cellules de diffusion ou à l'aide de plaques multi-puits avec insert, couramment utilisées en culture cellulaire.

Dans ce chapitre, nous nous intéresserons plus spécifiquement aux méthodes basées sur la mesure de la quantité de PA capable de traverser les membranes en utilisant des cellules de diffusion.

Le type de cellules, la nature de la membrane, la quantité de forme galénique déposée, la composition du milieu receveur, la vitesse d'agitation dans le compartiment receveur, la fréquence et le volume des prélèvements, ainsi que la température sont autant de paramètres à définir selon les objectifs à atteindre (Ng, 2010 a).

III.2.1 Appareillage : cellules de diffusion

Une cellule de diffusion est composée d'un compartiment receveur et d'un compartiment donneur (en verre ou téflon), séparés par une membrane dont l'étanchéité est assurée par un joint. Selon la position de la membrane qui sépare le compartiment receveur du compartiment donneur et selon les modalités de renouvellement du milieu receveur, on distingue différents types de cellules.

Les cellules de diffusion horizontale, dont la membrane est placée verticalement (figure I.9 gauche), présentent des compartiments juxtaposés, dans lesquels l'agitation continue permet ainsi

d'évaluer une solution saturée en principe actif sans colmater la membrane et perturber la diffusion horizontale.

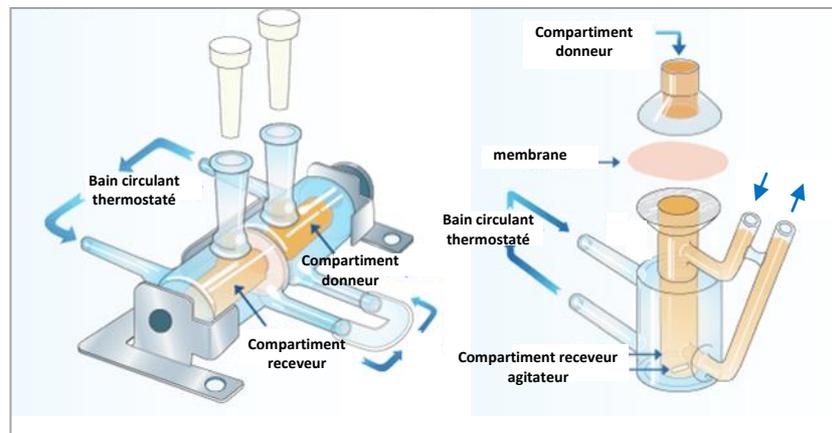


Figure I.9 : Schéma de cellules de diffusion horizontale (gauche) et verticale (droite)
(site PermeGear : <http://permegear.com>)

Cette configuration n'est toutefois pas adaptée pour mimer le passage percutané des formes semi-solides. Par conséquent, pour les études de passage transdermique, on préférera utiliser des cellules dites verticales dont le compartiment donneur exempt de toute agitation est positionné au-dessus du compartiment receveur (figure I.9 droite). Ce dispositif vertical présente l'avantage de pouvoir travailler dans des conditions occlusives, semi ou non occlusives (Gummer, 1987) selon que la forme galénique soit au contact ou non de l'air ambiant.

Selon les dispositifs, il est possible d'opérer dans des conditions statiques (cellules statiques ne permettant pas le renouvellement du milieu receveur) ou dynamiques (cellules à flux continu permettant le renouvellement du milieu receveur).

Bien que les cellules de diffusion statiques, telles la cellule de Franz, nécessitent des prélèvements manuels réguliers du milieu receveur, leur facilité de mise en œuvre font d'elles les plus couramment utilisées. Bien que la cellule à flux continu permette une automatisation des prélèvements, de mimer le flux sanguin, de limiter les problèmes de saturation, sa mise en œuvre plus fastidieuse et le recours aux méthodes de quantification plus sensibles notamment lors d'étude du métabolisme cutanée (Boudry, 2008), font d'elle une cellule moins utilisée.

Notons qu'il existe un large panel de cellules dont les dimensions du compartiment donneur et receveur (ex : 3, 8 ou 15 mL) et de la surface d'échange (ex : 0,64 - 2,54 ou 3,14 cm²) sont variables.

III.2.2 Les membranes

Les membranes des cellules de diffusion peuvent être des membranes synthétiques pour déterminer des profils de libération ou être issus d'explants cutanés humain ou animal pour évaluer la toxicité des produits ou encore évaluer l'absorption percutanée.

III.2.2.a Membranes synthétiques

Les membranes synthétiques sont fréquemment composées de silicone, de cellulose ou encore de polysulfone. Elles doivent être inertes d'un point de vue physique et chimique vis à vis du PA et ne servir que de support pour séparer la forme galénique du compartiment receveur. Toutefois, leur porosité et tortuosité impactent le flux (Ng, 2010 b) et leur contamination éventuelle par des résidus issus des processus de fabrication tels que le glycérol sont susceptibles de biaiser la cinétique. Une vigilance quant au choix et à la préparation de la membrane est donc nécessaire.

Ce modèle permet de caractériser une formulation galénique indépendamment de toutes interactions avec son site d'administration. Ainsi, il permet d'évaluer sa capacité propre à libérer un PA dissous ou dispersé dans le véhicule qui le constitue. Dans l'industrie pharmaceutique, il est utilisé pour l'évaluation des formes semi-solides non stériles (SUPAC-SS) lors de l'étape de développement ainsi que dans le processus de contrôle qualité. Comme le taux de libération (IVRT : *In Vitro* Release Test) du PA est influencé par la solubilité et la taille des particules du PA ou encore des propriétés rhéologiques de la forme (Klein, 2010), l'utilisation de ce modèle permet d'apprécier des changements dans le processus de fabrication et donc de détecter une erreur de préparation ou encore de contrôler les différences de libération avant et après changement d'excipients (Siewert, 2003).

III.2.2.b Membranes reconstruites

Les modèles cellulaires de peau humaine sont obtenus à partir de cellules en culture primaire ou fractions subcellulaires de peau humaine. Il existe des modèles équivalents à la peau vivante (LSE) possédant un derme, un épiderme et un stratum corneum partiellement différencié (Graftskin®, EpiDermFT®) et des modèles d'épidermes reconstruits (HRE) de types Episkin®, Skinethic® (Flaten, 2015 ; Godin, 2007). Ces modèles sont de plus en plus utilisés dans le développement de produits cosmétiques et pharmaceutiques notamment pour évaluer l'innocuité des matières premières et formes finies. Ils sont commercialisés en plaques avec des puits contenant chacun une unité reconstruite.

Ces modèles plus complexes que les membranes synthétiques permettent d'obtenir des données toxicologiques (phototoxicité, corrosion et irritation), et métaboliques sans avoir recours à

l'expérimentation animale et limitant les variabilités. Toutefois, dénués d'annexes cutanées, de phénomène de desquamation du SC, ils ne peuvent actuellement remplacer les explants cutanés pour étudier la perméabilité cutanée.

III.2.2.c Membranes naturelles

- **Espèces**

Pour évaluer l'absorption dermique de la peau humaine et animale excisée, il est nécessaire d'avoir recours à des explants cutanés dont la préparation est bien décrite par l'OECD et l'European Centre for Validation of Alternative Methods (ECVAM) (Abdallah, 2015).

La peau humaine est obtenue à partir de mastectomie, d'abdominoplastie ou à partir de cadavre (Diembeck, 1999). Ce modèle de premier choix, prédictif des conditions *in vivo* présente toutefois des problèmes de disponibilité et des variations inter-individuelles (sites anatomiques, âge, sexe, ethnique...) ce qui le rend moins étudié que les modèles animaux (Jacques, 2010). La peau animale est donc la solution alternative même si l'extrapolation des données de perméation cutanée chez l'homme reste difficile du fait des différences anatomo-morphologiques et métaboliques. Toutefois, certaines espèces telles que le cochon sont à privilégier, du fait de leurs similitudes à l'Homme concernant l'épaisseur du SC (vingtaine de μm) ou encore la pilosité (20 poils/ cm^2 contre 30 chez l'homme excepté les cheveux) (Godin, 2007). C'est plus précisément la peau d'oreille de cochon qui est le modèle animal le plus pertinent tant pour ses propriétés histologiques que biochimiques proches de l'homme (Herkenne, 2006 ; Jacobi, 2007). Alors que la peau de rongeurs sur-estime la perméation, celle de la peau d'oreille de cochon est le modèle de référence pour les études d'absorption cutanée. Malgré ces ressemblances, les rongeurs restent les animaux les plus utilisés (rat, souris, lapin, cochon d'Inde). Les animaux de laboratoires présentent l'avantage de standardiser les études (âge, sexe, site anatomique) et permettent ainsi d'avoir une bonne reproductibilité pour comparer différentes compositions galéniques lors des phases de développement galénique, en plus de leur accessibilité.

- **Epaisseur**

Lors des études *in vitro*, il est possible de travailler sur la peau entière. Toutefois, l'hypoderme et le derme qui ne sont plus vascularisés créent un effet barrière supplémentaire notamment pour la diffusion des molécules lipophiles piégées dans le derme. De ce fait, en fonction des molécules étudiées, les recommandations préconisent de dermatomer la peau ou d'isoler l'épiderme. Voici comment préparer et conserver ces échantillons.

1. Peau entière

L'explant cutané est généralement évalué dans son intégralité (épiderme, derme et hypoderme) lorsque celui-ci reste inférieur à 1 mm d'épaisseur tel que chez la souris ou le lapin.

La peau fraîche excisée doit immédiatement être placée à 4°C et être utilisée le plus rapidement possible dans les 24h si une étude du métabolisme est envisagée. Le cas échéant, l'échantillon pourra être stocké dans un sac plastique scellé ou entre deux feuilles d'aluminium à - 20°C (OCDE n°428, 2004) perdant ainsi toute activité enzymatique. La congélation n'aurait donc pas d'impact sur la diffusion à travers la peau humaine (Dennerlein, 2013) (étude menée sur 30 jours ; congélation entre deux feuilles d'aluminium). Bien que la pénétration soit inchangée lors d'une congélation à -20°C pendant 3 semaines, le SC doublerait de volume et serait donc altéré (Nielsen, 2011). Après congélation, l'explant doit être décongelé à température ambiante (Sintov, 2014).

2. Peau dermatomée

L'explant cutané est séparé de l'hypoderme et du derme profond à l'aide d'un dermatome mécanique (dermatome Lagrot) ou électrique (commercialisé par Zimmer® ou encore Humeca®). Il est possible d'obtenir une bonne reproductibilité des échantillons dont la finesse est contrôlée entre 200 à 400 µm (épiderme + derme papillaire), à condition d'opérer avec un dermatome électrique, dont le coût est malheureusement élevé. Elle permet de conserver une bonne intégrité cutanée.

3. Peau épidermée

Elle est obtenue en supprimant toute la couche dermique et en isolant l'épiderme à partir d'un processus thermique, chimique, enzymatique ou mécanique. Le choix de la méthode est fonction de l'espèce en raison des différences morphologiques de la peau et de la profondeur des follicules pileux (OCDE n°428, 2004).

La méthode chimique nécessite l'immersion de la peau dans des solutions de sels de brome, de thiocyanate (OCDE n°428, 2004) ou encore d'ammoniaque ou d'acide chlorhydrique (Baumberger, 1942), néanmoins ces solutions peuvent altérer l'intégrité de la peau ; elle est, toutefois, recommandée pour la préparation de l'épiderme de rat.

La méthode enzymatique repose sur l'utilisation de bains de collagénases ou de protéases (trypsine ou thermolysine). Dans ce dernier cas, l'épaisseur de peau ne doit pas excéder 1 mm. Il s'agit d'une méthode efficace, qui peut également altérer la qualité de l'épiderme.

La méthode thermique ne requière que de l'eau. La peau entière est placée selon la méthode de Kligman et Christophers (Kligman, 1963) dans l'eau à 60°C pendant 60 s, puis l'épiderme est retiré à l'aide de pinces. Cette méthode présente l'avantage d'être très peu onéreuse et facile à mettre en œuvre mais l'inactivation des enzymes qui en résulte peut réduire voir inhiber le métabolisme cutané. Elle est recommandée pour les peaux humaines et de cochon.

Enfin, la méthode mécanique repose sur l'étirement ou l'aspiration de la peau.

Il est impossible d'isoler l'épiderme de la peau de la souris, du lapin et de cochon d'inde du fait de leur importante pilosité (Davies, 2004).

III.2.2.d Contrôle de l'intégrité des membranes naturelles

L'OECD oblige l'opérateur à vérifier l'intégrité des membranes utilisées avant chaque étude de perméation afin de ne pas obtenir de résultats erronés d'autant plus que celles-ci sont souvent altérées au-delà de 24 h et n'assurent plus, dans ce cas, de fonction barrière.

Alors que la peau entière relève généralement d'une simple observation visuelle, les peaux dermatomées et épidermées doivent être soumises à l'un des trois tests d'intégrité à savoir la perte insensible en eau (PIE ou TEWL), la mesure de l'impédance ou la perméabilité à l'eau tritiée. Dans ces trois méthodes, la membrane est placée sur une cellule de diffusion de type cellule de Franz dont le compartiment receveur est rempli par une solution saline de NaCl à 0,9% (Fasano, 2002). Le compartiment donneur est vide lorsque l'on effectue la mesure de la perte insensible en eau, rempli de NaCl à 0,9% dans le cas de la mesure de l'impédance ou lors de l'évaluation de la perméabilité à l'eau tritiée.

- **La perte insensible en eau**

La structure imperméable du stratum corneum conférée par les cornéocytes et les couches lamellaires lipidiques, permet de protéger l'organisme contre la perte d'eau diffusionnelle (Humbert, 2003). Un épiderme endommagé ou une épaisseur du SC réduite engendre ainsi une augmentation des pertes hydriques cutanées. La perte insensible en eau (PIE) est une technique qui reflète la capacité du SC à limiter les pertes en eau. Cette mesure repose sur un phénomène passif de transfert d'eau sous l'influence du gradient de pression de vapeur d'eau de part et d'autre de la membrane et qui peut être décrit par la première loi de Fick :

$$J = -K_m \cdot D \cdot \frac{\Delta C}{\Delta \delta} \quad (\text{équation I.4})$$

où J est le flux d'eau à travers la peau, K_m le coefficient de partage de l'eau entre le SC et l'épiderme vivant, D le coefficient de diffusion de l'eau dans le SC et $\Delta C/\Delta \delta$, le gradient de tension de vapeur d'eau à travers la peau. La perte insensible en eau exprimée en $\text{g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$, est estimée à l'aide d'un évaporimètre placé à la surface de la peau qui enregistre la température et l'hygrométrie au niveau de deux capteurs positionnés à une distance respective de 3 et 9 mm de la surface cutanée. Ce gradient proportionnel à l'échange de vapeur d'eau depuis la peau est exprimé en valeur relative du fait de sa variation en fonction des paramètres opératoires tels que la température du milieu

receveur, l'humidité de l'air ou encore l'épaisseur de la peau. Dans les conditions opératoires définies, il est nécessaire de valider et d'étalonner les mesures avec une méthode alternative.

- **L'impédance**

Les membranes cellulaires agissent comme un circuit électrique microscopique où la tension est due à la différence entre la distribution des charges ioniques, créant un champ électrique de part et d'autre de la membrane cellulaire (Pethig, 1987). La structure membranaire riche en lipides joue un rôle isolant et la surface un rôle conducteur. La bicouche lipidique peut être apparentée à un condensateur : les têtes polaires des phospholipides conductrices représenteraient les armatures et les chaînes aliphatiques non conductrices, l'espace isolant. De même, les canaux ioniques agissent comme des résistances variables spécifiques à chaque ion. La peau joue donc le rôle d'isolant électrique. L'opposition au passage du courant total conféré par la peau est caractérisée par l'impédance. Ce paramètre qui mesure l'opposition au passage d'un courant alternatif sinusoïdal dans un circuit électrique, peut être exprimé par généralisation de la loi d'Ohm de la manière suivante :

$$U = Z_p \cdot I \quad (\text{équation I.5})$$

avec U la tension (V), I l'intensité (A) et Z_p l'impédance (Ω) qui est la résultante d'une partie réelle (la résistance, R_p) et d'une partie imaginaire (la réactance capacitive, X_{Cp}), exprimées en ohm :

$$Z_p = \sqrt{R_p^2 + X_{Cp}^2} \quad (\text{équation I.6})$$

La résistance R_p est une partie résistive contrairement à la réactance capacitive X_c qui est une partie réactive et qui n'est présente qu'en courant alternatif, c'est à dire en présence d'une fréquence non nulle reflétant l'incapacité des électrons à traverser un condensateur.

La mesure de l'impédance permet de s'assurer de l'intégrité de la peau et peut être obtenue à l'aide d'un système de type LCR databridge ou équivalent, qui utilise deux électrodes immergées dans la solution saline introduite de part et d'autre de la membrane à étudier (clampée sur la cellule de Franz) et l'application d'une tension alternative basses fréquences aux bornes de ces électrodes. Il est important de choisir convenablement les conditions de mesure (tension appliquée et fréquence ; composition de la solution saline) afin que la méthode soit sensible et robuste et pour ne pas altérer la membrane.

- **Eau tritiée**

La perméabilité à l'eau tritiée est un bon indicateur du maintien de l'intégrité de la peau et de l'épiderme ; elle est souvent utilisée comme une méthode de référence pour fixer les critères d'acceptation (Lawrence, 1997). L'eau tritiée est déposée sur la membrane et sa vitesse d'absorption est mesurée sur une période de quelques heures afin d'estimer le coefficient de perméabilité K_p ($\text{cm}\cdot\text{h}^{-1}$). Il s'agit de la méthode la plus standardisée, la plus reproductible d'un laboratoire à un autre.

La méthode de mesure de l'impédance est plus rapide que la méthode de l'eau tritiée pour évaluer l'intégrité. Elle a déjà montré son efficacité dans le cas de peaux dermatomées et épidermées d'oreille de cochon (Davies, 2004 ; Dick 1992).

III.2.3 Composition du milieu receveur

La composition du milieu receveur est choisie en fonction de l'objectif de l'étude et des propriétés physico-chimiques du PA. Sa composition doit être telle que la solubilité du PA y soit suffisante pour être en mesure de travailler dans les « sink conditions », à savoir une concentration du PA dans le compartiment receveur n'excédant pas 10% de sa concentration saturante pour éviter tout phénomène de rétrodiffusion. Par ailleurs, on s'assurera que le milieu receveur n'altère pas la membrane utilisée.

Ainsi, lors d'études de libération, un milieu très solubilisant est requis en raison des quantités élevées de PA transférés dans le milieu receveur pouvant conduire rapidement à des concentrations saturantes. L'addition d'un surfactant (tween) ou d'un alcool (éthanol) pourra alors être envisagée, notamment lors de l'évaluation de PA lipophiles.

Dans le cadre d'études de perméation réalisées en présence d'une membrane naturelle, la composition du milieu receveur doit se rapprocher des conditions physiologiques. Un tampon salin à pH 7,4 (Baert, 2010) est généralement utilisé. L'ajout de nutriments et de conservateurs antimicrobiens est requis si une activité cellulaire doit être préservée (Baert, 2010). Du tween 20, du polyéthylène glycol, de l'éthanol, de l'albumine de sérum bovin ou encore des cyclodextrines pourront être également ajoutés au milieu receveur mais à des teneurs très limitées (< 6%) pour éviter l'altération de la membrane (Moser, 2001).

III.2.4 Le compartiment donneur

La quantité de PA déposée sur la membrane dépend à la fois de la teneur en PA dans la formulation, mais également de la quantité de formulation contenue dans le compartiment donneur. L'évaluation d'une formulation peut se faire selon deux approches utilisant :

- une dose infinie. Dans ce cas, la quantité de PA introduite dans le compartiment receveur est suffisamment importante pour être considérée comme étant constante et infinie pendant toute la durée de l'étude. En effet, malgré la diffusion du PA au travers de la membrane, l'épuisement en PA dans la formulation reste négligeable. Les quantités de formulation déposées sont généralement importantes (de 1 à 10 mg.cm⁻²), ce qui exerce un effet occlusif (Selzer, 2013).

- une dose finie. Dans ce cas, des quantités plus limitées de formulation sont déposées dans le compartiment receveur.

D'un point de vue cinétique, ces deux scénari conduisent à des profils de diffusion différents (figure I.10). En dosage fini, l'épuisement en PA dans le compartiment donneur se caractérise par une quantité cumulée en PA dans le milieu receveur qui croît de façon exponentielle dans les quelques heures suivant le dépôt de la formulation, puis qui se stabilise pour atteindre un équilibre. Dans le cas d'une dose infinie, l'état d'équilibre sera atteint dans un délai plus long, mais la détermination des paramètres de diffusion tels que le coefficient de perméation ou le temps de latence sera plus facilement accessible.

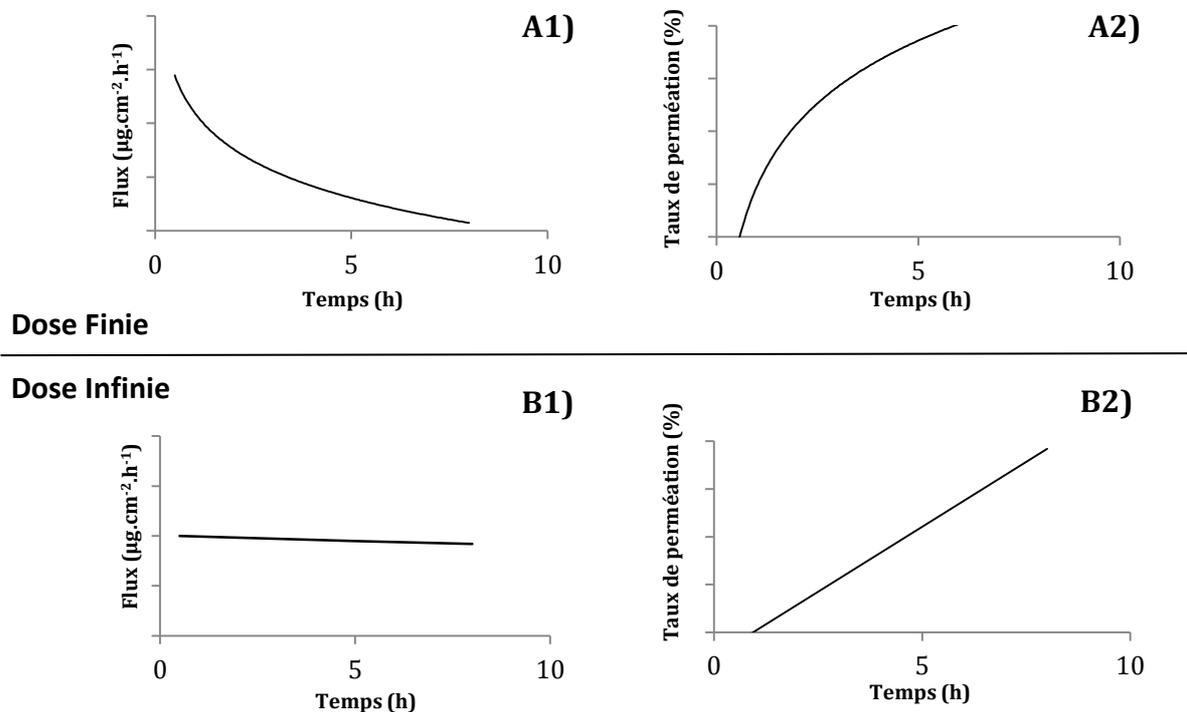


Figure I.10 : Comparaison du flux et du taux de perméation obtenus avec un dépôt d'une dose finie (A) et infinie (B) (Buist, 2010)

III.2.5 Autres paramètres

Les cinétiques de libération et de perméation sont également impactées par la température et la vitesse d'agitation du milieu receveur. Si la température peut être facilement modulée (généralement réglée à 32°C afin de mimer la température à la surface de la peau) par le biais d'un système de bain thermostaté circulant, la vitesse d'agitation ne l'est pas toujours et dépend notamment du fabricant.

IV Références Bibliographiques

- Abdallah MAE**, Pawar G, Harrad S, *Environment International*, 74 (2015) 13-22.
- Al Abood RM**, Talegaonkar S, Tariq M, Ahmad FJ, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 101 (2013) 143-151.
- Allen Loyd V**, *International Journal of Pharmaceutical Coumpounding*, 4 (2000) 305 a.
- Allen Loyd V**, *International Journal of Pharmaceutical Coumpounding*, 4 (2000) 287 b.
- Alvarez O**, Freeman A, Bedros A, Call SK, Volsch J, Kalbermatter O, Halverson J, Convy L, Cook L, Mick K, Zimmerman G, *Journal of Pediatric Hematology / Oncology*, 17 (1995) 145-150.
- Autret-Leca E**, Bensouda-Grimaldi L, Le Guellec C, Jonville-Béra AP, *Archives de Pédiatrie*, 13 (2006) 181-185.
- Awasthi R**, Kulkarni GT, Pawar VK, *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 3 (2011) 1-3.
- Baert B**, Boonen J, Burvenich C, Roche N, Stillaert F, Blondeel P, Van Bocxlaer J, De Spiegeleer B, *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 13 (2010) 218-230.
- Bangham AD**, Standish MM, Watkins JC, *Journal of Molecular Biology*, 13 (1965) 238-252.
- Baumberger J**, Suntzeff V, Cowvry EV, *Journal of the National Cancer Institute*, 2 (1942) 413-423.
- Barry BW**, *Journal of Controlled Release*, 15 (1991) 237-248.
- Barry BW**, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 14 (2001) 101-114.
- Basch E**, Prestrud AA, Hesketh PJ, Kris MG, Feyer PC, Somerfield MR, Chesney M, Clark-Snow R.A, Flaherty A.M, Freundlich B, Morrow G, V.Rao K, N.Schwartz R, H.Lyman G, *Journal of Clinical Oncology*, 29 (2011) 4189-4198.
- Benfeldt E**, Serup J, Menné T, *British Journal of Dermatology*, 140 (1999) 739-748.
- Bleicher J**, Bhaskara A, Huyck T, Constantino S, Bardia A, Loprinzi CL, Silberstein PT, *The Journal of Supportive Oncology*, 6 (2008) 27-32.
- Boudry I**, Trescos Y, Vallet V, Cruz C, Lallement G, *Pathologie Biologie*, 56 (2008) 292-299.
- Buist HE**, Van Burgsteden JA, Freidig AP, Maas WJ, Van de Sandt JJ, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 57 (2010) 200-209.
- Campos Alves MC**, Almeida PA de, Polonini HC, Raposo NRB, Ferreira A de O, Brandão MAF, *Química Nova*, 37 (2014) 728-735.
- Caspers PJ**, Lucassen GW, Carter EA, Bruining HA, Puppels GJ, *The journal of Investigative Dermatology*, 116 (2001) 434-442.
- Chandra A**, Sharma PK, Irchhiaya R, others, *Asian Journal of Pharmaceutics*, 3 (2009) 30-36.
- Chen Y**, Quan P, Liu X, Wang M, Fang L, *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 9 (2014) 61-64.
- Crickx B**, *Annales de Dermatologie et de Vénérologie*, 132 (2005) 8S3-8S104.
- Dass S**, Dey SK, *Indo American Journal of Pharmaceutical Research*, 3 (2013) 4680-4696.
- Davies DJ**, Ward RJ, Heylings JR, *Toxicology in Vitro*, 18 (2004) 351-358.
- Dennerlein K**, Schneider D, Göen T, Schaller KH, Drexler H, Korinth G, *Toxicology in Vitro*, 27 (2013) 708-713.
- Dick IP**, Scott RC, *Pharmaceutical Research*, 9 (1992) 884-887.

- Diembeck** W, Beck H, Benech-Kieffer F, Courtellemont P, Dupuis J, Lovell W, Paye M, Spengler J, Steiling W, *Food and Chemical Toxicology*, 37 (1999) 191-205.
- Dréno** B, *Annales de Dermatologie et de Vénérologie*, 136 (2009) S247-S251.
- Duggin** K, Tickle K, Norman G, Yang J, Wang C, Cross SJ, Gajjar A, Mandrell B, *Journal of Pediatric Oncology Nursing*, 31 (2014) 277-283.
- Dupuis** LL, Boodhan S, Holdsworth M, Robinson PD, Hain R, Portwine C, O'Shaughnessy E, Sung L, *Pediatric Blood and Cancer*, 60 (2013) 1073-1082.
- Dupuis** LL, Robinson PD, Boodhan S, Holdsworth M, Portwine C, Gibson P, Philips R, Maan C, Stefin N, Sung L, *Pediatric Blood and Cancer*, 61 (2014) 1506-1512.
- Durand** J-P, Madelaine I, Scotté F, *Bulletin du Cancer*, 10 (2009) 951-960.
- El Maghraby** GM, Barry BW, Williams AC, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 34 (2008) 203-222.
- Elnaggar** Y.S.R, El-Refaie W, El-Massik W, Abdallah Y.O, *Journal of Controlled Release*, 180 (2014) 10-24.
- Elsayed** MM, Abdallah OY, Naggar VF, Khalafallah NM, *International Journal of Pharmaceutics*, 332 (2007) 1-16.
- Escobar-Chávez** J.J, Merino-Sanjuán V, López-Cervantes M, Urban-Morlan Z, Piñón-Segundo E, Quintanar-Guerrero D, Ganem-Quintanar A, *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 11 (2008) 104-130.
- Ettinger** DS, *Oncology*, 11 (1997) 57-89.
- Fagron**, *20 ways improving patient care & pharmacy profitability*, (Spring 2013) 51.
- Fasano** WJ, Manning LA, Green JW, *Toxicology in Vitro*, 16 (2002) 731-740.
- Fletcher** DS, Coyne PJ, Dodson PW, Parker GG, Wan W, Smith TJ, *Journal of Pain and Symptom Management*, 5 (2014) 797-803.
- Flaten** GE, Palac Z, Engesland A, Filipović-Grčić J, Vanić Z, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, (2015) sous presse.
- Förster** M, Bolzinger MP, Fessi H, Briançon S, *European Journal of Dermatology*, 19 (2009) 309-323.
- Förster** M, Bolzinger MP, Montagnac G, Briançon S, *European Journal of Dermatology*, 21 (2011) 851-863.
- Gillet** A, Compère P, Lecomte F, Hubert P, Ducat E, Evrard B, Piel G, *International Journal of Pharmaceutics*, 411 (2011) 223-231.
- Godin** B, Touitou E, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59 (2007) 1152-1161.
- Gummer** CL, Hinz RS, Maibach HI, *International Journal of Pharmaceutics*, 40 (1987) 101-104.
- Gwak** HS, Oh IS, Chun IK, *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 30 (2004) 187-194.
- Hadgraft** J, *International Journal of Pharmaceutics*, 184 (1999) 1-6.
- Hébert** G, Prot-Labarthe S, Tremblay M-E, Bussièrès J-F, Bourdon O, *Archives de Pédiatrie*, 21 (2014) 245-250.
- Herkenne** C, Alberti I, Naik A, Kalia YN, Mathy F-X, Préat V, Guy R, *Pharmaceutical research*, 25 (2008) 87-103.
- Herkenne** C, Naik A, Kalia YN, Hadgraft J, Guy RH, *Pharmaceutical Research*, 23 (2006) 1850-1856.

- Higo N**, Naik A, Bommanna DB, Potts RO, Guy RH, *Pharmaceutical Research*, 10 (1993) 1500-1506.
- Honeywell-Nguyen PL**, Bouwstra JA, *Drug Discovery Today: Technologies*, 2 (2005) 67-74.
- Humbert P**, *Pathologie Biologie*, 51 (2003) 271-274.
- Hussain A**, Wahab GMKA, Ur Rahman MAS, Altaf H, Akhtar N, Qayyum MI, *International Journal of Basic Medical Sciences and Pharmacy*, 4 (2014) 19-22.
- Jacobi U**, Kaiser M, Toll R, Mangelsdorf S, Audring H, Otberg N, Sterry W, Lademann J, *Skin Research and Technology*, 13 (2007) 19-24.
- Jacques C**, Perdu E, Duplan H, Jamin EL, Canlet C, Debrauwer L, Cravedi JP, Mavon A, Zalko D, *Toxicology Letters*, 199 (2010) 22-33.
- Jones M**, *International Journal of Pharmaceutical Compounding*, 7 (2003) 180-183.
- Jordan K**, Kasper C, Schmoll HJ, *European Journal of Cancer*, 41 (2005) 199-205.
- Kang HJ**, Loftus S, Taylor A, DiCristina C, Green S, Zwaan CM, *The Lancet Oncology*, 16 (2015) 385-394.
- Karande P**, Mitragotri S, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*, 1788 (2009) 2362-2373.
- Karimi N**, Ghanbarzadeh B, HamishehKar H, Keivani F, Pezeshki A, Madhi Gholian M, *Applied Food Biotechnology*, 2 (2015) 17-27.
- Kazarian SG**, Chan KLA, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1758 (2006) 858-867.
- Kim KS**, Ita K, Simon L, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 68 (2015) 137-143.
- Klein RR**, Tao JQ, Wilder S, Burchett K, Bui Q, Thakker KD, *Dissolution Technologies*, 17 (2010) 6-10.
- Kligman AM**, Christophers E, *Archives of Dermatology*, 88 (1963) 702-705.
- Knorr F**, Lademann J, Patzelt A, Sterry W, Blume-Peytavi U, Vogt A, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 71 (2009) 173-180.
- Kogan A**, Garti N, *Advances in Colloid and Interface Science*, 123-126 (2006) 369-385.
- Krishnaiah YS**, Rama B, Raghuram V, Ramanamurthy KV, Satyanarayana V, *Pharmaceutical Development and Technology*, 14 (2009) 53-64.
- Kumar R**, Katare OP, *AAPS PharmSciTech*, 6 (2005) 298-310.
- Lawrence JN**, *Toxicity in Vitro*, 11 (1997) 241-249.
- Lehman PA**, Raney SG, *International Journal of Pharmaceutical Compounding*, 16 (2012) 248-252.
- Lopez RF**, Collett JH, Bentley MVL, *International Journal of Pharmaceutics*, 200 (2000) 127-132.
- Lorin A**, Flore C, Thomas A, Basseur R, *Biotechnology Agronomy Society and Environment*, 3 (2004) 163-176.
- Malakar J**, Nayak AK, Basu A, *International Scholarly Research Network Pharmaceutics*, 2012 (2012) 1-6.
- Marquis C**, Ouellet G, Therrien R, *Pharmactuel*, 39 (2006) 202-212.
- Marwah H**, Garg T, Goyal AK, Rath G, *Drug delivery*, 2014, 1-15.
- Mathur V**, Satrawala Y, Rajput MS, *Asian Journal of Pharmaceutics*, 4 (2010) 173-183.
- Mendelsohn R**, Flach CR, Moore DJ, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1758 (2006) 923-933.
- Morrow DIJ**, McCarron PA, Woolfson AD, Donnelly RF, *The Open Drug Delivery Journal*, 1 (2007) 36-59.

- Moser** K, Kriwet K, Naik A, Kalia YN, Guy RH, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 52 (2001) 103-112.
- Mukherjee** B, Mahapatra S, Gupta R, Patra B, Tiwari A, Arora P, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 59 (2005) 475-483.
- Murdan** S, *Hospital Pharmacist*, 12 (2005) 267-270.
- Naik** A, Kalia YN, Guy RH, *Pharmaceutical Science & Technology Today*, 3 (2000) 318-326.
- Nielsen** JB, Plasencia I, Sørensen JA, Bagatolli LA, *Skin Pharmacology and Physiology*, 24 (2011) 193-102.
- Neubert** RHH, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 77 (2011) 1-2.
- Ng** S-F, Rouse J, Sanderson D, Eccleston G, *Pharmaceutics*, 2 (2010) 209-223 b.
- Ng** S-F, Rouse J, Sanderson D, Meidan V, Eccleston G, , *AAPS PharmSciTech*, 11 (2010) 1432-1441 a.
- Obata** Y, Ashitaka Y, Kikuchi S, Isowa K, Takayama K, *International Journal of Pharmaceutics*, 399 (2010) 87-93.
- OCDE**, « Essai n°428 : Absorption cutanée : méthode *in vitro* » consulté en 2015, http://www.oecd-ilibrary.org/fr/environment/essai-n-428-absorption-cutanee-methode-in-vitro_9789264071094-fr.
- Olver** I, Paska W, Depierre A, Seitz J-F, Stewart DJ, Goedhals L, McQuade B, McRae J, Wilkinson J.R, *Annals of Oncology*, 7 (1996) 945-52.
- Otberg** N, Patzelt A, Rasulev U, Hagemeister T, Linscheid M, Sinkgraven R, Sterry W, Lademann J, *British Journal of Clinical Pharmacology*, 65 (2008) 488-492.
- Patel** DR, Joshi A, Patel HH, Stagni G, *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 41 (2015) 1030-1036.
- Paudel** KS, Milewski M, Swadley CL, Brogden NK, Ghosh P, Stinchcomb AL, *Therapeutic Delivery*, 1 (2010) 109-131.
- Pawar** HA, Banghale B, *Journal of Bioanalysis and Biomedicine*, 7 (2015) 6-12.
- Pethig** R, Douglas K, *Physics in Medicine and Biology*, 32 (1987) 933-970.
- Polonini** HC, Brandão MA, Ferreira AO, Ramos C, Raposo NR, *International Journal of Pharmaceutical Compounding*, 18 (2014) 332-340 a.
- Polonini** HC, Soldati PP, Oliveira MAL de, Brandão MAF, Chaves M das GM, Raposo NRB, *Química Nova*, 37 (2014) 720-727 b.
- Potard** G, Laugel C, Schaefer H, Marty JP, *Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology*, 13 (2000) 336-344.
- Prausnitz** MR, Elias PM, Franz TJ, Schmuth M, Tsai J-C, Menon G, Holleran W, Feingold K, *Dermatology*, 3rd edition, *Elsevier Health Sciences, Philadelphia, United States*, 2012, 2065-2073.
- Rajabalaya** R, Qin CH, David SRN, *International Journal of Drug Delivery*, 4 (2012) 125.
- Rey** J-B, Launay-Vacher V, Scotté F, Krakowski I, Aapro M. *Journal of Clinical Oncology*, 14 (2012) 329-342.
- Roila** F, Herrstedt J, Aapro M, Gralla RJ, Einhorn LH, Ballatori E, Bria E, Clark-Snow R.A, Espersen B.T, Feyer P, Grunerg S.M, Hesketh P.J, Jordan K, Kris M.G, Maranzano E, Molassiotis A, Morrow G, Olver I, Rapoport B.L, Rittenderg C, Saito M, Tonato M, Warr D, *Annals of Oncology*, 21 (2010) 232-243.

- Saini S**, Baghel S, Chauhan SS, *Journal of Advanced Pharmacy Education & Research*, 4 (2014) 31-40.
- Schuetz Y**, Naik A, Guy R, Kalia Y, *Expert Opinion on Drug Delivery*, 2 (2005) 533-548.
- Selvam RP**, Singh AK, Sivakumar T, *International Journal of Pharmaceutical and Biomedical research*, 1 (2010) 1-8.
- Selzer D**, Abdel-Mottaleb MM, Hahn T, Schaefer UF, Neumann D, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65 (2013) 278-294.
- Semalty A**, Semalty M, Rawat MSM, Franceschi F, *Fitoterapia*, 81 (2010) 306-314.
- Sharma S**, Parvez N, Sharma PK, *African Journal of Basic & Applied Sciences*, 7 (2015) 1-7.
- Siewert M**, Dressman J, Brown CK, Shah VP, Aiache J-M, Aoyagi N, Bashaw D, Brown W, Burgess D, *AAPS PharmSciTech*, 4 (2003) 43-52.
- Sintov AC**, Greenberg I, *International Journal of Pharmaceutics*, 471 (2014) 516-524.
- Smith TJ**, Ritter JK, Poklis JL, Fletcher D, Coyne PJ, Dodson P, Parker G, *Journal of Pain and Symptom Management*, 43 (2012) 961-966.
- Swain K**, Pattnaik S, Sahu SC, Mallick S, *Latin American Journal of Pharmacy*, 28 (2009) 706-714.
- Thong HY**, Zhai H, Maibach HI, *Skin Pharmacology and Physiology*, 20 (2007) 272-282.
- Torchilin VP**, *Nature Reviews Drug Discovery*, 4 (2005) 145-160.
- Trauer S**, Lademann J, Knorr F, Richter H, Liebsch M, Rozycki C, Balizs F, Büttemeyer R, Linscheid M, Patzel A, *Skin Pharmacology and Physiology*, 23 (2010) 320-327.
- Trauer S**, Richter H, Kuntsche J, Büttemeyer R, Liebsch M, Linscheid M, Fahr A, Schäfer-Korting M, Lademann J, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 86 (2014) 301-306.
- Tsai JC**, Lin CY, Lo YL, Huang YH, *Pharmaceutical Research*, 20 (2003) 632-638.
- Warr DG**, Hesketh PJ, Gralla RJ, Muss HB, Herrstedt J, Eisenberg PD, Raftopoulos H, Grunberg M, Gabriel M, Rodgers A, Bohidar N, Klinger G, Hustad C, Horgan K, Skobieranda F, *Journal of Clinical Oncology*, 23 (2005) 2822-2830.
- Weschules DJ**, *Journal of Palliative Medicine*, 8 (2005) 1135-1143.
- Wiedersberg S**, Guy RH, *Journal of Controlled Release*, 190 (2014) 150-156.
- Williams A.C**, Barry B.W, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64 (2012) 128-137.
- Willis-Goulet HS**, Schmidt BA, Nicklin CF, Marsella R, Kunkle GA, Tebbett I, *Veterinary Dermatology*, 14 (2003) 83-89.
- Winterfeld U**, Le Heuzey M-F, Acquaviva E, Mouren M-C, Brion F, Bourdon O, *Archives de Pédiatrie*, 16 (2009), 1252-1260.
- Xiao C**, Moore DJ, Flach CR, Mendelsohn R, *Vibrational Spectroscopy*, 38 (2005) 151-158 a.
- Xiao C**, Moore DJ, Rerek ME, Flach CR, Mendelsohn R, *The Society for Investigative Dermatology*, 124 (2005) 622-632 b.
- Zillich OV**, Schweiggert-Weisz U, Hasenkopf K, Eisner P, Kerscher M, *International Journal of Cosmetic Science*, 35 (2013) 491-501.

CHAPITRE 2 :

Développement et validation de méthodes analytiques pour la quantification de l'ondansétron, de la dexaméthasone et de l'aprépitant.

CHAPITRE 2 : Développement et validation de méthodes analytiques pour la quantification de l'ondansétron, de la dexaméthasone et de l'aprépitant

I Introduction

La pharmacotechnie hospitalière est un secteur responsable de la fabrication et du contrôle des préparations dispensées par la PUI (Pharmacie à Usage Intérieur). Ces préparations sont des médicaments répondant aux exigences d'efficacité, de qualité et sécurité et faisant l'objet d'une pharmacovigilance. Elles sont réalisées sur prescription médicale et en l'absence de spécialités pharmaceutiques (AMM et ATU) disponibles ou adaptées. Deux types de préparations pharmaceutiques sont réalisés : les préparations magistrale et hospitalière. La préparation magistrale diffère principalement par son caractère extemporané, sa dispensation à un malade déterminé et sa réalisation faisant partie intégrante des missions habituelles d'une PUI (article 5.5126-8 du CSP). Les préparations hospitalières à l'inverse, sont préparées à l'avance par unité de lot inférieur à 300, dispensées pour plusieurs patients de l'établissement de santé, déclarées obligatoirement auprès de l'ANSM, et nécessitent que la PUI ait reçu une autorisation spécifique et préalable auprès du directeur de l'ARS (articles R.5126-9 du CSP).

Dans tous les cas, la qualité de la préparation est assurée par un contrôle approprié et la mise en place d'un système qualité conformément à la réglementation en vigueur. Depuis les années 2000, les institutions ont travaillé sur des documents spécifiques à la préparation de formulations pharmaceutiques pour assurer la qualité de celles-ci. Parmi eux, sont référencés :

- Les documents opposables :
 - *Les Bonnes Pratiques de Préparation (BPP)* relatives aux préparations magistrales, hospitalières, officinales et préparations rendues nécessaires par les recherches biomédicales dont celles des médicaments expérimentaux (JO du 21/11/2007),
 - *Les Bonnes Pratiques de Pharmacie Hospitalière (BPPH)* relatives à la gestion de la qualité, du personnel, des locaux et du matériel des PUI (arrêté du 22 juin 2001),
 - *Les Pharmacopées européenne et française* (Articles L.5112-1 et 5112-2 du CSP),
 - *Le formulaire national de la pharmacopée* (Articles L.5112-1 et 5112-2 du CSP).
- les documents non opposables :
 - *Les référentiels de certification de la HAS*

- *Les référentiels de la SFPC « Guide méthodologique des études de stabilité des préparations »* (Avril 2013),
- *Le guide européen du comité PIC/S* (Guide to good practices for the preparation of medicinal products in healthcare establishments) publié en mars 2008 relatif aux bonnes pratiques de préparation des médicaments dans les établissements de santé qui permet de compléter les BPP françaises.

Après réalisation, toute préparation terminée fait l'objet d'un contrôle. Ces contrôles garantissent que les analyses nécessaires et appropriées ont réellement été effectuées et que la préparation dispensée est de qualité satisfaisante. Dans la pharmacopée européenne, la méthode de dosage du principe actif et de ses impuretés fait référence à une méthode séparative en chromatographie (Pharmacopée Européenne, version 8.5 - a, b et c). Toutefois, d'autres méthodes de dosages pour contrôler la teneur des PA dans la préparation finie sont décrites dans le formulaire national de la pharmacopée française tel que le titrage acido-basique (ex : pommade à l'acide salicylique) ou encore la spectrométrie d'absorption UV (gélules de chlorhydrate d'amiodarone).

Par ailleurs, lors du développement d'une nouvelle forme galénique, il est nécessaire de définir ces conditions de stabilité. C'est pourquoi une méthode chromatographique conventionnelle est généralement développée. Toutefois, une fois l'étude de faisabilité terminée et la durée de stabilité définie, il est possible de simplifier le contrôle de routine par des méthodes de dosages tout aussi pertinentes mais moins coûteuses, moins chronophages telle que la spectroscopie.

Quelques méthodes séparatives en Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP) ont été développées pour quantifier l'ondansétron (Dépôt, 1997 ; Sheshala, 2009 ; Moreira, 2010), l'aprépitant (Sreekanth, 2011 ; Constanzer, 2004 ; Chavez-Eng, 2004 ; Wu, 2009) et la dexaméthasone (Grippa, 2000 ; Frerichs, 2004 ; Luo, 2005 ; Deventer, 2003 ; McCrea, 2003). Toutefois, ces méthodes ne permettent pas de quantifier simultanément ces trois antiémétiques.

Ce chapitre décrit les méthodes analytiques développées au laboratoire afin de quantifier les trois antiémétiques dans les formulations préparées afin de vérifier leur conformité. Elles devront également permettre le suivi de la cinétique de libération et de perméation des PA formulés dans les différents véhicules et de ce fait leur dosage dans différents milieux de diffusion

Dans un premier temps, deux méthodes analytiques ont été développées au laboratoire, puis validées, pour le dosage des trois principes actifs, à savoir l'ondansétron (ond), la dexaméthasone (dex) et l'aprépitant (apt), dans les formes préparées :

- une méthode utilisant la CLHP couplée à une détection UV
- une méthode utilisant la UV/PLS : méthode spectroscopique UV qui met en œuvre un algorithme issu d'un traitement mathématique par régression linéaire multiple, la PLS (Partial Least Square). Il s'agit d'une méthode non séparative qui permet de quantifier simultanément les trois principes actifs. A titre d'exemple, cette dernière a été appliquée au dosage des PA dans l'organogel pluronique à base de lécithine (PLO®).

Une forme galénique à base de PLO®, contenant les trois PA, a finalement été dosée à l'aide de ces deux méthodes orthogonales afin de comparer leur capacité prédictive et de valider leur application en routine pour contrôler la teneur des PA dans les formes transdermiques.

Dans un deuxième temps, la faisabilité du dosage des PA par la méthode CLHP/UV dans le cadre des études cinétiques a été évaluée. Des essais préliminaires ont montré la nécessité d'adapter la méthode séparative pour doser l'aprépitant par couplage à un spectromètre de masse.

II Méthodes analytiques pour le contrôle qualité de la préparation

II.1 CLHP/UV

II.1.1 Matériel et Méthodes

II.1.1.a Réactifs et Solvants

➤ **Analytes**

Les principes actifs et leurs étalons internes proviennent des fournisseurs suivants :

- Ondansétron : Biotrend (Zurich, Suisse)
- Dexaméthasone : Inresa (Bartenheim, Allemagne)
- Aprépitant : Focus Synthesis LLC (San Diego, Etats-Unis)
- Chlorhydrate d'hydrocortisone : Coopération pharmaceutique française (Melun, France)
- Métoprolol : Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, Canada)
- Lopéramide : Sigma Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France)

➤ **Véhicules**

Cinq véhicules ont été gracieusement fournis par la société Fagron :

- Trois crèmes hydrophiles liposomales : le Pentravan®, le Pentravan® Plus et le Lipovan®
- Une crème hydrophile à base de phytosomes : le Phytobase®
- Un organogel à base de lécithine pluronique : le PLO®

➤ Solvants

L'acétonitrile (VWR, Val de Fontenay, France) et l'éthanol (LiChrosolv Darmstadt, Allemagne) sont de qualité analytique. L'eau a été produite par un système de purification d'eau Milli-Q Waters 18 MΩ de chez Millipore (Saint-Quentin en Yvelines, France). L'acide formique (Prolabo, Val de Fontenay, France) a été utilisé comme adjuvant de la phase mobile.

II.1.1.b Instrumentation et protocoles opératoires

Afin de pouvoir doser simultanément les trois antiémétiques dans chacun des véhicules, une méthode de dosage par chromatographie liquide haute performance en polarité de phase inversée et couplée à une détection UV (CLHP/UV) a été développée. Le système expérimental chromatographique utilisé présente les caractéristiques suivantes :

- Chaîne : Waters (Milfors, MA, USA) équipée d'une pompe quaternaire, d'un dégazeur en ligne, d'un détecteur UV à barrettes de diodes 996.
- Logiciel de traitement : Empower v.2 (Waters)

Les conditions opératoires retenues après optimisation sont les suivantes :

- Colonne : Core shell Kinetex C18 (100 x 4,60 mm de diamètre interne, 2,6 μm de granulométrie) fournie par Phenomenex (Le Pecq, France)
- Phase mobile : mélange de [A] 0,1% HCOOH dans H₂O et de [B] 0,1% HCOOH dans ACN selon le gradient suivant ([figure II.1](#)) :

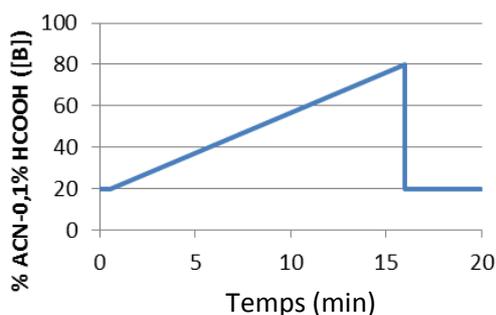


Figure II.1: Gradient d'élution pour le dosage des principes actifs.

- Débit : 1 mL/min
- Volume d'injection : 20 μL
- Température : 25°C
- Longueurs d'onde de détection : 310 nm pour l'ondansétron et la métoclopramide
265 nm pour les autres composés
- Composition du solvant d'échantillonnage : EtOH/H₂O – (20/80 - v/v).

II.1.1.c Validation de la méthode CLHP/UV

La méthode analytique a été validée selon les recommandations de la Société Française des Sciences Techniques et Pharmaceutiques SFSTP (Hubert, 2004 ; Hubert 2007 a et b). Elle repose sur l'élaboration de standards de calibration et de validation. Chaque standard se compose de la matrice diluée, des trois antiémétiques (l'ondansétron, la dexaméthasone et l'aprépitant), et de leurs étalons internes respectifs (le métoclopramide, l'hydrocortisone et le lopéramide) dont les structures sont présentées dans le [tableau II.2](#).

➤ Standards de calibration et de validation

Des solutions mères de chaque PA et des étalons internes à 1000 mg.L⁻¹ ont été préparées dans l'éthanol. Une solution de matrice a été obtenue par mise en suspension du véhicule dans de l'éthanol (dilution au 1/50^{ème} (m/m)), suivie d'une sonication pendant 15 min dans un bain à ultrasons et d'une filtration sur un filtre seringue PTFE de 0,45 µm (Alltech, Templemars, France).

Ces solutions mères ont été utilisées pour préparer 400 µL de chaque solution standard dans un mélange hydro-alcoolique EtOH/H₂O (20/80 – v/v) ([tableau II.1](#)), contenant au final :

- la matrice diluée à 0,033% (m/m),
- une concentration en étalon interne fixée à 3, 10 et 30 mg.L⁻¹, respectivement, pour l'hydrocortisone (Hyd), la métoclopramide (Met) et le lopéramide (Lop),
- une concentration variable en PA.

Tableau II.1 : Composition des standards de calibration (A) et de validation (B)

	(A) - Standards de calibration							
	Sol 1	Sol 2	Sol 3	Sol 4	Sol 5	Sol 6	Sol 7	Sol 8
[Ond] (mg.L ⁻¹)	0,05	0,10	0,75	1,50	3,00	6,00	9,00	12,00
[Met] (mg.L ⁻¹)	10	10	10	10	10	10	10	10
[Dex] (mg.L ⁻¹)	0,20	0,40	0,80	1,00	1,50	2,00	3,00	4,00
[Hyd] (mg.L ⁻¹)	3	3	3	3	3	3	3	3
[Apt] (mg.L ⁻¹)	1	2	4	8	16	25	32	40
[Lop] (mg.L ⁻¹)	30	30	30	30	30	30	30	30

	(B) - Standards de validation			
	QC 1 (bas)	QC 2 (médian 1)	QC 3 (médian 2)	QC 4 (haut)
[Ond] (mg.L⁻¹)	0,2	1,0	5,0	10,0
[Met] (mg.L ⁻¹)	10	10	10	10
[Dex] (mg.L⁻¹)	0,30	0,90	1,75	3,50
[Hyd] (mg.L ⁻¹)	3	3	3	3
[Apt] (mg.L⁻¹)	1,5	6,0	20	35
[Lop] (mg.L ⁻¹)	30	30	30	30

➤ Méthode de validation

La validation de la méthode CLHP a été menée sur trois jours consécutifs. Chaque jour, un blanc, une série de standards de calibration et quatre standards de validation préparés en triplicat sont analysés.

La spécificité, la fonction de réponse, la linéarité, la justesse, la fidélité et la limite de quantification ont été étudiées et le profil d'exactitude a été construit avec des limites d'acceptation fixées à $\pm 10\%$ au risque statistique de 5%.

II.1.2 Résultats et Discussion

II.1.2.a Optimisation de la méthode séparative

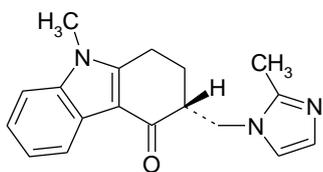
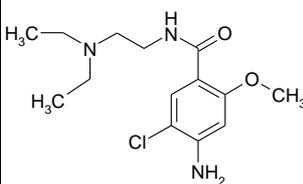
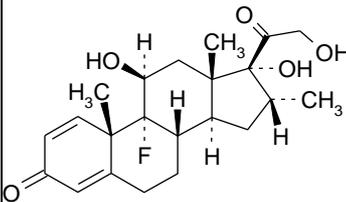
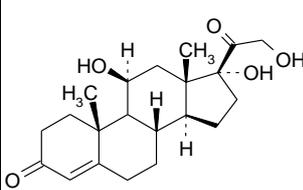
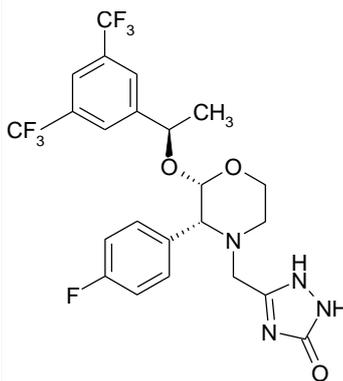
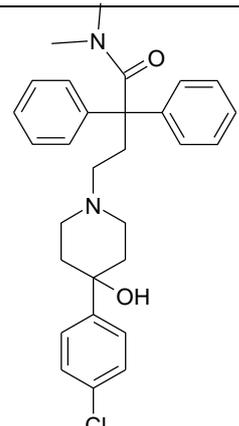
A ce jour, aucune méthode analytique n'a été publiée pour le dosage simultané de l'Ond, de la Dex et de l'Apt. Notre objectif a donc été de développer une méthode chromatographique permettant de doser simultanément ces trois principes actifs :

- dans les formes galéniques finies ou lors d'études cinétiques *in vitro* par couplage à une détection en spectrophotométrie UV,
- dans des milieux biologiques lors d'études de pharmacocinétiques *in vivo* par couplage à une détection en spectrométrie de masse (couplage envisagé pour la suite de l'étude).

Les conditions de séparation ont été définies afin d'être compatibles avec les deux modes de détection et les applications précédemment citées. Ainsi, nous avons fait le choix d'introduire un acide volatil dans la phase mobile en vue de favoriser l'ionisation des molécules lors du futur couplage du système chromatographique à un spectromètre de masse. Par ailleurs, le dosage d'échantillons biologiques nécessitant un pré-traitement, nous avons dosé les échantillons par étalonnage interne. Compte tenu des différences structurales importantes entre les PA à doser et

entre leurs propriétés physico-chimiques telles que leur capacité d'ionisation (pKa) ou encore leur caractère hydrophobe (log P), un étalon interne propre à chaque antiémétique a été utilisé (tableau II.2). Une étude préliminaire nous a conduits à sélectionner le métoclopramide, l'hydrocortisone et le lopéramide comme étalons internes respectifs de l'ondansétron, de la dexaméthasone et de l'aprépitant.

Tableau II.2 : Structure chimique des principes actifs et de leurs étalons internes respectifs

Principes Actifs d'intérêt	Structures chimiques	Etalons internes	Structures chimiques
<p>Ondansétron</p> <p>Log P : 2,00</p> <p>pKa : 7,6</p> <p>MM : 293 g.mol⁻¹</p> <p>λ_{max}* : 310 nm</p>		<p>Métoclopramide</p> <p>Log P : 2,62</p> <p>pKa : 9,3</p> <p>MM : 300 g.mol⁻¹</p> <p>λ_{max}* : 310 nm</p>	
<p>Dexaméthasone</p> <p>Log P : 1,83</p> <p>pKa : 13,5</p> <p>MM : 392 g.mol⁻¹</p> <p>λ_{max}* : 243 nm</p>		<p>Hydrocortisone</p> <p>Log P : 1,61</p> <p>pKa : 12,6</p> <p>MM : 362 g.mol⁻¹</p> <p>λ_{max}* : 245 nm</p>	
<p>Aprépitant</p> <p>Log P : 4,80</p> <p>pKa : 9,7</p> <p>MM : 534 g.mol⁻¹</p> <p>λ_{max}* : 265 nm</p>		<p>Lopéramide</p> <p>Log P : 5,50</p> <p>pKa : 13,2</p> <p>MM : 477 g.mol⁻¹</p> <p>λ_{max}* : 262 nm</p>	

*données obtenues dans un solvant EtOH/H₂O (50/50-v/v)

A partir des données de la littérature, la séparation des trois antiémétiques et de leurs étalons internes a été menée par CLHP/UV à l'aide d'une phase stationnaire de type C18 et d'une phase mobile constituée d'un mélange acétonitrile/eau contenant 0,1% d'acide formique. L'optimisation de

la séparation a été menée à l'aide d'un échantillon reconstitué contenant les trois antiémétiques et leurs étalons internes, et la matrice diluée à 0,033% (m/m), dans un mélange EtOH/H₂O-20/80 (v/v). Trois paramètres ont ainsi été optimisés : la proportion d'acétonitrile dans la phase mobile, le gradient d'élution et la température.

L'objectif de cette optimisation a été de séparer les trois antiémétiques, leurs étalons internes et les résidus issus du véhicule (matrice) en un minimum de temps. Deux paramètres ont été suivis pour apprécier la qualité de la séparation :

- La résolution (R_s), dont la valeur doit être supérieure à 1,5 pour présager d'une séparation complète entre deux composés,
- Le facteur de rétention (k') dont la valeur doit être inférieure à 10 pour éluer les composés dans un temps d'analyse acceptable.

➤ **Proportion d'acétonitrile dans la phase mobile**

En chromatographie de partage à polarité de phase inversée, le pourcentage de solvant organique contenu dans la phase mobile joue un rôle primordial sur la rétention des solutés. L'influence du pourcentage d'acétonitrile a tout d'abord été étudiée, en mode isocratique, dans une gamme allant de 20 à 60%. Les résultats obtenus en terme de résolution et de facteur de rétention sont présentés sur les figures II.2A et II.2B, respectivement.

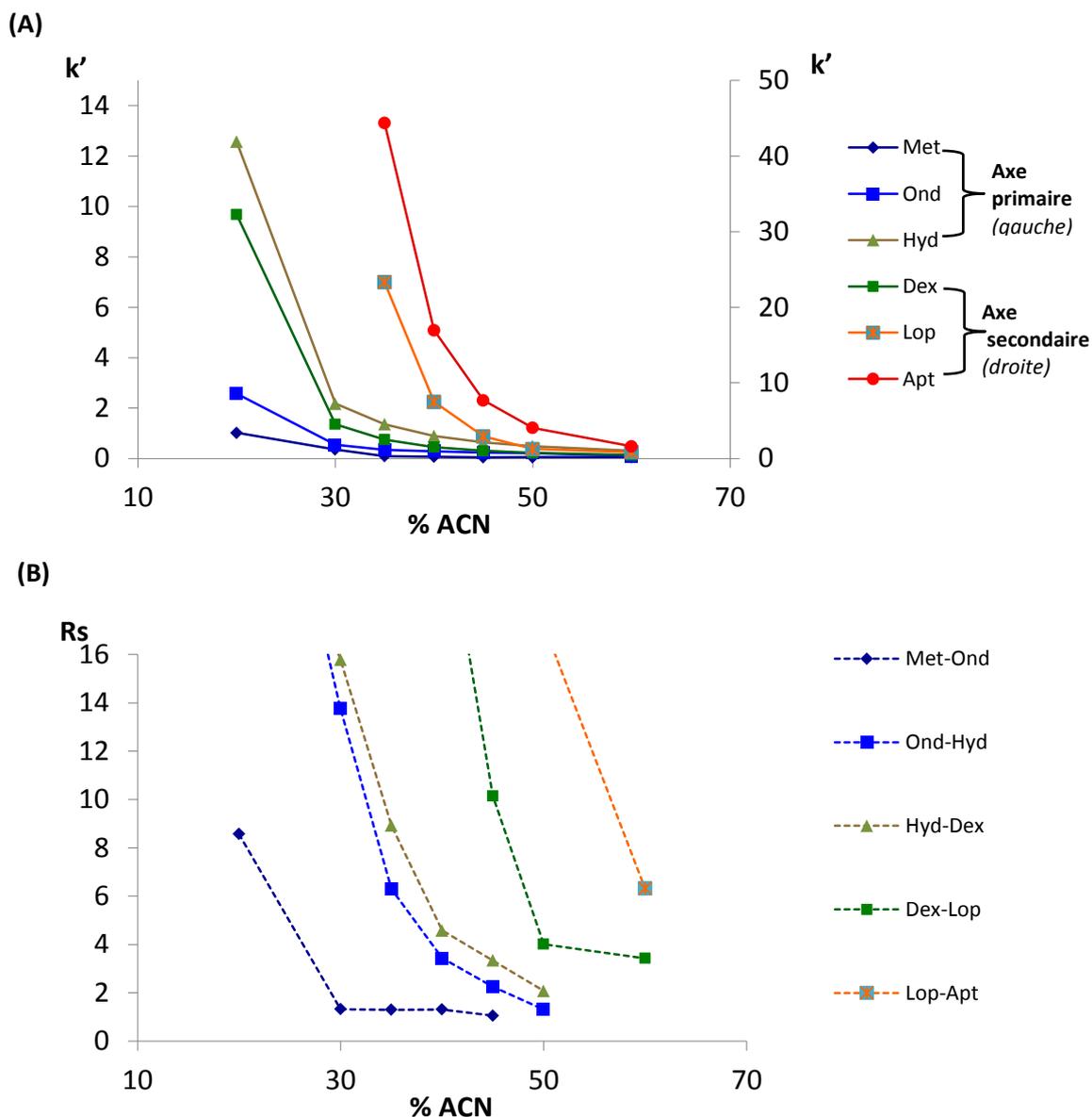


Figure II.2 : Facteur de rétention (A) et résolution (B) des analytes élués en fonction du pourcentage d'ACN

Conditions : phase stationnaire C18 (100 x 4,6 mm ; 5 μ m) ; phase mobile : ACN/H₂O à 0,1 % d'HCOOH en mode isocratique ; 1 mL.min⁻¹, 25 °C, volume d'injection : 20 μ L ; λ = 265 nm et 310 nm.

Quelle que soit la teneur en ACN dans la phase mobile, l'ordre d'élution reste inchangé : 1) Met, 2) Ond, 3) Hyd, 4) Dex, 5) Lop et 6) Apt. Par ailleurs, quel que soit le pourcentage d'acétonitrile, les valeurs de k' observées pour les trois analytes d'intérêts sont toujours très différentes. Par exemple, l'ACN à 35 % induit des facteurs de rétention k' pour l'Ond, la Dex et l'Apt respectivement de 0,34 ; 2,51 et 44,39. Dans ces conditions, l'Ond est peu retenu contrairement à l'Apt. Par ailleurs, dans ces conditions, la séparation du métoprololamide et de l'ondansétron n'est pas suffisante ($R_s < 1,5$). La séparation de l'ensemble des composés est donc impossible en mode isocratique. De ce fait, un gradient d'élution a été mis au point en s'appuyant sur les données obtenues. Le

chromatogramme représentatif de la séparation et le gradient d'élution utilisé sont présentés sur la figure II.3.

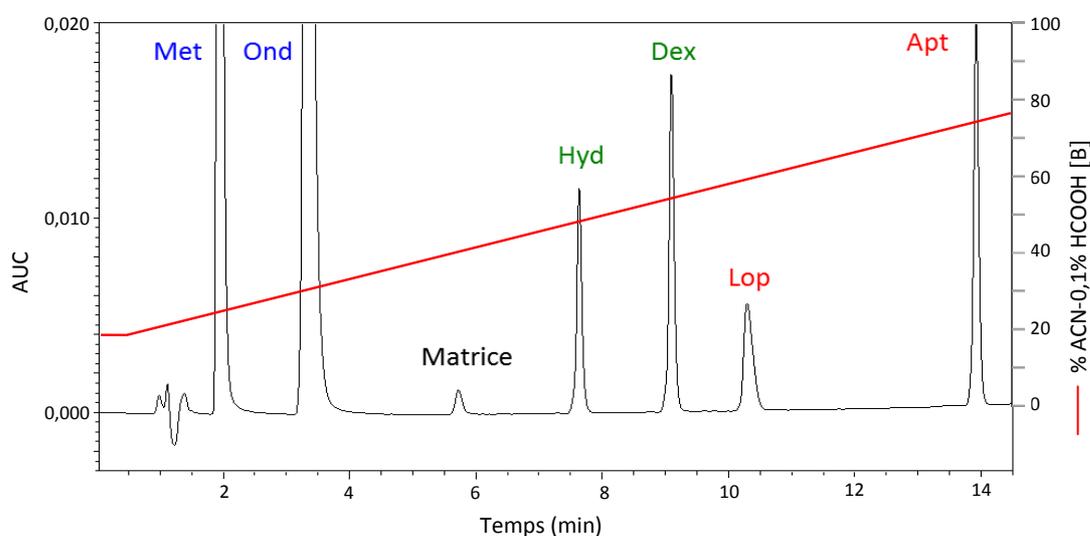


Figure II.3 : Chromatogramme obtenu dans les conditions optimisées pour l'analyse d'une formulation contenant les trois antiémétiques

Conditions : phase stationnaire C18 (100 x 4,6 mm ; 5 μ m) ; phase mobile : ACN/H₂O à 0,1% d'HCOOH en mode gradient d'élution ; 1 mL.min⁻¹, 25 °C, volume d'injection : 20 μ L ; λ = 265 nm et 310 nm.

Le gradient d'élution mis au point a permis d'améliorer la séparation du métoclopramide et de l'ondansétron (R_s = 2,52) tout en conservant un temps d'analyse raisonnable (< 15 min).

➤ Température de la colonne

L'influence de la température sur la séparation a ensuite été étudiée. La colonne a été successivement thermostatée aux températures suivantes : 20, 25, 30, 35 et 40 °C. Notons, qu'après chaque changement de température, une mise à l'équilibre de 45 minutes a été nécessaire avant de procéder à l'injection suivante. Aucune modification significative des temps de rétention n'a été observée. La symétrie des pics augmentant très légèrement avec la température et étant satisfaisante sur l'ensemble des températures étudiées, la température de la colonne a été maintenue à 25°C.

En conclusion, une séparation optimale est obtenue à 25°C et à un débit de 1 mL.min⁻¹, en utilisant le gradient d'élution suivant :

- 1) mélange de solvant A et B à 80/20 (v/v) de 0 à 0,5 min
- 2) augmentation linéaire du pourcentage de B à 80 % de 0,5 à 16 min.

avec A : H₂O à 0,1% d'HCOOH et B : ACN à 0,1% d'HCOOH.

Dans ces conditions, les antiémétiques et leurs étalons internes respectifs sont élués en moins de 15 min avec une résolution comprise entre 2,52 et 9,49.

II.1.2.b Validation de la méthode de dosage

L'objectif de la validation d'une méthode de dosage est de garantir que la concentration qui sera déterminée ultérieurement en routine, sera suffisamment proche de la « vraie concentration » de l'échantillon inconnu ou du moins dans une limite acceptable.

La méthode a été validée selon les recommandations de la Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques. Ces recommandations sont basées sur l'étude de l'exactitude, aussi appelée « erreur totale », qui représente la somme des erreurs systématiques (justesse) et aléatoire (fidélité) obtenues à partir de l'analyse des standards de validation. L'erreur totale décrit la différence entre la valeur vraie et la valeur calculée pour chaque standard de validation. Elle est représentée par l'intervalle de tolérance sur le profil d'exactitude qui est un outil graphique décisionnel permettant d'assurer la qualité de la méthode analytique. Pour rappel, notre méthode a été validée avec des limites d'acceptabilité fixées à $\pm 10\%$ pour un risque d'erreur fixé à 5%.

➤ **Spécificité**

Dans un premier temps, la spécificité de la méthode a été évaluée afin de s'assurer que dans les conditions d'analyses précédemment développées, les composés présents dans la matrice, issus du véhicule, ne sont pas co-élués avec les six analytes (3 PA et leurs étalons internes). Cette étude a été menée pour les cinq véhicules utilisés pour préparer les formes galéniques, en comparant, pour chacun d'eux, les chromatogrammes obtenus lors de l'injection d'un blanc matriciel contenant la matrice diluée à 0,033% et de cette même solution additionnée des trois antiémétiques d'intérêt et de leurs étalons internes respectifs.

A 265 nm, la matrice ainsi que les six composés sont détectés. Toutefois, dans le cas du PLO® (figure II.4), l'étalon interne choisi pour doser l'ondansétron, à savoir le métoclopramide, est co-élué avec un des composés présents dans la matrice ($t_r = 1,9$ min). Cette co-élution rend donc impossible le dosage de l'ondansétron à 265 nm. En revanche, à 310 nm, seuls l'ondansétron et le métoclopramide étant détectés, cette longueur d'onde a été sélectionnée pour doser ces analytes.

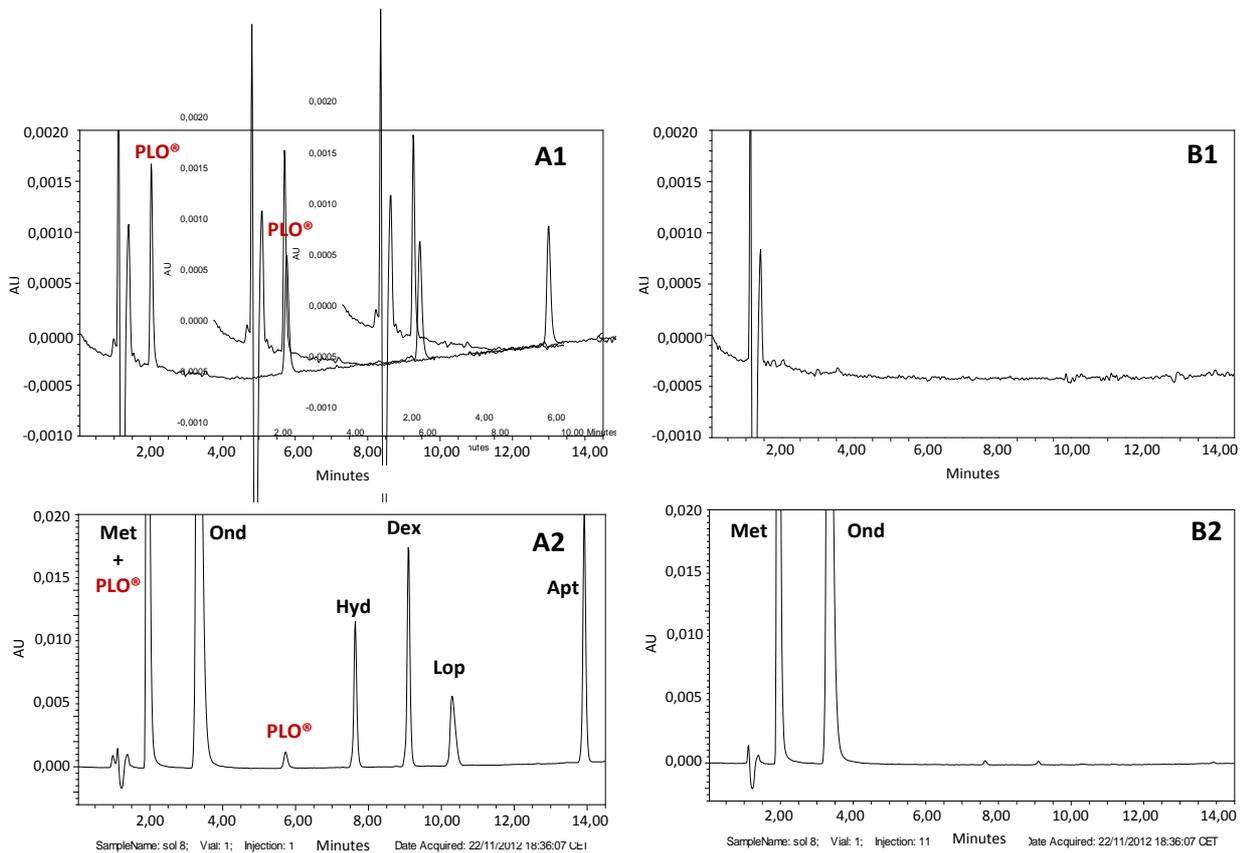


Figure II.4 : Spécificité obtenue à 2 longueurs d'onde de détection (310 et 265 nm)

Blanc matriciel (PLO® dilué à 0,033% (m/m) dans un mélange EtOH/H₂O – 20/80 (v/v))

- détecté à 265 nm (A1)
- détecté à 310 nm (B1)

Standard de calibration : [Ond], [Dex], [Apt], [Met], [Hyd] et [Lop], respectivement égales à 12 mg.L⁻¹, 4 mg.L⁻¹, 40 mg.L⁻¹, 10 mg.L⁻¹, 3mg.L⁻¹ et 30 mg.L⁻¹ dans le PLO® dilué à 0,033% (m/m) dans un mélange EtOH/H₂O – 20/80 (v/v)

- détecté à 265 nm (A2)
- détecté à 310 nm (B2)

Toutefois, pour le dosage de la dexaméthasone et de l'aprépitant, la spécificité de la méthode est vérifiée à 265 nm, longueur d'onde qui a été utilisée pour doser ces deux PA. Les quatre autres matrices absorbent également à 265 nm mais ne présentent aucun chevauchement chromatographique avec les six analytes.

➤ Erreur de prédiction de la méthode

Chaque jour, et ce pendant trois jours consécutifs, une série de huit standards de calibration et quatre standards de validation (en triplicat) ont été préparés et analysés. Les résultats obtenus après exploitation des données expérimentales exprimant la fonction de réponse, la linéarité, la justesse, la fidélité et l'exactitude sont détaillés dans le [tableau II.3](#) et seront commentés dans les paragraphes suivants.

Tableau II.3 : Paramètres de validation de la méthode CLHP/UV

Paramètres de validation	Ond		Dex		Apt	
Fonction de réponse f(x) R ²	y=0,1191x - 0,0439 0,999 ± 0,001		y=0,4210x + 0,0024 0,999 ± 0,001		y=0,0504x - 0,0012 0,995 ± 0,006	
Linéarité Pente y interception R ²	1,002 0,019 0,999 ± 0,001		1,001 -0,004 0,999 ± 0,001		0,999 0,037 0,995 ± 0,006	
Justesse	<i>C calculée</i> (mg.L ⁻¹)	<i>Biais relatif</i> (%)	<i>C calculée</i> (mg.L ⁻¹)	<i>Biais relatif</i> (%)	<i>C calculée</i> (mg.L ⁻¹)	<i>Biais relatif</i> (%)
QC1	0,21 ;	4,83	0,30 ;	-1,53	1,70 ;	13,63
QC2	0,99 ;	-0,66	0,86 ;	-4,65	5,77 ;	-3,87
QC3	4,96 ;	-0,80	1,72 ;	-1,91	20,91 ;	4,55
QC4	10,38 ;	3,80	3,65 ;	4,35	35,30 ;	-0,33
Fidélité	<i>Répétabilité</i> (% CV)	<i>Fidélité intermédiaire</i> (% CV)	<i>Répétabilité</i> (% CV)	<i>Fidélité intermédiaire</i> (% CV)	<i>Répétabilité</i> (% CV)	<i>Fidélité intermédiaire</i> (% CV)
QC1	2,01 ;	2,01	4,11 ;	4,71	6,34 ;	14,88
QC2	3,11 ;	9,71	0,68 ;	0,68	1,65 ;	1,65
QC3	2,32 ;	3,80	1,17 ;	2,17	0,94 ;	0,94
QC4	4,66 ;	6,47	2,76 ;	3,75	4,58 ;	7,55
Exactitude (Intervalle de Tolérance 95 %)	<i>Limite basse</i>	<i>Limite haute</i>	<i>Limite basse</i>	<i>Limite haute</i>	<i>Limite basse</i>	<i>Limite haute</i>
QC1	2,77 ;	6,89	-4,36 ;	1,31	8,18 ;	19,70
QC2	-6,51 ;	5,19	-6,58 ;	-2,73	-5,89 ;	-1,85
QC3	-4,08 ;	2,49	-4,87 ;	1,05	2,60 ;	6,51
QC4	0,49 ;	7,11	1,20 ;	7,51	-4,34 ;	3,67

➤ Fonction de réponse

La fonction de réponse traduit, à l'intérieur de l'intervalle de dosage, la relation existant entre la réponse (rapport de l'aire du pic du PA sur celle de son EI (A_{PA}/A_{EI})) et la concentration en PA dans l'échantillon.

Chaque jour, une série de huit standards de calibration a été analysée. L'intervalle de dosage pour chaque antiémétique a été préalablement défini selon l'approche suivante. Le niveau inférieur de la gamme d'étalonnage a été déterminé par l'estimation préliminaire de la limite de quantification, définie comme la concentration en PA dont le rapport entre la hauteur du signal sur l'amplitude du bruit de fond est égal à 10. Les concentrations basses des standards de calibration pour l'Ond, la Dex et l'Apt sont respectivement égales à 0,05 ; 0,2 et 1 mg.L⁻¹. Le niveau supérieur a été déterminé en fonction de la teneur des PA ciblée dans les formulations. Les concentrations hautes des standards de calibration pour l'Ond, la Dex et l'Apt sont respectivement égales à 10, 4 et 45 mg.L⁻¹.

Pour chacun des trois PA, on constate que la fonction de réponse est une droite dont le coefficient de détermination R² est supérieur à 0,995 (tableau II.3).

➤ **Linéarité**

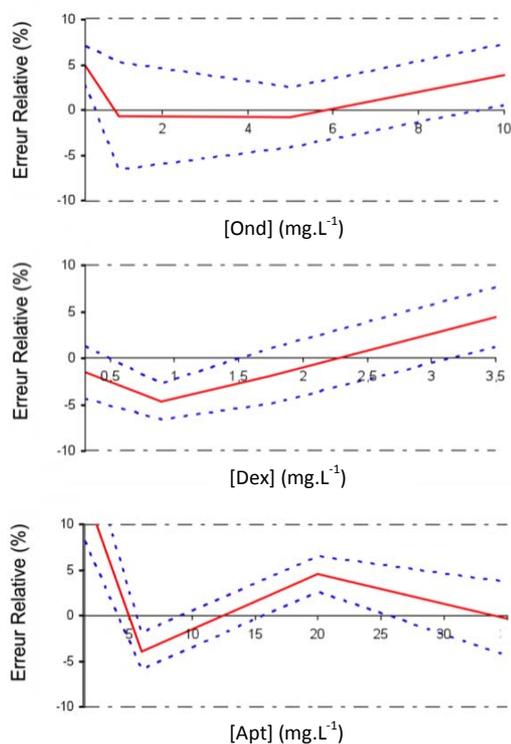
La linéarité est la capacité, à l'intérieur de l'intervalle de dosage défini, d'obtenir des résultats de quantification directement proportionnels à la concentration réelle en PA dans l'échantillon. Elle a été évaluée à partir des standards de calibration dont les concentrations ont été calculées à partir des fonctions de réponse. Les droites obtenues ($R^2 > 0,995$), leurs pentes proches de 1 et les ordonnées à l'origine proches de zéro (tableau II.3) confirment la linéarité de la méthode pour chacun des trois PA.

➤ **Exactitude : justesse et fidélité**

L'exactitude de la méthode a été évaluée à partir de l'erreur totale (erreur systématique + erreur aléatoire) lors de la construction du profil d'exactitude. La justesse (erreur systématique) et la fidélité (erreur aléatoire) sont en effet les deux paramètres qui permettent de juger de l'exactitude de la méthode. Leur évaluation est donc nécessaire. Dans le cas présent, la justesse exprime l'étroitesse de l'accord entre une concentration moyenne obtenue à partir d'une série de dosages d'un standard de validation (QC) et la concentration réelle. Elle est évaluée par le calcul du biais relatif. La fidélité exprime l'étroitesse de l'accord (degré de dispersion) entre une série de mesures provenant de multiples prises provenant d'un échantillon homogène (Hubert, 2004 ; Hubert, 2007 a et b). Le calcul d'un coefficient de variation permet de matérialiser la fidélité.

Cette évaluation a été menée sur trois jours, à l'aide de quatre standards de validation préparés en triplicat. Les concentrations des standards de validation ont été recalculées à partir des fonctions de réponses afin d'apprécier la justesse et la fidélité intermédiaire de la méthode.

Pour l'ondansétron et la dexaméthasone, les biais relatifs sont compris entre -4,65% et 4,83% (tableau II.3). La fidélité de la méthode (répétabilité et fidélité intermédiaire) est représentée par les coefficients de variation (CV) inférieurs à 9,71%. A partir de ces résultats, les limites de tolérance hautes et basses des standards de validation ont été déterminées et les profils d'exactitude ont pu être établis. Comme l'illustre la figure II.5, quel que soit le niveau de concentration, l'intervalle de tolérance ($\beta = 5\%$) est inclus dans la limite d'acceptabilité fixée à $\pm 10\%$ pour l'ondansétron et la dexaméthasone. Il y a donc 5% de risque que l'erreur totale sur la valeur vraie analysée soit supérieure à 10%. La méthode est donc validée pour le dosage de ces composés sur la gamme de concentrations étudiée.



--- Intervalle de tolérance (au risque statistique de 5%) ; - - - limite d'acceptation (fixée à $\pm 10\%$) ; — biais

Figure II.5 : Profils d'exactitude des trois PA par analyse en CLHP/UV

Concernant l'aprépitant, l'intervalle de tolérance se trouve en dehors des limites d'acceptation aux faibles concentrations. Ainsi, la limite de quantification de l'aprépitant a pu être calculée à partir du point d'intersection entre la limite haute d'acceptabilité et l'intervalle de tolérance ; elle est égale à $3,5 \text{ mg.L}^{-1}$.

La méthode a été validée sur les gammes de concentration $0,3 - 3,5 \text{ mg.L}^{-1}$ et $0,2 - 10 \text{ mg.L}^{-1}$ pour la dexaméthasone et l'ondansétron, respectivement (gammes correspondantes aux concentrations extrêmes des standards de validation). Dans le cas de l'aprépitant, la méthode de dosage a été validée sur une gamme de concentrations allant de $3,5$ à 35 mg.L^{-1} .

II.2 L'UV/PLS

II.2.1 Intérêt de la régression UV/PLS

La spectroscopie UV est couramment utilisée comme méthode directe univariée pour mesurer l'absorbance d'un analyte à une seule longueur d'onde donnée. L'application de la loi de Beer-Lambert permet de déterminer la concentration de l'analyte qui est proportionnelle à l'absorbance et au trajet optique parcouru selon la relation :

$$A = \epsilon \cdot l \cdot C \quad (\text{équation II.1})$$

où l est la longueur du trajet optique (épaisseur de la cuve, en cm), C la concentration de l'analyte (mol.L^{-1}) et ϵ , le coefficient d'extinction molaire ($\text{L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) propre à chaque composé et pour une longueur d'onde λ .

Le dosage simultané de plusieurs analytes se complique lorsque ceux-ci sont présents en mélange et lorsque plusieurs composés absorbent sur le même intervalle spectral. Dans ce cas, si aucune longueur d'onde n'est spécifique à un analyte et il est nécessaire d'avoir recours à un modèle multivarié qui répond à la loi d'additivité de Beer-Lambert :

$$A_{(\lambda_i)} = A_{\text{ond}(\lambda_i)} + A_{\text{dex}(\lambda_i)} + A_{\text{apt}(\lambda_i)} \quad (\text{équation II.2})$$

Il existe de nombreux modèles multivariés tels que l'Analyse en Composante Principale (ACP), la Régression en Composante Principale (PCR) ou encore la Régression par les moindres carrés (PLS) (Thomas, 1990 ; Haaland 1988). L'application de la PLS à des mesures spectroscopiques a été développée dans les années 1985 par H.Wold (Wold, 1985). A ce jour, elle a prouvé son réel intérêt pour le dosage de plusieurs principes actifs dans une préparation pharmaceutique par spectroscopie UV (Lopez, 2003 ; Sena, 2004, Rezaei, 2006 ; Secq, 2009 ; Sarlak, 2011 ; Gupta, 2012).

Un retraitement mathématique des mesures d'absorbance par PLS consiste sur une gamme spectrale définie, à décomposer le spectre d'un mélange d'analytes en réattribuant pour chaque λ , l'absorbance de chaque analyte corrélée à sa propre concentration dans le mélange. Cette méthode nécessite la construction de deux blocs matriciels X et Y reliés entre eux par la relation :

$$Y = BX + E \quad (\text{équation II.3})$$

- où
- X matrice de dimensions $n \times p$: **matrice des variables explicatives x**
 - Y matrice de dimensions $n \times c$: **matrice des variables à expliquer y**
 - B = matrice de dimensions $p \times c$: **matrice des coefficients de régression pour X**
(matrice de prédiction définissant les combinaisons linéaires)
 - E = matrice de dimensions $n \times c$: **matrice des résidus**

Dans le cas de notre étude, le bloc matriciel X est composé de variables explicatives, indépendantes, correspondant aux valeurs d'absorbance mesurées à chaque λ et pour chaque mélange ternaire préparé (n mélanges au total). La matrice Y regroupe les variables à expliquer, dépendantes ; à savoir la concentration de chaque analyte dans les n échantillons préparés. Ces deux blocs ont autant de lignes n qu'il y a de mélanges étudiés et autant de colonnes Y et X, qu'il y a, respectivement, d'analytes à doser et de λ enregistrées (tableau II.4).

Tableau II.4 : Exemple des blocs matriciels X et Y obtenus après enregistrement des données spectrales

33 mélanges ($i=1 \rightarrow n$) contenant 3 principes actifs ($k=1 \rightarrow q$) : l'ondansétron (Ond), la dexaméthasone (Dex) et l'aprépitant (Apt) à des concentrations différentes et dont les absorbances UV sont enregistrées à chaque λ ($j=1 \rightarrow p$),

		$k = 1 \longrightarrow q$			$j = 1 \longrightarrow p$				
		[Ond] (mg.L ⁻¹)	[Dex] (mg.L ⁻¹)	[Apt] (mg.L ⁻¹)	Abs à 200 nm	Abs à 200,5 nm	.	.	Abs à 340 nm
$i = 1$ ↓ n	N°1	2	2	10	1,8735	2,0468	.	.	0,0030
	N°2	2	2	35	0,9120	0,9775	.	.	0,0141

	N°33	18	10	60	1,2941	1,4352	.	.	0,0143

⏟

Bloc Y = variables dépendantes
(n x p) = variables à expliquer

⏟

Bloc X = variables indépendantes
(n x p) = variables explicatives

Le traitement des données peut se faire à l'aide de plusieurs logiciels de statistiques disposant d'un module de PLS. On distingue SIMCA-P pour windows développé par le fondateur de la méthode (édité par Umetrics), Statistica (Statsoft Inc.), Unscrambler (Camo AS), SAS/Stat (SAS institute) ou Xlstat (Addinsoft).

II.2.1.a Construction du modèle de régression UV/PLS et évaluation de sa qualité prédictive

Afin d'expliquer simultanément plusieurs variables réponses Y, à savoir la concentration en ondansétron, dexaméthasone et aprépitant dans une même formulation, la construction d'un modèle PLS 2 a été réalisé.

➤ Détermination du nombre de composantes

La première étape du retraitement PLS consiste à réduire l'espace multidimensionnel des matrices X et Y en déterminant un nombre optimal de composantes (h).

Chaque composante résulte de la combinaison linéaire de variables explicatives, c'est à dire, qu'elle regroupe les longueurs d'ondes qui apportent des informations quantitatives similaires sur la substance à doser. Elles sont ensuite classées de la plus informative à la moins informative pour expliquer la composition de l'échantillon. L'information pertinente est alors concentrée dans les premières composantes pour construire le modèle de prédiction et exclure au maximum les

variabilités intrinsèques des échantillons (résidus) qui sont également répartis sur la gamme spectrale et qui ne sont pas descriptifs des réponses. Un nombre de composantes trop important ou trop faible peut respectivement conduire à un sur ou sous-ajustement du modèle. Le nombre de composantes impacte donc fortement sur la qualité d'ajustement et de prédiction du modèle. Plusieurs méthodes existent pour choisir le nombre de composantes d'un modèle de régression et pour évaluer l'incertitude du modèle. La validation croisée est la méthode la plus adaptée pour estimer l'exactitude des prédictions de modèles qui utilisent un nombre croissant de composantes. Parmi les différentes méthodes de validation croisée, la méthode du « leave one out » (un groupe de validation égal à un échantillon) est une des plus connues. Cette dernière utilise un jeu de n solutions standards. A partir de n-1 échantillons, un modèle à h composantes est construit, la solution standard restante étant utilisée comme échantillon de validation pour calculer une erreur résiduelle de prédiction. Cette procédure est répétée n fois afin de calculer une erreur résiduelle de prédiction pour chacun des n échantillons. A partir de ces valeurs, des paramètres d'évaluation des performances des modèles sont déterminés. Le premier paramètre est le PRESS (Predicted Error Sum of Square) qui représente la moyenne de la somme des carrés des n erreurs résiduelles de prédiction obtenue avec h composantes (Chen, 2003 ; Samadi-Maybodi, 2010) :

$$PRESS_h = \sum (y_i - y'_{h(-i)})^2 \quad (\text{équation II.4})$$

où y_i et $y'_{h(-i)}$ sont respectivement la concentration vraie du $i^{\text{ème}}$ échantillon et la concentration du $i^{\text{ème}}$ échantillon estimée à partir du modèle de calibration construit sans l'observation i . Le nombre de composantes optimal est celui permettant d'obtenir le $PRESS_h$ le plus petit ($PRESS \rightarrow 0$).

Le choix du nombre de composantes peut également être guidé par le calcul de l'index Q^2_{cum} qui mesure l'apport de l'ensemble des h premières composantes PLS (Tenenhaus, 1998). Plus sa valeur tend vers 1, plus le modèle sera descriptif. Il est possible de s'intéresser à l'apport global du Q^2_{cum} (équation II.5) pour l'ensemble des variables Y (concentration des 3 PA) ou au Q^2_{cum} propre à chaque variable y_k (équation II.6) pour h composantes ($a = 1 \rightarrow h$).

$$(Q^2_{cum})_h = 1 - \prod_{a=1}^h \frac{\sum_{k=1}^q PRESS_{ka}}{\sum_{k=1}^q PRESS_{k(a-1)}} \quad (\text{équation II.5})$$

$$(Q_{cum}^2)_{kh} = 1 - \prod_{a=1}^h \frac{PRESS_{ka}}{RESS_{k(a-1)}} \quad (\text{équation II.6})$$

où a est le nombre de composantes prises en compte, h le nombre total de composantes, q le nombre de variables à expliquer et $RESS$ la somme des carrés des erreurs résiduelles des concentrations pour la variable y_k , défini pour h composantes par :

$$RESS_{k(a-1)} = \sum (y_i - y'_{hi})^2 \quad (\text{équation II.7})$$

avec y_i est la concentration vraie du $i^{\text{ème}}$ échantillon et y'_{hi} la concentration du $i^{\text{ème}}$ échantillon estimée à partir du modèle de calibration construit à partir des n échantillons et $a - 1$ composantes.

➤ Détermination de l'intervalle spectrale

Pour établir un modèle PLS à partir des données spectroscopiques, il est nécessaire de sélectionner la bande spectrale la plus informative où tous les composés à doser absorbent afin de minimiser l'introduction d'un bruit de fond significatif dans la matrice, et où les différences d'absorbance entre les composés sont importantes. Le VIP (Variable Importance for Projection) qui exprime le pouvoir explicatif d'une variable x_j sur Y sera le critère examiné. Les variables ayant un fort VIP ($> 0,8$) sont les plus importantes dans la construction de Y et permettent de présager d'une bonne contribution au modèle (Wold, 1995).

➤ Observations des données aberrantes ou outliers

Dans le modèle, il est possible de retirer des valeurs aberrantes appelées « outliers ». Le paramètre utilisé est la DModx (Distance au Modèle des observations dans l'espace des X) qui permet la détection des valeurs extrêmes et donc l'identification des valeurs anormales des variables explicatives. La valeur de DModX est optimale si elle s'approche de zéro.

II.2.2 Matériel et Méthodes

II.2.2.a Instrumentation

Les mesures spectroscopiques ont été effectuées sur un spectrophotomètre Cary 100 UV-visible fourni par Varian (Les Ulis, France). Elles ont été enregistrées sur une gamme spectrale comprise entre 200 à 400 nm avec un pas de 0,5 nm et une vitesse d'acquisition fixée à 300 nm.min⁻¹. Les mesures ont été réalisées à 25°C en utilisant une cuve en quartz de 1 cm. Les données sont collectées par le logiciel WinUV.

II.2.2.b Préparation des standards de calibration et de validation

Les solutions mères des trois analytes d'intérêt ont été préparées dans l'éthanol aux concentrations de 100 mg.L⁻¹ pour l'ondansétron et la dexaméthasone et de 1000 mg.L⁻¹ pour l'aprépitant. Une solution mère matricielle de PLO® a été préparée à 2% (m/m) dans l'éthanol.

Des standards de calibration contenant les 3 PA à différents niveaux de concentrations (-1 ; 0 ; +1) ([tableau II.5](#)) et la matrice (0,033% - m/m) ont été préparées dans l'EtOH à partir d'un plan factoriel complet 3³. Un point central (niveau 0) a été répété six fois afin d'évaluer la validité du modèle. Le [tableau II.6](#) présente la composition des 33 standards de calibration nécessaires à l'optimisation du modèle PLS.

[Tableau II.5](#) : Concentration des standards de calibration

Niveau	[Ond] (mg.L ⁻¹)	[Dex] (mg.L ⁻¹)	[Apt] (mg.L ⁻¹)
-1	2	2	10
0	10	6	35
+1	18	10	60

Tableau II.6: Composition des standards de calibration établie à partir du plan d'expériences

Standards de calibration	[Ond] (mg.L ⁻¹)	[Dex] (mg.L ⁻¹)	[Apt] (mg.L ⁻¹)	Ordre de préparation
1	-1	-1	-1	17
2	-1	-1	0	2
3	-1	-1	+1	20
4	-1	0	-1	30
5	-1	0	0	4
6	-1	0	+1	13
7	-1	+1	-1	15
8	-1	+1	0	32
9	-1	+1	+1	23
10	0	-1	-1	1
11	0	-1	0	22
12	0	-1	+1	18
13	0	0	-1	28
14	0	0	0	8
15	0	0	+1	16
16	0	+1	-1	12
17	0	+1	0	6
18	0	+1	+1	25
19	+1	-1	-1	24
20	+1	-1	0	5
21	+1	-1	+1	26
22	+1	0	-1	19
23	+1	0	0	21
24	+1	0	+1	7
25	+1	+1	-1	14
26	+1	+1	0	11
27	+1	+1	+1	33
28	0	0	0	27
29	0	0	0	10
30	0	0	0	29
31	0	0	0	9
32	0	0	0	31
33	0	0	0	3

Les standards de validation contenant les 3 PA ont été préparés en triplicat de façon indépendante aux standards de calibration, et à trois niveaux de concentration (bas, médian et haut) (tableau II.7).

Tableau II.7 : Concentrations des standards de validation aux niveaux bas, médian et haut

Niveau	[Ond] (mg.L ⁻¹)	[Dex] (mg.L ⁻¹)	[Apt] (mg.L ⁻¹)
Bas (B)	5	4	20
Median (M)	10	6	35
Haut (H)	15	8	50

Chaque jour, 33 standards de calibration et 9 standards de validation sont ainsi préparés et analysés. Ce protocole est répété sur trois jours consécutifs.

II.2.2.c Validation de la méthode de dosage en UV/PLS

La validation externe de la méthode PLS a été réalisée à partir du jeu de standards de validation. La qualité de prédiction du modèle en PLS a été évaluée par le calcul du REP (erreur relative de prédiction) exprimée en pourcentage (%). Ce calcul a été réalisé pour chaque PA et à chaque niveau de concentration, à l'aide de la formule suivante :

$$\% REP_k = \frac{100}{C_{vraie}} \frac{1}{n} \sqrt{\sum_{i=1}^n (C_{vraie} - C_{pred})^2} \quad (\text{équation II.8})$$

où C_{vraie} est la concentration réelle du standard de l'échantillon i , C_{pred} la concentration correspondante estimée par le modèle de calibration et n le nombre de standards de validation étudiés à la même concentration.

L'exactitude de la méthode a été évaluée comme pour la méthode en CLHP/UV par la construction d'un profil d'exactitude.

II.2.3 Résultats et Discussion

II.2.3.a Optimisation : détermination de la bande spectrale et du nombre de composantes

Dans un premier temps, les spectres d'absorption UV de la matrice et de chaque PA ont été enregistrés sur une gamme spectrale allant de 200 à 400 nm (figure II.6).

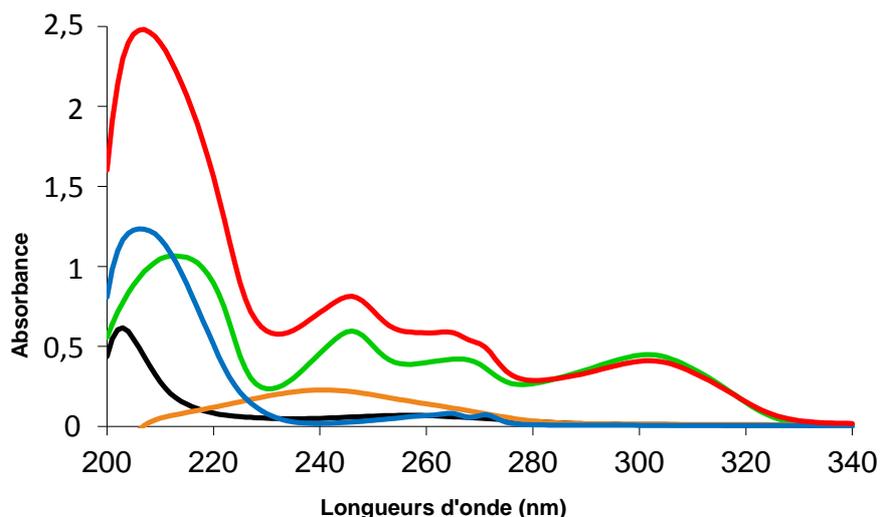


Figure II.6: Spectres des trois anti-émétiques et du PLO® seuls ou en mélange

— PLO® dilué à 0,033% (m/m) ; — [Ond] = 10 mg.L⁻¹ ; — [Dex] = 6 mg.L⁻¹ ; — [Apt] = 35 mg.L⁻¹ ;
 — PLO® dilué à 0,033% (m/m) + [Ond-Dex-Apt ; 10-6-35 mg.L⁻¹]

Les trois principes actifs présentent un chevauchement spectral important et l'absorbance de la matrice n'est pas négligeable ce qui ne permet pas de déterminer la concentration de chaque PA par une simple comparaison de leur absorbance à celle d'une solution de référence. La mise en place d'une méthode de calibration multivariée est donc indispensable. Elle nécessite l'utilisation d'un plan d'expériences pour l'analyse des standards de calibration afin de développer un modèle de régression PLS.

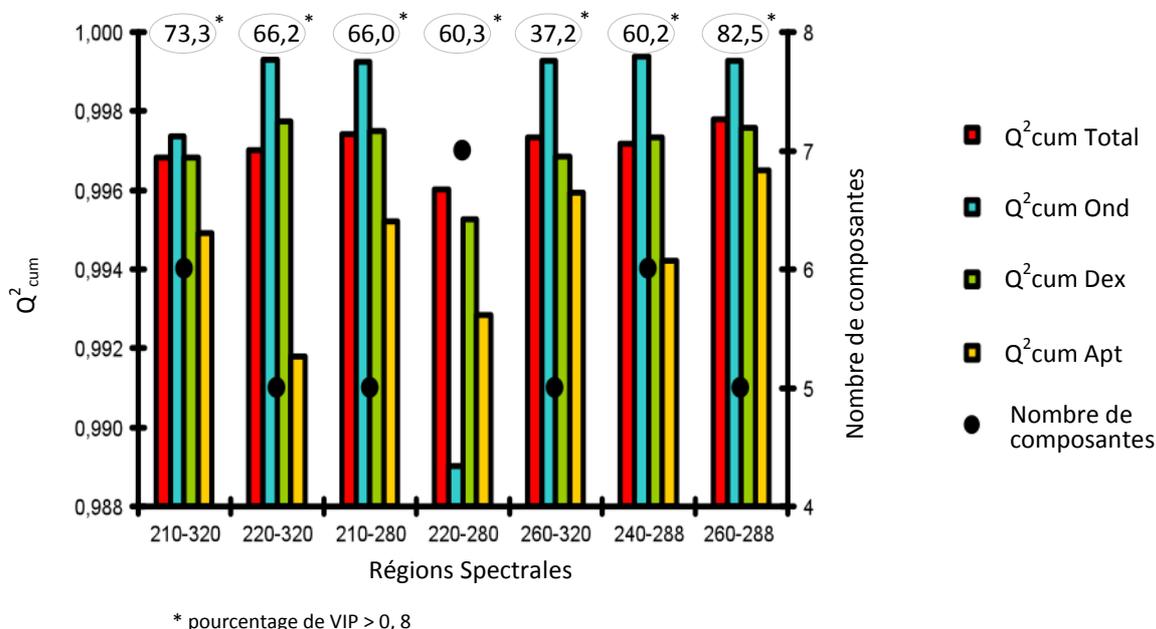
L'intervalle de concentrations de chacun des antiémétiques a été sélectionné afin de permettre l'évaluation de la teneur de formes galéniques adaptées à des patients d'âge différents. Les concentrations ont été choisies dans une gamme linéaire et au-dessus des limites de quantification (LOQ) égales à 0,07 mg.L⁻¹, 0,10 mg.L⁻¹ et 2,00 mg.L⁻¹ respectivement pour l'Ond, la Dex et l'Apt. Ces valeurs ont été déterminées lors de l'évaluation de la gamme linéaire de réponse à l'aide de la relation suivante :

$$\text{LOQ} = 10 \times \frac{\sigma_n}{a} \quad (\text{équation II.9})$$

où σ_n est le bruit de fond du signal et a la pente de la droite d'étalonnage.

Au sein de la gamme spectrale étudiée, sept régions ont été sélectionnées afin d'exploiter les données d'absorbance obtenues pour les 33 solutions de calibration (210-320 nm ; 220-320nm ; 210-280 nm ; 260-320 nm ; 240-288 nm ; 260-288 nm). Pour chacune d'entre elles, un modèle PLS a été construit. L'objectif de cette étude a été de déterminer le nombre de composantes (h) permettant

d'obtenir un modèle présentant un ajustement maximal (Q^2_{cum} , étroitesse d'accord entre la valeur calculée et la valeur vraie) sur un intervalle spectrale le plus informatif possible. La [figure II.7](#) présente le nombre de composantes optimales, les paramètres de performances (Q^2_{cum} , VIP) pour chaque modèle.



[Figure II.7](#) : Optimisation du modèle de régression PLS

Selon la région spectrale, le nombre de composantes varie entre 5 à 7. Les valeurs de Q^2_{cum} obtenues après suppression des outliers, sont optimales pour la région spectrale allant de 260 à 288 nm ($Q^2_{cum} > 0,996$ pour les trois anti-émétiques et un Q^2_{cum} total égal à 0,997). Sur cette même gamme spectrale 82,5% des variables explicatives (λ) sont descriptives de la concentration des 3 PA dans le mélange car elles présentent un VIP supérieurs à 0,8.

Ainsi la prise en compte des données expérimentales dans une bande spectrale allant de 260 à 288 nm a permis de mettre en place un modèle PLS utilisant un nombre de composantes minimal et égal à cinq. Ce modèle est caractérisé par une valeur de Q^2_{cum} proche de 1 et une valeur de VIP de 82,5% présageant un bon ajustement du modèle.

II.2.3.b Validation de la méthode

La validation externe de la méthode PLS a été réalisée à partir des standards de validation. Le REP (Relative Error of Prediction) et le profil d'exactitude ont été évalués.

➤ **Le REP**

La qualité de prédiction d'un modèle en PLS est fréquemment décrite par le REP (relative error of prediction) exprimé en %. L'erreur relative de prédiction a été calculée pour chaque analyte et aux trois niveaux de concentration, c'est-à-dire pour les 9 standards de validation. Les REP obtenus varient de 2,8% à 7,9%, de 4,0% à 5,6% et de 2,7% à 6,0% pour l'Ond, la Dex et l'Apt, respectivement. En considérant une limite d'acceptation fixée à $\pm 10\%$, la qualité prédictive du modèle estimée par le REP est acceptable. Toutefois le REP ne permet pas de définir l'erreur totale de la méthode (fidélité et justesse) à un risque statistique β . Afin d'avoir une méthodologie homogène entre les deux méthodes analytiques et de définir l'erreur totale, la méthode a été validée comme pour la CLHP/UV selon les recommandations de la SFSTP Pharma.

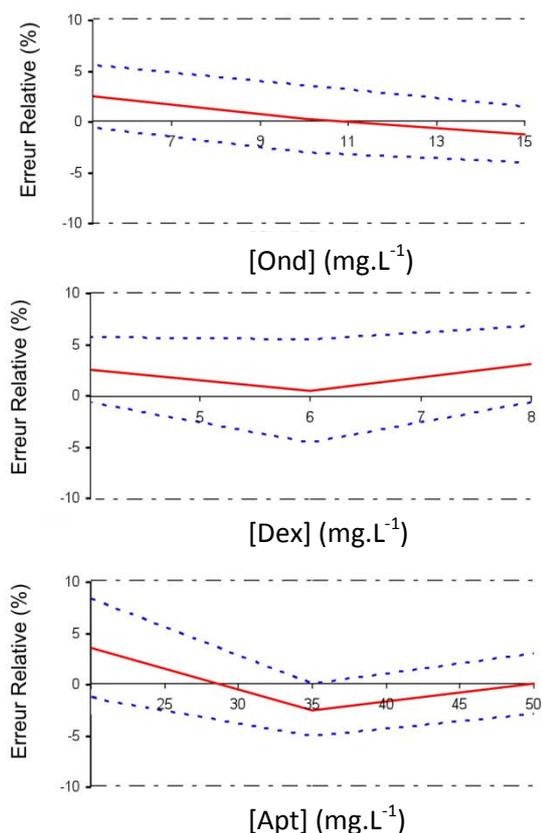
➤ **Profil d'exactitude**

A partir des 9 standards de validation, la justesse, la fidélité et l'exactitude de la méthode ont été déterminées. Les résultats sont présentés dans le tableau II.8 :

Tableau II.8 : Paramètres de validation de la méthode UV/PLS

Paramètres de validation	Ond		Dex		Apt	
Fonction de réponse $Y = BX + E^a$	modèle PLS à 5 composantes; $Q^2_{cum} \text{ total} = 0,996 \pm 0,002$					
Q^2_{cum}	0,999 \pm 0,001		0,999 \pm 0,001		0,992 \pm 0,002	
Justesse	<i>C calculée</i> (mg.L ⁻¹)	<i>Biais relatif</i> (%)	<i>C calculée</i> (mg.L ⁻¹)	<i>Biais relatif</i> (%)	<i>C calculée</i> (mg.L ⁻¹)	<i>Biais relatif</i> (%)
QC1	4 , 94 ;	-1 , 16	4 , 03 ;	0 , 80	20 , 74 ;	3 , 70
QC2	9 , 99 ;	-0 , 11	6 , 08 ;	1 , 29	35 , 34 ;	0 , 98
QC3	14 , 71 ;	-1 , 91	8 , 32 ;	4 , 03	49 , 84 ;	-0 , 32
Fidélité	<i>Répétabilité</i> (% CV)	<i>Fidélité intermédiaire</i> (% CV)	<i>Répétabilité</i> (% CV)	<i>Fidélité intermédiaire</i> (% CV)	<i>Répétabilité</i> (% CV)	<i>Fidélité intermédiaire</i> (% CV)
QC1	1 , 36 ;	3 , 42	1 , 56 ;	2 , 16	1 , 08 ;	3 , 26
QC2	1 , 30 ;	1 , 49	0 , 98 ;	1 , 32	3 , 72 ;	4 , 51
QC3	2 , 84 ;	4 , 25	1 , 63 ;	2 , 77	0 , 93 ;	3 , 11
Exactitude (Intervalle de Tolérance 95 %)	<i>Limite basse</i>	<i>Limite haute</i>	<i>Limite basse</i>	<i>Limite haute</i>	<i>Limite basse</i>	<i>Limite haute</i>
QC1	-4 , 86 ;	2 , 53	-1 , 78 ;	3 , 39	-0 , 43 ;	7 , 84
QC2	-2 , 28 ;	2 , 06	-1 , 04 ;	3 , 62	-1 , 75 ;	3 , 70
QC3	-4 , 92 ;	1 , 11	0 , 95 ;	7 , 11	-4 , 42 ;	3 , 78

La justesse de la méthode estimée par des biais relatifs compris entre -1,91% et 4,03% est en accord avec les critères pharmaceutiques fixés par la pharmacopée européenne pour le contrôle des préparations transdermiques (biais inférieur à $\pm 10\%$). La fidélité de la méthode est attestée par des coefficients de variation inférieurs à 4,51% qui présagent d'une erreur aléatoire acceptable. A partir de ces données, l'erreur totale de la méthode est calculée sur l'ensemble des standards de validation. Elle est représentée par les limites haute et basse de l'intervalle de tolérance construits sur le profil d'exactitude (figure II.8).



----- Intervalle de tolérance (au risque statistique de 5%) ; - - - - limite d'acceptation (fixée à ± 10%) ; ——— biais

Figure II.8: Profils d'exactitude des 3 PA obtenus avec la méthode UV/PLS

Quel que soit le niveau de concentration des trois antiémétiques, l'intervalle de tolérance est inclus dans la limite d'acceptabilité fixée à ± 10%. Ainsi, la méthode est validée sur les gammes de concentration 5 – 15 mg.L⁻¹, 4 – 8 mg.L⁻¹ et 20 – 50 mg.L⁻¹ pour l'ondanséton, la dexaméthasone et l'aprépitant.

II.3 Application des méthodes CLHP/UV – UV/PLS pour le dosage d'une formulation à base d'Ond, de Dex et d'Apt dans le PLO®

Les deux méthodes d'analyse (CLHP/UV et UV/PLS) ont été appliquées pour le dosage simultané de l'Ond, la Dex et l'Apt dans le PLO®, respectivement formulés à 1,5 ; 1,2 et 4,2% (m/m). Pour ce faire, trois prélèvements de la formulation d'environ 50 mg chacun ont été réalisés. Chaque échantillon prélevé a été dilué à 2% (m/m) dans l'éthanol et filtré sur un filtre seringue PTFE de 0,45 µm. Ces trois solutions ont ensuite été diluées pour obtenir des solutions à 0,033% (m/m) soit dans de l'éthanol pour la méthode spectroscopique, soit dans une solution éthanolique contenant les trois étalons internes (Met, Hyd et Lop) pour la méthode chromatographique. Les résultats de

recouvrement (tableau II.9) sont compris entre 95 et 102% pour l'ensemble des deux méthodes, ce qui satisfait à l'intervalle d'acceptation de la pharmacopée fixé entre 90 et 110%. Par conséquent, ces deux méthodes pourront être appliquées pour le contrôle de la teneur des trois antiémétiques dans le PLO®.

Tableau II.9 : Pourcentage de recouvrement des 3 PA dans le PLO® par CLHP/UV et UV/PLS

		Méthodes de dosage	
		CLHP/UV	UV/PLS
Recouvrement (%)	Ond	99 ± 3	97 ± 5
	Dex	102 ± 2	95 ± 3
	Apt	95 ± 4	95 ± 4

III Méthodes analytiques pour les études de passage transmembranaire

Nos travaux ont pour objectif d'évaluer et de comparer les performances de différents véhicules commerciaux pour l'administration transdermique de l'Ond, de la Dex et de l'Apt, au moyen de cellules de diffusion. Il est donc indispensable de disposer d'une méthode d'analyse permettant de suivre l'évolution de la concentration de ces PA dans la solution introduite dans le compartiment donneur (milieu receveur ; mélange hydro-alcoolique (EtOH/H₂O – 50/50 (v/v) ou SBF à 0,5% en HP-β-CD), après leur passage au travers d'une membrane synthétique ou biologique. La spécificité de la méthode CLHP/UV développée précédemment, pour l'analyse des PA dans ces deux milieux receveurs, a été vérifiée en injectant un échantillon de chacun de ces milieux dilué au ½ (échantillon injecté à 25% d'EtOH). La méthode a ainsi pu être validée pour l'analyse des échantillons issus des études cinétiques.

La méthode CLHP/UV a pu être appliquée avec succès à l'analyse de l'Ond, de la Dex et de l'Apt lors des études de libération de ces PA par les différents véhicules. Il en a été de même en ce qui concerne l'analyse de l'Ond et de la Dex lors des études de perméation. En revanche, elle n'a pu être appliquée au dosage de l'Apt. En effet, les premiers essais de perméation de l'Apt formulés dans les cinq véhicules ont montré des quantités de principe actif retrouvées dans le compartiment receveur inférieures aux limites de quantification déterminées par CLHP/UV (LOQ = 3,5 mg.L⁻¹). Une méthode de dosage mettant en œuvre la CLHP couplée à la spectrométrie de masse (SM) a donc été développée au Centre Universitaire de Mesures et d'Analyses dirigé par le Professeur J.F. Goossens, en collaboration avec le Docteur M. Kouach (CUMA, Université Lille 2).

III.1 CLHP/UV

C.f. paragraphe II.1 de ce chapitre.

III.2 CLHP/SM-SM

III.2.1 Matériel et méthodes

III.2.1.a Réactifs et Solvants

C.f. paragraphe II.1.1.a de ce chapitre.

III.2.1.b Instrumentation et protocole opératoire

La méthode séparative couplée à un détecteur UV utilisée précédemment étant compatible avec une détection en SM, nous avons choisi de réaliser la séparation selon un mode opératoire proche (colonne et nature des solvants utilisés en mode gradient d'élution inchangés). Nous nous sommes donc attachés à l'optimisation des paramètres du spectromètre de masse. Notons cependant, que le gradient d'élution a été modifié de manière à permettre une analyse plus rapide de l'Apt en présence de son étalon interne, le lopéramide.

Le système expérimental est constitué d'une chaîne Shimadzu UFLCXR équipée d'un passeur d'échantillons et d'un four. Les conditions chromatographiques sont les suivantes :

- Colonne : Core shell Kinetex C18 (100 x 4,60 mm de diamètre interne, 2,6 μm) fournie par Phenomenex (Le Pecq, France)
- Phase mobile : mélange de [A] 0,1% HCOOH dans H₂O et de [B] 0,1% HCOOH dans ACN selon le gradient suivant :
 - (1) mélange de solvant A et B à 60/40 (v/v) de 0 à 3 min
 - (2) augmentation linéaire du pourcentage de B à 70% de 3 à 6 min
 - (3) mélange de solvants A et B à 30/70 (v/v) de 6 à 8 min
 - (4) diminution linéaire du pourcentage de B à 40% de 8 à 10 min
 - (5) mélange de solvants A et B à 60/40 (v/v) de 10 à 11 min
- Débit : 1 mL.min⁻¹
- Volume d'injection : 5 μL
- Température : 25°C
- Composition du solvant d'échantillonnage : SBF à 0,5% d'HP- β -CD.

Après deux minutes d'élution, la phase mobile issue du système chromatographique est envoyée dans le spectromètre de masse équipé d'une source d'ionisation turbo ionspray opérant en mode d'ionisation positif et d'un analyseur Q-Trap (API 5500, AB Sciex).

Après optimisation, la température de la source et les débits respectifs des gaz rideau, de nébulisation et de désolvatation (N_2) ont été fixés respectivement, à 550 °C, 35, 50 et 50 psi. La tension du cône a été fixée à 90 V et l'intensité de l'aiguille à 5500 V. L'acquisition et le retraitement des données ont été réalisés avec le logiciel Analyst. La détection a été réalisée en mode MRM en utilisant les paramètres de réglages des quadripôles Q1, Q2, Q3 pour l'aprépitant et son étalon interne respectivement égaux à 535 Da, 25 V, 277 Da et 477 Da, 25 V, 265 Da.

III.2.1.c Pré-validation de la méthode

Afin de pré-valider la méthode d'analyse développée, nous avons étudié la spécificité, la limite de quantification de la méthode, la fonction de réponse, la justesse et la fidélité de cette méthode.

La **spécificité** de la méthode a été vérifiée en comparant le chromatogramme obtenu lors de l'injection d'une solution de SBF à 0,5% d'HP- β -CD à celui obtenu pour le mélange d'aprépitant et de son étalon interne, le lopéramide dans cette solution de SBF.

La **limite de quantification (LOQ)** correspond à la concentration d'aprépitant permettant d'obtenir un rapport signal sur bruit égale à 10. Elle a été déterminée par l'injection de solutions de SBF à 0,5% d'HP- β -CD, contenant des concentrations décroissantes d'aprépitant.

La **fonction de réponse** a été établie en injectant une série de solutions standards de calibration d'aprépitant de concentrations allant de 5,35 $\mu\text{g.L}^{-1}$ à 427,5 $\mu\text{g.L}^{-1}$, et 51,3 $\mu\text{g.L}^{-1}$ en étalon interne, préparées dans la solution de SBF à 0,5% d'HP- β -CD.

La **justesse et la fidélité** de la méthode ont été évaluées à l'aide de trois solutions standard de validation (QC) contenant l'aprépitant à des concentrations respectivement égales à 5,35, 214 et 427,5 $\mu\text{g.L}^{-1}$ et 51,3 $\mu\text{g.L}^{-1}$ d'étalon interne (solutions préparées dans le SBF à 0,5% de HP- β -CD). Chacune de ces solutions a été préparée en triplicat, puis injectée dans le système chromatographique.

III.2.2 Résultats

III.2.2.a Optimisation de la méthode CLHP/SM-SM

La méthode CLHP/SM-SM a été développée afin de suivre l'évolution de la concentration de l'aprépitant dans une solution de SBF à 0,5% d'HP- β -CD, utilisée comme milieu receveur lors des études de perméation.

L'optimisation des paramètres de la source de type ESI et des paramètres de réglage des quadripôles de l'analyseur Q-Trap a tout d'abord été réalisée par l'introduction directe d'une solution éthanolique à $5,35 \mu\text{g.L}^{-1}$ en Apt et $51,3 \mu\text{g.L}^{-1}$ en lopéramide dans le spectromètre de masse API 5500. Il est indispensable d'optimiser la température, le débit du gaz de nébulisation, et ceux des gaz rideau et de désolvatation pour obtenir un processus ESI stable et répétable, ainsi qu'une sensibilité élevée. Les paramètres fixés après optimisation sont répertoriés sur le schéma de la source ESI d'un API 5500 (figure II.9).

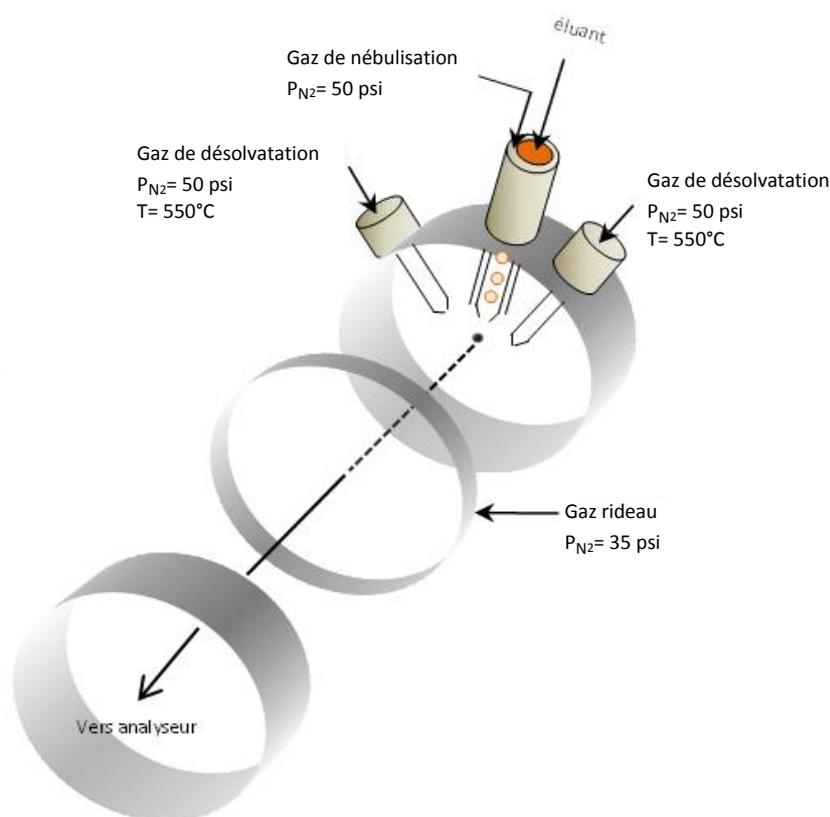
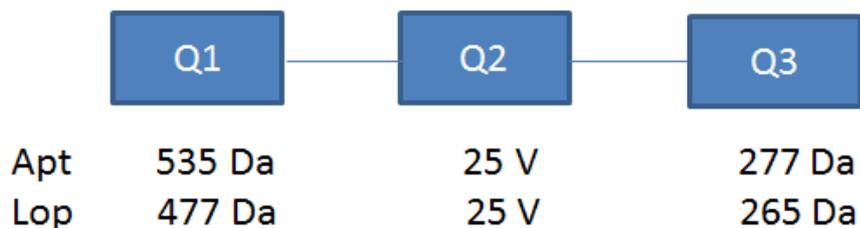


Figure II.9 : Schéma de la source ESI d'un appareil Q-TRAP API 5500 (AB Sciex).

Par ailleurs, comme l'ont montré Dzuman *et al* (Dzuman, 2015) pour le dosage de l'Apt, l'utilisation du mode Multiple Reaction Monitoring (MRM) permet d'obtenir de seuils de quantification très faibles, il a de ce fait été sélectionné pour cette étude. Pour rappel, nous avons utilisé un analyseur triple quadripôle (QQQ) qui résulte de l'association de deux analyseurs quadripolaires (Q1 et Q3) en série, séparés par une cellule de collision (Q2) constituée d'un quadripôle plus court (Menet, 2011). Le mode MRM consiste à suivre un ion produit spécifique (Q3) issue d'une fragmentation particulière d'un ion précurseur (Q1) en appliquant une énergie de

collision (Q2). La relation entre un ion précurseur et un ion produit est appelée « transition ». Les paramètres de réglage de l'analyseur ont donc été optimisés et sont présentés sur la [figure II.10](#).



[Figure II.10](#) : Paramètres de réglage des quadripôles en mode MRM pour le dosage de l'aprépitant en présence d'étalon interne le lopéramide

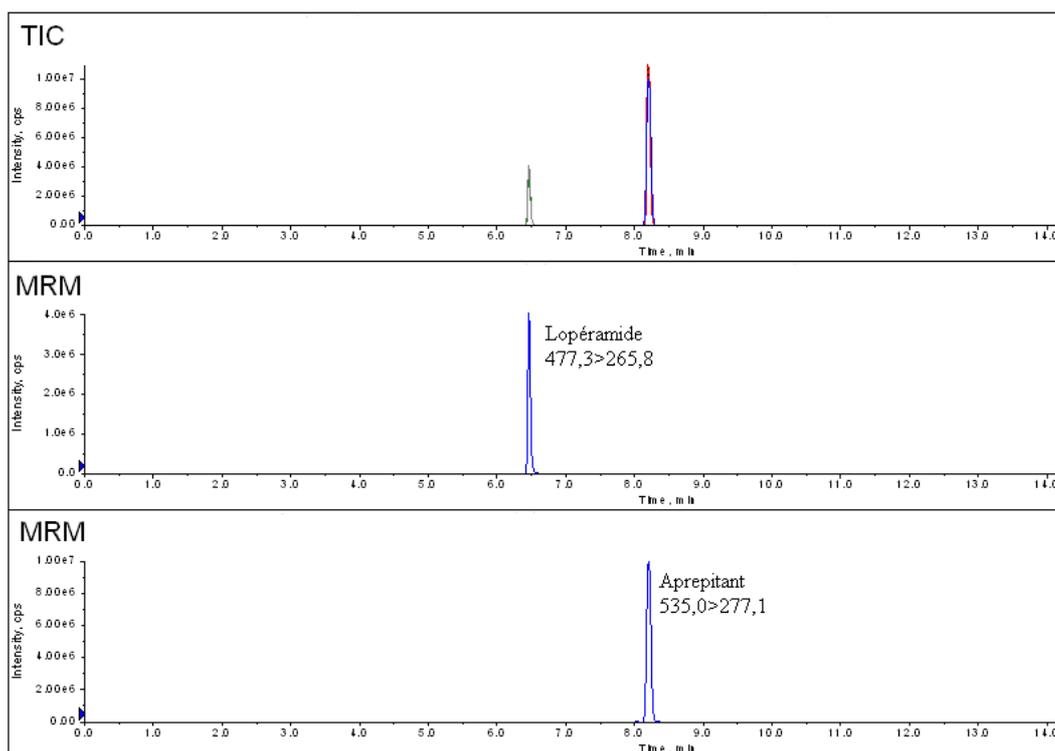
Dans un second temps, le système chromatographique a été couplé au spectromètre de masse. La méthode CLHP/UV précédemment développée conduisant à des temps de rétention pour le lopéramide et l'aprépitant respectivement de 11 et 14 min environ, nous avons choisi de modifier le gradient d'élué pour raccourcir la durée d'analyse. Le gradient retenu est le suivant :

- (1) mélange de solvant A et B à 60/40 (v/v) de 0 à 3 min
- (2) augmentation linéaire du pourcentage de B à 70 % de 3 à 6 min
- (3) mélange de solvants A et B à 30/70 (v/v) de 6 à 8 min
- (4) diminution linéaire du pourcentage de B à 40% de 8 à 10 min
- (5) mélange de solvants A et B à 60/40 (v/v) de 10 à 11 min

avec [A] 0,1% HCOOH dans H₂O et de [B] 0,1% HCOOH dans ACN

Dans ces conditions, les temps de rétention du lopéramide et de l'Apt sont respectivement de 6,5 min et 8,2 min. Sachant que les échantillons à analyser sont riches en sels ainsi qu'en d'HP-β-CD, (composés non retenus sur la colonne C18 utilisée), afin de ne pas encrasser l'analyseur et pour éviter tout phénomène de suppression ionique, nous avons choisi de ne pas introduire la phase éluée pendant les 2 premières minutes de l'analyse dans le spectromètre de masse.

A l'issue de l'optimisation des paramètres du spectromètre de masse, voici le chromatogramme obtenu lors de l'analyse d'une solution d'aprépitant à 5,35 µg.L⁻¹ en présence de 51,3 µg.L⁻¹ de lopéramide ([figure II.11](#)).



Split réalisé de 0 à 2 min

Figure II.11 : Chromatogrammes obtenus après optimisation des paramètres de la source du spectromètre de masse et de la méthode MRM.

III.2.2.b Pré-validation de la méthode de dosage par CLHP/SM-SM.

La **spécificité** de la méthode a été vérifiée en comparant le chromatogramme obtenu lors de l'injection d'une solution de SBF à 0,5% d'HP- β -CD à celui obtenu pour le mélange d'aprepitant et d'étalon interne, le lopéramide. L'absence de signal correspondant à ces deux composés sur le chromatogramme de la solution de SBF à 0,5% d'HP- β -CD a permis d'attester de la spécificité de la méthode.

La **limite de quantification (LOQ)** a été déterminée par injection de solutions de SBF à 0,5% d'HP- β -CD, contenant des concentrations décroissantes d'aprepitant. Elle est égale à $9,35 \cdot 10^{-3} \mu\text{g.L}^{-1}$.

La **fonction de réponse** a été établie en injectant une série de solutions standards de calibration d'aprepitant de concentration allant de $5,35 \mu\text{g.L}^{-1}$ à $427,5 \mu\text{g.L}^{-1}$, et $51,3 \mu\text{g.L}^{-1}$ en étalon interne, préparées dans la solution de SBF à 0,5% d'HP- β -CD. Le rapport des aires des pics de l'aprepitant sur celui de l'étalon interne ($A_{\text{ApT}}/A_{\text{Ei}}$) en fonction de la concentration de l'aprepitant, est reporté sur la [figure II.12](#). Le profil obtenu a été modélisé à l'aide d'une régression polynomiale d'ordre 2, conduisant à l'équation suivante :

$$\frac{A_{Apt}}{A_{EI}} = -5,60.10^{-6} \times C_{Apt}^2 + 7,16.10^{-3} \times C_{Apt} - 7,93.10^{-3} \quad (\text{équation II. 10})$$

C_{Apt} étant exprimée en $\mu\text{g.L}^{-1}$

La valeur du coefficient de corrélation obtenue ($R^2 > 0,999$) atteste de la validité du modèle.

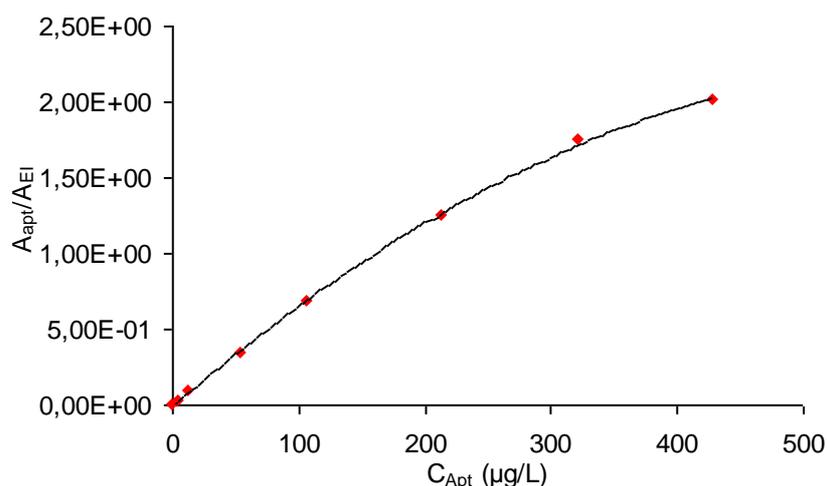


Figure II.12 : Fonction de réponse pour le dosage de l'aprépitant par CLHP/SM-SM.

La détermination de la concentration de l'aprépitant dans un échantillon à doser se fera à partir du rapport A_{Apt}/A_{EI} mesuré pour cet échantillon lors de l'analyse par CLHP/SM-SM, en résolvant cette équation du second degré à l'aide du logiciel Excel.

La **justesse et la fidélité** de la méthode ont été évaluées à l'aide de trois solutions standard de validation (QC) contenant l'aprépitant à des concentrations respectivement égales à 5,35, 214 et 428 $\mu\text{g.L}^{-1}$ et 51,3 $\mu\text{g.L}^{-1}$ d'étalon interne. Chacune de ces solutions a été préparée en triplicat, puis injectée dans le système chromatographique. Le tableau II.10 présente les résultats obtenus.

Tableau II.10 : Etude de la justesse et fidélité de la méthode.

QC	[Apt] ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Justesse Erreur relative (%)	Répétabilité CV (%)
1	5,35	-6,3	4,4
2	214	-2,0	2,8
3	428	-3,0	2,1

Quel que soit le niveau de concentration, l'erreur relative est inférieure à 7%. La méthode peut donc être considérée comme étant juste si l'on se fixe un seuil d'acceptabilité de 10%. Par ailleurs, les coefficients de variation mesurés sont inférieurs à 5%, ce qui reflète la répétabilité de la méthode.

IV Conclusion

Deux méthodes d'analyse orthogonales ont été développées pour doser simultanément l'Ond, l'Apt et la Dex. Ces deux méthodes ont montré leur capacité à déterminer la concentration des 3 PA dans une préparation galénique et ce avec justesse et fidélité.

Bien que la préparation de l'échantillon soit quasi équivalente dans les deux cas (une simple dilution éthanolique), la méthode UV/PLS est globalement plus rapide que la méthode CLHP (5 min versus 30 min) et sera particulièrement intéressante pour le contrôle en routine des préparations transdermiques au sein d'une Pharmacie à Usage Intérieur.

Développée avec le PLO[®], cette méthode chimiométrique ne peut toutefois, pas être transposée directement lors de l'analyse d'autres véhicules transdermiques qui sont à l'étude. De plus, la méthode UV/PLS présente des seuils de quantification plus élevés que ceux obtenus en CLHP/UV, la rendant moins pertinente pour suivre la cinétique de perméation des PA à travers la peau. Ainsi, de par sa spécificité, la CLHP/UV est la méthode retenue lors de cette étude, pour contrôler la teneur des 3 PA lors de leur formulation dans les différents véhicules et d'autre part, pour évaluer le passage transmembranaire.

Enfin, le couplage d'un spectromètre de masse à la CLHP a permis de diminuer le seuil de quantification de l'aprépitant d'un facteur 10^5 , ce qui permettra de suivre la cinétique de perméation de l'aprépitant lors des études ultérieures, en opérant dans la gamme de concentration pour laquelle la fonction de réponse a été établie.

V Références Bibliographiques

Chavez-Eng C.M, Constanzer M.L, Matuszewski B.K, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 35 (2004) 1213-1229.

Chen J, Xue X, Schramm K.W, Quan X, Yang F, Kettrup A, *Computational Biology and Chemistry*, 27 (2003) 165-171.

Constanzer M.L, Chavez-Eng C.M, Dru J, Kline W.F, Matuszewski B.K, *Journal of Chromatography B*, 807 (2004) 243-250.

Dépôt M, Leroux S, Caillé G, *Journal of Chromatography B*, 693 (1997) 399-406.

Deventer K, Delbeke K, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 17 (2003) 2107-2114.

Dzuman Z, Zachariasova M, Veprikova Z, Modula M, Haislova J, *Analytica Chimica Acta*, 863 (2015) 29-40.

Frerichs V.A, Tornatore K.M, *Journal of Chromatography B*, 802 (2004) 329-338.

Grippa E, Santitni L, Castellano G, Gatto M.T, Leone M.G, Saso L, *Journal of Chromatography B*, 738 (2000) 17-25.

Gupta A, Bhagawati S.T, Muddukrishna B.S, Jagadish P.C, Bhat K, *Indian Journal Pharmaceutical Education and Research*, 46 (2012) 197-205.

Haaland D.M, Thomas E.V, *Analytical Chemistry*, 60 (1988) 1193-1202.

Hubert Ph, Nguyen-Hu J.J, Boulanger B, Chapuzet E, Chiap P, Cohen N, Compagnon P.A, Dewé W, Feinberg M, Lallier M, Laurentie M, Mercier N, Muzard G, Nivet C, Valat L, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 36 (2004) 579-586.

Hubert Ph, Nguyen-Hu J.J, Boulanger B, Chapuzet E, Chiap P, Cohen N, Compagnon P.A, Dewé W, Feinberg M, Lallier M, Laurentie M, Mercier N, Muzard G, Nivet C, Valat L, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 45 (2007) 70-81 a.

Hubert Ph, Nguyen-Hu J.J, Boulanger B, Chapuzet E, Chiap P, Cohen N, Compagnon P.A, Dewé W, Feinberg M, Lallier M, Laurentie M, Mercier N, Muzard G, Nivet C, Valat L, Rozet E, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 45 (2007) 82-96 b.

López-Martínez L, López-de-Alba P.L, García-Campos R, De León-Rodríguez L.M., *Analytica Chimica Acta*. 493 (2003) 83-94.

Luo Y, Uboh C.E, Soma L.R, Guan F, Rudy J.A, Tsang D.S, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 19 (2005) 825-832.

McCrea J.B, Majumdar A.K, Goldberg M.R, Iwamoto M, Gargano C, Panebianco D. L, Hesney M, Lines C. R, Petty K. J, Deutsch P. J, Murphy M. G, Gottesdiener K. M, Goldwater D. R, Blum R. A, *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 74 (2003) 17-24.

Menet MC, Delbeke K, *Revue Francophone des Laboratoires*, 437 (2011) 41-53.

Moreira R.F, Salvadori M.C, Azevedo C.P, Oliverra-Silva D, Borges D.C, Moreno R.A, Sverdloff C.E, Borges N.C, *Biomedical Chromatography Journal*, 24 (2010) 1220-1227.

Pharmacopée Européenne version 8.5 "Monographie Ondansétron (Chlorhydrate d') Hihydraté", consulté en 2015, Online6.edqm.eu/ep805/ a.

Pharmacopée Européenne version 8.5, "Monographie Dexamethasone Acetate", consulté en 2015, Online6.edqm.eu/ep80w5/ b.

- Pharmacopée Européenne version 8.5**, "Monographie 2.2.46 Techniques de séparation chromatographique", consulté en 2015, Online6.edqm.eu/ep805/ c.
- Rezaei Z**, Hemmateenejad B, Khabnadiheh S, Gorgin M, *Talanta*, 65 (2006) 21-28.
- Samadi-Maybodi A**, Nejad-Darzi S.K, *Spectrochimica Acta*, 75 (2010) 1270-1274.
- Sarlak N**, Anizadeh M, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 160 (2011) 644-649.
- Secq A**, Iannoy D, Dewulf S, Baethelemy C, Décaudin B, Odou P, *European Journal of Pharmaceutical Science*, 15 (2009) 36-43.
- Sena M**, Chaudhry Z, Collins C, Poppi R, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 36 (2004) 743-749.
- Sheshala R**, Darwis Y, Kan N, *Chromatographia*, 70 (2009) 75-81.
- Srekanth N**, Babu R.C, Bahlul Z.A, Mukkanti K, *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 10 (2011) 491-497.
- Tenenhaus M**, La régression PLS théorie et pratique, *Editions Technip*, 1998.
- Thomas E.V**, Haaland D.M, *Analytical Chemistry*, 62 (1990) 1091-1099.
- Wu D**, Paul D.J, Zhao X, Douglas S.D, Barrett J.S, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 49 (2009) 739-745.
- Wold.H**, Partial least squares, *Encyclopedia of sciences*, *Wiley*, 1985.
- Wold S**, Chemometric methods in molecular design, *Han van de Waterbeemd-Wiley-VCH*, *Weiheim*, Germany, 1995, 195-218.

CHAPITRE 3 :

Evaluation *in vitro* des véhicules prêts à l'emploi pour l'administration de l'aprépitant, de la dexaméthasone et de l'ondansétron par voie transdermique.

CHAPITRE 3 : Evaluation *in vitro* des véhicules prêts à l'emploi pour l'administration de l'aprépitant, de la dexaméthasone et de l'ondansétron par voie transdermique

I Introduction

L'objectif de ces travaux est de développer une forme transdermique semi solide contenant simultanément l'aprépitant, la dexaméthasone et l'ondansétron pour traiter les nausées et vomissements chimio-induits dans un des cinq véhicules transdermiques prêts à l'emploi à savoir, le PLO[®], Pentravan[®] Plus, Pentravan[®], Lipovan[®] et Phytobase[®].

Pour ce faire, un protocole de préparation adapté aux contraintes hospitalières a été développé afin d'incorporer seul ou en association les trois principes actifs (dexaméthasone, aprépitant et ondansétron). Puis chaque PA a été introduit seul dans chacun des 5 véhicules transdermiques prêts à l'emploi selon le protocole développé. Un contrôle qualité impliquant une mesure du pH, une observation microscopique et une évaluation de la teneur en PA et de l'homogénéité des formes a été réalisé sur les quinze formulations ainsi préparées.

Dans un second temps, deux études cinétiques ont été menées sur chacune de ces formulations, au moyen de cellules de diffusion de Franz : une étude de libération, afin d'apprécier la capacité de chaque véhicule à libérer un PA, puis une étude de perméation, afin d'apprécier la capacité de chaque PA à traverser la peau. Ces études cinétiques ont préalablement fait l'objet d'une optimisation des paramètres opératoires relatifs au protocole de préparation des membranes et à la composition du milieu receveur. Durant chaque essai cinétique, des prélèvements réguliers du milieu receveur ont été dosés par CLHP couplée à un détecteur UV ou à un spectromètre de masse afin de déterminer les quantités de chaque PA cumulées et de construire les profils cinétiques de libération et de perméation. Lors des études de libération, les paramètres cinétiques (flux à la première heure et quantités cumulées au bout de 7,5 h) ont tout d'abord été évalué, puis une modélisation de chaque profil de libération a été réalisée à l'aide de 6 modèles mathématiques afin de trouver un modèle permettant de décrire le mécanisme de libération de chacun des PA dans chacune des formulations et de comparer les profils de libération théoriques dans leur globalité au moyen du facteur de similarité f_2 . Lors des études de perméation, les paramètres cinétiques tels que les flux à l'équilibre, les temps de latence, les coefficients de perméabilité ou encore les quantités cumulées au bout de 40 h ont été calculés à partir des profils expérimentaux et ont été comparés dans le but de

sélectionner le véhicule transdermique le plus prometteur pour promouvoir l'absorption des PA combinés dans une même formulation.

Enfin, dans un troisième et dernier temps, une formulation contenant les PA en mélange dans le véhicule préalablement sélectionné a fait l'objet d'études de perméation : l'influence de la combinaison des PA ainsi que celle de l'incorporation de différents promoteurs d'absorption de type alcool (éthanol, éthylène glycol, propylène glycol) ou de type surfactant (tween 20 et tween 80) sur la cinétique de perméation a donc été étudiée. Les meilleures performances obtenues ont finalement été comparées aux données de la littérature.

II Matériels et méthodes

II.1 Réactifs et solvants

II.1.1 Principes actifs

L'ondansétron et la dexaméthasone utilisés pour la préparation des formes transdermiques et pour le dosage de ces PA (solutions témoins de calibration), proviennent, respectivement, de Biotrend (Zurich, Suisse) et d'Inresa (Bartenheim, Allemagne). L'aprépitant utilisé pour le dosage a été obtenu auprès de la société Focus Synthesis LLC. Pour préparer les formes galéniques, compte tenu du coût de l'aprépitant pur obtenu chez Focus Synthesis LLC (1000\$/100mg), nous avons choisi de l'extraire de la spécialité pharmaceutique Emend® (gélule 125 mg MSD Ltd., Hoddesdon, UK) selon un protocole développé au laboratoire. Il consiste à vider le contenu de dix gélules et à peser environ 1,250 g de granules. Elles sont ensuite micronisées manuellement dans un récipient en acier à l'aide de billes métalliques, en exécutant des mouvements circulaires, jusqu'à obtenir une poudre de granulométrie assez fine. Après avoir mis la poudre en suspension dans 100 mL d'éthanol, l'ensemble est placé aux ultrasons pendant 10 min, puis centrifugé à 3200 trs.min⁻¹ pendant 5 min. Enfin, le surnageant est récupéré, puis évaporé au rotavapor (40°C – 135 mbar) pendant 20 min et la poudre obtenue est tamisée au travers de mailles métalliques de 250 µm. La pureté de l'aprépitant obtenue selon ce protocole est de 80%.

II.1.2 Excipients

Les cinq véhicules prêts à l'emploi dont la composition est détaillée dans le tableau I.6 du du paragraphe I.3.3, chapitre I, ont été gracieusement fournis par la société Fagron à savoir :

- Les trois crèmes hydrophiles liposomales : Pentravan®, Pentravan® Plus et Lipovan®
- La crème hydrophile phytosomale : Phytobase®
- L'organogel liposomal : PLO® (organogel pluronique à base de lécithine).

II.1.3 Réactifs et solvants

Les solvants utilisés à savoir l'acétonitrile (VWR, Val de Fontenay, France), l'éthanol (Lichrosolv, Darmstadt, Allemagne) et l'isopropanol (Prolabo, Fontenay-sous-Bois, France) sont de qualité HPLC. Le tween 20 et le tween 80 proviennent de la société Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). L'éthylène glycol provient de la société Prolabo (Fontenay-sous-Bois, France). L'eau ultra-pure (18 MΩ) a été produite par un système de purification d'eau Milli-Q de chez Millipore (Saint-Quentin en Yvelines, France). L'hydroxypropyl-β-cyclodextrine (HP-β-CD) a été obtenue auprès de la société Roquette (Lestrem, France).

II.1.4 Préparation de la solution de SBF

Les sels utilisés pour la préparation du « Simulated Body Fluid » (SBF) ont été obtenus auprès de la société Sigma-Aldrich. Sa composition est la suivante : 137,5 mM de NaCl ; 4,19 mM de NaHCO₃ ; 3,02 mM de KCl ; 1 mM de K₂PO₄ ; 1,53 mM de MgCl₂ .6H₂O ; 2,64 mM de CaCl₂.2H₂O ; 0,51 mM de Na₂SO₄ et de 50,05 mM de TRIS. Le pH est ajusté à 7,4 à l'aide d'HCl à 1 M (Baert, 2010).

II.2 Préparation et contrôle des formes galéniques

II.2.1 Protocole de formulation

A ce stade de l'étude, les premières formes transdermiques préparées ne contiennent qu'un seul antiémétique. Chaque principe actif a donc été formulé seul dans chacun des 5 véhicules de manière à obtenir 2,5 g de forme finie contenant 15% (m/m) d'éthanol. Quinze préparations ont ainsi été réalisées. Les teneurs en principe actif dans les formulations sont de 1,6% (m/m) pour l'aprépitant et l'ondansétron et de 1,2% (m/m) pour la dexaméthasone.

Après la mise en suspension d'une masse m de principe actif dans 500 µL d'éthanol, le mélange est placé au bain à ultrasons pendant 15 min. Une masse de véhicule est alors ajoutée afin d'obtenir 2,5 g de forme finie. A l'exception du PLO[®], les véhicules sont introduits à l'aide d'une seringue et en une seule étape dans la suspension éthanolique. Pour le PLO[®], l'addition se fait à l'aide d'une micropipette en plusieurs étapes : (1) ajout à la suspension d'une phase lipophile composée de lécithine et d'isopropyl palmitate (pour une teneur finale de 22% m/m) ; (2) ajout de la phase aqueuse composée de Pluronic[®] F127 préalablement refroidi à 0°C afin d'être liquéfié (en quantité suffisante pour obtenir 2,5 g de préparation). Durant 15 min, la préparation est homogénéisée en effectuant des mouvements circulaires à l'aide d'une spatule repliée à son extrémité à 90° et d'un vortex. Elle est finalement conditionnée dans une seringue en polypropylène de 2 mL.

II.2.2 Contrôle des formes galéniques

II.2.2.a Evaluation de la teneur en PA

Afin de déterminer la teneur en PA dans ces formes galéniques et de vérifier leur homogénéité, trois prélèvements d'environ 50 mg ont été effectués dans le flacon ayant servi à la préparation et contenant la forme galénique. Chaque échantillon prélevé est alors additionné d'éthanol afin d'obtenir une solution diluée au 50^{ème} (m/m). Le mélange obtenu est placé pendant 15 min dans une cuve à ultrasons afin de dissoudre le PA. La suspension est alors filtrée sur filtre PTFE (0,45 µm). Une seconde dilution en série permet d'obtenir une solution finale au 3000^{ième}, contenant l'étalon interne propre du PA étudié, à la concentration définie dans le paragraphe II.1.1.c du chapitre II, dans un mélange EtOH/H₂O (20/80 – v/v). Enfin, ces solutions sont analysées par CLHP/UV. La méthode CLHP/UV validée pour la quantification de chaque principe actif et dont les régressions linéaires, de type $y = ax + b$, ont des ordonnées à l'origine (b) statistiquement non différentes de zéro, permettent de doser les échantillons en se basant sur un étalonnage interne en un point (Algranti, 1992). Ainsi, chaque jour, des standards de calibration à 2, 4 et 6 mg.L⁻¹, respectivement, pour la dexaméthasone, l'ondansétron et l'aprépitant sont préparés dans un mélange EtOH/H₂O (20/80 v/v) puis analysés par CLHP/UV.

II.2.2.b Détermination du pH

Afin d'apprécier le pH de chaque préparation, une goutte de formulation a été déposée sur un morceau de papier tournesol (pH 1-14). Le pH a pu être évalué en comparant la teinte de l'indicateur coloré obtenu après dépôt à celle présente sur l'échelle colorimétrique d'équivalence de pH.

II.2.2.c Observation morphologique

Les préparations terminées ont toutes été observées à l'aide d'un microscope optique MOTIC DMB1 (Wetzlar, Germany) dont les images ont été capturées par une caméra digitale de résolution 2 MP, reliée au logiciel Motic Image Plus software. Pour ce faire, une goutte de formulation a été déposée sur une lame puis étalée à l'aide d'une lamelle superposée. Après réglage, une image a été enregistrée pour chaque préparation au grossissement 400.

II.3 Etude cinétique de la libération des PA

II.3.1 Détermination de la solubilité des PA

La solubilité des trois principes actifs a été évaluée dans différents milieux aqueux (H₂O, SBF, SBF + 0.5% HP-β-CD) et hydro-alcoolique (EtOH/H₂O - 50/50 (v/v)). Un excès de principe actif est placé dans chacun de ces quatre milieux (essais réalisés en triplicat), pendant 48 h, sous agitation, à

32°C et à l'abri de la lumière. S'ensuit une centrifugation à 32 000 tours.min⁻¹ pendant 10 min à 32°C. Le surnageant récupéré est dilué de façon appropriée puis dosé par CLHP/UV.

II.3.2 Cellule de diffusion de Franz

La cinétique de libération des principes actifs a été évaluée au moyen de cellules de diffusion de Franz (SES GmbH, Analyse System, Bechenheim, Allemagne). La cellule de Franz est une cellule de diffusion statique composée d'un compartiment receveur et d'un compartiment donneur séparés d'une membrane. Dans notre cas, le volume du compartiment receveur est de 3,1 mL, le diamètre interne du compartiment donneur est de 0,9 mm et la surface d'échange de 0,64 cm². L'étanchéité est assurée par un joint et les deux compartiments sont maintenus à l'aide d'une pince de fixation. Un barreau aimanté est introduit dans le compartiment receveur dont la vitesse d'agitation est fixée à 600 rpm (figure III.1).

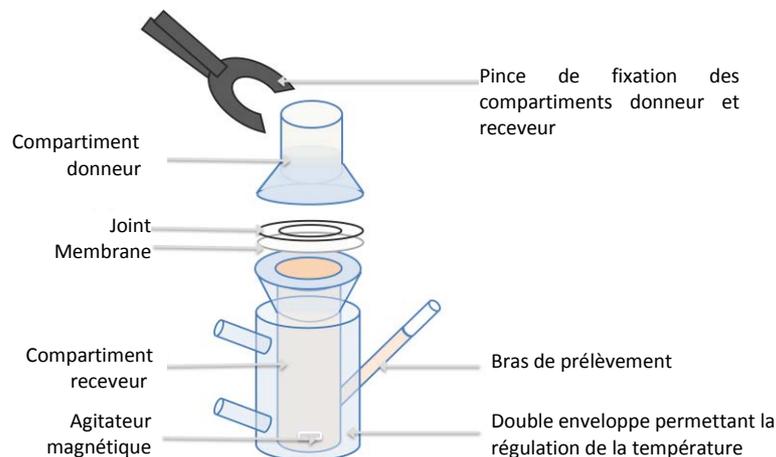


Figure III.1 : Schéma d'une cellule de diffusion de Franz.

Chaque formulation est testée en triplicat à l'aide de trois cellules de Franz placées en série sur un banc d'essai, permettant une agitation continue et une régulation de la température du milieu receveur (32°C) afin de mimer les mouvements des fluides et la température physiologique (figure III.2).

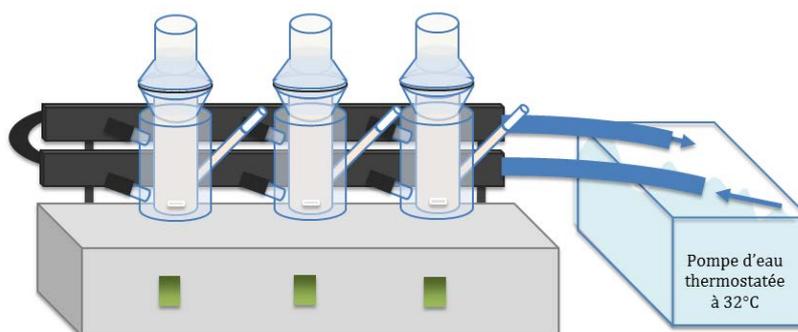


Figure III.2 : Schéma du banc d'agitation et de régulation de la température des cellules de Franz.

II.3.3 Préparation de la membrane synthétique

Afin d'évaluer la cinétique de libération des principes actifs, chaque cellule est équipée d'une membrane inerte en acétate de cellulose (0,45 μm , 25 mm de diamètre). Toute membrane neuve est immergée dans un mélange de composition identique à celui du milieu receveur durant les 12 heures précédant l'initiation de la cinétique de libération.

II.3.4 Protocole expérimental d'étude de la cinétique de libération

Le compartiment receveur est rempli d'un mélange EtOH/H₂O - 50/50 (v/v) préalablement dégazé et thermostaté à 32°C. La membrane est déposée sur le compartiment receveur, puis recouverte par le compartiment donneur. Le volume du compartiment receveur est ensuite ajusté via le bras de prélèvement jusqu'au trait de jauge afin d'obtenir un volume final de 3,1 mL. L'absence de bulles d'air sous la membrane est alors vérifiée avant de placer un parafilm autour de la jonction des deux compartiments et à l'orifice du bras de prélèvement, afin d'assurer l'étanchéité totale. La cinétique de diffusion est initiée dès le dépôt d'une masse de 200 mg de formulation sur la membrane synthétique. Des prélèvements de 200 μL du milieu receveur sont alors effectués à 0,25 ; 0,5 ; 1 ; 2 ; 3 ; 4 ; 5 ; 6 et 7,5 h après le dépôt, à l'aide d'une seringue en verre de 250 μL . Après chaque prélèvement, le volume de solution contenu dans le compartiment receveur est réajusté par une solution fraîche d'EtOH/H₂O – 50/50 (v/v) et thermostatée à 32°C.

II.3.5 Dosage des prélèvements

La concentration en principe actif dans chacun des prélèvements est déterminée en CLHP/UV par étalonnage interne en un point. Des standards de calibration à 2, 4 et 6 mg.L^{-1} , respectivement, pour la dexaméthasone, l'ondansétron et l'aprépitant sont préparés dans un mélange EtOH/H₂O (20/80 v/v) en présence de lopéramide (30 mg.L^{-1}), de métoclopramide (10 mg.L^{-1}) et d'hydrocortisone (3 mg.L^{-1}).

La concentration du PA dans le compartiment receveur augmente avec le temps. Or, pour réaliser l'analyse des échantillons par CLHP, il est indispensable que la concentration en PA dans les échantillons soit proche de celle des standards de calibration. Une dilution des solutions prélevées a été effectuée du 10^{ème} au 300^{ème} simultanément à l'ajout de l'étalon interne propre à chaque PA.

II.3.6 Exploitation des résultats

II.3.6.a Détermination des quantités cumulées

A partir des résultats de quantification obtenus précédemment, la quantité cumulée (Q_{cum}) de chaque principe actif dans le milieu receveur, est calculée à l'aide de la formule suivante :

$$Q_{cum} = \left((C_n \times V) + \left(\sum_{i=1}^{n-1} C_i \times V_p \right) \right) \quad (\text{équation III.1})$$

Avec C_n , la concentration en principe actif dans le prélèvement n ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) ; V , le volume du compartiment receveur de la cellule de Franz (mL) ; V_p , le volume prélevé (mL) et n , le nombre de prélèvements effectués.

II.3.6.b Calcul du flux

Le flux (J , $\mu\text{g.cm}^{-2}.\text{h}^{-1}$) a été calculé sur la première heure de la cinétique de diffusion par linéarisation du profil ; il correspond à la pente de la droite de régression, divisée par la surface de la membrane.

II.3.6.c Modélisation des cinétiques

➤ **Modèles étudiés**

Différents modèles mathématiques (tableau III.1) ont été évalués pour décrire les profils de libération.

Tableau III.1 : Modèles mathématiques évalués pour décrire les cinétiques de libération des PA.

Modèle mathématique	Equation	Graphique	Référence
Ordre zéro	$Q_{cum} = Q_0 + K_0 t$	$Q_{cum} = f(t)$	(Aucoin, 2013)
Premier ordre	$\ln(Q_i - Q_{cum}) = \log Q_i - K_1 t$	$\ln(Q_i - Q_{cum}) = f(t)$	(Aucoin, 2013)
Higuchi	$Q_{cum} = K_H t^{1/2}$	$Q_{cum} = f(t^{1/2})$	(Aucoin, 2013)
Korsmeyer - Peppas	$Q_{cum} = \alpha Q_\infty t^n$	$\log Q_{cum} = f(\log t)$	(Aucoin, 2013)
Weibull	$Q_{cum}/Q_\infty = 1 - \exp[-(t - T_i)^b / a]$	$\log[-\ln(1 - Q_{cum}/Q_\infty)] = f(\log t)$	(Costa, 2001)
Hixson - Crowell	$(1 - Q_{cum}/Q_i)^{1/3} = 1 - K_\beta t$	$(1 - Q_{cum}/Q_i)^{1/3} = f(t)$	(Costa, 2001)

Q_0 : quantité initiale de PA dans le compartiment receveur ; Q_i : quantité de PA dans le compartiment receveur à l'instant t ; K_0 : constante de perméation d'ordre 0 ; Q_{cum} : quantité cumulée de PA dans le milieu receveur à l'instant t ; K_1 : constante de perméation d'ordre 1 ; K_H : constante d'Higuchi ; Q_∞ : quantité cumulée de PA dans le milieu receveur à l'équilibre ; n : exposant de diffusion ; T_i : temps initial avant le passage du PA dans le compartiment receveur ; a : paramètre d'échelle exprimé à partir de la valeur de $1/a$ à $t = 1$; b : coefficient de la pente ; K_β : constante d'Hixson – Crowell ; Q_i : quantité de PA initiale dans la forme galénique.

➤ Evaluation de l'ajustement du modèle

La qualité d'ajustement des modèles a été évaluée par le calcul du MAPE « Mean Absolute Percentage Error ». Ce paramètre, dont la formule est présentée ci-dessous, permet de réaliser une comparaison de Q_{cum} théorique (déterminé par le modèle) et de Q_{cum} expérimentale :

$$MAPE = \sum_{m=1}^m \frac{|Q_{cum\ expérimentale} - Q_{cum\ théorique}|}{m \times Q_{cum\ expérimentale}} \times 100 \quad (\text{équation III.2})$$

Où m est le nombre de points inclus dans le profil cinétique.

Le MAPE représente la moyenne obtenue à partir des écarts relatifs exprimés en valeurs absolues entre les quantités cumulées calculées à l'aide du modèle et les quantités cumulées observées pour chaque prélèvement effectué. Plus le MAPE est faible, plus le modèle décrit au mieux les résultats expérimentaux. Le MAPE a été déterminé pour chaque essai individuellement. Un MAPE moyen a ensuite été calculé pour chaque préparation étudiée à partir des essais réalisés en triplicat. Il a servi de paramètre pour sélectionner le modèle le plus pertinent.

II.3.6.d Comparaison des cinétiques de libération

Les profils cinétiques théoriques de chaque principe actif formulé individuellement dans chacun des cinq véhicules, et définis selon le modèle de Korsmeyer – Peppas, ont été comparés deux à deux en utilisant le facteur de similarité f_2 décrit par Moore et Flanner (Moore, 1996):

$$f_2 = 50 \times \log \left\{ \left[1 + \left(\frac{1}{m} \right) \sum (R_t - T_t)^2 \right]^{-0,5} \times 100 \right\} \quad (\text{équation III.3})$$

Où m , est le nombre de points des cinétiques de libération ; R_t et T_t , les pourcentages de principe actif libérés à chaque instant (t), pour les profils de référence et à tester, respectivement. Des valeurs de f_2 supérieures à 50 témoignent de la similarité entre deux profils cinétiques. Dans ces conditions, la différence moyenne entre les deux profils n'excède pas 10% (Shah, 1998).

II.4 Etude cinétique de la perméation des PA

II.4.1 Préparation des épidermes

Les oreilles de cochons ont été gracieusement fournies par l'animalerie du CHRU de Lille et les Abattoirs de Valenciennes dont l'obtention et l'utilisation ont fait l'objet d'une autorisation préfectorale. L'acheminement des oreilles a été réalisé par nos soins dans les deux heures qui ont suivi l'euthanasie, dans une glacière contenant des pains de glace. Dès réception, les oreilles ont été lavées à grande eau et tamponnées avec des compresses pour enlever le sang résiduel. Les oreilles ont ensuite été observées minutieusement afin d'exclure les parties altérées par d'éventuels érythèmes ou égratignures. La peau a ensuite été séparée du cartilage à l'aide d'un scalpel équipé d'une lame de 23 mm.

Les quelques soies présentes sur la face dorsale de l'oreille ont été délicatement rasées puis retirées de la peau préalablement humidifiée par du sérum physiologique. La peau a été séchée avant d'être stockée entre deux feuilles d'aluminium à -20°C pour une durée maximale d'un mois. Le processus d'épidermisation a été effectué sur une peau décongelée à température ambiante. La séparation épidermique a été réalisée par un procédé thermique. Pour ce faire, une section de peau d'une dizaine de cm^2 est immergée pendant 60 secondes dans un bain-marie d'eau distillée thermostaté à 60°C . La peau est ensuite retirée du bain-marie et humidifiée par du sérum physiologique avant d'être tendue à l'aide d'aiguilles sur une plaque de polystyrène. L'épiderme a délicatement été séparé du derme à l'aide d'une pince brucelle courbée puis étalée sur une feuille d'aluminium, stratum corneum côté air ambiant. Des morceaux de 2 cm^2 ont ensuite été coupés au scalpel pour s'adapter à la géométrie des cellules de Franz. La [figure III.3](#) présente les différentes étapes requises pour l'obtention des membranes épidermiques.



Figure III.3 : Procédure de préparation des épidermes à partir des faces dorsales de peau d'oreille de cochon.

II.4.2 Vérification de l'intégrité des épidermes

Avant d'étudier la perméation des formulations sur les peaux épidermées d'oreille de cochon, il est nécessaire de vérifier que ces membranes biologiques n'aient pas été endommagées lors du procédé d'épidermisation. Pour évaluer l'intégrité des épidermes, une mesure de l'impédance transépidermique a été réalisée sur chacun d'eux. Pour ce faire, l'épiderme est clampé sur la cellule de Franz (face extérieure du SC vers le haut) entre les compartiments donneur et receveur remplis d'un volume constant de solution saline physiologique de NaCl à 0,9% préalablement placée 15 min aux US. Deux électrodes en platine sont ensuite immergées, une dans le compartiment donneur et une deuxième dans le compartiment receveur via le bras de prélèvement. Ces deux électrodes placées de part et d'autre de la membrane, à une distance prédéfinie, sont reliées entre elles par un circuit électrique composé d'un ampèremètre, mesurant le courant en μA , d'un voltmètre, mesurant la tension en mV et d'un générateur de basses fréquences, délivrant une tension sinusoïdale de 1 V à une fréquence de 100 Hz.

A partir de la relation $Z=U/I$, où U est la tension efficace et I l'intensité efficace du courant mesuré, l'impédance Z du circuit est déduite à partir de cette relation. Les membranes pour lesquelles l'impédance totale du circuit est inférieure à $3,5 \text{ k}\Omega$ sont écartées.

II.4.3 Protocole expérimental de la cinétique de perméation

Le compartiment receveur de la cellule de Franz est tout d'abord rempli d'une solution de SBF ($\text{pH} = 7,4$) contenant 0,5% d'HP- β -CD. L'épiderme est placé à l'interface des deux compartiments qui sont ensuite maintenus avec une pince. La cinétique de perméation débute dès le dépôt de 200 mg de la forme transdermique à étudier sur l'épiderme, dans le compartiment donneur. Afin d'évaluer la quantité de principe actif ayant traversé l'épiderme, des prélèvements de 200 μL du milieu receveur, sont réalisés à 0,25 ; 0,5 ; 1 ; 2,5 ; 4 ; 5,5 ; 7 ; 16 ; 19 ; 23 et 40 h. Après chaque prélèvement, le volume du compartiment receveur est réajusté par ajout de 200 μL d'une solution

fraîche de SBF additionnée de 0,5% HP- β -CD et thermostatée à 32°C. Les différents prélèvements sont ensuite analysés par CLHP/UV (dexaméthasone et ondansétron) ou par CLHP/SM-SM (aprépitant).

II.4.4 Dosage

La concentration en dexaméthasone et en ondansétron dans chacun des prélèvements est déterminée en CLHP/UV par étalonnage interne en un point. La préparation des standards de calibration est réalisée selon le même protocole que celui décrit dans le *paragraphe II.3.5 de ce chapitre*. La détermination de l'aprépitant a été réalisée en CLHP/SM-SM à partir de la courbe d'étalonnage présentée dans le *chapitre II*, après addition de 5 μ L d'une solution d'étalon interne à 513 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ dans 45 μ L de chacun des échantillons.

II.4.5 Exploitation des résultats

II.4.5.a **Détermination des quantités cumulées**

A partir des résultats de quantification obtenus par CLHP/UV (pour la dexaméthasone et l'ondansétron) ou par CLHP/SM-SM (pour l'aprépitant), la quantité cumulée de chaque principe actif (Q_{cum}) dans le milieu receveur, a été calculée selon l'équation III.1 décrite précédemment.

II.4.5.b **Détermination des paramètres cinétiques**

L'évolution de Q_{cum} en fonction du temps a ensuite été tracée (*figure III.4*).

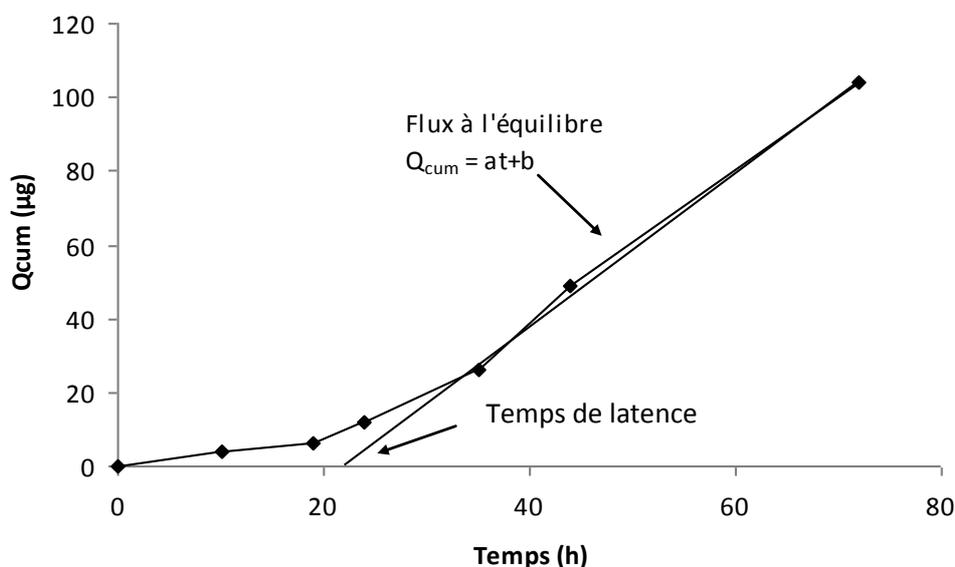


Figure III.4 : Quantité cumulée en fonction du temps : détermination graphique des paramètres cinétiques.

A partir de ce profil, il est possible d'évaluer le flux J ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$), la constante de perméabilité K_p ($\text{cm}\cdot\text{h}^{-1}$) et le temps de latence T_l (h).

Le Flux J ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$) représente la vitesse de perméation du principe actif lorsque l'équilibre du gradient de concentration est atteint. Il correspond à la pente a ($\mu\text{g}\cdot\text{h}^{-1}$) de la droite de régression tracée sur la portion linéaire de la cinétique de perméation, divisée par la surface de la membrane S (cm^2) (Baert, 2011).

$$J = \frac{a}{S} \quad (\text{équation III.4})$$

La constante de perméabilité, K_p ($\text{cm}\cdot\text{h}^{-1}$), est ensuite calculée selon la formule suivante (Korinth, 2005) :

$$K_p = \frac{J}{C_o} \quad (\text{équation III.5})$$

où C_o est la concentration en principe actif dans la formulation galénique ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$).

Le temps de latence T_l (h) appelé plus communément le « lag time », est le temps nécessaire à l'établissement de l'équilibre du gradient de concentration en principe actif dans la peau. Il correspond à l'intersection de la droite décrite précédemment avec l'axe des abscisses ($y = 0$) (Italo Giannola, 2007). Ainsi, T_l est obtenu à partir de la relation suivante :

$$T_l = \frac{|b|}{a} \quad (\text{équation III.6})$$

avec b , l'ordonnée à l'origine de la droite et a , le coefficient directeur de la droite.

II.4.5.c Analyses statistiques

Un test de Kruskal-Wallis suivi d'un test *post hoc* de Dunn a été réalisé afin de comparer les valeurs des flux et des quantités de PA diffusées à 40 h, à l'aide du logiciel XLSTAT. Les p-values inférieures à 0,05 indiquent des différences significatives.

III Résultats

III.1 Développement du protocole de formulation

Il a tout d'abord été nécessaire de choisir la teneur des trois PA dans les formes galéniques. En première approche, celles-ci ont été fixées en considérant les doses orales maximales administrées classiquement lors de l'association des 3 PA, pour traiter, chez l'adulte, les nausées et vomissements induits par une chimiothérapie hautement émétisante, à savoir 12 mg, 32 mg et 125 mg, respectivement pour la Dex, l'Ond et l'Apt. En supposant qu'un gramme de forme galénique sera déposé sur la peau du patient, des préparations contenant 1,2% ; 3,2% et 12,5% (m/m), respectivement de dexaméthasone, d'ondansétron et d'aprépitant auraient dû être préparées. Cependant, pour mener à bien les études *in vitro* visant à étudier la capacité intrinsèque de chaque formulation à libérer le PA, les teneurs pour l'ondansétron et l'aprépitant ont été ramenées à 1,6% compte tenu de la solubilité des PA dans le milieu introduit dans le compartiment receveur et pour conserver les « sink conditions ».

Dans un second temps, nous nous sommes consacrés au développement de protocoles de formulation en nous inspirant de la littérature publiée par Allen Loyd (Allen Loyd, 2000 a et b). Bien que l'ondansétron et la dexaméthasone aient déjà été formulés séparément l'un de l'autre dans le PLO aux concentrations suivantes 8 mg.mL⁻¹ et 12 mg.mL⁻¹, aucune donnée n'est disponible pour les autres véhicules, ni pour les autres principes actifs. Aucun protocole précis n'est détaillé : seule l'introduction du PA dans un solvant avant l'ajout du véhicule. Concernant l'aprépitant, il semblerait qu'il n'ait jamais été formulé en forme transdermique.

Compte tenu de la difficulté à préparer de faibles volumes de forme galénique de l'ordre du mL et à incorporer de grande quantité de poudre, le protocole de préparation a fait l'objet de plusieurs échecs avant d'être validé. En effet, différents paramètres tels que le support de préparation (ex : une plaque en verre engendre une perte éthanolique et un tube à hémolyse limite l'accès au mélangeur due à sa géométrie) ; ou encore le mélangeur (ex : un mélangeur industriel est de dimensions inadaptées) ont été étudiés. Le flacon choisi (V =5 mL ; d.i. = 1,2 cm ; h = 3,5 cm) permet d'homogénéiser la préparation sans évaporation de solvant, par passage au bain à ultrasons suivi d'une étape de mélange à l'aide d'une spatule recourbée à son extrémité à 90° et d'un vortex. On peut noter que le PLO® diffère des autres véhicules par son mélange extemporané de deux phases distinctes, la lécithine et le Pluronic® F127 préalablement refroidi, ce qui nécessite des étapes supplémentaires et contribue à augmenter le temps de préparation. Dans tous les cas, ces véhicules sont incorporés à un PA mouillé par un solvant approprié. Un solvant commun aux trois PA, l'éthanol a été retenu. Il a été choisi afin de rendre possible une association de ces 3 PA dans une même

formulation. L'éthanol joue également le rôle de promoteur d'absorption. On a donc pris soin de l'ajouter aux véhicules de manière à ce que sa teneur soit identique dans toutes les formes préparées et que les cinétiques de diffusion de chaque véhicule puissent ainsi être comparées sans être biaisées.

La qualité des préparations et la validité du protocole de formulation ont été évaluées en dosant les PA par CLHP/UV (méthode préalablement validée) dans les différentes formes galéniques développées.

III.2 Contrôle des formes galéniques

III.2.1 Teneur en PA

Le contrôle a été réalisé selon le protocole décrit dans le *paragraphe II.3 du chapitre II*, pour les différentes formes galéniques contenant un seul principe actif. Il consiste à apprécier la teneur du PA à trois niveaux dans la forme galénique (haut, moyen et bas). Pour cela on évalue par CLHP/UV, la teneur en principe actif dans des prélèvements (n = 3) effectués dans le flacon servant à la préparation de la forme galénique. Il est alors possible de calculer un taux de recouvrement (écart à la valeur attendue exprimée en %) à l'aide de la formule suivante :

$$\text{Recouvrement (\%)} = \frac{[PA_{\text{expérimental}}]}{[PA_{\text{théorique}}]} \times 100 \quad (\text{équation III.7})$$

Les valeurs moyennes obtenues pour les 15 préparations sont présentées sur la figure III.5 sous forme d'histogrammes, ainsi que les écarts types associés.

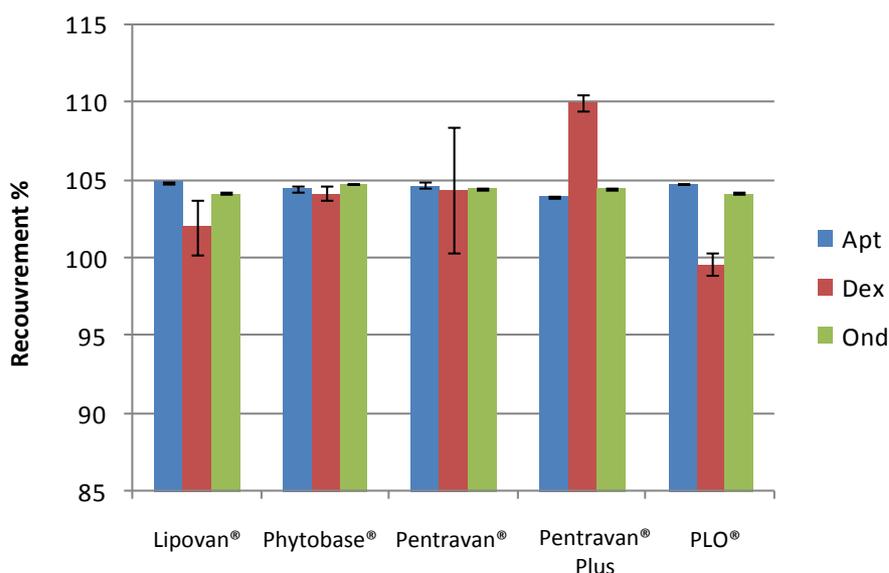


Figure III.5 : Pourcentage de recouvrement des différents PA dans les différentes formes transdermiques.

Pour l'ensemble des préparations, les coefficients de variation sont inférieurs à 4% et traduisent une homogénéité des formes galéniques. Les pourcentages de recouvrement sont compris entre 99,6% et 110%. Les recouvrements, en accord avec les critères d'acceptation décrits dans la pharmacopée, sont donc corrects.

III.2.2 Caractéristiques physico-chimiques

Le contrôle du pH des préparations transdermiques a montré une acidité autour de 5-6, compatible avec une application cutanée.

Une observation microscopique (x 400) des formulations et des véhicules exempts de PA, a permis d'évaluer le degré de solubilisation des principes actifs dans chacun des cinq véhicules (figure III.6).

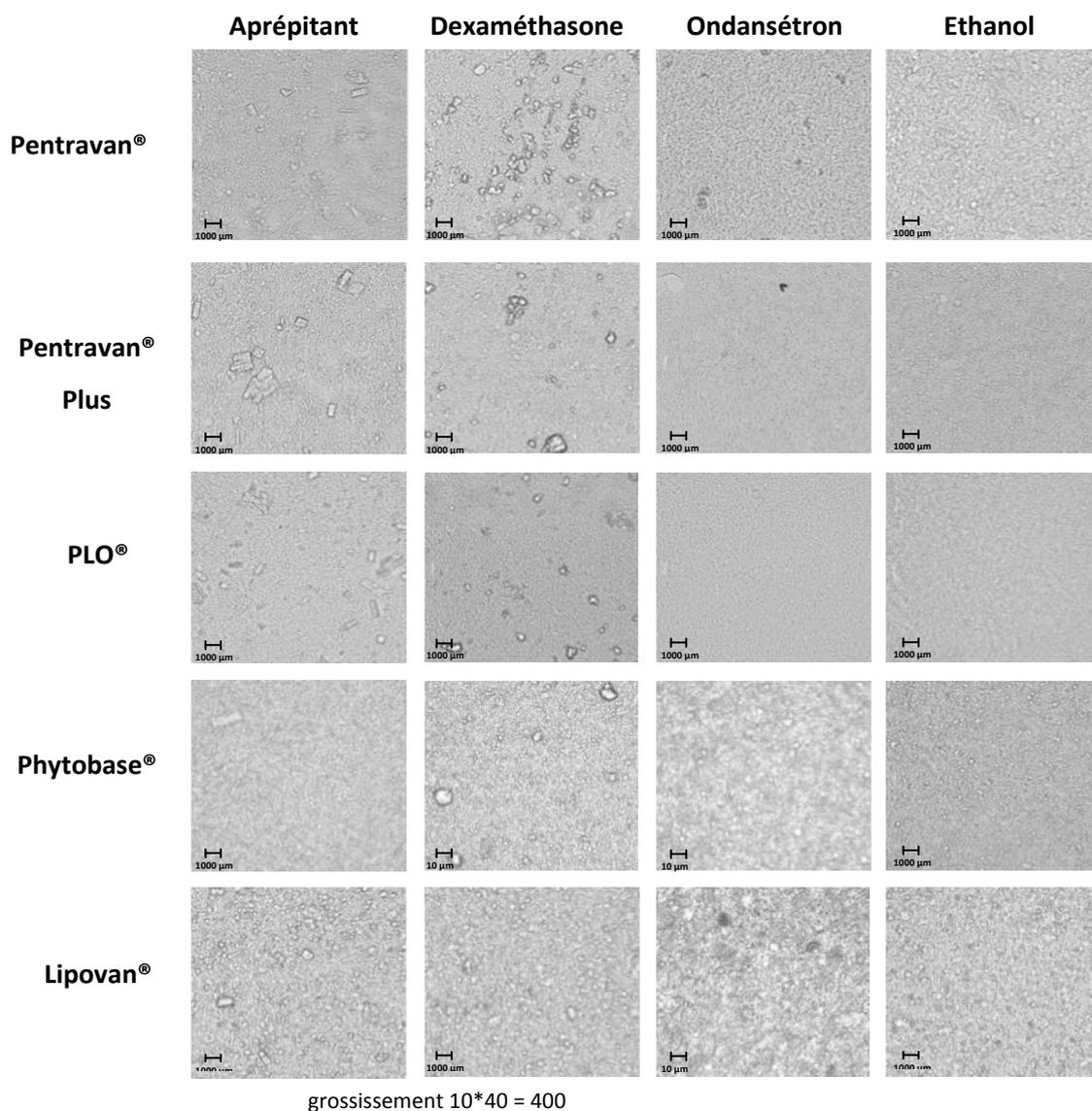


Figure III.6 : Véhicules transdermiques seuls ou en présence de PA observés en microscopie optique

On observe la présence de particules ou d'aggrégats d'aprépitant et de dexaméthasone dans l'ensemble des cinq véhicules indiquant une solubilisation partielle de ces PA dans la formulation. Au grossissement 400, l'ondansétron semble être totalement solubilisé dans les différents véhicules, excepté dans le Pentravan®. Ceci permet également de confirmer l'avantage du Pentravan® Plus par rapport à son homologue le Pentravan®, de contenir des quantités de PA plus importantes. Les différences de solubilité peuvent être à l'origine des particules de PA dans les formulations.

III.3 Etude de la cinétique de libération des principes actifs

Pour administrer un PA par voie transdermique, celui-ci doit tout d'abord être libéré de la formulation galénique avant de pénétrer la peau puis rejoindre la circulation systémique. Pour certaine formulation et en fonction des propriétés physico-chimiques du PA, cette première étape de libération peut être le facteur limitant lors du développement d'une nouvelle forme galénique.

Ainsi, l'objectif de cette étude est de comparer la capacité de chaque véhicule à libérer chacun des PA. Après avoir choisi la composition du milieu receveur, la cinétique de libération des PA a été étudiée à l'aide des cellules de Franz en utilisant des membranes synthétiques poreuses et chimiquement inertes. Pour chaque PA, les profils de libération obtenus dans chacun des cinq véhicules ont été comparés et une première tendance de libération a pu être observée en évaluant le flux initial et la quantité cumulée dans le compartiment receveur après 24 h. Afin d'affiner ces résultats, des constantes cinétiques de libération ont été déterminées à partir d'un modèle mathématique adapté, préalablement sélectionné parmi six modèles étudiés, permettant une comparaison plus « fine » des résultats.

III.3.1 Etude préliminaire : choix du milieu receveur

Avant d'étudier la capacité des différents véhicules à libérer les PA, il est indispensable de choisir une solution qui servira de milieu receveur dans la cellule de Franz. En effet, les PA doivent être suffisamment solubles dans cette solution pour que leur cinétique de libération ne soit pas impactée. On se doit de respecter les « sink conditions », à savoir ne pas dépasser 10% de la concentration saturante en PA dans le compartiment receveur.

Une étude de la solubilité de chacun des trois PA a été réalisée à 32°C dans l'eau et en milieu hydro-alcoolique (H₂O/EtOH - 50/50 (v/v)). Les résultats sont présentés dans le tableau III.2 :

Tableau III.2 : Solubilité des trois PA dans l'eau et en milieu hydro-alcoolique.

Milieu	Solubilité (mg.L ⁻¹)		
	Aprépitant	Dexaméthasone	Ondansétron
H ₂ O	5,2 ± 2,3	111 ± 38	54 882 ± 11 689
EtOH/H ₂ O – 50/50	3 077 ± 530	8 000 ± 1646	108 886 ± 18 568

Bien que l'Ond soit fortement soluble dans l'eau (54 900 mg.L⁻¹), l'eau ne peut pas être utilisée comme milieu receveur, en raison de la faible solubilité de l'Apt (5,2 mg.L⁻¹) et de la Dex (111 mg.L⁻¹). Dans un mélange EtOH/H₂O (50/50-v/v), les solubilités de l'Apt, de la Dex et de l'Ond sont significativement augmentées d'un facteur 600, 72 et 2, respectivement. Ainsi, les solubilités de l'Apt, de la Dex et de l'Ond sont respectivement de 3077, 8000 et 108 886 mg.L⁻¹ en milieu hydro-éthanolique. Ce milieu a été sélectionné pour réaliser les études des cinétiques de libération des 3 PA.

III.3.2 Profils cinétiques de libération

L'aptitude des 5 véhicules à libérer les 3 PA a été évaluée au moyen de cellules de diffusion de Franz en utilisant une membrane synthétique en acétate de cellulose. Les quantités cumulées d'Apt, de Dex et d'Ond, recueillies dans le milieu receveur, ont été déterminées en fonction du temps (figure III.7).

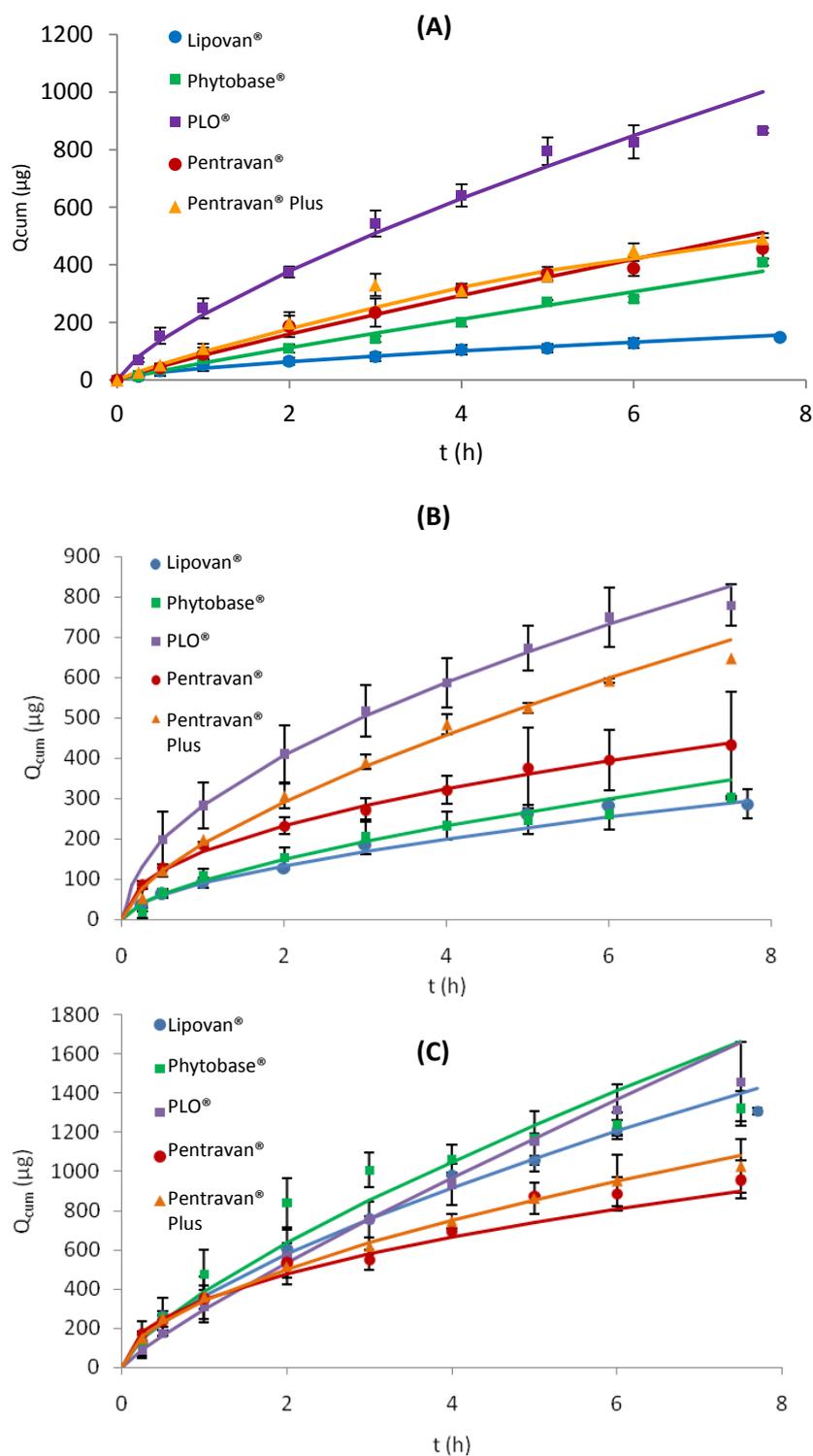


Figure III.7 : Profils cinétiques de libération moyens (n = 3) de (A) l'aprépitant, (B) la dexaméthasone et (C) l'ondansétron, formulés dans les différents véhicules.

Les points expérimentaux sont représentés par des symboles et les lignes pleines matérialisent les profils cinétiques modélisés par l'équation de Korsmeyer-Peppas. Les barres d'erreur représentent les écarts type calculés à partir de trois essais indépendants.

A partir de ces profils cinétiques, les quantités de PA libérées à 7,5 h ($Q_{cum, 7,5 h}$) ont été déterminées et les flux initiaux (J) ont été calculés par linéarisation des courbes sur les 60 premières minutes après l'initiation de la cinétique de diffusion. Les résultats sont présentés sur la figure III.8.

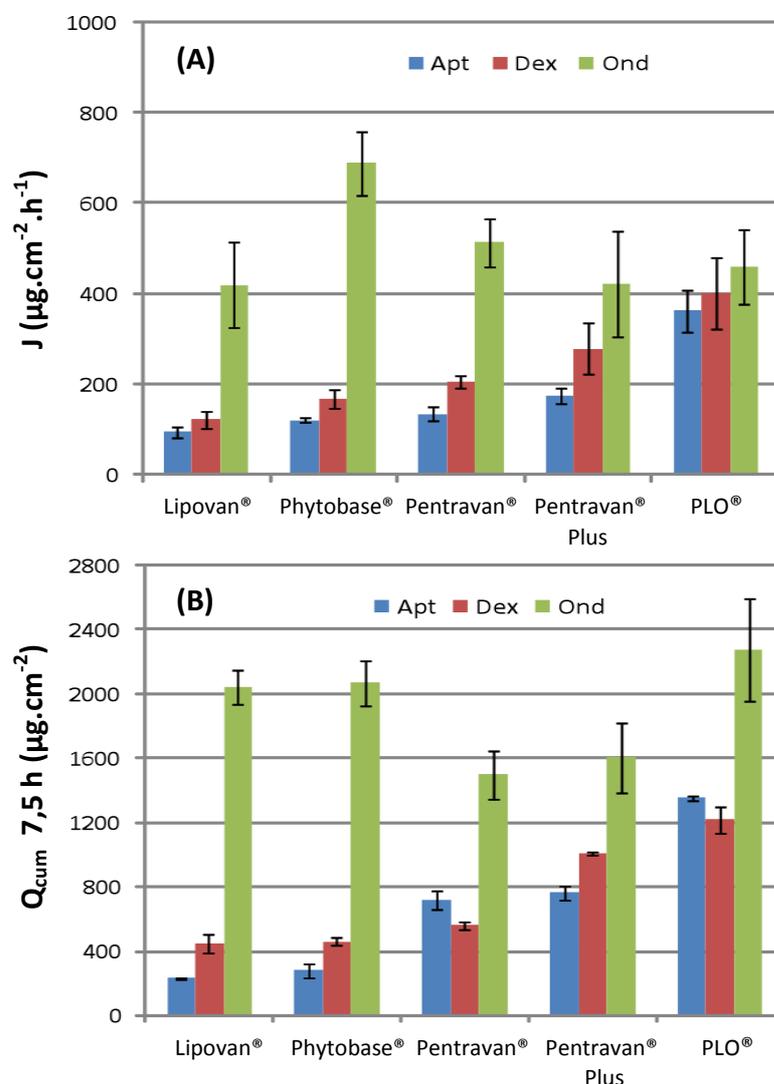


Figure III.8 : (A) Flux (J) et (B) quantités cumulées à 7,5 h ($Q_{cum, 7,5 h}$) de chaque PA dans le milieu receveur pour chacune des formulations préparées.

Les barres représentent les écarts-type calculés à partir de 3 déterminations.

Pour l'aprépitant et la dexaméthasone, le flux et la quantité de PA libérée à 7,5 h augmentent lorsque l'on passe successivement du Lipovan®, au Phytobase®, au Pentravan®, au Pentravan® Plus et au PLO®. Par exemple, lorsque le Lipovan® est utilisé pour formuler l'Apt, sa cinétique de libération est lente ($J < 121 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$) et la quantité cumulée (Q_{cum}) dans le compartiment receveur est faible ($290 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$, *i.e.* 5% de la quantité déposée). Lorsque le PLO® est utilisé, le flux et la quantité cumulée augmentent d'au moins un facteur trois : les valeurs de Q_{cum} mesurées sont

respectivement égales à $320 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ et $1350 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ (25% de la quantité déposée). Pour la dexaméthasone, après 7,5 h, 25% de la quantité déposée a été libérée ($1200 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$), avec une vitesse de libération égale à $400 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$. Quel que soit le véhicule, le flux et la quantité cumulée dans le compartiment receveur pour l'Apt et la Dex sont relativement similaires compte tenu de la précision des mesures (écart type).

Concernant l'ondansétron, les différences entre les véhicules sont moins marquées. En effet, tous les véhicules permettent la libération d'au moins 25% de la quantité initiale de PA contenue dans les formulations. Toutefois, il semblerait que le Lipovan[®], le Phytobase[®] et le PLO[®] soient capables de libérer de plus fortes quantités d'Ond ($> 2045 \mu\text{g cm}^{-2}$ – 40% de la quantité déposée) que le Pentravan[®] et le Pentravan[®] Plus ($1550 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ – 30% de la quantité déposée). Par ailleurs, la cinétique de libération est plus rapide dans le Phytobase[®] ($J = 753 \pm 153 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$) que dans les autres véhicules ($420 < J < 514 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$).

Quel que soit le véhicule, l'Ond diffuse à travers la membrane synthétique plus rapidement et en plus grande quantité que la Dex et l'Apt. Ces différences de comportement sont probablement liées aux propriétés physico-chimiques des PA, telles que leur caractère hydrophobe et leur état d'ionisation. Bien que l'Ond et la Dex possèdent un caractère hydrophobe similaire ($\log P = 2$ et $1,83$, respectivement), la cinétique de libération de l'Ond est 2 à 3 fois plus rapide que celle de la Dex. Cette différence peut être expliquée en partie par leur état de charge qui diffère lorsqu'ils sont introduits dans les véhicules transdermiques. En effet, à pH 6 (pH du véhicule), l'Ond est principalement sous sa forme cationique, tandis que la Dex est sous sa forme neutre. De plus, les coefficients de distribution ($\log D$) de l'Ond et la Dex, respectivement égaux à $0,39$ et $1,83$, conduisent à une répartition différente de ces deux PA dans les phases lipophile et hydrophile des véhicules transdermiques, en faveur de la libération de l'Ond. Par ailleurs, bien que l'Apt soit sous sa forme cationique à pH 6, son caractère hydrophobe très marqué ($\log P = 4,8$) réduit sa solubilité en milieu aqueux ($5,2 \pm 2,3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) et par conséquent limite sa vitesse de libération et ses quantités libérées.

Afin de vérifier cette hypothèse, l'Ond a été formulé dans les véhicules dont le pH avait été préalablement fixé à 3 et 9, par l'ajout d'HCl 1 M ou de NaOH 1M, respectivement. Les cinétiques de diffusion ont alors été initiées comme décrit précédemment. A titre d'exemple, la [figure III.9](#) présente l'influence du pH de la formulation à base de Pentravan[®] sur la libération de l'Ond.

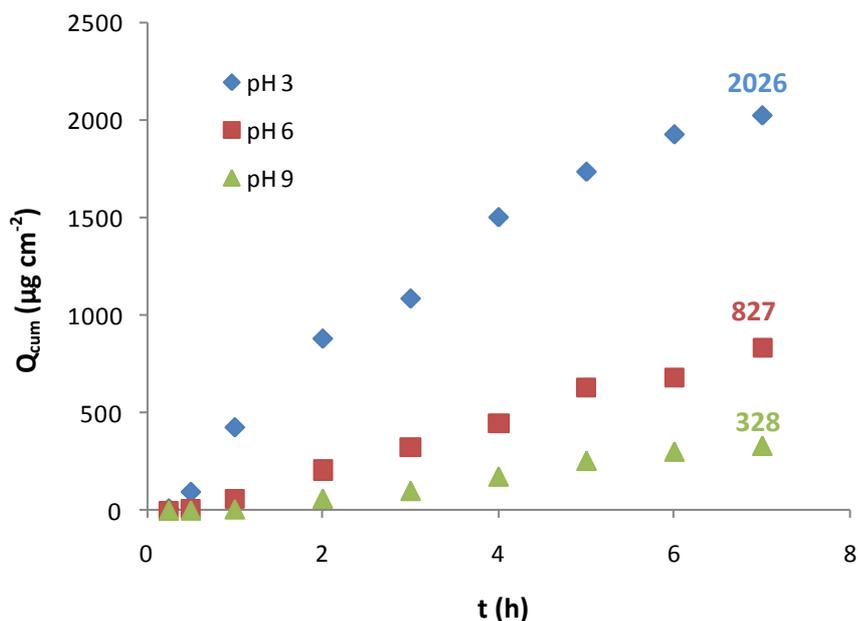


Figure III.9: Influence du pH de la formulation à base de Pentravan® sur le profil cinétique de libération de l'ondansétron.

Il apparaît clairement que le pH de la formulation impacte fortement le flux et la quantité d'Ond libérée. En effet, la quantité cumulée d'Ond dans le milieu receveur, à 7 h, augmente d'un facteur 6 en acidifiant la formulation. De la même manière, une diminution du pH de la formulation (de 9 à 3), accélère substantiellement sa vitesse de diffusion sur la première heure de la cinétique (J varie de 8 à $513 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$). Ce résultat conforte l'hypothèse proposée précédemment relative à l'influence du taux d'ionisation de l'Ond ($\text{pK}_a = 7,6$) sur sa cinétique de libération. Ainsi, compte tenu de la composition du Pentravan® Plus, il semblerait que, sous sa forme neutre, l'Ond reste préférentiellement solubilisé dans la phase liposomale du véhicule conduisant à une diminution de la vitesse de diffusion et des quantités libérées ou qu'il soit moins soluble dans la phase hydrophile externe. Payghan *et al* (Payghan, 2012) avaient déjà noté l'influence du pH lors de la formulation du piroxicam dans des émulsions non aqueuses, afin de favoriser le taux de libération.

III.3.3 Modélisation des profils cinétiques de libération

Afin d'élucider les mécanismes mis en jeu lors du processus de libération des PA par les différents véhicules transdermiques prêts à l'emploi, les 15 profils cinétiques ont été étudiés à l'aide de six modèles cinétiques (ordre zéro, premier ordre, Hixson-Crowell, Higushi, Korsmeyer-Peppas et Weibull) présentés dans le tableau III.1 du *paragraphe II.3.6.c* de ce chapitre.

III.3.3.a Démarche expérimentale

La méthodologie d'évaluation de ces modèles est la suivante :

1. Evaluation des paramètres constants (K, a, b, n) et de R² (coefficient de détermination)

Dans un premier temps, une évaluation des paramètres constants reliant la quantité cumulée (Q_{cum}) au temps (t), en prenant en compte l'expression mathématique correspondante au modèle étudié, est effectuée. Pour ce faire, l'ensemble des points expérimentaux pour lesquels l'équilibre n'est pas atteint ont été linéarisés à l'aide des équations mathématiques présentées dans le tableau III.3:

Tableau III.3 : Fonctions mathématiques et paramètres constants déterminés

Modèle	Linéarisation		
	Fonction étudiée	Pente	Ordonnée à l'origine
Ordre 0	$f(t) = Q_{cum}$	K ₀	Q ₀
Ordre 1	$f(t) = \ln Q_{cum}$	K ₁	lnQ _{cum}
Higuchi	$f(t^{1/2}) = Q_{cum}/S$	K _H	0
Korsmeyer-Peppas	$f(\log(t)) = \log Q_{cum}$	n	log K
Weibull	$f(\log t) = \text{Log} [-\ln (1 - (Q_{cum} - Q_i))]$	b	-log a
Hixson-Crowell	$f(t) = [1 - (1 - ((Q_i - Q_{cum}) / Q_i))^{1/3}]^3$	K _β	1

Abréviations : voir Tableau III.1 du paragraphe II.3.6.c de ce chapitre

Le coefficient de détermination R² de la droite obtenue sert de premier paramètre d'évaluation de la capacité du modèle à décrire les résultats expérimentaux. Cette exploitation se fait pour chaque cellule de Franz indépendamment. La valeur moyenne des R² obtenus pour les trois cellules est alors calculée. Si R² ≥ 0,95, l'évaluation du modèle est poursuivie (le cas échéant, le modèle est rejeté). La pente et/ou l'ordonnée à l'origine de la droite obtenue, permettent de calculer les paramètres constants inclus dans le modèle.

2. Calcul de la quantité théorique « Q_{cum} théorique »

Le calcul de la Q_{cum} théorique en fonction du temps est effectué à partir de l'expression mathématique du modèle et grâce aux paramètres constants déterminés précédemment. Elle permet de dessiner un profil de libération théorique qui par similitude avec le profil expérimental permet de visualiser la capacité du modèle à représenter les points expérimentaux.

3. Calcul du MAPE

Le calcul du MAPE (équation III.2) a permis de réaliser une comparaison entre le $Q_{cum\ théorique}$ et le $Q_{cum\ expérimentale}$. Ce paramètre est un critère décisionnel permettant de sélectionner la fonction mathématique la plus adaptée pour modéliser la cinétique de libération des PA à partir des véhicules transdermiques.

III.3.3.b Illustration de cette démarche : cas de la dexaméthasone formulée dans le PLO®

Afin d'illustrer cette démarche méthodologique, nous avons choisi de présenter en détail les résultats obtenus à partir de la dexaméthasone formulée dans le PLO®.

1. Evaluation des paramètres constants et des coefficients de détermination (R^2) pour chaque modèle.

Pour chaque modèle évalué, la fonction mathématique qui a permis d'étudier les résultats expérimentaux, ainsi que les paramètres constants pouvant être déterminés sont regroupés dans le tableau III.3. La figure III.10 présente l'ensemble des profils obtenus selon ces différents modèles mathématiques.

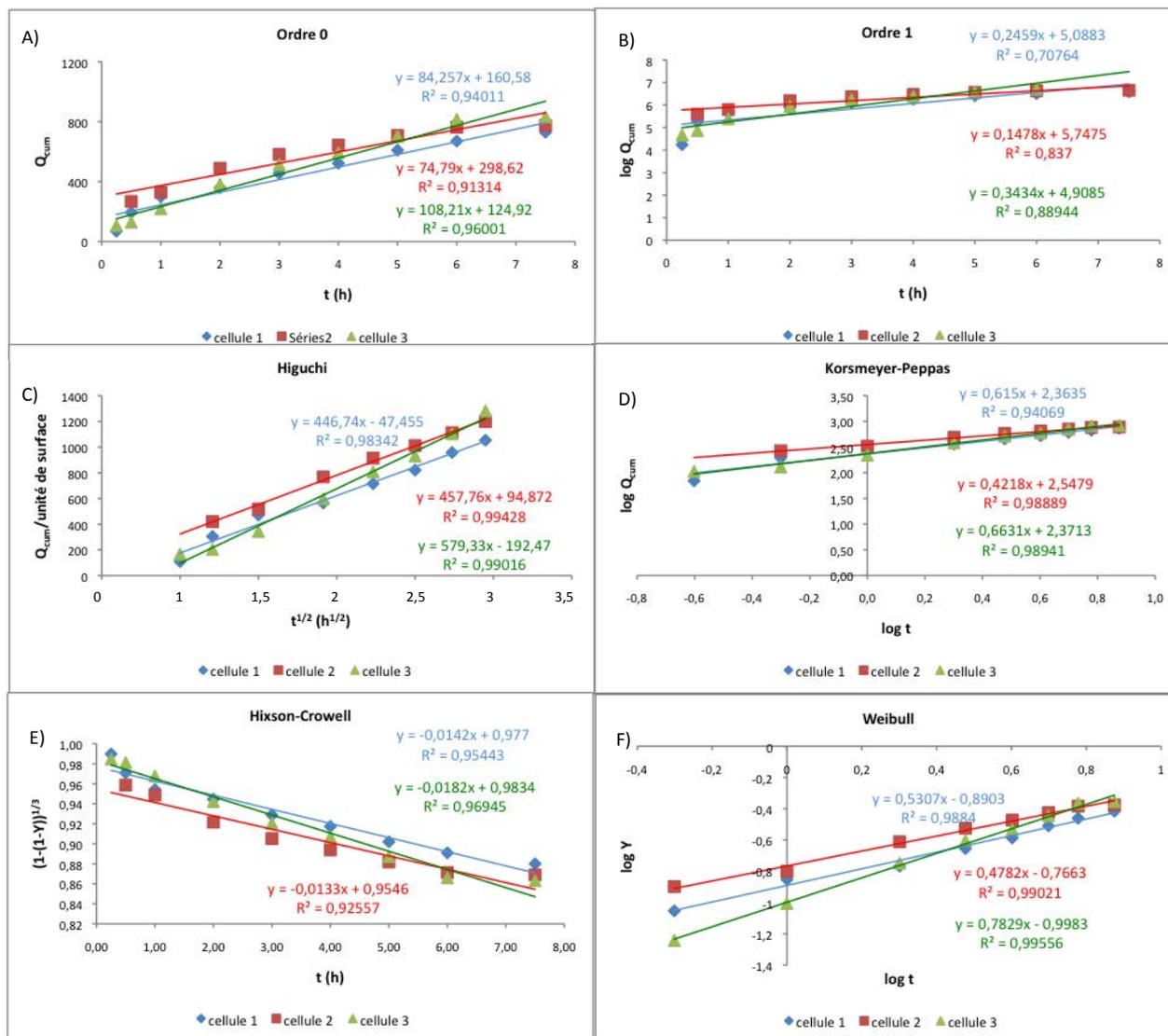


Figure III.10 : Profils de libération de la dexaméthasone dans le PLO® modélisés par une cinétique d'ordre 0 (A), d'ordre 1(B), le modèle d'Higuchi (C), Korsmeyer-Peppas (D), Hixson Crowell (E) et Weibull (F).

Des valeurs de R^2 moyennes inférieures à 0,95 ont été obtenues pour l'ordre 0 et l'ordre 1 contrairement aux modèles d'Higuchi, de Korsmeyer-Peppas, d'Hixson-Croxell et de Weibull pour lesquels les R^2 moyens sont respectivement de 0,98 ; 0,99 ; 0,95 et 0,99 (tableau III.4).

Tableau III.4 : Coefficients de détermination (R^2) moyens obtenus par linéarisation des modèles d'ordre 0, d'ordre 1, d'Higuchi, de Korsmeyer-Peppas, d'Hixson-Crowell et Weibull.

	Modèles cinétiques					
R^2	Ordre 0	Ordre 1	Higuchi	Korsmeyer Peppas	Hixson Crowell	Weibull
cellule 1	0,94	0,71	0,98	0,95	0,95	0,99
cellule 2	0,91	0,84	0,99	0,99	0,93	0,99
cellule 3	0,96	0,89	0,99	0,99	0,97	0,99
moyenne	0,94	0,81	0,98	0,99	0,95	0,99
σ	0,02	0,09	0,02	0,01	0,02	0,01
CV (%)	3	12	2	1	2	1

Cela nous a conduit à rejeter l'ordre 0 et 1 et à poursuivre l'évaluation des autres modèles par l'estimation des Q_{cum} théoriques.

2. Calcul de la quantité théorique « Q_{cum} théorique »

Le calcul des quantités théoriques est réalisé à partir des équations décrites dans le tableau III.1 de ce chapitre. Dans un premier temps, la capacité de prédiction de chaque modèle peut être appréciée graphiquement en comparant le profil cinétique de libération expérimental et le profil obtenu à l'aide du modèle. Pour chaque modèle, le graphique est représenté dans la figure III.11.

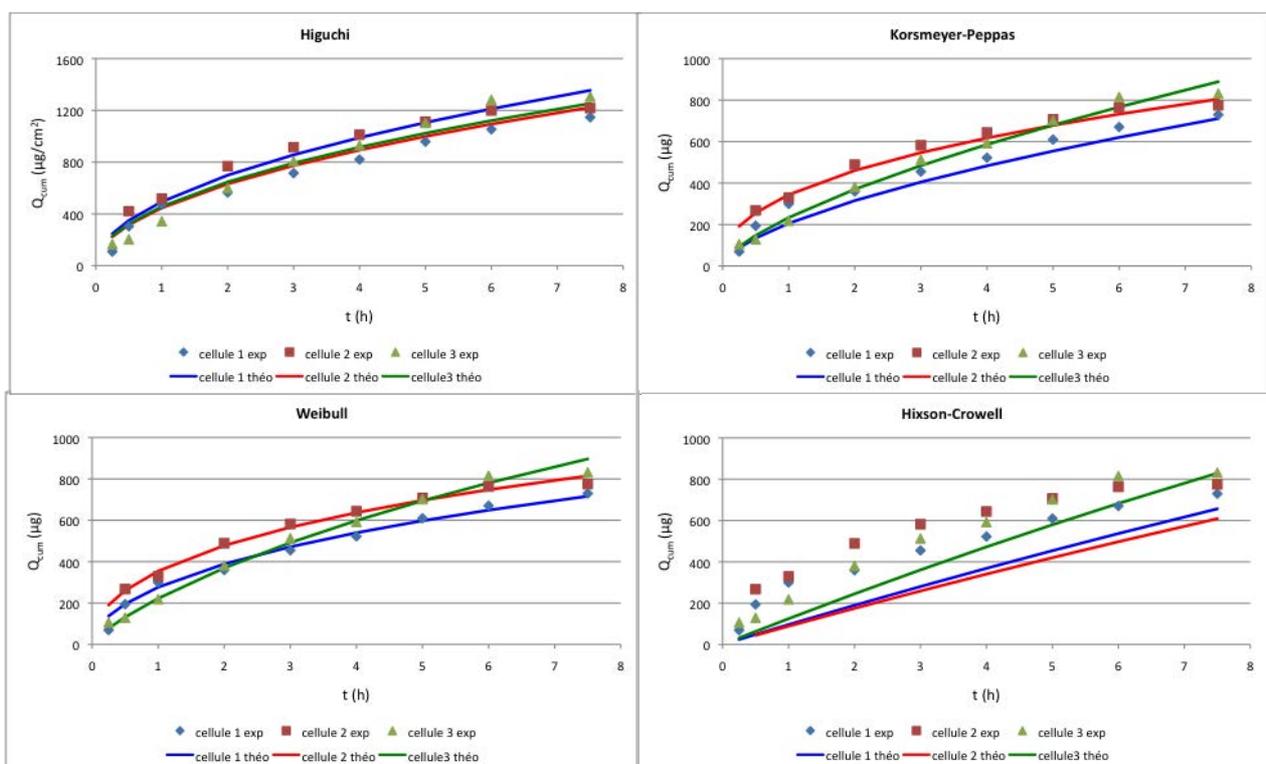


Figure III.11 : Comparaison entre les cinétiques de libération expérimentales et théoriques de la dexaméthasone dans le PLO® pour les modèles d'Higuchi, Korsmeyer-Peppas, Weibull et Hixson-Crowell.

On observe une bonne adéquation entre les points expérimentaux et les profils théoriques pour les modèles d'Higuchi, de Korsmeyer-Peppas et de Weibull. En revanche, les tracés obtenus par le modèle cinétique d'Hixson-Crowell décrivent très partiellement les résultats expérimentaux. Afin de confirmer ces hypothèses et de différencier la qualité de prédiction de ces modèles, les valeurs de MAPE moyens ont été calculées.

3. Calcul du MAPE

Les MAPE moyens obtenus pour les quatre modèles préalablement retenus sont présentés sous forme d'histogramme (figure III.12):

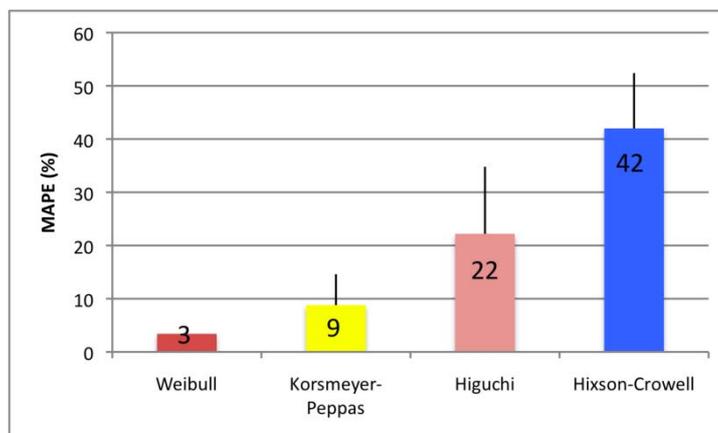


Figure III.12 : Histogramme des MAPE moyens (%) obtenus après modélisation des profils cinétiques de libération de la dexaméthasone dans le PLO® avec les modèles de Weibull, Korsmeyer-Peppas, Higuchi et Hixson-Crowell.

Les modèles d'Hixson-Crowell et d'Higuchi présentent respectivement des MAPE moyens supérieurs à 40 et 20% présageant d'un mauvais ajustement de ces modèles pour décrire les profils cinétiques de libération. En revanche, les MAPE moyens sont inférieurs à 10% pour les modèles de Korsmeyer-Peppas et de Weibull. On peut noter une supériorité prédictive pour le modèle de Weibull (MAPE moyen = 3%) par rapport à Korsmeyer-Peppas (MAPE moyen = 9%). Toutefois, dans les deux cas, l'erreur de prédiction reste faible et est acceptable.

Ainsi, le calcul du MAPE permet d'affiner la sélection du modèle. Pourtant, plusieurs études (Malakar, 2012) sélectionnent leur modèle cinétique uniquement en évaluant le R^2 . Si nous nous étions arrêtés à ce seul paramètre, les erreurs prédictives de modélisation avec Hixson-Crowell n'auraient pas été acceptables (MAPE > 40 %). De plus, les R^2 moyens pour Higuchi, Korsmeyer-Peppas, et Weibull respectivement de 0,98 – 0,99 et 0,99 ne permettaient pas de différencier la qualité des modèles. Le calcul du MAPE moyen nous a donc permis de montrer la faiblesse du modèle d'Hixson Crowell et de prioriser la qualité prédictive des modèles restants à savoir, Higuchi < Korsmeyer-Peppas < Weibull.

III.3.3.c Application de l'approche à la dexaméthasone formulée dans chaque véhicule

Cette approche a été appliquée à la dexaméthasone formulée dans les quatre autres véhicules. Les MAPE moyens obtenus pour ce PA dans l'ensemble des véhicules sont détaillés dans [la figure III.13](#).

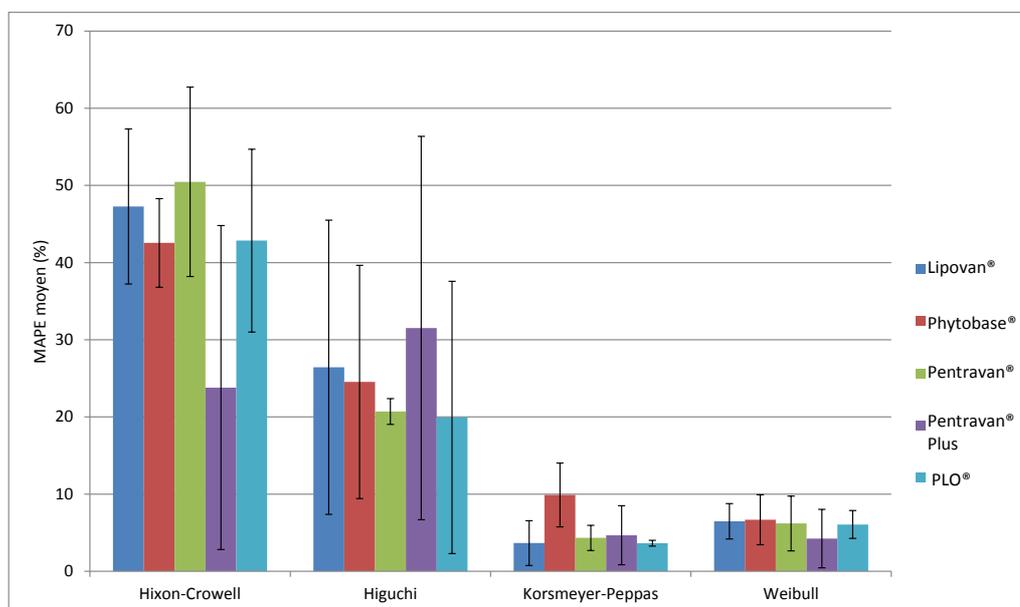


Figure III.13 : MAPE moyens obtenus avec les modèles d'Hixson-Crowell, d'Higuchi, de Korsmeyer-Peppas et de Weibull pour la dexaméthasone dans les cinq véhicules (Pentravan®, Pentravan® Plus, Lipovan®, Phytobase® et PLO®).

Comme pour le PLO®, l'ordre 0 et l'ordre 1 n'ont pas fait l'objet d'un calcul des MAPE moyens car les R^2 moyens étaient inférieurs à 0,95. Pour l'ensemble des véhicules à l'étude contenant la dexaméthasone, les plus faibles MAPE ont été obtenus avec les modèles de Korsmeyer-Peppas et de Weibull respectivement $\leq 15\%$ et $< 10\%$.

III.3.3.d Généralisation à l'ensemble des principes actifs

Un même constat peut être fait pour l'ondansétron et l'aprépitant et ce dans les cinq véhicules. Pour l'ondansétron, les MAPE moyens obtenus respectivement pour Korsmeyer-Peppas et Weibull sont inférieurs à 12% et 14% ; pour l'aprépitant ils sont inférieurs à 14% pour ces deux modèles ([tableau III.5](#)).

Tableau III.5 : Evaluation des modèles cinétiques : R² et MAPE (%)

			Lipovan®	Phytobase®	Pentraivan®	Pentraivan® Plus	PLO®
Aprépitant	Ordre zéro	R ²	0,924	0,959	0,961	0,941	0,937
		MAPE (%)	n.d.	23	22	n.d.	n.d.
	Ordre un	R ²	0,944	0,962	0,971	0,941	0,947
		MAPE (%)	n.d.	22	15	n.d.	n.d.
	Hixson-Crowell	R ²	0,954	0,961	0,967	0,951	0,945
MAPE (%)		38	22	17	26	n.d.	
Higuchi	R ²	0,970	0,991	0,988	0,971	0,980	
	MAPE (%)	29	97	80	82	48	
Korsmeyer-Peppas	R ²	0,950	0,967	0,982	0,979	0,983	
	MAPE (%)	14	14	8	10	9	
Déxaméthasone	Ordre zéro	R ²	0,975	0,939	0,884	0,967	0,940
		MAPE (%)	52	n.d.	n.d.	39	n.d.
	Ordre un	R ²	0,978	0,931	0,923	0,974	0,960
		MAPE (%)	50	n.d.	n.d.	32	39
	Hixson-Crowell	R ²	0,958	0,929	0,931	0,971	0,956
MAPE (%)		47	n.d.	n.d.	24	43	
Higuchi	R ²	0,995	0,976	0,976	0,994	0,987	
	MAPE (%)	26	25	21	32	20	
Korsmeyer-Peppas	R ²	0,995	0,970	0,987	0,994	0,991	
	MAPE (%)	4	10	4	5	4	
Ondansétron	Ordre zéro	R ²	0,968	0,878	0,931	0,947	0,964
		MAPE (%)	39	n.d.	n.d.	n.d.	25
	Ordre un	R ²	0,969	0,876	0,942	0,968	0,978
		MAPE (%)	39	n.d.	n.d.	46	25
	Hixson-Crowell	R ²	0,964	0,866	0,939	0,968	0,974
MAPE (%)		34	n.d.	n.d.	38	17	
Higuchi	R ²	0,989	0,954	0,958	0,990	0,985	
	MAPE (%)	35	45	11	28	69	
Korsmeyer-Peppas	R ²	0,986	0,952	0,952	0,983	0,973	
	MAPE (%)	7	15	8	6	12	

MAPE (%) : Mean Absolute Percentage Error

Le modèle de Weibull étant un modèle exclusivement empirique (Costa, 2001) et ne reposant sur aucun mécanisme de libération rationnel, son utilisation lors d'études de diffusion est très souvent critiquée. Par conséquent, le modèle le plus pertinent pour décrire nos résultats est celui de Korsmeyer-Peppas comme en attestent les profils théoriques définis sur la [figure III.7](#).

Les paramètres du modèle de Korsmeyer-Peppas (αQ_{∞} et n) ont alors été déterminés pour les 3 PA formulés dans chaque véhicule (tableau III.6).

Tableau III.6 : Paramètres du modèle de Korsmeyer-Peppas (αQ_{∞} et n) pour l'aprépitant, la dexaméthasone et l'ondansétron formulés seuls dans chacun des véhicules.

PA	Véhicule	αQ_{∞}	n
Aprepitant	Lipovan®	41,4 ± 3,3	0,67 ± 0,19
	Phytobase®	59,4 ± 18,8	0,91 ± 0,07
	Pentravan®	86,6 ± 18,3	0,86 ± 0,03
	Pentravan® Plus	98,1 ± 10,3	0,86 ± 0,03
	PLO®	227,6 ± 19,6	0,74 ± 0,04
Dexaméthasone	Lipovan®	89,0 ± 17,0	0,58 ± 0,11
	Phytobase®	95,8 ± 18,0	0,64 ± 0,08
	Pentravan®	168,5 ± 5,1	0,47 ± 0,10
	Pentravan® Plus	186,4 ± 31,6	0,65 ± 0,13
	PLO®	283,3 ± 66	0,54 ± 0,15
Ondansétron	Lipovan®	363,4 ± 104,5	0,67 ± 0,05
	Phytobase®	388,6 ± 3,1	0,73 ± 0,16
	Pentravan®	345,3 ± 67,6	0,47 ± 0,02
	Pentravan® Plus	340,3 ± 67,6	0,58 ± 0,18
	PLO®	295,9 ± 47,7	0,85 ± 0,09

Le modèle de Korsmeyer-Peppas (équation III.8) a été initialement développé pour décrire des phénomènes de transport de principe actif dans des matrices polymériques pour lesquels l'utilisation de la loi de Fick conduisait à des écarts de prédiction (Korsmeyer, 1983).

$$Q_{\text{cum}} = \alpha Q_{\infty} t^n \quad (\text{équation III.8})$$

où la valeur de l'exposant n est caractéristique du mécanisme de libération.

Classiquement mis en œuvre afin de modéliser les cinétiques de dissolution de formes galéniques sphériques ou cylindriques (Peppas, 1994), le modèle de Korsmeyer-Peppas peut également être appliqué aux études de diffusion d'un PA au travers d'une membrane synthétique au moyen d'une cellule de diffusion de Franz (Lucero, 2013). Dans ce cadre, la zone de contact entre la formulation et la membrane synthétique s'apparente à une surface plane. Le [tableau III.7](#) présente

les mécanismes de libération qui peuvent être proposés en fonction des valeurs de n pour des systèmes de géométrie planaire.

Tableau III. 7 : Relation entre la valeur de l'exposant, n , du modèle de Korsmeyer-Peppas et le mécanisme de libération du PA, pour une géométrie planaire.

n	Mécanisme de libération du PA
0,5	Diffusion Fickienne
$0,5 < n < 1$	Diffusion non Fickienne
1	Transport de type « case II »

Alors qu'une valeur de l'exposant « n » égale à 0,5 est caractéristique d'un mécanisme de libération purement Fickien, la diffusion du PA suit un mécanisme de transport non Fickien (transport anormal) pour des valeurs de n comprises entre 0,5 et 1. Dans ce dernier cas, le mécanisme de libération du PA est lié à un effet conjoint de la diffusion du PA et de la dégradation du polymère présent dans le véhicule (relaxation). Ce mécanisme de libération mixte couramment rencontré pour des formes galéniques polymériques, peut également être observé pour des formes liposomales (Jeon, 2015). Pour des valeurs de n égales à 1, le mécanisme de transport est de type II ; il n'est plus régi par la diffusion et la vitesse de libération est indépendante du temps ; ce cas correspond à une cinétique d'ordre 0.

Concernant les formulations à l'étude et à l'exception de l'Ond dans le pentravan ($n = 0,47 \pm 0,02$), les valeurs de l'exposant « n » obtenues par modélisation selon l'équation de Korsmeyer-Peppas sont comprises entre 0,5 et 1. Ces résultats indiquent que la diffusion des PA et la dégradation de la matrice polymérique (Pentravan®, Pentravan® Plus, PLO®, Phytobase®) et/ou liposomale (Lipovan®, Pentravan®, Pentravan® Plus, PLO®) sont à l'origine de la libération des PA de leur forme galénique.

III.3.4 Comparaison des véhicules

Afin de sélectionner le véhicule transdermique le plus performant pour la libération de chaque PA et de s'assurer qu'une différence significative existe entre les véhicules, un test de similarité a été réalisé entre le profil cinétique du véhicule capable de libérer la plus grande quantité de PA à 7,5 h (formulation de référence) et les quatre autres véhicules (formulations à tester). Les valeurs de f_2 obtenues sont présentées dans le [tableau III.8](#).

Tableau III.8: Facteurs de similarité (f_2) calculés entre une formulation de référence et des formulations à tester, pour chaque PA.

PA	Formulation de référence	Formulation à tester	f_2
Aprépitant	PLO®	Pentravan® Plus	51,3
	PLO®	Pentravan®	50,8
	PLO®	Phytobase®	46,0
	PLO®	Lipovan®	40,4
Dexaméthasone	PLO®	Pentravan® Plus	65,6
	PLO®	Pentravan®	49,8
	PLO®	Phytobase®	43,6
	PLO®	Lipovan®	42,0
Ondansétron	Phytobase®	PLO®	79,7
	Phytobase®	Lipovan®	68,5
	Phytobase®	Pentravan® Plus	50,6
	Phytobase®	Pentravan®	45,1

Le profil de libération de l'Apt formulé dans le PLO® est similaire à ceux obtenus dans le Pentravan® et le Pentravan® Plus ($f_2 > 50$). En revanche, on constate une différence ($> 10\%$) entre les profils cinétiques du PLO® et ceux du Phytobase® et du Lipovan® qui sont donc moins performants que le PLO®, le Pentravan® et le Pentravan® Plus.

Concernant la Dex, seuls le PLO® et le Pentravan® Plus ont des profils cinétiques équivalents avec une valeur de f_2 supérieure à 65. Les trois autres véhicules sont significativement moins performants pour libérer la Dex.

Bien que l'examen visuel des profils de libération de l'Ond suggère des différences moins marquées entre les véhicules, l'étude de similarité démontre une différence notable entre les profils cinétiques du Phytobase® et du Pentravan® ($f_2 = 45,1$) alors que les autres véhicules ont des performances équivalentes à celles obtenues avec le Phytobase® ($50,6 < f_2 < 79,7$).

Cette étude montre que le PLO® et le Pentravan® Plus sont les deux véhicules qui libèrent au mieux les 3 PA.

III.3.5 Discussion

Les informations fournies par la société Fagron sur les véhicules prêts à l'emploi évalués lors de ce travail, sont très limitées en ce qui concerne leur composition (nature et teneur des différents excipients) et le protocole de formulation optimal à utiliser. Les cinq véhicules sont des systèmes colloïdaux dont la phase externe est hydrophile. Ils sont à base de phospholipides dont la nature et les proportions ne sont pas précisées : le PLO®, le Lipovan®, le Pentravan® et le Pentravan® Plus sont

composés de systèmes vésiculaires liposomaux, alors que le Phytobase® de systèmes phytosomaux. Les caractéristiques telles que la taille, la charge ou encore le nombre de bicouches lipidiques ne sont pas disponibles. Le Lipovan® a été préparé selon un procédé de fabrication différent de celui du Pentravan® et du Pentravan® Plus, de même que celui du PLO®; il est hyper-enrichi en liposomes. Dans le PLO®, il semblerait que les liposomes soient formés extemporanément lors de l'étape de formulation, alors qu'ils seraient déjà préformés dans les autres véhicules.

Compte tenu de l'objectif de l'étude réalisée, qui est d'identifier un véhicule susceptible d'entraîner le passage transdermique des antiémétiques d'intérêt, nous ne nous sommes pas attachés à la caractérisation fine des formes préparées (taille et charge des vésicules, taux d'encapsulation des PA). Seul un contrôle au microscope des formes galéniques et la mesure du pH de ces formes ont été réalisés. A partir des profils de libération obtenus, un certain nombre d'hypothèses peuvent cependant être avancées.

Si l'on compare les flux et les quantités libérés pour l'aprépitant et la dexaméthasone, on constate qu'elles évoluent de manière identique lorsque l'on passe d'un véhicule à un autre. Par ailleurs, pour un même véhicule ces paramètres sont relativement proches, alors que pour l'ondansétron ils sont systématiquement bien supérieurs, bien que les quantités d'aprépitant introduites dans les véhicules soient identiques à celles de l'ondansétron. Cette tendance générale de l'ondansétron à être mieux libéré pourrait être simplement liée à une concentration supérieure de ce dernier dans la phase hydrophile externe des véhicules. Nous avons en effet pu vérifier que l'ondansétron était beaucoup plus soluble dans l'eau ou en milieu hydro-alcoolique que la dexaméthasone et que l'aprépitant. Par ailleurs, l'examen au microscope des formes galéniques préparées, a révélé l'absence de particules dans le cas de l'ondansétron, contrairement à la dexaméthasone et à l'aprépitant. Compte tenu de la meilleure solubilité de l'ondansétron dans les phases externes aqueuses des véhicules, il semble ainsi logique qu'il soit libéré plus rapidement que l'aprépitant introduit à la même teneur dans les cinq véhicules.

En revanche il est très difficile d'émettre la moindre hypothèse permettant d'expliquer l'évolution de la libération en fonction des différents véhicules. Pour l'Apt et la Dex dont les comportements sont similaires, on peut souligner que le Lipovan® est le véhicule le moins performant. Sachant qu'il est hyper-enrichi en liposomes, on pourrait penser que les taux d'encapsulation y sont plus importants, diminuant ainsi la concentration de ces deux PA dans la phase externe hydrophile et rendant, par conséquent, la diffusion moins importante. L'ondansétron aurait un comportement plus homogène pour l'ensemble des véhicules en raison de sa bonne solubilité aqueuse. En effet, la quantité solubilisée dans les phases externes hydrophiles resterait

sensiblement la même pour l'ensemble des véhicules, ce qui n'impacterait pas la diffusion et ce, malgré une incorporation potentielle dans les systèmes vésiculaires.

III.3.6 Conclusion

L'étude des cinétiques de diffusion réalisée au moyen de cellule de Franz et en utilisant une membrane synthétique a montré que le PLO® et le Pentravan® Plus sont les deux véhicules les plus performants pour libérer les 3 PA. Même si ces résultats cinétiques donnent un premier aperçu des propriétés des véhicules, ils sont obtenus dans un milieu non physiologique et avec une membrane inerte. Ils ne peuvent présager des performances respectives des différents véhicules en ce qui concerne le passage transdermique des PA. En effet, les interactions différentes mises en jeu entre les formes transdermiques et la membrane naturelle vont influencer leurs performances. Ainsi, le paragraphe suivant a pour objectif d'évaluer l'aptitude de ces véhicules à diffuser les 3 PA au travers d'une membrane naturelle : l'épiderme de peau d'oreilles de cochon.

III.4 **Etude cinétique de la perméation des principes actifs**

III.4.1 Etude préliminaire : choix du milieu receveur

Comme pour l'étude de libération des PA, le choix du milieu receveur est un point crucial dans le cadre d'études de perméation réalisées avec des membranes naturelles. Un milieu aqueux est privilégié afin de ne pas altérer l'intégrité de la membrane naturelle. Il est par ailleurs préférable d'utiliser un milieu permettant de mimer les conditions physiologiques tel que le « Simulated Body Fluid » (SBF). Un agent solubilisant comme l'albumine de sérum bovin, le polyéthylène glycol ou l'éthanol peut être ajouté au milieu receveur afin de faciliter la solubilisation des PA et de satisfaire aux « sink conditions » (Baert, 2010). Des cyclodextrines (CD), oligosacccharides cycliques, peuvent également être introduits dans le milieu receveur : l'inclusion du PA dans la cavité hydrophobe de la CD peut augmenter de façon significative la solubilité du PA (Ventura, 2006). Par ailleurs, la présence de CD dans le milieu receveur ne nécessite pas de traitement de l'échantillon préalablement à l'analyse chromatographique, contrairement à la BSA pour laquelle la mise en place d'une extraction sur support solide est souvent préconisée. Cette dernière approche a été retenue et une étude de la solubilité des trois PA a été réalisée à 32°C sur 48 h dans différents milieux aqueux : l'eau, le SBF additionné ou non de 0,5% d'hydroxypropyl- β -cyclodextrine (HP- β -CD). Les concentrations saturantes moyennes obtenues pour chaque principe actif, dans chacun des milieux à l'étude, sont répertoriées dans le tableau III.9 :

Tableau III.9 : Solubilité des trois principes actifs dans les différents milieux aqueux testés.

Milieu	Solubilité (mg.L ⁻¹)		
	Aprépitant	Dexaméthasone	Ondansétron
H ₂ O	5,2 ± 2,3	111 ± 38	54 294 ± 831
SBF	1,9 ± 0,1	88 ± 6	14 389 ± 2 727
SBF + 0,5 HP-β-CD	4,6 ± 1,1	495 ± 56	13 038 ± 2 354

(n=3)

On constate que la solubilité des trois principes actifs décroît quand on passe de l'ondansétron à la dexaméthasone puis à l'aprépitant. Ceci est lié à la différence de leurs propriétés physico-chimiques. Si l'ondansétron possède un log P proche de celui de la dexaméthasone (log P_{ond} = 2,0 ; log P_{dex} = 1,83) à pH 7,4, l'ondansétron est en partie sous forme cationique (base faible, pK_a_{ond} = 7,6) contrairement à la dexaméthasone qui est neutre à ce pH (acide faible, pK_a_{dex} = 13,5), donc moins soluble. L'aprépitant qui se trouve également sous forme cationique est très hydrophobe (log P = 4,80), ce qui explique sa faible solubilité dans les différents milieux.

Le milieu receveur doit se rapprocher au plus possible des conditions physiologiques du corps humain. La solubilité des principes actifs dans le milieu se rapprochant au plus des conditions de la composition du plasma, à savoir le SBF est quant à elle faible, notamment pour l'aprépitant et la dexaméthasone (facteur 1500 et 100 respectivement par rapport à l'ondansétron). Un agent de solubilisation, l'HP-β-CD, a été ajouté au SBF à hauteur de 0,5% afin d'augmenter la solubilité de la dexaméthasone et de l'aprépitant. L'addition de 0,5% HP-β-CD dans le SBF ne modifie pas significativement la solubilité de l'ondansétron sans doute en raison du fait qu'il s'agit d'une molécule déjà très soluble dans le SBF. Pour l'aprépitant et la dexaméthasone, l'ajout de cet agent capable de complexer les molécules hydrophobes par inclusion dans la cavité de la cyclodextrine (Moya-Ortega, 2011), augmente légèrement leur solubilité. Cette augmentation est probablement due au fait que ces molécules sont peu affines pour le SBF et interagissent donc d'avantage avec la HP-β-CD que l'ondansétron qui est moins hydrophobe et par ailleurs ionisé. Le milieu receveur choisi pour notre étude est donc le SBF à 0,5% d'HP-β-CD car il se rapproche au mieux de la composition du fluide corporel. Afin de satisfaire aux « sink conditions », c'est-à-dire que la concentration du PA dans le compartiment receveur n'excède pas 10% de la concentration saturante, la concentration de l'aprépitant, de la dexaméthasone et de l'ondansétron ne pourront pas excéder 0,46 – 49,5 et 1303 mg.L⁻¹, respectivement, dans les conditions physiologiques retenues.

III.4.2 Préparation des membranes naturelles

La peau de porc, dont la structure (épaisseur, composition lipidique du stratum corneum, densité pileuse, etc...) est proche de celle de la peau humaine, a été sélectionnée pour étudier l'absorption percutanée des 3 PA. De plus, son approvisionnement aisé (animalerie du CHRU ou abattoirs) constitue un avantage indéniable par rapport aux explants cutanés humains.

Comme évoqué dans le chapitre bibliographique, l'évaluation du passage transdermique d'un PA ne peut pas être réalisée en utilisant des explants de peau entière, en raison d'un stockage éventuel du PA dans le derme, notamment pour les molécules lipophiles.

Parmi les quatre méthodes décrites dans la littérature pour réduire l'épaisseur des explants, les méthodes chimique et enzymatique n'ont pas été retenues. Bien qu'efficaces pour séparer le derme de l'épiderme, les protocoles expérimentaux ont recours à l'utilisation d'enzymes ou de solutions acido-basiques qui altèrent l'intégrité de la peau. Notre choix s'est tout d'abord orienté vers la méthode mécanique qui repose sur l'utilisation d'un dermatome afin de ne conserver que l'épiderme et la partie superficielle du derme papillaire.

III.4.2.a Evaluation de la méthode mécanique

Les premiers essais réalisés à l'aide d'un dermatome mécanique se sont révélés très délicats. En effet, il est apparu très difficile d'appliquer une pression et une vitesse de cisaillement constante afin d'obtenir des échantillons d'épaisseur constante et de surface suffisante pour recouvrir la surface d'échange des cellules de Franz. Lorsque la surface des échantillons d'épiderme obtenue était suffisante, ceux-ci ont été utilisés pour des premiers essais de perméation. Les résultats se sont avérés non répétables, ce qui peut s'expliquer par la présence de traces de tissu adipeux d'épaisseur variable selon les échantillons. Pour ces raisons, la méthode mécanique a été écartée.

III.4.2.b Evaluation de la méthode thermique

La méthode thermique a ensuite été testée afin de séparer le derme de l'épiderme. Pour les peaux humaines, de rongeurs, la température optimale de séparation de ces deux couches serait de 50°C pour une immersion de 2 min (Baumberger, 1942). Dans le cas de la peau d'oreilles de cochon, selon les auteurs, une immersion dans l'eau à 60°C pendant 45 s (Bhatia, 1996) ou 60 s (Davies, 2004) est recommandée. Afin de s'assurer des conditions opératoires optimales à utiliser, des essais d'immersion d'échantillons de peau ont été réalisés dans de l'eau thermostatée à 40, 60 et 90°C durant 1 min. La séparation s'est révélée difficile à 40°C. A 90°C, l'aspect de la peau était modifiée (perte de la couleur rosâtre). Par conséquent, une immersion de 1 min à 60°C a été retenue pour

épidermer les peaux d'oreille de cochon et une méthode a été développée afin de vérifier l'intégrité de l'épiderme.

III.4.3 Vérification de l'intégrité des épidermes

Avant d'évaluer les cinétiques de passage des principes actifs à travers les épidermes, obtenus par le procédé thermique, il est nécessaire de s'assurer de leur intégrité. Parmi les trois techniques détaillées dans le chapitre bibliographie, celle basée sur la mesure de l'impédance de la peau a été choisie pour vérifier la qualité des explants biologiques épidermés. L'impédance dépend des propriétés électriques des membranes cellulaires.

Elle peut être mesurée à l'aide d'un système de type LCR databridge ou équivalent, qui repose sur l'immersion de deux électrodes de part et d'autre de la membrane à étudier et l'application d'une tension alternative basses fréquences aux bornes de ces électrodes. Les caractéristiques de l'appareil de mesure, ainsi que la procédure expérimentale utilisée, peuvent avoir une incidence sur les valeurs de l'impédance transépidermique. En effet, les longueurs immergées et la distance des électrodes vis à vis de la membrane, la composition de la solution ionique ou encore la tension alternative appliquée et sa fréquence, sont autant de paramètres qui influent sur la mesure de l'impédance (Davies, 2004).

Notre objectif a été de développer une méthode reproductible et sensible permettant de détecter des épidermes défectueux. Nous nous sommes donc attachés à valider les conditions de mesure de l'impédance et à définir la valeur d'impédance seuil propre à l'appareillage utilisé, qui servira de référence afin de conclure quant à l'intégrité de l'épiderme (OCDE n°430, 2013).

III.4.3.a Appareillage pour mesurer l'intégrité des membranes

Un montage a été développé au laboratoire afin de mesurer l'impédance des explants d'épiderme à l'aide de la cellule de Franz. L'épiderme est clampé sur la cellule de Franz (face extérieure du SC vers le haut) entre les compartiments donneur et receveur remplis d'un volume constant de solution saline physiologique de NaCl à 0,9%, préalablement placée 15 min aux US. Deux électrodes en platine sont ensuite immergées dans la solution saline, une dans le compartiment donneur et une deuxième dans le compartiment receveur via le bras de prélèvement ([figure III.14](#)). Les deux électrodes placées de part et d'autre de la membrane à une distance prédéfinie sont ensuite connectées à un circuit électrique composé, d'un ampèremètre mesurant le courant en μA , d'un voltmètre mesurant la tension en mV, d'une résistance de $1\text{ k}\Omega$ sécurisant le montage d'un

court-circuit et d'un générateur de basses fréquences (GBF) dont la tension de sortie est inférieure à 1 V (valeur efficace).

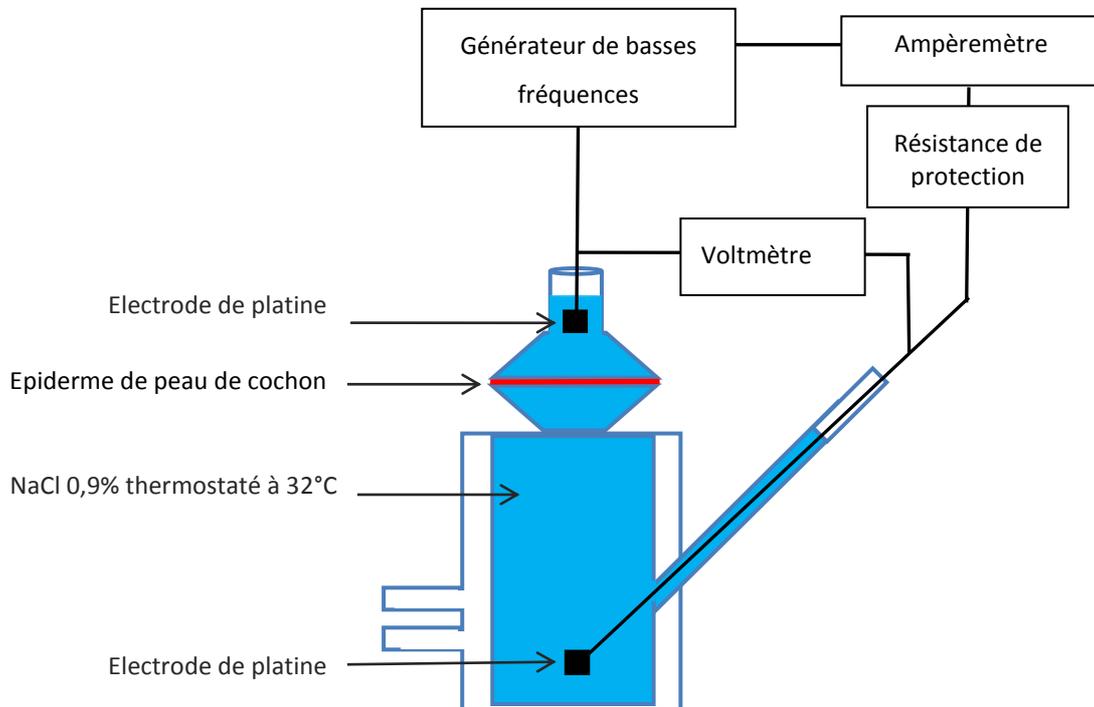


Figure III.14 : Schéma du montage expérimental utilisé pour mesurer l'intégrité des membranes épidermiques d'oreille de cochon sur cellule de Franz.

III.4.3.b Choix des paramètres de mesure

La première étape de ce travail a porté sur la détermination de la fréquence et de la tension alternative à utiliser afin de mesurer l'impédance des explants d'épiderme. Elle doit être telle que lorsque l'intégrité de la peau varie, l'impédance totale mesurée qui résulte de l'impédance de la solution saline et de celle de l'épiderme, soit modifiée significativement. Dans ces conditions, l'impédance totale pourra servir de facteur discriminant pour s'assurer de l'intégrité de la peau.

La seconde étape de ce travail a porté sur la détermination d'une valeur seuil d'impédance pouvant servir de référence lors du choix des membranes utilisées lors de l'évaluation de la cinétique de perméation des principes actifs.

➤ Validation du choix de la fréquence

Des mesures d'impédance ont tout d'abord été réalisées à l'aide de la cellule de Franz remplie de solution saline, en présence ou non de l'épiderme, en utilisant le montage présenté sur la [figure III.14](#) et en modulant la tension de sortie du générateur basses fréquences entre 100 mV et 1 V. Ces

premiers essais ont été menés à une fréquence de 100 Hz recommandée par l'OCDE pour l'évaluation de l'intégrité de la peau via des mesures d'impédance.

Ainsi, lorsque la cellule de Franz ne contient que la solution saline, si l'on module la tension de sortie du GBF, la fonction qui relie le courant circulant à travers la peau et la tension mesurée aux bornes des électrodes est linéaire ($R^2 = 0,9997$; $U = 2,4129 \cdot 10^3 I$). Il est de même lorsque l'épiderme est inséré entre les deux compartiments remplis de solution saline ($R^2 = 0,9995$; $U = 496,4 I$). Ceci atteste du fait que la loi d'Ohm généralisée est respectée dans les deux cas et donc que l'impédance de la solution saline seule ou en contact de l'épiderme est constante dans ces conditions de mesure quelle que soit la tension de sortie du GBF.

Ce premier résultat a donc permis de valider le protocole expérimental utilisé pour mesurer l'impédance.

Dans le but de comparer l'impédance de l'épiderme par rapport à celle de la solution saline afin de déterminer si l'impédance totale mesurée reflète l'impédance de l'épiderme, mais aussi son intégrité, un modèle a été mis en place. Celui-ci est présenté sur la [figure III.15](#).

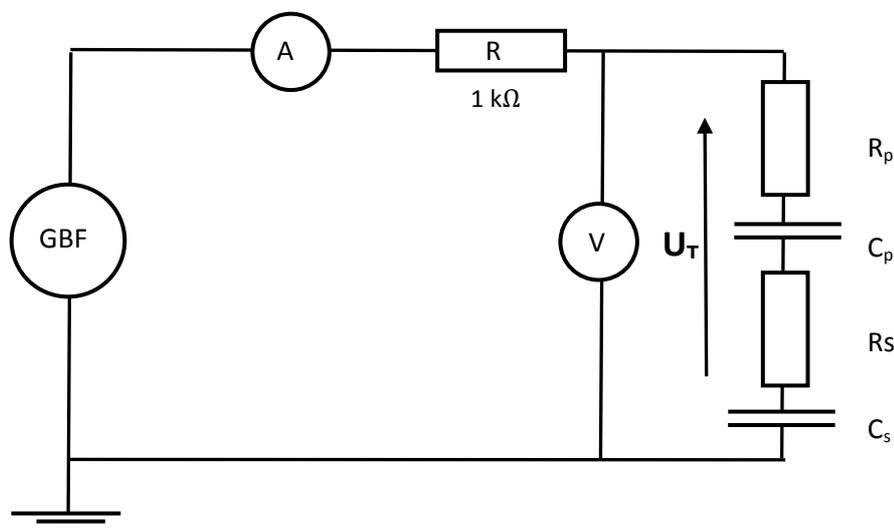


Figure III.15 : Schéma électrique du système de mesure de l'impédance de l'épiderme.

GBF (fréquence de 100 Hz, tension de sortie de 1 V) ; R_p et C_p , la résistance et la capacité de la peau ; R_s et C_s , la résistance et la capacité de la solution de NaCl à 0,9%.

Dans ce modèle, la solution saline et la peau sont schématisées par un montage électrique simplifié avec, une résistance et un condensateur qui reflètent l'impédance propre de chacune dans un circuit électrique soumis à une tension alternative à basses fréquences (Lai, 1998). Celles-ci sont placées en série dans le circuit électrique.

A partir de ce modèle et des impédances mesurées à deux fréquences distinctes (90 et 100 Hz), la résistance (R_s) et la capacité (C_s) de la solution de NaCl à 0,9%, puis la résistance (R_p) et la capacité de la peau (C_p) ont été calculées.

Pour cela, on considère que lorsqu'une résistance est placée en série avec un condensateur, l'impédance résultante est définie par l'équation III.9 :

$$Z = \sqrt{R^2 + \left(\frac{1}{2\pi fC}\right)^2} \quad (\text{équation III.9})$$

avec $\frac{1}{2\pi fC} = X_C$ (équation III.10)

où Z est l'impédance (Ω), R la résistance (Ω), f la fréquence (Hz), C la capacité (F) et X_c la réactance capacitive (Ω).

Il est possible d'écrire un système de deux équations à deux inconnues, dont la résolution permet alors de déterminer la résistance, R, et la capacité, C, du système considéré. Dans le cas de la solution saline, le système d'équations est le suivant :

$$\left\{ \begin{array}{l} Z_{S(90\text{ Hz})} = \sqrt{R_s^2 + \left(\frac{1}{2\pi \cdot 90 \cdot C_s}\right)^2} \end{array} \right. \quad (\text{équation III.11})$$

$$\left\{ \begin{array}{l} Z_{S(100\text{ Hz})} = \sqrt{R_s^2 + \left(\frac{1}{2\pi \cdot 100 \cdot C_s}\right)^2} \end{array} \right. \quad (\text{équation III.12})$$

Où Z_s est l'impédance de la solution.

Dans la gamme de fréquence utilisée, une résistance R_s de 426 Ω et une capacité de $8,9 \cdot 10^{-6}$ F ont ainsi été obtenues. Cette capacité correspond à une réactance capacitive X_{cs} de 179 Ω pour une fréquence de 100 Hz.

Une approche similaire a été utilisée pour le système épiderme-solution saline afin de calculer les résistances totales R_T et la capacité totale C_T de ce système ; A 100 Hz, une résistance R_T de 4234 Ω et une réactance capacitive X_T de 497 Ω ont ainsi été obtenues.

Compte tenu du modèle proposé, à une fréquence donnée x en Hz, la résistance totale R_T du circuit et la réactance capacitive totale X_T sont respectivement définies par les équations III.13 et III.14 :

$$R_{T(x Hz)} = R_{s(x Hz)} + R_{p(x Hz)} \quad (\text{équation III.13})$$

$$X_{T(x Hz)} = X_{s(x Hz)} + X_{p(x Hz)} \quad (\text{équation III.14})$$

Il est donc possible de calculer $R_{p(x Hz)}$ et $X_{p(x Hz)}$ connaissant $R_{T(x Hz)}$, $X_{T(x Hz)}$, $R_{s(x Hz)}$ et $X_{s(x Hz)}$.

Ainsi à 100 Hz, l'impédance propre de la peau est donc de 3821 Ω et celle de la solution est de 462 Ω . La figure III.16 correspond à la représentation de Fresnel des impédances de la solution saline (bleu) et de l'épiderme (vert) et totale (rouge). Chaque composante, à savoir résistance (R) et réactance capacitive (X_c), est représentée par un vecteur de Fresnel.

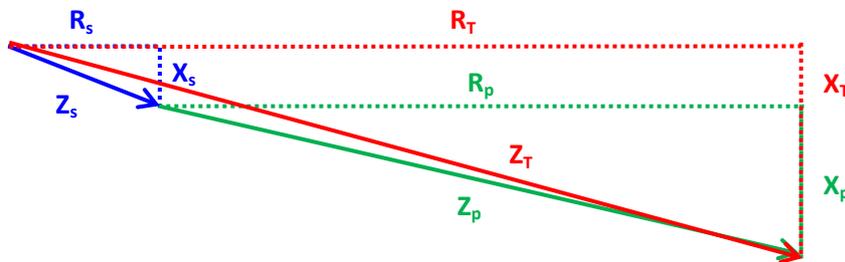


Figure III.16 : Construction de Fresnel des résistances (R), des réactances capacitives (X) et des impédances (Z) de la solution saline (bleu), de l'épiderme (vert) et totale (rouge).

On peut noter que dans nos conditions de mesure (fréquence de 100 Hz, tension en sortie du GBF de 1 V), l'impédance de la solution est négligeable par rapport à celle la peau et que la partie résistive (R) est prépondérante sur la partie capacitive (X). Dans ces conditions, il sera possible de négliger l'impédance de la solution saline lors des mesures de l'impédance du système épiderme-solution saline, c'est-à-dire de considérer que l'impédance mesurée reflète directement l'impédance de l'épiderme.

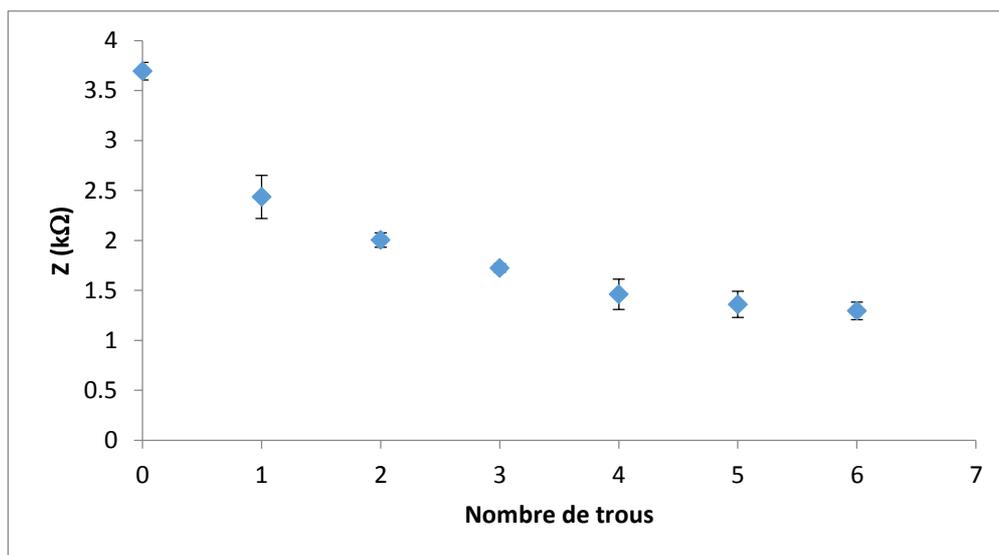
Pour chaque fréquence étudiée, afin de vérifier la qualité du modèle, l'impédance totale a été recalculée à partir des résistances et réactances capacitives calculées à l'aide du modèle. Elle a ensuite été comparée à la valeur expérimentale par un calcul du biais selon l'équation III.15 :

$$\text{Biais (\%)} = \frac{Z_{calculée} - Z_{expérimentale}}{Z_{expérimentale}} \times 100 \quad (\text{équation III.15})$$

Ainsi, la qualité d'ajustement du modèle a été attestée par des biais inférieurs à 1% pour des fréquences de 90 et 100 Hz pour la solution saline et l'épiderme. Ceci valide le modèle proposé et les conclusions qui en sont tirées.

➤ **Détermination du seuil d'acceptation et de la sensibilité**

Après avoir validé le modèle à une fréquence optimale, la sensibilité de la méthode et le seuil d'acceptation des impédances des membranes épidermiques ont été déterminées. Pour ce faire, trois peaux ont été décongelées à température ambiante puis épidermées selon le protocole détaillé précédemment. Une observation au microscope optique avec un grossissement de 100 a ensuite été réalisée afin de s'assurer qu'aucune micro-incision n'ait été induite lors du processus d'épidermisation. Les impédances de ces trois membranes épidermiques ont ensuite été mesurées selon le protocole détaillé ci-dessus. Des trous répétés à différents endroits de la membrane ont ensuite été réalisés à l'aide d'une aiguille à tête d'épingle afin de mesurer l'évolution de l'impédance en fonction de son état endommagé. La [figure III.17](#) présente les variations de l'impédance en fonction du nombre de trous réalisés.



[Figure III.17](#) : Influence du nombre de trous sur l'impédance de l'épiderme.

L'impédance mesurée sur l'épiderme obtenue par la méthode thermique est d'environ 3,7 kΩ ; elle présente une bonne répétabilité (CV = 3%). La réalisation d'un premier trou entraîne une diminution importante de l'impédance (35%). Lorsque le nombre de trous augmente, l'impédance

diminue progressivement jusqu'à atteindre une valeur seuil d'environ 1,3 k Ω . Ces résultats attestent de la sensibilité de la méthode.

Ainsi, le seuil d'acceptabilité de l'impédance totale a été fixé à 3,5 k Ω . Le rapport de l'impédance totale sur la surface d'échange de la membrane doit donc être supérieur à 5,5 k Ω .cm⁻² pour qu'une membrane puisse être retenue.

III.4.3.c Conclusion

La mesure de l'impédance transépidermique est une méthode simple, rapide, sécurisée pour laquelle il est nécessaire d'optimiser puis de valider les paramètres d'appareillage (Davies, 2004). Nous avons défini et validé les paramètres pour évaluer l'intégrité des membranes épidermées par mesure de l'impédance totale (peau épidermée + solution saline) ; l'impédance de la solution saline utilisée pour les mesures étant négligeable par rapport à celle de la peau épidermée. Nous avons démontré à 100 Hz que le modèle électrique présente un bon ajustement et que la sensibilité de la mesure est bonne pour discriminer des membranes endommagées. Conformément aux recommandations de l'OCDE, l'impédance est mesurée avec une fréquence de travail comprise entre 50 et 1000 Hz (OCDE n°430, 2013) et une basse tension. L'impédance totale mesurée servira de critère d'évaluation de l'intégrité des épidermes préparés afin d'étudier la cinétique de perméation des principes actifs. Ainsi, avec une solution ionique de NaCl 0,9% dégazée et maintenue à 32°C, une tension et fréquence en sortie de GBF fixées respectivement à 1 V et 100 Hz, les membranes épidermiques d'oreille de cochon seront rejetées si l'impédance totale du montage mesurée est inférieure à 5,5 k Ω .cm⁻².

III.4.4 Profils cinétiques de perméation

Le passage transcutané des 3 PA, formulés dans les 5 véhicules a été évalué au moyen de cellules de diffusion de Franz en utilisant une membrane épidermique. Les quantités cumulées d'Apt, de Dex et d'Ond, recueillie dans le milieu receveur, ont été reportées en fonction du temps.

III.4.4.a Cas de l'ondansétron

Après le dépôt de 200 mg de formulation contenant 1,6% d'Ond dans le compartiment donneur de la cellule de Franz, la cinétique de perméation a été initiée, et les quantités cumulées d'Ond retrouvées dans le compartiment receveur ont été déterminées durant 40 h (figure III.18).

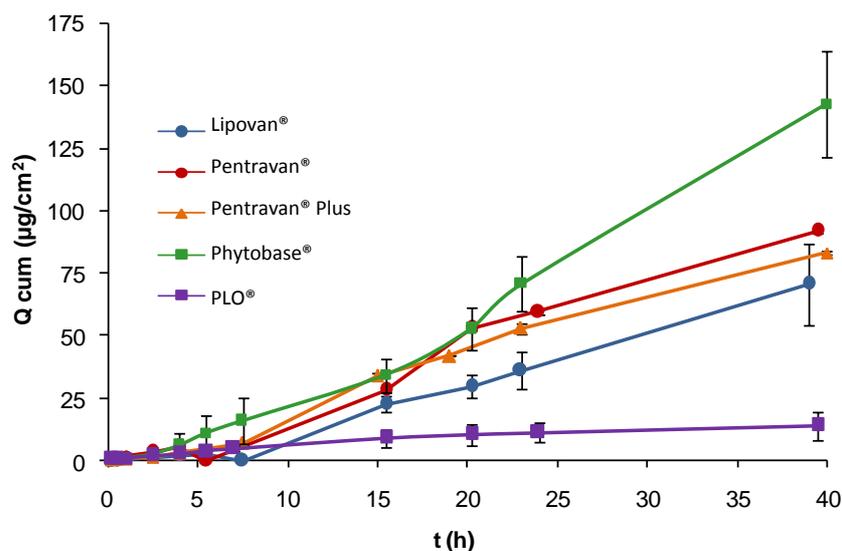


Figure III.18 : Profils cinétiques de perméation de l'ondansétron dans les 5 véhicules transdermiques.

Les barres d'erreur représentent les écarts type associés aux Q_{cum} ($n = 3$).

A partir des profils de perméation, différents paramètres cinétiques, tels que le flux, le temps de latence et la constante de perméation de l'ondansétron ont été calculés. L'ensemble des résultats est présenté dans le [tableau III.10](#).

Tableau III.10 : Valeurs des différents paramètres de perméation de l'ondansétron formulé dans les différents véhicules.

Véhicule	Flux ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$)	$Q_{cum\ 40h}$ ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$)	T_{lag} (h)	K_p ($\text{cm}\cdot\text{h}^{-1}$)
Lipovan®	$1,95 \pm 0,17^{a,b}$	$70,58 \pm 16,07^{a,b}$	$45\ \text{min} < T_{lag} < 7\ \text{h}$	$1,22\cdot 10^{-4}$
Pentravan	$2,46 \pm 0,35^{a,b}$	$91,79 \pm 21,59^{a,b}$	$30\ \text{min} < T_{lag} < 5\ \text{h}$	$1,54\cdot 10^{-4}$
Pentravan® Plus	$2,26 \pm 0,15^{a,b}$	$82,98 \pm 0,63^{b*}$	$< 1\ \text{h}30$	$1,41\cdot 10^{-4}$
Phytobase®	$4,51 \pm 0,30^{*b}$	$152,63 \pm 16,05^{b*}$	$30\ \text{min} < T_{lag} < 1\ \text{h}30$	$2,82\cdot 10^{-4}$
PLO®	$0,56 \pm 0,05^{*a}$	$13,93 \pm 5,34^{a*}$	n.d.	$3,51\cdot 10^{-5}$

^a : classification du véhicule dans la famille A ; ^b : classification du véhicule dans la famille B ; * si les véhicules appartiennent à deux familles distinctes, les résultats sont statistiquement différents ($p\text{-value} < 0,05$) ; n.d. : non déterminé.

Des tests statistiques non paramétriques de comparaison (Kruskal-Wallis) ont été réalisés sur les valeurs de flux et sur les quantités cumulées d'Ond à 40 h afin de classer les véhicules. La constante de perméabilité étant directement proportionnelle au flux, les conclusions qui seront faites sur le flux pourront être étendues aux constantes de perméabilité.

En ce qui concerne les flux, les tests statistiques montrent que les véhicules peuvent être classés en deux familles distinctes :

- la famille A dont font partie le Lipovan[®], le Pentravan[®], le Pentravan[®] Plus et le PLO[®], pour lesquels les valeurs des flux ne sont pas significativement différentes ($0,075 < p\text{-value} < 0,917$) et avoisinent $1,81 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$.
- la famille B qui regroupe le Pentravan[®], le Pentravan[®] Plus, le Lipovan[®] et le Phytobase[®] ($0,123 < p\text{-value} < 0,174$) et dont le flux moyen est égal à $2,80 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$.

Par ailleurs, on peut noter que les flux de l'Ondansétron formulé dans le PLO[®] et dans le Phytobase[®] sont statistiquement différents ($p\text{-value} = 0,003$) et respectivement égaux à $0,56 \pm 0,05 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ et à $4,51 \pm 0,30 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$.

En fonction des quantités libérées à 40 h, on retrouve également deux familles de profils qui regroupent les mêmes véhicules, à l'exception du Pentravan[®] Plus qui appartient uniquement à la famille B. Ainsi, le PLO[®], le Lipovan[®] et le Pentravan[®] constituent la famille A de véhicules dont la perméation moyenne d'Ond est de $59 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$. La famille B regroupe l'ensemble des véhicules sauf le PLO[®] et conduit à une perméation moyenne de l'Ond de $99 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$.

En ce qui concerne les temps de latence, des variations importantes ont été observées pour un même véhicule. Compte tenu de la précision, aucune comparaison statistique n'a été réalisée et il apparaît délicat de conclure quant à ce paramètre. On peut souligner que le temps de latence peut varier de 30 min à 7 h.

Ces résultats permettent de conclure que le Phytobase[®] est le véhicule le plus performant pour le passage transdermique de l'ondansétron tant au niveau des quantités libérées (Q_{cum} à 40 h = $152,63 \pm 16,05 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) que d'un point de vue cinétique ($K_p = 2,82 \cdot 10^{-4} \text{ cm}\cdot\text{h}^{-1}$). Le temps de latence est dans ce cas inférieur à 1h30.

III.4.4.b Cas de la dexaméthasone

Une démarche expérimentale identique à celle présentée précédemment a été conduite afin d'évaluer le passage percutané de la dexaméthasone. Les profils cinétiques obtenus dans les différents véhicules sont présentés sur la [figure III.19](#) :

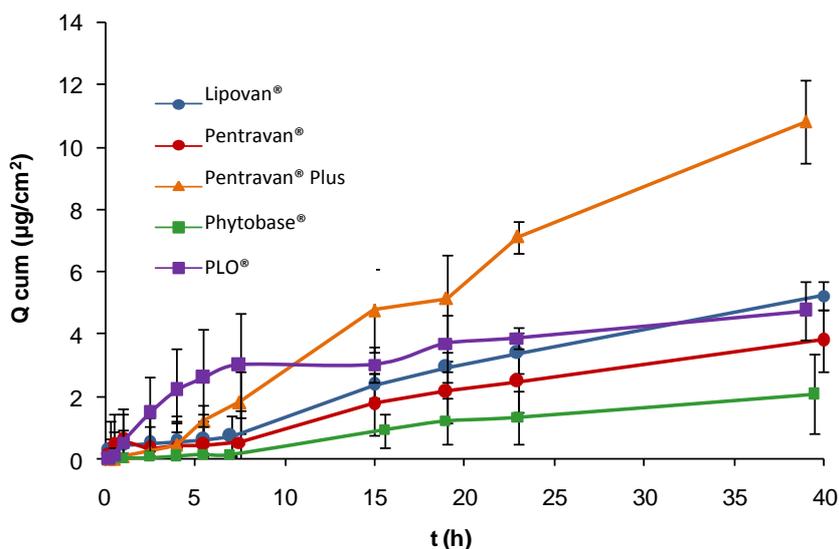


Figure III.19 : Profils cinétiques de perméation de la dexaméthasone dans les 5 véhicules transdermiques.

Les barres d'erreur représentent les écarts type associés aux Q_{cum} (n = 3).

Les flux, les quantités cumulées à 40 h, les temps de latence ainsi que les valeurs de K_p de la dexaméthasone ont été calculées. L'ensemble des résultats est présenté dans le [tableau III.11](#) :

Tableau III.11 : Valeurs des différents paramètres cinétiques de perméation de la dexaméthasone dans les différents véhicules.

Véhicule	Flux ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$)	$Q_{cum\ 40h}$ ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$)	T_{Lag} (h)	K_p ($\text{cm}\cdot\text{h}^{-1}$)
Lipovan®	$0,19 \pm 0,03^{a,b}$	$5,23 \pm 0,43^{a,b}$	2h15 min < T < 6h45	$1,57\cdot 10^{-5}$
Pentravan	$0,15 \pm 0,02^{a,b}$	$3,80 \pm 1,44^{a*}$	1h30 < T < 4h45	$1,24\cdot 10^{-5}$
Pentravan Plus®	$0,32 \pm 0,02^{b*}$	$10,81 \pm 1,35^{b*}$	30 min < T < 1h30	$2,66\cdot 10^{-5}$
Phytobase®	$0,08 \pm 0,01^{a*}$	$2,08 \pm 1,28^{a*}$	1h30 < T < 5h	$7,00\cdot 10^{-6}$
PLO®	-	$4,75 \pm 0,94^{a,b}$	-	-

^a : classification des véhicules dans la famille A ; ^b : classification des véhicules dans la famille B ; * si les véhicules appartiennent à deux familles distinctes, les résultats sont statistiquement différents (p-value < 0,05) ; n.d. : non déterminé.

Le profil obtenu pour le PLO® semble être différent de ceux des autres véhicules. La perméation semble démarrer dès le dépôt de la formulation. Après une phase d'absorption rapide, qui pourrait traduire un flux de l'ordre de $0,3\ \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$, la vitesse du passage percutanée diminue fortement. On pourrait penser que le T_{lag} est proche de zéro, ce qui semble surprenant par rapport aux autres véhicules. Cependant compte tenu des écarts types importants mesurés, il est difficile de conclure. De ce fait seul la quantité cumulée à 40 h sera considérée pour le PLO®. Bien que les formulations aient toujours été préparées dans les 24 h qui précédaient l'étude cinétique, un

phénomène de démixtion pourrait être envisagé après 15h de dépôt et pourrait expliquer le profil cinétique du PLO®.

La comparaison des flux de la dexaméthasone permet de distinguer deux familles de véhicules à savoir, la famille A qui regroupe le Lipovan®, le Phytobase® et le Pentravan® ($0,072 < p\text{-value} < 0,317$) et la famille B composée du Lipovan®, du Pentravan® et du Pentravan® Plus ($0,068 < p\text{-value} < 0,317$). Seuls les flux de la Dex formulée dans le Lipovan® et le Pentravan® Plus sont statistiquement différents ($p\text{-value} = 0,011$) et respectivement égaux à $0,19 \pm 0,03 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ et $0,32 \pm 0,02 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$.

Les véhicules sont également classés en deux familles selon les quantités cumulées de Dex à 40 h :

- A l'exception du Pentravan® Plus, la famille A regroupe l'ensemble des véhicules pour lesquels la quantité moyenne de Dex capable de passer au travers l'épiderme est de $3,97 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$.
- La famille B est constituée du PLO®, du Lipovan® et du Pentravan® Plus. La quantité moyenne d'Ond diffusées par ces véhicules est $6,93 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$.

Ces résultats permettent de conclure que le Pentravan® Plus est le véhicule le plus performant pour le passage transdermique de la dexaméthasone tant au niveau des quantités libérées ($Q_{\text{cum}} \text{ à } 40 \text{ h} = 10,81 \pm 1,35 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) que d'un point de vue cinétique ($K_p = 2,66\cdot 10^{-5} \text{ cm}\cdot\text{h}^{-1}$).

III.4.4.c Cas de l'aprépitant

Les premiers essais de perméation de l'aprépitant formulé dans les cinq véhicules ont montré des quantités de principe actif retrouvées dans le compartiment receveur de la cellule de Franz, inférieures aux limites de quantification déterminées par CLHP/UV ($\text{LOQ} = 3,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$). Une méthode de dosage mettant en œuvre la CLHP couplée à la spectrométrie de masse a donc été développée, pré-validée puis appliquée au dosage de l'aprépitant dans les prélèvements du milieu receveur réalisés au cours des cinétiques de perméation.

Ainsi, des prélèvements de 200 μL de la solution contenue dans le compartiment receveur (SBF à 0,5% d'HP- β -CD) ont été effectués pendant 48 h. Les échantillons prélevés ont été analysés à l'aide de la méthode CLHP/SM-SM préalablement optimisée.

Les concentrations mesurées ont permis de calculer la quantité d'aprépitant cumulée par unité de surface dans le compartiment receveur en fonction du temps. Les profils cinétiques obtenus pour les 5 véhicules sont présentés sur la figure III.20.

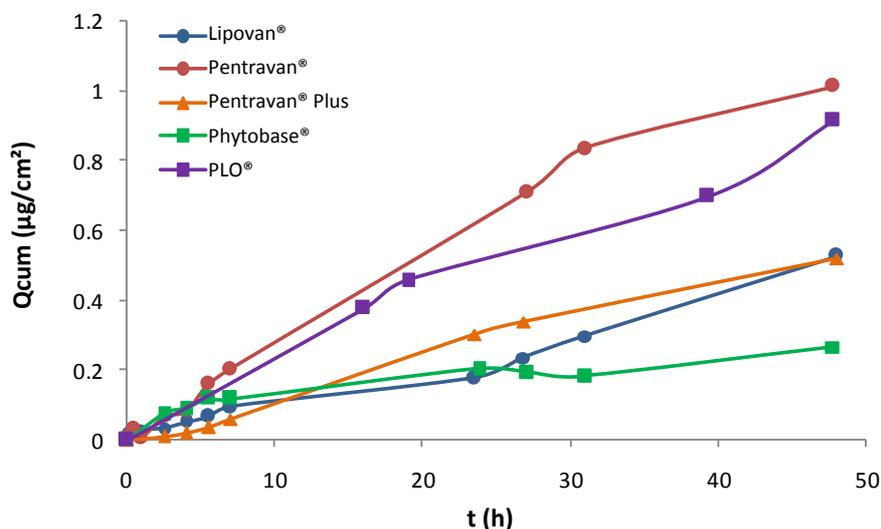


Figure III.20 : Profils cinétiques de perméation de l'aprépitant dans les 5 véhicules transdermiques.

On constate que la quantité d'aprépitant cumulée dans le compartiment receveur augmente au cours du temps mais que cette quantité reste globalement très faible à 40 h ($0,21 < Q_{cum} < 1,1 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) en comparaison des quantités ayant diffusées pour la dexaméthasone ($2,1 \mu\text{g} < Q_{cum} < 10,8 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) et l'ondansétron ($13,9 < Q_{cum} < 153 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$).

III.4.4.d Discussion

Les profils de perméation ont été obtenus sur une peau d'oreille de cochon, conservée à -20°C et épidermée par méthode thermique. Par conséquent, les résultats reflètent uniquement la diffusion passive des PA au travers des différentes couches épidermiques et ne prennent pas en compte le métabolisme qui aurait pu avoir lieu sur l'épiderme natif.

Aux vues des profils cinétiques obtenus, il apparaît que l'ondansétron diffuse environ 10 fois mieux que la dexaméthasone et 100 fois mieux que l'aprépitant à travers l'épiderme. Les quantités de PA retrouvées dans le compartiment receveur sont très inférieures à celles retrouvées lors de l'étude de libération, ce qui permet d'affirmer que l'étape de libération n'est pas le processus limitant lors de la perméation.

Pour un même véhicule, si l'on compare les quantités cumulées de l'Ond à la Dex, et de l'Ond à l'Apt, à la fin des cinétiques de libération et de perméation, on constate qu'elles sont 2 à 80 fois et

15 à 750 fois plus élevées pour l'Ond. Cette différence de comportement montre que les **propriétés physico-chimiques** de l'Ond sont favorables à son passage transdermique. Comme précédemment, sa **solubilité** accrue dans l'eau ($S_{\text{Ond-H}_2\text{O}} = 54,3 \text{ mg.mL}^{-1}$) par rapport à celle de la dexaméthasone ($S_{\text{Dex-H}_2\text{O}} = 0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$) en faveur d'une concentration supérieure dans la phase hydrophile externe des différentes formes galéniques, permet sa meilleure perméation. Par ailleurs, le **poids moléculaire** inférieur de l'ondansétron ($M_{\text{Ond}}=293 \text{ g.mol}^{-1}$; $M_{\text{Dex}}=392 \text{ g.mol}^{-1}$) est également en faveur de sa perméation. Bien qu'ils présentent un caractère hydrophobe équivalent ($\log P_{\text{Dex}}=1,83$; $\log P_{\text{Ond}}=2,0$), l'ionisation de l'ondansétron au pH des formes galéniques et au pH de la peau lui confère un log D compris entre - 0,6 et 0,39 *versus* 1,83 pour la dexaméthasone. Si la dexaméthasone sous forme neutre possède une affinité supérieure à l'ondansétron pour le SC très hydrophobe, il se pourrait qu'elle diffuse plus difficilement à travers l'épiderme viable plus riche en eau que dans le SC (Polinini, 2014). En ce qui concerne l'aprépitant, il présente une très faible solubilité aqueuse ($S_{\text{Apt-H}_2\text{O}} = 0,005 \text{ mg.mL}^{-1}$), un poids moléculaire élevé ($M_{\text{Apt}} = 534 \text{ g.mol}^{-1}$), ainsi qu'un **caractère hydrophobe** marqué ($\log P_{\text{Apt}} = 4,8$) qui sont probablement à l'origine de sa très faible diffusion à travers l'épiderme. Les faibles quantités d'Apt libérées et diffusant à travers l'épiderme sont peut être également liées à la granulométrie de l'Apt utilisé pour la formulation et obtenu par extraction à partir de l'Emend®. En effet, il a été démontré que la biodisponibilité de l'Apt est étroitement liée à la taille des particules d'Apt. Dans l'Emend®, l'Apt est sous forme de nanoparticules (de technologie Nanocrystal®) qui présentent des surfaces d'échange supérieures, ce qui permet d'augmenter sa solubilité et de ce fait sa biodisponibilité (Kesisoglou, 2008). Cette structure n'est pas conservée après extraction de l'Apt. Il aurait été intéressant de disposer de nanoparticules d'Apt identiques à celles incorporées dans l'Emend® afin de réaliser une étude comparative. De même, pour la dexaméthasone et l'aprépitant, il aurait été pertinent de déterminer la quantité de PA présente dans le SC et l'épiderme viable afin de vérifier ces hypothèses.

Il est également important de souligner que ce ne sont pas forcément les véhicules qui libèrent au mieux le PA, qui permettent la meilleure perméation. Ainsi, dans le cas de l'Ond, alors que le PLO®, le Phytobase®, le Pentravan® Plus et le Lipovan® permettent une libération équivalente à la fois rapide et importante, le PLO® se distingue des autres véhicules lorsqu'il s'agit d'induire la perméation de l'Ond à travers l'épiderme : le flux et la quantité cumulée à 40 h sont dans ce cas 10 fois plus faibles que pour le Phytobase® dont les performances sont les meilleures, au même titre que celles du Pentravan® Plus, du Pentravan® et du Lipovan®. Ceci est probablement lié à la **composition propre de chacun des véhicules**, notamment la nature des promoteurs d'absorption, la structure de la matrice (polymérique ou non) et le système vésiculaire. En effet, pour l'Ond, les promoteurs d'absorption et les phytosomes contenus dans le Phytobase® participeraient à la

déstructuration du SC, favorisant ainsi la perméation de l'ondansétron (Williams, 2012 ; Pawar, 2015) contrairement à la Dex, où les promoteurs d'absorption et les liposomes contenus dans le Pentravan®, le Pentravan Plus®, le PLO® et le Lipovan® contribueraient préférentiellement à son passage transcutané.

Ces différences observées peuvent également être liées aux interactions des PA avec les véhicules, notamment en terme d'**encapsulation**. En effet, si l'on s'intéresse au comportement individuel de chacun des PA formulés dans les différents véhicules, il apparaît qu'ils ne sont pas équivalents. Le Phytobase® est le véhicule qui permet la pénétration la plus rapide (flux = $4,31 \pm 0,30 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$) et en plus grande quantité ($Q_{\text{cum}40\text{h}}=152,63 \pm 16,05 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) de l'ondansétron. Ceci pourrait s'expliquer par la composition phytosomale propre au Phytobase®. En effet, les phytosomes sont capables d'encapsuler une plus grande quantité de PA hydrophile par interaction de type liaisons hydrogène entre les têtes polaires des PL et le PA, ce qui augmenterait leur absorption (Pawar, 2015). L'ondansétron sous forme cationique pourrait interagir d'avantage avec les phytosomes que la dexaméthasone neutre et moins hydrophile.

III.4.5 Choix du véhicule

Afin de sélectionner le véhicule le plus prometteur pour administrer la dexaméthasone et l'ondansétron simultanément à partir d'une même formulation, les quantités cumulées (Q_{cum} à 23 h) des deux principes actifs formulés individuellement dans chacun des véhicules ont été comparés. Les résultats sont présentés dans la [figure III.21](#).

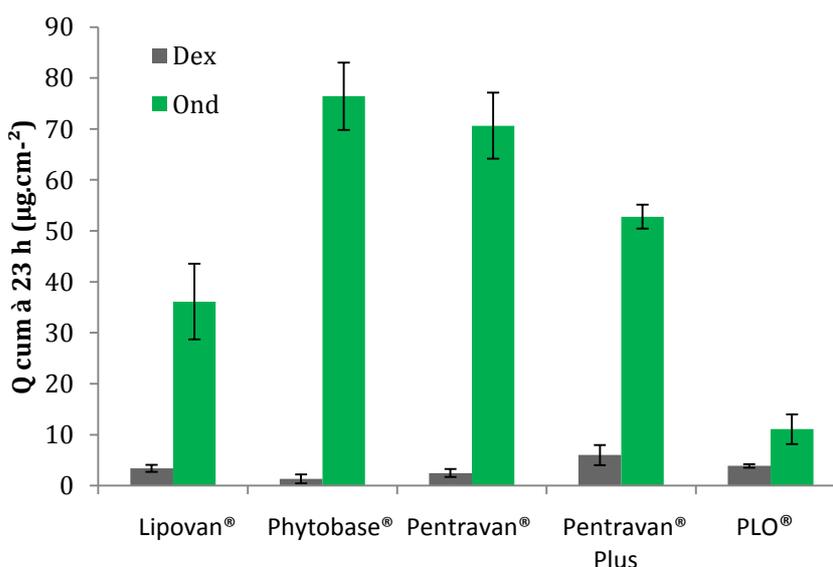


Figure III.21 : Histogrammes de comparaison de Q_{cum} à 23 h entre la dexaméthasone et l'ondansétron.

Quel que soit la nature du véhicule, on constate que l'ondansétron passe la barrière cutanée en plus grande quantité que la dexaméthasone. Cette différence de comportement ne semble être liée ni au poids moléculaire ($M_{Dex}=392 \text{ g.mol}^{-1}$; $M_{Ond}=293 \text{ g.mol}^{-1}$) ni au caractère hydrophobe de ces molécules ($\log P_{Dex}=1,83$; $\log P_{Ond}=2,0$). En revanche, la solubilité accrue de l'ondansétron dans l'eau et dans un milieu EtOH/H₂O – 50/50 (v/v) ($S_{Ond-H_2O} = 54,3 \text{ mg.ml}^{-1}$; $S_{Ond-EtOH/H_2O}= 108 \text{ mg.ml}^{-1}$) par rapport à celle de la dexaméthasone ($S_{Dex-H_2O} = 0,1 \text{ mg.ml}^{-1}$; $S_{Dex-EtOH/H_2O}=8 \text{ mg.ml}^{-1}$) pourrait être à l'origine d'un passage transdermique plus favorable à l'ondansétron.

L'absorption percutanée de l'ondansétron est maximale lorsqu'il est formulé dans le Phytobase® (80 µg à 23 h), tandis que le Pentravan® Plus est le véhicule le plus adapté pour diffuser la dexaméthasone à travers l'épiderme. Bien que le passage transdermique de l'ondansétron soit trois fois plus faible dans le Pentravan® Plus que dans le Phytobase®, ce véhicule a été sélectionné pour formuler simultanément la dexaméthasone et l'ondansétron, car il est plus adapté pour la dexaméthasone.

III.4.5.a Impact du mélange des deux PA sur le flux et la quantité cumulée à 23 h.

La Dex et l'Ond ont été formulés simultanément dans le Pentravan® Plus en présence de 15% d'éthanol. Puis, les cinétiques de perméation dans ces deux PA au travers des épidermes ont été initiées durant 40 h. Les quantités cumulées à 23 h ($Q_{cum_{23h}}$) et les flux des deux PA ont été déterminés et comparés à ceux de l'Ond et de la Dex formulés individuellement dans le Pentravan® Plus. Les résultats sont présentés dans le [tableau III.12](#)

Tableau III.12 : Flux et $Q_{cum_{23h}}$ de la Dexaméthasone et de l'Ondansétron seuls ou en mélange dans le Pentravan® Plus.

Formulation dans le Pentravan®		
Plus	Flux ($\mu\text{g.cm}^{-2}.\text{h}^{-1}$)	$Q_{cum_{23h}}$ ($\mu\text{g.cm}^{-2}$)
Dexaméthasone		
- seule	0,32 ± 0,02	6,00 ± 1,95
- en mélange	0,09 ± 0,02	3,61 ± 0,93
Ondansétron		
- seul	2,26 ± 0,15	53 ± 2
- en mélange	1,08 ± 0,16	35 ± 10

La vitesse de perméation et la $Q_{cum_{23}}$ de la Dex sont divisées par 3 et 2, respectivement, lorsque celle-ci est formulée en mélange avec l’Ond dans le Pentravan® Plus. Pour l’Ond, sa vitesse de perméation et sa $Q_{cum_{23h}}$ diminuent respectivement d’un facteur 2 et 1,5, quand celui-ci est formulé en mélange avec la Dex dans le Pentravan® Plus.

Même si les quantités cumulées dans le compartiment receveur après 23 h pour l’ondansétron et la dexaméthasone sont encourageantes, nous nous sommes attachés à améliorer le passage transdermique de ces deux principes actifs en jouant sur la nature du solvant utilisé pour mettre les PA en suspension avant leur incorporation dans les véhicules car ce solvant joue aussi le rôle de promoteur d’absorption.

III.4.5.b Impact du promoteur d’absorption sur le flux et la quantité cumulée à 23 h.

La dexaméthasone et l’ondansétron ont été formulés simultanément dans le Pentravan® Plus, en présence de 15% (m/m) d’éthanol, d’isopropanol (iPrOH), d’éthylène glycol (EG), de tween 20 (T 20) ou de tween 80 (T 80). Chaque formulation a été contrôlée et le pourcentage de recouvrement a été calculé ; quel que soit le solvant utilisé, il est inclus dans les limites d’acceptabilité fixées à $\pm 10\%$. Les flux et les quantités cumulées à 23 h ($Q_{cum_{23h}}$) de chacun des deux principes actifs sont respectivement présentés sur le [tableau III.13](#) et la [figure III.22](#).

Tableau III.13: Influence de la nature du promoteur sur le flux de la Dexaméthasone et de l’Ondansétron présents en mélange dans le Pentravan® Plus.

PA	Promoteur	Flux ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$)
Dexamethasone	Ethanol	$0,09 \pm 0,02$ ^{a*}
	Isopropanol	$0,12 \pm 0,01$ ^{a,b}
	Ethylène glycol	$0,07 \pm 0,03$ ^{a*}
	Tween 20	$0,20 \pm 0,02$ ^{b*}
	Tween 80	$0,21 \pm 0,03$ ^{b*}
Ondansetron	Ethanol	$1,08 \pm 0,16$ ^{a,b,c}
	Isopropanol	$0,98 \pm 0,11$ ^{a,b}
	Ethylène glycol	$0,48 \pm 0,09$ ^{a*}
	Tween 20	$2,14 \pm 0,29$ ^{c*}
	Tween 80	$1,52 \pm 0,21$ ^{b,c}

^a : classification des promoteurs dans la famille A ; ^b : classification des promoteurs dans la famille B ; ^c : classification des promoteurs dans la famille C, * si les promoteurs appartiennent à deux familles distinctes, les résultats sont statistiquement différents (p-value < 0,05).

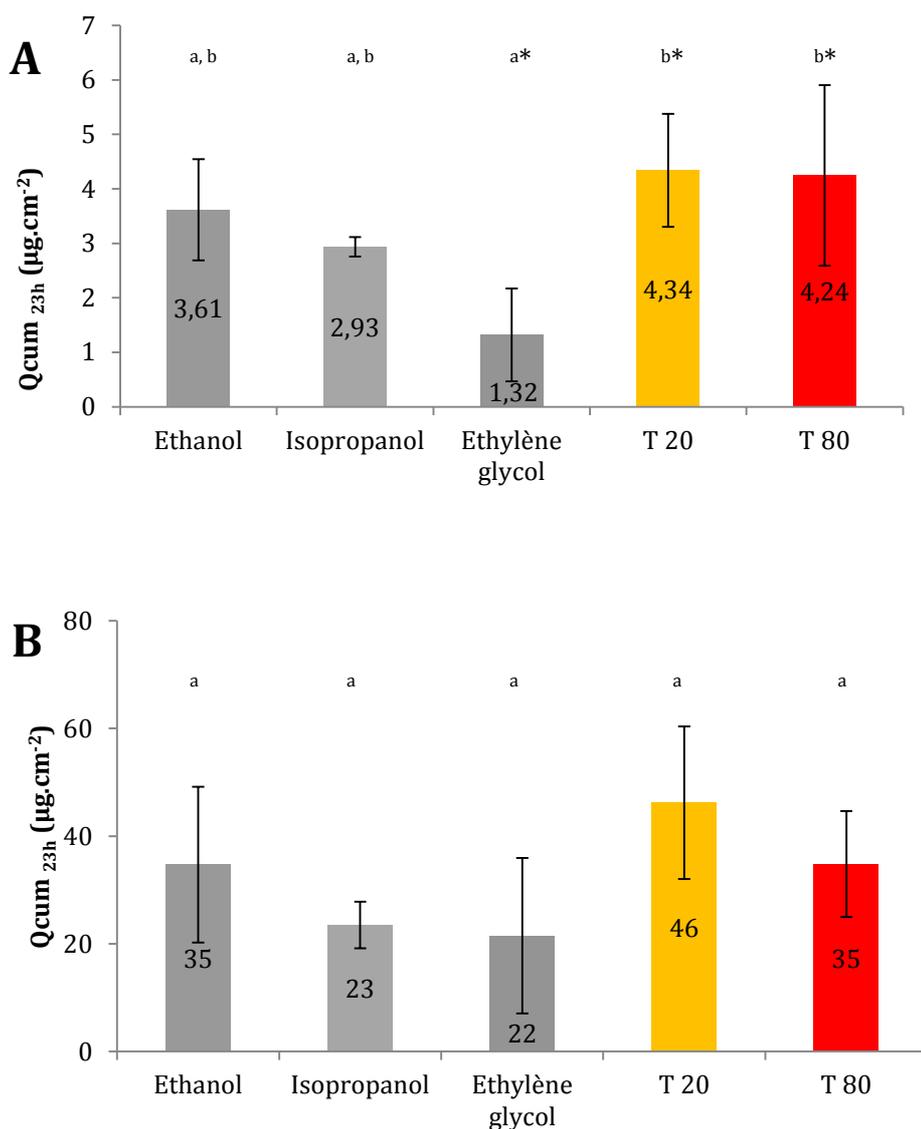


Figure III.22 : Influence de la nature du promoteur sur les quantités cumulées à 23 h de A) la Dexaméthasone et de B) l'Ondansétron présents en mélange dans le Pentravan® Plus.

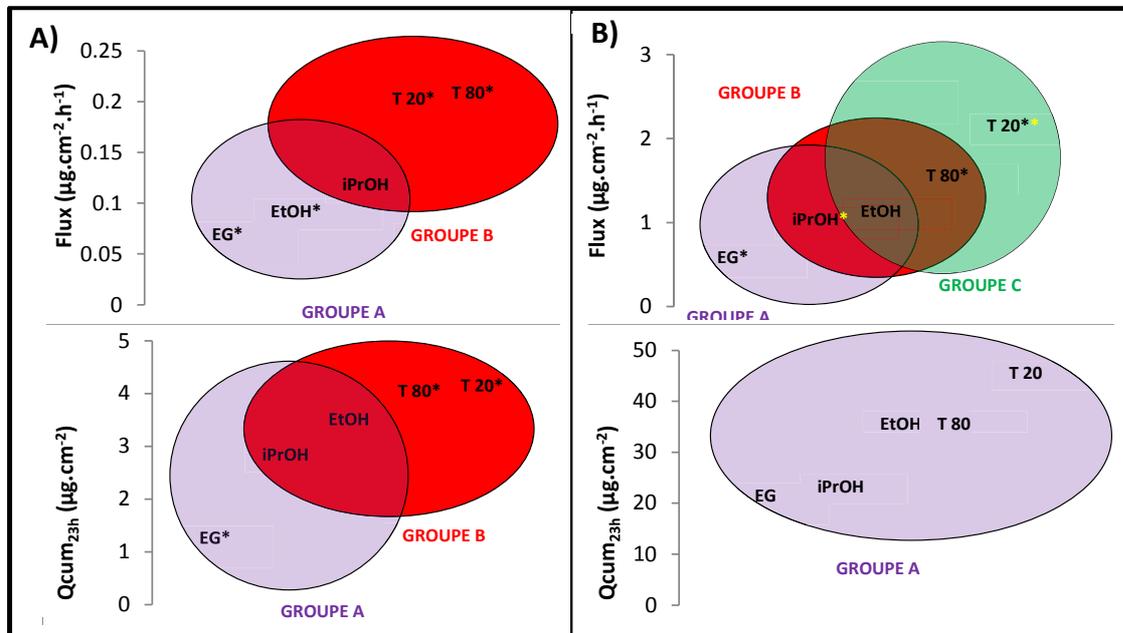
Les barres d'erreur représentent les écarts type associés aux Q_{cum} ($n = 3$).

^a : classification des promoteurs dans la famille A ; ^b : classification des promoteurs dans la famille B ; * si les promoteurs appartiennent à deux familles distinctes, les résultats sont statistiquement différents (p -value < 0,05).

Des tests statistiques non paramétriques de comparaison (Kruskal-Wallis) ont été réalisés sur les valeurs de flux et sur les quantités cumulées d'Ond et de Dex à 23 h afin de classer les véhicules. Comme mentionné dans le paragraphe III.4. de ce chapitre, la constante de perméabilité étant directement proportionnelle au flux, les conclusions qui seront faites sur le flux pourront être

étendues aux constantes de perméabilité. Des groupes de familles ont pu être établis comme l'illustre la [figure III.23](#).

Figure III.23 : Groupes de Famille des flux et Qcum23h obtenus avec le test de Kruskal –Wallis pour A) la dexaméthasone et B) l'ondansétron.



* pour les promoteurs appartenant à deux familles distinctes, les résultats sont statistiquement différents (p-value < 0,05).

En ce qui concerne les flux de la Dex, les tests statistiques montrent que les véhicules peuvent être classés en deux familles distinctes ([figure III.23.A](#)) :

- la famille A dont font partie l'éthylène glycol, l'isopropanol et l'éthanol, pour lesquels les valeurs des flux ne sont pas significativement différentes ($0,315 < p\text{-value} < 0,648$) et dont le flux moyen est égal à $0,09 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$.
- la famille B qui regroupe, l'isopropanol, le tween 20 et le tween 80 ($0,201 < p\text{-value} < 0,927$) et dont le flux moyen est égal à $0,18 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$.

Ainsi, les flux de la dexaméthasone formulée dans l'éthanol ou dans l'éthylène glycol sont statistiquement différents de ceux formulée dans le tween 20 ou 80 (* en noir dans le [figure III.23.A](#) ; $0,006 < p\text{-value} < 0,022$) et respectivement égaux à $0,09 \pm 0,2 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$, $0,07 \pm 0,03 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$, $0,20 \pm 0,02 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ et $0,21 \pm 0,03 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$. Les flux moyens de la Dex formulée dans les promoteurs appartenant à la famille B sont deux fois supérieurs à ceux appartenant au groupe A.

En fonction des $Q_{cum_{23h}}$, on retrouve également deux familles de profils :

- la famille A dont font partie l'éthylène glycol, l'isopropanol et l'éthanol, pour lesquels les valeurs des $Q_{cum_{23h}}$ ne sont pas significativement différentes ($0,122 < p\text{-value} < 0,673$) et dont le $Q_{cum_{23h}}$ moyen est égal à $2,62 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$.
- la famille B qui regroupe, l'éthanol, l'isopropanol, le tween 20 et le tween 80 ($0,206 < p\text{-value} < 0,675$) et dont le $Q_{cum_{23h}}$ moyen est égal à $3,78 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$.

On peut noter que les $Q_{cum_{23h}}$ de l'éthylène glycol sont significativement différents de ceux des tweens 20 et 80.

En ce qui concerne les flux de l'Ond, les tests statistiques montrent que les véhicules peuvent être classés en trois familles distinctes (figure III.23.B) :

- la famille A dont font partie l'éthylène glycol, l'isopropanol et l'éthanol, pour lesquels les valeurs des flux ne sont pas significativement différentes ($0,083 < p\text{-value} < 0,523$) et dont le flux moyen est égal à $0,80 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$.
- la famille B qui regroupe, l'isopropanol, l'éthanol et le tween 80 ($0,273 < p\text{-value} < 0,648$) et dont le flux moyen est égal à $1,20 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$.
- la famille C qui regroupe, l'éthanol, le tween 80 et le tween 20 ($0,144 < p\text{-value} < 0,648$) et dont le flux moyen est égal à $1,60 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$.

Par ailleurs, on peut noter que le flux de l'Ondansétron formulé :

- dans l'éthylène glycol est statistiquement différent de ceux dans les tweens 20 et 80 (* noire dans la figure III.23.B; $p\text{-value}_{EG-T20} = 0,001$ et $p\text{-value}_{EG-T80} = 0,028$) et respectivement égaux à $0,48 \pm 0,09 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$, $2,14 \pm 0,29 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ et $1,52 \pm 0, \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$.
- dans l'isopropanol est statistiquement différent de celui obtenu dans le tween 20 (*jaune dans la figure III.23.B; $p\text{-value}_{iPrOH-T20} = 0,036$) et respectivement égaux à $0,98 \pm 0,11 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ et $2,14 \pm 0,29 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$.

En fonction des quantités d'ondansétron libérées à 23 h, aucune différence significative entre les différents promoteurs n'est observée ($0,055 < p\text{-value} < 0,834$). A un risque statistique plus élevé, on peut toutefois noter une différence significative des $Q_{cum_{23h}}$ lorsque l'Ond est formulé dans le tween 20 ($46 \pm 14 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$), respectivement avec l'isopropanol ($23 \pm 4 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$; $p\text{-value}_{isoP-T20} = 0,055$) et le l'éthylène glycol ($22 \pm 4 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$; $p\text{-value}_{isoP-T80} = 0,101$).

Ces résultats permettent de conclure que les tweens (tensio-actifs non ioniques) sembleraient être plus performants pour le passage transdermique de l'ondansétron et de la dexaméthasone que les promoteurs alcooliques.

III.4.6 Discussion

Bien qu'aucune étude de perméation n'ait été réalisée dans les mêmes conditions opératoires que celle utilisée lors de notre étude, rendant de ce fait difficile les comparaisons, il est néanmoins intéressant de positionner nos résultats obtenus par rapport à ceux issus de la littérature. En effet, dans les études répertoriées, qui seront discutées ci-dessous, les membranes biologiques sont d'origine différente aussi bien en terme d'espèce que de site anatomique ou encore d'épaisseur (peau entière, dermatome ou épiderme), ce qui impactent les résultats. La température (32 ou 37°C), la vitesse d'agitation du milieu receveur ou encore le type de cellule de diffusion (statique ou dynamique), peuvent également influencer la perméation. Les conditions opératoires décrites étant souvent incomplètes, l'interprétation des résultats est alors délicate.

Aucune étude transdermique portant sur l'aprépitant n'ayant, à notre connaissance, été publiée, nous discuterons et comparerons nos résultats obtenus pour l'ondansétron et la dexaméthasone formulés séparément, à ceux d'études portant sur le passage transdermique de ces mêmes PA formulés dans d'autres véhicules, car il s'agit des seules données disponibles. Nous comparerons également nos résultats à ceux obtenus pour d'autres PA formulés dans les mêmes véhicules étudiés.

Rappelons que nos travaux ont été menés sur des peaux d'oreille de cochon épidermées, à l'aide de cellules de Franz dont la surface d'échange est de 0,64 cm², le volume du compartiment receveur de 3,1 mL et la nature du milieu receveur du SBF à 0,5 % HP-β-CD. Les données de perméation ont été obtenues après dépôt de 200 mg de formulation à 1,6% (m/m) d'ondansétron et à 1,2% (m/m) de dexaméthasone dans le Pentravan® Plus en présence de 15% d'éthanol (m/m). Les paramètres caractérisant la perméation sont les suivants: Flux_{OND} = 2,26 ± 0,15 µg.cm⁻².h⁻¹, K_p OND = 1,41.10⁻⁴ (cm.h⁻¹) ; Flux_{DEX} = 0,32 ± 0,02 µg.cm⁻².h⁻¹; K_p DEX = 2,66.10⁻⁵ (cm.h⁻¹).

A ce jour, aucune cinétique de perméation sur membrane naturelle n'a été entreprise avec le Phytobase®, le Lipovan® ou le Pentravan® Plus. Seuls le Pentravan® et le PLO® ont fait l'objet d'études sur membranes biologiques. L'étude de Lehman (2012) évalue la perméation de la testostérone 10% et du kétoprofène 10% formulés chacun dans le PLO® et le Pentravan®, à l'aide d'une cellule de Franz. Les flux obtenus dans le Pentravan® et le PLO® pour le kétoprofène sont respectivement égaux à 1,7 µg.cm⁻².h⁻¹ et 0,45 µg.cm⁻².h⁻¹. Pour la testostérone, ils sont égaux à 0,1

$\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ et $0,05 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$. Ces résultats sont du même ordre de grandeur que ceux obtenus lors de notre étude pour l'Ond et la Dex, bien que des concentrations de kétoprofène et de testostérone supérieures (x4) aient été utilisées. Une autre étude (Polonini, 2014) évalue la perméation de la progestérone à 5% dans le Pentravan® en présence de 30% d'éthylglycérol. Le flux de $4,5 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ est très proche de celui mesuré pour l'ondansétron à 1,6% dans le Pentravan® Plus.

A notre connaissance, 8 études ont porté sur le développement et l'évaluation de formes galéniques pour l'administration transdermique de l'ondansétron. On dénombre ainsi 5 gels (dont 4 utilisés en mode occlusif), 2 microémulsions et une suspension aqueuse. Le [tableau III.14.A](#) reprend les données principales relatives aux formes galéniques développées et aux études de perméation réalisées sur la peau.

L'équipe de Patel (2015) a développé un gel contenant 2% d'Ond, 2% d'hydroxypropylcellulose (HPC), 2,5% d'isopropyl myristate (IPM) dans un mélange EtOH/H₂O – 60/40 (v/v). Une étude *in vitro* de ce gel a été menée sur cellule de Franz thermostatée à 37°C, en déposant 1 g de gel sur de la peau d'oreille de cochon entière. Les flux et coefficients de perméabilité obtenus pour l'Ond sont respectivement égaux à $84 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ et $4,3\cdot 10^{-3}\text{cm}\cdot\text{h}^{-1}$; soit 37 fois supérieures aux nôtres.

De même, l'équipe de Krishnaiah (2009) a développé un patch réservoir rempli d'hydrogel à 2% d'HPC et à 3% de nérodilol dans un mélange EtOH/H₂O – 60/40 (v/v) et contenant 3% d'Ond et dont la surface d'échange était constituée d'une membrane de contrôle de libération EVA 1802 + PEG 600 recouverte d'adhésif. Lors de l'étude *in vitro* menée sur de l'épiderme de rat, en déposant 2 g de forme galénique, un flux de $112 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ a été obtenu, soit 50 fois plus que celui obtenu lors de notre étude. Rappelons que chez les rongeurs la perméation est surestimée (Godin, 2007).

Ces deux études évaluant des formulations d'hydrogel relativement proches en terme de composition (2% d'HPC, entre 2 et 3% de promoteur et 60% d'éthanol) ont donc montré des performances de perméation *in vitro* similaires et élevées qui sont probablement liées à la solubilité accrue de l'ondansétron dans l'hydrogel constitué d'un polymère hydrophile et contenant une proportion importante d'éthanol. L'éthanol étant lui-même un promoteur d'absorption, une telle proportion a certainement favorisé la perméation. Notons également qu'il n'est pas impossible qu'elle ait entraîné une dénaturation de la peau lors des études cinétiques menées par ces deux équipes, d'autant plus dans le cas de Krishnaiah qui utilise un mélange hydroalcoolique à 60% d'éthanol dans le compartiment receveur, pour mener son étude. Une telle teneur en éthanol est en effet discutable dans la mesure où elle risque d'altérer la peau des patients, même si les auteurs ne relatent aucun phénomène d'irritation lors d'une seule application. On peut cependant supposer qu'une perte d'innocuité à de tels taux est à envisager lors d'administrations répétées.

Tableau III.14 : Synthèse des études *in vitro* de perméation présentes dans la littérature scientifique et issus de nos travaux pour l'ondansétron A) et de la dexaméthasone B)

A) ondansétron

Auteurs	Nature de la forme galénique	Composition de la forme galénique	Teneur en Ond	Système occlusif	Modèle étudié	Dispositif d'étude	Conditions d'étude	J ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$)	$K_p^{(1)}$ ($\text{cm}\cdot\text{h}^{-1}$)
Nos travaux	Crème Hydrophile (Pentra ® Plus)	15% d'EtOH, 83,4% de Pentra ® Plus [®]	1,6%	Non	Epiderme d'oreilles de cochon	Cellule de Franz ($V_{\text{recepteur}} = 3,1 \text{ mL}$; $S_{\text{echange}} = 0,64 \text{ cm}^2$)	32°C, dépôt de 0,2 g, milieu receveur : SBF à 0,5% d'HP- β -CD	2,26	$1,4\cdot 10^{-4}$
Patel, 2015	hydrogel	2% d'HPC, 2,5% d'IPM dans un mélange EtOH/H ₂ O – 60/40 (v/v)	2%	Non	Peau d'oreilles de cochon	Cellule de Franz, géométrie non précisée	37°C, dépôt de 1 g de gel, milieu receveur : DPBS pH 7,2	84	$4,3\cdot 10^{-3}$
Krishnaiah, 2009	hydrogel	2% d'HPC, 3% de nérodilol dans un mélange EtOH/H ₂ O – 60/40 (v/v)	3%	Oui : patch réservoir incluant une membrane de contrôle de libération EVA 1802 + PEG600 recouverte d'adhésif	Epiderme de rat	Cellule de Keshary Chien ($V_{\text{recepteur}} = 35 \text{ mL}$; $S_{\text{echange}} = 6,6 \text{ cm}^2$)	37°C, dépôt: application du patch réservoir contenant 2 g de formulation, milieu receveur : mélange EtOH/H ₂ O - 60/40 (v/v)	112	$3,7\cdot 10^{-3}$
Obata, 2010	hydrogel	1% d'HPC, 1% d'HEC, 15% d'IPA, 9% de NMP et 0,96% de l-menthol	1%	Oui	Peau de souris	Cellule de Franz ($V_{\text{recepteur}} = 16 \text{ mL}$; $S_{\text{echange}} = 2 \text{ cm}^2$)	37°C, dépôt de 1 g, milieu receveur : PBS pH 7,4	77	$7,7\cdot 10^{-3}$
Swain, 2009	gel	70 % d'un mélange EC/PVP – 10/90 et 30% de di-n-butylphtalate (plastifiant)	40%	Oui : patch matriciel	Peau humaine	Cellule de Keshary Chien ($V_{\text{recepteur}} = 20 \text{ mL}$; $S_{\text{echange}} = 1,77 \text{ cm}^2$)	37°C, dépôt non précisé, milieu receveur : NaCl 0,9% (m/v)	1,41	$3,5\cdot 10^{-6}$
Rajabalaya, 2013	gel	68% d'EC, 29% PVP, 40% dibutyl sebacate (plastifiant)	3%	Oui : patch matriciel	Peau de souris	Cellule de Franz, géométrie non précisée	32°C, dépôt non précisé, milieu receveur : PBS pH 7,4	5,39 ⁽²⁾	$1,8\cdot 10^{-4}$
Al Abood, 2013	microémulsion	5% d'acide oléique, 30% d'un mélange tween 20/PEG 400 - 2/1 et 64,5% d'H ₂ O	0,50%	Oui : parafilm	Peau de rat	Cellule de Keshary Chien ($V_{\text{recepteur}} = 20 \text{ mL}$; $S_{\text{echange}} = 10,78 \text{ cm}^2$)	37°C, dépôt non précisé, milieu receveur : PBS pH 7,4	179	$3,6\cdot 10^{-2}$
Malakar, 2012	microémulsion	10% d'IMP, 8% d'H ₂ O et 82% d'un mélange tween 80/IPA - 3/1	/	Non	peau d'oreilles de cochon	Cellule de Franz ($V_{\text{recepteur}} = 16 \text{ mL}$; $S_{\text{echange}} = 0,78 \text{ cm}^2$)	37°C, dépôt de 5 mL, milieu receveur : PBS pH 7,4	0,284	/
Takahashi, 2001	suspension aqueuse	PBS pH7,4/ EtOH- 80 /20 (v/v)	60%	Non	peau de serpent imprégnée de promoteur (acide oléique)	Cellule de Franz ($V_{\text{recepteur}} = 10 \text{ mL}$; $S_{\text{echange}} = 1,77 \text{ cm}^2$)	37°C, dépôt de 0,5 mL, milieu receveur : PBS pH 6/EtOH - 80/20 (v/v)	24	$4\cdot 10^{-5}$

⁽¹⁾ déterminé par nos soins ; ⁽²⁾ Donnée non vérifiable ;

EC : éthyl cellulose ; HEC : hydroxyéthyl cellulose ; HPC : hydroxypropyl cellulose ; IMP : isopropylmyristate ; IPA : isopropanol ; NMP : N-méthyl-2-pyrrolidone ; PVP : polyvinyl pyrrolidone.

B) dexaméthasone

Auteurs	Nature de la forme galénique	Composition de la forme galénique	Teneur en Dex	Système occlusif	Modèle étudié	Dispositif d'étude	Conditions d'étude	J ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$)	$K_p^{(1)}$ ($\text{cm}\cdot\text{h}^{-1}$)
Nos travaux	Crème Hydrophile (Pentravan® Plus®)	15% d'EtOH, 83,4% de Pentravan® Plus	1,2%	Non	Epiderme d'oreilles de cochon	Cellule de Franz ($V_{\text{receveur}} = 3,1 \text{ mL}$; $S_{\text{échange}} = 0,64 \text{ cm}^2$)	32°C, dépôt de 0,2 g, milieu receveur : SBF à 0,5% d'HP- β -CD	0,32	$2,6\cdot 10^{-5}$
Mukherjee, 2005	Gel	13% de PVP, 66% d'Eudragit® et 20% de di-n-butylphtalate (plastifiant)	1,2 $\text{mg}\cdot\text{cm}^{-2}$	Oui : patch matriciel	Peau de souris	Cellule de Franz ($V_{\text{receveur}} = 300 \text{ mL}$; $S_{\text{échange}} = 1 \text{ cm}^2$)	34°C, dépôt de 1 g de gel, milieu receveur : solution saline à 1M et 20% de PEG 400	30	/
Lopez, 2000	Hydrogel	2% d'HEC, 1% de β -CD, 10% d'HP- β -CD dans l'eau	/	Non	Peau de souris	Cellule de Franz ($S_{\text{échange}} = 2,54 \text{ cm}^2$)	dépôt: 1,5g de formulation, milieu receveur : PBS pH 7,2	0,24	/
Chandra, 2009	Hydrogel	10% d'huile d'olive, 70% d'un mélange de lécithine/IPA - 2/1 (v/v), eau	0,1%	Non	Peau de rat	Cellule de Franz ($V_{\text{receveur}} = 16 \text{ mL}$; $S_{\text{échange}} = 2 \text{ cm}^2$)	37°C, dépôt de 1g, milieu receveur : PBS pH 7,4	54,9	$5,5\cdot 10^{-2}$

⁽¹⁾ déterminé par nos soins ;

HEC : hydroxyéthyl cellulose ; IPA : isopropanol ; PVP : polyvinyl pyrrolidone.

Une dernière étude menée par Obata (2010), a permis d'obtenir un flux de $77 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ pour l'Ond, après sa formulation à hauteur de 1% dans un hydrogel à 1% d'HPC, 1% d'HEC, 15% d'IPA, 9% d'NMP et 0,96% de l-menthol. Dans ce cas, la proportion d'alcool est modérée (15% d'IPA), mais l'étude a été réalisée sur de la peau de souris.

Les performances en terme de perméation des patchs matriciels de type gels à base d'éthyl cellulose (EC), de Polyvinylpyrrolidone (PVP) et d'un plastifiant, préparés par l'équipe de Swain (2009) ou de Rajabalaya (2013), sont plus modérées. Dans le cas de Swain, la formulation contenant un mélange EC/PVP – 10/90 et 40% d'Ond a permis d'obtenir un flux optimal égal à $1,41 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$, soit du même ordre de grandeur que celui obtenu lors de notre étude pour une teneur en Ond 25 fois plus importante. Les auteurs expliquent ce résultat par la capacité du PVP, qui est un polymère hydrophile, à absorber l'eau, favorisant ainsi la dissolution de l'Ond et de ce fait sa libération. Rajabalaya *et al.* annoncent, quant à eux, un flux de $5,39 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ mesuré sur de la peau de souris. On peut ainsi espérer qu'en augmentant la quantité d'Ond dans le Pentravan® Plus, un flux supérieur soit obtenu.

En ce qui concerne les microémulsions, la préparation d'Al Abood (2013) contenant 0,5% d'Ond, 5% d'acide oléique, et 30% d'un mélange tween 20/PEG 400 – 2/1 et 64,5% d'H₂O conduit à un flux important de l'ondansétron ($179 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$) à travers la peau de rat (quantité déposée non précisée). A l'inverse Malakar *et al* (2012) évaluent le flux de l'ondansétron à $0,284 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ sur de la peau d'oreilles de cochon, sans préciser la teneur en ondansétron de la microémulsion contenant 10% d'IMP, 8% d'eau et 82% d'un mélange tween80/IPA -3/1 (v/v).

Il semble donc que les flux d'ondansétron mesurés lors de nos travaux soient inférieurs à ceux des autres études, même si ceux-ci ont été en partie évalués sur des peaux de rongeurs qui surestiment la perméation. Il est intéressant de souligner que les formulations transdermiques les plus efficaces citées précédemment contiennent toutes des promoteurs d'absorption en proportions importantes. Des combinaisons de promoteurs chimiques incluant du menthol avec de l'isopropanol et de la N-méthyl 2-pyrrolidone (Obata, 2010) dans un hydrogel ou encore du tween 20, du PEG 400 et de l'acide oléique dans une microémulsion (Al Abood, 2013) ont permis d'augmenter la perméation de l'ondansétron. Dans notre étude, le tween 20 pourrait être un bon promoteur et remplacer l'éthanol dont l'utilisation est controversée notamment en pédiatrie. Par ailleurs, le tween 20 est connu pour sa capacité à fluidifier les membranes des liposomes élastiques ainsi que le SC, favorisant de ce fait la perméation (Hathout, 2011). Ainsi, en modifiant la teneur de ce tensioactif non ionique ainsi que celle des PA, on pourrait espérer une augmentation significative des flux.

Enfin, concernant la dexaméthasone, il semblerait qu'elle ait fait l'objet d'un nombre plus limité d'études (tableau III.14.B). Alors que l'équipe de Chandra (2009) obtient un flux du même ordre de

grandeur que celui mesuré avec le Pentravan® Plus pour une formulation de type hydrogel, les équipes de Mukherjee (2005) et Lopez (2000) obtiennent des flux supérieurs à $30 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$, respectivement avec un gel et un hydrogel. Bien qu'il soit difficile de comparer les résultats, car les concentrations de la dexaméthasone ne sont pas toutes précisées, il semblerait néanmoins que le Pentravan® Plus soit peu performant et nécessite une optimisation ultérieure.

IV Références Bibliographiques

- Algranti P**, Guilloteau M, Histe M, Lallier M, N'Guyen-Huu JJ, Russotto R, *S.T.P Pharma Pratiques*, 2 (1992) 250-226.
- Al Abood RM**, Talegaonkar S, Tariq M, Ahmad FJ, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 101 (2013) 143-151.
- Allen Loyd VJ**, *International Journal of Pharmaceutical Compounding*, 4 (2000) 287 a.
- Allen Loyd VJ**, *International Journal of Pharmaceutical Compounding*, 4 (2000) 305 b.
- Aucoin HR**, Wilson AN, Wilson AM, Ishihara K, Guiseppi-Elie A, *Polymers*, 5 (2013) 1241-1257.
- Baert B**, Boonen J, Burvenich C, Roche N, Stillaert F, Blondeel P, Van Bocxlaer J, De Spiegeleer B, *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 13 (2010) 218-230.
- Baert B**, Van Steelandt S, De Spiegeleer B, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 55 (2011) 472-478.
- Baumberger JP**, Suntzeff V, Cowdry EV, *Journal of the National Cancer Institute*, 2 (1942) 413-423.
- Bhatia KS**, Singh J, *Pharmaceutical Sciences*, 2 (1996) 275-276.
- Chandra A**, Sharma PK, Irchhiaya R, others, *Asian Journal of Pharmaceutics*, 3 (2009) 30-36.
- Costa P**, Sousa Lobo JM, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 13 (2001) 123-133.
- Davies DJ**, Ward RJ, Heylings JR, *Toxicology in Vitro*, 18 (2004) 351-358.
- Godin B**, Touitou E, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59 (2007) 1152-1161.
- Hathout R**, Mansour S, Geneidi A, Mortada N, *Journal of Colloid and Interface Science*, 354 (2011) 124-130.
- Italo** Giannola L, De Caro V, Giandalia G, Siracusa MG, Tripodo C, Florena AM, Campisi G, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 67 (2007) 425-433.
- Jeon S**, Yoo CY, Park, *Colloids and Surfaces B*, 128 (2015) 7-14.
- Kesisoglou F**, Wu Y, *AAPS Journal*, 10 (2008) 516-525.
- Korinth G**, Heinz Schaller K, Drexler H, *Archives of Toxicology*, 79 (2005) 155-159.
- Korsmeyer RW**, Gurny R, Doelker E, Buri P, Peppas NA, *International Journal of Pharmaceutics*, 15 (1983) 25-35.
- Krishnaiah YS**, Rama B, Raghuramurthy V, Ramanamurthy KV, Satyanarayana V, *Pharmaceutical Development and Technology*, 14 (2009) 53-64.
- Lai PM**, Roberts MS, *Dermal Absorption and Toxicity Assessment*, 91 (1998) 371-414.
- Lehman PA**, Raney SG, *International Journal of Pharmaceutical Compounding*, 16 (2012) 248-252.
- Lopez RF**, Collett JH, Bentley MVL, *International Journal of Pharmaceutics*, 200 (2000) 127-132.
- Lucero MJ**, Claro C, Casas M, Jiménez-Castellan M, *Carbohydrate Polymers*, 92 (2013) 149-156.
- Malakar J**, Nayak AK, Basu A, *International Scholarly Research Network Pharmaceutics*, 2012 (2012) 1-6.
- Moore JW**, Flanner HH, *Pharmaceutical Technology*, 20 (1996) 64-74.
- Moya-Ortega MD**, Messner M, Jansook P, Nielsen TT, Wintgens V, Larsen KL, Amiel C, Sigurdsson HH,

- Loftsson T, *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 69 (2011) 377-382.
- Mukherjee** B, Mahapatra S, Gupta R, Patra B, Tiwari A, Arora P, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 59 (2005) 475-483. mpm
- Obata** Y, Ashitaka Y, Kikuchi S, Isowa K, Takayama K, *International Journal of Pharmaceutics*, 399 (2010) 87-93.
- OCDE**, *Essai n° 430: Corrosion cutanée in vitro: Essai de résistance électrique transcutanée (RET)*, consulté en 2015, http://www.oecd-ilibrary.org/environment/essai-n-430-corrosion-cutanee-in-vitro-essai-de-resistance-electrique-transcutanee-ret_9789264071131-fr.
- Patel** DR, Joshi A, Patel HH, Stagni G, *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 41 (2015) 1030-1036.
- Pawar** HA, Banghale B, *Journal of Bioanalysis and Biomedicine*, 7 (2015) 6-12.
- Payghan** SA, Kate VK, Purohit S, Bhandari A, *Inventi Rapid: Phar Tech*, 2012 (2012) 505-512.
- Peppas** NA, Wu JC, Von Meerwall E, *Macromolecules*, 27 (1994) 5626-5638.
- Polonini** HC, Brandão MA, Ferreira AO, Ramos C, Raposo NR, *International Journal of Pharmaceutical Compounding*, 18 (2014) 332-340.
- Rajabalaya** R, Chen DS, David SRN, *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 12 (2013) 279-285.
- Shah** VP, Tsong Y, Sathe P, Liu JP, *Pharmaceutical Research*, 15 (1998) 889-896.
- Swain** K, Pattnaik S, Sahu SC, Mallick S, *Latin American Journal of Pharmacy*, 28 (2009) 706-714.
- Takahashi** K, Rytting JH, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 53 (2001) 789-794.
- Ventura** CA, Tommasini S, Falcone A, Giannone I, Paolino D, Sdrafkakis, Mondello MR, Puglisi G, *International Journal of Pharmaceutics*, 314 (2006) 37-45.
- Williams** A.C, Barry B.W, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64 (2012) 128-137.

CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION GENERALE

Trois classes thérapeutiques sont recommandées dans les protocoles des sociétés savantes d'oncologie pour prendre en charge les nausées et vomissements chimio-induits, à savoir un antagoniste des récepteurs 5-HT₃, un antagoniste des récepteurs NK1 et un corticoïde. Ainsi, l'ondansétron, l'aprépitant et la dexaméthasone, référencés dans notre centre hospitalier universitaire, ont été sélectionnés pour être introduits dans une préparation magistrale transdermique destinée aux patients hospitalisés, pour lesquels les voies orale et intraveineuse sont inadaptées.

L'étude de la bibliographie a montré que différentes formes transdermiques contenant de l'ondansétron ou de la dexaméthasone (gel, microémulsion ou patch) et mettant à profit la diffusion passive, permettaient d'obtenir des résultats de perméation encourageants. En revanche, à notre connaissance, aucune étude n'a porté sur l'administration transdermique de l'aprépitant. Parmi les spécialités pharmaceutiques transdermiques commercialisées, il existe un dispositif transdermique contenant le granisétron (Sancuso®) qui présente une AMM européenne mais qui n'est toutefois pas commercialisé en France. La préparation de patch étant fastidieuse et inadaptée aux contraintes hospitalières, l'utilisation d'un véhicule semi-solide prêt à l'emploi a été retenue. A ce titre, des véhicules commercialisés par la société Fagron ont été sélectionnés. Il s'agit de systèmes colloïdaux contenant des vésicules liposomales (PLO®, Lipovan®, Pentravan® et Pentravan® Plus) ou phytosomales (Phytobase®), pour lesquels peu d'informations sur leur mode de formulation ou encore leurs performances sont disponibles. Les travaux réalisés ont donc porté sur l'évaluation de ces véhicules pour la formulation simultanée de l'Apt, la Dex et l'Ond, et pour la perméation de ces PA à travers la peau.

Des méthodes analytiques ont tout d'abord été mises au point et validées afin de doser l'Ond, l'Apt et la Dex dans les préparations finies et lors des études de diffusion. Une méthode séparative en CLHP/UV a été développée pour l'ensemble des véhicules sur colonne C18 en mode gradient d'élution, avec une phase mobile compatible avec une détection en spectrométrie de masse. La séparation complète des PA en présence de leurs étalons internes a été obtenue en moins de 14 min. Une méthode UV/PLS a, quant à elle, été développée pour doser les 3 antiémétiques formulés simultanément dans de PLO®. Ainsi, un algorithme incluant 5 composantes, permettant d'évaluer la concentration des 3 PA à partir du spectre UV enregistré sur une gamme spectrale de 260-288 nm, a été mis en place. Ces deux méthodes ont ensuite été validées selon les recommandations de la SFSTP Pharma. La construction des profils d'exactitude a permis de valider les méthodes avec une erreur totale comprise dans les limites d'acceptations fixées à $\pm 10\%$ sur des

gamme de concentration pour la Dex, l'Ond et l'Apt respectivement comprises entre 0,3 - 3,5 mg.L⁻¹ ; 0,2 - 10 mg.L⁻¹ et 3,5 - 35 mg.L⁻¹ en CLHP/UV. En UV/PLS elles sont respectivement égales à 4 - 8 mg.L⁻¹, 5 - 15 mg.L⁻¹ et 20 - 50 mg.L⁻¹. Bien que la méthode UV/PLS affiche des seuils de quantification plus élevés que ceux obtenus en CLHP/UV, elle peut néanmoins présenter un réel intérêt au sein d'une Pharmacie à Usage Intérieur pour le contrôle en routine des préparations, de par sa facilité et sa rapidité d'utilisation. Toutefois, l'algorithme n'est valable que pour les formulations transdermiques à base de PLO[®] contrairement à la CLHP/UV qui peut être appliquée aux différents véhicules. Ainsi, la CLHP/UV a été retenue au laboratoire pour contrôler la teneur des 3 PA des préparations finies et pour doser les PA lors des études de diffusion sur cellule de Franz. Une détection en spectrométrie de masse a toutefois été requise pour doser l'aprépitant lors des études de perméation.

Un protocole de formulation a ensuite été défini afin de formuler 2,5 mL de formes transdermiques contenant les trois antiémétiques seuls ou en mélange dans chacun des cinq véhicules. La Dex, l'Apt et l'Ond ont été introduits dans les véhicules respectivement aux concentrations de 1,2%, 1,6% et 1,6% après mise en suspension dans l'éthanol, dont la teneur finale a été fixée à 15% (m/m). Le protocole de formulation simple et rapide est toutefois plus chronophage avec le PLO[®] qui nécessite une étape supplémentaire et un refroidissement préalable du Pluronic[®] F127. La validité du protocole de formulation a ensuite été appréciée par un dosage et un contrôle d'homogénéité des formes préparées, dont les teneurs en PA exprimées en recouvrement étaient toutes comprises entre 90 et 110%. De plus, une observation microscopique au grossissement 400 a permis de montrer que l'Ond était plus soluble dans les différents véhicules que les autres PA.

La capacité de chaque véhicule à libérer les antiémétiques et à promouvoir leur perméation cutanée a ensuite été menée sur cellule de Franz. Une étude préalable de la solubilité des PA dans différents milieux (physiologiques ou non), a permis de montrer une solubilité aqueuse de l'ondansétron respectivement 100 à 1000 fois supérieure à celle de la dexaméthasone et de l'aprépitant. Elle a également orienté le choix du milieu receveur. L'étude de libération a été menée pendant 7,5 h, après dépôt de 200 mg de formulation sur une membrane en acétate de cellulose. Le dosage des PA dans un mélange EtOH/H₂O - 50/50 (v/v), utilisé comme milieu receveur, a permis de construire les profils de libération des 3 PA. Il a été montré que la libération des PA dans l'ensemble des véhicules pouvait être décrite par un modèle de Korsmeyer-Peppas. A l'exception de l'Ond formulé dans le Pentravan[®], le mécanisme de transport des PA est non Fickien. On peut noter que l'Apt et la Dex ont des comportements similaires en fonction des véhicules. Par ailleurs, l'Ond présente des flux et des quantités cumulées supérieures à ceux des autres PA et ce pour l'ensemble

des véhicules. Cette étude a permis de démontrer la supériorité du PLO® et du Pentravan® Plus pour libérer les 3 PA.

Toutefois, ces données ne présagent en rien des performances de ces véhicules sur la membrane biologique non inerte qu'est la peau. Ainsi, les profils de perméation ont été établis sur des épidermes de peau d'oreilles de cochon obtenus par méthode thermique et dont l'intégrité a été évaluée par mesure d'impédance électrique avec un seuil de rejet fixé à $5,5 \text{ k}\Omega \cdot \text{cm}^{-2}$. L'évaluation des quantités cumulées dans un milieu physiologique (SBF + 0,5% HP- β -CD), ayant servi de milieu receveur, a permis le tracé des profils cinétiques de perméation. La supériorité du Phytobase® et du Pentravan® Plus pour la perméation de l'Ond et de la Dex, respectivement, a été démontrée par les valeurs de K_p et celles des quantités cumulées à 40 h. Concernant l'aprépitant, compte tenu de sa faible perméation, les essais n'ont pas été répétés et n'ont de ce fait pas été comparés. Il a été exclu de la préparation finale.

Bien que le passage transdermique de l'ondansétron soit trois fois plus faible dans le Pentravan® Plus que dans le Phytobase®, ce véhicule a été sélectionné pour formuler simultanément la dexaméthasone et l'ondansétron, car il est plus adapté pour la dexaméthasone qui passe moins bien à travers la peau. L'Ond et la Dex ont donc été formulés, en mélange, dans le Pentravan® Plus à une teneur respective de 1,6% et 1,2% et en présence de 15% (m/m) d'éthanol, d'isopropanol, d'éthylène glycol, de tween 20 ou de tween 80. La combinaison des deux antiémétiques modifie le profil de perméation sans toutefois impacter substantiellement la quantité cumulée à 24 h. Par ailleurs, les tweens ont montré une supériorité par rapport aux solvants de type alcool, ce qui pourrait être une bonne alternative à l'utilisation de l'éthanol controversée en pédiatrie. Les performances obtenues avec le Pentravan® Plus sont du même ordre de grandeur que celles décrites dans la littérature pour ce même véhicule avec d'autres PA. Toutefois, elles restent en deçà des performances présentées pour ces mêmes PA dans des formulations innovantes en développement.

Aux vues de nos résultats, l'optimisation *in vitro* de la formulation à base de Pentravan® Plus contenant simultanément l'ondansétron et la dexaméthasone doit être menée. Ainsi, de prochaines études s'appuyant sur différentes stratégies pour promouvoir l'absorption par diffusion passive seront abordées. Pour ce faire, l'évaluation de différents promoteurs chimiques désorganisant les lipides du stratum corneum et/ou augmentant la solubilité et le coefficient de partage des PA sera poursuivie. La sursaturation en PA et la formation de paires d'ions avec l'ondansétron sont notamment envisagées. L'utilisation d'un mélange de promoteurs d'absorption impliquant des mécanismes d'action différents et pouvant présenter un effet synergique, serait également une perspective d'optimisation. Dans un premier temps, l'étude de l'influence propre de chacun des promoteurs sur la perméation sera évaluée. Les quantités de PA présentes dans le milieu receveur,

et rémanentes dans le SC, seront déterminées. Une approche multivariée reposant sur l'utilisation d'un plan d'expériences sera ensuite mise en place afin de déterminer la concentration optimale des promoteurs retenus au préalable, ainsi que la concentration des deux PA. Enfin, la formulation optimisée fera l'objet d'une caractérisation approfondie : la taille, la charge, la dispersion, le nombre de bicouches lipidiques des vésicules avant et après formulation ou encore le taux d'encapsulation des antiémétiques dans le système vésiculaire seront étudiés. La stabilité de la forme et son innocuité seront également évaluées avant d'envisager une étude *in vivo*.

Développement de formes transdermiques à usage hospitalier, à partir de véhicules prêts à l'emploi, pour le traitement des nausées et vomissements chimio-induits.

Malgré le nombre important de spécialités pharmaceutiques mises sur le marché, certains patients hospitalisés ne peuvent bénéficier d'un traitement pour lequel aucun dosage et/ou forme pharmaceutique n'est disponible. Dans ce cas, la pharmacotechnie hospitalière peut être autorisée à formuler et contrôler des préparations.

L'objectif de ces travaux a été de développer une forme transdermique semi-solide, à partir de véhicules prêts à l'emploi et contenant trois antiémétiques, pour traiter les nausées et vomissements chimio-induits. Pour ce faire, l'ondansétron, la dexaméthasone et l'aprépitant ont été formulés dans cinq véhicules commerciaux de composition liposomale (PLO[®], Lipovan[®], Pentravan[®] et Pentravan[®] Plus) ou phytosomale (Phytobase[®]). Après avoir protocolisé la formulation, un contrôle qualité a été réalisé sur chaque préparation finie. Il a essentiellement porté sur l'évaluation de la teneur en principes actifs dans les formulations et sur leur homogénéité. Dans ce but une méthode séparative utilisant la CLHP/UV et une méthode basée sur l'UV/PLS ont été développées et validées selon les recommandations de la Société Française des Sciences Techniques et Pharmaceutiques pour doser simultanément les trois antiémétiques.

Deux études *in vitro* ont ensuite été mises en œuvre sur des cellules de Franz. La première, menée à l'aide de membranes d'acétate de cellulose, a montré que le PLO[®] et le Pentravan[®] Plus sont les véhicules les plus performants pour libérer les trois principes actifs (PA) formulés séparément. La seconde visait à évaluer la perméation des mêmes PA à travers des épidermes de peau d'oreilles de cochon. Elle a mis en évidence les performances du Pentravan[®] Plus comme véhicule pour l'administration simultanée de l'ondansétron et de la dexaméthasone par voie transdermique. La perméation de l'aprépitant étant trop faible pour envisager son administration par voie transdermique, il n'a pas été intégré à la formulation finale. Différents promoteurs d'absorption ont été évalués afin d'améliorer le passage transcutané : le tween 20 s'est révélé tout aussi performant que l'éthanol classiquement utilisé pour l'incorporation des PA dans ces véhicules.

Mots-clés : CLHP/UV, UV/PLS, antiémétique, ondansétron, dexaméthasone, aprepitant, transdermique, *in vitro*, cellule de Franz, libération, perméation, peau d'oreille de cochon.

Development of transdermal formulation for hospital use, from ready for use vehicles, for the treatment of chemotherapy-induced nausea and vomiting.

Despite the high number of formulations available for a drug on the pharmaceutical market, it can arise that a patient needs a treatment for which none pharmaceutical form or dosage is available. In this case, pharmacy department of the hospital may have to prepare this form, in accordance with health agency.

The goal of this work was to develop a semi-solid transdermic formulation from ready for use vehicle and containing three antiemetic drugs for the treatment of chemotherapy induced nausea and vomiting. Hence, ondansetron, dexamethasone and aprepitant have been formulated in five commercial vehicles of liposomal (PLO[®], Lipovan[®], Pentravan[®] and Pentravan[®] Plus) or phytosomal (Phytobase[®]) composition. After development of a formulation protocol, quality control was carried out on every finished preparations. It focused on the evaluation of the content of active ingredients in formulations and their homogeneity. For this purpose a separation method using HPLC/UV and a method based on UV/PLS have been developed and validated according to the recommendations of the French Society of Pharmaceutical Science and Technology to assay the three antiemetics simultaneously.

Two *in vitro* studies were then implemented on a Franz cell. The first, using cellulose acetate membranes, has shown that the PLO[®] and the Pentravan[®] Plus are the most efficient vehicles to release the three drugs formulated separately. The second one was performed to assess the permeation of the same drug through pig ears skin epidermis. It highlighted the performances of Pentravan[®] Plus as a vehicle for the simultaneous transdermal administration of ondansetron and dexamethasone. Nevertheless, as permeation of aprepitant is too poor to consider its transdermal administration, it has not been included in the final formulation. Different chemical enhancers were evaluated to improve the transcutaneous permeation: tween 20 appeared to be as powerful as ethanol conventionally used for the incorporation of drugs in these vehicles.

Keywords: HPLC/UV, UV/PLS, antiemetic, ondansetron, dexamethasone, aprepitant, transdermic, *in vitro*, Franz cell, release, permeation, pig ear skin.