



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITE HENRI POINCARÉ – NANCY I
2009-2010
UFR de Pharmacie
Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du
titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE HENRI POINCARÉ - NANCY 1

Mention : Sciences de la Vie et de la Santé

Par
David ATTIVI

Sujet :

*Mise en forme et amélioration de la biodisponibilité d'un anticancéreux destiné à la
voie orale : Exemple du mitotane*

Le 5 Février 2010

MEMBRES DU JURY :

Rapporteurs : M. Jean Claude CHAUMEIL
Professeur, Faculté de Pharmacie, Paris V
M. Robert FARINOTTI
Professeur, Faculté de Pharmacie, Paris XI
Examineurs : M. Alain ASTIER
Professeur, Pharmacie Hôpital Henri MONDOR, Créteil
M. Philippe MAINCENT
Professeur, Faculté de Pharmacie, Nancy
Mme. Geneviève UBEAUD-SEQUIER
Professeur, Faculté de Pharmacie, Strasbourg
M. Stéphane GIBAUD
Docteur, Faculté de Pharmacie, Nancy, Directeur de thèse

UNIVERSITE HENRI POINCARE – NANCY I
2009-2010
UFR de Pharmacie
Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du
titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE HENRI POINCARE - NANCY 1

Mention : Sciences de la Vie et de la Santé

Par
David ATTIVI

Sujet :

*Mise en forme et amélioration de la biodisponibilité d'un anticancéreux destiné à la
voie orale : Exemple du mitotane*

Le 5 Février 2010

MEMBRES DU JURY :

Rapporteurs : M. Jean Claude CHAUMEIL
Professeur, Faculté de Pharmacie, Paris V
M. Robert FARINOTTI
Professeur, Faculté de Pharmacie, Paris XI
Examineurs : M. Alain ASTIER
Professeur, Hôpital Henri MONDOR, Créteil
M. Philippe MAINCENT
Professeur, Faculté de Pharmacie, Nancy
Mme. Geneviève UBEAUD-SEQUIER
Professeur, Faculté de Pharmacie, Strasbourg
M. Stéphane GIBAUD
Docteur, Faculté de Pharmacie, Nancy, Directeur de thèse

A ma famille,

Que Monsieur le Docteur Stéphane GIBAUD, qui a dirigé cette thèse avec persévérance, trouve ici l'expression de mes remerciements pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire, pour la confiance qu'il m'a témoignée durant ces années.

Je remercie les Professeurs Jean Claude CHAUMEIL et Robert FARINOTTI pour l'honneur qu'ils me font d'avoir accepté de juger ce travail et d'en être les rapporteurs.

Je remercie le Professeur Alain ASTIER qui m'a encouragé dès le début de ce travail et pour son parrainage sur les chemins de la connaissance scientifique.

Je remercie le Professeur Geneviève UBEAUD-SEQUIER pour l'honneur qu'elle me fait de participer au jury de cette thèse.

Je remercie le Professeur Philippe MAINCENT, de m'avoir accueilli dans l'Unité de Recherche et pour l'honneur qu'il me fait de participer au jury de cette thèse.

Je remercie les Docteurs Anne SAPIN et Marc MERTENS pour leurs conseils dans le cadre de la culture cellulaire.

Enfin, je tiens à remercier tout le personnel du laboratoire de pharmacie clinique pour leur soutien : Mr. Christophe MOTT et Mme Pascale CARNET.

Liste des abréviations

ABL : Aqueous Boundary Layer

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

BCS : Biopharmaceutics Classification System

BSA : Bovin Serum Albumin

CLHP : Chromatographie Liquide Haute Performance

CCS : Carcinome Cortico-Surrénalien

HLB : Hydrophile Lipophile Balance

MTT : MethylThiazolTetrazolium

PCL : Poly- ϵ -CaproLactone

PLA : Acide polylactide

SEDDS : Self-Emulsifying Drug Delivery System

SMEDDS : Self-MicroEmulsifying Drug Delivery System

SSC : Surface Sous la Courbe (SSC)

Table des matières

Introduction générale	1
Rappels bibliographiques	3
I. LE MITOTANE	3
1.1. Historique	3
1.2. Caractéristiques physico-chimiques.....	5
1.3. Mécanisme d'action.....	6
1.4. Caractéristiques pharmacocinétiques	7
1.4.1 Absorption et biodisponibilité du mitotane.....	7
1.4.2 Distribution	10
1.4.3 Métabolisme	11
1.4.3 Elimination.....	13
1.5. Evaluations cliniques et posologie du mitotane® AP-HP et du Lysodren®.....	15
1.6. Effets indésirables et limites d'utilisation du mitotane® AP-HP et du Lysodren®	21
1.7. Indication du Lysodren® : le carcinome surrénalien	23
II. AMELIORATION DE LA BIODISPONIBILITE DES PRINCIPES ACTIFS TRES PEU SOLUBLES DANS L'EAU	25
II.1. Méthodes d'amélioration de la solubilité des molécules peu solubles dans l'eau.....	26
II.1.1. Les méthodes chimiques.....	26
II.1.2. Les cyclodextrines	26
II.2. Les Microémulsions (SMEDDS ou Self-MicroEmulsifying Drug Delivery System).....	27
II.2.1. Composition des microémulsions.....	28
II.2.1.1. Critères généraux de sélection des excipients	28
II.2.1.2. Les triglycérides	29
II.2.1.3. Les surfactants hydrophobes	30
II.2.1.4. Les surfactants hydrophiles	31
II.2.1.5. Les co-solvants (ou co-tensioactifs) et additifs	33
II.2.2. Mécanisme de l'auto-émulsification	34
II.2.3. Caractérisation des microémulsions	35
II.2.4. Obtention et zone d'existence des microémulsions.....	38
II.2.5. Propriétés des excipients et différents types de formulations autoémulsionnantes.....	39
II.2.5.1. La miscibilité des excipients	39
II.2.5.2. La capacité de solvant des triglycérides	39
II.2.5.3. Compatibilité avec les gélules	39
II.2.5.4. Classification des émulsions	40
II.2.5.4.1 Les formulations de type I.....	40
II.2.5.4.2 Les formulations de type II.....	40
II.2.5.4.3 Les formulations de type III.....	42
II.2.5.4.4 Les formulations de type IV	43
II.3. Les Nanocapsules.....	43
II.3.1. Polymères utilisés pour la préparation des nanocapsules	44
II.3.1.1 La poly-ε-caprolactone (PCL).....	44
II.3.1.2 Les Eudragit® RS/RL	45
II.3.2 Méthodes de préparation des nanocapsules.....	46
II.3.2.1. Préparation par polymérisation interfaciale	46
II.3.2.2 Préparation par émulsion - diffusion.....	48
II.3.2.3. Préparation par encapsulation de nanoémulsions	51
III. ASPECTS BIOPHARMACEUTIQUES DES NANOCAPSULES, MICROPARTICULES ET SMEDDS	52
III.1. Avantages biopharmaceutiques des nanocapsules, microparticules et des SMEDDS	52
III.1.1. Modalités d'absorption des systèmes nanocapsulaires, microparticules et des SMEDDS	52
III.1.1.1. Rappel sur la paroi intestinale.....	52
III.1.1.2. La système lymphatique	54
III.1.1.3. Absorption des systèmes nanocapsulaires et des microparticules.....	54
III.1.1.3.1 Le passage intracellulaire.....	55
III.1.1.3.2 Le passage paracellulaire au niveau des cellules épithéliales de la muqueuse intestinale	56
III.1.1.3.3 Les plaques de Peyer de la circulation lymphatique	56

III.1.1.4. Absorption des formulations lipidiques.....	60
III.1.1.4.1 Influence du principe actif sur l'absorption.....	61
III.1.1.4.2 Influence du véhicule huileux et des tensioactifs sur l'absorption des principes actifs	61
III.2. Les barrières d'absorption	66
III.2.1. La couche aqueuse liée au mucus.....	66
III.2.2. La membrane apicale.....	67
IV. ETUDE DE L'ABSORPTION INTESTINALE DES PRINCIPES ACTIFS ET DES VECTEURS DE MEDICAMENTS DANS LES	
MODELES CELLULAIRES ET TISSULAIRES	68
IV.1. La culture cellulaire Caco-2	68
IV.1.1. Transport moléculaire par les cellules Caco-2 et l'épithélium intestinal	68
IV.1.2. Coefficient de perméabilité et absorption des cellules Caco-2.....	70
IV.1.3. Utilisation du modèle cellulaire Caco-2 pour l'étude des vecteurs lipidiques autoémulsionnants et particulaires	71
IV.2. Un modèle de tissus isolés : La chambre de Ussing.....	76
IV.3. Les modèles d'intestin perfusé.....	77
V. CONCLUSION	77

Travail expérimental 79

I. MISE AU POINT DES NANOCAPSULES, DES MICROPARTICULES ET DES MICROEMULSIONS DE MITOTANE..	79
I.1.1. Matières premières	79
I.1.1.1 Matières premières utilisées pour la préparation des Nanocapsules et Microparticules.....	79
I.1.1.1.1 Le Mitotane.....	79
I.1.1.1.2 Les polymères	79
I.1.1.1.3 Les tensioactifs et autres excipients.....	80
I.1.1.2 Matières premières utilisées pour la préparation des Microémulsions	80
I.1.1.2.1 Les huiles.....	80
I.1.1.2.2 Les tensioactifs et autres	80
I.1.2. Méthode de préparation	81
I.1.2.1 Préparation des Nanocapsules et des Microparticules	81
I.1.2.2 Préparation des Microémulsions.....	82
I.1.2.2.1 Solubilité du mitotane dans les différents véhicules utilisés.....	82
I.1.2.2.2 Elaboration des diagrammes pseudoternaires de mitotane.....	82
I.1.3. Contrôle physico-chimique	83
I.1.3.1 Taux d'encapsulation, diamètre et potentiel zêta des Nanocapsules de PCL et PCL /RS	83
I.1.3.3 Diamètre des Microémulsions	83
I.1.4. Cinétique de libération in « vitro »	84
I.1.5. Résultats et discussion	84
I.1.6. Bilan de la mise au point et de la caractérisation des différentes formulations de mitotane	92
II. PHARMACOCINETIQUE DES MICROEMULSIONS, DES NANOCAPSULES ET DES MICROPARTICULES DE MITOTANE	
CHEZ DES LAPINS	93
II.1. Matériel et Méthodes	93
II.2. Résultats et discussion	94
II.3. Conclusion	96
III. EVALUATION DES MICROEMULSIONS, DES NANOCAPSULES ET DES MICROPARTICULES DE MITOTANE DANS LE	
MODELE CELLULAIRE CACO-2 ET CHAMBRES DE USSING	97
III.1. Etude de la perméabilité cellulaire dans le modèle Caco-2	97
III.1.1 Matériel et Méthodes	97
III.1.1.1 Matériel.....	97
III.1.1.2 Culture cellulaire Caco-2	97
III.1.1.3 Evaluation de la toxicité cellulaire des formes galéniques de mitotane	98
III.1.1.4 Etude de la perméabilité cellulaire du mitotane	98
III.1.2 Résultats et discussion.....	99
III.1.3 Conclusion	101
III.2. Etude de la perméabilité intestinale dans le modèle de la Chambre de Ussing	103
III.2.1 Matériel et Méthodes	103
III.2.1.1. Matériel.....	103
III.2.1.2 Etude de la perméabilité du jéjunum de rat	103
III.2.2 Résultats	104
III.2.3 Conclusion	105

Discussion générale.....	106
Conclusion	115
Annexes : Development of microemulsion of mitotane for improvement of oral bioavailability	116
Liste des figures	119
Liste des tableaux.....	126
Références bibliographiques.....	127
RESUME.....	139

Introduction générale

Le carcinome corticosurrénalien ou corticosurrénalome est une tumeur rare du cortex surrénal. Son pronostic est mauvais et la plupart des corticosurrénalomes chez les enfants et les adolescents sont des tumeurs sécrétant des hormones. L'une de ces manifestations cliniques est un syndrome de Cushing qui survient à la suite d'une sécrétion excessive et chronique de cortisol dans le sang et de la perte de ses variations nycthémérales quelle qu'en soit l'étiologie. Cliniquement, l'hypercortisolisme va se traduire par une obésité tronculaire, un faciès lunaire, vergetures, ecchymoses, hypertension et intolérance au glucose. Parmi les causes pouvant être à l'origine de ce syndrome, on distingue les étiologies ACTH dépendantes (essentiellement les maladies de Cushing pour 70% des cas et les sécrétions ectopiques paranéoplasiques d'ACTH) et les étiologies ACTH indépendantes (regroupant les tumeurs bénignes et malignes de la corticosurrénale).

Le traitement du syndrome de Cushing vise à obtenir un contrôle rapide de la sécrétion du cortisol. Il est avant tout chirurgical, par exérèse (adénomectomie hypophysaire, surrénalectomie). Le traitement médicamenteux est réservé en cas d'échec ou de risque opératoire. Ces médicaments ont en commun de bloquer la synthèse des corticoïdes surrénaliens. Deux d'entre eux bénéficient d'une indication officielle dans le syndrome de Cushing, l'aminogluthétimide (Oriméthène[®]) et la métyrapone (Métopirone[®]).

Actuellement, une troisième molécule, le mitotane (*o,p'*-DDD ou encore *o,p'*-dichlorodiphényldichloroéthane), présente un intérêt particulier. Cette molécule est à la base un dérivé du DDD, insecticide organochloré dérivé du diphenyléthane, pratiquement insoluble dans l'eau. Son mécanisme d'action original, associe une inhibition de la stéroïdogénèse surrénalienne et une action adrénocorticolytique unique, ce qui a permis son utilisation dans le traitement du carcinome corticosurrénalien. Il existe actuellement dans le cadre d'une AMM européenne, une spécialité (Lysodren[®]), qui a pour indication officielle « le traitement du carcinome surrénalien dans les formes avancées chez le patient inopérable, dans les formes métastatiques, ou dans les formes récidivantes »

Malgré tout, l'*o,p'*-DDD est une molécule peu absorbée au niveau du tractus digestif (40% environ), peu soluble dans le plasma, avec une répartition élective au niveau des tissus

riches en lipides et ses effets secondaires surtout neurologiques sont importants, ce qui impose un contrôle régulier des concentrations plasmatiques.

Plusieurs techniques sont envisageables pour réaliser une forme plus soluble et mieux absorbée de mitotane, comme l'inclusion dans des cyclodextrines, la formation de nanocapsules ou de microémulsions.

De même, peu d'études ont été effectués dans le but de comparer les formulations particulières entre elles.

Notre travail a consisté à mettre au point des microémulsions et des formes particulières de mitotane afin de comparer les biodisponibilités obtenues après administration orale chez le lapin. En effet, les microémulsions et les particules polymériques sont des formes galéniques susceptibles d'améliorer l'absorption de nombreux principes actifs. Il est donc intéressant d'étudier la biodisponibilité obtenue avec ces nouvelles formes et de comparer les résultats obtenus par rapport à ceux de la forme conventionnelle (Lysodren® comprimé) disponible sur le marché.

Dans la partie bibliographique, nous avons fait une présentation du mitotane, de son action thérapeutique et des limites de son utilisation actuelle. Puis, nous avons détaillé les aspects biopharmaceutiques des nanocapsules et des microémulsions tout en soulignant leur intérêt dans la formulation des principes actifs lipophiles.

Notre travail expérimental a permis l'étude de la perméabilité intestinale du mitotane sous forme de microémulsions, de microparticules et de nanocapsules dans des modèles cellulaires Caco-2. Nous avons également réalisé l'étude de la biodisponibilité du mitotane formulé sous forme de microémulsions, microparticules et de nanocapsules chez des lapins. Ainsi, nous avons essayé d'évaluer l'intérêt de ces formulations par rapport à la forme conventionnelle Lysodren® comprimé.

Rappels bibliographiques

I. Le mitotane

I.1. Historique

Le Mitotane (figure 1) ou *o,p'*-DDD (*o,p'*-dichlorodiphényldichloroéthane) est un isomère du DDD, insecticide organochloré, lui-même dérivé du DDT, pesticide synthétisé par Othmar Zeidler en 1874.

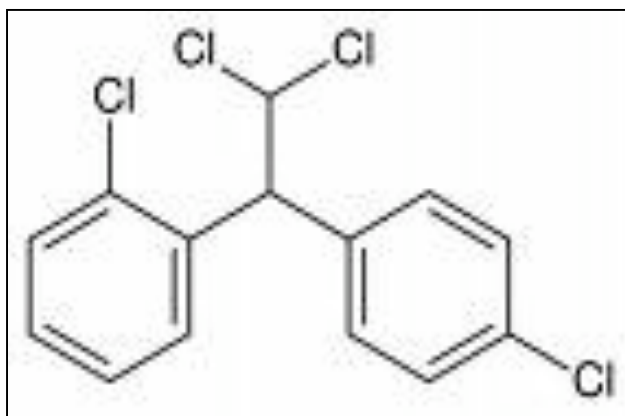


Figure 1 : Structure chimique du mitotane

En 1949, des chercheurs ont rapporté dans une étude sur la toxicité des insecticides (incluant la série du diphenyléthane) que l'administration *per os* en quantité importante de DDD technique (mélange commercial) au chien, entraînait une atrophie des glandes corticosurrénales de l'animal tandis que dans les mêmes conditions le DDT était totalement inefficace (Nelson, 1949).

Quelques années plus tard, Nichols (Nichols and Hennigar, 1957) mettait en évidence que, dans le DDD technique, le principal agent responsable de l'effet toxique était l'*o,p'*-DDD.

L'analyse chimique du DDD a révélé une composition complexe sous la forme d'un mélange de différents isomères (Figure 2) en proportions variables dont les principaux représentants sont l'*o,p'*-, *m,p'*- et *p,p'*-DDD (Cueto and Brown, 1958).

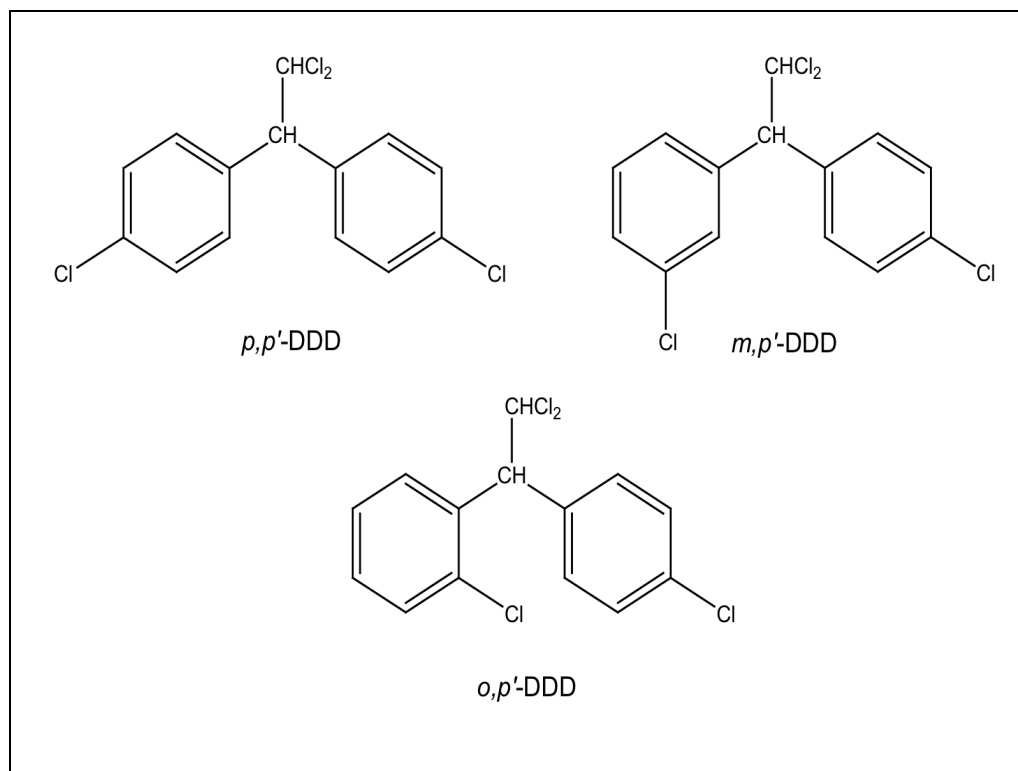


Figure 2 : Structure des trois principaux isomères du DDD

Chez le chien, le *p,p'*-DDD n'a montré aucune efficacité comme anticorticosurrénalien après 10 semaines de traitement oral (Cueto et al., 1958). Par conséquent, le DDD commercial essentiellement composé de *p,p'*-DDD (83%) a une action inhibitrice sur les corticosurrénales fortement liée à celle de l'*o,p'*-DDD. Cette fraction représentant environ 10% était considérée comme un contaminant.

Les premières études pharmacocinétiques et cliniques de l'*o,p'*-DDD (mitotane) chez l'homme ont été réalisées au début des années 1960 (Bergental, 1960).

La première utilisation importante du mitotane date de 1961, dans le traitement de la maladie de Cushing par hyperplasie bilatérale des surrénales (Wallace et al., 1961). Ces travaux donnèrent le signal de départ à une série d'expérimentations cliniques chez l'homme.

En 1966, Hutter et Kayhoe (Hutter and Kayhoe, 1966) évaluèrent le mitotane chez 138

patients souffrant de carcinome corticosurrénalien et comparèrent leur résultat avec 48 cas de carcinomes surrénaux publiés et traités sans mitotane. Les doses de mitotane dans cette étude sont administrées oralement 3 à 4 fois par jour. Les doses initiales sont progressivement augmentées jusqu'à des doses de 8 à 10 g par jour. Les doses maximales journalières étaient de 125 mg/kg. A la dose maximale, des toxicités réversibles de type gastro-intestinales avec nausées, vomissements et diarrhées sont fréquentes. Des toxicités cutanées et neuromusculaires sont également observées. De même, concernant l'efficacité du mitotane, une réduction de plus 50% du cortisol urinaire est observée et accompagnée d'une diminution des symptômes endocriniens de la maladie. Cette réponse fut observée sur une période moyenne de 5 mois. La réduction de la taille tumorale obtenue après 7 mois de traitement concernait 42% des patients étudiés. L'analyse de la courbe de survie indique une parfaite corrélation entre la réponse endocrinienne et la survie globale.

Cette première étude sur une série de 138 patients atteints de carcinome corticosurrénalien a permis de retenir l'indication de l'*o,p'*-DDD ou mitotane dans le traitement du carcinome corticosurrénalien avancé inopérable, de type fonctionnel ou non fonctionnel.

Actuellement, le mitotane est commercialisé par les laboratoires HRA Pharma sous le nom de Lysodren[®], dans l'indication spécifique du carcinome corticosurrénalien avancé inopérable, de type fonctionnel ou non fonctionnel.

Le carcinome corticosurrénalien est dit fonctionnel (60% des cas) lorsqu'il s'accompagne d'une hypersécrétion hormonale parlante ; le plus souvent, il s'agit d'une hypersécrétion de cortisol.

En France, le mitotane possède le statut de médicament orphelin depuis Juin 2002, c'est à dire qu'il s'applique à une pathologie assez rare car les coûts de développement et de distribution du Lysodren[®], ne sont raisonnablement pas amortis par les seules ventes sur le territoire national. Son utilisation est généralement étendue à l'ensemble des hypercorticismes (CCS, maladie de Cushing, préparation à la surrénalectomie), l'action recherchée étant la diminution de la cortisolémie.

I.2. Caractéristiques physico-chimiques

Après les premières études de Cueto précédemment citées (Cueto and Brown, 1958; Cueto et al., 1958), l'*o,p'*-DDD (ou le mitotane) fut identifié comme le principal agent adrénolytique du mélange complexe DDD. Il se présente sous forme d'une poudre blanche

cristalline. Il est insoluble dans l'eau, soluble dans l'éthanol, l'éther et le tétrachlorure de carbone.

Dans le cadre de la mise en forme des molécules lipophiles, Trotta a utilisé le mitotane comme modèle d'étude en l'incorporant dans des nanosuspensions (Trotta et al., 2001) ; Il a étudié la solubilité du mitotane dans l'eau à 25°C qu'il trouve égale à 3 mg/l. Dans l'albumine à 2%, la solubilité est d'environ 40 mg/l. Cette solubilité augmente de façon significative dans les solvants organiques. Ainsi dans l'alcool benzylique, la solubilité du mitotane atteint 246 mg/l et 518 mg/l dans la triacétine.

La masse moléculaire du mitotane est de $M_r = 320,05$ g.

I.3. Mécanisme d'action

Le mitotane agit sur les zones fasciculée et réticulée de la corticosurrénale par inhibition de la 11 β -hydroxylation (du composé S, de la désoxycorticostérone et de la corticostérone, figure 3) et par arrêt de la chaîne de synthèse du cholestérol, ce qui diminue la synthèse du cortisol et de l'aldostérone (Trainer and Besser, 1994). Hormis cette inhibition de la 11 β -hydroxylation, on observe un effet cytolytique avec atrophie et fibrose des zones fasciculée et réticulée des surrénales, effet qui serait lié à une altération des fonctions mitochondriales des cellules corticosurrénales (Ahlman et al., 2001).

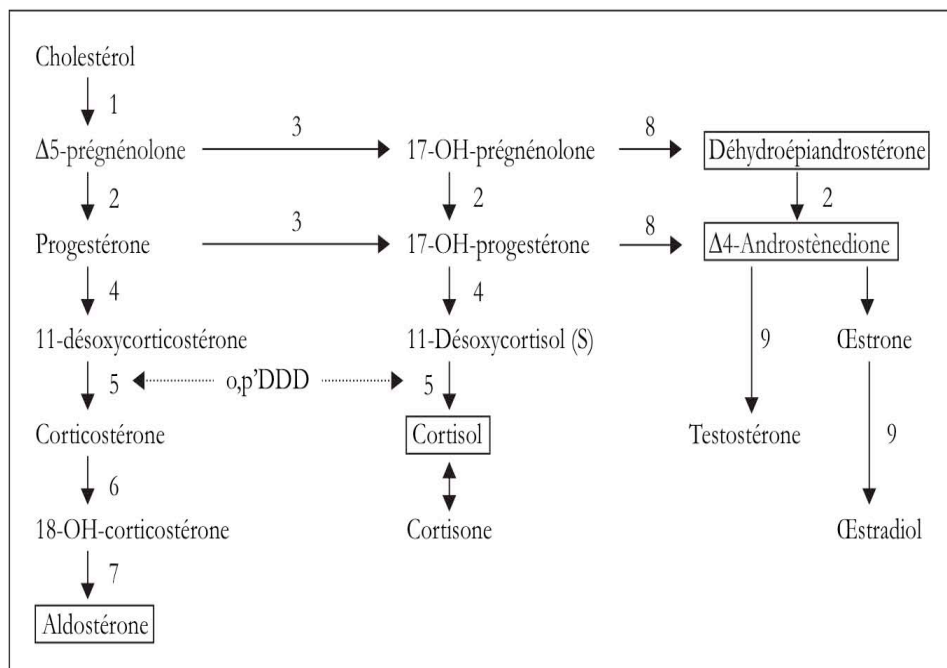


Figure 3 : Biosynthèse des hormones surrénaliennes (Bacchetta and Droz, 2005)

I.4. Caractéristiques pharmacocinétiques

I.4.1 Absorption et biodisponibilité du mitotane

La biodisponibilité orale a été estimée à partir des travaux de Moy (Moy, 1961) à 40%. En effet, le dosage dans les matières fécales a permis de retrouver 62 à 66% du produit sous une forme non métabolisée. L'impact de l'alimentation sur le profil plasmatique a fait l'objet de quelques évaluations. Une quantification du taux d'absorption a été publiée par Moolenaar (Moolenaar et al., 1981). Le mitotane a été administré sous différentes formes : comprimés à micro-granules, dans le lait, chocolat et enfin dans une émulsion lipidique. Les différentes formulations ont été administrées à dose orale unique. Les concentrations maximales ont été observées entre la 5^{ème} et 10^{ème} heure avec toutes les formes administrées. Les plus faibles concentrations plasmatiques ont été observées avec les microgranules (G) de mitotane. Dans tous les cas, le mélange au lait (M) semblait fournir la meilleure absorption (Figure 4).

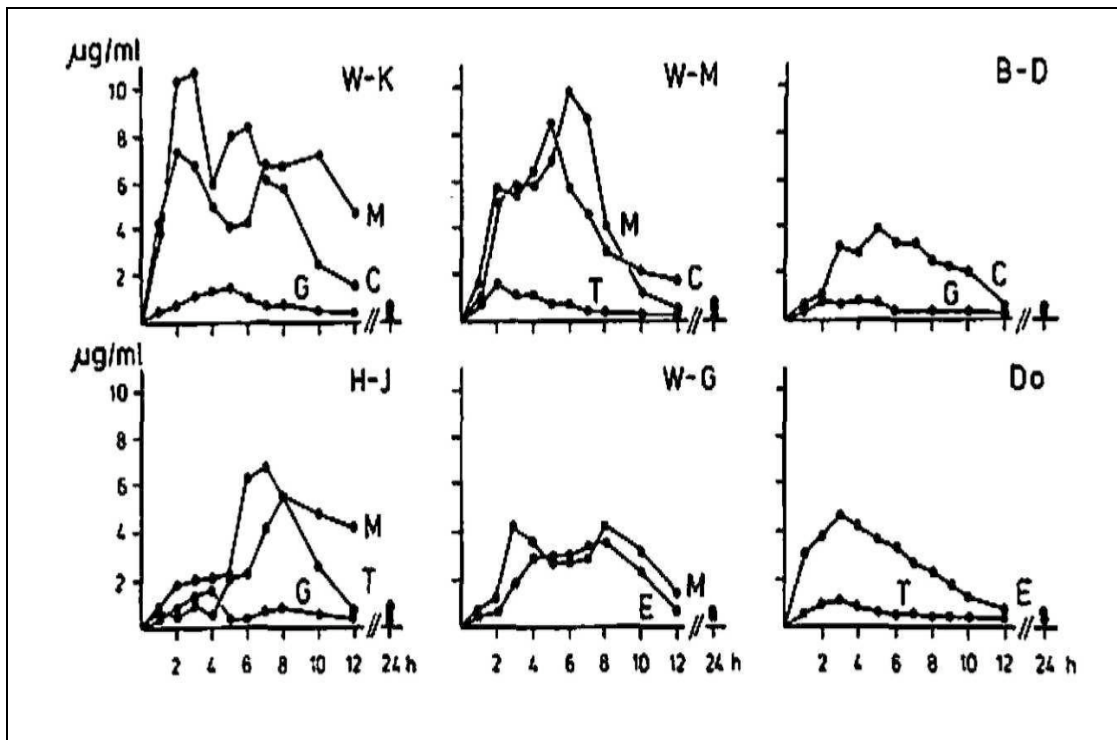


Figure 4 : Concentration plasmatique (mg/l) du mitotane en fonction du temps (h) après administration orale unique de 2g chez 6 patients atteints de carcinome. (M : Lait, C : Chocolat, T : Comprimé, G : Granulés, E : Emulsion) (Moolenaar et al., 1981)

Une autre étude a permis d'évaluer l'impact de l'alimentation sur l'absorption du mitotane chez des chiens atteints de carcinome corticosurrénalien (Watson et al., 1987).

Cette étude a été réalisée sur des chiens séparés en 3 groupes. Un premier groupe a reçu des comprimés de mitotane (Lysodren®), le second groupe, des émulsions (mélange de gomme arabique, huile de maïs et de l'eau) de mitotane et le dernier groupe, de la poudre de mitotane dispersée dans l'alimentation enrichie en huile de maïs.

La surface sous la courbe (SSC) obtenue dans le troisième groupe c'est-à-dire dans le groupe des chiens nourris avec de la poudre de mitotane mélangée à l'alimentation enrichie en huile de maïs est la plus importante de l'ordre de 63 mg.h/l. Dans le cas de l'émulsion de mitotane la SSC obtenue est de 40 mg.h/l alors qu'avec le Lysodren® seul, la SSC atteint à peine 2 mg.h/l (Figure 5).

Cette étude confirma que l'absorption du mitotane peut être améliorée par sa formulation galénique et que l'alimentation enrichie en huile de maïs est un bon moyen pour augmenter la biodisponibilité du mitotane.

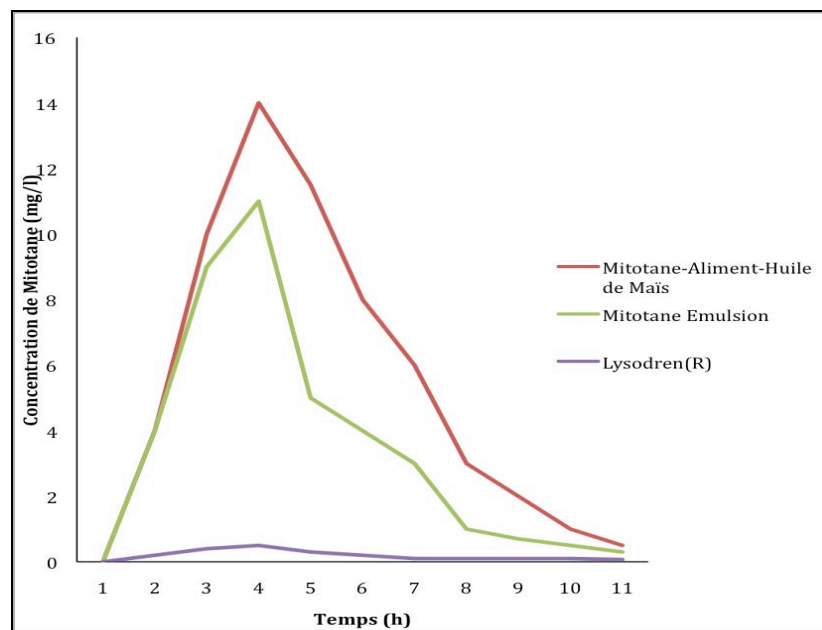


Figure 5 : Concentration plasmatique (mg/l) du mitotane (50 mg/kg) en fonction du temps (h) après administration orale chez des chiens (Watson et al., 1987)

Lorsque le mitotane est administré à des sujets atteints de corticosurrénalome à la dose de 11g par jour durant 14 à 210 j, on constate que les taux sanguins *d'o,p'*-DDD augmentent de façon progressive chez les patients (Figure 6).

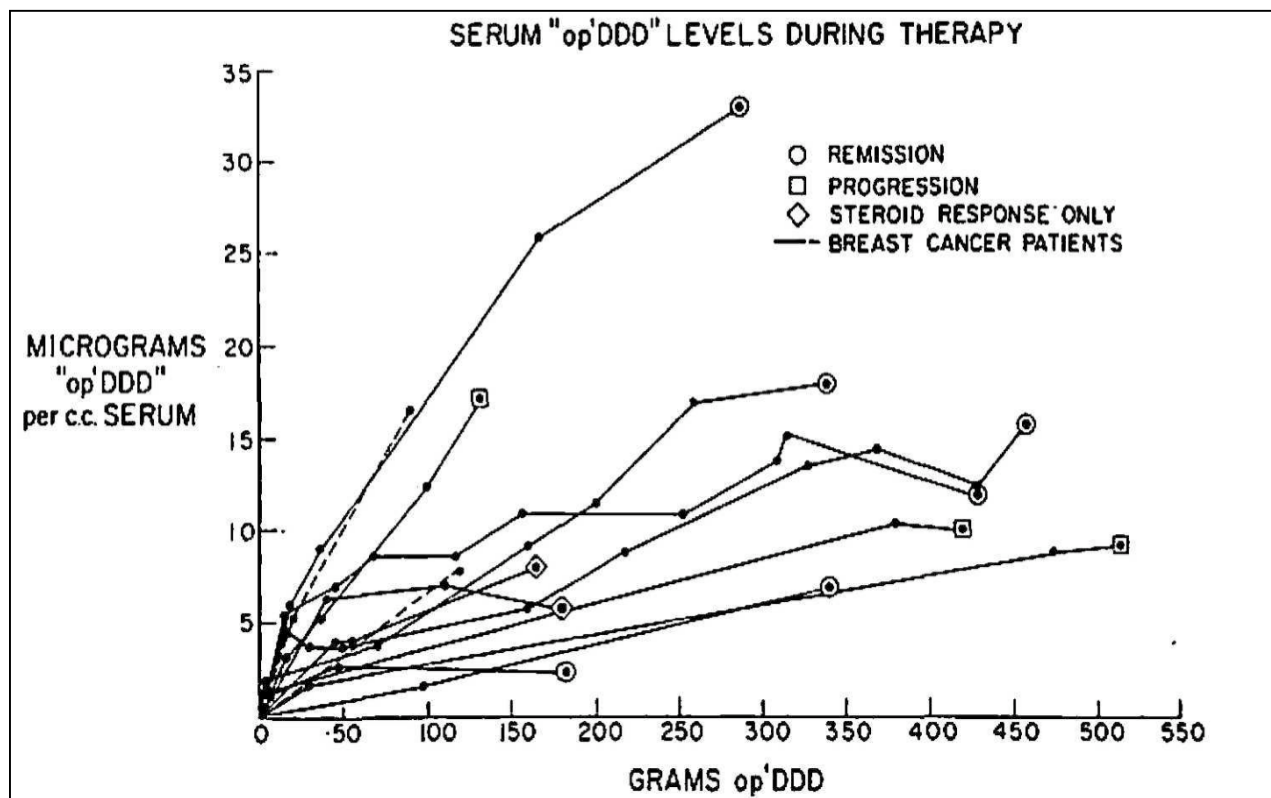


Figure 6 : Evolution des concentrations plasmatiques du mitotane chez des patients atteints de corticosurrénalome en fonction de la dose administrée (Moy, 1961)

Les dosages montrent que les concentrations plasmatiques sont très variables selon les patients allant de 7 à 89 mg/l et que ces chiffres continuent à augmenter pendant toute l'expérience. Enfin il est également mentionné que des troubles nerveux sévères ont été observés chez certains sujets dont les concentrations en mitotane étaient supérieures à 20 mg/l.

I.4.2 Distribution

Concernant la distribution tissulaire, les études chez le rat et le chien (Touitou et al., 1977), font mention d'une localisation élective du produit dans le tissu adipeux et de faibles concentrations dans les surrénales, le foie et les reins, ce qui est conforme aux propriétés lipophiles du mitotane. Deux études beaucoup plus récentes confirment le tropisme du mitotane pour les tissus gras. La première est celle réalisée par Silvia De Francia (De Francia et al., 2006) en vue d'évaluer l'accumulation du mitotane et de ses métabolites chez l'homme et le rat. Dans cette évaluation, des dosages de mitotane ont été réalisés dans le plasma, les hématies, les tissus gras, le rein, le foie, le cerveau et dans les surrénales des rats traités par le mitotane durant 3 mois. Il apparaît clairement que les globules rouges et les tissus gras constituent des lieux de stockage prépondérants du mitotane (Figure 7).

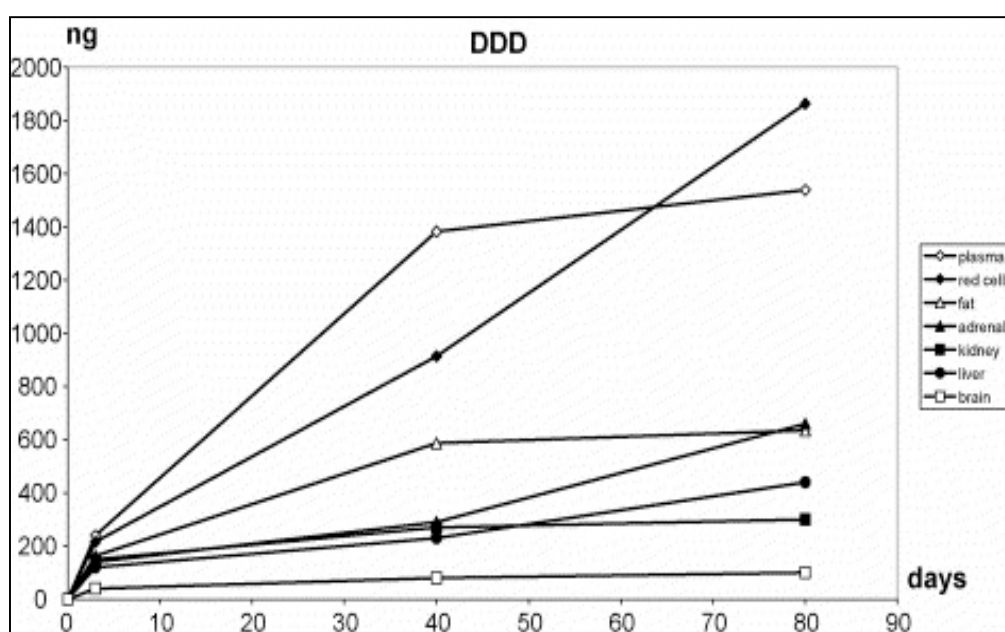


Figure 7 : Concentration tissulaire du mitotane dans les globules rouges et organes après administration à des rats (De Francia et al., 2006)

Hermansson quantifia également l'accumulation du mitotane dans les tissus (Hermansson et al., 2008).

Cette évaluation est réalisée à dose unique sur des cochons d'Inde durant 10 jours. Les animaux ont reçu une administration orale de mitotane dispersée dans de l'huile de maïs (30 mg/kg).

La mesure des concentrations plasmatiques montre un pic à 834 ng de mitotane/g de plasma, 8 h après l'administration. La phase d'élimination reste extrêmement longue avec une demi-vie de 28 jours. Cette demi-vie longue peut être expliquée par le stockage dans les tissus graisseux qui se comporteraient comme un réservoir de mitotane.

I.4.3 Métabolisme

Le métabolisme est dépendant de l'espèce animale. Le mitotane entraîne chez le chien une atrophie corticosurrénalienne particulièrement nette au niveau des zones fasciculée et réticulée (Cazorla and Moncloa, 1962). Par contre, aucune manifestation histologique n'est visible chez le rat, la souris, le lapin et le macaque rhésus, même après un traitement prolongé (Tullner, 1970). Ces constations pourraient être liées à des différences dans le métabolisme de l'*o,p'*-DDD conduisant chez les espèces sensibles comme le chien, à la formation d'un métabolite actif. Les lésions de la surrénale apparaissent chez le chien dès le 2^{ème} jour de traitement à 100 mg/kg, l'atrophie des zones fasciculo-réticulées étant complète en 6 semaines tandis que le glomérule n'est touché qu'après 3 mois de traitement. L'étude de l'ultrastructure du cortex surrénalien permet de mettre en évidence une atteinte précoce de 12 heures à la dose de 200 mg/kg. De même, le suivi des concentrations plasmatiques d'un des métabolites (dichlorodiphénylène ou DDE) du mitotane montre une cinétique comparable à celle du mitotane avec une concentration maximale de 1690 ng/g de plasma. Cela montre que le profil plasmatique du DDE est proche de celui du mitotane chez le cochon d'Inde (Figure 8).

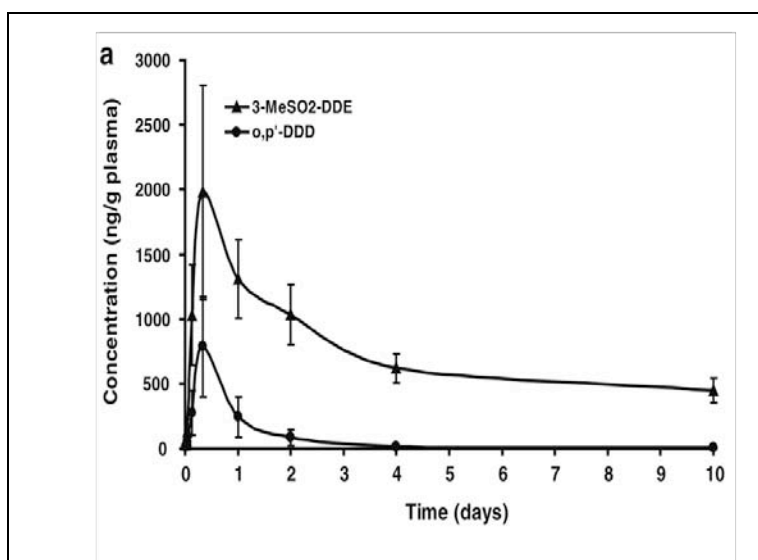


Figure 8 : Evolution de la concentration plasmatique du mitotane et du DDE chez des cochons d'Inde (Hermansson et al., 2008)

Les auteurs ont supposé qu' après stockage dans les tissus adipeux, le mitotane libéré serait progressivement métabolisé au niveau hépatique par hydroxylation et oxydation en deux composés (Figure 9) le DDE (dichlorodiphényléthène) et le DDA (dichlorodiphénylacétate) (Kitamura et al., 2002). Ces éléments confirment les données déjà observées par Finnegan (Finnegan et al., 1949).

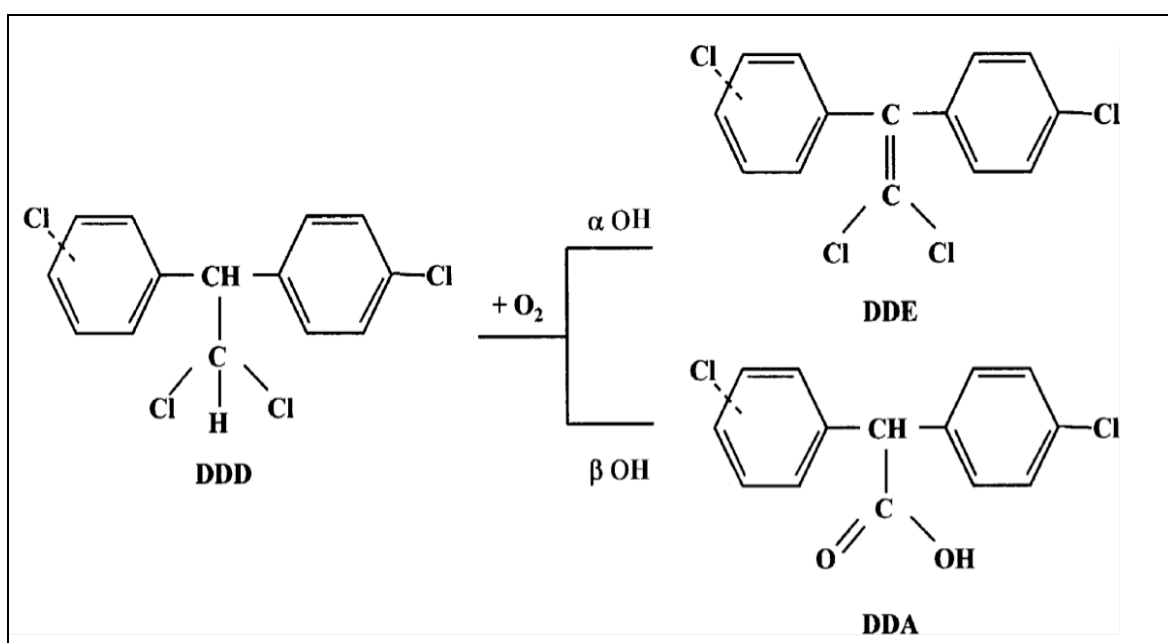


Figure 9 : Métabolisme hépatique du mitotane (De Francia et al., 2006)

La mise au point d'une méthode de dosage du mitotane par chromatographie liquide (Andersen et al., 1999) a permis une évaluation de la cinétique plasmatique des différents métabolites et du mitotane chez trois patients. Les résultats résumés dans le tableau suivant montrent que le DDA est à une concentration 10 fois plus importante que le mitotane et le DDE dans la circulation plasmatique (Tableau 1). Cette hypothèse est confirmée par l'étude de Hermansson (Hermansson et al., 2008) qui montra que les vitesses d'élimination du mitotane et du DDE sont superposables avec des demi-vie respectives de 28 et 50 jours (Figure 10). Selon les auteurs, *l'o,p'*DDD (ou le mitotane) et le DDE s'accumuleraient dans le tissu adipeux alors que le DDA diffuserait directement dans le plasma et subirait ensuite une élimination urinaire.

Composés	Concentration (μM)	r^2
o,p'DDA	comprise entre 1-800	0,998
o,p'DDD	comprise entre 1-80	0,999
o,p'DDE	comprise entre 1-80	0,999

Tableau 1 : Concentrations du mitotane et de ses métabolites dans le plasma humain (Andersen et al., 1999)

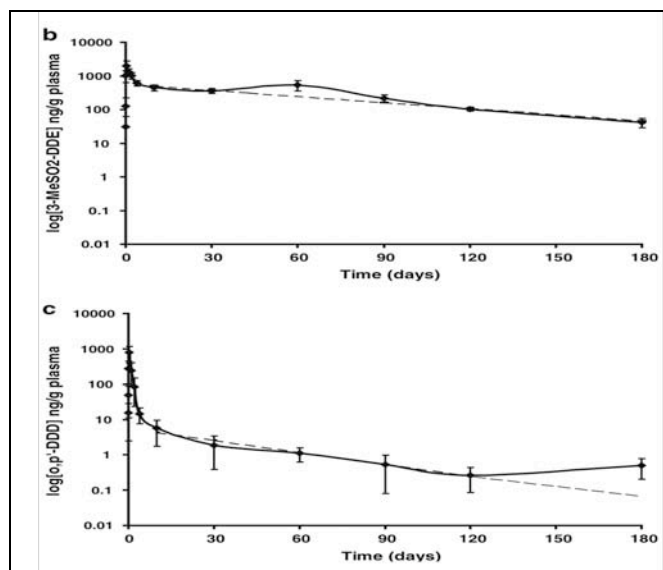


Figure 10 : Cinétique d'élimination du mitotane et du DDE dans le compartiment plasmatique chez des cochons d'Inde (Hermansson et al., 2008)

I.4.3 Elimination

Les premières données disponibles chez l'animal suite à l'administration du DDD (DDD technique) à des chiens mettaient en évidence des concentrations urinaires élevées de en dichlorodiphenylacétate (DDA), un métabolite du DDD (Finnegan et al., 1949).

L'étude de Moy (Moy, 1961) confirma ces observations chez l'homme et décrivit également une absence d'o,p'-DDD dans les urines. En effet, dans les urines de 24 heures, environ 10% de la dose quotidienne de l'o,p'-DDD, administrée par voie buccale est retrouvée sous forme de DDA. Il n'y a par contre aucune trace d'o,p'-DDD dans les urines. Le DDA est également détecté dans la bile et ses concentrations peuvent atteindre 2,17 mg/ml.

Dans les matières fécales, on retrouve essentiellement de l'*o,p'*-DDD qui n'a pas été absorbé et une quantité faible de DDA, variant de 1 à 17%. Wedermeyer conclut que la présence de DDA dans les fèces est le témoin de la transformation métabolique du DDD par la flore intestinale (Wedermeyer, 1967).

Après administration de 100 mg d'*o,p'*-DDD radioactif à des rats, 1% de la dose a été récupérée dans les urines au bout de 6h, et seulement 7% au bout de 8 jours. Par contre l'élimination fécale atteint 50% en 48 heures. Un autre métabolite, le dichlorodiphényléthène (DDE), (Reif et al., 1974) a également été signalé.

De cette pharmacocinétique, il en ressort également que :

- L'état d'équilibre n'a pas été atteint pendant toute l'expérimentation chez les sujets malades et on observe une grande variabilité interindividuelle pour une même dose administrée. De plus l'augmentation des concentrations sériques, lors d'un traitement de longue durée, est très variable d'un sujet à l'autre.

- Il est difficile d'établir une corrélation entre la dose administrée et la concentration plasmatique du produit. Ceci pourrait être dû à une élimination urinaire et à un stockage très variable de l'*o,p'*-DDD et ses métabolites dans les différents tissus.

- Le taux sanguin ne peut en aucun cas être retenu comme le reflet de la réponse du malade au traitement. En période de rémission clinique et biologique les concentrations plasmatiques varient selon les malades dans un rapport de 1 à 15. Il a été conclu que le taux sanguin n'est pas un bon index de l'efficacité du produit. Le cas d'une fillette de 10 ans chez qui la mitotanie a atteint 140 mg/l et qui est restée insensible au traitement a servi d'exemple (Moy, 1961).

- Les taux sanguins ne sont pas nécessairement élevés chez les sujets ayant des effets indésirables et à l'arrêt du traitement, les concentrations sanguines du produit diminuent progressivement mais l'*o,p'*-DDD reste détectable 2 à 3 mois après la suspension du traitement. La persistance des taux plasmatiques de l'*o,p'*-DDD serait liée en premier lieu à la quantité totale administrée ; ainsi 10 semaines après l'arrêt du traitement, le taux plasmatique chez une malade traitée par une forte dose cumulée de 1900 g atteignait la valeur de 60 mg/l (Moy, 1961). Ce phénomène serait lié à une mobilisation de l'*o,p'*-DDD des tissus de stockage, en particulier le tissu adipeux.

- En plus de l'*o,p'*-DDD, le sang et les tissus des sujets traités renferment un métabolite soluble en milieu alcalin, le dichlorodiphénylacétate (DDA) qui est retrouvé en quantité importante dans les urines.

I.5. Evaluations cliniques et posologie du mitotane[®] AP-HP et du Lysodren[®]

Le mitotane reste le traitement de référence du carcinome corticosurrénalien en adjuvant après exérèse chirurgicale des formes localisées et comme traitement médical des formes avancées ou métastatiques, associées ou non à la chimiothérapie (Dickstein et al., 1998; Baudin et al., 2001). Une seule forme galénique du mitotane est disponible actuellement en Europe : le Lysodren[®] comprimés.

Afin d'atteindre rapidement et de façon optimisée les concentrations thérapeutiques plusieurs études ont essayé de corrélérer les doses de mitotane à utiliser avec la concentration plasmatique désirée. Dans ces premières études, le mitotane était utilisé sous forme de poudre brute diluée dans du lait ou dans une émulsion lipidique.

Les taux sériques du mitotane peuvent être mesurés par la chromatographie liquide haute performance (Andersen et al., 1999) ou en phase gazeuse (Benecke et al., 1987). En pratique, la chromatographie liquide est beaucoup plus utilisée.

En 1984, sur un échantillons de 35 patients atteints de carcinome surrénalien, van Slooten (van Slooten et al., 1984), a corréler la réponse tumorale et la concentration plasmatique du mitotane. Il a observé un allongement du temps de survie chez 14 patients pour lesquels la concentration plasmatique du mitotane est au delà de 14 mg/l. En dessous de 10 mg/l, il est noté une absence d'efficacité thérapeutique et au delà de 20 mg/l, des toxicités digestives et neuromusculaires réversibles.

Une étude rétrospective (Haak et al., 1994) sur une plus large population de 96 patients atteints de carcinome corticosurrénalien a été effectuée en vue d'évaluer l'efficacité du mitotane en adjuvant sur la survie globale.

Dans cette évaluation, les patients sont stratifiés en fonction de la mitotanémie (> à 14 mg/l ou < à 14 mg/l). Presque la moitié (49%) des patients ont bénéficié d'une résection tumorale totale et 39% d'une résection partielle. Les patients qui ont bénéficié d'une résection totale de la tumeur ont une survie globale plus longue et le traitement adjuvant n'influence pas cette survie.

Sur 62 patients qui ont pris de façon régulière le traitement durant les phases symptomatiques de la maladie, 30 patients ont eu une mitotanémie > 14 mg/l et ont eu une survie globale longue par rapport aux patients n'ayant pas pris le traitement de façon régulière.

Le seuil de 14 mg/l sera ainsi considéré comme limite au delà de laquelle une action thérapeutique efficace est observée. Le seuil d'efficacité ainsi défini n'est pas facile à atteindre avec les formes galéniques commercialisées du mitotane. Le nombre de prise quotidien n'était pas clairement défini et les délais pour atteindre ce seuil sont longs (plus de 4 mois).

Le mitotane existait sous deux formes galéniques jusqu'au 1^{er} octobre 2004 : le Mitotane[®] AP-HP, sous forme de granulés à libération prolongée et commercialisé jusqu'en 2004 et le Lysodren[®] comprimés, encore commercialisé aujourd'hui. Deux études ont analysé la capacité de ces deux produits pour atteindre un taux sérique supérieur à 14 mg/l.

Le Mitotane[®] AP-HP était constitué de granulés à libération prolongée contenant de l'*o,p'*-DDD et de l'acétylphtalate de cellulose. Chaque gélule contenait 500 mg de mitotane. Le Mitotane[®] AP-HP a été évalué (Baudin et al., 2001) sur des patients dans une étude monocentrique (Institut Gustave Roussy-France). Les objectifs de cette étude étaient de confirmer l'impact de la mitotanémie sur la survie globale des patients atteints de carcinome surrénalien (1) et de corréler la mitotanémie à la posologie quotidienne du mitotane (2).

Les patients recrutés dans l'étude prenaient du mitotane depuis 1995. Le diagnostic de la maladie était confirmé en l'anatomopathologie à l'Institut Gustave Roussy. Les tumeurs fonctionnelles étaient confirmées par l'évaluation plasmatique et urinaire des hormones surrénaliennes. Pour rappel, le carcinome corticosurrénalien est dit fonctionnel (60% des cas) lorsqu'il s'accompagne d'une hypersécrétion hormonale parlante ; le plus souvent, il s'agit d'une hypersécrétion de cortisol.

Les patients sont répartis en 2 groupes : le premier groupe, 13 patients métastatiques ayant bénéficié de chirurgie, prenaient le mitotane comme thérapie néoadjuvante (c'est-à-dire avant la chirurgie).

Le deuxième groupe, 11 patients avec une rémission complète, prenaient le mitotane comme adjuvant (après chirurgie ou radiothérapie).

Dans les deux groupes, le mitotane était administré oralement 3 fois par jour, avec des doses comprises entre 6 et 12 g pendant 3 semaines. La dose maximale est maintenue au moins sur une durée de 3 mois ou jusqu'à ce que la concentration plasmatique du mitotane soit supérieure à 14 mg/l. La concentration plasmatique est mesurée par chromatographie liquide haute pression tous les 2 mois durant les 6 premiers mois de traitement. Le traitement est réajusté en fonction de la réponse tumorale, des effets indésirables observés et de la mitotanémie. Dans tous les cas, la mitotanémie objectivée chez tous les patients était dans la fourchette 14-20 mg/l.

En vue de compenser la freination totale de la sécrétion cortisolique, une compensation par l'hydrocortisone et la fludrocortisone est instaurée avec un régime diététique équilibré en sodium.

Un suivi biologique et radiologique était effectué tous les 2 mois ou à l'arrêt du traitement. La toxicité est graduée selon l'échelle de l'Organisation Mondiale de la Santé.

Concernant la réponse tumorale dans le groupe 1, constitué d'une série de 13 patients (néoadjuvant), 31% des patients soit 4 patients ont eu une réponse significative. Un patient du groupe a eu une réponse complète. Les durées de la réponse tumorale sur les 4 patients du groupe 1 sont de 10, 11, 33 et 48 mois. Une réponse hormonale est observée sur 3 patients ayant eu une réponse tumorale. Ces 4 patients ont tous eu des concentrations plasmatiques de mitotane supérieures à 14 mg/l.

Six patients au total ont eu des concentrations supérieures à la concentration seuil. Tous les autres patients n'ayant pas répondu ont eu des mitotanémies strictement inférieures à <14 mg/l.

Dans le groupe 2 constitué d'une série de 11 patients (mitotane en adjuvant), 72% soit 8 patients ont eu une progression de la maladie, dans la première année d'initiation du traitement par le Mitotane[®] AP-HP. Trois patients n'ont pas eu une progression de la maladie et sur les trois, 2 patients ont des concentrations plasmatiques de mitotane > à 14 mg/l.

Il en ressort de cette étude de dose - efficacité avec le Mitotane[®] AP-HP, que les doses de mitotane utilisées sont de 6 à 12 g par jour dans les trois semaines d'initialisation du traitement. Chez 58 % de patients soit 14 patients qui ont eu une mitotanémie > à 14 mg/l, la progression de la maladie est restée faible et la réponse au traitement satisfaisante. Aucune corrélation n'a été trouvée entre la mitotanémie et les paramètres morphométriques des patients. Par contre, une faible corrélation ($r^2 = 0,34$) est trouvée entre les concentrations plasmatiques élevées de mitotane et les doses cumulées journalières (Figure 11).

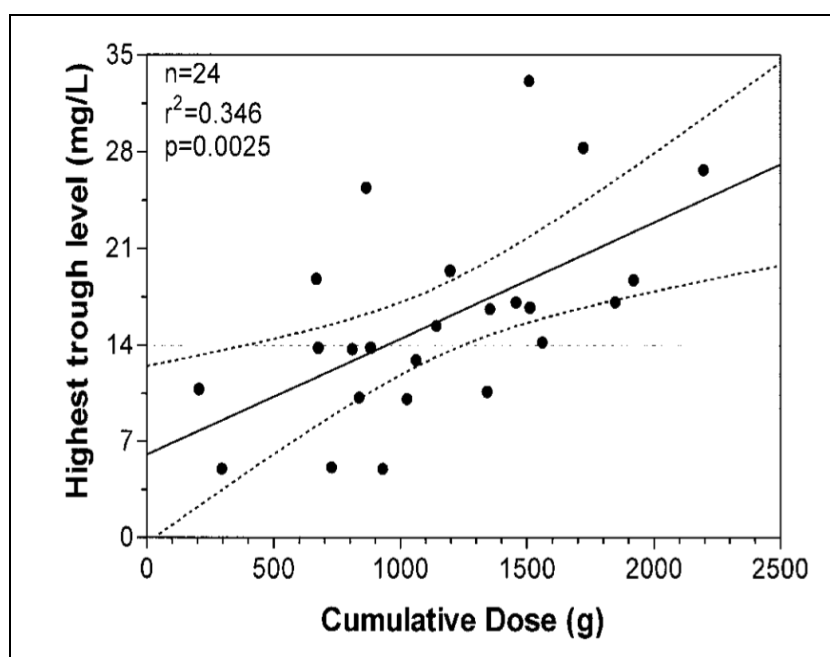


Figure 11 : Corrélation entre doses totales de mitotane et les mitotanémies les plus élevées chez 24 patients atteints de carcinome surrénalien (Baudin et al., 2001)

Le temps nécessaire pour atteindre la concentration seuil avec le Mitotane[®] AP-HP est d'en moyenne 113 jours (environ 4 mois) avec une dose cumulative de 1103 g soit une dose moyenne journalière de 9 g.

Cette étude confirme qu'une concentration supérieure à 14 mg/l permet d'obtenir des réponses tumorales favorables (en adjuvant ou néoadjuvant). Cette étude montre également que la dose journalière de Mitotane[®] AP-HP permettant d'atteindre la concentration plasmatique seuil, est en moyenne de 9 g soit 18 gélules de Mitotane[®] AP-HP par jour durant 4 mois. Cette posologie longue et élevée serait l'une des raisons qui ferait retirer cette spécialité du marché.

Actuellement, une autre spécialité est disponible sur le marché : il s'agit du Lysodren[®] qui a obtenu une Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) européenne et qui est commercialisé par la société HRA Pharma. Le Lysodren[®] est constitué de l'*o,p'*-DDD mélangé à du polyéthylène glycol. Chaque comprimé est également dosé à 500 mg de mitotane.

Terzolo a évalué le Lysodren[®] sur une série de 8 patients (Terzolo et al., 2000). Comme dans les études précédentes, la concentration plasmatique considérée comme efficace devait être comprise entre 14 et 20 mg/l. L'objectif était d'évaluer si le Lysodren[®] pouvait permettre de diminuer les doses journalières tout en gardant comme objectif la fourchette de mitotanémie efficace.

Dans cette étude, 8 patients atteints de carcinome corticosurrénalien ont été recrutés au centre d'oncologie médicale de Chieri (Italie). Certains de ces patients avaient une altération de l'état général ne permettant pas une chimiothérapie classique, les autres refusaient tout simplement une chimiothérapie ou encore ayant déjà reçu une chimiothérapie et en progression de la maladie.

Le mitotane (Lysodren[®]) a été fourni par les laboratoires Bristol-Myers Squibb Canada. Les posologies orales doivent augmenter progressivement de 1 jusqu'à 3 g. Quand la mitotanémie atteint 14 mg/l, la posologie journalière est réajustée entre 1 et 2 g. L'administration orale du Lysodren[®] est ensuite poursuivie jusqu'à la progression de la maladie ou l'apparition d'effets indésirables.

En vue de compenser la freination totale de la sécrétion cortisolique, une compensation par l'hydrocortisone et la fludrocortisone est instaurée avec un régime diététique équilibré en sodium. Aucun patient n'était insuffisant hépatique ou rénal. Un suivi biologique, y compris mitotanémie et radiologique était effectué tous les 3 mois ou à l'arrêt du traitement. La toxicité est graduée selon l'échelle de l'Organisation Mondiale de la Santé.

Les résultats montrent une augmentation progressive de la concentration plasmatique du mitotane et cette augmentation est corrélée à la dose totale de mitotane absorbée ($r > 0,8$; figure 12). La mitotanémie minimale est atteinte chez tous les patients après 3-5 mois d'administration avec une dose totale moyenne de 363 g ce qui correspond en moyenne à 3 g de mitotane soit 6 comprimés de Lysodren[®] par jour durant 4 mois. La durée moyenne du traitement jusqu'à progression est de 9 mois.

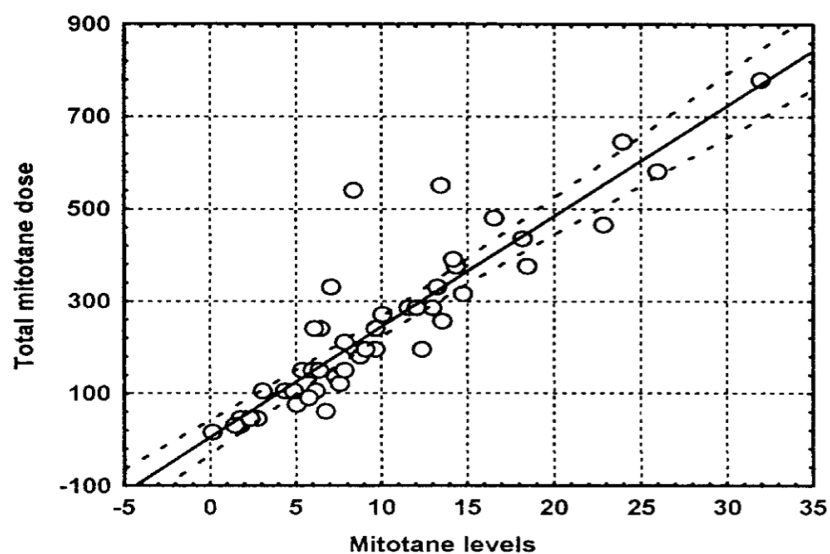


Figure 12 : Corrélation entre doses totales de mitotane (Lysodren[®]) et les mitotanémies chez 8 patients atteint de carcinome surrénalier (Terzolo et al., 2000)

Ci joint la figure 13 montrant l'évolution de la mitotanémie et de la dose journalière chez 2 patients traités avec du Lysodren[®].

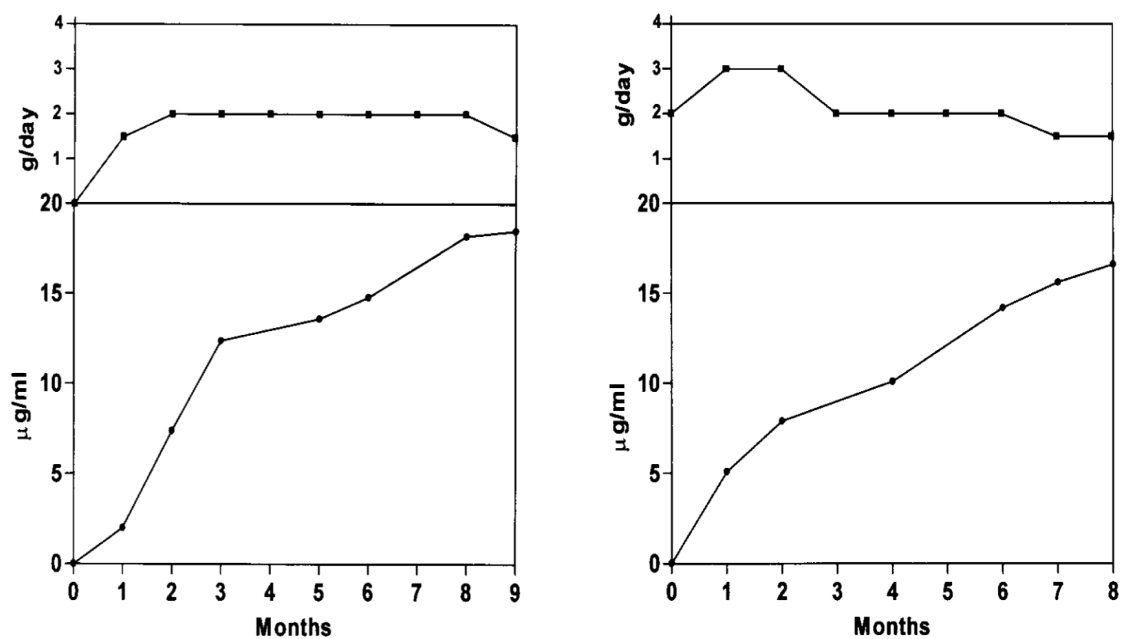


Figure 13 : Mitotanémie et doses journalières de Lysodren[®] durant les 8 premiers mois chez deux patients (Terzolo et al., 2000)

Concernant le taux de réponse observée, 50% des patients ont eu une stabilisation tumorale, 2 patients une réponse partielle et 25% des patients ont eu une progression de la maladie.

Ces résultats corroborent les observations de van Slooten qui relie la réponse tumorale avec une mitotanémie minimale de 14 mg/l.

En définitive, lorsque la mitotanémie cible est atteinte, le mitotane semble avoir un effet favorable sur la durée de vie des patients si le traitement est débuté immédiatement après une résection chirurgicale incomplète ou chez des patients porteurs d'une tumeur à un stade avancé inopérable.

I.6. Effets indésirables et limites d'utilisation du mitotane[®] AP-HP et du Lysodren[®]

Depuis sa commercialisation, l'utilisation du mitotane a été limitée en thérapeutique par les effets indésirables digestifs et neuromusculaires. Les observations de van Slooten (van Slooten et al., 1984) corrélaient les effets toxiques observés à une concentration plasmatique dépassant les 20 mg/l.

Baudin et collaborateurs (Baudin et al., 2001) ont traité 24 patients par le Mitotane[®] AP-HP. Les toxicités observées sont gastro-intestinales (nausées et anorexie), neurologiques, dermatologiques (rash et prurit) et gynécomasties. L'étude de la toxicité du mitotane sur le système nerveux central a été approfondie. Chez 9 patients ayant présenté une toxicité neurologique, 5 ont souffert de somnolence, 3 de troubles visuels, 2 de paresthésies et 1 de confusion. Trois patients présentant une toxicité neurologique combinant somnolence et vertiges avaient des taux sériques de mitotane supérieurs à 20 mg/l. Tous ces effets indésirables ont régressé lors de la diminution des doses quotidiennes, prouvant la relation entre mitotanémie et effets indésirables.

Des effets indésirables de type biologique sont aussi observés : hypercholestérolémie, hypertriglycémie, diminution de l'uricémie et toxicité hépatique. Des effets hépatotoxiques avec augmentation des transaminases ont été décrits chez 10 patients étudiés (Neuman et al., 2001). Les taux enzymatiques observés sont jusqu'à 6 fois la valeur normale. Le retour à la normale peut ensuite prendre de quelques semaines en quelques mois pour des doses moyennes de 9 g par jour. Par ailleurs, les auteurs de cette observation indiquent que l'augmentation des transaminases est signe de toxicité alors que celle des gammaglutamyl-

transférases (γ GT) est signe de l'imprégnation en mitotane. Neuman reporte également qu'aucun cas d'insuffisance hépatique ne semble avoir été décrit dans la littérature. Une augmentation du temps de saignement secondaire à un défaut d'agrégation plaquettaire a été décrite par Haak et collaborateurs (Haak et al., 1991) selon un mécanisme aspirine-like (inhibition de la cyclooxygénase). Des effets indésirables exceptionnels ont été décrits avec le Mitotane[®] AP-HP chez un patient : cystite interstitielle, rétinopathie toxique avec œdème maculaire (Ahlman et al., 2001), myélosuppression (Bonacci et al., 1998) sachant que la patiente recevait dans le même temps une chimiothérapie par cisplatine-étoposide. Une aplasie fébrile a été décrite en dehors de tout autre traitement potentiellement hématotoxique chez une patiente traitée par Mitotane[®] AP-HP seul pour syndrome de Cushing paranéoplasique (Andres et al., 2001).

Concernant le Lysodren[®], Terzolo a également évalué la toxicité sur les 8 patients inclus dans son étude (Terzolo et al., 2000). Il retrouve les mêmes effets indésirables que ceux décrits avec le Mitotane[®] AP-HP : toxicité gastro-intestinale, toxicité neurologique, asthénie et gynécomastie. La toxicité du Lysodren[®] sur le système nerveux central a aussi été étudiée : Les mêmes symptômes à savoir somnolence, vertiges, confusion sont retrouvés. Les taux sériques retrouvés dans les deux cas de toxicité neurologique dépassaient 20 mg/l.

Sur le plan biologique, les perturbations observées sont une augmentation de cholestérol, de gammaglutamyl-transférases chez les 8 patients évalués par Terzolo. En conclusion, les données de toxicité ne semblent pas trouver de différence majeure entre les 2 formes galéniques de mitotane.

I.7. Indication du Lysodren® : le carcinome surrénalien

Le carcinome corticosurrénalien (CCS) est une tumeur maligne rare mais agressive, au pronostic dévastateur. Son incidence annuelle est estimée entre 1 à 2 cas/million d'habitants et représente 0,2% des décès par cancer.

La maladie s'observe le plus souvent chez la femme (sexe ratio 3:1) et l'âge de survenue est variable, avec un premier pic dans l'enfance, presque toujours avant 5 ans (80%) et un second pic plus important où l'âge moyen de survenue est de 45 ans (Dackiw et al., 2001).

L'étiologie du CCS est peu connue ; certaines études épidémiologiques soulignent l'influence du tabagisme et la prise de contraceptifs oraux (Hsing AF, 1996) pour les patients adultes. Au niveau moléculaire, de nombreuses altérations génétiques comme la présence d'anomalies structurales de certaines régions chromosomiques ont été mises en évidence. Cette pathologie orpheline fait courir un double risque lié d'une part, à l'hypersécrétion hormonale qui peut l'accompagner et d'autre part, un potentiel oncogénique de la tumeur. Il s'agit en effet d'une tumeur hautement maligne entraînant le plus souvent la mort par diffusion métastatique : la survie à 5 ans après le diagnostic n'excède pas 22% le plus souvent. Le pronostic de la maladie dépend en grande partie du stade tumoral.

La classification habituellement utilisée est celle de MacFarlane et Sullivan qui distingue 4 stades dans la maladie (Tableau 2).

Stades	Critères
I	Tumeur < 5 cm de diamètre localisée à la glande surrénale
II	Tumeur > 5 cm de diamètre localisée à la glande surrénale
III	Tumeur de taille variable avec présence de nodules lymphatiques métastatiques
IV	Tumeur de taille variable avec invasion métastatique sur les organes adjacents et/ou à distance

Tableau 2 : Classification de MacFarlane et Sullivan

Le syndrome de Cushing avec ou sans virilisation est le tableau clinique le plus fréquent du CCS fonctionnel associant atrophie cutanée et musculaire, hyperglycémie, hypertension et troubles psychiatriques. L'hypersécrétion hormonale éventuellement associée précise encore plus la symptomatologie : l'excès d'androgènes chez la femme provoque un hirsutisme, des troubles menstruels, une atrophie mammaire et une raucité de la voix ; l'hypersécrétion d'œstrogènes chez l'homme conduit à une atrophie testiculaire et une gynécomastie alors que chez la femme, on retrouvera une tension mammaire et une irrégularité du cycle. L'hypersécrétion d'aldostérone est peu fréquente mais conduit à une hypokaliémie et une hypertension.

Dans le cas du CCS non fonctionnel (sans hypersécrétion hormonale parlante), la majorité des patients (plus des 2/3) est diagnostiquée à un stade plus tardif de la maladie avec une extension métastatique loco-régionale ou à distance, et avec une atteinte préférentielle au niveau hépatique et pulmonaire (Allolio et al., 2004).

La résection chirurgicale complète (dite « curative ») offre les meilleures chances de survie prolongée (Dackiw et al., 2001) dans le cas d'une forme relativement peu étendue de la maladie (stades I à III de MacFarlane-Sullivan) alors que tout espoir chirurgical devient impossible dans le cas d'une maladie étendue ou en présence d'une diffusion métastatique.

Dans ce cas, il est nécessaire de disposer d'un traitement médicamenteux pour traiter ces formes diffuses et/ou inopérables et c'est dans cette indication que le mitotane semble être un candidat intéressant. Le Lysodren® est également indiqué en adjuvant dans le traitement du carcinome cortico-surrénalien (Mullerad et al., 2006; Terzolo et al., 2007). En effet, l'évaluation du Lysodren® sur 177 patients atteints de carcinome corticosurrénalien et ayant bénéficié d'une résection chirurgicale a montré un impact significatif sur la survie sans récurrences.

II. Amélioration de la biodisponibilité des principes actifs très peu solubles dans l'eau

Le mitotane est un principe actif quasiment insoluble dans l'eau (solubilité : $1,29 \cdot 10^{-7}$ mol/l à 25°C) et les études pharmacocinétiques qui ont été réalisées et qui ont été présentées dans la première partie de ce rapport ont démontré que son absorption était relativement faible.

D'après la classification BCS (Biopharmaceutics Classification System) établie par la Food And Drug Administration (FDA), la solubilité aqueuse et la perméabilité membranaire sont les paramètres les plus importants influençant la biodisponibilité d'une molécule. Selon cette classification, on peut distinguer 4 classes de molécules (Figure 14).

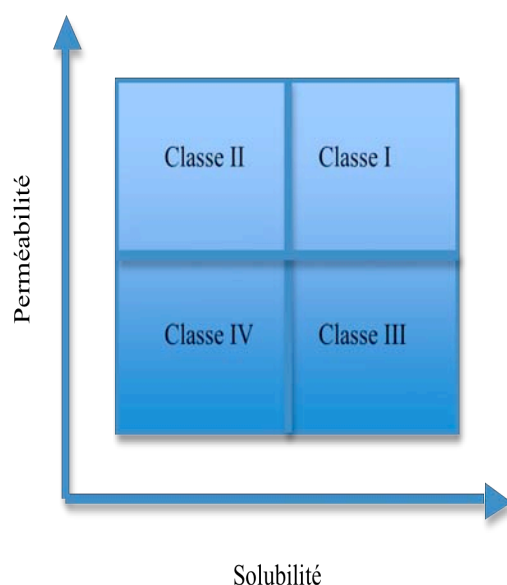


Figure 14 : Classification BCS des molécules

Les molécules de faible solubilité aqueuse peuvent appartenir à la classe II (faible solubilité/forte perméabilité) ou à la classe IV (faible solubilité/faible perméabilité) (Amidon et al., 1995). Le mitotane fait vraisemblablement partie de l'une de ces deux classes. Sa dissolution dans l'environnement digestif influence l'étape d'absorption. Pour permettre son absorption, il existe différentes techniques dites d'hydrophilisation qui favorisent la dissolution des molécules peu solubles.

Parmi ces techniques, figure :

- l'emploi des cyclodextrines
- la réalisation chimique de prodrogues hydrosolubles
- la dispersion dans des matrices hydrophiles
- l'utilisation des tensioactifs
- la réalisation de systèmes émulsionnants ou autoémulsionnants

Ces techniques seront détaillées dans ce chapitre. Nous les illustrerons par des exemples de travaux réalisés sur des principes actifs faiblement solubles. Nous insisterons tout particulièrement sur les microémulsions utilisées dans la partie expérimentale de ce travail.

II.1. Méthodes d'amélioration de la solubilité des molécules peu solubles dans l'eau

La solubilisation vise à augmenter la solubilité des molécules dans l'eau. Pour cela, il existe des méthodes chimiques modifiant la structure des molécules et des méthodes mettant en jeu une incorporation de ces molécules dans des complexes tels des cyclodextrines ou des systèmes lipidiques.

II.1.1. Les méthodes chimiques

Diverses méthodes chimiques ont été utilisées pour améliorer la solubilité des molécules peu solubles dans l'eau. Ces méthodes sont par exemple la variation de pH, l'adjonction de sels ou métaux ou pour la plupart du temps, la réalisation de prodrogues par modification de groupements chimiques. La réalisation de prodrogues se fait par des réactions d'estérifications sur des groupements hydroxyles, carboxyles, amines... Ces réactions chimiques rendent les molécules beaucoup plus solubles dans le liquide intestinal et par conséquent améliorent leur biodisponibilité.

II.1.2. Les cyclodextrines

Les cyclodextrines sont des oligosaccharides cycliques non réducteurs obtenus industriellement par dégradation enzymatique de l'amylose (structure linéaire de l'amidon) à l'aide d'une enzyme, la cyclodextrine glucosyltransférase (CGTase). La famille des cyclodextrines comprend plusieurs dérivés naturels classés en fonction du nombre d'unités glucoses qui les composent. Les molécules les plus fréquemment rencontrées sont l' α cyclodextrine (6 glucoses), la β cyclodextrine (7 glucoses) et γ cyclodextrines (8 glucoses). Les cyclodextrines possèdent des propriétés intéressantes qui peuvent permettre l'amélioration de

la solubilité des molécules peu solubles dans l'eau. Elles possèdent une structure chimique parfaitement définie, une cavité hydrophobe de taille variable, une faible activité biologique intrinsèque, une grande stabilité thermique (température de décomposition vers 300°C) et surtout une bonne solubilité aqueuse (Uekama et al., 1998). Les cyclodextrines ont à ce titre permis l'amélioration de la solubilité et de la biodisponibilité de la testostérone et du kétoconazole (Uekama et al., 1998). Il a été démontré que les complexes ne passent pas la barrière intestinale. Il s'agit donc d'une simple solubilisation dans le liquide intestinale. Le piroxicam, un anti-inflammatoire non stéroïdien a faible solubilité intestinale a reçu l'AMM sous le nom de CYCLADOL[®], spécialité dans laquelle le piroxicam est complexé à une β cyclodextrine pour faciliter son absorption digestive et obtenir une action plus rapide.

II.2. Les Microémulsions (SMEDDS ou Self-MicroEmulsifying Drug Delivery System)

Les systèmes autoémulsionnants ou SMEDDS peuvent être décrits comme des solutions isotropiques d'huiles et de tensioactifs, qui forment des microémulsions huile dans l'eau (H/E) quand elles sont mises en présence d'un milieu aqueux. Une très légère agitation permet de réaliser ces systèmes qui peuvent être liquides mais aussi solides selon les excipients utilisés. Elles peuvent être administrées par voie orale, ce qui est un réel intérêt pour une utilisation médicale. En effet, la motilité de l'estomac et de l'intestin fournit une agitation suffisante au processus d'émulsification *in vivo*. Ces préparations peuvent donc être administrées dans des gélules ou capsules de gélatine afin d'obtenir des formes orales pratiques avec des dosages précis.

Les microémulsions sont définies par une taille inférieure à une centaine de nanomètres (souvent inférieure à 50 nm). Les microémulsions sont thermodynamiquement stables, isotropiques et limpides (Constantinides, 1995). La limpidité qui succède spontanément et brutalement à l'aspect laiteux d'une émulsion sert de critère pour fixer les limites du domaine d'existence des microémulsions. Les fines particules lipidiques dispersées en phase aqueuse offrent une grande surface de contact avec l'épithélium digestif améliorant ainsi l'absorption des principes actifs lipophiles.

II.2.1. Composition des microémulsions

La formulation de SMEDDS fait intervenir trois composés essentiels : les huiles, les tensioactifs et les co-solvants ou co-tensioactifs. Les différentes combinaisons de ces trois éléments sous certaines conditions de température sont nécessaires à la formation de systèmes autoémulsionnants.

II.2.1.1. Critères généraux de sélection des excipients

Plusieurs raisons conditionnent le choix des excipients pour la formulation des systèmes autoémulsionnants. La toxicité des composants vis-à-vis des membranes cellulaires est un critère essentiel. D'une façon générale, les surfactants cationiques sont réputés plus toxiques que les anioniques et les non ioniques sont en général bien tolérés (Davis et al., 1970). Ainsi, une formulation comportant uniquement des surfactants non chargés serait un choix judicieux pour éviter des problèmes de toxicité. De même, les données toxicologiques indiquent qu'une dose orale journalière de 1 g de ces surfactants non ioniques est bien tolérée (Attwood and T., 1983). Des spécialités antirétrovirales comme l'Agenerase[®], le Kaletra[®] et le Norvir[®] contiennent de fortes doses journalières (2 à 3 g) de surfactants non ioniques.

Un autre critère de choix est la capacité qu'ont certains types d'huiles à réaliser des systèmes autoémulsionnants beaucoup plus stables. Ainsi les huiles végétales naturelles (exemple d'esters d'acides oléiques des huiles d'olive et d'amande douce) sont moins performantes et par conséquent moins choisies que leurs dérivés hydrolysés ou hémisynthétiques (exemple du Myvacet[®] qui est un monoglycéride acétylé) pour la formulation des systèmes autoémulsionnants.

Enfin, la présence de traces de contaminants est un problème crucial dans le choix des excipients. Les taux de peroxydes et d'aldéhydes par exemple, durant les phases de production sont essentiels et doivent conditionner le choix des huiles.

II.2.1.2. Les triglycérides

Les triglycérides, qu'on appelle généralement des huiles (mono, di, triglycérides), ont plusieurs avantages pour la formulation des systèmes auto-émulsionnants. Ils peuvent être incorporés à l'alimentation et sont bien digérés. Les huiles peuvent être constituées de différents acides gras à chaînes carbonées, de leurs dérivés, des phospholipides, de glycolipides ou de stérols (Figure 15). Dans la formulation des SMEDDS, les huiles choisies sont généralement des glycérides synthétiques possédant un haut degré de lipophilie et une capacité de solubilisation élevée. Les triglycérides à chaînes moyennes sont peu sujets à l'oxydation et constituent un excellent choix pour la préparation des microémulsions.

Enfin le choix de l'huile a une influence sur la viscosité et la consistance finale de la préparation. L'huile choisie aura un impact sur les étapes de production des SMEDDS : plus l'huile est fluide et liquide, plus elle permettra un remplissage aisé des gélules de gélatine

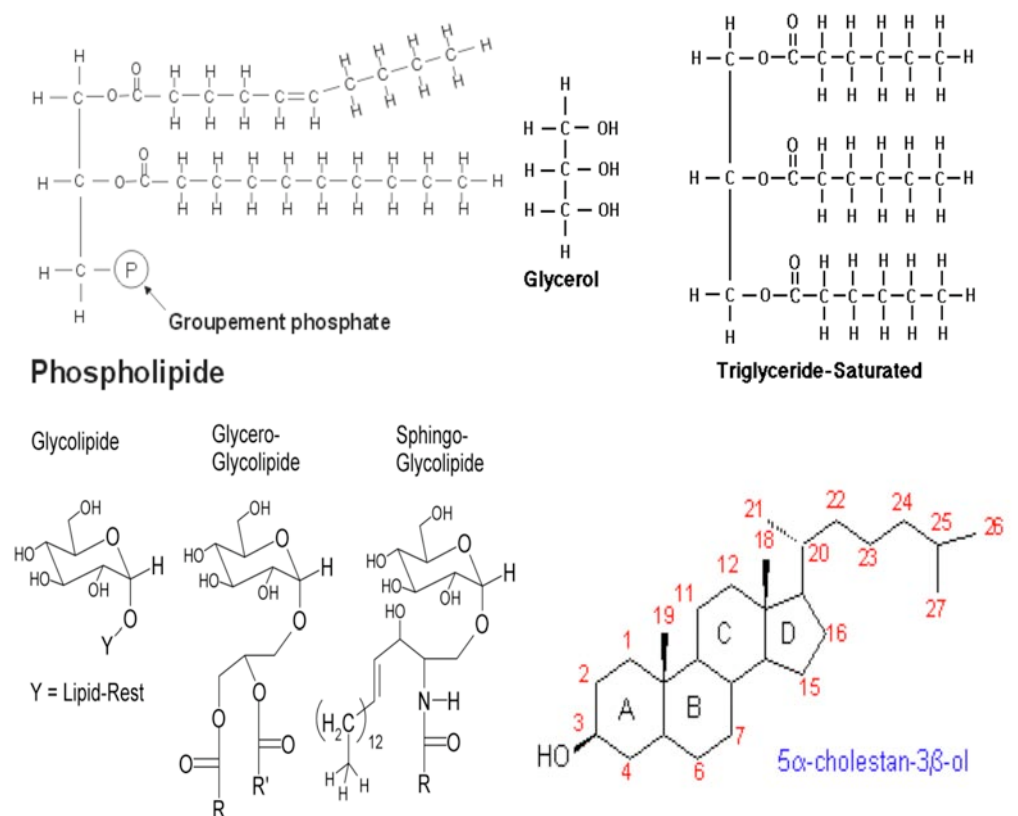


Figure 15 : Différents représentants des huiles

II.2.1.3. Les surfactants hydrophobes

Un tensioactif est un composé chimique qui permet de diminuer la tension interfaciale (eau/huile ou huile/eau). L'activité de ces composés est liée à leur structure chimique ; une longue chaîne moléculaire comprend 2 parties (Figure 16) :

- une queue hydrophobe hydrocarbonate parfois associée à des noyaux aromatiques ou insaturés.
- une tête hydrophile (tête polaire) ionique (anionique, cationique, ou zwitterionique) ou non ionique.

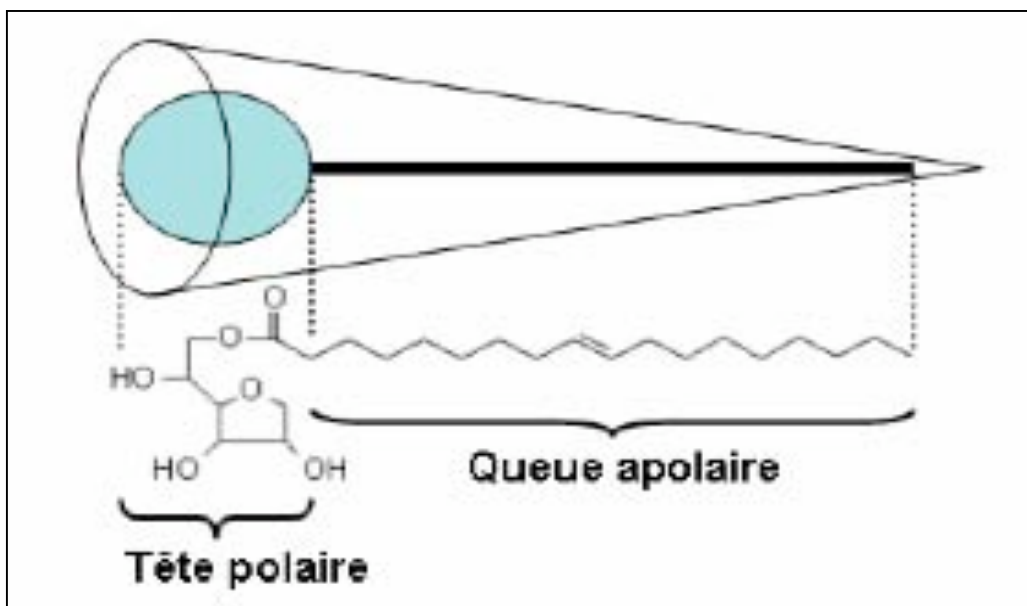


Figure 16 : Structure moléculaire d'un tensioactif apolaire

Dans une émulsion, le tensioactif se place à l'interface entre la phase aqueuse et la phase huileuse (Figure 17). Le rôle recherché ici est de diminuer la tension interfaciale entre les deux phases tout en favorisant la formation d'une émulsion.

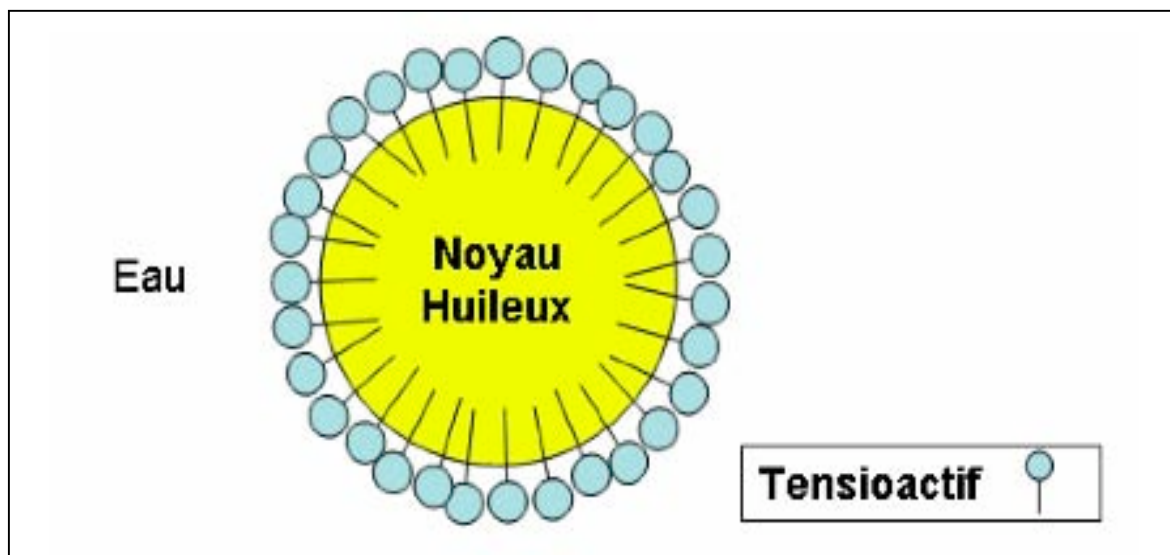


Figure 17 : Schéma d'une gouttelette d'émulsion

Il existe des tensioactifs possédant de très faible solubilité dans l'eau. Ils possèdent une balance hydrophilie-lipophilie (HLB) comprise entre 8 et 12 qui leur permet de créer une émulsion H/E. Ils permettent ainsi d'obtenir des microémulsions qualifiées de type II. Ce sont des esters d'acide oléique tel le trioléate de polyoxyéthylène sorbitane (Polysorbate 85 ou Tween[®] 85) ou le trioléate de polyoxyéthylène glycérol (Tagat[®] TO) (Pouton and Porter, 2008).

II.2.1.4. Les surfactants hydrophiles

Ce sont les surfactants les plus utilisés pour la formulation des microémulsions. Ces surfactants permettent d'obtenir des microémulsions qualifiées de type III et IV. Leur HLB est supérieure ou égale à 12. Ils sont issus de réactions entre le polyéthylène glycol et les huiles végétales. Les plus connus sont les dérivés du Crémophor[®] (type EL ou RH 40) qui sont largement utilisés par l'industrie pharmaceutique. Le Crémophor[®] serait inhibiteur de la glycoprotéine de type P impliquée dans l'efflux intestinal des principes actifs (Shono et al., 2004). D'une manière générale, quelle que soit la solubilité du tensioactif, la concentration

usuelle de tensioactif dans les SMEDDS pour la formation d'une émulsion stable dans le tractus intestinal varie entre 30 et 60 % (m/m) de la formulation. D'une façon générale, les données toxicologiques pondérées par la concentration du tensioactif dans la formulation finale sont très importantes.

Des valeurs élevées de HLB (tensioactifs hydrophiles) sont nécessaires pour la formation instantanée de gouttelettes d'huile dans l'eau. Les tensioactifs sont amphiphiles et peuvent solubiliser des quantités importantes de molécules lipophiles. Serajuddin a démontré que la nature amphiphile des tensioactifs est nécessaire pour éviter la précipitation de la molécule lipophile dans la lumière intestinale et optimiser la phase d'absorption (Serajuddin et al., 1988).

D'une façon générale, les mélanges lipidiques contenant de grandes quantités de tensioactifs (de 50 à 100%) conduisent dans certains cas à la formation de microémulsions (Vonderscher and Meinzer, 1994; Constantinides, 1995). Des études ont montré des microémulsions de type SMEDSS extrêmement fines de quelques nanomètres et limpides prouvant une solubilisation de la molécule lipophile en phase aqueuse.

Les formulations ne comportant qu'un mélange de tensioactifs peuvent former des émulsions ou microémulsions, des solutions micellaires et dans certains cas des niosomes dotés de bicouches de tensioactifs (Figure 18).

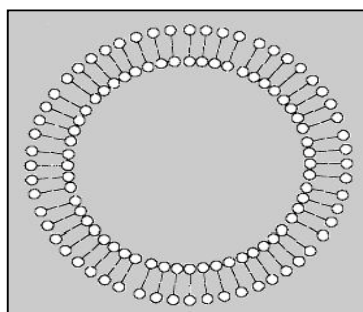


Figure 18 : Structure d'un niosome constitué d'une bicouche et obtenu à partir d'un excès de tensioactifs

Il existe également des tensioactifs polymères qui ont un effet stabilisateur dans la formulation des microémulsions. Ce sont par exemple le succinate de polyéthylène glycol d'alpha tocophérol (TPGS), ou les poloxamers (Ke et al., 2005; Goddeeris and Van den Mooter, 2008).

II.2.1.5. Les co-solvants (ou co-tensioactifs) et additifs

Des solvants organiques, compatibles avec une administration orale (éthanol, propylène glycol (PG), polyéthylène glycol (PEG)...) peuvent permettre une meilleure dissolution de grandes quantités de principe actif lipophile dans une matrice lipidique : ce sont des co-solvants. Ils jouent également aussi un rôle de co-tensioactif dans les systèmes microémulsionnants.

Lorsque ce co-solvant contribue à l'émulsification, il permet d'atteindre le domaine de la microémulsion par action sur le rayon de courbure et la taille de la gouttelette d'émulsion. L'efficacité du co-solvant ou co-tensioactif va dépendre de sa structure moléculaire ou de sa chaîne hydrocarbonatée (Saint Ruth et al., 1995). H. Ruth et coll. ont montré que le butanol était 7 fois plus efficace que l'éthanol à quantité égale pour la formation des microémulsions. En fait, pour obtenir un rayon de courbure propice à la formation de gouttelettes huileuses dans une phase externe de nature hydrophile et aqueuse, l'alcool doit pouvoir s'insérer à l'interface huile/eau. La rigidité du film interfacial se trouve ainsi réduite ce qui favorise la courbure (figure 19) permettant la formation de microémulsions de tailles fines. L'insertion de l'alcool à l'interface va dépendre de son caractère hydrophile et par conséquent de son coefficient de partition huile/eau.

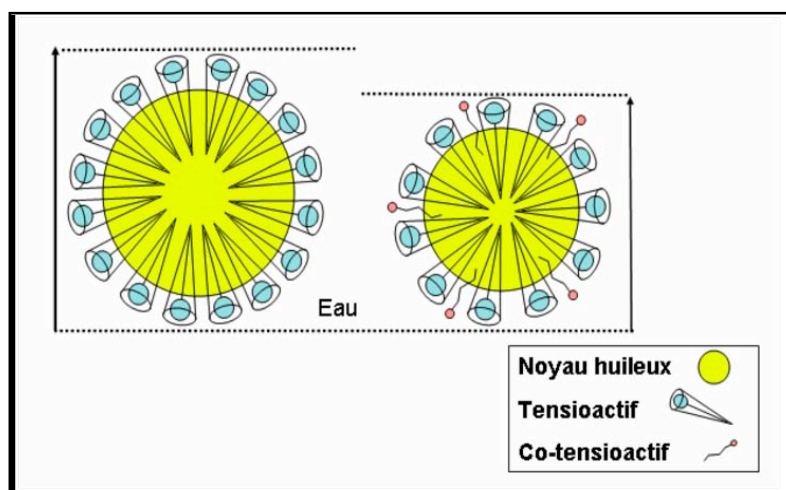


Figure 19 : Schéma représentant l'action du co-tensioactif sur le rayon de courbure et sur la taille de la gouttelette d'émulsion

La solubilité aqueuse de l'éthanol est meilleure que celle du butanol. Mais son coefficient de partition huile/eau est moins favorable que celui du butanol. Ainsi pour des résultats équivalents, il faudra des quantités plus importantes d'éthanol. L'éthanol est utilisé comme co-solvant pour la formulation des microémulsions de ciclosporine. Il est également primordial de tenir compte de l'influence du co-solvant sur la stabilité des principes actifs. Enfin, dans la formulation des systèmes autoémulsionnants, les co-solvants contribuent à la dissolution des principes actifs lipophiles et à la stabilisation de l'ensemble du système (Gan-Zuo and Friberg, 1982).

II.2.2. Mécanisme de l'auto-émulsification

L'hypothèse avancée pour expliquer l'auto-émulsification fait intervenir des notions de thermodynamiques sur deux éléments fondamentaux de l'état des systèmes : l'entropie et l'énergie libre.

Rappelons que, l'entropie est une fonction d'état définie par Rudolf Clausius en 1865 comme grandeur physique évaluant le degré de désordre d'un système. Quant à l'énergie libre, elle est définie comme une fonction d'état permettant d'obtenir le travail utile susceptible d'être fourni par un système thermodynamique fermé, à température constante.

L'auto-émulsification a lieu lorsque l'entropie du système (ou le désordre du système) en faveur de la dispersion *est plus grande* que l'énergie requise pour augmenter la surface de la dispersion. Dans le cas des systèmes autoémulsionnants, l'énergie libre requise pour former une émulsion est soit très faible et positive, soit négative (dans ce cas, le processus d'émulsification est spontané ; sinon il requiert une faible agitation) (Craig, 1995). L'auto-émulsification nécessitant un très petit apport d'énergie, implique alors des phénomènes de déstabilisation à travers la contraction de régions interfaciales locales (Dabros et al., 1999). C'est l'abaissement de l'énergie libre qui engendrait le processus d'auto-émulsification après une simple et légère agitation du mélange.

II.2.3. Caractérisation des microémulsions

Concernant la caractérisation des microémulsions, plusieurs publications décrivent des critères physico-chimiques pour mettre en évidence la formation des microémulsions obtenues. Le temps de formation des microémulsions et leur taille sont néanmoins les critères les plus utilisés. La taille des gouttelettes est un critère qui influence les caractéristiques biopharmaceutiques des microémulsions. En effet, de la taille des gouttelettes va dépendre le taux de libération de la substance lipophile dans la lumière intestinale et par conséquent la biodisponibilité (Tarr and Yalkowsky, 1989; Shah et al., 1994). En pratique, la mesure des tailles est obtenue par spectroscopie de corrélation de photons (PCS). Cette technique est particulièrement indiquée dans l'analyse des microémulsions car elle évite de modifier les propriétés de l'émulsion malgré la dilution à l'infini qui est effectuée avant l'analyse. Cette technique de spectroscopie peut être complétée par la microscopie électronique pour s'assurer de la répartition homogène des tailles et de l'aspect microscopique des microémulsions. De récentes études privilégient l'association de la microscopie électronique à la PCS ; pour cela, les microémulsions obtenues subissent une transformation supplémentaire pour l'obtention d'une phase finale solide.

Une étude récente a été effectuée en ce sens avec la simvastatine, un hypocholestérolémiant (Margulis-Goshen and Magdassi, 2008). La simvastatine possède une faible solubilité aqueuse (30 µg/ml). L'amélioration de sa solubilité intestinale peut potentiellement améliorer son efficacité thérapeutique. Après formulation en microémulsions avec une phase organique constituée de n-butylacétate et une phase aqueuse constituée d'eau, le mélange obtenu grâce au tensioactif polysorbate 80 est soumis à une évaporation de solvant à froid (-47°C, 1 mbar). A ce stade, les auteurs notent qu'il y a formation de microémulsions solides de simvastatine.

L'évaluation de la taille de ces microémulsions obtenues par cette technique montre des particules de 100 nm avec des taux d'incorporation de simvastatine dépassant 95% de la quantité initiale.

La microscopie électronique confirme l'homogénéité des particules solides (figure 20). L'originalité de cette technique de préparation réside dans la formation de microémulsions en une forme solide pouvant être dispersée dans de l'eau pour régénérer des microémulsions.

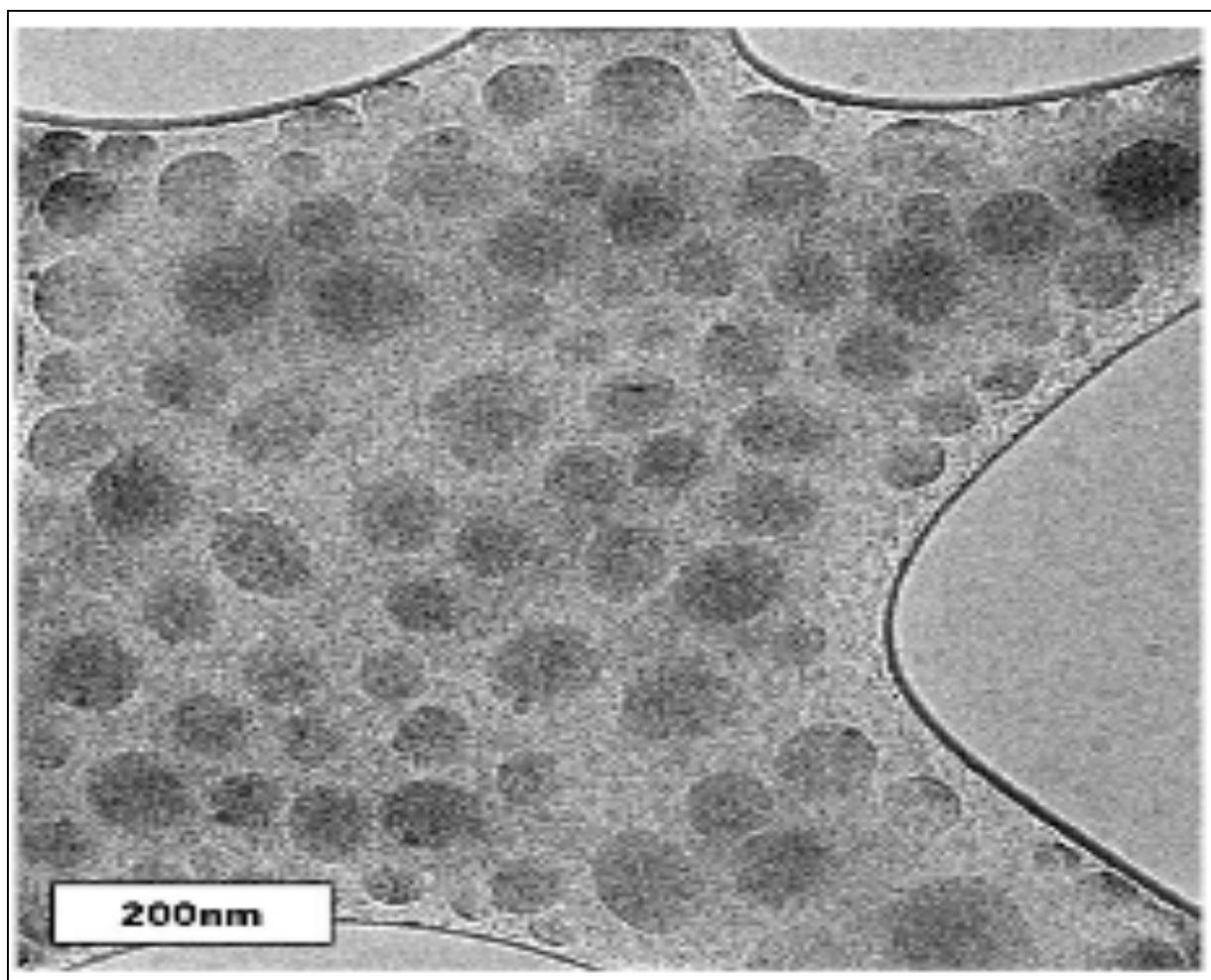


Figure 20 : Microscopie électronique de l'émulsion après dispersion de la poudre lyophilisée (Margulis-Goshen and Magdassi, 2008)

L'analyse par diffraction X de la poudre lyophilisée montre la simvastatine à l'état amorphe, qui est transformée en simvastatine cristallisée à température ambiante. Cette lyophilisation se révèle très intéressante car elle permet d'obtenir au final, un profil de dissolution extrêmement intéressante par rapport à la simvastatine conventionnelle.

Des microémulsions de dexibuprofène, un dérivé dextrogyre de l'ibuprofène, anti-inflammatoire non stéroïdien, ont été également transformées en particules solides (Balakrishnan et al., 2009). Dans un premier temps, le dexibuprofène a été formulé sous forme de microémulsions puis rendu à l'état solide par pulvérisation, séchage et dépôt sur des particules solides de silice (AEROSIL 200®). Les mesures de diamètre ne montrent aucune différence entre l'émulsion solide ou liquide. Les particules ont un diamètre d'environ 200 nm.

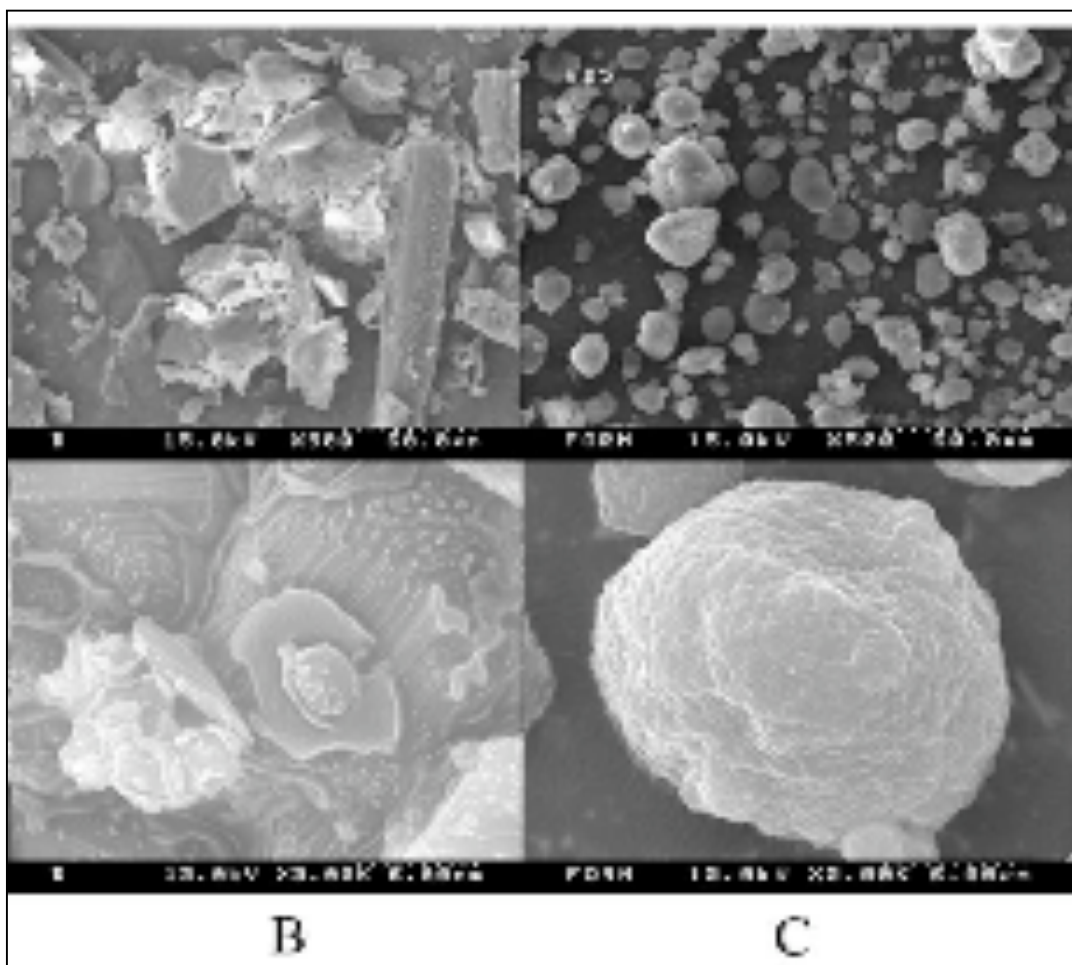


Figure 21 : Microscopie électronique de la poudre de dexibuprofène (B) et l'émulsion après dispersion séchage (C) (Balakrishnan et al., 2009)

L'observation en microscopie électronique du dexibuprofène formulé en microémulsions solides montre des particules homogènes aux contours bien délimités, alors que le dexibuprofène sous forme de poudre montre des amas de particules très variables aux formes indéfinies (Figure 21). Les auteurs ont également montré que la formulation de microémulsions solides permet d'améliorer considérablement la cinétique de libération et la biodisponibilité du dexibuprofène.

II.2.4. Obtention et zone d'existence des microémulsions

Dans plusieurs publications (Kang et al., 2004; Shafiq et al., 2007; Zhang et al., 2008), la méthode de titration est utilisée pour la préparation des microémulsions. Cette méthode, qui est de loin, la plus utilisée permet grâce aux diagrammes pseudoternaires de localiser la zone d'existence des microémulsions. Dans une première phase, le principe actif liposoluble est dissous dans le composé huileux. Le mélange tensioactif et co-solvant est ensuite ajouté au composé huileux et l'ensemble est mis sous agitation jusqu'à dissolution complète du principe actif. Puis une titration est effectuée ajoutant de l'eau en goutte à goutte jusqu'à obtention d'une transparence.

C'est la transparence qui succède spontanément et brutalement à l'aspect laiteux d'une émulsion qui sert de critère pour fixer les limites des domaines d'existence des microémulsions. Pour étudier ces domaines, des diagrammes pseudoternaires de phase (eau/huile/tensioactif/co-solvant) sont réalisés. Ces derniers permettent de représenter graphiquement les mélanges optimaux conduisant à la formation de microémulsions (Figure 22). Outre le domaine d'existence des microémulsions, ces diagrammes peuvent aussi permettre de réaliser des études de stabilité de la microémulsion dans le temps.

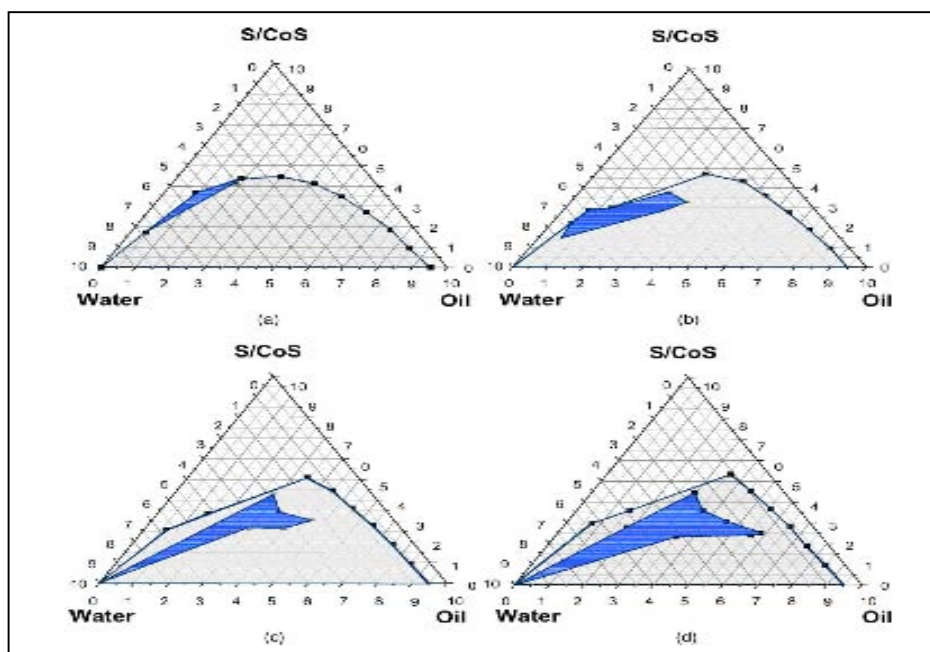


Figure 22 : Diagrammes pseudo-ternaires montrant les domaines de microémulsions de simvastatine (zone pleine) avec des pourcentages variables de tensioactif et co-solvant (Kang et al., 2004)

Quelques publications (Kommuru et al., 2001; Grove et al., 2006; Grove et al., 2007) font état d'une dissolution du principe actif dans la phase huileuse suivie de l'ajout du mélange tensioactif /co-solvant. Le mélange réalisé à des pourcentages variables est alors incorporé à un excès de phase aqueuse. C'est la transparence qui apparaît brutalement qui sert aussi de critère d'identification de la zone d'existence de microémulsions. Dans ce cas, les diagrammes pseudoternaires ne tiennent pas compte de la proportion d'eau mais font figurer les pourcentages d'huile, tensioactif et co-solvant.

II.2.5. Propriétés des excipients et différents types de formulations autoémulsionnantes

II.2.5.1. La miscibilité des excipients

La miscibilité entre excipients est une condition nécessaire pour la formation des microémulsions claires et stables. Les triglycérides à chaînes longues ne sont pas souvent miscibles avec les surfactants hydrophiles. Par contre, les surfactants hydrophobes sont miscibles avec les triglycérides à chaîne longue et moyenne. Dans la plupart des cas, il est nécessaire d'avoir recours à un co-solvant pour favoriser la miscibilité des excipients.

II.2.5.2. La capacité de solvant des triglycérides

Les triglycérides ont des pouvoirs solvants assez faibles. Pour les principes actifs lipophiles, l'utilisation des surfactants polyoxyéthylénés hydrophiles en combinaison avec un co-solvant est un moyen d'augmenter la capacité de solvant des huiles. Malheureusement, l'utilisation de co-solvants peut limiter la stabilité du principe actif.

II.2.5.3. Compatibilité avec les gélules

La présence d'huile et de co-solvant peut entraîner une migration des molécules de faible pouvoir moléculaire au travers de la paroi des capsules. Les surfactants peuvent également déstabiliser les capsules. Ainsi, la compatibilité des capsules utilisées avec la formulation est un problème fréquent pendant les phases de formulation et de production (Cole et al., 2008).

II.2.5.4. Classification des émulsions

Les émulsions peuvent être classées selon la nature des excipients utilisés.

II.2.5.4.1 Les formulations de type I

Les formulations de type I sont obtenues avec des excipients possédant une très faible solubilité aqueuse. Typiquement, ce sont des mélanges comportant uniquement des triglycérides d'origine végétale, bien résorbés au niveau intestinal. Ces systèmes ne comportent pas de tensioactifs ou très peu et ne fournissent pas d'émulsions limpides lorsqu'ils sont mis en présence de molécules d'eau. Ces formulations de type I fournissent des systèmes colloïdaux qui sont résorbés par la muqueuse intestinale après action des lipases pancréatiques. Pour les systèmes comportant des triglycérides à longues chaînes, une miscellisation par les sels biliaires est indispensable pour une absorption optimale (Kossena et al., 2003). Hormis l'action des sels biliaires, la longueur de la chaîne carbonée peut influencer la biodisponibilité du principe actif utilisé comme cela a été observé dans le cas de l'halofantrine (Porter et al., 2004). Dans cette étude, les formulations effectuées avec des triglycérides à chaîne moyenne favorisent peu la solubilisation de l'halofantrine. De plus, ces formulations peuvent être sujettes à des problèmes d'instabilité. Dans ces cas, une utilisation de mélanges d'huiles comportant divers types de glycérides à chaînes variables (des longues et des moyennes) peut être une excellente alternative.

II.2.5.4.2 Les formulations de type II

Ces formulations sont obtenues avec des mélanges d'huiles et de surfactants hydrophobes. Une formulation typique est un mélange de triglycérides à chaînes moyenne et de Tween 85 (Pouton, 1985). Dans ces formulations, les systèmes autoémulsionnants se forment lorsque le taux de tensioactif varie entre 30 et 40%. Au delà de 50%, ces systèmes perdent le caractère spontané de l'émulsification à cause de la présence de liquide cristallin et visqueux.

Il a été constaté avec ces formulations, en présence de faible quantité d'eau, qu'une phase cristalline prédomine avec la phase huileuse. Selon les auteurs, cette phase cristalline favorise la pénétration progressive d'eau et contribue ainsi à la formation de microémulsions.

Le devenir de ce type d'émulsions dans le tractus digestif a fait l'objet de peu d'investigations (Pouton and Porter, 2008).

La réalisation de mélange comportant du Miglyol 812 et de polyoxyéthylène glycérol d'acide trioléique (Tagat TO) (Pouton and Porter, 2008) fournit un exemple de formulation de type II (figure 23).

Les formulations combinant les triglycérides à chaînes longues et les surfactants hydrophobes forment des systèmes instables et d'une manière générale aucune formulation de type II n'est disponible sur le marché. Une des raisons est que la plupart des surfactants qui rentre dans la formulation des microémulsions de type II ne sont pas acceptés par la Food and Drug Administration.

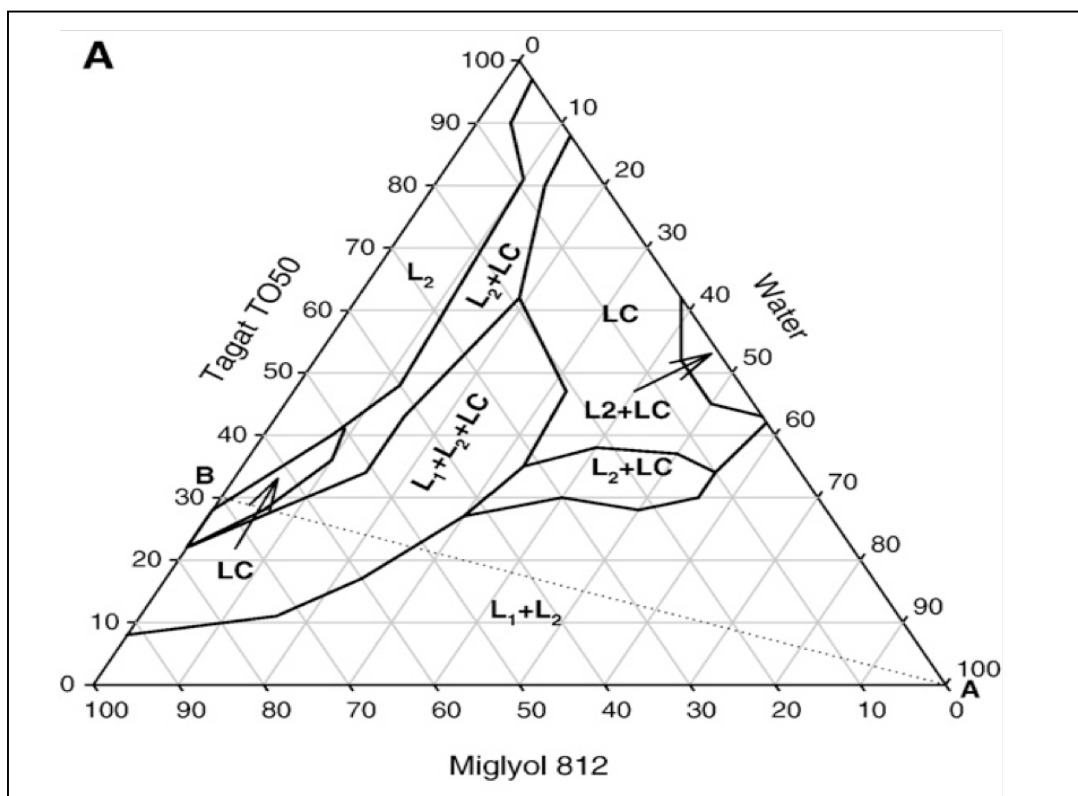


Figure 23 : Diagramme pseudo-ternaire montrant les zones de formation de la phase continue aqueuse (L1), la phase continue huileuse (L2), la phase cristalline (LC) dans une formulation de type II (Pouton and Porter, 2008)

II.2.5.4.3 Les formulations de type III

Ce type de formulation est le plus utilisé pour les principes actifs peu biodisponibles. Nous disposons du cas du Neoral[®] qui est un exemple de formulation de type III comportant un surfactant hydrophile et des triglycérides (Pouton, 2006). Ces formulations ont la capacité de s'autoémulsionner rapidement en présence d'eau, tout en formant un liquide clair, transparent et stable dans le temps. Le tensioactif le plus utilisé dans ce type de formulation est le Crémophor[®] (EL ou RH 40). Les huiles les plus utilisées sont les glycérides pégylés (le Labrasol ou Gelucires) (Strickley, 2004).

La réalisation de diagramme pseudo-ternaire fait apparaître une zone L2 observée sur la figure 24, zone qui comporte majoritairement les microémulsions. Si les microémulsions identifiées dans cette zone ont des propriétés idéales, il est toutefois difficile de distinguer par une simple observation visuelle les formes micellaires qui s'y trouvent. Les formulations de type III ont l'inconvénient de posséder des zones où coexistent plusieurs formes d'émulsions.

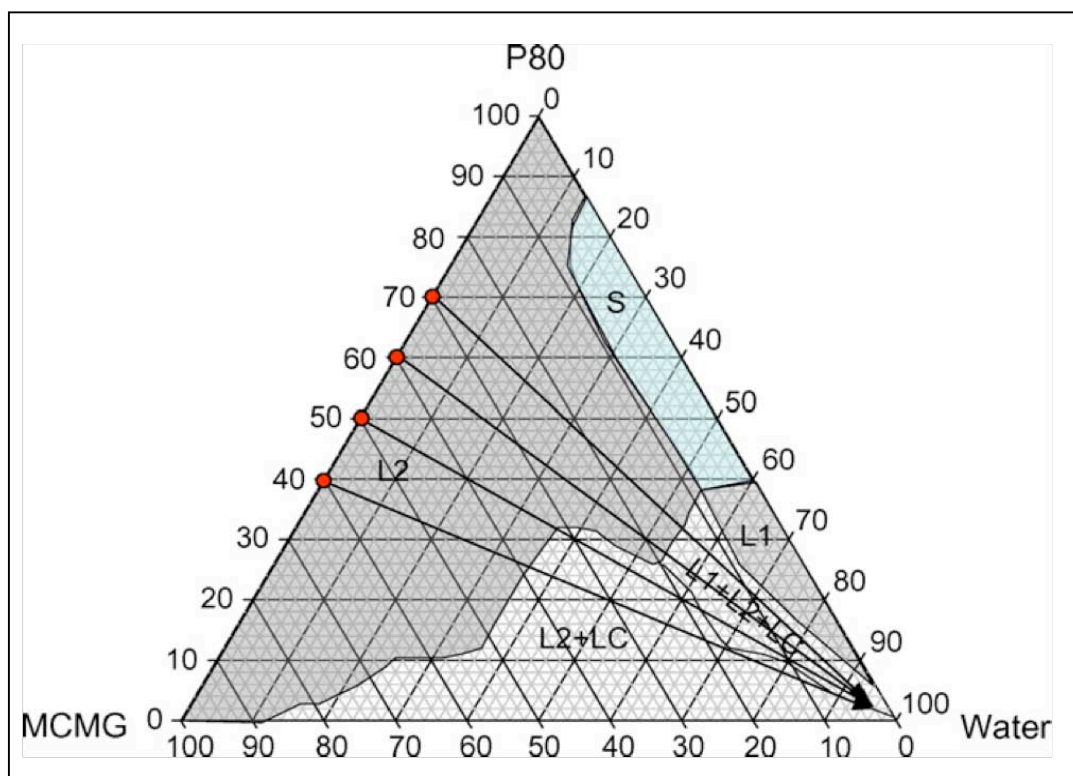


Figure 24 : Diagramme pseudo-ternaire montrant les zones de formation de la phase continue aqueuse (L1), la phase continue huileuse (L2), la phase cristalline (LC) dans une formulation de type III (Pouton and Porter, 2008)

II.2.5.4.4 Les formulations de type IV

Ces systèmes sont constitués d'une grande proportion de tensioactifs ou sont des mélanges de co-solvants et tensioactifs. Dans ces systèmes, les molécules liposolubles précipitent rapidement et forment des suspensions microcristallines (Pouton and Porter, 2008). Cependant, les auteurs soulignent qu'il y a deux problèmes fondamentaux liés à un excès de tensioactifs. Le système par la formation d'une phase cristalline importante, perd sa capacité à s'autoémulsionner rapidement et des problèmes de toxicité des tensioactifs vis-à-vis du tractus gastro-intestinal sont beaucoup plus importants. L'Agenerase[®] est un exemple de formulation de type IV comportant le succinate de polyéthylène glycol d'alpha tocophérol (TPGS), du propylène glycol et du polyéthylène glycol 400.

II.3. Les Nanocapsules

Les nanoparticules polymériques sont des particules solides colloïdales (figure 25) constituées de polymères non biodégradables synthétiques ou de polymères biodégradables synthétiques, semi synthétiques ou naturels.

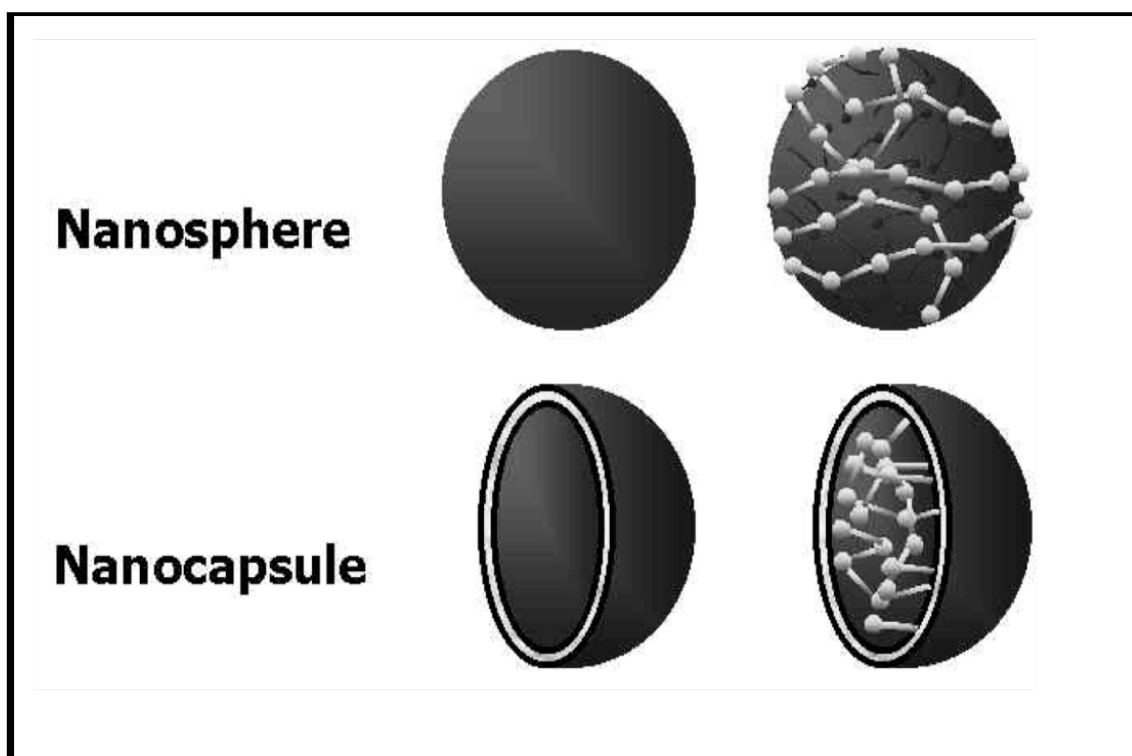


Figure 25 : Structure schématisée des nanoparticules

Ces nanoparticules se différencient en :

- particules de type matrice (nanosphères) qui correspondent à des particules pleines, sans cavité ni paroi distinctes (Puisieux and Roblot-Treupel, 1989). Le principe actif étant dispersé dans la particule.
- particules type réservoir (nanocapsules) formées d'une cavité liquide, où est dissous le principe actif et d'une paroi de polymère.

Les nanocapsules ont été développées dans le but d'augmenter l'efficacité d'encapsulation des principes actifs lipophiles contenus dans le cœur huileux central (Allemann et al., 1993).

II.3.1. Polymères utilisés pour la préparation des nanocapsules

II.3.1.1 La poly-ε-caprolactone (PCL)

La poly-ε-caprolactone est un polyester aliphatique (Figure 26) biodégradable dont l'intérêt ne cesse de croître dans l'industrie pharmaceutique pour la mise en forme des principes actifs. Synthétisée en 1930 (Van Natta et al., 1934), ses propriétés biodégradables sont découvertes en 1973. Le processus de biodégradation du polymère est lent et se déroule sur une période de plus d'un an. Par sa bonne perméabilité au principe actif, la PCL se révèle être un polymère de choix pour la modulation de la cinétique de libération des molécules d'intérêt biologique.

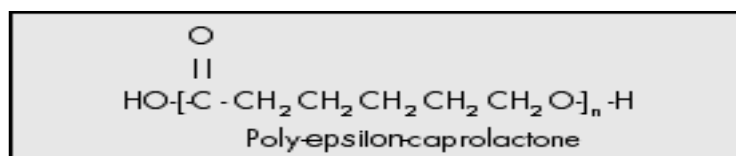


Figure 26 : Formule développée de la PCL

La PCL est un polymère de nature cristalline dont le point de fusion se situe entre 59 et 64°C. Son poids moléculaire varie entre 10 et 43 kilodaltons. La PCL est soluble dans les solvants organiques tels le dichlorométhane, l'acétone, l'acétonitrile et l'éthylacétate. Elle est insoluble dans l'éthanol. Elle peut former des liaisons avec d'autres polymères en vue d'améliorer sa stabilité physico-chimique ou d'accélérer sa biodégradabilité. R. K. Chang a amélioré la cinétique de libération *in vitro* de la chlorpromazine, un neuroleptique, en

l'encapsulant dans des microparticules associant des polymères de PCL et d'acide polylactique (PLA) (Chang et al., 1986).

II.3.1.2 Les Eudragit® RS/RL

Les Eudragit® appartiennent à la famille des polymères acryliques (Figure 27). Les Eudragit® de type RL et RS sont des copolymères de chlorure de triméthyl ammonioéthyl méthacrylate dont la stabilité physique et chimique est due à la présence d'un squelette de base formé d'atomes de carbones et de branches d'esters. Les monomères méthacryliques assurent la rigidité de la molécule. Les unités acryliques contribuent plutôt à la souplesse et à la flexibilité. Les groupes esters méthacryliques sont aussi plus stables vis-à-vis de l'hydrolyse que les esters acryliques. En raison de leur nature hydrophile, les groupes ammonium quaternaires augmentent la perméabilité du polymère. Les Eudragit® RL ou A sont plus perméables que les Eudragit® RS ou B, en raison d'une proportion plus élevée de groupements ammonium. De plus, les Eudragit® restent ionisés à tous les pH physiologiques, avec une charge positive, si bien que la perméabilité *in vivo* du polymère est indépendante du pH. Ce ne sont pas des polymères biodégradables car ils ne sont ni absorbés, ni métabolisés *in vivo* mais éliminés sans biotransformation (Dittgen et al., 1997). Nous avons montré qu'en associant les polymères PCL et Eudragit, on obtient un potentiel *zêta* positif à la surface des particules (Attivi et al., 2005).

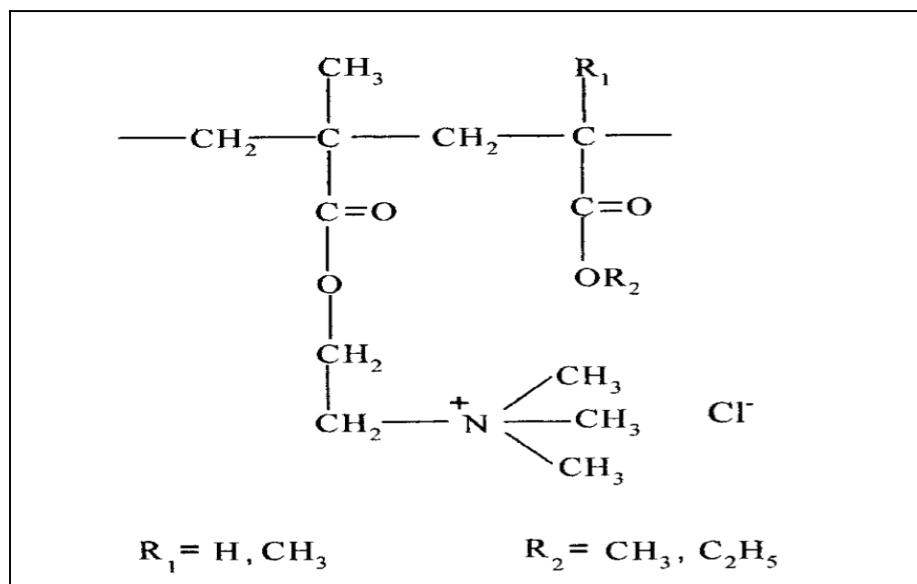


Figure 27 : Formule développée des Eudragit RL et RS

II.3.2 Méthodes de préparation des nanocapsules

II.3.2.1. Préparation par polymérisation interfaciale

Les premières nanocapsules à visée thérapeutique, ont été produites par la technique de polymérisation interfaciale décrite en 1986 par N. al Khouri et H. Fessi (al Khouri et al., 1986). Cette technique de nanoprécipitation a d'abord utilisé des monomères d'alkylcyanoacrylate dissous en phase organique qui forment spontanément des nanocapsules incluant un corps lipidique, lorsqu'on met en contact la phase organique avec une phase aqueuse. La phase organique est évaporée à la fin de la polymérisation interfaciale (Figure 28). Des nanocapsules d'isobutylcyanoacrylate contenant une molécule lipophile (Lipiodol®) ont également été préparées avec succès par polymérisation interfaciale (Dange et al., 1987). Ces systèmes nanocapsulaires formulés pour la plupart avec des polymères biodégradables ont une stabilité de plus de 3 mois. Toutefois, la présence de résidus toxiques, les réactions croisées de polymères et principes actifs limitent le potentiel de ces nanocapsules d'alkylcyanoacrylate. Une alternative proposant des polymères biodégradables d'acides polylactiques est alors utilisée (Ammoury et al., 1990). Néanmoins plusieurs facteurs physico-chimiques influencent fortement la stabilité des nanocapsules produites par nanoprécipitation. S. S. Guterres étudia la stabilité des nanocapsules de diclofénac dans diverses conditions de température (Guterres et al., 1995).

Pour cela, la préparation est réalisée avec une phase organique constituée de polymères d'acide lactique dissous dans de l'acétone. La phase aqueuse est constituée de poloxamer. Le rapport volumique entre phase organique et aqueuse est de $\frac{1}{2}$. La phase organique est alors ajoutée lentement à la phase aqueuse. L'acétone est évaporée sous pression réduite.

La caractérisation physico-chimique, montre que la stabilité des nanocapsules ainsi préparée peut atteindre 8 mois en présence d'une huile, le Miglyol®. Le diamètre des nanocapsules obtenues est de l'ordre de 200 nanomètres. Les taux d'encapsulation sont généralement supérieurs à 90% mettant en évidence une bonne incorporation des principes actifs étudiés dans le corps huileux.

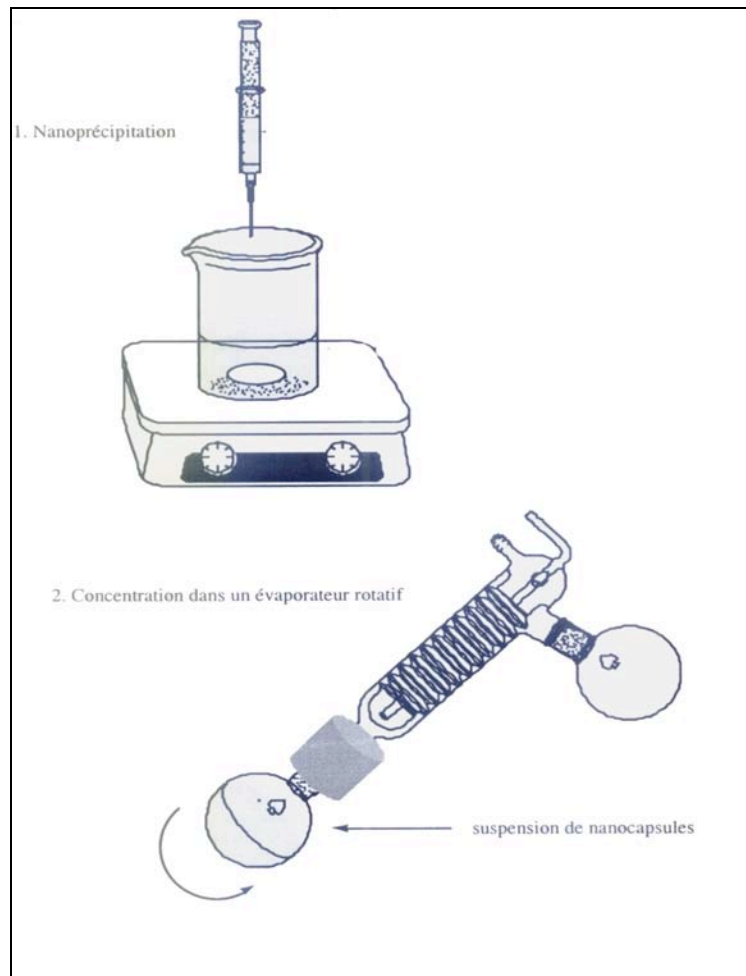


Figure 28 : Formation de nanocapsules par la technique de nanoprécipitation

La technique de polymérisation interfaciale a également été utilisée pour formuler des nanocapsules de primaquine, antiparasitaire utilisé dans le traitement du paludisme (Rodrigues et al., 1995). Le polymère utilisé est l'acide polylactique. L'analyse morphologique des nanocapsules montre des particules de diamètre variant entre 150 et 200 nm. Concernant le taux de primaquine encapsulé, il apparaît que le pH et la concentration moléculaire influencent fortement la quantité de primaquine encapsulée. L'étude de stabilité montre que les nanocapsules de primaquine sont stables pendant 3 mois à 4°C.

Une étude de stabilité réalisée sur des nanocapsules d'atovaquone à base d'acides polylactiques a montré une bonne stabilité sur une période de 3 mois (Dalençon et al., 1997). Au delà de la période de stabilité, on observe une diminution du diamètre des nanocapsules. Ce phénomène est explicable par une érosion du polymère biodégradable.

II.3.2.2 Préparation par émulsion - diffusion

L'émulsion - diffusion est une technique de production des nanocapsules décrite par Leroux (Leroux et al., 1995). Quintanar-Guerrero y apporta des améliorations en étudiant l'influence des agents stabilisants (Quintanar-Guerrero et al., 1996). Récemment, les mécanismes qui interviennent dans la production des nanocapsules par émulsion - diffusion furent étudiés (Moinard-Checot et al., 2008). C'est une technique utilisant comme dans le cas de la polymérisation interfaciale, une phase organique et une phase aqueuse. La phase aqueuse est constituée d'un agent stabilisant, l'alcool polyvinylique. La phase organique est constituée d'éthylacétate dans lequel est dissous le polymère d'acide *epsilon* caprolactone (PCL). La molécule lipophile est incorporée à la phase organique. Après mélange des 2 phases, une émulsification intensive et vigoureuse est effectuée pendant 10 minutes. A ce stade il y'a formation d'une émulsion huile dans eau. Une dilution de la phase aqueuse, permet une diffusion de l'éthylacétate de l'émulsion préalablement formée, éthylacétate qui est alors évaporé sous pression réduite (Figures 29, 30).

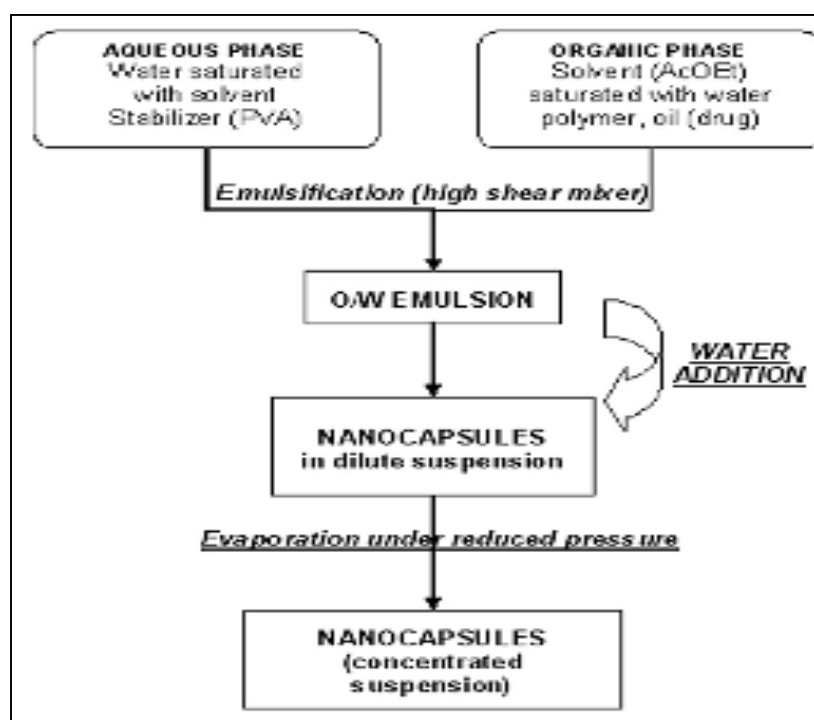


Figure 29 : Préparation des nanocapsules par la technique d'émulsion – diffusion (Moinard-Checot et al., 2008)

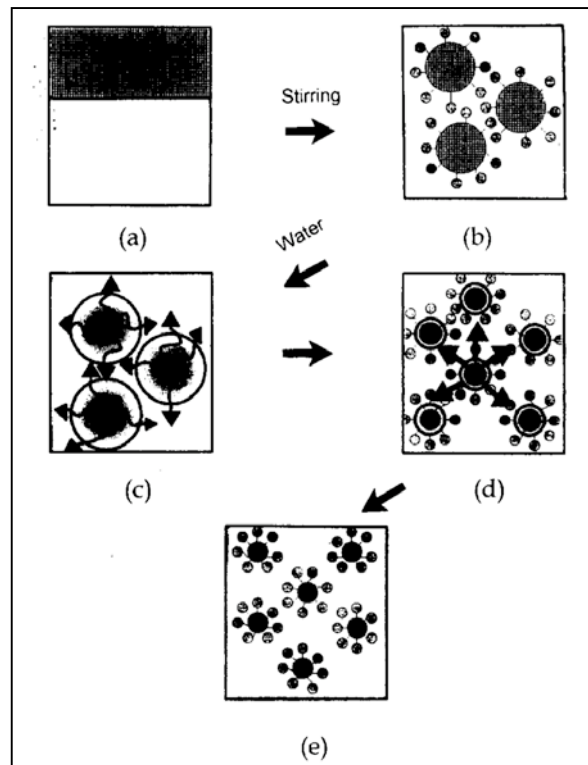


Figure 30 : Représentation schématique des nanocapsules préparées par la technique d'émulsion – diffusion. (a) : mélange ; (b) : Emulsion huile dans eau ; (c) : Diffusion de solvant ; (d) : Formation de nanocapsules (Quintanar-Guerrero et al., 1996)

Les caractéristiques physico-chimiques des nanocapsules montrent des particules sphériques de diamètre d'environ 100 à 500 nm au Zetasiser[®] 3000 HS (Malvern). Les auteurs notent que les conditions de l'évaporation de la phase organique sont fortement corrélées avec le diamètre particulaire obtenu. Ils ont démontré que le diamètre moyen décroît de 1100 nm à 450 nm entre les deux phases du processus. Les conditions de stockage et de température semblent également influencer la stabilité des nanocapsules. Les auteurs notent à ce propos, que les nanocapsules obtenues après évaporation du solvant sont stables durant 5 mois à 4°C et 40°C.

D'autres paramètres, influençant le diamètre des nanocapsules ont également été étudiés : la viscosité et la concentration du Miglyol[®] dans la phase organique, la concentration et la masse moléculaire du polymère utilisé (PCL), la concentration et la masse moléculaire de l'alcool polyvinylique.

Par exemple, la concentration de l'alcool polyvinylique influence fortement le diamètre final des nanocapsules. Ainsi une forte concentration de l'alcool polyvinylique rend la phase aqueuse plus visqueuse entraînant une augmentation du diamètre moyen des nanocapsules. Cette augmentation du diamètre moyen des nanocapsules en fonction de la concentration de l'alcool polyvinylique a déjà été rapportée (Loxley and Vincent, 1998). Hormis ces paramètres, une vitesse élevée de l'Ultraturrax® permet d'obtenir des nanocapsules de petites tailles (Moinard-Checot et al., 2008).

La structure interne des nanocapsules obtenue par émulsion-diffusion a été également étudiée. Les techniques de microscopie électronique couplée à celles de la cryofracture ont permis d'observer des nanocapsules de 500 nm avec une mince couche membraneuse polymérique estimée à 30 nm. Le marquage de la structure interne huileuse des nanocapsules au deutérium confirme l'existence d'un corps central huileux (Figure 31).

Concernant la phase de diffusion du solvant organique, les auteurs soulignent qu'une diffusion graduelle et rapide (moins de 20 ms) de l'éthylacétate entre l'émulsion primaire et la phase aqueuse serait à l'origine de la formation des nanocapsules.

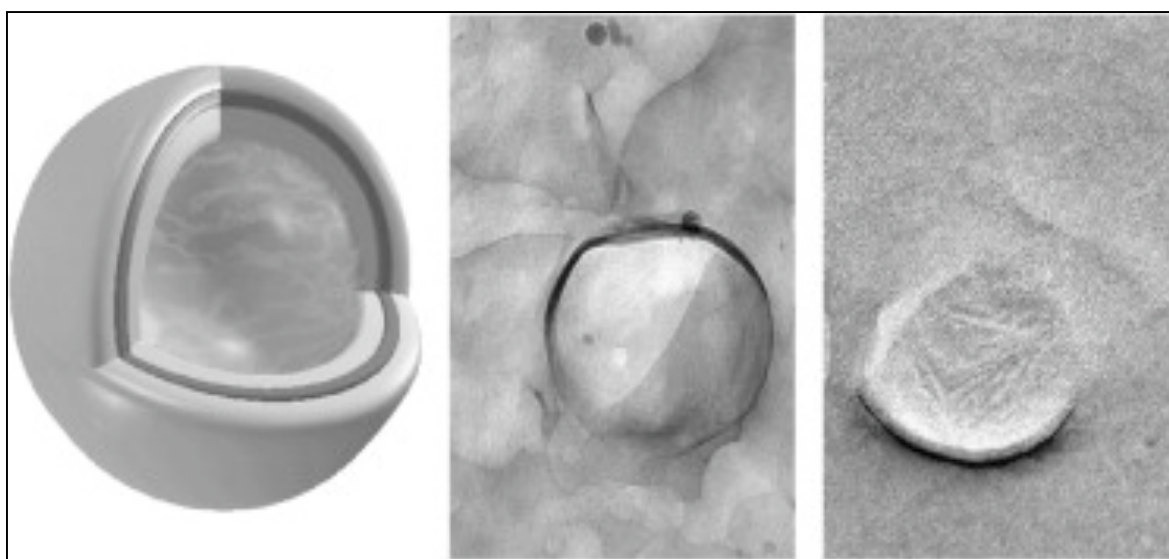


Figure 31 : Microscopie électronique à transmission et cryofracture de nanocapsules (Moinard-Checot et al., 2008)

II.3.2.3. Préparation par encapsulation de nanoémulsions

Cette technique de préparation de nanocapsules a été décrite par l'équipe de M. J. Alonso (Prego et al., 2005). Dans l'objectif de pouvoir encapsuler et de stabiliser des peptides d'intérêt biologique, ces auteurs ont décrit une technique faisant également appel au déplacement de solvant.

La première phase est constituée par la préparation de nanoémulsions stabilisées par de la lécithine d'œuf. Pour cela, dans une première étape, une phase organique composée d'une huile, (Miglyol[®]), de lécithine d'œuf, de l'éthanol et de l'acétone est ajoutée à une phase aqueuse composée d'un tensioactif (poloxamer 188). Les deux phases mélangées sont maintenues sous agitation faisant apparaître une émulsion laiteuse. Le solvant organique (acétone) est ensuite évaporé sous vide. Dans une seconde étape, les nanoémulsions obtenues sont encapsulées par simple dépôt dans une solution de chitosan.

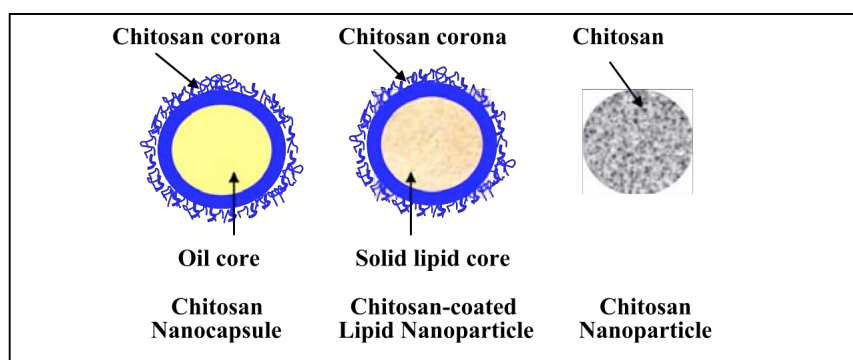


Figure 32 : Structure schématisée des nanocapsules de chitosan (Prego et al., 2005)

Les caractéristiques physico-chimiques des nanocapsules formées montrent des particules sphériques (Figure 32), de diamètre d'environ 260 nm avec un potentiel *zêta* de +34 mV. Selon les auteurs, le potentiel *zêta* positif permettrait une forte interaction de ces nanocapsules de chitosan avec le mucus intestinal, ce qui faciliterait par exemple l'absorption digestive.

En conclusion, Les principales techniques qui ont été mises au point pour la production des nanocapsules sont la polymérisation interfaciale, l'émulsion-diffusion et l'encapsulation des nanoémulsions.

III. Aspects biopharmaceutiques des nanocapsules, microparticules et SMEDDS

La voie d'administration la plus simple pour le malade est sans contexte la voie orale. Cependant, cette voie représente pour tout principe actif, le chemin le plus long et le plus difficile pour atteindre le sang. Le tractus gastro-intestinal possède en effet de nombreuses barrières physiologiques et morphologiques qui limitent l'absorption intestinale du principe actif. La bonne solubilité du principe actif dans le liquide digestif est aussi nécessaire pour optimiser cette absorption intestinale. Parmi les solutions proposées par les chimistes et les galénistes pour améliorer la biodisponibilité de certains principes actifs, figure l'utilisation des systèmes particuliers et des microémulsions.

III.1. Avantages biopharmaceutiques des nanocapsules, microparticules et des SMEDDS

III.1.1. Modalités d'absorption des systèmes nanocapsulaires, microparticules et des SMEDDS

III.1.1.1. Rappel sur la paroi intestinale

L'appareil digestif présente la même structure générale sur toute sa longueur. La paroi de l'intestin grêle dont les différents segments sont le duodénum, le jéjunum et l'iléon comporte cinq couches tissulaire distinctes : muqueuse, sous muqueuse, couches musculaires circulaires et longitudinales, séreuse. La muqueuse est particulièrement impliquée dans les phénomènes d'absorption. Elle comporte plusieurs éléments :

- **Un épithélium intestinal** constitué par les entérocytes, soudés deux à deux à leurs sommets par des jonctions étroites et des desmosomes. Leur membrane s'écarte vers la base pour laisser un espace intercellulaire relativement important où parvient la majorité des substances absorbées par la cellule. Ces substances traversent la membrane basale qui délimite la face interne de l'épithélium et qui est proche de la paroi capillaire sanguin sous-jacent. Les cellules à mucus, les cellules endocrines et les cellules de Paneth sont aussi des éléments de l'épithélium.

- **La lamina propria**, englobant le tissu conjonctif de nombreux vaisseaux sanguins.

- **La muscularis mucosae**, couche musculaire lisse.

Par ailleurs, la muqueuse intestinale présente de nombreux replis appelés valvules conniventes, particulièrement développées au niveau du duodénum et du jéjunum et qui portent aussi des protubérances ou villosités. De plus, chaque cellule épithéliale présente des microvillosités à son sommet, ce qui augmente considérablement la surface de contact avec la lumière intestinale. Chaque villosité renferme une artériole et une veinule associée à un riche réseau de capillaires sanguins et un vaisseau lymphatique. Le tractus gastro-intestinal est tapissé en totalité par du mucus dont le rôle est de protéger l'estomac et le duodénum contre le liquide gastrique.

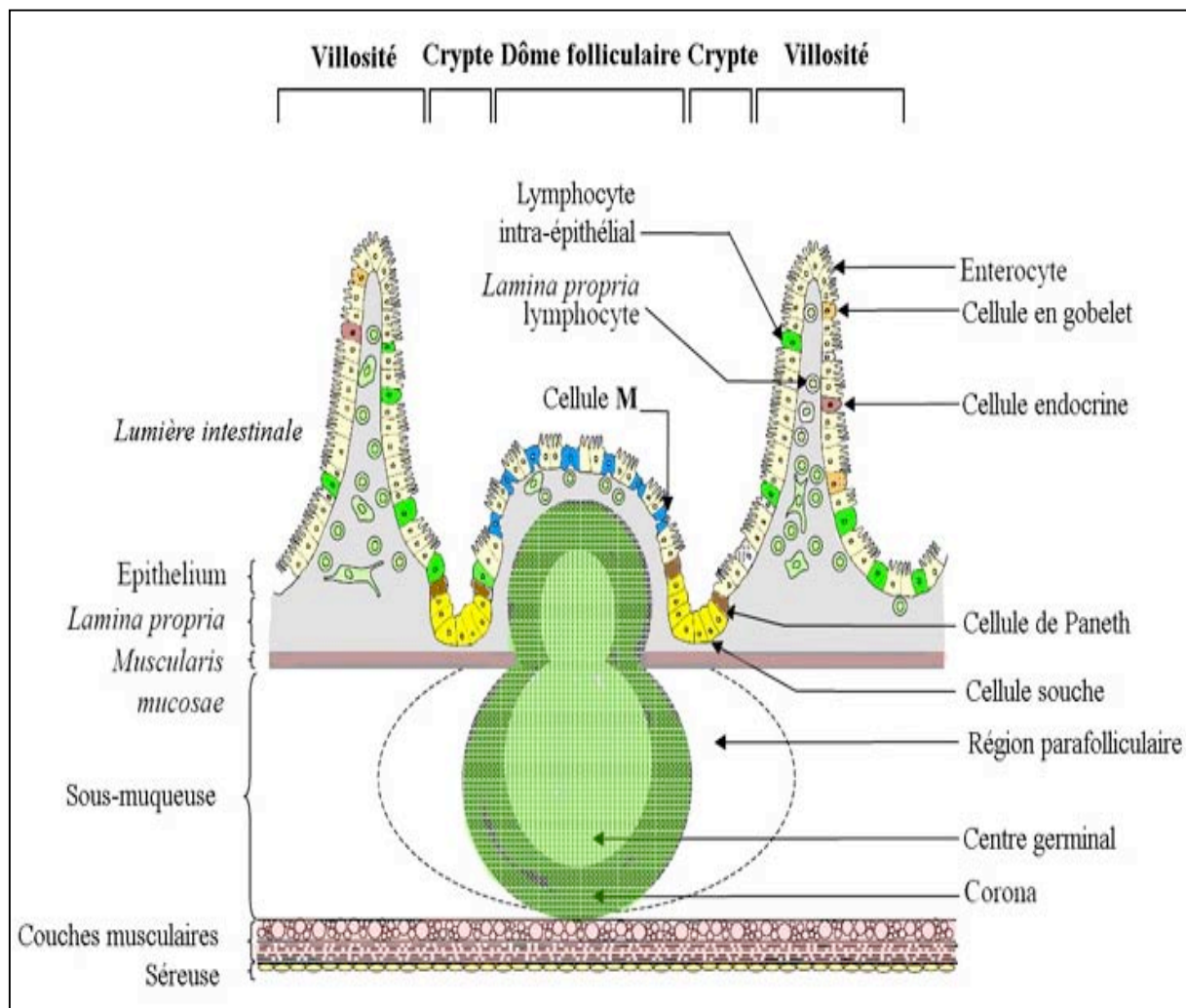


Figure 33 : Organisation de la paroi digestive et des tissus lymphoïdes

III.1.1.2. Le système lymphatique

Le système lymphatique (Guenard, 1991), comprend deux parties :

1. Un réseau de vaisseaux lymphatiques, qui ramènent dans la circulation sanguine le surplus de liquide interstitiel résultant de la filtration des capillaires
2. Divers organes et tissus lymphatiques disséminés dans l'organisme, qui sont le siège de la production des phagocytes et des lymphocytes, agents essentiels de la défense immunitaire.

La particularité de ce réseau lymphatique est l'existence de capillaires lymphatiques fenêtrés qui facilitent le passage de molécules. Ce système véhicule la lymphe qui est un ultrafiltrat du plasma. L'absorption lymphatique gastro-intestinale se réalise via un ensemble de tissus non lymphoïdes et d'autres tissus à caractères lymphoïdes.

Les tissus non lymphoïdes sont constitués de cellules endothéliales des vaisseaux lymphatiques à jonctions séparées. Ces jonctions séparées permettent le passage des chylomicrons (75-600 nm) dans la lumière lymphatique (Yoshikawa et al., 1984). Les tissus lymphoïdes sont constitués de plaques de Peyer et de cellules de M. Les cellules de Peyer sont constituées de plaques de cellules localisées dans le tissu lymphoïde intestinal. Chaque plaque de Peyer est formée d'un agrégat de follicules lymphoïdes comprenant principalement des lymphocytes B. Les cellules M sont des cellules spécialisées situées au niveau des plaques de Peyer. Elles ont pour rôle la capture des virus, des bactéries et protozoaires se trouvant dans la lumière intestinale et de les transporter vers les cellules immunocompétentes, dans la couche sous épithéliale de la plaques de Peyer.

III.1.1.3. Absorption des systèmes nanocapsulaires et des microparticules

Administrées par voie orale, quatre possibilités de capture intestinale concernent les particules polymériques :

1. Le passage intracellulaire
2. Le passage paracellulaire au niveau des cellules épithéliales de la muqueuse intestinale
3. Les plaques de Peyer de la circulation lymphatique

4. Après phagocytose par les macrophages intestinaux

III.1.1.3.1 Le passage intracellulaire

Sanders a observé des particules de polystyrène dans les cellules épithéliales du jéjunum une heure après leur administration intragastrique à des rats (Sanders and Ashworth, 1961). Elles étaient en grand nombre dans le cytoplasme des cellules épithéliales où elles étaient emprisonnées dans des vésicules. Elles sont aussi retrouvées dans les espaces intercellulaires étroits de l'épithélium. Des nanoparticules de ferritine (McClean et al., 1998) ont été trouvées à l'intérieur de l'épithélium de cellules intestinales de type Caco-2 (figure 34). La capture intracellulaire obéirait à un mécanisme d'endocytose.

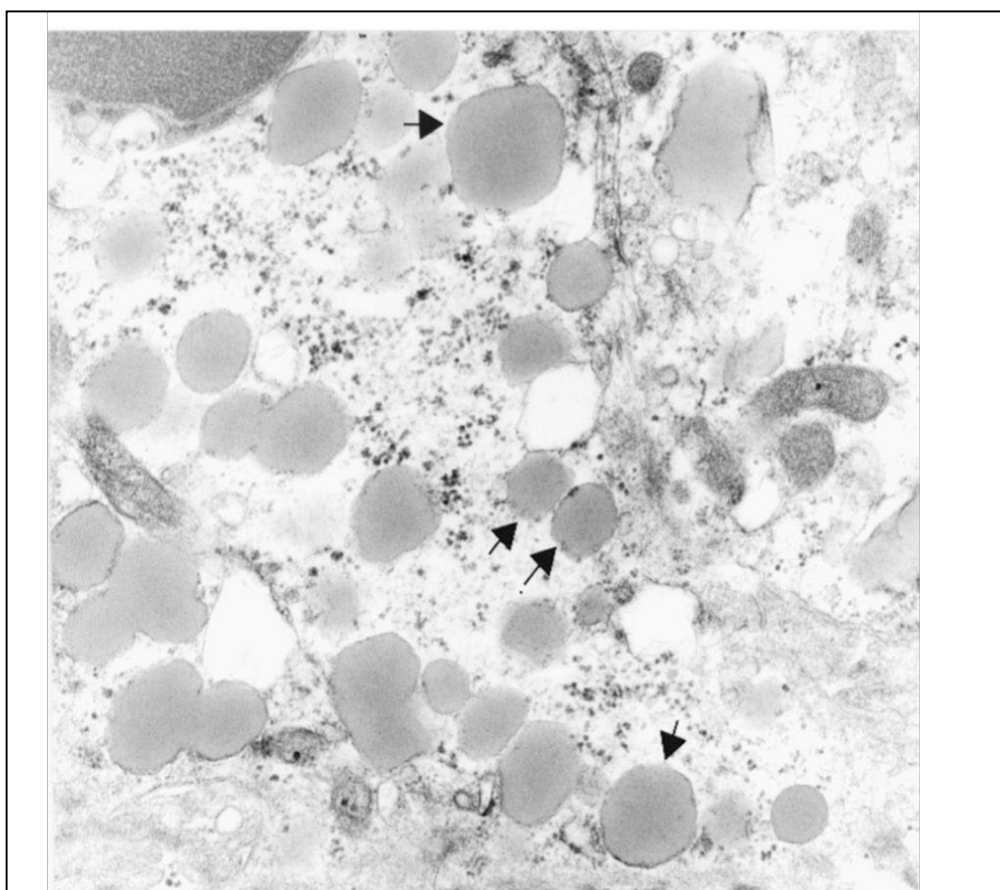


Figure 34 : Nanoparticules de ferritine à l'intérieur des cellules Caco-2 (McClean et al., 1998) observées en microscopie confocale, les flèches désignant les nanoparticules de ferritine incorporées dans les cellules de type Caco-2

III.1.1.3.2 Le passage paracellulaire au niveau des cellules épithéliales de la muqueuse intestinale

L'absorption intestinale des nanocapsules de polyalkylcyanoacrylate de Lipiodol[®] (huile radio-opaque) a été étudiée sur des chiens (Aprahamian et al., 1987). Quinze minutes après l'administration intrajéjunale, des nanocapsules sont retrouvées dans les espaces intercellulaires en grand nombre et dans la *lamina propria* à proximité de la membrane basale des entérocytes. Trente minutes après, les nanocapsules sont en grand nombre à la surface de l'épithélium vasculaire et une heure après, seules quelques particules sont observées dans les capillaires sanguins. Les auteurs concluent que les nanocapsules augmentent l'absorption et le transport du Lipiodol[®] depuis la lumière intestinale jusqu'au compartiment vasculaire par un processus paracellulaire. Ainsi, les nanocapsules sont potentiellement des vecteurs susceptibles d'améliorer le passage intestinal des médicaments. Le passage paracellulaire des microparticules et des nanoparticules est controversé. Il est largement admis que la voie paracellulaire n'est accessible que pour les molécules dont la taille n'excède 11,5 Å (Norris et al., 1998).

III.1.1.3.3 Les plaques de Peyer de la circulation lymphatique

Plusieurs publications décrivent l'absorption par les plaques de Peyer via les cellules M comme le mécanisme principal d'absorption des nanoparticules et des microparticules. La quantification des particules de latex fluorescents chez le lapin a montré que les particules de 600 à 750 nm de diamètre étaient internalisées par les cellules M et transportées vers l'espace sous épithélial dès la 10^{ème} minute après leur administration (Pappo and Ermak, 1989).

De même, après administration orale, de nombreuses nanoparticules de polyisobutylcyanoacrylate d'une taille de 200 nm ont été observées dans la paroi intestinale et au niveau des plaques de Peyer (Scherer et al., 1993). La pénétration des nanoparticules dans la paroi intestinale s'effectue sur une période de 4 heures. Concernant les microparticules, il a été observé une accumulation de microparticules de latex dans les plaques de Peyer, 18 h après administration orale (Jani et al., 1992).

Le diamètre et les propriétés de surface des particules influencent l'absorption par les plaques de Peyer. Jani a montré que l'absorption des nanoparticules et la vitesse de la capture des particules par les plaques de Peyer sont fonctions du diamètre des particules (Jani et al., 1990).

Concernant les propriétés de surface, les particules à surfaces les plus hydrophobes seraient préférentiellement absorbées au niveau des plaques de Peyer. Il a été également observé que la capture était plus importante pour les polymères les plus hydrophobes (polystyrène, polyméthacrylate) que pour les polymères moins hydrophobes (polyacide lactique) (Eldridge et al., 1989). Par ces différents mécanismes de passage, les nanocapsules ont amélioré la biodisponibilité des molécules lipophiles par voie orale. Le processus d'absorption des particules par phagocytose a été étudié (Jepson et al., 1993; Damge et al., 1996). Les mécanismes impliqués restent cependant complexes.

Par ces différents processus, de nombreuses évaluations ont montré que les vecteurs particuliers peuvent améliorer la biodisponibilité des molécules présentant une faible absorption digestive. Ces systèmes vont protéger les principes actifs contre la dégradation enzymatique dans le cas des protéines, augmenter la solubilité des molécules lipophiles ou favoriser l'interaction des molécules d'intérêt thérapeutique avec le mucus digestif.

L'insuline constitue l'exemple de molécules dont la biodisponibilité orale est améliorée chez l'animal par l'utilisation des vecteurs particuliers composites.



Figure 35 : Les flèches désignent les microsphères de zéine captées par des cellules M (Ermak and Giannasca, 1998) et observées en microscopie électronique. E désigne les entérocytes

Naturellement, l'insuline est dégradée par l'acidité gastrique et les enzymes digestives. Sa biodisponibilité orale est nulle. L'insuline encapsulée dans des nanoparticules de chitosan, chargées positivement et administrées oralement à une dose de 5 UI/kg a permis d'avoir une efficacité identique à la voie sous cutanée (Sonaje et al., 2009).

L'étude pharmacocinétique montre un pic insulinaire 5 heures après administration de la forme orale nanocapsulaire alors que la forme sous cutanée permet d'obtenir le pic insulinaire en 1 heure (Figure 36). Malgré ce retard, les nanocapsules de chitosan permettent d'avoir un effet durable sur l'abaissement de la glycémie. La biodisponibilité à la dose de 15 UI/kg de d'insuline encapsulée a été estimée à 15% par rapport à la forme sous cutanée.

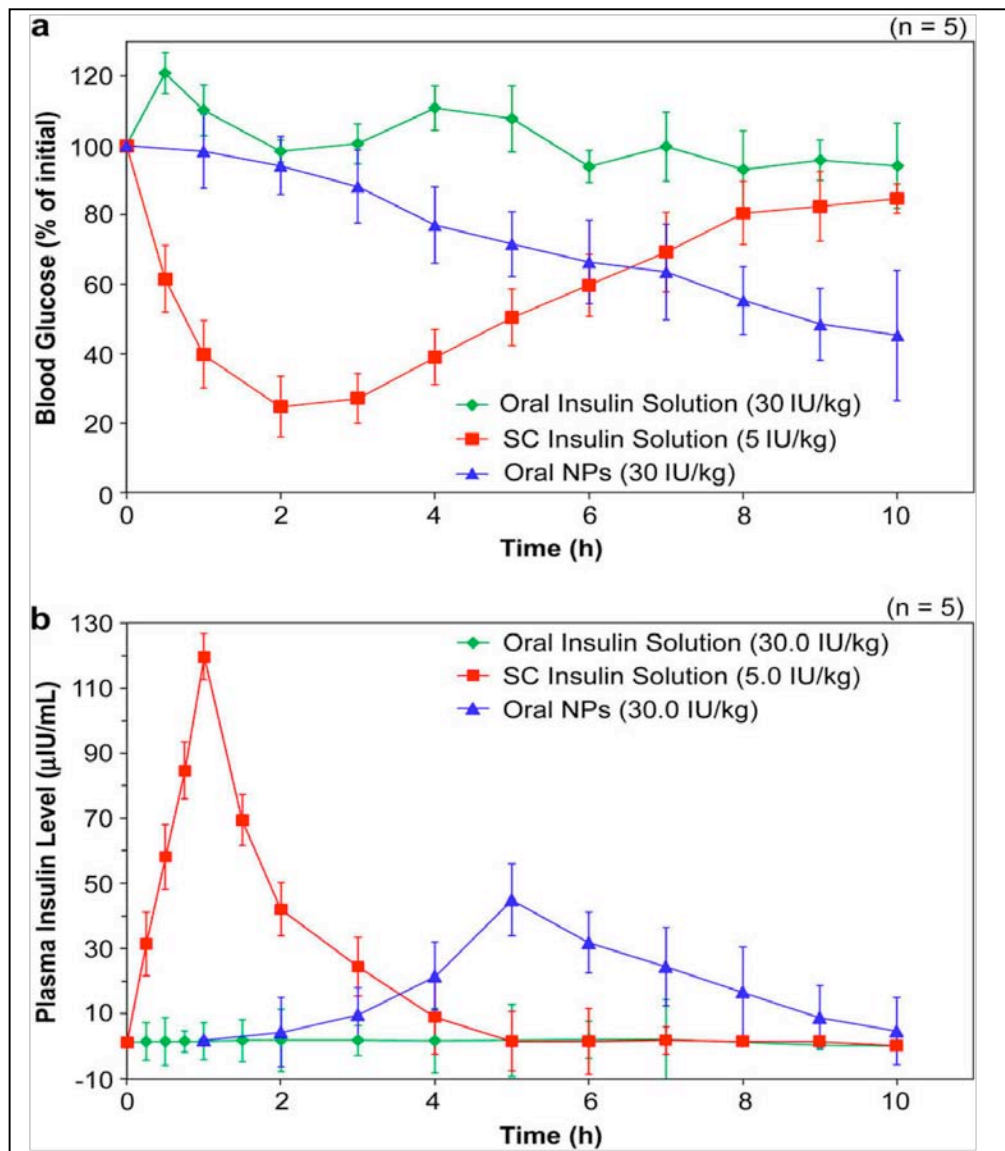


Figure 36 : Impact des différentes formes galéniques d'insuline à dose variable sur la glycémie chez des rats diabétiques (Sonaje et al., 2009)

Concernant les microparticules, l'utilisation des polymères a surtout permis la modulation de la cinétique de libération des principes actifs. L'encapsulation de la nitrendipine par des polymères Eudragit® E100, ou des polymères de phtalate d'hydroxypropylméthylcellulose ou d'acétate d'hydroxypropylméthylcellulose a permis d'obtenir des concentrations plasmatiques progressives évitant des pics sanguins de nitrendipine (Yang et al., 2004).

III.1.1.4. Absorption des formulations lipidiques

L'influence d'une alimentation riche en huiles sur la biodisponibilité des molécules lipophiles constitue le point de départ dans la formulation des systèmes lipidiques. Il a été observé qu'une alimentation riche en triglycérides améliorerait la biodisponibilité de la griséofulvine (Crounse, 1961). Par la suite, plusieurs études confirmeront que les suspensions lipidiques et les microémulsions pourraient constituer des formes pharmaceutiques de choix pour la formulation des molécules lipophiles (Humberstone and Charman, 1997; Gershanik and Benita, 2000). Après pénétration du mucus intestinal, la molécule peut subir un transport transcellulaire, paracellulaire ou lymphatique (Figure 37).

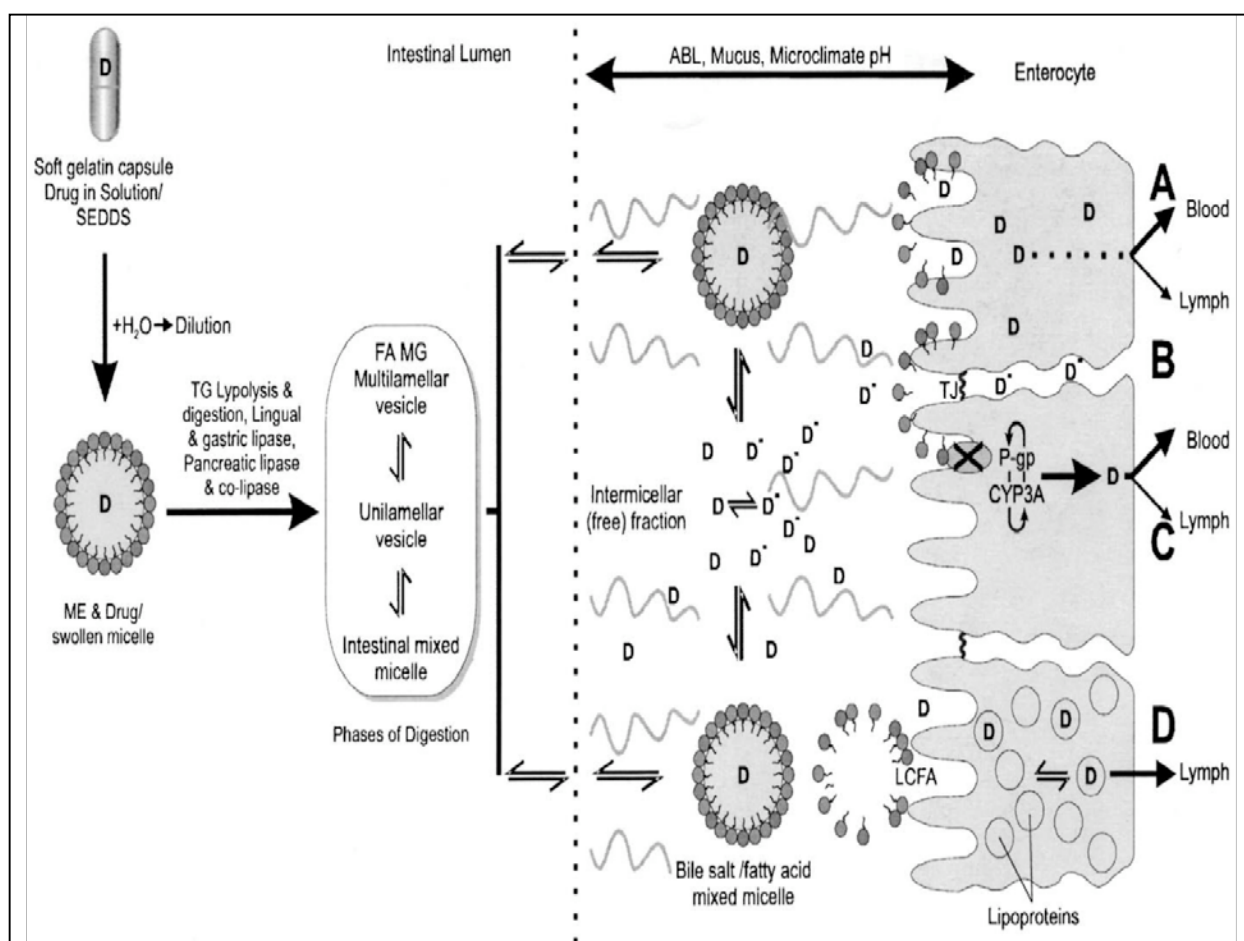


Figure 37 : Processus d'absorption des microémulsions. A : voie transcellulaire, B : voie paracellulaire, C : Inhibition de la Pg-P et du cytochrome 3A, D : Voie lymphatique et chylomicrons (O'Driscoll, 2002)

Plusieurs mécanismes interviennent dans l'absorption des microémulsions. Après ingestion orale des microémulsions, elles subissent une émulsification par les fluides biologiques intestinaux. Grâce au péristaltisme intestinal, la solubilisation du principe actif est accélérée et conduit à la formation d'émulsions plus ou moins grossières. Les lipases intestinales et pancréatiques vont favoriser la digestion des lipides et la formation de micelles mixtes et de microémulsions.

Plusieurs facteurs comme la nature du principe actif, du véhicule huileux ou des micelles formées peuvent influencer l'absorption des microémulsions.

III.1.1.4.1 Influence du principe actif sur l'absorption

La nature et le degré de lipophilie du principe actif jouent un rôle majeur dans l'amélioration de l'absorption. La lipophilie de la molécule favorise la perméabilité au travers des membranes biologiques, constituées de bicouches de phospholipides, une fois la molécule libérée. Cette forte lipophilie pourrait également participer à une meilleure incorporation de la molécule au sein de la microémulsion. C'est la raison pour laquelle, la plupart des auteurs s'attachent à étudier la solubilité des molécules au sein des véhicules en vue de choisir les meilleurs excipients.

III.1.1.4.2 Influence du véhicule huileux et des tensioactifs sur l'absorption des principes actifs

La combinaison des huiles, tensioactifs et principes actifs liposolubles permet d'obtenir différents types de microémulsions. Comme nous l'avons décrit précédemment, il existe 4 types de microémulsions ayant une efficacité variable sur l'absorption des principes actifs. Les microémulsions de type I comportent des triglycérides et très peu de tensioactifs. La longueur de la chaîne carbonée peut influencer la biodisponibilité comme observé dans le cas de l'halofantrine (Figure 38). Il apparaît que les triglycérides à longues chaînes améliorent la biodisponibilité de l'halofantrine (Porter et al., 2004).

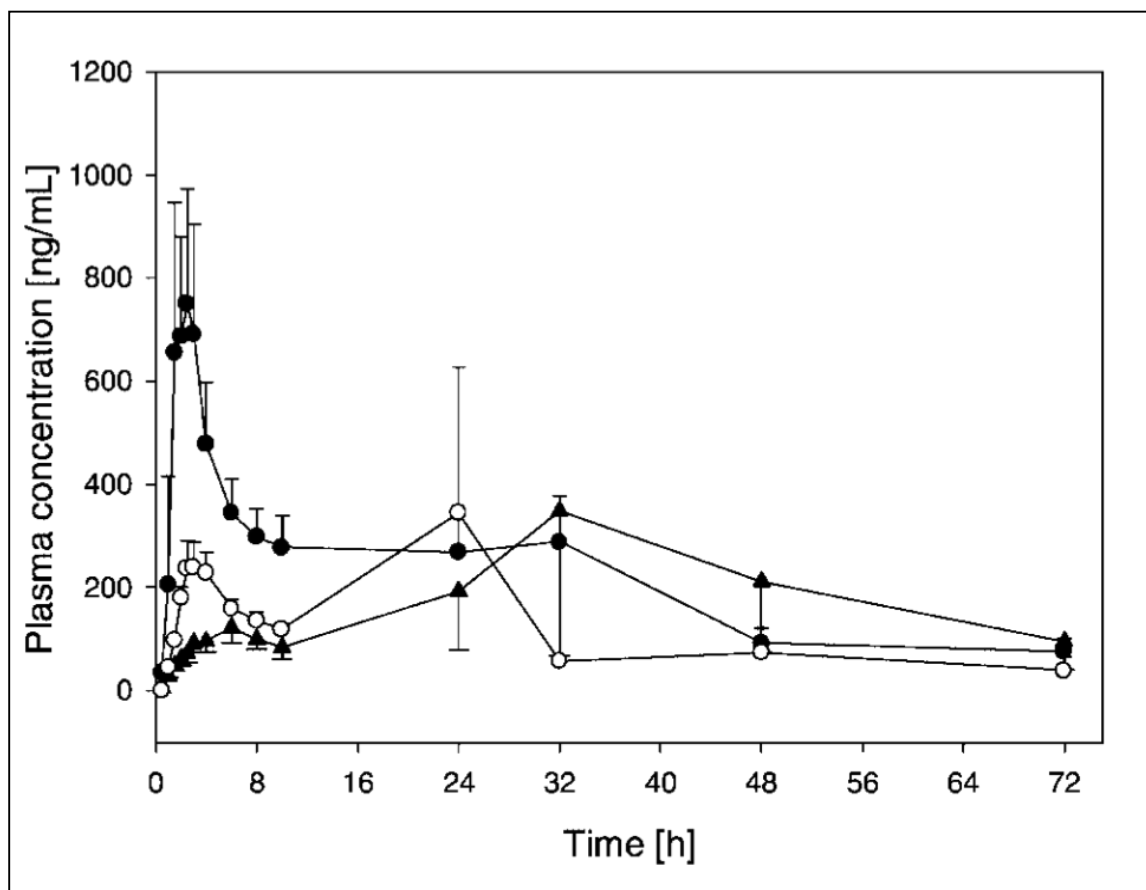


Figure 38 : Profil pharmacocinétique de l'halofantrine formulée avec un triglycéride à longue chaîne (●), à chaîne moyenne (○) et mélange longue et moyenne chaîne (▲) chez le chien (Porter et al., 2004)

Les formulations de type II comportent entre 30 et 40% de tensioactifs hydrophobes et des triglycérides à chaînes longues. La formulation de RO-15-0778 avec de l'huile d'arachide et du polyéthylène glycol (SEDDES) a amélioré la biodisponibilité de plus de 300% par rapport aux formes évaluées chez le chien (Tableau 3). Les auteurs ont conclu que cette amélioration de la biodisponibilité serait principalement due à la solubilisation de la molécule dans le liquide gastroduodénal (Shah et al., 1994).

Formulation	Cmax (µg/ml)	Tmax (h)	AUC (µg.h/ml)	Biodisponibilité relative (%)
SEDDES	5,57	2,50	29,77	389,00
Solution de PEG 400 à 1,2%	1,44	2,00	7,64	100,00
Poudre de P.A. obtenue par nébulisation (capsule)	0,78	3,00	2,69	35,30
Comprimé de P.A. micronisé	0,58	2,00	1,32	17,20

Tableau 3 : Paramètres pharmacocinétiques des différentes formulations du RO-15-0778 chez le chien (Shah et al., 1994)

Les formulations de type III ont fourni les meilleurs exemples d'efficacité des systèmes autoémulsionnants. Ces formulations ont la capacité de s'autoémulsionner rapidement en présence d'eau, tout en formant un liquide clair, transparent et stable dans le temps. Elles comprennent des tensioactifs hydrophiles et des triglycérides à chaînes moyennes. Contrairement aux formulations de type II, le diamètre des microémulsions ne dépasse pas 100 nm.

La ciclosporine a été formulée sous forme de microémulsions (Néoral[®]) et a reçu l'AMM en tant qu'agent immunosuppresseur administrable par voie orale. La biodisponibilité relative du Néoral[®] par rapport à la forme conventionnelle le Sandimmun[®] (simple émulsion lipidique) varie de 174 à 234% selon la dose. Outre l'amélioration de la biodisponibilité, cette dernière formulation a permis de réduire les variations inter et intra individuelles et d'obtenir une meilleure linéarité dose/exposition. Ceci se traduit par une meilleure sécurité d'emploi pour cette molécule dont l'index thérapeutique est faible. Le Sandimmun[®] contient à la fois, le principe actif, un triglycérides à longues chaînes (LCT, huile de maïs), des LCT éthylénées (huile de maïs éthylénée, Labrafil M2125 CS, HLB 3-4 jouant le rôle de tensioactif), du glycérol et de l'éthanol déshydraté (12,7%). Il est administré comme une émulsion orale préalablement à diluer dans de l'eau, ou du jus de fruit (sauf jus de pamplemousse) ou du lait. Il se présente sous forme de capsule de gélatine. Les performances biopharmaceutiques du Sandimmun[®] étaient cependant relativement faibles parce que l'absorption était variable (biodisponibilité comprise entre 7 et 90 % et T_{max} compris entre 1,5 et 22 heures), incomplète et affectée par l'alimentation (Gupta et al., 1990).

La formulation de Ciclosporine actuelle (Néoral[®]), conduit à la formation d'une microémulsion. Il s'agit d'un mélange de mono- di et triglycérides issus d'huile de maïs (phase huileuse), d'huile de ricin polyhydrogénée (Cremophor[®] RH40, HLB 14-16, agent tensioactif), de DL-alpha-tocophérol (vitamine E) (anti-oxydant), de propylène glycol (co-solvant) et d'éthanol déshydraté (co-solvant). Les études de bioéquivalence entre les 2 formes ont montré une amélioration de la biodisponibilité d'un facteur 2 du Néoral[®] par rapport au Sandimmun[®] (Tableau 4) (Mueller et al., 1994).

	Dose 200 mg		Dose 400 mg	
Paramètres	SANDIMMUN®	NEORAL®	SANDIMMUN®	NEORAL®
Tmax (h)	2,1 ± 0,7	1,5 ± 0,4	2,1 ± 0,9	1,4 ± 0,4
Cmax (ng/mL)	558 ± 228	1026 ± 218	785 ± 252	1556 ± 286
Cmax/dose (ng/mL par mg)	2,79 ± 1,14	5,13 ± 1,09	1,96 ± 0,63	3,90 ± 0,72
AUC (ng.h/mL)	2013 ± 614	3471 ± 1029	3336 ± 1130	7054 ± 1522
AUC/dose (ng.h/mL par g)	10,07 ± 3,07	17,36 ± 5,15	8,34 ± 2,83	17,64 ± 3,81
T1/2 (h)	5,8 ± 2,4	7,0 ± 2,6	7,4 ± 2,4	11,0 ± 2,9

Tableau 4 : Paramètres pharmacocinétiques de la ciclosporine chez le volontaire sain (Mueller et al., 1994)

Le cas de la ciclosporine est un exemple de l'utilité des microémulsions de type III. Hormis l'amélioration de la biodisponibilité des molécules lipophiles et par conséquent des posologies plus confortables, les microémulsions pourraient améliorer la tolérance digestive des molécules lipophiles.

La biodisponibilité de plusieurs molécules lipophiles a ainsi été améliorée et sont donc potentiellement susceptibles d'être encapsulées dans des microémulsions (Tableau 5).

Molécule et référence	Type de système d'administration	Huiles	Tensioactifs	Observations
Ciclosporine (Mueller et al., 1994)	SMEDDS (Néoral®)	Huile de maïs hydrolysée	Glycérides polyglycosylés, dérivés polyoxyéthylénés de l'huile de ricin	Augmentation de F d'un facteur 2
Halofantrine (Khoo et al., 1998)	SEDDS SMEDDS	Captex 355, Capmul Huile de Soja, Maïsine	Crémophor EL	Augmentation de F d'un facteur 6-8
Ontazolast (Hausse et al., 1998)	SEDDS (Semi-solide)	Gelucire 44/14, Peceol	-----	Augmentation de F d'un facteur 10
Coenzyme Q10 (Kommuru et al., 2001)	SEDDS	Myvacet	Labrasol, Lauryglycol	Augmentation de F d'un facteur 2
Simvastatine (Kang et al., 2004)	SMEDDS	Capryol 90	Crémophor EL, Carbitol	Augmentation de F d'un facteur 1,5
Progestérone (Tuleu et al., 2004)	SEDDS	Mono, diglycerides	Polysorbate 80	Augmentation de F d'un facteur 9
Indométhacine (Kim and Ku, 2000)	SEDDS	Ethyloléate	Tween 85	Augmentation de F d'un facteur 2
Dexibuprofène (Balakrishnan et al., 2009)	SEDDS	Capryol 90	Labrasol, Labrafil	Augmentation de F d'un facteur 2-3
Phénytoïne (Atef and Belmonte, 2008)	SEDDS	Labrafac	Labrasol, Plurol, Transcutol	Augmentation de F d'un facteur 2
Vitamine E (Julianto et al., 2000)	SEDDS	Huile de Soja, Huile de palme	Tween 80, Span 80	Augmentation de F d'un facteur 3

Tableau 5 : Tableau résumant quelques applications des systèmes lipidiques autoémulsionnants

III.2. Les barrières d'absorption

Les principes actifs doivent franchir des barrières d'absorption avant d'arriver dans la circulation sanguine. Comme nous l'avons souligné précédemment, les principes actifs doivent être solubilisés dans le liquide gastrique avant de pouvoir franchir la membrane intestinale. Une fois cette solubilisation réalisée, un ensemble d'obstacles biologiques rentrent en jeu pour l'absorption de la molécule : il s'agit de la couche aqueuse liée au mucus, du mucus intestinal, de la membrane apicale avec son complexe enzymatique et du potentiel de surface.

III.2.1. La couche aqueuse liée au mucus

La surface de la membrane intestinale est tapissée par une couche aqueuse appelée couche ABL (Aqueous Boundary Layer). Cette couche est principalement constituée d'eau, de mucus et de glycocalyx. Les molécules solubilisées et diffusant dans le liquide intestinal doivent pénétrer et traverser cette couche ABL avant d'arriver dans la circulation sanguine. Cette couche ABL assure une protection de la muqueuse car elle constitue le premier point de rempart contre les particules infectieuses (Magalhaes et al., 2007). Elle peut également être le facteur limitant de l'absorption moléculaire.

On peut raisonnablement penser que l'utilisation des tensioactifs modifie la structure de cette couche aqueuse et que les particules qui traversent cette couche sont phagocytées par l'ensemble du système immunitaire qui la traverse. Un microclimat acide de pH 5,3-6,2 au niveau de l'ABL intestinal a été mis en évidence chez le rat (Shiau, 1990). L'ensemble de cette couche aqueuse est alimenté par un gel visqueux appelé mucus intestinal dont le composé principal est la mucine. L'épaisseur de cette couche de mucus peut atteindre 192 μm chez l'homme.

Ce mucus a également un rôle de défense vis-à-vis des pathogènes et constitue une barrière à l'absorption des particules. Les systèmes micellaires peuvent altérer les propriétés physico-chimiques du mucus.

III.2.2. La membrane apicale

Les cellules intestinales sont entourées du côté apical par une membrane lipidique double couche qui ont un rôle essentiel dans l'absorption des molécules. Des jonctions serrées (Figure 39) assurent la continuité et la cohésion de la couche membranaire intestinale. Certaines substances comme les tensioactifs peuvent modifier la structure moléculaire des jonctions serrées. La membrane apicale est riche en glycoprotéine P, protéine qui assure l'efflux d'un certain nombre de molécules et peptides (Multi Drug Resistance, MDR).

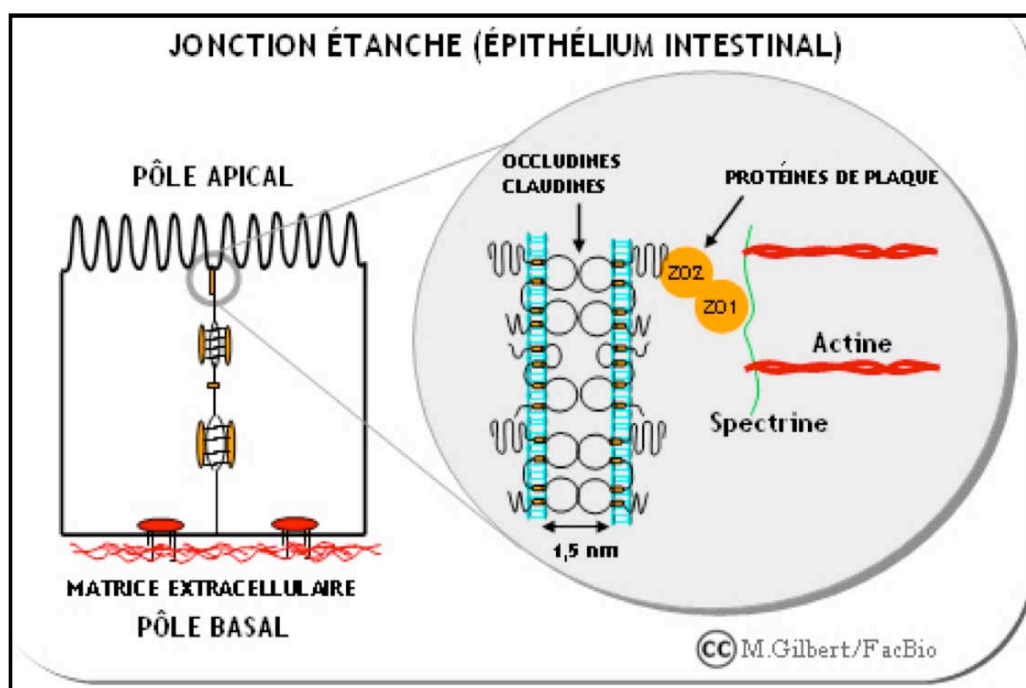


Figure 39 : Structure des jonctions serrées cellulaires

La glycoprotéine P agit en coopération avec les cytochromes cytosoliques des entérocytes (Benet et al., 1999). La présence de ces éléments est un frein important à l'absorption des molécules lipophiles véhiculées par les vecteurs.

De nombreuses études physiologiques ont prouvé que la membrane apicale des cellules intestinales ainsi que celles d'autres cellules de l'organisme est chargée négativement. Ceci serait dû à la présence de phospholipides membranaires portant une charge négative due aux groupements phosphates. Cette charge négative permettrait comme nous le verrons plus loin, une interaction avec les vecteurs possédant un potentiel ζ positif de la couche de Stern. Cette interaction a pour conséquence d'améliorer l'absorption des molécules associées à ces vecteurs. Des exemples sont connus pour les nanocapsules de chitosan (Prego et al., 2006) et des microémulsions de Labrasol® (Sha et al., 2005a)

IV. Etude de l'absorption intestinale des principes actifs et des vecteurs de médicaments dans les modèles cellulaires et tissulaires

IV.1. La culture cellulaire Caco-2

IV.1.1. Transport moléculaire par les cellules Caco-2 et l'épithélium intestinal

Quatre possibilités de transport des molécules au travers des cellules intestinales et Caco-2 sont actuellement identifiées (Figure 40) : le transport passif transcellulaire, le transport paracellulaire, le transport actif et la pinocytose. Le modèle cellulaire Caco-2 peut permettre d'étudier ces quatre possibilités.

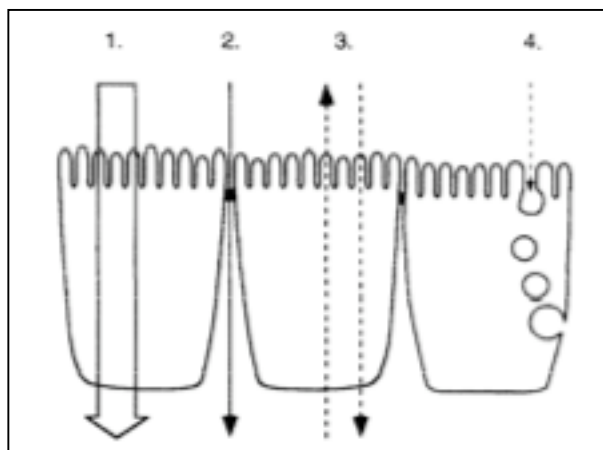


Figure 40 : Modèles de transport de molécule au travers des cellules intestinales : 1) La diffusion passive transcellulaire ; 2) Le transport paracellulaire ; 3) Le transport actif ; 4) La pinocytose (Artursson et al., 2001)

La plupart des molécules arrivent dans la circulation sanguine après passage au travers de la bordure en brosse des membranes entérocytaires. Ces vingt dernières années, afin d'étudier l'absorption intestinale des molécules, le modèle cellulaire Caco-2 a fait l'objet de nombreuses applications dans le domaine des sciences pharmaceutiques. Les cellules Caco-2, sont des lignées cancéreuses adénocarcinomeuses de colon humain qui ont acquis la propriété de se différencier en milieu de culture. Elles peuvent ainsi former une monocouche de cellules à morphologie et propriétés fonctionnelles identiques et similaires à celles de l'épithélium intestinal humain (Hilgers et al., 1990; Kim et al., 1993; Wils et al., 1994; Lennernas et al., 1996; Yee, 1997). La perméabilité des molécules au travers des cellules Caco-2 peut être corrélée à l'absorption intestinale humaine *in vivo* et cette corrélation permet de classer les molécules d'intérêt thérapeutique selon un critère qui est le degré de

perméabilité intestinale. La plupart des publications recommandent de classer les molécules selon leur « perméabilité intestinale » obtenue par la culture des Caco-2. Des étalons moléculaires sont établis avec par exemple le labétalol, le métoprolol et le timolol comme molécules possédant une forte perméabilité cellulaire alors que l'acébutolol et l'aténolol sont définies comme des molécules ayant de faibles perméabilités cellulaires (Yang et al., 2007).

Lors de l'étude de passage dans les cellules cultivées, un certain nombre de paramètres biologiques ou physico-chimiques peuvent être utiles :

✓ Le coefficient de perméabilité apparente P_{app} , qui illustre la capacité de la molécule à passer au travers de la membrane cellulaire. Il est exprimé en cm/s

$$P_{app} = \frac{\Delta Q / \Delta t}{A C_0}$$

$\Delta Q / \Delta t$ (mM/s) étant la vitesse de passage de la molécule vers le compartiment basolatéral

A étant la surface de la membrane utilisée (cm²)

C_0 étant la concentration initiale de la molécule dans le compartiment apical (mM/cm³)

✓ Le coefficient de partage octanol/eau P, qui quantifie la lipophilie de la molécule c'est-à-dire son tropisme pour les milieux non aqueux. L'octanol est considéré comme ayant des propriétés lipophiles proches de celles de la membrane cellulaire.

✓ La résistance électrique transépithéliale, TEER, qui informe sur la densité et l'état de cohésion de la monocouche cellulaire. Elle est exprimée en $\Omega \cdot \text{cm}^2$. Le TEER est considéré comme un excellent marqueur de l'intégrité cellulaire Caco-2, et des valeurs au delà de 300 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ sont généralement prises comme références (Klingberg et al., 2005; Beck et al., 2007).

$$\text{TEER} = (R_{\text{cell monocouche}} - R_{\text{filtre}}) \times A$$

$R_{\text{cell monocouche}}$: Résistance de la monocouche cellulaire

R_{filtre} : Résistance du filtre de la membrane culture

A étant la surface de la membrane utilisée

Parfois, l'évaluation de ces paramètres associés à des inhibiteurs enzymatiques membranaires permet de déterminer les types de mécanisme impliqués dans le transfert des molécules au travers des cellules entérocytaires.

IV.1.2. Coefficient de perméabilité et absorption des cellules Caco-2

Dans les premières études d'absorption, l'utilisation des propriétés intrinsèques des molécules était exploitée pour prédire leur perméabilité au travers des cellules Caco-2. Ces paramètres physico-chimiques sont le pKa, la vitesse de dissolution en milieu aqueux, le diamètre et le poids des molécules, le coefficient de partage octanol/eau. Dès lors, il apparaît que l'absorption intestinale des molécules est meilleure lorsque les conditions de solubilité et de perméabilité cellulaire sont optimales ; une forte solubilité proche de la saturabilité couplée à une perméabilité cellulaire maximale offrent les conditions requises pour une bonne absorption intestinale.

Une étude sur Caco-2, comportant un panel de molécules établit une corrélation entre le coefficient de perméabilité de la molécule évaluée et l'absorption *in vivo* (Pade and Stavchansky, 1998). Ainsi, il était possible après connaissance du coefficient de perméabilité cellulaire d'une molécule de prédire l'absorption intestinale *in vivo* chez l'homme.

IV.1.3. Utilisation du modèle cellulaire Caco-2 pour l'étude des vecteurs lipidiques autoémulsionnants et particuliers

Les systèmes autoémulsionnants (SMEDDS) ont été utilisés pour l'amélioration de la biodisponibilité de plusieurs principes actifs comme nous l'avons décrit précédemment. L'efficacité de ces systèmes autoémulsionnants a été étudiée sur le modèle cellulaire Caco-2 (Sha et al., 2005b). Il s'agit d'étudier l'action du Labrasol[®], un tensioactif contenu dans le système autoémulsionnant, sur les jonctions serrées cellulaires. L'évaluation de la résistance cellulaire montre que celle-ci est fortement modifiée par la présence d'émulsions chargées positivement et le Labrasol[®]. Le Crémophor[®] EL, par contre, n'affecte pas le TEER (Figure 41). Quant au coefficient de perméabilité cellulaire du mannitol, témoin du passage paracellulaire, il est fortement augmenté en présence du Labrasol[®] contenu dans les microémulsions chargées positivement.

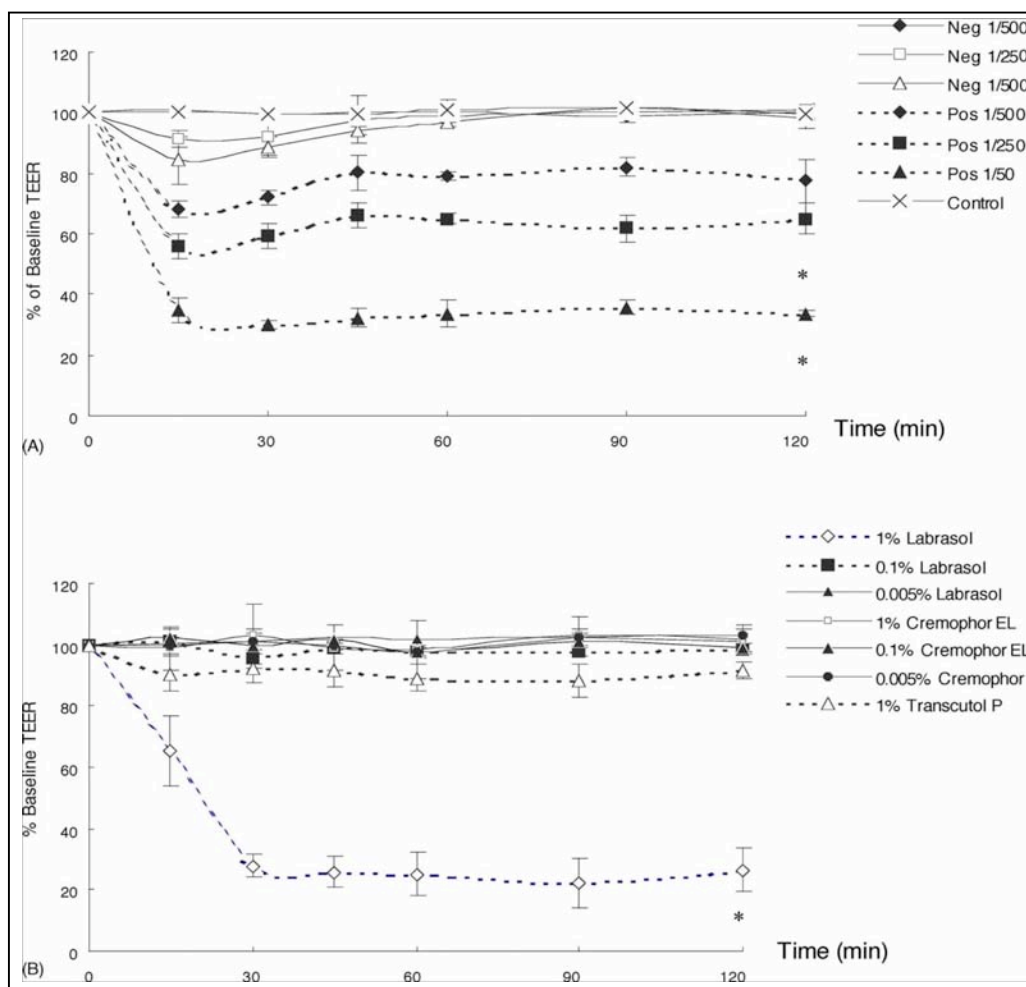


Figure 41 : Effets de la charge des microémulsions SMEDDS (A) et des tensioactifs (B) sur la résistance cellulaire des Caco-2 (Sha et al., 2005b)

L'observation en microscopie électronique des cellules Caco-2 exposées à des microémulsions diluées au 50^{ème} et 500^{ème}, montre une modification des filaments d'actine et des jonctions serrées de type ZO-1. Cette étude montre que les microémulsions formées en présence d'eau et contenant du Labrasol[®] permettent de modifier considérablement les protéines des jonctions cellulaires. Selon les auteurs, la charge positive des émulsions permet une interaction avec les protéines chargées négativement de la membrane cellulaire. Les microémulsions chargées négativement ont une interaction beaucoup plus faible avec la membrane cellulaire, ce qui a pour conséquence un passage paracellulaire de moindre importance. De plus, les auteurs pensent qu'une forte concentration du tensioactif cationique (Labrasol[®] à 1%), en augmentant la densité des charges cationiques, permet une meilleure interaction membranaire et une modification de la structure moléculaire des protéines de jonction cellulaire. Cette interaction a été suggérée dans le cas de microémulsions de ciclosporine (Gershanik et al., 1998). D'autres polypeptides de nature cationique interagissent également avec les membranes cellulaires et les jonctions cellulaires augmentant leur absorption intestinale (Miyamoto et al., 2001; Gonzalez Ferreiro et al., 2002).

Des microémulsions de nature non ionique de carbamazépine, un antiépileptique, ont été testées sur des modèles cellulaires Caco-2 (Kogan et al., 2008). L'intérêt de cette étude est d'évaluer l'impact des Tween[®] (esters de polyoxyéthylène), connus comme moins toxiques sur les cellules intestinales Caco-2 (Quan et al., 1998). Il s'avère que dans le cas de cette évaluation, les tensioactifs du type Tween[®] n'augmentent pas le coefficient de perméabilité de la carbamazépine et les microémulsions formulées à partir de ces tensioactifs n'augmentent pas non plus le coefficient de perméabilité par rapport à la carbamazépine seule.

Afin de démontrer la capacité qu'ont les nanoémulsions pour augmenter le coefficient de perméabilité des molécules, C. Brusewitz et coll. ont formulé 3 principes appartenant à 3 groupes différents du Système de Classification Biopharmaceutique (BCS) : il s'agit du métoprolol (Classe I des molécules de forte perméabilité et forte solubilité), le danazol (Classe II des molécules de forte perméabilité et faible solubilité) et l'aténolol (Classe III des molécules de faible perméabilité et forte solubilité). L'étude du coefficient de perméabilité de ces 3 principes actifs formulés sous forme de nanoémulsions avec des constituants différents (A, B, C) montre une nette augmentation des coefficients de perméabilité cellulaire (Tableau 6) (Brusewitz et al., 2007). Les auteurs associent cette augmentation de la perméabilité à l'association des deux excipients Pluronic[®] P104 et Lauroglycol 90.

Drug	Formulation	$P_{app} \pm S.D.$ (nm/s)	Total drug recovery ^a (%)	Enhancement factor ^b
Atenolol	Formulation A	$26.3^* \pm 3.1$	102.4	2.1
	Formulation B	$31.6^* \pm 5.9$	107.6	2.5
	Formulation C	15.9 ± 1.9	105.8	–
	Control	12.8 ± 3.6	102.3	–
Metoprolol	Formulation A	$335.3^* \pm 19.7$	106.8	1.4
	Formulation B	$289.3^* \pm 3.7$	108.7	1.2
	Formulation C	$256.6^* \pm 11.0$	100.8	1.1
	Control	232.5 ± 19.5	101.9	–
Danazol	Formulation A	$22.5^* \pm 1.3$	103.6	3.2
	Formulation B	$14.0^* \pm 1.6$	102.6	2.0
	Formulation C	$11.8^* \pm 0.9$	104.0	1.7
	Control	7.1 ± 2.3	120.1	–

Tableau 6 : Coefficient de perméabilité cellulaire de l'aténolol, du métoprolol et du danazol formulés sous forme de nanoémulsions (Brusewitz et al., 2007)

Des nanocapsules ont été également testées sur des modèles cellulaires Caco-2. L'équipe de M. J. Alonso a observé que les nanocapsules de chitosan ont la propriété d'augmenter l'absorption de la calcitonine (Prego et al., 2005). Ces nanocapsules sont constituées d'une cavité huileuse dans laquelle est logée la calcitonine stabilisée par de la lécithine.

Pour élucider les mécanismes impliqués dans l'absorption de la calcitonine encapsulée, la même équipe a étudié la nature des interactions entre les nanocapsules de chitosan et la monocouche Caco-2. Il est clairement démontré que l'effet sur la résistance cellulaire est dose dépendant : une concentration nanocapsulaire de $204,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ diminue la résistance cellulaire de façon beaucoup plus significative qu'une concentration de $80 \mu\text{g}/\text{cm}^2$.

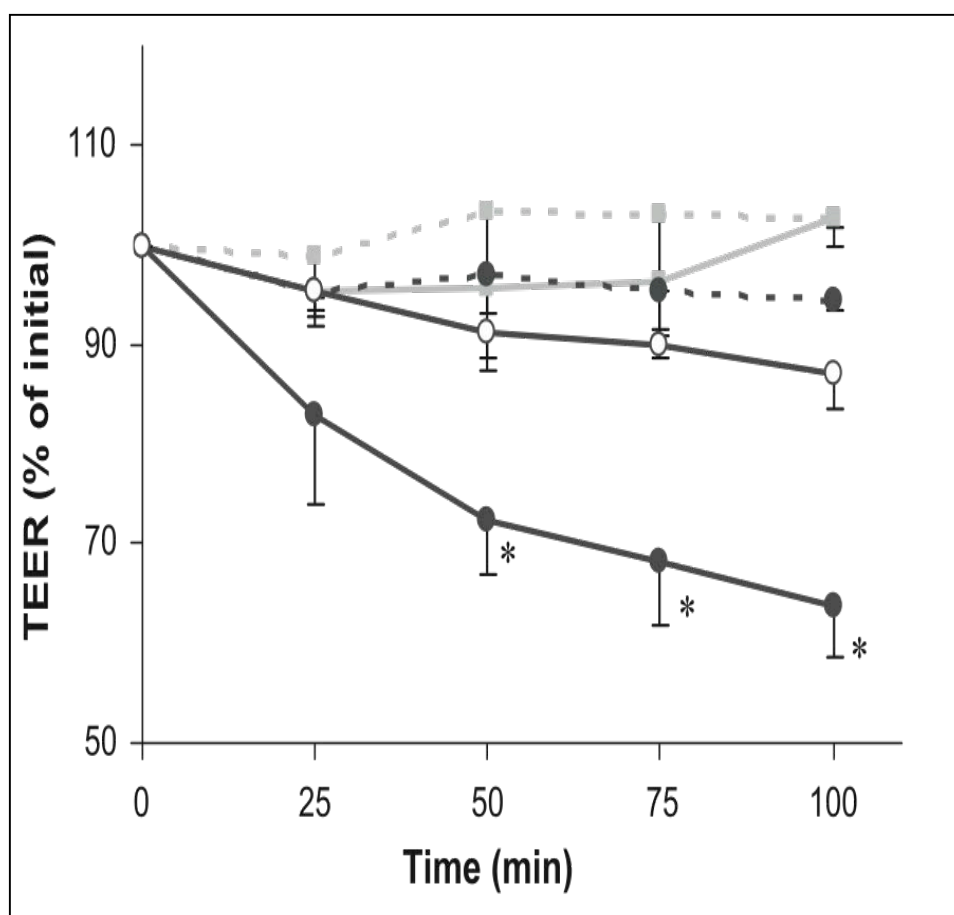


Figure 42 : Effet des nanocapsules à 204,5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (—●—) et des nanocapsules à 80 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (—○—) sur la résistance de la monocouche cellulaire (Prego et al., 2005)

A 80 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, les valeurs du TEER sont proches de celles de la solution témoin de calcitonine (Figure 42). L'absence d'effet sur la résistance cellulaire de la monocouche Caco2 est expliquée par l'absence du mucus intestinal dans le modèle cellulaire Caco-2. Pour confirmer cette hypothèse et comprendre les mécanismes d'absorption des nanocapsules de chitosan, les mêmes auteurs réalisent une culture de cellules HT29-M6 (cellules entérocytaires à parois extérieures tapissées de mucus) (Prego et al., 2006). L'observation en microscopie électronique montre que les nanocapsules adhèrent à la face apicale des cellules Caco-2 pendant environ 1 heure avant de subir un passage transcellulaire. On ne note aucune interaction avec les protéines de jonction cellulaire. Les auteurs concluent que les

nanocapsules de chitosan optimiseraient l'absorption intestinale de la calcitonine par une interaction entre la couche du mucus intestinal de charge négative et la charge positive de la molécule de chitosan, facilitant ainsi le passage transcellulaire.

Des nanoparticules de chitosan ont également permis d'augmenter le passage de l'insuline dans le modèle cellulaire Caco-2 (Sonaje et al., 2009). Il est clairement démontré que, lorsque le pH du compartiment donneur est proche de 6,6 ; le coefficient de perméabilité apparent est augmenté de façon significative (Figure 43).

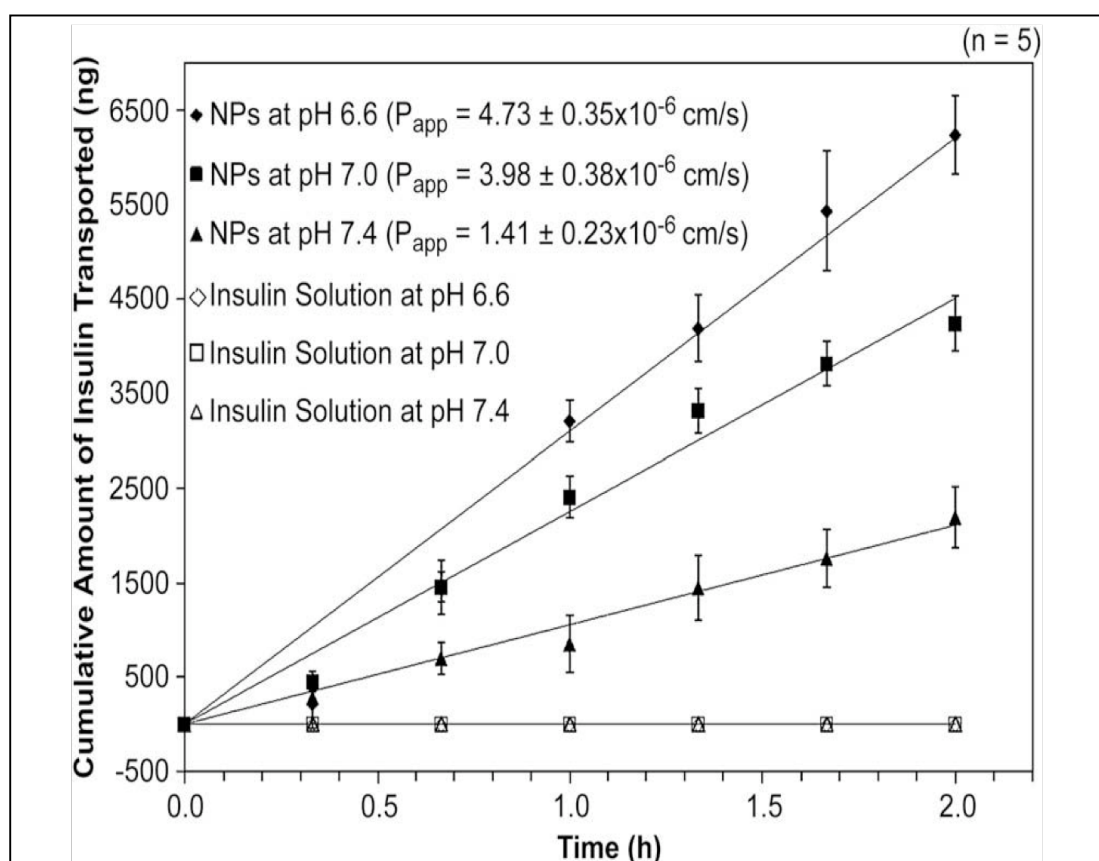


Figure 43 : Passage de l'insuline en fonction du pH du compartiment donneur dans un modèle cellulaire Caco-2 (Sonaje et al., 2009)

IV.2. Un modèle de tissus isolés : La chambre de Ussing

La chambre de Ussing (Figure 44) est une méthode qui évalue le transport intestinal des électrolytes, nutriment et des molécules. Elle a été développée par Hans Ussing qui étudiait le transport actif du chlorure de sodium (Clarke, 2009). Le principe de la méthode consiste à placer un morceau de tissu intestinal entre 2 demi-chambres de manière à délimiter 2 compartiments. Le compartiment muqueux, en contact avec la bordure en brosse des cellules des épithéliales et d'autre part le compartiment basolatéral ou séreux, en contact avec la couche musculaire du tissu basolatérale strippé. L'ensemble de la chambre de Ussing est alimenté par un fluide biologique tamponné à 7,4 (Ringer Bicarbonate Krebs). Un mélange de gaz constitué à 95% d'oxygène et 5% de gaz carbonique barbote le milieu tamponné. La viabilité du tissu intestinal monté est objectivée par la prise de son potentiel électrique grâce à des électrodes au Calomel. Ce potentiel peut varier entre -2 et 20 mV (Clarke, 2009).

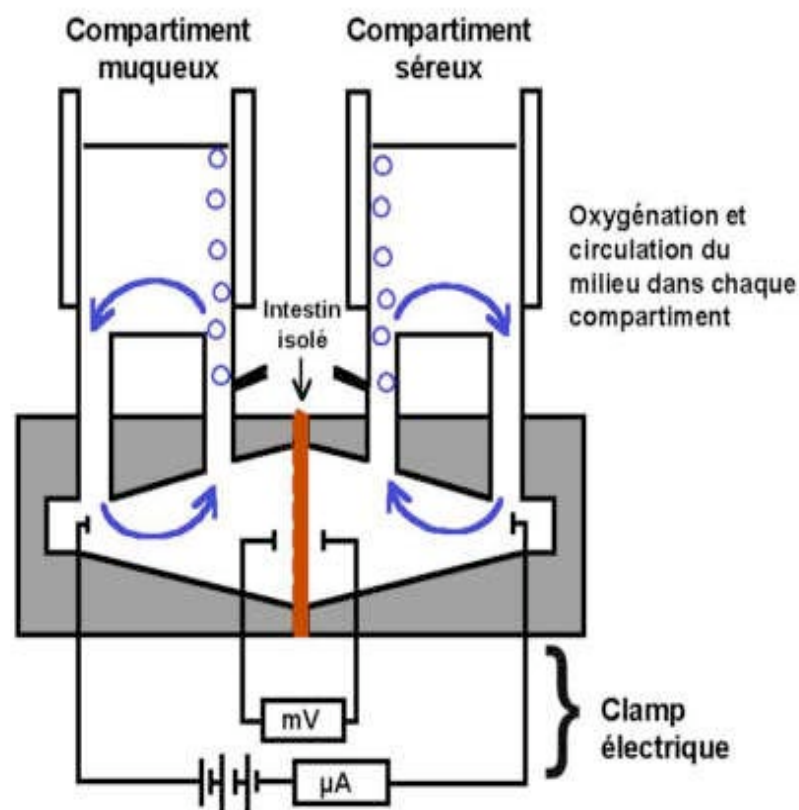


Figure 44 : Schéma d'une chambre de Ussing

Pour les molécules d'intérêt biologique à faible biodisponibilité, la chambre de Ussing peut contribuer à l'évaluation des mécanismes d'absorption et à leur optimisation. Des nanocapsules de chitosan greffés au polyisobutylcyanoacrylate ont été évaluées dans une chambre de Ussing (Bravo-Osuna et al., 2008). Il a été démontré que ces nanocapsules pouvaient diffuser par la voie paracellulaire dès que les groupements thiols greffés à la surface des nanoparticules permettaient une interaction forte avec la muqueuse intestinale. Concernant les microémulsions, il a été démontré grâce à la chambre de Ussing que la muqueuse intestinale jouerait un rôle primordial dans le mécanisme de passage de cette forme galénique (Araya et al., 2006). En effet des émulsions d'ibuprofène se révèlent moins perméables à l'intestin en présence de la N-acetylcystéine, molécule qui a la propriété de détruire la couche de mucus, empêchant ainsi l'interaction entre particules et muqueuses.

IV.3. Les modèles d'intestin perfusé

L'évaluation des molécules d'intérêt thérapeutique peut se réaliser sur des modèles d'organes perfusés qui sont assez proches des conditions physiologiques d'absorption des molécules. Ces modèles peuvent être sans recirculation (Single pass perfusion) ou avec recirculation (Recirculating perfusion). Une bonne corrélation a été obtenue entre ces modèles et l'absorption intestinale *in vivo* chez l'homme (Amidon et al., 1988). Les vitesses de perfusion utilisées dans ces systèmes influencent fortement l'absorption des molécules étudiées. Le modèle à passage unique a été utilisé pour quantifier l'augmentation de la biodisponibilité du paclitaxel formulé en microémulsions par rapport à la forme conventionnelle (Taxol®) chez le rat (Nornoo et al., 2009).

V. Conclusion

En tenant compte des différents travaux de la littérature scientifique, nous considérons que les microémulsions et les formes nanocapsulaires sont des formes intéressantes pour augmenter la biodisponibilité du mitotane. Comme nous l'avons souligné, actuellement il est nécessaire d'utiliser environ 6 comprimés de Lysodren® soit 3 g de mitotane par jour durant 4 mois pour espérer atteindre la mitotanémie efficace. Les vecteurs particuliers et les microémulsions sont des formes galéniques innovantes qui peuvent augmenter la biodisponibilité des molécules lipophiles. Nous exploiterons les potentialités de ces vecteurs dans le cadre de ce travail afin d'améliorer la biodisponibilité du mitotane et d'espérer diminuer sa dose journalière. L'effet espéré en clinique humaine est un délai d'action du

mitotane beaucoup plus court et des effets indésirables digestifs et neuromusculaires moindres.

Notre hypothèse de travail repose sur l'augmentation de la solubilité intestinale du mitotane afin d'accroître sa biodisponibilité. Pour cela, nous essayerons de formuler le mitotane sous forme de microémulsions, de nanoparticules et de microparticules. Nous évaluerons ces différentes formes galéniques dans les modèles cellulaires Caco-2, sur des fragments de jéjunum et sur des lapins.

Travail expérimental

I. Mise au point des Nanocapsules, des Microparticules et des Microémulsions de mitotane

Le premier objectif de notre travail a été de mettre au point des formes particulières polymériques (nanocapsules et microparticules) et des microémulsions de mitotane. Concernant les formes particulières, nous avons privilégié l'utilisation de polymères biodégradables (Poly-epsilon-Caprolactone ou PCL) pour les microparticules et une combinaison PCL et Eudragit RL dans le cas de nanoparticules afin de rendre la charge positive au niveau de la couche de Stern. Cette inversion de charge a été démontrée dans des travaux antérieurs effectués sur des nanoparticules d'insuline (Attivi et al., 2005). Concernant les microémulsions, nous avons choisi des véhicules huileux qui permettront une bonne solubilisation du mitotane.

I.1.1. Matières premières

I.1.1.1 Matières premières utilisées pour la préparation des Nanocapsules et Microparticules

I.1.1.1.1 Le Mitotane

Le Mitotane (*o,p'*-DDD or 1,1-dichlorodiphenyldichloroethane) a été obtenu auprès de Fluka (Buchs, Switzerland). Son degré de pureté est de 99% et sa masse moléculaire est de 320,05 g.mol⁻¹.

I.1.1.1.2 Les polymères

La poly-epsilon-caprolactone (PCL, PM 30000 Da), polymère biodégradable, a été obtenue auprès de la société Aldrich Chemical Company (Milwaukee, USA). L'Eudragit® RL, polymère non biodégradable (PM 150000 Da) est a été obtenu auprès de la société Rohm GMBH (Darmstadt, Germany).

I.1.1.1.3 Les tensioactifs et autres excipients

Pour la préparation des nanocapsules, la phase huileuse des nanocapsules a été réalisée avec du benzoate de benzyle, acquis auprès de la société Prolabo (Fontenay-sous-Bois, France). La lécithine d'œuf, agent tensioactif, a été obtenue auprès de Merck (Vaugereau, France). L'éthanol ayant servi à la dissolution de la lécithine d'œuf a été obtenu auprès de VWR (Leuven, Belgique). L'acétone ayant servi de solvant pour les polymères a été obtenue auprès de Carlo Erba France. Le Pluronic F-68, de la phase aqueuse est fourni par Sigma (Steinheim, Allemagne).

Pour la préparation des microparticules, l'alcool polyvinilique (PM 30000-70000) utilisé comme tensioactif anionique nous a été fourni par Sigma Chemical Company (St Louis, USA).

I.1.1.2 Matières premières utilisées pour la préparation des Microémulsions

I.1.1.2.1 Les huiles

Le Capryol® 90 (propylène glycol monocaprylate) a été fourni gracieusement par Gattefossé (Gennevilliers, France). Le Myvacet® (Monoglycérides acétylés) a été commandé auprès de la société Eastman (Kingsport, USA). L'éthyloléate (Acide gras polyinsaturé) a été commandé auprès de Merck (Hohenbrunn, Allemagne), l'huile de Soja auprès de la société Cooper (Melun, France), le Miglyol®812 auprès de Dynamit Nobel (Leverkusen, Allemagne) et le Captex® 355 (Triglycerides de caprylique/acide caprique) est fourni par Abitec Corporation (Janesville, USA).

I.1.1.2.2 Les tensioactifs et autres

Le Crémophor® EL (Polyoxyéthylène glycérol triricinoléate), le Tween® 20 (Polyoxyéthylène sorbitan monolaurate) et le Tween® 80 (Polyoxyéthylène sorbitan mono-oléate) sont obtenus auprès de la Sigma Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). L'albumine a été fournie gracieusement par la société LFB (Courtaboeuf, France).

I.1.2. Méthode de préparation

I.1.2.1 Préparation des Nanocapsules et des Microparticules

✓ Les nanocapsules de mitotane ont été préparées par la méthode de **nanoprécipitation** décrite par Fessi (Fessi et al., 1988). Elle consiste à solubiliser le principe actif (mitotane, 100 mg), le polymère (PCL, 250 mg ou PCL 125 mg et Eudragit RL 125 mg), une substance huileuse (Benzoate de Benzyle ; 0,5 mL) et un agent tensioactif (lécithine d'œuf, 125 mg) dans un solvant organique (acétone, 23 mL). Ce mélange est ajouté sous agitation magnétique à une phase aqueuse (Pluronic 1%, dans l'eau, 50 mL). La formation des nanocapsules se fait par précipitation interfaciale du polymère autour de la phase huileuse dans laquelle se trouve le principe actif. Elle est instantanée et se traduit par l'opalescence du milieu. Pour cela, la phase organique est ajoutée lentement à la phase aqueuse sous agitation magnétique. L'acétone et une partie de l'eau sont ensuite éliminées par évaporation sous vide (Rotavapor Heidolf), durant environ 15 minutes et à 40°C.

✓ Les microparticules de mitotane ont été fabriquées selon la technique de la **simple émulsion**.

Préparation de la phase organique :

La poly-epsilon-caprolactone ou PCL (250mg) a été dissoute dans 10 ml de dichlorométhane (agitation 3min, 1600 tours/min). Le mitotane (10, 20, 50, 100, 150, 250 mg) a ensuite été ajouté à cette solution et agité jusqu'à dissolution complète.

Préparation de l'émulsion :

10 ml de la solution organique de dichlorométhane (contenant 10, 20, 50, 100, 150, 250 mg de mitotane) ont été ajoutés sous agitation mécanique (1500 tours/min) à 800 ml d'une solution aqueuse d'alcool polyvinylique à 0.1%.

Agitation jusqu'à évaporation totale de solvant :

L'agitation est maintenue pendant 2 heures afin d'éliminer la totalité du dichlorométhane et permettre la formation des microparticules.

Filtration des microparticules

Les microparticules sont filtrées sur un filtre Millipore (filtre HA 0,45 µm)

Dessiccation des microparticules :

Les microparticules sont mises sous vide à température ambiante pendant 24 heures.

I.1.2.2 Préparation des Microémulsions

I.1.2.2.1 Solubilité du mitotane dans les différents véhicules utilisés

Pour déterminer l'huile et les tensioactifs dans lesquels le mitotane est le plus soluble, un excès de mitotane (500 mg) est introduit dans des tubes contenant 2 ml de chaque excipient (Huiles ou tensioactifs). Ces tubes sont placés au bain-marie (Memmert WB-14, Schwabach, Allemagne) à 60°C sous une agitation pendant 48 heures. On laisse les échantillons refroidir une demi-journée. S'il y a présence de cristaux au fond du tube, on transfère la solution dans un tube Eppendorf, puis on le centrifuge à 3000 tours/min pendant 5 min. Le surnageant est dilué avec du méthanol et le dosage du mitotane est réalisé par CLHP.

I.1.2.2.2 Elaboration des diagrammes pseudoternaires de mitotane

La zone de microémulsions peut être identifiée grâce la réalisation du diagramme de phases dont les trois composants (huile, tensioactif et co-tensioactif) sont représentés. Une série de mélanges lipidiques a été préparée avec le Capryol 90 (huile), le tensioactif Tween 20 et le co-tensioactif, le Cremophor EL. L'influence des tensioactifs sur l'émulsification a été étudiée en variant le ratio tensioactif/co-tensioactif dans des proportions 1/0,5 ; 1/1 ; 1/2 (m/m). La phase huileuse est alors ajoutée sur les tensioactifs en différentes quantités : 5 ; 10 ; 20 ; 30 ; 40 ; 50 ; 60 ; 70% (m/m). Les mélanges ainsi réalisés sont titrés avec de l'eau jusqu'à apparition d'un aspect laiteux marquant l'apparition d'émulsions grossières. Pour chaque formulation, la proportion de mitotane est fixée à 6,25% soit 125 mg dans 2000 mg de véhicule.

Le résultat de l'émulsification est évalué par l'observation visuelle et microscopique.

I.1.3. Contrôle physico-chimique

I.1.3.1 Taux d'encapsulation, diamètre et potentiel zêta des Nanocapsules de PCL et PCL /RS

Le taux d'encapsulation a été évalué après dissolution des nanocapsules lyophilisées. Pour cela, 20 mg de nanocapsules ont été préalablement dissous dans 100 ml d'acétonitrile. Le dosage du mitotane est effectué directement par chromatographie liquide. La technique de dosage du mitotane est une technique par CLHP. La séparation est réalisée sur une colonne CC 250/4,6 Nucléosil 100-5 Cl8 (Macherey - Negal, eckbolisheim, France) avec un débit 1,5 ml/min (pompe 8810, spectra physics ; détecteur M-490 Waters). La phase mobile est composée d'un mélange méthanol/eau (85 : 15). Un volume de 20 µl est injecté (Injecteur automatique WISP 712, Waters) et la détection est réalisée à 230 nm.

La mesure de la taille des nanocapsules a été effectuée par diffraction laser (Zetasizer 3000, Malvern Instrument, Royaume Uni). Parallèlement à la taille, des mesures de potentiel zêta ont été effectuées sur le Zetasizer ® 3000.

I.1.3.2 Taux d'encapsulation et diamètre des Microparticules de PCL

Pour chaque lot, 10 mg de microparticules ont été préalablement dissous dans 100ml d' acétonitrile. Le dosage du mitotane est effectué comme décrit ci-dessus. Les diamètres ont été mesurés au microscope optique à l'aide d'un oculaire muni d'une graduation micrométrique.

I.1.3.3 Diamètre des Microémulsions

La mesure de la taille des Microémulsions a été effectuée par diffraction laser (Zetasizer® 3000, Malvern Instrument, Royaume Uni). 50 µl du mélange sont dispersés sous agitation magnétique (50 rpm/min) dans 50 ml d'eau purifiée contenu dans un bécher. La transparence qui succède spontanément et brutalement à l'aspect laiteux de l'émulsion et la taille des gouttelettes évaluées par le Zetasizer® 3000 ont servi de critères pour identifier les microémulsions. En vue d'étudier l'impact de la masse du mitotane sur le diamètre des microémulsions, des masses croissantes de mitotane ont été utilisées pour la formulation des microémulsions. Une observation en microscopie électronique des microparticules a été également réalisée.

I.1.4. Cinétique de libération in « vitro »

Les cinétiques de libération doivent théoriquement être réalisées dans des conditions proches des conditions « sink ». La concentration maximale de mitotane pouvant être libérée dans le milieu devrait être inférieure d'au moins 10 fois la concentration de saturation afin que le gradient de concentration puisse être supposé infini (Gibaud et al., 2004). Le mitotane a une solubilité de 36 mg/L dans un tampon phosphate à 2% d'albumine (BSA) et la limite de sensibilité de la méthode de dosage par chromatographie nous a permis d'utiliser les concentrations de l'ordre de 32 mg/L, proches des conditions « sink ».

Les nanoparticules, microparticules et microémulsions sont mises en suspension séparément dans des boudins de dialyse contenant 20 ml d'eau distillée. Les boudins de dialyse sont mis en légère rotation dans une phase liquide constituée de 100 ml de BSA 2% à 37°C. A différents temps (5 et 30 min, 1, 2, 4, 7, 9.5, 24h), 1ml de la solution de BSA est prélevé puis centrifugé à 7200 tours/min pendant 5 minutes (Centrifugeuse Denver Instrument). La concentration en mitotane du surnageant est mesurée par CLHP. Dans les mêmes conditions, sont réalisées parallèlement, les cinétiques de libération de la forme conventionnelle (Lysodren®) et de la poudre de mitotane dispersée dans du Capryol (Mitotane-Capryol).

I.1.5. Résultats et discussion

La sélection d'un système optimal pour la préparation des formulations auto-émulsionnantes requiert l'étude de la solubilité du mitotane dans les différents excipients.

Le tableau 7 (page 85) montre que le mitotane est très soluble dans le Capryol® 90, le Tween® 20 et le Cremophor® EL par rapport aux autres excipients. Par conséquent, cette huile (Capryol® 90) et les tensioactifs (Tween® 20 et le Cremophor® EL) ont été sélectionnés pour préparer des systèmes auto-microémulsionnants (SMEDDS). Malgré la forte solubilité du mitotane dans le Captex355®, les mélanges réalisés ne permettent pas la formation de systèmes autoémulsionnants mais génèrent des formulations troubles et opalescentes.

<i>Excipients</i>	<i>Concentration du mitotane en mg/ml</i>
Myvacet®	71 ± 16
Capryol®	282,97 ± 5
Ethyloléate®	114 ± 5
Miglyol®	232 ± 10
Huile de soja®	16 ± 10
Captex355®	345 ± 13
Tween 20®	389 ± 7
Tween 80®	226 ± 9
Crémophor EL®	409 ± 3
Albumine humaine (2%)	0,036 ± 0,010

Tableau 7 : Solubilité du mitotane dans différents véhicules

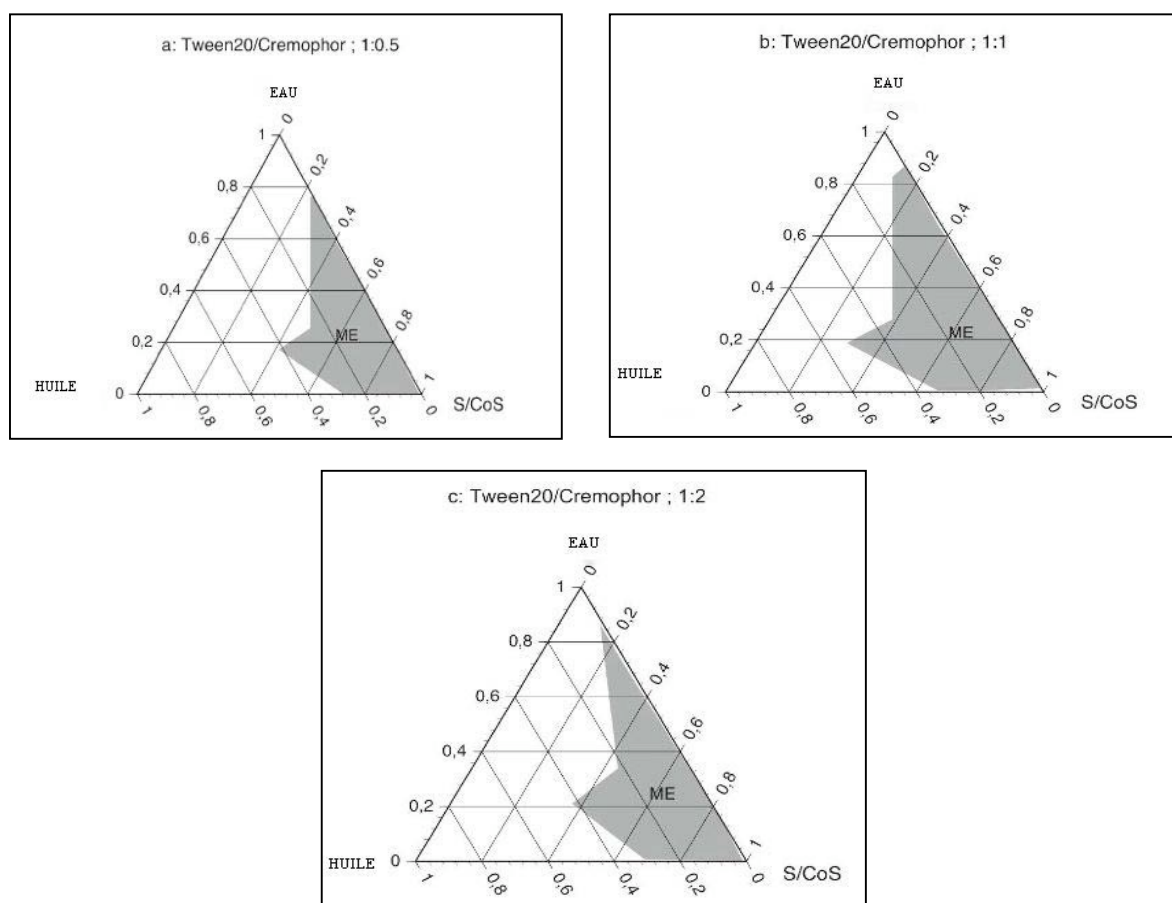


Figure 45 : Diagrammes pseudoternaires montrant les zones de formation des microémulsions de mitotane

La détermination de la zone de microémulsion huile dans eau (ME H/E) est réalisée à l'aide d'un diagramme de phases pseudoternaires. La zone de microémulsion est identifiée grâce au caractère isotrope et limpide du mélange huile/tensioactifs/eau. La figure 45 montre les diagrammes pseudoternaires où les trois composants du système autoémulsionnants sont représentés en présence du principe actif à taux fixe (6,25%). Ce diagramme permet d'identifier graphiquement les mélanges optimaux conduisant à la formation de microémulsions. Comme nous le constatons, la plus grande zone de microémulsions est obtenue lorsque le rapport surfactant/cosurfactant c'est à dire (Tween[®] 20/Crémophor[®] EL) est égal à 1. Au fur et à mesure que ce rapport augmente, il y a une diminution de la zone de formation des microémulsions, se traduisant par l'apparition d'émulsions grossières. La formation de microémulsions est caractérisée par la limpidité qui succède spontanément et brutalement à l'aspect laiteux du mélange. Les émulsions grossières (EG) sont thermodynamiquement instables et caractérisées par un aspect laiteux.

Nous avons sélectionné dans la zone de microémulsions, une formulation aisée à réaliser constituée de part égale de véhicules c'est à dire 33% de Capryol[®], 33% de Tween[®] 20 et 33% de Crémophor[®] EL.

L'évaluation de la distribution de la taille des gouttelettes par diffraction laser de cette formulation, montre que les globules lipidiques ont une taille inférieure à 50 nm, caractéristique des microémulsions.

On constate également que lorsque la quantité de mitotane incorporée atteint 20%, il y a une augmentation rapide de la taille des microémulsions formées (Figure 46).

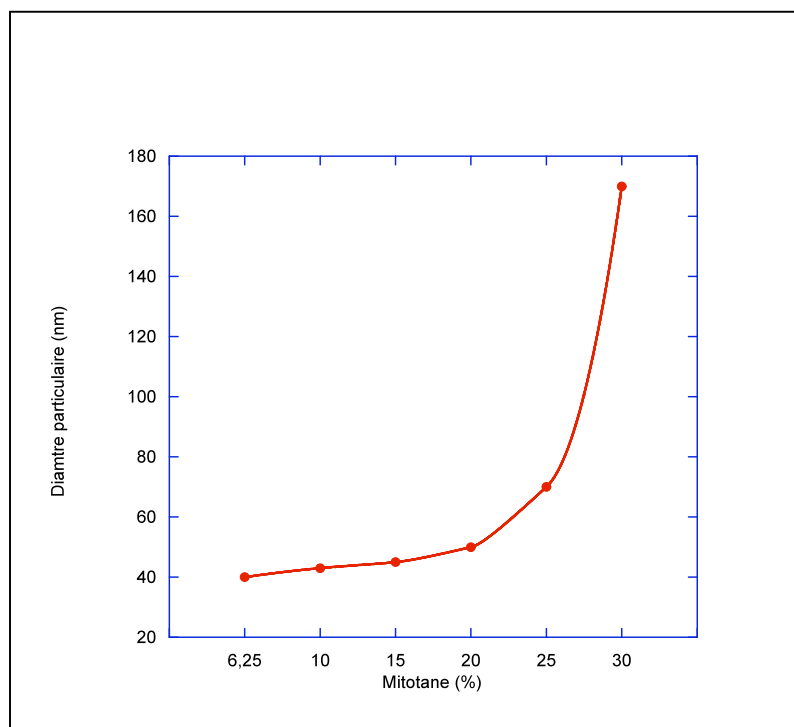


Figure 46 : Evolution du diamètre moyen des microémulsions en fonction de la quantité de mitotane incorporée

Concernant les nanocapsules, les taux d'encapsulation du mitotane sont en moyenne de 77%. Les tailles des nanocapsules PCL et PCL/RL de mitotane sont d'environ 300 nm. L'Eudragit® RL n'influence pas le diamètre des nanocapsules produites. Par contre, ce polymère impose son potentiel zêta positif lorsqu'il est ajouté à la PCL. En effet, les nanocapsules de PCL et PCL/RL ont respectivement un potentiel de -18,5 et +23,3 mV (Tableau 8).

Nanocapsules de mitotane (n=3)	PCL	PCL/RL
Taux d'encapsulation (%)	75 ± 4	80 ± 6
Diamètre en nm	300 ± 12	315 ± 7
Potentiel zêta en mV	-18,5 ± 0,7	+23,3 ± 0,5

Tableau 8 : Taux d'encapsulation, diamètre et potentiel zêta des nanocapsules de mitotane

Concernant les microparticules, le principal facteur que nous avons fait varier lors de leur fabrication est la quantité de mitotane (10, 20, 50, 100, 150, 250 mg) dissous dans la phase organique. Ces différentes formulations sont appelées respectivement MIT-10, MIT-20, MIT-50, MIT-100, MIT-150, MIT-250.

Le diamètre et le taux d'encapsulation augmentent en fonction de la quantité de mitotane ajoutée dans la phase organique (Tableau 9).

Microparticules de PCL	Diamètre (µm)	Taux encapsulé (%)	Qop (mg/mg de POL)	Q pol (mg/mg)
MIT-0	38	0	0	0
MIT-10	49	31	40	12
MIT-20	47	36	80	29
MIT-50	53	32	200	64
MIT-100	70	47	400	191
MIT-150	76	69	600	418
MIT-250	76	71	1000	711

Tableau 9 : Diamètre, taux d'encapsulation, Quantité de mitotane ajoutée au dichlorométhane par mg de polymère (Qop), Quantité de mitotane incorporée par mg de polymère (Qpol)

Le profil d'incorporation du mitotane décrit un phénomène triphasique : lors de la première phase a, la partie initiale de la courbe permet de mettre en évidence une répartition équilibrée du mitotane entre les phases aqueuse et organique. A l'issue de cette phase a, la partie aqueuse du mélange n'est pas saturée en mitotane car le mitotane se dissout très peu en phase aqueuse. Puis, la courbe suit dans une seconde phase la première bissectrice ($y=x$) qui traduit une saturation de la phase aqueuse par la molécule de mitotane à partir de 200 mg de mitotane par g de polymère. Lorsque le mitotane incorporée passe au delà de 1200 mg de mitotane par gramme ce polymère, une phase c traduit vraisemblablement la saturation de la phase organique avec précipitation du mitotane dans le mélange (Figure 47).

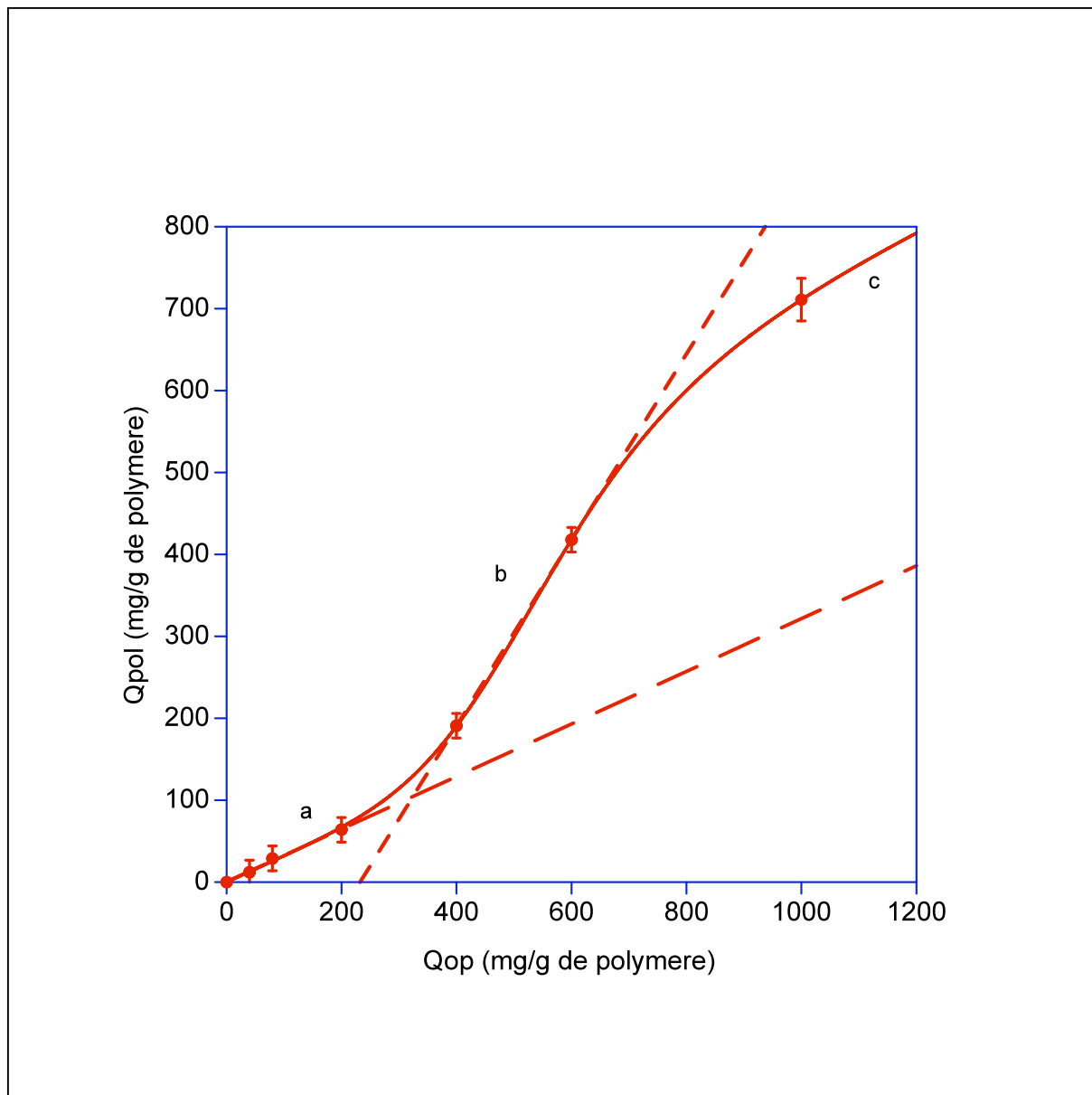
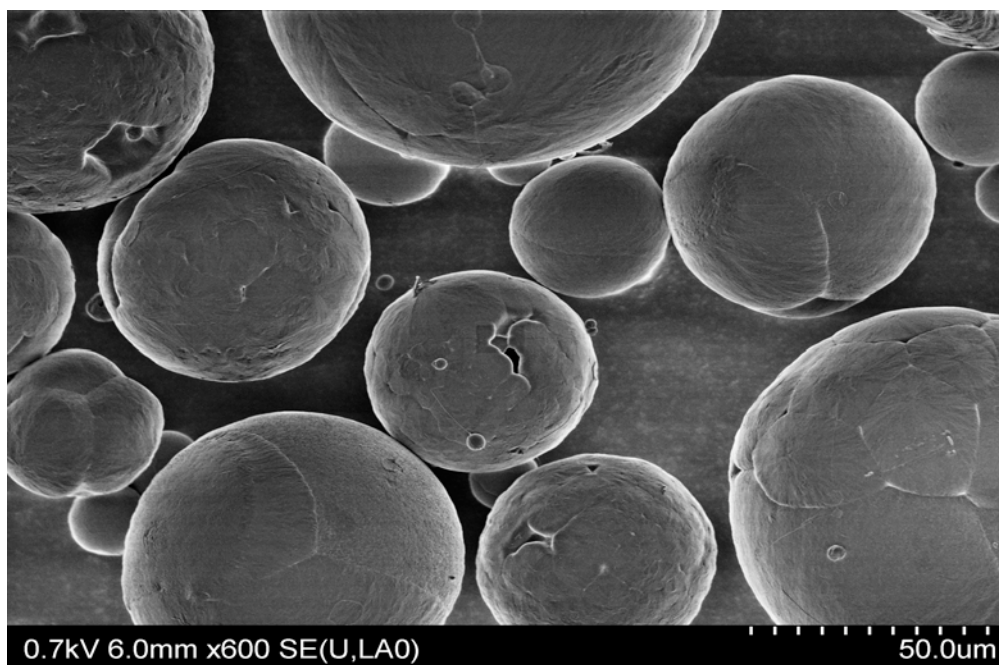


Figure 47 : Profil d'incorporation du mitotane dans les microparticules de PCL en fonction de la concentration du mitotane dans la phase organique. Q_{op} désignant la quantité de mitotane en mg ajoutée au dichlorométhane par mg de polymère. Q_{pol} désignant la quantité de mitotane en mg par g de polymère

La microscopie électronique sur les microparticules de mitotane montre que, quelle que soient les masses de mitotane utilisées, il y a formation de particules sphériques avec des contours lisses (figure 48).

A



B

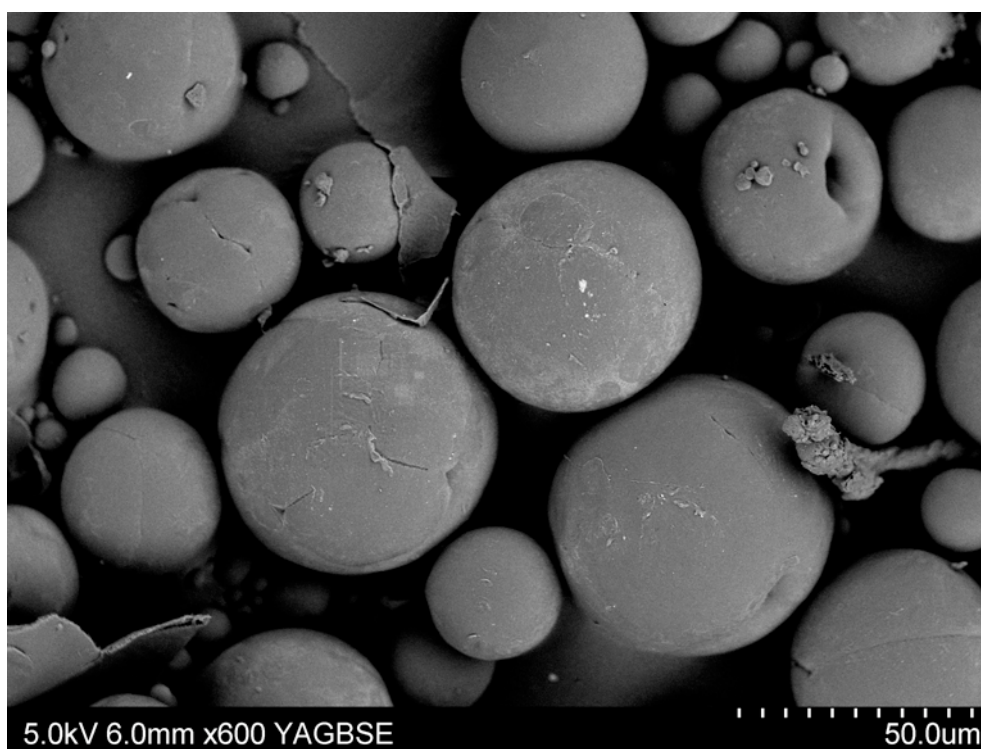


Figure 48 : Microscopie électronique montrant des microparticules lisses MIP 60 (A) et MIP 250 (B)

Les cinétiques de libération *in vitro* effectuées montrent que les microémulsions libèrent progressivement 40% de leur contenu en mitotane au bout de 50 h. Les nanocapsules de PCL/RL et PCL montrent un profil de dissolution aussi progressive avec des pourcentages respectifs de 30 et 18% de mitotane libéré. La forme conventionnelle (Lysodren®) ne libère que 8% de son contenu. Quant à la forme de mitotane dispersé dans le Capryol®, la quantité de mitotane libérée reste très faible de l'ordre de 3% au bout de 50h (Figure 49).

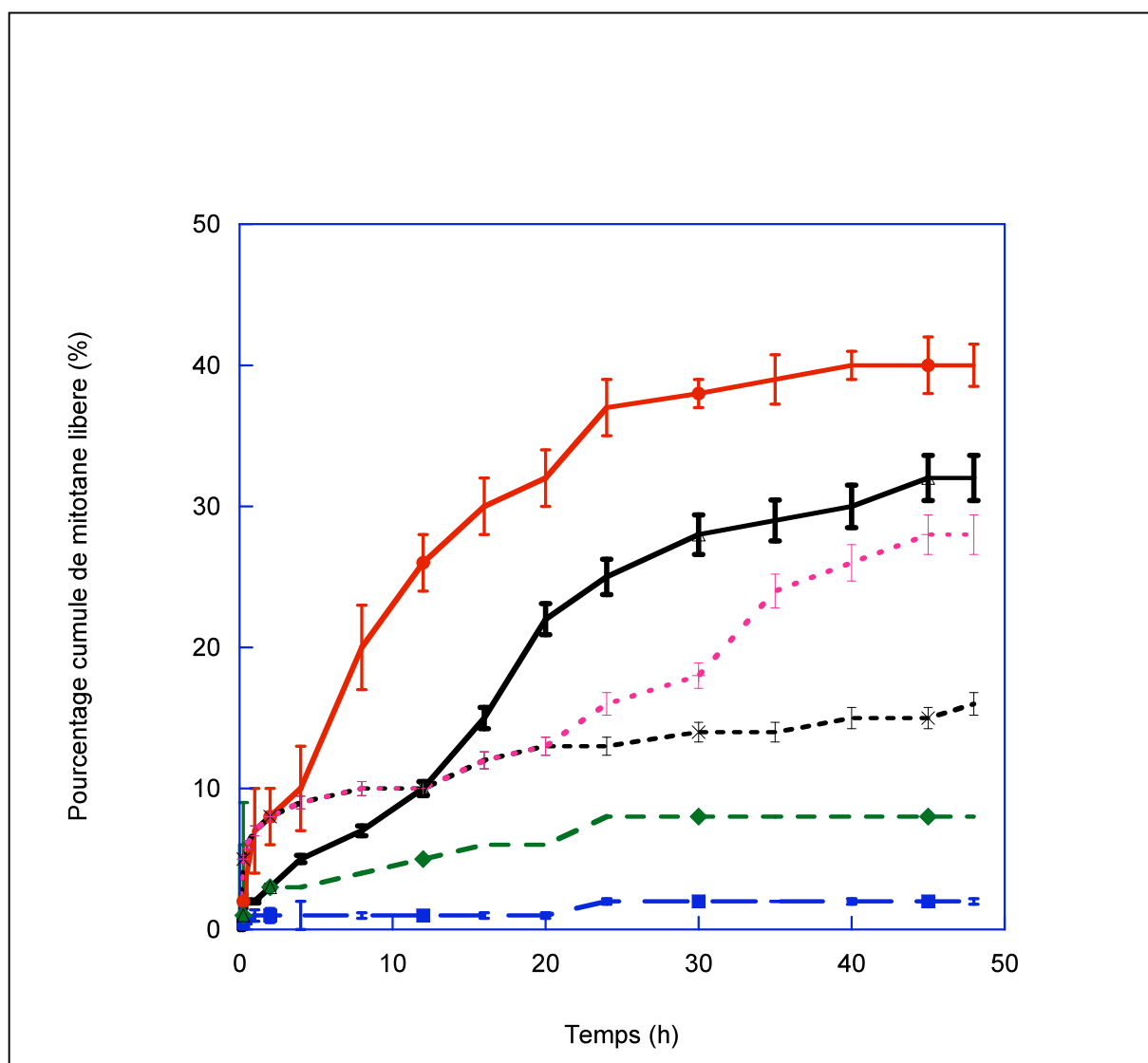


Figure 49 : Cinétique de libération *in vitro* des Microémulsions (—●—), du Mitotane-Capryol (—■—), du Lysodren® (—◆—), des Microparticules MIT250 de PCL (—x—) et des Nanocapsules PCL (—x—) et PCL/RL (—●—)

Les cinétiques de libération réalisées sur les microparticules de PCL MIT 250 montrent une libération progressive du mitotane. Les pourcentages de mitotane libéré atteignent les 30% de la quantité initiale encapsulée.

I.1.6. Bilan de la mise au point et de la caractérisation des différentes formulations de mitotane

Lors de cette étude, nous avons réussi à mettre au point différentes formes galéniques du mitotane. Dans le cas des nanocapsules et des microparticules, elles présentent de bons taux d'incorporation du mitotane (>70%) et une cinétique de libération permettant une évaluation sur des modèles cellulaires ou *in vitro*. Le choix judicieux des excipients pouvant solubiliser le mitotane, nous a permis de mettre au point des microémulsions de mitotane qui libèrent environ 40 % de mitotane incorporé. Ces premiers éléments montrent des avantages galéniques par rapport à la forme conventionnelle (Lysodren®) qui ne libère que 8% du mitotane. Nous avons réalisé sur des lapins, la pharmacocinétique de ces formulations de mitotane afin de déterminer la formulation qui présenterait la meilleure biodisponibilité *in vivo*. De même, nous avons réalisé une évaluation *in vitro*, sur des cellules Caco-2 et sur des fragments de jéjunum en vue de quantifier le taux d'absorption intestinale du mitotane.

II. Pharmacocinétique des Microémulsions, des Nanocapsules et des Microparticules de mitotane chez des lapins

Comme nous l'avons décrit dans la partie bibliographique, le but de notre travail est de choisir la formulation pouvant nous permettre d'améliorer la biodisponibilité du mitotane. Très peu de travaux en ce sens ont été réalisés sur le mitotane. L'impact de l'alimentation sur la biodisponibilité du mitotane a fait l'objet de quelques publications mais la conception d'une forme galénique prenant en compte les propriétés physico-chimiques du mitotane et donnant satisfaction en clinique reste un enjeu important. Dans cette partie, nous décrirons les études de pharmacocinétique que nous avons réalisées et détaillerons les résultats obtenus après administration de dose unique journalière chez des lapins.

II.1. Matériel et Méthodes

Pour ces études de dose unique, nous avons utilisé 18 lapins mâles, pesant entre 2,5 et 3 kg. Afin d'éviter l'influence de l'alimentation sur l'évaluation, ces lapins ont été privés d'alimentation 12 heures avant l'administration orale des formes galéniques de mitotane. Les lapins ont été répartis par randomisation en 6 groupes de 3.

1. Le premier groupe de lapins reçoit du mitotane dispersé dans du Capryol® (100 mg/kg, dose unique orale).
2. Le second groupe de lapins reçoit des microémulsions (33% Capryol® ; 33%Tween ® 20 ; 33% Crémophor EL) de mitotane (100 mg/kg, dose unique orale).
3. Le troisième groupe de lapins reçoit du Lysodren ® (100 mg/kg, dose unique orale).
4. Le quatrième groupe de lapins reçoit des Nanocapsules PCL de mitotane (100 mg/kg, dose unique orale)
5. Le cinquième groupe de lapins reçoit des Nanocapsules PCL/RL de mitotane (100 mg/kg, dose unique orale)
6. Le sixième groupe de lapins reçoit des Microparticules PCL de mitotane (100 mg/kg, dose unique orale)

A différents temps (0; 0,5; 1; 2; 4; 6; 8; 10; 12; 14; 16; 18; 20 and 24h.), des échantillons de sang ont été collectés dans la veine marginale de l'oreille des lapins et mis dans des tubes héparinés. Pour la séparation du plasma, une centrifugation est effectuée

pendant 10 min à 3000 rpm. Le plasma obtenu est congelé à -18°C jusqu'à dosage du mitotane par CLHP. Pour le dosage du mitotane, les plasmas sont décongelés à température ambiante, 200µl d'échantillons de plasma sont précipités par 560 µl de méthanol. Le précipité obtenu est vortexé puis centrifugé pendant 10 min à 3000 rpm. Le surnageant méthanolique est alors analysé par CLHP comme précédemment décrit. En vue de quantifier le mitotane plasmatique, une courbe de calibration réalisée dans les mêmes conditions de traitement de l'échantillon plasmatique est tracée à des concentrations de 1, 2,5, 5, 10, 20 mg/l.

Le coefficient de corrélation obtenue est de $r=0,998$.

La surface sous la courbe ($SSC_{0-\infty}$) est estimée avec le logiciel Kaleidagraph 4.0. (Synergy Software) et les biodisponibilités relatives (F) du mitotane dans les formes évaluées par rapport au Lysodren® est calculée par la formule :

$$F = \frac{AUC_{test}}{AUC_{référence}} \times 100 \quad (Equation \quad 1)$$

II.2. Résultats et discussion

Les différentes formulations de mitotane ont été évaluées à la même dose unique et par voie orale sur des lapins. Le profil pharmacocinétique montre un Tmax proche de 4h pour toutes les formulations sauf dans les cas des nanocapsules de PCL/RL et du mitotane-Capryol® où ce temps avoisine respectivement 8,5 et 5h.

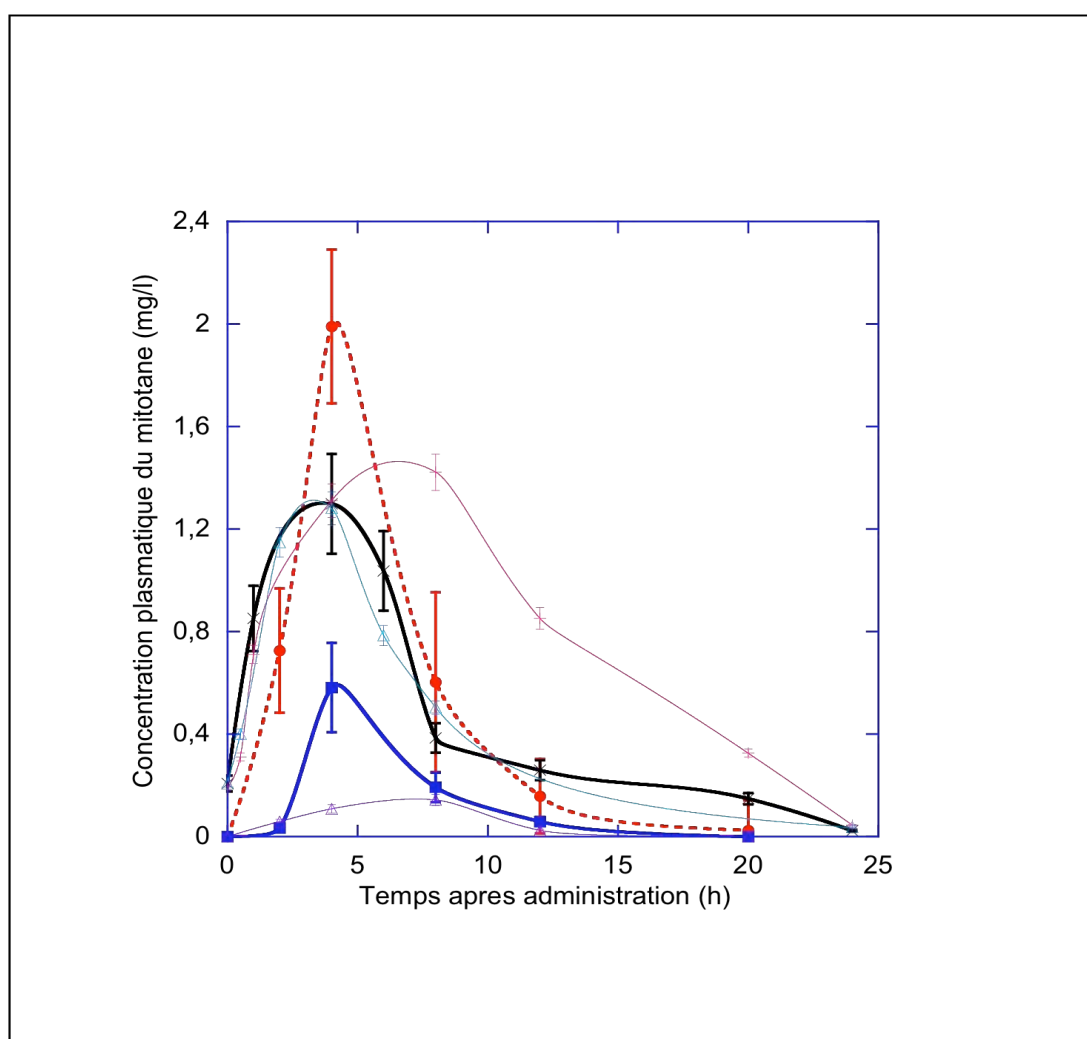


Figure 50 : Profil plasmatique obtenu avec les différentes formes galéniques de mitotane. Microémulsions (---●---), Mitotane-Capryol (—△—), Lysodren® (—■—), Microparticules MIT250 de PCL (—△—) Nanocapsules PCL (—) et PCL/RL (—)

Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau suivant :

	PCL Nanocapsules	PCL/RLNanocapsules	PCL Microparticules	Microémulsions	Capryol Mitotane	Lysodren®
AUC _{0-∞} (mg.h/l)	6 ± 0,9	6 ± 0,3	5,8 ± 0,03	10,5 ± 0,3	1,36 ± 0,02	3,1 ± 0,3
C _{max} (mg/l)	0,58 ± 0,02	0,6 ± 0,09	0,58 ± 0,03	2,2 ± 0,4	0,13 ± 0,06	0,63 ± 0,19
T _{max} (h)	3,8 ± 0,02	8,6 ± 0,02	3,8 ± 0,05	3,2 ± 0,03	5,1 ± 0,14	3,31 ± 0,14
Biodisponibilité relative (%)	194	197	187	339	44	100

Tableau 9 : Paramètres pharmacocinétiques des différentes formes de mitotane

Les aires sous la courbe obtenues avec les nanocapsules et les microparticules ont été quasiment doublées par rapport à celle obtenue avec la forme conventionnelle (Lysodren®). Cela a permis pour ces formes polymériques de mitotane d'obtenir des biodisponibilités comprises entre 187 et 197%. Avec les microémulsions, la biodisponibilité relative est multipliée par 3 par rapport à la forme conventionnelle. Ces premiers résultats montrent que les microémulsions permettent d'obtenir la meilleure biodisponibilité pour le mitotane.

II.3. Bilan de l'étude pharmacocinétique

L'ensemble de l'étude pharmacocinétique que nous avons réalisé nous a permis d'évaluer les biodisponibilités relatives des formulations de mitotane. Les formes polymériques nanocapsulaires et microparticulaires et les microémulsions ont permis d'améliorer la biodisponibilité du mitotane chez le lapin. Ces résultats nous font espérer une forme galénique pouvant améliorer la biodisponibilité du mitotane chez l'homme.

III. Evaluation des Microémulsions, des Nanocapsules et des Microparticules de mitotane dans le modèle cellulaire Caco-2 et chambres de Ussing

Nous ne disposons pas actuellement d'études ayant évalué les modalités d'absorption du mitotane au niveau des cellules intestinales. Nous savons, selon les données publiées, que le mitotane administré par voie orale présente une faible biodisponibilité de l'ordre de 40% (Moy, 1961). Dans cette partie de notre travail, nous tenterons d'évaluer le pourcentage d'absorption intestinale du mitotane en fonction des différentes formes galéniques en utilisant des cellules épithéliales intestinales humaines de type Caco-2. Nous porterons une attention particulière sur la viabilité cellulaire afin de prévoir la toxicité aigue des composants utilisés. En fonction des résultats obtenus, nous essaierons de déterminer, le coefficient de transport intestinal, dans un modèle utilisant l'intestin de rat isolé dans une chambre de Ussing.

III.1. Etude de la perméabilité cellulaire dans le modèle Caco-2

III.1.1 Matériel et Méthodes

III.1.1.1 Matériel

Les cellules Caco-2 sont fournies gracieusement par le laboratoire d'Ingénierie de la Vectorisation Particulaire (Angers, France). Le milieu DMEM (Dubelco Modified Eagle's Medium), le serum de veau foetal, le bleu de Trypan, le tampon phosphate DPBS, l'EDTA-trypsine, l'antibiotique (streptomycine, pénicilline, amphotéricine B) et les acides aminés non essentiels sont obtenus auprès de la société Gibco, Invitrogen, USA. Les flasques de culture (75 et 25 cm²), les inserts et leur support sont obtenus auprès de la société Becton Dickinson, USA.

III.1.1.2 Culture cellulaire Caco-2

Les cellules intestinales de type Caco-2 sont décongelées et cultivées dans des flasques de 75 cm² à une densité de 10⁶ cellules par flasque. Le milieu de culture utilisé est un mélange de DMEM + L-glutamine + pyruvate + 4,5 g/L de D-glucose supplémenté par 15% de sérum de veau fœtal décomplémenté, et de 1% d'antibiotiques, 1% d'acides aminés non essentiels. L'incubation est réalisée à 37° C dans une atmosphère constituée de 95% air - 5% oxygène. Le milieu de culture est remplacé toutes les 48 h. A confluence, les cellules (passage 47) sont lavées trois fois avec une solution tampon exempte de calcium et de magnésium avant de subir une trypsination. Elles sont ensuiteensemencées sur des inserts en polycarbonate de type Transwell® (1µm ; 0,31 cm²) à une densité de 2. 10⁵ cellules par insert.

Les faces apicale et basale des inserts sont remplies respectivement avec 2 et 3 ml de milieu de culture. Ces milieux sont remplacés tous les 48 heures jusqu'à obtention de la monocouche cellulaire à J21. La résistance transmembranaire (TEER), exprimée en $\Omega \cdot \text{cm}^2$ est mesurée quotidiennement avec un ohmmètre pour vérifier l'intégrité et la cohésion du tapis cellulaire. La valeur retenue est celle obtenue après soustraction de la résistance due aux filtres des inserts.

III.1.1.3 Evaluation de la toxicité cellulaire des formes galéniques de mitotane

Afin d'évaluer la toxicité des formes galéniques du mitotane sur les cellules Caco-2, nous avons effectué le test de cytotoxicité par MTT (Méthylthiazoltétrazolium). L'anneau de tétrazolium de ce réactif est réduit par la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes actives en formazan. La couleur du milieu passe alors du jaune au bleu violacé. L'intensité de cette coloration est proportionnelle au nombre de cellules vivantes présentes lors du test mais aussi à leur activité métabolique. Les cellules Caco-2 étant des cellules adhérentes, nous avons utilisé la méthode de Carmichael (Carmichael et al., 1987; Park et al., 1987) adaptée à ces types de cellules. Brièvement, après dépôt des cellules dans des microplaques de 96 puits à une densité de 10^5 cellules par ml et incubation durant 24 h à 37°C, 200 μl des différentes formes de mitotane (Nanocapsules de PCL, Nanocapsules de PCL/RL, Microparticules de PCL, Microémulsions, Capryol®-Mitotane, Mitotane poudre) sont déposées dans les 96 puits. Chaque formulation est évaluée en 3 concentrations différentes de mitotane (19, 38, 76 mg/l). Les plaques sont mises en incubation pendant 72 h à 37°C, ensuite une solution de MTT est ajoutée et laisser à incubation. Quatre heures plus tard, tout le milieu est éliminé et l'on ajoute 100 μl d'huile de paraffine dans chaque puits. Les plaques sont laissées à incubation à 40°C. 12 h plus tard elles sont lues au spectrophotomètre à 565 nm.

III.1.1.4 Etude de la perméabilité cellulaire du mitotane

Les études de perméabilité (dans le sens apical vers basolatéral) ont été réalisées à J22 de la culture cellulaire dans des inserts 6 puits. Le milieu de transport utilisé pour la réalisation des tests de perméabilité est le DMEM. Six formes de mitotane (Nanocapsules PCL et PCL/RL, Microparticules PCL, Microémulsions, Mitotane-Capryol®, Mitotane poudre) sont diluées dans le DMEM afin d'obtenir une concentration finale en mitotane dans le milieu de transport égal à 38 mg/l. 2 ml des solutions ou suspensions ainsi constituées sont

ajoutées dans le compartiment apical de la monocouche cellulaire Caco-2 et 3 ml de DMEM sont ajoutés dans le compartiment basolatéral des inserts. Des échantillons de 100 µl sont prélevés et aussitôt remplacés par un volume équivalent de DMEM dans la chambre basolatérale à différents temps (0, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 240, 300, 360 min). Ces échantillons sont dilués au tiers dans du méthanol et dosés par CLHP.

III.1.2 Résultats et discussion

Le suivi de la résistance cellulaire montre une augmentation progressive avec une valeur maximale de $326 \Omega \cdot \text{cm}^2$ obtenue à J22.

Les tests de cytotoxicité réalisés aux 3 concentrations montrent un effet toxique assez important lorsque la concentration de mitotane dans les formulations est de 76 mg/l. Comme on peut le constater sur la figure 51, à 19 mg/l de mitotane, les taux de viabilité sont élevés mais cette concentration ne permet pas de faire des dosages par CLHP.

A l'inverse à 76 mg/l, le mitotane poudre présente une faible viabilité, ce qui ne nous permet pas de réaliser des études de passage au travers des cellules Caco-2. La concentration de 38 mg/l offre des pourcentages de viabilités acceptables. En effet, à cette concentration, les cellules Caco-2, après une exposition de 72 h, ont quelle que soit la formulation des pourcentages de viabilité supérieure à 50% sauf dans les cas de la poudre de mitotane et du mitotane Capryol. De plus, cette concentration peut être dosée CLHP.

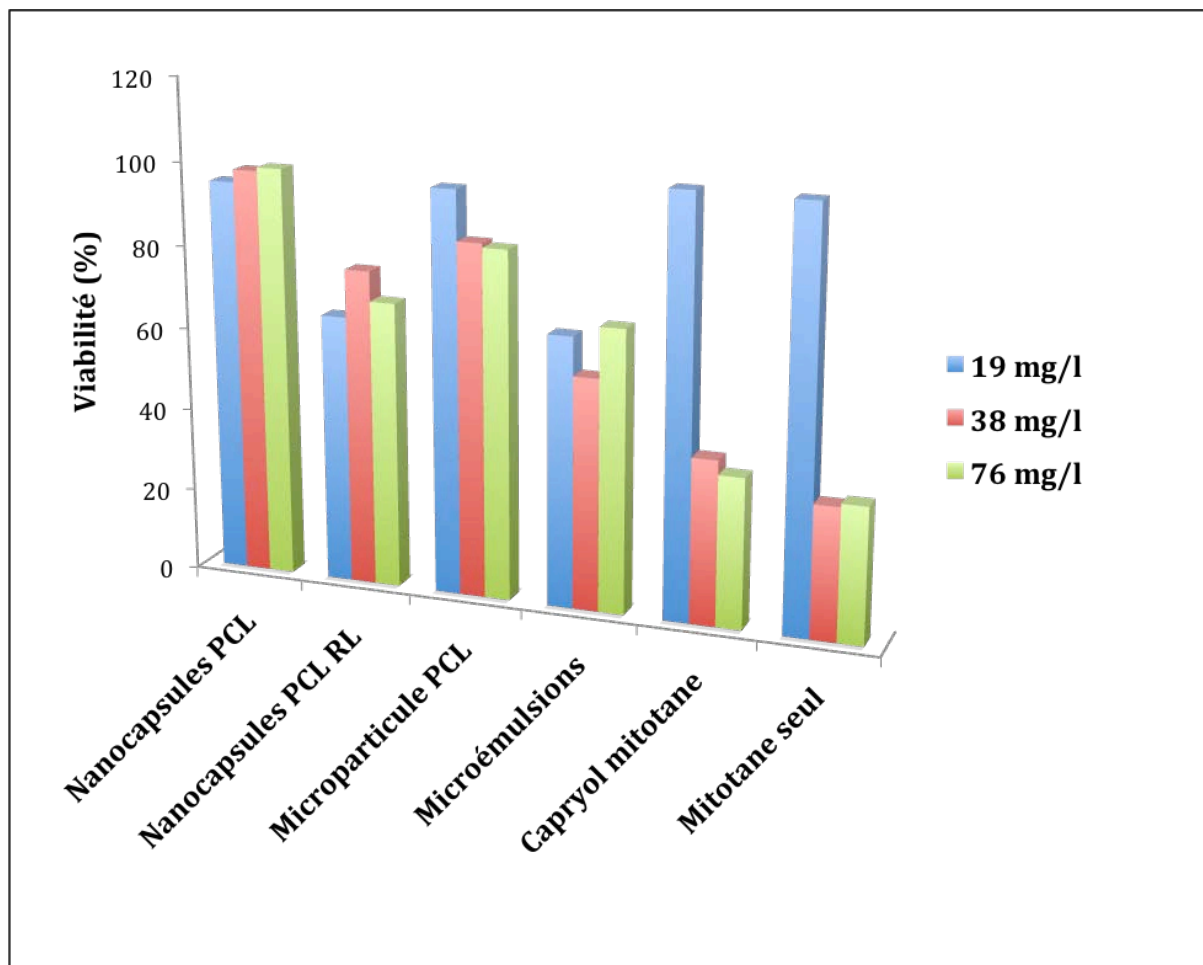


Figure 51 : Viabilité cellulaire en fonction des formulations de mitotane

En ce qui concerne le pourcentage d'absorption intestinale, les résultats illustrés par la figure 52, montrent que l'absorption est totale avec les microémulsions au bout de 4 heures et qu'elle se réalise de façon linéaire. Les microparticules de PCL permettent une absorption de l'ordre de 50% de la dose mise dans le compartiment apical. Les nanocapsules présentent des résultats assez proches de l'ordre de 42 à 45%. Nous remarquons qu'entre 2 et 4 heures, le taux de mitotane accédant au compartiment basolatéral augmente brutalement avec les nanocapsules. Ce phénomène peut être lié soit à une libération brutale du mitotane par éclatement des capsules suivi d'un passage membranaire des globules lipidiques contenant le mitotane ou soit lié à un passage direct des nanocapsules à travers les cellules Caco-2.

La formulation mitotane capryol permet d'atteindre 30% de la dose initiale alors qu'avec la poudre de mitotane, le taux d'absorption par les cellules Caco-2, ne dépasse pas les 10% de la dose initiale.

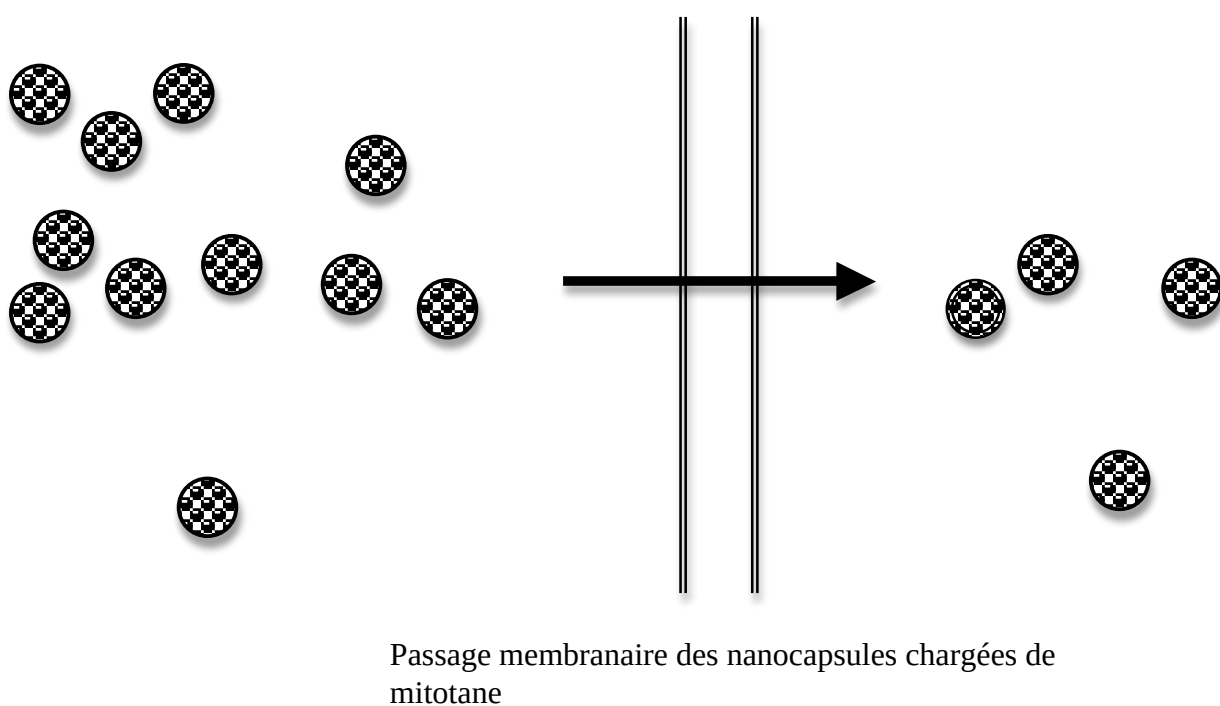
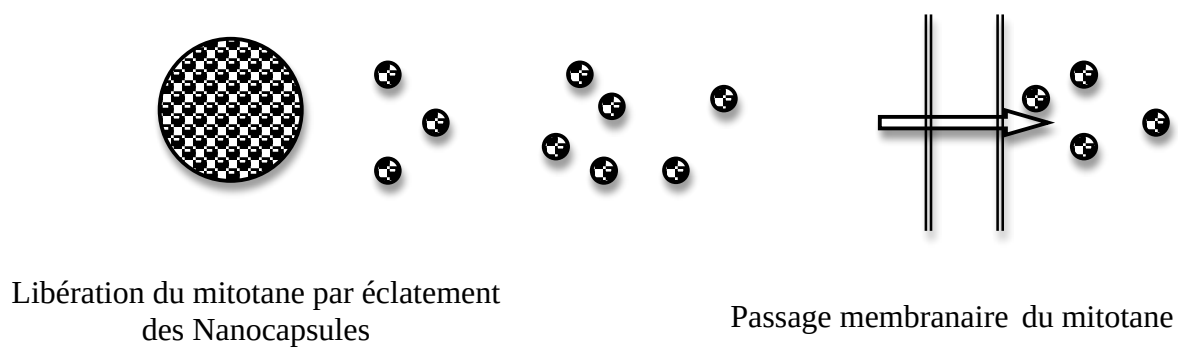


Figure 52 : modalités de passage des nanocapsules de mitotane au travers des membranes des cellules Caco-2. Eclatement ou passage direct des nanocapsules de mitotane

III.1.3 Conclusion

Les taux d'absorption évalués avec les cellules Caco-2 nous confirment que les différentes formes utilisées améliorent l'absorption du mitotane. Par rapport à la forme poudre, les taux d'absorption sont 5 et 6 fois plus importants lorsqu'on utilise respectivement les formes particulières et les microémulsions.

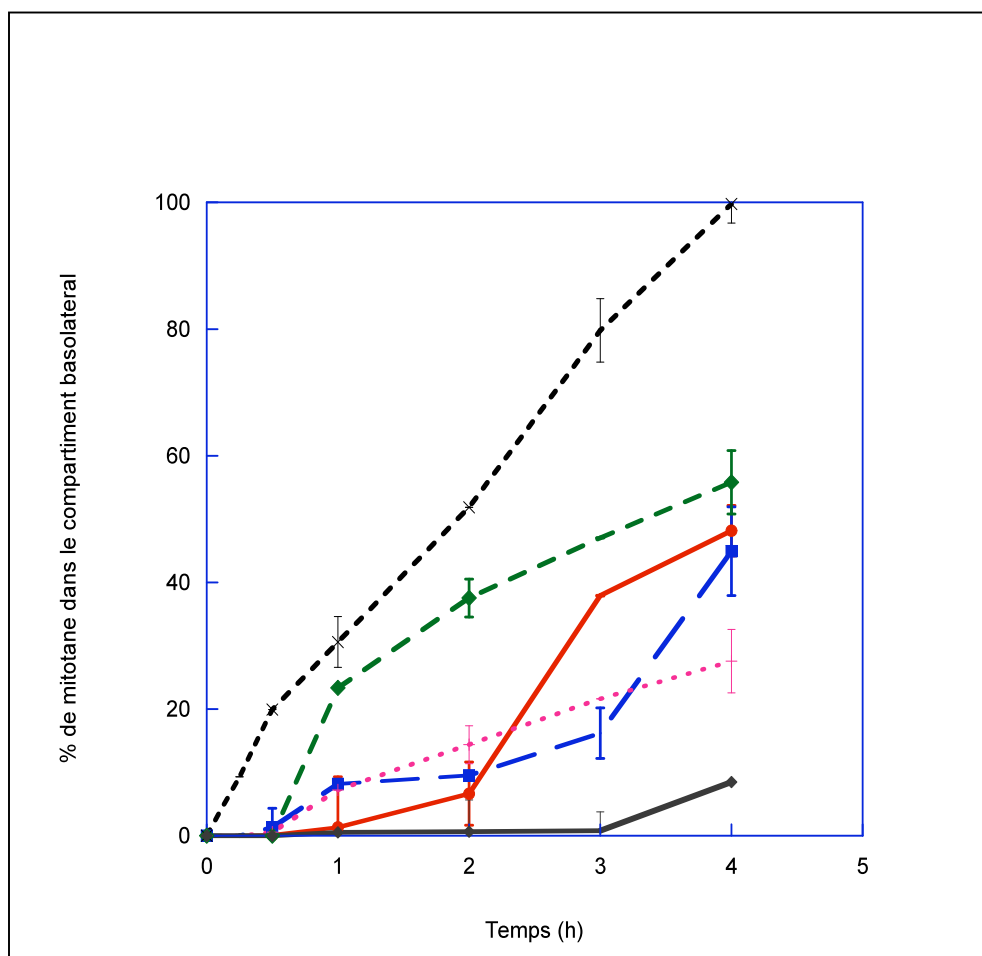


Figure 53 : Passage du mitotane au travers des cellules Caco-2 en fonction du temps. Microémulsions (—x—), Mitotane-Capryol (—·—), Mitotane poudre (—◆—), Microparticules MIT250 de PCL (—◆—) Nanocapsules PCL (—) et PCL/RL (—■—)

III.2. Etude de la perméabilité intestinale dans le modèle de la Chambre de Ussing

Compte tenu des précédents résultats obtenus sur les modèles cellulaires Caco-2, nous avons réalisé une étude de perméabilité dans le modèle de la chambre de Ussing en utilisant les microémulsions qui présentent le plus fort taux d'absorption parmi toutes les formes galéniques étudiées.

III.2.1 Matériel et Méthodes

III.2.1.1. Matériel

Cette technique est réalisée avec un morceau d'intestin de rat Wistar mâle. La solution de Krebs bicarbonate Ringer est composée de : 137 mM NaCl ; 4,7 mM KCl ; 1,2 mM KH_2PO_4 ; 25 mM NaHCO_3 ; 1,2 mM MgSO_4 ; 2,5 mM CaCl_2 ; 10 mM Mannitol et 10 mM glucose, pH 7,4. Le mélange de gaz O_2 et CO_2 (95 % et 5 %) est obtenu auprès d'Air Médical France. La chambre de Ussing est obtenue auprès de la société WPI, Royaume Uni.

III.2.1.2 Etude de la perméabilité du jéjunum de rat

L'étude utilise un morceau d'intestin de rat. Le jéjunum est strippé et placé entre deux compartiments. La surface d'échange du tissu est de $0,125 \text{ cm}^2$. Le compartiment muqueux (lumen) et le compartiment séreux (basolatéral) baignent en permanence dans une solution de Krebs bicarbonate Ringer et oxygénée par un mélange de gaz O_2 et CO_2 (95 % et 5 %). A l'aide de deux électrodes, la chambre est reliée à un appareil qui permet l'enregistrement de la résistance transmembranaire. La résistance renseigne sur l'intégrité du tissu intestinal.

Le jéjunum prélevé précédemment est strippé, c'est-à-dire, sa couche musculaire a été enlevée à l'aide d'une pince. Le jéjunum est placé dans la chambre d'Ussing et baignant dans une solution de Krebs bicarbonate Ringer à pH 7,4 et oxygénée par un mélange de gaz d' O_2 et de CO_2 (95 % et 5 %), maintenu sous une température de 37°C par le bain-marie thermostat.

Dans le test de passage du mitotane, une quantité de mitotane est dissoute dans une solution de KBR à 2 % d'albumine pendant 2h30. Un certain volume de la solution à 3 mM de mitotane est placé dans le compartiment muqueux de la chambre. On fait des prélèvements d'échantillons du compartiment séreux à l'instant T_0 et ensuite à un intervalle de temps

régulier de 5 min et ce pendant 120 min. Le volume d'échantillon prélevé est immédiatement remplacé avec du KBR à 2 % d'albumine.

Pour le test de passage des microémulsions chargées en mitotane, la formulation lipidique (33% Capryol[®] 90, 33% Tween[®] 20, 33% Cremophor[®] EL) a été sélectionnée pour évaluer le passage de mitotane. Ce mélange lipidique est rajouté sur la solution de KBR à 2 % d'albumine, placé sous agitation magnétique à 25 °C pendant 5 à 10 minutes. Un certain volume du mélange est placé dans le compartiment muqueux. Les échantillons sont prélevés du compartiment séreux à l'instant T_0 et ensuite après chaque 5 min pendant 120 min. Chaque fois, le volume prélevé est remplacé par du KBR à 2 % d'albumine. La concentration du mitotane dans les échantillons est déterminée par CLHP.

III.2.2 Résultats

La perméabilité intestinale est mesurée en présence de 3 mM de mitotane poudre ou incorporés dans des microémulsions ou SMEDDS. On remarque que la diffusion du mitotane sous forme de microémulsions H/E est plus rapide que celle de mitotane en solution (Figure 53). Nous avons trouvé que la quantité de mitotane en microémulsions ayant diffusé est de $1,88 \pm 0,15 \mu\text{mol}$ soit $14,85 \pm 0,8 \mu\text{mol.cm}^{-2}$, alors que seulement $0,36 \pm 0,03 \mu\text{mol}$ soit $3,03 \pm 0,2 \mu\text{mol.cm}^{-2}$ de mitotane en solution a diffusée à travers l'épithélium intestinal. La comparaison de ces deux résultats révèle que la diffusion de mitotane sous forme de ME est approximativement 5 fois plus élevée que celle du mitotane en solution

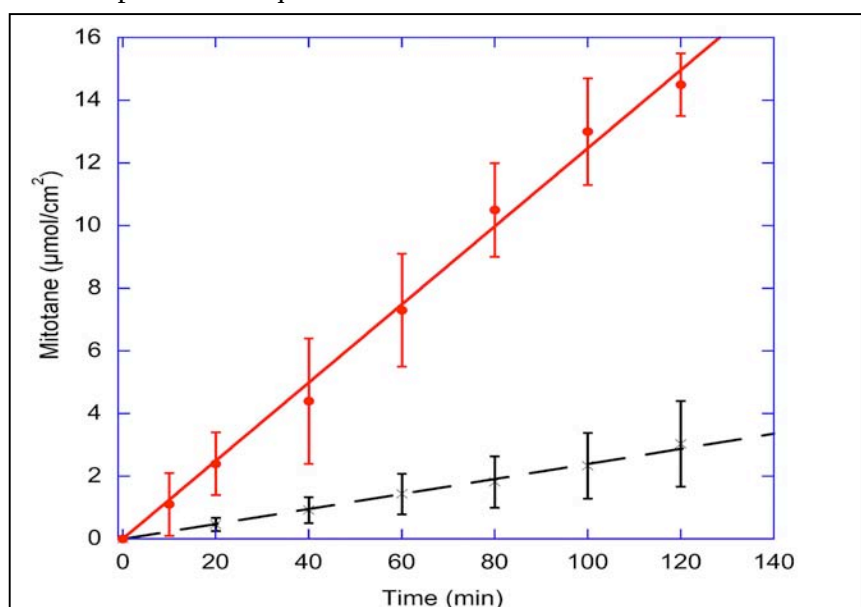


Figure 54 : Flux transépithélial du mitotane au travers du jéjunum de rat. Le mitotane 3mM est ajouté (---) sous forme de poudre ou de microémulsions (—●—)

III.2.3 Conclusion

Les études de passage réalisées en chambre de Ussing nous montrent que le taux de mitotane ayant diffusé au travers de la membrane jéjunale est 5 à 6 fois plus important dans le cas des microémulsions par rapport à la poudre de mitotane. Ces résultats renforcent les données obtenues avec les cellules Caco-2 qui montrent également que les meilleurs taux d'absorption sont obtenus avec les microémulsions. Grâce à ces différentes évaluations, nous disposons d'informations nous indiquant que les microémulsions permettraient d'obtenir une biodisponibilité pouvant améliorer l'utilisation du mitotane en clinique.

Discussion générale

Le mitotane, médicament utilisé dans le carcinome corticosurrénalien, est une molécule très lipophile. Cette propriété physico-chimique favorise la distribution de ce principe actif dans les tissus riches en lipides. Dès sa première utilisation chez les patients atteints de la maladie de Cushing en 1961 (Wallace et al., 1961), des effets indésirables doses dépendantes de type gastro-intestinaux et neuromusculaires ont été rapportés. Les doses maximales journalières de 125 mg/kg diminuaient de façon significative le taux de cortisol circulant mais ne permettaient pas aux patients de poursuivre le traitement. La première étude pharmacocinétique (Moy, 1961) rapportait une faible biodisponibilité de 40%, ce qui mettait en évidence une faible absorption intestinale. Il apparaît dès lors, qu'une amélioration de l'absorption intestinale pouvait optimiser le traitement et diminuer les effets toxiques gastroduodénaux. L'administration concomitante du mitotane avec des alimentations enrichies en huiles ou produits laitiers a été étudiée comme stratégie pour améliorer son absorption. L'association au lait, chocolat, aliments gras est évaluée (Moolenaar et al., 1981) et montra qu'effectivement des produits riches en lipides pouvaient augmenter la concentration plasmatique du mitotane. Malgré ses résultats encourageants, le mitotane a été formulé sous des formes galéniques n'intégrant pas de véhicules lipidiques. Il s'agit du mitotane® AP-HP, contenant principalement de l'acétylphtalate de cellulose, qui a été retiré du marché car nécessitant de fortes doses pour atteindre la mitotanémie efficace et de l'actuel Lysodren® contenant du polyéthylène glycol et ayant reçu une AMM européenne. Bien que les doses moyennes nécessaires pour atteindre la mitotanémie efficace soit plus faible avec le Lysodren® (Terzolo et al., 2000), les effets indésirables gastroduodénaux et neuromusculaires persistent après généralement 3 mois de traitement et sont fortement corrélés avec des doses journalières de 3 g.

Le carcinome corticosurrénalien est une pathologie orpheline et le mitotane reste la molécule de choix pour la prise en charge de cette pathologie. Assez tôt, Il a été observé que les patients compliants sont ceux qui présentent peu d'effets indésirables et que c'est également chez eux que sont observés les meilleurs taux d'efficacité. Il apparaît alors indispensable de rendre les patients compliants en vue d'espérer des taux d'efficacité plus intéressants. La stratégie qui se dégage est de diminuer les effets indésirables par réduction des doses journalières tout en permettant d'atteindre assez rapidement la mitotanémie efficace. Le mitotane étant très lipophile, une augmentation de sa solubilité dans le liquide

gastro-intestinale peut *a priori* augmenter son absorption intestinale. Dans cette optique, nous avons opté pour l'utilisation des techniques galéniques afin d'optimiser l'absorption et par conséquent la biodisponibilité du mitotane. L'objectif dans le cadre de ce travail est de concevoir la forme galénique qui permettra l'utilisation de faibles doses journalières tout en augmentant l'absorption intestinale du mitotane. Dans cet objectif, nous avons formulé :

1. des formes polymériques nanocapsulaires et microparticulaires
2. des formes autoémulsionnantes ou microémulsions

La mise au point et l'évaluation de ces différentes formulations constituent l'objectif de cette thèse. Nous présentons d'abord les formulations galéniques qui ont été mises au point : les nanocapsules et microparticules polymériques et les microémulsions. Ensuite, nous discuterons les études pharmacocinétiques chez les lapins et les études de passage *in vitro* (Caco-2 et chambres de Ussing) que nous avons réalisées ainsi que les innovations cliniques qui pourraient être réalisées à la suite de ce travail.

1. Mise au point des nanocapsules de mitotane

Nous avons fabriqué des nanocapsules de mitotane par la technique de nanopréciipitation de Fessi en utilisant des polymères de poly-epsilon-caprolactone (PCL) et une association de PCL et Eudragit® RL. L'objectif de ce travail est de concevoir des formes nanocapsulaires pouvant incorporer le mitotane lipophile dans un cœur huileux entouré par une membrane polymérique de surface hydrophile. Ainsi, le mitotane intégré dans un véhicule qui pourra se solubiliser dans le liquide digestif, facilitera son absorption intestinale. A la suite de ce travail, nous avons obtenu de bons taux d'encapsulation supérieure à 70%. Ce taux d'encapsulation montre l'affinité du mitotane pour les polymères utilisés. Le mitotane s'incorpore bien dans le cœur lipidique des nanocapsules et évite la diffusion vers la phase aqueuse externe. Comme nous l'avons remarqué, l'association des polymères de PCL et Eudragit® RL ne modifie pas le taux d'encapsulation. Les diamètres des nanocapsules (300 nm) ne sont pas influencés par cette association. Par contre, le potentiel de surface qui est négatif (-18 mV) pour le polymère de PCL devient positif (+23 mV) lorsqu'il est associé à l'Eudragit® RL. Nous avons déjà observé ce phénomène lors de l'encapsulation de l'insuline (Attivi et al., 2005). Le potentiel *zêta* traduit du point de vue ionique, l'interface entre les nanocapsules et le milieu liquide environnant. L'ionisation des groupements carboxyliques

terminaux de la PCL explique la charge négative observée. Par contre, la charge positive observée par l'ionisation des groupements ammonium quaternaires des molécules d'Eudragit® RL confère sa valeur positive même en présence des molécules de PCL. Ainsi nous espérons par la mise au point de nanocapsules à potentiel ζ positif, faciliter l'interaction avec les protéines de surface négatives dans le but d'augmenter les taux d'absorption du mitotane.

Le mécanisme de libération, le coefficient de diffusion d'une molécule à l'intérieur des polymères et la vitesse de biodégradation du polymère sont les principaux facteurs gouvernant la cinétique de libération du principe actif incorporé dans les nanocapsules et les microparticules. La vitesse de libération du principe actif est aussi influencée par l'environnement biologique.

Lorsque nous observons le profil de libération du mitotane de ces nanocapsules de polymères, nous remarquons un profil de libération atteignant 30% du mitotane encapsulé dans le cas de l'association PCL/RL et de 18% dans le cas de la PCL seule. Dans tous les cas, la libération est plus importante et plus rapide par rapport au Lysodren® qui ne libère que 8% du mitotane et qui est sous forme comprimé donc nécessitant une phase de délitement préalable. La phase initiale de libération rapide des nanocapsules pourrait s'expliquer par un effet « burst » correspondant à la fraction de mitotane adsorbée à la surface des nanocapsules. La deuxième phase de libération plus ralentie correspondrait à la diffusion progressive hors des nanocapsules vers le milieu extérieur puis à travers la membrane de dialyse. La technique de l'ultrafiltration nous a fourni des résultats peu reproductibles. Comme les formes étudiées sont destinées à l'administration orale, nous avons utilisé des milieux de libération reproduisant les conditions physiologiques du tractus digestif intestinal à 37°C. Nous remarquons une libération plus importante du mitotane dans le cas de l'association PCL/RL au bout de 24h qui peut s'expliquer par une meilleure diffusion de la molécule dans le cas de l'association des 2 polymères. Dans les deux cas, les nanocapsules présentent une meilleure cinétique de libération que la forme mitotane-Capryol qui ne libère que 3% de son contenu. Cela peut s'expliquer par le défaut de solubilisation du mitotane à l'intérieur du boudin de dialyse et par conséquent de l'impossibilité du mitotane de diffuser à travers la membrane de dialyse.

2. Mise au point des microparticules de PCL

Des microparticules de PCL ont été développées par la technique de la simple émulsion suivie d'une évaporation de solvant (O'Donnell and McGinity, 1997). L'objectif ici, est d'étudier, l'incorporation du mitotane dans les microparticules et la modulation de sa cinétique de libération. Ces deux éléments pourraient améliorer le profil plasmatique du mitotane.

Dans le cadre de notre travail, nous avons déterminé quelle était la concentration optimale de mitotane à dissoudre dans la phase organique. L'encapsulation reste très faible (figure 47, page 89) pour des quantités de mitotane $Q_{op} < 200$ mg/mg de polymère (MIT 50). Ensuite, les taux d'encapsulation s'accroissent rapidement jusqu'aux environs de $Q_{op} = 1000$ mg/mg de polymère (MIT 200). A ces concentrations, le mitotane reste parfaitement soluble dans la phase huileuse et aucun cristal n'a été observé. C'est donc cette formulation que nous avons choisie pour la suite des travaux.

Les études de libération du mitotane du MIT-250, montrent que seulement 30% du mitotane encapsulé sont libérés des particules de façon progressive. Dans les mêmes conditions, le Lysodren[®] ne libère que 8% du mitotane et de façon plus lente, ce qui semble logique puisque cette forme conventionnelle est constituée de polyéthylène glycol et nécessite une phase préalable de délitement.

3. Mise au point des microémulsions de mitotane

La mise au point de microémulsions chargées en mitotane a été réalisée dans le but d'améliorer son absorption intestinale et d'augmenter sa biodisponibilité lors de son administration par voie orale.

La solubilité du mitotane dans les différents excipients a été déterminée. Le choix des excipients (huile/tensioactifs) utilisés dans la formation des systèmes auto-microémulsionnants est un facteur important, car il va conditionner les propriétés du système comme la rapidité de l'auto-émulsification en présence de la phase aqueuse, la stabilité des microémulsions formées et leurs tailles.

La réalisation des diagrammes de phases pseudoternaires (à base d'huile, de tensioactifs et l'eau) nous a permis de délimiter une zone de microémulsions H/E (Huile dans

eau) relativement large, lorsque le rapport Tween[®] 20/Cremophor[®] EL est égale à 1. Cette zone représente les formulations optimales conduisant à la formation de Microémulsions H/E. Nous avons constaté que les formulations lipidiques à base de Capryol[®] 90 (huile) et de Tween[®] 20/Cremophor[®] EL, utilisées pour préparer des microémulsions H/E chargées en mitotane présentent certains avantages :

- 1- L'auto-émulsification à température ambiante et sous agitation douce en présence de la phase aqueuse.
- 2- La formation de microémulsions chargées en mitotane qui sont des dispersions H/E, thermodynamiquement stables, isotropiques et limpides.
- 3- Les ME sont stabilisées par des tensioactifs non-ioniques qui se placent à l'interface entre les phases aqueuse et huileuse et qui sont *a priori* les moins toxiques.
- 4- La dissolution du mitotane dans la phase huileuse du mélange lipidique et augmentation de sa solubilité dans la phase aqueuse.

La caractérisation du système auto-microémulsionnant est réalisée en tenant compte de la rapidité de l'auto-émulsification en phase aqueuse et de la taille des particules obtenues. Les mesures de la taille des microgouttelettes H/E par diffraction laser montrent qu'elles ont une taille inférieure à 50 nm, caractéristique des microémulsions. La zone de l'auto-émulsification se réduit lorsque le ratio Tween[®] 20/Cremophor[®] EL dépasse 1. L'existence d'un excès de co-surfactant peut déstabiliser le film interfacial, augmentant la pénétration d'eau dans la phase huileuse et réduisant ainsi la zone de stabilité des microémulsions (Pouton, 1997). Pour cela, nous avons sélectionné le rapport Tween[®]20/Cremophor[®]EL=1 pour la formulation qui répondrait à nos attentes. La formulation constituée de Capryol[®], Tween[®] 20, Crémophor[®] EL (33, 33, 33 %) a été choisie car elle permet la formation de microémulsions chargées en mitotane (6,25%) limpides et offrant une stabilité de plus de 3 jours. Nous constatons également que la proportion de mitotane influence la stabilité de l'ensemble du système. Ainsi, au delà de 25% de mitotane incorporé, il y a une augmentation exponentielle de la taille des microémulsions. Ce phénomène peut s'expliquer par la précipitation de mitotane non solubilisé qui affecte le diamètre apparent des émulsions.

Le profil de libération montre un phénomène rapide et libérant jusqu'à 62% du mitotane incorporé. C'est le plus fort taux de toutes les formulations évaluées, traduisant une meilleure solubilisation du mitotane en milieu aqueux. Par rapport à la forme

conventionnelle Lysodren[®], le mitotane libéré est 6 fois plus important. Cette performance est liée à la formation des microémulsions en présence d'un excès d'eau. Ces microémulsions véhiculent le mitotane en milieu aqueux et facilitant la diffusion de la molécule à travers la membrane de dialyse.

4. Pharmacocinétique des formulations de mitotane

Après administration orale, un principe actif se distribue dans l'organisme en fonction de ses caractéristiques physico-chimiques (log P, pKa, masse moléculaire). Les médicaments hydrosolubles séjournent préférentiellement en phase aqueuse alors que les médicaments liposolubles peuvent diffuser plus facilement d'un compartiment à l'autre et être stockés de manière prolongée dans des secteurs constituant un compartiment profond tel que la masse adipeuse. D'autres facteurs, comme la fixation aux protéines plasmatiques, peuvent également influencer significativement la distribution des principes actifs. Le devenir d'un principe actif après administration orale dépend aussi des différents excipients de la formulation. Plusieurs travaux ont montré que certaines formulations galéniques peuvent modifier les conditions d'absorption d'une molécule et influencer fortement sa biodisponibilité. Nous avons fait référence au cas du Néoral[®] qui a permis de multiplier par 2 la biodisponibilité de la ciclosporine (Mueller et al., 1994). Nous avons réalisé la pharmacocinétique des différentes formulations de mitotane afin de déterminer celles pouvant nous permettre de répondre à l'objectif principal de ce travail.

Les biodisponibilités relatives du mitotane formulé en nanocapsules et microparticules sont respectivement de 195 et 187% chez les lapins par rapport à la forme Lysodren[®]. Pour les microémulsions, la biodisponibilité relative est encore plus forte, de l'ordre de 339%. La poudre de mitotane formulée avec du Capryol[®] voit sa biodisponibilité relative diminuée à 44% par rapport au Lysodren[®]. L'amélioration de la biodisponibilité apportée par les microémulsions et les particules polymériques est importante. Ces résultats rejoignent ceux décrivant les nanocapsules comme formes galéniques modifiant la biodisponibilité de molécules d'intérêts thérapeutiques (Hubert et al., 1991; Peltier et al., 2006; Sonaje et al., 2009). Pour les microémulsions de mitotane, cette forte biodisponibilité relative vient conforter celles décrites avec les microémulsions de ciclosporine, de la simvastatine, du coenzyme Q... (Tableau 5, page 65).

Du point de vue cinétique, le pic de concentration obtenu (T_{max}) avec les nanocapsules de mitotane en PCL reste identique à celui de la forme conventionnelle Lysodren[®] ($T_{max} \approx 4h$). Dans le cas des nanocapsules de PCL/RL où le délai est plus long ($T_{max} \approx 8,5h$). Pour les microémulsions, le T_{max} reste proche de celui des nanocapsules ($T_{max} \approx 4h$).

Plusieurs hypothèses peuvent être prises en compte pour expliquer l'augmentation importante de la biodisponibilité du mitotane incorporée dans les particules polymériques et les microémulsions après une administration orale.

Les interactions des particules polymériques avec les surfaces cellulaires sont le plus souvent de nature non covalente et s'établissent entre les groupements fonctionnels de la surface des cellules et la couche ionique superficielle des particules. Ces interactions qui peuvent aussi être électrostatiques pourraient concerner les nanocapsules d'Eudragit[®] et s'exercer entre les charges négatives des acides sialiques des glycoprotéines du mucus gastro-intestinal et les charges positives caractérisant la surface des particules polymériques. Un contact étroit et renforcé entre les nanoparticules et la muqueuse digestive pourrait permettre une absorption prolongée du mitotane le long du tractus digestif. La charge superficielle des nanocapsules et des microparticules de PCL est incompatible avec les groupements ionisés négatifs du mucus intestinal. Ainsi, d'autres mécanismes peuvent aussi conduire à la rétention des particules chargées négativement. La rétention pourrait résulter de la pénétration des chaînes de polymères à l'intérieur du réseau des glycoprotéines constituant le mucus, en particulier lorsque des chaînes de polymères sont très flexibles (Peppas and Buri, 1985). La nature caoutchouteuse et amorphe de la PCL à température ambiante et sa flexibilité peuvent permettre la rétention des polymères au niveau de la muqueuse intestinale. D'autres part, les chaînes d'oxyde d'éthylène du Pluronic[®] F68 utilisé pour la stabilisation de la suspension de nanocapsules de PCL pourraient aussi faciliter la pénétration des nanocapsules dans le réseau du mucus. A la suite de ces interactions, il est vraisemblable que les nanocapsules libèrent leur contenu en mitotane ou traversent la muqueuse intestinale.

La petite taille des nanocapsules et des microparticules permet d'envisager l'hypothèse d'un franchissement de la barrière digestive par capture via les plaques de Peyer. Comme nous l'avons décrit dans la partie bibliographique, il est possible d'envisager que les particules polymériques ont quitté les plaques de Peyer pour gagner la circulation lymphatique, via le canal mésentérique avant de retourner dans le sang.

Concernant les microémulsions, la multiplication de la biodisponibilité par un facteur 3 par rapport au Lysodren[®] rend vraisemblable la formation de fines dispersions de mitotane. Ce phénomène a certainement favorisé la solubilisation du mitotane dans le liquide intestinal, ce qui a facilité son absorption intestinale chez le lapin. Plusieurs mécanismes d'absorption peuvent expliquer cette forte biodisponibilité. Comme nous l'avons décrit le transport du mitotane par les voies transcellulaire et paracellulaire peuvent expliquer les résultats obtenus. De même, il peut y avoir aussi une implication de l'absorption par voie lymphatique. Cette voie peut contribuer à l'absorption des composés très lipophiles, c'est-à-dire avec un Log de P supérieur à 5 et ayant une grande solubilité dans les triglycérides. L'effet du véhicule peut avoir un important impact sur le transport de la molécule lipophile comme il a été observé pour l'halofantrine. En effet pour cette molécule, un ordre de croissance Micelles > Emulsions > Solution lipidique a été observé (Porter et al., 1996). Nous avons essayé de quantifier le taux d'absorption par les modèles Caco-2 et chambre de Ussing en vue de déterminer quelle formulation nous permettra d'augmenter l'absorption intestinale du mitotane.

5. Etude de l'absorption intestinale du mitotane dans les modèles cellulaires Caco-2 et fragments jéjunaux de rats

Nous avons étudié les pourcentages de mitotane absorbé suivant les différentes formulations que nous avons mises au point. Le but est de quantifier le transport intestinal du mitotane afin d'optimiser le choix de la forme galénique. Lorsque le mitotane est formulé sous forme de microémulsions, le pourcentage transporté du compartiment apical vers le compartiment basolatéral atteint 100% au bout de 4h. Le transport du mitotane est rapide et se déroule de façon quasi-linéaire. Ce pourcentage est de l'ordre de 50% lorsque les microparticules sont utilisées et de 42 à 45% avec les formulations nanocapsulaires polymériques. Ce fort pourcentage obtenu avec les microémulsions peut s'expliquer par la capacité qu'ont ces formulations de solubiliser le mitotane et aussi par l'action des tensioactifs sur les jonctions serrées cellulaires Caco-2. L'interaction entre les protéines constitutives des jonctions serrées et les tensioactifs permettraient le passage des molécules peu absorbées. Cette observation a été suggérée par plusieurs auteurs (Gershanik et al., 1998; Sha et al., 2005a).

En ce qui concerne, les nanocapsules et les microparticules, un mécanisme de type transcellulaire via une interaction avec les cellules Caco-2 peut expliquer le fort pourcentage

de passage observé par rapport à la poudre de mitotane seul. Le passage paracellulaire nous semble peu plausible, car il est largement admis que la voie paracellulaire n'est accessible que pour les molécules dont la taille n'excède 11,5 Å (Norris et al., 1998).

Nous avons constaté en utilisant la chambre de Ussing que le résultat du passage de mitotane sous forme de microémulsions H/E est intéressant car la quantité de mitotane qui a diffusé est 5 fois supérieure à la quantité du mitotane en solution. On peut supposer que la dissolution du mitotane dans la solution lipidique (huile/tensioactifs) engendre l'augmentation de sa solubilité dans le liquide physiologique et l'amélioration de son absorption par l'épithélium intestinal. Par ailleurs, les tensioactifs à HLB élevé jouent également un rôle important dans l'absorption du mitotane par la membrane cellulaire des entérocytes. Certains auteurs ont indiqué que ces tensioactifs sont capables d'augmenter la fluidité membranaire en créant des désordres dans la région hydrophobe de la membrane (Kajii et al., 1988). L'équipe d'Araya 2006, avait suggéré que le mécanisme de passage de principe actif incorporé dans les microémulsions H/E à travers l'épithélium intestinal est semblable à celui des micelles d'acides biliaires contenant les lipides. Ces micelles facilitent l'absorption des lipides en maintenant ceux-ci sous forme hydrosolubles et en surmontant la résistance de la couche aqueuse. Elles se décomposent dans la couche muqueuse et les monoglycérides et les acides gras diffusent à travers les cellules épithéliales intestinales (Araya et al., 2006). Cette même équipe avait supposé que les microémulsions chargées en principe actif sont transportées par un mécanisme n'impliquant pas des interactions avec la couche muqueuse. Ces SMEDDS qui se comportent comme des gouttelettes huileuses pénètrent dans la muqueuse et au contact de la membrane cellulaire, le principe actif libéré de la microémulsion diffuse à travers la membrane cellulaire des entérocytes. Notre travail ouvre également le champ à la réalisation d'études complémentaires pour la compréhension du type de mécanisme de transport impliqué dans l'absorption du mitotane. L'utilisation d'inhibiteurs enzymatiques spécifiques peut permettre de savoir le type de mécanisme impliqué dans le passage du mitotane (transcellulaire, paracellulaire ou autres).

La problématique de délivrance de principes actifs lipophiles par voie orale trouve avec les systèmes auto-émulsionnants de type ME H/E (SMEDDS) une solution prometteuse. L'utilisation de ces systèmes n'est pas uniquement réservée à la voie orale, mais d'autres voies d'administration peuvent être envisageables (voie rectale, sous-cutanée, intraveineuse). Des études de cytotoxicité peuvent être réalisées *in vitro* dans le but de sélectionner les formulations de SMEDDS les moins toxiques. De même, des études concernant les

interactions membrane - tensioactif sont nécessaires, afin d'apprécier le rapport bénéfice risque relatif à leur emploi. Les SMEDDS incorporant le mitotane peuvent être testées *in vivo*, pour évaluer leur comportement avec l'appareil gastro-intestinal, ainsi que l'effet du flux de la sécrétion de la bile sur ces systèmes.

Conclusion

Les travaux présentés dans cette thèse, s'inscrivent dans le cadre des recherches menées sur l'optimisation galénique d'un anticancéreux, le mitotane, au sein du laboratoire de pharmacie clinique à la faculté de pharmacie de Nancy. L'objectif de ces travaux était de mettre au point une forme galénique optimale pour le traitement d'une pathologie rare, le carcinome corticosurrénalien. Le but recherché par la nouvelle formulation galénique est d'améliorer et de permettre la réduction des effets indésirables qui compliquent le suivi du traitement. En d'autres termes, il s'agit d'améliorer la qualité de vie des patients bénéficiant de ce traitement.

Originalité de notre démarche et apports essentiels :

Les perspectives de ce travail sont particulièrement intéressantes car nous avons pu effectuer une étude comparative sur les différentes formes galéniques d'une même molécule et l'optimisation galénique pourrait intéresser plusieurs domaines thérapeutiques. Concernant les nanocapsules et les microparticules, notre travail apporte un supplément d'informations quant à la possibilité d'utiliser ces formes galéniques pour l'amélioration de la biodisponibilité des molécules lipophiles. Le problème de ces formes galéniques reste leur production à grande échelle et le coût des investissements. En ce qui concerne, les microémulsions, la production peut se réaliser à moindre coût, dans des conditions techniquement moins compliquées, ce qui indique que cette forme galénique est une sérieuse alternative à la forme conventionnelle Lysodren® disponible sur le marché européen.

Annexes: Development of microemulsion of mitotane for improvement of oral bioavailability

Drug Dev Ind Pharm. 2009 Sep 24

ORIGINAL ARTICLE

Development of microemulsion of mitotane for improvement of oral bioavailability

David Attivi, Imane Ajana, Alain Astier, Béatrice Demoré and Stéphane Gibaud

Laboratoire de Pharmacie Clinique, Nancy Université, Nancy, France

Abstract

Background: Mitotane (*o,p'*-DDD) is considered to be the drug of choice in the treatment of nonresectable and metastasized adrenocortical carcinoma. However, mitotane has poor solubility in the gastrointestinal tract and very low bioavailability. Consequently, to achieve therapeutic plasma level, high cumulative doses (4–6 g/day) of mitotane were usually used during 3–5 months. To shorten this equilibration time and reduce gastrointestinal side effects, a self-microemulsifying drug delivery system (SMEDDS) of mitotane has been developed. **Method:** First time, the solubility of mitotane was determined in various oils and surfactants; then, the influence of oils, surfactants, and cosurfactants on the formation of SMEDDS was investigated by constructing ternary phase diagrams. SMEDDS was characterized by morphological observations and droplet size measurements. Intestinal drug permeation of SMEDDS of mitotane (3 mM) was assessed in an Ussing-type apparatus and the bioavailability was determined in a rabbit model. **Results:** The optimum formulation consisted of a mixture of Capryol[®], Tween[®], and Cremophor[®] EL (33:33:33). The formulation was found to pass through the intestinal barrier much faster than a solution of mitotane (14.85 ± 0.8 versus $3.03 \pm 0.2 \mu\text{mol}/\text{cm}^2$). Moreover, after oral administration in rabbits, the relative bioavailability was 3.4, compared with that of the conventional form (Lysodren[®]). **Conclusion:** This SMEDDS can now be considered as a very good candidate to optimize the administration of mitotane.

Key words: Bioavailability; microemulsion; mitotane; oral route; pharmacokinetics

Introduction

Mitotane (*o,p'*-DDD, Figure 1), an adrenolytic agent, is considered to be the drug of choice in the treatment of non-resectable and metastasized adrenocortical carcinoma¹. A 30% objective response rate has been observed in patients with adrenocortical carcinoma, but cure is rarely achieved and its impact on survival is questioned². This response rate could increase to 55–66% if plasma mitotane levels reach 14 mg/L^{3,4}. Additively, its use has been shown to be beneficial as an adjuvant treatment, after surgery⁵.

However, mitotane has poor solubility in the gastrointestinal tract. After administration of 10 g/day (capsules of mitotane), the bioavailability was assumed to be at most 40% (62–66.5% excreted unchanged in the feces)^{6,7}. Nevertheless, it has been demonstrated that this value depends greatly on the administered doses: 94.4% after a

single dose of 1 g and only 50% after daily doses of 8 g⁸. Then, to achieve therapeutic plasma level, high cumulative doses of mitotane were usually used during 3–5 months. With 1103 g (6–12 g/day; 119 ± 47 days) of micronized mitotane mixed with cellulose acetylphthalate³, 58% success rate in obtaining 14 mg/L was obtained, whereas 100% was reported with 363 g (1–3 g/day, 3–5 months) of pure mitotane⁴. Although the studies are not completely comparable, it seems that mitotane formulation could impact bioavailability. Moreover, the administration of mitotane in chocolate, emulsion, and milk leads to higher plasma levels than tablets⁹. Generally, for lipophilic drugs like mitotane, increasing the solubility in aqueous media allows improving bioavailability after oral administration. Various formulation strategies are reported in the literature, including the use of surfactants, cyclodextrins, nanoparticles, solid dispersions, lipids, and permeation enhancers¹⁰. Concerning

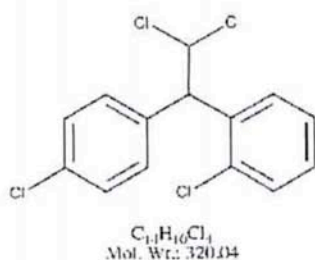
Address for correspondence: Dr. Stéphane Gibaud, Laboratoire de Pharmacie Clinique, EA 3452, Nancy Université, 5, rue Albert Lebrun, 54000 Nancy, France. Tel: +33 3 83 68 23 10, Fax: +33 3 83 68 23 07. E-mail: stephane.gibaud@pharma.uhp-nancy.fr

(Received 21 Feb 2009; accepted 31 Jul 2009)

ISSN 0363-9045 print/ISSN 1520-5762 online © Informa UK, Ltd.
DOI: 10.1080/03639040903225083

RIGHTS LINK

<http://www.informapharmascience.com/ddi>



1-chloro-2-[2,2-dichloro-1-(4-chlorophenyl)ethyl]benzene

INN: mitotane

Figure 1. Chemical structure of mitotane.

mitotane, emulsions¹¹ and nanosuspensions¹² have been prepared with no further evaluation.

In recent years, one of the most popular approaches is the incorporation of the lipophilic component into self-microemulsifying drug delivery system (SMEDDS). The small oil droplets provide a large interfacial area for pancreatic lipase to hydrolyze triglycerides and release the drug and/or allow the formation of mixed micelles bile salts/drug. These SMEDDS are defined as isotropic mixtures of lipid, surfactant, cosurfactant, and drug that rapidly form a microemulsion after mixing with water. The digestive motility of the stomach and the intestine provides the agitation necessary for self-emulsification¹³. Factors such as the ability to form small droplets of oil (<100 nm) and the solubility of the drug in the oils and surfactants are important to achieve suitable SMEDDS. Moreover, regarding surfactants, they are known to improve the intestinal absorption by various mechanisms such as improved drug dissolution¹⁴, increased intestinal epithelial permeability¹⁵, increased tight junction permeability¹⁶, and decreased/inhibited *p*-glycoprotein drug efflux¹⁷.

Coenzyme Q₁₀, an antioxidant¹⁸, has reported a two-fold increase in the bioavailability of this poorly soluble compound when formulated as self-emulsifying drug delivery system (SEDDS). For simvastatin, a cholesterol-lowering agent, the pharmacokinetics in beagle dogs showed a 1.5-fold increase in bioavailability when compared with the conventional tablets¹⁹. Finally, a commercially available SMEDDS preparation with cyclosporine A (Neoral®), an immunosuppressant, is known to improve bioavailability in humans²⁰.

Because of its high lipophilicity, mitotane is also a good candidate for the formulation of microemulsions. Hence, the objective of this study was to develop and characterize SMEDDS of mitotane and to assess its bioavailability compared with that of conventional tablets (Lysodren®).

Materials and methods

Materials

Mitotane (*o,p'*-DDD or 1,1-dichlorodiphenyldichloroethane, Mr: 320.05 g/mol), Cremophor® EL, Tween® 20, and Tween® 80 were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). Capryol® (propylene glycol monocaprylate) was a gift from Gattefossé (Gennevilliers, France). Myvacet® (acetylated monoglycerides) was purchased from Eastman (Kingsport, TN, USA), ethyloleate from Merck (Hohenbrunn, Germany), soya oil from Cooper (Melun, France), Miglyol® 812 (triglycerides of caprylic/capric acid) from Dynamit Nobel (Leverkusen, Germany), Captex® 355 (triglycerides of caprylic/capric acid) from Abitec Corporation (Janesville, WI, USA), and albumin was a gift from LFB (Courtaboeuf, France).

Solubility studies

The solubility of mitotane in oils and surfactants was determined as follows: 2 mL of each of these vehicles was added in screw-cap vials containing excesses of mitotane (i.e., 500 mg). After sealing, the mixture was heated in a shaking water bath (Mettmert, Schwabach, Deutschland; 30°C, 48 hours, 60 strokes/min) to improve the solubilization. After equilibrium was achieved, the mixture was centrifuged at 1400 × *g* for 5 minutes and unsolubilized mitotane was discarded. Concentrations were determined by high-performance liquid chromatography (HPLC).

SMEDDS formulations

A series of mixtures were prepared with various ratios of Capryol®, Tween® 20, and Cremophor® EL. In each formulation, the amount of mitotane was set at 125 in 2000 mg (i.e., 6.25%) of vehicle phase. The oily solutions were prepared by dissolving the amount of mitotane in Capryol®; subsequently, Tween® 20 and Cremophor® EL were added and all components were mixed under magnetic stirring (500 rpm) until a transparent solution was obtained.

Pseudoternary phase diagrams of oil, surfactant, cosurfactant, and water were developed using titration method in the presence of the mitotane (125 mg, 6.25%). Three phase behavior systems were studied at various ratios of surfactant/cosurfactant: 1:0.5, 1:1, and 1:2 (w/w). The oily phase was added to such mixtures in different amounts: 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, and 70% (w/w). Each mixture was then titrated by adding water up to clouding. Pseudoternary diagrams were constructed to identify the good self-emulsifying regions.

Emulsion droplet size analysis

The droplet size of the microemulsions was measured by photon correlation spectroscopy using a Zetasizer 3000[®] (Malvern Instruments, Orsay, France). Fifty microliters of the mixture was dispersed in 50 mL of purified water in a flask and gently mixed at 50 rpm. A mixture was defined to be SMEDDS if there is a formation of a crystal-clear microemulsion giving droplet sizes of less than 100 nm at ambient temperature when introduced to aqueous phase.

Release studies

The release of mitotane from SMEDDS was compared with that of the conventional formulation (Lysodren[®]) and a solution of mitotane in Capryol[®] (6.25%, w/w). A dialysis method was performed as follows: 62.5 mg of mitotane (SMEDDS of mitotane, Lysodren[®], or the Capryol[®] solution) was poured in 20 mL of water and then instilled into the dialysis bag (10 kDa). Each bag was placed into a bath of 3000 mL of phosphate buffer (0.1 M, pH 6.8). As albumin was shown to improve the solubility of mitotane, 2% of bovine serum albumin (BSA) was added into the external solution to approach sink conditions. These preparations were placed under magnetic stirring (100 rpm) and aliquots were withdrawn during the release period (48 hours) and before HPLC analysis.

HPLC assays

Determination of mitotane was carried out by HPLC. Twenty microliters of sample was injected onto a C18 column (Nucleosil[®], 5 µm, 0.46 mm, 25 cm; Macherey-Nagel, Eckbolsheim, France) using an autosampler (Spectra Physics AS1000). The mobile phase was a mixture of methanol and water (85:15, v/v) at a flow rate of 1.5 mL/min (Spectra Physics P1000XR; Thermo Electron S.A., Courtaboeuf, France). Detection was performed by UV spectrophotometry at 230 nm (Spectra Physics UV 1000), and peak surface was used for the quantification.

Studies of intestinal drug permeation

Jejunum from male Wistar (RjHan:WI, 400 g, 8–10 weeks old, Charles Rivers) was rapidly removed by surgery, washed with cold Krebs-Bicarbonate Ringer's (KBR) solution (114 mM NaCl, 25 mM NaHCO₃, 5 mM KCl, 1.1 mM MgCl₂, 1.25 mM CaCl₂, 1.65 mM Na₂HPO₄, 0.3 mM NaH₂PO₄, 25 mM NaHCO₃, 10 mM glucose, pH 7.4), and placed in a beaker aerated with a mixture of O₂/CO₂ (95:5). The jejunum was immediately stripped through the mucosal layer to remove the serosal and muscular layers under the dissection microscope. Mucosa was mounted between the two halves of an Ussing chamber (CHM8, 0.5 cm² WPI, Stevenage, UK).

The two compartments of the Ussing chamber were filled with cell culture Ringer and 2% of BSA at 37°C. Current electrodes (Electrode kit for Ussing chamber, WPI) were placed on each side: the transmucosal electrical resistance (TER) that reflects the integrity of the tissue was monitored during each experiment and tissue samples that showed TER < 30 Ω cm² were discarded²¹.

As tablets of Lysodren[®] could not be inserted in the small chamber, the microemulsion of mitotane (SMEDDS of mitotane, 3 mM) was compared with small amounts of pure powder (3 mM). The crystals spread homogeneously in the donor compartment (mucosal side). The receiver compartment (serosal side) was filled with 2 mL of fresh medium. This compartment (2 mL) was entirely withdrawn after 20 minutes for quantification. The process (filling/withdrawal) was repeated every 20 minutes. Results are presented as cumulative values (*n* = 3).

Bioavailability studies

For single administrations, nine male rabbits, weighing 2.5–3 kg, were used. They were starved for 12 hours prior to the oral administration. Animals were allocated to three groups at random. The first group received mitotane in Capryol[®] (100 mg/kg, single dose orally), the second, SMEDDS of mitotane (100 mg/kg, single dose orally, mean particle size: 40 nm), and the third, the conventional form (Lysodren[®]) at 100 mg/kg.

Blood samples (1 mL) were collected from the ear vein into heparinized tubes at 0, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, and 24 hours. Plasma samples were immediately separated from whole blood by centrifugation for 10 minutes at 1400 × *g* and stored at –18°C prior to analysis. Mitotane was analyzed by HPLC. Briefly, after frozen plasma samples were thawed at room temperature, 200 µL of plasma sample was diluted with 560 µL of methanol, mixed with vortex, and centrifuged at 1400 × *g* for 10 minutes. The methanolic supernatant was analyzed by HPLC. The calibration curve was obtained using various amounts (1, 2.5, 5, 10, 20 mg/L) in plasma and treated in the same conditions (correlation coefficient *r* = 0.998).

The area under plasma concentration–time curve (AUC_{0–∞}) was estimated with Kaleidgraph 4.0. (Synergy Software) and the relative bioavailability (*F*) of SMEDDS to Lysodren[®] was calculated using the following equation:

$$F = \frac{AUC_{\text{test}}}{AUC_{\text{reference}}} \times 100\% \quad (1)$$

Results and discussion

Solubility studies

The components used in self-emulsifying systems have to avoid the precipitation after dilution in the gut lumen *in vivo*. Therefore, these components should have very high solubilization capacities for the mitotane.

Results for solubility studies are presented in Table 1. Among the oils, Captex[®] and Capryol[®] provided the higher solubilization capacity (345 ± 13 and 282 ± 5 mg/mL, respectively). Tween[®] 20 and Cremophor[®] were the best surfactants (389 ± 7 and 409 ± 3 mg/mL, respectively). Hence, these components have been used for further experiments.

Pseudoternary phase diagram study

Phase diagrams were constructed in the presence of constant level of mitotane (6.25%) to obtain the optimum concentrations of oil, surfactant, and cosurfactant. The function of the surfactant and the cosurfactant is to reduce the interfacial energy and provide a mechanical barrier to coalescence: the decrease in the free energy required for the emulsion formation improves the stability of the microemulsion²².

Preliminary diagrams were conducted with Captex[®], Tween[®] 20 and Cremophor[®], and mitotane but the mixtures did not allow us to obtain microemulsions areas. Mixtures of Capryol[®], Tween[®] 20, and Cremophor[®] gave better results (Figure 2). In practice, the largest microemulsion formation area was obtained when the ratio of surfactant/cosurfactant (S/CoS) was equal to 1 (Figure 2b). Moreover, the effect of oil concentration on the droplet size distribution was investigated. The droplet size increased from 25 to 180 nm as the Capryol[®] concentration increased from 5% to 50%.

Table 1. Solubility of mitotane in various vehicles.

Vehicle	Solubility of mitotane (mg/mL)
Myvacet [®]	71 ± 16
Capryol [®]	282 ± 5
Ethyloléate	114 ± 5
Soya oil	16 ± 10
Miglyol [®] 812	232 ± 10
Captex [®] 355	345 ± 13
Tween [®] 20	389 ± 7
Tween [®] 80	226 ± 9
Cremophor [®] EL	409 ± 3
Human albumin (2% in water)	0.036 ± 0.010

Concentrations were determined as described in 'Materials and methods' (mean $\pm$ SD; $n = 3$).

When S/CoS is higher than 1, the size of the microemulsion region was slightly decreased. This could be explained by excessive cosurfactant, which could create instability of the interfacial film. Then, we selected S/CoS = 1 for an optimal formulation. Consequently, the selected formulation consisted of a mixture of Capryol[®], Tween[®] 20, and Cremophor[®] (33:33:33), which was shown to spread rapidly in water, forming a clear and transparent microemulsion stable up to 3 days.

The droplet size of various formulations was studied. An increase of both surfactant and cosurfactant from 30% to 70% resulted in a decrease in the mean particle size. A smaller droplet size (40 nm) was observed when Capryol[®], Tween[®] 20, and Cremophor[®] EL were in equal proportion. Tween[®] 20 and Cremophor[®] EL probably increased the penetration of water into the bulk oil, causing interfacial disruption and ejection of droplets into the bulk aqueous phase as reported by Pouton²³. In our study, we investigated the effect of mitotane on droplet size. As drug loading increased from 6.25% to 25% the droplet size remained unchanged (Figure 3).

Above 25%, the mean size increased strongly with the drug concentrations probably as a consequence of undissolved mitotane in the formulation, which affected the apparent droplet size.

In vitro release study

Release studies were conducted for SMEDDS (Capryol[®] 33%, Tween[®] 20 33%, and Cremophor[®] EL 33%) mitotane in Capryol[®] and Lysodren[®] by a dialysis method. In our conditions, the solubility of mitotane in the external compartment (2% of BSA) was 0.036 mg/mL, and the study could be conducted near sink conditions. Nevertheless, as BSA is not able to pass in the bag, the release occurs in pure water.

As shown in Figure 4, the release of mitotane from SMEDDS was higher and faster than from Lysodren[®] ($62 \pm 3\%$ versus $12 \pm 5\%$, after 48 hours), confirming the solubilization power of microemulsions. On the contrary, the Capryol[®] solution did not release significant amounts of mitotane ($3.1 \pm 0.3\%$). In this latter formulation, the lack of surfactant/cosurfactant avoids a good dispersion of the drug, and the partition occurs merely following the oil/water partition rules. This formulation was not used for further studies.

Studies of intestinal drug permeation

In this experiment, mitotane is directly added (donor compartment) in the culture Ringer of the Ussing chamber. As hypothesized, the SMEDDS of mitotane passed through the intestinal barrier much faster than the suspension (14.85 ± 0.8 versus 3.03 ± 0.2 $\mu\text{mol}/\text{cm}^2$, Figure 5). This can be partly explained by

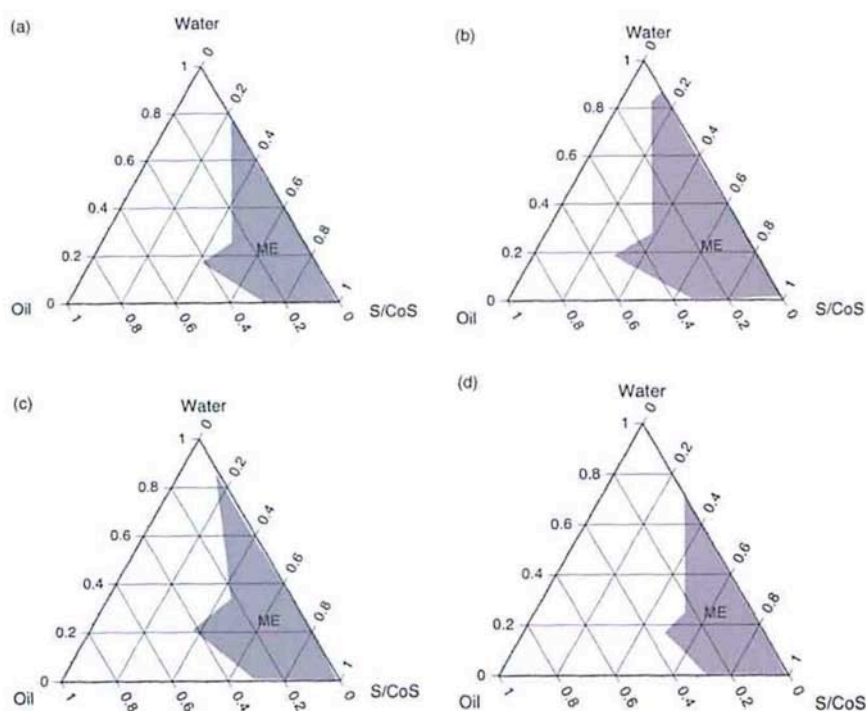


Figure 2. Pseudoternary phase diagram of SMEDDS. (a) Tween 20/Cremophor = 1:0.5; (b) Tween 20/Cremophor = 1:1; (c) Tween 20/Cremophor = 1:2; (d) Tween 20/Cremophor = 1:3. ME, microemulsion zone.

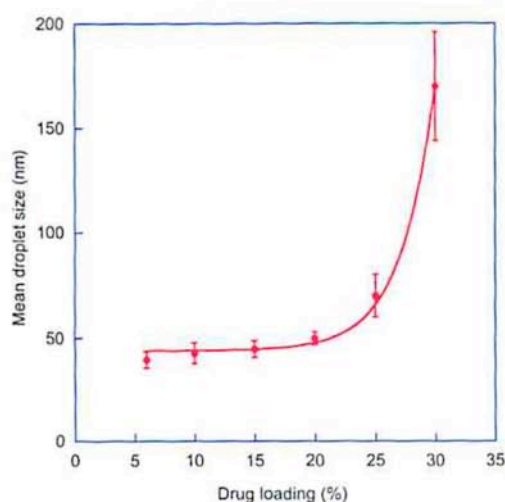


Figure 3. Effect of mitotane on the mean droplet size.

the very poor solubility of mitotane in the aqueous medium even though the BSA (2%) improves the solubility (Table 1). Moreover, H. Araya explained that drugs entrapped in o/w microemulsions are released in the mucin layer, without passing through the route of the mixed micelle formation by bile, and thus permeates the intestinal membrane efficiently²⁴. Hence, SMEDDS can be regarded as drug carriers that are able to deliver mitotane to the intestine barrier in a more efficient way than the conventional formulations.

In vivo studies

The *in vivo* pharmacokinetics of mitotane in Capryol[®], mitotane in SMEDDS (Capryol[®] 33%, Tween[®] 20 33%, and Cremophor[®] EL 33%), and Lysodren[®] were investigated in rabbits. Figure 6 shows the plasma concentrations of mitotane after single oral administrations of the three formulations. Pharmacokinetic parameters are given in Table 2. The C_{max} and $AUC_{0-\infty}$ of the SMEDDS were significantly higher than those of mitotane in Capryol[®] and Lysodren[®] (i.e., the relative bioavailability

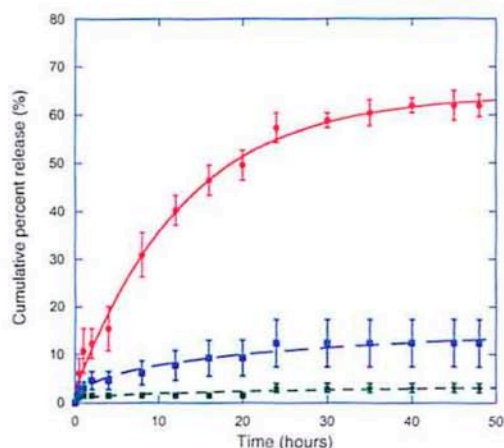


Figure 4. Cumulative percent of release of mitotane by dialysis. $\bullet$, from SMEDDS of mitotane; $\blacksquare$, from Lysodren[®]; $\blacklozenge$, from mitotane in Capryol[®]. Medium: phosphate buffer (0.1 M, pH 6.8) with 2% of BSA. Symbols represent means of three experimental determinations. Vertical lines indicate mean $\pm$ SD.

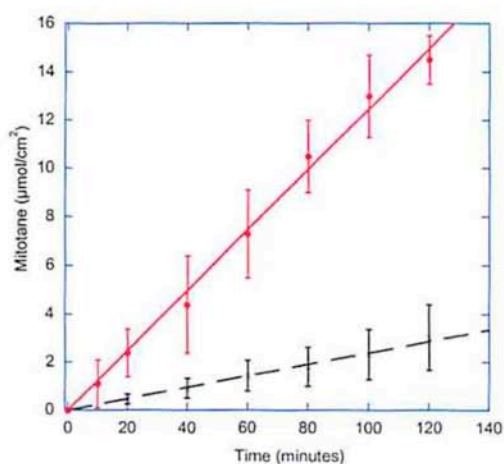


Figure 5. Mucosal-serosal transepithelial flux of mitotane across rat jejunum at 37°C. The drug was added as a suspension of rough powder (3 mM, $\blacksquare$) or as a microemulsion of mitotane (SMEDDS of mitotane, 3 mM, $\bullet$) in the donor compartment (mucosal side). Symbols represent means of three experimental determinations. Vertical lines indicate mean $\pm$ SD.

of SMEDDS was 3.4 with Lysodren[®] as reference). This value can be compared with the 5.1-fold improvement of release (63.3% versus 12.5% after 48 hours, Figure 4) and with the 4.9-fold improvement of absorption (Figure 5). As previously said, the bioavailability

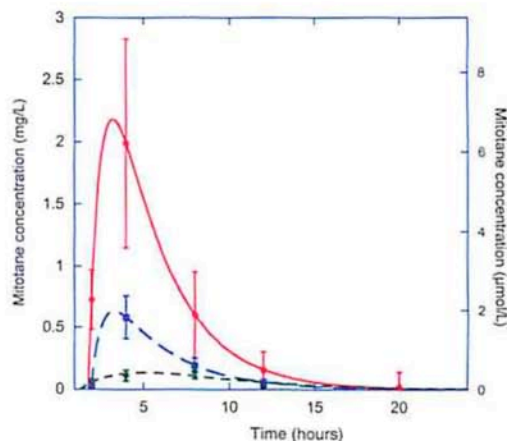


Figure 6. Plasma concentration of mitotane after administration of 100 mg/kg (single dose, orally) of mitotane ($\bullet$, SMEDDS of mitotane; $\blacksquare$, Lysodren[®]; $\blacklozenge$, mitotane in Capryol[®]). Symbols represent means of three experimental determinations. Vertical lines indicate mean $\pm$ SD.

Table 2. Relative bioavailability and pharmacokinetics parameters of mitotane after oral administration of SMEDDS of mitotane, mitotane in Capryol[®], and Lysodren[®] ($n = 3$).

	SMEDDS of mitotane	Capryol [®] solution of mitotane	Tablets (Lysodren [®])
AUC _{0-∞} (mg·h/L)	10.5 $\pm$ 0.9	1.3 $\pm$ 0.02	3.1 $\pm$ 0.3
C _{max} (mg/L)	2.2 $\pm$ 0.4	0.13 $\pm$ 0.06	0.63 $\pm$ 0.19
T _{max} (hours)	3.2 $\pm$ 0.03	5.0 $\pm$ 0.14	3.3 $\pm$ 0.14
Relative bioavailability	3.4	0.42	1

depends greatly on the administered dose, on the formulation, and probably on the animal species. Hence, it would be abusive to compare too accurately our results with those obtained in other studies with various formulations (tablets, capsules, etc.) in humans⁸. Nevertheless, compared with other compounds, the improvement is very important. Actually, the well-known SMEDDS of cyclosporin have been shown to increase the bioavailability by a factor of 1.6²⁵ and as a function of the dose up to 2.39-fold²⁶.

Conclusion

The bioavailability of mitotane is known to be very low and therapeutic levels are achieved only after 3-5 months of high amounts (6-12 g/day) of drug. Moreover, pronounced interindividual variation in plasma

concentrations after administration of oral doses has been reported. The daily mitotane dose explained only 35% of the variability between patients, suggesting that the formulation and food bolus³ are of most importance. These variations may impact the treatment efficiency.

An optimal SMEDDS formulation of mitotane (33% of Capylol, 33% of Tween 20, and 33% of Cremophor EL) showed a 3.4-fold improvement of the bioavailability compared to Lysodren[®] and can now be considered as a very good candidate to optimize the administration of mitotane. Reducing the doses from 10 to 2 or 3 g would undoubtedly make the treatment more acceptable for the patients. Nevertheless, as major side effects of mitotane include gastrointestinal effects, clinical studies will have to determine the impact of this formulation on this side effects and on the compliance of the patients.

Acknowledgments

Authors are very thankful to HRA Pharma for the generous gift of Lysodren[®].

Declaration of interest: The authors report no conflicts of interest.

References

- Hahner S, Fassnacht M. (2005). Mitotane for adrenocortical carcinoma treatment. *Curr Opin Investig Drugs*, 6:386-94.
- Wooten MD, King DK. (1993). Adrenal cortical carcinoma. Epidemiology and treatment with mitotane and a review of the literature. *Cancer*, 72:3145-55.
- Baudin E, Pellegriti G, Bonnay M, Penfornis A, Laplanche A, Vassal G, et al. (2001). Impact of monitoring plasma 1,1-dichlorodiphenyldichloroethane (*o,p'*-DDD) levels on the treatment of patients with adrenocortical carcinoma. *Cancer*, 92:1385-92.
- Terzolo M, Pia A, Berruti A, Osella G, Ali A, Carbone V, et al. (2000). Low-dose monitored mitotane treatment achieves the therapeutic range with manageable side effects in patients with adrenocortical cancer. *J Clin Endocrinol Metab*, 85:2234-8.
- Terzolo M, Angeli A, Fassnacht M, Daffara F, Tauchmanova L, Conton PA, et al. (2007). Adjuvant mitotane treatment for adrenocortical carcinoma. *N Engl J Med*, 356:2372-80.
- Moy RH. (1961). Studies of the pharmacology of *o,p'*-DDD in man. *J Lab Clin Med*, 58:296-304.
- Richie JP, Gittes RF. (1980). Carcinoma of the adrenal cortex. *Cancer*, 45:1957-64.
- Grid'ko AN, Borzunov EE, Komissarenko IV, Perepelitsa NP. (1981). Pharmacokinetics of chlodithane tablets in the treatment of Cushing's syndrome. *Probl Endokrinol (Mosk)*, 27:32-5.
- Moolenaar AJ, van Slooten H, van Seters AP, Smeenk D. (1981). Blood levels of *o,p'*-DDD following administration in various vehicles after a single dose and during long-term treatment. *Cancer Chemother Pharmacol*, 7:51-4.
- Aungst BJ. (1993). Novel formulation strategies for improving oral bioavailability of drugs with poor membrane permeation or presystemic metabolism. *J Pharm Sci*, 82:979-87.
- Musial SP, Freeman CJ, Sinsheimer JE. (1985). Mitotane (*o,p'*-DDD) emulsion and tablet analysis by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr*, 319:467-70.
- Trotta M, Gallarate M, Pattarino F, Morel S. (2001). Emulsions containing partially water-miscible solvents for the preparation of drug nanosuspensions. *J Control Release*, 76:119-28.
- Charman SA, Charman WN, Rogge MC, Wilson TD, Dutko FJ, Pouton CW. (1992). Self-emulsifying drug delivery systems: Formulation and biopharmaceutical evaluation of an investigational lipophilic compound. *Pharm Res*, 9:87-93.
- Constantinides PP. (1995). Lipid microemulsions for improving drug dissolution and oral absorption: Physical and biopharmaceutical aspects. *Pharm Res*, 12:1561-72.
- Scott Swenson E, Curatolo WJ. (1992). (c) Means to enhance penetration: (2) intestinal permeability enhancement for proteins, peptides and other polar drugs: Mechanisms and potential toxicity. *Adv Drug Deliv Rev*, 8:39-92.
- Lindmark T, Nikkila T, Artursson P. (1995). Mechanisms of absorption enhancement by medium chain fatty acids in intestinal epithelial caco-2 cell monolayers. *J Pharmacol Exp Ther*, 275:958-64.
- Nerurkar MM, Burton PS, Borchardt RT. (1996). The use of surfactants to enhance the permeability of peptides through caco-2 cells by inhibition of an apically polarized efflux system. *Pharm Res*, 13:528-34.
- Kommuru TR, Gurley B, Khan MA, Reddy IK. (2001). Self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) of coenzyme Q10: Formulation development and bioavailability assessment. *Int J Pharm*, 212:233-46.
- Kang BK, Lee JS, Chon SK, Jeong SY, Yuk SH, Khang G, et al. (2004). Development of self-microemulsifying drug delivery systems (SMEDDS) for oral bioavailability enhancement of simvastatin in beagle dogs. *Int J Pharm*, 274:65-73.
- Friman S, Bäckman L. (1996). A new microemulsion formulation of cyclosporin: Pharmacokinetic and clinical features. *Clin Pharmacokinet*, 30:181-93.
- Mardones P, Andrinolo D, Csentes A, Lagos N. (2004). Permeability of human jejunal segments to gonyautoxins measured by the Ussing chamber technique. *Toxicol*, 44:521-8.
- Groves MJ, de Galindez DA. (1976). The self-emulsifying action of mixed surfactants in oil. *Acta Pharm Suec*, 13:361-72.
- Pouton CW. (1997). Formulation of self-emulsifying drug delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev*, 25:47-58.
- Araya H, Tomita M, Hayashi M. (2006). The novel formulation design of self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) type O/W microemulsion III: The permeation mechanism of a poorly water soluble drug entrapped O/W microemulsion in rat isolated intestinal membrane by the Ussing chamber method. *Drug Metab Pharmacokinet*, 21:45-53.
- Chang T, Benet LZ, Hebert MF. (1996). The effect of water-soluble vitamin E on cyclosporine pharmacokinetics in healthy volunteers. *Clin Pharmacol Ther*, 59:297-303.
- Garrigues J, Lambert G. (2004). Microémulsions et systèmes autoémulsionnants per os. In: Falson-Rieg F, Faivre V, Pirot F, eds. *Nouvelles formes médicamenteuses*. Paris: Editions Tech & Doc, pp. 101-15.

Liste des figures

Figure 1 : Structure chimique du mitotane	3
Figure 2 : Structure des trois principaux isomères du DDD	4
Figure 3 : Biosynthèse des hormones surrénaliennes (Bacchetta and Droz, 2005)	6
Figure 4 : Concentration plasmatique (mg/l) du mitotane en fonction du temps (h) après administration orale unique de 2g chez 6 patients atteints de carcinome. (M : Lait, C : Chocolat, T : Comprimé, G : Granulés, E : Emulsion) (Moolenaar et al., 1981)	7
Figure 5 : Concentration plasmatique (mg/l) du mitotane (50 mg/kg) en fonction du temps (h) après administration orale chez des chiens (Watson et al., 1987)	8
Figure 6 : Evolution des concentrations plasmatiques du mitotane chez des patients atteints de corticosurrénalome en fonction de la dose administrée (Moy, 1961)	9
Figure 7 : Concentration tissulaire du mitotane dans les globules rouges et organes après administration à des rats (De Francia et al., 2006)	10
Figure 8 : Evolution de la concentration plasmatique du mitotane et du DDE chez des cochons d'Inde (Hermansson et al., 2008)	11
Figure 9 : Métabolisme hépatique du mitotane (De Francia et al., 2006)	12
Figure 10 : Cinétique d'élimination du mitotane et du DDE dans le compartiment plasmatique chez des cochons d'Inde (Hermansson et al., 2008)	13
Figure 11 : Corrélation entre doses totales de mitotane et les mitotanémies les plus élevées chez 24 patients atteints de carcinome surrénalien (Baudin et al., 2001).	18
Figure 12 : Corrélation entre doses totales de mitotane (Lysodren®) et les mitotanémies chez 8 patients atteints de carcinome surrénalien (Terzolo et al., 2000).	20
Figure 13 : Mitotanémie et doses journalières de Lysodren® durant les 8 premiers mois chez deux patients (Terzolo et al., 2000)	20
Figure 14 : Classification BCS des molécules	25
Figure 15 : Différents représentants des huiles	29
Figure 16 : Structure moléculaire d'un tensioactif apolaire	30
Figure 17 : Schéma d'une gouttelette d'émulsion	31
Figure 18 : Structure d'un niosome constitué d'une bicouche et obtenu à partir d'un excès de tensioactifs	32
Figure 19 : Schéma représentant l'action du co-tensioactif sur le rayon de courbure et sur la taille de la gouttelette d'émulsion	33
Figure 20 : Microscopie électronique de l'émulsion après dispersion de la poudre lyophilisée (Margulis-Goshen and Magdassi, 2008)	36
Figure 21 : Microscopie électronique de la poudre de dexibuprofène (B) et l'émulsion après dispersion séchage (C) (Balakrishnan et al., 2009)	37
Figure 22 : Diagrammes pseudo-ternaires montrant les domaines de microémulsions de simvastatine (zone pleine) avec des pourcentages variables de tensioactif et co-solvant (Kang et al., 2004)	38
Figure 23 : Diagramme pseudo-ternaire montrant les zones de formation de la phase continue aqueuse (L1), la phase continue huileuse (L2), la phase cristalline (LC) dans une formulation de type II (Pouton and Porter, 2008)	41
Figure 24 : Diagramme pseudo-ternaire montrant les zones de formation de la phase continue aqueuse (L1), la phase continue huileuse (L2), la phase cristalline (LC) dans une formulation de type III (Pouton and Porter, 2008)	42
Figure 25 : Structure schématisée des nanoparticules	43
Figure 26 : Formule développée de la PCL	44
Figure 27 : Formule développée des Eudragit RL et RS	45
Figure 28 : Formation de nanocapsules par la technique de nanoprécipitation	47
Figure 29 : Préparation des nanocapsules par la technique d'émulsion – diffusion (Moinard-Checot et al., 2008)	48
Figure 30 : Représentation schématique des nanocapsules préparées par la technique d'émulsion – diffusion. (a) : mélange ; (b) : Emulsion huile dans eau ; (c) : Diffusion de solvant ; (d) : Formation de nanocapsules (Quintanar-Guerrero et al., 1996)	49
Figure 31 : Microscopie électronique à transmission et cryofracture de nanocapsules (Moinard-Checot et al., 2008)	50

Figure 32 : Structure schématisée des nanocapsules de chitosan (Prego et al., 2005)	51
Figure 33 : Organisation de la paroi digestive et des tissus lymphoïdes	53
Figure 34 : Nanoparticules de ferritine à l'intérieur des cellules Caco-2 (McClean et al., 1998) observées en microscopie confocale, les flèches désignant les nanoparticules de ferritine incorporées dans les cellules de type Caco-2.	55
Figure 35 : Les flèches désignent les microsphères de zéine captées par des cellules M (Ermak and Giannasca, 1998) et observées en microscopie électronique. E désigne les entérocytes.	58
Figure 36 : Impact des différentes formes galéniques d'insuline à dose variable sur la glycémie chez des rats diabétiques (Sonaje et al., 2009).	59
Figure 37 : Processus d'absorption des microémulsions. A : voie transcellulaire, B : voie paracellulaire, C : Inhibition de la Pg-P et du cytochrome 3A, D : Voie lymphatique et chylomicrons (O'Driscoll, 2002).	60
Figure 38 : Profil pharmacocinétique de l'halofantrine formulée avec un triglycéride à longue chaîne (●), à chaîne moyenne (○) et mélange longue et moyenne chaîne (▲) chez le chien (Porter et al., 2004)	62
Figure 39 : Structure des jonctions serrées cellulaires.....	67
Figure 40 : Modèles de transport de molécule au travers des cellules intestinales : 1) La diffusion passive transcellulaire ; 2) Le transport paracellulaire ; 3) Le transport actif ; 4) La pinocytose (Artursson et al., 2001)	68
Figure 41 : Effets de la charge des microémulsions SMEDDS (A) et des tensioactifs (B) sur la résistance cellulaire des Caco-2 (Sha et al., 2005b).....	71
Figure 42 : Effet des nanocapsules à 204,5 µg/cm ² (—●—) et des nanocapsules à 80 µg/cm ² (—○—) sur la résistance de la monocouche cellulaire (Prego et al., 2005)	74
Figure 43 : Passage de l'insuline en fonction du pH du compartiment donneur dans un modèle cellulaire Caco-2 (Sonaje et al., 2009).	75
Figure 44 : Schéma d'une chambre de Ussing	76
Figure 45 : Diagrammes pseudoternaires montrant les zones de formation des microémulsions de mitotane	85
Figure 46 : Evolution du diamètre moyen des microémulsions en fonction de la quantité de mitotane incorporée	87
Figure 47 : Profil d'incorporation du mitotane dans les microparticules de PCL en fonction de la concentration du mitotane dans la phase organique. Qop désignant la quantité de mitotane en mg ajoutée au dichlorométhane par mg de polymère. Qpol désignant la quantité de mitotane en mg par g de polymère.	89
Figure 48 : Microscopie électronique montrant des microparticules lisses MIP 60 (A) et MIP 250 (B).....	90
Figure 49 : Cinétique de libération <i>in vitro</i> des Microémulsions (—●—), du Mitotane-Capryol (—■—), du Lysodren® (—◆—), des Microparticules MIT250 de PCL (—) et des Nanocapsules PCL (-x-x-) et PCL/RL (- - -).	91
Figure 50 : Profil plasmatique obtenu avec les différentes formes galéniques de mitotane. Microémulsions (—●—), Mitotane-Capryol (—□—), Lysodren® (—■—), Microparticules MIT250 de PCL (—Δ—) Nanocapsules PCL (—) et PCL/RL (---).	95
Figure 51 : Viabilité cellulaire en fonction des formulations de mitotane	100
Figure 52 : modalités de passage des nanocapsules de mitotane au travers des membranes des cellules Caco-2. Eclatement ou passage direct des nanocapsules de mitotane	101
Figure 53 : Passage du mitotane au travers des cellules Caco-2 en fonction du temps. Microémulsions (—x—), Mitotane-Capryol (---), Mitotane poudre (—◆—), Microparticules MIT250 de PCL (—◆—) Nanocapsules PCL (—●—) et PCL/RL (—■—).	102
Figure 54 : Flux transépithélial du mitotane au travers du jéjunum de rat. Le mitotane 3mM est ajouté (---) sous forme de poudre ou de microémulsions (-●-)	104

Liste des tableaux

Tableau 1 : Concentrations du mitotane et de ses métabolites dans le plasma humain (Andersen et al., 1999)....	13
Tableau 2 : Classification de MacFarlane et Sullivan	23
Tableau 3 : Paramètres pharmacocinétiques des différentes formulations du RO-15-0778 chez le chien (Shah et al., 1994).....	62
Tableau 4 : Paramètres pharmacocinétiques de la ciclosporine chez le volontaire sain (Mueller et al., 1994).	64
Tableau 5 : Tableau résumant quelques applications des systèmes lipidiques autoémulsionnants.....	65
Tableau 6 : Coefficient de perméabilité cellulaire de l'aténolol, du métoprolol et du danazol formulés sous forme de nanoémulsions (Brusewitz et al., 2007).	73
Tableau 7 : Solubilité du mitotane dans différents véhicules	85

Références bibliographiques

Références bibliographiques

Ahlman, H., Khorram-Manesh, A., Jansson, S., Wangberg, B., Nilsson, O., Jacobsson, C.E., Lindstedt, S., 2001. Cytotoxic treatment of adrenocortical carcinoma. *World J Surg.* 25(7), 927-933.

al Khouri, N., Fessi, H., Roblot-Treupel, L., Devissaguet, J.P., Puisieux, F., 1986. An original procedure for preparation of nanocapsules of polyalkylcyanoacrylates for interfacial polymerization. *Pharma Acta Helv.* 61(10-11), 274-281.

Allemann, E., Gurny, R., Doelker, E., 1993. Drug-loaded nanoparticles: Preparation methods and drug targeting tissues. *Review Eur J Biopharm.* 39(5), 173-191.

Allolio, B., Hahner, S., Weismann, D., Fassnacht, M., 2004. Management of adrenocortical carcinoma. *Clin Endocrinol (Oxf).* 60(3), 273-287.

Amidon, G.L., Lennernas, H., Shah, V.P., Crison, J.R., 1995. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification : The correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharm Res.* 12(3), 413-420.

Amidon, G.L., Sinko, P.J., Fleisher, D., 1988. Estimating human oral fraction dose absorbed : A correlation using rat intestinal membrane permeability for passive and carrier-mediated compounds. *Pharm Res.* 5(10), 651-654.

Ammoury, N., Fessi, H., Devissaguet, J.P., Allix, M., Plotkine, M., Boulu, R.G., 1990. Effect on cerebral blood flow of orally administered indomethacin-loaded poly(isobutylcyanoacrylate) and poly(dl-lactide) nanocapsules. *J Pharm Pharmacol.* 42(8), 558-561.

Andersen, A., Kasperlik-Zaluska, A.A., Warren, D.J., 1999. Determination of mitotane (o,p-ddd) and its metabolites o,p-dda and o,p-dde in plasma by high-performance liquid chromatography. *Ther Drug Monit.* 21(3), 355-359.

Andres, E., Vinzio, S., Goichot, B., Schlienger, J.L., 2001. Mitotane-induced febrile pancytopenia: A first case report in paraneoplastic cushing's syndrome. *Eur J Endocrinol.* 144(1), 81.

Aprahamian, M., Michel, C., Humbert, W., Devissaguet, J.P., Damge, C., 1987. Transmucosal passage of polyalkylcyanoacrylate nanocapsules as a new drug carrier in the small intestine. *Biol Cell.* 61(1-2), 69-76.

Araya, H., Tomita, M., Hayashi, M., 2006. The novel formulation design of self-emulsifying drug delivery systems (sedds) type o/w microemulsion iii: The permeation mechanism of a poorly water soluble drug entrapped o/w microemulsion in rat isolated intestinal membrane by the ussing chamber method. *Drug Metab Pharmacokinet.* 21(1) 45-53.

Artursson, P., Palm, K., Luthman, K., 2001. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. *Adv Drug Deliv Rev.* 46(1-3), 27-43.

Atef, E., Belmonte, A.A., 2008. Formulation and in vitro and in vivo characterization of a phenytoin self-emulsifying drug delivery system (sedds). *Eur J Pharm Sci.* 35(4), 257-263.

Attivi, D., Wehrle, P., Ubrich, N., Damge, C., Hoffman, M., Maincent, P., 2005. Formulation of insulin-loaded polymeric nanoparticles using response surface methodology. *Drug Dev Ind Pharm.* 31(2), 179-189.

Attwood, D., T., F.A., 1983. *Surfactant systems: Their chemistry, pharmacy and biology.* Chapman and Hall, London.

Bacchetta, J., Droz, J.P., 2005. [practical use of o,p'ddd in adrenocortical carcinoma]. *Bull Cancer.* 92(3), 273-279.

Balakrishnan, P., Lee, B.J., Oh, D.H., Kim, J.O., Hong, M.J., Jee, J.-P., Kim, J.A., Yoo, B.K., Woo, J.S., Yong, C.S., Choi, H.-G., 2009. Enhanced oral bioavailability of dexibuprofen by a novel solid sedds formulation. *Eur J Pharm Biopharm.* In Press,

Baudin, E., Pellegriti, G., Bonnay, M., Penfornis, A., Laplanche, A., Vassal, G., Schlumberger, M., 2001. Impact of monitoring plasma 1,1-dichlorodiphenildichloroethane (o,p'ddd) levels on the treatment of patients with adrenocortical carcinoma. *Cancer.* 92(6), 1385-1392.

Beck, R.C., Pohlmann, A.R., Hoffmeister, C., Gallas, M.R., Collnot, E., Schaefer, U.F., Guterres, S.S., Lehr, C.M., 2007. Dexamethasone-loaded nanoparticle-coated microparticles: Correlation between in vitro drug release and drug transport across caco-2 cell monolayers. *Eur J Pharm Biopharm.* 67(1), 18-30.

Benecke, R., Vetter, B., De Zeeuw, R.A., 1987. Rapid micromethod for the analysis of mitotane and its metabolite in plasma by gas chromatography with electron-capture detection. *J Chromatogr.* 417(2), 287-294.

Benet, L.Z., Izumi, T., Zhang, Y., Silverman, J.A., Wachter, V.J., 1999. Intestinal mdr transport proteins and p-450 enzymes as barriers to oral drug delivery. *J Control Release.* 62(1-2), 25-31.

Bergental, D.M., Hertz, R., Lipsett, M.B., Moy, R.H., 1960. Chemotherapy of adrenocortical cancer with o,p'-ddd (rothane). *Annals of Internal Medicine.* 53, 672-682.

Bonacci, R., Gigliotti, A., Baudin, E., Wion-Barbot, N., Emy, P., Bonnay, M., Cailleux, A.F., Nakib, I., Schlumberger, M., 1998. Cytotoxic therapy with etoposide and cisplatin in advanced adrenocortical carcinoma. *Reseau comete inserm. Br J Cancer.* 78(4), 546-549.

Bravo-Osuna, I., Vauthier, C., Chacun, H., Ponchel, G., 2008. Specific permeability modulation of intestinal paracellular pathway by chitosan-poly(isobutylcyanoacrylate) core-shell nanoparticles. *Eur J Pharm Biopharm.* 69(2), 436-444.

Brusewitz, C., Schendler, A., Funke, A., Wagner, T., Lipp, R., 2007. Novel poloxamer-based nanoemulsions to enhance the intestinal absorption of active compounds. *Int J Pharm.* 329(1-2), 173-181.

Carmichael, J., DeGraff, W.G., Gazdar, A.F., Minna, J.D., Mitchell, J.B., 1987. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: Assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.* 47(4), 936-942.

Cazorla, A., Moncloa, F., 1962. Action of 1,1-dichloro-2-p-chlorophenyl-2-o-chlorophenyl ethane on dog adrenal cortex. *Science.* 136, 47.

Chang, R.K., Price, J.C., Whitworth, C.W., 1986. Dissolution characteristics of poly(epsilon-caprolactone)-polylactide microspheres of chlorpromazine. *Drug Dev Ind Pharm.* 12(14), 2355-2380.

Clarke, L.L., 2009. A guide to ussing chamber studies of mouse intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 296(6), 1151-1166.

Cole, E.T., Cade, D., Benameur, H., 2008. Challenges and opportunities in the encapsulation of liquid and semi-solid formulations into capsules for oral administration. *Adv Drug Deliv Rev.* 60(6), 747-756.

Constantinides, P.P., 1995. Lipid microemulsions for improving drug dissolution and oral absorption: Physical and biopharmaceutical aspects. *Pharm Res.* 12(11), 1561-1572.

Craig, D.Q.M., Barker, D., Banning, D., Booth, S.W., 1995. An investigation into the mechanisms of self-emulsification using particle size analysis and low frequency dielectric spectroscopy. *Int J Pharm.* 114(1), 103-110.

Crounse, R.G., 1961. Human pharmacology of griseofulvin: The effect of fat intake on gastrointestinal absorption. *J Invest Dermatol.* 37, 529-533.

Cueto, C., Brown, J.H., 1958. The chemical fractionation of an adrenocorticolytic drug. *Endocrinology.* 62(3), 326-333.

Cueto, C., Brown, J.H., Richardson, A.P., Jr., 1958. Biological studies on an adrenocorticolytic agent and the isolation of the active components. *Endocrinology.* 62(3), 334-339.

Dabros, T., Yeung, A., Masliyah, J., Czarnecki, J., 1999. Emulsification through area contraction. *J Colloid Interface Sci.* 210(1), 222-224.

Dackiw, A.P., Lee, J.E., Gagel, R.F., Evans, D.B., 2001. Adrenal cortical carcinoma. *World J Surg.* 25(7), 914-926.

Dalençon, F., Amjaud, Y., Lafforgue, C., Derouin, F., Fessi, H., 1997. Atovaquone and rifabutine-loaded nanocapsules: Formulation studies. *Int J Pharm.* 153(1), 127-130.

Damge, C., Aprahamian, M., Balboni, G., Hoeltzel, A., Andrieu, V., Devissaguet, J.P., 1987. Polyalkylcyanoacrylate nanocapsules increase the intestinal absorption of a lipophilic drug. *Int J Pharm.* 36(2-3), 121-125.

Damge, C., Aprahamian, M., Marchais, H., Benoit, J.P., Pinget, M., 1996. Intestinal absorption of plaga microspheres in the rat. *J Anat.* 189(3), 491-501.

Davis, W.W., Pfeiffer, R.R., Quay, J.F., 1970. Normal and promoted gastrointestinal absorption of water-soluble substances. I. Induced rapidly reversible hyperabsorptive state in the canine fundic stomach pouch. *J Pharm Sci.* 59 (7), 960-963.

De Francia, S., Pirro, E., Zappia, F., De Martino, F., Sprio, A.E., Daffara, F., Terzolo, M., Berruti, A., Di Carlo, F., Ghezzi, F., 2006. A new simple hplc method for measuring mitotane and its two principal metabolites tests in animals and mitotane-treated patients. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 837(1-2), 69-75.

Dickstein, G., Shechner, C., Arad, E., Best, L.A., Nativ, O., 1998. Is there a role for low doses of mitotane (o,p'-ddd) as adjuvant therapy in adrenocortical carcinoma? *J Clin Endocrinol Metab.* 83(9), 3100-3103.

Dittgen, M., Durrani, M., Lehman, K., 1997. Acrylic polymers. A review of pharmaceutical applications. *S.T.P. Pharma Sci.* 7, 403-437.

Eldridge, J.H., Meulbroek, J.A., Staas, J.K., Tice, T.R., Gilley, R.M., 1989. Vaccine-containing biodegradable microspheres specifically enter the gut-associated lymphoid tissue following oral administration and induce a disseminated mucosal immune response. *Adv Exp Med Biol.* 251, 191-202.

Ermak, T.H., Giannasca, P.J., 1998. Microparticle targeting to m cells. *Adv Drug Deliv Rev.* 34(2-3), 261-283.

Fessi, H., Devissaguet, J.P., Puisieux, F., Thies, C., 1988. Procédé de préparation de systèmes colloïdaux dispersibles d'une substance sous forme de nanoparticules. Brevet français. FR 2 608 988,

Finnegan, J.K., Haag, H.B., Larrison, P.S., 1949. Tissue distribution and elimination of ddd and ddt following oral administration to dogs and rats. . *Proc Soc Exp Biol.* 72(2), 357-360.

Gan-Zuo, L., Friberg, S.E., 1982. Surfactant/cosurfactant association and emulsion stability. *J Am Oil Chem Soc.* 59(12), 569-572.

Gershanik, T., Benita, S., 2000. Self-dispersing lipid formulations for improving oral absorption of lipophilic drugs. *Eur J Pharm Biopharm.* 50(1), 179-188.

Gershanik, T., Benzeno, S., Benita, S., 1998. Interaction of a self-emulsifying lipid drug delivery system with the everted rat intestinal mucosa as a function of droplet size and surface charge. *Pharm Res.* 15(6), 863-869.

Gibaud, S., Jabir Al Awwadi, N., Ducki, C., Astier, A., 2004. Poly([epsilon]-caprolactone) and eudragit microparticles containing fludrocortisone acetate. *Int J Pharm.* 269(2), 491-508.

Goddeeris, C., Van den Mooter, G., 2008. Free flowing solid dispersions of the anti-hiv drug uc 781 with poloxamer 407 and a maximum amount of tpgs 1000: Investigating the relationship between physicochemical characteristics and dissolution behaviour. *Eur J Pharm Sci.* 35(1-2), 104-113.

Gonzalez Ferreiro, M., Tillman, L.G., Hardee, G., Bodmeier, R., 2002. Alginate/poly-l-lysine microparticles for the intestinal delivery of antisense oligonucleotides. *Pharm Res.* 19(6), 755-764.

Grove, M., Mullertz, A., Nielsen, J.L., Pedersen, G.P., 2006. Bioavailability of seocalcitol ii: Development and characterisation of self-microemulsifying drug delivery systems (smedds) for oral administration containing medium and long chain triglycerides. *Eur J Pharm Sci.* 28(3), 233-242.

Grove, M., Mullertz, A., Pedersen, G.P., Nielsen, J.L., 2007. Bioavailability of seocalcitol iii. Administration of lipid-based formulations to minipigs in the fasted and fed state. *Eur J Pharm Sci.* 31(1), 8-15.

Guenard, H., 1991. Circulation lymphatique. In : *Physiologie Humaine*. Paris : Pradel. 136-138.

Gupta, S.K., Manfro, R.C., Tomlanovich, S.J., Gambertoglio, J.G., Garovoy, M.R., Benet, L.Z., 1990. Effect of food on the pharmacokinetics of cyclosporine in healthy subjects following oral and intravenous administration. *J Clin Pharmacol.* 30(7), 643-653.

Guterres, S.S., Fessi, H., Barratt, G., Devissaguet, J.P., Puisieux, F., 1995. Poly (dl-lactide) nanocapsules containing diclofenac: I. Formulation and stability study. *Int J Pharm.* 113(1), 57-63.

Haak, H.R., Caekebeke-Peerlinck, K.M., van Seters, A.P., Briet, E., 1991. Prolonged bleeding time due to mitotane therapy. *Eur J Cancer.* 27(5), 638-641.

Haak, H.R., Hermans, J., van de Velde, C.J., Lentjes, E.G., Goslings, B.M., Fleuren, G.J., Krans, H.M., 1994. Optimal treatment of adrenocortical carcinoma with mitotane: Results in a consecutive series of 96 patients. *Br J Cancer.* 69(5), 947-951.

Hauss, D.J., Fogal, S.E., Ficorilli, J.V., Price, C.A., Roy, T., Jayaraj, A.A., Keirns, J.J., 1998. Lipid-based delivery systems for improving the bioavailability and lymphatic transport of a poorly water-soluble ltb4 inhibitor. *J Pharm Sci.* 87(2), 164-169.

Hermansson, V., Cantillana, T., Hovander, L., Bergman, A., Ljungvall, K., Magnusson, U., Torneke, K., Brandt, I., 2008. Pharmacokinetics of the adrenocorticolytic compounds 3-methylsulphonyl-dde and o,p'-ddd (mitotane) in minipigs. *Cancer Chemother Pharmacol.* 61(2), 267-274.

Hilgers, A.R., Conradi, R.A., Burton, P.S., 1990. Caco-2 cell monolayers as a model for drug transport across the intestinal mucosa. *Pharm Res.* 7(9), 902-910.

Hsing AF, N.J., Co Chien HF, McLaughlin JK, Fraumeni JF., 1996. Risk factors for adrenal cancer: An exploratory study. *Int J Cancer.* 65(4), 432-436.

Hubert, B., Atkinson, J., Guerret, M., Hoffman, M., Devissaguet, J.P., Maincent, P., 1991. The preparation and acute antihypertensive effects of a nanocapsular form of darodipine, a dihydropyridine calcium entry blocker. *Pharm Res.* 8(6), 734-738.

Humberstone, A.J., Charman, W.N., 1997. Lipid-based vehicles for the oral delivery of poorly water soluble drugs. *Adv Drug Deliv Rev.* 25(1), 103-128.

Hutter, A.M., Kayhoe, D.E., 1966. Adrenal cortical carcinoma : Results of treatment with o,p'ddd in 138 patients. *A J Med.* 41(4), 581-592.

Jani, P., Halbert, G.W., Langridge, J., Florence, A.T., 1990. Nanoparticle uptake by the rat gastrointestinal mucosa: Quantitation and particle size dependency. *J Pharm Pharmacol.* 42(12), 821-826.

Jani, P.U., McCarthy, D.E., Florence, A.T., 1992. Nanosphere and microsphere uptake via peyer's patches: Observation of the rate of uptake in the rat after a single oral dose. *Int J Pharm.* 86(2-3), 239-246.

Jepson, M., Simmons, N., Savidge, T., James, P., Hirst, B., 1993. Selective binding and transcytosis of latex microspheres by rabbit intestinal m cells. *Cell Tissue Res.* 271(3), 399-405.

Julianto, T., Yuen, K.H., Noor, A.M., 2000. Improved bioavailability of vitamin e with a self emulsifying formulation. *Int J Pharm.* 200(1), 53-57.

Kajii, H., Horie, T., Hayashi, M., Awazu, S., 1988. Fluorescence study of the membrane-perturbing action of sodium caprylate as related to promotion of drug absorption. *J Pharm Sci.* 77(5), 390-392.

Kang, B.K., Lee, J.S., Chon, S.K., Jeong, S.Y., Yuk, S.H., Khang, G., Lee, H.B., Cho, S.H., 2004. Development of self-microemulsifying drug delivery systems (smedds) for oral bioavailability enhancement of simvastatin in beagle dogs. *Int J Pharm.* 274(1-2), 65-73.

Ke, W.T., Lin, S.Y., H, H., Sheu, M.T., 2005. Physical characterizations of microemulsion systems using tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate (tpgs) as a surfactant for the oral delivery of protein drugs. *J Control Release.* 102(2), 489-507.

Khoo, S.M., Humberstone, A.J., Porter, C.J., Edwards, G.A., Charman, W.N., 1998. Formulation design and bioavailability assessment of lipidic self-emulsifying formulations of halofantrine. *Int J Pharm.* 167(1-2), 155-164.

Kim, D.C., Burton, P.S., Borchardt, R.T., 1993. A correlation between the permeability characteristics of a series of peptides using an in vitro cell culture model (caco-2) and those

using an in situ perfused rat ileum model of the intestinal mucosa. *Pharm Res.* 10(12), 1710-1714.

Kim, J.Y., Ku, Y.S., 2000. Enhanced absorption of indomethacin after oral or rectal administration of a self-emulsifying system containing indomethacin to rats. *Int J Pharm.* 194(1), 81-89.

Kitamura, S., Shimizu, Y., Shiraga, Y., Yoshida, M., Sugihara, K., Ohta, S., 2002. Reductive metabolism of p,p'-ddt and o,p'-ddt by rat liver cytochrome p450. *Drug Metab. Disp.* 30(2), 113.

Klingberg, T.D.F., Pedersen, M.H., Cencic, A., Budde, B.B., 2005. Application of measurements of transepithelial electrical resistance of intestinal epithelial cell monolayers to evaluate probiotic activity. *Appl Environ Microbiol.* 71(11), 7528-7530.

Kogan, A., Kesselman, E., Danino, D., Aserin, A., Garti, N., 2008. Viability and permeability across caco-2 cells of cbz solubilized in fully dilutable microemulsions. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 66(1), 1-12.

Kommuru, T.R., Gurley, B., Khan, M.A., Reddy, I.K., 2001. Self-emulsifying drug delivery systems (sedds) of coenzyme q10: Formulation development and bioavailability assessment. *Int J Pharm.* 212(2), 233-246.

Kossena, G.A., Boyd, B.J., Porter, C.J.H., Charman, W.N., 2003. Separation and characterization of the colloidal phases produced on digestion of common formulation lipids and assessment of their impact on the apparent solubility of selected poorly water-soluble drugs. *J Pharm Sci.* 92(3), 634-648.

Lennernas, H., Palm, K., Fagerholm, U., Artursson, P., 1996. Comparison between active and passive drug transport in human intestinal epithelial (caco-2) cells in vitro and human jejunum in vivo. *Int J Pharm.* 127(1), 103-107.

Leroux, J.C., Allemann, E., Doelker, E., Gurny, R., 1995. New approach for the preparation of nanoparticles by an emulsification-diffusion method. *Eur J Pharm Biopharm.* 41(1), 14-18.

Loxley, A., Vincent, B., 1998. Preparation of poly(methylmethacrylate) microcapsules with liquid cores. *J Colloid Interface Sci.* 208(1), 49-62.

Magalhaes, J.G., Tattoli, I., Girardin, S.E., 2007. The intestinal epithelial barrier: How to distinguish between the microbial flora and pathogens. *Semin Immunol.* 19(2), 106-115.

Margulis-Goshen, K., Magdassi, S., 2008. Formation of simvastatin nanoparticles from microemulsion. *Nanomedicine.* 4, In press.

McClean, S., Prosser, E., Meehan, E., O'Malley, D., Clarke, N., Ramtoola, Z., Brayden, D., 1998. Binding and uptake of biodegradable poly-dl-lactide micro- and nanoparticles in intestinal epithelia. *Eur J Pharm Sci.* 6(2), 153-163.

Miyamoto, M., Natsume, H., Iwata, S., Ohtake, K., Yamaguchi, M., Kobayashi, D., Sugibayashi, K., Yamashina, M., Morimoto, Y., 2001. Improved nasal absorption of drugs

using poly--arginine: Effects of concentration and molecular weight of poly--arginine on the nasal absorption of fluorescein isothiocyanate-dextran in rats. *Eur J Pharm Biopharm.* 52(1), 21-30.

Moinard-Checot, D., Chevalier, Y., Briancon, S., Beney, L., Fessi, H., 2008. Mechanism of nanocapsules formation by the emulsion-diffusion process. *J Colloid Interface Sci.* 317(2), 458-468.

Moolenaar, A.J., van Slooten, H., van Seters, A.P., Smeenk, D., 1981. Blood levels of o,p'-ddd following administration in various vehicles after a single dose and during long-term treatment. *Cancer Chemother Pharmacol.* 7(1), 51-54.

Moy, R.H., 1961. Studies of the pharmacology of o,p'ddd in man. *J Lab Clin Med.* 58, 296-304.

Mueller, E.A., Kovarik, J.M., van Bree, J.B., Tetzloff, W., Grevel, J., Kutz, K., 1994. Improved dose linearity of cyclosporine pharmacokinetics from a microemulsion formulation. *Pharm Res.* 11(2), 301-304.

Mullerad, M., Dickstein, G., Shechner, C., Meyer, G., Moskovitz, B., Nativ, O., 2006. Long-term follow-up of adrenocortical carcinoma patients treated with adjuvant low-dose mitotane (o, p', -ddd). *Eur Urol Suppl.* 5(2), 150-150.

Nelson, A.A., Woodard, G., 1949. Severe adrenal cortical atrophy (cytotoxic) and hepatic damage produced in dogs by feeding 2,2-bis(p-chlorophenyl)-1,1- dichloroethane (ddd or tde). *Virchows Archiv fuer Pathologische Anatomie und Physiologie und fuer Klinische Medizin.* 48, 387-394.

Neuman, O., Bruckert, E., Chadarevian, R., Jacob, N., Turpin, G., 2001. [hepatotoxicity of a synthetic cortisol antagonist: Op'ddd (mitotane)]. *Therapie.* 56(6), 793-797.

Nichols, J., Hennigar, G., 1957. Studies on ddd, 2,2-bis (parachlorophenyl)-1, 1-dichloroethane. *Exp. Med. Surg.* 15(4), 310-316.

Nornoo, A.O., Zheng, H.A., Lopes, L.B., Johnson-Restrepo, B., Kannan, K., Reed, R., 2009. Oral microemulsions of paclitaxel: In situ and pharmacokinetic studies. *Eur J Pharm Biopharm.* 71(2), 310-317.

Norris, D.A., Puri, N., Sinko, P.J., 1998. The effect of physical barriers and properties on the oral absorption of particulates. *Adv Drug Deliv Rev.* 34(2-3), 135-154.

O'Donnell, P.B., McGinity, J.W., 1997. Preparation of microspheres by the solvent evaporation technique. *Adv Drug Deliv Rev.* 28(1), 25-42.

O'Driscoll, C.M., 2002. Lipid-based formulations for intestinal lymphatic delivery. *Eur J Pharm Sci.* 15(5), 405-415.

Pade, V., Stavchansky, S., 1998. Link between drug absorption solubility and permeability measurements in caco-2 cells. *J Pharm Sci.* 87(12), 1604-1607.

Pappo, J., Ermak, T.H., 1989. Uptake and translocation of fluorescent latex particles by rabbit peyer's patch follicle epithelium: A quantitative model for m cell uptake. *Clin Exp Immunol.* 76(1), 144-148.

Park, J.G., Kramer, B.S., Steinberg, S.M., Carmichael, J., Collins, J.M., Minna, J.D., Gazdar, A.F., 1987. Chemosensitivity testing of human colorectal carcinoma cell lines using a tetrazolium-based colorimetric assay. *Cancer Res.* 47(22), 5875-5879.

Peltier, S., Oger, J.F., Lagarce, F., Couet, W., Benoit, J.P., 2006. Enhanced oral paclitaxel bioavailability after administration of paclitaxel-loaded lipid nanocapsules. *Pharm Res.* 23(6), 1243-1250.

Peppas, N.A., Buri, P.A., 1985. Surface, interfacial and molecular aspects of polymer bioadhesion on soft tissues. *J Control Release.* 2, 257-275.

Porter, C., Kaukonen, A.M., Taillardat-Bertschinger, A., Boyd, B.J., O'Connor, J.M., Edwards, G.A., Charman, W.N., 2004. Use of in vitro lipid digestion data to explain the in vivo performance of triglyceride-based oral lipid formulations of poorly water-soluble drugs: Studies with halofantrine. *J Pharm Sci.* 93(5), 1110-1121.

Porter, C.J., Charman, S.A., Charman, W.N., 1996. Lymphatic transport of halofantrine in the triple-cannulated anesthetized rat model: Effect of lipid vehicle dispersion. *J Pharm Sci.* 85(4), 351-356.

Pouton, C.W., 1985. Self-emulsifying drug delivery systems: Assessment of the efficiency of emulsification. *Int J Pharm.* 27(2-3), 335-348.

Pouton, C.W., 1997. Formulation of self-emulsifying drug delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev.* 25(1), 47-58.

Pouton, C.W., 2006. Formulation of poorly water-soluble drugs for oral administration: Physicochemical and physiological issues and the lipid formulation classification system. *Eur J Pharm Sci.* 29(3-4), 278-287.

Pouton, C.W., Porter, C.H.J., 2008. Formulation of lipid-based delivery systems for oral administration: Materials, methods and strategies. *Adv Drug Deliv Rev.* 60(6), 625-637.

Prego, C., Fabre, M., Torres, D., Alonso, M.J., 2006. Efficacy and mechanism of action of chitosan nanocapsules for oral peptide delivery. *Pharm Res.* 23 (3), 549-556.

Prego, C., Garcia, M., Torres, D., Alonso, M.J., 2005. Transmucosal macromolecular drug delivery. *J Control Release.* 101(1-3), 151-162.

Puisieux, F., Roblot-Treupel, L., 1989. Vectorisation et vecteurs de médicaments. *S.T.P. Pharma. Sciences.* 5, 107-113.

Quan, Y.S., Hattori, K., Lundborg, E., Fujita, T., Murakami, M., Muranishi, S., Yamamoto, A., 1998. Effectiveness and toxicity screening of various absorption enhancers using caco-2 cell monolayers. *Bio Pharm Bull.* 21(6), 615-620.

Quintanar-Guerrero, D., Fessi, H., Allemann, E., Doelker, E., 1996. Influence of stabilizing agents and preparative variables on the formation of poly(-lactic acid) nanoparticles by an emulsification-diffusion technique. *Int J Pharm.* 143(2), 133-141.

Reif, V.D., Sinsheimer, J.E., Ward, J.C., Schteingart, D.E., 1974. Aromatic hydroxylation and alkyl oxidation in metabolism of mitotane (o,p'-ddd) in humans. *J Pharm Sci.* 63(11), 1730-1736.

Rodrigues, J.M., Fessi, H., Bories, C., Puisieux, F., Devissaguet, J.p., 1995. Primaquine-loaded poly(lactide) nanoparticles: Physicochemical study and acute tolerance in mice. *Int J Pharm.* 126(1-2), 253-260.

Saint Ruth, H., Attwood, D., Ktistis, G., Taylor, C.J., 1995. Phase studies and particle size analysis of oil-in-water phospholipid microemulsions. *Int J Pharm.* 116(2), 253-261.

Sanders, E., Ashworth, C.T., 1961. A study of particulate intestinal absorption and hepatocellular uptake. Use of polystyrene latex particles. *Exp Cell Res.* 22, 137-145.

Scherer, D., Mooren, F.C., Kinne, R.K., Kreuter, J., 1993. In vitro permeability of pbca nanoparticles through porcine small intestine. *J Drug Targeting.* 1(1), 21-27.

Serajuddin, A., Sheen, P.C., Mufson, D., Bernstein, D.F., Augustine, M.A., 1988. Effect of vehicle amphiphilicity on the dissolution and bioavailability of a poorly water-soluble drug from solid dispersions. *J Pharm Sci.* 77(5), 414-417.

Sha, X., Yan, G., Wu, Y., Li, J., Fang, X., 2005a. Effect of self-microemulsifying drug delivery systems containing labrasol on tight junctions in caco-2 cells. *Eur J Pharm Sci.* 24(5), 477-486.

Sha, X., Yan, G., Wu, Y., Li, J., Fang, X., 2005b. Effect of self-microemulsifying drug delivery systems containing labrasol on tight junctions in caco-2 cells. *European Journal of Pharmaceutical Sciences.* 24, 477-486.

Shafiq, S., Shakeel, F., Talegaonkar, S., Ahmad, F.J., Khar, R.K., Ali, M., 2007. Development and bioavailability assessment of ramipril nanoemulsion formulation. *Eur J Pharm Biopharm.* 66(2), 227-243.

Shah, N.H., Carvajal, M.T., Patel, C.I., Infeld, M.H., Malick, A.W., 1994. Self-emulsifying drug delivery systems (sedds) with polyglycolized glycerides for improving in vitro dissolution and oral absorption of lipophilic drugs. *Int J Pharm.* 106(1), 15-23.

Shiau, Y.F., 1990. Mechanism of intestinal fatty acid uptake in the rat: The role of an acidic microclimate. *J Physiol.* 421, 463-474.

Shono, Y., Nishihara, H., Matsuda, Y., Furukawa, S., Okada, N., Fujita, T., Yamamoto, A., 2004. Modulation of intestinal p-glycoprotein function by cremophor el and other surfactants by an in vitro diffusion chamber method using the isolated rat intestinal membranes. *J Pharm Sci.* 93(4), 877-885.

Sonaje, K., Lin, Y.-H., Juang, J.-H., Wey, S.-P., Chen, C.-T., Sung, H.-W., 2009. In vivo evaluation of safety and efficacy of self-assembled nanoparticles for oral insulin delivery. *Biomaterials*. 30(12), 2329-2339.

Strickley, R.G., 2004. Solubilizing excipients in oral and injectable formulations. *Pharm Res*. 21(2), 201-230.

Tarr, B., Yalkowsky, S.H., 1989. Enhanced intestinal absorption of cyclosporine in rats through the reduction of emulsion droplet size. *Pharm Res*. 6(1), 40-43.

Terzolo, M., Angeli, A., Fassnacht, M., Daffara, F., Tauchmanova, L., Conton, P.A., Rossetto, R., Buci, L., Sperone, P., Grossrubatscher, E., Reimondo, G., Bollito, E., Papotti, M., Saeger, W., Hahner, S., Koschker, A.C., Arvat, E., Ambrosi, B., Loli, P., Lombardi, G., Mannelli, M., Bruzzi, P., Mantero, F., Allolio, B., Dogliotti, L., Berruti, A., 2007. Adjuvant mitotane treatment for adrenocortical carcinoma. *N Engl J Med*. 356(23), 2372-2380.

Terzolo, M., Pia, A., Berruti, A., Osella, G., Ali, A., Carbone, V., Testa, E., Dogliotti, L., Angeli, A., 2000. Low-dose monitored mitotane treatment achieves the therapeutic range with manageable side effects in patients with adrenocortical cancer. *J Clin Endocrinol Metab*. 85(6), 2234-2238.

Touitou, Y., Bogdan, A., Legrand, J.C., Desgrez, P., 1977. [metabolism of o,p'-ddd (mitotane) in human and animals. Actual notions and practical deductions (author's transl)]. *Ann Endocrinol (Paris)*. 38(1), 13-25.

Trainer, P.J., Besser, M., 1994. Cushing's syndrome. Therapy directed at the adrenal glands. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 23(3), 571-584.

Trotta, M., Gallarate, M., Pattarino, F., Morel, S., 2001. Emulsions containing partially water-miscible solvents for the preparation of drug nanosuspensions. *J Control Release*. 76(1-2), 119-128.

Tuleu, C., Newton, M., Rose, J., Euler, D., Saklatvala, R., Clarke, A., Booth, S., 2004. Comparative bioavailability study in dogs of a self-emulsifying formulation of progesterone presented in a pellet and liquid form compared with an aqueous suspension of progesterone. *J Pharm Sci*. 93(6), 1495-1502.

Tullner, W., 1970. Adrenal atrophy effects in animals. In : Proceedings of the chemotherapy conference on ortho para' ddd. Edited by le broder, sk carter, bethesda. Cancer therapy Evaluation Branch, N. C. I. 6-16.

Uekama, K., Hirayama, F., Irie, T., 1998. Cyclodextrin drug carrier systems. *Chemical Reviews (Washington, D. C.)*. 98(5), 2045-2076.

Van Natta, F.J., Hill, J.W., Carruthers, W.H., 1934. Polymerization and ring formation, epsilon-caprolactone and its polymers. *J Am Chem Soc*. 56, 455-459.

van Slooten, H., Moolenaar, A.J., van Seters, A.P., Smeenk, D., 1984. The treatment of adrenocortical carcinoma with o,p'-ddd: Prognostic implications of serum level monitoring. *Eur J Cancer Clin Oncol*. 20(1), 47-53.

Vonderscher, J., Meinzer, A., 1994. Rationale for the development of sandimmune neoral. *Transplant Proc.* 26(5), 2925-2927.

Wallace, E.Z., Silverstein, J.N., Villadolid, L.S., Weisenfeld, S., 1961. Cushing's syndrome due to adrenocortical hyperplasia. Treatment with an inhibitor of adrenocortical secretions. *N Engl J Med.* 265, 1088-1093.

Watson, A.D., Rijnberk, A., Moolenaar, A.J., 1987. Systemic availability of o,p'-ddd in normal dogs, fasted and fed, and in dogs with hyperadrenocorticism. *Res Vet Sci.* 43(2), 160-165.

Wedermeyer, G., 1967. Dechlorination of 1,1,1-trichloro-2, 2-bis (p-chlorophenyl) ethane by *aerobacter aerogenes* i. Metabolic products. *Appl. Microbiol.* 15(3), 569-574.

Wils, P., Warnery, A., Phung-Ba, V., Scherman, D., 1994. Differentiated intestinal epithelial cell lines as in vitro models for predicting the intestinal absorption of drugs. *Cell Biol Toxicol.* 10(5-6), 393-397.

Yang, M., Cui, F., You, B., You, J., Wang, L., Zhang, L., Kawashima, Y., 2004. A novel pH-dependent gradient-release delivery system for nitrendipine: I. Manufacturing, evaluation in vitro and bioavailability in healthy dogs. *J Control Release.* 98(2), 219-229.

Yang, Y., Faustino, P.J., Volpe, D.A., Christopher, D., Ellison, C.D., Lyon, R.C., Yu, L.X., 2007. Biopharmaceutics classification of selected beta-blockers: Solubility and permeability class membership. *Mol Pharm.* 4(4), 608-614.

Yee, S., 1997. In vitro permeability across caco-2 cells (colonic) can predict in vivo (small intestinal) absorption in man--fact or myth. *Pharm Res.* 14(6), 763-766.

Yoshikawa, H., Takada, K., Muranishi, S., 1984. Molecular weight dependence of permselectivity to rat small intestinal blood-lymph barrier for exogenous macromolecules absorbed from lumen. *J Pharm Dyn.* 7(1), 1-6.

Zhang, P., Liu, Y., Feng, N., Xu, J., 2008. Preparation and evaluation of self-microemulsifying drug delivery system of oridonin. *Int. J. Pharm.* 355(1-2), 269-276.

RESUME

Le mitotane ou *o,p'*-DDD est un dérivé organochloré très peu soluble dans l'eau. Il est utilisé dans le traitement du cancer corticosurrénalien métastasé ou inopérable (Lysodren®). En thérapeutique, il est nécessaire d'utiliser de fortes doses pour atteindre généralement au bout de trois mois, la mitotanémie efficace. Cela entraîne le plus souvent, des effets indésirables gastroduodénaux et neuromusculaires, qui rendent les patients très peu compliants.

L'objectif principal de cette thèse est de mettre au point, d'évaluer et de comparer les différentes formulations de mitotane afin d'améliorer la biodisponibilité du mitotane par rapport à la forme conventionnelle Lysodren®. Dans cette optique, le but recherché en clinique humaine serait de concevoir une forme galénique pouvant permettre d'utiliser de faibles doses journalières afin d'éviter les effets indésirables liés à la toxicité cumulative du mitotane. Pour cela, dans le but d'augmenter sa solubilité et de le rendre plus biodisponible, nous avons encapsulé le mitotane sous formes de particules polymériques et de microémulsions.

Nous avons préparé des nanocapsules à partir de polymères biodégradables (la poly-epsilon-caprolactone) (PCL) et d'une association de PCL et de polymères non biodégradables (L'Eudragit® RL). Nous avons également préparé des microparticules de PCL et des systèmes autoémulsionnants ou SMEDDS.

L'évaluation des caractéristiques physico-chimiques des particules montre des diamètres de 300 nm pour les nanocapsules et pour les microparticules, des diamètres variant de 40 à 76 µm. Le *potentiel zêta* est négatif pour les particules de PCL et positif pour celles associant les polymères PCL et RL. Pour les microémulsions, les diagrammes pseudoternaires ont permis le choix d'une association comportant du Capryol®, Tween® 20 et Crémophor® EL (33, 33, 33%). Les microémulsions ont un diamètre d'environ 40 nm. Les profils de libération *in vitro* du mitotane montrent une cinétique rapide et une quantité de mitotane libérée plus importante pour les microémulsions et les formes particulières par rapport à la forme conventionnelle Lysodren®.

De même, la réalisation de la pharmacocinétique à dose unique de 100 mg/kg chez des lapins montre des biodisponibilités relatives de 339% plus importantes pour les microémulsions, 195% pour les nanocapsules et 187% pour les microparticules. La quantification du mitotane absorbé dans des modèles Caco-2 montre une absorption complète du mitotane au bout de 4h lorsque le mitotane est formulé sous forme de microémulsions. Pour les microparticules et les nanocapsules, 50 et 45% de la dose initiale ont été respectivement absorbées par les cellules Caco-2. Cette évaluation sur le modèle Caco-2 a également confirmé le faible taux de passage de la poudre de mitotane (10%). Enfin, la réalisation des études de passage sur des coupes de jéjunum de rat en chambre de Ussing confirme que la quantité de mitotane qui a diffusé à travers la membrane jéjunale à partir des microémulsions est 5 fois supérieure à celle obtenue à partir de la poudre de mitotane.

En conclusion, les microémulsions présentent un intérêt comme forme orale pour améliorer la biodisponibilité du mitotane. Elles ont pour avantage de multiplier la biodisponibilité par un facteur 3 chez le lapin et sont de fabrication peu coûteuse. Elles constituent une réelle alternative à la forme conventionnelle Lysodren® disponible actuellement sur le marché européen.

MOTS CLES : Mitotane-Microémulsions-Nanocapsules-Microparticules-Pharmacocinétique-Chambre de Ussing-Caco-2