PolyPublie
Polytechnique Montréal

POLYTECHNIQUE MONTRÉAL
UNIVERSITÉ D'INGÉNIERIE

Titre: Title:	Micro/nanonisation du naproxène et du dipropionate de béclométhasone en milieu aqueux par fragmentation laser femtoseconde
Auteur: Author:	Weimeng Ding
Date:	2011
Type:	Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis
Référence: Citation:	Ding, W. (2011). Micro/nanonisation du naproxène et du dipropionate de béclométhasone en milieu aqueux par fragmentation laser femtoseconde [Mémoire de maîtrise, École Polytechnique de Montréal]. PolyPublie. https://publications.polymtl.ca/652/

Document en libre accès dans PolyPublie
Open Access document in PolyPublie

URL de PolyPublie: PolyPublie URL:	https://publications.polymtl.ca/652/
Directeurs de recherche: Advisors:	Michel Meunier, & Grégoire Leclair
Programme: Program:	Génie biomédical

Ce fichier a été téléchargé à partir de PolyPublie, le dépôt institutionnel de Polytechnique Montréal
This file has been downloaded from PolyPublie, the institutional repository of Polytechnique Montréal

https://publications.polymtl.ca

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

MICRO/NANONISATION DU NAPROXÈNE ET DU DIPROPIONATE DE BÉCLOMÉTHASONE EN MILIEU AQUEUX PAR FRAGMENTATION LASER FEMTOSECONDE

WEIMENG DING
INSTITUT DE GÉNIE BIOMÉDICAL
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

MÉMOIRE PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLÔME DE MAÎTRISE ÈS SCIENCES APPLIQUÉES
(GÉNIE BIOMÉDICAL)
AOÛT 2011

© Weimeng Ding, 2011.

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Ce mémoire intitulé :

MICRO/NANONISATION DU NAPROXÈNE ET DU DIPROPIONATE DE BÉCLOMÉTHASONE EN MILIEU AQUEUX PAR FRAGMENTATION LASER FEMTOSECONDE

présenté par : DING Weimeng
en vue de l'obtention du diplôme de : Maîtrise ès sciences appliquées
a été dûment accepté par le jury d'examen constitué de :

M. DE CRESCENZO Grégory, Ph.D., président
M. MEUNIER Michel, Ph.D., membre et directeur de recherche
M. LECLAIR Grégoire, Ph.D., membre et codirecteur de recherche
Mme LEBLOND-CHAIN Jeanne, Ph.D., membre

REMERCIEMENTS

Je remercie avant tout mon directeur de recherche, le professeur Michel Meunier, pour m'avoir offert l'opportunité de travailler au sein de son équipe dans un environnement valorisant. Pendant cette première expérience de chercheure, j'ai appris de lui l'art de voir la recherche, de la comprendre, de la faire avancer et de la partager. Je remercie mon codirecteur de recherche, le professeur Grégoire Leclair de la faculté de pharmacie de l'Université de Montréal, où j'ai effectué une grande partie de mes travaux. Sa guidance, ses conseils, son attention et ses aides, que j'apprécie énormément, ont été des éléments cruciaux pour mon projet de recherche. Je tiens à remercier tout particulièrement Jean-Philippe Sylvestre, associé de recherche dans notre équipe jusqu'à l'été 2011. Il m'a transmis ses connaissances et son savoir-faire, m'a accordé son temps et sa patience et m'a offert un encadrement rigoureux et de l'aide continuelle. Sans lui, nul doute que j'aurais rencontré beaucoup plus de difficultés.

Merci à tous mes collègues de laboratoire avec qui j'ai partagé les équipements. Merci aux professeurs et personnes avec qui j'ai suivi des cours ou des formations. Enfin, je remercie particulièrement Mme Jeanne Leblond Chain, professeure adjointe de la faculté de pharmacie de l'Université de Montréal, et M. Gregory De Crescenzo, professeur agrégé du département de génie chimique de l'École Polytechnique de Montréal, pour avoir généreusement accepté d'être membre et président du jury de mon diplôme de maîtrise. Un gros merci à mes parents et à Éric, pour leur compagnie et leur soutien dans ma vie.

Bilan personnel

J'ai beaucoup apprécié cette expérience qui m'a initiée à la recherche. J'ai acquis des connaissances dans le domaine pharmaceutique et dans les méthodes courantes de caractérisation physico-chimique. J'ai également développé mes habitudes dans la pratique au laboratoire : utilisation de l'équipement, la conception des expériences, la collecte de données ainsi que la relation avec les collègues de laboratoire. En plus, j'ai appris la communication scientifique et la conduite d'un projet de recherche. Je suis confiante que cette expérience m'a préparée pour les études doctorales, et m'aidera à développer la maturité nécessaire dans la recherche et à devenir une chercheuse compétente.

RÉSUMÉ

Réduire la taille des particules est une approche simple pouvant être utilisée afin d'améliorer la biodisponibilité, surtout pour les médicaments administrés par inhalation et par voie orale. Cependant, les techniques existantes de micro/nanonisation ne sont pas adaptées à la phase de découverte, où la quantité d'actif disponible est restreinte. Nous proposons une nouvelle approche, la fragmentation laser, pour micro/nanoniser les médicaments en faible quantité disponible. Notre hypothèse est que le procédé laser peut produire des micro/nanocristaux de deux médicaments modèles, le dipropionate de béclométhasone (médicament pulmonaire) et le naproxène (médicament oral), avec des transformations physico-chimiques minimes.

La fragmentation laser consiste à focaliser une radiation laser dans une suspension de médicament agitée magnétiquement. Un laser femtoseconde a été utilisé. La taille des particules a été caractérisée par la diffusion de lumière et par la microscopie électronique à balayage. La dégradation a été évaluée par la chromatographie liquide à haute performance. Les propriétés physico-chimiques des micro/nanocristaux lyophilisés ont été évaluées par la spectrométrie infrarouge, la diffraction de rayons X, l'analyse élémentaire et la calorimétrie différentielle. La cinétique de dissolution *in vitro* des nanoparticules a aussi été étudiée.

Des nanocristaux de naproxène et des microcristaux de dipropionate de béclométhasone (DPB) ont été produits par fragmentation laser avec succès. Des particules de tailles différentes variant de 500 nm à quelques microns peuvent être produites en modifiant les paramètres de fabrication. La nanonisation a été accompagnée d'une dégradation chimique $2 \sim 3$ fois plus élevée que la micronisation. Après le traitement laser, la composition chimique est majoritairement conservée ($65\% \sim 100\%$), et le changement est dû à une oxydation possible lors de l'interaction laser-matière dans l'eau. La phase cristalline a été conservée, mais une forme amorphe peut apparaître (possiblement à la surface des particules). La vitesse de dissolution *in vitro* du naproxène nanonisé par laser est améliorée de 10 fois et plus.

La fragmentation par laser femtoseconde permet de micronniser des médicaments en petite quantité avec une dégradation et des transformations physico-chimiques limitées. La nanonisation par laser, bien que possible, induit plus de dégradation et de transformations physico-chimiques. La fragmentation laser est donc une technique adaptée pour la micronisation (et dans certains cas la nanonisation) de médicament pendant la phase de découverte, et est particulièrement intéressante pour les médicaments pulmonaires peu solubles dans l'eau.

ABSTRACT

Reducing the particle size of drugs is a simple approach that may be used to improve their bioavailability, especially for compounds delivered by inhalation and orally. However, current micro/nanonization techniques are not well adapted to the drug discovery stage, where the availability of the actives is scarce. We propose a novel approach, laser fragmentation, to perform micro/nanonization of drugs using small quantities. Our hypothesis is that the laser process can produce micro/nanocrystals of two drug models, beclomethasone dipropionate (BDP) (pulmonary drug) and naproxen (oral drug), with minimal physico-chemical transformations.

Laser fragmentation consists in focusing a laser radiation into a magnetically agitated drug suspension. In this study, a femtosecond laser was used. The drugs particle size was characterized by dynamic light scattering and scanning electron microscopy. The degradation was evaluated by high performance liquid chromatography. The physicochemical properties of the lyophilized micro/nanocrystals were evaluated by Fourier transform infrared spectroscopy, x-ray diffraction, elemental analysis and differential scanning calorimetry. The *in vitro* dissolution kinetics of nanoparticles was also studied.

Nanocrystals of naproxen and microcrystals of BDP were successfully produced by laser fragmentation. Particles of different sizes (from 500 nm to several micrometers) could be obtained by adjusting the process parameters. Nanonization was accompanied by $2 \sim 3$ times more chemical degradation than micronization. After the laser process, the chemical composition was mainly conserved ($65\% \sim 100\%$), and the change may be attributed to a moderate oxidation occured during laser-drug interaction in water. Drug crystallinity was maintained, but an amorphous form may appear (possibly on the particle surface). The *in vitro* dissolution rate of laser-nanonized naproxen showed considerable improvements (at least 10 times faster) compared to the untreated drug powder.

Laser fragmentation enables the micronization of small quantities of drugs with limited degradation and polymorphic transformation. The nanonization presents more degradation and physico-chemical transformations. The process therefore represents a suitable micronization (and in some cases nanonization) technique for the drug discovery phase, and is of particular interest for poorly water-soluble pulmonary drugs.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS iii

RÉSUMÉ iv

ABSTRACT v

TABLE DES MATIÈRES vi

LISTE DES TABLEAUX ix

LISTE DES FIGURES x

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS xii

INTRODUCTION 1

CHAPITRE 1 REVUE DE LITTÉRATURE 4
1.1 Administration des médicaments et concepts pharmaceutiques de base 4
1.1.1 Les voies d'administration d'un médicament 5
1.1.2 Les propriétés physico-chimiques du médicament 7
1.1.3 Système de classification biopharmaceutique 11
1.2 Problématiques de la biodisponibilité dans le développement pharmaceutique . 12
1.2.1 Aperçu du développement des médicaments 12
1.2.2 La biodisponibilité peut être améliorée à l'aide des méthodes physiques ou chimiques 14
1.3 Techniques de réduction de taille 23
1.3.1 Précipitation 23
1.3.2 Homogénisation 24
1.3.3 Broyage mécanique 24
1.4 Nouvelle approche de micro/nanonisation par laser 25
1.4.1 Production de micro/nanoparticules inorganiques par laser 26
1.4.2 Production de micro/nanoparticules organiques par laser 28
1.4.3 Micro/nanonisation de médicament par laser 28
1.5 Médicaments choisis dans le cadre du projet de maîtrise 31
1.5.1 Naproxène 31

1.5.2 Dipropionate de béclométhasone 32
1.6 Techniques d'analyse et leurs concepts 34
1.6.1 Diffusion de la lumière (Dynamic Light Scattering (DLS)) 34
1.6.2 Diffraction par laser (Laser Diffraction (LD)) 35
1.6.3 Microscopie électronique à balayage (Scanning Electronic Microscopy (SEM)) 36
1.6.4 Chromatographie liquide à haute performance (High Performance Liquid Chromatography (HPLC)) 37
1.6.5 Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (Fourier Transform InfraRed spectrometry (FTIR)) 38
1.6.6 Analyse élémentaire (Elemental Analysis (EA)) 39
1.6.7 Calorimétrie différentielle (Differential Scanning Calirometry (DSC)) . 40
1.6.8 Diffraction par Rayon X (X-Ray Diffraction (XRD)) 41
1.6.9 Analyse *in vitro* de la cinétique de dissolution 42
1.7 Proposition de recherche 43

CHAPITRE 2 MÉTHODOLOGIE EXPÉRIMENTALE 44
2.1 Matériel utilisé 45
2.2 Fabrication de micro/nanosuspension à différentes conditions 45
2.3 Systèmes d'analyse et de caractérisations physico-chimiques 47
2.4 Bilan de masse 49
2.5 Broyage mécanique 49
2.6 Test de dissolution 50

CHAPITRE 3 NANONISATION PAR FRAGMENTATION LASER DU NAPROXÈNE 51
3.1 Criblage : taille et pureté chromatographique 51
3.1.1 Effets du laser : l'augmentation de l'énergie émise entraîne la diminution de taille et de pureté des particules 51
3.1.2 Effet du milieu aqueux : l'ajout d'un surfactif apporte peu d'amélioration 53
3.1.3 La direction du faisceau laser incident (verticale ou latérale) a peu d'effet 53
3.2 Vérification de la taille des particules 55
3.2.1 Les analyses par LD montrent que la taille est réduite à l'échelle micro/nanométrique 55
3.2.2 Les micrographes confirment que la taille ciblée est atteinte 56
3.3 Le test en teneur indique que la dégradation pourrait être plus élevée 57
3.4 Propriétés physico-chimiques 58

3.4.1 L'analyse par FTIR suggère qu'une oxydation peut avoir eu lieu lors de la fragmentation . . . 58
3.4.2 Confirmation de l'oxydation induite lors du procédé laser par EA . . . 59
3.4.3 L'analyse par rayons X indique la conservation de la phase cristalline . 60
3.4.4 L'analyse par calorimétrie suggère une amorphisation partielle possible 61
3.5 Comparaison avec le broyage mécanique . . . 61
3.6 Test *in vitro* de la cinétique de dissolution . . . 63
3.7 Conclusion : nanonisation par laser femtoseconde . . . 64

CHAPITRE 4 MICRONISATION PAR FRAGMENTATION LASER DU DIPROPIONATE DE BÉCLOMÉTHASONE . . . 66
4.1 Criblage : taille et pureté chromatographique . . . 66
4.2 Taille des particules par LD et SEM . . . 67
4.3 Test en teneur par bilan de masse . . . 71
4.4 Propriétés physico-chimiques . . . 71
4.4.1 Analyse par spectrométrie infrarouge . . . 71
4.4.2 Analyse élémentaire . . . 73
4.4.3 Analyse par calorimétrie . . . 73
4.4.4 Analyse par rayons X . . . 74
4.5 Conclusion : micronisation par laser femtoseconde . . . 77

CHAPITRE 5 DISCUSSION : AVANTAGES ET INCONVENIENTS DE LA FRAGMENTATION LASER . . . 78
5.1 Caractéristiques recherchées et comparaison avec des techniques conventionnelles 78
5.1.1 Contrôle de taille . . . 78
5.1.2 Application universelle . . . 78
5.1.3 Conservation de l'intégrité du médicament . . . 79
5.1.4 Simplicité et coûts de production . . . 80
5.1.5 La fragmentation laser est adaptée pour la découverte de médicaments 80
5.1.6 Résumé des avantages et des inconvénients de la fragmentation laser . . 81
5.2 Phénomène physique : réduction de taille et la pureté du médicament . . . 82

CONCLUSION . . . 83

RÉFÉRENCES . . . 85

ANNEXE . . . 92

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1 Comparaison des techniques conventionnelles de micro/nanonisation avec la fragmentation laser 30
Tableau 3.1 Taille et pourcentage d'impureté chromatographique du naproxène fragmenté dans l'eau pure 52
Tableau 3.2 Taille et pourcentage d'impureté chromatographique du naproxène fragmenté dans l'eau, à grande quantité 52
Tableau 3.3 Taille et pourcentage d'impureté chromatographique du naproxène fragmenté dans une solution de poloxamer. 54
Tableau 3.4 Taille et pourcentage d'impureté chromatographique du naproxène fragmenté par le montage latéral 54
Tableau 3.5 Teneur mesurée par bilan de masse 58
Tableau 3.6 Composition chimique du naproxène par EA 60
Tableau 3.7 Caractéristiques thermales du naproxène par DSC 61
Tableau 3.8 Taille et pureté du naproxène broyé après 48 h à 200 rpm 62
Tableau 4.1 Taille et pourcentage d'impureté chromatographique du DPB fragmenté dans l'eau pure 67
Tableau 4.2 Teneur du DPB mesurée par bilan de masse 71
Tableau 4.3 Composition chimique du DPB par EA 73
Tableau 4.4 Caractéristiques thermales du DPB par DSC 73
Tableau 5.1 Évaluation de la fragmentation laser en comparaison des techniques conventionnelles de micro/nanonisation 81

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 Système de classification biopharmaceutique 11
Figure 1.2 Les phases de R&D d'un médicament 13
Figure 1.3 Le fonctionnement d'un promédicament 17
Figure 1.4 Micelle, liposome et dendrimère 20
Figure 1.5 Schéma comparatif de l'absorption des grandes particules et des nanoparticules de médicament 21
Figure 1.6 La structure pulmonaire et les exigences sur la taille des particules de médicament 22
Figure 1.7 Schéma simplifié de PLD 27
Figure 1.8 Ablation et fragmentation par PLA en milieu liquide 27
Figure 1.9 Structure moléculaire et spectre d'absorption du naproxène 32
Figure 1.10 Structure moléculaire et spectre d'absorption du DPB 33
Figure 1.11 Fonctionnement simplifié du DLS 35
Figure 1.12 Fonctionnement simplifié du LD 36
Figure 1.13 Principe de fonctionnement du HPLC 38
Figure 1.14 Principe de fonctionnement du FTIR 39
Figure 1.15 Principe de fonctionnement du EA 39
Figure 1.16 Principe de fonctionnement du DSC 40
Figure 1.17 Principe de fonctionnement du XRD 41
Figure 1.18 Principe de fonctionnement du test de cinétique de dissolution 42
Figure 2.1 Résumé de la méthodologie de recherche 45
Figure 2.2 Montage du système : fragmentation verticale et latérale 46
Figure 2.3 Les différentes combinaisons de paramètres étudiés 47
Figure 2.4 Montage simplifié du broyage humide à billes utilisé comme référence . 50
Figure 3.1 Distribution de taille des particules de naproxène par LD 55
Figure 3.2 Électromicrographes du naproxène 57
Figure 3.3 Analyse par FTIR du naproxène 59
Figure 3.4 Analyses par XRD 60
Figure 3.5 Nanoparticules produites par broyage mécanique dans une solution de poloxamer 188. 62
Figure 3.6 La cinétique de dissolution des nanosuspensions. 63
Figure 4.1 Distribution de taille du DPB après fragmentation laser sous diverses conditions 68

Figure 4.2 Électromicrographes du DPB 69
Figure 4.3 Électromicrographes du DPB (suite) 70
Figure 4.4 Analyse par FTIR du DPB 72
Figure 4.5 Analyse par XRD du DPB 75
Figure 4.6 Comparaison de la structure cristalline du DPB fragmenté par laser et broyé à billes 76
Figure 5.1 Relation entre l'impureté et la taille de particule des médicaments fragmentés par laser femtoseconde 82
Figure A.1 Référence : spectrogramme FTIR du DPB monohydrate 92
Figure A.2 Référence : diffractogramme XRD du DPB brut, anhydrate et monohydrate 93

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

BCS	Biopharmaceutical Classification System
DLS	Dynamic Light Scattering
DPB	dipropionate de béclométhasone
DSC	Differential Scanning Calirometry
EA	Elemental Analysis
FDA	Food & Drug Administration
FE	Field Emission
FTIR	Fourier Transform InfraRed spectrometry
HPC	hydroxypropyl cellulose
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
LD	Laser Diffraction
LP2L	Laboratoire de Plasmonique et des Procédés par Laser
NCE	New Chemical Entity
PDI	polydispersity index
PLA	Pulsed Laser Ablation
PLD	Pulsed Laser Deposition
R&D	recherche et développement
SEM	Scanning Electronic Microscopy
XRD	X-Ray Diffraction

INTRODUCTION

Ce mémoire présente le résultat du travail effectué dans le cadre du programme de maîtrise de recherche en génie biomédical à l'École Polytechnique de Montréal pendant la période de 2009 à 2011. Le projet de recherche a été conduit au sein du Laboratoire de Plasmonique et des Procédés par Laser (LP2L) de l'École Polytechnique de Montréal, en collaboration avec la faculté de pharmacie de l'Université de Montréal. Le projet a été financé par la Chaire de Recherche du Canada (en Micro/nano-ingénierie des matéraux par laser), le Conseil de Recherches en Sciences Naturelles et en Génie du Canada (CRSNG), les Instituts de Recherche en Santé du Canada (IRSC) et les Fonds Québécois de Recherche sur la Nature et les Technologies du Québec (FQRNT). L'objectif de cette recherche est de développer une nouvelle technique de broyage par laser ayant des applications possibles en recherche et développement (R&D) de l'industrie pharmaceutique.

Ce projet vise à évaluer la faisabilité et la performance de la technique de fragmentation laser pour réduire la taille des particules des médicaments peu solubles dans l'eau. Cette technique a été appliquée depuis plus d'une décennie dans la production des nanoparticules inorganiques. Possédant cette expertise, le laboratoire LP2L est spécialiste et pionnier dans la fabrication des nanoparticules de métaux et de semi-conducteurs. Parallèlement, dans la R&D pharmaceutique, une tendance lourde s'est installée au cours des deux dernières décennies : les nouveaux médicaments développés sont de moins en moins solubles dans l'eau. Comme les médicaments doivent se dissoudre avant d'être absorbés par le corps humain, cette faible solubilité des nouveaux médicaments entraîne souvent un problème de *biodisponibilité* [1]. Pour améliorer l'efficacité d'absorption (la biodisponibilité) des médicaments peu solubles dans l'eau, une solution simple et efficace consiste à réduire la taille des particules du médicament, visant ainsi à améliorer leur cinétique de dissolution. Une pratique courante est la *micronisation*, qui réduit la taille des particules à quelques micromètres selon l'usage du médicament (2), (3). Pour les médicaments pulmonaires, la taille idéale de particule se situe entre 0,5 et 5 μm, ce qui maximise le dépôt et ainsi la dissolution des particules dans le poumon (4). Pour certains autres médicaments (ex. par voie orale et parentérale), les expériences ont démontré que la cinétique de dissolution se trouve améliorée de façon considérable lorsque la taille des particules est réduite à l'échelle de quelques centaines de nanomètres ($<$ 1 μm) (*nanonisation*)(5).

1. Un terme relatif à la fraction de médicament absorbée dans la circulation sanguine par rapport à la quantité totale administrée (1)

Quelques méthodes de micro/nanonisation, telles que la précipitation, le broyage mécanique et l'homogénisation, sont couramment utilisées. Cependant, ces techniques existantes sont surtout appliquées à la production de médicament à grande échelle (de quelques grammes à des kilogrammes), et aucune parmi elles n'est adaptée pour la phase de découverte de médicament, où l'actif n'est disponible qu'à l'échelle de quelques milligrammes. Avec les avancées en R&D pharmaceutique, une nouvelle technique de micro/nanonisation adaptée à la phase de découverte devient de plus en plus nécessaire.

C'est dans ce contexte que les chercheurs de la faculté de pharmacie de l'Université de Montréal, Prof. Jean-Christophe Leroux et Prof. Grégoire Leclair [2] se sont intéressés à la fabrication de nanoparticules par laser, qui pourrait être appliquée dans la micro/nanonisation des médicaments peu solubles pour la phase de découverte. Avec le directeur du laboratoire LP2L, Prof. Michel Meunier de l'École Polytechnique de Montréal, un projet sans précédent visant à appliquer la technique laser dans la fabrication de micro/nanoparticules de médicament a été établi.

Le présent projet de recherche consiste à étudier deux médicaments [3] (le naproxène et le dipropionate de béclométhasone) en utilisant cette technique laser. Ce mémoire présentera le contexte de la recherche, les méthodes utilisées ainsi que les résultats expérimentaux au cours des prochains chapitres :

Le chapitre 1 donne au lecteur les connaissances nécessaires pour comprendre le projet global. Les concepts de base en pharmacie, les enjeux de la R&D pharmaceutique, ainsi que les solutions existantes sont d'abord expliqués, suivis par une description des avancées de la technique laser. Les deux médicaments de mon projet de maîtrise ainsi que les méthodes de caractérisation courantes sont ensuite présentés. Le chapitre se termine par la description des hypothèses et des objectifs de recherche.

Le chapitre 2 décrit la méthodologie employée lors des expériences. Le matériel et les paramètres utilisés y sont également précisés.

2. Prof. Leroux était professeur titulaire de l'Université de Montréal et est maintenant professeur à ETH Zürich depuis septembre 2008. Prof. Leclair est professeur adjoint à l'Université de Montréal depuis 2008 et a participé à cette collaboration interuniversitaire depuis l'été 2009.

3. Trois autres médicaments ont été étudié par mes collègues, Jean-Philippe Sylvestre et Sukhy Kenth. Emmanuelle Bouvier, Laurent Doré-Mathieu et Kathrin Fuhrmann ont également participé au projet en tant que stagiaires.

Les chapitres 3 et 4 présentent les résultats obtenus après les études sur les deux médicaments, le naproxène et le DPB respectivement. Comme les méthodes de caractérisation sont les mêmes pour les deux médicaments, les données obtenues présentent souvent des similarités. Ainsi, certaines descriptions ou commentaires des figures ou des tableaux dans le chapitre 4 sont abrégés pour ne pas alourdir le texte, si des figures ou tableaux similaires ont été préalablement discutés dans le chapitre 3.

Enfin, le chapitre 5 présente les avantages et les inconvénients de cette nouvelle technique proposée, et permet de tirer des conlusions sur la fragmentation par laser des médicaments.

CHAPITRE 1

REVUE DE LITTÉRATURE

L'objectif de ce chapitre est de présenter les notions pharmaceutiques de base et de clarifier le contexte dans lequel les travaux ont été effectués. La première section est dédiée à une description globale de l'administration de médicaments. La deuxième section décrit les problématiques de l'industrie pharmaceutique, en particulier au niveau du développement de nouveaux médicaments. Dans la troisième section, des techniques courantes de réduction de taille sont présentées, suivies dans la quatrième section par une présentation de l'utilisation de la technique laser dans différents domaines de micro/nanonisation. La cinquième section donne un aperçu des profils des médicaments modèles choisis : le naproxène et le DPB. La sixième section énumère des méthodes de caractérisation courantes de médicament sous forme solide. Enfin, le chapitre se termine par la formulation de l'hypothèse et des objectifs de recherche du projet. fe

1.1 Administration des médicaments et concepts pharmaceutiques de base

Un médicament est généralement composé de plusieurs ingrédients. Parmi ceux-ci, le *principe actif* est la substance chimique ayant les propriétés thérapeutiques recherchées. Les ingrédients auxiliaires, qu'on appelle *excipients*, ont quant à eux des rôles variés, par exemple : protéger le principe actif dans le liquide gastrique acide, servir comme matrice de soutien qui libère progressivement le principe actif, ou encore déclencher une activité de défense immunitaire du corps pour mieux réagir avec le principe actif. La façon de préparer le médicament en mélangeant le principe actif et les différents excipients – la « recette » – est appelée la *formulation*.

Un médicament est un « système de livraison » qui permet d'administrer le principe actif dans le corps de manière sécuritaire, efficace, reproductible et commode. L'objectif de l'administration du médicament est d'atteindre la réponse thérapeutique souhaitée par le biais d'une formulation, qui peut être fabriquée à grande échelle avec une qualité reproductible. Afin de parvenir à cet objectif, trois catégories de facteurs sont à prendre en compte (1) :

- Les considérations biopharmaceutiques, telles que les facteurs qui influencent l'absorption du principe actif selon différentes voies d'administration (cf. section 1.1.1, p. 5) ;
- Les facteurs concernant le médicament, tels que les propriétés physiques et chimiques

des substances (cf. section 1.1.2, p. 7) ;
– Les considérations cliniques, telles que l'usage du médicament dans le traitement clinique et le profil physiologique du patient.

Dans le présent projet de recherche, les facteurs des deux premières catégories sont au cœur de nos préoccupations, et seront plus approfondis dans les prochaines sections. La troisième catégorie concerne la pratique clinique et ne sera pas traitée plus en détail dans le cadre de cette recherche.

1.1.1 Les voies d'administration d'un médicament

La manière dont les médicaments sont livrés et absorbés diffère d'un médicament à un autre, et varie considérablement selon la voie d'administration. Un médicament peut être livré de façon *systémique* ou *locale*. Dans le premier cas, le principe actif (ou ses métabolites [1]) est transporté dans le corps entier par la circulation sanguine. Un avantage de la livraison systémique est que le principe actif peut interagir avec pratiquement tous les organes du corps, surtout les moins accessibles tels que le cœur et le cerveau, mais l'inconvénient est que des effets secondaires peuvent survenir lors des interactions non-souhaitées avec d'autres tissus ou organes qui ne sont pas ciblés. En revanche, la livraison locale, qui concerne surtout les parties du corps accessibles telles que la peau et les yeux, permet de livrer des médicaments en faible quantité mais avec un meilleur ciblage. La livraison systémique ou locale peut être réalisée principalement par cinq voies courantes d'administration.

1.1.1.1 Voie orale

La voie orale est la voie d'administration de médicaments la plus fréquemment utilisée. Les médicaments se présentent généralement sous diverses formes solides ou liquides : comprimés, capsules, suspensions, solutions et émulsions [2]. Les médicaments administrés par cette voie ont souvent des effets thérapeutiques systémiques, et sont absorbés majoritairement par l'épithélium et le mucus du système gastro-intestinal. Comparativement aux autres voies, la voie orale est la voie d'administration la plus simple, la plus sécuritaire et la plus commode, mais présente elle aussi des inconvénients. Par exemple, la prise d'effet du principe actif relativement lente, la possibilité d'absorption irrégulière, la destruction du principe actif par des

1. Après administration, le médicament subit des transformations métaboliques au niveau du foie ou des reins, telles que la dégradation ou la conjugaison chimique. Dans certains cas, ce sont les substances produites lors du processus de métabolisation par le foie ou les reins, appelées *métabolites*, qui ont des effets thérapeutiques recherchés.

2. Émulsion : cf. section 1.2.2.6, p. 18

enzymes et des sécrétions gastriques et l'effet du premier passage [3].

La solubilisation (cf. section 1.1.2.1, p. 8) du médicament dans les fluides gastro-intestinaux aqueux au site d'absorption est pré-requise pour l'absorption du principe actif. Plusieurs facteurs peuvent affecter l'absorption d'un médicament solubilisé ou le faire précipiter :

- Le principe actif peut réagir avec d'autres matières présentes dans le système digestif [4] ;
- Le temps de vidange gastrique [5] peut influencer l'efficacité d'absorption par l'intestin, où la surface d'absorption est extrêmement grande ($\sim$ 200 m^2 chez un adulte) ;
- Le pH environnemental variant de 1 (à l'estomac) à 8 (au grand intestin) peut influencer la solubilisation. Ainsi, pour chaque médicament, il existe une « fenêtre d'absorption» optimale. En dehors de cette fenêtre, l'absorption est inefficace. Toutefois, la membrane biologique est plus *perméable* aux formes non-ionisées — un équilibre entre la solubilité et la perméabilité est donc nécessaire pour une meilleure absorption (cf. section 1.1.2.3, p. 9).

1.1.1.2 Voie parentérale

Cette voie consiste à injecter le médicament via une aiguille au travers d'une barrière anatomique. Elle comprend principalement trois types d'administration : intraveineuse, intramusculaire et sous-cutanée. La voie parentérale est utilisée généralement quand le patient n'est pas capable de prendre des médicaments par voie orale, ou en cas d'urgence pour une absorption rapide. Le médicament se présente généralement sous forme de solution (dans le cas intraveineux), pour entrer dans la circulation sanguine, ou de suspension (dans le cas intramusculaire), pour créer un « réservoir » [6], permettant une libération graduelle.

1.1.1.3 Voie respiratoire

Le poumon présente une excellente surface pour l'absorption de médicaments sous forme gazeuse, d'aérosol ou de particules solides ultrafines. La taille des particules est importante pour l'absorption pulmonaire (cf. section 1.2.2.11, p. 22). Cette voie d'administration est particulièrement utile pour le traitement local des maladies pulmonaires telles que l'asthme, les infections chroniques pulmonaires ou le cancer du poumon. Les avantages de cette voie d'administration sont la réduction des effets secondaires systémiques et la possibilité de dé-

3. Le médicament absorbé dans le tube digestif passe par le foie où il est métabolisé avant d'atteindre la circulation générale.

4. Par exemple, la formation des complexes insolubles avec le calcium dans la nourriture.

5. Durant la digestion, l'estomac vide son contenu périodiquement dans le petit intestin. Plus le temps de vidange est long, plus le médicament risque des inactivations et moins l'absorption sera efficace.

6. Une suspension du médicament se disperse dans la circulation plus lentement qu'une solution.

poser une dose élevée de médicament au site d'action (6).

Récemment, cette voie d'administration attire de plus en plus l'intérêt pour la livraison systémique et pour servir de porte d'entrée à des peptides ou à des protéines. En effet, la grande surface d'absorption ($\sim$ 100 m^2), la finesse de la membrane ($\sim$ 1-2 μm) et le flux sanguin élevé (5 L/min) rendent le poumon intéressant pour distribuer les molécules dans le corps entier. De plus, la faible activité métabolique du poumon est moins destructive pour le principe actif que lors de l'administration orale (cf. note 1, p. 5). Ainsi, la voie pulmonaire devient une voie populaire qui rend de nombreuses nouvelles thérapies de valeur possibles (7).

1.1.1.4 Voie rectale

Les médicaments administrés par la voie rectale le sont surtout sous forme de solution, de suppositoire et d'émulsion pour des effets locaux et parfois systémiques. Cette voie d'administration est utilisée pour les médicaments sensibles au fluide gastrique, au métabolisme par le foie et les reins, ou quand le patient n'est pas capable de prendre des médicaments par voie orale. Comme l'administration par voie rectale est peu appréciée par le patient, elle est moins développée par rapport les autres voies d'administration, sauf pour certains médicaments destinés aux enfants.

1.1.1.5 Voie cutanée

Cette voie concerne principalement les onguents, les crèmes et les pâtes ayant des fonctions antiseptiques, antifongiques ou anti-inflammatoires, pouvant être appliqués sur la peau, ou dans les yeux, le nez ou les oreilles. Les formulations cutanées doivent présenter un caractère à la fois *hydrophile*[7] et *hydrophobe*[8] en raison de l'anatomie dermale. Ainsi, la forme la plus courante est l'émulsion (cf. section 1.2.2.6, p. 18).

1.1.2 Les propriétés physico-chimiques du médicament

Les propriétés physico-chimiques du médicament influencent considérablement sa reproductibilité, sa sécurité et sa biodisponibilité, et sont les considérations les plus importantes pour la formulation[9]. C'est seulement quand les propriétés physico-chimiques du médicament

7. Hydrophile : polaire, ayant la tendance à dissoudre dans l'eau par formation de liaisons hydrogènes.
8. Hydrophobe : non-polaire, n'est pas ou que très faiblement soluble dans l'eau.
9. Durant la formulation, les excipients seront sélectionnés en fonction des propriétés physico-chimiques du principe actif. Selon l'utilisation de celui-ci, certaines modifications chimiques peuvent également y être apportées.

sont conservées que les effets thérapeutiques sont prédictibles après administration. Parmi toutes les propriétés, les plus importantes seront maintenant décrites.

1.1.2.1 Solubilité et dissolution

Un médicament doit être dissous dans le fluide du site d'absorption avant d'être absorbé(8). Ainsi, tous les médicaments doivent démontrer une moindre solubilité aqueuse pour l'efficacité thérapeutique. La dissolution est souvent l'étape déterminante dans l'absorption des médicaments relativement peu solubles dans l'eau.

La *dissolution* d'un solide dispersé dans un liquide comprend deux étapes (9) :
- La première est la *solvation* : au niveau de l'interface entre les phases solide et liquide, à cause des réactions interfaciales, les molécules du solide se libèrent de sa « matrice » et se dissolvent dans la phase liquide ;
- La seconde est la *dispersion* : ces molécules dissoutes, qui forment une « couche » autour de la particule solide, sont transportées dans le milieu liquide par diffusion ou convection.

L'équation de Noyes-Whitney (10) décrit de façon simplifiée la dissolution d'un médicament :

$$\frac{\mathrm{d}m}{\mathrm{d}t} = kA(C_s - C_t) \tag{1.1}$$

où $\frac{\mathrm{d}m}{\mathrm{d}t}$ est la vitesse de dissolution, k est une constante, A la *surface spécifique*[10] du solide dissous, C_s la concentration du soluté requise pour saturer le médium et C_t la concentration du soluté dans le médium à temps t. Cette équation montre que la vitesse de dissolution augmente quand la surface spécifique s'accroît (donc quand la taille de la particule diminue).

1.1.2.2 Taille des particules

La formule (1.1) montre que la réduction de la taille des particules peut améliorer la cinétique de dissolution. Ceci peut s'expliquer principalement par deux raisons :
- Une augmentation de la surface spécifique de la poudre, ce qui favorise plus de réactions interfaciales lors de la phase de solvation ;
- Une diminution de l'épaisseur de la couche de diffusion autour de la particule, facilitant la dispersion des molécules dissoutes dans le médium.

Ainsi, la micronisation des médicaments est devenue une pratique courante pour augmenter leur vitesse de dissolution (2). Depuis une décennie, la nanonisation des médicaments a

10. Surface spécifique : surface par unité de poids.

été développée après des études empiriques qui ont montré qu'une taille réduite au niveau micrométrique n'entraîne pas nécessairement une dissolution plus rapide (9). Cela consiste à obtenir une taille finale sous-micrométrique qui permet d'augmenter davantage la vitesse de dissolution des médicaments ayant une solubilité faible (11). La micro/nanonisation sera expliquée ultérieurement (cf. section 1.2.2.9, p. 20).

1.1.2.3 Perméabilité, coefficient de partage et pK_a

La *perméabilité* décrit la capacité (la vitesse) d'une substance médicamenteuse à traverser la membrane physiologique (la peau, la membrane gastro-intestinale, la cornée,...) pour atteindre la circulation sanguine du site d'action. La valeur de la perméabilité est souvent déterminée par des expériences *in vitro* ou *ex vivo* sur les cellules épithéliales d'intestin en culture, selon l'équation (dérivée de la loi de Fick) (12) :

$$P_{app} = \frac{V_r}{AC_{d0}} \times \frac{\Delta C_r}{\Delta t} \tag{1.2}$$

où P_{app} est le coefficient de perméabilité apparente [11], V_r le volume du compartiment donneur, A la surface membrane, C_{d0} la concentration de départ du compartiment donneur [12] et $\frac{\Delta C_r}{\Delta t}$ le changement en concentration du compartiment receveur dans le temps.

Généralement, les membranes sont plus perméables aux substances ayant une meilleure affinité avec l'huile ou solvant organique (applé *lipophile*). Ainsi, on utilise le *coefficient de partage* entre deux phases organique (souvent octanol) et aqueuse (eau) pour mesurer la lipophilicité de la molécule (sous forme non-ionisé), ce qui permet de prédire sa performance à traverser une membrane physiologique. Plus le coefficient de partage est élevé, plus la substance est lipophile et vraisemblablement affine aux membranes.

Le pH du milieu et le pK_a du médicament sont des facteurs importants pour déterminer la proportion entre des molécules sous formes non-ionisée et ionisée. Le K_a est la constante de dissociation d'une substance dans une solution aqueuse [13]. Le pK_a [14] permet d'estimer le comportement de dissociation d'un médicament dans un milieu au pH donné. Cependant, ces facteurs ne décrivent pas complètement le processus d'absorption, car certaines substances,

11. La perméabilité *apparente* P_{app} correspond à l'apparition de la substance après la traversée de la barrière biologique (sans tenir compte de chaque couche intrinsèque de la barrière). La perméabilité *effective* correspond à la disparition de la substance avant la barrière biologique, qui est généralement plus grande que P_{app} à cause de la rétention de la substance par les couches intrinsèques (13).
12. Cette concentration est limitée par la solubilité de la substance. ($C_{d0} \leqslant$ Concentration de saturation.)
13. K_a = [A$^-$] [H$^+$]/ [HA] (si la substance AH a pour réaction HA $\leftrightarrows$ A$^-$ + H$^+$ dans le milieu aqueux).
14. pK_a = - $\log_{10} K_a$. Si p$K_a <$ pH, la substance existe majoritairement sous forme ionique ([A$^-$] > [HA]).

avec un coefficient de partage faible ou qui sont extrêmement ionisées, ont démontré une biodisponibilité élevée.

1.1.2.4 Propriétés cristallines : polymorphisme

Tous les médicaments sont manipulés sous forme solide à un moment donné dans le processus de développement et de production. Cette forme solide peut être cristalline, *amorphe*[15], *anhydre*[16], *hydrate*[17], *solvate*[18] et varier en dureté, de morphologie et en taille. De plus, pour beaucoup de substances médicamenteuses, les différentes formes peuvent co-exister dans la structure cristalline : c'est ce qu'on appelle *polymorphisme*.

À une température, une pression et un milieu donné, seulement une forme d'une substance médicamenteuse pure est stable, et les autres formes non stables (appelées *métastables*) peuvent se convertir en cette forme cristalline stable (1). Cette conversion peut provoquer des changements des propriétés physiques telles que la dissolution et la stabilité à long terme. Il est connu que la forme amorphe est généralement mieux absorbée que la forme cristalline, et peut se dissoudre dans l'eau plus facilement. Par exemple, certains produits d'insuline insolubles sont préparés sous forme amorphe pour une action immédiate, sous forme cristalline pour une action lente à longue durée, ou en mélangeant les deux formes pour une vitesse d'action intermédiaire. Toutefois, la stabilité de la forme amorphe doit être assurée pour éviter la recristallisation pendant le stockage du médicament avant son expiration.

1.1.2.5 Stabilité

Pendant la formulation, certains excipients spécifiques sont rajoutés pour livrer le principe actif (cf. section 1.1, p. 4), et aussi pour assurer que l'intégrité chimique du principe actif soit conservée à l'intérieur de la durée d'utilisation. Les substances médicamenteuses peuvent se dégrader sous les effets de la chaleur, de l'oxygène, de la lumière et de l'humidité. Les mécanismes de dégradation, surtout pour les solides, sont souvent complexes et difficiles à prévoir. Toutefois, une compréhension complète de tous les mécanismes n'est pas toujours requise pour la formulation, car des méthodes d'amélioration de la stabilité peuvent être appliquées *à posteriori*. Par exemple, les anti-oxydants peuvent être rajoutés dans la formulation pour le principe actif sensible à l'oxygène et pour les médicaments sensibles à la lumière, du matériel

15. Sans arrangements réguliers de réticules moléculaires.
16. Sans formation de liaison avec des molécules d'eau.
17. Contenant dans la structure des liaisons avec des molécules d'eau à différents degrés. Cette forme ne modifie pas la composition chimique du médicament.
18. Contenant des molécules de solvant dans la structure.

d'emballage adapté peut résoudre le problème. Cependant, il est important de connaître la nature des mécanismes, par exemple, de savoir que la dégradation provient d'une oxydation.

1.1.3 Système de classification biopharmaceutique

Selon la solubilité et la perméabilité d'un médicament, son comportement *in vivo* peut être identifié selon « Biopharmaceutical Classification System », un système de classification proposé par Amidon *et al.* (14) afin de prévoir les problèmes de la biodisponibilité pour les différentes phases de développement du médicament. Cette classification permet d'éviter des tests *in vivo* non nécessaires pour les médicaments oraux.

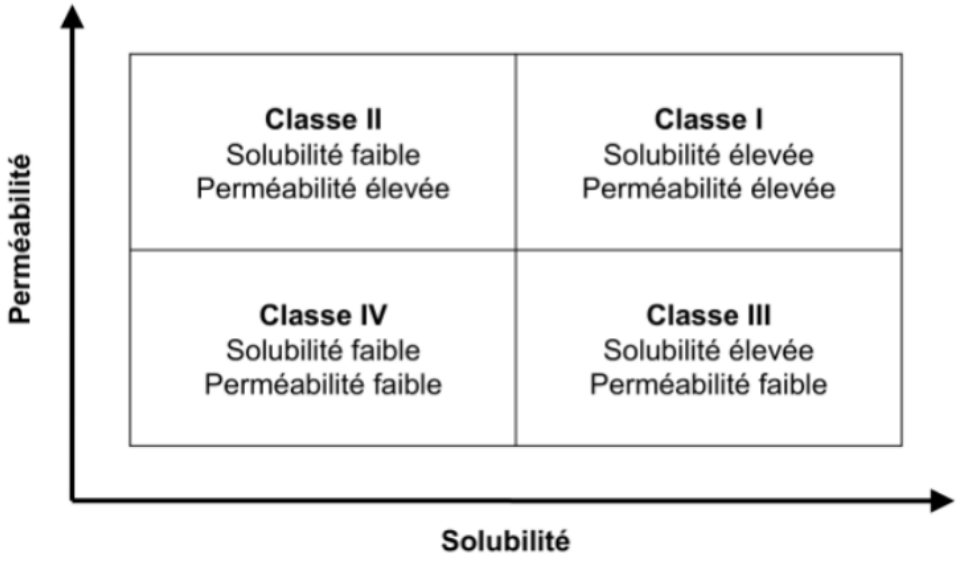

Figure 1.1 Système de classification biopharmaceutique (BCS) (Traduit de : Pharmainfo.net)

Un médicament est considéré soluble quand la dose thérapeutique la plus élevé peut être dissoute dans 250 mL (un verre) d'eau dans l'intervalle de pH 1-8 ; il est perméable quand 90% de la dose administrée peut être absorbé dans le corps humain [19]. Lindenberg *et al.* (15) ont investigué la classification des 130 médicaments essentiels listés par l'Organisation Mondiale de la Santé et ont conclu que, parmi les 61 médicaments identifiés, 34% appartiennent à la classe I, 17% à la classe II, 39% à la classe III et 10% à la classe IV. Les médicaments de classe II et IV sont donc moins présents (27% du total), limités par leur faible solubilité [20].

19. La perméabilité peut être mesuré par des appareils qui simulent l'environnement *in vitro* ou par la culture cellulaire *ex vivo*.

20. Il faut noter que les substances listées de l'OMS sont potentiellement des molécules anciennes et que ces chiffres ne correspondent probablement plus à la réalité actuelle. Grâce aux avancements technologiques, de plus en plus de médicaments peu solubles ont été développés. Les chiffres présentés ci-dessus sont surtout pour illustrer l'importance de résoudre le problématique de la faible solubilité des substances.

1.2 Problématiques de la biodisponibilité dans le développement pharmaceutique

Le développement de médicaments est un processus long et coûteux. Les statistiques ont démontré qu'en moyenne, après 12 à 15 ans de développement et d'essais cliniques en plus d'un investissement d'environ 500 millions de dollars par substance, seul 1 médicament candidat parmi 5000 potentiels réussit à être approuvé et peut être prescrit par un médecin (16). La plupart des échecs sont dus au problème de biodisponibilité des candidats potentiels. Afin de comprendre les problématiques de l'industrie pharmaceutique, le processus de développement du médicament sera décrit dans les pages suivantes, suivi par une présentation des techniques visant à améliorer la biodisponibilité des substances médicamenteuses.

1.2.1 Aperçu du développement des médicaments

La R&D d'un médicament est généralement complétée en deux parties (cf. figure 1.2, p. 13). La première partie de la R&D, la phase préliminaire, correspond à la *phase de découverte*. Pendant cette phase, on essaie d'abord de comprendre le mécanisme de la maladie, de cibler les sites/composantes du corps responsables de la maladie, et de valider [21] la cible. Ensuite, on produit en très petite quantité (quelques milligrammes) des substances qui interagissent avec la cible et on effectue les essais de criblage « High-Throughput Screening » via divers tests *in vitro* et *in vivo* [22]. Ces essais permettent d'obtenir une bibliothèque de substances appelées « hits ». La prochaine étape consiste à établir une relation de dose-réponse et à identifier les candidats prometteurs dans la bibliothèque des « hits ». Le candidat devient alors le « lead ». Ce processus de criblage est réalisé principalement par des analyses informatiques ou automatisées, et la quantité disponible de « hits » est généralement de quelques milligrammes, voire en-dessous d'un milligramme (17). Par la suite, on optimise les propriétés physico-chimiques du « lead » afin de générer une formulation non-toxique pouvant être absorbée, distribuée, métabolisée et éliminée (ADME [23]), en présentant une pharmacocinétique [24] adéquate. Un « lead» optimisé devient finalement une nouvelle entité chimique (« New Chemical Entity (NCE) »).

21. Prouver que la modulation/modification de la cible a des effets réels sur la maladie.
22. Les tests *in vitro* sont souvent effectués sur les cellules en culture, et révèlent plusieurs critères de base tels que la fiabilité, la faisabilité, la toxicité et le coût. Les substances ayant réussi les tests *in vitro* seront appliquées sur les animaux modèles ayant des organes/tissus ressemblant à ceux d'humains malades.
23. ADME décrit le processus complet qu'un médicament subit à l'intérieur du corps selon la voie d'administration.
24. Le terme *pharmacocinétique* décrit la cinétique d'absorption, de distribution, de métabolisme et d'élimination (ADME), et surtout les deux premières étapes.

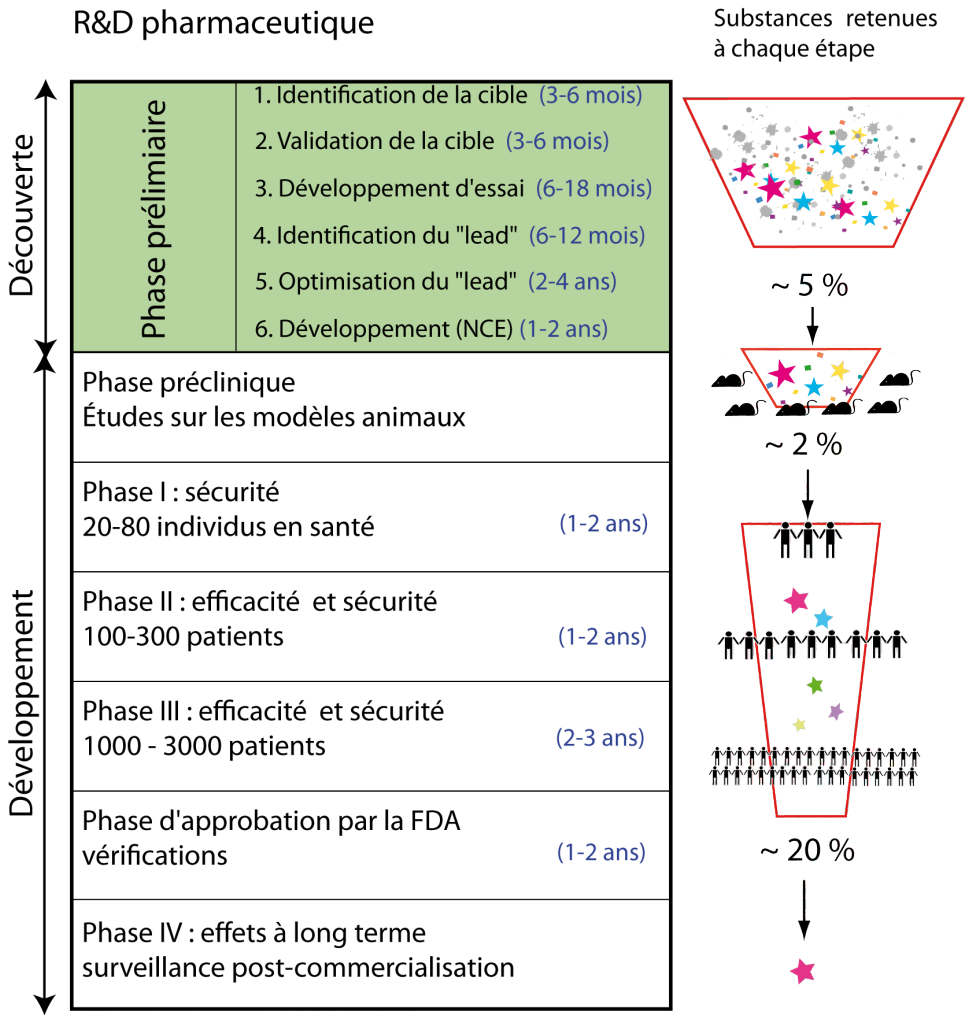

Figure 1.2 Les phases de R&D d'un médicament (18), (16).

La deuxième partie de la R&D correspond à la *phase de développement*, qui se subdivise en 6 étapes. La phase préclinique consiste à tester les NCE *in vitro* et *in vivo* sur des modèles animaux pour étudier la toxicité et les effets pharmacocinétiques (tels que la dose thérapeutique, la durée d'action avant l'élimination et les effets secondaires). Pendant cette phase, le médicament candidat préclinique est généralement disponible en quelques grammes. Une fois les données précliniques collectées, la NCE sera produite en quelques kilogrammes et sera testée sur des individus volontaires en santé et malades pendant les phases cliniques I, II et III. Neuf sur dix NCE échouent : le taux d'échec est de 40% à la phase I, de 62% à la phase II et de 40% à la phase III. Quand une NCE est enfin jugée sécuritaire et efficace, une demande de « nouveau médicament» est déposée à l'agence fédérale américaine Food & Drug Administration (FDA), qui en refuse encore 23% après de multiples vérifications [25]

25. Ces vérifications se basent surtout sur des critères méthodologiques et éthiques, telles que le choix du

(17). Une fois approuvé, le nouveau médicament peut être commercialisé et prescrit par les médecins, mais sera surveillé à long-terme. Dès que des données suffisantes démontrent que les effets néfastes dépassent le bénéfice thérapeutique du médicament, ce dernier est retiré du marché.

Parmi les candidats ayant échoué, 40% des échecs sont dus à une faible pharmacocinétique ou une faible biodisponibilité [26] (19). Ainsi, beaucoup d'efforts ont été placés sur les méthodes améliorant la biodisponibilité dans le développement pharmaceutique. Ces dernières seront présentées par la suite.

1.2.2 La biodisponibilité peut être améliorée à l'aide des méthodes physiques ou chimiques

Le problème de la faible biodisponiblité et de l'inefficacité clinique est surtout lié à la faible solubilité du médicament (20). Particulièrement, lors de la phase de découverte, la solubilité est un paramètre préoccupant qui détermine la survie des « leads » pour la suite du développement. Lipinski (21) et ses collègues ont conclu, lors du processus d'optimisation de « leads », que 39,8% des substances enregistrées [27] sont peu solubles.

Le problème de solubilité ne peut pas être résolu simplement en administrant plus de médicaments, et la définition de « peu soluble » varie au cas par cas. En effet, pour chaque médicament, il existe une solubilité minimale nécessaire pour qu'il soit efficace, et ce seuil de solubilité est déterminé par la dose [28] et la perméabilité de la substance. Les études de Lipinski *et al.* (8) montrent que pour une dose moyenne (1 mg/kg) et une perméabilité moyenne, la solubilité minimale est 52 μg/mL [29]. Le même auteur estime qu'environ un tiers des nouvelles substances synthétisées en laboratoire aura une solubilité inférieure à 10 μg/mL, qu'un autre tiers aura une solubilité de 10-100 μg/mL, et que le dernier tiers aura une solubilité supérieure à 100 μg/mL (22).

Ainsi, la solubilité de la substance est un facteur clé dans l'amélioration de la biodisponi-

standard et de l'échantillonnage pour des études cliniques et le respect des principes éthiques et pratiques de toutes les phases cliniques.

26. La deuxième cause est l'inefficacité clinique (30%).

27. Les substances enrgistrées sont celles préparées et sélectionnées par les chimistes pendant les étapes antérieures (cf. figure 1.2, p. 13, étapes 1-4 de la phase de découverte).

28. La quantité de médicament nécessaire pour atteindre le seuil thérapeutique selon le poids du patient.

29. Cas extrêmes : pour une dose faible (0,1 mg/kg) et une perméabilité élevée, la solubilité minimale est 1 μg/mL ; pour une dose élevé (10 mg/kg) et une perméabilité faible, la solubilité minimale est 2100 μg/mL. Ainsi, il est difficile de définir une valeur absolue pour catégoriser une substance *peu soluble*.

bilité et dans le succès du développement d'un médicament.

Face à ces enjeux, les méthodes d'amélioration de la solubilité ont été développées au fil des années par des scientifiques. Ces méthodes peuvent faciliter le développement des NCE et le processus de sélection des « leads ». Il faut préciser que ces stratégies sont rarement utilisées individuellement. C'est seulement en combinant les avantages de toutes ces stratégies que l'on peut avoir une efficacité améliorée.

1.2.2.1 Stratégie 1 : Formation de sel

La formation de sel est une stratégie courante en vue d'améliorer l'absorption. Généralement le sel d'une substance acide ou basique faible est beaucoup plus soluble que l'acide ou la base même. Ainsi, la substance administrée sous forme de sel peut se dissoudre plus rapidement que sous forme de non-sel. Cependant, comme les fluides biologiques sont souvent tamponnés, la substance sous forme dissoute ne peut exister seulement pendant une courte période, et deviendra de nouveau l'acide ou la base, qui se précipiteront finalement. Par conséquent, cette approche ne fonctionne que pour certains acides ou bases faibles. De plus, beaucoup de médicaments potentiels sont tellement peu solubles que même leur formes salines n'ont pas la solubilité minimale exigée. Enfin, comme le sel est souvent formé dans un solvant organique (et non dans l'eau), certains problèmes de solubilité, de conversion inversée [30] et de stabilité peuvent survenir également après administration du médicament (22). Cette stratégie est donc souvent utilisée en combinaison avec d'autres stratégies d'amélioration de la solubilité.

1.2.2.2 Stratégie 2 : Cosolvants

Certains médicaments peu solubles dans l'eau ont une solubilité plus élevée dans un cosolvant composé d'eau et d'autres solvants organiques, comme par exemple l'éthanol, le propylène glycol, etc. Cependant, la méthode présent un risque de précipitation après l'administration du médicament. De plus, le nombre de solvants non-toxiques est limité, et les excipients rajoutés en vue de diminuer la toxicité des solvants en excès peuvent provoquer des problèmes d'incompatibilité (23).

30. Le sel se reconvertit et se précipite en acide ou base d'origine.

1.2.2.3 Stratégie 3 : Complexation avec les cyclodextrines

Cette technique consiste à former une conjugaison des molécules médicamenteuses avec d'autres molécules complexes telle que les cyclodextrines qui sont des oligosaccharides [31] cycliques dérivés de l'amidon(24). Les cyclodextrines ont une forme de cône tronquée, dans lesquelles s'insère une molécule de médicament. La plupart des cyclodextrines ont une paroi extérieure hydrophile et une paroi intérieure hydrophobe, ce qui permet aux molécules hydrophobes insérées d'établir des liaisons non-covalentes et former un complexe stable. Après administration du complexe, la paroi extérieure de la cyclodextrine se disperse rapidement dans le milieu aqueux à l'extérieur de la membrane d'absorption. La molécule hydrophobe de médicament quitte son transporteur par diffusion et est absorbée par la membrane grâce à sa lipophilicité [32]. Certaines cyclodextrines modifiées ont une paroi extérieure plus lipophile (par méthylation) afin d'augmenter la perméabilité du complexe (25).

Il existe actuellement une trentaine de produits pharmaceutiques commercialisés qui emploient la complexation avec cyclodextrines avec environ 6 types différents de conjugaison (24). Les cyclodextrines permettent de faciliter la dissolution des médicaments peu solubles et peuvent être utilisés pour différentes voies d'administration. Cependant, la complexation présente des problèmes de toxicité rénale (26), peut modifier la stabilité et la perméabilité de la molécule de médicament, et dans certains cas, peut limiter (au lieu d'améliorer) le processus d'absorption. Ainsi, cette méthode exige une bonne compréhension des propriétés physico-chimiques des molécules de médicament et de leurs interactions avec les cyclodextrines. De plus, une étape d'optimisation est nécessaire avant d'adapter une formulation existante à une nouvelle molécule développée (25).

1.2.2.4 Stratégie 4 : Promédicaments

Un *promédicament* (« prodrug » en anglais) est un dérivé bioréversible des molécules de médicament qui libère le principe actif après transformations enzymatiques ou chimiques *in vivo* (27). La figure 1.3 illustre le principe de fonctionnement.

La conjugaison d'un groupement fonctionnel soluble peut faciliter la dissolution et donc l'absorption des médicaments peu solubles (28). De plus, une grande variété d'applications, telles que l'amélioration des propriétés physico-chimiques ou la livraison ciblée du médicament, peuvent être réalisées par cette méthode. Actuellement, 5 à 7% des médicaments

31. Appartiennent à la famille des sucres.
32. Généralement quand une molécule est hydrophobe, elle est lipophile (a une affinité pour l'huile), donc plus perméable aux membranes physiologiques.

approuvés font partie de cette catégorie, et ses avantages rendent cette méthode prometteuse (27).

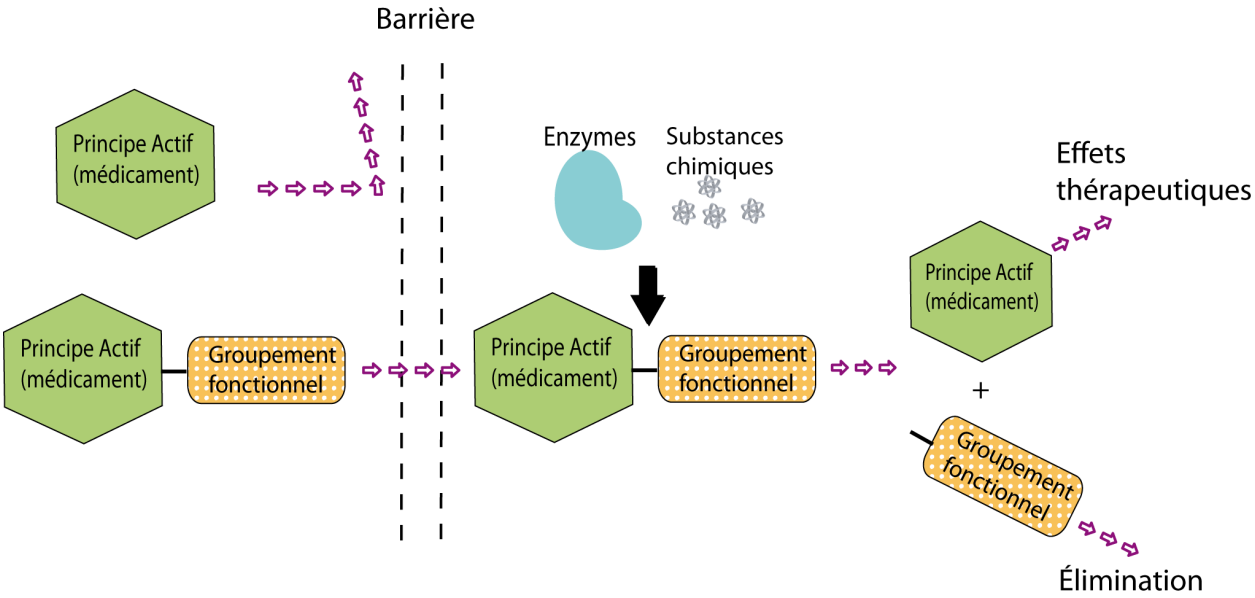

Figure 1.3 Le fonctionnement d'un promédicament (Inspiré de (27)). (La « barrière » représente ici la membrane physiologique ou une limitation du principe actif à avoir un effet optimal.)

Toutefois, une conjugaison de médicament et du groupement fonctionnel nécessite la compréhension complète des mécanismes de transformations et des propriétés du principe actif et de la barrière[33]. La formulation d'une bonne conjugaison est souvent longue et coûteuse (29). Ainsi, cette stratégie ne s'applique qu'à certains médicaments et groupements fonctionnels.

1.2.2.5 Stratégie 5 : Systèmes colloïdaux : micro-émulsions, organogels, liposomes, micelles et dendrimères

Un *système colloïdal* est une entité liquide ou solide (voire gazeuse) composée des particules de taille entre 1 nm et 1 μm, dispersées dans un milieu (30). Pour le système colloïdal, les propriétés d'interface et les forces entre les particules peuvent modifier considérablement ses comportements. L'équilibre du système colloïdal est atteint quand l'*enthalpie*[34] est mini-

33. La barrière pourrait être la faible solubilité, l'instabilité chimique, le métabolisme pré-systémique, la pénétration inadéquate au cerveau, etc.

34. L'enthalpie est l'énergie totale d'un système thermodynamique, correspondant à la somme de l'énergie interne (l'énergie requise pour créer le système) et l'énergie nécessaire pour créer un espace dans le milieu

misée (31).

Afin de faciliter la livraison et l'absorption de médicaments et ainsi améliorer leur biodisponibilité, plusieurs types de systèmes colloïdaux ont été utilisés. Leur structure de base est cependant similaire : souvent sphérique et formée par une ou plusieurs couches de molécules de *surfactif*[35].

1.2.2.6 Micelles, micro-émulsions et organogels

Sous certaines conditions de température et de concentration, des agents amphiphiles ayant une tête hydrophile et une queue hydrophobe (cf. figure 1.4, p. 20) peuvent former[36] des micelles. La taille des micelles varie entre 5 et 100 nm (31). Les micelles peuvent aider à la solubilisation en milieu aqueux des médicaments hydrophobes quand les molécules de ces derniers sont insérées dans le noyau de la sphère. Une micelle inverse, formée par des surfactifs en direction contraire (tête vers l'intérieur et queue vers l'extérieur), permet à son tour de solubiliser des médicaments hydrophiles dans l'huile. De plus, l'utilisation de surfactifs ayant des propriétés spécifiques permet de réaliser certaines fonctions, telles que l'augmentation de demie-vie après administration intraveineuse ou le ciblage du site d'action pour une libération locale (32).

Les micro-émulsions[37] peuvent être formées également à l'aide des surfactifs. La différence entre une particule de micro-émulsion et une micelle est que, pour la première, le noyau contient de l'eau libre (dans le cas de l'eau dans l'huile) emballée dans une couche rigide de surfactifs, alors que le noyau d'une micelle est entièrement rigide et contient de l'eau immobilisée. Ainsi, la particule de micro-émulsion est plus grande que la micelle (33). Les organogels sont des systèmes qui ressemblent à des micro-émulsions mais sous forme semi-solide. Leur viscosité est très supérieure à celle des micro-émulsions, la microstructure est ainsi plus rigide et entrelacée. Les organogels utilisés en pharmaceutique sont majoritairement des systèmes

pour que le système ait un volume et une pression. La modification de l'enthalpie est souvent sous forme de changement de chaleur.

35. Un surfactif (appelé également *tensioactif* en français ou *surfactant* en anglais) est une molécule amphiphile (à la fois hydrophile et hydrophobe), souvent un polymère, ayant deux parties de polarités différentes (ayant une affinité avec l'eau et avec l'huile respectivement). Le rôle du surfactant est de diminuer la tension de surface entre deux liquides ou entre un liquide et un solide afin de stabiliser le système.

36. À une concentration critique, les agents s'assemblent spontanément et forment une sphère.

37. Une émulsion est un mélange homogène de deux liquides non miscibles, où une phase est dispersée dans une autre phase continue. Si c'est l'eau qui est dispersée dans l'huile, on l'appelle « l'eau dans l'huile » et *vice versa*. Les phases peuvent s'organiser et s'inverser automatiquement sous certaines conditions, rendant le système instable. Le lait, les crèmes, la mayonnaise et le beurre sont tous des exemples d'émulsion. Une micro-émulsion est une émulsion dont les gouttelettes sont de taille micrométrique.

à base d'ester de lécithine, de gélatine ou de sorbitan dans des solvants biocompatibles (31).

Les micro-émulsions et les organogels, ensemble avec les micelles, permettent d'améliorer la biodisponibilité et la distribution des médicaments peu solubles (ou peu perméables) sous forme solide ou liquide par différentes voies d'administration. Cependant, le contrôle de la libération de médicament et la stabilité restent problématiques : en-dessous de la concentration critique (cf. note 1.2.2.6, p. 18), les agents se dissocient et forment des chaînes libres, causant la libération soudaine des médicaments. (34). Les micro-émulsions et organogels ne permettent pas la liaison avec des ligands [38] spécifiques pour la livraison ciblée des médicaments, et leur rayon d'application est limité (31).

1.2.2.7 Liposomes

Les *liposomes* sont des vésicules composées d'une ou plusieurs double-couches lipidiques, et se forment spontanément par agitation du film lipidique hydraté (35) [39]. Chaque double-couche contient des molécules de phospholipide, ayant une tête polaire vers l'extérieur de la double-couche, et une queue non-polaire vers l'intérieur (cf. figure 1.4, p. 20, B). Ces double-couches ont une apparence et une perméabilité semblables à la membrane biologique (31). Contrairement aux micelles, les liposomes offrent un environnement à la fois hydrophile (dans le cœur) et hydrophobe (dans la double-couche), et peuvent ainsi augmenter la solubilité de nombreux médicaments (36). Les liposomes présentent des avantages de grande capacité de chargement, de bonne tolérance et de sélectivité tissulaire, ce qui en fait de bons candidats pour livrer des peptides, des protéines et de l'ADN (à l'aide des ligands ou des agents spécifiques dans certains cas)(37). Toutefois, des problèmes de la complexité, de l'instabilité du stockage et des coûts élevés du développement peuvent aussi survenir (36).

1.2.2.8 Dendrimères

Les *dendrimères* sont des structures macromoléculaires sphériques et hautement ramifiées, synthétisées à l'aide de méthodes itératives (34). Basés sur le même principe que les micelles, les dendrimères ont un noyau (cavité centrale) hydrophobe et des branches superficielles hydrophiles (cf. figure 1.4, p. 20). Selon la spécificité du médicament et du site d'action, les dendrimères peuvent être construits avec des ligands ou des molécules de conjugaison — ce qui les rendent des véhicules d'intérêt dans la livraison ciblée des médicaments, surtout des

38. Ligands : molécules qui ont une grande affinité pour d'autres molécules spécifiques (souvent des récepteurs exprimés à la surface des cellules cibles dans le cas de livraison de médicaments).

39. Depuis la découverte des liposomes dans les années 1960, de nombreuses méthodes de formation ont été conçues afin de créer des liposomes de différentes tailles et de structures variées.

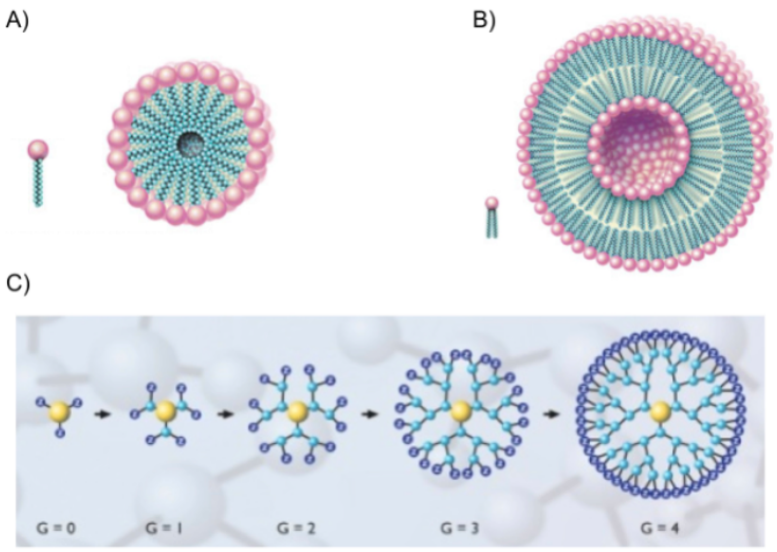

Figure 1.4 Micelle, liposome et dendrimère : A) Une molécule d'acide gras (à gauche) et une micelle (à droite). (Source : (38)). B) Une molécule phospholipide (à gauche) et un liposome (à droite). (Source : (39)). C) La génération d'un dendrimère par étape. (Source : (40)).

médicaments à base d'ADN. En tant que matériaux nanométriques, les dendrimères peuvent aussi servir dans le diagnostic par imagerie. Toutefois, il est à noter que l'administration de certains dendrimères présente des problèmes de cytotoxicité et de bioincompatibilité, malgré leurs domaines d'application variés (31).

1.2.2.9 Stratégie 6 : Réduction de taille sous forme solide

La réduction de taille des particules peut améliorer la solubilisation aqueuse d'un médicament hydrophobe par augmentation de la surface de contact (équation Noyes-Whitney 1.1, page 8). Selon l'ordre de grandeur de la taille finale, on peut classer le niveau de réduction en échelles micrométrique (quelques micromètres) ou nanométrique (en dessous de 1 μm, souvent quelques centaines de nanomètres), correspondant aux processus de micronisation et de nanonisation respectivement. Les « micro/nanoparticules » dont il est question ici se distinguent des particules de taille micro/nanométrique dans les stratégies présentées précédemment. Il s'agit surtout des particules solides non dissoutes mais dispersées dans un liquide, qu'on appelle une *suspension*.

Contrairement aux voies orale et parentérale, l'administration de médicaments par la voie respiratoire est limitée par la structure particulière du poumon. Dans ce cas, la réduction de taille vise surtout à un meilleur dépôt des particules médicamenteuses sur la surface membranaire dans le poumon profond, de façon à ce qu'elles ne soient pas éliminées par le mouvement

ciliaire et du mucus pulmonaire. Les mécanismes d'action des micro/nanoparticules pour ces trois voies d'administration seront présentés par la suite.

1.2.2.10 *Nanonisation*

La nanonisation est utilisée surtout pour les médicaments peu solubles administrés par voie orale ou parentérale. Pour un médicament oral, il existe une fenêtre d'absorption à l'intérieur de laquelle le médicament doit se dissoudre afin d'être absorbé au maximum (cf. figure 1.5, p. 21). Une fois dissous, le médicament existe sous forme de molécule dans le fluide gastro-intestinal. Les molécules sont donc absorbées par la membrane gastro-intestinale, traversent les cellules épithéliales (de la membrane) dans cette membrane par diffusion, et arrivent dans la circulation sanguine où elles sont distribuées rapidement (1). Par rapport aux grandes particules ($\sim 10\ \mu$m), les nanoparticules se dissolvent plus rapidement et en plus grande quantité dans la fenêtre d'absorption, ce qui améliore la cinétique d'absorption et la biodisponibilité.

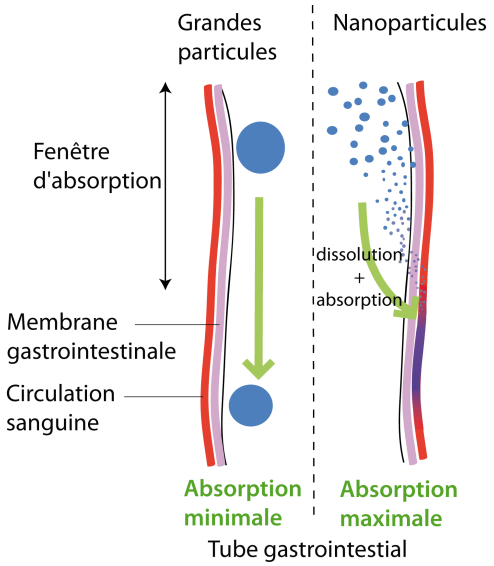

Figure 1.5 Schéma comparatif de l'absorption des grandes particules et des nanoparticules de médicament

Pour les médicaments administrés par voie parentérale, les particules de médicament sont injectées directement dans le sang ou dans les muscles. Les nanoparticules de médicament ont une solubilité améliorée, sont sous forme solide donc présentent une meilleure stabilité et ont un potentiel de toxicité moins élevé que certaines alternatives comme par exemple la stratégie du cosolvant [40], et permettent une dose plus élevée que la stratégie de la complexation (3).

40. Les cosolvants ou excipients sont souvent irritants et inadéquats à l'injection directe dans le sang ou le

1.2.2.11 *Micronisation*

La micronisation est primordiale dans le cas des médicaments pulmonaires. Pour l'administration pulmonaire, le médicament doit être présenté sous forme d'*aérosol*[41], et être livré par un appareil propulsif. À cause de la structure du poumon (cf. figure 1.6, p. 22), l'efficacité d'inhalation d'un aérosol est déterminée principalement par la taille des particules :

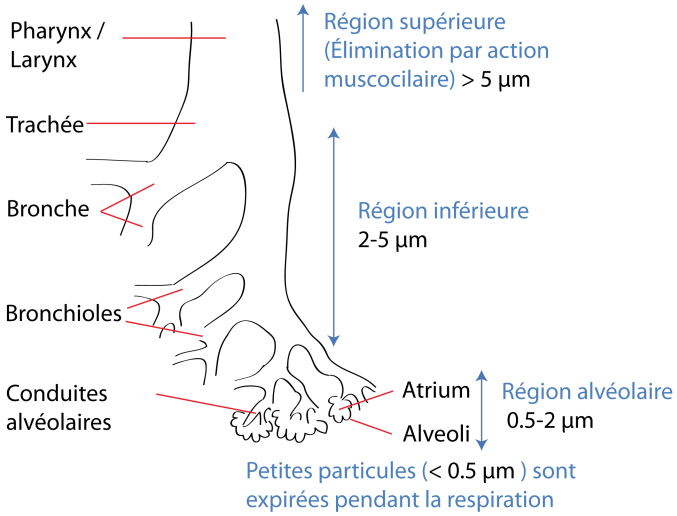

Figure 1.6 La structure pulmonaire et les exigences sur la taille des particules de médicament (schéma modifié de (1))

- Les particules > 5 μm sont déposées par impact inertiel et seront ensuite éliminées par les mouvements du mucus et des cils des cellules de la membrane dans la région supérieure (le nez, la gorge, le pharynx et le larynx) ;
- Les particules entre 0,5 et 5 μm sont déposées dans les régions inférieures et alvéolaires (la trachée, les bronches, les bronchioles et les terminaux alvéolaires) par sédimentation gravitationnelle – c'est la déposition optimale recherchée ;
- Les particules $< 0{,}5$ μm sont influencées grandement par le mouvement aérien et seront expirées lors de l'exhalation.

Une fois déposé aux régions inférieure et alvéolaire, le médicament sera absorbé par les cellules épithéliales, transporté par diffusion et libéré dans la circulation sanguine du poumon.

muscle. En plus, certains médicaments peuvent se former des agrégats après l'injection, ce qui augmente le risque d'obstruction.

41. Un aérosol et un système de deux phases : une phase de particules solides ou liquides dispersée dans une phase gazeuse, souvent l'air.

1.3 Techniques de réduction de taille

Les stratégies de micro/nanonisation sont soit de type « bottom-up » (basée sur l'agglomération moléculaire de façon chimique), soit de type « top-down » (basée sur la fragmentation physique de grosses particules cristallines). Les techniques « top-down » sont plus populaires (41).

1.3.1 Précipitation

Les méthodes « bottom-up » utilisent le phénomène de précipitation par solubilisation compétitive : une substance X est soluble dans un solvant A mais insoluble dans un solvant B. Les solvants A et B sont complètement miscibles entre eux. Ainsi, le rajout du solvant B dans la solution de X dans A va créer un environnement de *sursaturation*[42], ce qui précipite la substance X en micro/nanoparticules, de taille et de morphologie différentes[43] selon la condition de précipitation (température, concentration, agitation du solvant, etc.).

Le processus de précipitation comprend deux phases : une phase initiale de nucléation (création d'un noyau cristallin), et une phase subséquente de croissance. Certaines conditions favorisent la création des noyaux et limitent la croissance, ce qui permet de fabriquer des particules très fines en suspension stable : ce sont des micro/nanosuspensions. Cette génération rapide de particules entraîne cependant des imperfections dans la structure cristalline, et est plus susceptible de créer des formes fragiles et métastables (cf. section 1.1.2.4, p. 10). En revanche, la production industrielle utilise les conditions contraires, qui ont un faible taux de génération de noyaux, mais qui favorisent la croissance lente des cristaux. Ainsi, les particules de médicament produites sont plus grosses et pures (3).

La méthode de précipitation en environnement supersaturé est simple et peu coûteuse. Cependant, les agents de stabilisation (surfactifs) sont souvent nécessaires, et la taille et la forme des particules sont difficilement contrôlables. Certaines nouvelles techniques de nanonisation dissolvent le médicament dans un fluide supercritique[44] pour générer de fines particules lorsque le liquide se transforme en gaz. De cette façon, les micro/nanoparticules peuvent être générées de façon controlée, mais les coûts de production et la consommation de l'énergie

42. La concentration du soluté est plus élevée que la concentration de saturation. C'est un état temporaire et instable – le soluté va se précipiter pour atteindre la stabilité de la solution.

43. Les différentes formes particulaires de nombreuses substances, telles que sphérique, dendritique ou irrégulière, sont présentées dans l'article de Reverchon (42).

44. À une pression et une température donnée, des gaz (ex. CO_2) existent sous forme de liquide supercritique (entre liquide et gazeuse). La diminution de la pression et de la température peut liquidifier ou évaporer le gaz.

sont élevés.

De plus, les résultats des précipitations sont rarement prédictibles – les conditions optimales de précipitation sont déterminées généralement par des essais empiriques (43). La méthode exige également que la substance soit soluble dans au moins l'un des solvants ou dans le fluide supercritique, donc est applicable pour seulement un nombre limité de médicaments.

1.3.2 Homogénisation

La méthode d'homogénisation utilise la force externe pour casser les grosses particules de médicament (« top-down »). Il existe deux types principaux d'homogénisation : la microfluidisation et l'homogénisation à haute pression par « piston-gap ». Dans la technique de microfluidisation, une suspension de médicament est accélérée à une grande vitesse. Ce flux de liquide est ensuite soit poussé à travers une chambre en zigzag, soit séparé en deux pour se confronter. Dans les deux cas, la collision brise les particules. Dans la technique de l'homogénisation à haute-pression [45], la suspension de médicament est poussée à travers une valve étroite. La diminution de la pression statique dû au changement de diamètre forme des bulles gazeuses, un phénomène appelé « cavitation ». Une fois la valve passée, ces bulles d'air éclatent, brisant ainsi les particules de médicament.

Afin d'obtenir une distribution étroite de nanoparticules, la suspension doit circuler au travers du système pendant des dizaines de cycles, ce qui nécessite une quantité considérable de temps et d'énergie. La taille finale des particules dépend de la dureté du médicament (44). La transformation de la structure cristalline des particules et l'amorphisation ont été observées (11), (45). La technique nécessite souvent une micronisation préalable afin d'éviter l'obstruction du passage. Ainsi, l'avantage de la méthode se situe surtout au niveau d'un traitement *a posteriori* des particules produites par la précipitation (3).

1.3.3 Broyage mécanique

Une autre technique de micro/nanonisation couramment utilisé à l'échelle industrielle est le broyage mécanique humide ou sec. Le broyage humide consiste à remplir une macrosuspension de médicament dans un contenant en présence d'un média de broyage, tel que les billes en verre, en oxyde de zirconium ou en polymère dur (ex. dérivées de polystyrene) (46). Les agents surfactifs sont obligatoires pour la stabilisation de la suspension. Le mélange de

45. La pression peut varier de ∼500 bar à 4000 bar (44).

médicament et de billes est ensuite mis en rotation pendant un certain temps [46], et la force de collision entre les billes et le médicament va briser les particules. Cette technique permet d'obtenir des nanocristaux de médicament de distribution relativement étroite sans grand impact sur leurs propriétés physico-chimiques. Cependant, le problème de contamination dû à l'érosion des billes a été observé (11). De plus, la taille des particules après le broyage dépend surtout de la dureté du médicament, et est difficilement contrôlable par cette technique. Le ratio billes / médicament peut atteindre 2 : 1, ce qui rajoute du volume et du poids à la machinerie lourde. La technique n'est pas adaptée pour la phase de découverte car elle nécessite une quantité importante de médicament afin de créer des points de contact suffisants entre les particules et les billes. Quelques tentatives de miniaturisation du système de broyage ont été reportées (47) et démontrent la faisabilité de nanoniser des médicaments de 10 mg ou plus. Toutefois, la récupération d'une aussi faible quantité de principe actif dans un mélange de billes et de surfactif reste difficile.

Le broyage sec inclut plusieurs méthodes. Le « jet-milling » est utilisé surtout pour la micronisation. Sous une pression de 3 à 10 bar, un jet d'air atteint une vitesse élevée lors de l'expansion, et propulse les particules de médicament qui entrent en collision (48). Les particules réduites au niveau micrométrique sont filtrées et collectées, laissant les plus grosses particules en collision continuelle. De même, cette technique ne permet pas de contrôler la taille de particule et nécessite au minimum plusieurs grammes de médicament, ce qui est rarement le cas durant la phase de découverte. D'autres méthodes telles que le « ball milling » et « hammer milling » consistent à briser les particules par la collision des boules (similaire au broyage à billes) ou des marteaux, mais toutes dans un milieu sec.

1.4 Nouvelle approche de micro/nanonisation par laser

Depuis quelques dizaines d'années, l'utilisation des lasers dans les procédés de matériaux est devenue de plus en plus populaire. Les lasers peuvent offrir des solutions peu coûteuses et plus efficaces dans la microfabrication des matériaux, avec des applications dans l'électronique, dans la nanotechnologie et dans les sciences biomédicales (49). Parmi toutes les techniques développées, l'ablation par laser pulsé (Pulsed Laser Ablation (PLA)) a connu des succès dans la synthèse de nanomatériaux depuis son invention dans les années 1960. Comme la lumière n'induit pas de contamination et n'est pas sujet à la dégradation, des nanomatériaux métastables aux propriétés uniques peuvent être créés. L'ablation d'un solide

46. Il y a deux types de broyage humide : le broyage de type à faible énergie (ex : « roller mill») nécessite quelques jours de rotation, et le type à haute énergie (ex : « dynomill») prend quelques heures pour achever la nanonisation.

dans le vide ou dans un gaz peut éjecter des particules qui s'accumulent sur un substrat et ainsi former un film nanostructuré. Dans un liquide, la PLA produit alors une solution colloidale ou une nanosuspension (50).

Cependant, les avancées de la PLA se situent surtout dans le domaine de nanomatériaux inorganiques. Quelques nanomatériaux organiques produits par PLA ont été également étudiés depuis quelques années (51), mais peu d'études sur la production de nanomédicament par PLA pouvaint être retracées. Les prochaines sections présenteront un bref aperçu des avancées de PLA dans la micro/nanonisation des matériaux inorganiques, des substances organiques et des médicaments.

1.4.1 Production de micro/nanoparticules inorganiques par laser

1.4.1.1 PLA sous vide ou en milieu gazeux

Une technique mature de PLA est la Pulsed Laser Deposition (PLD). Le fonctionnement est schématisé ci-dessous. Dans un milieu sous vide ou gazeux, l'ablation laser sur le matériau donneur crée un nuage de molécules et/ou d'atomes qui ensuite s'agglomèrent et se déposent sur le substrat. Selon les paramètres du laser, il est possible de contrôler la vitesse de dépôt ainsi que l'épaisseur de la couche fine sur le substrat. En modifiant le gaz du milieu d'ablation (par exemple l'oxygène ou l'oxyde d'azote), il est également possible de créer des formes oxydes ou nitrures [47]. Cette technique est particulièrement intéressante dans le domaine électronique : on peut créer artificiellement des couches minces de façon précise, sans avoir recours à des techniques de post-traitement. Les matériaux concernés sont surtout des métaux tels que Fe, Cu, Zn, Al, Ca, et des composants semi-conducteurs tels que Si, C, Te, Ga (52), (53).

1.4.1.2 PLA en milieu liquide

Une autre technique de PLA développée après la PLD consiste à produire des nanoparticules dans une phase liquide. Depuis son introduction en 1987 par Patil *et al.* (54), cette méthode a été développée pour fabriquer dans différents liquides une grande variété de nanosuspensions métalliques, d'alliages et de nanocristaux, entre autres. Les nouvelles matières ainsi produites ont été revues en détail par Masala *et al.* (55) et par Yang (56). Ces nanoparticules peuvent être utilisées non seulement dans les domaines classiques (colorants, semi-conducteurs, etc.), mais offrent de nouvelles possibilités dans des domaines révolutionnaires telles que la livraison magnétique de médicament, l'imagerie par résonance magnétique,

47. Nitrures : composées de l'azote au nombre d'oxydation -3 (N^{3-}). Par exemple, Li_3N, Zn_3N_2, etc.

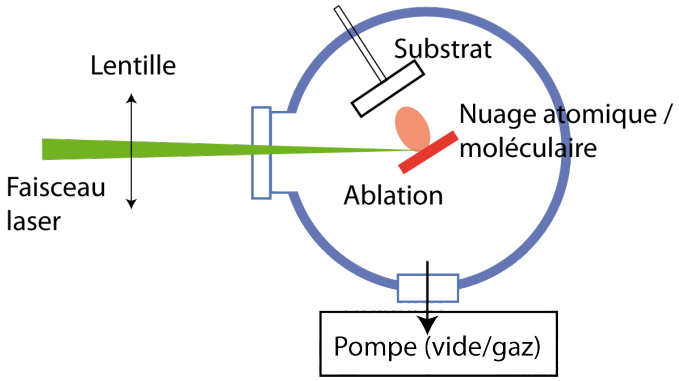

Figure 1.7 Schéma simplifié de PLD. (Inspiré de (53))

la thérapie du cancer, les nanostructures (nano- « code bars ») et l'énergie verte.

Il existe deux mécanismes de fabrication : l'ablation et la fragmentation. Le schéma ci-dessous en résume leur fonctionnement. L'ablation consiste à irradier un substrat dans un milieu liquide. L'irradiation crée un plasma et d'autres phénomènes sur l'interface laser-matière, produisant des nanoparticules. Les surfactifs présents dans le milieu permettent de disperser ces nanoparticules et évitent leur agglomération. Dans le cas de la fragmentation, on irradie par laser une suspension de la matière agitée magnétiquement. Les grosses particules sont brisées en nanoparticules lors de leur passage sous le rayon de laser. Comme les grosses particules sont plus fragiles et susceptibles d'être brisées que les nanoparticules, il est possible d'obtenir une suspension avec une distribution de taille relativement étroite.

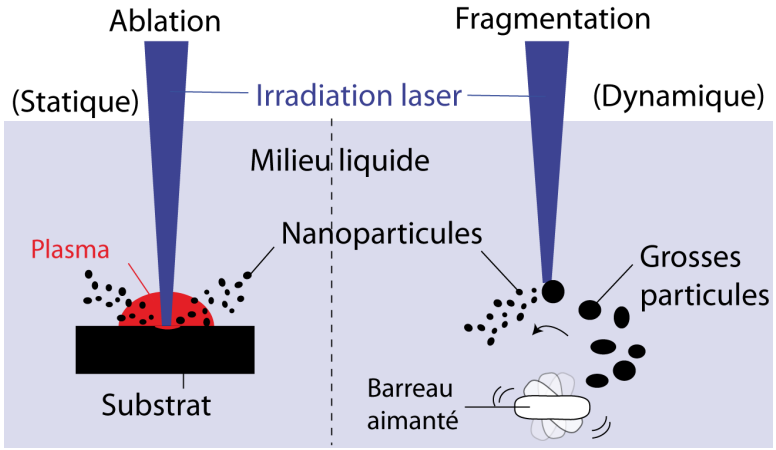

Figure 1.8 Ablation et fragmentation par la PLA en milieu liquide

Le type et les paramètres de laser, tels que le temps d'impulsion (nanoseconde, pico-

seconde etc.), la fluence [48], la longueur d'onde du laser et la durée de traitement, peuvent influencer considérablement les propriétés des micro/nanoparticules produites. Généralement, des impulsions longues, une fluence élevée, une longueur d'onde se rapprochant le maximum de l'absorption de la matière [49] ou une longue durée, sont des paramètres plus « destructifs » pour la matière. Besner et Meunier (50) ont fourni plusieurs micrographes de SEM illustrant les effets de ces paramètres.

1.4.2 Production de micro/nanoparticules organiques par laser

Contrairement aux matériaux inorganiques, la production de micro/nanoparticules organiques par laser présente des difficultés particulières. Les matériaux organiques sont souvent composés des éléments C, H, N, O et ont une structure fonctionnelle spécifique. Ces caractéristiques rajoutent de la fragilité au matériau – il est possible que l'énergie et la chaleur émises lors de l'ablation laser brisent cette structure fonctionnelle et modifient les propriétés physico-chimiques du matériaux.

Quelques groupes de recherche ont reporté la production par laser des nanoparticules de vanadyl phthalocyanine (57), de quinacridone (58), de buckminsterfullerène (C_{60}) (51), de 3, 4, 9, 10-perylenetetracarboxylicdianhydride (59) et de melamine cyanurate (60). Ce sont des molécules de colorant, de semi-conducteur organique et de produit ignifuge. Ces études ont démontré qu'il était possible de créer des nanoparticules organiques par ablation ou fragementation laser, mais les informations sur les propriétés physico-chimiques des matériaux après le procédé laser étaient manquantes.

1.4.3 Micro/nanonisation de médicament par laser

À notre connaissance, seulement un autre groupe de recherche a étudié la production de nanoparticules de médicaments par laser. Nagare *et al.* (61) ont reporté la fabrication de nanoparticules de moins de 20 nm de phenytoin et d'indomethacine par PLD sans décomposition chimique, mais ces particules s'agglomèrent lors du dépôt sur le substrat. Cette agglomération risque d'être irréversible et la dispersion des particules dans le milieu liquide, ce qui est l'objectif de la micro/nanonisation du médicament, serait difficile. Le même groupe de recherche a effectué une autre étude sur les molécules conjuguées de l'albumine du sérum bovin et l'indomethacine, toujours par PLD dans un environnement gazeux. Les changements

48. Fluence : énergie lumineuse par unité de surface.

49. La capacité d'absorption d'une matière varie selon la longueur d'onde. Par exemple, la chlorophylle apparaît verte car elle a deux maximums d'absorption à 400-450 nm (lumière violette-bleue) et à 650-700 nm (lumière orange-rouge). La lumière absorbée interagit avec les molécules et atomes, et les échanges d'énergie lors de ces interactions peuvent modifier la structure moléculaire de la matière.

dans la cristallinité des particules obtenues (< 50 nm) ont été observés (62). Dans les deux études, la dispersion des particules de médicaments nanonisées n'a pas été évaluée.

En 2007, une collaboration a débuté entre la faculté de pharmacie de l'Université de Montréal et le laboratoire LP2L [50] de l'École Polytechnique de Montréal, afin d'investiguer la fabrication des nanoparticules de paclitaxel et de l'acétate de mégestrol par PLA en milieu aqueux (63), (64). De cette façon, les particules sont produites directement en suspension en présence des surfactifs afin d'éviter l'agglomération. Leurs études ont permis d'établir plusieurs conclusions :

- La simple fragmentation dans une suspension de médicament en poudre est plus efficace et pratique que le processus d'ablation sur un comprimé de médicament. Celui-ci présente deux inconvénients : seulement une partie du comprimé de médicament sert à produire les nanoparticules – la perte de matière est non négligeable ; la chaleur locale émise de l'irradiation laser peut gazéifier des médicaments ayant un point d'ébullition faible, formant ainsi une bulle au-dessus du site d'ablation, ce qui limite le processus d'ablation.
- Le laser femtoseconde induit moins de dégradation que le laser nanoseconde (pour l'acétate de mégestrol). En effet, le temps d'impulsion est plus court avec le laser femtoseconde (120 fs) que le laser nanoseconde (5 ns). Par conséquent, les particules de médicament sont moins exposées à l'énergie et la chaleur émise lors de l'irradiation par laser femtoseconde, ce qui réduit la dégradation.
- L'acétate de mégestrol a été micro/nanonisé avec un niveau de dégradation limité ($\sim 2\%$ pour les particules micrométriques et $\sim 4\%$ pour les particules sous-micrométriques). De légères transformations physico-chimiques ont été observées, qui sont principalement l'oxydation de la matière et une perte partielle de la cristallinité. Les tests *in vitro* et *in vivo* ont confirmé une cinétique de dissolution et une absorption améliorées.
- Le paclitaxel a cependant subi des transformations importantes lors de la nanonisation par laser femtoseconde. Le niveau de dégradation se situait à environ 20%. Ceci pourrait être dû à la structure moléculaire complexe de ce médicament.

Les deux études ont prouvé que la micro/nanonisation de médicament par la fragmentation laser est possible, et que la quantité utilisée de l'actif pouvait être aussi faible que quelques milligrammes. Il est possible de comparer cette technique laser avec les autres techniques de micro/nanonisation présentées précédemment (cf. tableau 1.1, p. 30). Cependant, ces études

50. À l'époque Laboratoire de Procédés par Laser.

donnant deux résultats plutôt contradictoires ne sont pas concluantes. Dans le tableau comparatif des techniques de micro/nanonisation, les cases marquées avec « ? » restent à être étudiées plus en profondeur [51]. Est-ce que les effets physico-chimiques induits par le procédé laser sont spécifiques à chaque médicament ou universels ? Est-ce que la même condition de fabrication donne la même taille finale des micro/nanoparticules ? Des études sur d'autres médicaments semblent nécessaires afin de valider la technique de micro/nanonisation par laser et d'établir des conclusions plus générales.

Tableau 1.1 Comparaison des techniques conventionnelles de micro/nanonisation avec la fragmentation laser

Principes	Techniques	Nanonisation	Micronisation	Applicabilité (phase de découverte)	Consommation	Contamination	Transformation polymorphique
Précipitation	**Supersaturation**	±	√	±	Minimale	Toxicité du solvant	Forme amorphe possible
	Fluide supercritique	√	√	±	Énergie	Minimale	Forme amorphe possible
Homogénisation	**Microfluidisation**	√	√	Non	Temps et énergie	Érosion métallique	Forme amorphe possible
	Homogénisation à pression élevée	√	√	Non	Temps et énergie	Érosion métallique	Forme amorphe possible
Broyage	**Broyage humide**	√	±	±	Temps et énergie	Érosion du média	Minimale
	Broyage sec	Non	√	Non	Temps	Minimale	Forme amorphe possible
Laser	**Fragmentation par laser**	√	√	√	**?**	**?**	**?**

51. « √ » signifie que le méthode est applicable et « ± » signifie que la méthode pourrait fonctionner sous certaines conditions, mais n'est pas applicable généralement.

1.5 Médicaments choisis dans le cadre du projet de maîtrise

C'est dans ce contexte que cette maîtrise traite de la fragmentation par laser femtoseconde de deux autres médicaments. Les médicaments disponibles dans le marché et les profils des médicaments choisis seront ensuite présentés.

Parmi les médicaments existants, approximativement 18 médicaments sont actuellement développés et commercialisés sous forme de nanosuspension de particules solides (3), (65) et environ 8 médicaments anti-asthmatiques sont administrés par inhalation (66), dont 6 sont peu solubles dans l'eau. En plus des médicaments modèles étudiés antérieurement (paclitaxel, acétate de mégestrol et fenofibrate) (cf. section 1.4.3, p. 28), le naproxène a été choisi parmi les candidats restants pour la nanonisation et le DPB pour la micronisation. Les critères de sélection comprennent la disponibilité des informations de référence, l'accessibilité du produit (coût raisonnable, présence d'un fournisseur en Amérique du Nord, etc.) et les propriétés (faible solubilité aqueuse, la taille de particules de la poudre d'origine, etc.).

1.5.1 Naproxène

Le naproxène est un anti-inflammatoire non-stéroïdien administré par voie orale, classé de type II au système BCS (solubilité faible, perméabilité élevée)(cf. section 1.1.3, p. 11). La poudre de naproxène est sans odeur, blanche et cristalline. Étant un acide faible, le naproxène est soluble dans des solvants organiques (ethanol, méthanol, etc.) et dans l'eau à pH élevé, mais pratiquement insoluble dans l'eau à faible pH [52]. On estime une solubilité de 15,9 mg/L dans l'eau à pH neutre (67). La figure 1.9 indique que le naproxène a une absorption maximale à 222 nm (correspondant à la longueur d'onde utilisée pour HPLC, cf. section 2.3, p. 47) et pratiquement aucune absorption à 800 nm (longueur d'onde utilisée pour la fragmentation laser femtoseconde) [53].

Le naproxène a été commercialisé dans les années 1970. À cette époque, les médicaments anti-inflammatoires non-stéroïdiens étaient considérés irritants pour la muqueuse gastrique, mais il a été prouvé que cet endommagement pouvait être influencé par la voie d'administration. Liversidge *et al.* (68) ont démontré que la réduction de la taille de particule de naproxène (de 20-30 μm à 270 nm) par broyage à bille (durant 5 jours dans une solution de

52. Ainsi, la solubilisation et l'absorption n'ont lieu que dans l'intestin (pH élevé), après le passage dans l'estomac (pH faible).

53. La longueur d'onde du laser devrait être éloignée de celle du pic d'absorption du médicament pour diminuer la dégradation. Ainsi, l'énergie émise par le laser à 800 nm devrait se consacrer principalement à briser les particules, et non à chauffer et dégrader le médicament. L'intensité de l'absorption est une valeur relative en unité arbitraire, qui donne la différence entre l'absorbance la solution de naproxène et le solvant.

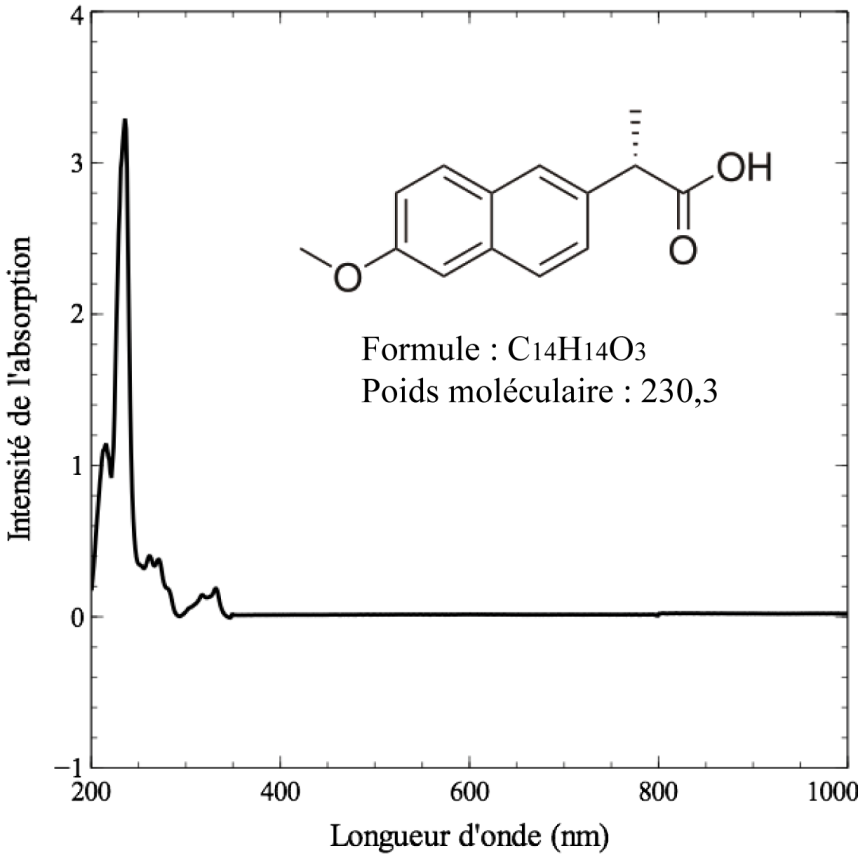

Figure 1.9 Structure moléculaire et spectre d'absorption du naproxène

poloxamer Pluronic® F-68) diminue l'irritation gastrique chez le rat, et de plus, la vitesse d'absorption augmente d'environ 4 fois. D'autres études sur la nanonisation de médicaments par différentes techniques ont été également menées par des groupes de recherche dans les années suivantes (69), (5), (70), (71). Étant donné que ces études pouvaient servir de référence pour notre technique de laser, et que le coût du naproxène est abordable ($\sim$ 185$ pour 100 g), le naproxène a été choisi pour servir de modèle de médicament pour la nanonisation par fragmentation laser.

1.5.2 Dipropionate de béclométhasone

Le DPB est un anti-inflammatoire stéroïdien administré par inhalation. La poudre est sans odeur, blanche et cristalline. La figure 1.10 indique que le DPB n'a également peu d'absorption à 800 nm. Le DPB commercial peut également exister sous forme monohydrate (liée avec une molécule de H_2O). Les formes d'inhalation peuvent être la nébulisation de la suspension de ses microcristaux (inhalation nasale), ou l'aérosol de la solution dans l'éthanol en présence d'un agent propulsif (inhalation orale) (cf. section 1.2.2.11, p. 22) (67). La solubilité

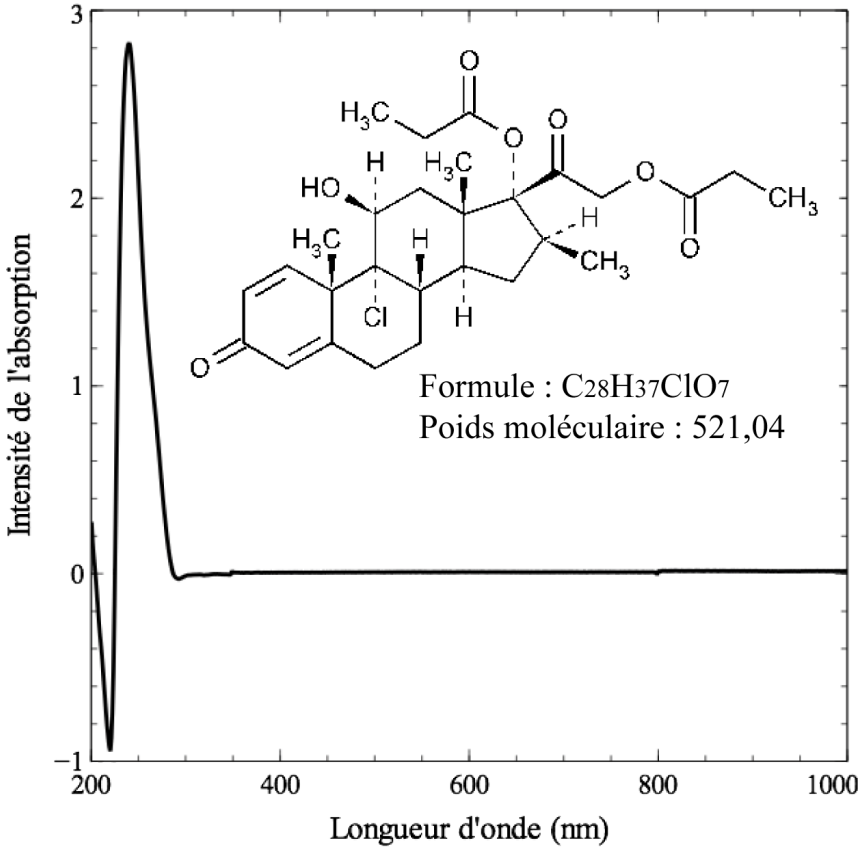

Figure 1.10 Structure moléculaire et spectre d'absorption du DPB

dans l'eau est estimée à 0,69 mg/L (72).

Quelques années après son utilisation en tant qu'onguent topique, le DPB en aérosol a été prouvé efficace dans le traitement de l'asthme (73). Après d'autres essais cliniques, le DPB a été commercialisé, et le médicament ainsi que son appareil de livraison (*metered-dose-inhaler* ou *spray*) ont été perfectionnés.

Le DPB a été choisi comme médicament modèle dans de nombreux projets de recherche pour le développement de nouvelle technique de micro/nanonisation. Ostrander *et al.* (74) ont réduit la taille de particule (de 1960 nm à 164 nm) par le broyage mécanique (puis regroupé les nanoparticules dans des micro-goutelettes par nébulisation ultrasonique pour l'administration). Wang *et al.* (75) ont obtenu, avec la méthode de précipitation, des micro/nanoparticules ayant un intervalle de 0,2 - 1,2 μm à partir des particules originales de 0,2 - 12 μm. Rasenack *et al.* (76) ont démontré que, par la précipitation (croissance contrôlée de cristaux), il était possible d'augmenter la population de particules < 5 μm de 9% à 25-33%, et que la forme

de DPB pouvait être amorphe (sphérique) ou cristalline (forme aiguille). Steckel *et al.* (77) n'ont cependant pas obtenu de particule par la méthode de fluide supercritique (dans CO_2). De par son coût acceptable d'environ 1000$ pour 5 g et sa faible solubilité aqueuse, le DPB semble un choix judicieux de médicament modèle pour la micronisation.

1.6 Techniques d'analyse et leurs concepts

Afin d'évaluer la performance de la technique de micro/nanonisation par fragmentation laser, il est important de mesurer par différentes méthodes la taille des particules produites, ainsi que d'analyser leurs propriétés physico-chimiques. Étant donné que l'approche laser vise des applications pour la phase de découverte, les transformations physico-chimiques doivent être minimisées pour faciliter les phases de production et d'essai en aval, lors desquelles les micro/nanoparticules des médicaments seront produites par une méthode conventionnelle (ex. broyage).

Les techniques de caractérisation pouvant être employées sont la chromatographie liquide à haute performance (*High Performance Liquid Chromatography*)(HPLC) pour analyser la pureté des médicaments, la diffusion de lumière (*Dynamic Light Scattering*)(DLS) et la diffraction par laser (*Laser Diffraction*)(LD) pour la taille, la microscopie électronique à balayage (*Scanning Electronic Microscopy*)(SEM) pour la morphologie, la diffraction par rayon-X (*X-Ray Diffraction*)(XRD) et la calorimétrie différentielle (*Differential Scanning Calirometry*)(DSC) pour les caractéristiques physiques, la spectrométrie infrarouge (*Fourier Transform InfraRed spectrometry*)(FTIR) et l'analyse élémentaire (*Elemental Analysis*)(EA) pour la composition chimique (47), (78). Toutes les techniques mentionnées seront présentées brièvement dans cette section.

1.6.1 Diffusion de la lumière (DLS)

Lorsqu'une lumière monochromatique rencontre une particule dont la taille est proche de sa longueur d'onde, le phénomène de diffusion peut avoir lieu. L'intensité de la lumière diffusée varie alors dans le temps, car les particules sont sujettes au mouvement Brownien. La distance entre les particules change continuellement, et la lumière diffusée subit donc des interférences constructives ou destructives. Ces informations sont contenues dans la fluctuation de l'intensité. Comme les petites particules sont plus sensibles au mouvement Brownien que les grandes, la variation est plus prononcée chez les premières (c.f. figure 1.11). Selon des modèles de calculs complexes, on peut évaluer la taille moyenne des particules ainsi qu'un

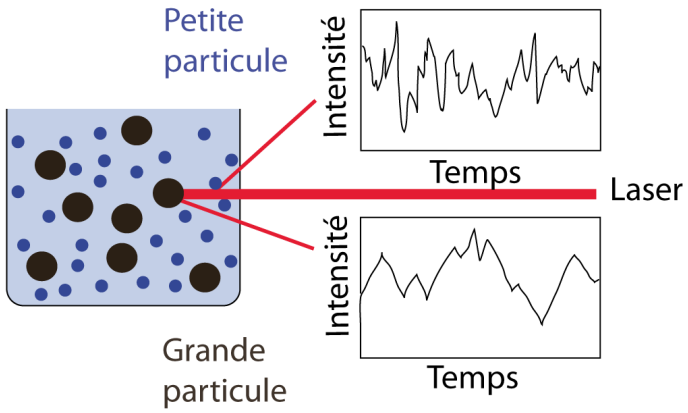

Figure 1.11 Fonctionnement simplifié du DLS

indice de polydispersité (polydispersity index (PDI)) [54].

Un inconvénient de cette méthode est que la plage de tailles mesurées est limitée à environ 1 nm – 10 μm, au delà de laquelle les valeurs ne sont plus fiables. Cependant, la technique permet de mesurer rapidement des suspensions avec des concentrations variées et est non destructrice. Ainsi, dans le cadre du projet, la DLS a été utilisée surtout comme un outil de première sélection afin d'évaluer la tendance de la taille des particules produites à différentes conditions. Les échantillons mesurés ont ensuite été récupérés pour d'autres analyses.

1.6.2 Diffraction par laser (LD)

La diffraction par laser est une autre méthode d'analyse de taille des particules. Par rapport à la DLS (destiné aux particules de taille sous-micrométrique), la LD permet de mesurer sur une large plage dynamique (de 10 nm à 2 mm). La technique utilise le principe de diffraction de lumière, représenté dans le schéma suivant (cf. figure 1.12, p. 36). L'angle de diffraction est petit pour les grandes particules et grand pour les petites particules. L'intensité varie également : plus les particules sont petites, moins l'intensité de lumière est détectée. Ainsi, on obtient un profil de diffraction, qui peut être analysé mathématiquement par différents modèles physiques. Par exemple, la théorie de Mie pour des particules sous-micrométriques, et celle de Fraunhofer pour des microparticules. On obtient alors la distribution de la population des particules selon la taille.

54. Le PDI est une valeur variant entre 0 et 1 et donne une indication de la largeur de la distribution.

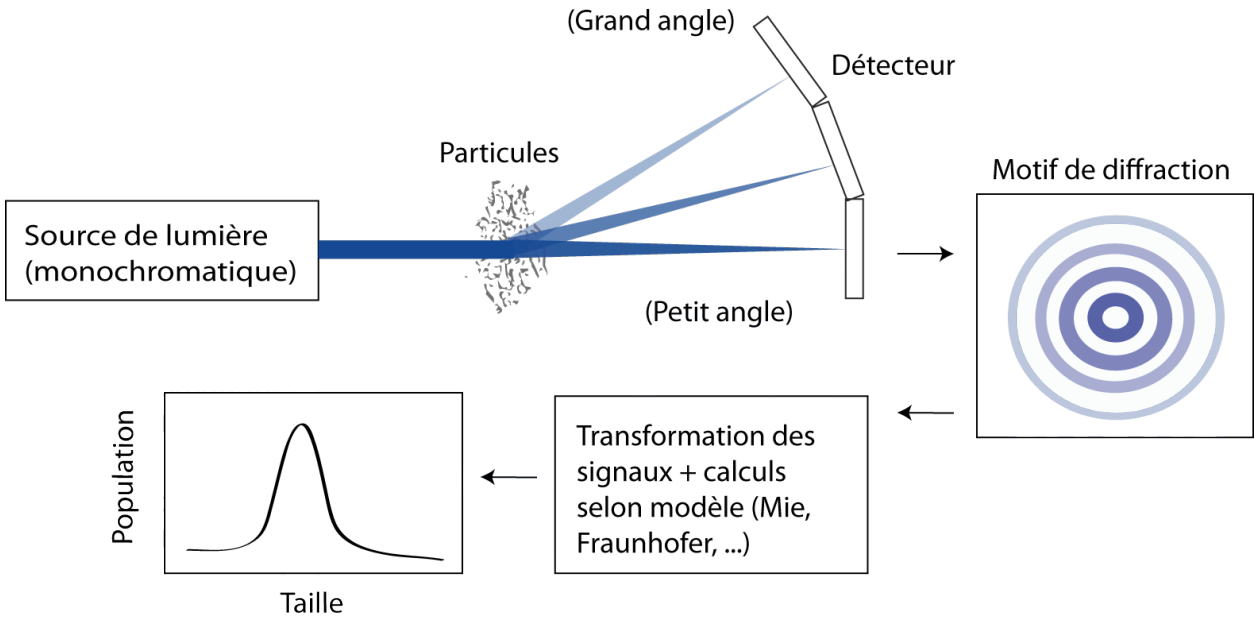

Figure 1.12 Fonctionnement simplifié du LD

Dans le cadre du projet, la LD a été utilisée pour évaluer la distribution de taille lorsque les micro- et les nanoparticules co-existent dans le même échantillon, ce qui ne peut pas être mesuré par la DLS. Cependant, la LD nécessite des échantillons en grand volume et ne permet pas la récupération de l'échantillon. Comme la LD est une méthode destructrice, seulement les particules préparées aux conditions choisies de l'étape de criblage (analysées par DLS) ont été examinées par la LD (cf. chapitre 2, p. 44).

1.6.3 Microscopie électronique à balayage (SEM)

L'utilisation de la SEM est répandue dans tous les domaines de recherche. Le microscope utilise une source d'électrons engendrés par un filament de W (Tungstène), de LaB_6 ou d'une pointe de W d'un champ électrique (Field Emission (FE)), qui sont détectés après la diffusion sur la surface des objets à visualiser. La source d'électrons est balayée sur l'objet et l'image de la surface se reconstruit point par point selon l'intensité de la diffusion. Avec cette technique, il est possible de visualiser directement la forme et la topographie des objets jusqu'à quelques nanomètres. Il est également possible de détecter la composition des éléments inorganiques, surtout les métaux. Dans notre projet, la SEM permet de visualiser directement la taille et la morphologie des particules de médicament, contrairement aux méthodes de DLS et LD qui sont des méthodes indirectes basées sur des modèles de calculs. Cependant, la nature organique des particules de médicament a limité la capacité d'analyse de la SEM.

Par exemple, pour atteindre une bonne résolution à quelques centaines de nanomètres, il est souvent d'usage d'augmenter la tension ou le courant de la source d'émission d'électrons. Mais cette augmentation est accompagnée d'une élévation de l'énergie locale, ce qui peut faire fondre les particules de médicament, changeant ainsi leur apparence. Pour éviter les effets indésirables, la tension et le courant doivent être limités, ce qui en contrepartie limite le grossissement maximal réalisable. Aussi, la SEM utilisée dans le projet est de type FE, qui induit moins d'effet de charge (causant la déformation de l'image) et offre plus de résolution qu'un SEM conventionnelle basée sur des filaments. Les paramètres expérimentaux seront présentés dans le chapitre suivant.

Un autre inconvénient de la SEM est la restriction au niveau de l'échantillonnage. Chaque image prise ne reflète seulement qu'une petite partie de l'ensemble de l'échantillon, contrairement à la DLS et à la LD. Il existe des techniques d'analyse d'images pouvant calculer statistiquement certaines données telles que le nombre de particules par unité de surface et la distribution de la taille, mais ces techniques ne sont fiables que lorsque la forme des particules est régulière, ce qui n'est pas le cas pour les micro/nanoparticules de médicament fragmenté par laser. Dans le projet, l'utilisation de SEM est surtout pour une confirmation qualitative [55].

1.6.4 Chromatographie liquide à haute performance (HPLC)

La chromatographie liquide est une technique permettant la séparation de composées chimiques contenus dans un échantillon. La partie la plus importante de l'HPLC est la colonne chromatographique, dans laquelle sont fixées les billes de silice entourées par des chaînes alkyles. Généralement des colonnes de C18 ou de C8, dont les chiffres signifient le nombre de carbone (C) dans les chaînes alkyles non-polaires, sont utilisées. On injecte dans le flux qui traverse la colonne une solution de la substance à analyser dissoute dans un solvant organique, pour que cette solution soit entraînée dans une phase mobile composée de solvants organiques (souvent polaires, comme le méthanol et l'acétonitrile). Les substances polaires contenues dans la solution ayant une affinité faible avec les chaînes alkyles non-polaires sont donc moins retenues dans la colonne et sortent en premier. La lampe UV positionnée à la sortie de la colonne détecte alors l'intensité d'absorption à une longueur d'onde adéquate. De cette façon, les substances de polarité différente sont séparées selon leur temps de retention,

55. Les mesures ont été prises afin de diminuer l'effet de l'échantillonage limité : chaque échantillon analysé par la SEM a été visualisé d'abord dans son ensemble (à faible grossissement) et les zone présentant des anomalies (ex. très grosse particule, points noirs, topographie irrégulière, etc.) ont été visualisées en détail à grossissement plus élevé. Les figures de SEM publiées dans ce mémoire sont des images représentatives (visuellement similaires que environ $> 90\%$ de la surface totale de l'échantillon sous le microscope).

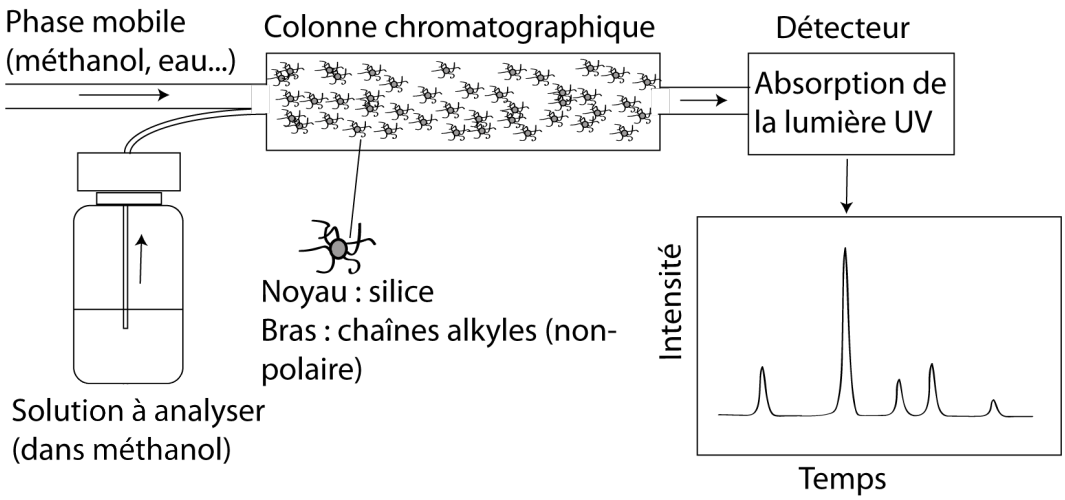

Figure 1.13 Principe de fonctionnement du HPLC

et sont représentées par des pics sur le chromatogramme. Le plus grand pic correspond généralement à la substance principale pure, et les autres des impuretés. En comparant l'aire sous la courbe du pic principal avec la somme de l'aire sous la courbe de toutes les impuretés, la ***pureté*** chromatographique peut être obtenue.

Comme l'intégration du pic est proportionnelle à la quantité de la substance, on peut tracer une courbe linéaire de calibration à l'aide des solutions pures à concentrations connues. Ainsi, la courbe donne une relation linéaire de l'aire sous la courbe avec la concentration. Il est donc possible de quantifier la concentration d'un composé dans l'échantillon. Cette concentration détectée permet de calculer la teneur de la substance pure, qu'on obtient en comparant la concentration attendue selon la masse de la poudre de la substance pesée et celle mesurée par la HPLC. De cette façon, on obtient la ***teneur***.

Dans le projet de recherche, la pureté chromatographique a été mesurée pour évaluer la tendance de la dégradation dans l'étape de criblage, et la teneur afin d'estimer les produits de dégradation qui ne sont pas visibles dans les chromatogrammes, pour certaines raisons telles que l'insolubilité dans le méthanol ou la faible absorbance à la longeur d'onde utilisée par la lampe UV de détection.

1.6.5 Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)

La spectroscopie infrarouge FTIR est une méthode courante dans l'analyse chimique permettant l'identification de substances. Le principe de fonctionnement est basé sur le phéno-

mène d'absorption de la lumière infrarouge. Selon la composition de la substance, à chaque longueur d'onde, la lumière émise peut être plus ou moins absorbée, ce qui permet d'obtenir des spectres variés en intensité en fonction de l'inverse de la longueur d'onde. Ces spectres représentent l'empreinte chimique de la substance et correspondent aux énergies de vibration des groupements chimiques tels que O-H, C-H, C-N, etc. En comparant avec une bibliothèque de référence préétablie, il est ainsi possible de déterminer la composition chimique de la substance analysée.

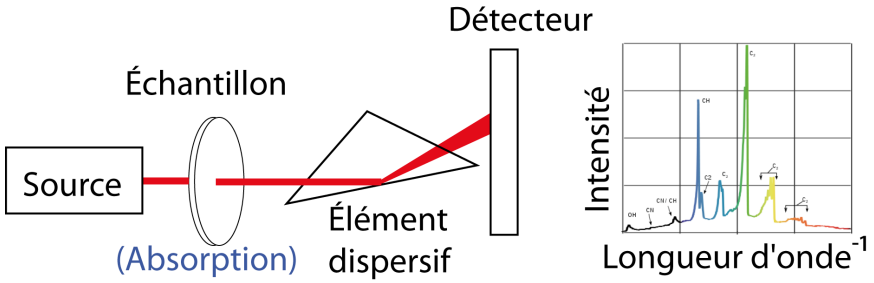

Figure 1.14 Principe de fonctionnement du FTIR

1.6.6 Analyse élémentaire (EA)

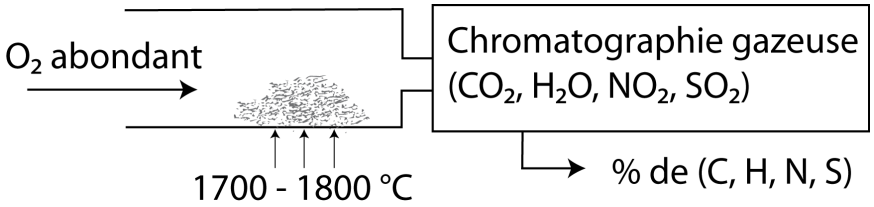

Figure 1.15 Principe de fonctionnement du EA

L'analyse élémentaire est une méthode essentiellement utilisée par les chimistes dans l'analyse des composés organiques. La technique permet de déterminer la fraction massique des éléments C (carbone), H (hydrogène), N (azote) et un autre variable X selon l'usage (souvent S (soufre) ou un élément halogénique) [56]. Le principe de fonctionnement est simple : on brûle la substance à très haute température sous oxygène abondant, et tous les composants se transforment en gaz oxydés. Ces gaz passent ensuite une chromatographie gazeuse qui

56. Ce dernier élément est fixe à chaque appareil d'analyse et ne peut pas être modifié une fois l'appareil construit. On parle alors de l'analyseur de type CHN, de CHNS, de CHNCl, etc. L'appareil disponible dans le présent projet de recherche est de type CHNS.

permet de séparer et quantifier les produits d'oxydation : CO_2, H_2O, NO_2 et SO_2 (ou X_n si le module détecte un élément halogénique). Ainsi, on peut obtenir la fraction massique de chaque composant C, H, N et X.

L'avantage de cette méthode est qu'elle permet de quantifier la composition chimique de l'échantillon. Par contre, elle ne donne aucune information sur la structure chimique de l'échantillon, ce qui peut rendre les interprétations difficiles dans certains cas. De ce point de vue, FTIR est une méthode plutôt qualitative qui est complémentaire à EA.

1.6.7 Calorimétrie différentielle (DSC)

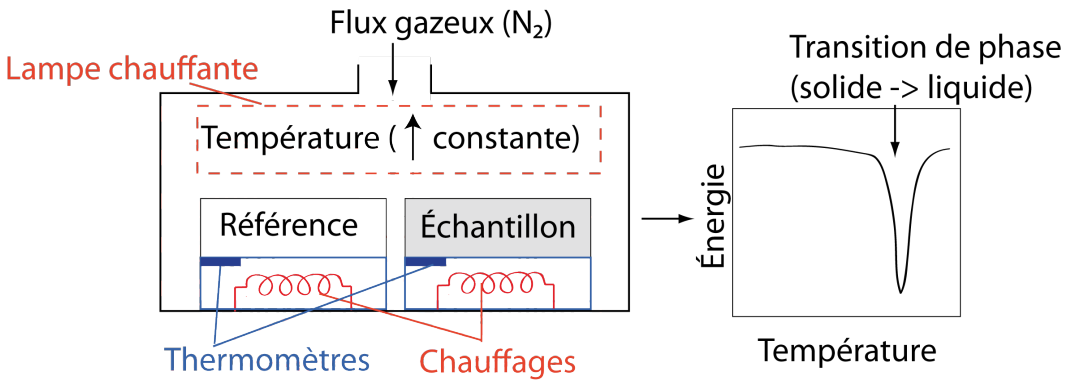

Figure 1.16 Principe de fonctionnement du DSC

La calorimétrie différentielle est une méthode thermoanalytique courante. La figure 1.16 résume le principe de fonctionnement. Dans une chambre fermée, on place le produit à analyser dans une cupule en aluminium sur un système de thermomètre et de résistance électrique chauffante. La même cupule vide servant de référence est placée sur un même système voisin. On introduit alors un flux gazeux d'azote afin de garder un milieu inerte. Une lampe chauffante est ensuite démarrée pour augmenter la température de la chambre de façon linéaire. Les résistances (chauffages) en-dessous des produits d'analyse (échantillon et référence) maintiennent continuellement leur température au même niveau que celle de la chambre : si le thermomètre détecte une baisse de température du produit d'analyse par rapport à la température de la chambre, la résistance électrique fournira de l'énergie. On obtient donc la différence entre les énergies fournies à la référence et à l'échantillon à analyser en fonction de la température ambiante de la chambre, qui sera présenté à l'écran après traitement de données. Autrement dit, l'appareil trace le profil thermique (la chaleur apportée) de l'échantillon.

Quand une substance est en transition de phase, par exemple d'un solide à un liquide, elle absorbe davantage de chaleur (phénomène *endothermique*) – la différence en énergie fournie (entre la substance et la référence) pour combler ce manque est exprimée par un pic dans la courbe, dont la température en abscisse correspond au point de fusion [57]. Si la transition de phase est *exothermique*, c.-à-d. qui libère de la chaleur, le pic apparaissant à l'écran pointe vers le haut, contrairement à la transition endothermique [58]. Pour une substance donnée, plus la température de fusion est élevée, plus l'énergie de liaison du cristal est élevée, car plus d'énergie est nécessaire pour détruire l'organisation stable des réseaux atomiques. De même, l'enthalpie de fusion peut être déterminée à partir de l'aire sous le pic. Plus cette valeur est élevée, plus la substance est cristalline. Il est alors possible d'estimer le pourcentage de cristallinité en comparant l'enthalpie de fusion d'un échantillon à une référence de la même substance dont la structure cristalline est connue.

1.6.8 Diffraction par Rayon X (XRD)

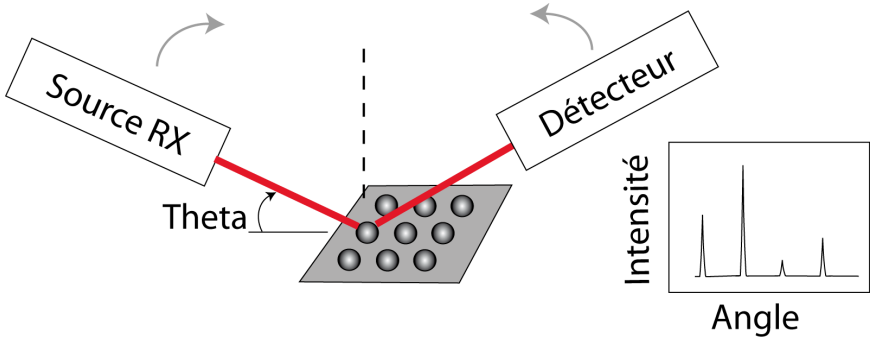

Figure 1.17 Principe de fonctionnement du XRD

La technique de XRD est fréquemment utilisée pour déterminer la structure cristalline des matériaux. Cette technique se base sur la diffraction des rayons-X lorsqu'ils rencontrent des plans atomiques dans des matériaux cristallins. La source émet les rayons-X sur le matériau à un angle d'incidence [59] appelé theta, qui varie linéairement et en continuité entre les deux valeurs extrêmes de l'angle définies par l'utilisateur. Quand l'angle d'incidence correspond

57. La température de fusion est calculée par l'intersection de la tangente du point d'inflexion avec la ligne de base x.

58. Le sens des pics endo- ou exothermiques peut varier selon les appareils. Un appareil différent que celui utilisé dans le projet peut tracer un pic pointant vers le bas pour une transition exothermique et un vers le haut pour une transition endothermique.

59. L'angle d'incidence ici est mesuré par l'angle entre le rayon incident et le plan horizontal de la plaque support de l'échantillon. L'échantillon étant de la poudre, on suppose qu'il y a suffisamment de particules ayant des plans atomiques parallèles au plan horizontal du support.

à l'angle de Bragg [60] d'un plan atomique, la diffraction a lieu et les rayons diffractés se dirigent vers une direction symétrique par rapport à la normale du plan atomique. Ces rayons diffractés sont détectés et analysés par le récepteur, qui peut être statique ou mobile [61]. On voit donc à l'écran les pics à haute intensité, qui correspondent aux différents plans atomique du matériaux, en fonction de l'angle [62]. En comparant ces pics avec des standards, on pourra déterminer l'orientation du réseau atomique du cristal, la présence des inclusions, voire déterminer des composants inconnus dans un matériau.

1.6.9 Analyse *in vitro* de la cinétique de dissolution

Afin d'évaluer la dissolution des médicaments, la pharmacopée américaine (79) propose divers appareils de test de la cinétique de dissolution. Pour les médicaments solides, sous forme de comprimé, de capsules et de suspension, les appareillages de « type 1 » et de « type 2 » sont recommandés. L'appareillage (de type) 2 est souvent le premier choix grâce à sa reproductibilité (plus facile que l'appareillage 1) et son acceptation générale.

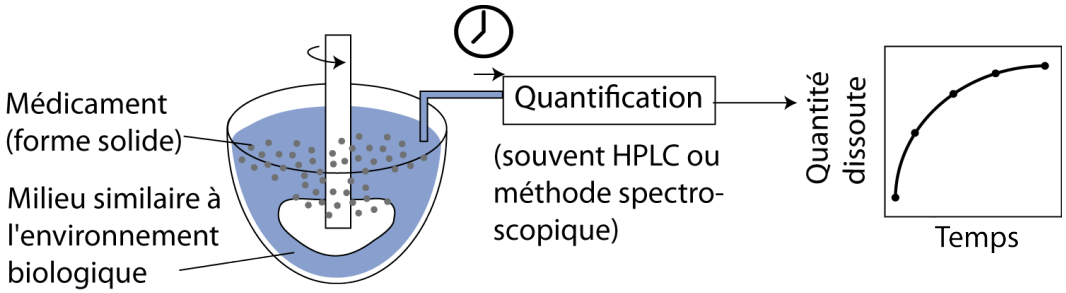

Figure 1.18 Principe de fonctionnement du test de cinétique de dissolution (USP apparatus 2)

Le fonctionnement de l'appareil de type 2 est schématisé ci-dessous. Une quantité de médicament sous forme solide est déposée dans un récipient contenant un liquide. Celui-ci peut être de l'eau pure, une solution de NaCl à 0,9% (liquide physiologique) ou des solutions tampons à différents pH. Le médicament est mélangé dans le liquide continuellement. Avec une fréquence pré-déterminée, par exemple à 5, 10, 30 et 60 minutes après le dépôt initial du

60. La loi de Bragg détermine des angles pour la diffraction cohérente, où les ondes sont en phase, rendant l'intensité de diffraction élevée. Si l'angle d'incidence n'équivaut pas à l'angle de Bragg, les ondes diffractées par les plans atomique parallèles arrivent alors en déphasage. Aucune diffraction ne sera donc détectée.

61. Généralement le récepteur mobilise de façon symétrique par rapport à la normale que la source RX (angle de réception = angle incident = theta). On parle alors de la technique angle 2-theta. Si l'échantillon est une couche mince de matériau, on peut utiliser la technique d'angle rasant, où le récepteur est statique, pour une différenciation plus délicate.

62. L'angle est exprimé conventionnellement en 2-theta.

médicament, une portion du mélange est prélevée et filtrée. On quantifie ensuite la concentration du médicament dissous. Ainsi, on peut obtenir une courbe qui décrit le pourcentage du médicament dissous en fonction du temps.

1.7 Proposition de recherche

L'**hypothèse de recherche** du présent projet est que la technique de fragmentation laser femtoseconde permet de produire des nanocristaux de naproxène et des microcristaux du DPB, avec des effets minimes sur leurs propriétés physico-chimiques.

L'**objectif principal** du projet est de fabriquer par fragmentation laser femtoseconde des nanocristaux de naproxène et des microcristaux de DPB dans un environnement aqueux, et d'évaluer les changements des propriétés physico-chimiques et les transformations polymorphiques par les techniques de caractérisation présentées dans la section précédente.

Cet objectif principal peut être atteint en réalisant quatre objectifs spécifiques :
- déterminer les conditions optimales de fabrication ;
- étudier les impacts du procédé laser sur les propriétés physico-chimiques des médicaments micro/nanonisés ;
- comparer la taille des particules fabriquées par la fragmentation laser et par la technique conventionnelle ;
- si possible, évaluer *in vitro* l'amélioration de la biodisponibilité après micro/nanonisation.

CHAPITRE 2

MÉTHODOLOGIE EXPÉRIMENTALE

Afin de vérifier les hypothèses de recherche, pour chaque médicament, les étapes suivantes ont été effectuées :

1. Production de micro/nanoparticules en modifiant les paramètres de fabrication : la puissance du laser, le volume et la concentration de la suspension, la durée du traitement et la présence d'un surfactif dans le milieu.
2. Une étude de criblage par DLS et par HPLC pour mesurer respectivement la taille moyenne des particules et leur pureté chromatographique.
3. Parmi toutes les conditions, cibler les plus optimales, pour lesquelles la pureté des particules est relativement élevée mais la taille moyenne est petite.
4. Confirmer la distribution de taille des particules des suspensions choisies par LD et par SEM. Cette étape valide la première hypothèse que la fragmentation laser permet de fabriquer les particules de taille micro/sous-micrométrique.
5. Évaluer la dégradation du médicament après traitement laser par un bilan de masse.
6. Lyophiliser les suspensions choisies afin d'obtenir des micro/nanoparticules sèches. (C'est une méthode connue pouvant conserver la morphologie originale des particules solides après sèchage.)
7. Analyser ces poudres sèches par les techniques de caractérisation physico-chimiques : FTIR, XRD, EA et DSC. Cette étape valide la deuxième hypothèse que le procédé laser induit des transformations physico-chimiques minimes.
8. Évaluer la cinétique de dissolution des suspensions micro/nanonisées par l'appareillage de USP de type 2. Cette étude est adéquate seulement pour le naproxène et non pour le DPB, car celui-ci est administré par la voie pulmonaire.

Ces étapes sont résumées dans le schéma suivant (cf. figure 2.1, p. 45). Au cours des sections suivantes, les paramètres utilisés et les détails pertinents de chaque étape seront décrits.

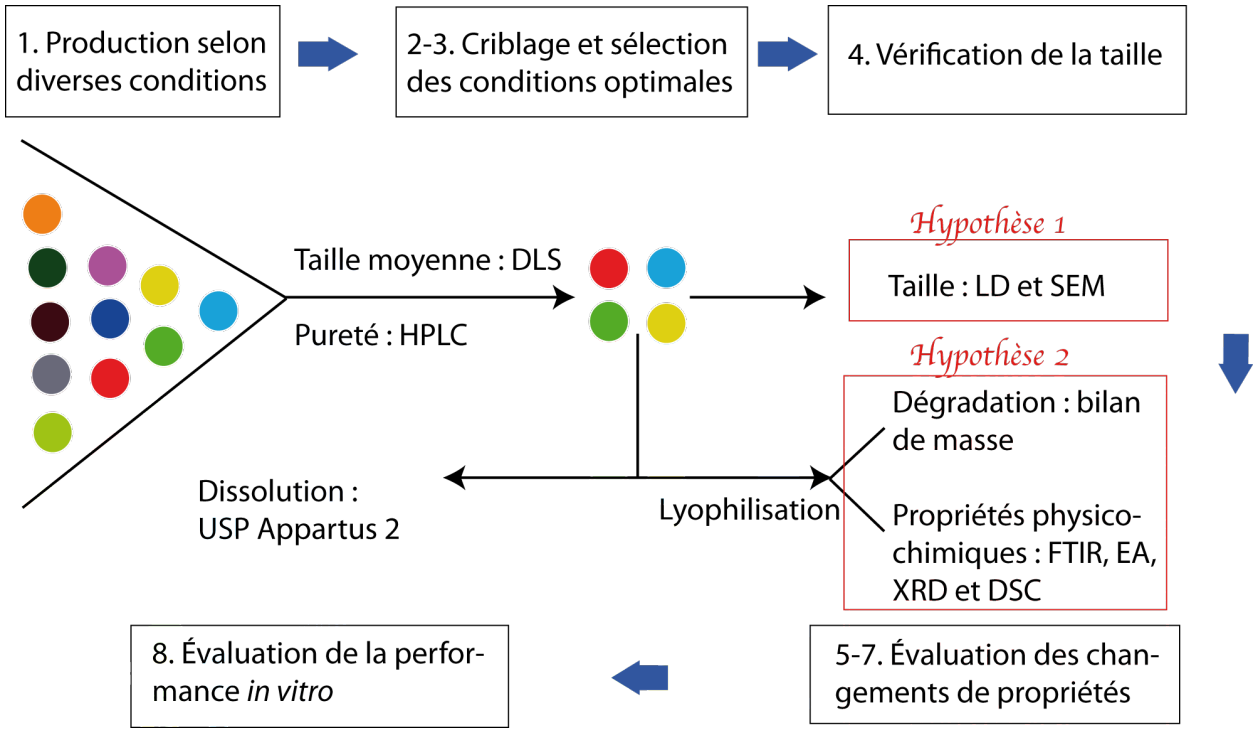

Figure 2.1 Résumé de la méthodologie de recherche

2.1 Matériel utilisé

Le naproxène (> 98%) a été fourni par AK Scientific, Inc. (Mountain View, CA, États-Unis). Le DPB (> 99%) a été acheté chez Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, États-Unis). Le poloxamer 188 (Pluronic® F-68, un polymère surfactif non-ionique) a été fourni par BASF (Mississauga, ON, Canada). Les billes d'oxide de zircone (stabilisées à l'yttrium) de diamètre de 0,8 mm pour le broyage mécanique ont été achetées de Glenmills (Clifton, NJ, États-Unis). Toutes les solutions et les suspensions ont été préparées avec de l'eau désionisée (18,2 MΩ·cm) générée par le système de Millipore Milli-Q (Bedford, MA, États-Unis). Le méthanol utilisé était de grade HPLC et a été fourni par JT Baker (Philipsburg, NJ, États-Unis). L'acide acétique glacial a été fourni par Fisher Scientific (Nepean, ON, Canada).

2.2 Fabrication de micro/nanosuspension à différentes conditions

Le laser femtoseconde (Ti :sapphire, Hurricane laser, Newport Corporation, Mountain View, CA, É.-U.) fournit une irradiation à 800 nm avec des impulsions de 120 fs et une fréquence de 1 kHz. Le foyer de la lentille utilisée est de 100 mm.

Les suspensions ont été préparées en déposant un volume d'eau désionisée (ou de solution de surfactif) dans une fiole contenant de la poudre de médicament pesée avec précision (jusqu'à ± 0,01 mg). Chaque suspension a été homogénisée par ultrasonication pendant 30-40 min avant la fragmentation par laser.

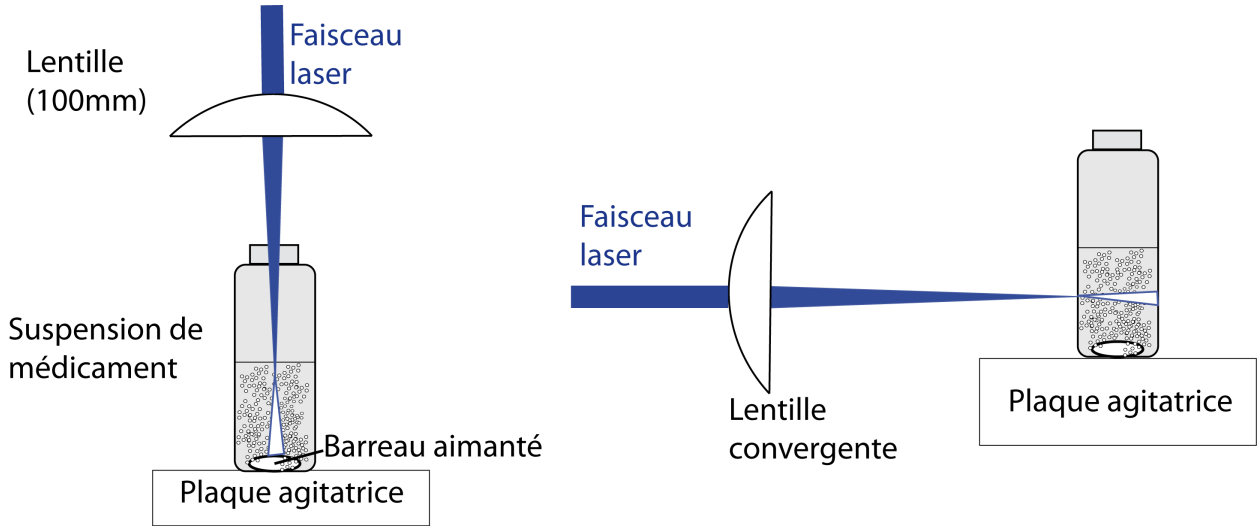

Figure 2.2 Montage du système : fragmentation verticale (gauche) et latérale (droite)

Deux types de montage peuvent être utilisés. Dans le montage de fragmentation verticale décrit dans le schéma (cf. figure 2.2, p. 46) à gauche, la suspension est placée en dessous d'un faisceau laser. Le foyer du faisceau se situe environ 2-3 mm en dessous de la surface liquide, où une lumière blanche est générée. Dans le montage de fragmentation latérale, représenté à droite, le foyer du faisceau se situe à l'intérieur des parois en verre. Les suspensions sont agitées à une vitesse de 300-400 rpm (tours par minute).

Les conditions utilisées sont schématisées ci-dessous (cf. figure 2.3, p. 47). Pour le naproxène, les puissances de laser testées étaient 50, 100, 250 et 400 mW, avec des concentrations faible (0,5 mg/mL) et élevée (2,5 mg/mL), dans 2 mL ou 10 mL d'eau. Pour le DPB, les puissances ont été 50, 100, 200, 300 et 400 mW, avec des concentrations de 0,5 et de 2 mg/mL, dans 2 ou 10 mL d'eau. Les suspensions ayant un volume de 2 mL ont été irradiées pendant 30 min, et celles de 10 mL à 0,5 mg/mL pendant 1 h. Pour les suspensions de 10 mL à 2,5 mg/mL, les suspensions ont toutes été irradiées à 50 ou à 100 mW, mais pendant une durée variant entre 3 h et 24 h. Pour chaque concentration/volume donné, une suspension qui n'est pas irradiée a servi de contrôle. Chaque combinaison (concentration/ volume/

puissance/ durée) a été répétée à trois reprises afin d'avoir une idée de la variabilité.

Pour le naproxène, les deux montages (fragmentation verticale et latérale) ont été étudiés. Pour le DPB, seulement le montage vertical a été utilisé. Les suspensions de naproxène préparées dans la solution de poloxamer (0,8% [1]) ont été comparées avec les suspensions dans l'eau pure pour les conditions de 2 mL et de 10 mL à une concentration de 0,5 mg/mL.

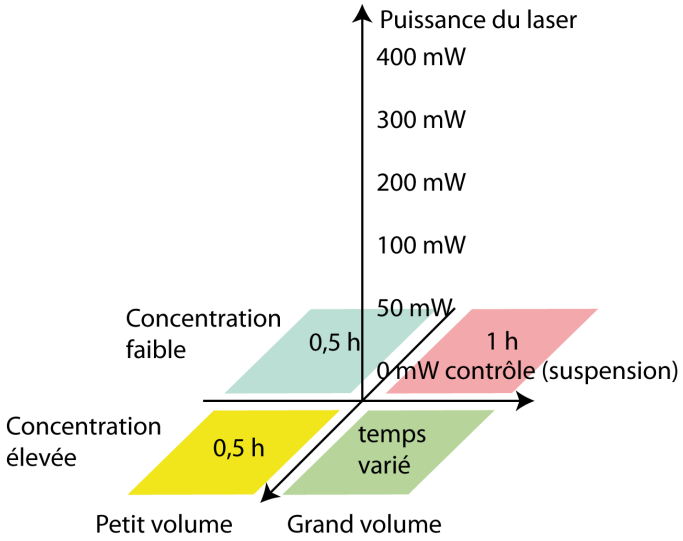

Figure 2.3 Les différentes combinaisons de paramètres étudiés

2.3 Systèmes d'analyse et de caractérisations physico-chimiques

Les systèmes suivants ont été utilisés pour étudier la taille et la pureté :

- DLS : Malvern Zetasizer NanoSeries NanoZS. L'angle constant a été fixé à 173°. Chaque mesure a été effectuée en triplicata sur une suspension non diluée dans une cuvette jetable à faible volume à 25 °C. La taille moyenne (Z average) et la largeur de la distribution (PDI) ont été obtenues.
- HPLC : modèle de Shimadzu Liquid Chromatograph. Les colonnes utilisées étaient Eclipse XDB-C18 4,6 mm x 15 cm 3,5μ de Zorbax Columns. Le naproxène a été analysé dans une phase mobile de méthanol (75%) / acide acétique à 0,2% (v :v) (25%) à 40 °C.

1. La concentration des solutions de surfactif est calculée par poids/volume, soit 0,8 mg/mL. Idem pour les concentrations mentionnées dans les pages suivantes, sauf indication contraire. Cette concentration, considérée optimale, a été déterminée après plusieurs essais lors des études antérieures sur l'acétate de mégestrol et sur le paclitaxel. Cependant, une petite variation ($< \pm$ 10%) de la concentration de la solution du surfactif n'influence peu la taille de particule et le niveau de dégradation du médicament.

La longueur d'onde de la lampe UV était de 222 nm et le temps de rétention était de 2,87 min. Chaque suspension de naproxène a été diluée à 0,25 mg/mL dans du méthanol. Le DPB a été analysé dans une phase mobile de méthanol (75%) / eau (25%) à 25 °C. La longueur d'onde de détection était de 242 nm et le temps de rétention 5,98 min.

- LD : Horiba LA-950 particle size distribution analyzer (avec adapteur pour petits volumes (30 mL)) de Horiba Instruments, Inc. a été utilisé pour mesurer la distribution de taille du naproxène et LS 13 320 Particle Size Analyzer de Beckman Coulter pour le DPB. L'indice complexe de réfraction utilisée était 1,55 - i0,1. Le dispersant du naproxène était une solution saturée de naproxène, et celui du DPB était de l'eau désionisée. Un modèle basé sur la théorie de Mie a été utilisé pour extraire la distribution en taille sur les deux systèmes.
- SEM : Hitachi FE-MEB S-4700. La tension d'émission utilisée variait entre 1 et 3 keV avec un courant de 10-20 μA. Pour préparer l'échantillon à visualiser, une goutte de suspension a été déposée sur un substrat de silicone, et le tout a été séché pendant plus de 12 h dans un dessiccateur sous vide.

Pour analyser les proprétés physico-chimiques, les suspensions ont été lyophilisées [2] pendant au moins 72 h. Les suspensions contenant du surfactif ont été traités par ultracentrifugation [3]. Les poudres lyophilisées ont été analysées avec les systèmes suivants :

- FTIR : Bio-Rad Excalibur Series spectrometer FTS3000, avec une résolution de 4 cm^{-1} dans l'intervalle de 400-4000 cm^{-1}. La technique du bromure de potassium (KBr) a été appliquée : 2 mg de poudre de médicament mélangé avec 150 mg de KBr, et le tout broyé avec pilon et mortier. Une pastille est obtenue en compressant le mélange.
- EA : Costech ECS4010 elemental analyzer. Le pourcentage moyen des éléments C, H, N et S a été calculé sur deux replicas. Dans le cas du naproxène, l'élément O a été calculé par la soustraction (1 moins la somme des pourcentages de C, H, N, S), car la substance ne contient pas d'autres éléments. Dans le cas du DPB, la composition de (O+Cl) a été calculée de la même façon [4].
- XRD : X'Pert X-ray PANAlytical diffractometer. La méthode d'angle rasant a été utilisée ($\omega = 2°$). Environ 10 mg-15 mg de la poudre lyophilisée (poids non contrôlé) a été analysée à une vitesse de rotation ($2\theta/s$) de 0,02° entre 5-40°.

2. La lyophilisation consiste à sublimer la glace d'un échantillon préalablement congelé. De cette façon, les particules sont séchées tout en conservant la même morphologie que dans la suspension avant la congélation.

3. Nettoyage par ultracentrifugation : 17400 g, 15 min. Le surnageant est remplacé par l'eau désionisée. Ce nettoyage a été répété trois fois.

4. Le DPB contient l'élément Cl (chlore). Par la soustraction, il n'est pas possible de distinguer la présence de chlore par rapport à celle de l'oxygène.

– DSC : Perkin Elmer DSC 7. Entre 1,5 et 2 mg d'échantillons ont été enveloppés dans une capsule d'aluminium et analysés sous un flux d'azote de 20 mL/min. Les capsules d'échantillon et de la référence ont été chauffées de 25 °C à 170 °C (naproxène) ou à 210 °C (DPB), à une vitesse de 5 ou 10 °C/min respectivement.

2.4 Bilan de masse

Le bilan de masse (mesure de la teneur) a été effectué comme méthode complémentaire à la pureté chromatographique. Pour ce faire, le méthanol a été rajouté directement dans la suspension après le traitement au laser et le mélange a été bien agité pour une dissolution complète. La concentration du mélange a été ensuite mesurée par le HPLC selon une courbe de calibration ($R^2 > 0{,}99$) [5].

2.5 Broyage mécanique

Pour fin de comparaison, des échantillons de référence ont été produits par broyage humide, grâce au montage présenté à la figure 2.4. Pour évaluer la performance de la technique laser par rapport à celle du broyage humide, trois échantillons avec du naproxène en faible quantité ont été testés. 100 mg de naproxène et 5 mL de billes ont été mélangés dans trois bouteilles de 20 mL. Le milieu liquide contenu dans les trois bouteilles était 5 mL de solution (dans l'eau désionisée) de poloxamer 188 (1%), de poloxamer 188 (1%) + SDS (0,2%) et de hydroxypropyl cellulose (HPC) (SL) (1%) respectivement. Toutes les bouteilles ont été mises en rotation pendant 48 h à une vitesse de 200 rpm.

Pour le test de dissolution, deux suspensions de naproxène en plus grande quantité ont été broyées en milieu aqueux de façon suivante : une bouteille de 30 mL avec 10 mL de billes, 150 mg de médicament et 7,5 mL de solution aqueuse de poloxamer 188 (0,8%). La rotation était fixée à 70 rpm pendant 72 h. Toutes les suspensions après le broyage ont été récupérées à l'aide d'une seringue et filtrées avec un filtre de 1,0 μm. Les particules broyées ont été nettoyées par centrifugation (cf. note 3, p. 48) précédant les analyses au SEM et au XRD.

Pour le DPB, les conditions de broyage humide sont les mêmes que celles relatives au naproxène pour le test de dissolution [6]. Le DPB a été broyé pour confirmer que le contact

5. Concentrations utilisées pour les points standards sont : 0,1-0,4 mg/mL à intervalle 0,05 mg/mL pour le naproxène (7 points) et 0,02-0,1 mg/mL à intervalle 0,02 mg/mL pour le DPB (5 points).

6. C'est la condition utilisée par Sylvestre *et al.* (64) : 150 mg de médicament, 10 mL de billes et 7,5 mL de solution de poloxamer (0,8%) dans une bouteille de 30 mL, mise en rotation pendant 72 h à une vitesse de 70 rpm.

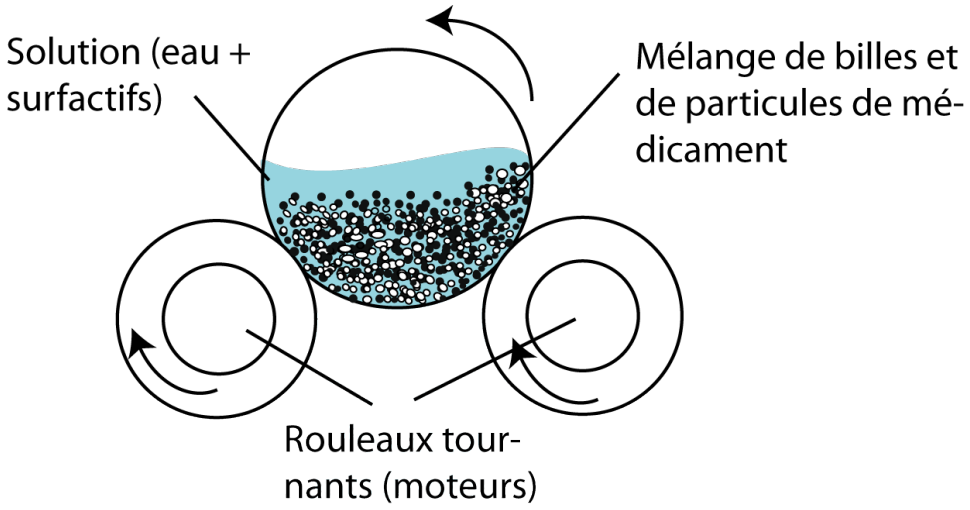

Figure 2.4 Montage simplifié du broyage humide à billes utilisé comme référence

avec l'eau peut créer une forme hydrate du médicament (cf. section 4.4.1, p. 71).

2.6 Test de dissolution

Les études sur la performance *in vitro* ont été réalisées en utilisant l'appareil Distek 2100A avec la méthode de USP Apparatus 2 (pale). La vitesse a été fixée à 50 rpm et la température du bain à 22 ± 1 °C [7]. Le milieu de dissolution consiste en 900 mL d'eau désionisée. La poudre originale du naproxène, une nanosuspension produite par broyage mécanique et une autre par fragmentation laser ont été testées. Toutes les suspensions ont été préparées dans une solution de poloxamer 188 (0,8%). La quantité déposée au départ correspond à 5 mg de naproxène, et à chaque intervalle de temps, un prélèvement de 1 mL du milieu a été filtré (diamètre = 0,02 μm). La concentration a été ensuite déterminée par HPLC. Les expériences ont été effectuées en duplicata et la condition « sink » a été respectée.

7. La température a été fixée à 22 °C pour mieux évaluer la cinétique de dissolution. À 37 °C, la dissolution a été trop rapide pour observer une différence évidente entre les nanosuspensions et la suspension non broyée.

CHAPITRE 3

NANONISATION PAR FRAGMENTATION LASER DU NAPROXÈNE

3.1 Criblage : taille et pureté chromatographique

Dans cette partie, les résultats de la taille des particules du naproxène et leur niveau d'impureté après la fragmentation sont présentés. Le naproxène a été évalué :

- après fragmentation par laser dans l'eau pure ;
- en utilisant une faible énergie à longue durée ;
- en rajoutant un agent stabilisant dans le milieu ;
- en ayant recours à deux montages laser différents.

3.1.1 Effets du laser : l'augmentation de l'énergie émise entraîne la diminution de taille et de pureté des particules

Le tableau 3.1 présente la taille des particules, la polydispersité (PDI) (mesurées par DLS) et le pourcentage d'impureté chromatographique (mesuré par HPLC). Les contrôles sont des suspensions préparées et soniquées de la même façon, mais sans aucun traitement au laser. La fragmentation a été réalisée par le montage vertical. Selon ce tableau, on peut conclure que la taille des particules est réduite lorsque la puissance du laser augmente, mais le pourcentage d'impureté augmente également. La condition correspondant à 2,5 mg/mL présente une variation de taille relativement importante, probablement due à une agitation insuffisante pour cette concentration élevée.

La nanonisation conventionnelle du naproxène est le broyage mécanique en milieu humide, qui consiste à casser les particules par le contact avec des billes lors de la rotation durant de longues heures. De cette façon, l'énergie reçue par les particules est relativement faible. Le tableau 3.2 montre les résultats obtenus par une fragmentation laser à une (relativement) faible énergie pendant plusieurs heures. La taille micro/nanométrique a été obtenue, mais il ne semble pas y avoir d'amélioration significative quant à la quantité d'impureté par rapport à des traitements plus courts à énergie plus élevée.

Les conditions (a) 0,5 mg/mL, 2 mL, 30 min, 400 mW ; (b) 0,5 mg/mL, 10 mL, 1h, 250 mW et (c) 2 mg/mL, 10 mL, 12h, 50 mW ont été sélectionnées [1] pour des études plus détaillées.

1. La condition (a) produit la plus petite taille de particules nanométriques. La dégradation de cette

La condition (a) représente la nanonisation, les conditions (b) et (c) la micronisation.

Tableau 3.1 Taille et pourcentage d'impureté chromatographique du naproxène fragmenté dans l'eau pure. (Valeur moyenne ± écart-type ; n = 3.)

Condition	**Puissance** (mW)	**Taille moyenne** (nm)	**PDI**	**Impureté** (%)
suspension sans traitement laser	0	4570 ± 2070	0,6 ± 0,3	1,2 ± 0,4
0,5 mg/mL, 2 mL, 30 min	50	1060 ± 170	0,5 ± 0,2	3,0 ± 0,4
	100	960 ± 330	0,4 ± 0,2	2,3 ± 0,4
	250	560 ± 120	0,3 ± 0,1	4,5 ± 2,0
	400 **(a)**	500 ± 100	0,3 ± 0,1	7,3 ± 3,2
2,5 mg/mL, 2 mL, 30 min	50	2980 ± 1720	0,7 ± 0,3	1,4 ± 0,2
	100	2000 ± 990	0,5 ± 0,2	1,7 ± 0,4
	250	1040 ± 620	0,8 ± 0,2	2,7 ± 1,2
	400	1380 ± 1240	0,5 ± 0,2	2,7 ± 2,0
0,5 mg/mL, 10 mL, 1 h	50	3920 ± 2020	0,8 ± 0,3	1,2 ± 0,4
	100	3010 ± 1100	0,7 ± 0,3	1,5 ± 0,7
	250 **(b)**	1100 ± 380	0,5 ± 0,3	1,9 ± 0,6
	400	760 ± 180	0,4 ± 0,1	2,5 ± 0,3

Tableau 3.2 Taille et pourcentage d'impureté chromatographique du naproxène fragmenté à 2 mg/mL, 10 mL. (Valeur moyenne ± écart-type ; n = 3.)

Condition	**Durée** (h)	**Taille moyenne** (nm)	**PDI**	**Impureté** (%)
50 mW	6	970 ± 70	0,4 ± 0,1	2,1 ± 0,2
50 mW	12 **(c)**	810 ± 150	0,6 ± 0,2	2,5 ± 1,2
100 mW	3	1130 ± 170	0,4 ± 0,1	1,8 ± 0,1
25 mW	24	1000 ± 370	0,4 ± 0,1	2,0 ± 0,3

condition est la plus élevée (le « pire scénario »), ce qui permet d'identifier au maximum les transformations physicochimiques par la suite. Les conditions (b) et (c) produisent toutes les deux des microparticules, car selon les expériences empiriques, une taille moyenne de 1 μm mesurée par DLS correspond plutôt une distribution de 1-5 μm par LD.

3.1.2 Effet du milieu aqueux : l'ajout d'un surfactif apporte peu d'amélioration

Le tableau 3.3 montre les résultats du naproxène fragmenté selon les mêmes paramètres que le tableau 3.1 dans un milieu de solution de poloxamer 188 (0,8% dans l'eau désionisée). La tendance est semblable à celle observée dans l'eau pure. On remarque que la majorité des conditions ont une distribution en taille (valeur moyenne ± l'écart-type) similaire, et l'ajout du surfactif n'apporte pas d'amélioration évidente. Dans certains cas, la taille moyenne et le niveau d'impureté sont plus élevés pour les échantillons avec surfactif. Tenant compte du nombre d'échantillons (n = 3) et la grande variation, il est difficile de quantifier statistiquement la différence entre les échantillons avec ou sans surfactif.

Dans le cas du broyage mécanique, la présence d'un surfactif est obligatoire afin de diminuer la tension de surface entre les particules, qui autrement vont s'agglomérer. Dans le cas de la fragmentation laser, les particules produites semblent stables contre l'agglomération [2], que ce soit avec ou sans surfactif, ce qui suggère que l'interaction entre le laser et les particules a possiblement modifié la surface des particules (en les rendant plus hydrophiles) et les a ainsi stabilisées. Ce point sera revisité plus tard dans le mémoire.

3.1.3 La direction du faisceau laser incident (verticale ou latérale) a peu d'effet

Le tableau 3.4 dévoile les résultats obtenus par le montage latéral. Le foyer du laser a été placé au milieu des parois en avant et en arrière. Aucune amélioration sur la taille ou sur l'impureté n'est observée (de façon qualitative). Le type de montage a peu d'effet sur la performance de la fragmentation. Encore une fois, quantifier la différence statistique est difficile, dû au faible nombre d'échantillons et à la grande variation des valeurs. Le montage vertical a été choisi pour continuer l'étude car il ne nécessite pas d'alignement avant le procédé [3]. Il est à noter que pour des applications où un laser à haute puissance est utilisé, par exemple un laser nanoseconde (voir (64)), il peut être avantageux d'utiliser un montage avec un faisceau incident latéral afin d'éviter les éclaboussures du liquide sur la surface de la suspension.

2. Selon des observations visuelles et des mesures par DLS des échantillons fragmentés et entreposés pendant plus que 6 mois. Cependant, outre que la mesure de taille par DLS et de l'impureté par HPLC, aucune étude quantitative n'a été effectuée pour évaluer la stabilité des particules fragmentées.

3. Dans le tableau 3.4, les impuretés sont relativement plus élevées que celles dans le tableau 3.1, mais avec plus de variations . Cela pourrait être dû à un mauvais alignement du laser.

Tableau 3.3 Taille et pourcentage d'impureté chromatographique du naproxène fragmenté dans une solution de poloxamer. (Valeur moyenne ± écart-type ; n = 3.)

Condition	**Puissance** (mW)	**Taille moyenne** (nm)	**PDI**	**Impureté** (%)
suspension sans traitement laser	0	5600 ± 1930	0,6 ± 0,3	1,1 ± 0,2
0,5 mg/mL, 2 mL, 30 min	50	1050 ± 130	0,3 ± 0,0	3,1 ± 0,6
	100	1000 ± 200	0,3 ± 0,1	2,6 ± 0,7
	250	1280 ± 740	0,4 ± 0,3	2,6 ± 0,8
	400	680 ± 220	0,2 ± 0,1	7,0 ± 5,5
2,5 mg/mL, 2 mL, 30 min	50	2310 ± 1020	0,4 ± 0,2	1,3 ± 0,1
	100	1550 ± 270	0,4 ± 0,1	2,1 ± 0,3
	250	1520 ± 860	0,4 ± 0,1	2,1 ± 0,6
	400	1040 ± 290	0,3 ± 0,1	3,2 ± 2,0
0,5 mg/mL, 10 mL, 1 h	50	2750 ± 970	0,5 ± 0,3	1,3 ± 0,5
	100	1680 ± 230	0,4 ± 0,2	1,4 ± 0,2
	250	980 ± 100	0,3 ± 0,1	2,0 ± 0,4
	400	880 ± 100	0,3 ± 0,0	2,5 ± 0,1

Tableau 3.4 Taille et pourcentage d'impureté chromatographique du naproxène fragmenté par le montage latéral. (Valeur moyenne ± écart-type ; n = 3.)

Condition	**Puissance** (mW)	**Taille moyenne** (nm)	**PDI**	**Impureté** (%)
0,5 mg/mL, 2 mL, 30 min	50	1340 ± 220	0,5 ± 0,1	4,4 ± 2,2
	100	1500 ± 940	0,6 ± 0,2	6,7 ± 6,1
	250	540 ± 100	0,4 ± 0,1	8,6 ± 6,0
	400	710 ± 210	0,5 ± 0,2	5,8 ± 2,4

3.2 Vérification de la taille des particules

Les particules de naproxène ont été produites en plus grande quantité selon les conditions sélectionnées (a) 0,5 mg/mL, 2 mL, 30 min, 400 mW ; (b) 0,5 mg/mL, 10 mL, 1h, 250 mW et (c) 2 mg/mL, 10 mL, 12h, 50 mW. Ces particules ont été ensuite analysées par LD et SEM afin de vérifier leur taille, mesurée précédemment par la DLS.

3.2.1 Les analyses par LD montrent que la taille est réduite à l'échelle micro/nanométrique

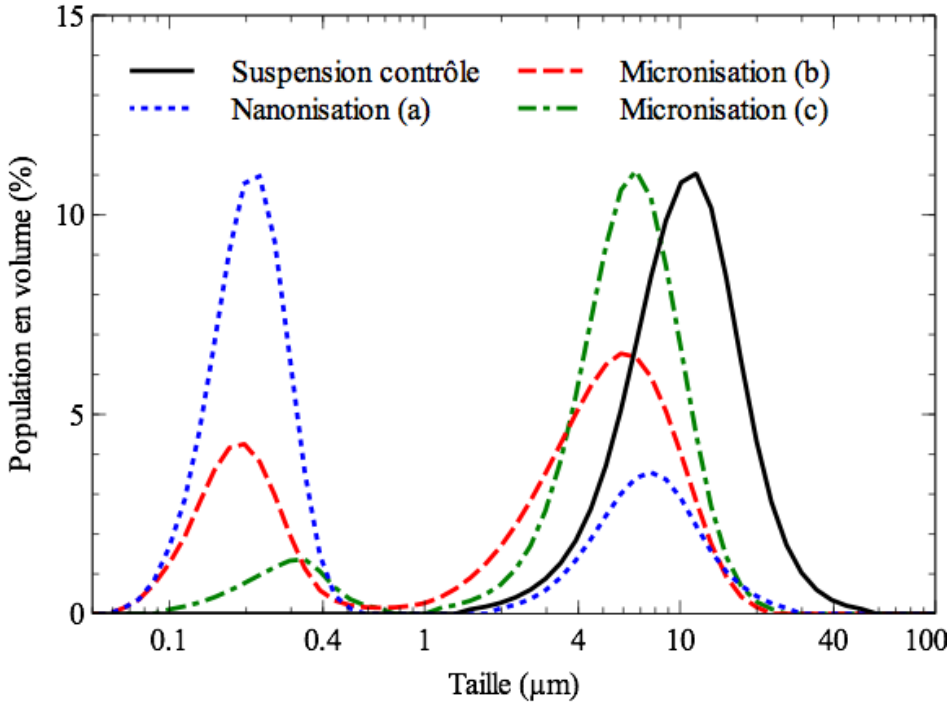

Figure 3.1 Distribution de taille des particules de naproxène par LD

La figure 3.1 montre la distribution de la taille des particules mesuré par l'appareil LD d'Horiba. La taille de la suspension de contrôle sans traitement laser est centrée à environ 10 μm, et une distribution de 1 à 50 μm. Selon le graphique, les particules micro/nanométriques ont été produites dans des conditions différentes de fragmentation. La technique confirme qu'un pourcentage significatif de nanoparticules est obtenu dans la condition (a). On remarque aussi que la distribution démontre un profil bimodal. Cette bimodalité est souvent

présente durant un procédé de broyage mécanique [4], mais peut aussi être expliquée par le fait que l'agitation par le barreau magnétique n'étant pas complètement homogène, une partie des particules a possiblement eu plus de passages sous l'irradiation laser, ainsi a une taille plus réduite.

Toutefois, la LD estime la distribution de taille par des calculs basés sur la diffusion de la lumière par des particules. Des particules produites selon la condition (c) ont été également analysées par l'appareil LD de Beckman Coulter et ont démontré une distribution unimodale centrée à 1-2 μm avec un intervalle entre 0,4 et 10μm. Cette différence par rapport à la figure ci-dessus pourrait être causée par une différence entre les modèles mathématiques utilisées par les deux appareils. De plus, le milieu étant l'eau sans surfactif, il est possible que les particules, après la nanonisation par laser, soient agglutinées et forment de plus « grosses » particules du point de vue de l'appareil. Ainsi, il est difficile de tirer une conclusion en se basant seulement sur la figure 3.1. D'autres analyses avec la SEM aideront à évaluer la distribution de la taille.

3.2.2 Les micrographes confirment que la taille ciblée est atteinte

Selon la SEM, la majorité des microparticules produite par la fragmentation laser a une taille entre 0,5 et 5 μm, et la taille des nanoparticules produite est majoritairement inférieure à 1 μm. Dans la figure 3.2, page 57, (i) montre que la taille des particules de la poudre orginale est de l'ordre de 10 μm, (ii)-(iv) montre les particules fragmentées selon les trois conditions de fabrication (a)-(c).

On remarque aussi que dans la figure 3.2, le contour des particules nanonisées (ii) et micronisées (iii), qui ont subi une fragmentation à haute énergie pendant une courte durée, est plus irrégulier par rapport à celui dans (i) et (iv). Cela suggère qu'une amorphisation peut être causée par la chaleur locale pendant la décharge d'énergie lors des intéractions laser-matière. Les données quantitatives seront présentées dans la prochaine section (cf. section 3.4.4, p. 61) sur cette amorphisation induite.

4. Il existe une taille minimale accessible par la technique de broyage, dépendamment de la dureté des particules de médicament (1). Généralement, le pourcentage des grosses particules réduit lorsque le temps de broyage augmente, jusqu'à ce que finalement la distribution devienne unimodale.

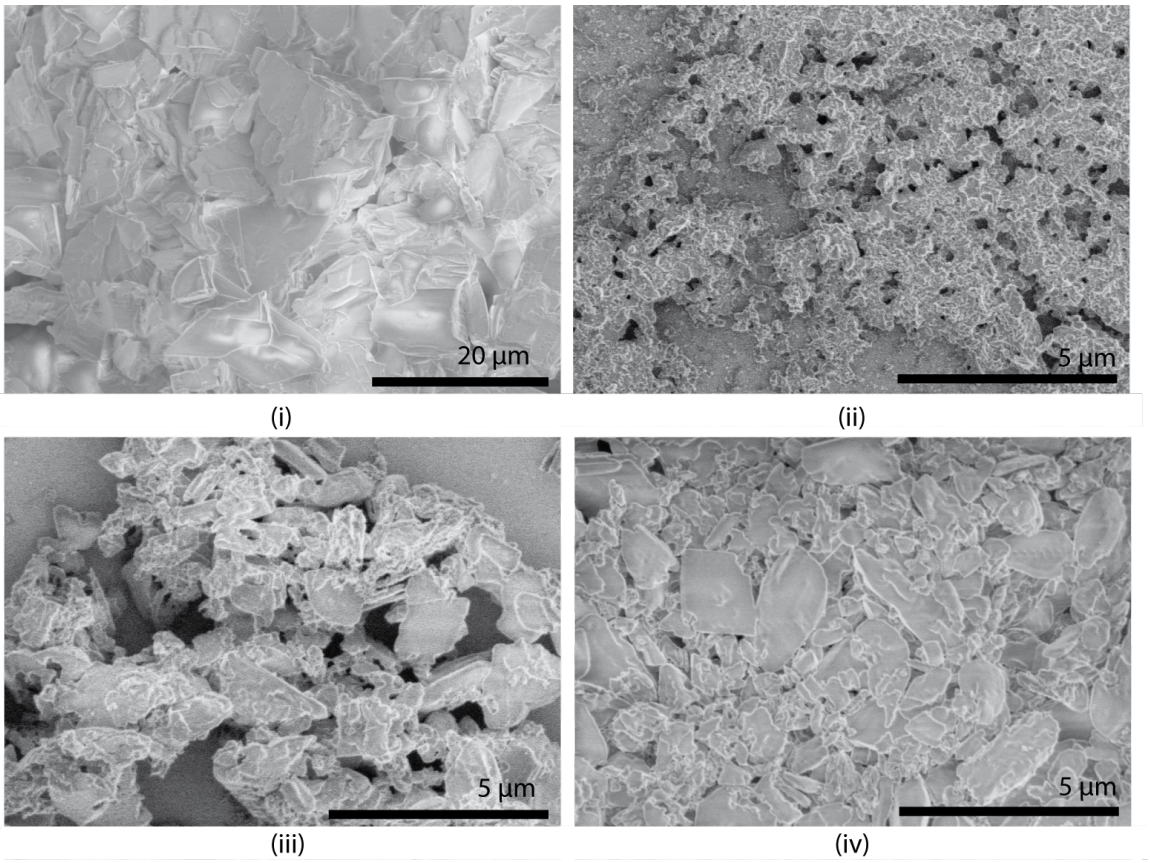

Figure 3.2 Électromicrographes du naproxène : (i) Naproxène en suspension sans traitement ; (ii) Naproxène nanonisé (condition **a**) ; (iii) Naproxène micronisé (condition **b**) ; (iv) Naproxène micronisé (condition **c**).

3.3 Le test en teneur indique que la dégradation pourrait être plus élevée

La teneur déterminée par un bilan de masse est présentée au tableau 3.5. On remarque que les dégradations sont plus élevées que les pourcentages d'impuretés obtenus par la HPLC. Il est possible que certains produits de dégradation insolubles dans le méthanol ne soient pas détectés par la chromatographie. Ce phénomène avait été également observé pour l'acétate de megestrol (64).

On remarque que l'écart-type de la condition (c) est relativement élevé. Il semble que la profondeur du foyer du faisceau laser dans la suspension a un impact important sur la performance de la fragmentation laser, surtout lorsqu'il s'agit d'une fragmentation à longue durée (12 h). Durant le projet, il était difficile de calibrer cette profondeur afin d'évaluer son influence.

Tableau 3.5 Teneur mesurée par bilan de masse. (Valeur moyenne ± écart-type ; n = 2.)

Conditions de fragmentation	**Teneur** (%)
Nanonisation (cond. **a** : 0,5 mg/mL ; 2 mL ; 400 mW ; 30 min)	77,2 ± 2,6
Micronisation (cond. **b** : 0,5 mg/mL ; 10 mL ; 250 mW ; 1 h)	92,0 ± 1,7
Micronisation (cond. **c** : 2 mg/mL ; 10 mL ; 50 mW ; 12 h)	91,2 ± 9,0

3.4 Propriétés physico-chimiques

3.4.1 L'analyse par FTIR suggère qu'une oxydation peut avoir eu lieu lors de la fragmentation

La figure 3.3 met en évidence une augmentation de la bande O-H vers 3500 cm^{-1} sur la courbe des particules nanonisées (condition a), ce qui suggère qu'une oxydation a eu lieu durant le procédé. Cette modification chimique n'est cependant que peu visible dans les autres conditions. Il est à noter que l'étape de pré-traitement des suspensions dans l'eau (ultrasonication et agitation) induit déjà une légère oxydation (visible par la légère augmentation vers 3500 cm^{-1} de la courbe « suspension sans traitement » par rapport à la courbe de la « poudre originale »). L'intervalle entre 2000 - 500 cm^{-1} correspond à la région d'empreinte (« footprint region ») de la substance et ne présente pas de modification importante par rapport à la poudre originale, sauf dans le cas des nanoparticules, où les spectres semblent être superposés sur un plateau entre 1500 et 800 cm^{-1}. Cela suggère la présence possible d'impuretés, qui sont cependant difficiles à identifier [5].

5. Une augmentation du « bruit de fond » a aussi été observée pour l'acétate de mégestrol. Des efforts ont été faits pour l'identifier les produits d'impureté dans le cas de l'acétate de mégestrol (64) mais sans résultats convaincants (cf. section 5.1.3, p. 79).

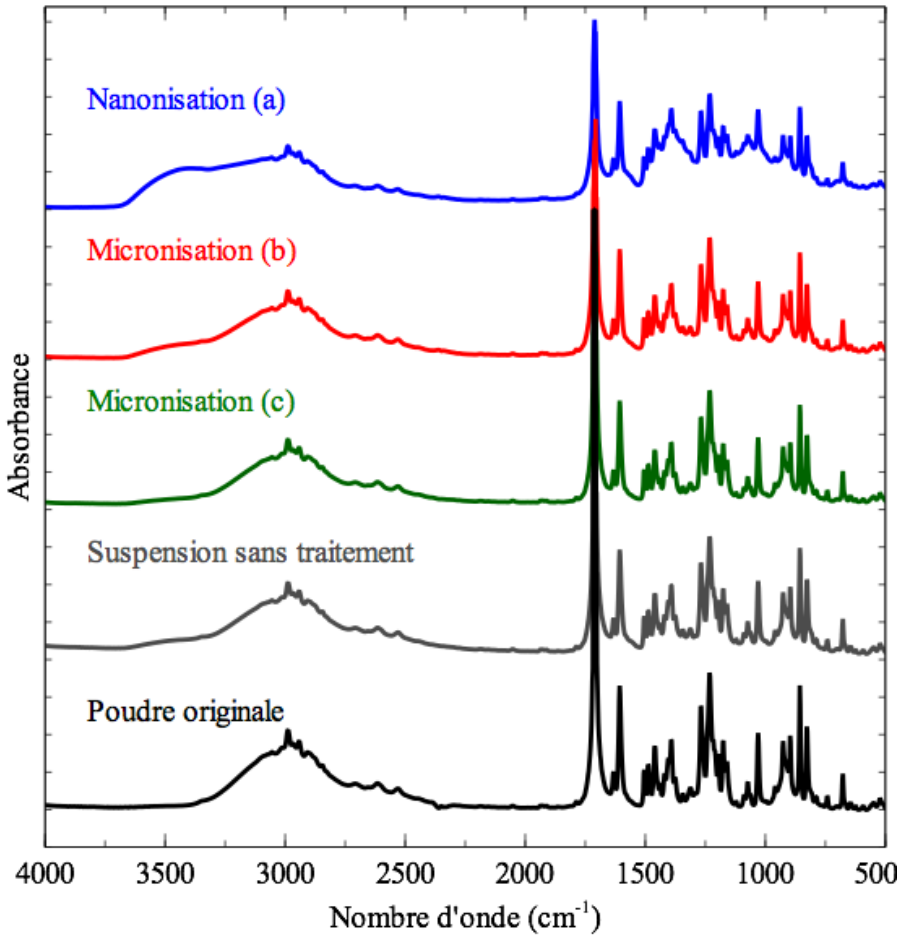

Figure 3.3 Analyse par FTIR du naproxène : l'augmentation vers 3500 cm^{-1} pour la nanonisation (a) suggère une oxydation ; les conditions de micronisation ne démontrent aucun changement apparent.

3.4.2 Confirmation de l'oxydation induite lors du procédé laser par EA

Les données présentes dans le tableau 3.6 indiquent une augmentation du rapport oxygène (O) / carbone (C) pour les échantillons traités selon les conditions a et b, alors que le ratio hydrogène (H)/ carbone (C) reste identique pour tous les échantillons. Cela signifie que la présence de l'élément oxygène a augmenté dans les deux échantillons (cond. a et b). Ici encore, l'étape d'homogénisation dans l'eau (ultrasonication et agitation) semble une source d'oxydation car la suspension sans traitement contient plus d'oxygène (O/C = 0,32) que la poudre originale (O/C = 0,29).

Tableau 3.6 Composition chimique du naproxène par EA

Conditions de fragmentation	C	H	H/C	O/C
Poudre originale	72,9	6,1	0,08	0,29
Suspension contrôle	72,7	6,1	0,08	0,32
Nanonisation (cond. **a**)	63,4	5,3	0,08	0,49
Micronisation (cond. **b**)	68,5	5,9	0,08	0,37
Micronisation (cond. **c**)	72,3	5,8	0,08	0,31

3.4.3 L'analyse par rayons X indique la conservation de la phase cristalline

La structure cristalline du médicament semble être conservée entièrement après le procédé laser. Tous les échantillons contiennent des phases atomiques identiques, représentées par les pics dans la figure 3.4.

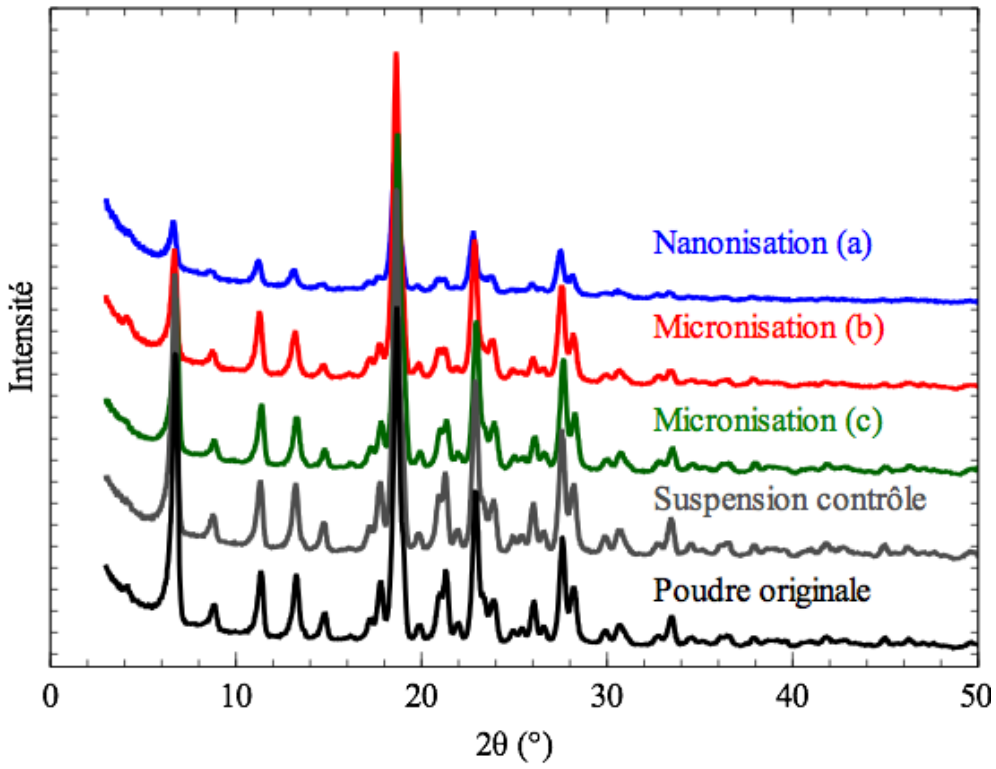

Figure 3.4 Analyses par XRD : aucun changement notable de la phase cristalline du naproxène.

On peut remarquer que l'amplitude des pics dans la première courbe (condition a) est plus faible. Cela est dû au fait que le médicament lyophilisé était moins abondant. Pour tous les échantillons traités au laser, certains spectres, notamment à 21°, à 26° et à 33.5°, ont

une intensité relativement réduite par rapport aux pics de la suspension contrôle et de la poudre originale. Cela suggère qu'une perte partielle de cristallinité est possible. Cependant, les phases cristallines du naproxène micro/nanonisé ne sont pas modifiées, car aucun nouveau pic est apparu dans le spectrogramme des échantillons traités au laser.

3.4.4 L'analyse par calorimétrie suggère une amorphisation partielle possible

L'analyse par DSC montre que le point de fusion et l'enthalpie de fusion des échantillons traités au laser ont diminué, surtout chez le naproxène nanonisé. Cette diminution peut être causée par trois facteurs : la présence de l'impureté créée lors de la fragmentation, la réduction de la taille de particule qui résulte en un ratio surface/volume plus grand et l'amorphisation des cristaux du médicament. En tenant compte du résultat par XRD qui suggère la conservation de la phase cristalline, on peut faire l'hypothèse que cette amorphisation est partielle et se trouve sur la surface des particules. Dans les micrographes (figure 3.2), on voit que l'échantillon micronisé (condition c) semble visuellement plus cristallin (contour des particules plus net) que les autres (cond a et b), ce qui correspond à son enthalpie relative plus élevée (81%) que celle des deux autres (68% et 24%).

Tableau 3.7 Caractéristiques thermales du naproxène par DSC

Conditions	**Point de fusion** (°C)	**Enthalpie de fusion** (J/g)	**Enthalpie relative** (%)
Poudre originale	153,7 ± 0,1	141,0 ± 3,4	100
Suspension contrôle	150,8 ± 1,3	123,3 ± 8,9	87
Nanonisation (cond. **a**)	127,6 ± 1,3	33,2 ± 7,1	24
Micronisation (cond. **b**)	144,2 ± 0,1	96,0 ± 2,2	68
Micronisation (cond. **c**)	149,9 ± 2,1	114,4 ± 14,5	81

3.5 Comparaison avec le broyage mécanique

Le naproxène a été broyé dans trois milieux différents par broyage humide pour servir de référence. Les particules obtenues par le broyage mécanique ont toutes une taille sous-micrométrique (tableau 3.8), avec une distribution de taille (PDI $< 0{,}2$) plus étroite que celle obtenue par la fragmentation laser (PDI $> 0{,}3$). La pureté ($> 98\%$) correspond à la pureté garantie du produit. La figure 3.5 présente les nanoparticules de naproxène broyé dans la solution de poloxamer 188 (1%) (première condition dans le tableau 3.8. On observe que les particules sont plus uniformes et avec un contour particulaire plus régulier que par la fragmentation laser (cf. figure 3.2, p. 57, (ii)). Cela peut être expliqué de deux façons :

premièrement, dans le broyage humide, le mélange continuel avec des billes « polit » les particules du médicament ; deuxièmement, lors de la fragmentation, l'irradiation laser des particules peut créer des « nanoexplosions », qui sont sources de la forme irrégulière des micro/nanoparticules de médicament produites.

Tableau 3.8 Taille et pureté du naproxène broyé après 48 h à 200 rpm. (Valeur moyenne ± écart-type ; n = 1.)

Surfactifs	**Taille moyenne** (nm)	**PDI**	**Impureté** (%)
Poloxamer 188 (1%)	255 ± 3	0,12 ± 0,03	1,2
Poloxamer 188 (1%) + SDS (0,2%)	290 ± 5	0,13 ± 0,01	2,0
HPC (1%)	437 ± 11	0,19 ± 0,05	1,4

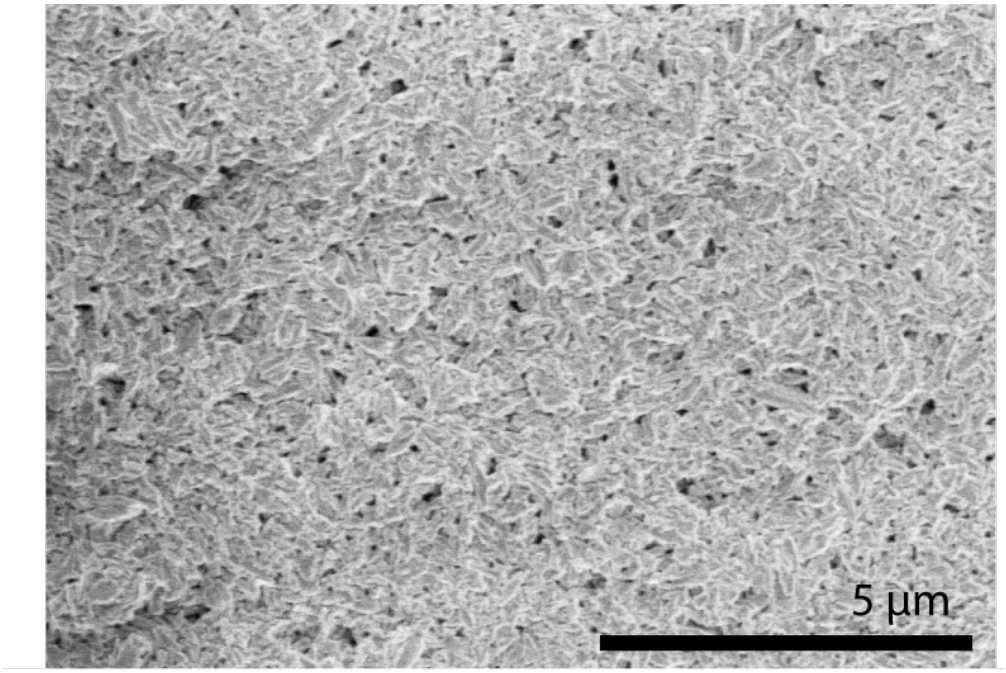

Figure 3.5 Nanoparticules produites par broyage mécanique dans une solution de poloxamer 188.

Il est difficile de comparer les changements physico-chimiques entre les particules broyées mécaniquement et celles fragmentées au laser. En effet, dans le cas du broyage mécanique, les particules et les molécules du surfactif sont mélangées. Ainsi, le lavage par centrifugation et resuspension est nécessaire. Pendant le lavage, lorsque la présence des molécules du surfactif

diminue, les particules de médicaments ont tendance à s'agglomérer, ce qui les rend plus difficiles à resuspendre. Par conséquent, la présence du surfactif est toujours possible et non quantifiable. Les résultats obtenus par des méthodes de caractérisation physico-chimiques ne sont donc pas fiables.

3.6 Test *in vitro* de la cinétique de dissolution

Le naproxène nanonisé par la fragmentation laser a une cinétique de dissolution similaire à celle des nanoparticules par le broyage humide. La figure 3.6 montre que 97% des nanosuspensions préparées des deux façons sont dissoutes après 15 min, alors que seulement 76% de la suspension originale sans micro/nanonisation est dissoute après 15 min et 91% après 1 h. La cinétique de dissolution des nanosuspensions est nettement meilleure que celle du médicament original. Cette tendance avait été observée pour l'acétate de mégéstrol (64), et une augmentation de la biodisponibilité chez le rat avait ensuite été observée.

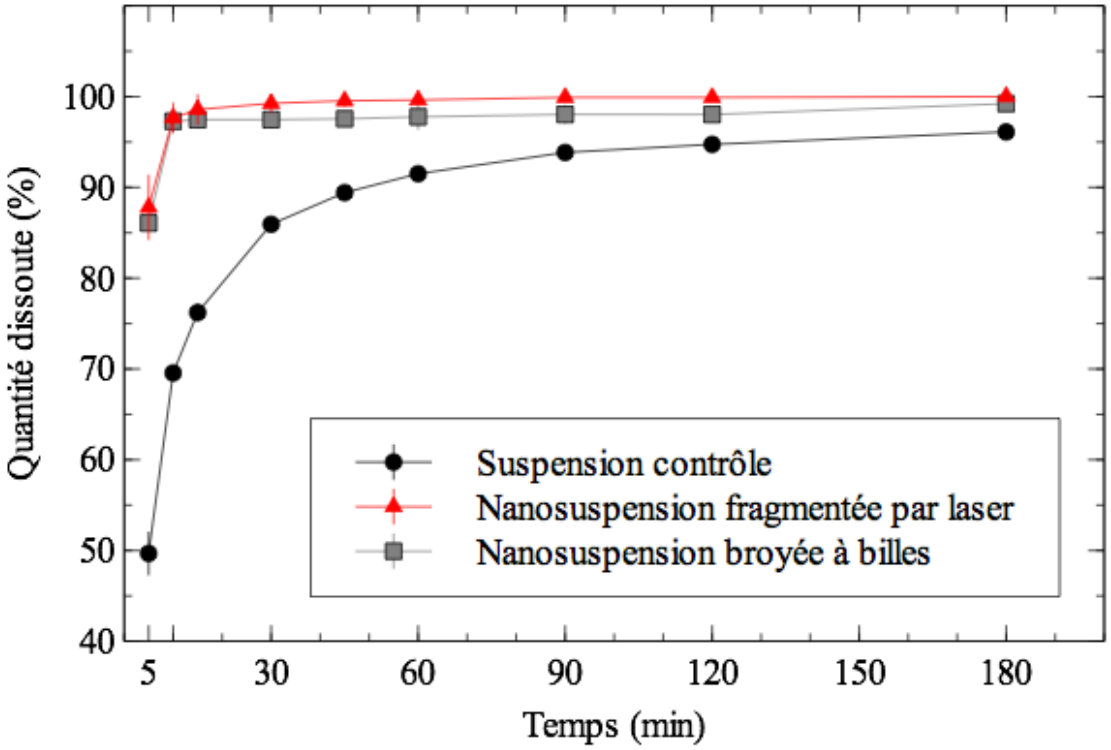

Figure 3.6 La cinétique de dissolution des nanosuspensions.

3.7 Conclusion : nanonisation par laser femtoseconde

Dans ce chapitre, les résultats du criblage, la taille, la dégradation et les analyses des propriétés physico-chimiques des particules de naproxène fragmentées, ainsi qu'une comparaison avec la technique de référence ont été présentés. Plusieurs conclusions peuvent être tirées selon différents aspects.

D'un point de vue technique, le montage (vertical ou horizontal) n'a pas d'impact important sur la performance de la fragmentation. L'ajout d'un surfactif n'apporte pas d'amélioration évidente au niveau de la taille, la dégradation ou de la stabilité à court terme (pendant quelques mois [6]). La puissance du laser, la durée de traitement et la quantité de naproxène dans la suspension sont cependant des facteurs déterminants de la taille et de la pureté des particules.

Les nanoparticules de naproxène ont été produites avec succès, ce qui a été confirmé par LD et SEM. Le profil de la distribution de taille est cependant bi-modal : environs deux tiers des particules ont une taille < 500 nm, et un tiers entre 2 - 20 μm. De plus, la réduction de taille a été obtenue au détriment de la pureté des particules, qui s'élève à 5% ou plus (impureté chromatographique) ou 23% (par bilan de masse) lorsque la taille est sous-micrométrique.

La composition chimique des nanoparticules de naproxène fragmenté par le laser contient plus d'oxygène, qui forme probablement des groupements O-H. Cela suggère que le procédé laser utilisé est de nature oxydative et que les impuretés créées sont des produits d'oxydation. Ceci est en accord avec ce qui avait été trouvé pour l'acétate de mégéstrol (64) [7]. Les particules de naproxène nanonisées sont également recouvertes [8] d'une forme amorphe qui, avec

6. La taille (par DLS) et la pureté (par HPLC) des suspensions aqueuses (sans surfactif) de naproxène micro/nanonisé par laser mesurées après quelques mois de stockage dans la température ambiante sont similaires que celles obtenues peu après la fragmentation.

7. Pour le paclitaxel (63) et pour le DPB (cf. section 4.4.1, p. 71), les changements dans des spectrogrammes FTIR, XRD etc. ont été attribués à la présence d'une forme hydrate du médicament. Il n'est pas impossible que le naproxène soit également hydraté lors de la fragmentation par laser en milieu aqueux, mais les évidences ne sont pas suffisantes pour confirmer cette possibilité. Il n'existe pas de forme hydratée connue du naproxène et la phase cristalline du naproxène n'est pas modifiée (selon XRD). En revanche, les données obtenues par EA, FTIR et le niveau de dégradation élevé dans le cas de nanonisation sont des preuves convaincantes pouvant appuyer l'hypothèse que le naproxène a subit une oxydation lors du procédé.

8. On suppose que la forme amorphe et les impuretés sont sur la surface des particules, car les techniques utilisées dans ce projet ne donnent pas d'informations directes concernant la surface. Les études par la spectrométrie photoélectronique X (anglais : XPS), technique d'analyse exclusivement de la surface, ont été conduites pour l'acétate de mégéstrol, et la présence d'un produit d'oxydation à la surface a été confirmée (64). Cette technique présente cependant un coût trop élevé pour des informations limitées et peu contributives pour le projet, pour être réutilisée dans le cas du naproxène et du DPB.

les impuretés, ont contribué à la baisse du point de fusion et de l'enthalpie de fusion du médicament. La modification de la morphologie des particules visible dans les micrographes (cf. figure 3.2, p. 57) et la stabilité des suspensions micro/nanonisées par la fragmentation sans surfactif (cf. section 3.1.2, p. 53) suggèrent également que la nature chimique et la structure cristalline de la surface ont pû être modifiées. Toutefois, les phases cristallines du naproxène ont été conservées après la nanonisation par laser, ce qui suggère qu'aucune nouvelle phase n'a été créée lors du procédé laser qui pourrait éventuellement modifier la structure de base de naproxène.

Les nanoparticules produites par la fragmentation laser ont une meilleure cinétique de dissolution *in vitro*, et la courbe de dissolution (cf. figure 3.6, p. 63) ressemble à celle des nanoparticules broyées conventionnellement. Toutefois, la taille moyenne et l'impureté des nanoparticules broyées sont nettement plus faibles. Le broyage humide est une méthode de nanonisation de médicament bien établie et reste le choix par excellence. La nanonisation par fragmentation laser, par contre, permet de traiter des quantités de poudre beaucoup plus faibles (1-10 mg vs. 100-150 mg).

Cependant, les particules micronisées par la fragmentation laser sont moins dégradées et les transformations physico-chimiques sont relativement limitées par rapport à celles des nanoparticules. La micronisation par fragmentation laser semble plus prometteuse et mérite d'autres études sur des médicaments dont l'usage nécessite la micronisation. Le prochain chapitre présentera les résultats de la micronisation de DPB par fragmentation laser femtoseconde.

CHAPITRE 4

MICRONISATION PAR FRAGMENTATION LASER DU DIPROPIONATE DE BÉCLOMÉTHASONE

Pour le médicament DPB, les conditions de fabrication des micro/nanosuspensions, les études de taille et de la dégradation ainsi que les analyses des propriétés physico-chimiques sont similaires à celles effectuées pour le naproxène. Ainsi, dans ce chapitre, les résultats seront présentés avec des descriptions succintes.

4.1 Criblage : taille et pureté chromatographique

Le tableau 4.1 montre la taille et le niveau d'impureté des particules du DPB selon différentes conditions de fabrication. Comme les cristaux du DPB semblent mécaniquement plus résistants que le naproxène [1], on peut remarquer que pour une condition donnée, la taille des particules de DPB est supérieure à celle du naproxène (pour la condition (a) 0,5 mg/mL, 2 mL, 30 min, 400 mW, par exemple, la taille moyenne du naproxène est 500 ± 100 nm). La réduction de taille et la perte en pureté suivent la même tendance : plus la puissance est elevée, plus la taille est petite mais la présence d'impureté augmente également. Cependant, la création d'impureté par le procédé laser est relativement minime (< 3 %). Il faut noter que la pureté de la poudre originale ($> 99\%$) est supérieure à celle du naproxène ($> 98\%$).

On remarque aussi que pour la dernière condition (2 mg/mL, 10 mL, 50 mW, 20 h), la taille moyenne est plus élevée que la même condition pendant 16 h. Ceci est probablement dû à une sédimentation des grosses particules dans le temps. Aussi, comme indiqué dans la section de description du DPB (cf. section 1.5.2, p. 32), une forme monohydrate du DPB peut se former dans le milieux aqueux, ce qui peut éventuellement hausser la valeur mesurée de la taille moyenne. Cette forme sera discutée dans les sections suivantes.

Trois conditions de micronisation [2] ont été sélectionnées pour des études plus approfondies : (b) 0,5 mg/mL, 10 mL, 1 h, 400 mW ; (c) 2 mg/mL, 2 mL, 30 min, 400 mW ; (d) 2 mg/mL, 10 mL, 16 h, 50 mW. La condition (e) 2 mg/mL, 10 mL, 20 h, 50 mW a également été analysée pour sa taille moyenne anormale.

1. Car le point de fusion du DPB est environ 210 °C, ce qui est plus élevé que celui du naproxène, qui est autour de 170 °C.

2. Toutes les conditions ont été appelées « micronisation » car la taille moyenne se situe à 1,0 ± 0,2 μm.

Tableau 4.1 Taille et pourcentage d'impureté chromatographique du DPB fragmenté dans l'eau pure. (Valeur moyenne ± écart-type ; n = 3.)

Condition	**Puissance** (mW)	**Taille moyenne** (nm)	**PDI**	**Impureté** (%)
suspension sans traitement laser	0	7460 ± 4680	0,7 ± 0,3	0,8 ± 0,2
0,5 mg/mL, 2 mL, 30 min	50	1490 ± 170	0,3 ± 0,1	1,8 ± 0,1
	100	1260 ± 310	0,2 ± 0,1	2,1 ± 0,5
	200	1130 ± 300	0,3 ± 0,1	2,2 ± 0,7
	300	1090 ± 220	0,3 ± 0,1	2,5 ± 0,5
	400 **(a)**	1010 ± 200	0,2 ± 0,1	2,7 ± 0,5
0,5 mg/mL, 10 mL, 1 h	50	1610 ± 200	0,4 ± 0,2	1,0 ± 0,3
	100	1430 ± 170	0,4 ± 0,1	1,4 ± 0,3
	200	1460 ± 240	0,4 ± 0,2	1,4 ± 0,1
	300	1160 ± 130	0,3 ± 0,1	1,4 ± 0,2
	400 **(b)**	990 ± 120	0,4 ± 0,1	2,1 ± 0,8
2 mg/mL, 2 mL, 30 min	50	3380 ± 2630	0,4 ± 0,3	0,8 ± 0,1
	100	1540 ± 180	0,5 ± 0,2	0,9 ± 0,1
	200	2150 ± 690	0,5 ± 0,3	0,9 ± 0,1
	300	1260 ± 310	0,5 ± 0,1	1,0 ± 0,1
	400 **(c)**	1290 ± 260	0,4 ± 0,1	1,0 ± 0,1
Condition	**Durée** (h)	Taille moyenne (nm)	PDI	Impureté (%)
2 mg/mL, 10 mL, 50 mW	6	1300 ± 300	0,6 ± 0,2	1,0 ± 0,2
	12	1010 ± 310	0,6 ± 0,1	1,2 ± 0,3
	16 **(d)**	880 ± 260	0,6 ± 0,1	1,6 ± 0,6
	20 **(e)**	1490 ± 830	0,7 ± 0,2	1,6 ± 0,6

4.2 Taille des particules par LD et SEM

La figure 4.1 montre la distribution de taille obtenue par la LD à différentes conditions. Les figures 4.2 et 4.3 présentent les micrographes des particules de DPB micronisées par la fragmentation laser.

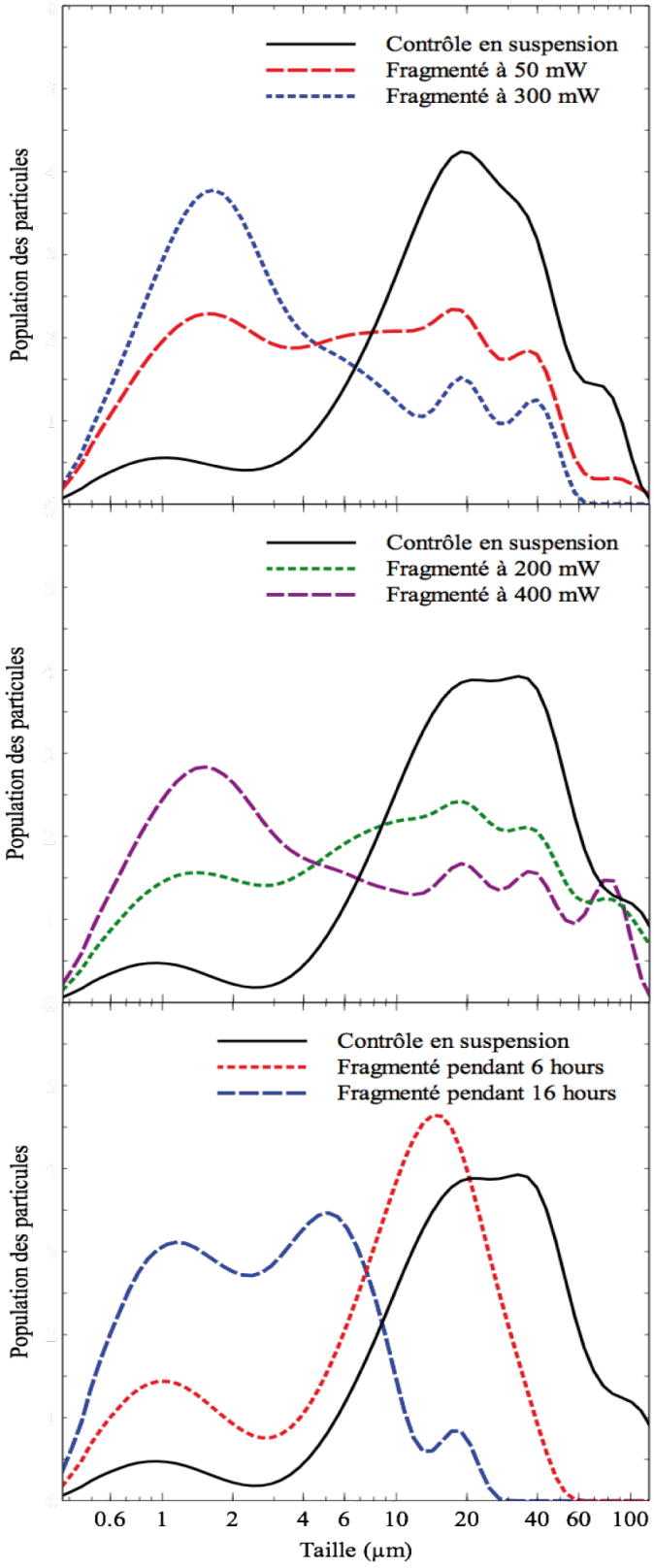

Figure 4.1 Distribution de taille du DPB après fragmentation laser sous diverses conditions : 0,5 mg/mL, 10 mL, 1h (en haut) ; 2 mg/mL, 2 mL, 30 min (au milieu) ; 2 mg/mL, 10 mL, 50 mW (en bas). Les pics situés à 20 et 40 μm sont des artéfacts (voir texte).

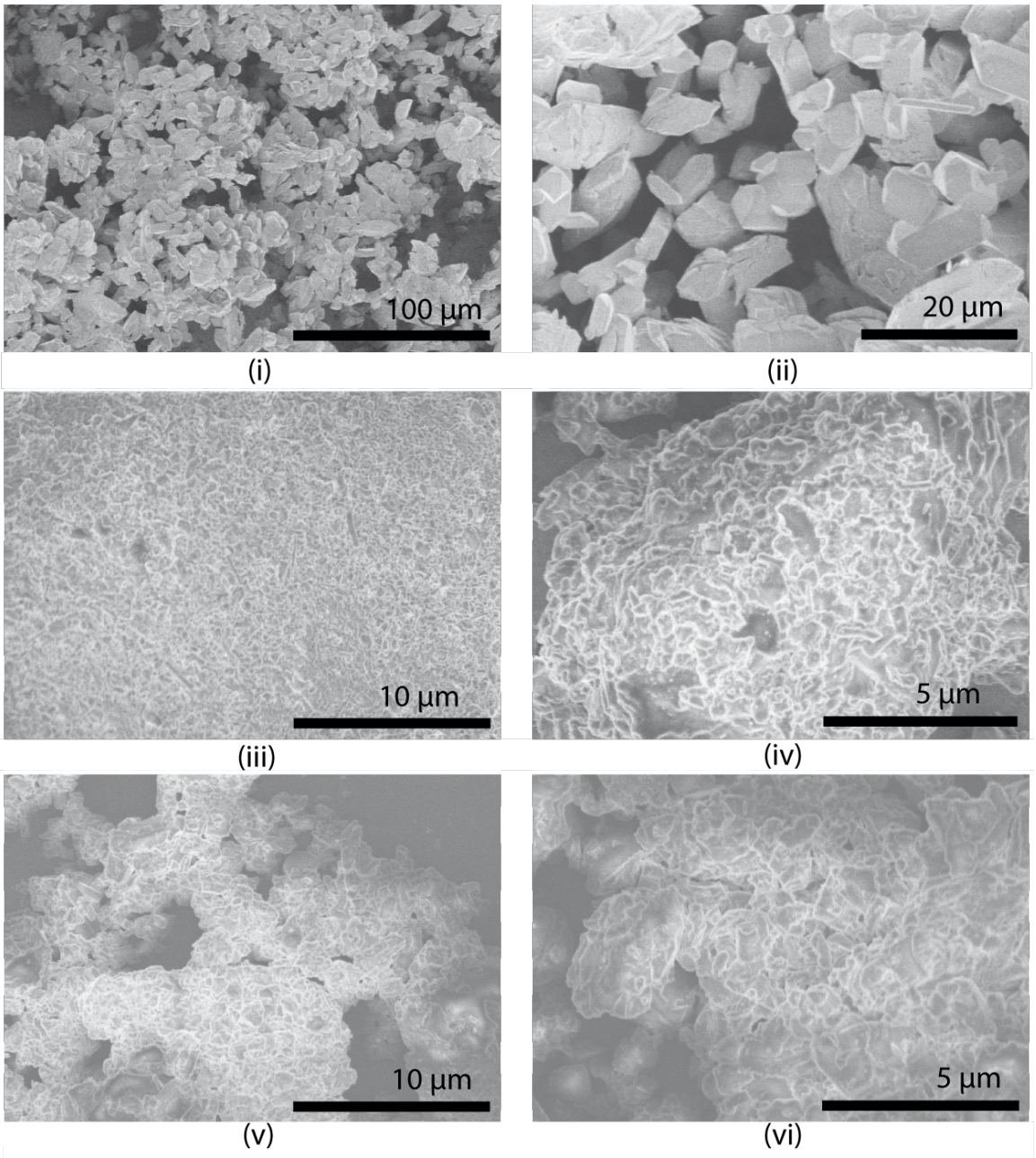

Figure 4.2 Électromicrographes du DPB : (i) et (ii) DPB en suspension sans traitement ; (iii) et (iv) DPB fragmenté sous condition **b** (0,5 mg/mL, 10 mL, 1h, 400 mW) ; (v) et (vi) DPB fragmenté sous condition **d** (2 mg/mL, 10 mL, 16h, 50 mW). Les micrographes dans la colonne à gauche (grande échelle) montrent peu de grosses particules résiduelles après le traitement au laser. Cette figure confirme que les microparticules ont été produites avec succès.

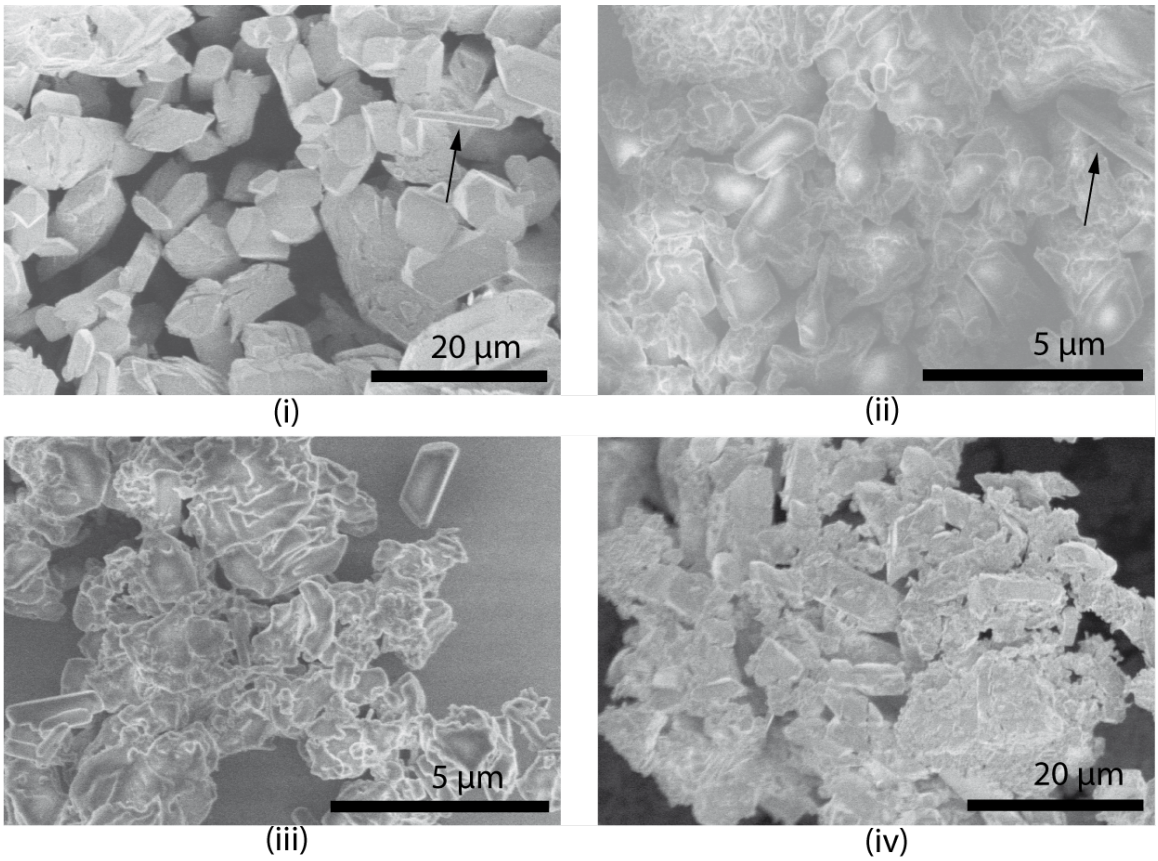

Figure 4.3 Électromicrographes du DPB des autres conditions : (i) DPB en suspension sans traitement ; (ii) DPB fragmenté sous condition **c** (2 mg/mL, 2 mL, 30 min, 400 mW) ; (iii) DPB fragmenté sous condition **a** (0,5 mg/mL, 2 mL, 30 min, 400 mW) ; (iv) DPB fragmenté sous condition **e** (2 mg/mL, 2 mL, 20 h, 50 mW). Remarque : les particules sous forme d'aiguille sont visibles dans (i) et (ii), pointées par les flèches. Cela pourrait être la forme hydratée du DPB.

Selon les résultats présentés, les particules micrométriques ont été obtenues avec succès. La distribution correspond à l'intervalle idéal recherché (0,5 - 5 μm). Dans la figure 4.1, on observe deux (ou trois) pics au niveau de 20 et de 40 μm (ou plus). Ces pics sont très probablement des artéfacts pour deux raisons. Premièrement, lors de l'analyse par SEM, une attention particulière est apportée aux particules de taille 20 ou 40 μm, qui sont cependant peu présentes dans tous les échantillons examinés. Par exemple, dans la figure 4.1, la courbe de « fragmenté 400 mW »du graphique du milieu suggère qu'il y a autant de particules > 5 μm que < 5 μm, mais la figure 4.2 (iii) et (iv), qui correspondent au même échantillon, montrent plutôt une distribution micrométrique homogène presque toutes < 5 μm. Deuxièmement, les pics de 20 et 40 μm sont également présents pour deux autres médicaments fragmentés au laser de façon récurrente. Ainsi, il est très probable que cet appareil de LD (de Beckman

Coulter) utilisé surestime les grosses particules > 5 μm. Cependant, la tendance est claire : la taille des particules diminue lors que la puissance ou la durée augmentent.

4.3 Test en teneur par bilan de masse

La teneur du DPB déterminée par un bilan de masse est présentée au tableau 4.2. On constate que le résultat est similaire que la teneur du naproxène ($\sim$ 92%) et à celle de l'acétate de mégestrol ($\sim$ 93%) obtenue après la micronisation (condition de courte durée et haute puissance) par fragmentation laser femtoseconde (64). Pour la condition où le DPB a été micronisé pendant une longue durée à faible puissance du laser (cond. d), la teneur est plus élevée [3]. La décharge d'énergie du faisceau laser à grande puissance, qui entraîne le réchauffement local brutal, est sûrement responsable de la dégradation du médicament [4]. En effet, pour comprendre la différence entre les deux conditions mentionnées ci-dessus, on peut utiliser cette analogie : à haute puissance, le médicament est brisé par des « micro-explosions » créées lors de l'irradiation laser, alors qu'à faible puissance et pendant une longue durée, le médicament est brisé par « usure », avec moins de dommage sur sa structure.

Tableau 4.2 Teneur du DPB mesurée par bilan de masse. (Valeur moyenne ± écart-type ; n = 2.)

Conditions de fragmentation	**Teneur** (%)
Micronisation (cond. **b** : 0,5 mg/mL ; 10 mL ; 400 mW ; 30 min)	93,6 ± 1,7
Micronisation (cond. **c** : 2 mg/mL ; 2 mL ; 400 mW ; 30 min)	89,5 ± 3,1
Micronisation (cond. **d** : 2 mg/mL ; 10 mL ; 50 mW ; 16 h)	95,8 ± 1,2

4.4 Propriétés physico-chimiques

Le DPB micronisé par la fragmentation laser a été lyophilisé et analysé avec des techniques de caractérisation physico-chimiques de la même façon que pour le naproxène.

4.4.1 Analyse par spectrométrie infrarouge

Les spectrogrammes des conditions (b) et (c) sont presque identiques que celui de la suspension contrôle, ce qui suggère que le procédé laser n'a pas induit de changement au

3. Il faut noter que, comme le bilan de masse est prenant et coûteux, le nombre d'essai est limité (n=2). Ce nombre est insuffisant pour conduire une analyse statistique.

4. Il est cependant difficile de quantifié la chaleur dégagée, car le calcul doit tenir compte de plusieurs paramètres et de mécanismes, telle que la surface de contact des particules avec le point focal du laser, la vitesse du mouvement des particules et l'évaporation de l'eau, etc.

niveau de la composition chimique du DPB, contrairement au cas du naproxène nanonisé. Une augmentation de la bande de O-H libre (pics entre 3600-3500 cm^{-1}) est cependant visible pour les conditions de durée plus longue (conditions d et e). Cela suggère qu'une forme d'hydrate du DPB a été créée lors de l'exposition prolongée à l'eau, car les spectrogrammes des conditions (d) et (e) présentés dans la figure 4.4 sont très similaires à celui du DPB monohydrate (en annexe, cf. figure A.1, p. 92, (80)) [5]. Cette formation d'hydrate n'est pas due au procédé laser et sera confirmée plus loin (cf. section 4.4.4, p. 74).

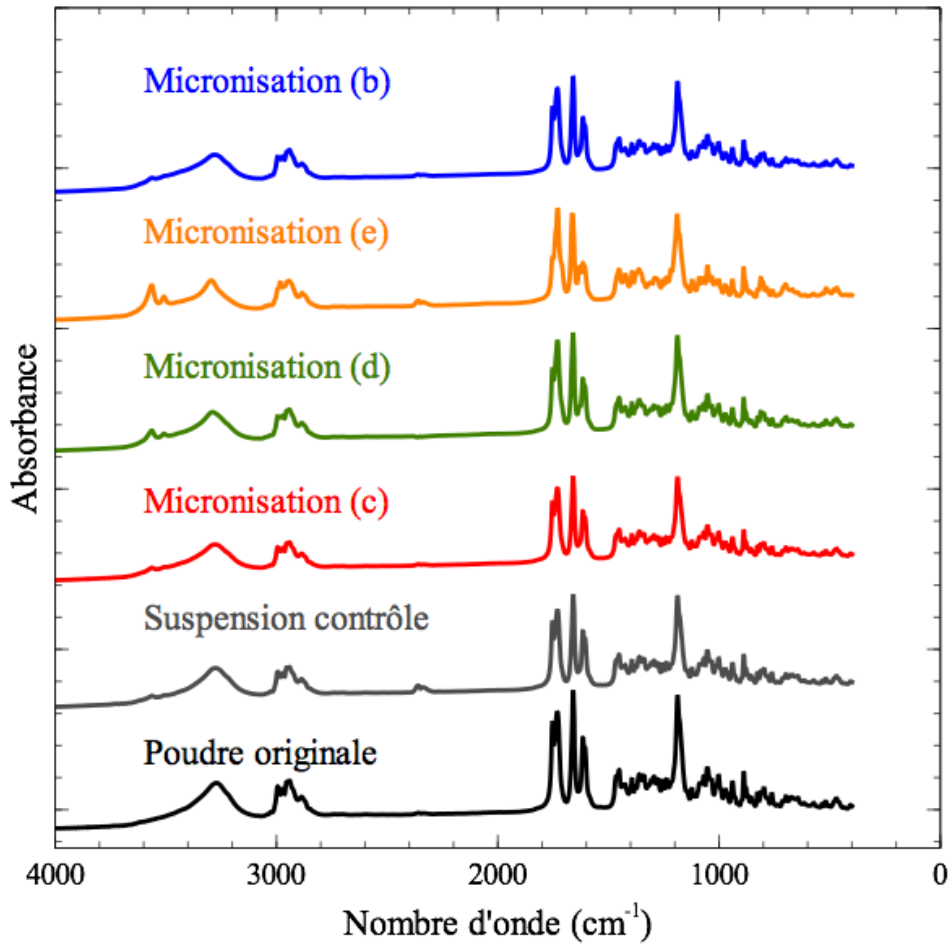

Figure 4.4 Analyse par FTIR du DPB : les conditions (d) et (e) présentent une augmentation vers 3500 cm^{-1}, suggérant la formation d'un hydrate. La composition chimique du DPB micronisé selon les conditions (b) et (c) est conservée. La suspension de contrôle est de 2 mg/mL.

5. Il n'est pas impossible que le DPB soit également oxydé comme dans le cas du naproxène, mais les évidences qui appuient l'hypothèse de l'hydratation, telles que l'existance d'une forme hydrate du DPB, le faible changement de la présence d'oxygène par EA et la modification de la phase cristalline par XRD, qui seront présentées dans les sections suivantes, sont plus convaincantes.

4.4.2 Analyse élémentaire

Le rapport (O+Cl)/C [6] n'a augmenté que légèrement par rapport à la suspension de contrôle. Ici encore, la formation d'un monohydrate du DPB pourrait contribuer à cette augmentation.

Tableau 4.3 Composition chimique du DPB par EA

Conditions de fragmentation	**C**	**H**	**O+Cl**	**H/C**	**(O+Cl)/C**
Poudre originale	64,7	7,3	28,0	0,11	0,43
Suspension contrôle (0,5 mg/mL)	63,0	7,2	29,8	0,11	0,47
Micronisation (cond. **b**)	63,0	7,1	29,9	0,11	0,47
Suspension contrôle (2 mg/mL)	63,6	7,1	29,4	0,11	0,46
Micronisation (cond. **c**)	62,5	7,0	30,5	0,11	0,49
Micronisation (cond. **d**)	62,9	7,2	29,9	0,11	0,47
Micronisation (cond. **e**)	62,4	7,2	30,3	0,12	0,49

4.4.3 Analyse par calorimétrie

Comme le naproxène, le point de fusion et l'enthalpie de fusion des particules de DPB ont baissé après la fragmentation laser. Cette diminution peut être attribuée à une amorphisation partielle, à l'augmentation du ratio surface/volume ou à la présence d'impuretés.

Tableau 4.4 Caractéristiques thermales du DPB par DSC

Conditions	**Point de fusion** (°C)	**Enthalpie de fusion** (J/g)	**Enthalpie relative** (%)
Poudre originale	209,6 ± 0,1	71,6 ± 17,2	100
Suspension contrôle	209,0 ± 0,0	63,6 ± 7,7	89
Micronisation (cond. **b**)	197,5 ± 0,0	38,6 ± 3,9	54
Micronisation (cond. **c**)	201,8 ± 0,0	53,1 ± 0,6	74
Micronisation (cond. **d**)	203,3 ± 0,4	51,7 ± 6,6	72
Micronisation (cond. **e**)	201,7 ± 0,4	55,5 ± 4,3	77

6. La quantité de l'élément O n'est pas mesurée directement, mais obtenue par soustraction (100 - % de C et de H). Comme le DPB contient l'élément Cl, seulement (O+Cl) peut être obtenu. Cependant, la présence de Cl est faible dans l'air et dans l'eau (le milieu expérimental), donc le changement dans le ratio (O+Cl)/C est principalement dû à la présence de l'oxygène.

4.4.4 Analyse par rayons X

La figure 4.5 montre que dès que le DPB entre en contact avec l'eau même sans traitement laser, un nouveau pic apparaît à 8-9° (visible sur le diffractogramme de la suspension contrôle). Les microparticules de DPB micronisées selon deux conditions (b et c) avec une durée de contact avec l'eau < 1 h ont conservé leur phase cristalline. Pour les conditions à longues durées (16 h et 20 h), ce pic augmente en intensité, et d'autres modifications dans le diffractogramme apparaissent (régime 10-14°). Ces modifications sont dues à l'hydratation du DPB en présence de l'eau. La figure 4.6 compare la phase cristalline de DPB broyé mécaniquement (dans une solution aqueuse de poloxamer pendant 72 h) avec celle par laser sous condition (e). Les pics sont très similaires, ce qui confirme que le changement de phase par rapport à la poudre originale n'est pas causé par le procédé laser, mais par le contact prolongé avec l'eau. Le diffractogramme du DPB brut, anhydrate et monohydrate sont présentés en annexe (cf. figure A.2, p. 93, (81)). On remarque que dans le diffractogramme de la forme monohydrate du DPB, le grand pic à 8° est présent et le grand pic à 18.5° est absent, ce qui peut expliquer les modifications mentionnées.

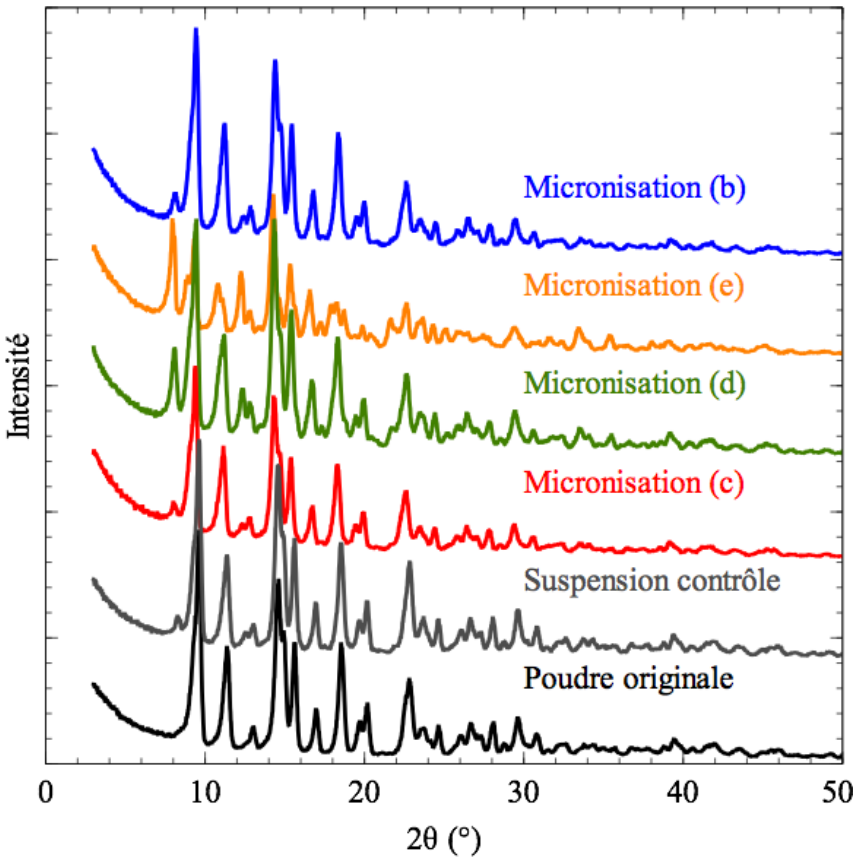

Figure 4.5 Analyse par XRD du DPB : les conditions (b) et (c) ont conversé la phase cristalline du médicament. Pour les conditions (d) et (e), le changement du profile reflète la présence d'une forme hydratée du DPB. La suspension de contrôle est de 2 mg/mL.

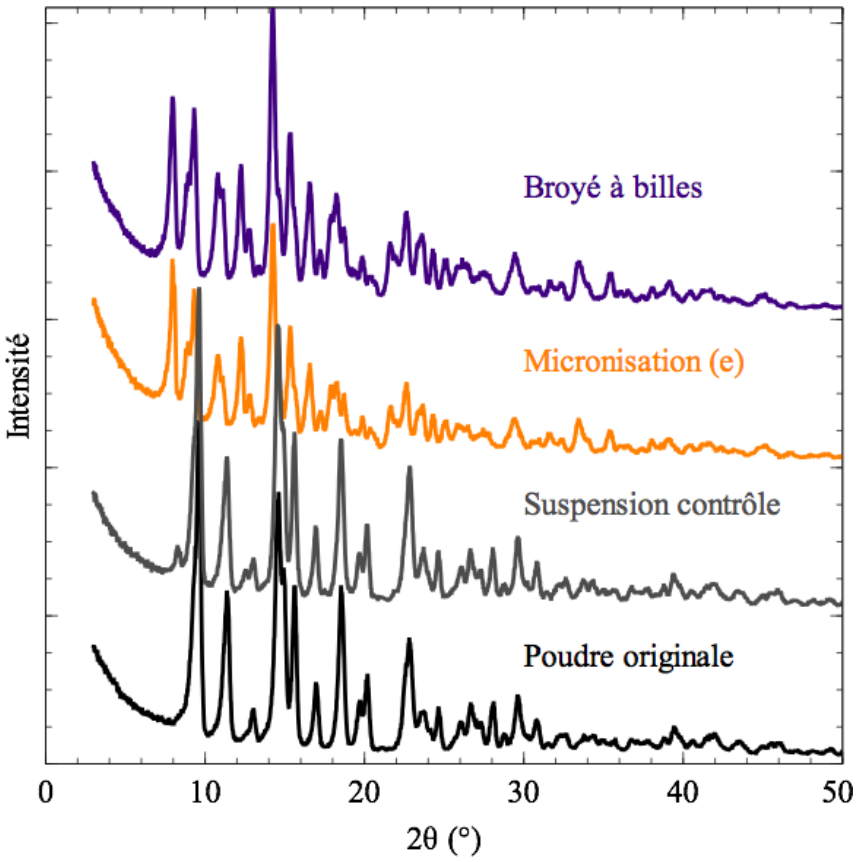

Figure 4.6 Comparaison de la structure cristalline du DPB fragmenté par laser et broyé à billes : la structure du DPB broyé à billes (pendant 72 h dans une solution aqueuse de poloxamer 188) et celle du DPB fragmenté par laser (pendant 20 h dans l'eau désionisée) sont similaires. Le changment de phase n'est pas dû au procédé laser, mais au contact avec l'eau qui a vraisemblablement hydraté le médicament.

4.5 Conclusion : micronisation par laser femtoseconde

Les microcristaux de naproxène et de DPB ont été obtenus par la fragmentation laser avec succès. Une grande majorité des particules ont une taille située dans les limites de l'intervalle recherché (0,5 -5 μm). De plus, la dégradation pourrait être considérée acceptable d'un point de vue industriel [7] (< 3 %) et est beaucoup plus faible que celle des particules nanonisées par laser, observés pour le naproxène. Les changements des propriétés physico-chimiques après la micronisation sont également minimes par rapport à la nanonisation. La micronisation par fragmentation laser est une technique prometteuse.

Dans le cas du DPB, une forme hydrate se forme au contact de l'eau. Si cette forme est non-désirée, il faut minimiser le temps de fragmentation par laser et utiliser une puissance plus élevée afin d'obtenir la taille de particule visée. Un hydrate avait aussi été trouvé dans le cas de paclitaxel (63).

Pour évaluer la performance *in vitro* des particules micronisées, il serait intéressant de tester la distribution aérodynamique dans un « cascade impactor » [8], un appareil simulant l'administration pulmonaire. Une comparaison entre la performance des particules micronisés par la fragmentation laser et les microparticules produites par la technique conventionnelle de broyage par jet d'air (« jet-milling ») serait également intéressante. Malheureusement, les équipements ne sont pas disponibles au moment de la réalisation du projet.

7. Comme la fragmentation laser vise la phase de découverte qui est en amont de la chaîne de création et de fabrication d'un médicament, il est important que les propriétés de la substance candidat traitée au laser soient conservées. Cela assure la reproductibilité et permet de prédire des comportement du médicament lors des étapes subséquentes telles que les essais cliniques et la production à grande échelle par d'autres techniques de micro/nanonisation.

8. L'appareil contient des tamis de différents diamètres, comme les conduites du poumon (bronchée, bronchiole, alvéole etc.). L'entrée du médicament se fait par un aspirateur qui simule l'aspiration par la bouche.

CHAPITRE 5

DISCUSSION : AVANTAGES ET INCONVENIENTS DE LA FRAGMENTATION LASER

5.1 Caractéristiques recherchées et comparaison avec des techniques conventionnelles

Une technique idéale qui réduit la taille des particules de médicaments peu solubles devrait présenter certaines caractéristiques énumérées ci-dessous. Pour chaque caractéristique, une comparaison de la fragmentation laser avec les autres techniques conventionnelles sera proposée.

5.1.1 Contrôle de taille

La technique idéale permet de contrôler la taille finale des particules de médicament, avec une distribution de taille qui est relativement étroite, et une étendue qui se situe à l'intérieur de l'intervalle visé. Toutes les techniques conventionnelles permettent de le réaliser avec certaines contraintes. Il a été montré que la fragmentation par laser femtoseconde peut micro/nanoniser les médicaments et que la taille est contrôlable par les paramètres de fabrication (puissance, durée, concentration etc.). La distribution de taille de cette méthode est bimodale, comme d'autres techniques de broyage (82), ce qui signifie que les particules finales ne seront pas complètement nanométriques ou micrométriques quand la durée de traitement n'est pas suffisante. Une filtration (ex. par filtre papier standard de 2 μm) serait nécessaire pour séparer ces particules de tailles différentes.

On pourrait aussi investiguer d'autres types de laser. Par exemple, avec un laser nanoseconde à 1064 nm, il a été possible de microniser le naproxène et le fénofibrate avec une faible proportion de nanoparticules (manuscrit en rédaction).

5.1.2 Application universelle

La méthode de micro/nanonisation idéale est indépendante du médicament et fonctionne pour la plupart des médicaments peu solubles dans l'eau sans modification majeure. Parmi les techniques conventionnelles, la précipitation nécessite de déterminer le type et la proportion des solvants ainsi que la température optimale, qui varie d'une substance à une autre. Cette

technique n'est pas universelle. L'homogénisation et le broyage sont des techniques qui s'appliquent pour des médicaments avec des modifications moins importantes, telles que la durée de traitement, le nombre de cycles, les surfactifs utilisés etc. Pour la fragmentation laser, cinq médicaments avec des structures moléculaires et des usages différents ont été étudiés : acétate de mégestrol, paclitaxel (cf. section 1.4.3, p. 28), naproxène, DPB et fénofibrate (manuscrit en rédaction). Tous les médicaments ont montré des tendances similaires à celles décrites dans les chapitres précédents. La seule différence entre ces médicaments est que certains (paclitaxel, naproxène et fénofibrate) nécessitent moins d'énergie pour être nanonisés (200-300 mW pour la condition de 0,5 mg/mL, 2 mL, 30 min) que d'autres (acétate de mégestrol et DPB nécessitent environ 400 mW pour la même condition). Ainsi, on peut imaginer que la fragmentation laser est une méthode relativement universelle [1], en se basant sur les résultats des cinq médicaments étudiés.

5.1.3 Conservation de l'intégrité du médicament

La technique idéale de micro/nanonisation doit également minimiser la transformation des propriétés physico-chimiques des médicaments. Toutes les techniques conventionnelles présentent plus ou moins de contaminations ou de transformations du médicament.

Pour la nanonisation, le broyage humide reste le choix par excellence, car la dégradation créée est négligeable. Seul le contact avec le surfactif et avec les agents de broyage (billes) est source de contamination. Au contraire, la fragmentation laser ne crée pas de source de contamination (car le médicament est dans l'eau désionisée), mais les interactions laser-matière induisent des produits de dégradation, de nature oxydative vraisemblablement, qui sont difficilement identifiables [2]. Ces dégradations sont relativement importantes pour la nanonisation et ne sont pas acceptables d'un point de vue pharmaceutique [3].

Pour la micronisation, la dégradation créée par la fragmentation laser est minime et plus

1. Les médicaments étudiés sont tous des poudres blanches et ont une absorption négligeable à la longueur d'onde du laser utilisé. Un médicament ayant une forte absorption à la longueur d'onde utilisée peut avoir une forte dégradation.

2. Nous avons remarqué que les cinq médicaments produisent tous une odeur irritante après la fragmentation laser. Les échantillons originalement blancs deviennent jaunes foncés pour des conditions de fragmentation à haute décharge énergétique. Après la centrifugation, des substances jaunes et noires sont visibles au fond du flacon. Des analyses par dialyse ont été effectuées pour identifier ces substances de dégradation, mais les résultats ne sont pas concluants.

3. Pendant le développement et la fabrication d'un médicament, des techniques conventionnelles sont utilisées pour la production à grande échelle. Un médicament produit par la fragmentation laser lors de la phase de découverte doit avoir les mêmes propriétés physico-chimiques que celles obtenues par les techniques conventionnelles, afin d'assurer ses effets thérapeutiques.

acceptable que la nanonisation. Une légère amorphisation est possible, mais cette transformation est presque inévitable pour toutes les autres techniques de réduction de taille par des forces physiques. La fragmentation laser peut être une méthode alternative de micronisation des médicaments peu solubles dans l'eau.

5.1.4 Simplicité et coûts de production

Une méthode idéale de micro/nanonisation est simple à manipuler et peu consommatrice en temps, en énergie et en matière. Parmi toutes les techniques, l'homogénisation et le broyage humide nécessitent du temps et de l'énergie (car il faut mobiliser le médicament et son milieu lourd contenant du liquide et/ou des billes). La précipitation consomme des matières (solvants ou gaz) en grande quantité. Le broyage sec et la fragmentation laser semblent des techniques plus économiques, qui ne nécessitent pas de matières supplémentaires (billes, solvants etc.) et consomment relativement moins d'énergie. Au niveau de la simplicité, toutes les autres techniques conventionnelles nécessitent de nombreuses manipulations telles que la préparation des matières/agents auxiliaires (solvants, billes, gaz etc.), la récupération de l'actif et le nettoyage de l'appareil. La fragmentation laser est la méthode la plus simple : toute la préparation est une suspension du médicament dans l'eau désionisée. Aucune récupération ni nettoyage n'est nécessaire, car le médicament est directement micro/nanonisé dans son contenant.

Pour réaliser la fragmentation laser, un système laser doit être installé. Un laser femtoseconde avec les composants auxiliaires valent environ de 100 000 à 500 000 dollars. Pour une application en industrie ou au laboratoire, le laser peut être substitué par un laser nanoseconde plus abordable qui coûte entre 40 000 et 60 000 dollars. La performance de micro/nanonisation par un laser nanoseconde est légèrement plus faible par rapport au laser femtoseconde (cf. section 1.4.3, p. 28, pour acétate de mégestrol). Mais les résultats [4] sur le naproxène et le fénofibrate ont montré que la différence entre les lasers femtoseconde et nanoseconde est négligeable lorsqu'il s'agit de la micronisation.

5.1.5 La fragmentation laser est adaptée pour la découverte de médicaments

Le plus grand avantage de la fragmentation laser est qu'elle est capable de produire des nano/microparticules de médicaments en faible quantité. La spécificité de la phase de découverte (cf. section 1.2, p. 12) et comment la fragmentation laser satisfait au besoin de cette phase ont été développés précédemment (cf. section 1.4.3, p. 28).

4. Manuscrits en rédaction.

5.1.6 Résumé des avantages et des inconvénients de la fragmentation laser

Pour résumer les caractéristiques de cette nouvelle méthode proposée, nous pouvons compléter le tableau de comparaison des techniques de réduction de taille comme suit :

Tableau 5.1 Évaluation de la fragmentation laser en comparaison des techniques conventionnelles de micro/nanonisation

Principes	Techniques	Nanonisation	Micronisation	Applicabilité (phase de découverte)	Consommation	Contamination	Transformation polymorphique
Précipitation	**Supersaturation**	±	√	±	Minimale	Toxicité du solvant	Forme amorphe possible
	Fluide supercritique	√	√	±	Énergie	Minimale	Forme amorphe possible
Homogénisation	**Microfluidisation**	√	√	Non	Temps et énergie	Érosion métallique	Forme amorphe possible
	Homogénisation à pression élevée	√	√	Non	Temps et énergie	Érosion métallique	Forme amorphe possible
Broyage	**Broyage humide**	√	±	±	Temps et énergie	Érosion du média	Minimale
	Broyage sec	Non	√	Non	Temps	Minimale	Forme amorphe possible
Laser	**Fragmentation par laser**	√	√	√	**Minimale (nécessite laser)**	**Oxydation**	**Forme amorphe possible**

5.2 Phénomène physique : réduction de taille et la pureté du médicament

Une tendance remarquable de la fragmentation laser est que la réduction de la taille est toujours accompagnée d'une plus grande quantité d'impuretés créées lors des interactions laser-matière. Cette tendance semble indépendante des conditions de fragmentation. Le figure 5.1 montre l'impureté détectée par la HPLC en fonction de la taille moyenne de chaque échantillon (fragmenté ou non), sans considérer les conditions appliquées. On remarque qu'il semble y avoir une relation entre la taille et l'impureté [5].

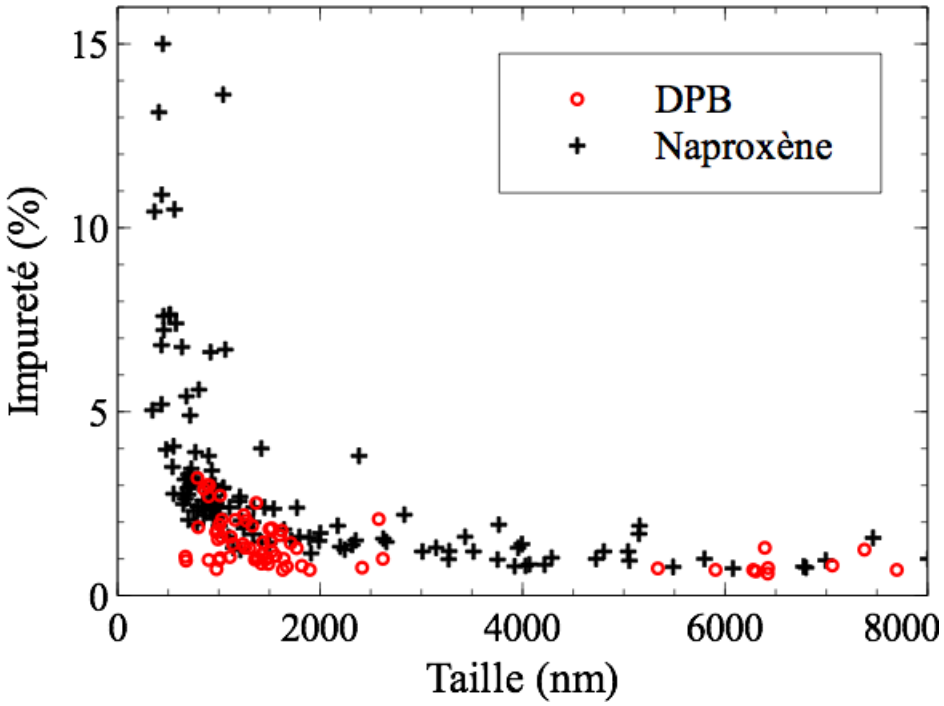

Figure 5.1 Relation entre l'impureté et la taille de particule des médicaments fragmentés par laser femtoseconde

Selon la figure, une zone optimale correspondant à la plus petite taille avec une impureté faible peut être remarquée : c'est la partie correspondant à une taille de 800-1500 nm tout en ayant un niveau d'impureté faible ($< 3\%$). À gauche de cette zone, la dégradation augmente considérablement lorsque la taille diminue. On peut en conclure que la meilleure application que la fragmentation laser peut offrir est effectivement la micronisation, où la taille de particule est minimale avec un niveau d'impureté acceptable.

5. Des tentatives ont été menées pour trouver la fonction mathématique de la courbe, mais aucun modèle standard telle que linéaire ou exponentielle (pour impureté en fonction de 1/taille) a eu un coefficient de corrélation suffisamment grand ($> 0{,}7$) et convaincant.

CONCLUSION

L'hypothèse de recherche de ce mémoire était que les micro/nanocristaux du DPB et du naproxène pourraient être fabriqués par la fragmentation laser femtoseconde, et que les transformations physico-chimiques seraient minimes. Après les études présentées, la première partie de l'hypothèse a été confirmée : la fragmentation laser femtoseconde peut effectivement réduire la taille des cristaux des deux médicaments aux niveaux micro- ou sous-micrométriques. Cependant, deux types de transformations peuvent avoir lieu : l'amorphisation surfacique des cristaux (constituant une réduction de la cristallinité), et l'oxydation qui peut causer des impuretés. Ces transformations physico-chimiques sont minimes pour la micronisation, mais ne sont pas négligeables pour la nanonisation.

De plus, les micro/nanoparticules ont été produites en utilisant seulement quelques milligrammes d'actif, ce qui est difficilement réalisable par les autres techniques existantes de réduction de taille. Cette particularité rend la fragmentation laser une alternative de micro/nanonisation très bien adaptée pour la phase de découverte de médicament, surtout pour la micronisation.

Voici quelques suggestions d'améliorations qui pourraient y être apportées dans le futur :

- Développer un système automatisé de laser à faisceaux multiples : présentement, les échantillons ont été traités un à la fois. Pour une application commercialisable de la phase de découverte, il sera pratique de fragmenter plusieurs substances à la fois. On pourra imaginer une plateforme avec des dizaines de puits, chacun contenant un médicament candidat différent. Sur chaque puit est installé des mirroirs qui dirigent un faisceau laser de façon simultanée. Des dizaines ou centaines de médicaments pourraient ainsi être micronisés rapidement.
- Réduction de la distribution de taille : l'intervalle de la taille de particules obtenu à présent est relativement large, dû probablement à la méthode d'agitation (magnétique). Un système permettant d'agiter la suspension de façon homogène réduirait la dispersion de taille de particules. Un système microfluidique en recirculation pourrait aussi permettre de mieux contrôler le nombre d'impulsions laser dirigés sur une particule.
- Augmenter la reproductibilité : la variation de la taille moyenne finale obtenue pour une même condition n'est pas négligeable à présent. En plus de la méthode d'agitation mentionnée, la distance de pénétration du foyer laser en-dessous de la surface peut

contribuer également à la variation. Des mesures pourraient être développées afin de réduire toute variation pouvant être induite par ces facteurs externes, comme par exemple un système de recirculation mentionné ci-dessus.

– Au total, cinq médicaments ont été traités par deux types de laser. Des études sur d'autres médicaments et par d'autres types de laser pourraient être menées pour élargir le bassin des données et pour approfondir nos connaissances sur la réduction de taille des particules de médicament par la fragmentation laser.

RÉFÉRENCES

[1] M. E. Aulton, *Pharmaceutics : The Science of Dosage Form Design*, 2nd ed. Edinburgh : Churchill Livingstone, 2002.

[2] N. Rasenack, H. Hartenhauer, and B. Muller, "Microcrystals for dissolution rate enhancement of poorly water-soluble drugs," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 254, no. 2, pp. 137–145, 2003.

[3] B. E. Rabinow, "Nanosuspensions in drug delivery," *Nature Review Drug Discovery*, vol. 3, no. 9, pp. 785–796, 2004.

[4] K. Taylor, "Pulmonary drug delivery," in *Pharmaceutics : The Design and Manufacture of Medicines*, 3rd ed. Edinburgh : Churchill Livingstone, 2007, pp. 539–554.

[5] E. Merisko-Liversidge, G. G. Liversidge, and E. R. Cooper, "Nanosizing : a formulation approach for poorly-water-soluble compounds," *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 18, pp. 113–120, 2003.

[6] G. Pilcer and K. Amighi, "Formulation strategy and use of excipients in pulmonary drug delivery," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 392, no. 1-2, pp. 1 – 19, 2010.

[7] I. Gonda, "The ascent of pulmonary drug delivery," *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 89, no. 7, pp. 940–945, 2000.

[8] C. Lipinski, "Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability," *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, vol. 44, pp. 235 – 249, 2000.

[9] M. Mosharraf and C. Nyström, "The effect of particle size and shape on the surface specific dissolution rate of microsized practically insoluble drugs," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 122, no. 1-2, pp. 35 – 47, 1995.

[10] A. Noyes and W. Whitney, "The rate of solution of solid substances in their own solutions," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 19, no. 12, pp. 930–934, 1897.

[11] R. H. Müller, C. Jacobs, and O. Kayser, "Nanosuspensions as particulate drug formulations in therapy : Rationale for development and what we can expect for the future," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 47, no. 1, pp. 3 – 19, 2001.

[12] K. A. Youdim, A. Avdeef, and N. J. Abbott, "*In vitro* trans-monolayer permeability calculations : often forgotten assumptions," *Drug Discovery Today*, vol. 8, no. 21, pp. 997 – 1003, 2003.

[13] H. van de Waterbeemd and B. Testa, *Drug Bioavailability : Estimation of Solubility, Permeability, Absorption and Bioavailability.* Germany : Wiley-VCH, 2009.

[14] G. Amidon, H. Lennernäs, V. Shah, and J. Crison, "A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification : the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability," *Pharmaceutical Research*, vol. 12, no. 3, pp. 413–420, 1995.

[15] M. Lindenberg, S. Kopp, and J. B. Dressman, "Classification of orally administered drugs on the world health organization model list of essential medicines according to the biopharmaceutics classification system," *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 58, no. 2, pp. 265 – 278, 2004.

[16] B. M. Bolten and T. DeGregorio, "Trends in development cycles," *Nature Reviews Drug Discovery*, vol. 1, no. 5, pp. 335–336, May 2002.

[17] J. Eckstein, *Isoa/Arf Drug Development Tutorial*, 2005, disponible en ligne : http ://www.alzforum.org/drg/tut/ISOATutorial.pdf.

[18] F. Sams-Dodd, "Target-based drug discovery : is something wrong ?" *Drug Discovery Today*, vol. 10, pp. 139–147, 2005.

[19] R. A. Prentis, Y. Lis, and S. R. Walker, "Pharmaceutical innovation by the seven UK-owned pharmaceutical companies (1964-1985)." *British Journal of Clinical Pharmacology*, vol. 25, pp. 387–396, Mar. 1988.

[20] J. Kipp, "The role of solid nanoparticle technology in the parenteral delivery of poorly water-soluble drugs," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 284, pp. 109–122, 2004.

[21] C. A. Lipinski, "Solubility in water and DMSO : Issues and potential solutions," in *Pharmaceutical Profiling in Drug Discovery for Lead Selection*, 2004, pp. 93–125.

[22] A. T. Serajuddin, "Salt formation to improve drug solubility," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 59, no. 7, pp. 603 – 616, 2007.

[23] P. Li and L. Zhao, "Developing early formulations : Practice and perspective," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 341, no. 1-2, pp. 1–19, 2007.

[24] T. Loftsson and M. Brewster, "Pharmaceutical applications of cyclodextrins : basic science and product development," *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, vol. 62, pp. 1607–1621, 2010.

[25] T. Loftsson, P. Jarho, M. Másson, and T. Järvinen, "Cyclodextrins in drug delivery," *Expert Opinion on Drug Delivery*, vol. 2, no. 2, pp. 335–351, 2005.

[26] V. J. Stella and R. A. Rajewski, "Cyclodextrins : Their future in drug formulation and delivery," *Pharmaceutical Research*, vol. 14, pp. 556–567, 1997.

[27] J. Rautio, H. Kumpulainen, T. Heimbach, R. Oliyai, D. Oh, T. Jarvinen, and J. Savolainen, "Prodrugs : design and clinical applications," *Nature Reviews Drug Discovery*, vol. 7, no. 3, pp. 255–270, Feb. 2008.

[28] R. Duncan, S. Gac-Breton, R. Keane, R. Musila, Y. Sat, R. Satchi, and F. Searle, "Polymer-drug conjugates, PDEPT and PELT : basic principles for design and transfer from the laboratory to clinic," *Journal of Controlled Release*, vol. 74, pp. 135–146, 2001.

[29] V. J. Stella and K. W. Nti-Addae, "Prodrug strategies to overcome poor water solubility," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 59, pp. 677–694, 2007.

[30] J. Lyklema, *Fundamentals of interface and colloid science*. Academic Press, 2005.

[31] G. Bonacucina, M. Cespi, M. Misici-Falzi, and G. F. Palmieri, "Colloidal soft matter as drug delivery system," *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 98, no. 1, pp. 1–42, 2009.

[32] A. Müllertz, A. Ogbonna, S. Ren, and T. Rades, "New perspectives on lipid and surfactant based drug delivery systems for oral delivery of poorly soluble drugs," *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, vol. 62, pp. 1622–1636, 2010.

[33] S. P. Moulik and B. K. Paul, "Structure, dynamics and transport properties of microemulsions," *Advances in Colloid and Interface Science*, vol. 78, pp. 99–195, 1998.

[34] A. K. Patri, I. J. Majoros, and J. R. Baker, "Dendritic polymer macromolecular carriers for drug delivery," *Current Opinion in Chemical Biology*, vol. 6, pp. 466–471, 2002.

[35] A. Bangham and R. Horne, "Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope," *Journal of Molecular Biology*, vol. 8, no. 5, pp. 660 – 668, IN2–IN10, 1964.

[36] T. M. Allen and P. R. Cullis, "Drug delivery systems : Entering the mainstream," *Science*, vol. 303, pp. 1818 –1822, Mar. 2004.

[37] R. Sawant and V. Torchilin, "Liposomes as 'smart'pharmaceutical nanocarriers," *Soft Matter*, vol. 6, no. 17, pp. 4026–4044, 2010.

[38] Britannica.org, site web du dictionnaire en ligne : http :// www.britannica.com/ EBchecked/ media/ 92238/ When-a-soap-is-dissolved-in-water-fatty-acids-in. Consulté en mai 2011.

[39] Britannica. org, site web du dictionnaire en ligne : http :// www.britannica.com/ EBchecked/ media/ 92244/ Phospholipids-can-be-used-to-form-artificial-structures-called-liposomes. Consulté en mai 2011.

[40] Chemical Heritage Foundation, site web de chemheritage en ligne : http :// www.chemheritage.org/ Images/ Main-Images-250x290/ Discover/ Themes/

Microelectronics-and-Nanotechnology/ dendrimers_550x254.jpg. Consulté en mai 2011.

[41] B. V. Eerdenbrugh, G. V. den Mooter, and P. Augustijns, "Top-down production of drug nanocrystals : Nanosuspension stabilization, miniaturization and transformation into solid products," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 364, no. 1, pp. 64 – 75, 2008.

[42] E. Reverchon, "Supercritical antisolvent precipitation of micro-and nano-particles," *Journal of Supercritical Fluids, The*, vol. 15, no. 1, pp. 1–21, 1999.

[43] J. Brouwers, M. Brewster, and P. Augustijns, "Supersaturating drug delivery systems : The answer to solubility-limited oral bioavailability ?" *Journal of pharmaceutical sciences*, vol. 98, no. 8, pp. 2549–2572, 2009.

[44] C. Keck and R. Müller, "Drug nanocrystals of poorly soluble drugs produced by high pressure homogenisation," *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 62, no. 1, pp. 3–16, 2006.

[45] S. Kenth, "Investigation of Femtosecond Laser Technology for the Fabrication of Drug Nanocrystals in Suspension," Dec. 2009, mémoire de maîtrise, Université de Montréal.

[46] E. Merisko-Liversidge and G. G. Liversidge, "Nanosizing for oral and parenteral drug delivery : A perspective on formulating poorly-water soluble compounds using wet media milling technology," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 63, no. 6, pp. 427 – 440, 2011.

[47] B. Van Eerdenbrugh, B. Stuyven, L. Froyen, J. Van Humbeeck, J. Martens, P. Augustijns, and G. Van den Mooter, "Downscaling drug nanosuspension production : Processing aspects and physicochemical characterization," *AAPS PharmSciTech*, vol. 10, no. 1, pp. 44–53, 2009.

[48] N. Rasenack and B. Müller, "Micron-size drug particles : common and novel micronization techniques," *Pharmaceutical Development and Technology*, vol. 9, no. 1, pp. 1–13, 2004.

[49] K. Sugioka, M. Meunier, and A. Piqué, *Laser precision microfabrication*. Springer Verlag, 2010, vol. 135.

[50] S. Besner and M. Meunier, "Laser synthesis of nanomaterials," in *Laser Precision Microfabrication*. Springer, 2010, pp. 163–187.

[51] T. Asahi, T. Sugiyama, and H. Masuhara, "Laser fabrication and spectroscopy of organic nanoparticles," *Accounts of Chemical Research*, vol. 41, no. 12, pp. 1790–1798, 2008.

[52] D. Lowndes, D. Geohegan, A. Puretzky, D. Norton, and C. Rouleau, "Synthesis of novel thin-film materials by pulsed laser deposition," *Science*, vol. 273, no. 5277, p. 898, 1996.

[53] M. Ashfold, F. Claeyssens, G. Fuge, and S. Henley, "Pulsed laser ablation and deposition of thin films," *Chemical Society Reviews*, vol. 3, no. 3, pp. 23–31, 2004.

[54] P. P. Patil, D. M. Phase, S. A. Kulkarni, S. V. Ghaisas, S. K. Kulkarni, S. M. Kanetkar, S. B. Ogale, and V. G. Bhide, "Pulsed-laser–induced reactive quenching at liquid-solid interface : Aqueous oxidation of iron," *Physical Review Letters*, vol. 58, no. 3, pp. 238–241, Jan 1987.

[55] O. Masala and R. Seshadri, "Synthesis routes for large volumes of nanoparticles," *Annual Review of Materials Research*, vol. 34, pp. 41–81, 2004.

[56] L. Yang, "Self-Assembly and Ordering Nanomaterials by Liquid-Phase Pulsed Laser Ablation, Chapitre 2," Ph.D. dissertation, University of Bristol., Nov. 2007.

[57] Y. Tamaki, T. Asahi, and H. Masuhara, "Nanoparticle formation of vanadyl phthalocyanine by laser ablation of its crystalline powder in a poor solvent," *The Journal of Physical Chemistry A*, vol. 106, no. 10, pp. 2135–2139, 2002.

[58] H. Jeon, T. Sugiyama, H. Masuhara, and T. Asahi, "Study on electrophoretic deposition of size-controlled quinacridone nanoparticles," *The Journal of Physical Chemistry C*, vol. 111, no. 40, pp. 14 658–14 663, 2007.

[59] J. Hobley, T. Nakamori, S. Kajimoto, M. Kasuya, K. Hatanaka, H. Fukumura, and S. Nishio, "Formation of 3, 4, 9, 10-perylenetetracarboxylicdianhydride nanoparticles with perylene and polyyne byproducts by 355 nm nanosecond pulsed laser ablation of microcrystal suspensions," *Journal of Photochemistry and Photobiology A : Chemistry*, vol. 189, no. 1, pp. 105–113, 2007.

[60] P. Wagener and S. Barcikowski, "Laser fragmentation of organic microparticles into colloidal nanoparticles in a free liquid jet," *Applied Physics A : Materials Science & Processing*, pp. 1–5, 2010.

[61] S. Nagare and M. Senna, "Reagglomeration mechanism of drug nanoparticles by pulsed laser deposition," *Solid State Ionics*, vol. 172, no. 1-4, pp. 243–247, 2004.

[62] S. Nagare, J. Sagawa, and M. Senna, "Chemical and structural properties of drug–protein nanocomposites prepared by pulsed laser deposition from conjugated targets," *Journal of Nanoparticle Research*, vol. 8, no. 1, pp. 37–42, 2006.

[63] S. Kenth, J.-P. Sylvestre, K. Fuhrmann, M. Meunier, and J.-C. Leroux, "Fabrication of Paclitaxel Nanocrystals by Femtosecond Laser Ablation and Fragmentation," *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 100, no. 3, pp. 1022–1030, 2011.

[64] J.-P. Sylvestre, M.-C. Tang, A. Furtos, G. Leclair, M. Meunier, and J.-C. Leroux, "Nanonization of megestrol acetate by laser fragmentation in aqueous milieu," *Journal of Controlled Release*, vol. 149, no. 3, pp. 273 – 280, 2011.

[65] J. Junghanns and R. Müller, "Nanocrystal technology, drug delivery and clinical applications," *International Journal of Nanomedicine*, vol. 3, no. 3, p. 295, 2008.

[66] I. Smith and M. Parry-Billings, "The inhalers of the future ? a review of dry powder devices on the market today," *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, vol. 16, no. 2, pp. 79–95, 2003.

[67] National Library of Medicine, site web du DailyMed : http ://dailymed.nlm.nih.gov/. Consulté en mai 2011.

[68] G. Liversidge and P. Conzentino, "Drug particle size reduction for decreasing gastric irritancy and enhancing absorption of naproxen in rats," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 125, no. 2, pp. 309–313, 1995.

[69] N. Franson and D. Snyder, "Milled naproxen with hydroxypropyl cellulose as a dispersion stabilizer," Jan. 7 1997, brevet US 5,591,456.

[70] P. Pathak, M. Meziani, T. Desai, and Y. Sun, "Nanosizing drug particles in supercritical fluid processing," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 126, no. 35, pp. 10 842–10 843, 2004.

[71] J. Lee, S. Lee, J. Choi, J. Yoo, and C. Ahn, "Amphiphilic amino acid copolymers as stabilizers for the preparation of nanocrystal dispersion," *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 24, no. 5, pp. 441–449, 2005.

[72] SRC Corporation, site web de la base de données SRC PhysProp, http :// www.syrres.com/ what-we-do/ databaseforms.aspx ?id=386. Consulté en mai 2011.

[73] H. Brown, G. Storey, and W. George, "Beclomethasone dipropionate : a new steroid aerosol for the treatment of allergic asthma," *British Medical Journal*, vol. 1, no. 5800, p. 585, 1972.

[74] K. Ostrander, H. Bosch, and D. Bondanza, "An in-vitro assessment of a nanocrystal^{TM}beclomethasone dipropionate colloidal dispersion via ultrasonic nebulization," *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 48, no. 3, pp. 207–215, 1999.

[75] Z. Wang, J. Chen, Y. Le, Z. Shen, and J. Yun, "Preparation of ultrafine beclomethasone dipropionate drug powder by antisolvent precipitation," *Industrial & Engineering Chemistry Research*, vol. 46, no. 14, pp. 4839–4845, 2007.

[76] N. Rasenack, H. Steckel, and B. Müller, "Micronization of anti-inflammatory drugs for pulmonary delivery by a controlled crystallization process," *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 92, no. 1, pp. 35–44, 2003.

[77] H. Steckel, J. Thies, and B. Muller, "Micronizing of steroids for pulmonary delivery by supercritical carbon dioxide," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 152, no. 1, pp. 99–110, 1997.

[78] K. Gilani, A. Rouholamini Najafabadi, M. Barghi, and M. Rafiee-Tehrani, "Aerosolisation of beclomethasone dipropionate using spray dried lactose/polyethylene glycol carriers," *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 58, no. 3, pp. 595–606, 2004.

[79] USP, *USP 32–NF 27, General Chapter Dissolution <711>*. Rockville : United States Pharmacopeial Convention, 2011.

[80] J. Hunt and J. Padfield, "Micronised beclomethasone dipropionate monohydrate compositions and methods of use," Sep. 12 1989, Brevet US 4,866,051.

[81] H. Valo, P. Laaksonen, L. Peltonen, M. Linder, J. Hirvonen, and T. Laaksonen, "Multifunctional hydrophobin : toward functional coatings for drug nanoparticles," *ACS Nano*, vol. 4, no. 3, pp. 1750–1758, 2010.

[82] J. N. Staniforth and M. E. Aulton, "Particle size analysis," in *Pharmaceutics : The Design and Manufacture of Medicines*, 3rd ed. Edinburgh : Churchill Livingstone, 2007, pp. 121–136.

ANNEXE : FIGURES SUPPLÉMENTAIRES

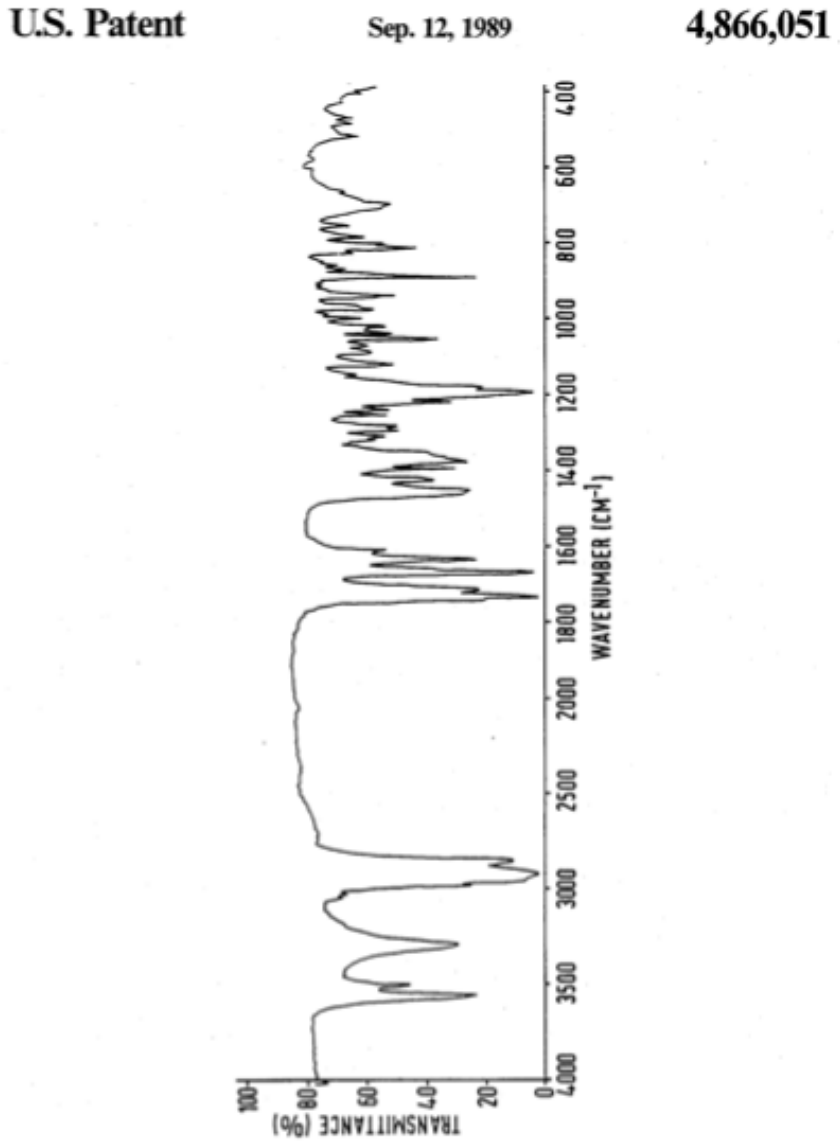

Figure A.1 Le spectrogramme FTIR du DPB monohydrate publié dans (80).

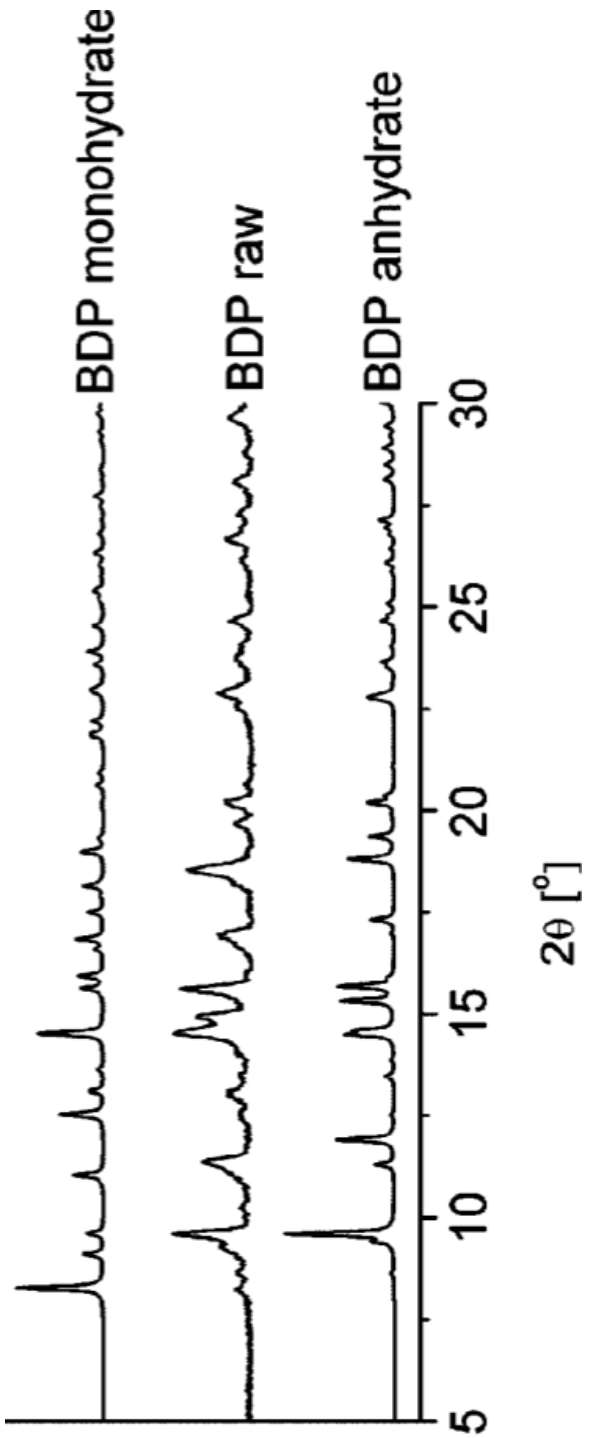

Figure A.2 Le diffractogramme XRD du DPB brut, anhydrate et monohydrate publié dans (81).

Index

Administration
    locale, 5
    pulmonaire, 6
    systémique, 5
    voie cutanée, 7
    voie orale, 5
    voie parentérale, 6
    voie rectale, 7
    voie respiratoire, 6
Amorphe, 10
Analyse élémentaire, 39

Biodisponibilité, 1, 12
Broyage, 24
    humide, 24
    sec, 25

Coefficient de partage, 9
Colloïdal, système, 17
    dendrimères, 19
    liposomes, 19
    micelles, 18
    micro-émulsion, 18
    organogel, 18
Complexation, 16
Cyclodextrines, 16

Dissolution, 8
    facteurs d'influence, 6
DLS, 34
DSC, 40

EA, 39
Enthalpie, 17
Excipients, 4

Formulation, 4
FTIR, 38

Homogénisation, 24
HPLC, 37
Hydrophile, 7

LD, 35
Lipophile, 9

Métabolisme, 5
Métabolite, 5
Métastable, 10
Micronisation, 1, 22

Nanonisation, 1, 21

Perméabilité, 6, 9, 11, 14
Pharmacocinétique, 12
Phase de découverte, 12
Phase de développement, 13
Polymorphisme, 10
Précipitation, 23
Principe actif, 4
Promédicament, 16

SEM, 36
Solubilité, 8, 14
Solvation, 8
Spectroscopie par infrarouge, 38
Surface spécifique, 8
Surfactif, 18

XRD, 41