

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique
Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou
Faculté de médecine
Département de pharmacie

ANNEE : 2020-2021

N° d'ordre :



THÈSE

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR

En sciences médicales

Spécialité : Pharmacie galénique

Titre

LYOPHILISATION D'UNE NANOEMULSION : APPLICATION A DES PRINCIPES ACTIFS PEU SOLUBLES

Soutenu le 26 Décembre 2021 par :

Fetta KESSAL

Devant le jury composé de :

M^{me} le Professeure Barkahoum ALAMIR	Université d'Alger 1	Présidente
M^r le Professeur Karim HOUALI	UMMTO	Examineur
M^r le Professeur Abdelhakim BOUDENDOUNA	Université d'Alger 1	Examineur
M^r le Professeur Henni CHADER	Université d'Alger 1	Examineur
M^{me} le Professeure Fatma Zohra GHANASSI	Université d'Alger 1	Directrice de thèse

A mon père, mon héros, cet homme exceptionnel et exemplaire,

A ma mère, mon amie, ma confidente,

A ma sœur, mon soutien inconditionnel,

A mon frère, mon meilleur ami,

A ma belle-sœur, en signe de reconnaissance et de gratitude,

A mon adorable nièce, avec tout mon amour,

A mon mari et mes enfants, mon carburant, ma raison de vivre,

A toute ma famille,

Avec toute mon affection.

Je vous dédie cette thèse.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier tous les membres du jury d'avoir accepté de juger mon travail de thèse ; pour votre dévouement et lecture attentive.

*Au Professeure **Alamir Barkahoum**, Professeure en toxicologie de la faculté de médecine d'Alger; vous me faites l'honneur de venir présider ma soutenance de thèse. Recevez tous mon respect et l'expression de ma parfaite reconnaissance.*

*A ma Directrice de thèse, Professeure **Ghanassi Fatma Zohra**, Cheffe de service du laboratoire de pharmacie galénique d'Alger. Je vous remercie d'avoir accepté de diriger ce travail, pour le temps que vous m'avez consacré et pour la liberté que vous m'avez accordé pour mener jusqu'au bout mes recherches. Vos conseils avisés et critiques scientifiques, ainsi que vos encouragements et orientations m'ont été d'un grand soutien. Veuillez trouver ici l'expression de mes sentiments les plus respectueux. Aucun mot ne pourrait exprimer ma gratitude et mon respect.*

*Au Professeur **Houali Karim**, Directeur du Laboratoire de Biochimie Analytique et Biotechnologies (LABAB) de l'Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou ; vous me faites l'honneur de siéger parmi le jury et d'évaluer mon travail.*

*Toute ma reconnaissance et l'expression de mon profond respect vont également au Professeur **Chader Henni**, Professeur en pharmacologie de l'Université d'Alger 1;
Vous étiez attentif et bienveillant, vous avez mis à ma disposition l'essentiel pour mener à bien les essais in vivo. Votre patience durant la période de la COVID m'a beaucoup aidé. Recevez toute ma gratitude et ma reconnaissance pour l'honneur que vous me faites en siégeant parmi les membres du jury.*

*Mes plus vifs remerciements vont également au Professeur **Boudendouna Abdelhakim**, Professeur en pharmacie galénique de l'Université d'Alger 1;
Merci d'être présent parmi le jury, vous me faites l'honneur d'examiner ce travail. Veuillez trouver ici l'expression de ma sincère reconnaissance.*

Mes remerciements s'adressent également :

*Au Professeur **Benmounah Abdelbaki**, Professeur en Génie des procédés et Directeur de l'Unité de Recherche, Matériaux, Procédés et Environnement (URMPE) de l'Université M'hamed Bougara de Boumerdès;*

Je tenais à vous remercier de m'avoir ouvert les portes de votre laboratoire, ce qui m'a permis de terminer en beauté mon travail. Votre gentillesse et positivité n'ont pas d'égal. Veuillez trouver ici le témoignage de ma profonde gratitude pour votre soutien continu tout au long de ces années.

*Au Professeur **Ait Amar Hamid**, Professeur en sciences et techniques en procédés chimiques et Directeur du laboratoire du génie des procédés à l'Université des Sciences et Technologie Houari Boumediène;*

Un grand merci pour votre accueil, votre disponibilité et gentillesse. Je n'oublierai pas de remercier également votre équipe qui était aux petits soins avec moi pendant toute la période de caractérisation.

*Je remercie également le Professeur **Mansouri Kamel**, Professeur en pharmacologie de la faculté de médecine d'Alger; de m'avoir ouvert accès à l'agence national des produits pharmaceutiques et de m'avoir permis de mener jusqu'au bout mes essais.*

*Mes remerciements les plus distingués vont au Docteur **Ali Said**, maitre-assistant en biochimie de l'université d'Alger pour avoir répondu présent et m'avoir aidé à réaliser la partie analyse biochimique des essais in vivo. Je vous souhaite une belle réussite professionnelle.*

*Au Professeur **Chaouchi Ahcene**, Directeur du Laboratoire de Chimie Appliquée et Génie Chimique de l'UMMTO de m'avoir permis de réaliser les lectures des absorbances sur spectrophotomètre UV-Visible ainsi qu'aux membres de votre équipe qui m'ont assisté, à leur tête Monsieur **Halouane**.*

*Au Docteur **Touzouirt Saida**, maitre de conférences au département du génie des procédés industriels de l'UMBB, pour ses orientations et ses encouragements.*

Je tiens à associer à ces remerciements :

*Toute l'équipe du laboratoire de pharmacie galénique de la faculté de médecine, Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou, à leur tête Madame **Hadjem Zohra** et **Bouzar Ouahiba**, merci pour vos mots d'encouragements, pour votre soutien inconditionnel. Merci pour les personnes formidables que vous êtes. Soyez assurées de ma profonde amitié.*

*Mme **Semsoum** du laboratoire du génie des procédés pour avoir été si gentillement disponible, Monsieur **Lebad** d'avoir été présent durant les analyses sur le Nanosizer[®]. Mes remerciements s'adressent également à **Asma** et à Madame **Terkmani** de la faculté de biologie de l'USTHB. Un grand merci pour l'équipe du laboratoire de pharmaco-toxicologie de l'Agence national des produits pharmaceutiques. Au Docteur **Ammi**, pour sa présence attentive, à **Fahima** pour ses idées lumineuses, à **Nahla**, pour les discussions scientifiques, à **Kenza** pour son aide et sa disponibilité et enfin à **Rabah** de m'avoir accompagnée tout au long des essais *in vivo*, merci d'avoir pris soins de mes rats.*

*Je n'oublierai pas de remercier mon confrère Dr **Djellouli Salim**, maitre-assistant hospitalo-universitaire en pharmacologie de l'Université Saad Dahlab de Blida, pour son assistance sans faille durant l'étape éprouvante des prélèvements, ta disponibilité et ton aide ont été si précieuses. Je te remercie vivement et te souhaite plein succès.*

Enfin, je voudrais remercier les membres de ma famille et amis pour m'avoir soutenue tout au long de ces années. Merci pour votre patience et confiance.

TABLE DES MATIERES

Glossaire	i
Liste des abréviations et symboles	iii
Liste des figures	vii
Liste des tableaux	xiii
INTRODUCTION GENERALE	1
OBJECTIFS	5
PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE	7
1 Définitions	9
1.1 Les émulsions	9
1.2 Notion d'émulsification.....	11
1.3 Classification des émulsions	12
1.4 Stabilité des émulsions	14
1.4.1 Crémage et sédimentation	15
1.4.2 Flocculation.....	17
1.4.3 Mûrissement d'Ostwald	18
1.4.4 Coalescence	20
1.4.5 Inversion de phase	21
1.5 Agents émulsionnants.....	22
1.6 Rôle des surfactants dans la formation des émulsions	25
2 Formulation des émulsions.....	27
2.1 Choix du type d'émulsion	27
2.2 Choix de la phase huileuse ou phase organique	28
2.3 Consistance de l'émulsion.....	29
2.4 Sélection des émulsionnants.....	31
2.5 Inversion de phase	34
3 Nanoémulsions.....	35
3.1 Définitions	35
3.2 Avantages et inconvénients	38

3.3	Propriétés des nanoémulsions	40
3.4	Structure et formulation des nanoémulsions	42
3.5	Nanoémulsification	44
3.5.1	Matières premières et excipients	45
3.5.1.1	Huiles /lipides.....	45
3.5.1.2	Phase aqueuse.....	49
3.5.1.3	Surfactifs	50
3.5.1.4	Co-surfactants.....	56
3.5.1.5	Stabilisants.....	56
3.5.1.6	Texturants	56
3.5.1.7	Autres composants	57
3.6	Méthodes de préparation des nanoémulsions et contraintes de formulation	58
3.6.1	Méthode d'homogénéisation à haute pression et méthode à ultrasons.....	59
3.6.2	Microfluidisation	64
3.6.3	Méthodes de basse énergie	64
3.6.3.1	Emulsification spontanée.....	65
3.6.3.2	Méthode par inversion de la température de phase (TIP).....	66
3.6.4	Etudes comparatives des méthodes de nanoémulsification et limitations	68
3.6.5	Critères de choix d'un procédé de nanoémulsification et paramètres influençant	71
3.7	Attributs qualité et principales caractérisations des nanoémulsions	75
3.7.1	Analyse de la taille des gouttelettes et potentiel zêta	76
3.7.2	Etude morphologique	78
3.7.3	Indice de polydispersité.....	79
3.7.4	Mesure du pH	79
3.7.5	Spectroscopie infra-rouge.....	79
3.7.6	Stabilité des NEs	80
3.8	Nanoémulsions et applications	82
3.8.1	Nanoémulsions orales.....	82
3.8.2	Applications intranasales.....	82

3.8.3	Applications topiques et transdermiques	83
3.8.4	Applications parentérales	83
3.8.5	Applications pulmonaires.....	84
3.8.6	Applications en phytothérapie	84
3.8.7	Nanoémulsions à usage antimicrobien	87
3.9	Les nanoémulsions brevetées	88
3.10	Devenir in vivo des nanoémulsions par voie orale.....	90
3.10.1	Cinétique de libération du principe actif	90
3.10.2	Devenir in vivo des nanoémulsions.....	92
4	Rappels biopharmaceutiques et Biopharmaceutical Classification System (BCS)	94
4.1	Devenir in vivo des médicaments et système L.A.D.M.E.....	95
4.2	Biopharmaceutical Classification System (B.C.S).....	95
4.3	Stratégies d'amélioration de la biodisponibilité des médicaments.....	96
4.3.1	Impact des nanoparticules sur le devenir in vivo d'un médicament.....	96
4.3.1.1	Impact sur l'absorption.....	97
4.3.1.2	Impact sur la distribution.....	97
4.3.1.3	Impact sur le métabolisme.....	97
4.3.1.4	Impact sur l'élimination	98
5	Encapsulation des molécules faiblement solubles et nanoémulsions	98
6	Lyophilisation des nanoémulsions	99
6.1	Principe de la lyophilisation et intérêts	99
6.2	Diagramme de changement de phase	100
6.3	Equipement.....	101
6.4	Etapas de lyophilisation.....	101
6.4.1	Congélation	102
6.4.2	Dessiccation primaire	102
6.4.3	Dessiccation secondaire.....	102
6.5	Lyophilisation des systèmes dispersés	103

6.6	Lyophilisation des nanoémulsions	104
7	Généralités sur la méthodologie des plans d'expériences (MPE).....	104
7.1	Définitions	104
7.2	Etapes	105
8	Outils.....	106
9	Applications de la méthodologie de surface de réponses dans le développement de nanoémulsions encapsulant des molécules faiblement solubles dans l'eau	106
	PARTIE EXPERIMENTALE	109
	CHAPITRE I : Approche d'optimisation de la formulation de la nanoémulsion	110
	Introduction	111
1	Essais d'orientation pour la production d'une nanoémulsion stable ..	112
1.1	Etape 1	114
1.2	Etape 2	114
1.3	Etape 3	115
1.4	Etape 4	116
1.5	Etape 5	116
1.6	Etape 6	118
1.7	Etape 7	119
1.8	Etape 8	120
2	Formulation et préparation des nanoémulsions à base de Polyvinylalcool et de SDS en présence du Tween®80.....	129
2.1	Principe de la méthode sélectionnée : émulsification spontanée et mécanisme de stabilisation	129
2.2	Mode opératoire	130
2.3	Choix de la composition qualitative et quantitative et paramètres opératoires	131
2.3.1	Choix du tensioactif (Tween®80)	132
2.3.2	Choix du rapport huile/solvant (H/S ou S_{mix})	132

2.3.3	Choix du rapport Tween® 80/PVA (R).....	132
2.3.4	Choix du stabilisateur (SDS).....	134
2.3.5	Choix du rapport phase organique/phase aqueuse.....	134
2.3.6	Choix de la température.....	135
2.3.7	Choix du temps et de la vitesse d'agitation.....	136
3	Approche de développement pharmaceutique d'une nanoémulsion stable en application de la méthodologie de surface de réponses	137
3.1	Matières premières et préparation de la nanoémulsion	139
3.2	Essais préliminaires : Etude des effets des conditions de formulation et optimisation	140
3.2.1	Choix du plan d'expérience.....	141
3.2.2	Choix des facteurs et définition du domaine expérimental	141
3.2.3	Choix et définition des réponses.....	142
3.2.4	Construction du plan de criblage pour les essais préliminaires.....	143
3.2.5	Construction du plan composite centré cubique.....	144
3.2.6	Fabrication et caractérisation des nanoémulsions	146
3.2.6.1	Matériels.....	146
3.2.6.2	Méthodes de caractérisation des nanoémulsions	147
3.2.7	Résultats et discussions	151
3.2.7.1	Analyse de criblage et étude statistique des résultats	152
3.2.7.2	Analyse des surfaces de réponses.....	155
	Conclusion	171
	CHAPITRE II : Stratégie d'optimisation du procédé de préparation des nanoémulsions.....	172
	Introduction	173
1	Problématique	173
2	Fabrication et méthodes de caractérisation des nanoémulsions	174
2.1	Matériels.....	174
2.2	Méthode de fabrication et caractérisations	174
2.2.1	Taille des gouttelettes, indice de polydispersité et potentiel zêta.....	175

2.2.2	Mesure du pH	175
2.2.3	Mesure de la turbidité.....	176
3	Choix des variables du process	176
3.1	Choix des facteurs	176
3.2	Choix des réponses.....	177
4	Etude de l'influence des paramètres opératoires sur les attributs qualité de la nanoémulsion	178
4.1	Construction du plan de criblage.....	178
4.2	Construction du plan de surface de réponse (optimisation)	179
4.3	Résultats et discussion.....	181
4.3.1	Analyse de criblage et étude statistique des résultats	181
4.3.2	Analyse des surfaces de réponses (optimisation)	185
4.3.2.1	Validation du modèle proposé.....	188
4.3.2.2	Facteurs significatifs.....	188
4.3.2.3	Analyse de la variance.....	189
4.3.2.4	Analyse des résidus	191
4.3.2.5	Expression du modèle mathématique.....	191
4.3.2.6	Phase d'optimisation	194
	Conclusion	197
	CHAPITRE III : Encapsulation de principes actifs faiblement solubles dans l'eau et essais in vivo	198
	Introduction	199
1	Nanoémulsion à base de PVA-Tween®80 et SDS pour encapsuler des molécules faiblement solubles dans l'eau.....	200
1.1	Protocole expérimental et mode d'encapsulation.....	200
1.2	Détermination de la taille moyenne des gouttelettes et du potentiel zêta après encapsulation des molécules candidates.....	201
1.3	Résultats et discussions	201

2	Essais in vivo pour l'évaluation de l'efficacité des NEs encapsulant le fénofibrate	202
2.1	Prérequis des essais in vivo	204
2.2	Matières premières, matériels et méthodes	205
2.2.1	Molécule candidate.....	205
2.2.2	Autres	206
2.2.3	Petits matériels et verreries.....	206
2.2.4	Matériel biologique et sélection des groupes d'animaux de laboratoire	206
2.2.4.1	Conditions d'élevage et préparation des lots.....	207
2.2.4.2	Pesée des rats.....	208
2.2.5	Méthodologie expérimentale	208
2.2.5.1	Induction du diabète de type 1 et contrôles des paramètres biochimiques.....	208
2.2.5.2	Traitement médicamenteux	212
2.2.6	Protocole expérimental.....	214
2.2.6.1	Conduite des prélèvements.....	215
2.2.6.2	Dosage des paramètres biochimiques.....	216
2.3	Résultats et discussions	216
2.3.1	Evolution de l'état général des rats et de leur poids corporel.....	216
2.3.2	Evolution du taux glycémique.....	224
2.3.3	Etudes de l'évolution des paramètres sanguins lipidiques	232
	Conclusion	234
	CHAPITRE IV : Approche de lyophilisation et application aux nanoémulsions.....	236
1	Problématique et approche proposée pour la lyophilisation de la nanoémulsion	237
2	Mise au point des microsphères à base d'alginate de sodium et de calcium véhiculant la nanoémulsion chargée en fénofibrate.....	241
2.1	Description des conditions de travail	241
2.1.1	Préparation de la nanoémulsion encapsulant le fénofibrate	241

2.1.2	Procédé de gélification ionotropique.....	242
2.1.3	Lyophilisation des billes d’alginate de calcium encapsulant la nanoémulsion	244
2.2	Matières premières, matériels et méthodes	245
2.2.1	Matières premières	245
2.2.2	Matériels.....	245
2.2.3	Méthodologie et protocole expérimental de la production des microsphères à partir de la NE.....	246
2.2.3.1	Cryodessiccation des billes d’alginate de calcium chargées en nanoémulsion	247
2.2.3.2	Préparation des microsphères d’alginate contenant la NE-FB	249
2.3	Caractérisation des billes d’Alginate de calcium chargées de nanoémulsion contenant le Fénofibrate (B-NE-FB)	250
2.3.1	Aspect macroscopique.....	250
2.3.2	Observation au microscope optique à caméra	251
2.3.3	Détermination du taux d’humidité résiduelle sur balance infrarouge	251
2.3.4	Observation au microscope électronique à balayage (MEB)	252
2.4	Résultats et discussions	253
2.4.1	Aspect macroscopique.....	253
2.4.2	Observation au microscope optique à caméra	255
2.4.3	Détermination du taux d’humidité résiduelle sur balance infrarouge	257
2.4.4	Observation au microscope électronique à balayage (MEB)	257
3	Evaluation des performances in vitro des billes d’alginate de calcium contenant la NE-FB.....	264
3.1	Intérêts de l’étude et principe	264
3.2	Démarche opératoire et méthodologie.....	265
3.2.1	Cinétique de dissolution	265
3.2.2	Prérequis à l’évaluation des performances in vitro des billes d’alginate de calcium ..	266
3.2.2.1	Formules de calculs	268
3.2.2.2	Expression des résultats.....	270
3.2.3	Mode opératoire des essais de performance in vitro	270
3.3	Résultats et discussions	271

3.3.1	Analyse des résultats de l'étude de performance in vitro de la Série N°1.....	271
3.3.2	Interprétation des résultats.....	275
3.3.3	Analyse des résultats de l'étude de performance in vitro de la Série N°2.....	277
	Discussion des résultats.....	282
	Conclusion générale et perspectives	284
	Références bibliographiques	289
	Annexes.....	327
	Résumé.....	376
	Abstract	377

Glossaire

Ad libitum	Ad libitum est une expression latine qui signifie littéralement « jusqu'à satisfaction », ou mieux, « à volonté ».
Cloud point	Température à laquelle un produit liquide limpide devient trouble ou opaque.
Composite	Un matériau composite est un assemblage d'au moins deux composants non miscibles dont les propriétés se complètent. Le nouveau matériau ainsi constitué, hétérogène, possède des propriétés que les composants seuls ne possèdent pas.
Cryoprotectrice	Propriété d'un excipient qui protège la formulation et maintient sa stabilité initiale.
Désolvatation	Phénomène physico-chimique qui signifie le déplacement d'un solvant de son soluté.
Domaine expérimental	C'est un espace expérimental où les facteurs appelés aussi variables définissent les points expérimentaux qui serviront à réaliser les essais.
Effet placebo	Correspond au résultat psycho-physiologique positif (bénéfique) constaté après l'administration d'une substance ou la réalisation d'un acte thérapeutique, indépendamment de l'efficacité intrinsèque attendue du traitement.
Emulgel	Un émugel est un gel à base émulsionnée.
Facteur	Variable expérimentale.
Gelosphères	Particules sphériques gélifiées.
Hydrogel	Un hydrogel est un gel dont la matrice est un réseau polymérique qui gonfle dans l'eau.
Matrice	En mathématique, ce terme signifie des tableaux regroupant les éléments et les données qui servent à interpréter les calculs. En pharmacie, un système matriciel est un support galénique constitué le plus souvent de polymère.
Métastable	Se dit d'un système colloïdale qui est thermodynamiquement instable, mais sur le plan macroscopique, il apparaît stable en raison notamment de l'action des tensioactifs.
Modèle polynomial	Permet de modéliser une relation de forme non linéaire entre la réponse (Y) et la ou les variables explicatives (X).

Plan d'expérience	C'est une suite ordonnée d'essais d'une expérimentation, chacun permettant d'acquérir de nouvelles connaissances en maîtrisant un ou plusieurs paramètres d'entrée pour obtenir des résultats validant un modèle.
Plurionics	Appelés aussi poloxamers. Ce sont des copolymères non-ioniques à trois blocs, possédant typiquement un bloc central « hydrophobe » de polypropylène glycol et deux blocs externes hydrophiles de polyéthylène glycol. Ils sont utilisés comme émulsifiants ou encore stabilisants.
Prémix	Opération de mélangeage d'une partie des composants qui se fait avant le mélange final afin de garantir une bonne dispersion et donc une uniformité du mélange.
Scoring	Codification
Sublimation	Correspond au passage de l'eau de l'état solide à l'état vapeur sans passer par l'état liquide.
Surfactant	Composé chimique appelé également agent tensioactif, se composant de molécules amphiphiles modifiant la tension interfaciale.
Template	Terme anglo-saxon qui veut dire « modèle ».
Topographie	La topographie est une représentation en illustration ou en image des formes ou des détails les plus fins.
Triglycérides à chaînes moyennes	C'est des triglycérides dans lequel les trois groupements hydroxyle du glycérol sont estérifiés par des acides gras à chaîne moyenne (6 à 12 atomes de carbone). Il est présent dans l'huile de noix de coco, l'huile de palme et le beurre.
Turbidité	La turbidité est une caractéristique d'un fluide transparent qui désigne la teneur en matières qui le troublent (matières en suspension ou matières colloïdales) et qui absorbent, diffusent ou réfléchissent la lumière.
Réponse	C'est une caractéristique ou spécification recherchée.
Réticulation	La réticulation est un phénomène qui correspond à la formation d'un ou de plusieurs réseaux tridimensionnels sous l'action d'agents réticulants.
Z-average	C'est une moyenne de distribution de taille, exprimée en nanomètre.

Liste des abréviations et symboles

®	: Symbole dont la lettre R représente le mot « Registered »
%m/m	: Pourcentage massique
[SDS]	: Concentration en Sodium Dodécyl Sulfate
ADN	: Acide Désoxyribonucléique
AF	: Acide Folique
AFM	: Atomic Force Microscopy
ANOVA	: Analyse de la variance
ANSM	: Agence National de la Santé et du Médicament
ATR	: Atorvastatine
BCS	: Biopharmaceutical Classification System
CH	: Code pays pour Suisse
CHOLT	: Cholestérol
CLHP	: Chromatographie Liquide à Haute Performance
CMC	: Concentration Micellaire Critique
CTAB	: Bromure de Cétyl Triméthyl Ammonium
DDL	: Degré de liberté
DLS	: Dynamic Light Scattering
DTAB	: Dodecyl Triméthyl Aminonium Bromide
E/H	: Eau dans l'huile
E/H/E	: Eau dans l'huile dans l'eau
EPI	: Emulsification par Inversion de Phase
FB	: Fénofibrate
FDA	: Food and Drug Administration
FR	: Code pays pour France
FTIR	: Fourier Transform Infrared Spectroscopy
g/dL	: Grammes/décilitre
GI	: Gastro-intestinal
GRAS	: Generally Recognized As Safe
H/E	: Huile dans l'eau
H/E/H	: Huile dans l'eau dans l'huile
H/H	: Huile dans l'huile
H/S	: Rapport huile/solvant

HDLc	: High Density Lipoproteins-Cholesterol
HLB	: Balance Hydrophile Lipophile
ICH	: International Conference of Harmonization
IP	: Intra-péritonéale
IUPAC	: International Union of Pure and Applied Chemistry
KHz	: Kilo Hertz
L.A.D.M.E	: Libération-Absorption-Distribution-Métabolisme-Elimination
LDLc	: Low Density Lipoproteins-Cholesterol
MCTs	: Methyl Chain Triglycerides
MEB	: Microscopie Electronique à Balayage
MET	: Microscopie Electronique à Transmission
MPE	: Méthodologie des Plans d'Expériences
MSR	: Méthodologie des Surfaces de Réponses
mV	: Millivolt
NA	: Non applicable
NE-AF	: Nanoémulsion encapsulant l'acide folique
NE-ATR	: Nanoémulsion encapsulant l'atorvastatine
NE-FB	: Nanoémulsion encapsulant le fénofibrate
NEs	: Nanoémulsions
nm	: Nanomètre
NP	: Nanoprécipitation
NPs	: Nanoparticules
NTU	: Nephelometric Turbidity Unit
OH	: Groupement hydroxyle
O/W	: Oil in Water
OWR	: Oil Water Ratio
PA	: Principe actif
PCL	: poly (ϵ -caprolactone)
PdI	: Indice de polydispersité
PEG	: Poly (éthylène glycol)
PEO	: Poly (éthylène-oxyde)
pH	: Potentiel d'hydrogène
PIC	: Méthode par Inversion de Composition

pKa	: Constante de dissociation acido-basique
PM	: Poids Moyen
PPARα	: Peroxisome Proliferator Activated Receptor de type alpha
Psi	: Poiseuille
PVA	: Alcool polyvinylique
QbD	: Quality By Design
Qsp	: Quantité suffisante pour
R	: Rapport des proportions de Tween [®] 80 sur PVA
SCE	: Somme des carrés des erreurs
SCF	: Somme des carrés du modèle
SDS	: Sodium Dodecyl Sulfate
SEM	: Scanning Electron Microscopy
SGF	: Simulated Gastric Fluid
SIF	: Simulated Intestinal Fluid
SNC	: Système Nerveux Central
SNEDDS	: Self nanoemulsified drug delivery system
SOR	: Surfactif Oil Ratio
SRE	: Système Réticulo-Endothéliale
STZ	: Streptozocine
T₀	: Temps zéro
TE	: Taux d'encapsulation
TCM	: Triglycérides à Chaines Moyennes
TEM	: Transmission Electron Microscopy
TGI	: Tractus Gastro-Intestinal
TIP	: Température d'Inversion de Phase
TPGS	: Tocopheryl Polyethylene Glycol 1000 Succinate
USA	: Code pays pour United States of America
USP	: United States Pharmacopea
UV-Vis	: UltraViolet-Visible
VLDL	: Very Low Density Lipoproteins
W/O	: Water in Oil
WO	: Abréviation de World pour les demandes de brevets
Zug	: Pour Zoug, ville en Suisse

λ : Lambda, pour longueur d'onde

Liste des figures

Listes des figures de la partie bibliographique

Figure 1. Représentation schématique d'une émulsion E/H (à gauche) et H/E (à droite) (Clint 1992).	13
Figure 2. Représentation schématique de l'agencement et empilement des gouttelettes et fraction volumique de la phase dispersée (gauche) image au microscope optique d'une émulsion H/E concentrée (droite) (Brochette 2013).	14
Figure 3. Les différentes instabilités des émulsions (Moussa 2019).	15
Figure 4. Représentation schématique du phénomène de floculation et stabilisation électrolytique (Hutin 2019).	17
Figure 5. Représentation schématique du mûrissement d'Ostwald (Singh 2017). Le transfert de la matière entraîne la disparition des gouttes les plus petites.	20
Figure 6. Etapes du processus de coalescence (Springinsfeld 2009).	21
Figure 7. a) Schéma d'un tensioactif b) positionnement d'un tensioactif à l'interface (Springinsfeld 2009).	23
Figure 8. Représentation schématique d'une émulsion de Pickering (a) angle de contact $\theta < 90^\circ$ dans une émulsion type H/E (b) angle de contact $\theta > 90^\circ$ dans une émulsion type E/H (Mollet 2001).	25
Figure 9. Evolution de la tension interfaciale en fonction de la concentration en surfactant (Lavaud 2013).	26
Figure 10. Variation de la stabilité de l'émulsion en fonction du pourcentage du surfactant dans le milieu (Tadros 2013).	34
Figure 11. Aspect macroscopique entre émulsion, microémulsion et nanoémulsion (Kale 2017).	36
Figure 12. Représentation schématique d'une émulsion type H/E encapsulant une molécule lipophile (a). Représentation schématique d'une émulsion E/H encapsulant des molécules hydrophiles (b) (Qadir 2016).	38
Figure 13. Macroémulsions (A) Nanoémulsions (B) (Qadir 2016).	42
Figure 14. Exemple de diagramme ternaire de nanoémulsion simplifiée à température et à pression constante. (1 Φ) : monophasique ; (2 Φ) : biphasique (Montenegro 2016).	43
Figure 15. Représentation schématique des différentes orientations du surfactif à l'interface H/E (Santana 2013).	44
Figure 16. Comparaison des diamètres moyens des particules obtenues par émulsification spontanée (SE) et technique d'émulsification par inversion de phase (EPI). La comparaison est faite sur des systèmes similaires (Ostertag 2012).	49
Figure 17. Différence structurale entre le Tween [®] 20 et le Tween [®] 80 (Shi 2015).	52
Figure 18. Influence du ratio surfactif-huile sur la taille des particules (a) et la distribution granulométrique (b) (Komaiko 2015a).	54

Figure 19. Représentation schématique de la morphologie (a) et du comportement des surfactants non ioniques sous l'effet de la température (b) (Leal-Calderon 2007).....	67
Figure 20. Administration de nanoémulsions par voie nasale et site d'action (Chatterjee 2019).	83
Figure 21. Nanoémulsions antimicrobiennes avec (a) des agents antimicrobiens liposolubles encapsulés et surfactant inerte (b) surfactant à activité antimicrobienne adsorbé à la surface et lipide inactif (c) surfactant et lipides antimicrobiens (Salvia-Trujillo 2017).....	88
Figure 22. Représentation schématique des différentes étapes de l'absorption des NEs orales depuis leur ingestion jusqu'à leur passage à travers la barrière gastro-intestinale (Singh 2017).....	92
Figure 23. Devenir in vivo des nanoémulsions intraveineuses (A) et transdermiques (B) (Singh 2017).	94
Figure 24. Diagramme d'état de l'eau pure et d'une solution contenant un soluté (Marin 2012).....	100
Figure 25. Schéma descriptif d'un lyophilisateur (Cook 2007).	101

Liste des figures du chapitre I

Figure I. 1. Principe illustré de l'émulsification spontanée pour la production d'une nanoémulsion type H/E : a) mise en contact entre la phase organique et aqueuse. b) diffusion du solvant dans la phase aqueuse et organisation du Tween [®] 80 autour des gouttelettes huileuses. Figure adaptée (Chang 2013).	124
Figure I. 2. Zetasizer 3000 HS, Malvern [®] pour la mesure du potentiel zêta.	126
Figure I. 3. Aspect macroscopique des émulsions obtenues. (a) Emulsion dont la composition correspond à la formule 16, (b) émulsion dont la composition correspond à la formule aux valeurs intermédiaires appelée « point au centre du domaine », (c) émulsion correspondante à la formule 17.	128
Figure I. 4. Schéma descriptif du principe de base de la méthode d'émulsification spontanée.	129
Figure I. 5. Représentation schématique du mécanisme proposé de la stabilisation polymérique exercée par le PVA (a) d'une nanoémulsion à base de Tween [®] 80 (b) et en présence du SDS.	130
Figure I. 6. Spectroscopie à transformée de Fourier sur l'appareil PERKIN ELMER [®] Spectrum Two.	133
Figure I. 7. Figure illustrant les conditions de préparation de la nanoémulsion.....	147
Figure I. 8. Turbidimètre HANNA instruments [®]	148
Figure I. 9. Technique d'habillage des grilles et de préparation de l'échantillon pour analyse au microscope électronique à transmission.	149
Figure I. 10. a) Microscope électronique à transmission EM900 Carl ZEISS [®] , b) écran d'observation du cliché, c) résultat de l'analyse au microscope.	150
Figure I. 11. Zetasizer Nano ZS [®] à droite de l'image en fonctionnement.	151
Figure I. 12. Représentation groupée des coefficients du modèle par facteur pour les réponses Y1 (épaisseur du gel) et Y2 (transparence).	153

Figure I. 13. Histogrammes de l'influence des coefficients sur l'épaisseur du gel (Y1).	154
Figure I. 14. Histogrammes de l'influence des coefficients sur la transparence (Y2).	154
Figure I. 15. Représentation groupée des coefficients normalisés pour l'analyse de surface de réponses.	156
Figure I. 16. Représentation graphique des valeurs observées (axes des ordonnées) en fonction des valeurs estimées (axes des abscisses) de l'épaisseur du gel (Y1).....	157
Figure I. 17. Représentation graphique des valeurs observées (axes des ordonnées) en fonction des valeurs estimées (axes des abscisses) de la transparence (Y2).....	157
Figure I. 18. Histogrammes de l'influence des coefficients sur l'épaisseur du gel (Y1).	158
Figure I. 19. Histogrammes de l'influence des coefficients sur la transparence (Y2).	159
Figure I. 20. Evolution des résidus (axes des ordonnées) en fonction des réponses prédites (axes des abscisses), (a) épaisseur du gel, (b) transparence.	162
Figure I. 21. Courbes iso-réponse représentant la variation de l'épaisseur du gel (Y1) et de la transparence (Y2) en fonction des variations de facteurs.....	164
Figure I. 22. Phase d'optimisation exécutée par le logiciel et solutions proposées à travers l'image scannée du logiciel. (a) propriétés désirées pour les réponses Y1 et Y2, (b) solutions proposées par l'optimiseur.	166
Figure I. 23. Nanoémulsion à base de PVA-Tween®80-SDS.....	168
Figure I. 24. Distribution des diamètres des nanogouttelettes de la formule sélectionnée à l'issue des essais préliminaires.....	169
Figure I. 25. Observation de la nanoémulsion au microscope électronique à transmission avec une magnification de 2800.....	170
Figure I. 26. Observation de la nanoémulsion au microscope électronique à transmission avec une magnification de 4800.....	170
Figure I. 27. Observation de la nanoémulsion au microscope électronique à transmission avec une magnification de 8000.....	171

Liste des figures du chapitre II

Figure II. 1. Flow chart ou schéma général du procédé de préparation des nanoémulsions.	175
Figure II. 2. Représentation groupée des coefficients par facteur pour les réponses Y1, Y2 et Y3. Taille des particules, indice de polydispersité et potentiel zêta, respectivement.	183
Figure II. 3. Histogrammes de l'influence des coefficients sur la taille des particules.	184
Figure II. 4. Histogrammes de l'influence des coefficients sur l'indice de polydispersité.	184
Figure II. 5. Histogrammes de l'influence des coefficients sur le potentiel zêta.	185
Figure II. 6. Représentation groupée des coefficients par facteur pour l'analyse de surface de réponses pour Y1 et l'optimisation du process.	187

Figure II. 7. Représentation graphique des valeurs observées en fonction des valeurs estimées de la taille des particules.	188
Figure II. 8. Histogrammes de l'influence des coefficients par facetur sur la taille des particules. ...	189
Figure II. 9. Evolution des résidus en fonction des réponses prédites de Y1.....	191
Figure II. 10. Courbes iso-réponse pour la taille des particules (Y1), (a) représentation graphique en 2D des variations de la réponse en fonction des variations des facteurs (b) représentation graphique en 4D des variations de la réponse en fonction des variations des facteurs T°_1 et t_1	193
Figure II. 11. Phase d'optimisation exécutée par le logiciel et solutions proposées à travers l'image scannée du logiciel, (a) propriétés désirées pour les réponses Y1, (b) solutions proposées par l'optimiseur, (c) Solutions renvoyées par l'optimiseur du logiciel Modde®6.	194
Figure II. 12. Nanoémulsion obtenue après optimisation des paramètres opératoires.....	196

Liste des figures du chapitre III

Figure III. 1. Préparation des groupes de rats à l'essai in vivo.	210
Figure III. 2. Préparation de la solution d'alloxane à raison de 150mg/Kg.	211
Figure III. 3. Préparation du plan de travail (A); Induction du diabète expérimental chez les rats par injection IP de l'alloxane (B).	211
Figure III. 4. Préparation de la charge médicamenteuse (A), administration per os de la dose médicamenteuse au rat (B).	213
Figure III. 5. Anesthésie au diéthyl éther.....	214
Figure III. 6. Suivi pondéral des rats.....	214
Figure III. 7. Préparation des rats anesthésiés au prélèvement.	215
Figure III. 8. Prélèvement rétrobulbaire chez le rat.	216
Figure III. 9. Evolution du poids moyen de chaque rat du lot 1 en fonction du temps.....	218
Figure III. 10. Evolution du poids moyen de chaque rat du lot 2 en fonction du temps.	219
Figure III. 11. Evolution du poids moyen de chaque rat du lot 3 en fonction du temps.	220
Figure III. 12. Evolution du poids moyen de chaque rat du lot 4 en fonction du temps.	221
Figure III. 13. Comparaison de l'évolution du poids moyen de chaque rat par lot (T0 : avant induction du diabète, TS10 : à la fin de l'étude).	222
Figure III. 14. Evolution du poids moyen de chaque lot de rats en fonction du temps.	223
Figure III. 15. Evolution de la glycémie du lot 1 pendant l'étude. Les rats portant code R4B, R5B ne sont pas représentés dans le graphe (a) et sa moyenne (b).	228
Figure III. 16. Evolution de la glycémie du lot 2 pendant l'étude. Les rats portant code R1A, R1B ne sont pas représentés dans le graphe (a) et sa moyenne (b).	229
Figure III. 17. Evolution de la glycémie du lot 3 pendant l'étude. Les rats portant code R1A, R1B et R3B ne sont pas représentés dans le graphe (a) et sa moyenne (b).	230

Figure III. 18. Evolution de la glycémie du lot 4 pendant l'étude. Les valeurs de la série 3 ainsi que les rats portant code R1B et R3B ne sont pas représentés dans le graphe (a) et sa moyenne (b).	231
Figure III. 19. Evolution du taux des triglycérides chez les rats pendant toute la durée d'étude.	234
Figure III. 20. Evolution du taux de cholestérol chez les rats pendant toute la durée d'étude.	234

Liste des figures du chapitre IV

Figure IV. 1. Tentative de lyophilisation directe de la nanoémulsion.....	238
Figure IV. 2. Lyophilisation d'un composite NE-Polymère-CaCl ₂ . a) Obtention d'une pastille. b) Obtention d'une poudre après broyage.....	238
Figure IV. 3. Reconstitution du composite. a) Poudre de composite, b) ajout de l'eau et reconstitution, c) obtention de l'hydrogel de départ.....	239
Figure IV. 4. Etapes de préparation des microsphères d'alginate de calcium.....	242
Figure IV. 5. Principe de réticulation de l'alginate par les ions calcium pour former le modèle de « boîtes à œuf » (Fernando 2020).....	243
Figure IV. 6. Schéma représentatif de la structure interne des gélisphères, a) structure matricielle des billes formées ; b) structure cœur-membrane des billes après réticulation ; c) représentation schématique de la composition d'une nanogouttelette.....	243
Figure IV. 7. Préparation de la lyophilisation des billes d'Alginate de calcium encapsulant le fénofibrate. a) lyophilisateur Cryo-Christ® 2-4 LD plus avant sa mise en marche, b) mise en place de l'échantillon et fermeture de l'enceinte, c) édition des valeurs de consignes pour la dessiccation secondaire.....	248
Figure IV. 8. Etapes de formulation des billes d'alginate de calcium par la méthode de gélification en goutte. a) Préparation des solutions, b) mise en forme des billes, c) maturation, d) filtration, e) lavage, f) Séchage de quelques minutes sur papier filtre, g) lyophilisation.....	250
Figure IV. 9. Analyse de la taille des microsphères au microscope optique à caméra OPTIKA®.	251
Figure IV. 10. Dessiccateur à infrarouges Mettler Toledo®TM HB43-S Halogen.	252
Figure IV. 11. Microscope électronique à balayage FEI® Versa 3D.....	253
Figure IV. 12. Ecran d'observation de l'analyse de la surface d'un échantillon de billes au microscope électronique à balayage.	253
Figure IV. 13. Différentes étapes de traitement des billes d'alginate et contrôle macroscopique. a) formation de billes de calcium d'Alginate dans le bain réticulant, b) étape de maturation des billes, c) récupération des billes après rinçage multiple à l'eau distillée, d) éliminer l'excès d'eau au moyen de papier filtre.	254
Figure IV. 14. Aspect des billes lyophilisées (a), test à l'écrasement (b), reprise de la taille initiale à la levée de la contrainte (c).	255
Figure IV. 15. Résultats de l'observation macroscopique des billes humides (a) et microscopique après lyophilisation (b) des billes préparées encapsulant le fénofibrate.....	256

Figure IV. 16. Appréciation de la structure poreuse et de la sphéricité conservée des microsphères après lyophilisation.....	257
Figure IV. 17. Conduite de l’essai de détermination du taux d’humidité résiduelle sur balance infrarouge. a) lecture en cours, b) stabilisation de la valeur et résultat final.....	257
Figure IV. 18. Préparation de l’échantillon pour analyses microscopiques et traitement d’images. .	259
Figure IV. 19. Microporosité des billes d’alginate de sodium.	259
Figure IV. 20. Coupe transversale de la microbille montrant l’organisation interne du réseau polymérique.....	260
Figure IV. 21. Coupe radiale montrant les canalicules du réseau (flèches blanches).	260
Figure IV. 22. a) Billes contenant NE-FB et b) sa coupe transversale.....	261
Figure IV. 23. Nanogouttelettes tapissant la structure interne de la microbille.	262
Figure IV. 24. Cliché montrant la localisation des nanogouttelettes.....	263
Figure IV. 25. Nanogouttelette huileuse à l’intérieur du réseau polymérique.	263
Figure IV. 26. Tailles des particules telles que mesurées par l’échelle intégrée du MEB.	264
Figure IV. 27. Dissolutest de marque SOTAX® AT7 Smart.....	266
Figure IV. 28. Spectrophotomètre UV-Visible à double faisceau SHIMADZU® UV-1601.....	266
Figure IV. 29. Lecture des échantillons après filtration et dilution.....	269
Figure IV. 30. Les différentes étapes du test de performance in vitro. a) Introduction des billes dans le vase, b) prélèvements des échantillons, c) filtration des échantillons.	271
Figure IV. 31. Courbes d’étalonnage à pH = 1,2 (à gauche) et à pH=6,8 (à droite), avec un coefficient de corrélation proche de 1.	272
Figure IV. 32. Profils de dissolution du fénofibrate dans le milieu acide des billes d’alginate chargée de fénofibrate (Série N°1).	274
Figure IV. 33. Comparaison des profils de dissolution des billes lyophilisées et des billes séchées à l’air libre en milieu acide pH=1,2 (A) et basique pH=6,8 (B). Profils de dissolution totale (C).	279
Figure IV. 34. Etat de surface et microrelief des billes séchées à l’air libre (aucune porosité).	280
Figure IV. 35. Etat de surface et microrelief des billes lyophilisées (porosité élevée).	281

Liste des tableaux

Liste des tableaux de la partie bibliographique

Tableau 1. Différents types d'émulsions et critères de classification (Danielsson 1981).	14
Tableau 2. Intervalles de valeurs HLB et leurs applications (Tadros 2013).	32
Tableau 3. Exemples de surfactants non ioniques et leurs valeurs HLB (la série des Tweens®) (Rowe 2006).....	33
Tableau 4. HLB requis pour chaque application (Tadros 2013).	33
Tableau 5. Comparaison entre nanoémulsions et microémulsions (Qadir 2016).....	36
Tableau 6. Liste des principales huiles utilisées dans le développement pharmaceutique des nanoémulsions (Qadir 2016).	48
Tableau 7. Surfactants utilisés dans la formulation des NEs et leur classification (Qadir 2016).....	51
Tableau 8. Exemples de co-surfactants utilisés dans la formulation des NEs et leurs principales caractéristiques (Qadir 2016).	56
Tableau 9. Liste non exhaustive des travaux antérieurs des NEs produites par des méthodes de haute énergie (Salvia-Trujillo 2017).	62
Tableau 10. Liste non exhaustive des travaux antérieurs des NEs produites par des méthodes de haute énergie (Salvia-Trujillo 2017) suite.....	63
Tableau 11. Exemples de nanoémulsions parentérales (Singh 2017).	86
Tableau 12. Récents brevets sur les nanoémulsions (http://patentstorm.us ; http://www.pharmacast.com ; Lovelyn 2011; Qadir 2016).	89
Tableau 13. Nanoémulsions commercialisées (Lovelyn 2011).....	90
Tableau 14. Système de classification biopharmaceutique (Amidon 1995; Yu 2002).	96

Liste des tableaux du chapitre I

Tableau I. 1. Composition qualitative des formules 1 et 2 à base d'O-xylène.....	114
Tableau I. 2. Tableau récapitulatif des premiers essais d'orientation.	121
Tableau I. 3. Tableau récapitulatif des premiers essais d'orientation (suite).	122
Tableau I. 4. Composition qualitative et quantitative des formules sélectionnées pour la suite des essais d'orientation.	125
Tableau I. 5. Formules à base d'huile de coco et adaptation du procédé de formulation.	125
Tableau I. 6. Résultats des mesures du potentiel zêta des formules finales des essais d'orientation.	127
Tableau I. 7. Domaine d'expérimentation pour l'obtention de nanoémulsions stables à base de PVA, SDS et T80.	128
Tableau I. 8. Présentation des variables de l'étude et caractéristiques.	142
Tableau I. 9. Caractéristiques des réponses enregistrées par le formulateur.....	142

Tableau I. 10. Présentation de la matrice du Plan de « Plackett et Burman » pour le criblage lors des essais préliminaires.....	143
Tableau I. 11. Présentation de la matrice du plan composite centré pour l'étude des surfaces de réponses en vue de l'optimisation de la formule lors des essais préliminaires.	145
Tableau I. 12. Réponses enregistrées lors des essais de criblage.	152
Tableau I. 13. Matrice du plan composite centré cubique et réponses enregistrées.....	155
Tableau I. 14. Analyse de la variance pour la réponse Y1 (épaisseur du gel) et Y2 (transparence)..	160
Tableau I. 15. Les effets des facteurs pour la réponse Y1 et Y2.....	161
Tableau I. 16. Caractérisations physicochimiques de la NE après la phase d'optimisation des paramètres de formulation.	168

Liste des tableaux du chapitre II

Tableau II. 1. Caractéristiques des facteurs.	177
Tableau II. 2. Caractéristiques des réponses choisies.	178
Tableau II. 3. Présentation de la matrice du Plan de « Plackett et Burman » pour l'étape du criblage des paramètres opératoires.	179
Tableau II. 4. Présentation de la matrice du Plan composite centré cubique pour l'étude des surfaces de réponses en vue de l'optimisation des paramètres opératoires du procédé.	180
Tableau II. 5. Réponses enregistrées lors des essais de criblage des paramètres opératoires.	182
Tableau II. 6. Coefficients de corrélation lors de l'analyse du criblage des paramètres opératoires.	182
Tableau II. 7. Matrice du plan composite centré cubique et réponses enregistrées.	186
Tableau II. 8. Analyse de la variance pour la réponse Y1 (taille des particules).....	190
Tableau II. 9. Les effets des facteurs pour la réponse Y1 (taille des particules).	190
Tableau II. 10. Résultats de la caractérisation physico-chimique de la proposition « 2 ».	195

Liste des tableaux du chapitre III

Tableau III. 1. Valeurs et moyenne de taille des gouttelettes, de l'indice de polydispersité et du potentiel zêta des NEs de l'atorvastatine, fénofibrate et acide folique.....	201
Tableau III. 2. Variation du poids moyen du lot 1.....	218
Tableau III. 3. Variation du poids moyen du lot 2.....	219
Tableau III. 4. Variation du poids moyen du lot 3.....	220
Tableau III. 5. Variation du poids moyen du lot 4.....	221
Tableau III. 6. Comparaison du poids moyen des rats de l'étude par lot.	222
Tableau III. 7. Evolution du poids moyen de chaque lot au cours de l'étude.	223
Tableau III. 8. Valeurs de la glycémie contrôlée au glucomètre avant injection de l'alloxane.	225

Tableau III. 9. Valeurs de la glycémie (g/dL) contrôlée au glucomètre 72 heures après injection de l'alloxane (série 1).....	225
Tableau III. 10. Valeurs de la glycémie contrôlée au glucomètre (série 2).....	226
Tableau III. 11. Valeurs de la glycémie contrôlée au glucomètre (série 3).....	226
Tableau III. 12. Valeurs de la glycémie contrôlée au glucomètre (série 4).....	227
Tableau III. 13. Pourcentages de réduction du taux de glycémie pour les lots 3 et 4.....	232
Tableau III. 14. Taux moyen des triglycérides sériques et du cholestérol total.....	232

Liste des tableaux du chapitre IV

Tableau IV. 1. Réactifs utilisés dans la préparation des solutions de travail.	245
Tableau IV. 2. Présentation de la matrice expérimentale en vue de l'optimisation de la mise au point des microsphères.	247
Tableau IV. 3. Tailles moyennes des billes lyophilisées.	256
Tableau IV. 4. Préparation et lecture des absorbances des étalons.	272
Tableau IV. 5. Résultats des mesures des absorbances des 11 formulations de la Série N°1 à pH=1,2 et pH=6,8.....	273
Tableau IV. 6. Résultats des calculs du taux de dissolutions du fénofibrate à pH=1,2 et pH=6,8 (Série N°1).	273
Tableau IV. 7. Tableau récapitulatif des réponses enregistrées des 11 formules des billes encapsulant le fénofibrate.	276
Tableau IV. 8. Comparaison des taux de dissolution en milieu acide et basique des billes séchées à l'air libre et des billes lyophilisées.....	278

INTRODUCTION GENERALE

Durant les dernières décennies, les chercheurs se sont penchés sur le développement des produits issus de la nanomédecine et l'intérêt de cette dernière dans le domaine pharmaceutique. En effet, plusieurs études ont été conduites dans le but d'aboutir à un médicament qui puisse contenir un ou plusieurs principes actifs. Des formulations et des modes de synthèse ont vu le jour, pour pallier aux contraintes technologiques et aux caractéristiques physicochimiques défavorables, pour une meilleure biodisponibilité du candidat médicament.

40% des molécules en développement sont des molécules apolaires qui appartiennent à la classe II et IV BCS et représentent 90% des molécules commercialisées. Dès lors, l'amélioration de leurs propriétés d'absorption devient une priorité. En effet, lorsque ces dernières sont administrées par voie orale, leur absorption est limitée par plusieurs facteurs : une faible solubilité, une dégradation dans le tractus gastro-intestinal, une élimination pré-systémique ou une perméabilité membranaire réduite (Aungst 1993). D'autre part, le devenir in vivo de ces molécules dépend essentiellement des performances du support galénique qui doit promouvoir leur mise à disposition dans l'organisme pour atteindre l'effet thérapeutique recherché (Mehnert 2001). La pharmacie galénique permet d'entreprendre des améliorations de formulation pour contourner les problèmes de solubilisation de ces molécules par l'usage de solvants miscibles à l'eau qui visent à améliorer la solubilité, ou encore l'introduction d'agents tensioactifs pour améliorer la mouillabilité, mais aussi la mise au point de systèmes lipidiques tels que les nanoémulsions qui permettent également d'augmenter la surface de contact avec les liquides, en réduisant la taille des particules (Hamoudi 2011). C'est l'une des stratégies les plus courantes et adoptée à la voie orale (Shively 1993; Dahan 2008; Porter 2008).

Dans le domaine de la nanotechnologie appliqué au volet pharmaceutique, nous pouvons recenser d'innombrables travaux relatant l'intérêt des systèmes nanodispesés dans l'encapsulation et l'amélioration de la solubilité des principes actifs lipophiles. La notion d'encapsulation s'applique non seulement aux principes actifs de faible solubilité dans l'eau mais également à d'autres catégories de principes actifs, à titre d'exemple ceux considérés comme fragiles ou sensibles (vitamines, antibiotiques, protéines). Ce phénomène physique fait appel dans le domaine de la formulation pharmaceutique, à des excipients dont les fonctionnalités sont assez connues et permettent, suite à leur combinaison et selon des voies de synthèse ou de fabrication connues, d'aboutir à des systèmes médicamenteux stables.

Les formes liquides ont toujours été considérées comme des formes instables comparativement aux formes solides et ou sèches. Cette caractéristique qui a toujours joué en leur défaveur tend à disparaître avec l'avènement des systèmes nanodispesés, lesquels, avec une bonne mise au point, peuvent être cinétiquement stables.

En effet, les nanoémulsions (NEs) font parties de cette classe et ne cessent d'attirer l'attention des chercheurs quant à leurs potentialités d'encapsuler dans leurs systèmes un nombre varié de principes actifs, notamment ceux faiblement solubles dans l'eau. De par leur taille nanométrique, elles permettent d'améliorer la solubilité des principes actifs qu'elles contiennent mais aussi la mise à disposition de ces derniers dans l'organisme.

Par ailleurs, leur transparence et leur facilité de formulation à l'échelle laboratoire, l'utilisation de combinaisons d'excipients assez variés et étudiés, mais aussi des équipements peu sophistiqués comparativement aux autres formes pharmaceutiques, font de ces systèmes nanodispesés un excellent choix de formulation.

Les nanoémulsions sont des systèmes dispersés dont la taille des particules se situent entre 20 et 200 nm, leur mise au point peut se faire par des méthodes de haute énergie nécessitant des équipements coûteux tels l'homogénéisateur à haute pression ou bien les sondes à ultrasons ; ou par des méthodes faiblement consommatrice d'énergie dite de basse énergie (méthode d'émulsification spontanée, méthode de température d'inversion de phase,...).

Nous avons mis au point une nanoémulsion stable capable d'encapsuler des principes actifs peu solubles, en optant pour des excipients biodégradables et biocompatibles d'une part et un mode de fabrication de basse consommation d'énergie d'autre part. Pour ce faire, des essais préliminaires nous ont permis de sélectionner les excipients sur la base des données des travaux antérieurs mais aussi des caractéristiques physico-chimiques attendus du produit final (transparente, bon potentiel zêta et taille réduite à l'échelle nanométrique). La sélection de la méthode de nanoémulsification s'est faite en rapport avec la composition de la formulation et répond aux exigences de faisabilité, simplicité d'exécution sans coût excessif.

Par la suite, nous avons pu encapsuler dans notre nanoémulsion trois principes actifs considérés comme faiblement solubles dans l'eau faisant partie de la classe II et IV du système de classification biopharmaceutique (fénofibrate, atorvastatine et acide folique), aboutissant à des systèmes nanométriques stables et transparents. In vivo, la nanoémulsion encapsulant la molécule modèle (fénofibrate) et administrée par gavage, présentait une meilleure efficacité thérapeutique sur les rats que le médicament commercialisé.

Enfin, nous avons lyophilisé le système grâce à la méthode de gélification en goutte (précipitation en phase aqueuse) reposant sur le principe de réticulation en obtenant des microsphères polymériques ; ce qui a permis de stabiliser la nanoémulsion médicamenteuse avec un taux d'humidité résiduelle optimal. Ce lyophilisat est également caractérisé par microscopie électronique à balayage (MEB). Le taux d'encapsulation est déterminé à travers une évaluation des performances in vitro des microsphères obtenues.

Notre travail est alors organisé en deux grandes parties :

La première partie est une revue de la littérature qui nous permet de positionner la nanoémulsions comme systèmes vecteurs prometteurs. Nous aborderons l'essentiel des travaux antérieurs faits dans le domaine de la nanomédecine et plus précisément en ce qui concerne les nanoémulsions et leurs applications. Aussi, les méthodes de nanoémulsification et de caractérisation sont largement développées. Nous nous intéresserons également au phénomène d'encapsulation et son intérêt pour les molécules BCS II et IV.

La seconde partie regroupe les travaux expérimentaux. Elle est organisée comme suit :

Chapitre I, nous exposerons d'abord les techniques expérimentales d'élaboration des nanoémulsions puis aborderons la formulation proprement dite via l'approche « Quality by Design » (QbD), basée sur les plans d'expériences. Dans ce chapitre, il s'agit d'optimiser la formule qualitative et quantitative de la nanoémulsion, ainsi que sa caractérisation.

Dans le **Chapitre II**, nous allons étudier l'impact des différents paramètres opératoires sur les attributs qualité de la nanoémulsion, en appliquant également les plans d'expériences.

Chapitre III, l'encapsulation est faite sur la formule dont la composition et le procédé de fabrication ont été optimisés, cette dernière sera ensuite soumise aux essais in vivo sur modèle animal. Les résultats de l'administration de la nanoémulsion chargée seront exposés et discutés.

Chapitre IV, il s'agira de l'application du procédé de lyophilisation. Dans cette partie, nous aborderons l'approche expérimentale choisie pour stabiliser la nanoémulsion ainsi que tous les résultats de la caractérisation. Nous compléterons cette dernière par l'étude du comportement des formes générées dans les milieux gastrique et intestinal simulés.

Nous achèverons nos travaux par une conclusion générale en faisant le point sur l'ensemble des résultats avancés et perspectives de recherche proposées.

OBJECTIFS

L'objectif principal de ce travail de thèse a été de mettre au point une nanoémulsion stable afin d'encapsuler des molécules faiblement solubles, classées BCS II et/ou BCS IV.

Autour de cet objectif principal s'articulent des objectifs secondaires :

- Dans un premier temps faire une préselection des excipients potentiellement compatibles et définir un procédé de nanoémulsification à travers les essais d'orientation ;
- Optimiser la composante qualitative et quantitative de la nanoémulsion ;
- Optimiser le procédé de préparation, en l'occurrence l'émulsification spontanée ;
- Encapsuler des principes actifs faiblement solubles et en sélectionner la molécule modèle (fénofibrate) ;
- Prouver l'efficacité de la formulation à travers les essais in vivo comparatifs chez les rats ;
- Appliquer la lyophilisation comme stratégie de stabilisation de la nanoémulsion et évaluation de l'impact de cette démarche sur la structure et le comportement des microsphères obtenues, ainsi que sur la libération du fénofibrate encapsulé.

Le développement pharmaceutique et l'organisation de la recherche obeit durant l'étape d'optimisation de la formule et du procédé à la méthodologie des plans d'expériences, couplée à des méthodes de caractérisations approfondies telles que la turbidité, la taille des particules, le potentiel zeta, ou encore la microscopie électronique à balayage.

Ces travaux de recherche présentent l'originalité de combiner une série de procédés pharmaceutiques. D'abord en mettant au point un système colloïdal à l'échelle nanométrique stable par émulsification spontanée, puis l'encapsulation d'une molécule active pharmaceutique modèle faiblement soluble, suivie d'une gélification ionotropique de la nanoémulsion et enfin sa stabilisation au sein d'un réseau polymérique multiparticulaire sec par lyophilisation.

PARTIE
BIBLIOGRAPHIQUE

Introduction

Sur toutes les définitions que nous pouvons rencontrer dans la littérature, on s'accorde tous sur le fait que les nanoémulsions sont des systèmes métastables issus de la coexistence de deux phases immiscibles, phase généralement huileuse ou organique et aqueuse. L'une étant dispersée dans l'autre sous forme de très fines gouttelettes dont la taille se situe entre 20 et 200 nm.

Durant les dernières décennies, leur importance ne cesse de croître notamment dans le domaine pharmaceutique. Elles ont largement fait leur preuve dans le domaine de l'agroalimentaire, la chimie mais aussi les sciences des matériaux (Ali 2016a; Kale 2017).

Dans le domaine pharmaceutique, les nanoémulsions ont été le plus souvent appliquées aux PA fragiles améliorant en conséquence leur stabilité chimique et ou les protégeant d'une éventuelle dégradation enzymatique.

Par ailleurs, de nombreux travaux décrivent l'intérêt des nanoémulsions dans l'amélioration de la biodisponibilité des PA, grâce notamment à leur taille nanométrique, favorisant l'augmentation de la surface de contact. En effet, en raison de l'augmentation de l'interface huile/eau, leur mise au point nécessite une proportion élevée de tensioactifs (Ali 2016a) mais également de stabilisants.

80% des tensioactifs sont considérés comme toxiques ou irritants, ce qui pourrait limiter l'usage biologique des NEs à long terme (Ali 2016a). Toutefois, les stabilisants sont connus par leur aptitude à maintenir en l'état de départ l'agencement physique et/ou chimique afin d'éviter au maximum l'apparition du mûrissement d'Ostwald. Le plus généralement, ce sont des polymères qui peuvent être d'origine biologique ou synthétique, biodégradable ou biocompatible, utilisés à des proportions non toxiques.

Les nanoémulsions peuvent être obtenues par différentes voies de fabrication mettant essentiellement en jeu l'apport technologique, elles sont dites alors méthodes de haute énergie ou bien faisant appel le plus souvent à des techniques de basse consommation d'énergie. En contrepartie, il faudrait trouver le juste équilibre entre les différents composants et faire des choix les plus judicieux en matière de formulation. Ces méthodes sont appelées méthodes de basse énergies.

Les nanoémulsions de type huile dans l'eau sont largement répandues pour leur potentiel d'encapsulation des molécules considérées faiblement solubles dans l'eau et appartenant soit à la classification BCS II ou BCS IV (Lindenberg 2004).

Dans ce chapitre, nous donnons les principales références sur les NEs et ce depuis les trois dernières décennies. Après avoir présenté les NEs et ses principales caractéristiques, les différenciant des émulsions conventionnelles, nous passerons aux différentes méthodes et voies de fabrication ainsi que les principales applications dans le domaine pharmaceutique.

D'autre part, nous nous intéresserons aux molécules faiblement solubles dans l'eau et à l'intérêt des NEs dans l'amélioration de leur biodisponibilité.

A l'issue de cette synthèse bibliographique, nous sélectionnerons le procédé de fabrication le plus adéquat, ainsi que les différents composants entrant dans la mise au point d'un système stable, innovant, destiné à encapsuler principalement des molécules de faible solubilité.

1 Définitions

1.1 Les émulsions

Le terme « émulsion » trouve probablement ses origines du mot latin « emulgere », qui veut dire « traire » (Brochette 2013). On entend par émulsions des systèmes biphasiques dans lesquels deux ou plusieurs phases liquides sont stabilisés par des agents dits émulsionnants sans démixtion pendant toute la durée prévue pour son utilisation.

Deux phases immiscibles sont mélangées en dispersant l'une dans l'autre sous forme de fines gouttelettes et d'aspect macroscopiquement homogène (Aulton 2001; Springinsfeld 2009) et dont l'échelle de taille permet entre autre leur classification mais aussi leur distinction de par leurs propriétés applicatives.

Elles sont administrées via différentes voies pour un usage local ou systémique: voie orale, topique, rectale, respiratoire ou même parentérale. Par voie orale, les émulsions peuvent être administrées telles quelles ou bien introduites dans des capsules dures sous forme de microémulsions encapsulant des principes actifs peu solubles dans l'eau afin d'améliorer leur biodisponibilité (Aulton 2001). Par voie parentérale, l'administration des émulsions généralement nutritives est rendue possible grâce à l'usage de tensioactifs non toxiques tels que

la lécithine mais aussi à la maîtrise de la taille des particules. Cette dernière est d'une importance capitale dans la prévention de la formation d'embolies (Aulton 2001).

Thermodynamiquement parlant, c'est des systèmes hors équilibre en raison de leur énergie interfaciale très élevée (Ali 2016a). Pour stabiliser donc cet ensemble, l'ajout d'agents émulsionnants permet d'abaisser cette tension et d'apporter l'équilibre qui permettra de maintenir aussi longtemps que possible le système uniforme sans séparation de phase.

Une émulsion comprend ainsi trois phases (Aulton 2001):

- Phase dispersée : représentée par les particules du liquide divisé, appelé aussi phase interne ou phase discontinue ;
- Phase dispersante : c'est le liquide au sein duquel les gouttelettes sont dispersées et diffusent, on l'appelle aussi phase externe ou continue ;
- Phase interfaciale : formée d'un ou de plusieurs agents émulsifiants ou stabilisants.

On lui confère de nombreux avantages (Kale 2017) :

- L'émulsion présente des caractères organoleptiques très séduisants : blanchâtre, brillante, onctueux ;
- Association de deux principes actifs incompatibles ;
- Elle véhicule à l'état de suspension une poudre médicamenteuse qui est insoluble dans les deux phases ;
- La division des particules et l'augmentation de leur mouillabilité présente une meilleure absorption et effet ;
- Elle permet l'optimisation de l'effet locale et général ;
- Elle est capable de contenir à la fois des principes actifs solubles dans l'eau et des principes actifs solubles dans l'huile et même certains agents aromatisants ;
- Elle permet d'une certaine manière la protection de principes actifs ;
- Elle permet l'hydratation de la peau ;
- La phase huileuse peut être elle-même thérapeutiquement active, ou un véhicule pour les principes actifs solubles dans la phase huileuse ;
- Amélioration de la biodisponibilité et réduction des effets secondaires ;

Cependant,

- Elle est assujettie à la contamination bactérienne ;

- La stérilisation est difficile à mettre en œuvre en raison des caractères physicochimiques de l'émulsion ;
- Risque d'augmentation de la toxicité par augmentation de la pénétration et de l'absorption ;
- Faible inertie vis-à-vis des tissus et cellules ;
- Manifestations d'intolérance ;
- Instabilités : crémage, sédimentation, floculation et coalescence (les émulsions multiples sont plus difficiles à stabiliser) ;
- L'émulsion E/H est difficile à injecter, vu la viscosité de la phase continue. Ceci peut être pallié par la formulation d'émulsions multiples par réémulsification de l'émulsion primaire E/H, produisant une émulsion multiple de type E/H/E moins visqueuse ;
- Les émulsions parentérales stériles de type H/E pour administration IV de corps gras, carbohydrates et de vitamines sont utilisées pour les patients immunodéprimés comme véhicule pour les principes actifs faiblement solubles dans l'eau (lipophiles) : vitamine K, diazépam, vitamine A. Ceux-ci dissous dans la phase huileuse ne précipitent pas et ne causent pas de douleurs après injection.

Les principes actifs sujets à l'hydrolyse ou à l'oxydation, sont protégés par la phase non aqueuse. A titre d'exemples : les émulsions à base de diazépam et d'érythromycine sont moins douloureuses. Par ailleurs, les préparations contenant l'Amphotéricine B sont moins toxiques.

Par ailleurs, l'étude dynamique et du comportement des émulsions sous l'effet d'une contrainte est intéressante car elle permet d'évaluer leur stabilité dans le temps. Les résultats obtenus conditionnent également le mode d'administration et leur application. En effet, à titre d'exemple dans les émulsions à l'état dilué (lorsque la fraction de la phase dispersée est très faible), les gouttelettes sont agitées par un mouvement Brownien, leur conférant les propriétés mécaniques d'un fluide Newtonien. A l'opposé, dans les émulsions dites concentrées, dont la proportion de la phase dispersée dépasse 60%, le mouvement des gouttelettes est assez restreint et l'émulsion se comporte comme un solide viscoélastique (Leal-Calderon 2007).

1.2 Notion d'émulsification

Le principal souci du formulateur est d'obtenir une émulsion monodispersée ; car une distribution de taille étroite conditionne la stabilité et les propriétés rhéologiques de cette dernière (Leal-Calderon 2007).

Connue pour être des systèmes hétérogènes, une émulsion ne peut se former sans apport d'énergie. Du point de vue thermodynamique, ce sont des systèmes instables. En effet, leur stabilisation dépend à la fois de l'énergie fournie mais aussi des bases physico-chimiques du formulateur, à qui revient le choix des agents émulsionnants et stabilisants (Brochette 2013). Pour créer des émulsions, un cisaillement doit être appliqué d'une manière qui provoque l'étirement et la rupture des gouttelettes d'une phase en plus fines gouttelettes dans l'autre phase, sous une certaine intensité pendant un temps précis (Leal-Calderon 2007). Les émulsions à échelle micrométrique peuvent être facilement générées par énergie mécanique, grâce à la variété des équipements présents sur le marché (agitateurs mécaniques et homogénéisateurs) qui sont munis de divers organes d'agitation (Mason 2006b; Gad 2008). Les émulsions ne peuvent se former qu'en présence de surfactif(s) ou d'émulsionnant(s) sous l'effet d'une contrainte, c'est le procédé d'émulsification.

Cependant, les méthodes conventionnelles d'émulsification ne permettent pas d'obtenir des nanoémulsions dont la taille des gouttelettes est inférieure à 100 nm. Il faudra leur appliquer des contraintes de cisaillement extrêmement élevées pour provoquer de violents étirements et ruptures des gouttelettes (homogénéisation à haute pression ou encore la microfluidisation et l'ultrasonication) (Mason 2006b; Gad 2008). D'autres techniques permettent d'obtenir aisément cette catégorie d'émulsions, en passant par des méthodes de préparation de basse consommation d'énergie telles que l'émulsification spontanée (Gad 2008).

1.3 Classification des émulsions

On peut classer les émulsions selon plusieurs critères, principalement selon la nature de la phase dispersante et de la phase dispersée. Deux types d'émulsions se distinguent : les émulsions huile dans l'eau (en abréviation H/E ou O/W), qui sont des émulsions à phase continue aqueuse (polaire) et à phase discontinue huileuse (apolaire ou peu polaire), appelées aussi les « émulsions directes » (Mason 2006b; Leal-Calderon 2007) ou simples (Benichou 2004; McClements 2005b). Les émulsions à phase continue huileuse (apolaire ou très peu polaire), contenant les particules divisées d'un liquide très polaire, le plus souvent l'eau, sont dites eau dans l'huile ou émulsions inverses (E/H ou W/O) (Leal-Calderon 2007) (figure 1). On peut distinguer aussi des émulsions H/H ou O/O (oil in oil) dans lesquelles l'une des phases est de nature huileuse polaire (ex. propylène glycol) et l'autre huileuse apolaire tel que l'huile de paraffine (Tadros 2013). Un autre type d'émulsions et pas des moindres, puisque son usage est essentiellement destiné à protéger des principes actifs fragiles ou instables ; ce sont les

émulsions des émulsions, elles sont dites triphasiques ou multiples (E/H/E ou H/E/H) (Aulton 2001; Tadros 2004; Tadros 2013).

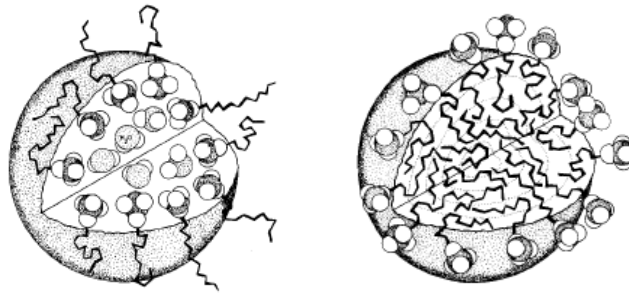


Figure 1. Représentation schématique d'une émulsion E/H (à gauche) et H/E (à droite) (Clint 1992).

Nous pouvons également tenir compte de l'aspect géométrique et classer les émulsions selon le critère de la taille des particules soit en « microémulsion » ou bien en « nanoémulsion » à côté des « macroémulsions » (tableau 1).

Les microémulsions, contrairement aux macroémulsions, sont thermodynamiquement stables, transparentes et homogènes. Elles se forment de manière spontanée, lorsque le rapport entre les différents composants y est favorable (Aulton 2001).

Selon certains auteurs, la taille des particules des microémulsions se situe entre 2 et 50 nm. Elles nécessitent pour cela une proportion élevée de tensioactifs, souvent associés à un co-surfactif (Schulman 1959; Aulton 2001; Fanun 2010a); ce sont essentiellement des systèmes micellaires (Aulton 2001). En revanche, la distinction entre une micelle contenant de l'huile et une gouttelette d'huile entourée d'une couche interfaciale composée en grande partie de tensioactif, est difficile à évaluer.

Dans leur formulation, l'addition de co-surfactif, à titre d'exemple un alcool à longue chaîne, est souhaitable afin d'abaisser au maximum la tension interfaciale nécessaire à leur stabilité (Jönsson 1998; Aulton 2001).

A l'opposé des microémulsions, les nanoémulsions sont des systèmes dont les gouttelettes sont ultrafines (Brochette 2013). Elles nécessitent moins de tensioactifs dans leur formulation, ce sont des systèmes dont la forme des particules est sphérique (Tadros 2004).

Appelées aussi « miniémulsions », les nanoémulsions ont suscité l'intérêt des chercheurs ces dernières décennies, que ce soit dans le domaine pharmaceutique, cosmétique ou même agroalimentaire (Sonneville-Aubrun 2004; Wooster 2006; Mou 2008; Singodia 2010; Shi

2015), grâce à leur stabilité et transparence (très faible turbidité) qui jouent avantageusement en leur faveur (Tadros 2004).

Tableau 1. Différents types d'émulsions et critères de classification (Danielsson 1981).

Type de l'émulsion	Intervalle de taille	Stabilité	Apparence
Macroémulsion	>1 μm	Thermodynamiquement instable	Opaque
Nanoémulsion	20 nm - 500 nm	Thermodynamiquement instable mais cinétiquement stable	Transparente/trouble
Microémulsion	10 nm - 100 nm	Thermodynamiquement stable	Transparente/trouble

En règle générale, la fraction volumique de la phase dispersante est plus importante. Cependant dans certains cas, nous pouvons noter des proportions ne dépassant pas les 30% ; les gouttelettes s'y trouvent rapprochées voir entassées entraînant même la déformation des gouttelettes (figure 2). On les désigne en utilisant le terme d'émulsions concentrées (Brochette 2013).

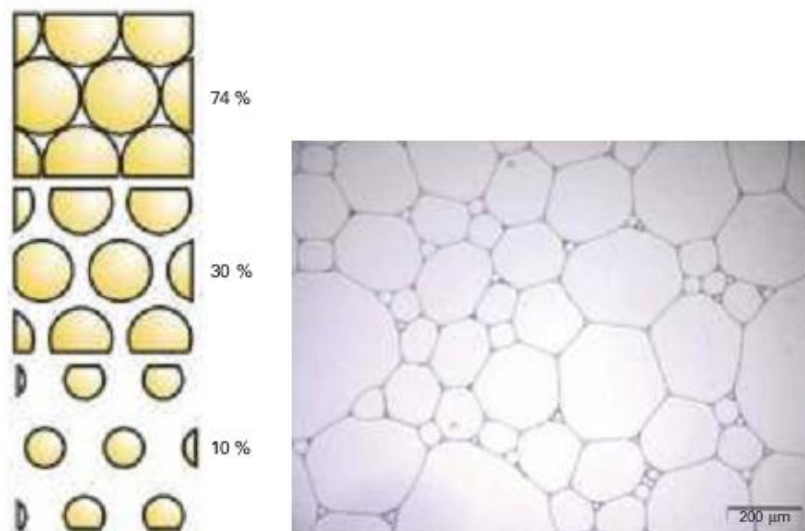


Figure 2. Représentation schématique de l'agencement et empilement des gouttelettes et fraction volumique de la phase dispersée (gauche) image au microscope optique d'une émulsion H/E concentrée (droite) (Brochette 2013).

1.4 Stabilité des émulsions

Les émulsions sont des formes liquides d'apparence uniforme mais dites thermodynamiquement instables ; leur stabilité varie dans le temps. Ce sont des systèmes métastables qui évoluent irrémédiablement vers une séparation macroscopique de phases en réduisant au maximum la surface de contact. C'est l'état d'équilibre thermodynamique

(Springinsfeld 2009). Elles sont le plus souvent sujettes à des instabilités physiques au cours du stockage ou bien pendant leur formulation en causant volontairement un désordre au sein du système.

Elles peuvent être réversibles ou ségrégatives et dans ce cas précis les gouttelettes se frôlent sans pour autant rompre leur intégrité. On note une séparation non homogène des gouttes. Généralement une simple agitation permet de les redisperser. D'un autre côté, elles peuvent être irréversibles, ce qui implique généralement la destruction des gouttelettes, c'est le cas du mûrissement d'Ostwald et la coalescence qui sont deux mécanismes distincts mais qui peuvent se produire simultanément (Leal-Calderon 2007; Springinsfeld 2009) (figure 3).

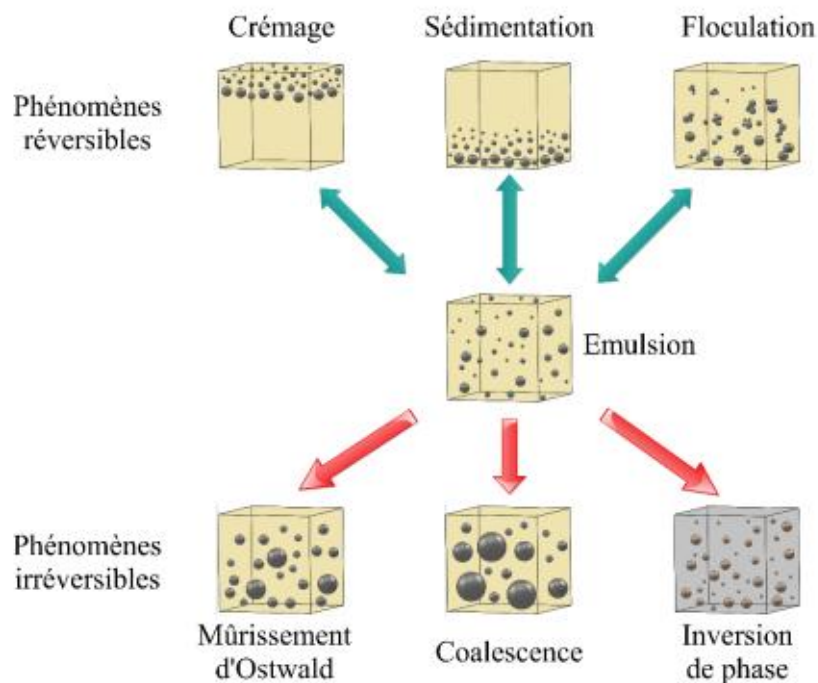


Figure 3. Les différentes instabilités des émulsions (Moussa 2019).

Les différentes instabilités et leurs causes sont décrites comme suit.

1.4.1 Crémage et sédimentation

Ce sont des instabilités réversibles qui surviennent obligatoirement, suite à une différence de densité entre les deux phases liquides (Springinsfeld 2009). Sous l'effet de la gravité, quand la densité de la phase dispersée est inférieure à la densité de la phase dispersante, on observe un phénomène appelé « crémage » ; les gouttelettes se déplacent verticalement vers le haut, s'assemblent et forment une couche qui se distingue du reste du milieu. A l'inverse, quand la densité de la phase dispersante se trouve élevée, cette dernière sédimente à une vitesse

dépendante de la taille des gouttelettes qui la composent, de la viscosité de la phase dispersante ainsi que de la différence de densité des deux phases.

Ces trois facteurs influencent grandement sur le crémage, il est donc possible d'intervenir pour diminuer son importance en augmentant la viscosité de la phase dispersante par l'ajout d'épaississants ou bien des polymères à haut poids moléculaire, tels que la gomme xanthane, hydroxy éthylcellulose, alginates, etc. ; ou bien en diminuant la taille des globules ou encore la différence de densité entre les deux phases (Aulton 2001; Springinsfeld 2009; Tadros 2013). La vitesse de migration de la goutte est alors donnée par la loi de Stokes qui s'est inspiré de la force de poussée d'Archimède qui dirige une sphère immergée de rayon R vers le haut (Springinsfeld 2009) :

$$v = \frac{2g(\rho_c - \rho_d)R^2}{9\eta_c}$$

Où, les indices c et d font références aux phases dispersée et continue, respectivement. ρ est la masse volumique, g est l'accélération gravitationnelle (g 9,81 m.s⁻²) et η est la viscosité de la phase continue ou dispersante.

Comme c'est une instabilité réversible, il est possible de restaurer l'état de départ de l'émulsion en la soumettant à une agitation mécanique suffisante.

D'autre part, quand la taille des particules est $< 0,1 \mu\text{m}$ et plus précisément dans le cas des nanoémulsions, où la taille est comprise entre 20 et 200 nm ; un mouvement Brownien kT se crée au sein du système (k est la constante de Boltzmann, T est la température absolue) qui excède la force de gravité (masse x accélération de la pesanteur g). Il en résulte ainsi une stabilité dans le milieu (Tadros 2013).

$$kT > \frac{4}{3} \pi R^3 \Delta\rho g L$$

Où :

R : taille des particules dispersées;

$\Delta\rho$: Différence de densité entre les particules et le milieu dispersant ;

L : hauteur du milieu ou bien du contenant.

1.4.2 Flocculation

La flocculation correspond à l'association faible et réversible d'un nombre plus ou moins grand des particules de la phase dispersée et formation de flocons ou globules. Il passe d'un état dispersé vers un état non dispersé (Springinsfeld 2009). Les globules gardent leur individualité et le film interfacial reste intact. Ils peuvent donc être séparés par simple agitation. Ce phénomène d'instabilité résulte principalement des forces d'attraction de Van der Waals communes aux systèmes dispersés. Cette force d'attraction est inversement proportionnelle à la distance interparticulaire. Donc, pour que les gouttes soient stables, il faut que s'exerce entre les gouttes une interaction répulsive à longue distance (électrostatique ou stérique), de portée similaire et au moins aussi intense que l'interaction attractive de van der Waals (Springinsfeld 2009).

L'ajout de surfactants ioniques crée une double couche électrique autour des globules comme barrière de protection à l'encontre de ce phénomène, il s'en suit une augmentation des énergies répulsives comparativement à l'énergie d'attraction qui se trouve dans ce cas très faible. A une certaine concentration dite intermédiaire des électrolytes rajoutés, cette stabilisation peut s'avérer inefficace; au-delà de cette concentration le rapport de forces (répulsives et attractives) s'inverse et entraîne l'apparition d'une forte flocculation qui peut mener vers une coalescence (figure 4).

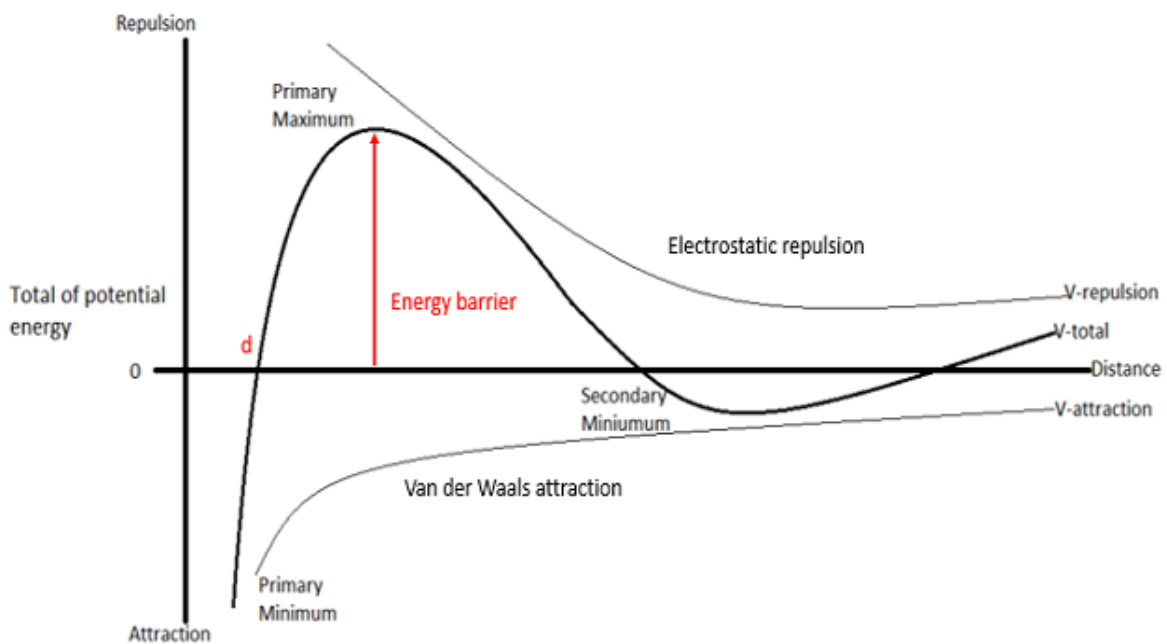


Figure 4. Représentation schématique du phénomène de flocculation et stabilisation électrolytique (Hutin 2019).

D'un autre côté, la stabilisation stérique constitue un moyen efficace de contrer la floculation par l'ajout de surfactants non ioniques ou bien des polymères, Pour ce faire, quatre critères doivent être remplis : (i) les chaînes moléculaires doivent couvrir complètement les gouttelettes, (ii) elles doivent être parfaitement ancrées au cœur des gouttelettes et insolubles dans la phase dispersante. Certaines formulations nécessitent la présence des blocks copolymères qui se trouvent indispensables à leur stabilisation et dont les chaînes sont solubles dans le milieu dispersant ; ils sont de type A-B, A-B-A ou BA_n dans lesquels B est la partie ancrée et A représentée par les chaînes stabilisatrices et l'épaisseur de la couche adsorbée doit se situer dans l'intervalle de 5 à 10 nm, (iv) les chaînes stabilisatrices doivent être maintenues solubles quelques soient la température et les conditions de stockage (Tadros 2013).

1.4.3 Mûrissement d'Ostwald

Le mûrissement d'Ostwald est dû à la différence de pression de Laplace qui existe entre des gouttes de différentes tailles, il se produit un transfert de matière des gouttes de petites tailles où la pression est plus importante vers les gouttes les plus grandes. Ce phénomène provoque la disparition des petites gouttes au profit des plus grosses (Springinsfeld 2009; McClements 2012; Brochette 2013). Il est propre aux émulsions nanométriques.

En effet, l'existence d'une énergie interfaciale a une conséquence importante sur l'état du liquide dispersé sous forme de gouttelettes. La différence de pression ΔP est directement proportionnelle à l'énergie interfaciale et inversement proportionnelle au rayon de la particule comme décrit par la loi de Laplace.

$$\Delta P = \frac{2\gamma}{r}$$

ΔP : (Pa) surpression de Laplace ;

γ : (mJ/m²) énergie interfaciale ;

r : (m) rayon de la particule.

Plus le rayon de la particule est faible, plus il y'a de surpression à l'intérieur de ces gouttelettes les rendant moins déformables que les grosses (Brochette 2013). A l'inverse des émulsions conventionnelles, lorsque il y'a une trop grande différence de pression, le phénomène est très rapide (Wooster 2008).

Il est possible d'observer une augmentation de la taille des gouttelettes dans une émulsion et une réduction du nombre de celles-ci dans la phase continue (Leal-Calderon 2007). Le grossissement des globules de la phase dispersée se fait par diffusion de très petites gouttelettes dans la phase continue suite à une différence de solubilité (figure 5) (Springinsfeld 2009). En effet, selon la loi de Laplace, les plus petites particules possèdent une tension superficielle élevée et donc une plus forte solubilité comparativement aux molécules les plus larges (plus difficiles à fragmenter), augmentant par conséquent la vitesse de diffusion moléculaire et donc la vitesse de grossissement de ces dernières au dépend des plus petites (Tadros 2013; Singh 2017).

Leur solubilité est directement liée à la tension superficielle et inversement proportionnelle au rayon des particules comme indiquée dans l'équation précédente.

Ce mécanisme se produit dès qu'il existe une légère solubilité (à l'échelle moléculaire) de la phase dispersée dans la phase continue. Avec le temps, ce processus ralentit et la distribution de taille devient étroite. Théoriquement, il est donc préférable d'employer des huiles très faiblement solubles dans l'eau, comme par exemple les triglycérides à moyennes et/ou longues chaînes comme l'huile de maïs (Lim 2011; Singh 2017). Il est aussi possible de freiner ce phénomène en jouant sur la solubilité, c'est-à-dire en ajoutant à la phase discontinue un composant totalement insoluble rendant la diffusion impossible (Springinsfeld 2009). En effet, En utilisant par exemple des tensioactifs qui sont fortement adsorbés à l'interface huile-eau mais surtout insolubles dans la phase continue, nous pouvons réduire considérablement la tension interfaciale et donc le mûrissement d'Ostwald. C'est le cas des tensioactifs polymères qui ne se désorbent pas pendant la maturation (Tadros 2013). Dans les NEs type O/W, Nam et al. ont démontré l'efficacité des blocs copolymères amphiphiles à l'encontre de ce phénomène (Nam 2010). Le poly (éthylène oxyde)-poly (ϵ -caprolactone) (PEO-b-PCL) est soluble dans la phase huileuse à haute température mais se cristallise à température ambiante rendant le phénomène du mûrissement d'Ostwald impossible.

L'usage des polymères peut se faire également en les ajoutant à un solvant très volatil qui sera éliminé durant le processus d'émulsification, laissant alors le polymère façonner des gouttelettes de plus en plus petites et denses, s'opposant au mûrissement d'Ostwald (Fryd 2011).

Par ailleurs, l'augmentation de la température contribue efficacement à ralentir ce phénomène, en y ajoutant des composants tels que la cire aux huiles insolubles (Delmas 2011).

Ce phénomène de surpression a inspiré le monde industriel et a été utilisé à bon escient dans le domaine du bionettoyage sans biocides, grâce à l'usage de nanoémulsions où seul l'effet mécanique permet de rompre la paroi cellulaire des micro-organismes (Brochette 2013).

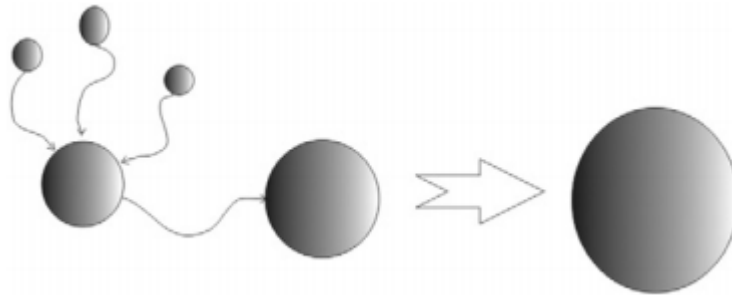


Figure 5. Représentation schématique du mûrissement d'Ostwald (Singh 2017). Le transfert de la matière entraîne la disparition des gouttes les plus petites.

Il est à noter que, plus le pouvoir solubilisant du tensioactif est grand dans la phase continue ou dispersante, plus le grossissement par diffusion sera important. Ce processus de diffusion moléculaire ne requiert pas de contact rapproché entre les particules.

1.4.4 Coalescence

La coalescence est une forme d'instabilité qui correspond à la fusion complète et irréversible de plusieurs globules préalablement floculés. Elle commence par la fusion du film et se termine par la rupture de celui-ci. En effet, la fragilité du film interfaciale engendre le rapprochement de particules adjacentes pour donner un seul et même globule (Leal-Calderon 2007).

Insinué ainsi, lors de la coalescence, les globules préalablement floculés perdent leur individualité. A la limite, le phénomène de coalescence se traduit par la séparation complète des deux phases.

La destruction des films liquides peut être décomposée en trois étapes (figure 6) :

- 1- Les deux interfaces se rapprochent en drainant le liquide de la phase continue et forment un film plat ;
- 2- Génération de trous au sein du film ;
- 3- Le diamètre de ce dernier croît et en même temps il se crée une goutte qui adopte graduellement une forme sphérique.

La vitesse d'apparition de ce phénomène dépend essentiellement des propriétés interfaciales, plus précisément de la concentration en agents surfactifs. Si cette dernière est faible, le film interfacial va se rompre rapidement. Le temps de vie du film est alors gouverné par la vitesse de drainage (Springinsfeld 2009).

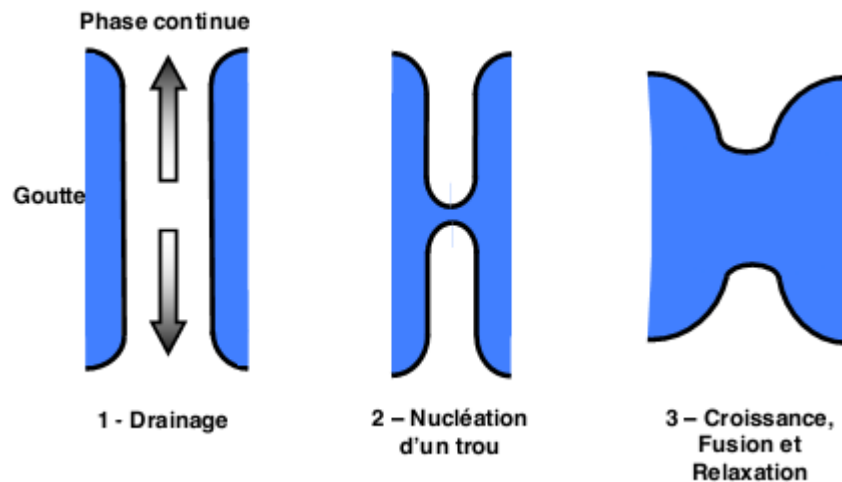


Figure 6. Etapes du processus de coalescence (Springinsfeld 2009).

L'usage de mélanges de surfactants à titre d'exemple ceux de type ionique et non ionique permet d'élever la viscosité et d'éviter la rupture du film interfaciale (Tadros 2013).

La coalescence est un phénomène décrit essentiellement dans les émulsions où la fraction dispersée dépasse les 64%. En régime concentré, les gouttelettes sont déjà rapprochées et le film interfaciale devient plat, nous ne pouvons écarter l'avènement de cette instabilité (Springinsfeld 2009).

Dans les NEs, le mûrissement d'Ostwald et la coalescence peuvent survenir simultanément. Selon la loi de Stokes, plus la taille des gouttelettes est réduite mieux le système est résistant aux phénomènes d'instabilité tels que le crémage ou la sédimentation. Pour aboutir à ce résultat, l'ajout de surfactant hydrophile qui crée à l'interface une couche flexible et résistante est souhaitable, ou encore un surfactant chargé qui en plus d'une stabilisation stérique confère au système une stabilisation électrostatique (Singh 2017).

1.4.5 Inversion de phase

L'inversion de phase est une forme d'instabilité qui se traduit par un brusque changement du sens de l'émulsion (une émulsion H/E devient E/H et, inversement une émulsion E/H devient H/E).

L'inversion d'une émulsion est rare pendant le stockage. Elle peut se produire pendant la fabrication quand la phase continue est ajoutée à la phase discontinue. La technique d'inversion des phases est utilisée volontairement pour obtenir des émulsions stables.

Notons que pendant la survenue de ce phénomène, nous pouvons observer une variation de la viscosité et de la conductivité.

Dans certains cas, l'inversion de phase peut survenir lors de l'ajout d'électrolytes ou en augmentant la température jusqu'à atteindre la température d'inversion de phase (TIP) entraînant une variation de la valeur de HLB de certains tensioactifs (ex. polyoxyéthylène). En effet, à une valeur de température dite critique, les chaînes du surfactant se déshydratent et deviennent finalement solubles dans la phase huileuse et lorsque le nombre HLB atteint une valeur appropriée il se produit une inversion de phase (Tadros 2013; Montenegro 2016).

1.5 Agents émulsionnants

Une émulsion est dite stable si les particules de la phase dispersée sont maintenues individualisées et intactes mais aussi uniformément distribuées au sein de la phase dispersante (Aulton 2001).

Le rôle essentiel d'un émulsionnant est de façonner autour des gouttelettes nouvellement formées de la phase discontinue une couverture empêchant ces dernières de coalescer ou bien créer un film interfaciale chargé (Walstra 1993; Tadros 2004; Schramm 2006), augmentant ainsi les forces répulsives évitant leur rapprochement (Aulton 2001).

En effet, les forces répulsives doivent être suffisamment importantes pour éviter l'agrégation des gouttelettes. Les surfactants ioniques répondent parfaitement à cette exigence. De leur côté, les surfactifs non ioniques agissent par encombrement stérique, empêchant le rapprochement des gouttelettes nouvellement formées. En bref, les surfactifs doivent répondre à trois caractéristiques (McClements 2002b; Esquena 2003; Liu 2006; Anton 2007):

- Adsorption rapide à l'interface ;
- Réduction de la tension interfaciale ;
- Stabiliser les gouttelettes en formant une couverture rigide à l'interface.

Les émulsionnants, appelés aussi surfactifs ou agents tensioactifs, sont des composés naturels ou synthétiques, lesquels dissous ou dispersés dans un liquide, sont préférentiellement adsorbés

à une interface, ce qui détermine un ensemble de propriétés physicochimiques d'intérêt pratique : ils sont détergents, mouillants, dispersants, moussants et surtout émulsifiants.

Ces composés sont des substances amphiphiles (Figure 7), leur molécule est formée d'une partie apolaire dite hydrophobe, qui est une longue chaîne hydrocarbonée et qui n'a pas d'affinité avec l'eau, et d'une partie polaire hydrophile, ionisée ou non, qui a beaucoup d'affinité pour l'eau (Springinsfeld 2009).

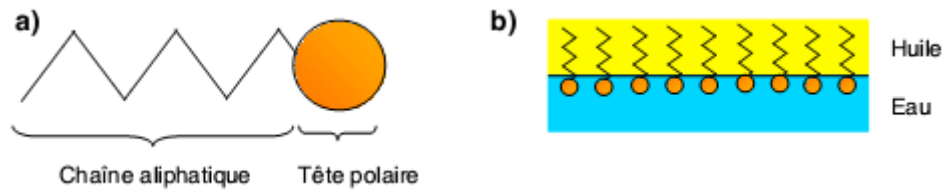


Figure 7. a) Schéma d'un tensioactif b) positionnement d'un tensioactif à l'interface (Springinsfeld 2009).

Cette dualité de structure les rend favorables à s'adsorber énergiquement aux interfaces auxquelles ces composants entrent en contact, mais aussi à s'orienter préférentiellement en se solubilisant dans le solvant approprié et formant ainsi des monocouches (Aulton 2001; Springinsfeld 2009).

Les émulsionnants non ioniques sont largement utilisés pour stabiliser les émulsions de type H/E ou E/H contre les phénomènes de floculation et de coalescence. Ils s'avèrent être moins sensibles aux variations de pH et à l'ajout d'électrolytes (Aulton 2001; Tadros 2013). Ils sont aussi plus efficaces que certains polymères tels que l'alcool polyvinylique (Salvia-Trujillo 2017). Quant aux émulsionnants ioniques, nous les retrouvons le plus souvent dans les émulsions de type H/E, c'est l'exemple du sodium dodecyl sulfate (SDS) (Tadros 2013).

Souvent les associations d'émulsionnants sont envisagées, à titre d'exemple un agent émulsionnant ionique et non ionique ou bien un mélange de deux agents non ioniques, qui se trouvent être plus efficaces dans le processus d'émulsification et de stabilisation du système.

D'autre part, certains composants dits hydrocolloïdes ou aussi stabilisants, tels que la gélatine, alginates et dérivés celluloses, possèdent une faible activité de surface mais s'adsorbent à l'interface liquide-liquide en formant une multicouche viscoélastique résistante à la rupture et constituant une barrière mécanique à l'encontre du phénomène de coalescence (Aulton 2001). Ce sont des molécules basées sur un squelette de polysaccharides sur lequel sont greffés des

groupements non polaires. Ce sont des produits uniquement hydrophiles utilisés plutôt à concentration élevée pour empêcher le crémage et stabiliser le système. A très faible concentration, ils entraînent un effet déstabilisant (Springinsfeld 2009).

Par ailleurs, les polymères non ioniques, tel que la classe des Pluronic[®], sont considérés plus stabilisants mais tout de même avec des difficultés d'émulsification, afin d'atteindre des tailles de gouttelettes plus petites. Notons également l'usage des polyélectrolytes comme agents émulsionnants, exemple de l'acide poly (méthacrylique) (Tadros 2013).

De son côté, la FDA préconise de ne pas dépasser un taux de 0,6% massique de poloxamer 188 (Pluronic[®] F68) dans la formulation des NEs à usage parentérale (Tabibiazar 2015). En effet, au-delà d'un certain taux, la viscosité engendrée pourrait causer une douleur au moment de l'administration (Mirkovic 2017).

Le mélange idéal serait donc de fusionner l'action d'un agent émulsionnant avec un polymère surfactant (Lovelyn 2011).

Dans un autre type d'émulsions appelées émulsions de Pickering, l'accumulation de fines particules solides à l'interface H/E peut agir avantageusement au moment de l'émulsification en favorisant la stabilisation du système et dans lequel ces dernières sont partiellement imprégnées de phase huileuse et ou de phase aqueuse (Tadros 2013), et adhèrent suffisamment à la phase interfaciale afin de stabiliser le système. Ces particules solides, finement divisées, devraient avoir une très faible masse leur permettant ainsi de maintenir l'état d'équilibre aussi longtemps que possible dans le temps (Aulton 2001).

Dans la représentation schématique de la figure 8, les fines particules agissent de manière plus ou moins subtiles en modifiant les propriétés de surface (courbure, élasticité, viscosité de surface, encombrement de surface, etc.) (Brochette 2013). Les particules solides imprégnées de leur solvant préférentiel s'alignent sur l'interface convexe des gouttelettes de la deuxième phase ou solvant avec lequel elles créent un angle de contact θ inférieur à 90° . Ce solvant préférentiel est considéré comme étant la phase dispersante ou continue et vice versa (Aulton 2001).

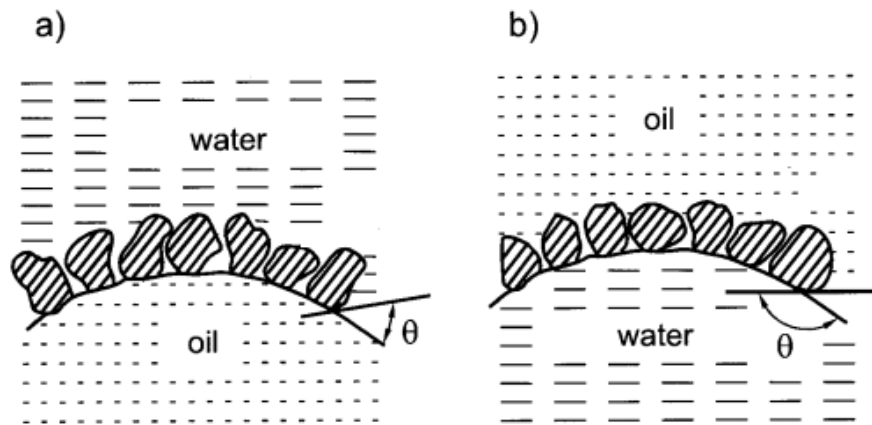


Figure 8. Représentation schématique d'une émulsion de Pickering (a) angle de contact $\theta < 90^\circ$ dans une émulsion type H/E (b) angle de contact $\theta > 90^\circ$ dans une émulsion type E/H (Mollet 2001).

1.6 Rôle des surfactants dans la formation des émulsions

Les émulsionnants appelés aussi surfactants ont pour principale action d'abaisser la tension interfaciale entraînant la réduction de la taille des gouttelettes de la phase dispersée. Cette proportionnalité est directement liée à la concentration et au type d'agents émulsionnants mis en jeu. Ce phénomène est décrit dans l'équation dite d'adsorption de Gibbs (Springinsfeld 2009; Tadros 2013):

$$-d\gamma = RT\Gamma d \ln a$$

Où,

γ : tension interfaciale ;

R : constante des gaz parfaits;

T : température absolue;

Γ : taux d'absorption ou excès de surface (nombre de moles adsorbées par unité de surface à l'interface).

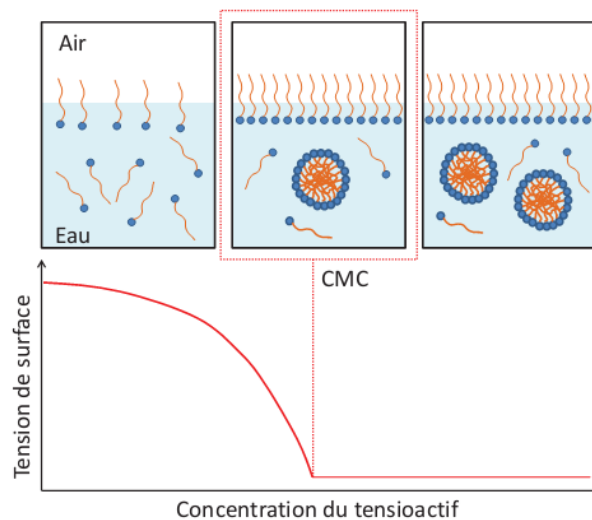


Figure 9. Evolution de la tension interfaciale en fonction de la concentration en surfactant (Lavaud 2013).

La figure 9 montre l'évolution de la tension interfaciale en fonction de la concentration en agent tensioactif dans la phase où il est solubilisé. Au-delà de la CMC, la γ reste constante et n'évolue pas, les molécules de tensioactifs ne s'adsorbent plus et s'auto-associent à partir de cette concentration en micelles nanométriques (Springinsfeld 2009).

Le taux d'absorption augmente avec l'augmentation de la concentration en surfactifs présents dans le milieu et peut éventuellement atteindre son taux de saturation. En effet, durant l'émulsification, l'augmentation de la surface interfaciale entraîne naturellement la réduction du nombre de molécules adsorbées sur cette dernière. L'équilibre est rapidement atteint dépendamment du temps et du taux de surfactifs présents dans le milieu (Tadros 2013).

La concentration en surfactif mise en jeu permet de prévenir l'avènement du phénomène de coalescence à la suite d'un cisaillement. Lorsque le surfactif est en excès, il présente la propriété de s'auto-assembler en micelles, mais permet aux nouvelles gouttelettes générées d'être rapidement enrobées par les molécules libres de surfactifs (Lovelyn 2011).

D'un autre côté, la valeur de γ dépend de la nature de l'huile mais aussi de l'agent émulsionnant. Selon la littérature, si ce dernier est de nature non ionique, il s'avère être plus efficace dans l'abaissement de γ que les polymères surfactants.

Dans la pratique, il est courant d'opter pour des mélanges surfactants-polymères, grâce à leur activité synergique abaissant en conséquence la tension interfaciale. Le temps nécessaire pour

atteindre l'équilibre est dépendant de la nature et de la concentration des composants (Tadros 2013).

2 Formulation des émulsions

La formulation d'une émulsion vise à apporter au mélange le ou les produits qui vont faciliter la formation d'un système stable au repos, durant toute la durée de conservation de l'émulsion, de la préparation jusqu'à l'utilisation.

Bien que nous disposions d'une large gamme d'agents à propriétés émulsionnantes, il est évident que le choix final se fera en fonction des attentes et des objectifs établis dès le départ par le formateur et des attributs qualité du produit final. Pour conduire au mieux la mise au point d'une émulsion stable, des lignes directives doivent être prises en considération (Aulton 2001).

2.1 Choix du type d'émulsion

Selon Bancroft, « La phase continue de l'émulsion sera celle qui solubilise préférentiellement le tensio-actif », cette règle empirique permet d'anticiper et de prévoir le type d'émulsion en fonction du tensioactif utilisé avant même que le mélange de phases ne soit soumis à cisaillement (Leal-Calderon 2007; Springinsfeld 2009).

Nous pouvons également tenir compte du rapport ou des proportions des deux phases dans le choix du sens de l'émulsion. En effet, si la phase à disperser ou à solubiliser est en très faible quantité, la solubilisation micellaire ou la préparation de microémulsion très stable est préférable. Par contre, si la phase à disperser étant en quantité appréciable, il faudra choisir entre une émulsion H/E ou E/H. Le choix est souvent dirigé vers une émulsion H/E car l'eau est atoxique, ininflammable, plus accessible, moins cher et ne se dégrade pas, cependant d'autres contraintes peuvent exister.

On choisit ensuite le sens de l'émulsion; l'émulsion E/H présente une meilleure pénétration à travers la peau avec une action lente par voie intraveineuse (IV). L'émulsion H/E est moins visqueuse, elle est mieux tolérée avec une action plus rapide par voie IV. Dans le cas d'une administration intramusculaire, il est possible de formuler une émulsion E/H si la nature hydrophile d'un principe actif l'impose (Aulton 2001). En revanche, Si on désire une libération

contrôlée et/ou le principe actif est fragile ou bien on veut associer deux principes actifs incompatibles, le choix tend vers une émulsion multiple.

D'autre part, si certaines huiles ou graisses doivent être utilisées pour un usage oral, il est évident que l'émulsion sera plutôt de type H/E. C'est également le cas des principes actifs lipophiles ou liposolubles (Aulton 2001).

Les émulsions sont préférentiellement utilisées pour un usage externe ou topique; de consistance semi-solide ou liquide/fluide, se déclinant sous forme de crèmes ou de lotions respectivement. Elles sont de type H/E ou E/H.

Dans le premier cas l'usage est plutôt local, ces émulsions sont facilement lavables à l'eau. En revanche, les émulsions de type E/H auront un effet occlusif sur les couches supérieures du stratum cornéum et favorisent la mise à disposition du PA à travers la peau. D'autre part, elles permettent d'éviter la sécheresse des couches du stratum cornéum et donc de maintenir une hydratation convenable de la peau. Elles peuvent avoir également comme autre application le nettoyage de la peau grâce à leur nature grasse. En revanche, elles sont moins acceptables par le consommateur (Aulton 2001).

2.2 Choix de la phase huileuse ou phase organique

Généralement l'huile entrant dans la composition de l'émulsion peut être soit l'ingrédient actif introduit à des concentrations prédéterminées ou bien tout simplement le véhicule de la substance active.

Certaines huiles sont choisies afin de donner au produit final la consistance qui convient à son usage. C'est l'exemple des formes topiques lesquelles contiennent des composants de nature huileuse, leur permettant de maîtriser à des concentrations précises la viscosité nécessaire et favorable à leur application mais aussi la mise à disposition du PA qu'elles contiennent ; c'est l'exemple des hydrocarbures (paraffine liquide, paraffine solide).

D'autres composants peuvent être rajoutés tels que les cires, huile de silicone, huile de maïs, huile de coton, huile d'arachide, etc. Ces huiles d'origine végétale sont souvent considérées comme riches en protéines mais aussi en vitamines et peuvent être considérées elles-mêmes comme étant la phase interne active (Aulton 2001).

2.3 Consistance de l'émulsion

Les émulsions peuvent se présenter sous plusieurs textures, ce qui explique l'intérêt que leur portent les acteurs des domaines pharmaceutique, agroalimentaire et des industriels de l'hygiène et de la beauté. Elles sont fluides, crémeuses ou même gélifiées.

La texture de l'émulsion est exclusivement contrôlée en interne par l'encombrement que créent les gouttelettes, leur déformabilité, leur taille et distribution granulométrique. En externe, la gestion de la texture est confiée à des produits stabilisants, appelés texturants ou encore épaississants. Effectivement, ces derniers sont volontiers ajoutés pour stabiliser le système à long terme mais aussi lorsqu'on veut attribuer à un produit des propriétés d'écoulement perçues positivement par le consommateur et délivrant certaines impressions sensorielles (Brochette 2013).

Sur le plan rhéologique et dans le cas idéal, l'émulsion doit présenter un caractère pseudoplastique voir thixotrope (Aulton 2001). Le produit au final devrait avoir une viscosité apparente telle qu'elle puisse garder l'émulsion suffisamment stable dans le temps et empêcher l'avènement du phénomène de floculation ou de coalescence (Gad 2008). Au repos, cette dernière doit être élevée. Cependant, au moment de l'administration, le produit doit s'écouler facilement et permettre une prise médicamenteuse aisée, cette viscosité apparente devient faible.

Ce changement en viscosité apparente doit être pris en considération lors de la formulation d'un produit destiné à usage médicamenteux ou cosmétique. Il doit être réversible dans le temps afin que le produit puisse reprendre ses caractéristiques de départ et éviter toute instabilité (Aulton 2001; Gad 2008) .

A usage dermique, il y'a un large choix de texture. Nous pouvons citer les lotions ou liniments lesquels sont le plus souvent conditionnés dans des contenants en plastiques flexibles. Leur faible viscosité à l'usage facilite grandement leur application dans le cas des affections inflammatoires. En revanche, les crèmes sont des formes semi-solides ayant une viscosité apparente élevée au repos, conditionnées le plus souvent dans des flacons ou tubes (Aulton 2001).

Les facteurs influençant les propriétés rhéologiques des émulsions sont le plus souvent liés aux paramètres de formulation. Selon la littérature, la viscosité apparente est directement liée au

rapport des deux phases dans le système ou plus précisément à la proportion de la phase dispersante dans le milieu. Elle est également liée à la viscosité de cette dernière, donc plus la proportion de la phase dispersante augmente plus la viscosité apparente du produit augmente. Cette dernière serait plus élevée que la viscosité apparente de la phase dispersante. La proportion de celle-ci ne doit pas dépasser les 60% (Aulton 2001).

Aussi, la réduction de la taille des particules de la phase dispersée augmenterait la viscosité apparente grâce à l'homogénéisation. En effet, dans le cas d'un système monodispersé contrairement aux systèmes polydispersés, l'épaisseur de la double couche électrique joue un rôle primordial en faveur de l'augmentation de la viscosité apparente. D'un autre côté, les globules dispersés auront tendance à flocculer avec le temps et former des agrégats piégeant ainsi une partie de la phase continue. Ce phénomène d'instabilité peut entraîner des variations au niveau de la double couche électrique qui devient moins efficace et entraîner par conséquent une irrégularité du comportement rhéologique du produit.

Par ailleurs, l'ajout d'un agent hydrocolloïde viendra s'adsorber à la surface des globules de la phase dispersée formant ainsi une couche macromoléculaire. En effet, la réduction de la taille des particules a pour but d'augmenter la surface de contact, puis l'agent hydrocolloïde vient se fixer fortement et en grande proportion afin de former autour des gouttelettes un film protecteur favorisant ainsi l'augmentation de la viscosité apparente du milieu (Aulton 2001).

Il existe également une relation directe entre la viscosité de la phase dispersante ou continue et la viscosité de l'émulsion, à titre d'exemple les hydrocolloïdes utilisés comme agent stabilisant, ont pour propriété d'augmenter la viscosité de la phase dispersante. Si la phase continue est huileuse, l'augmentation de la viscosité peut passer par l'ajout de paraffine liquide ou solide par exemple. En revanche, l'ajout d'excipients tels que le glycérol ou certains sirops comme agents édulcorants dans les formes orales pourrait augmenter la viscosité mais aussi entraîner une différence de densité favorisant ainsi le phénomène de crémage (Aulton 2001).

Notons aussi, que la nature et la concentration en agent émulsionnant sont considérées comme deux facteurs influençant la viscosité de la phase dispersée. Dans le cas des émulsions H/E, les agents hydrocolloïdes sont en même temps stabilisants et viscosifiants. D'autre part, selon la structure chimique des agents de surface, il y'a création de ponts entre les globules adjacents

formant une structure de type gel. Le système ainsi floculé présentera une viscosité apparente élevée laquelle est proportionnelle à la concentration en agents tensioactifs (Aulton 2001).

Au-delà des rapports existants entre les paramètres de formulation ou opératoires et la viscosité apparente du milieu, il est judicieux dans le cadre des études de stabilité de prévoir le comportement rhéologique de l'émulsion sous différentes conditions de stockage en termes de température, en la soumettant à une légère contrainte de cisaillement sous l'action d'un rhéomètre pour prédire sa stabilité physique dans le temps.

2.4 Sélection des émulsionnants

Lors de la mise au contact des phases immiscibles, l'agent émulsionnant a pour rôle de faciliter la dispersion grâce à son pouvoir solubilisant mais aussi de maintenir l'ensemble durablement stable lorsque l'apport énergétique cesse (Brochette 2013).

Le choix de la nature et de la concentration en agent émulsionnant et ou stabilisant est primordial et constitue l'un des facteurs déterminants la stabilité et les propriétés physicochimiques finales d'un système (McClements 2005a).

Dans un premier temps, le choix de l'agent émulsionnant dépendra de la voie d'administration et se fera sur la base de sa toxicité. En revanche, Il n'existe pas de liste d'agents émulsionnants approuvée par les autorités compétentes dans le cas de leurs applications pharmaceutiques. Parallèlement, le caractère « irritant » des tensioactifs est à prendre en considération car il est directement lié à la tolérance du produit.

Les émulsionnants non ioniques sont les plus largement utilisés dans le domaine pharmaceutique comme dans le domaine agroalimentaire. Ils ne sont pas porteurs de charge et stabilisent les émulsions par répulsion stérique.

Les agents émulsionnants non ioniques sont considérés comme moins toxiques et moins irritants que les agents anioniques ou cationiques. Ces derniers sont fortement déconseillés pour une administration orale à cause de leur effet laxatif. Les agents cationiques sont connus pour être les plus toxiques même à de faibles concentrations alors que les agents anioniques seraient fortement irritants à cause de leur pH basique. Ils sont déconseillés dans le cas des émulsions à usage topique.

Par ailleurs, la lécithine, méthylcellulose, gélatine, sérum d'albumine et Polysorbate 80 (Tween[®]80), sont tous des émulsionnants non ioniques qui rentrent dans la formulation des formes à usage parentéral (Aulton 2001).

Généralement, le choix d'un émulsionnant ou de son mélange passe par le concept du HLB (balance hydrophile-lipophile) introduit par Griffin en 1949, lequel représente le pourcentage relatif des groupements hydrophile et hydrophobe au sein de la même molécule (Aulton 2001; Springinsfeld 2009). La valeur HLB est fonction directe de la partie hydrophile dans la molécule de surfactif. Elle est élevée lorsque la fraction hydrophile est prédominante avec des valeurs allant de 8 à 18 (Montenegro 2016), ou supérieure à 10 (Hasenhuettl 2008). Dans ce cas, il y'a formation d'émulsion de type H/E (tableau 2 et 3). Au contraire, la valeur HLB est faible (généralement variant de 3 à 6) (Montenegro 2016), ou inférieure à 10 si la molécule est plus lipophile qu'hydrophile et tend à former par conséquent une émulsion type E/H (Hasenhuettl 2008).

Explicitement, dans une émulsion de type H/E, les chaînes hydrophobes de l'agent émulsionnant résident dans les gouttelettes lipidiques alors que la tête hydrophile se trouve orientée vers la phase dispersante, c'est-à-dire aqueuse. De même pour une émulsion E/H, la partie hydrophobe se trouve dans la phase dispersante huileuse alors que la tête hydrophile se trouve immergée dans les gouttelettes aqueuses dispersées.

Dans le tableau 2, on affecte pour chaque intervalle de HLB une application particulière.

Tableau 2. Intervalles de valeurs HLB et leurs applications (Tadros 2013).

<i>Valeurs HLB</i>	<i>Applications</i>
3 - 6	Emulsionnant pour émulsion type E/H
7 - 9	Agent mouillant
8 - 18	Emulsionnant pour émulsion type H/E
13 - 15	Détergent
15 - 18	Solubilisant

Tableau 3. Exemples de surfactants non ioniques et leurs valeurs HLB (la série des Tweens®) (Rowe 2006).

<i>Emulsionnant/surfactant</i>	<i>Valeur HLB</i>
Tween®20 (Polyoxyéthylène (20) sorbitan monolaurate)	16,7
Tween®40 (Polyoxyéthylène (20) monopalmitate, Polysorbate)	15,6
Tween®60 (Polyoxyéthylène (20) sorbitan monostéarate)	14,9
Tween®65 (Polyoxyéthylène sorbitan tristéarate)	10,5
Tween®80 (Polyoxyéthylène (20) sorbitan monooléate)	15,0
Tween®85 (Polyéthylène glycol sorbitan trioléate))	11,0

Par ailleurs, le choix du HLB qui assurera l'émulsification est dépendant de l'huile présente dans le système comme le montre le tableau suivant (Tadros 2013).

Tableau 4. HLB requis pour chaque application (Tadros 2013).

<i>Huile</i>	<i>Emulsion type E/H</i>	<i>Emulsion type H/E</i>
Huile de paraffine	4	10
Beeswax	5	9
Linoléine anhydre	8	12
Cyclohexane	–	15
Toluène	–	15

La proportion de l'émulsionnant ou de son mélange doit être optimale afin d'éviter l'apparition des instabilités physiques dans le temps. En effet, l'objectif est d'obtenir les gouttelettes les plus fines en assurant la plus basse tension interfaciale. Ceci a été constaté avec un pourcentage de surfactant à valeur HLB élevée comme indiqué dans la figure 10 (Tadros 2013).

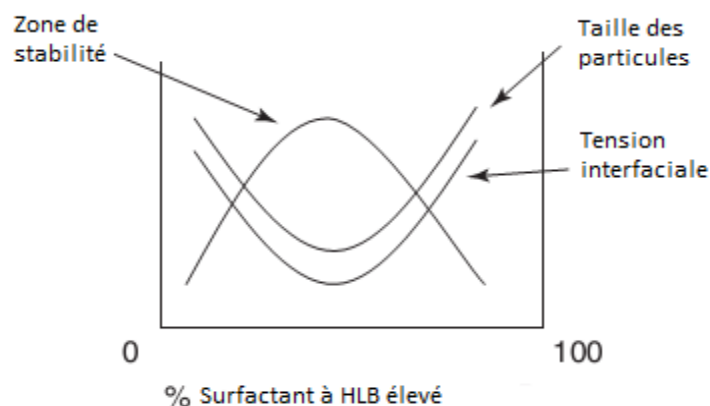


Figure 10. Variation de la stabilité de l'émulsion en fonction du pourcentage du surfactant dans le milieu (Tadros 2013).

2.5 Inversion de phase

La stratégie de formuler des émulsions en utilisant le concept d'inversion de phase tient compte des conditions opératoires telles que la température. En effet, dans le cas des émulsifiants non ioniques, une émulsion H/E peut devenir E/H au-delà d'une certaine température. Cette température est appelée TIP (température d'inversion de phase). La valeur HLB de ces tensioactifs s'abaissent, ils deviennent alors hydrophobes et s'orientent dans le sens d'une émulsion E/H (Aulton 2001). Nous pouvons par ailleurs inverser les phases en jouant sur les proportions de chacune d'entre elles sans pour autant varier la température (Kale 2017).

Lorsqu'il s'agit de tensioactifs non ioniques, la température d'émulsification doit convenir à la stabilisation de l'émulsion, c'est-à-dire ne pas contrer leur adsorption (Brochette 2013).

Formulation et procédé sont étroitement imbriqués. Un agent émulsifiant ne pourra pas jouer pleinement son rôle si le temps requis pour une émulsification est court ou rapide. De même l'ajout d'un épaississant avant le travail d'émulsification peut entraver l'action du tensioactif en surface et empêche d'atteindre des valeurs de cisaillement élevées. Nous devons donc optimiser parallèlement la stabilisation à l'interface et le rendement de l'énergie utilisée pour réaliser la dispersion (Brochette 2013).

3 Nanoémulsions

3.1 Définitions

Dans les années quarante, Hoar et Schulman (Hoar 1943) ont émis l'hypothèse de l'existence de structures microscopiques caractérisées par leur transparence de type émulsion suite à un mélange d'alcool, d'huile, d'eau et de tensioactif cationique. Grâce à la microscopie électronique, ces structures ont pu être caractérisées et tout système transparent portait l'appellation générale de « microémulsions » (J.H. Schulman 1959). De leur côté Chou et al., (Chou 1980) ont proposé le terme « miniémulsion » en 1980.

Selon Montenegro (Montenegro 2016), cette terminologie leur est impropre car la taille des gouttelettes est généralement de l'ordre du nanométrique, par conséquent on leur préfère l'appellation de « nanoémulsions », largement utilisée au cours de ces dernières décennies.

Par ailleurs, l'IUPAC définit les microémulsions comme étant des dispersions colloïdales (IUPAC 1972), thermodynamiquement stables, contenant une phase aqueuse, huileuse et interfaciale. Elles se forment presque spontanément (Kale 2017 ; McClements 2012). Les nanoémulsions sont similaires aux microémulsions. Quant à la taille des gouttelettes à l'échelle nanométrique (figure 11). Elles sont en revanche obtenues par apport d'énergie mécanique, mettant en jeu une faible proportion de tensioactifs (3% à 10% m/m) (Kale 2017), contrairement aux microémulsions (environ 20% m/m) (Kale 2017), qui sont par conséquent potentiellement irritantes (Aulton 2001; McClements 2012; Montenegro 2016; Kale 2017). En revanche, ces dernières sont thermodynamiquement stables et composées essentiellement de micelles de surfactifs (Flanagan 2006a). Elles sont produites grâce à ses molécules de surfactif qui s'auto-assemblent sans apport d'énergie (Santana 2013).

Les principales différences entre ces deux systèmes sont listées dans le tableau 5.

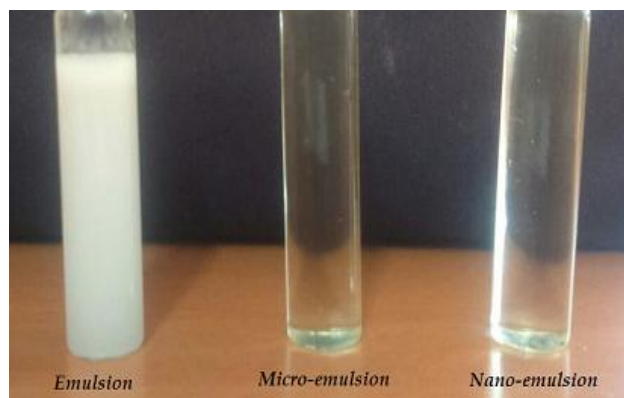


Figure 11. Aspect macroscopique entre émulsion, microémulsion et nanoémulsion (Kale 2017).

Tableau 5. Comparaison entre nanoémulsions et microémulsions (Qadir 2016).

<i>Microémulsions</i>	<i>Nanoémulsions</i>
<ul style="list-style-type: none"> - Thermodynamiquement stables - Restent stables très longtemps - Forte proportion en surfactant - Production moins coûteuse que celle des nanoémulsions 	<ul style="list-style-type: none"> - Cinétiquement stables - Ne possèdent pas une très grande stabilité - Ne nécessitent pas de fortes proportions en tensioactifs - Coût de production élevé

Ces deux systèmes ont la propriété commune de solubiliser les molécules médicamenteuses et de les maintenir uniformément distribuées en solution (Aulton 2001). En revanche, le pouvoir solubilisant des NEs est nettement plus efficace que les dispersions micellaires (Yukuyama 2016).

Les nanoémulsions sont définies comme étant des systèmes thermodynamiquement instables, mais sur le plan cinétique elles sont considérées comme étant stables (Montenegro 2016). En effet, leur stabilité cinétique peut être améliorée, en y ajoutant l'émulsifiant adéquat et en optimisant le processus (McClements DJ. 2005; Mason 2006a). Elles peuvent conserver pendant plusieurs mois leur état initial même après dilution de ces dernières ou variations de la température (Anton 2008).

Elles contiennent dans leur composition l'eau, l'huile ou un solvant organique et un ou plusieurs surfactant(s), auxquels on peut rajouter un co-surfactif. On les appelle les émulsions submicroscopiques, ultrafines ou encore miniémulsions, dont la taille des particules couvrent un intervalle allant de 50 à 500 nm (Tadros 2004 ; Anton 2008; Aboofazeli 2010; Lovelyn 2011; Singh 2017), de 30 à 200 nm ou < 200 nm (Solans 2005; Salvia-Trujillo 2017), parfois même

de 100 à 500 (Wulff-Perez 2009; McClements 2012), ou encore de 100 à 600 nm (Nakajima 1993; Nakajima 1997). Suivant toutes ces définitions, les émulsions dont la taille des particules se situent entre 20 et 600 nm peuvent être considérées comme des nanoémulsions.

Elles peuvent être de type H/E ou E/H, H/E/H ou E/H/E (Kale 2017), contenant dans leur formulation des composants « Generally Recognized As Safe » GRAS par la FDA (Lovelyn 2011; Singh 2017), des composants naturels comme par exemple les peptides et les polysaccharides ainsi que les surfactants de bas poids moléculaire, tels que les Tweens[®] et les Spans[®]. Ces derniers en plus de leur action émulsionnante connue, possèdent une toxicité minimale (Rao 2011a).

Dans la mise au point des NEs, il faut tenir compte des proportions des deux phases (interne et externe) mises en jeu, ainsi que de la nature du surfactif, car dans la majorité des cas, ils conditionnent le sens de l'émulsion. En effet, lorsque le volume ratio de la phase interne/externe dépasse 40% ; il y'a inversion de phase. D'autre part, le surfactant hydrophile tend à former des NEs type H/E contrairement aux surfactants lipophiles qui favorisent la formation des NEs de type E/H. Les surfactifs à valeur HLB élevée sont stabilisants à l'encontre du phénomène de coalescence (Singh 2017). Les émulsions multiples les plus couramment formulées sont de type E/H/E comme par exemple l'association du 5-fluoro uracile qui est hydrophile et le paclitaxel qui est lipophile, présents dans la phase interne et/ou externe aqueuse et dans la phase huileuse respectivement. Quant aux NEs type H/E/H, elles sont extrêmement rares (Singh 2017).

Les schémas représentant les types d'émulsions sont présentés dans la figure 12.

Reconnues pour être transparentes ainsi que pour leurs très fines particules, elles font l'objet de différentes applications notamment dans le domaine de l'agroalimentaire, en cosmétique, à usage de diagnostic, en biotechnologie et bien évidemment dans le domaine pharmaceutique dans lequel l'usage des nanoémulsions est très largement répandu en tant que système nanovecteur de molécules d'intérêt.

Leurs propriétés physicochimiques uniques en matière de stabilité (absence de floculation et de coalescence), ainsi que leur très faible turbidité font de ces systèmes une catégorie de médicaments très attractifs (Tadros 2004; Sagalowicz 2010).

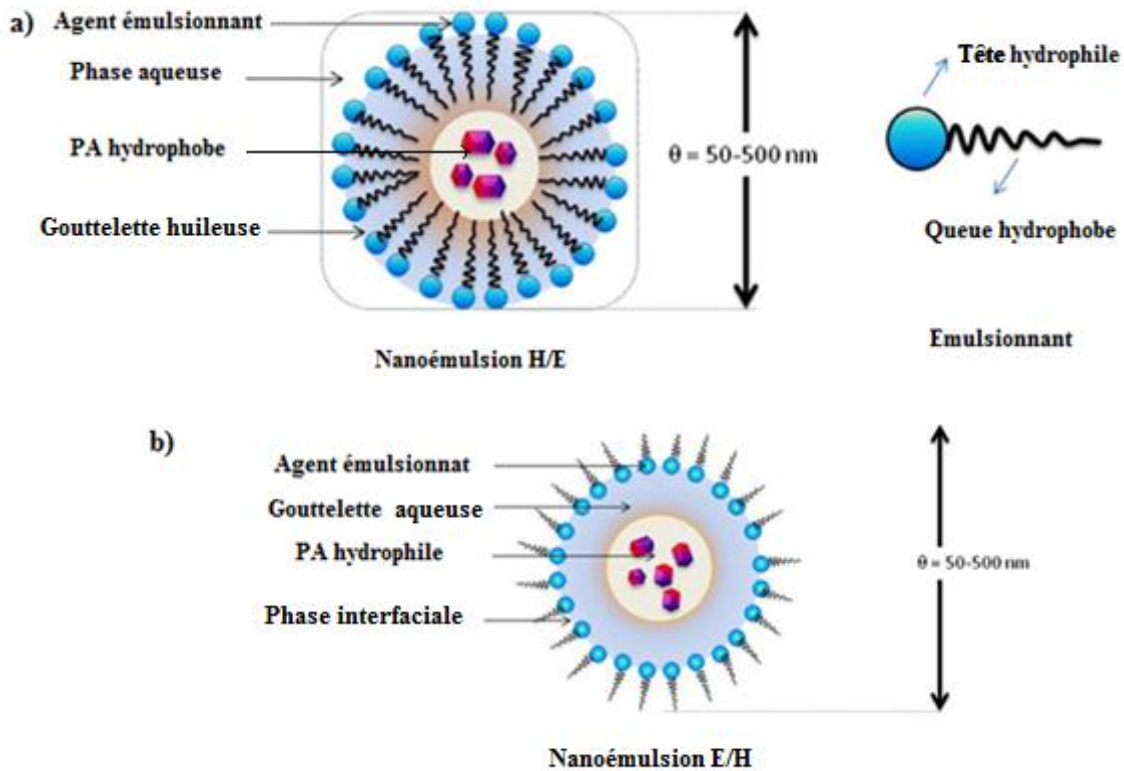


Figure 12. Représentation schématique d'une émulsion type H/E encapsulant une molécule lipophile (a). Représentation schématique d'une émulsion E/H encapsulant des molécules hydrophiles (b) (Qadir 2016).

Leur principe de fabrication repose sur l'augmentation de la surface de contact entre la phase huileuse et/ou organique et la phase aqueuse, ce qui permet d'améliorer efficacement la solubilité, promouvoir l'absorption et donc la biodisponibilité des molécules actives mais aussi la protection de molécules fragiles instables contre les facteurs de dégradation (Shafiq 2007a; Cortes-Munoz 2009).

3.2 Avantages et inconvénients

Les NEs sont classées dans la famille des systèmes dispersés, dont la taille nanométrique de leurs gouttelettes leur confère de nombreux avantages comparées aux formes conventionnelles au sein de la même classification (T.Tadros 2004; Sarker 2005; Qadir 2016; Kale 2017):

- Absence des phénomènes de sédimentation et de crémage ou même de floculation, grâce au mouvement Brownien des particules qui s'exerce à l'encontre de la force de pesanteur, engendrant une stabilité cinétique ;
- Pour de très petites tailles, le film interfaciale est rigide et s'oppose à sa déformation et donc à toute forme de coalescence ;

- Augmentation du taux d'absorption des PA et donc de leur biodisponibilité, surtout pour la voie orale (Bouchemal 2004; Sonnevile-Aubrun 2004; McClements 2011a);
- Améliore la solubilité de certains PA lipophiles ;
- Les NEs sont intéressantes pour un usage dermique car la large surface d'activité offerte par les gouttelettes dispersées favorise une rapide pénétration des substances actives ;
- Une meilleure pénétration tissulaire grâce aux tailles nanométriques des gouttelettes qu'elle contient ;
- Possibilité d'une libération prolongée ou contrôlée ;
- Minimise l'effet du premier passage hépatique ;
- Ce sont des systèmes qui véhiculent les peptides souvent sujets à l'hydrolyse enzymatique ;
- Leur transparence ainsi que leur faible viscosité leur confèrent une agréable sensation au toucher ;
- Contrairement aux microémulsions qui nécessitent une concentration élevée en surfactif, généralement de l'ordre de 20% ; pour les NEs, une concentration de l'ordre de 5 à 10% peut être raisonnable ;
- Les NEs se déposent uniformément après application et possèdent un bon pouvoir pénétrant ;
- A usage cosmétique, les NEs peuvent encapsuler des fragrances ou parfums rentrant dans la formulation des produits de soins corporels ;
- Les NEs, sont des systèmes stables avec un rendement beaucoup plus élevé contrairement aux liposomes ;
- Les NEs sont hautement stables sur le plan cinétique ;
- Plus petites est la taille des gouttelettes des NEs, plus stable est le produit qui les contient ;
- L'intérêt particulier que portent les industriels aux NEs incitent à la compétitivité, ce qui favorise l'abaissement du prix de production ;
- Fabrication aisée et facilité de transposition d'échelle.

Les inconvénients des nanoémulsions sont (Tadros 2004; Qadir 2016; Kale 2017) :

- La majorité des NEs sont produites par homogénéisation à haute pression ou ultrasonication ;
- En cosmétologie, les NEs coûtent chères (excès de surfactants et de co-surfactants);
- Excès de surfactants peut engendrer une toxicité ;

- Manque de compréhension du mécanisme de production des NEs, ainsi que du rôle de chacun des surfactif et co-surfactif ;
- Le concept TIP reste peu connu des chimistes ainsi que les mécanismes qui s'en suivent ;
- Ce sont des systèmes sensibles aux variations de pH et de température ;
- Le mûrissement d'Ostwald est la principale instabilité liée aux NEs ;
- Obligation d'ajout de certains composants insolubles telle qu'une seconde phase huileuse ou un polymère surfactant insoluble dans la phase aqueuse pour contrer le mûrissement d'Ostwald.

3.3 Propriétés des nanoémulsions

Considérées comme étant thermodynamiquement instables, les NEs possèdent une énergie libre de surface, appelée énergie de Gibbs, supérieure à zéro. Elles ont tendance à réduire cette énergie afin de stabiliser le système (McClements 2012). En matière de stabilité, et contrairement aux émulsions conventionnelles, elles résistent à la ségrégation gravitationnelle, à la coalescence et à la floculation (McClements 2007; McClements 2011b), mais sont plus sujettes au mûrissement d'Ostwald (Taylor 1998; Tadros 2004).

En outre, ses propriétés spectrales sont directement liées à la taille des particules, qui sont nanométriques (Lovelyn 2011; McClements 2012). Les NEs présentent l'effet Tyndall. En effet, elles sont transparentes légèrement bleutées ou bien légèrement troubles dont la taille des particules dispersées est inférieure à la longueur d'onde du spectre (figure 13), elles n'absorbent pas, ou bien diffusent très peu la lumière dans le visible (McClements 2012), plus précisément dans l'Ultra-violet (Aulton 2001; Tadros 2004).

Lorsque la taille des gouttelettes se trouve ≤ 20 nm, les NEs sont transparentes, ce qui les rend particulièrement intéressantes dans le domaine des sciences alimentaires surtout dans la production des boissons (Salvia-Trujillo 2017). La transparence dépend de la fraction huileuse ou apolaire dispersée, elle conditionne la turbidité de la NE. Cette dernière au cours d'un processus de nanoémulsification par ultrasons ou homogénéisation sous pression, diminue progressivement et tend vers la transparence. Ceci s'explique par la migration des gouttelettes huileuses au sein des micelles de surfactifs, qui ne diffusent plus la lumière (Leong 2009; Abbas 2013). Par ailleurs, La perte de la transparence est un signe d'instabilité qui traduit une augmentation de la taille des particules (Lovelyn 2011).

Les nanoémulsions sont connues pour être stables physiquement, l'intégrité de leur structure est maintenue grâce à la stabilisation stérique générée par le surfactant ou par ajout de polymère. L'action synergique de ces deux composants peut être envisagée (Tadros 2004; Sarker 2005). En effet, les NEs sont connues pour leur stabilité « cinétique » et non « thermodynamique ». Toutefois, le temps de stabilité dépend étroitement des paramètres de formulation qui doivent être maîtrisés, comme l'ajout de tensioactif adéquat mais aussi de co-stabilisant qui permet de minimiser le phénomène de diffusion des petites gouttelettes vers les plus grosses (mûrissement d'Ostwald), en créant une pression osmotique qui contrebalance la pression de Laplace (Hansali 2012)

Des inconvénients des formes dispersées conventionnelles découlent des nanoémulsions avec ses nombreux avantages et applications. Leur très faible taille ainsi que la très grande surface de contact de ses particules, laissent prétendre à une encapsulation de molécules bioactives en vue d'améliorer la biodisponibilité, et par là réduire les effets indésirables (Lovelyn 2011). En outre, elles ont l'avantage d'améliorer la solubilité des molécules hydrophobes et protéger d'autres molécules fragiles contre la dégradation enzymatique et l'hydrolyse ; la voie parentérale s'y prête dans ce dernier cas. De plus, une libération prolongée et/ou contrôlée peut être envisagée.

Il existe une relation de corrélation étroite entre la taille nanométrique des particules et la solubilité des substances actives ou bioactives qu'elles contiennent. Ces particules se trouvent déjà uniformément et finement distribuées dans leur phase dispersante les entourant. Cette échelle de taille est particulièrement intéressante pour certaines molécules hydrophobes ou faiblement solubles dans l'eau.

La réduction de la taille des particules et l'augmentation de la surface qui en résulte, ajouté à cela l'effet de courbure, améliorent nettement la solubilité (Salvia-Trujillo 2017).

L'absence de phénomènes d'instabilités physiques tels que la floculation, la sédimentation ou bien la coalescence motive le choix de la voie parentérale (Lovelyn 2011).

Grâce à leur grande stabilité cinétique, ces systèmes sont d'excellents précurseurs pour la synthèse de nanoparticules tels que les nanosphères ou nanocapsules polymériques, ainsi que les nanoparticules lipidiques. Il existe évidemment un lien entre la formulation des NEs et la génération des NPs (Anton 2008).

D'autre part, le comportement rhéologique des NEs n'est pas à négliger. En effet son caractère viscoélastique est très intéressant à explorer. Leur aspect peut varier de l'opaque au transparent. Elles peuvent être liquides comme elles peuvent être semi-solides (Lovelyn 2011; Qadir 2016).

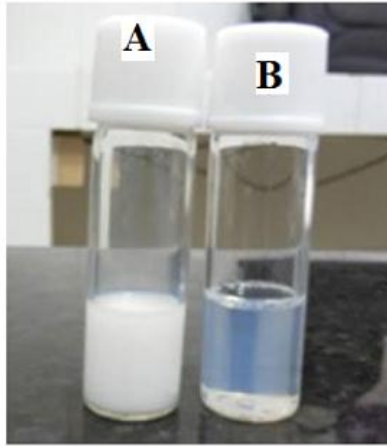


Figure 13. Macroémulsions (A) Nanoémulsions (B) (Qadir 2016).

3.4 Structure et formulation des nanoémulsions

La formulation et la stabilité des NEs sont conditionnées d'abord par la composition, généralement quaternaire du système, ensuite par le procédé de formulation mis en jeu (Qadir 2016). En effet, l'association de surfactif/co-surfactif, de la phase huileuse/PA et ou de la phase aqueuse/PA, est soumise à des essais préliminaires sur diagramme ternaire.

Sur ce dernier, est apposé de chaque côté les pourcentages ou rapports de mélange binaires suscités (Shakeel 2007; Qadir 2016). A l'issue d'une série d'expérimentations, on fait ressortir un domaine d'étude, hébergeant les différentes proportions menant à des NEs (figure 14). Seule la phase classée Winsor IV est monodispersée et utilisée comme vecteur médicamenteux. En dehors de cette zone, la quantité de surfactif ou d'émulsionnant n'est pas suffisante pour former des NEs (Montenegro 2016).

Plus explicitement, le formulateur repose essentiellement sur un examen visuel selon lequel, si la préparation est trouble, elle est donc considérée comme biphasique et si elle apparaît claire et ou transparente, elle est considérée comme monophasique.

Sur le diagramme ternaire qui en découle, on attribue à chacune des combinaisons monophasiques un spot. Ceci permettra de définir une zone ou un domaine d'expérimentations pour l'obtention de NEs (Qadir 2016).

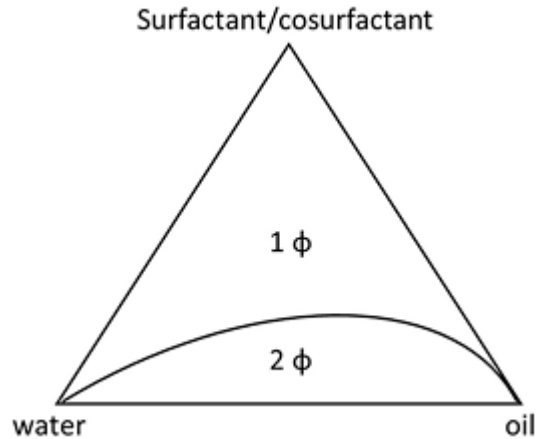


Figure 14. Exemple de diagramme ternaire de nanoémulsion simplifiée à température et à pression constante. (1Φ) : monophasique ; (2Φ) : biphasique (Montenegro 2016).

Souvent, la formulation de NEs repose soit sur le concept HLB ou bien sur la structure géométrique des surfactifs et leur réarrangement à l'interface Huile/Eau. Une large gamme de tensioactifs fut utilisée pour leur mise au point.

Lorsqu'il s'agit de tensioactif non ionique, les NEs sont dites thermosensitives. . En effet, lors de la formulation, la température est un paramètre important à prendre en considération, car au-delà de la TIP, il y'aura changement de propriétés du tensioactif qui rentre dans leur composition. En revanche, lorsqu'il s'agit de tensioactif ionique, le problème ne se pose pas car le choix se fera généralement sur la base de leur HLB, lequel orientera le sens de la NEs vers un système type H/E ou E/H (Montenegro 2016). Le surfactif à l'interface H/E formera une courbure positive, négative ou nulle comme cela est indiqué dans la figure 15 (Santana 2013).

Selon la littérature, les surfactifs de conformation conique ont tendance à former des interfaces courbes, tandis qu'avec des surfactifs en forme de cône tronqué ou bien de blocs rectangulaires, on a plus de chance d'obtenir des structures lamellaires (Jonsson 1999).

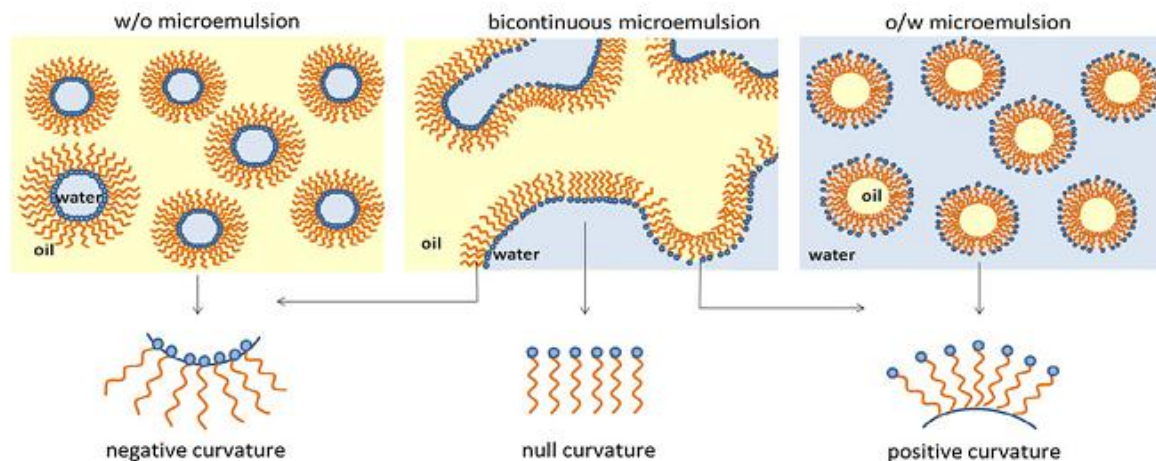


Figure 15. Représentation schématique des différentes orientations du surfactif à l'interface H/E (Santana 2013).

3.5 Nanoémulsification

Dans la littérature, il y'a très peu de précisions concernant la méthodologie d'obtention de NEs. En revanche toutes les sources s'accordent sur la nécessité de l'apport énergétique dans l'obtention de ces dernières. Dans ce cas, le cisaillement doit être extrême afin que la taille des gouttelettes puisse atteindre l'échelle nanométrique (Qadir 2016).

Le recourt à l'énergie mécanique dans la production des émulsions entraîne une augmentation de la surface de contact, en augmentant le nombre de gouttelettes dispersées. Leur obtention combine souvent une forte agitation suivie d'une homogénéisation.

En revanche, si l'on veut réduire la taille des gouttelettes en passant de l'échelle micrométrique à l'échelle nanométrique, deux choix s'offrent à nous : le recours à l'ajout d'une quantité raisonnable de tensioactif ou bien en choisissant une méthode d'émulsification adaptée à cet effet.

Plus les gouttelettes sont sphériques et fines, plus l'énergie requise pour réduire leur taille est importante. Le besoin de recourir à des méthodes énergétiques tire ses conclusions du théorème de Laplace et plus précisément de la différence de pression entre le milieu interne et externe des gouttelettes dispersées (Tadros 2004).

Dans la formulation des NEs, les efforts sont d'abord orientés vers le choix des composants du système, lesquels constituent les paramètres critiques dont dépendent la solubilité du PA, le comportement thermodynamique de la NE, mais aussi la stabilité de cette dernière (Qadir

2016). Par conséquent, la réussite de leur mise au point doit passer par un rapport Huile/eau adéquat, et l'ajout d'un surfactif associé à un co-surfactif en proportion permettant de solubiliser une large quantité de substance(s) active(s) et de lui (leur) éviter une quelconque dégradation (Qadir 2016). L'objectif final du formulateur est le gain de temps et d'énergie qui passerait forcément par des choix optimums lors des essais de préformulation et de formulation.

Il n'existe pas de démarches précises permettant de prédire la structure et les propriétés des NEs. Il est par ailleurs évident que dans un premier temps, si l'on se réfère aux valeurs HLB de chaque surfactif mis en jeu, de conclure sur le sens et donc le type de la NEs à obtenir. Tout en sachant que si la valeur de HLB est élevée, la NE est de type H/E et vice versa (Qadir 2016).

3.5.1 Matières premières et excipients

Dans la composition des NEs, entrent des composants aux fonctionnalités variées. Ces derniers seront étudiés et décortiqués tant sur le plan physicochimique que rhéologique, car leur mélange final devra aboutir aux propriétés des NEs escomptées par les formulateurs.

Ces composants qui serviront d'adjuvants dans des systèmes de délivrance de médicament devront répondre aux exigences communes suivantes : biocompatibilité, faible toxicité et irritabilité. On peut fréquemment observer que dans certaines compositions, nous pouvons retrouver des excipients tels que les polysorbates, les lécithines ainsi que des huiles naturelles. D'autre part, les NEs doivent satisfaire aux exigences thérapeutiques de spécificité et d'efficacité (performance pharmacocinétique) (Tadros 2004).

Les NEs sont des systèmes quaternaires comprenant généralement des huiles, des surfactifs, des co-surfactifs et une phase aqueuse.

3.5.1.1 Huiles /lipides

C'est l'un des composants les plus importants des NEs. Elles en contiennent entre 5% et 20% dans la composition d'une NE type H/E (Singh 2017). Leur sélection dépend essentiellement de la solubilité de la substance active à véhiculer (Qadir 2016; Singh 2017). La phase huileuse possède non seulement le potentiel d'encapsuler bon nombre de molécules lipophiles, mais également de favoriser leur absorption dans le tractus gastro-intestinal (GI). La NE type E/H constitue la meilleure option pour les PA hydrophiles, tandis que pour les PA lipophiles, seules les NEs type H/E leur sont adaptées (Qadir 2016).

Cependant, n'est pas chose aisée l'encapsulation des molécules faiblement solubles, car leur solubilité dans les différents composants de la formulation doit être rigoureusement étudiée. Il se trouve que certaines huiles comestibles, possèdent une capacité insuffisante à encapsuler les PA faiblement solubles dans l'eau. De plus, ces derniers nécessiteraient, en conséquence, l'ajout d'une forte proportion d'huile et de surfactif en parallèle, ce qui peut engendrer probablement une toxicité. Pour toutes ces raisons, Les huiles hydrolysées ou modifiées leur sont préférables (Qadir 2016). Dans le tableau 6, nous listons les huiles fréquemment utilisées dans le développement pharmaceutique des NEs.

La phase huileuse peut être constituée essentiellement de l'huile dite bioactive, à l'exemple des huiles essentielles ou aromatiques, ou bien même des vitamines dissoutes dans une phase huileuse vectrice, comme par exemple : l'huile de tournesol ou l'huile d'olive (McClements 2011b). La D- α -Tocopherol (vitamine E) fut largement utilisée comme vecteur médicamenteux dans la formulation des NEs (Morais Diane 2014; Pawar 2014; Ozturk 2015).

De leur côté, les huiles d'origine végétale sont facilement disponibles et adaptées à certaines applications. En revanche, leur usage est limité par leur volume moléculaire (Flanagan 2006a). On leur préfère les huiles à courte chaîne telle que l'hexane ou encore les triglycérides à chaînes moyennes (TCM)s, lesquels sont très largement utilisés dans la formulation des NEs (Patel 2006). L'huile de soja (Anuchapreeda 2012; Jiang 2013; Ghosh 2014), l'huile de sésame (Ghosh 2014), l'huile de coton (Abd-Elsalam 2015), ou encore l'huile de coco (Al-Edresi 2009) furent toutes utilisées seules ou en association. L'acide oléique et l'oléate d'éthyle furent également utilisés pour des NEs à usage parentérale, orale et topique (Makhmalzadeh 2012; Ali 2014).

La phase huileuse peut contenir plusieurs composants non polaires, tels que les huiles essentielles, triglycérides ou des huiles d'origine minérale. Cette approche permet à la NE de résister au mûrissement d'Ostwald (Chang 2012; Ozturk 2015).

Les caractéristiques physico-chimiques de ces huiles doivent être prises en considérations lors des études de préformulation, telle que la viscosité et la tension interfaciale (Aranow 1963). La viscosité par exemple, influence grandement la qualité finale des NEs produites, à savoir la taille des particules mais également leur stabilité (McClements 2005a; Troncoso 2012a). Plus la viscosité de l'huile augmente, plus les NEs produites par émulsification spontanée sont fines (Bouchemal 2004). En revanche, ceci ne constitue pas une règle absolue car d'autres études

montrent qu'il n'existe aucune corrélation entre la viscosité et le diamètre moyen des particules ($r^2 < 0,4$) (Komaiko 2015a). Selon Bouchemal et al., certaines huiles à faible viscosité permettent d'obtenir des NEs (Bouchemal 2004).

D'autres auteurs ont rapporté dans leurs travaux qu'une phase huileuse possédant une faible viscosité et une faible tension interfaciale, faciliteraient la dispersion et la déformation de cette dernière, ce qui entraîne la réduction de la taille des particules. Ainsi, le temps de résidence des gouttelettes au sein d'un homogénéisateur se trouve réduit (Seekkuarachchi 2006; Jafari 2008; Wooster 2008; Qian 2011). C'est l'exemple des huiles essentielles, avec lesquelles nous pouvons obtenir facilement des NEs contrairement aux triglycérides à longue chaîne TLCs (McClements 2011b). En effet, ces huiles essentielles sont des composés cycliques à double liaison non amphiphiles et possèdent un poids moléculaire faible comparé aux triglycérides. Elles sont parfaitement compatibles avec les chaînes hydrophobes du surfactif, favorisant ainsi leur pénétration dans le film interfacial assurant ainsi une meilleure solubilité de l'huile (Yaghmur 2002).

A l'issue de cette synthèse, nous pouvons donc conclure que l'optimisation du processus passe inévitablement par un choix adéquat lors de la phase du développement des NEs. Le choix optimal d'une phase huileuse, se basant sur sa viscosité et sa tension interfaciale entre autres serait alors idéal. Pour certaines huiles visqueuses, l'augmentation de la température lors d'un procédé de préparation favoriserait et faciliterait ainsi la nanoémulsification.

La nature de l'huile est primordiale (Salvia-Trujillo 2017). Certaines huiles d'origine minérale sont non digestibles et vont à l'encontre d'un passage gastro-intestinal. D'un autre côté, ces dernières sont d'excellentes alternatives aux TLCs et MCTs, beaucoup mieux tolérées par les patients aux antécédents d'athérosclérose (Singh 2017).

Tableau 6. Liste des principales huiles utilisées dans le développement pharmaceutique des nanoémulsions (Qadir 2016).

<i>Phase huileuse</i>	<i>Nom chimique</i>	<i>Précautions à prendre lors du développement des NEs</i>
<i>Captex 355</i>	Glyceryl tricaprilate/caprice	Bonnes propriétés d'émulsification et de solubilisation qui conviennent au développement de NE topiques/transdermiques
<i>Captex 200</i>	Propylene dicaprilate/dicaprate glycol	Convient pour le développement de NE topique/transdermique avec de bonnes propriétés de solubilisation et d'émulsification
<i>Captex 8000</i>	Glyceryl tricaprilate (tricaprylin)	
<i>Witepsol</i>	90:10% w/w C12 glyceride tri:dieters	
<i>Myritol 318</i>	C8/C10 triglycerides	Développement de NE topiques, orales et parentérales avec de bonnes propriétés de solubilisation et d'émulsification
<i>Sunflower oils</i>	Beta carotene	Convient au développement de NE orales
<i>Corn oil</i>	Beta carotene	
<i>Sesame oil</i>	Alfa tocopherol	
<i>Olive oil</i>	Alfa tocopherol	
<i>Soybeans oil</i>	Alfa tocopherol	Convient au développement de NE orales et parentérales
<i>Paraffin oil</i>	Alfa tocopherol	Convient au développement de NE orales et topiques
<i>Isopropyl myristate</i>	Myristic acid isopropyl ester	
<i>Eucalyptus oil</i>	Eugenia	
<i>Sefsol 218®</i>	Propylene glycol monocaprylic ester	Convient au développement de NE à usages multiples ayant de bonnes propriétés de solubilisation et d'émulsification.
<i>Sefsol-228®</i>	Propylene glycol dicaprylic ester	
<i>Homotex PT®</i>	Glycerol monocaprylic ester	
<i>Triacetin</i>	Glycerol triacetate	
<i>Capryol 90®</i>	Propylene glycol monocaprylate	
<i>Lauroglycol 90®</i>	Polyglycolysed glycerides	
<i>Capmul MCM®</i>	C8/C10 mono-diglycerides	
<i>Labrafac lipophile®</i>	Caprylic/capric triglyceride	

En revanche, l'usage des huiles triglycérides qui sont reconverties en monoglycérides et acides gras libres, sont facilement solubilisés dans les fluides du tractus gastro-intestinal (TGI). Ils constituent de meilleurs vecteurs pour les molécules lipophiles et vitamines. Le choix entre triglycérides à longues chaînes et moyennes chaînes est tributaire de la nature et la conformation de la molécule à encapsuler, ainsi dans l'exemple des caroténoïdes, les TCLs sont suffisamment larges de structure pour encapsuler ces dernières (Qian 2012; Salvia-Trujillo 2013a). Les études

conduites par McClements et al. sur l'influence de la nature des lipides (McClements 2012), ont clairement montré l'apport positif des triglycérides à longue et moyenne chaînes dans l'amélioration de la biodisponibilité de la curcumine encapsulée dans une NE.

En outre, dans une étude comparative de l'impact des variables opératoires et de composition, mettant en jeu des huiles différentes en présence du Tween[®]80, les NEs obtenues par émulsification spontanée montrent une réduction de taille dans l'ordre suivant : MCTs < huiles essentielles < TLCs (Komaiko 2015a).

Pour la même composition qualitative et en conduisant une émulsification par inversion de phase, les résultats sont identiques aux précédents avec des gouttelettes plus larges en présence de TLCs (figure 16) (Ostertag 2012). De son côté, McClements (McClements 2005a) a statué sur l'effet positif sur les valeurs du potentiel zêta des NEs produites avec les TCMs ou MCTs en présence de Tween[®]20. Ceci est dû à la composition de cette huile et la capacité du surfactif à être présent à l'interface.

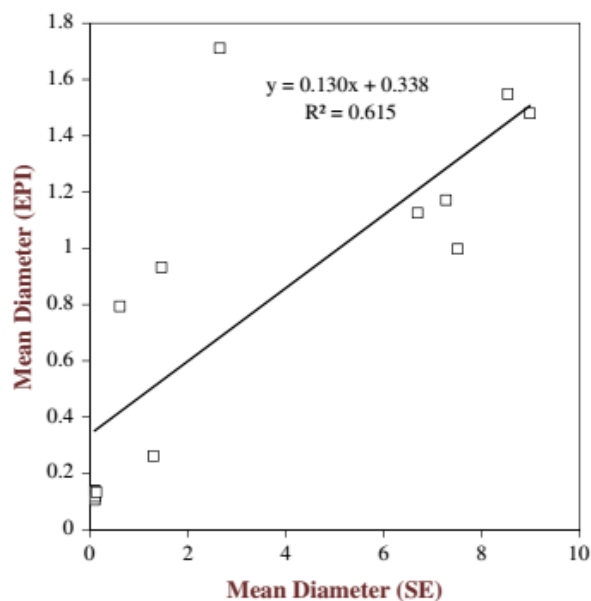


Figure 16. Comparaison des diamètres moyens des particules obtenues par émulsification spontanée (SE) et technique d'émulsification par inversion de phase (EPI). La comparaison est faite sur des systèmes similaires (Ostertag 2012).

3.5.1.2 Phase aqueuse

C'est sur la phase aqueuse que repose la majorité des caractéristiques organoleptiques d'une NE (Lohith Kumar 2018). La composition de la phase aqueuse joue un rôle déterminant dans les attributs qualité des NEs. En effet, elle peut contenir des adjuvants tels que les arômes,

les acides, les bases, les polysaccharides, les surfactifs, etc. Aussi, nous pouvons contrôler à travers des choix optimaux de formulation, les propriétés de la phase aqueuse ainsi que les paramètres opératoires du procédé choisi.

En effet, ce dernier sera adapté à la formulation en ajoutant des agents viscosifiants par exemple. Les contraintes de cisaillement requises pour une homogénéisation, seraient plus importantes pour une réduction de taille des gouttelettes dispersées, mais en contrepartie, on garantit une meilleure stabilité de ces dernières au sein de leur phase dispersante (Qian 2011). D'un autre côté, ce genre d'adjuvants améliore la stabilité de la NE en évitant tout phénomène d'instabilité telle qu'une sédimentation, floculation ou coalescence (McClements 2005a). Par conséquent, il est aisé d'agir sur la phase aqueuse pour modifier les propriétés fonctionnelles et la stabilité des NEs produites (Salvia-Trujillo 2017).

3.5.1.3 Surfactifs

Dans la composition de tout système dispersé, l'ajout d'un tensioactif devient indispensable à la stabilité de la formule finale. Il agit en abaissant la tension interfaciale en facilitant la dispersion et l'homogénéisation (Salvia-Trujillo 2017). A la fin, la flexibilité du film interfaciale permet de maintenir les gouttelettes finement divisées et individualisées. C'est le caractère lipophile du tensioactif qui façonne et offre la courbure correcte à l'interface huile/eau (Qadir 2016), la géométrie moléculaire y contribue également et confère au film interfaciale une certaine flexibilité (Komaiko 2015a).

Dans le cas des surfactifs à valeurs HLB qui se situent entre 3 et 6 tels que les Spans[®], les NEs obtenues sont orientées types E/H, contrairement aux surfactifs dont les valeurs HLB se situent entre 8 et 18 tels que les Tweens[®], lesquels sont choisis quand le type H/E est souhaité (Qadir 2016).

Selon la littérature, toutes les NEs préparées avec un surfactif à HLB plutôt hydrophile, présentaient une réduction de taille des gouttelettes qu'elles contiennent : HLB ~11 (Pouton 1997), HLB autour de 15 (Ostertag 2012), ou en augmentant la valeur HLB (Bouchemal 2004; Komaiko 2015a). Toutefois, les surfactifs très hydrophiles sont écartés car ces derniers doivent être également solubles dans la phase huileuse (Komaiko 2015a).

Le tableau 7 fournit une liste non exhaustive des différents émulsionnants communément utilisés dans le développement des NEs. Les surfactifs utilisés dans la formulation des NEs sont nombreux comme par exemple : La lécithine (Klang 2011), Crémophor EL (polyoxyl-35-castor

oil) (Vyas 2008; Zhang, T., 2016), Tween[®]20,40,60 et 80 (polyoxyéthylène sorbitan monolaurate) (Wang 2008; Jo 2014), Span[®]20,40,60 et 80 (sorbitan monolaurate) (Polychniatou 2014; Jadhav 2015), le Solutol HS-15 (poly oxyéthylène-660-hydroxystéarate) (Scheller 2014), la famille des poloxamers (Brüsewitz 2007), Sodium dodécyl sulfate (Brüsewitz 2007; Erramreddy 2014; Uluata 2016), caséine (He 2011; Maher 2011), β lactoglobuline (Ali 2016b), les polysaccharides ex. gommés et dérivés d'amidon (Combrinck 2014), polyéthylène glycol et copolymères (Rapoport 2010).

Tableau 7. Surfactants utilisés dans la formulation des NEs et leur classification (Qadir 2016).

Emulsifiants/surfactants	Type	Propriétés	Références	
<i>Cremonophor-EL</i>	Surfactant non ionique	Non toxique/adapté à l'émulsification spontanée	(Silva 2011)	
<i>Solutol-HS15</i>			(Anton 2007)	
<i>Brij-L4</i>			(Izquierdo 2004)	
<i>Span[®]20</i>		Non toxique/abaisse la tension interfaciale en association avec d'autres surfactants		(Porras 2008)
<i>Span[®]80</i>				
<i>Tween[®]20</i>		Non toxique/adapté à l'émulsification spontanée		(Conolly 2007)
<i>Tween[®]80</i>				
<i>Tween[®]40</i>				
<i>Tween[®]60</i>				
<i>Ryotol</i>				
<i>Polyoxyethylene 6-lauryl ether</i>				
<i>Decaglycerol monolaurate</i>		Surfactant anionique	Toxique, mais adapté à l'émulsification spontanée	(D'Angelo 1996)
<i>Polyglycerol esters of fatty acids</i>	(Izquierdo 2005)			
<i>Alkanol-XC</i>	Surfactant cationique		(D'Angelo 1996)	
<i>Sodium dodecyl sulfate</i>			(Olla 1999)	
<i>Dodecyl trimethylammonium bromide</i>	Surfactant amphiphile	Non toxique/adapté à l'émulsification spontanée	(Rouessac 2007)	
<i>Gelatin</i>			(McClements 2000)	
<i>Whey protein isolate</i>			(Mulik 2010)	
<i>Whey protein concentrate</i>			(Lee 2010)	
<i>Whey protein hydrolysate</i>			(Chu 2007)	
<i>Sodium caseinate</i>		(D'Angelo 1996)		
<i>Modified starch</i>	Hydrocolloïde cationique	Toxique, mais adapté à l'émulsification spontanée	(Jafari 2007)	
<i>Pectin</i>	Hydrocolloïde anionique		(Porod 1982)	
<i>Lipoid S75-3</i>	Phospholipide amphiphile	Non toxique/adapté à l'émulsification spontanée	(Anton 2007)	

Sécurité et solubilité sont les deux critères de choix des surfactifs entrant dans la formulation des NEs, on leur préfère donc les surfactifs d'origine naturelle plutôt que synthétique. D'autre part, l'usage des surfactifs non ioniques est très courant et recommandé dans la mise au point des NEs (Qadir 2016). En effet, l'impact sur la taille des particules, l'indice de polydispersité et la stabilité, est non négligeable.

Parmi les surfactifs non ioniques, le Tween[®]80 se distingue du Tween[®]20 par exemple, dans la réduction de la taille des particules des NEs type H/E. Ceci est dû à la différence de géométrie de la partie non polaire de ces molécules amphiphiles, saturée et linéaire pour le Tween[®]20, ramifiée et insaturée pour le Tween[®]80 (Ghosh 2014), voir figure 17. En effet, les NEs produites par émulsification spontanée en présence de Tween[®]80 dans la phase huileuse comparativement à d'autres tensioactifs de la famille des Tweens[®] et le Span[®]20, présentaient à elles seules des particules très fines. La taille de leur gouttelettes était 6 fois plus réduite que celles des NEs produites avec le Span[®]20 (Komaiko 2015a). Par ailleurs, la présence de double liaison dans la chaîne hydrophobe contribue positivement à l'obtention de NE avec des tailles de particules réduites (Dai 1997). Nous pouvons également rapporter leur aptitude à assurer un taux d'encapsulation de 100%, comme c'est le cas de l'encapsulation du pyrène (Hansali 2012).

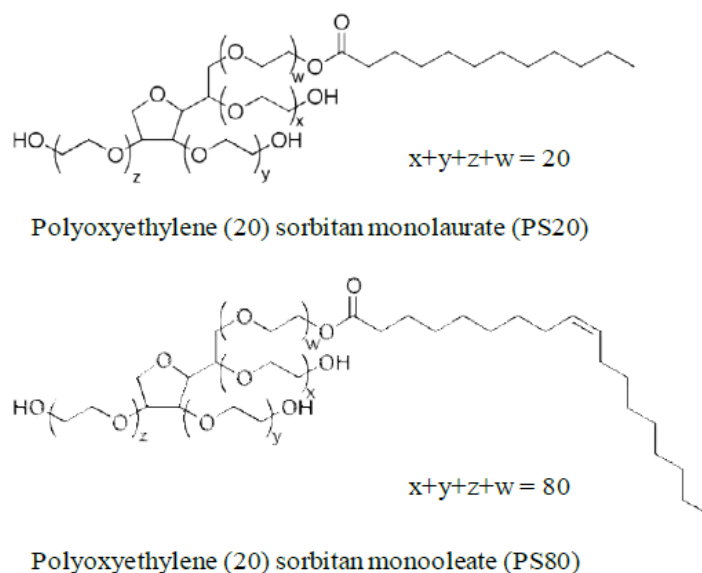


Figure 17. Différence structurale entre le Tween[®]20 et le Tween[®]80 (Shi 2015).

Aussi, les surfactifs non ioniques sont considérés comme moins toxiques que leurs homologues ioniques, avec notamment un HLB élevé. Leur concentration varie généralement de 30 à 60%

en masse (Qadir 2016). Pour les NEs à usage parentérale, cette concentration ne doit pas dépasser 0,5%, c'est l'exemple du poloxamer 188 (Emanuele 2014). Ce paramètre de formulation, doit être sérieusement pris en considération. En effet, la surface de contact au cours de la nanoémulsification tend à augmenter ce qui nécessite des concentrations beaucoup plus élevées que celles requises pour les émulsions conventionnelles (Salvia-Trujillo 2017). Ainsi, la taille des gouttelettes lipidiques est inversement proportionnelle à la proportion d'émulsifiant quel que soit la méthode de nanoémulsification utilisée (McClements 2011b; Qian 2011). L'excès de surfactif conduit à la formation de micelles qui se dissocient en monomères, rapidement adsorbés à l'interface des gouttelettes qui sont instantanément recouvertes pendant l'émulsification d'une couche les protégeant contre le phénomène de coalescence (Mason 2006a; Qian 2011; Rao 2012d).

Il est donc primordial d'optimiser la concentration en agent tensioactif, car au-delà d'un certain seuil, nous pouvons observer une irritation de la peau ou des muqueuses GI. D'un autre côté, l'augmentation en proportion du tensioactif dans la formulation, conduit avantageusement à la réduction de la taille des particules de la phase dispersée (ex. Labrafic CM-10). Ceci s'explique par la capacité du surfactant à s'organiser à l'interface huile/eau du système (Qadir 2016). Dans une étude menée par Gosh et al. (Ghosh 2014), on souligne également l'importance d'augmenter la concentration en surfactif pour une NE de type H/E, encapsulant l'eugénol. En effet, avec un taux d'huile de 6% constant à chaque formulation, et un taux passant de 6% à 12% puis 18%, la taille moyenne des particules passe de 95 nm à 47 nm puis 20 nm, respectivement.

L'optimisation du ratio surfactif-huile (SOR) semble plus qu'importante. Dans une étude antérieure, elle est entreprise pour formuler des NEs à base de MCTs (10%) et de Tween[®]80, en variant le ratio (0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.25, 1.5, 1.75 et 2). Les résultats attestent que plus le rapport est élevé plus la taille des particules diminue, montrant une distribution de taille étroite illustrée par une courbe monomodale (figure 18 (Komaiko 2015a)). De son côté, Pouton s'aligne sur le même constat pour des NEs produites avec les MCTs en présence du Tween[®]85, par émulsification spontanée (Pouton 1997). Ou encore, les NEs produites par la technique d'émulsification par inversion de phase en présence Tween[®]80 (Ostertag 2012).

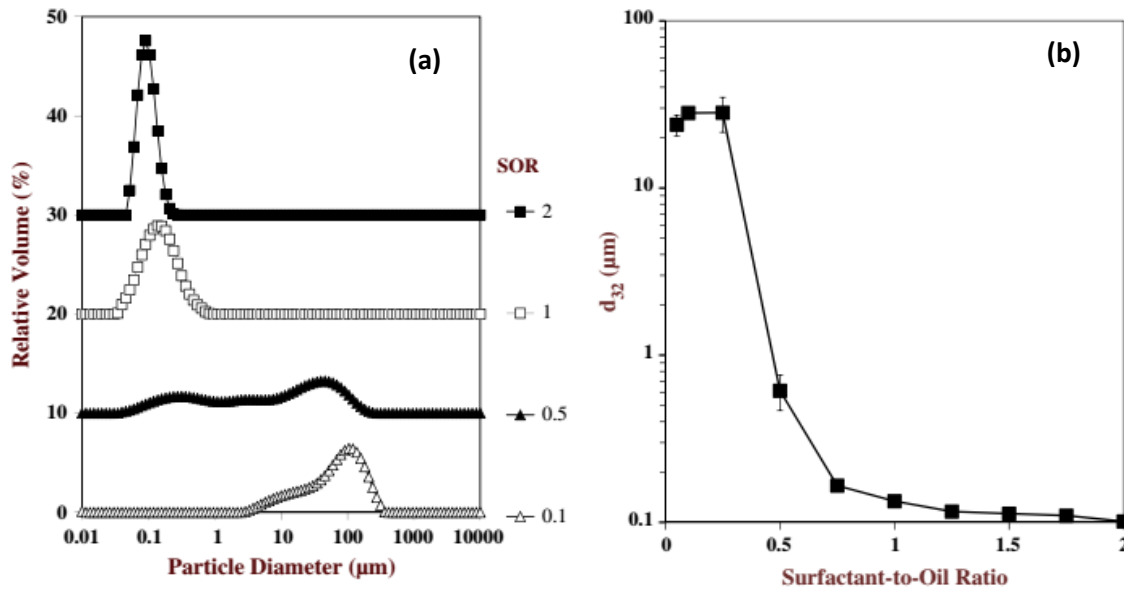


Figure 18. Influence du ratio surfactif-huile sur la taille des particules (a) et la distribution granulométrique (b) (Komaiko 2015a).

Sur le plan macroscopique, les NEs produites en augmentant le ratio surfactif-huile, semblent gagner en transparence (McClements 2002a), ce qui constitue un avantage pour tout type d'application (Komaiko 2015a). D'autres phénomènes physico-chimiques peuvent expliquer cette réduction de taille. En effet, en augmentant la concentration en surfactif, ce dernier s'adsorbe à l'interface huile/eau en formant une gaine protectrice autour des gouttelettes, empêchant ainsi leur agrégation (McClements 2011a). Elle gagne en rigidité lorsque le SOR se situe entre 1 et 2. Cette dernière valeur semble plus adaptée pour une NE à base de MCTs et de Tween[®]80 (Komaiko 2015a).

Par ailleurs, une augmentation de la concentration du surfactif au-delà d'un certain seuil, peut inverser la tendance en formant de plus larges gouttelettes (Pouton 1985; Pouton 1997; Komaiko 2014). De plus, cette augmentation peut conduire à la rupture du film interfacial et par conséquent à une instabilité irréversible, d'où la nécessité de définir correctement la concentration à mettre en œuvre (Qadir 2016).

Aussi, on note que les petites molécules de surfactifs sont plus aptes à former des émulsions fines (Wooster 2008). C'est l'exemple d'une étude conduite par Silva et al. (Silva 2015), qui démontre clairement que les NEs produites par homogénéisation à haute pression en présence de SDS possèdent une faible taille des gouttelettes comparées aux NEs produites avec du Dodecyl Triméthyl Aminonium Bromide (DTAB) ou encore avec du Tween[®]20. Le SDS a pour

propriété de réduire considérablement le phénomène de coalescence et la vitesse de crémage, grâce aux forces répulsives générées et l'augmentation de la charge des gouttelettes (Silva 2015).

En effet, les molécules de faibles poids moléculaire ont l'aptitude de s'adsorber et s'orienter facilement et rapidement à l'interface, grâce à leur configuration et donc réduire au maximum la tension interfaciale (McClements 2010; Qian 2011; Donsi 2011b; Sari 2015). En outre, après 28 jours de stockage et à travers une analyse granulométrique conduite sur 9 échantillons, le SDS a montré une propriété stabilisatrice puisque 8 NEs sur 9 produites conserveraient la taille des gouttelettes initiale. Après une année de stockage dans les mêmes conditions, ces NEs semblent conserver les mêmes caractéristiques de départ sans montrer de phénomène de crémage (Silva 2015). Ceci s'explique par la taille du SDS et par sa capacité à s'adsorber rapidement et efficacement aux interfaces huile/eau (Donsi 2011b). Aussi, l'augmentation de la charge des gouttelettes contribue à augmenter les forces répulsives entre celles-ci et donc éviter le phénomène de coalescence (McClements 2005a; Silva 2015).

Outre leur capacité à émulsionner et former des NEs, les surfactifs joueraient un rôle important en encapsulant des molécules actives et assurant la protection des molécules fragiles. A titre d'exemple, les NEs de β -carotène à base de β -lactoglobuline sont beaucoup plus stables que celles à base de Tween[®]20. Par ailleurs, certains tensioactifs anioniques et cationiques, respectivement le sodium dodécyl sulfate (SDS) et l'alginate laurique, montrent également une activité antimicrobienne lorsqu'ils sont utilisés pour stabiliser les NEs, ce qui est très avantageux (Ziani 2011).

Le potentiel zêta est l'un des indicateurs de stabilité des émulsions. Généralement, dans les NEs, il avoisine ± 30 mV. La nature du surfactif a un impact sur la valeur du potentiel zêta, c'est l'exemple de l'étude de Silva et al. (Silva 2015), faite sur trois surfactifs différents, à savoir le Tween[®]20, le SDS et le CTAB, qui sont des surfactifs non ionique, anionique et cationique, respectivement. Les NEs produites chacune en présence de l'un de ces surfactants ont un potentiel zêta allant de -15 à -30 mV pour le Tween[®]20, de -66 à -84 mV pour le SDS et de +43 à +76 mV pour le CTAB.

3.5.1.4 Co-surfactants

L'association d'un co-surfactant à un agent tensioactif dans la formulation des NEs est fréquente. Elle permet l'obtention d'un film moins rigide et beaucoup plus flexible à l'interface. D'autre part, ce couple permet d'avoir une certaine aisance en matière de composition et permet de varier les proportions afin d'obtenir plus facilement des NEs qu'avec un tensioactif seul. Les alcools, les acides alcanoïques, les alkanediols et les alkyl amines sont souvent retrouvés dans les préparations des NEs (voir tableau 8).

Un co-surfactant idéal, est généralement une petite molécule, un alcool à chaîne carbonée courte ou moyenne, par exemple (C₃-C₈). Ce dernier a la propriété de diffuser à travers les différentes phases du système (Qadir 2016). Les co-surfactants les plus communément employés dans la formulation des NEs sont : propylène glycol, polyéthylène glycol, éthanol, transcutole P, glycérine, éthylène glycol et le propanol ou encore le méthanol (Zhang 2014; Qadir 2016).

Tableau 8. Exemples de co-surfactants utilisés dans la formulation des NEs et leurs principales caractéristiques (Qadir 2016).

<i>Co-surfactant</i>	<i>Principales propriétés</i>
<i>Transcutol P</i>	Très largement utilisé, non toxique et aide à abaisser la tension interfaciale
<i>Glycérine, éthylène glycol</i>	Non toxique/abaisse la tension interfaciale Non toxique/abaisse la tension interfaciale
<i>Propylène glycol</i>	
<i>Ethanol</i>	
<i>Propanol</i>	Très toxique/abaisse la tension interfaciale
<i>Méthanol</i>	

A côté des composants principaux, on retrouve également :

3.5.1.5 Stabilisants

Les NEs sont des systèmes thermodynamiquement instables, l'ajout d'agents stabilisants tels que les agents mouillants, les texturants ou modificateurs de texture et les inhibiteurs du mûrissement d'Ostwald, est souvent requis pour éviter tout phénomène d'instabilité (McClements 2011b).

3.5.1.6 Texturants

Dans le domaine agro-alimentaire, les texturants (épaississants) sont d'usage courant. Leur ajout est doublement bénéfique, ils agissent sur la viscosité et donc les propriétés

organoleptiques des NEs (sensation au moment de l'administration ou application), mais améliorent également leur stabilité, en minimisant le mouvement des gouttelettes dispersées. Cette pratique nous la retrouvons également dans le domaine pharmaceutique.

Les propriétés gélifiantes de certains hydrocolloïdes ont été longuement étudiées. En effet, ces derniers doivent être rajoutés avec la plus grande précaution dans les systèmes dispersés, sous peine de déstabiliser le milieu. Il est à noter que l'ajout de polysaccharides aux nanoémulsions par exemple, pourrait entraîner la formation de ponts interparticulaires et de ce fait favoriser le phénomène de floculation (Dickinson 2003). En outre, ces composants pourraient interagir efficacement et s'adsorber à l'interface huile/eau (Goddard 2002; Dickinson 2003; Guzey 2006). En effet, dans le cas des polymères, l'ajout du Polyacrylamide modifié à une NE type H/E, contenant un mélange de Span[®]20 et de Tween[®]20, s'avère plus efficace en terme de réduction de taille des particules et stabilité du système, à l'encontre du mûrissement d'Ostwald, comparé à l'ajout du polyacrylamide hydraté. Il possède une triple action : agir comme épaississant, s'adsorber à l'interface H/E et interagir avec les surfactants présents dans le milieu, pour former un complexe solide qui viendra ensuite s'adsorber fortement et renforcer le film interfacial (Yang 2014a).

Cependant, ce phénomène est très lent, et leur capacité à réduire la tension interfaciale est très faible, ce qui impose leur association à des molécules plus petites, lesquelles s'adsorbent rapidement et diminuent significativement la tension interfaciale (McClements 2011b).

Communément, les polysaccharides ont une propriété épaississante et sont souvent utilisés pour former des gels. Certains à structure amphiphile, sont considérés comme émulsionnants, tels que les dérivés cellulosiques, les alginates, les pectines, etc. (Dickinson 2003).

Il a été reporté également que, la présence d'hydrocolloïdes dans la formulation des NEs influencerait le devenir gastro-intestinal et donc le profil de biodisponibilité des molécules encapsulées surtout lorsqu'elles sont lipophiles. La cinétique de libération dépend alors de la composition de la couche interfaciale huile/eau (Dickinson 2013; Gidley. 2013).

3.5.1.7 Autres composants

D'autres composants peuvent intervenir dans la formulation des NEs. C'est l'exemple des conservateurs qui doivent répondre aux critères de faible toxicité, de thermostabilité, stabilité physique et chimique, disponibilité, acceptabilité en matière d'odeur, de goût et de

couleur et ayant un large spectre antimicrobien, tels que les alcools (Asthana 2013). De leur côté, les huiles émulsionnés ou les lipides sans oublier certaines substances actives entrant dans la composition des NEs, peuvent subir une oxydation, on leur rajoute alors des antioxydants agissant soit en tant qu'agents réducteurs, par exemple : l'acide ascorbique et le métabisulfite, ou comme des agents bloquants comme c'est le cas du butylhydroxytoluène ou encore les tocophérols (Singh 2017).

3.6 Méthodes de préparation des nanoémulsions et contraintes de formulation

Les méthodes dites «Top-down» et «Bottom-up» sont les deux approches utilisées dans la fabrication des systèmes nanodispersés. La première approche étant descendante, on part du principe de division d'un système ou structure jusqu'à atteindre la taille nanométrique. Dans le deuxième cas, il s'agit d'une synthèse chimique reposant sur les propriétés des composants, mettant en jeu des réactions atome-atome ou molécule-molécule, conduisant directement au système nanométrique (Mishra 2010). Cette dernière approche est plus avantageuse en termes de stabilité et de consommation d'énergie. Dans la littérature, la classification commune des méthodes repose beaucoup plus sur ce dernier critère.

Dans le développement des NEs, on retrouve l'homogénéisation à haute pression, les méthodes de basses consommation d'énergie et enfin la méthode d'application de la température d'inversion de phase (TIP) (Tadros 2004).

L'obtention de nanoémulsions requiert le plus souvent des méthodes de haute énergie, en se limitant dans leur préparation à l'usage d'équipements, tel que l'homogénéisateur à haute pression ou un microfluidiseur ou encore l'usage d'une sonde à ultrasons. En d'autres termes, la production de NEs coûte plus d'énergie que celle requise pour produire des macroémulsions (Tadros 2004; Tan 2016; Salvia-Trujillo 2017).

En effet, le plus souvent les NEs ne se forment pas spontanément. Un cisaillement externe doit être appliqué pour rompre finement les grosses gouttelettes générées. Leur formation implique également l'ajout d'une proportion adéquate de tensioactif, et dans certains cas, une combinaison de ces deux approches (Lovelyn 2011).

Dans le cas des molécules lipophiles, des méthodes faisant appel au principe d'émulsification-évaporation, d'émulsification-diffusion, et au concept de déplacement du solvant ou nanopréciipitation (NP), sont utilisées et peuvent être catégorisées dans la classe des méthodes

hautement énergétiques comme dans la classe des méthodes faiblement énergétiques (Qadir 2016). Pour les molécules bioactives et thermosensibles, les méthodes de haute énergie sont exclues. On leur préfère les méthodes de basse énergie, beaucoup plus adaptées (Tan 2016).

Les NEs peuvent être produites par des méthodes de haute énergie comme des méthodes de basse énergie (Tadros 2004; McClements 2011b), ou par la combinaison des deux (Forgiarini A 2001; Mason 2006a). Sans tenir compte de la consommation d'énergie requise, les méthodes de haute énergie d'émulsification sont préférables et plus adaptées pour les raisons suivantes : lorsqu'il y'a ajout de tensioactif d'origine naturelle; en présence de concentrations moins importantes d'émulsionnants; facilité de transposition d'échelle; disponibilité et accessibilité des équipements; et enfin les méthodes sont facilement applicables et compréhensibles (Tan 2016; Salvia-Trujillo 2017).

En revanche, les fabricants doivent adapter la technique de préparation au produit et s'assurer de la réussite de la transposition d'échelle, car certaines formulations de laboratoires peuvent être difficilement transposables à l'échelle industrielle (Sarker 2005).

En ce qui concerne les méthodes moins énergivores, nous citons l'émulsification spontanée ou la méthode TIP (Solans 2005; Anton 2009). Ce qui rend ces différentes approches intéressantes, c'est le fait d'utiliser l'énergie stockée du système pour réduire la taille des gouttelettes dispersées et les maintenir stables. Tout ceci, en modifiant la température ou la composition du milieu (Lovelyn 2011). Par ailleurs, dans une étude citée par Tadros et al., on souligne l'importance de l'ordre d'addition des différents composants dans la génération des NEs par émulsification spontanée. C'est l'exemple de l'ajout de l'eau dans une mixture de décane et de Brij30 parmi deux autres méthodes d'introduction, qui a permis d'obtenir une NE dont la taille des particules huileuses avoisinait les 50 nm (Tadros 2004).

3.6.1 Méthode d'homogénéisation à haute pression et méthode à ultrasons

Très couramment utilisées, ces méthodes font appel à l'énergie mécanique qui permet la création d'interfaces, grâce à l'usage d'équipements particuliers. Les NEs produites se stabiliseront suite au dépôt du tensioactif, présent dans le milieu, aux interfaces créées (Anton 2008).

Trois principaux appareils ont été cités dans la littérature. Le rotor /stator fut le premier utilisé dans la formation de NE, lequel fut ensuite délaissé (ex. Omni-mixerpsy® et Ultra-turraxpsy®).

En effet, ces derniers ne fournissent pas des bonnes dispersions en terme de taille de gouttelettes et d'indice de polydispersité (Abismail 1999). Dernièrement, ce sont des équipements à haut rendement tels les ultrasons ou l'homogénéisateur à haute pression qui ont vu le jour (Anton 2008).

Le principe de génération de NEs par les ultrasons, est généralement attribué à un mécanisme de cavitation. Sous l'effet des ultrasons, l'émulsion de départ subit une succession de dépressions mécaniques et de compressions, entraînant ainsi la formation de bulles de cavitation favorisant la nanoémulsification (Anton 2008; Salvia-Trujillo 2017). En effet, les ondes ultrasoniques de hautes fréquences (généralement > 20 KHz), permettent une fine division des gouttelettes de la phase dispersée (Kale 2017). Les facteurs influençant sont principalement d'ordre opératoire, à savoir l'intensité des fréquences ultrasoniques et la durée du traitement (Salvia-Trujillo 2017).

C'est une méthode très largement répandue dans la recherche (tableau 9), néanmoins elle présente un certain nombre d'inconvénients : la température du milieu peut aller au-delà de 80°C ; dégradation des lipides de formulation par oxydation ou hydrolyse (Chemat 2004) ; les particules métalliques de la sonde ultrasonique peuvent se libérer dans le milieu sous l'effet de l'abrasion cavitationnelle (Freitas 2006); elle est non praticable à l'échelle industrielle comparativement à la méthode utilisant des équipements à haute pression (Salvia-Trujillo 2017).

Les méthodes à haute pression furent très largement répandues à l'échelle industrielle (Mishra 2010). Les équipements sont conçus de telle sorte à forcer les macroémulsions à passer à travers un orifice très étroit, en imposant des pressions élevées. Les méthodes mettent en œuvre l'usage d'un homogénéisateur à haute pression ou à piston, avec la conjugaison de plusieurs forces destructrices (forces hydrauliques et série d'écoulements, allongement, cisaillement et cavitation), jusqu'à l'obtention de NE désirée (Leal-Calderon 2007). Cette même NE pourra éventuellement subir d'autres cycles (Lovelyn 2011). La distribution de taille des gouttelettes est généralement reproductible avec une moyenne de taille allant de 50 nm à 1 µm (Leal-Calderon 2007). Le surfactant est de préférence dissout dans la phase dispersée (Tadros 2004; Lovelyn 2011).

Cette approche nécessite un équipement particulier. Avec des pressions allant de 100 à 2000 bar (Mishra 2010), ou de 500 à 5000 Psi (Kale 2017). L'émulsion de départ, appelée en terme

anglo-saxon « coarse emulsion », doit passer à travers un orifice ou une valve de diamètre extrêmement petit. Le fluide accélère de façon spectaculaire et les particules générées sont extrêmement fines (Anton 2008; Anton 2009; McClements 2011b; Qadir 2016; Kale 2017). C'est une méthode thermo-énergivore, mais facilement transposable à l'échelle industrielle (Qadir 2016; Tan 2016; Kale 2017; Salvia-Trujillo 2017).

Les facteurs influençant dans ce cas sont essentiellement opératoires, citons : le nombre de cycles et la pression exercée. La relation entre la taille des particules et ces deux facteurs est inversement proportionnelle (Donsi 2011b; Kale 2017). D'autre part, la géométrie de la valve a un impact non négligeable sur la distribution de taille des gouttelettes de la NE (Donsi 2011b). L'homogénéisation peut être réalisée à chaud comme à froid (Mishra 2010).

Dans les tableaux 9 et 10, Salvia-Trujillo et al. ont répertorié différentes formulations (Salvia-Trujillo 2017), produites selon la méthode de l'homogénéisation sous pression et les ultrasons pour obtenir des NEs.

Tableau 9. Liste non exhaustive des travaux antérieurs des NEs produites par des méthodes de haute énergie (Salvia-Trujillo 2017).

<i>Méthodes de fabrication</i>	<i>Paramètres opératoires</i>	<i>Phase huileuse</i>	<i>Ingrédients actifs</i>	<i>Emulsifiant</i>	<i>Taille des gouttelettes</i>	<i>Références</i>
Homogénéisation à haute pression	50-150 MPa; 1-10 cycles	NA	Huile essentielle de citronnelle	Tween [®] 80 et alginate de sodium	53–57 nm	(Salvia-Trujillo 2013b)
	5-150 MPa; 1-5 cycles	Huile de silicone	NA	Tween [®] 80, sodium caséinate et sodium dodecyl sulfate (SDS)	110-140 nm	(Lee et Norton 2013)
	150 MPa; 10 cycles	Medium-chain Triacylglycerides (MCTs)	β carotène	Octenylsuccinic Anhydride-amidon modifié	150 nm	(Liang 2013)
	10 KPa; 10 cycles	MCTs et huile de maïs	Huile essentielle de thym	Tween [®] 80	<200 nm	(Chang 2012)
	15,000 psi; 5 cycles	Huile de maïs : hexane	NA	β -lactoglobulin	<100 nm	(Troncoso 2012b)
	70-280 MPa; 1-10 cycles	Huile de tournesol	NA	Tween [®] 80, SDS, sucrose palmitate, lécithine de soja, ou amidon modifié	90-190 nm	(Donsi 2011b)
	9,000 psi; 3 cycles	Essence d'orange	β carotène	β -lactoglobulin	79 nm	(Qian 2012)
	12,000 psi; 5 cycles	Huile de maïs, MCTs et essences d'orange	Polymethoxy flavones	β -lactoglobulin, lyso-lecithin, Tween, dodecyl trimethyl ammonium bromide	<100 nm	(Li 2012)
	200-500 bar; 3 cycles	Huile de palme	Vitamine E	Tween [®] 40	200 nm	(El Kinawy 2012)
	300, 800, ou 1,200 bar; 12 cycles		α -Tocopherol	Proteine de lactosérum et/ou lécithine	201-431 nm	(Shukat 2011)
	9,000 psi; 3 cycles	NA	Huile essentielle de citron	Sucrose monopalmitate	<100 nm	(Rao 2011a)
	4-14 Kbar; 1-8 cycles	Huile de maïs	NA	β -lactoglobulin, sodium caseinate, Tween [®] 20 ou SDS	146-231 nm	(Qian 2011)
	300 MPa; 5 cycles	Huile de tournesol	Carvacrol, limonene, et cinnamaldehyde	Lécithine, protéines de pois, esters, et une combinaison de Tween [®] 20 et monooléate de glycérol	123-293 nm	(Donsi 2011a)
	1,000 bar, 5 cycles	Hexadecane ou huile d'arachides	NA	SDS et Tween [®] 80	80-120 nm	(Wooster 2008)
20 MPa; 1 cycle	NA	D-limonene	Maltodextrin et amidon modifié	570 nm	(Jafari 2007)	

Tableau 10. Liste non exhaustive des travaux antérieurs des NEs produites par des méthodes de haute énergie (Salvia-Trujillo 2017) suite.

<i>Méthodes de fabrication</i>	<i>Paramètres opératoires</i>	<i>Phase huileuse</i>	<i>Ingrédients actifs</i>	<i>Emulsifiant</i>	<i>Taille des gouttelettes</i>	<i>Références</i>
<i>Ultrasons</i>	750 W; 15 min	NA	Huile essentielle de basilic	Tween®80	29-41 nm	(Ghosh 2013a)
	750 W; 30 min	NA	Huile essentielle de canelle	Tween®80	65 nm	(Ghosh 2013b)
	12-28 W ; 70-170 s	NA	D-limonene	Sorbitan trioleate et polyoxyethylene (20) oleyl ether	24-444 nm	(Li 2012)
	30-100µm ; 30-180 s	NA	Huile essentielle de citronnelle	Tween®80 et alginate de sodium	5-35 nm	(Salvia-Trujillo2012)
	20-40% (W); 20 min (cycles de 10 s de sonication/30 s de repos)	Huile de soja et cire	NA	Lipoid s75 et polyethylene glycol (PEG)-surfactant	50-180 nm	(Delmas 2011)
	30 µm ; 5-20 min	Huile de tournesol et huile de colza	NA	Tween®80, Span®80, SDS, PEG	40-180 nm	(Leong 2009)
	40 W; 4 pulsations (15 s sonication/ 15 s de repos)	Huile de soja, huile de sésame et huile d'olives	NA	Pluronic F68	368-380 nm	(Wulff-Perez 2009)
	340 W; 17-119 s	Huile de lin	NA	Tween®40	130-140 nm	(Kentish 2008)
	100µm; 20 s	NA	D-limonene	Maltodextrine et amidon modifié	680 nm	(Jafari 2007)

NA : non applicable

3.6.2 Microfluidisation

La microfluidisation est une technologie brevetée, généralement utilisée dans les industries à grande échelle. Le principe de la méthode est le même que celui de l'homogénéisation à haute pression. En revanche, ce qui la différencie de cette dernière, c'est la pression appliquée (5000-20 000 psi), ainsi que l'équipement destiné à cet usage. En effet, le mélange phase organique et phase huileuse est préalablement homogénéisé avant de passer à travers des micro-canaux et subir une microfluidisation (Qadir 2016). Le produit obtenu subit ensuite une filtration sous azote afin d'éliminer les gouttelettes grossières et obtenir une NE uniforme. L'homogénéisation à haute pression et la microfluidisation sont deux méthodes utilisées à l'échelle industrielle comme à l'échelle laboratoire (Lovelyn 2011).

Les méthodes de haute énergie présentent un avantage particulier. La taille des nanogouttelettes ne semblent pas être influencée par l'ajout de monomère, de molécules à encapsuler ou d'agent stabilisant, car le processus d'émulsification est seulement gouverné par le cisaillement produit par l'équipement. Contrairement aux méthodes de basse énergie qui sont essentiellement régies par les paramètres de formulation en l'occurrence les propriétés physicochimiques des surfactants.

En outre, lorsqu'il s'agit d'encapsuler des molécules fragiles ou sensibles, l'énergie mécanique générée par les équipements à haute pression semble entraîner la destruction, la dénaturation et même la perte d'activité de ces ingrédients actifs comme c'est le cas des peptides et protéines.

Plus encore, à l'échelle industrielle l'économie d'énergie est un souci majeur. Dans les méthodes hautement énergétiques, les ultrasons se trouvent être moins énergivores. Cependant, lorsque la fraction volumique augmente, il y'a nécessité d'ajouter des opérations supplémentaires comme l'agitation mécanique, ce qui va entraîner l'augmentation du temps d'émulsification et donc la consommation d'énergie. Ce qui n'est pas le cas des méthodes de basse énergie (Anton 2008).

3.6.3 Méthodes de basse énergie

Ces dernières années, le choix est plus porté sur les méthodes plus économiques en termes d'énergie. En effet, ces dernières impliquent l'usage d'équipements peu coûteux et plus faciles à manipuler (Tan 2016). Des nanogouttelettes peuvent être aisément obtenues grâce à

l'exploitation des propriétés physicochimiques et intrinsèques des surfactants, co-surfactants et autres excipients entrant dans la composition de la NE (Anton 2008).

Dans la littérature, nous pouvons distinguer deux grandes catégories de méthodes moins énergivores :

3.6.3.1 Emulsification spontanée

Décrite pour la 1^{ère} fois en 1878 par Joahannes Gad. A ce jour le mécanisme reste encore mal élucidé (Leal-Calderon 2007). C'est une méthode relativement simple et sous agitation magnétique, le plus souvent. Ce phénomène survient pendant l'émulsification, on lui attribue une diffusion rapide d'un solvant volatile, miscible à l'eau, de la phase organique qui le contient vers la phase aqueuse (dispersante).

Parmi ces méthodes d'émulsification spontanée, citons la méthode de « déplacement de solvant » qui dérive de la méthode par nanoprécipitation pour l'obtention de NPs polymériques (Singh 2017). Elle se traduit par le passage d'un solvant organique tel que l'acétone ou l'éthanol vers la phase aqueuse. Dans un premier temps, l'ingrédient actif est mélangé dans la phase organique, en présence d'un surfactif adéquat, puis mélangé à la phase continue. Par la suite le solvant organique est éliminé par évaporation sous pression ou chauffage (Anton 2008 ; Kale 2017). Ce phénomène est appelé « effet Ouzo » (Anton 2008).

En effet, le cosolvant (ex. alcool) lors de sa diffusion dans la phase aqueuse entraîne avec lui la fraction huileuse préalablement dispersée. Sous l'effet d'une agitation magnétique, les surfaces nouvellement créées seront rapidement recouvertes d'une couche de surfactant (Singh 2017). Après évaporation de l'alcool, les gouttelettes huileuses se rétrécissent encore plus dans la phase continue (Leal-Calderon 2007; Singh 2017). Dans certains cas, le surfactif peut être présent dans la phase continue, généralement aqueuse (Lovelyn 2011; Singh 2017).

Théoriquement, avec cette approche on peut produire des NEs type H/E mais aussi des NEs type E/H. Cependant, la majorité des études faites sur ce procédé, rapportent l'obtention des NEs type H/E (Anton 2008). Ces NEs sont généralement utilisées pour des applications parentérales (Lovelyn 2011). Seul inconvénient de cette méthode, la nécessité d'opérer sous des précautions particulières pour éliminer les solvants organiques après préparation (Qadir 2016). Le processus d'élimination peut sembler simple à l'échelle laboratoire mais poserait des difficultés à l'échelle industrielle. Par ailleurs, selon la littérature, l'émulsification spontanée ne

peut être applicable qu'aux faibles fractions de phase dispersée (< 10%) (Leal-Calderon 2007). Précisons également, qu'en général le rapport solvant/huile est élevée et permet d'obtenir aisément une NE avec des tailles réduites des gouttelettes dispersées (Lovelyn 2011; Singh 2017).

3.6.3.2 Méthode par inversion de la température de phase (TIP)

Ce procédé d'émulsification est classé « Bottom up process », car la génération de gouttelettes nanométriques débute par une inversion de phase qui se termine ensuite par une réduction de la taille de ces dernières au voisinage de la TIP (Singh 2017). Rappelons que dans cette méthode, la température est un paramètre important et contrôlable, surtout dans le cas de l'utilisation de surfactifs non ioniques (polyoxyéthylénés) dans la formulation des NEs. Leur affinité pour la phase lipophile augmente, lorsque la température est élevée, et deviennent plus hydrophiles, lorsque la température est basse (Lovelyn 2011 ; Kale 2017). La solubilité des surfactants non ioniques est également pH-dépendante (Lovelyn 2011). Leur spécificité étant que leur coefficient de partage change, lorsque la température est proche de la TIP, suite à une déshydratation des groupements polyoxyéthylènes. C'est sur ce principe que repose la nanoémulsification (Anton 2008; Lovelyn 2011; Yaghmur 2002). En pratique, on obtient généralement des NEs type H/E (Anton 2008).

En effet, quand une émulsion H/E est préparée avec des tensioactifs non ioniques de type polyoxyéthylène et sous chauffage, on obtient une émulsion E/H (lorsqu'on dépasse la température critique (TIP)). Au voisinage de cette température, les gouttelettes sont très fines et la tension interfaciale atteint son minimum, ce qui rend le film interfacial fragile et flexible en même temps. Il se produit spontanément une courbure négative du film interfacial (Fanun 2010b), puis les gouttelettes fusionnent rapidement avec inversion de phase (figure 19). En revanche, si au voisinage de cette température, on refroidit rapidement cette émulsion, on conserverait la taille de ses gouttelettes avec l'intégrité du film interfacial (Leal-Calderon 2007). Selon la littérature, la TIP est généralement comprise entre 60°C et 68°C (Tadros 2004).

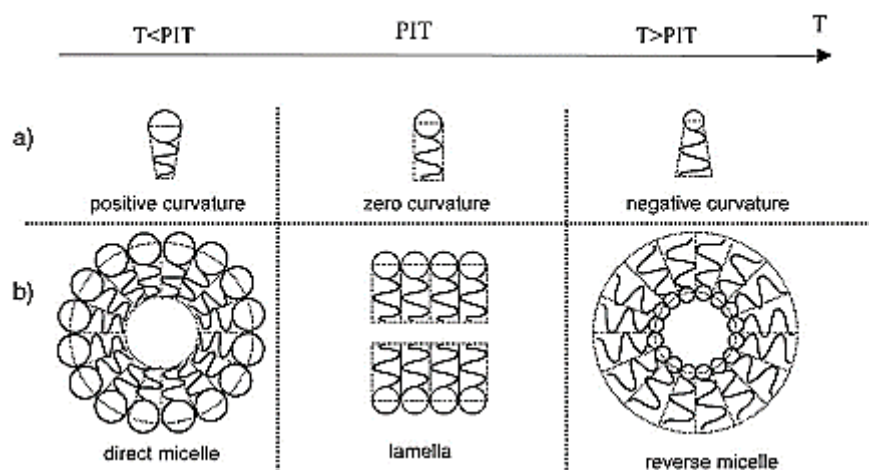


Figure 19. Représentation schématique de la morphologie (a) et du comportement des surfactants non ioniques sous l'effet de la température (b) (Leal-Calderon 2007).

Dans l'exemple d'une émulsion contenant le limonène, l'éthanol, le glycérol et le Tween®60, l'augmentation de la température entraîne un changement de comportement du surfactif non ionique à l'interface H/E, mais aussi l'élargissement de la région monophasique des NE type E/H (diagramme ternaire). La substitution du glycérol par le propylène glycol rend le système insensible aux variations de températures entre 25°C et 60°C.

L'effet positif de la température sur des émulsions initialement opaques, a également été observé en présence de Tween®80 (Flanagan 2006b) et en présence des mono et di-glycérides éthoxylés (Rao 2011a; Rao 2011b). De leur côté, Leser et al. (Leser 2006) ont rapporté l'efficacité du chauffage pendant l'agitation magnétique ou le vortexing par abaissement de la viscosité du système. Le produit final étant homogène et visqueux.

Sont exclues des molécules candidates à une nanoencapsulation, les molécules actives thermolabiles qui ne peuvent supporter les températures élevées sans se dégrader (ex ; peptides, trétinoïne). Pour pallier à cela, il est possible de mélanger les surfactants afin d'abaisser la TIP et minimiser ainsi la dégradation (Lovelyn 2011). En revanche, les molécules qui ne présentent pas cet inconvénient peuvent être solubilisées dans l'une des deux phases (Singh 2017).

Pour résumer, les méthodes de basse énergie dépendent de l'effet synergique de l'huile, du surfactant et du co-surfactant, de la valeur HLB mais aussi de la température opérationnelle (Delmas 2011; Solans 2012; Schabart 2013). On inclut dans cette catégorie l'émulsification spontanée (Lim 2011) et l'inversion de phase (Fryd 2011). Le point commun et caractéristique

de ces méthodes c'est la production de NEs via l'énergie emmagasinée par le système (Singh 2017).

Les méthodes de basse énergie peuvent être classées aussi en méthodes thermiques ou isothermiques (Komaiko 2015a). L'émulsification spontanée fait partie des méthodes isothermiques et peut être conduite de différentes manières :

- Simple mélange de l'huile, de l'eau et du solvant miscible à l'eau (Ganachaud 2005);
- Introduction de l'huile, du solvant miscible à l'eau et du surfactant lipophile dans la phase aqueuse (Bouchemal 2004) ;
- Introduction du mélange huile et surfactant hydrophile dans la phase aqueuse (Anton 2009).

Nous pouvons aussi associer à ces méthodes, celle qui repose sur la formulation ou plus précisément sur les proportions des deux phases (méthode par inversion de composition PIC) (Porras 2008). Cette méthode est généralement perçue comme un phénomène de dégradation d'une émulsion, qui peut donner naissance à des émulsions multiples intermédiaires (Salager 2006). A l'heure actuelle, elle reste complexe, ses mécanismes sont mal connus et difficilement reproductibles (Hansali 2012).

Toutes ces méthodes sont dites méthodes douces car relativement très économiques et permettent la protection des molécules fragiles. L'équipement est généralement simple et la technique transposable à l'échelle désirée. Les émulsions produites sont le plus souvent monodispersées et de distribution monomodale, dont la taille peut être ajustée par les paramètres de formulation et opératoires (Hansali 2012).

3.6.4 Etudes comparatives des méthodes de nanoémulsification et limitations

Des études comparatives ont été conduites dans le but de souligner l'importance d'une méthode par rapport à une autre, et pour un produit défini. L'objectif commun étant d'aboutir, quel que soit la méthode, à une NE stable aux propriétés désirées et encapsulant une molécule d'intérêt.

La comparaison faite entre les méthodes hautement énergétiques a clairement démontré que la microfluidisation était plus efficace que l'homogénéisation à haute pression en termes de rupture des gouttelettes (Lee 2013). Dans le même contexte, la comparaison faite entre l'ultrason et l'Ultra-turrax® montrent que les données diffèrent très peu en termes de taille des

particules. Cependant, les résultats peuvent être plus satisfaisants pour la méthode à ultrasons comparativement à l'Ultra-turrax[®], lorsque le temps du mélange passe de 15 minutes à 2 heures (Solè 2006). De leur côté, Jafari et al. (Jafari 2008), ont comparé les performances de l'ultra-turrax[®] et du générateur à ultrasons et ont démontré que les deux méthodes se valent sur la base de la taille des gouttelettes obtenues, toutes deux permettent d'obtenir une moyenne de taille n'excédant pas 180 nm. En revanche, pour la même formulation, l'émulsification spontanée est bien plus efficace avec une moyenne de taille de 27 nm.

Au contraire, la comparaison faite entre les méthodes faiblement énergétiques, en citant l'exemple de la nanoprécipitation (reposant sur le principe de déplacement de solvant) et l'émulsification diffusion, ont été conduite en évaluant leur aptitude respective à produire des NEs (Mora-Huertas 2011). Dans la même lignée, celle conduite par Komaiko et al. a clairement démontré que l'émulsification spontanée et la méthode d'émulsification par inversion de phase, faites sur une composition qualitative et quantitative identique, conduisaient à des nanogouttelettes de taille voisine avec un bon taux de corrélation ($r^2 > 0,61$, $n=14$). Ce qui suppose, que le processus d'émulsification réponde à un mécanisme commun (Komaiko 2015a).

Cependant, très peu d'études ont été menées pour comparer les performances des méthodes hautement énergétiques aux méthodes faiblement énergétiques. C'est l'exemple de l'étude conduite avec la microfluidisation et l'émulsification spontanée. Les résultats ont montré que les deux méthodes permettaient de produire des NEs avec une proportion beaucoup plus importante de tensioactif pour l'émulsification spontanée (Yang 2012). Rao et McClements (Rao 2011a; Rao 2011b), ont également comparé deux catégories de méthodes, et ont démontré que la méthode par inversion de la température de phase était bien plus efficace que les méthodes hautement énergétiques (microfluidisation et sonication).

La méthode par nanoprécipitation pourrait efficacement remplacer la méthode par homogénéisation à haute pression. En effet, celle-ci repose sur le principe du déplacement d'un solvant organique miscible à l'eau, véhiculant la molécule d'intérêt. L'introduction de la phase organique sous agitation magnétique dans la phase aqueuse, contenant généralement un tensioactif, entraîne une rapide diffusion du solvant à température ambiante (Qadir 2016). Suite à cela, il se produit une sursaturation du milieu entraînant la production spontanée de très fines particules (Håkansson 2011).

Dans une étude menée par Tan et al. (Tan 2016), on compare les performances de la NP à celle de la méthode d'homogénéisation à haute pression. Les attributs qualité d'une NE de type H/E produite par chaque méthode, ont été mis à profit (taille des gouttelettes et PDI). Cette NE contient du Tween[®]80 comme tensioactif, et la lutéine comme molécule d'intérêt.

Les résultats obtenus lors de cette étude, n'ont montré aucune différence significative des attributs qualité pour les deux méthodes sur la même formulation, avec un taux de rétention de la lutéine très satisfaisant > 90%. La NP se trouve être une alternative appropriée à la méthode d'homogénéisation à haute pression (Tan 2016).

Chaque procédé possède des limitations, le principal inconvénient des méthodes de basse énergie est la proportion de surfactif qui peut être mise en jeu, car certains d'entre eux peuvent s'avérer toxique au-delà d'une certaine concentration et certains d'entre eux d'origine synthétique sont interdits sur le plan réglementaire (McClements 2011b; Rao 2011b). Ceci n'est pas le cas des méthodes hautement énergétiques, où le principe de la nanoémulsification repose essentiellement sur des paramètres liés à la technologie de l'équipement. En effet, les quantités que nous retrouvons dans la composition à formuler ne dépassent pas 2%. On peut alors avoir un large choix de surfactifs et de copolymères (Qian 2011).

Dans les méthodes de basse énergie, on peut avoir recours à des cosolvants comme par exemple l'éthanol. Leur association à un surfactif devient intéressante dans le sens où elle améliore nettement la fluidité de la couche interfaciale; favorise le couplage entre surfactif et phase huileuse; améliore la solubilité de la phase huileuse et aqueuse (Flanagan 2006a).

D'autre part, nous pouvons envisager une association de surfactifs qui permet d'abaisser les concentrations individuelles en surfactifs et co-surfactifs (Lin 2009). L'association des surfactifs hydrophiles et lipophiles améliore la diffusion de la phase huileuse et aqueuse et évite toute instabilité (Yuan 2008). Par ailleurs, remplacer partiellement ou totalement la phase aqueuse par un autre solvant polaire comme par exemple le propylène glycol ou le glycérol, qui a pour rôle de modifier la polarité de la phase aqueuse, pénètre dans le film interfacial et favorise la formation des NEs (Yaghmur 2002). Ces solvants peuvent également être utilisés pour abaisser les concentrations en surfactifs et co-surfactifs (Santana 2013).

Comme leur nom l'indique, les méthodes hautement énergétiques par définition consomment beaucoup d'énergie. Leurs équipements sont chers et le coût de production est élevé. La

méthode de préparation des NEs peut passer par différentes étapes en fonction de leur composition qualitative et quantitative. Généralement, dans l'homogénéisation à haute pression, on passe par deux étapes. La première consiste à mettre au point une émulsion primaire par un simple mélange des deux phases puis passer à la réduction de taille afin d'atteindre l'échelle nanométrique (McClements 2012). Souvent les NEs produites par ces méthodes possèdent des particules dispersées larges comparativement aux méthodes de basse énergie. Leur taille se situe entre 200 nm et 300 nm dans le meilleur des cas (Koroleva 2012).

Le choix d'un procédé de développement des NEs passe par des critères de sélection relatifs au PA dans un premier temps (propriétés physicochimiques essentiellement), parallèlement on oriente son choix selon les objectifs thérapeutiques escomptés (voie d'administration, mode de libération du PA, etc.). Viendront ensuite les considérations économiques et la faisabilité du procédé. En effet, le procédé choisi doit pouvoir être exécuté en pratique tout en atteignant les caractéristiques principales que le formulateur se fixe au départ, à savoir une NE transparente dont la taille des particules ne devrait pas dépasser 500 nm et ayant un potentiel zêta avoisinant ± 30 mV, entre autres.

En règle générale, les méthodes de basse énergie permettent de produire d'excellentes NEs ayant pour principal avantage, une meilleure stabilité avec une réduction de taille des gouttelettes. La réussite d'une nanoémulsification repose sur une proportion non négligeable de surfactif et de co-surfactif. En pratique, et lorsque cela est possible, on préconise la combinaison des deux catégories de méthodes, ceci permet d'obtenir des NE avec des gouttelettes finement uniformes (Santana 2013).

3.6.5 Critères de choix d'un procédé de nanoémulsification et paramètres influençant

Dans la mise au point des NEs, tous les aspects doivent être minutieusement étudiés, qu'ils soient liés à la formulation ou au procédé. En effet, certains paramètres opératoires imposés par le procédé doivent être parfaitement ajustés à la formulation (Sarker 2005). C'est l'exemple de la température, dont l'effet est plus marqué dans les méthodes de basse énergie comparativement aux méthodes hautement énergétiques. Ce paramètre est d'autant plus important à prendre en considération, lorsque nous voulons encapsuler des molécules thermosensibles. L'effet de la température dépend essentiellement de la composition qualitative de la NE, plus précisément de la nature du surfactant (Santana 2013).

Dans des NEs contenant par exemple des émulsionnants non ioniques tels l'éther polyoxyéthylène (Brij®) ou les Tweens®, il devient impératif de faire attention à la température d'émulsification. Cette dernière, lorsqu'elle est connue et définie comme température d'inversion de phase, entraîne le passage de la NE type H/E vers une NE type E/H et vice versa (Sarker 2005). Ce phénomène devient préjudiciable à l'encapsulation des substances actives où l'on observe alors une déperdition de dose.

D'autres points sont à prendre en considérations, tels que les choix des opérations consécutives, comme par exemple les mauvaises conditions de stockage ou de congélation. Ces dernières pourront entraîner un changement de consistance ou éventuellement une séparation de phase. En effet, dans l'objectif de maintenir la NE stable à l'encontre des phénomènes de floculation, de gélification, de coalescence ou encore d'inversion de phase et de mûrissement d'Ostwald, la filtration stérilisante reste de loin l'alternative idéale pour pallier aux dommages qui peuvent être causés par un autoclavage (Sarker 2005).

Certains chercheurs ont évalué l'influence des variables opératoires sur la qualité finale d'une NE. L'ordre d'introduction des phases importe également; généralement trois méthodes sont entreprises dans l'émulsification spontanée d'un liquide dans un autre : ajout progressif de la phase huileuse dans la phase aqueuse contenant le surfactif; ajout de la phase aqueuse à une solution huileuse contenant un surfactif et enfin le mélange des tous les composants jusqu'à atteindre l'équilibre puis émulsification (Santana 2013).

Flanagan et al. (Flanagan 2006b), ont clairement constaté une différence pour un système contenant : 5% l'éthanol, 50% de saccharose, de l'huile de soja et comme surfactif les mono et di-glycérides éthoxylés. L'addition par partie de l'eau dans la phase huileuse permet d'obtenir plusieurs régions de NE sur le diagramme ternaire, tandis que l'ajout de l'huile dans la phase aqueuse contenant le surfactif ne permet d'avoir qu'une NE à un ratio eau : surfactant équivalent à 60:40. De même, pour un mélange d'eau, de décane et Brij30, la NE n'est obtenue que par l'ajout de l'eau dans la phase huileuse contenant le surfactant, alors qu'avec l'ajout de l'huile dans la phase aqueuse et/ou le mélange de tous les composants, les gouttelettes obtenues sont larges (Forgiarini A 2001).

Quant à l'emplacement du surfactif, Anton et al. (Anton 2009) ont clairement décrit le mécanisme de diffusion de ce dernier de la phase organique vers la phase aqueuse. C'est la méthodologie généralement préconisée, pour garantir la formation de NEs fines, lorsque nous

optons pour une émulsification spontanée. Cette hypothèse est également confirmée par Komaiko et al. (Komaiko 2014). Il est clairement défini que la présence absolue du surfactant dans la phase aqueuse ne permettait pas d'obtenir des gouttelettes nanométriques. En revanche, plus de 75% de sa proportion, présente dans la phase organique, permet d'obtenir des gouttelettes de l'ordre de 0,1 μm (Komaiko 2015a).

Selon Komaiko et al. (Komaiko 2015a), le temps d'agitation ne semble pas avoir un impact significatif au-delà d'une certaine valeur. En revanche, sur trois formulations avec un ratio surfactif-huile croissant à savoir 1, 2, et 3, l'étude de l'influence du temps d'émulsification (10 minutes, 20 minutes puis 30 minutes), a montré une nette réduction de la taille des particules (Ghosh 2014).

La vitesse d'introduction d'une phase dans une autre doit être optimisée. Elle est dépendante de la rhéologie, la structure et la stabilité du système produit. En effet, on préconise une vitesse d'introduction plus lente d'une phase dans une autre, lorsque la viscosité finale du produit est élevée (Pey 2006; Sole 2006). Cette viscosité impose en conséquence une augmentation de la vitesse d'agitation. Cependant, elle ne doit pas être trop élevée pour ne pas déstabiliser le système (Hansali 2012). Tandis que pour un système à forte énergie libre de surface, on préconise un ajout rapide d'une phase dans une autre pour éviter la séparation de phase (Pey 2006).

Dans les méthodes de basse énergie, on utilise souvent des dispositifs d'agitation pour une meilleure homogénéisation des composants. La géométrie du réservoir des mélangeurs à hélice et son design importe énormément, car lorsque le fond est plat, des zones mortes sont créées où des fractions visqueuses peuvent se former durant l'émulsification. De meilleurs résultats sont obtenus avec un fond arrondi (Sole 2006).

En ce qui concerne la vitesse d'agitation, des études menées par Solé et al., Tolosa et al. (Tolosa 2006; Solé 2010), ont montré que l'augmentation de la vitesse d'agitation produisait de larges gouttelettes. Au contraire, pour Pey et al., Solé et al. (Pey 2006; Solé 2006), de fines gouttelettes sont observées avec l'augmentation de ce paramètre.

On assume alors, que la vitesse d'agitation n'a pas une influence sur les propriétés de la NE produites par des méthodes d'émulsification de basse énergie, car les surfactifs ont la propriété de s'auto-assembler sans apport d'énergie considérable. En revanche, on peut admettre que la

vitesse d'agitation puisse temporairement changer le comportement des surfactif mais aussi ralentir ou accélérer l'état d'équilibre. Au-delà d'une certaine limite, on peut considérer la méthode d'émulsification comme hautement énergétique (Santana 2013), la vitesse d'agitation ou le taux de cisaillement devient alors un facteur influençant.

En effet, selon l'équation de Taylor, il existe une relation directe entre le taux de cisaillement appliqué et la taille des gouttelettes (Wooster 2008). En supposant que la différence de viscosité entre les deux phases est très faible, l'équation s'écrit comme suit :

$$r = \frac{\gamma}{\eta_c \times \sigma}$$

Où :

σ : taux de cisaillement ;

η_c : viscosité de la phase continue ;

γ : tension interfaciale ;

r : rayon de la gouttelette.

L'application d'un taux de cisaillement élevé entraîne la rupture de la gouttelette initiale. La surface de la gouttelette commence par s'étendre sous l'effet de la contrainte puis devient ellipsoïde et fini par se diviser, ce qui entraîne une réduction de taille. Ceci est d'autant plus accentué lorsque la tension interfaciale entre les deux phases est faible ou autrement dit, lorsque l'on se retrouve avec une proportion importante de surfactif (Singh 2017).

L'équation de Taylor met également en évidence le rôle que peut jouer la proportion du surfactif dans la génération de gouttelettes plus petites et la stabilisation de ces particules nouvellement formées le plus longtemps possible (Tadros 2004).

Par ailleurs, les paramètres de formulation ont un rôle considérable puisque la viscosité relative entre la phase aqueuse et la phase huileuse influence le processus de réduction de taille des gouttelettes au cours du processus choisi à cet effet. Ces dernières se mouvant moins, elles deviennent résistantes à la rupture et tournent sur elles-mêmes sous l'effet du cisaillement. Seulement, lorsque la viscosité de l'huile est trop élevée, les gouttelettes sont plus larges.

Idéalement le ratio optimum de viscosité que les chercheurs préconisent se trouve dans l'intervalle de $0,05 \leq \frac{\eta_d}{\eta_c} \leq 5$, où η_c est la viscosité de la phase continue et η_d est la viscosité de

la phase dispersée. Autrement, nous pouvons jouer sur la viscosité de la phase dispersante lorsque la formulation nous impose une huile visqueuse (Kislukhin 2016).

Aussi, le choix de la technique de préparation dépend étroitement du PA. Son encapsulation est tributaire du ratio de ce dernier, lequel est conditionné par la méthode choisie.

En bref, la réussite d'un procédé de fabrication des NEs passe inévitablement par un compromis entre facteurs de formulation et facteurs opératoires. Il faudra alors trouver le juste équilibre qui permettra d'œuvrer vers une réduction de taille optimale des gouttelettes de la phase dispersée.

3.7 Attributs qualité et principales caractérisations des nanoémulsions

Généralement, les nanoémulsions obtenues sont rapidement caractérisées ($T_0 = 0$ heure). Il est recommandé de ne pas aller au-delà de 24 heures de leur formulation ; à ce moment, la caractérisation serait non significative. Les mêmes contrôles peuvent être menés au bout de 10 à 30 jours voir même plus. Ceux-ci comprennent généralement les contrôles macroscopiques, la mesure de la taille moyenne des gouttelettes (z-average), le potentiel zêta, l'indice de polydispersité (Pdl) ainsi que le pH. Dans le cas des formes parentérales, le test de stérilité et la recherche d'endotoxines deviennent obligatoires (Mirkovic 2017).

Au niveau macroscopique, des informations utiles peuvent être recueillies tels que l'aspect, la consistance, la transparence laquelle est appréciée par des mesures de la turbidité. La viscosité ainsi que le comportement rhéologique des NEs sont des paramètres physiques très importants. Leur transparence les rend facilement caractérisables par les techniques spectroscopiques (Ansels 2005; Florence 2009).

Par ailleurs, d'autres mesures telles que la conductivité permet de définir le sens de l'émulsion, plus précisément la nature de la phase externe du système et d'en étudier sa stabilité avec le temps pour déceler ou non un changement de phase, liée par exemple à la TIP (Mirkovic 2017). Une NE type H/E est conductrice contrairement à une NE type E/H (Kale 2017).

Les NEs peuvent être facilement diluées dans leur phase dispersante. En revanche, si une NE type E/H est diluée dans de l'eau, cette dernière peut subir une inversion de phase (Sukanya 2013).

A l'échelle microscopique, la microscopie électronique est de loin la méthode la plus précise pour l'étude de la morphologie et de la structure des NEs.

3.7.1 Analyse de la taille des gouttelettes et potentiel zêta

Le principal intérêt des NEs réside dans leur taille nanométrique qui les rend facilement administrables en tant que liquides par voie orale mais aussi par voie intraveineuse (Hansali 2012).

On ne peut pas caractériser les NEs sous microscopie optique. En revanche, des techniques plus sophistiquées existent, telles que la microscopie à force atomique (AFM), la cryo-microscopie électronique (Cryo-SEM ou Cryo-TEM) ou encore la méthode connue sous la terminologie anglo-saxonne « Dynamic Light Scattering » (DLS) (Lovelyn 2011).

Cette dernière repose sur le principe de la spectroscopie. Elle est conduite sur un échantillon dilué ou pas, à une température de 25°C, accompagnée généralement d'une ou des méthodes de caractérisations suscitées (Singh 2017). L'équipement permet non seulement la mesure de la taille moyenne des gouttelettes et en même temps la détermination de l'indice de polydispersité. Parallèlement, il peut convertir la valeur de la mobilité électrophorétique de notre échantillon en une valeur correspondante à son potentiel zêta (Mirkovic 2017). Les échantillons sont maintenus au repos au minimum 15 minutes pour qu'ils soient suffisamment homogènes avant la mesure (Hansali 2012).

Sur la base des résultats obtenus dans les travaux antérieurs, les chercheurs s'accordent sur le fait que la taille des gouttelettes est directement corrélée à la présence du surfactif dans la formulation mais également à sa concentration (Han 2008; Mirkovic 2017). Elles deviennent encore plus petites en présence d'une association de tensioactifs.

Dans une étude menée par Mirkovic et al., l'association du poloxamer 188 (lequel assure une stabilisation stérique) aux phospholipides (lesquels assure une stabilité électrocinétique) dans la formulation de NEs à usage parentérale, composées d'huile de poisson associé aux triglycérides à chaînes moyennes (MCT)s ou à l'huile de soja, permettrait d'aboutir à une qualité optimale en matière de taille des particules (<500nm), de PdI (<0,25), de potentiel zêta ($\geq \pm 25\text{mV}$) et de pH (entre 6 et 9). Ce couple de tensioactifs, permet de maintenir le film interfacial résistant aux différentes contraintes de cisaillement lors de la préparation (Mirkovic 2017).

La présence de plus d'un surfactif est intéressante, si des opérations comme une homogénéisation à haute pression ou une stérilisation ultérieure sont envisagées. Cependant, la taille des particules augmenterait sous l'effet de certains facteurs d'instabilité et/ou durant les études du vieillissement des NEs. L'analyse de la taille des particules revêt une importance primordiale, particulièrement lors de la formulation des préparations à usage pulmonaire (Mirkovic 2017). En effet, la taille des gouttelettes lipidiques ne devraient pas excéder la valeur de 500 nm. Au-delà de 5 μ m, la présence de gouttelettes plus larges ne doit pas dépasser un taux de $\leq 0,05\%$ (USP Chapter 729 2013).

La taille des gouttelettes est également influencée par les paramètres du procédé qu'on impose à la composition. A titre d'exemple, la taille des gouttelettes de la NE obtenue à partir de l'huile de poisson en présence de phospholipides et de poloxamer 188, augmente en augmentant le nombre de cycle. Tandis que sous pression, la taille des gouttelettes diminue (Mirkovic 2017) .

Le potentiel zêta ou encore potentiel électrocinétique est un paramètre clé des systèmes dispersés. En valeur numérique, c'est la différence de potentiel entre le plan de mouvement de la particule et la neutralité (Preetz 2010). La NE est considérée comme stable, si son potentiel zêta est $\geq \pm 25\text{mV}$ (Mirkovic 2017), ou $\geq \pm 30\text{mV}$ (Khan 2006; Preetz 2010; Shakeel 2013; Kislukhin 2016; Kale 2017). Plus cette dernière est chargée, plus la NE résisterait aux phénomènes de floculation (Araújo 2011). A des valeurs plus faibles, on peut craindre un phénomène d'agrégation des gouttelettes (Kislukhin 2016).

D'autre part, les facteurs influençant le potentiel zêta sont nombreux. Parmi ces facteurs, on peut citer les plus importants : le pH, la force ionique, la morphologie et la taille des gouttelettes (Preetz 2010; Araújo 2011; Gao 2011), ainsi que le type et la concentration de l'agent émulsionnant (Mirkovic 2017). En ce qui concerne ce dernier facteur, et dans l'étude menée par Mirkovic et al., la présence du Poloxamer 188 en association avec les phospholipides au sein de la formulation, ainsi que le choix de l'huile utilisée (MCT)s, augmenteraient considérablement la valeur absolue du potentiel zêta durant toute la période de stockage (allant de -28 mV à -33 mV), qui s'étale de la formulation à 30 jours après (Mirkovic 2017).

Cependant, l'étude de l'influence des facteurs opératoires tels que la pression et le nombre de cycles d'homogénéisation ont montré des données intéressantes. L'impact est positif immédiatement après la formulation quand on augmente le nombre de cycles. En revanche, au

bout de 30 jours de stockage, il a été observé l'effet inverse. Contrairement à ce dernier, l'effet de la pression s'observe positivement après 30 jours de formulation (Mirkovic 2017).

3.7.2 Etude morphologique

La morphologie des gouttelettes dispersées des NEs peut être observée avec la microscopie électronique à balayage (MEB) et la microscopie électronique à transmission (MET). La MEB nous donne une image tridimensionnelle (3D) des gouttelettes, les échantillons sont examinés généralement à un voltage de 20 kV (kilovolts), à différents grossissements (Lovelyn 2011). Elle fournit des images de surface et de la structure, de très haute résolution. C'est l'une des techniques de caractérisation les plus utilisées dans différents domaines d'application (Qadir 2016).

Une observation de la surface et de la forme des gouttelettes dispersées peuvent être obtenues avec succès par MET, avec une bonne résolution d'image. Pour ce faire, une coloration à l'acide phosphotungstique à 1% ou bien en immergeant une grille microscopique de carbone portant l'échantillon dans une goutte de 2% d'acétate d'uranyle. Grâce à la MET et aux programmes de traitement d'image, nous pouvons également apprécier la taille des gouttelettes dispersées et étudier leur distribution (Samah 2010).

La MET possède une capacité de résolution de l'ordre de 0,2 nm (Wang, Z.L. 2000; Ribeiro 2008; Luykx 2008). L'échantillon doit être très mince et capable de résister à la pression et au vide, créés à l'intérieur de l'équipement. Cette technique présente un certain nombre d'inconvénients : la préparation de l'échantillon peut prendre du temps; possède un champ de vision assez restreint; l'échantillon peut être endommagé durant l'analyse par le faisceau d'électrons (Qadir 2016).

Il existe une technique microscopique plus récente qui permet d'observer la structure et la morphologie des gouttelettes et d'en apprécier la distribution avec une résolution de $\pm 0,1$ nm. Il s'agit de la microscopie à absorption atomique (AFM) (Ruozi 2005; Edwards 2006; Luykx 2008). Preetz et al. ont pu mener grâce à l'AFM des études comparatives entre NEs et nanocapsules, à travers une caractérisation de la forme, de la morphologie et de leurs propriétés mécaniques (Preetz 2010).

3.7.3 Indice de polydispersité

Ce paramètre permet d'apprécier la distribution de taille des gouttelettes lipidiques dispersées, immédiatement après préparation. Il définit la qualité et ou l'homogénéité de la dispersion (Chaix 2003; Burapapadh 2010; Li 2011a).

Selon Muller et al, la valeur du PdI ne doit pas dépasser 0,25 pour les préparations parentérales (Müller 2004). Une investigation est faite sur l'influence des paramètres de formulation et du process sur l'indice de polydispersité et indique clairement que, dans le cas de la NE produite à base d'huile de soja et d'huile de poisson, la taille des gouttelettes est diminuée, encore plus sous l'effet de la pression et en augmentant le nombre de cycle de l'homogénéisation. Au repos et après 30 jours d'investigation, le PdI reste diminué selon la même étude (Mirkovic 2017).

A l'opposé, dans le cas d'une NE à base d'huile de poisson et de MCTs, plus le nombre de cycle augmente, plus la valeur de PdI augmente (Mirkovic 2017). A l'issue de cette étude, il a été conclu que les paramètres opératoires doivent être ajustés en fonction de la nature de l'huile utilisée. Dans ce cas précis, il s'agit du nombre de cycles à appliquer (Mirkovic 2017).

3.7.4 Mesure du pH

La mesure du pH est conduite sur les échantillons immédiatement après formulation. Eventuellement, si des études de stabilité sont conduites sur ces dernières, la mesure est faite pendant et après tout process. Elle est conduite sur des échantillons à température ambiante, en immergeant l'électrode du pH, préalablement étalonné dans chaque échantillon. Les mesures répétées nous permettent de définir la valeur moyenne du pH de chaque échantillon.

Dans le cas des préparations parentérales à usage nutritive, il est primordial d'ajuster (en amont d'une stérilisation) le pH à une valeur avoisinant 9, quand l'effet probable d'une hydrolyse liée à la composition de la formule (phospholipides et triglycérides) peut survenir. En effet, les acides gras libres résultant de cette dernière peuvent amener le pH à une valeur plus basse (Mirkovic 2017).

3.7.5 Spectroscopie infra-rouge

Dans la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR), une partie du rayonnement infrarouge est absorbée par l'échantillon, une autre est transmise par ce dernier.

Le résultat obtenu est un spectre représentant l’empreinte moléculaire de l’échantillon, illustrée par des pics d’absorption correspondants à des fréquences de vibrations entre les liaisons atomiques (Nicolet 2001). Comme chaque échantillon à son propre spectre infrarouge, cette méthode permet d’apprécier la présence d’un composant grâce à ses pics d’absorption et de déceler d’éventuelles liaisons grâce aux nouveaux pics qui apparaissent dans un mélange d’un ou de plusieurs composants. En effet, c’est une méthode qualitative et sensible, elle fournit presque instantanément le résultat. Les mesures sont extrêmement précises et reproductibles (Nicolet 2001). Dans la caractérisation des NEs, cette méthode devient intéressante lorsqu’on veut suivre le processus de cristallisation d’une molécule active à travers son encapsulation. A titre d’exemple, Araújo et al. ont rapporté que la thalidomide, une fois encapsulée par nanoémulsification spontanée, se trouve dans un état polymorphe différent de celui de départ (Araújo 2011).

3.7.6 Stabilité des NEs

Les facteurs pouvant influencer la stabilité d’une NE sont : la température, la dilution, la composition et la solubilité des phases. L’observation la plus fréquemment rapportée par les chercheurs, concernant la stabilité physique d’une NE, est la formation d’un anneau blanchâtre ou nappe d’huile brillante autour du cou d’un tube ou récipient (Piorkowski 2014; Liu 2016).

Une NE est dite stable, lorsqu’elle conserve toutes ses caractéristiques physicochimiques et microbiologiques de départ. Il est donc préconisé de faire passer une batterie de tests au début et tout au long de la durée de vie prévue (Ahmed 2008; Shakeel 2008a).

Comme toutes les autres formes pharmaceutiques, elle peut faire l’objet des études de stabilité. Pour ce faire, tous les paramètres décrits dans cette section peuvent être reconduits à différents intervalles de temps. Si aucun changement significatif n’a été décelé, la NE peut être considérée comme étant physiquement stable. En ce qui concerne la stabilité chimique, elle est conduite en dosant la substance active et ses produits de dégradations à des intervalles de temps différents, selon les recommandations de l’ICH.

Nombreuses sont les études qui ont démontré l’amélioration de la stabilité physique et chimique des molécules actives encapsulées par des NEs (Baboota 2007; Shafiq 2007a; Shakeel 2008b; Qadir 2016). Par ailleurs, les NEs sont connues pour améliorer la stabilité chimique des

molécules lipophiles, tels que le celecoxib, l'indometacine ou encore le ramipril (Baboota 2007; Shafiq 2007a; Shafiq 2007b; Shakeel 2013).

Il est aisé de conduire des études de stabilité en mettant les NEs au réfrigérateur ou à température ambiante pendant des mois. Par ailleurs, pendant les études en temps accélérées et selon les recommandations de l'ICH, les NEs sont conservées à des températures élevées. Des échantillons sont prélevés au fur et à mesure à des intervalles de temps réguliers, lesquels sont ensuite analysés (ex. dosage du PA) (Shakeel 2008a).

Hormis les études prescrites par l'ICH, les chercheurs conduisent des études de stabilité sur le plan cinétique pour évaluer la résistance et l'intégrité des nanogouttelettes surtout en cas de fluctuations de température. Les NEs subissent d'abord un test de centrifugation, celles qui ne présentent aucune séparation de phase finissent par un test de congélation-décongélation (Silva 2015). Cette méthodologie correspond à des cycles répétés, plus connue sous le terme anglosaxon de « freeze thaw cycles ». On passe généralement de 4°C à 45°C, à raison de 48 heures pour chaque température et ainsi de suite, avec une moyenne de 6 cycles (Shafiq 2007a). Sont contrôlés par la suite, la taille des particules et l'aspect macroscopique comme le crémage, que l'on peut confirmer par une centrifugation de 3000-4000 g, ou après un stockage de 24 heures, 1 mois, 3 mois et 1 année. Le taux de crémage est apprécié en mesurant le rapport hauteur totale de la préparation/hauteur du sédiment (ou surnageant) (Li 2010).

Par ailleurs, des études de stress thermiques peuvent être conduites sur les NEs. 1 ml de NEs est soumis à des variations de température par palier de 10°C, allant généralement de 20°C à 80°C et ce pendant 10 minutes. La stabilité finale est appréciée par la mesure de la taille des particules dispersées par DLS (Morais Diane 2014).

Les études de stabilité cinétiques des NEs conduites par variations de températures ou sous l'effet d'une force centrifuge accélèrent le mouvement brownien des gouttelettes dispersées et les amènent à se rapprocher les unes des autres (McClements 2005a; Schramm 2006; Morais Diane 2014).

3.8 Nanoémulsions et applications

3.8.1 Nanoémulsions orales

La voie orale constitue l'une des meilleures alternatives pour véhiculer les molécules hydrophobes (antibiotiques, hormones, stéroïdes, cytotoxiques, diurétiques, antifongiques, etc.). Les NEs ont l'aptitude d'emmagasiner dans leur structure des molécules, les protégeant contre toute dégradation enzymatique et des variations de pH (Singh 2017). Par ailleurs, elles améliorent efficacement la biodisponibilité des molécules encapsulées grâce à leur taille, leur charge et leurs propriétés de surface.

Plusieurs formulations à usage oral furent développées. A titre d'exemple, la curcumine (Yu 2012), le candesartan cilexetol qui est un antihypertenseur formulé en NE en présence du Tween[®]80 et du solutol[®] HS-15 (Gao 2011), le paclitaxel lequel en présence du tocopheryl polyéthylène glycol 1000 succinate, un excipient utilisé pour promouvoir sa biodisponibilité jusqu'à > 70% (Khandavilli 2007), le sérum albumine humaine (Sun 2012), l'insuline (Li 2013), ou encore le saquinavir (antirétroviral) (Vyas 2008).

3.8.2 Applications intranasales

La voie intranasale est une voie non invasive, plutôt bien tolérée par les patients. Elle évite le premier passage hépatique et permet l'administration des molécules à action systémique. Les muqueuses nasales se trouvent parmi les voies les plus efficaces de par la réduction de l'activité enzymatique, la haute disponibilité des sites immunoactifs et son épithélium modérément perméable (Ugwoke 2005).

Cette application trouve son intérêt pour les molécules hydrophiles et celles à haut poids moléculaire, ainsi que pour le traitement de maladies lourdes telles que la maladie d'Alzheimer, migraine, dépression, schizophrénie, maladie de Parkinson, méningite, etc. (Kumar 2008; Mistry 2009). En effet, la muqueuse nasale offre une connexion directe entre le nez et le cerveau, particulièrement avantageux pour les traitements des maladies du système nerveux central (SNC) (figure 20). Par conséquent, l'usage de NEs pour le ciblage thérapeutique, devrait produire des résultats significatifs pour cette voie d'administration, comparativement aux voies conventionnelles (Clark 2001; Chatterjee 2019). Les formes muccoadhésives et ou type nanoémulgel ont donné des résultats appréciables. En revanche, le mécanisme d'action reste encore mal élucidé (Chatterjee 2019).

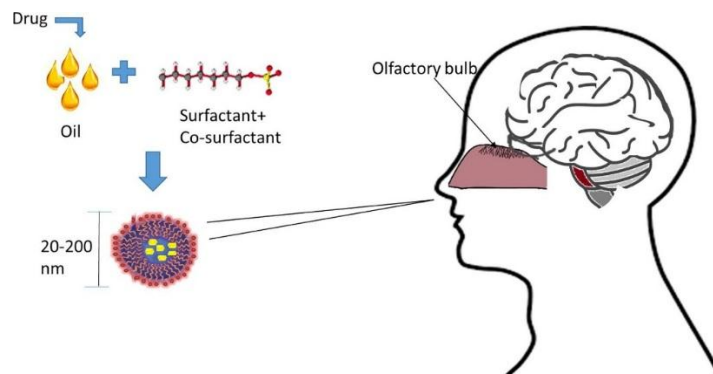


Figure 20. Administration de nanoémulsions par voie nasale et site d'action (Chatterjee 2019).

3.8.3 Applications topiques et transdermiques

L'administration de NEs à usage transdermique se fait à travers des patchs que le patient pourra retirer au moment voulu. Ces formes permettent une libération contrôlée sur une période prolongée. L'automédication est possible, ce qui n'est pas le cas de la voie parentérale.

Cette voie d'administration fut explorée avec succès. Elle améliore l'efficacité thérapeutique et donc la biodisponibilité, avec une réduction des effets secondaires. Ce fut le cas de la caféine qui a été utilisée dans le traitement de différents types de cancers par voie orale. Les études comparatives ont vite montré l'efficacité des NEs type E/H par rapport aux solutions aqueuses orales, par une meilleure pénétration et perméabilité à travers la barrière cutanée avec une reproductibilité des profils de biodisponibilité (concentrations plasmatiques en fonction du temps) (Shakeel 2010). Nous citons également l'exemple du paclitaxel (Khandavilli 2007), l'inuline (Wu 2001) et dacarbazine (Tagne 2008; Kakumanu 2011).

Par ailleurs, d'autres études ont confirmé l'efficacité des NEs au détriment des formes conventionnelles topiques telles les macroémulsions (Ktistis 1998; Gasco 1999). et les gels (Kriwet 1995; Shakeel 2008c; Patel 2010).

3.8.4 Applications parentérales

C'est la voie d'administration la plus courante en cas d'urgence, mais aussi pour les ingrédients actifs de faible biodisponibilité et à faible index thérapeutique. Les NEs sont d'excellents vecteurs médicamenteux, ils véhiculent efficacement des molécules hydrophobes, incompatibles, ou fragiles les protégeant contre toute hydrolyse et/ou dégradation enzymatique

(Lovelyn 2011; Ravi 2011). A titre d'exemple, le chlorambucil (anticancéreux utilisé dans le traitement du cancer du sein et des ovaires) (Ganta 2010; Lovelyn 2011), ou encore la carbamazépine (anticonvulsivant), sont toutes les deux des molécules actives faiblement solubles et formulées en NEs pour la voie parentérale. Leurs formulations respectives ont donné des résultats très satisfaisants (Lovelyn 2011). Nous citons également l'exemple du paclitaxel (Bawa 2016) et du diclofenac, formulés en NE de type H/E (Ramreddy 2012).

Le seul inconvénient de cette voie d'administration étant le risque d'opsonisation des NEs, une fois dans la circulation sanguine. Pour échapper au système réticulo-endothéliale (SRE), des supramolécules, telle que le polyéthylène glycol (PEG), sont greffées à la surface de ces systèmes nanométriques, afin de tromper les opsonines et atteindre la cible thérapeutique (Hak 2012). C'est l'exemple de la doxorubicine, utilisée pour le traitement de la leishmaniose où la molécule doit être à résidence intracellulaire (Kansal 2012). L'amphotéricine B est une autre molécule dont la NE de type H/E, fut décorée avec le chitosan (Asthana 2013).

D'autres exemples de formulations sont rapportés dans le tableau 11, par Singh et al. (Singh 2017).

3.8.5 Applications pulmonaires

Jusqu'à présent, les chercheurs n'ont pas exploré les potentialités d'une administration pulmonaire de ces NEs. Il y'a très peu de publications dans ce sens (Mansour 2009; Lovelyn 2011). Toutefois, les études comparatives entre les liposomes utilisés dans la thérapie génique et le couple émulsion/ADN, attestent l'efficacité de ce dernier par voie pulmonaire (Yi 2000).

Des réserves sont émises et des études plus approfondies sont obligatoires afin de vérifier l'innocuité des surfactifs et huiles présents dans la formulation des NEs, pour écarter une éventuelle interaction entre ces derniers avec les alvéoles pulmonaires, pouvant perturber leurs fonctions biologiques (Lovelyn 2011).

3.8.6 Applications en phytothérapie

Les produits de phytothérapie sont souvent formulés en microémulsions, mais très peu de documents en parlent. C'est le cas de la curcumine avec amélioration de sa solubilité par voie orale (Tsai 2010); l'hesperetin, dont la perméabilité in vitro est considérablement améliorée comparativement à la suspension aqueuse ou à celle de l'isopropyl myristate (Xu

2010). Ces microémulsions peuvent aisément faire l'objet d'une réduction de taille, allant jusqu'au nanomètre pour obtenir des NEs (Lovelyn 2011).

Tableau 11. Exemples de nanoémulsions parentérales (Singh 2017).

<i>Principe(s) actif(s)</i>	<i>Phase dispersée</i>	<i>Surfactant(s)</i>	<i>Méthode(s) d'émulsification</i>	<i>Taille moyenne des particules (nm)</i>	<i>Références</i>
<i>Carbamazepine</i>	Huile de ricin, MCTs	Lecithine de soja, Polyoxyl 35 Huile de ricin, Tween [®] 80	Emulsification spontanée	150	(Kelman 2007)
<i>Thalidomide</i>	Huile de ricin, huile d'olive, huile de soja, MCTs	Tween [®] 80		200	(Araújo 2011)
<i>Docetaxel</i>	Acide oléique, Stearyl amine	Lecithine	Homogénéisation suivie d'une ultrasonication	190-230	(Venkateshwarlu 2010)
<i>Primaquine</i>	Miglylol 812	Pluronic F68	Homogénéisation suivie d'une homogénéisation à haute pression	10-200	(Singh 2008)
<i>Fisetin</i>	Miglylol 812, huile de soja, oléate d'éthyl	Labrasol, Lipoid E80	Méthode TIP	153 ± 2	(Ragelle 2012)
<i>Insulin</i>	Complexe protéinique	Alcool polyvinylique	Emulsification spontanée	200-500	(Simon 2004)
<i>Clotrimazole</i>	Huile de soja	Pluronic F68, Cremophor, Tween [®] 20, Tween [®] 80	Emulsification spontanée	<25 nm	(Borhade 2012)
<i>Paclitaxel et ceramide</i>	Huile de pignon de pin	Lipoid-80	Homogénéisation suivie d'une ultrasonication	200	(Desai 2008)
<i>Paclitaxel et Sulforhodamine B</i>	Vitamin E	TPGS	Homogénéisation	~100	(Yang 2014b)

3.8.7 Nanoémulsions à usage antimicrobien

Dans le domaine agroalimentaire, les conservateurs antimicrobiens généralement hydrosolubles sont d'usage courant. En revanche, pour ce qui en est des agents antimicrobiens liposolubles, envisager l'encapsulation fut une excellente alternative proposée par les chercheurs, qui s'avère très efficace. C'est l'exemple de certaines huiles essentielles.

Les agents antimicrobiens peuvent être internalisés dans le cœur des gouttelettes huileuses dispersées, adsorbées à la surface de celles-ci ou bien les deux cas comme le montre la figure 21. En effet, en plus de l'encapsulation des huiles essentielles à l'intérieur des gouttelettes, il est possible d'incorporer dans la formulation des tensioactifs connus pour leur propriété antimicrobienne, qui viendront se fixer à l'interface H/E, tels que le lysozyme ou encore le SDS.

Les chercheurs sont mitigés quant à l'efficacité de cette dernière catégorie de NEs, car plus on réduit la taille des particules, plus le tensioactif antimicrobien aura tendance à s'adsorber à l'interface pour abaisser la tension interfaciale plutôt que d'agir sur les micro-organismes (Salvia-Trujillo 2017).

Les principaux travaux sur les NEs à activité antimicrobienne furent longuement débattues par Ziani et al., qui ont prouvé la nécessité de l'utilisation de surfactifs non ioniques dans la formulation des NEs, encapsulant l'huile essentielle de thym, afin de préserver l'intégrité des nanogouttelettes et par voie de conséquence l'activité antimicrobienne des NEs (Ziani 2011). En effet, l'ajout de tensioactif cationique entrainerait une interaction des nanogouttelettes lipidiques chargées positivement avec la surface des micro-organismes généralement porteuse de charge négative (Ziani 2011).

Par ailleurs, les NEs encapsulant des composants aromatiques sont plus efficaces que celles à base d'huiles essentielles directement nanoémulsionnées dans le système, et ce pour la même concentration mise en jeu (Donsi 2011a; Liang 2012; Ghosh 2014). De leur côté, Salvia-Trujillo et al., ont clairement démontré l'efficacité des NEs encapsulant la limonène par rapport aux émulsions conventionnelles, avec une rapide inactivation de l'*Escherichia coli*. (Salvia-Trujillo 2014).

En partant de ce constat, On pourrait conclure que l'usage de NEs pour leur efficacité prouvée aurait également pour avantage la réduction de la proportion de l'huile essentielle à introduire.

Mais la pratique est toute autre, puisque ces composants sont volatiles. Ce paramètre doit donc être pris en considération lors de la formulation de NEs (Donsı 2011a).

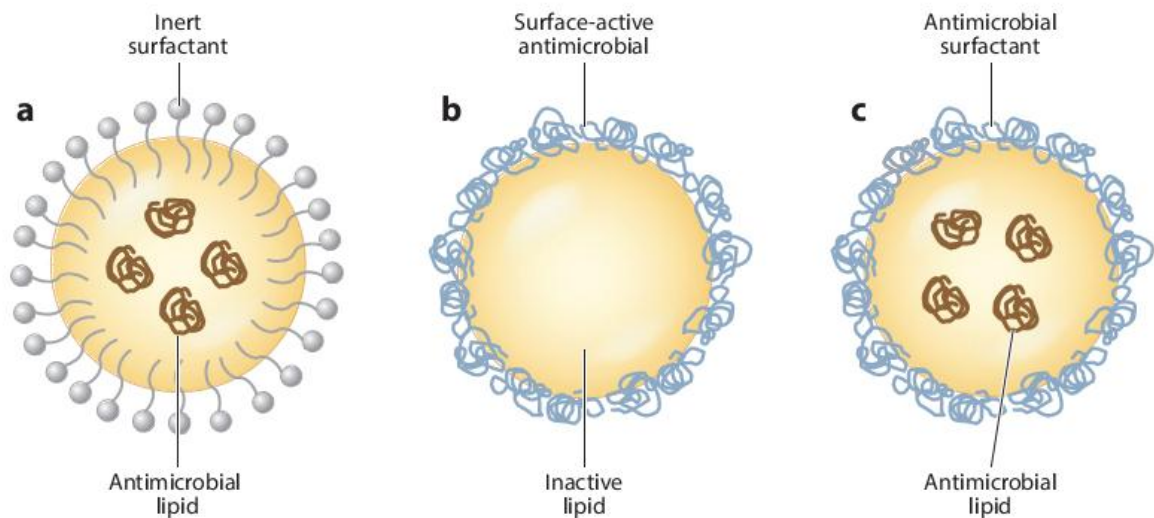


Figure 21. Nanoémulsions antimicrobiennes avec (a) des agents antimicrobiens liposolubles encapsulés et surfactant inerte (b) surfactant à activité antimicrobienne adsorbé à la surface et lipide inactif (c) surfactant et lipides antimicrobiens (Salvia-Trujillo 2017).

En outre, l'incorporation de NEs contenant des composés bioactifs dans les aliments, pour améliorer leur conservation, est conduite avec succès. Des études ont prouvé l'amélioration de la biodisponibilité des composés encapsulés, une fois ingérés avec la matrice alimentaire qui les véhicule par voie orale (McClements 2015).

Il est à noter que les NEs à usage agroalimentaire ont préférentiellement une taille des particules > 200 nm (Lohith Kumar 2018).

3.9 Les nanoémulsions brevetées

Le développement de NEs prend de l'élan, comme en témoignent les nombreuses publications et brevets accordés (tableau 12). Ces NEs furent conçues pour des molécules faiblement solubles, comme la cyclosporine ou le paclitaxel (Gao 2011). Les récents succès des produits commercialisés, comme Sandimmune Neoral® (Cyclosporine A), Fortovase® (Saquinavir) ou encore Norvir® (Ritonavir), reflètent l'énorme potentiel de ces nouveaux systèmes thérapeutiques de délivrance de médicaments (Qadir 2016). Nombreux sont les produits commercialisés qui sont formulés en NEs, comme le montre le tableau 13 (Lovelyn 2011).

Tableau 12. Récents brevets sur les nanoémulsions (<http://patentstorm.us> ; <http://www.pharmacast.com> ; Lovelyn 2011; Qadir 2016).

Titre du brevet	Propriétaire du brevet	Principales avancées	Numéro du brevet
<i>Non-toxic antimicrobial compositions and methods of use</i>	NanoBio Corporation (US)	Relate la composition et méthode de traitement des infections bactériennes	US 6,559,189 et US 6,635,676
<i>NEs based on phosphoric acid fatty acid esters and its uses in the cosmetics, dermatological, pharmaceutical, and/or ophthalmological fields</i>	L'Oréal (Paris, FR)	Développement de NEs utilisant un tensioactif anionique (esters d'acides gras d'acide phosphorique) et une huile pour son application dans les domaines cosmétique, dermatologique, pharmaceutique et ophtalmologique.	US 6,274,150
<i>NEs based on oxyethylenated or non-oxyethylenated sorbitan fatty esters, and its uses in the cosmetics, dermatological and/or ophthalmological fields.</i>	L'Oréal (Paris, FR)	Cette invention est liée au développement de NEs utilisant un tensioactif non ionique et une huile pour son application dans les domaines cosmétique, dermatologique, pharmaceutique et ophtalmologique.	US 6,335,022
<i>NEs based on ethylene oxide and propylene oxide block copolymers and its uses in the cosmetics, dermatological and/or ophthalmological fields.</i>	L'Oréal (Paris, FR)	Cette invention est liée au développement de NEs utilisant des copolymères à blocs d'oxyde d'éthylène et d'oxyde de propylène pour leur application dans les domaines suivants cosmétique, dermatologique, pharmaceutique et ophtalmologique.	US 6,464,990
<i>NEs based on glycerol fatty esters, and its uses in the cosmetics, dermatological and/or ophthalmological fields.</i>	L'Oréal (Paris, FR)	Cette invention est liée au développement de NEs utilisant des esters d'acides gras de glycérol pour leur application dans les domaines cosmétique, dermatologique, pharmaceutique et ophtalmologique.	US 6,541,018
<i>NEs based on sugar fatty esters or on sugar fatty ethers and its uses in the cosmetics, dermatological and/or Ophthalmological fields.</i>	L'Oréal (Paris, FR)	Cette invention est liée au développement de NEs utilisant des esters d'acides gras pour leur application dans les domaines cosmétique, dermatologique, pharmaceutique et ophtalmologique.	US 6,689,371
<i>Transparent NEs less than 100 nm based on fluid non-ionic amphiphilic lipids and use in cosmetic or in dermopharmaceuticals.</i>	L'Oréal (Paris, FR)	Cette invention est liée au développement de NEs transparentes avec une taille moyenne des particules inférieure à 100 nm. Les NEs ont été préparées en utilisant des lipides amphiphiles non ioniques pour leur application dans le domaine cosmétique ou dermopharmaceutique.	US 5,753,241
<i>NEs of poorly soluble pharmaceutical active ingredients and methods of making the same</i>	ASAT AG Applied Science and Technology (Zug, CH)	Cette invention est liée au développement de NEs de produits pharmaceutiques actifs peu solubles en utilisant une nouvelle méthode triphasique.	WO/2007/103294

Tableau 13. Nanoémulsions commercialisées (Lovelyn 2011).

<i>Ingrédient(s) actif(s)</i>	<i>Nom déposé</i>	<i>Fabricant</i>	<i>Indication thérapeutique</i>
<i>Palmitate alprostadil</i>	Liple®	Mitsubishi Pharmaceutical, Japan	Vasodilatateur/ antiagrégant plaquettaire
<i>Dexamethasone</i>	Limethason®	Mitsubishi Pharmaceutical, Japan	Stéroïdes
<i>Propofol</i>	Diprivan®	Astra Zanecca	Anesthésique
<i>Vitamins A, D, E et K</i>	Vitalipid®	Fresenius Kabi Europe	Nutrition parentérale

Malgré l'existence de méthodes moins énergivores, il y'a des difficultés de transposition d'échelle. En plus de cela, la nécessité d'introduire une proportion importante de surfactif pose un réel problème à l'industriel. Les méthodes telle que l'homogénéisation à haute pression, coûteraient chères aux industriels, ceci explique clairement leur faible engouement pour les formulations brevetées ou encore certaines formulations dont le mécanisme de production est mal compris, tant sur le plan physique que chimique (ex. méthode TIP) (Tadros 2004).

3.10 Devenir in vivo des nanoémulsions par voie orale

La voie orale étant la voie pour laquelle les émulsions furent développées dans un premier temps. En revanche, pour les molécules hydrophobes et en dehors de la voie orale, d'autres voies d'administration étaient envisagées avec beaucoup d'effets secondaires, tels que la déperdition de dose, atteinte d'organes non cibles et des formes pharmaceutiques nouvelles coûteuses, parfois difficilement exécutables à l'échelle industrielle.

Dans ce contexte, le retour vers les systèmes dispersés s'est imposé avec de meilleures caractéristiques physicochimiques et biopharmaceutiques. Les NEs répondent parfaitement à toutes ces exigences et sont de nos jours adaptées à toutes sortes de molécules avec différentes approches de formulation et un large éventail d'excipients aux différentes fonctionnalités.

Pour les molécules faiblement solubles dans l'eau, l'approche d'une encapsulation se fait instantanément avec pour principal objectif de promouvoir l'absorption et la perméabilité, en vue d'atteindre de meilleurs taux de biodisponibilité, pour lesquels il est important de comprendre quelques notions de biopharmacie.

3.10.1 Cinétique de libération du principe actif

La libération du PA de la NE répond à la 1^{ère} loi de Fick, selon l'équation suivante :

$$t_{1/2} = \frac{0,0585 r^2 K_{H/E}}{D}$$

Où :

$t_{1/2}$ est le temps requis pour la libération de la moitié de la dose active en dehors des gouttelettes ;

r est le diamètre des gouttelettes ;

$K_{H/E}$ est le coefficient de partage huile/eau ;

D le coefficient de diffusion propre à la molécule active.

La diffusion de la molécule en dehors de la phase dispersée dépend essentiellement de la nature de l'huile et son aptitude à être digérée. Comparée aux émulsions conventionnelles, les NEs de type H/E présentent une augmentation de la phase interfaciale huileuse, suite à la réduction de la taille des gouttelettes à l'échelle nanométrique, ce qui favorise une meilleure digestion de cette dernière lorsqu'elle est administrée par voie per os (Singh 2017).

Par ailleurs, des moyens qui permettent de ralentir ou de contrôler la libération de l'ingrédient actif existent. En effet, ceci est possible à travers un organogel qui jouera le rôle d'un frein (Yu 2012), mais aussi la formulation de NEs revêtues de couches rigides de polymères à l'image des nanocapsules (Asthana 2013), ou encore une bonne couche de surfactants transformant ainsi les gouttelettes dispersées en nanoréservoirs contrôlant la libération du PA (Singh 2017).

3.10.2 Devenir in vivo des nanoémulsions

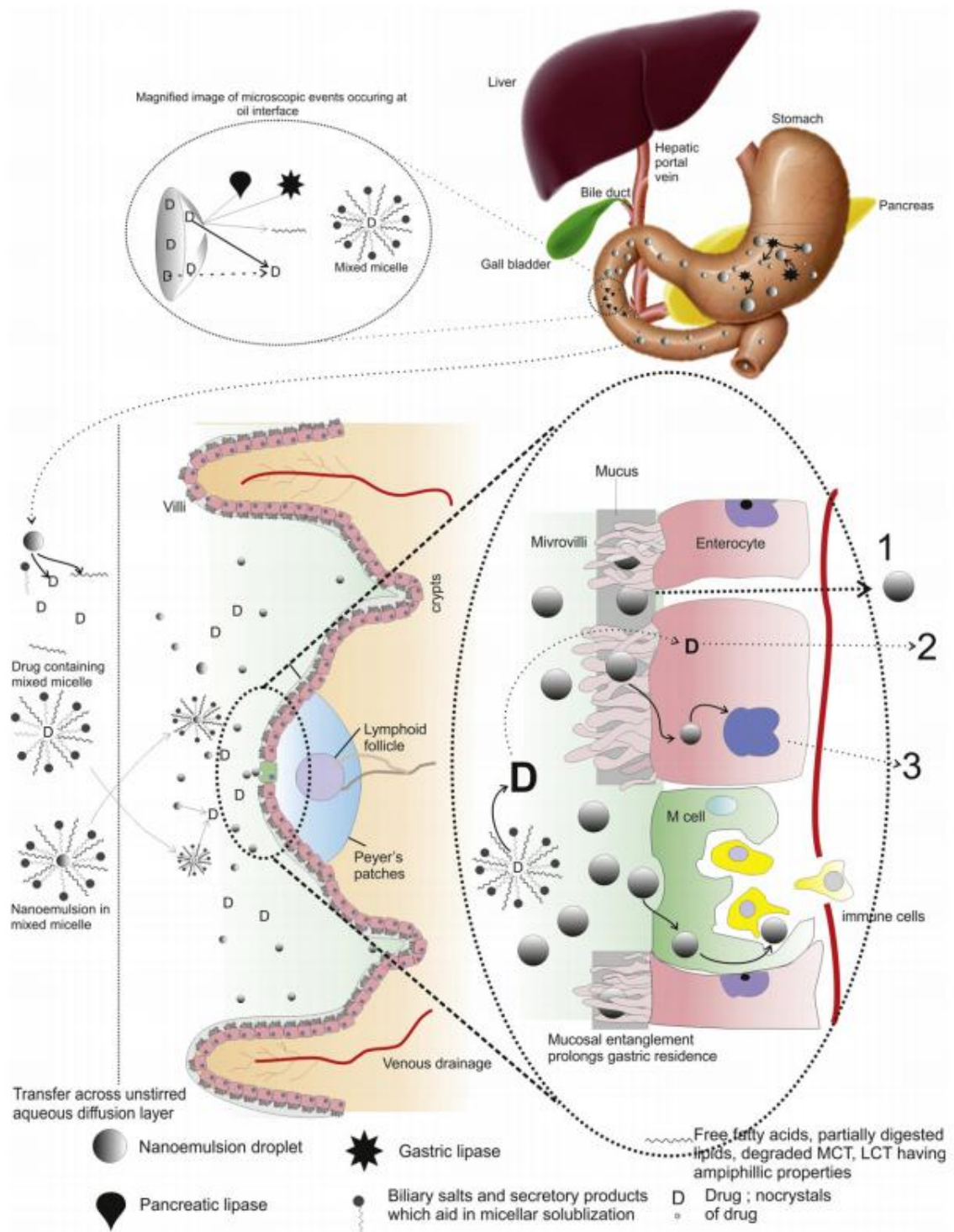


Figure 22. Représentation schématique des différentes étapes de l'absorption des NEs orales depuis leur ingestion jusqu'à leur passage à travers la barrière gastro-intestinale (Singh 2017).

D'après la figure 22, aussitôt après ingestion des NEs, il y'a activation partielle des mécanismes de sécrétion des lipases gastriques et pancréatiques (Persson 2006), ainsi que les sels biliaires , qui ont pour rôle de digérer les huiles composant généralement la phase dispersée en petites fractions, libérant le PA. Celui-ci subira par la suite une précipitation ou sera repris dans des micelles mixtes composées des restes des lipides digérées et des sels biliaires. Dans les deux cas la solubilité est nettement améliorée.

(1) la molécule active libre peut être rapidement absorbée et son devenir in vivo dépendra de ses propriétés biopharmaceutiques. Eventuellement, les nanogouttelettes partiellement digérées par les lipases peuvent à leur tour être solubilisées dans les micelles ; (2) le passage à travers la membrane GI peut se faire de différentes façons (transcellulaire, paracellulaire, jonction intercellulaire, etc.), grâce à la flexibilité des gouttelettes et leur aptitude à se déformer et épouser la forme qui leur ai imposée (Porter 2007); (3) une fois internalisée, la NE sera transformée en apolipoprotéines et canalisée par le lymph, ou encore se déversera dans la circulation sanguine via la veine hépatique (Singh 2017).

Outre la stérilité exigible pour les formes intraveineuses, la composition qualitative des NEs doit être validée en termes de sécurité. En effet, les excipients entrant dans la composition doivent être biocompatibles et ne doivent pas altérer la membrane des érythrocytes, comme c'est le cas des surfactants cationiques (Li 2011b; Baccarin 2015).

Après administration intraveineuse (figure 23.A), les NEs empreintent plusieurs voies d'absorption et de distribution : (1) elles peuvent libérer directement le PA dans la circulation sanguine qui sera rapidement mis à disposition au niveau du site d'action; (2) après internalisation cellulaire, elles vont interagir avec les protéines plasmatiques ou (3,4) il se produit une opsonisation des NEs considérées comme corps étrangers (Aggarwal 2009) et seront phagocytées avec résidence hépatosplénique de la charge active (Desai 2012; Hak 2015). (5) Les NEs peuvent échapper aux opsonines et atterrir au niveau des organes non cibles. Il y'aura une accumulation non spécifique des NEs. Ces dernières peuvent alors se déverser dans le fluide intestinal afin de se loger au niveau de son ciment cellulaire (Kuhn 2014). Les NEs seront ensuite digérées après phagocytose, endocytose, etc. (6) Pour une distribution plus spécifique, les NEs sont décorées de macromolécules à l'exemple du cholestérol, afin d'en acquérir un biomimétisme qui lui permettra de fusionner avec des membranes cellulaires cibles par le biais des récepteurs low-density-lipoprotéine (LDL) (Maranhao 1997). C'est l'exemple

des anticancéreux comme l'étoposide, le paclitaxel et la carmustine (Maranhao 2002; Rodrigues 2005).

Les NEs à usage topique (figure 23.B), traversent les barrières cutanées par voie transfolliculaire ou transépidermique pour atteindre la circulation générale.

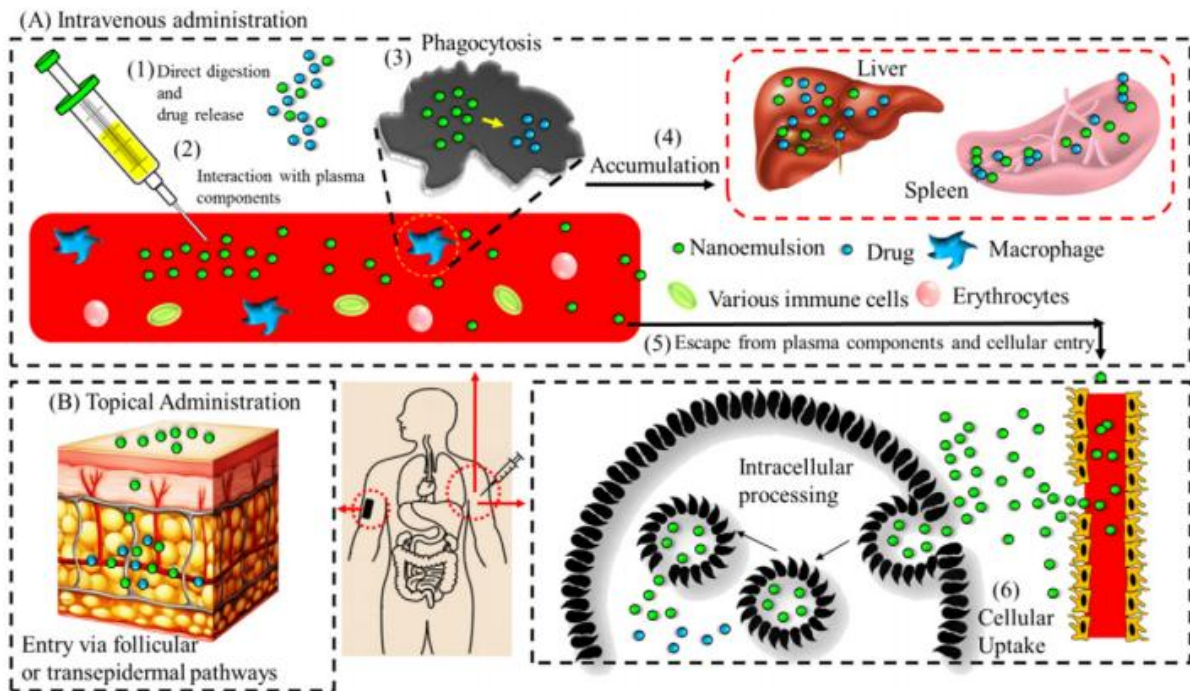


Figure 23. Devenir *in vivo* des nanoémulsions intraveineuses (A) et transdermiques (B) (Singh 2017).

4 Rappels biopharmaceutiques et Biopharmaceutical Classification System (BCS)

La formulation a pour objectif de développer un médicament qui devrait assurer la délivrance de la dose exacte, à la vitesse de disponibilité optimale, au site d'action et au temps désirés. En d'autre terme, la formulation doit garantir les meilleures conditions *biopharmaceutiques* et de *biodisponibilité* pour assurer l'activité, l'innocuité et stabilité de la forme et du principe actif. Un médicament serait donc défini, non seulement par la nature et la quantité de la substance active qu'il renferme, mais aussi par la disponibilité biologique de cette substance.

4.1 Devenir in vivo des médicaments et système L.A.D.M.E

Entre le moment de l'administration du principe actif et celui de l'obtention de l'effet, le principe actif doit franchir plusieurs étapes (constituant le système *L.A.D.M.E* dans le cas de l'administration à jeun par voie orale d'un comprimé classique), qui peuvent être divisées en *trois phases*:

- Phase biopharmaceutique.
- Phase pharmacocinétique.
- Phase pharmacodynamique.

La première phase, appelée phase biopharmaceutique, comporte les étapes de la mise à disposition de l'organisme des principes actifs (délitement et dissolution). C'est l'objet des études dites de la biopharmacie, qui est définie comme étant l'étude de l'influence de la formulation sur les performances biologiques de la substance médicamenteuse. En effet, l'apport de la pharmacie galénique dans la mise à disposition du médicament est incontestablement primordial dans le développement d'un médicament efficace, stable et sûr.

La biopharmacie considère aussi l'impact des diverses technologies et méthodes de fabrication sur les performances de la forme galénique. En outre, elle permet le développement rationnel d'une forme pharmaceutique support d'administration du principe actif, selon une cinétique adéquate pour optimiser l'effet thérapeutique et minimiser tout effet indésirable.

Les études de biopharmacie peuvent être conduites par des méthodes *in vitro* ou *in vivo*. Les études *in vitro* sont intéressantes pour comprendre et établir les propriétés physicochimiques du principe actif et de la forme, mais aussi évaluer la qualité du procédé de fabrication. Par la suite, la substance médicamenteuse doit être étudiée *in vivo*, pour évaluer son efficacité.

4.2 Biopharmaceutical Classification System (B.C.S)

La biodisponibilité d'un médicament par voie orale dépend de sa solubilité et de sa perméabilité à travers les membranes. Sur la base de ces facteurs, Amidon et al. ont développé et introduit en 1995 le concept de BCS, la substance est alors classée selon sa solubilité et sa perméabilité.

Le concept de « Biopharmaceutical Classification System » constitue un outil d'orientation et de développement pharmaceutique. Il permet de classer les substances actives en fonction de

leur solubilité aqueuse et de leur perméabilité intestinale (Amidon 1995; Dokoumetzidis 2006). Ces deux caractéristiques contrôlent à la fois la vitesse et la quantité de la molécule absorbée.

Une fois combinée aux caractéristiques de dissolution in vitro de la forme pharmaceutique, la B.C.S. prendra en compte les trois facteurs majeurs (solubilité, perméabilité intestinale et taux de dissolution), qui gouvernent la vitesse et l'importance de l'absorption des principes actifs présentés dans une forme orale sèche. Le tableau ci-dessous présente les quatre (04) classes B.C.S.

Tableau 14. *Système de classification biopharmaceutique (Amidon 1995; Yu 2002).*

	<i>Grande perméabilité</i>	<i>Faible perméabilité</i>
<i>Grande solubilité</i>	<i>Classe I</i>	<i>Classe III</i>
<i>Faible solubilité</i>	<i>Classe II</i>	<i>Classe IV</i>

L'absorption est un processus complexe qui dépend de la solubilité, de la perméabilité, des facteurs de formulation, facteurs physiologiques, pH, enzymes, motilité intestinale,...etc.

4.3 Stratégies d'amélioration de la biodisponibilité des médicaments

Face à la complexité des molécules et de leurs cibles biologiques, un grand nombre de nouvelles formes d'administration font leur apparition sur le marché du médicament pour délivrer des principes actifs peu solubles, des peptides ou encore des protéines (Orive 2003). En effet, avant d'atteindre la cible thérapeutique, la molécule doit idéalement se dissoudre, échapper au premier passage hépatique et à la dégradation enzymatique, être absorbée par perméation passive et/ou active (par le biais de transporteurs) et échapper au système réticuloendothélial.

L'étude des propriétés physicochimiques de la molécule active (structure moléculaire, solubilité et stabilité des médicaments) permet de cerner les insuffisances à combler par la formulation et d'améliorer leurs propriétés biopharmaceutiques.

4.3.1 Impact des nanoparticules sur le devenir in vivo d'un médicament

L'amélioration de la solubilité à travers un support galénique est une stratégie prometteuse en développement pharmaceutique. En effet la forme galénique peut modifier non

seulement le profil de libération mais aussi le devenir in vivo d'un médicament (absorption, distribution, métabolisme, élimination).

4.3.1.1 Impact sur l'absorption

L'absorption dans le système L.A.D.M.E est l'étape qui correspond au passage de la molécule médicamenteuse de son site d'administration à la circulation sanguine.

Dans la majorité des cas, l'absorption dépend des caractéristiques physicochimiques de la molécule active (solubilité et stabilité). Elle est soit complète ou insatisfaisante. Elle peut être également influencée par le premier passage hépatique ou par les contraintes physiopathologiques.

Toutes modifications de la formulation peuvent entraîner des conséquences non négligeables sur le devenir in vivo du médicament. Les nanoémulsions ont permis d'améliorer la biodisponibilité du médicament grâce à une réduction significative de la taille des particules, produisant un rapport surface-volume significativement élevé.

Les dispersions solides, les cyclodextrines ou encore les mini(tabs) sont les récentes avancées en matière d'améliorations de la solubilité des molécules et de libération contrôlée.

4.3.1.2 Impact sur la distribution

Le transport du médicament au niveau sanguin (phase plasmatique) puis sa diffusion dans les tissus (phase tissulaire) est significativement écourté grâce aux formes nanoparticulaires. En effet, ces dernières permettent de réduire considérablement le volume de distribution et les effets secondaires rencontrés dans le cas des formes conventionnelles. En outre, elles garantissent une thérapie ciblée et une spécificité d'action (Jordanovska 2015).

Par ailleurs, les nanomicelles appliquées aux molécules lipophiles à usage ophtalmiques permettent d'éviter la sensation collante et la vision trouble, généralement associées à l'utilisation de pommades (Shegokar 2020)

4.3.1.3 Impact sur le métabolisme

Au cours du métabolisme, la molécule médicamenteuse subit des modifications chimiques afin d'aboutir à un métabolite actif. Durant ce processus, la molécule peut perdre ses propriétés pharmacologiques initiales la rendant peu efficace.

Les nanoparticules (nanoparticules lipidiques, liposomes) permettent à ce stade d'assurer la protection de la molécule, ajouté à cela il n'y aurait plus besoin de compenser la perte de médicament métabolisée (Jordanovska 2015).

4.3.1.4 Impact sur l'élimination

L'étape finale du devenir in vivo du médicament correspond à son excrétion de l'organisme sous forme inchangée ou ses métabolites (Orive 2003).

Les nanoparticules permettent de prolonger la résidence vasculaire du principe actif qui est rapidement éliminé dans le cas des formes conventionnelles (Jordanovska 2015, Mannhold 2002).

5 Encapsulation des molécules faiblement solubles et nanoémulsions

Les molécules faiblement solubles représentent une proportion croissante de nouveaux médicaments en développement. Du point de vue développement pharmaceutique, venir à bout du problème de solubilité d'une molécule peut se suivre d'un échec ou de longues recherches.

Afin de répondre à cette problématique de nombreuses approches sont suggérées pour augmenter la biodisponibilité de ce type de molécules. Parmi les stratégies galéniques possibles, l'utilisation de formulations lipidiques telles les NEs de type H/E est très répandue. Elles permettent de maintenir la molécule active en solution dans le tractus gastro-intestinal et par conséquent améliorer la biodisponibilité.

L'encapsulation est une technique très ancienne qui remonte aux années 30 (Hansali 2012). Les molécules candidates à une encapsulation peuvent soit s'adsorber à la surface, soit diffuser au sein de la matrice ou introduites directement dans les nanoparticules. La libération est alors instantanée ou prolongée (Gbassi 2010).

Les nanoémulsions de type H/E furent introduites dans les années 50, sous forme de solutés nutritifs par voie parentérale; contenant généralement des huiles végétales telle que l'huile de soja ou encore MCTs, à raison de 10 à 20%. Récemment, les chercheurs se sont penchés sur leur potentialité à véhiculer des molécules faiblement solubles dans l'eau pour produire des formulations commercialisables, comme l'etomidate (Etomidat®, Lipuro®), le diazepam

(Diazepam® , Lipuro® et Stesolid®), le propofol (Disoprivan®), et le dexaméthasone palmitate (Lipotalon®).

Comparées aux autres approches de solubilisation testées sur ces mêmes molécules, les NE formulées permettent de réduire considérablement les effets indésirables localement et au niveau systémique. En revanche, une possibilité d'une libération contrôlée est limitée à cause de la taille nanométrique des gouttelettes, qui favoriserait plutôt une libération rapide du PA encapsulé (Bussemer 2003; Gad 2008).

6 Lyophilisation des nanoémulsions

6.1 Principe de la lyophilisation et intérêts

La lyophilisation sous son ancienne appellation « cryodessiccation » est un procédé de déshydratation à basse pression et à basse température qui consiste à débarrasser le produit de la majeure partie de l'eau qu'il contient. Elle fut décrite pour la première fois en 1906 (Bordas and d'Arsonval 1906), puis transposée à l'échelle industrielle (Franck 1998).

Cette technique est très utilisée pour les produits thermosensibles et facilement hydrolysables. Le produit obtenu est un lyophilisat très lyophile et se présente généralement sous forme d'une poudre. En pharmacie, la lyophilisation est une des méthodes qui permettent de stabiliser et de conserver un produit. Elle peut être appliquée aux produits pharmaceutiques à usage humain par voie parentérale, orale ou ophtalmique ou encore aux réactifs à usage diagnostic.

Les formes destinées à être lyophilisées sont essentiellement des solutions aqueuses ou l'eau est le seul solvant à éliminer. Toutefois, ce procédé possède de nombreux avantages pour les principes actifs faiblement solubles ou le solvant à éliminer est généralement un solvant organique ou un mélange d'eau et de cosolvant. La présence d'un cosolvant vise à améliorer la solubilité du PA mais aussi à accélérer la sublimation en diminuant par conséquent le temps de séchage et améliorer les propriétés de reconstitution (Bogdani 2011).

Les avantages qu'elle présente par rapport aux autres techniques de séchage sont nombreux :

- Elle offre une conservation à long terme grâce à l'abaissement de l'activité de l'eau du produit ;
- Elle permet d'obtenir des produits finaux de haute qualité en termes de dissolution et de biodisponibilité ;

- La forme et l'aspect du produit sont bien conservés ;
- Leur qualité aromatique est supérieure à celles des produits séchés ;
- Elle réduit les possibilités d'altération du produit ;
- Capacité du produit lyophilisé à se réhydrater instantanément.

6.2 Diagramme de changement de phase

Le diagramme de changement de phase dénommé également diagramme d'équilibre pression-température est séparé par trois surfaces délimitées par des courbes des couples pression-température, pour lesquels les phases correspondent aux états de la matière (solide, liquide vapeur).

S'appuyant sur le diagramme des phases de l'eau pure (figure 24), la zone de sublimation correspond à la zone des faibles pressions de vapeur et des faibles températures, en deçà du point triple P_1 (610 Pa ; 0,01 °C). Le point triple correspond à la présence simultanée des trois états de la matière en équilibre.

À partir de l'étape de congélation (trajet A) qui se déroule généralement à pression atmosphérique, il sera nécessaire en premier lieu d'abaisser la pression de vapeur au-dessous du point triple (trajet B). Puis, le passage à l'état vapeur sera favorisé par une augmentation de température (trajet C) et/ou par une diminution de la pression.

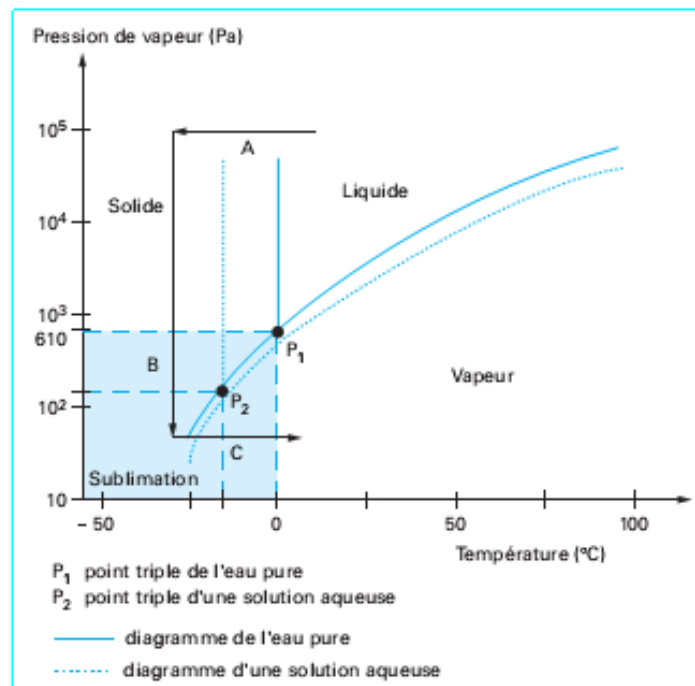


Figure 24. Diagramme d'état de l'eau pure et d'une solution contenant un soluté (Marin 2012).

6.3 Equipement

Le lyophilisateur est composé de deux parties, un réfrigérant ou une chambre de lyophilisation munie d'étagères et un condenseur pour piéger les vapeurs d'eau. L'ensemble est relié à une pompe à vide (figure 25).

Le produit à lyophiliser est introduit sous forme de solution ou préalablement congelé dans des flacons adaptés à la lyophilisation.

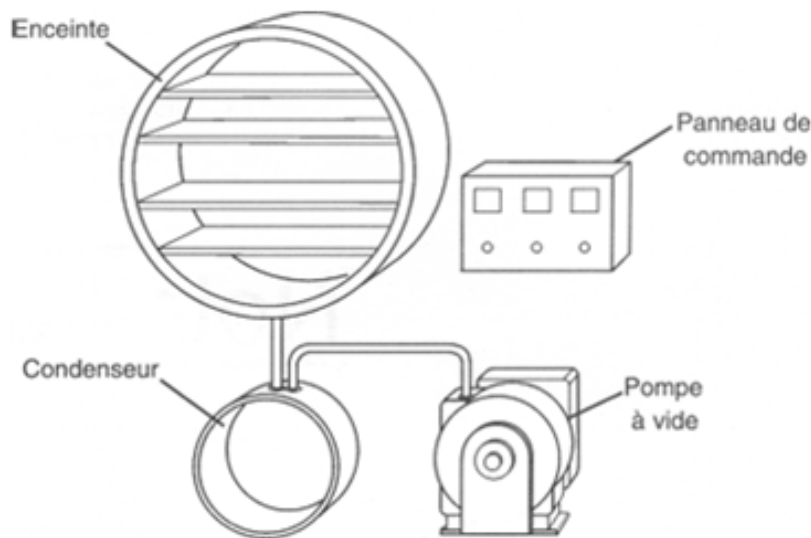


Figure 25. Schéma descriptif d'un lyophilisateur (Cook 2007).

Dans un mélange complexe, seule une partie de l'eau est dite congelable. Cette fraction subira l'étape de sublimation (dessiccation primaire). Les solutés contribuent à abaisser la valeur de la pression du point triple entraînant une réduction de la zone de sublimation.

La fraction d'eau résiduelle non cristallisée va subir une étape de désorption, dite de déshydratation secondaire, qui a lieu, pour l'essentiel, une fois la sublimation terminée à des niveaux de pression et de température plus bas en lyophilisation. Pour favoriser la désorption, la température peut être augmentée au-dessus de celle du point triple (dessiccation secondaire). A la fin de la lyophilisation, on obtient un produit de faible teneur en eau et de porosité importante d'où le fort caractère hygroscopique.

6.4 Etapes de lyophilisation

Le procédé de lyophilisation repose en pratique sur deux opérations chronologiques : la congélation et la déshydratation.

La déshydratation recouvre deux principes physiques : la sublimation de la glace (cristaux formés par congélation) et la désorption finale de la quantité d'eau résiduelle, non congelée, qui peut représenter 10 à 30 % de l'eau initialement présente dans le produit.

Un cycle de lyophilisation comprend habituellement trois étapes principales :

6.4.1 Congélation

La température et le temps de congélation dépendent de la nature du produit, de la quantité à congeler, du contenant et de la qualité finale du produit. Il est important d'obtenir une solidification uniforme de la matière à lyophiliser.

Le refroidissement doit être le plus long possible pour favoriser la formation de nucléis et éviter le grossissement des cristaux de glace néfaste pour la stabilité du PA et des propriétés technologiques du produit fini.

Par contre, la congélation proprement dite, doit être brusque (qui ne veut pas dire rapide) pour conserver l'état de la glace et échapper à un phénomène de transition vitreuse et donc conférer de meilleures propriétés à la poudre résultante en termes de porosité et de mémoire de forme.

6.4.2 Dessiccation primaire

Cette étape doit suivre immédiatement la congélation. Dans le cas où l'étape de congélation est faite en dehors du lyophilisateur, la dessiccation primaire doit se dérouler sans décongeler le produit à basse température et à basse pression.

La sublimation de la glace commence de la surface du produit préalablement congelé vers l'intérieur, la vapeur d'eau est éliminée par diffusion d'autant plus facilement que la congélation est faite en respectant les conditions citées plus haut, grâce aux grands cristaux formés à partir des nucléis qui facilitent sa diffusion et par conséquent le temps de la dessiccation primaire est réduit (Ingvarsson 2011).

6.4.3 Dessiccation secondaire

Cette étape est destinée à éliminer les dernières traces de vapeur d'eau retenues par absorption et une partie de l'eau liée au produit (Wang, W. 2000). L'objectif final est d'obtenir la plus faible humidité résiduelle possible. Au cours de cette phase, la température ne doit ni déstructurer ni dénaturer le produit.

La teneur en humidité résiduelle est un attribut qualité critique des produits finis lyophilisés. Selon les directives Q6A de la Conférence Internationale d'Harmonisation (ICH thème Q6A, 2016), la teneur en eau d'un produit fini doit faire l'objet d'une procédure de test et d'une spécification, le cas échéant, sans donner une norme ou une limite, l'impact de l'humidité pouvant être différent d'une formulation à une autre. A titre d'exemple : Doxycycline injectable (HR < 2%), Pénicilline injectable (HR < 1,5%) (USP 2019).

Durant les décennies passées, il a été admis par les experts et inspecteurs en industrie pharmaceutique une limite arbitraire de 1% sans référentiel quelconque (21 CFR 610.13, 1989).

Par ailleurs, d'autres propriétés seront recherchées dans le lyophilisat dont la réhydrabilité instantanée qui correspond au temps de reconstitution du produit.

6.5 Lyophilisation des systèmes dispersés

L'un des inconvénients des systèmes dispersés aqueux est le risque accru de contamination microbienne. Pour pallier à cela, la lyophilisation est le procédé qui permet de garantir la stabilité et de conserver le produit fini

La lyophilisation des systèmes dispersés aqueux (suspensions, émulsions) doit être conduite en tenant compte du produit et des paramètres opératoires. Ainsi, pour chaque produit est développé un cycle de lyophilisation qui lui est propre.

Le souci dans la lyophilisation des systèmes dispersés en général et émulsions en particulier est d'obtenir un produit de qualité. Hormis un taux d'humidité résiduelle optimale et une bonne réhydratabilité, les gouttelettes peuvent s'agglutiner. A titre d'exemple, l'étude comparative de deux modes de séchage faite sur une nanoémulsion à base d'eugénol diluée, indique qu'avec une lyophilisation, les nanogouttelettes s'agglutinent et sont hétérogènes (Hu 2016). Ce même constat fut observé pour une nanoémulsion encapsulant la vitamine E, alors que l'efficacité d'encapsulation fut de 86,1% (Parthasarathi 2016).

Afin de maintenir constantes les caractéristiques initiales du produit lors de l'étape de congélation et de séchage, l'addition d'un agent cryoprotecteur est primordial (Abdelwahed 2006). En effet, durant l'étape de congélation l'eau se déplace au sein du système dispersé pour former des cristaux et les gouttelettes commencent à s'agglutiner de manière irréversible. Toutefois, si la congélation est lente, l'agent cryoprotecteur peut migrer vers ces gouttelettes et

empêcher leur agrégation. Lorsque la congélation est rapide, ce phénomène est inévitable (Lee 2009).

En outre, l'efficacité d'encapsulation des systèmes dispersés encapsulant des molécules lipophiles après lyophilisation est presque inchangée car elles sont faiblement solubles dans l'eau (Chen 2010).

6.6 Lyophilisation des nanoémulsions

Comparées aux émulsions conventionnelles, les nanoémulsions au même titre que les microémulsions possèdent une bonne stabilité (Tadros 2004). Cependant la lyophilisation des nanoémulsions n'a pas été suffisamment étudiée.

Dans la littérature, on rapporte son usage en tant que méthode de séchage et de conservation, mais aussi dans la production des systèmes auto-nanoémulsifiants (SNeDDS). Durant la lyophilisation de ces derniers, aucun changement en termes de potentiel zêta et d'indice de polydispersité n'a été observé, seule une légère augmentation de la taille des particules est enregistrée, mais qui reste acceptable (<200 nm) (Gupta 2011). Dans une autre étude, on a démontré que le temps de reconstitution ou la propriété de réhydrabilité des nanoémulsions dépend en majeure partie de la nature de l'agent cryoprotecteur. C'est l'exemple du tréhalose qui facilite la redispersion comparé au mannitol (Li 2008). L'usage des nanoémulsions comme adjuvant en biotechnologie est également courant dans la formulation des vaccins. Les lyophilisats sont jugés très stables après les résultats concluants des études de stress thermiques (Orr 2014).

7 Généralités sur la méthodologie des plans d'expériences (MPE)

7.1 Définitions

La méthodologie des plans d'expériences vient de la terminologie anglosaxonne « Design of Experiments » ou « experimental designs ». Elle fut initiée en 1925 par Sir R. A. Fisher, statisticien Anglais et appliquée pour la première fois en agronomie. Elle a été introduite en milieu industriel au Japon par Taguchi, dans les années soixante. La MPE fut ensuite utilisée aux états unis dans les années 80 et dix années plus tard en Europe (Lepadatu 2006).

La MPE permet d'étudier l'influence de plusieurs variables avec un nombre limité d'expériences. L'analyse statistique des résultats permettra de déterminer quelle(s) variable(s) a une influence significative pour finir par corrélérer la réponse souhaitée (ex. taille des particules) avec les variables sous forme d'équation polynomiale (Gutiérrez 2008).

Les données d'entrée sont des variables contrôlables appelées « facteurs » et les données de sorties sont des « réponses » que l'on cherche à optimiser.

Les plans d'expériences ont pour objectifs de (Lepadatu 2006):

- diminuer le nombre d'essais ou de calculs,
- connaître les effets des paramètres,
- déduire les paramètres influents,
- évaluer les interactions entre paramètres,
- avoir une meilleure précision sur les résultats,
- établir une modélisation mathématique de la réponse.

7.2 Etapes

L'application de la MPE dans le développement pharmaceutique vise à étudier, évaluer et prévoir l'influence de certains paramètres sur les attributs qualité d'un produit. Elle a pour principal objectif la recherche des valeurs optimales des données d'entrée (facteurs) qui permettent une meilleure maîtrise des données de sorties (réponses) (Lepadatu 2006).

Pratiquement, les expériences sont réelles et répondent à une planification, généralement par le biais de logiciel qui étudie la réponse de chacune d'entre elles. Les variations des réponses seront étudiées, en fonction de chaque paramètre considéré comme influent. La relation est illustrée par des représentations graphiques fournies par le logiciel.

Les principales composantes de la MPE sont (Lepadatu 2006):

- Le *screening* ou la *technique de criblage* qui a pour but de déceler les facteurs supposés influents, de minimiser leur nombre pour ne retenir que ceux qui ont un fort impact sur une formulation ou un procédé. Elle passe par un recensement des facteurs qui ont une influence statistiquement non négligeable sur la variation de la réponse. Il s'agit de l'analyse de la variance qui permet de détecter mais surtout de hiérarchiser les impacts des paramètres d'un modèle (Benoist 1995). Cette étape répond à une question cruciale : *Pourquoi la réponse varie et surtout en fonction de quels facteurs ?*

- La *méthodologie de surfaces de réponses* (MSR) est appliquée dans le cadre d'un processus d'optimisation et vise à améliorer une caractéristique d'un produit, un comportement d'un système ou d'un procédé, dans un domaine expérimental bien défini influencé par une ou plusieurs variables (Lepadatu 2006). Cette étape constitue une analyse plus fine que la précédente.

8 Outils

L'outil d'optimisation Modde[®]6 est un logiciel conçu pour venir en aide à l'utilisateur. Il sert de structure d'accueil de données d'entrée afin d'optimiser des procédés industriels ou de mise en forme en fonction des objectifs proposés. Il permet l'application de la méthodologie par plans d'expériences et assure l'analyse statistique des données. Il assure la configuration de la matrice des expériences à réaliser et l'élaboration de tous les calculs et enfin l'exploitation des résultats obtenus par l'analyse des données de simulation et les différentes représentations graphiques de ces dernières.

9 Applications de la méthodologie de surface de réponses dans le développement de nanoémulsions encapsulant des molécules faiblement solubles dans l'eau

Dans la ligne directrice ICHQ8 (R2) (ICH Q8 (R2) Pharmaceutical development November 2009) de la Conférence Internationale pour l'Harmonisation des exigences techniques et pour l'enregistrement des médicaments à usage humain (ICH), on met en avant une nouvelle conception par les plans d'expériences. En effet, la deuxième partie du document détaille les éléments et les outils nécessaires pour définir un domaine expérimental dans lequel nulle variation des paramètres de formulation ou de procédé n'a de répercussion significative sur la qualité désirée du produit fini.

La MPE est un outil statistique puissant. Son utilisation en vue d'une étude d'optimisation de la préparation d'une NE n'a pas été largement reprise dans la littérature. Seuls quelques travaux relatent et font usage des plans d'expériences pour aboutir à une réponse optimale à des variables généralement opératoires tout en tenant compte des variables de composition (Gutiérrez 2008). D'autres en font usage pour optimiser la formule, en étudiant des variables

qualitatives et indépendantes (type de l'huile, type du surfactif, ajout d'un additif, etc.) (Taha 2004; Kelmann 2007; Zidam 2007). Ou encore étudier l'impact d'un process tel que l'ultrasonication sur les qualités d'une NE (Shah 2007). Nous pouvons citer aussi, l'étude conduite sur des variables de formulation et opératoires en même temps (Pey 2006).

Dans notre étude, le choix pour la MPE est motivé par la réduction du nombre d'essais qui pourra raccourcir les délais de conception et donc minimiser les coûts du développement et de production. Par ailleurs, cette approche de modélisation par les plans d'expériences est de plus en plus utilisée dans divers domaines d'application, pour simuler et établir une relation de causalité entre variables considérées et réponses mesurées.

Nous proposons d'instaurer tout au long de notre travail l'implémentation de la méthodologie par les plans d'expériences afin d'aboutir à une nanoémulsion stable permettant d'encapsuler des molécules hydrophobes. L'application sera conduite en plusieurs étapes de développement : essais préliminaires et préparation proprement dite de la nanoémulsion. Mais au préalable, des essais d'orientation sont menés, représentés par un ensemble d'expériences (formulations et procédés), permettant de déceler le mélange apte à répondre à nos objectifs.

Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons mis l'accent sur les nombreux avantages qu'offrent les nanoémulsions, leurs différents schémas de fabrication ainsi qu'une analyse approfondie de leur composition qualitative et quantitative à travers une revue bibliographique. Du point de vue pharmacologique, ces NEs peuvent remplir les exigences requises pour un système de délivrance efficace de molécules actives, en particulier pour celles qui sont faiblement solubles dans l'eau.

Les méthodes de préparation dites hautement énergétiques ont vite été remplacées par des méthodes moins énergivores, tout en recherchant une composition qui puisse réunir les critères d'une production facilement transposable, de stabilité et d'efficacité thérapeutique.

En effet, un vaste choix d'excipients permet de répondre à ces exigences et peut également écarter l'inconvénient d'une non biodégradabilité ou d'une éventuelle toxicité.

Par ailleurs, la réussite de la lyophilisation d'une nanoémulsion passe par le choix d'un bon agent cryoprotecteur, mais aussi par une maîtrise des paramètres opératoires. On évitera alors une agrégation des nanogouttelettes pendant la congélation, et on facilitera ensuite la dessiccation primaire et secondaire.

Dans ce contexte, nous avons essayé d'exploiter dans nos travaux les possibilités offertes par les récentes techniques, en utilisant du matériel peu coûteux et disponible, en appliquant la technique d'émulsification spontanée dont l'objectif final est d'arriver à une NE stable pouvant encapsuler des molécules hydrophobes. Sur la molécule modèle sélectionnée on va évaluer l'efficacité thérapeutique à travers des essais *in vivo*.

Préalablement à cette étape, la NE de type H/E sera optimisée en utilisant la méthodologie de surface de réponses, à travers la variation et la compréhension de l'impact des paramètres de formulation et les paramètres opératoires, respectivement. A la fin des contrôles des propriétés physicochimiques, nous sélectionnerons la formule optimale et le procédé adéquat qui serviront ultérieurement à la poursuite des travaux.

**PARTIE
EXPERIMENTALE**

CHAPITRE I :
Approche
d'optimisation de la
formulation de la
nanoémulsion

Introduction

Les molécules hydrophobes ont longtemps intéressé les chercheurs, car de par leur faible solubilité, s'en suivent les difficultés en matière de biodisponibilité. Leur mise en forme galénique fut l'issue de secours, en ce qui concerne l'amélioration de l'absorption de la molécule active. Parmi ces formes, les NEs ont montré leur efficacité par rapport aux formes conventionnelles. Le nombre croissant de publications scientifiques démontre l'intérêt des NEs pour la recherche fondamentale et appliquée.

Notre travail s'inscrit dans l'optique d'encapsuler ces molécules faiblement solubles dans des NEs et d'en faire des vecteurs stables, améliorant la solubilité de ces dernières une fois administrées. Elles sont produites par un procédé d'émulsification spontanée légèrement modifié et concerne la synthèse de NE de type H/E, dont les nanoparticules sont stabilisées par un film interfaciale anionique en l'occurrence le SDS (Sodium Dodécyl Sulfate) couplé au Tween[®]80 (tensioactif non ionique), lequel a prouvé son efficacité dans l'obtention de NEs stables. Le mécanisme de diffusion des gouttelettes huileuses, lors de leur dispersion, se fait grâce à une agitation mécanique suivie d'une nanoémulsification. Cette dernière est favorisée par la diffusion de l'éthanol qui s'évaporerait pour ne laisser que les gouttelettes nanométriques dans une base stabilisatrice, en l'occurrence une solution dispersante de PVA (alcool polyvinylique).

Les NEs produites à différents stades du développement (formulation et process), subiront une caractérisation physicochimique. Pour cela, différentes techniques telles que DLS (Dynamic Light Scattering) par le biais du Zetasizer Nano ZS[®], qui permet de mesurer le diamètre moyen des particules (Z-average), l'indice de polydispersité (PdI) et le potentiel zêta. Ou encore, la microscopie électronique à transmission MET qui permet d'identifier les nanogouttelettes et d'apprécier leur distribution. Seules les NEs qui répondront aux critères préétablis, surtout en matière de taille de particule, de potentiel zêta et de stabilité physique seront retenues.

Pour ce faire et afin de limiter au minimum le nombre d'expériences, la méthodologie des plans d'expériences (MPE) offre au formulateur un puissant outil de développement, en délimitant la zone d'étude en matière de composition quantitative dans une première étape pour en sélectionner une formule optimale. Dans une seconde étape, on étudie l'impact des paramètres opératoires sur les attributs qualité de cette NE. L'objectif final étant d'optimiser le process. Il

s'en suivra alors, l'encapsulation de molécules faiblement solubles comme modèles dans ce travail.

1 Essais d'orientation pour la production d'une nanoémulsion stable

Les essais d'orientation englobent une série d'expériences qui sont conduites dans le but de mettre au point la formule et le procédé qui lui est adapté. Pour ce faire, il faut d'abord se fixer des objectifs précis en termes d'efficacité, de stabilité et de sécurité. Dans notre cas, l'objectif principal étant d'aboutir à une nanoémulsion stable et transparente, qui sera ensuite proposée comme véhicule médicamenteux à une molécule faiblement soluble dans l'eau et par conséquent prétendre à l'amélioration de ses performances biopharmaceutiques.

Dans la composition de notre formule, le choix s'est porté sur l'usage du PVA en tant que matrice polymérique, cryoprotectrice et stabilisatrice du milieu. Il joue également le rôle de co-surfactif. En effet, ce dernier est couplé au SDS, qui est un tensioactif anionique, déjà utilisé dans la formulation de nanoémulsions et connu également pour ses propriétés stabilisatrices. Autour de cette composition de base, se fera le développement de la formule de référence qui servira à l'encapsulation des molécules modèles.

La réalisation pratique de cette nanodispersion a cependant fait apparaître des difficultés qui nous ont amenés à modifier quelque peu la composition qualitative puis quantitative. Ces difficultés ont été notamment dues à l'usage de l'O-xylène comme phase dispersée et aux fortes proportions de PVA et de SDS mises en jeu.

En effet, nous débuterons les essais d'orientations par une formule dont la phase organique est essentiellement composée de l'O-xylène, connu pour son aptitude à produire avec succès des nanoparticules par l'approche de lyophilisation d'une émulsion (Grant 2011). Dès lors, le procédé reposera essentiellement sur l'élimination du solvant par évaporation lors de la lyophilisation. Au départ, le rapport phase organique/phase aqueuse fut de 80/20 pour un volume total de 50 ml de préparation. La préparation est conduite dans des conditions strictes de sécurité. En effet, le port de masque, lunette de protection et le travail sous hotte sont obligatoires.

L'O-xylène est un solvant non miscible à l'eau. Il est extrêmement nocif pour le manipulateur et ne peut permettre d'assurer un développement pharmaceutique à long terme. Souvent dans

le développement des nanoémulsions, on préconise l'usage de solvant organique moins nocifs mais surtout miscible dans l'eau.

Dans un second volet, cette phase organique fut modifiée au profit d'un mélange huile/solvant. Ce couple est souvent additionné de surfactant. Le Tween[®]80 fut sélectionné pour notre travail, car il est très largement utilisé comme tensioactif comparé aux autres tensioactifs non ioniques. Il facilite grandement la nanoémulsification d'une part et conditionne la transparence de cette dernière d'autre part.

L'huile de soja et l'huile de coco furent également exploitées dans cette démarche. Le choix de l'huile est vite fait. L'huile de coco est retenue pour la suite des travaux. La température doit absolument avoisiner 25°C ou plus sans atteindre la TIP.

Sur le plan quantitatif, la composition est élaborée. Des formules sont conduites avec des rapports variables H/E, H/S, T80/PVA, SOR avec des concentrations différentes en PVA et SDS. Ainsi, nous avons pu délimiter la zone de nanoémulsification pour les expériences à venir. Les formules proposées sont soumises à des procédés d'émulsification différents. Le but étant d'aboutir au procédé qui nous permette avec chaque formule d'obtenir les caractéristiques de la NE, à savoir une émulsion stable physiquement, fluide et transparente.

Dans toutes les formules, la phase organique doit subir un prémix en une seule fois ou en deux fois, qui lui permettra d'atteindre l'équilibre avant de l'introduire ou la mélanger à la phase aqueuse.

Il s'en suivra la sélection de formules potentielles avec le meilleur procédé, sur la base de critères de sélection (transparence et bon potentiel zêta). A la fin, on devra délimiter un domaine expérimental avec des valeurs minimales et maximales pour chaque variable, opératoire ou relative à la formulation.

Nos essais d'orientation correspondent à une certaine logique décisionnelle, en modifiant soit la composition qualitative et ou quantitative ou les deux en même temps.

Dans ce qui suit, ces essais sont présentés en plusieurs étapes. Le passage d'une étape à une autre se fait suite à la discussion des résultats obtenus à chaque niveau :

1.1 Etape 1

Deux formules sont conduites selon les conditions présentées dans le tableau I.1.

Tableau I. 1. Composition qualitative des formules 1 et 2 à base d'O-xylène.

	<i>PVA</i>	<i>SDS</i>	<i>Solvant</i>	<i>Phase organique /phase aqueuse*</i>
<i>Formule 1</i>	5%	10%	O-xylène	80/20
<i>Formule 2</i>	5%	10%	O-xylène	20/80

*Phase aqueuse : eau. Qsp 100%.

Matériels et méthodes :

- Description du procédé de la formule 1 (procédé a) : il y'a introduction progressive du solvant sous agitation mécanique d'environ 600 trs/min pendant 20 minutes. Cette étape est suivie d'une homogénéisation à l'Ultra-Turrax® dans un bain glacé pendant 5 minutes.
- Description du procédé de la formule 2 (procédé b) : il y'a introduction progressive du solvant sous agitation mécanique d'environ 600 trs/min pendant 20 minutes. Le bécher est introduit dans un bain à ultrasons glacé pendant 5 minutes.

Résultats et discussions :

Les contrôles sont effectués après 24 heures de repos. Les émulsions obtenues sont blanchâtres et physiquement stables, les gouttelettes sont visibles au microscope optique et au grossissement x10. Il s'agit bien de macroémulsions. L'émulsion 1 est plus consistante que l'émulsion 2, ceci est dû au rapport des deux phases organique et aqueuse.

Ces formules ne seront pas retenues pour la suite des travaux, à cause des difficultés rencontrées lors de la réalisation de ces expériences et des résultats obtenus qui ne s'accordent pas avec l'objectif principal, celui d'obtenir des NEs transparentes avec une méthode d'émulsification de basse énergie. En revanche, on retiendra le ratio H/E : 20/80 pour l'étape suivante (plus faible est la proportion d'huile, meilleure sera la fluidité de la NE).

1.2 Etape 2

La phase huileuse est composée d'huile de soja et de Tween®80. La composition qualitative et quantitative de la formule 3 est la suivante :

- Huile de soja ;
- Eau distillée pH = 7,27 ;
- Tween[®] 80 ;
- H/E : 20/80 ;
- SOR : 1 ;
- PVA : 5%.

Matériels et méthodes :

La méthode d'inversion de phase utilisée est inspirée de la méthode de Mayer et al. (Mayer 2013). Le procédé est légèrement modifié (procédé c) : le surfactif et l'huile sont mélangés à 500 trs/min pendant 30 minutes. L'ajout de la phase aqueuse se fait gouttes à gouttes, à raison de 2 gouttes/seconde (20 gouttes pour 10 secondes). L'homogénéisation est faite à l'ultra-Turrax[®] (24 000 trs/min - 5 minutes).

Résultats et discussions :

Après 24 heures de repos, l'émulsion présente le phénomène de crémage. Elle est instable. Elle ne sera donc pas retenue.

1.3 Etape 3

La formule 3 sera reconduite avec modification du rapport H/E. La composition de la formule 4 est la suivante :

- Huile de soja ;
- Eau distillée pH = 7,27 ;
- Tween[®]80 ;
- H/E : 10/90 ;
- SOR : 1 ;
- PVA : 5%.

Matériels et méthodes :

L'émulsion est préparée selon le procédé c.

Résultats et discussions :

Au microscope optique, les gouttelettes sont visibles au GX100. Elles ont une taille moyenne de 10µm environ. En ce qui concerne l'aspect, l'émulsion obtenue est fluide de haut en bas. Après repos de 24 heures, il y'a apparition d'une couche de crémage moins importante et une autre couche trouble.

1.4 Etape 4

Dans la formule 5 et 6 nous rajoutons le SDS à 10%, le rapport H/E est variable de 20/80 à 10/90 pour les formules suscitées, respectivement. Le reste de la composition est maintenue identique à la formule 4.

Matériels et méthodes :

L'émulsion est préparée selon le procédé c.

Résultats et discussions :

- *Formule 5* : L'observation au microscope optique montre des gouttelettes visibles au GX100 de 30µm environ. L'émulsion obtenue est fluide de haut en bas. Après repos de 24 heures, il y'a apparition d'une couche de crémage moins importante et une autre couche trouble.

- *Formule 6* : L'observation au microscope optique montre des gouttelettes visibles organisées en amas au Gx40 de 25µm. Après repos de 24 heures, deux couches apparaissent (une couche de crémage et une couche inférieure blanchâtre)

1.5 Etape 5

A ce stade de développement, nous basculons vers une méthode par émulsification spontanée avec ajout de l'éthanol comme solvant à rapport égal avec l'huile (H/S ou $S_{mix} = 1$). Nous avons élaboré différentes formules avec et sans SDS :

Formule 7 : Cette formule répond à la composition qualitative et quantitative suivante :

- Huile de soja ;
- Eau distillée à pH = 7,27 ;
- Tween[®]80 ;
- Ethanol absolu ;

- PVA 5% ;
- H/E: 20/80;
- SOR:1 ;
- $S_{mix}=1$.

Formule 8 : Il s'agit de la même composition de la formule 7 avec ajout de SDS :

- Huile de soja ;
- Eau distillée à pH = 7,27 ;
- Tween[®]80 ;
- Ethanol absolu ;
- PVA 5% ;
- SDS 10% ;
- H/E: 20/80;
- SOR:1 ;
- $S_{mix}=1$.

Formule 9 : Dans cette formule, nous varions le rapport H/E. Il devient 10/90 en absence de SDS :

- Huile de soja ;
- Eau distillée à pH = 7,27 ;
- Tween[®]80 ;
- Ethanol absolu ;
- PVA 5% ;
- H/E: 10/90;
- SOR:1 ;
- $S_{mix}=1$.

Formule 10 : On reconduit la formule 9 en rajoutant le SDS :

- Huile de soja ;
- Eau distillée à pH = 7,27 ;
- Tween[®]80 ;
- Ethanol absolu ;
- PVA 5% ;

- SDS 10% ;
- H/E: 10/90;
- SOR:1 ;
- $S_{mix}=1$.

Matériels et méthodes :

La phase organique est préparée en mélangeant l'huile, l'éthanol et le Tween[®]80, sous agitation magnétique de 300 trs/min, pendant 5 minutes. Cette dernière est ensuite introduite dans la phase aqueuse sous agitation à 800trs/min, pendant 15 minutes (procédé d).

Résultats et discussions :

Les émulsions obtenues sont stables physiquement après 24 heures de repos. Elles sont légèrement troubles, exceptée l'émulsion de la formule 7 qui est trouble à blanchâtre. En effet, la présence du SDS dans la formule 8, rend cette dernière moins trouble. Aussi, le rapport H/E joue un grand rôle, nous pouvons noter que pour les formules 9 et 10, les émulsions obtenues sont moins troubles que ce soit avec ou sans SDS. Les gouttelettes ne sont visibles qu'au grossissement 100 et présentent une taille d'environ 5 μ m.

A l'issue de ces résultats, nous pouvons donc choisir une marge pour le rapport H/E, afin d'atteindre les objectifs escomptés. Cette marge se situe entre 20/80 et 10/90. Aussi, la présence du SDS est justifiée et souhaitable.

1.6 Etape 6

Dans cette étape, nous allons introduire une nouvelle valeur du rapport huile/solvant (H/S ou S_{mix}), en travaillant dans la zone sélectionnée pour le rapport H/E. Cette dernière est fixée à 15/85, une moyenne entre 10/90 et 20/80, pour être sure d'obtenir des émulsions stables et moins troubles. La variable S_{mix} , sera fixée à une valeur égale à 0,25 à la recherche de la transparence caractéristique de la NE.

La *formule 11* est la suivante :

- Huile de soja ;
- Eau distillée à pH = 7,27 ;
- Tween[®]80 ;
- Ethanol absolu ;

- PVA 5% ;
- SDS 10% ;
- H/E: 15/85;
- SOR:1 ;
- $S_{mix}=1/4$.

Cette même formule sera reproduite avec un rapport H/E égal à 30/70 pour donner la *formule 12*.

Matériels et méthodes :

L'émulsion est préparée selon le procédé d.

Résultats et discussions

L'émulsion 11 est fluide et opalescente avec une taille moyenne de 20 μm .

Au-delà de 24 heures, la formule 12 montre clairement une séparation de phase. Elle est donc instable, contrairement à la formule 11 qui est restée stable.

1.7 Etape 7

Nous avons changé l'huile de soja et utilisé l'huile de coco, qui est riche en Methyl Chain Triglycerides (MCTs), lesquels sont connus pour stabiliser les NEs. Nous reprenons ensuite la même composition de la formule 11.

La *formule 13* contient donc :

- Huile de coco ;
- Eau distillée à pH = 7,27 ;
- Tween[®]80 ;
- Ethanol absolu ;
- PVA 5% ;
- SDS 10% ;
- H/E: 15/85;
- SOR:1 ;
- $S_{mix}=1/4$.

Matériels et méthodes :

L'émulsion est préparée selon le procédé d.

Résultats et discussions

Au microscope optique les gouttelettes sont visibles au Gx40 mesurant environ 25 μm . Le contrôle macroscopique de la stabilité physique est effectué après 24 heures de repos à température ambiante. L'aspect de l'émulsion est opalescent.

1.8 Etape 8

A ce stade, nous reprenons la formule 8 dont la transparence a été améliorée avec l'ajout du SDS, mais avec un procédé d'émulsification différent qui est inspiré d'un procédé breveté (Bibette 2008).

La formule 14 contient les éléments suivants:

- Huile de soja ;
- Eau distillée à $\text{pH} = 7,27$;
- Tween[®]80 ;
- Ethanol absolu ;
- PVA 5% ;
- SDS 10% ;
- H/E: 20/80;
- SOR:1 ;
- $S_{\text{mix}}=1$.

Matériels et méthodes :

La phase organique est préparée sous agitation magnétique à 150 trs/min pendant 3 min. Puis, cette dernière est introduite sous agitation mécanique dans la phase aqueuse, à une vitesse de 150 trs/min et sous chauffage à 50°C. Le mélange final subit ensuite une ultrasonication à 4°C pendant 3min (procédé e).

Résultats et discussions :

Au microscope optique, les gouttelettes sont visibles au Gx40 mesurant environ 12 μm . Le contrôle est effectué après 24 heures de repos à température ambiante, l'émulsion est opalescente et ne montre aucune instabilité physique.

Dans ce qui suit, un tableau récapitulatif (tableau de tous les essais effectués avec critères de sélection et critères de rejets (surlignés en gras)).

Tableau I. 2. Tableau récapitulatif des premiers essais d'orientation.

<i>Etapes</i>	<i>Etape 1</i>		<i>Etape 2</i>	<i>Etape 3</i>	<i>Etape 4</i>	
<i>Composition/Critères</i>	<i>Formule 1</i>	<i>Formule 2</i>	<i>Formule 3</i>	<i>Formule 4</i>	<i>Formule 5</i>	<i>Formule 6</i>
<i>Eau</i>	•	•	•	•	•	•
<i>O Xylène</i>	•	•	×	×	×	×
<i>Huile de soja</i>	×	×	•	•	•	•
<i>Huile de coco</i>	×	×	×	×	×	×
<i>Ethanol</i>	×	×	×	×	×	×
<i>Tween 80</i>	×	×	•	•	•	•
<i>SDS 10%</i>	•	•	×	×	•	•
<i>PVA 5%</i>	•	•	•	•	•	•
<i>H/E Ratio</i>	80/20	20/80	20/80	10/90	20/80	10/90
<i>SOR Ratio</i>	NA	NA	1	1	1	1
<i>Smix Ratio</i>	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>Procédé</i>	a	b	c	c	c	c
<i>Aspect</i>	Blanchâtre	Blanchâtre	Trouble +++	Trouble +++	Trouble +++	Trouble +++
<i>Consistance</i>	Consistante	Moins consistante	Fluide	Fluide	Fluide	Fluide
<i>Stabilité après 24 h</i>	Stable	Stable	Crémage +++	Crémage +	Crémage +	Crémage +
<i>Décision</i>	Rejetée	Rejetée	Rejetée	Rejetée	Rejetée	Rejetée

NA : Non applicable

ND : Non défini

• : Composant inclus

x : Composant non inclus

Tableau I. 3. Tableau récapitulatif des premiers essais d'orientation (suite).

<i>Etapas</i>	<i>Etape 5</i>				<i>Etape 6</i>		<i>Etape 7</i>	<i>Etape 8</i>
<i>Composition/Critères</i>	<i>Formule 7</i>	<i>Formule 8</i>	<i>Formule 9</i>	<i>Formule 10</i>	<i>Formule 11</i>	<i>Formule 12</i>	<i>Formule 13</i>	<i>Formule 14</i>
<i>Eau</i>	•	•	•	•	•	•	•	•
<i>O Xylène</i>	×	×	×	×	×	×	×	×
<i>Huile de soja</i>	•	•	•	•	•	•	×	•
<i>Huile de coco</i>	×	×	×	×	×	×	•	×
<i>Ethanol</i>	•	•	•	•	•	•	•	•
<i>Tween 80</i>	•	•	•	•	•	•	•	•
<i>SDS 10%</i>	×	•	×	•	•	•	•	•
<i>PVA 5%</i>	•	•	•	•	•	•	•	•
<i>H/E Ratio</i>	20/80	20/80	10/90	10/90	15/85	30/70	15/85	20/80
<i>SOR Ratio</i>	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>Smix Ratio</i>	1	1	1	1	1/4	1/4	1/4	1
<i>Procédé</i>	d	d	d	d	d	d	d	e
<i>Aspect</i>	Trouble +++	Trouble +	Trouble ++	Trouble +	Opalescente	Opalescente	Opalescente	Opalescente
<i>Consistance</i>	Fluide	Fluide	Fluide	Fluide	Fluide	Fluide	Fluide	Fluide
<i>Stabilité après 24 h</i>	Stable	Stable	Stable	Stable	Stable	Séparation	Stable	Stable
<i>Décision</i>	Rejetée	Retenue	Rejetée	Retenue	Retenue	Rejetée	Retenue	Retenue

NA : Non applicable

ND : Non défini

• : Composant inclus

x : Composant non inclus

En résumé, la température peut influencer favorablement la taille des particules (réduction de la taille des particules), comparé aux autres procédés qui sont exécutés à froid ou à température ambiante. En revanche, l'aspect opalescent est omniprésent dans toutes les formules. On pourrait dès lors incriminer les concentrations élevées du SDS ou du PVA, à savoir 10% et 5%, respectivement. Nous travaillerons alors dans une seconde phase à réduire ces concentrations.

Par ailleurs, l'O-xylène choisi comme solvant organique dès le départ, a été remplacé. Pour des raisons de sécurité, le choix des solvants de classe III est souhaitable en raison de leur faible toxicité mais également pour leur miscibilité partielle ou totale à l'eau (European Pharmacopea 2019). L'éthanol fut le solvant choisi en mélange avec une huile végétale riche en MCTs. Son rapport au solvant H/S (S_{mix}) est ≤ 1 (varie entre 1/4 et 1/1). L'huile de coco fut choisi car facilement disponible, peu coûteuse et soluble dans l'éthanol. Elle a été utilisée comme vecteur dans la formulation de nombreuses NEs (Saberri 2013b; Suciati 2014; Yildirim 2017).

L'usage de polymères en mélange avec le solvant organique est courant. Dans notre travail, nous avons voulu l'introduire dans la phase aqueuse pour créer un réseau autour des gouttelettes qui permettra de les stabiliser dans le temps et de construire une couverture poreuse après lyophilisation. Combiné au SDS, le couple PVA-SDS viendra renforcer cette action. Cependant, leur proportion élevée en combinaison avec le Tween[®]80 dans le milieu, engendre inévitablement avec le temps l'apparition d'un gel au fond de la préparation.

D'autre part, les concentrations du PVA et du SDS sont revues à la baisse. Selon la littérature, on préconise des valeurs entre 0,5% et 2,5% pour les deux constituants (Rowe 2006).

Par ailleurs, dans la partie bibliographique, nous avons longuement justifié l'efficacité du Tween[®]80. Sa concentration conditionne la taille des particules et la transparence de la préparation. On évoque un SOR entre 1 et 2 pour des résultats satisfaisants (Saberri 2013b; Yildirim 2017).

Le choix de la méthode d'émulsification spontanée (ES) s'impose comme méthode économique, simple et propre de par le choix des constituants. Son principe répond au schéma illustré dans la figure I.1. Elle nécessite un prémix de la phase organique, puis son introduction dans la phase aqueuse sous agitation mécanique. La température de travail doit avoisiner 25°C

ou plus lorsqu'il s'agit de MCTs, sans pour autant dépasser la PIT. Le rapport des deux phases doit varier entre 10/90 et 20/80, selon les essais d'orientation.

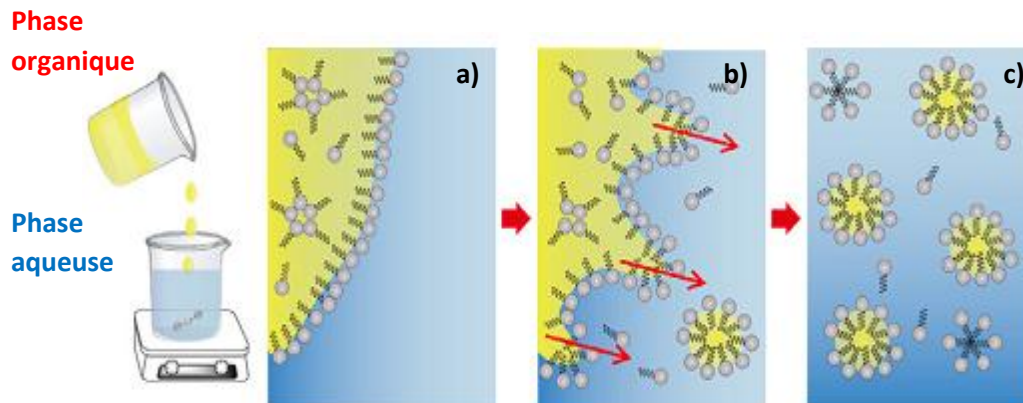


Figure I. 1. Principe illustré de l'émulsification spontanée pour la production d'une nanoémulsion type H/E : a) mise en contact entre la phase organique et aqueuse. b) diffusion du solvant dans la phase aqueuse et organisation du Tween[®]80 autour des gouttelettes huileuses. Figure adaptée (Chang 2013).

Suite à toutes ces étapes et à l'issue des conclusions faites concernant la composition qualitative et quantitative, nous reprenons certaines formules sélectionnées sur la base de leur stabilité physique et de leur aspect, puis nous les adaptons au procédé. Les détails sont présentés dans le tableau I.4 et I.5. Les modifications apportées au procédé concernent essentiellement le T1 (temps de mélange des composants de la phase organique). Il se fait en une seule étape comme indiqué dans le tableau I.4 ou bien en deux étapes comme détaillé dans le tableau I.5. On note alors ES 1 et ES 2, respectivement.

Tableau I. 4. Composition qualitative et quantitative des formules sélectionnées pour la suite des essais d'orientation.

	Phase organique (g)			Phase aqueuse (g)	Mode opératoire		
	T80	Huile (huile de soja / huile de coco)	Solvant	SDS 0,5% + PVA 1%	T1	T2	T3
F8	5	2,5	2,5	40	300 trs/min pendant 5 minutes	800 trs/min pendant 20 minutes	/
F10	2,5	1,25	1,25	45			
F11	2,5	1	4	42,5			
F13*	2,5	1	4	42,5			
F14	6,67	1,67	1,67	40	150 trs/min pendant 3 minutes à 50°C	150 trs/min pendant 3 minutes à 50°C	Sonication à 4 °C pendant 3 minutes

*Emulsion à base d'huile de coco ; T1 : Temps d'agitation de la phase organique ; T2 : Temps de mélange ; T3 : Opérations consécutives.

Tableau I. 5. Formules à base d'huile de coco et adaptation du procédé de formulation.

	Phase organique (g)			Phase aqueuse (g)	Mode opératoire*		
	T80	Huile de coco	Solvant	SDS 0,5% + PVA 1%	T1	T2	T3
F8'	5	2,5	2,5	40	300trs/min pendant 30min + T80 et 300trs/min pendant 30min	750 trs/min pendant 10 min	/
F10'	2,5	1,25	1,25	45			
F14'	6,67	1,67	1,67	40			
F15	5	2	3	40			

T1 : Temps d'agitation de la phase organique ; T2 : Temps de mélange ; T3 : Opérations consécutives.
*Le procédé est exécuté sous chauffage à une température maintenue à 25°C.

Dans cette dernière phase des essais d'orientation, nous allons mesurer le potentiel zêta comme critère de sélection ultime. Il nous permettra de justifier l'usage de l'huile de coco d'une part et de cerner les meilleures formules d'autre part, afin de délimiter les valeurs des variables de composition et de procédé.

Matériels et méthodes :

Les valeurs du potentiel zêta sont fournies par le Zetasizer 3000 HS, Malvern® (figure I.2). Chaque échantillon est soumis à une dilution de 1% dans de l'eau distillée et injecté dans

l'appareil à l'aide d'une seringue propre. Les valeurs présentées dans le tableau I.6 sont une moyenne des valeurs fournies par le logiciel.



Figure I. 2. Zetasizer 3000 HS, Malvern® pour la mesure du potentiel zêta.

Résultats et discussion

Le potentiel zêta d'une émulsion est un indicateur de stabilité. Plus la valeur absolue du résultat obtenu est élevée, plus l'émulsion est stable. En effet, le potentiel zêta représente la distance entre le plan de mouvement d'une particule dispersée et le plan de neutralité de cette dernière. Plus cette distance est élevée, plus les particules se repoussent, on note alors des forces d'attraction très faibles.

Généralement, dans le cas des NEs stables, les valeurs du potentiel zêta avoisinent au moins en valeur absolue 30 mV.

Selon les résultats qui figurent dans le tableau I.6, toutes les valeurs indiquent que les NEs obtenues sont stables. Certaines d'entre elles montrent des résultats très intéressants, comme l'exemple de la formule F8 et F14, lorsque l'on passe d'un procédé à un autre. D'autre part, les valeurs enregistrées pour les formules F10, F11 et F13 sont appréciables quelques soient les paramètres de formulation pour le procédé ES1. Aussi, ce dernier est le plus adapté car en fractionnant les mélanges de T1 de la phase organique (pour ES2), nous n'atteignons pas facilement l'état d'équilibre. Dès lors, nous préconisons un mélange de tous les composants pendant 60 minutes au maximum.

Nous validons également le choix de l'huile de coco, car outre sa solubilité dans la plupart des solvants organiques, elle semble adaptée au procédé et donne des valeurs satisfaisantes en potentiel zêta. Par ailleurs, son point de solidification qui se situe en dessous de 25°C, facilite la conservation de la taille des gouttelettes et ne nécessite pas forcément des opérations consécutives telles que le refroidissement.

Les résultats obtenus indiquent également qu'avec des rapports d'H/E allant de 10/90 à 20/80, des valeurs de SOR variant de 0,5 à 2 et un S_{mix} allant de 0,25 à 1, les NEs répondent aux exigences préétablies.

Tableau I. 6. Résultats des mesures du potentiel zêta des formules finales des essais d'orientation.

Formule	Huile	H/E	SOR	S_{mix}	Procédé	Potentiel zêta (mV)
F8	Huile de soja	20/80	1	5:5	ES1	-21,3
F10	Huile de soja	10/90	1	5:5	ES1	-49,2
F11	Huile de soja	15/85	0,5	2:8	ES1	-46,9
F13	Huile de coco	15/85	0,5	2:8	ES1	-44,6
F14	Huile de soja	20/80	2	5:5	(procédé e)	-52,0
F8'	Huile de coco	20/80	1	5:5	ES2	-55,2
F10'	Huile de coco	10/90	1	5:5	ES2	-29,2
F14'	Huile de coco	20/80	2	5:5	ES2	-14,9
F15	Huile de coco	20/80	1	4:6	ES2	-21,3

A l'issue des résultats obtenus, nous ressortons avec un procédé de préparation des NEs, inspiré de ES1 et ES2 avec seulement deux opérations et à étapes réduites, pour en faire une méthode faiblement énergivore. Le système dispersé est une composition à base d'huile de coco, de PVA, SDS et T80.

Le tableau I.7 est un récapitulatif des variables de composition et de procédé, avec leurs valeurs minimales et maximales respectives. Les concentrations de PVA et de SDS varieront entre 0,5% et 2,5%. m/v. Les émulsions obtenues dans cette marge de concentrations indiquées dans le tableau suscitée sont parfaitement transparentes (figure I.3).

Tableau I. 7. *Domaine d'expérimentation pour l'obtention de nanoémulsions stables à base de PVA, SDS et T80.*

	T80 (g)	Huile(g)	Solvant (g)	Phase aqueuse(g)	T1	T2	[SDS] et [PVA] (% m/v)
Niveau - F16	2,5	0,5	2	45	300 trs/min- 10 min	750 trs/min - 10 min	SDS 0,5 % et PVA 0,5 %
Niveau + F17	6,67	1,67	1,67	40	300 trs/min- 60 min	800 trs/min - 20 min	SDS 2,5 % et PVA 2,5 %

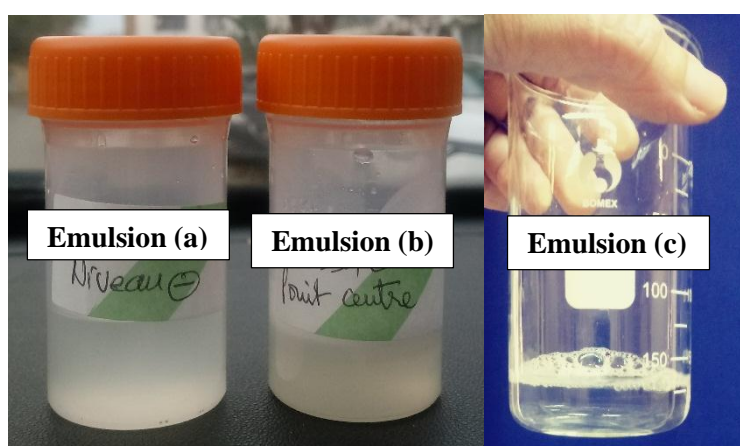


Figure I. 3. *Aspect macroscopique des émulsions obtenues. (a) Emulsion dont la composition correspond à la formule 16, (b) émulsion dont la composition correspond à la formule aux valeurs intermédiaires appelée « point au centre du domaine », (c) émulsion correspondante à la formule 17.*

Néanmoins, aux valeurs maximales indiquées dans ce tableau (F17), et au-delà de 24 heures de repos, la préparation initialement transparente et stable physiquement, subit un phénomène de désolvatation, résultant de la réticulation du seul polymère présent dans le milieu, à savoir le PVA. Par conséquent, avant d'entamer l'optimisation des paramètres de formulation et du procédé, nous sommes dans l'obligation de définir une zone de stabilité de ces NEs, qui se fera par le biais des essais préliminaires durant les phases du développement pharmaceutique, faisant suite aux essais d'orientation.

2 Formulation et préparation des nanoémulsions à base de Polyvinylalcool et de SDS en présence du Tween[®]80

2.1 Principe de la méthode sélectionnée : émulsification spontanée et mécanisme de stabilisation

La méthode de préparation utilisée est une variante de la méthode décrite dans la partie bibliographique avec une agitation mécanique au lieu d'une agitation magnétique. Le chauffage ne doit pas dépasser 60°C pour éviter la température d'inversion de phase (TIP). Le processus est assez simple, il y'a introduction progressive de la phase organique dans la phase aqueuse, comme cela est illustré dans la figure I.4.

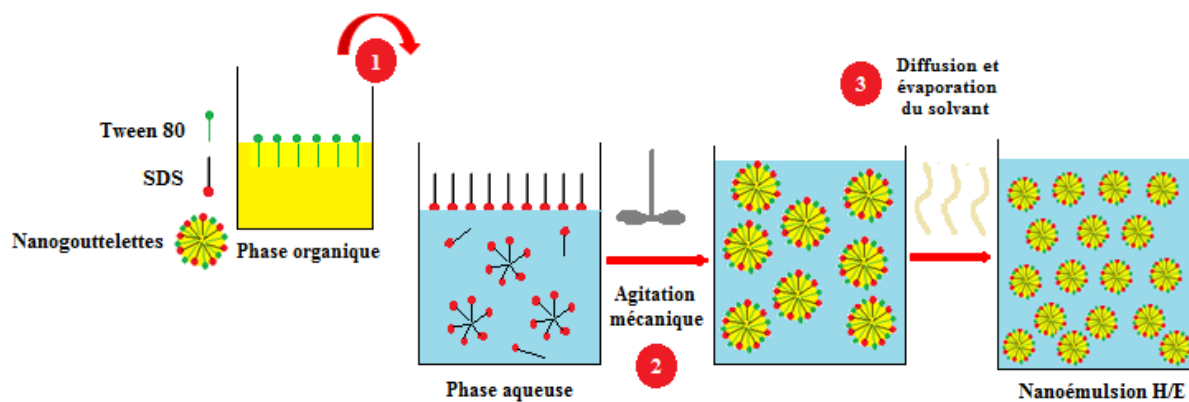


Figure I. 4. Schéma descriptif du principe de base de la méthode d'émulsification spontanée.

Au préalable, les deux phases sont préparées individuellement, tout en s'assurant de l'homogénéité de ces dernières et de l'absence de toutes particules en suspension.

La figure I.5 présente un schéma descriptif du mécanisme proposé pour stabiliser une NE, basé sur l'ajout de polymère (PVA) et en présence de surfactants en l'occurrence T80 et le SDS. En effet, à des rapports de concentrations optimales entre les différents composants, il se produit une forte interaction entre eux qui finit par ramener cet ensemble à l'interface (Walstra 1993). Cette couche mixte vient efficacement empêcher les plus petites gouttelettes de se mouvoir vers les plus grosses et ainsi éviter le phénomène de maturation (Tarimala 2004; Lin 2005).

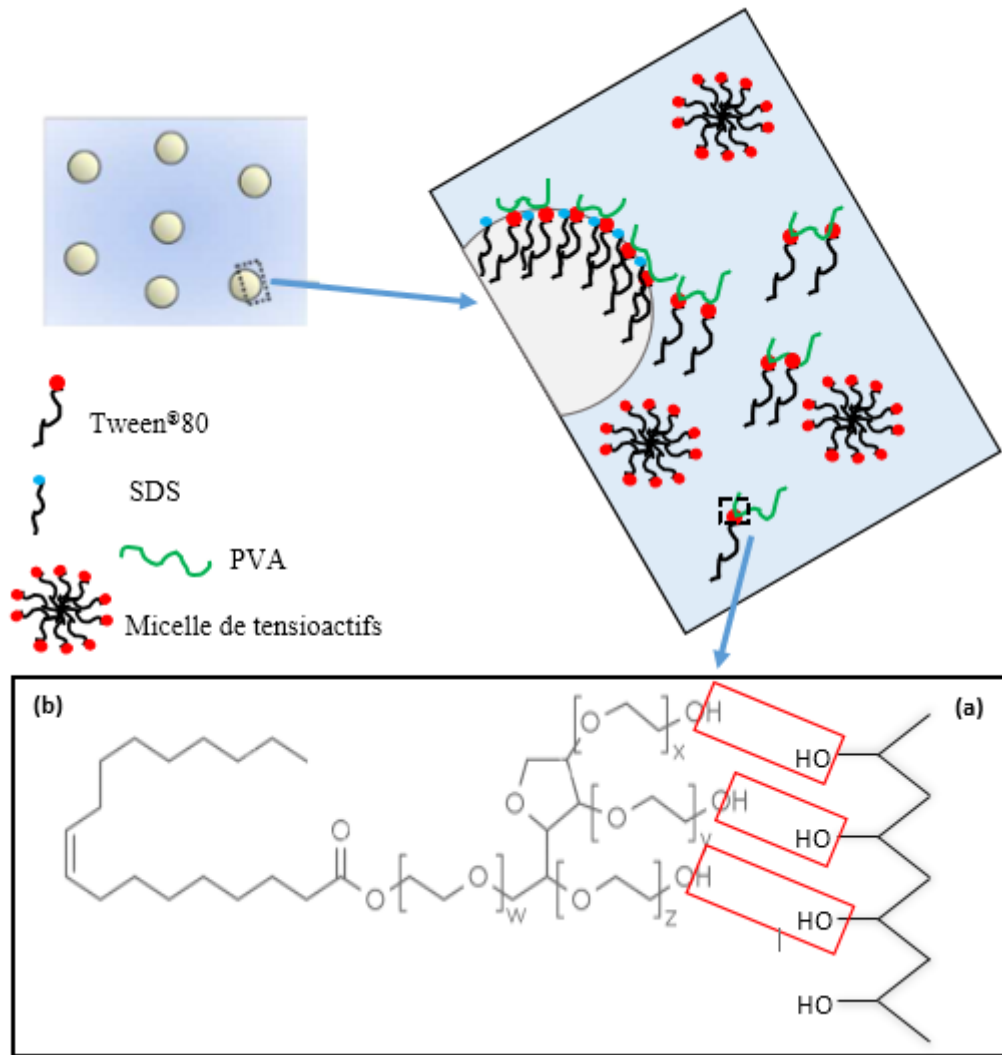


Figure 1.5. Représentation schématique du mécanisme proposé de la stabilisation polymérique exercée par le PVA (a) d'une nanoémulsion à base de Tween®80 (b) et en présence du SDS.

2.2 Mode opératoire

La formulation d'une nanoémulsion passe par la préparation des deux phases qui doivent être formulées de façon adéquate et reproductible.

La conduite des expériences se fait sur la base des plans d'expériences. Nous allons travailler en s'inspirant des conditions déjà optimisées dans les études d'orientation.

Pour rappel, la première démarche a consisté à faire des essais d'orientation et de faisabilité avec le PVA, le SDS, et l'O-xylène. Ce dernier fut rapidement remplacé par l'éthanol, classé III selon la pharmacopée européenne et très largement utilisé à côté de l'acétone et d'autres solvants (European Pharmacopea 2019), beaucoup moins nocifs dans la production de

nanoémulsions. En effet, les émulsions à base de l'O-xylène montraient une stabilité physique, mais elles étaient blanchâtres. À ce moment, l'usage de ce solvant répond en partie à l'objectif fixé.

D'un autre côté, l'usage des solvants a longtemps été décrié à cause de leur toxicité et leur nocivité. En plus, lorsqu'un certain nombre d'expériences est envisagé, il devient dangereux de manipuler ce solvant à long terme et par le même manipulateur. Pour des raisons de sécurité, nous avons décidé de garder dans la formulation future les deux principaux composants à savoir le PVA et le SDS, auxquels on rajouterait une base huileuse en présence d'un solvant organique et d'un surfactif.

Tout au long des essais préliminaires, on va retenir les objectifs suivants :

- Choisir un mode de préparation accessible, moins énergivore et facilement exécutable ;
- Aboutir à un système stable physiquement et transparent, capable de véhiculer des ingrédients actifs hydrophobes.

Les essais d'orientations ont conduit avec succès à un système macroscopiquement transparent et stable physiquement. Le PVA et le SDS, furent à chaque fois utilisés dans les mêmes proportions (de 0,5 à 2,5%). Le choix de tout un chacun fut motivé, grâce à leur capacité commune d'éviter le mûrissement d'Ostwald, la propriété cryoprotectrice du PVA et la propriété stabilisatrice et conservatrice du tensioactif anionique (SDS). Aussi, l'ajout du T80 fut largement justifié par la littérature.

A l'issue de ces essais, nous sommes ressortis avec une gamme de formules. Les choix du formulateur en matière de données d'entrée en formulation et préparation de notre NE sont justifiés dans ce qui suit.

2.3 Choix de la composition qualitative et quantitative et paramètres opératoires

Les choix sont motivés dans le but d'obtenir un système nanodispersé répondant aux critères de transparence, taille nanométrique des gouttelettes générées et stabilité physique. Ce dernier critère est étroitement lié aux deux premiers et dépend de plusieurs facteurs et/ou variables telles que la composition chimique, la fraction volumique des deux phases, la concentration en émulsionnant et la présence de certains additifs ainsi que de la température (Gupta 2016).

2.3.1 Choix du tensioactif (Tween®80)

Pour produire des émulsions stables, la présence d'un tensioactif est nécessaire. Le Polysorbate 80 (T80) a été choisi pour sa valeur HLB élevée et son aptitude à produire et à stabiliser les NEs. Il a été retenu car c'est aussi un liquide qui est miscible avec la phase organique et très fréquemment utilisé. Les études montrent que les NPs produites par le T80 sont capables de franchir les barrières sanguines (Olivier 2005). En effet, il a été sélectionné en se basant sur les travaux antérieurs. Sa gamme de concentration présentée en termes de rapport SOR, qui s'étale de 1 à 2% semble idéale pour obtenir des NEs (Chang 2013; Chang 2014). Toutes ces caractéristiques en font un tensioactif tout à fait intéressant.

2.3.2 Choix du rapport huile/solvant (H/S ou S_{mix})

Les proportions respectives de l'huile et du solvant sont déduites du rapport H/S qui varie avec les expériences. L'optimisation de ce rapport est une étape importante de la préparation des NEs, puisque la présence du solvant miscible à l'eau dans la phase organique à côté de l'huile, permet d'amorcer la diffusion des gouttelettes (chargées du PA et entourées de tensioactif généralement hydrophile) dans la phase aqueuse. Cette transition interfaciale du tensioactif entraîne la formation de nanogouttelettes, un concept qui fut largement appliqué en présence du T80 (Chang 2013; Chang 2014). Par ailleurs, l'usage de l'éthanol a permis l'obtention de NEs d'aspect homogène, sans agrégats, ni séparation de phases (Bouchemal 2004).

2.3.3 Choix du rapport Tween® 80/PVA (R)

Ce rapport doit être optimisé, afin de conserver une NE stable, sans pour autant voir apparaître au fond du tube un sédiment de gel.

En effet, il y'a un phénomène de désolvatation que nous avons décrit dans les essais d'orientation résultant de la réticulation du polymère qui se manifeste sous forme de gel. Cette gélification est amorcée une fois tous les composants de la formulation mis en contact.

A titre indicatif, nous avons réalisé une analyse du spectre infrarouge du sédiment obtenu. Le spectre IR du sédiment indique l'apparition d'un pic d'absorption de faible intensité à 1967 cm^{-1} , pouvant expliquer l'apparition du sédiment (Annexe 2). L'analyse est faite sur spectrophomètre infrarouge de marque PERKIN ELMER® Spectrum Two.

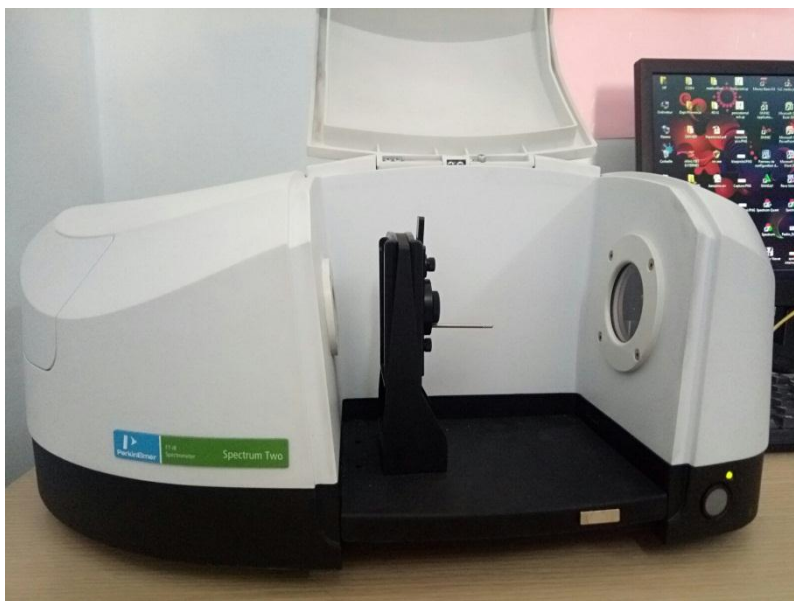


Figure I. 6. Spectroscopie à transformée de Fourier sur l'appareil PERKIN ELMER® Spectrum Two.

Les spectres de transmission FTIR du PVA et du sédiment sont présentés sur une plage de fréquences entre 4000 et 400 cm^{-1} . Sur les spectres obtenus, les pics caractéristiques des groupements fonctionnels doivent être parfaitement individualisés pour chaque composé, toute autre modification est synonyme d'interactions chimiques et/ou apparition de nouveaux groupements fonctionnels.

Les principales bandes d'absorption révèlent les groupements fonctionnels existants dans le PVA (Annexe 2a):

- Elongation de la liaison -OH de la fonction alcool entre 3200 et 3550 cm^{-1} ;
- Elongation de la liaison -CH caractéristique d'un alcane entre 1380 et 1385 cm^{-1} ;
- Elongation de la liaison C-O de la fonction alcool secondaire entre 1085 et 1124 cm^{-1} .

Concernant le sédiment, ce dernier présente les groupements fonctionnels suivants :

- Elongation de la liaison -OH de la fonction alcool entre 3550 et 3200 cm^{-1} ;
- Elongation de la liaison -OH de la fonction alcool entre 3300 et 2500 cm^{-1} ;
- Elongation de la liaison C-H du groupement aromatique entre 2000 et 1650 cm^{-1} , relative à trois pics d'absorption correspondant aux longueurs d'onde suivantes : 1967, 1737 et 1651 cm^{-1} . Les deux derniers pics sont caractéristiques du T80, tandis que le premier souligne l'apparition d'un nouveau pic de faible intensité. En effet, Il y'a des

bandes d'absorption caractéristiques du Tween[®]80 que l'on peut déceler dans le sédiment, à 2926, 1739 et 1642 cm⁻¹ et qui correspondent respectivement à l'élongation -OH intramoléculaire, et -CH du groupement aromatique caractéristique du Tween[®]80.

- Concernant le premier pic qui apparaît dans le sédiment, ce dernier indique bel et bien l'interaction qui peut survenir quand nous mélangeons le PVA avec le Tween[®]80.

Suite aux essais d'orientation, nous avons délimité le rapport T80/PVA dans l'intervalle de 2 à 10.

Par ailleurs, le PVA est un co-surfactif stabilisateur, connu pour son aptitude à augmenter la viscosité de la phase dispersante en venant renforcer l'action du Tween[®]80 par encombrement stérique. Par son action synergique, il permet alors de minimiser les phénomènes d'instabilité telle que la coalescence ou encore le mûrissement d'Ostwald.

En outre, nous avons opté pour le PVA pour son action cryoprotectrice (Rowe 2006).

2.3.4 Choix du stabilisateur (SDS)

Outre ses propriétés stabilisatrice et conservatrice, il a été rapporté que la libération du PA encapsulé est influencée par la concentration du tensioactif anionique (Vauthier 2003).

En outre, le SDS est un tensioactif anionique produisant des systèmes dispersés très stables avec un potentiel zêta très élevé (Silva 2015). Il possède également une action antibactérienne. Sa concentration ne doit pas dépasser 2,5%, pour éviter son action moussante qui pourrait entraver le processus de formulation mais aussi éviter que la formule ne soit trouble.

Le SDS est connu pour son aptitude à augmenter légèrement le point trouble « cloud point », engendrant en conséquence une stabilité thermique (Guttoff 2015). Il a une capacité à modifier la courbure de la monocouche du tensioactif et de ce fait augmenter la répulsion électrostatique entre les gouttelettes (Saberri 2014a). Son association au PVA permet de stabiliser toute la nanodispersion une fois formulée.

2.3.5 Choix du rapport phase organique/phase aqueuse

Dans le cas des NEs, le rapport des deux phases se situe généralement entre 20/80 (Burapapadh 2012; Saberri 2013b; Vatsraj 2014) et 10/90 (Campani 2016). La phase discontinue ou organique est constituée de MCTs représenté par l'huile de coco, auquel nous rajoutons de l'éthanol et du Tween[®]80. Il a pour avantage un point de solidification qui se situe en dessous

de 25°C avec une plage thermique étroite. En effet, à la fin du chauffage et après repos à température ambiante, les gouttelettes sont rapidement figées et conservent donc leur stabilité.

Par ailleurs, l'incorporation de grandes proportions en T80 dans la phase organique, nous permet d'obtenir des NEs avec de meilleurs attributs qualité. Aussi, l'usage d'un cosolvant (éthanol) contribue positivement à la nanoémulsification par une rapide diffusion de ce dernier dans la phase aqueuse. Son évaporation ultérieure va réduire la taille des nanogouttelettes et stabiliser ces dernières dans leur phase continue.

De son côté la phase continue est aqueuse, de nature polymérique et de qualité reproductible. Toutes les NEs sont fabriquées avec une eau distillée dont le pH varie entre 6,9 et 7,2 (pH mètre, METTLER TOLEDO®). Dès lors, toute variation de pH indique une instabilité chimique. Le pH mètre affiche à chaque mesure des valeurs incluses dans la marge précédemment citée.

2.3.6 Choix de la température

L'émulsification spontanée est réalisée sous chauffage. Les deux phases sont au préalable chauffées avant d'être mélangées l'une dans l'autre. Nous veillerons à chaque fois à ce que la température ne dépasse pas les 60°C, pour éviter l'inversion de phase.

Les températures de chauffage de la phase organique et de la phase aqueuse peuvent être identiques (An 2014; Komaiko 2015b), ou différentes les unes des autres (Saber 2013b).

Les études ont montré une réduction de la taille des particules qui est probablement due à la diminution de la viscosité qui facilitera le mouvement des molécules de tensioactifs, de l'huile ou encore de la phase aqueuse (An 2014; Komaiko 2015b).

Komaiko et al., préconisent de travailler sous chauffage en dehors de la zone de coalescence, laquelle est représentée par des températures allant de 50°C et 68°C pour des NEs contenant 10 % d'un mélange huileux, 10% Tween®80, 40% solution tampon, et 40% de glycérol (Komaiko 2016). Cependant, il convient de noter que certains co-solvants, tels que le glycérol contribue à abaisser la TIP de 75°C à 55°C, au même titre que certains sels (NaCl et CaCl₂) (Saber 2014b), ce qui peut expliquer l'augmentation rapide de la turbidité, contrairement au SDS (Guttoff 2015).

Pour étudier l'impact de la température, la phase organique est alors chauffée entre 30°C et 60°C. L'opération de mélange est aussi réalisée sous chauffage, en évitant la TIP. La phase aqueuse doit être chauffée à la même température que la phase organique lors du mélange dans les essais des plans d'expériences établis. Deux températures sont alors retenues pour le lancement des expériences (T°1 : température de préparation de la phase organique et T°2 : température de mélange des deux phases).

2.3.7 Choix du temps et de la vitesse d'agitation

Deux mesures de temps sont programmées. Celle nécessaire à l'homogénéisation de tous les composants de la phase organique (t1) et celle nécessaire au mélange de la phase organique à la phase aqueuse (t2).

En effet, l'étape de préparation de la phase organique est cruciale. Ce temps varie de 30 à 60 minutes. L'objectif étant d'atteindre l'équilibre de la phase organique avant de l'introduire dans la phase aqueuse. Tandis que, le temps de mélange des deux phases fut délimité entre deux valeurs, respectivement 10 et 20 minutes.

Par ailleurs, il a été prouvé que le cisaillement favoriserait la dispersion et pourrait avoir un impact positif sur la qualité finale de la NE, plus précisément en termes de réduction de la taille des particules (Komaiko 2016). Cette vitesse doit être suffisante pour garantir l'homogénéité et éviter la séparation de phase. Elle doit engendrer une réduction de taille et garantir la stabilité cinétique.

En augmentant la vitesse d'agitation de 200 trs/min à 800 trs/min, les NEs à base de T80 et de MCTs montraient toutes une réduction de la taille des particules (Saberri 2013b; Guttoff 2015). En effet, le cisaillement engendré lors de l'agitation faciliterait le mouvement des composants de la phase organique et la destruction de la couche bicontinue entre les deux phases (Saberri 2013b). Indépendamment de la technique de préparation utilisée, on rapporte que certaines variables opératoires telle que la vitesse d'agitation n'a aucune influence ou bien un très faible impact sur la taille des particules, surtout si la formule est déjà optimisée sur le plan composition. Ce point n'est toutefois pas à négliger, car il permet de réaliser favorablement une transposition d'échelle sans qu'il y' ait un réel impact sur les attributs qualité de la NE (Gutiérrez 2008).

Après quelques essais de faisabilité, nous avons pu fixer une marge de valeurs allant de 800 à 1200 trs/min.

D'autre part, afin de définir les temps optimums pour t1 et t2, nécessaires à la production de nanogouttelettes, un nombre d'expériences est planifié via le Modde®6. Les valeurs sont comprises entre 30 minutes et 60 minutes pour t1 et de 10 à 20 minutes pour t2. Le temps est mesuré depuis l'introduction de la 1^{ère} goutte de la phase organique dans la phase aqueuse.

Pour valider ces valeurs et statuer sur le domaine expérimental, nous avons réalisé des essais de faisabilité. Il a été constaté que la taille et la distribution de taille diminuent tandis que le potentiel zêta augmente, parallèlement à l'augmentation du temps et de la vitesse d'agitation. Les valeurs proposées du temps et de la vitesse d'agitation semblent correctes.

3 Approche de développement pharmaceutique d'une nanoémulsion stable en application de la méthodologie de surface de réponses

Après avoir prouvé la faisabilité de la méthode d'émulsification spontanée pour la production de NE à base de PVA et T80 en présence de SDS, nous poursuivons les autres essais. Afin d'étudier l'effet des paramètres de formulation et des paramètres opératoires sur les attributs qualité de la NE, nous avons planifié d'entreprendre une méthodologie par plans d'expériences, ou plus précisément la méthodologie des surfaces de réponses.

- Dans une première étape, nous avons varié le rapport H/E, le rapport T80/PVA (R), le rapport huile/solvant (H/S) ou S_{mix} et la concentration en SDS pour définir la formule optimale.
- Dans une seconde étape, nous sommes passées à l'étude de l'influence des paramètres opératoires sur cette dernière (voir chapitre II). En effet, l'étude se fera sur l'impact des paramètres opératoires tels que le temps d'agitation, la température ou encore la vitesse du mélange sur les attributs qualité de la NE. Les données ainsi que les conditions de travail seront précisées dans les tableaux générés par le Modde®6. Les résultats y sont également reportés à chaque fois.

- Dans la 3^{ème} étape, la formule ainsi validée, sera soumise à une lyophilisation dans l'objectif de la stabiliser. Il s'agit d'une cryodessiccation qui fait appel au séchage à froid et sous vide. Nous verrons dans le chapitre IV que des alternatives peuvent être appliquées, dans l'impossibilité de conduire une lyophilisation directement sur des NEs. En effet, cette dernière sera en totalité emprisonnée dans des microsphères, tout en veillant aux choix des réactifs mis en jeu lors de ce processus, en termes de disponibilité, faisabilité et reproductibilité du procédé.

L'optimisation de notre formule et du procédé sera organisée et planifiée en deux grandes étapes, respectivement chapitre I et II, avec présentation des résultats et interprétations :

a) Criblage et optimisation des paramètres de formulation

Dans cette partie des essais préliminaires nous ont permis de délimiter le domaine expérimental d'intérêt sur lequel nous portons toute notre attention afin d'aboutir à une formule optimale. Pour ce fait, nous allons également appliquer la méthodologie de surface de réponses en utilisant un plan composite centré à deux niveaux.

b) Criblage et optimisation des paramètres opératoires

La partie finale de l'application de la MPE est représentée par une optimisation multiréponse du process, pouvant être influencé par plusieurs paramètres opératoires. Cette étape d'investigation est entamée une fois la formule optimisée. Elle consiste à étudier l'impact des paramètres opératoires sur les attributs qualité de la NE finale. La stabilité de cette dernière étant un critère important, car les caractéristiques de départ de la NE obtenue doivent être maintenues, afin de prétendre à d'éventuelles opérations consécutives. Dans ce cas, il s'agit d'une seconde encapsulation par la technique de gélification ionotropique puis une lyophilisation.

Pour conduire au mieux cette étape, on applique également la méthodologie de surface de réponse en utilisant le plan de « Plackett et Burman » à deux niveaux pour le criblage afin d'identifier les facteurs significatifs. Puis, reconduire ces derniers dans un autre plan qui est le plan composite centré à deux niveaux pour définir les conditions optimales.

Le développement de la technique d'émulsification spontanée repose sur la composition des NEs. Les solvants organiques furent longtemps utilisés dans la formulation des NEs avec toutes les difficultés et les exigences en termes de sécurité pour le personnel ou pour l'environnement. Ces aléas techniques ont vite imposé l'usage et l'association de composants moins toxiques et plus faciles à manipuler sans pour autant instaurer des mesures de protection drastiques. Ces nouveaux composants sont biodégradables et/ou biocompatibles, moins nocifs et moins toxiques.

3.1 Matières premières et préparation de la nanoémulsion

La phase aqueuse contenant une prise d'essai de PVA (Biochem) et 0,25 g de SDS (Sigma-Aldrich) dans une eau distillée à pH= 6,9 , est préparée juste avant utilisation sous chauffage et ramenée à la température (T2), fixée par le plan d'expériences préalablement établi par le Logiciel Modde®6.

L'éthanol ($\geq 99,8^\circ$, Honeywell/Riedel-de-Haen), l'huile de coco (Hemani) et le Tween®80 (Sigma-Aldrich), sont mélangés pour obtenir une phase organique. Une fois le mélange organisé, chauffé et à l'état d'équilibre, on l'introduit lentement et de manière contrôlée, goutte à goutte dans la phase aqueuse préalablement préparée, jusqu'à épuisement. Le débit d'introduction est fixé approximativement à 2 ml/min.

L'émulsion est maintenue sous agitation jusqu'au temps indiqué (t2) et sous la température fixée (T2) par le plan d'expériences. Une fois terminée, la NE obtenue est refroidie à température ambiante et soumise aux caractérisations physico-chimiques.

Il convient de retenir qu'à partir du domaine d'expérience qui ressort des essais d'orientation, de nombreuses modifications seront apportées, à chaque étape du développement. En effet, nous allons passer par trois stades de développement en commençant par les essais préliminaires (criblage), dont l'objectif est d'éliminer l'apparition du phénomène de désolvatation (qui engendre une gélification), puis l'optimisation des paramètres de formulation pour aboutir à une formule de base et enfin l'optimisation des paramètres opératoires.

Les réponses étudiées sont essentiellement la taille moyenne des gouttelettes, le potentiel zêta et l'indice de polydispersité, entre autres. En ce qui concerne les variables retenues pour l'optimisation, elles seront à chaque étape identifiées en fonction des résultats des essais de criblage.

Dans tout ce qui suit, la formulation et le procédé sont modélisés mathématiquement à l'aide du Modde[®]6 afin de mieux comprendre le comportement des composants entre eux et vis-à-vis des contraintes imposées par le procédé. Cette démarche vise à déceler les paramètres significatifs de chaque opération.

3.2 Essais préliminaires : Etude des effets des conditions de formulation et optimisation

Problématique

Durant les essais d'orientation, nous avons réussi à sélectionner les valeurs correspondantes aux valeurs maximales de chaque paramètre (tableau I.7). Ces valeurs maximales de compositions entraînent malheureusement au-delà de 24 heures, l'apparition d'une masse gélifiée au fond du contenant. Sont exclues de ce constat, les valeurs minimales et les valeurs au centre du domaine expérimental.

Tout d'abord, il est nécessaire de conduire des essais préliminaires au cours desquels nous décideront de la continuité des expériences et des conditions de travail. L'objectif est de produire des NEs transparentes et sans l'apparition de masse gélifiée qui sédimente. En effet, le mélange de tensioactif (T80) et de PVA peut conduire à un sédiment, selon les proportions respectives mises en jeu de ces deux composants. Pour cela, une série d'expériences de mélanges binaires entre les différents composants est d'abord conduite, afin de retenir le mélange. A l'issue de ces tests, c'est avec des rapports de concentrations variables (Tween[®]80/PVA) et SDS; que nous allons mener les essais préliminaires. Après 24 heures de repos, chaque formulation subira la mesure de la hauteur du sédiment avec un pied à coulisse et l'appréciation de l'aspect macroscopique.

Cette démarche nous permettra d'optimiser le rapport Tween[®]80/PVA entre autre, d'exclure certaines valeurs et de limiter le domaine expérimental à une zone de valeurs acceptables selon les objectifs préétablis. Pour ce faire, seule la méthodologie expérimentale basée sur les plans d'expériences nous permettra d'atteindre les résultats escomptés.

3.2.1 Choix du plan d'expérience

Nous avons planifié des essais par simulation numérique pour la configuration de la matrice d'expériences. La mise en place des conditions expérimentales et le traitement statistique des résultats ont été faits à l'aide du logiciel Modde[®], version 6 (Umetrics AB 2001).

Notre objectif étant l'optimisation autour de la formule 17 (tableau I.7), qui nous permettra de revoir les valeurs maximales et ensuite délimiter la zone d'expériences dans laquelle nous pouvons produire des NEs stables et transparentes.

Un criblage de facteurs (significatifs) pouvant intervenir dans la génération du phénomène de désolvation du polymère. Le plan de criblage permet d'apprécier le poids de chaque facteur sur les réponses à étudier (épaisseur du gel et indice de transparence), de choisir le ou les niveaux les plus favorables de certains facteurs, ou d'éliminer du domaine d'étude les niveaux sans intérêt. Pour ce faire, le plan de type « Plackett et Burman » est privilégié dans cette première étape des essais préliminaires. Ces matrices sont très utilisées pour leur efficacité et puissance dans le milieu d'expérimentation (Lepadatu 2006).

Pour le plan d'optimisation de la formule, nous reprenons les facteurs importants qui ressortent de l'analyse statistique du plan de criblage pour les reconduire dans un plan composite centré cubique.

3.2.2 Choix des facteurs et définition du domaine expérimental

La stabilité de la NE dépend de plusieurs facteurs (tableau I.8), tels que le rapport massique des phases H/E, H/S, du mode de préparation et surtout de la nature et de la concentration du tensioactif entrant dans sa composition à savoir le Tween[®]80. Le facteur nouvellement introduit dans cette phase de développement est R, le rapport de T80 : co-surfactif (PVA). Un autre composant important présent dans la formulation, est le SDS, qui est un tensioactif anionique connu pour être également stabilisant. L'influence de ces composants sur les attributs qualité de la NE a été globalement appréciée au cours des essais d'orientation.

Dans le tableau I.10, les facteurs étudiés sont exprimés en valeurs centrées réduites, codées (-1 désignant le niveau bas, 0 le niveau moyen, et +1 le niveau haut), telles que fournies par le logiciel. Seul le procédé de préparation est fixe, il correspond à celui appliqué à la formule 17 (tableau I.7).

Tableau I. 8. Présentation des variables de l'étude et caractéristiques.

<i>Facteurs</i>	<i>Type</i>	<i>Unité</i>	<i>Limite inférieure</i>	<i>Limite supérieure</i>	<i>Description</i>
<i>H/E</i>	Quantitatif	%	10	20	<i>Rapport de la phase huileuse et la phase aqueuse</i>
<i>SOR</i>	Quantitatif	/	1	2	<i>Rapport du surfactif T80 à la phase huileuse</i>
<i>R</i>	Quantitatif	/	2	10	<i>Rapport du tensioactif/PVA</i>
<i>H/S</i>	Quantitatif	/	0,25	1	<i>Rapport de l'huile/ solvant</i>
<i>SDS</i>	Quantitatif	gr	0,25	1,25	<i>Masse du tensioactif anionique mis en jeu</i>

3.2.3 Choix et définition des réponses

L'émulsion sera considérée comme étant stable lorsqu'il y a absence de réticulation, c'est-à-dire absence de gélification (Y1), exprimée en centimètres, au-delà de 24 heures de repos. Elle sera également appréciée par sa transparence (Y2), qui est considérée comme l'une des principales caractéristiques d'une NE. On attribue un indice à chaque émulsion (1 : transparent, 2 : trouble, 3 : opaque). Ainsi, le nombre de réponses est limité à deux (tableau I.9). À travers ces deux réponses, nous allons apprécier les facteurs les plus influents, qui seront par la suite reconduits dans l'étude de l'optimisation.

Tableau I. 9. Caractéristiques des réponses enregistrées par le formulateur.

<i>Réponses</i>	<i>Unité de mesure</i>	<i>Description</i>
<i>Epaisseur du gel</i>	Millimètre	<i>Hauteur du sédiment</i>
<i>Transparence</i>	Scoring*	<i>Aspect macroscopique indiquant que le produit est translucide ou pas</i>

*Indice de transparence codifié (1, 2 ou 3), attribué par l'opérateur.

Les objectifs de cette étude vise à :

- Hiérarchiser les facteurs (étude de criblage) ;
- Optimiser la réponse Y1 (équivalent à zéro) et Y2 (doit correspondre à l'indice 1) ;
- Valider la technique de préparation de la NE.

3.2.4 Construction du plan de criblage pour les essais préliminaires

Le plan de « Plackett et Burman » est le plus utilisé pour conduire des essais de criblage. Il combine k facteurs à deux niveaux, notés +1 et -1. Le nombre de facteurs (k) est égal à 5 (H/E, SOR, T80/PVA, S_{mix} et [SDS]). Le nombre d'expériences à exécuter est composé de huit expériences, qui seront répétées deux fois pour apprécier la répétabilité et donner plus de puissance statistique au plan. Au total, nous allons opérer 16 expériences pour cette étape du criblage (tableau I.10).

Le modèle mathématique retenu est un modèle polynomial du premier degré qui vise à établir une relation linéaire entre les facteurs et les réponses mesurées.

Il peut être représenté par l'équation suivante (pour n facteurs) :

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^n \beta_i x_i + \varepsilon \text{ (éq.1)}$$

Où :

Y est la réponse étudiée,

x_n le niveau du facteur n,

β le coefficient du modèle relatif à chaque facteur,

ε sommes carrés des résidus.

Tableau I. 10. Présentation de la matrice du Plan de « Plackett et Burman » pour le criblage lors des essais préliminaires.

N°	H/E	SOR	R	H/S	SDS	Y1 (cm)	Y2*
	Valeurs codées						
1	1	-1	-1	1	-1	Y1 ₁	Y2 ₁
2	1	-1	-1	1	-1	Y1 ₂	Y2 ₂
3	1	1	-1	-1	1	Y1 ₃	Y2 ₃
4	1	1	-1	-1	1	Y1 ₄	Y2 ₄
5	1	1	1	-1	-1	Y1 ₅	Y2 ₅
6	1	1	1	-1	-1	Y1 ₆	Y2 ₆
7	-1	1	1	1	-1	Y1 ₇	Y2 ₇
8	-1	1	1	1	-1	Y1 ₈	Y2 ₈
9	1	-1	1	1	1	Y1 ₉	Y2 ₉
10	1	-1	1	1	1	Y1 ₁₀	Y2 ₁₀
11	-1	1	-1	1	1	Y1 ₁₁	Y2 ₁₁
12	-1	1	-1	1	1	Y1 ₁₂	Y2 ₁₂

13	-1	-1	1	-1	1	Y1 ₁₃	Y2 ₁₃
14	-1	-1	1	-1	1	Y1 ₁₄	Y2 ₁₄
15	-1	-1	-1	-1	-1	Y1 ₁₅	Y2 ₁₅
16	-1	-1	-1	-1	-1	Y1 ₁₆	Y2 ₁₆

**indice de transparence : 1) transparente, 2) légèrement trouble, 3) trouble.*

3.2.5 Construction du plan composite centré cubique

En ce qui concerne l'étape d'optimisation, nous avons choisi un plan composite centré cubique qui est un plan factoriel réduit (tableau I.11). La matrice du plan englobe 2^4 expériences (N_F), auxquelles on rajoute une expérience au centre du domaine expérimental, répétée 5 fois et nommée N_0 , pour estimer la variance de répétabilité des mesures et l'erreur expérimentale (Kanaan 2007), ainsi que deux points axiaux (points en étoile) pour chaque facteur $N\alpha$ (Goupy 2006; Lepadatu 2006; Pérez-Mosqueda 2015).

Le nombre total des expériences réalisées répond à l'application numérique de l'équation suivante :

$$N_F + N_0 + N\alpha = 2^4 + 5 + 2 \times k = 29 \text{ (éq.2)}$$

Le modèle mathématique utilisé dans l'étude d'optimisation est un modèle qui lie les facteurs sélectionnés avec leurs réponses, en tenant compte des effets des facteurs et de leurs interactions. Généralement, le modèle est donné par l'équation suivante (pour n facteurs):

$$Y = \beta_0 + \sum_{j=1}^n \beta_j x_j + \sum_{j=1}^n \beta_{jj} x_j^2 + \sum_{i < j}^n \beta_{ij} x_i x_j \text{ (éq.3)}$$

Où :

Y est la réponse étudiée,

x_n le niveau du facteur n,

β le coefficient du modèle.

Tableau I. 11. Présentation de la matrice du plan composite centré pour l'étude des surfaces de réponses en vue de l'optimisation de la formule lors des essais préliminaires.

N°	H/E	SOR	R	H/S	Y1 (cm)	Y2*
	Valeurs codées					
1	-1	-1	-1	-1	Y1 ₁	Y2 ₁
2	1	-1	-1	-1	Y1 ₂	Y2 ₂
3	-1	1	-1	-1	Y1 ₃	Y2 ₃
4	1	1	-1	-1	Y1 ₄	Y2 ₄
5	-1	-1	1	-1	Y1 ₅	Y2 ₅
6	1	-1	1	-1	Y1 ₆	Y2 ₆
7	-1	1	1	-1	Y1 ₇	Y2 ₇
8	1	1	1	-1	Y1 ₈	Y2 ₈
9	-1	-1	-1	1	Y1 ₉	Y2 ₉
10	1	-1	-1	1	Y1 ₁₀	Y2 ₁₀
11	-1	1	-1	1	Y1 ₁₁	Y2 ₁₁
12	1	1	-1	1	Y1 ₁₂	Y2 ₁₂
13	-1	-1	1	1	Y1 ₁₃	Y2 ₁₃
14	1	-1	1	1	Y1 ₁₄	Y2 ₁₄
15	-1	1	1	1	Y1 ₁₅	Y2 ₁₅
16	1	1	1	1	Y1 ₁₆	Y2 ₁₆
17	-1	0	0	0	Y1 ₁₇	Y2 ₁₇
18	1	0	0	0	Y1 ₁₈	Y2 ₁₈
19	0	-1	0	0	Y1 ₁₉	Y2 ₁₉
20	0	1	0	0	Y1 ₂₀	Y2 ₂₀
21	0	0	-1	0	Y1 ₂₁	Y2 ₂₁
22	0	0	1	0	Y1 ₂₂	Y2 ₂₂
23	0	0	0	-1	Y1 ₂₃	Y2 ₂₃
24	0	0	0	1	Y1 ₂₄	Y2 ₂₄
25	0	0	0	0	Y1 ₂₅	Y2 ₂₅
26	0	0	0	0	Y1 ₂₆	Y2 ₂₆
27	0	0	0	0	Y1 ₂₇	Y2 ₂₇
28	0	0	0	0	Y1 ₂₈	Y2 ₂₈
29	0	0	0	0	Y1 ₂₉	Y2 ₂₉

*indice de transparence : 1) transparente, 2) légèrement trouble, 3) trouble.

Pour apprécier le niveau d'ajustement du modèle (réponses prédites par le logiciel par rapport aux réponses mesurées), on établit le rapport R^2 , qui nous donne des informations sur l'existence d'une relation linéaire entre les différentes variables. Il est appelé coefficient de corrélation multiple ou coefficient de détermination.

R^2 varie entre 0 et 1. S'il est proche de 1, c'est que le modèle explique toutes les réponses mesurées (Cunha 2020). En revanche s'il vaut 0, cela ne signifie pas l'absence d'une relation entre les variables considérées (Lepadatu 2006).

3.2.6 Fabrication et caractérisation des nanoémulsions

3.2.6.1 Matériels

La figure I.7 illustre les conditions de travail et les équipements mis à disposition afin d'aboutir à la formulation de la NE. Les besoins en matériels et consommables y sont représentés :

- Agitateur magnétique chauffant NAHITA[®] model 690-1.
- Agitateur magnétique chauffant de marque STUART[®] heat-stir SB162.
- Balance analytique de précision de marque KERN[®] PLT 2000-3DM.
- Agitateur mécanique à hélices avec une gamme de vitesse allant de 50 à 2200 tours/min (DIAB OS4O-Pro).
- Support élévateur.
- Barreaux magnétiques (petit et grand).
- Tige pour barreaux magnétiques.
- Spatules métalliques.
- Nacelle de pesée.
- Becher de 25 ml.
- Becher haut de 250 ml, à col étroit.
- Erlen de 250 ml.

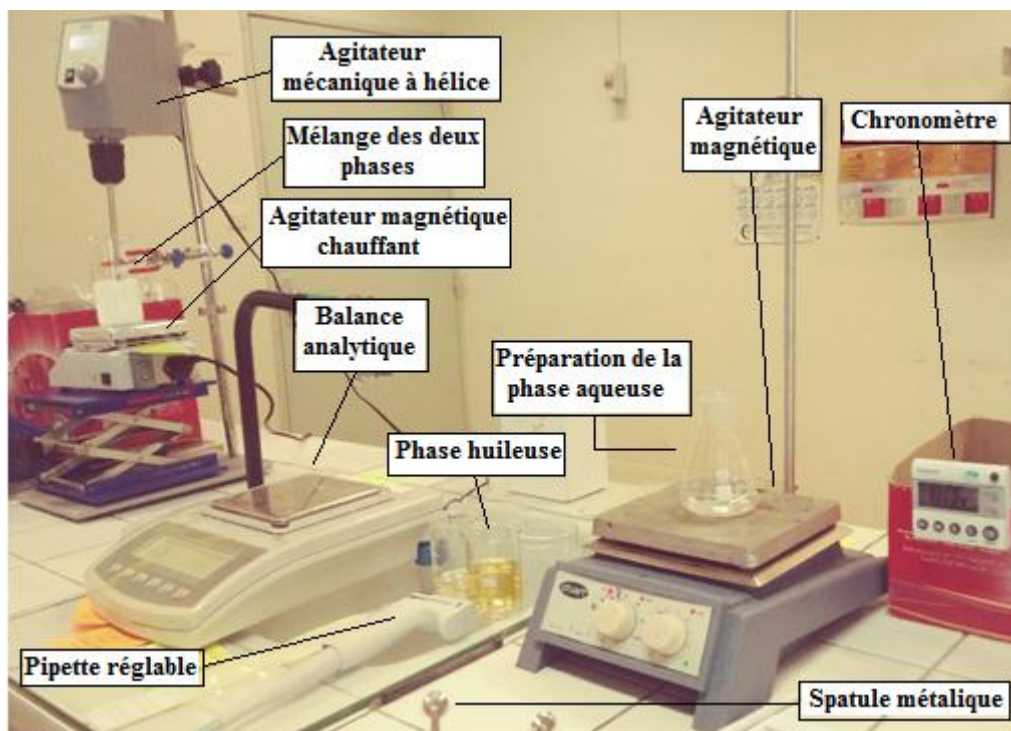


Figure I. 7. Figure illustrant les conditions de préparation de la nanoémulsion.

3.2.6.2 Méthodes de caractérisation des nanoémulsions

3.2.6.2.1 Taux de sédimentation (épaisseur du gel) et transparence

Sur le plan macroscopique, la dispersion est considérée stable s'il n'y a pas de séparation de phase. Dans notre cas, le taux de sédimentation doit être nul. Les NEs sont caractérisées entre autres par leur aspect transparent, qui reflète la présence de nanogouttelettes au sein du système colloïdal.

Ces caractéristiques macroscopiques sont appréciées par un test visuel qui permet d'évaluer le phénomène de réticulation qui se produit à des proportions non optimales du tensioactif et du polymère. La sédimentation est matérialisée par sa mesure à l'aide d'un pied à coulisse. L'absence de sédiment peut nous amener à considérer les proportions mises en jeu comme potentiellement optimales.

3.2.6.2.2 Mesure du pH

Le pH est déterminé en plongeant l'électrode d'un pH mètre directement dans l'émulsion, à $25^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$. Toute dérive de pH est considérée comme une instabilité amorcée au

sein du système. La mesure du pH est effectuée avec un pH mètre de marque METTLER TOLEDO®, calibré avec des étalons raccordés.

3.2.6.2.3 Mesure de la turbidité

La turbidité est l'une des mesures qui permettent d'apprécier la qualité de la NE. Après étalonnage de l'appareil de marque HANNA® Instruments Turbidimeter, modèle HI88703 (figure I.8); l'échantillon est introduit dans un flacon adapté et parfaitement nettoyé, lequel est à son tour introduit dans son récepteur pour effectuer la mesure.

Dans le cas de la NE, la turbidité est en rapport direct avec sa transparence. Plus la NE est transparente (valeurs faibles de turbidité), plus elle est stable ; c'est-à-dire qu'il y'a moins d'incidence de survenue du phénomène du mûrissement d'Ostwald. Dans la littérature, la turbidité peut varier en fonction de la taille moyenne des particules de 100 à 600 NTU (Simonnet 2004), ou de 60 à 600 NTU et de préférence de 70 à 300 NTU (Simonnet 2001).



Figure I. 8. Turbidimètre HANNA instruments®.

3.2.6.2.4 Analyse au microscope électronique à transmission

La microscopie électronique à transmission (MET) permet d'apprécier la taille des particules et leur état de distribution. On imprègne des microgrilles par la NE, en présence d'un agent de contraste, en l'occurrence l'acétate d'uranyle (figure I.9). L'observation microscopique est faite après un temps de séchage de 24 heures, sur un microscope de marque EM900 Carl ZEISS® (figure I.10).

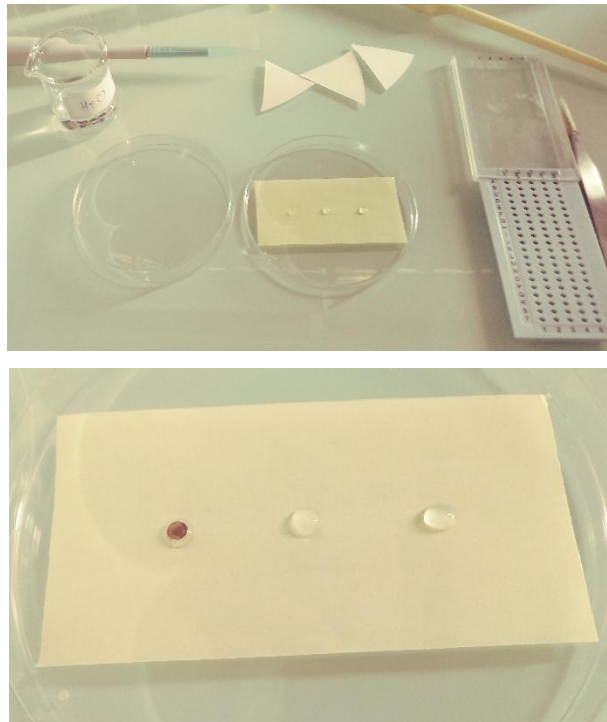


Figure I. 9. Technique d'habillage des grilles et de préparation de l'échantillon pour analyse au microscope électronique à transmission.

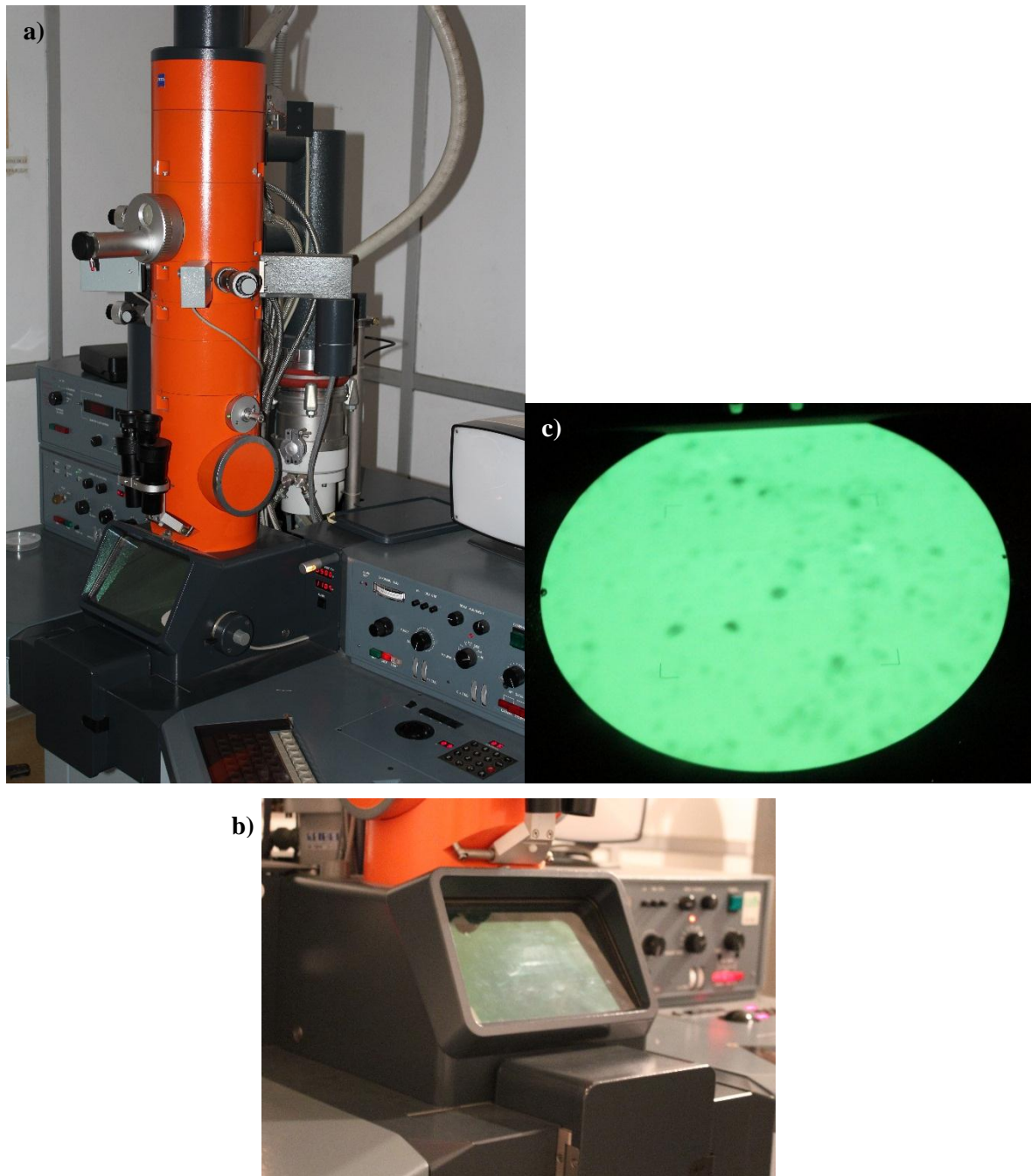


Figure I. 10. a) Microscope électronique à transmission EM900 Carl ZEISS®, b) écran d'observation du cliché, c) résultat de l'analyse au microscope.

3.2.6.2.5 Taille des gouttelettes, indice de polydispersité et potentiel zêta

Les résultats des mesures de la taille des gouttelettes, de l'indice de polydispersité et du potentiel zêta sont présentés sous forme de tableaux. Après 24 heures de repos, toutes les mesures suscitées sont faites sur un équipement de marque Zetasizer Nano ZS® Malvern (figure I.11).



Figure I. 11. Zetasizer Nano ZS® à droite de l'image en fonctionnement.

La diffusion dynamique de la lumière, appelée aussi « Dynamic Light scattering » (DLS en abréviations anglo-saxonnes), sert à mesurer la taille des particules et des molécules. Cette technique mesure la diffusion des particules soumises au mouvement brownien et calcule une distribution de taille des particules.

Nous introduisons dans une cellule un volume défini de NE sans aucune dilution ni filtration, en prenant la précaution d'éviter la génération de bulles d'air. Tapoter légèrement la cellule avant de mettre le couvercle. Placer ensuite cette cellule dans le sens indiqué sur l'appareil et lancer la mesure. On doit veiller à bien rincer la cellule après chaque mesure. En ce qui concerne le potentiel zêta, un autre type de cellule est utilisée tandis que la procédure reste la même.

Observer 15 minutes de repos après retournement des tubes et avant chaque mesure. Il est impératif de travailler dans les mêmes conditions à chaque fois et par le même opérateur. Les mesures sont répétées trois fois.

3.2.7 Résultats et discussions

Nous avons décrit précédemment notre approche méthodologique dans le développement de la nanoémulsion. Les résultats seront présentés chronologiquement dans l'ordre cité avec interprétation des résultats. Nous voulons souligner à chaque étape l'influence de chaque paramètre, appelé aussi variable ou facteur sur les attributs qualité de la NE formulée. Dans cette phase nous allons étudier l'effet de la composition quantitative de la formule sur les réponses, à savoir les caractéristiques macroscopiques de la NE obtenue (transparence et

absence de sédimentation). D'autres mesures complémentaires telles que la taille des particules, du potentiel zêta et de l'indice de polydispersité seront présentées après optimisation.

3.2.7.1 Analyse de criblage et étude statistique des résultats

Le plan de « Plackett et Burmann » semble parfait lorsque l'on dépasse 4 facteurs car le nombre d'expériences est considérablement réduit comparativement à l'usage d'un plan factoriel complet (Lepadatu 2006). Le plan retenu fut doublé pour vérifier si l'influence de chacun des facteurs reste reproductible et augmenter la puissance du plan.

Le tableau I.12 représente la matrice de « Plackett et Burman », ainsi que les réponses enregistrées après 24 heures de repos.

Tableau I. 12. Réponses enregistrées lors des essais de criblage.

N°	H/E	SOR	R	H/S	SDS	Y1 (cm)	Y2*
	Matrice						
1	1	-1	-1	1	-1	0,7	2
2	1	-1	-1	1	-1	0,7	2
3	1	1	-1	-1	1	0,8	1
4	1	1	-1	-1	1	0,8	1
5	1	1	1	-1	-1	0,3	1
6	1	1	1	-1	-1	0,3	1
7	-1	1	1	1	-1	0	1
8	-1	1	1	1	-1	0	1
9	1	-1	1	1	1	0,2	3
10	1	-1	1	1	1	0,2	3
11	-1	1	-1	1	1	0,6	1
12	-1	1	-1	1	1	0,6	1
13	-1	-1	1	-1	1	0	1
14	-1	-1	1	-1	1	0	1
15	-1	-1	-1	-1	-1	0,3	1
16	-1	-1	-1	-1	-1	0,3	1

*indice de transparence : 1) transparente, 2) légèrement trouble, 3) trouble.

Les coefficients de corrélation mesurent la variation de la réponse lorsqu'un facteur passe du niveau moyen (-1) au niveau (+1), tandis que les autres facteurs sont maintenus à leur niveau moyen (0). La qualité au sens statistique des résultats se mesure en calculant le R^2 , ce dernier est égal à 0,94 pour Y1 et à 0,93 pour Y2, ce qui indique à quel point le modèle explique les valeurs observées. Plus il est proche de 1 (>0,8), plus le modèle est bien ajusté.

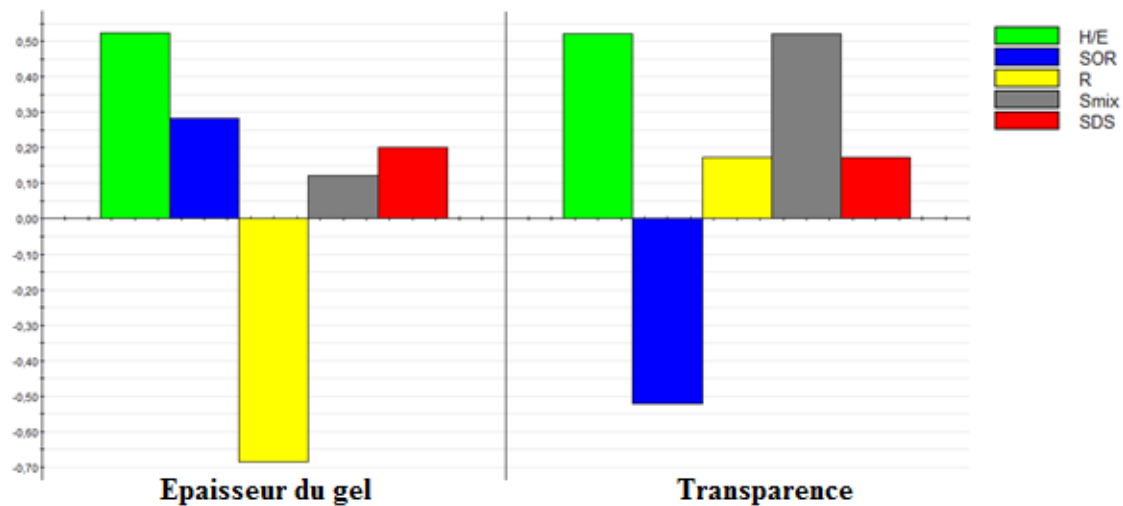


Figure I. 12. Représentation groupée des coefficients du modèle par facteur pour les réponses Y1 (épaisseur du gel) et Y2 (transparence).

Après analyse de l'influence des facteurs mis en jeu, nous avons constaté que la concentration en SDS n'a pas une influence significative sur les deux réponses. L'optimisation continue donc sans tenir compte de ce facteur.

D'après la figure I.12, il est clair qu'un rapport huile/solvant (H/S) élevé entraîne la formation d'une NE moins transparente, tandis qu'un rapport R élevé minimise l'apparition du gel. De son côté, la présence du T80 dans la phase huileuse, en forte proportion, est souhaitable pour garantir une transparence, ce qui s'accorde parfaitement avec les données de la littérature (Fissore 2014). Aussi, un rapport H/E proche de sa valeur supérieure est préférable pour l'obtention d'une émulsion sans gel et transparente.

Ces quatre facteurs sont évidemment fortement liés les uns aux autres, puisqu'on y retrouve un composant commun à savoir le T80, solubilisé dans la phase huileuse. Ce qui explique et valide l'interprétation des histogrammes mais également confirme l'influence du rapport R sur l'apparition du gel. Durant cette phase de criblage, on exclue de ce phénomène l'influence du SDS (ce dernier n'a presque pas d'influence sur les deux réponses Y1 et Y2), voir figure I.12.

Pour résumer, le facteur H/E agit positivement sur l'épaisseur du gel et la transparence alors que les facteurs R et SOR agissent négativement sur l'épaisseur du gel et la transparence, respectivement. Seul le S_{mix} affiche une action similaire et positive avec le facteur H/E sur la transparence du produit.

En effet, les figures I.13 et I.14 montrent clairement les effets de chaque facteur sur chacune des réponses sélectionnées dans notre étude, Y1 et Y2 respectivement. Un facteur est considéré comme significatif, donc influent, si l'intervalle de confiance (matérialisé par une barre au milieu de l'histogramme) ne coupe pas l'axe des abscisses, correspondant au zéro (Umetrics AB 2001). Les facteurs H/E et SOR (Surface Oil Ratio) sont considérés comme importants, auxquels nous pouvons rajouter le facteur R et S_{mix}. Le SDS sera fixé à sa concentration minimale (0,25g/50g) pour l'étape de l'optimisation des surfaces de réponses, car son pouvoir moussant peut poser problème lors de l'agitation. Par précaution, il est logique de maintenir le SDS présent dans la formule, pour les propriétés avantageuses qu'il présente en tant que stabilisant.

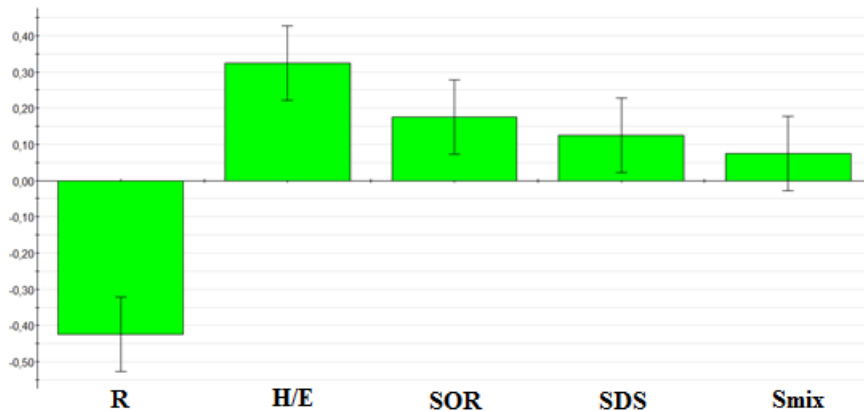


Figure I. 13. Histogrammes de l'influence des coefficients sur l'épaisseur du gel (Y1).

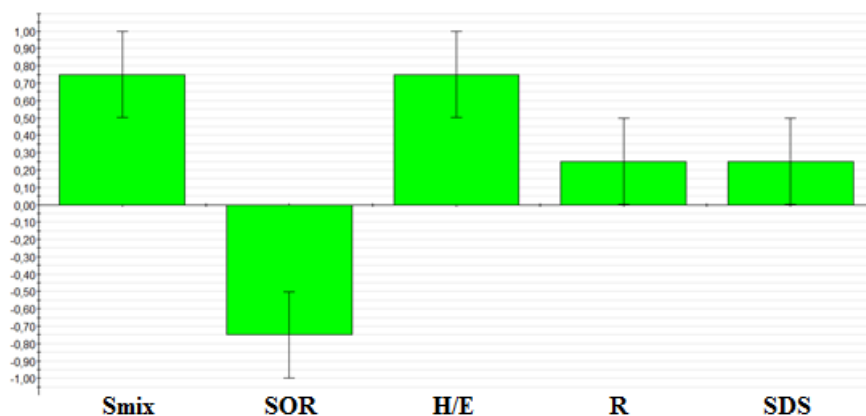


Figure I. 14. Histogrammes de l'influence des coefficients sur la transparence (Y2).

3.2.7.2 Analyse des surfaces de réponses

Dans cette étape d'optimisation de la formule, le nombre de facteurs se résume à quatre (H/E, SOR, R et H/S). La matrice du plan composite centré cubique ainsi que les réponses enregistrées sont présentés dans le tableau I.13. La caractérisation est faite après 24 heures de repos.

Tableau I. 13. Matrice du plan composite centré cubique et réponses enregistrées.

N°	H/E	SOR	R	H/S	Y1 (cm)	Y2*
1	-1	-1	-1	-1	0	1
2	1	-1	-1	-1	0,7	1
3	-1	1	-1	-1	0	1
4	1	1	-1	-1	0,9	1
5	-1	-1	1	-1	0	1
6	1	-1	1	-1	0	1
7	-1	1	1	-1	0	1
8	1	1	1	-1	0,2	1
9	-1	-1	-1	1	0	3
10	1	-1	-1	1	0,7	3
11	-1	1	-1	1	0	1
12	1	1	-1	1	0,9	3
13	-1	-1	1	1	0	3
14	1	-1	1	1	0	3
15	-1	1	1	1	0	1
16	1	1	1	1	0,1	2
17	-1	0	0	0	0	1
18	1	0	0	0	0,4	1
19	0	-1	0	0	0	2
20	0	1	0	0	0	1
21	0	0	-1	0	0,7	1
22	0	0	1	0	0	1
23	0	0	0	-1	0	1
24	0	0	0	1	0	2
25	0	0	0	0	0	1
26	0	0	0	0	0	1
27	0	0	0	0	0	1
28	0	0	0	0	0	1
29	0	0	0	0	0	1

**indice de transparence : 1) transparente, 2) légèrement trouble, 3) trouble.*

La figure I.15 montre clairement la même tendance que celle retrouvée dans l'analyse des résultats du criblage. L'effet des facteurs (H/E, SOR, R et H/S) sur Y1 et Y2 concorde bien

avec les résultats précédents pour ces mêmes facteurs et les mêmes réponses, appuyé par la forme quadratique du modèle pour certains facteurs (R^2 , SOR^2 et H/S^2). Le facteur H/E agit positivement sur l'épaisseur du gel et la transparence, alors que les facteurs R et SOR agissent négativement sur l'épaisseur du gel et la transparence. En revanche, plus le S_{mix} (H/S) est élevé, plus la préparation est trouble.

Par ailleurs, l'interaction entre facteurs H/E*R présente une influence non négligeable sur Y1. De même pour les interactions suivantes concernant Y2, citons H/E*SOR, H/E*H/S et SOR*H/S.

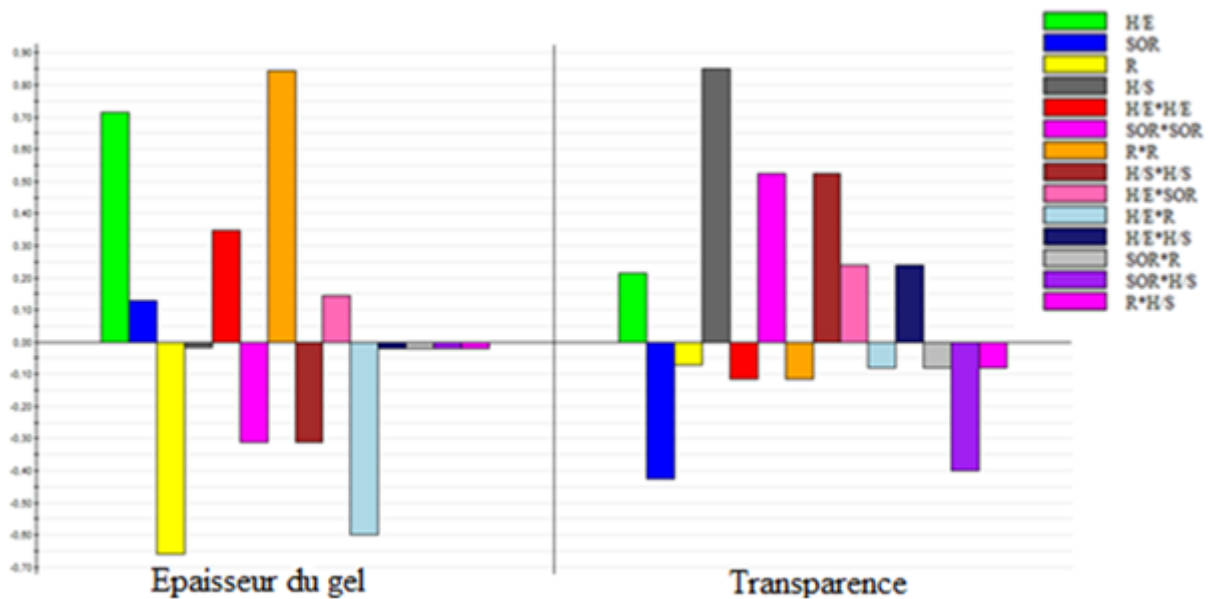


Figure I. 15. Représentation groupée des coefficients normalisés pour l'analyse de surface de réponses.

3.2.7.2.1 Validation du modèle proposé

La modélisation passe par la vérification du modèle proposé, qui se fera par le calcul du coefficient de détermination R^2 . La qualité du modèle polynomial est appréciée par une valeur de R^2 proche de l'unité. Pour un bon ajustement du modèle, le R^2 doit être supérieure à 0,8 (Pérez-Mosqueda 2015).

Les valeurs R^2 égale à 0,966 et R^2 ajusté égale à 0,933, signifient que la réponse Y1 est très bien expliquée par le modèle, ce qui est illustré par la figure I.16. L'équation du modèle permet aussi d'expliquer la réponse Y2 avec un coefficient R^2 égal à 0,954 et R^2 ajusté égal à 0,880

(figure I.17). Les résultats obtenus confirment que les valeurs enregistrées sont très proches des valeurs prédites.

Les valeurs élevées des coefficients de détermination (R^2) des deux réponses indiquent une bonne qualité descriptive du modèle. En effet, les figures I.16 et I.17 illustrent bien la relation entre les valeurs enregistrées et les valeurs prévues par le logiciel, qui se traduit par une courbe ayant l'allure d'une droite.

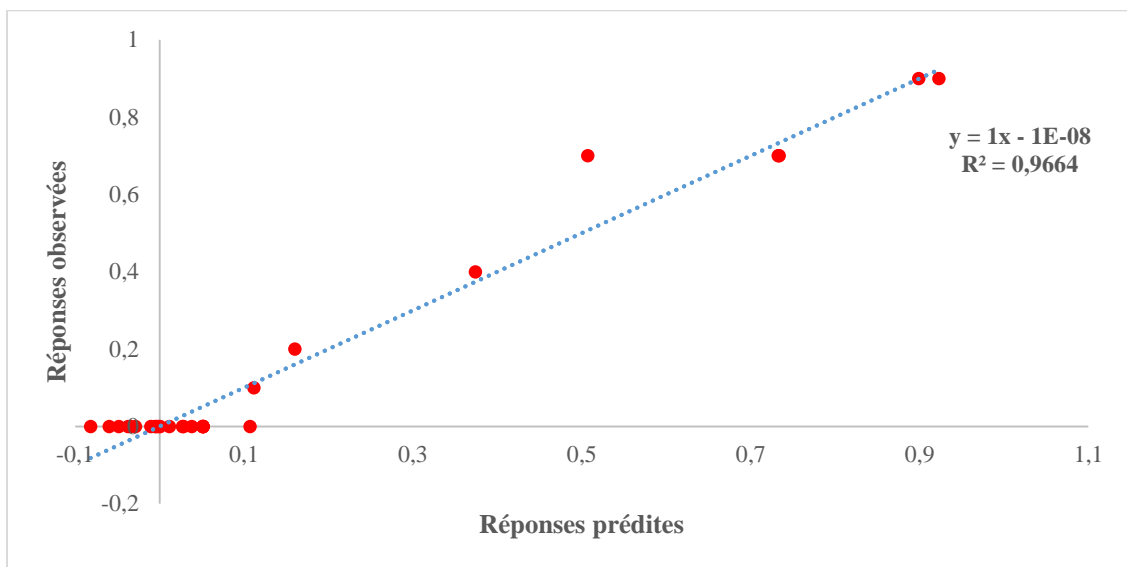


Figure I. 16. Représentation graphique des valeurs observées (axes des ordonnées) en fonction des valeurs estimées (axes des abscisses) de l'épaisseur du gel (Y1).

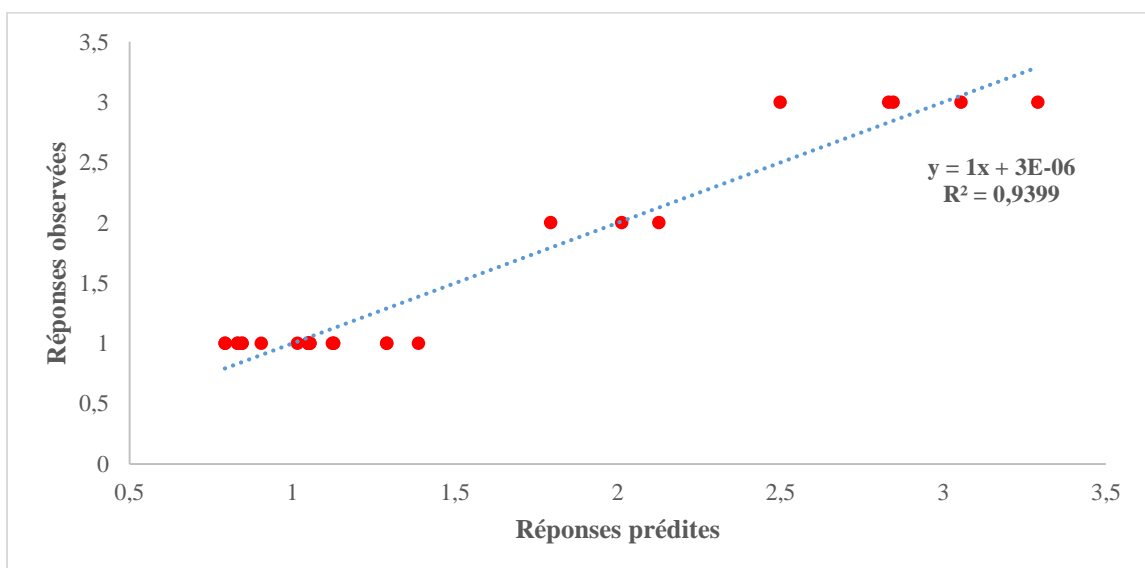


Figure I. 17. Représentation graphique des valeurs observées (axes des ordonnées) en fonction des valeurs estimées (axes des abscisses) de la transparence (Y2).

3.2.7.2.2 Facteurs significatifs

Un facteur est dit significatif lorsque l'intervalle de confiance, matérialisé par une barre au milieu de son histogramme qui ne coupe pas l'axe des abscisses (le zéro). Au seuil de signification de 5%, les facteurs significatifs pour l'épaisseur du gel sont les termes linéaire et quadratique du rapport T80/PVA (R), ainsi que le terme linéaire H/E avec son interaction H/E*R, H/E*SOR et son terme quadratique H/E*H/E (figure I.18). Ces données confortent notre hypothèse concernant l'apparition du gel avec une influence négative de R sur la réponse étudiée, c'est-à-dire qu'un PVA en excès entraîne inévitablement l'apparition du phénomène de désolvation.

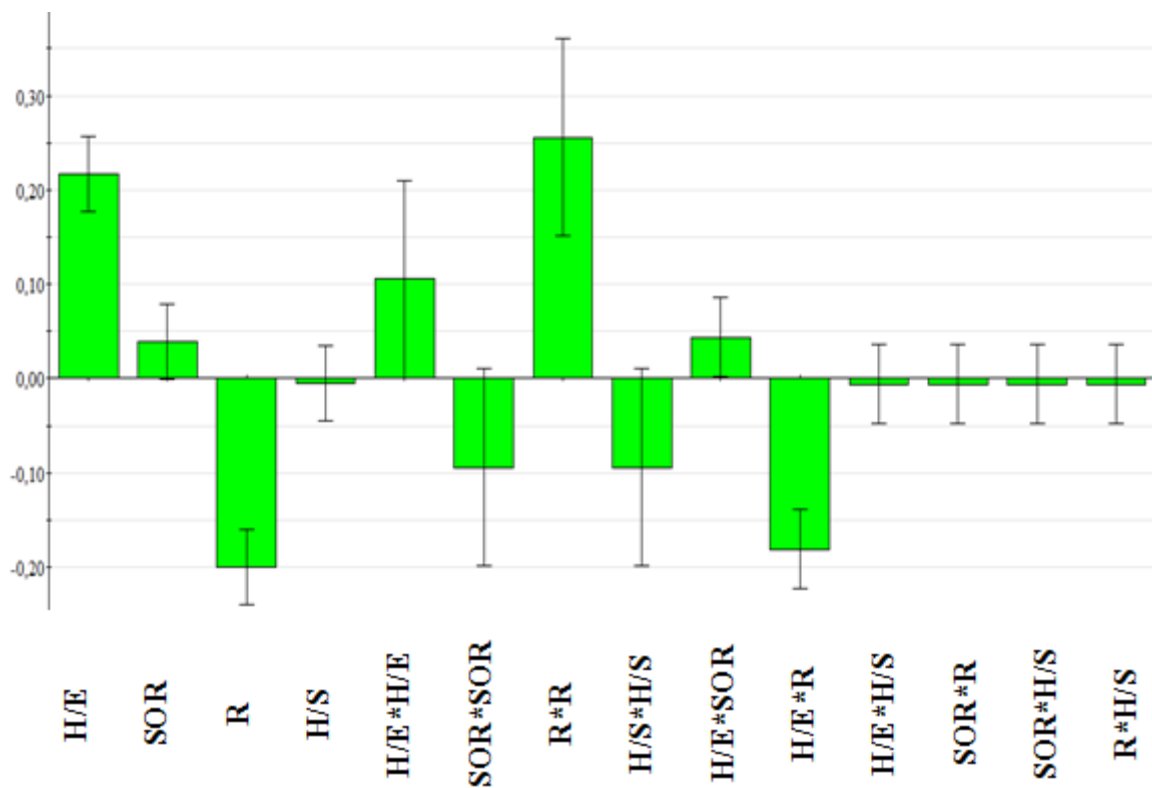


Figure I. 18. Histogrammes de l'influence des coefficients sur l'épaisseur du gel (Y1).

De la même manière, la transparence de la préparation est influencée par plusieurs facteurs à savoir H/E, SOR et H/S, à travers leurs termes linéaire mais également les termes quadratiques (SOR^2 et H/S^2), ainsi que certaines de leur interactions, telles que H/E*SOR, H/E*H/S et SOR*H/S (figure I.19). Selon la littérature, dans une NE contenant le T80, lorsque son rapport à sa phase huileuse est élevé, l'émulsion gagne en transparence (Komaiko 2015a). Aussi, les émulsions les plus transparentes sont celles dont la fraction huileuse est importante dans la

phase organique (Leong 2009; Abbas 2013). Les données récoltées dans notre étude sont en parfait accord avec la littérature.

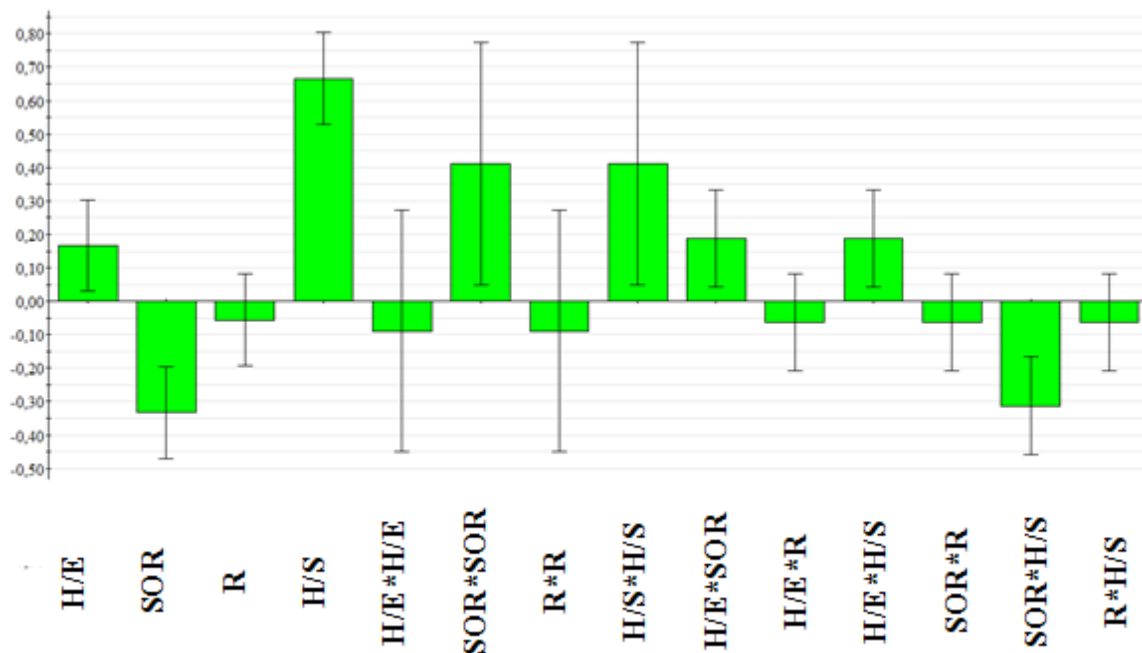


Figure 1. 19. Histogrammes de l'influence des coefficients sur la transparence (Y2).

3.2.7.2.3 Analyse de la variance (ANOVA)

L'analyse de la variance se fait en comparant le F-value ($F_{\text{observé}}$) avec le F_{critique} de la table de Fisher. Si le F de Fisher expérimental ($F_{\text{observé}}$) est supérieur à la valeur F de Fisher donnée par les tables (F_{critique}), les variations des réponses mesurées sont bien dues aux variations des facteurs et le modèle sera jugé valide.

Soit :

$$H_0 : F_{\text{observé}} = F_{\text{critique}}$$

$$H_1 : F_{\text{observé}} \geq F_{\text{critique}}$$

Test de l'hypothèse H_1 :

Si $F_{\text{observé}} \geq F_{\text{critique}}$, l'hypothèse H_1 est acceptée pour $F_{\text{critique}} = F(\alpha, v_1, v_2)$

où :

α est le risque d'acceptation de l'hypothèse H_1 , fixé à 5%.

v_1 et v_2 sont les degrés de liberté du numérateur et respectivement du dénominateur de l'équation suivante (pour le calcul de F_{critique}) :

$F_{\text{Critique}} = F(\text{SCF/SCE}) = F(0.05, 14, 14) = 2,48$; au seuil de signification $\alpha = 0,05$.

(voir table de Fisher-Snedecor en annexe 1).

La valeur F de Fisher est donnée par le Logiciel (tableau I.14) et peut également être calculée, en établissant le rapport du carré moyen du modèle (0,177435) à celui des résidus (0,0061611). Par ailleurs, les modèles avec des valeurs de *P*-value proche de zéro sont statistiquement significatifs et considéré comme appropriés pour décrire la réponse étudiée correspondante. D'après le tableau de l'analyse de la variance ci-dessous, le *p*-value est égal à zéro et le $F_{\text{observé}}$ est supérieur au F_{critique} .

Tableau I. 14. Analyse de la variance pour la réponse Y1 (épaisseur du gel) et Y2 (transparence).

<i>Y1</i>	<i>Sommes des carrés</i>	<i>DDL</i>	<i>Carré moyen</i>	<i>F-value</i>	<i>F critique</i>	<i>P-value</i>
Régression	2,48409	14	0,177435	28,7992	2,48	0,000
Résidus	0,0862555	14	0,0061611			
Constant	0,729655	1	0,729655			
Total	3,3	29	0,113793			
<i>Y2</i>	<i>Sommes des carrés</i>	<i>DDL</i>	<i>Carré moyen</i>	<i>F-value</i>	<i>F critique</i>	<i>P-value</i>
Régression	16,1402	14	1,15287	15,6363	2,48	0,000
Résidus	1,03223	14	0,0737306			
Constant	60,8276	1	60,8276			
Total	78	29	2,68966			

Comme $F_{\text{observé}} \geq F_{\text{critique}}$, le modèle est valide.

L'ANOVA nous donne aussi les facteurs ou interactions significatifs. Le tableau I.15 confirme que les facteurs H/E, R, R*R, H/E*R, H/E*SOR, H/E² sont significatifs pour la réponse Y1 (valeurs en gras dans la colonne *P*-value), ce qui était à priori attendu. Les données recueillies confirment également l'effet linéaire et quadratique des facteurs SOR et H/S pour la réponse Y2.

Pour conclure, les résultats de l'analyse montrent bien qu'il existe une relation entre les différents facteurs et les deux réponses Y1 et Y2.

Tableau I. 15. Les effets des facteurs pour la réponse Y1 et Y2.

<i>Variable</i>	<i>P-value (Y1)</i>	<i>P-value (Y2)</i>
<i>H/E</i>	1,28e-08	0,02081
<i>SOR</i>	0,0541326	0,00013
<i>R</i>	3,53e-08	0,40001
<i>H/S</i>	0,768369	5,62E08
<i>H/E*H/E</i>	0,0481815	0,60642
<i>SOR*SOR</i>	0,073772	0,02892
<i>R*R</i>	0,00012565	0,60642
<i>H/S*H/S</i>	0,0737721	0,02892
<i>H/E*SOR</i>	0,0426694	0,01528
<i>H/E*R</i>	2,47517e-007	0,3728
<i>H/E*H/S</i>	0,754807	0,01528
<i>SOR*R</i>	0,754807	0,3728
<i>SOR*H/S</i>	0,754807	0,00041
<i>R*H/S</i>	0,754807	0,3728

3.2.7.2.4 Analyse des résidus

En complément de cette analyse statistique, il faut s'assurer que les résidus soient distribués de manière aléatoire et qu'ils ne soient pas anormalement importants, en fonction des réponses étudiées.

La figure I.20 décrit la normalité de la distribution aléatoire. En effet, les résidus sont distribués de façon homogène tout le long de la droite.

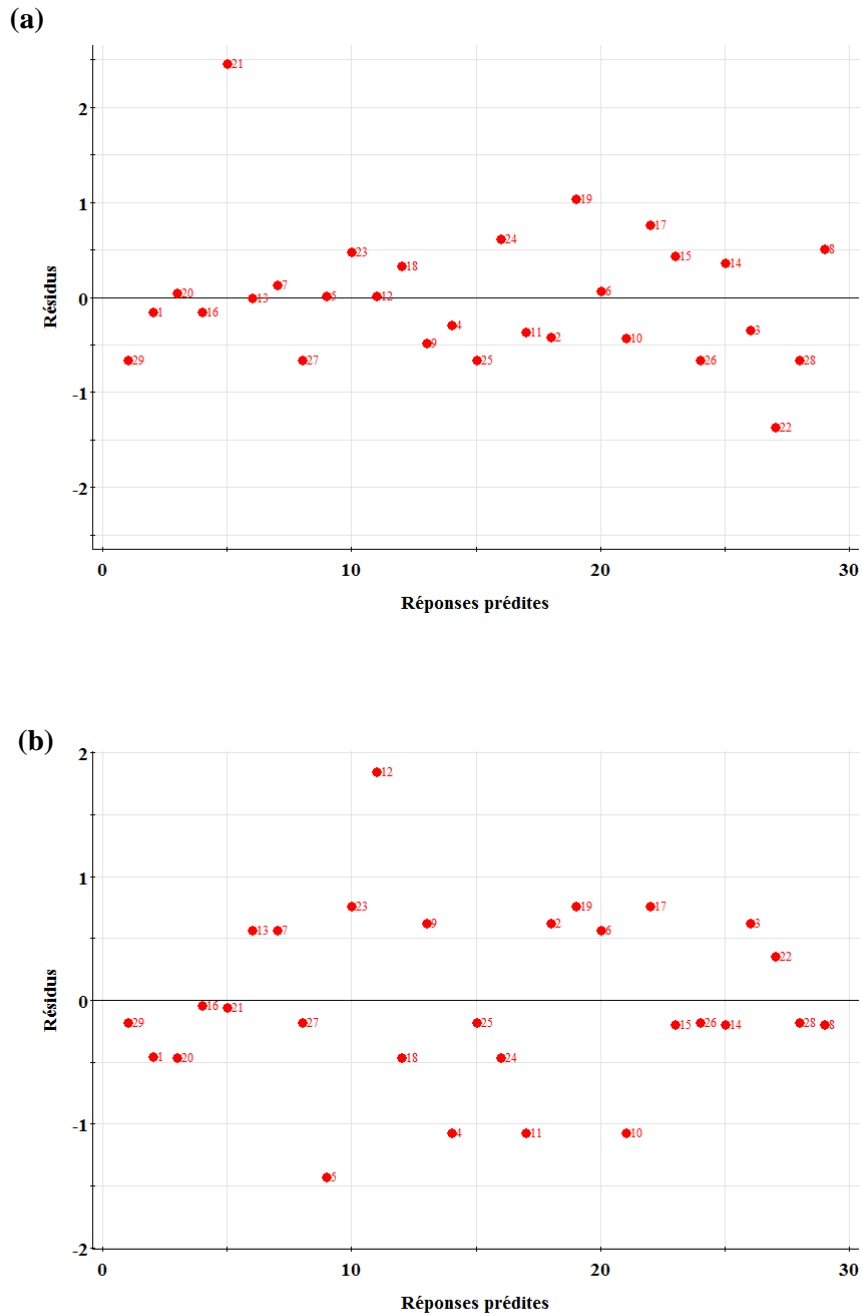


Figure I. 20. Evolution des résidus (axes des ordonnées) en fonction des réponses prédites (axes des abscisses), (a) épaisseur du gel, (b) transparence.

3.2.7.2.5 Expression du modèle mathématique et domaine optimal

L'analyse statistique des résultats montre qu'au seuil de 5%, l'épaisseur du gel (cm) peut être décrite par le modèle suivant:

$$Y_I = \beta_0 + \beta_1 * H/E + \beta_3 * R + \beta_{1^2} * H/E^2 + \beta_{3^2} * R^2 + \beta_{1-2} * H/E * R + \beta_{1-3} * H/E * R \quad (\text{éq.3})$$

Il en résulte de l'application numérique :

$$Y_1 = 0,051 + 0,217 * H/E - 0,2 * R + 0,106 * H/E^2 + 0,256 * R^2 + 0,044 * H/E * SOR - 0,181 * H/E * R$$

D'après l'équation, on peut noter une grande influence de nature positive du facteur H/E sur l'augmentation de l'épaisseur du gel. En revanche, les valeurs Y1 sont satisfaisantes pour un R autour de la moyenne. A ce stade, nous cherchons un compromis entre les différents facteurs significatifs pour une optimisation des réponses, ce qui est clairement illustré dans la figure I.21.

En effet, pour minimiser la réponse Y1 (la rendre nulle), il faut se tourner vers des valeurs entre 10% et 15% du facteur H/E et des valeurs très proches de la moyenne ($\frac{2+10}{2}$) pour le facteur R, à savoir 6. De fortes valeurs d'H/E combinées aux faibles valeurs de R doivent être évitables. Parallèlement à cela, il est tout à fait prévisible d'obtenir rapidement une réticulation lorsque le SOR est élevé.

Il faudrait donc trouver le juste compromis entre le rapport R et H/E pour obtenir les meilleures NEs.

La transparence est décrite par l'équation 4. Ce caractère dépend de plusieurs facteurs et de leurs interactions.

Le modèle qui décrit la réponse Y2 est exprimé par l'équation suivante :

$$Y_2 = \beta_0 + \beta_1 * H/E + \beta_2 * SOR + \beta_4 * H/S + \beta_2^2 * SOR^2 + \beta_4^2 * H/S^2 + \beta_{1-2} * H/E * SOR + \beta_{1-4} * H/E * H/S + \beta_{2-4} * H/S * SOR \text{ (éq.4)}$$

L'expression numérique du modèle est la suivante :

$$Y_2 = 1,409 + 0,167 * H/E - 0,333 * SOR + 0,667 * H/S + 0,411 * SOR^2 + 0,188 * H/S^2 + 0,188 * H/E * SOR + 0,188 * H/E * H/S - 0,313 * H/S * SOR$$

La figure I.21 représente les surfaces de réponse pour les effets significatifs des interactions des facteurs pour la réponse Y1 et Y2.

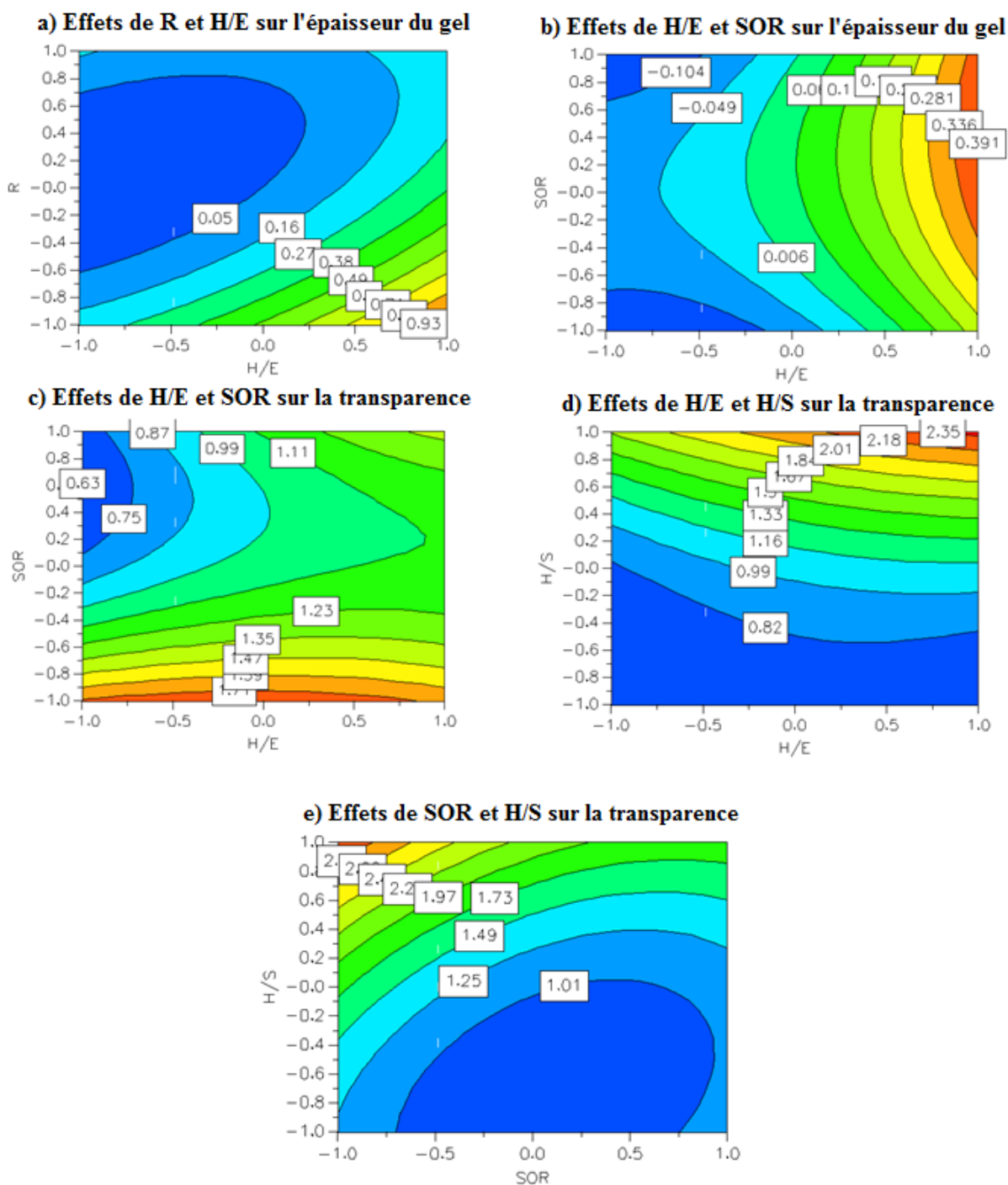


Figure I. 21. Courbes iso-réponse représentant la variation de l'épaisseur du gel (Y_1) et de la transparence (Y_2) en fonction des variations de facteurs.

L'équation 4 montre que toutes les émulsions considérées comme étant transparentes sont formulées en respectant des valeurs de SOR plus ou moins élevées, un rapport H/E autour de la moyenne et en présence de proportions élevées en solvant organique comparativement à l'huile (H/S). Toutes ces notifications sont clairement représentées dans les courbes des iso-réponses

de Y2 (courbes c, d et e de la figure I.21). Il est connu que la concentration en tensioactif favoriserait la réduction de la taille des particules (Komaiko 2015a). D'autant plus que le caractère hydrophile de celui-ci peut affecter positivement la libération du PA, avec observation du phénomène de « burst effect » (Hansali 2012). On peut donc affirmer qu'une forte proportion de T80 dans une phase organique contenant un rapport important de solvant garantit la réussite de la nanoémulsification, comme le démontre la figure I.21 c et e.

Pour résumer, toutes ces représentations schématiques qui correspondent aux chemins d'émulsification en rapport avec les réponses Y1 et Y2, nous permettent de supposer que les meilleures formules sont obtenues avec un rapport H/E entre 10% et 15%, un rapport H/S des plus faibles est souhaitable et un ratio SOR des plus importants pour garantir une transparence. Par ailleurs, un rapport R autour de la moyenne semble limiter l'avènement d'une réticulation et vise à la création d'un réseau tridimensionnel au sein de la préparation.

Dans l'étape suivante, nous saurons apprécier cette hypothèse et la valider grâce au module « *Optimizer* » du Modde®6.

3.2.7.2.6 Phase d'optimisation

L'objectif est de déterminer les paramètres de formulation optimales communes aux deux réponses Y1 et Y2 simultanément :

- Minimiser Y1 (le rendre nulle) ;
- Minimiser Y2 (obtenir le score 1).

Ces deux critères n'ont pas d'optimums de composition communs. Nous allons donc les rechercher à travers le module « *Optimizer* » du logiciel Modde®6. Le logiciel opère un ensemble de compromis acceptables, de manière analytique pour optimiser la fonction de désirabilité globale, en tenant compte des contraintes du système.

Les propriétés désirées pour la formule, ainsi que les réponses renvoyées par le logiciel sont illustrées dans la figure I.22. Les huit formules proposées aboutissent toutes à des NEs stables et transparentes.

Dans ce qui suit, nous tenterons de dégager les différentes propositions du logiciel et orienter notre choix en fonction des objectifs attendus.

(a)

	Factor	Role	Value	Low Limit	High Limit
1	OWR	Free		-1	1
2	SOR	Free		-1	1
3	T80/PVA	Free		-1	1
4	H/S	Free		-1	1

	Response	Criteria	Weight	Min	Target	Max
1	Epaisseur gel	Target	1	0	0,0001	0,001
2	transparent	Target	1	0,9	1	1,1

(b)

Iteration: 54 Iteration slider: _____

	1	2	3	4	5	6	7	8
	OWR	SOR	T80/PVA	H/S	Epaisseur gel	transparent	iter	log(D)
1	-0,2683	-0,0877	0,6077	0,0166	0,0004	0,9913	48	-1,1211
2	-0,1194	0,1257	0,2626	0,028	0,0001	0,9851	28	-1,9114
3	-0,2194	0,3718	0,0348	0,0862	0,0002	0,9697	36	-1,2521
4	-0,3358	0,5232	-0,1517	0,1941	0,0003	0,9986	44	-1,7882
5	-0,189	0,0362	0,1102	-0,0008	0,0001	0,9944	46	-1,8732
6	0,3586	0,8737	0,7065	-0,8596	0,0004	0,9855	35	-1,1026
7	-0,9871	0,5755	0,8296	0,77	0,0001	0,9852	54	-1,4787
8	0,1332	0,8154	0,0522	-0,751	0,0003	0,991	46	-1,4525

Figure I. 22. Phase d'optimisation exécutée par le logiciel et solutions proposées à travers l'image scannée du logiciel. (a) propriétés désirées pour les réponses Y1 et Y2, (b) solutions proposées par l'optimiseur.

D'après ces données, les compositions proposées (en valeurs codées) par le logiciel s'accordent avec l'interprétation des résultats obtenus et l'analyse des courbes iso-réponses.

Comme nous l'avons prédit, le facteur H/E se concentre entre 0 (valeur au centre) et -1 (valeur minimale). SOR tend plutôt vers les valeurs positives et varie entre 0 et 1 (valeur maximale). La plupart des valeurs de R et de H/S tournent autour de la valeur au centre du domaine expérimental.

La solution la plus adéquate est mise en évidence par le logiciel et correspond à la proposition « 2 », (encadrée en rouge). Cette dernière est acceptée par le formulateur en raison des réponses qu'elle renvoie, mais également des proportions mises en jeu qui correspondent au profil du produit recherché (critère de faisabilité qui n'est pas pris en compte par le logiciel).

Les conditions optimales proposées sont vérifiées expérimentalement par le formulateur et répétées 3 fois. Les réponses Y1 et Y2 doivent être estimées à la fin et correspondre aux valeurs prédites par le logiciel.

En effet, les résultats de la caractérisation macroscopique correspondent bien à nos attentes et sont en adéquation avec les valeurs données par le logiciel ($Y1=0$ cm et $Y2=1$). Les dispersions obtenues étaient toutes transparentes et stables, ce qui confirme la validation du modèle mathématique.

3.2.7.2.7 Caractérisation physicochimique

a) Matériels et méthodes

La formule ainsi retenue fut reconduite en trois fois afin de subir une caractérisation physicochimique (taille des particules, PdI et potentiel zêta) sur le Zetasizer Nano ZS[®] ainsi qu'une observation au microscope électronique à transmission. Pour cette dernière méthode l'échantillon subit un traitement spécial à base d'acétate d'uranyle. L'observation de l'échantillon fixé sur microgrilles est faite sur un microscope EM900 Carl ZEISS[®].

Aussi, la turbidité et le pH des NEs obtenues sont mesurés sur un turbidimètre HANNA Instruments[®] modèle HI88703 et un pH mètre METTLER TOLEDO[®], respectivement, après étalonnage.

b) Résultats et discussion

Les principales caractérisations physicochimiques effectuées sont présentées dans le tableau I.17. Une observation macroscopique s'impose pour s'assurer de la transparence de la nanoémulsion et de sa parfaite limpidité (figure I.23).

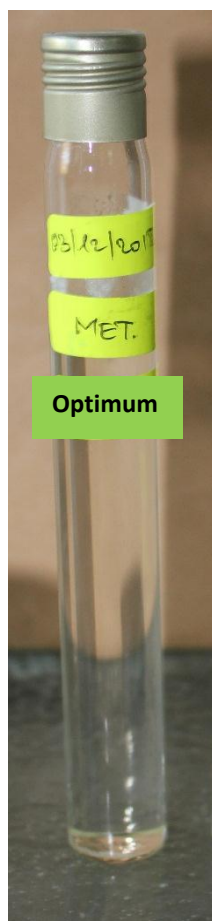


Figure I. 23. Nanoémulsion à base de PVA-Tween[®]80-SDS.

Tableau I. 16. Caractérisations physicochimiques de la NE après la phase d'optimisation des paramètres de formulation.

Préparation	Z-average (nm)*	PdI ¹ *	Potentiel zêta (mV)*	Turbidité (NTU) ² *	pH
1	54,62	0,565	-24	19,9	7,09
2	50,65	0,619	-24	20,4	6,92
3	45,05	0,678	-23	19,6	7,08

¹ pour une distribution monomodale les valeurs se situent entre 0,25 et 0,5

²Nephelometric Turbidity Unit

*Mesures faites après 24 heures de repos

Les résultats de la caractérisation confirme qu'il s'agit bien d'une nanoémulsion avec un potentiel zêta des plus satisfaisants (± 30 mV).

En outre, la turbidité est un critère couramment utilisé pour évaluer la stabilité et confirmer si l'équilibre est atteint (Gursoy 2004), mais surtout apprécier la transparence du produit (Ali 2016a). La méthode utilisée ne nécessite aucune dilution de l'échantillon. Elle s'effectue dans

le spectre visible (à 600 nm dans la plupart des études) (Saber 2013a; Zhang, J., 2016). Les valeurs des mesures sont très acceptables et rentrent dans la gamme d'étalonnage correspondant à des formulations parfaitement transparentes.

La figure I.24 permet d'apprécier la distribution de taille des gouttelettes dispersées, on en distingue facilement le caractère monomodale de la courbe. En effet, cette dernière fait apparaître un seul pic et montre que la majeure partie de la population des particules dispersées possède une taille qui avoisine 50 nm avec une superposition des graphes de chaque NE mesurée (mesure répétée trois fois).

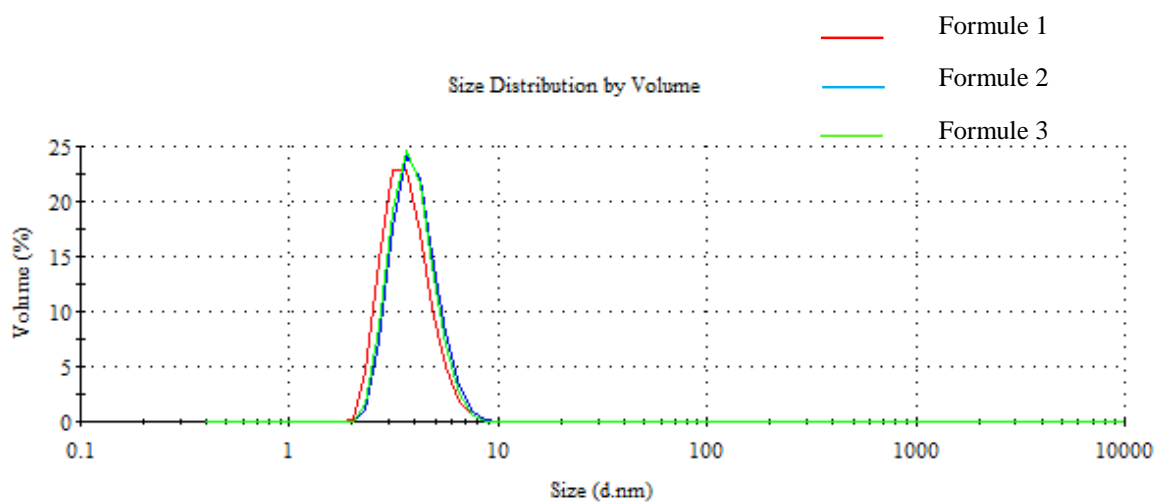


Figure I. 24. Distribution des diamètres des nanogouttelettes de la formule sélectionnée à l'issue des essais préliminaires.

L'analyse au MET (microscope électronique à transmission) nous permet d'attester de la présence de particules sphériques uniformément distribuées après ajout de l'acétate d'uranyle et séchage. Les nanogouttelettes apparaissent bien différenciées dans les figures I.25, I.26 et I.27, sous formes de spots noirâtres parfaitement individualisés par endroit.

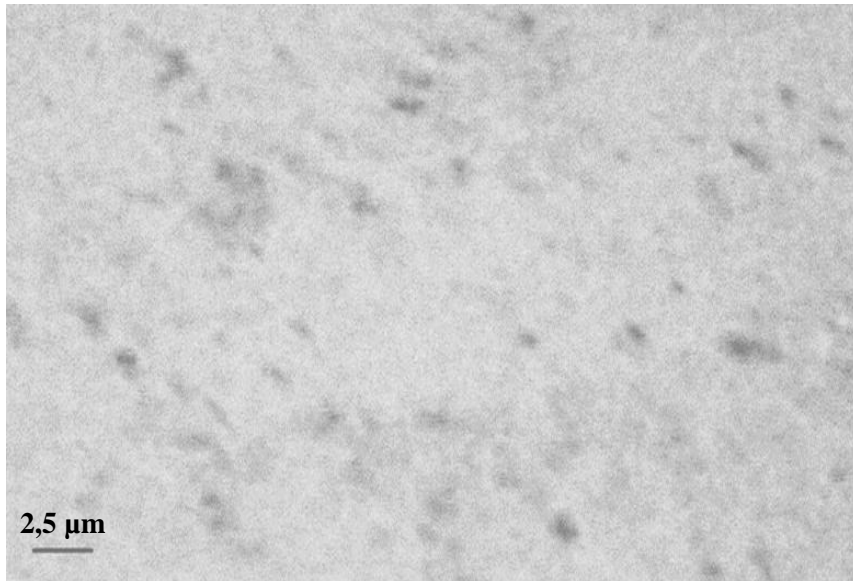


Figure I. 25. Observation de la nanoémulsion au microscope électronique à transmission avec une magnification de 2800.

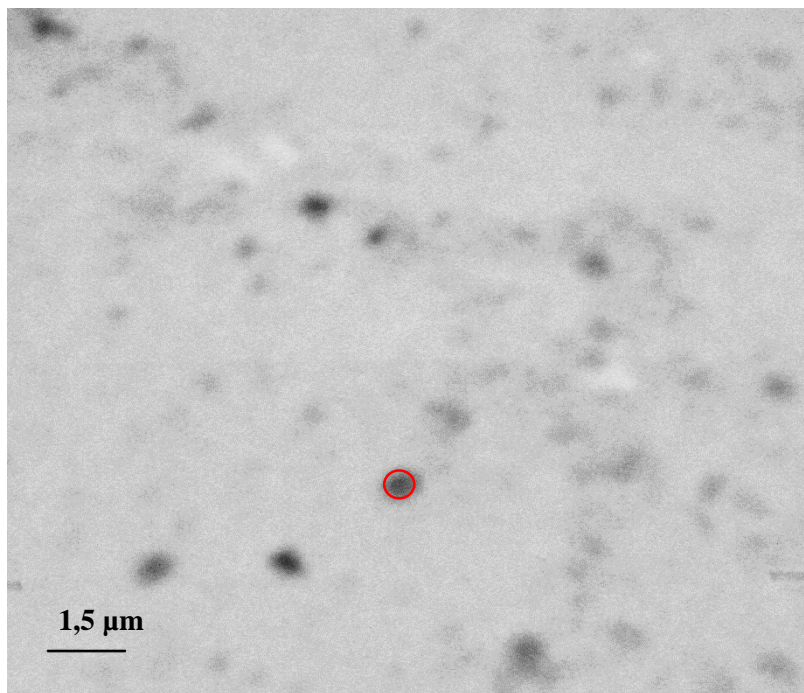


Figure I. 26. Observation de la nanoémulsion au microscope électronique à transmission avec une magnification de 4800.

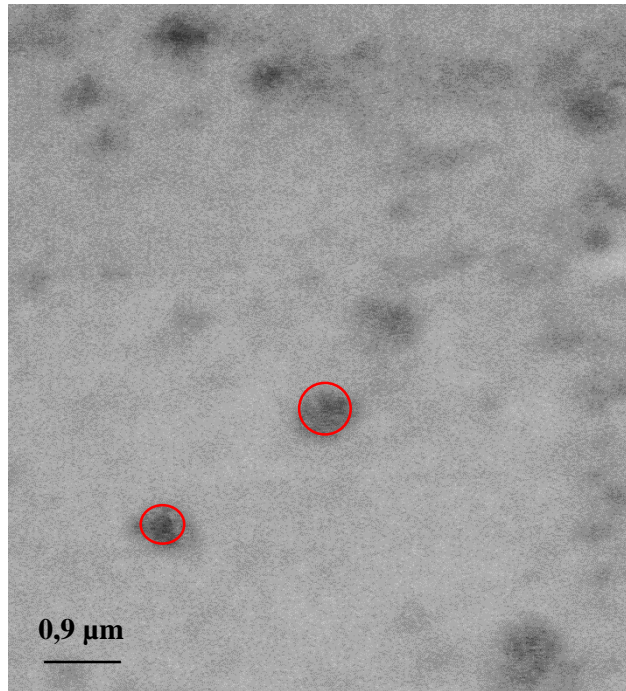


Figure I. 27. Observation de la nanoémulsion au microscope électronique à transmission avec une magnification de 8000.

Conclusion

Dans le but de définir une composition quantitative et qualitative satisfaisante en termes de qualité physique, on a adopté une démarche par MPE en plusieurs étapes.

Une première étape a consisté à établir un plan de criblage afin de mieux identifier et valider les composants susceptibles d'être influents.

29 expériences ont été planifiées dans une seconde étape, permettant d'étudier l'influence de la composition qualitative et quantitative sur les caractères physiques et macroscopiques de chacune des dispersions obtenues.

Un ensemble de formules acceptables ont été définies par la MSR. Un classement de propositions a été présenté par le logiciel. Et compte tenu des préférences envisagées pour Y1 et Y2, nous avons sélectionné la formule qui nous garantit les meilleures réponses. Cette dernière fut caractérisée avec des résultats qui correspondent aux objectifs attendus.

Les résultats de cette étude préliminaire montrent que la validité du modèle est confirmée et peut donner satisfaction, en termes de stabilité physique et de transparence. Ce profil de formule nous permet d'entamer la prochaine étape du développement de la NE, à savoir l'étude de l'impact des paramètres opératoires sur d'autres attributs qualité, en l'occurrence la taille des particules, l'indice de polydispersité et le potentiel zêta.

CHAPITRE II :
Stratégie
d'optimisation du
procédé de préparation
des nanoémulsions

Introduction

Dans ce chapitre, nous rappellerons très brièvement le procédé retenu pour le développement de notre NE. Ce dernier fut sélectionné après la réussite des études d'orientation et essais préliminaires, détaillés dans le chapitre précédent.

Nous nous focaliserons essentiellement sur les paramètres opératoires qui vont nous servir à moduler le procédé de préparation et l'adapter à la formulation de base qui a subi une phase d'optimisation.

Une attention particulière sera accordée à la caractérisation physico-chimique des NEs obtenues, et ce durant les phases de criblage et d'optimisation. En effet, la variabilité des paramètres opératoires relatifs à chaque étape de préparation et la particularité des équipements mis en jeu, nous a incités à choisir encore une fois la méthodologie des plans d'expériences. Cette méthode peut répondre efficacement à nos objectifs. Ceux d'obtenir via un procédé moins énergivore et peu coûteux des NEs transparentes et demeurant stables.

Dans le précédent chapitre, nous avons défini la MPE et ses différentes étapes ainsi que les outils nécessaires pour mener à bien l'optimisation. Nous allons appliquer encore une fois cette démarche sur la même formule à chaque fois, tout en respectant les variations des paramètres opératoires dictées par le plan d'expérience établi.

1 Problématique

L'optimisation des paramètres opératoires est tout aussi importante que l'optimisation des variables de composition. L'approche s'appuie sur la détermination de l'impact que peut avoir une variation de la température ou de la vitesse d'agitation sur la taille des particules, l'indice de polydispersité et le potentiel zêta.

En effet, la température de la phase organique doit être prise en considération, surtout en présence de tensioactifs non ioniques. Ce paramètre doit avoisiner la TIP sans pour autant la dépasser, pour éviter une inversion de phase d'une part et garantir une réduction de la tailles des particules d'autres part (Santana 2013; Singh 2017). Vient ensuite le temps d'émulsification qui a montré une influence surtout en présence de fortes proportions de surfactif (Ghosh 2014).

D'autre part, l'usage de contenant à fond non arrondi risquerait de compromettre la formation d'une NE stable, par la création de zones visqueuses aux angles aigus du contenant (Solè 2006). Pour cela, nous veillerons à ce que tous nos béciers soient les mêmes et aient des angles arrondies pour faciliter le flux liquidien.

En ce qui concerne la vitesse d'agitation, les auteurs ne s'accordent pas sur son influence. Cependant, lorsque celle-ci devient importante, elle devient facteur influent (Santana 2013).

Toutes ces variables peuvent avoir un impact significatif sur les attributs qualité de notre NE, plus particulièrement sur la taille des gouttelettes. Pour cela, nous avons prévu de faire une optimisation complète de la préparation de la NE.

Pour résumer; dans cette partie seront abordés les différents paramètres du procédé qui seront appliquées à la préparation des NEs. Différentes configurations du procédé de fabrication seront testées pour ensuite établir une configuration finale acceptable. Par le biais de la modélisation, nous pouvons prédire l'évolution des attributs qualité de la NE, en fonction des conditions opératoires dans le domaine expérimental étudié.

2 Fabrication et méthodes de caractérisation des nanoémulsions

2.1 Matériels

Le même dispositif expérimental est utilisé dans cette partie du travail (voir titre 3.2.6.1 du chapitre I).

2.2 Méthode de fabrication et caractérisations

Dans ce qui suit (figure II.1), nous décrivons brièvement les différentes étapes du procédé de préparation des nanoémulsions et les différents équipements mis en jeu.

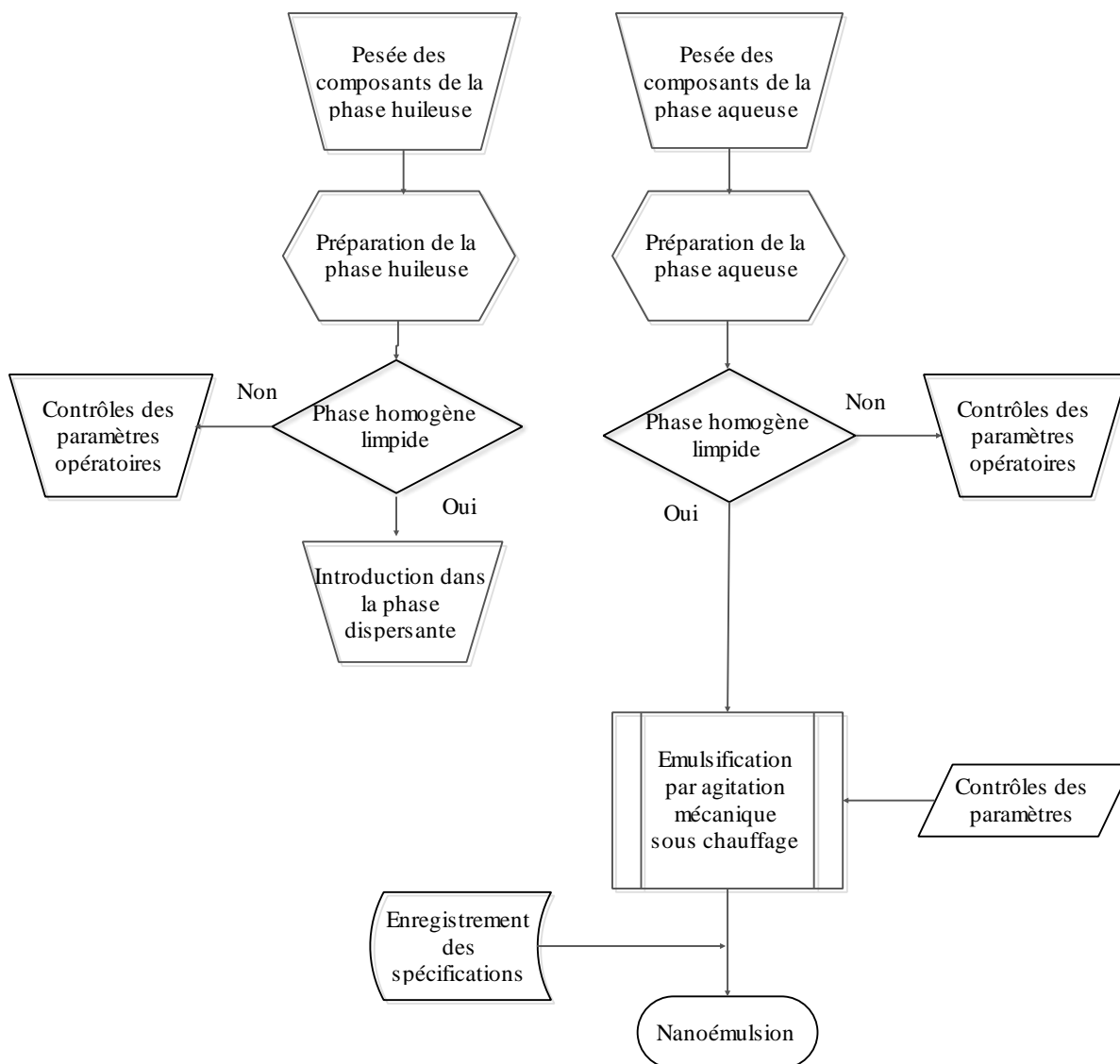


Figure II. 1. Flow chart ou schéma général du procédé de préparation des nanoémulsions.

2.2.1 Taille des gouttelettes, indice de polydispersité et potentiel zêta

Toutes ces mesures sont effectuées sur un seul et même équipement (Zetasizer Nano ZS®, Malvern). L'échantillon sera introduit dans une cellule de mesure, qui sera à son tour transférée vers l'équipement pour la lecture.

2.2.2 Mesure du pH

Des mesures de pH sont faites avec un pH mètre (METTLER TOLEDO®) préalablement étalonné, en plongeant l'électrode directement dans l'émulsion, à $25^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$.

Toute dérive de pH est considérée comme une instabilité ou plus précisément à un changement de la composante chimique du système.

2.2.3 Mesure de la turbidité

La turbidité est déterminée à l'aide d'un turbidimètre, de marque HANNA® Instruments Turbidimeter, modèle HI88703, préalablement étalonné. L'échantillon est introduit dans un flacon parfaitement nettoyé pour éviter toute interférence.

3 Choix des variables du process

3.1 Choix des facteurs

Nous considérer dans notre démarche les facteurs suivants (tableau II.1):

- Température de la phase organique (T°_1).
- Temps d'agitation de la phase organique (t_1).
- Température du mélange des deux phases (T°_2).
- Temps du mélange (t_2).
- Vitesse du mélange (V).

Par ailleurs, nous avons considéré qu'il n'était pas nécessaire de changer d'organe d'agitation, ni d'agitateur. Un seul et même agitateur fut utilisé tout au long des expériences. Aussi, nous utiliserons le même agitateur magnétique pour le mélange des composants de la phase organique.

Le choix de la température pour les différentes phases mises en œuvre (préparation de la phase aqueuse et la phase organique), doit tenir compte de la nature des composants de ces dernières, mais aussi des contraintes imposées par les caractéristiques des équipements. Ainsi, la température du mélange des composants de la phase organique se situe entre 30°C et 60°C (tableau II.1). De plus, pour solubiliser le PVA, on préconise de préparer la phase aqueuse sous chauffage avec agitation (Rowe 2006).

Un deuxième facteur à optimiser est le temps d'agitation de la phase organique. Ce dernier doit assurer l'équilibre entre les différents composants, d'autant plus en présence du T80. Un temps

variant entre 30 et 60 minutes a été repris. Autre facteur retenu et non des moindres, la température du mélange des phases aqueuse et organique. Celle-ci varie entre 10 et 20 minutes.

Enfin, la vitesse d'agitation qui fut retenu durant les essais préliminaires est de 800 trs/min. Dans ce qui suit, nous l'augmentons jusqu'à 1200 trs/min, cette dernière valeur fut choisie selon la faisabilité du procédé.

Tableau II. 1. Caractéristiques des facteurs.

<i>Facteurs</i>	<i>Type</i>	<i>Unité</i>	<i>Limite inférieure</i>	<i>Limite supérieure</i>	<i>Description</i>
$T^{\circ 1}$	Quantitatif	° Celsius	30°C	60°C	<i>Température du mélange de la phase organique</i>
t_1	Quantitatif	Minutes	30	60	<i>Temps d'agitation des composants de la phase organique</i>
$T^{\circ 2}$	Quantitatif	° Celsius	30°C	60°C	<i>Température du mélange des deux phases</i>
t_2	Quantitatif	Minutes	10	20	<i>Temps du mélange des deux phases</i>
V	Quantitatif	trs/minutes	800	1200	<i>Vitesse d'agitation du mélange des deux phases</i>

3.2 Choix des réponses

La taille des particules ainsi que le potentiel zêta furent considérés comme réponses sélectives, auxquelles on a rajouté le l'indice de polydispersité. Le tout représenté dans le tableau II.2.

La transparence et l'absence de sédiment étant assurées par la validation et l'optimisation des paramètres de la formulation (voir chapitre I).

Tableau II. 2. Caractéristiques des réponses choisies.

<i>Réponses</i>	<i>Unité de mesure</i>	<i>Description</i>
<i>Taille des particules(Y1)</i>	Nanomètre (nm)	<i>Taille des gouttelettes huileuses dispersées</i>
<i>Indice de polydispersité (Y2)</i>	/	<i>Apprécie la distribution de taille des gouttelettes</i>
<i>Potentiel zêta (Y3)</i>	Millivolts (mV)	<i>Indicateur de stabilité des nanoémulsions</i>

4 Etude de l'influence des paramètres opératoires sur les attributs qualité de la nanoémulsion

L'objectif principal de cette démarche expérimentale est de dégager le maximum de données et les principales tendances lors des essais de criblage, puis effectuer la modélisation du procédé de fabrication de ces nanodispersions. Enfin, définir un mode opératoire permettant la préparation d'une NE répondant aux exigences préétablies.

4.1 Construction du plan de criblage

L'identification paramétrique du modèle nécessite la conduction d'un modèle polynomial du premier degré avec interactions comportant 8 coefficients à déterminer, répondant au plan de « Plackett et Burmann », à deux niveaux pour 5 facteurs. Ce plan sera doublé pour apprécier la répétabilité et donner plus de puissance à l'étude. Ce qui implique de réaliser un nombre total de 16 expériences, voir tableau II.3.

Il peut être représenté par l'équation suivante :

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^n \beta_i x_i + \varepsilon \text{ (éq.N°1)}$$

Où :

Y est la réponse étudiée,

x_n le niveau du facteur n ,

β le coefficient du modèle,

ε sommes des carrés des résidus.

Tableau II. 3. Présentation de la matrice du Plan de « Plackett et Burman » pour l'étape du criblage des paramètres opératoires.

N°	T° ₁	t ₁	T° ₂	t ₂	V	Y1 (cm)	Y2	Y3 (mV)
	Valeurs codées							
1	1	-1	-1	1	-1	Y1 ₁	Y2 ₁	Y3 ₁
2	1	-1	-1	1	-1	Y1 ₂	Y2 ₂	Y3 ₂
3	1	1	-1	-1	1	Y1 ₃	Y2 ₃	Y3 ₃
4	1	1	-1	-1	1	Y1 ₄	Y2 ₄	Y3 ₄
5	1	1	1	-1	-1	Y1 ₅	Y2 ₅	Y3 ₅
6	1	1	1	-1	-1	Y1 ₆	Y2 ₆	Y3 ₆
7	-1	1	1	1	-1	Y1 ₇	Y2 ₇	Y3 ₇
8	-1	1	1	1	-1	Y1 ₈	Y2 ₈	Y3 ₈
9	1	-1	1	1	1	Y1 ₉	Y2 ₉	Y3 ₉
10	1	-1	1	1	1	Y1 ₁₀	Y2 ₁₀	Y3 ₁₀
11	-1	1	-1	1	1	Y1 ₁₁	Y2 ₁₁	Y3 ₁₁
12	-1	1	-1	1	1	Y1 ₁₂	Y2 ₁₂	Y3 ₁₂
13	-1	-1	1	-1	1	Y1 ₁₃	Y2 ₁₃	Y3 ₁₃
14	-1	-1	1	-1	1	Y1 ₁₄	Y2 ₁₄	Y3 ₁₄
15	-1	-1	-1	-1	-1	Y1 ₁₅	Y2 ₁₅	Y3 ₁₅
16	-1	-1	-1	-1	-1	Y1 ₁₆	Y2 ₁₆	Y3 ₁₆

4.2 Construction du plan de surface de réponse (optimisation)

Nous utilisons pour cette étape, un plan composite centré cubique à quatre facteurs et à deux niveaux. Ce plan comporte 29 expériences, dont les valeurs sont codées et réparties comme suit (tableau II.4):

Tableau II. 4. Présentation de la matrice du Plan composite centré cubique pour l'étude des surfaces de réponses en vue de l'optimisation des paramètres opératoires du procédé.

N°	T° ₁	t ₁	T° ₂	t ₂	Y1 (cm)	Y2	Y3 (mV)
1	-1	-1	-1	-1	Y1 ₁	Y2 ₁	Y3 ₁
2	1	-1	-1	-1	Y1 ₂	Y2 ₂	Y3 ₂
3	-1	1	-1	-1	Y1 ₃	Y2 ₃	Y3 ₃
4	1	1	-1	-1	Y1 ₄	Y2 ₄	Y3 ₄
5	-1	-1	1	-1	Y1 ₅	Y2 ₅	Y3 ₅
6	1	-1	1	-1	Y1 ₆	Y2 ₆	Y3 ₆
7	-1	1	1	-1	Y1 ₇	Y2 ₇	Y3 ₇
8	1	1	1	-1	Y1 ₈	Y2 ₈	Y3 ₈
9	-1	-1	-1	1	Y1 ₉	Y2 ₉	Y3 ₉
10	1	-1	-1	1	Y1 ₁₀	Y2 ₁₀	Y3 ₁₀
11	-1	1	-1	1	Y1 ₁₁	Y2 ₁₁	Y3 ₁₁
12	1	1	-1	1	Y1 ₁₂	Y2 ₁₂	Y3 ₁₂
13	-1	-1	1	1	Y1 ₁₃	Y2 ₁₃	Y3 ₁₃
14	1	-1	1	1	Y1 ₁₄	Y2 ₁₄	Y3 ₁₄
15	-1	1	1	1	Y1 ₁₅	Y2 ₁₅	Y3 ₁₅
16	1	1	1	1	Y1 ₁₆	Y2 ₁₆	Y3 ₁₆
17	-1	0	0	0	Y1 ₁₇	Y2 ₁₇	Y3 ₁₇
18	1	0	0	0	Y1 ₁₈	Y2 ₁₈	Y3 ₁₈
19	0	-1	0	0	Y1 ₁₈	Y2 ₁₈	Y3 ₁₈
20	0	1	0	0	Y1 ₂₀	Y2 ₂₀	Y3 ₂₀
21	0	0	-1	0	Y1 ₂₁	Y2 ₂₁	Y3 ₂₁
22	0	0	1	0	Y1 ₂₂	Y2 ₂₂	Y3 ₂₂
23	0	0	0	-1	Y1 ₂₃	Y2 ₂₃	Y3 ₂₃
24	0	0	0	1	Y1 ₂₄	Y2 ₂₄	Y3 ₂₄
25	0	0	0	0	Y1 ₂₅	Y2 ₂₅	Y3 ₂₅
26	0	0	0	0	Y1 ₂₆	Y2 ₂₆	Y3 ₂₆
27	0	0	0	0	Y1 ₂₇	Y2 ₂₇	Y3 ₂₇
28	0	0	0	0	Y1 ₂₈	Y2 ₂₈	Y3 ₂₈
29	0	0	0	0	Y1 ₂₉	Y2 ₂₉	Y3 ₂₉

La matrice du plan englobe 2^4 expériences (N_F), auxquelles on rajoute une expérience au centre du domaine expérimental, répétée 5 fois et nommée N_0 pour estimer la variance de répétabilité des mesures et l'erreur expérimental, ainsi que deux points axiaux (points en étoile) pour chaque facteur N_α .

Pour pouvoir apprécier la qualité des valeurs enregistrées par rapport aux valeurs prédites, le calcul de R^2 nous renseigne sur la qualité de l'ajustement des valeurs et doit être proche de 1 (Cunha 2020). Il s'en suivra une analyse statistique et la validation du modèle.

Le modèle mathématique utilisé dans l'étude d'optimisation est un modèle polynomial du second degré, qui lie les facteurs sélectionnés avec leurs réponses, en tenant compte des effets des facteurs et de leurs interactions. Généralement, le modèle est donné par l'équation suivante:

$$Y = \beta_0 + \sum_{j=1}^n \beta_j x_j + \sum_{j=1}^n \beta_{jj} x_j^2 + \sum_{i < j} \beta_{ij} x_i x_j \text{ (éq.N}^\circ\text{2)}$$

Où :

Y est la réponse étudiée,

x_n le niveau du facteur n ,

β le coefficient du modèle.

4.3 Résultats et discussion

4.3.1 Analyse de criblage et étude statistique des résultats

Les résultats obtenus lors du criblage sont présentés dans le tableau II.5. Il convient de préciser que les mesures de caractérisation sont faites après 24 heures de repos. Nous pouvons d'ores et déjà affirmer à l'examen visuel que les dispersions naissantes sont des nanoémulsions stables.

Tableau II. 5. Réponses enregistrées lors des essais de criblage des paramètres opératoires.

N°	T° ₁	t ₁	T° ₂	t ₂	V	Y1 (nm)	Y2	Y3 (mV)
	Matrice							
1	1	-1	-1	1	-1	33,95	0,978	-17,7
2	1	-1	-1	1	-1	37,82	1	-17
3	1	1	-1	-1	1	40,59	0,74	-21,3
4	1	1	-1	-1	1	35,5	0,8	-23,2
5	1	1	1	-1	-1	44,48	0,678	-18,4
6	1	1	1	-1	-1	43,9	0,649	-18,9
7	-1	1	1	1	-1	48,49	0,703	-18,5
8	-1	1	1	1	-1	48,39	0,708	-17,3
9	1	-1	1	1	1	27,21	1	-13,6
10	1	-1	1	1	1	27,26	1	-13,6
11	-1	1	-1	1	1	41,25	0,763	-23,3
12	-1	1	-1	1	1	39,57	0,733	-21,3
13	-1	-1	1	-1	1	240,6	0,433	-27,7
14	-1	-1	1	-1	1	247,4	0,443	-27,6
15	-1	-1	-1	-1	-1	299,5	0,688	-26,5
16	-1	-1	-1	-1	-1	301,1	0,777	-26,6

Les coefficients de corrélation respectifs aux réponses objectives (Y1, Y2 et Y3) sont de 0,926, 0,869 et 0,983. Rappelons que R^2 doit être supérieur à 0,8 pour juger que le modèle est ajusté. Nous pouvons alors conclure qu'en ce qui concerne Y1, Y2 et Y3, les valeurs respectives de R^2 et R^2 ajusté (voir tableau II.6), indiquent une très bonne qualité descriptive du modèle.

Tableau II. 6. Coefficients de corrélation lors de l'analyse du criblage des paramètres opératoires.

	Y1	Y2	Y3
R^2	0,983	0,869	0,926
$R^2_{ajusté}$	0,977	0,822	0,899

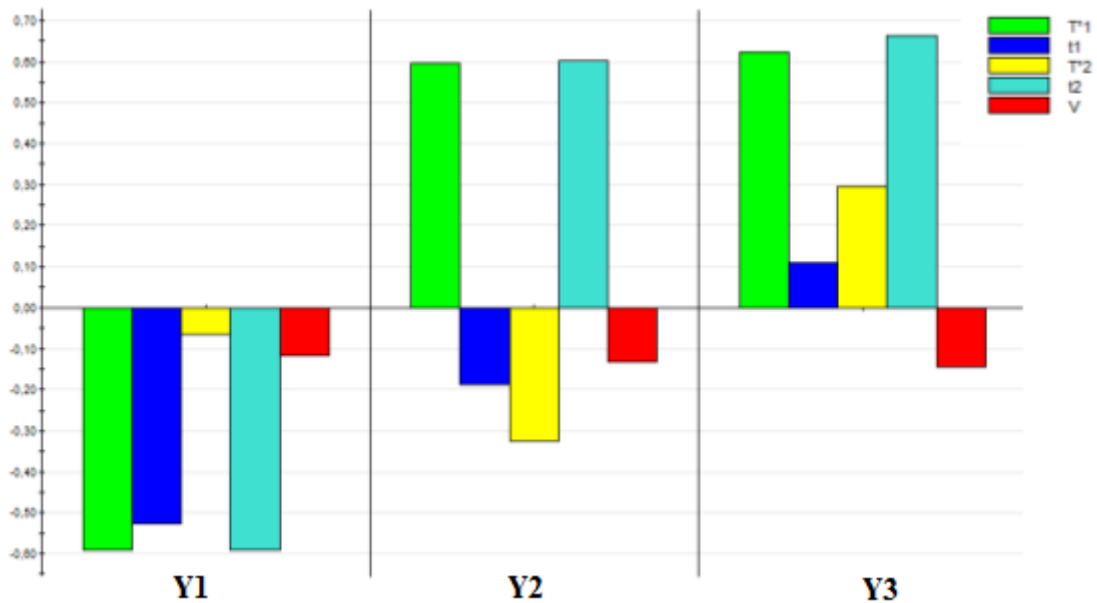


Figure II. 2. Représentation groupée des coefficients par facteur pour les réponses Y1, Y2 et Y3. Taille des particules, indice de polydispersité et potentiel zêta, respectivement.

L'analyse des facteurs mis en jeu à travers la figure II.2, nous permet déjà de déceler pour chaque réponse objective introduite dans l'étude, un ou deux facteurs significatifs au minimum.

En effet, en ce qui concerne la taille des particules (Y1), trois facteurs sont considérés comme fortement influençant la réduction de la taille. Il s'agit des conditions de préparation de la phase organique (température et temps d'agitation), qui permettent d'atteindre l'équilibre recherché, ainsi que le temps de mélange des deux phases organique et aqueuse. Leur impact est présenté comme suit : $t_2 > T^o_1 > t_1$.

Pour ce qui est de l'indice de polydispersité (Y2), nous constatons une tendance vers l'augmentation, lorsque la température de préparation de la phase organique (T^o_1) et le temps de mélange des deux phases (t_2) sont élevés. Seule la température du mélange (T^o_2) semble avoir un léger impact négatif sur cette réponse.

Le potentiel zêta (Y3) semble être grandement influencé par T^o_1 et t_2 . Les données graphiques de la figure II.2 indiquent qu'il y'a une tendance vers une diminution de la valeur absolue en potentiel zêta. Le même constat peut être appliqué pour le facteur T^o_2 , à un degré moindre.

En ce qui concerne la vitesse d'agitation, ce facteur ne semble pas significatif pour toutes les réponses étudiées. Sa variation de -1 à +1 n'influence pas les attributs qualité de la NE.

Pour apprécier au mieux cette analyse, les figures II.3, II.4 et II.5 donnent plus de détails. Un facteur est considéré comme significatif, donc influent, si l'intervalle de confiance (matérialisé par une barre au milieu de l'histogramme) ne coupe pas l'axe des abscisses, correspondant au zéro (Umetrics AB 2001).

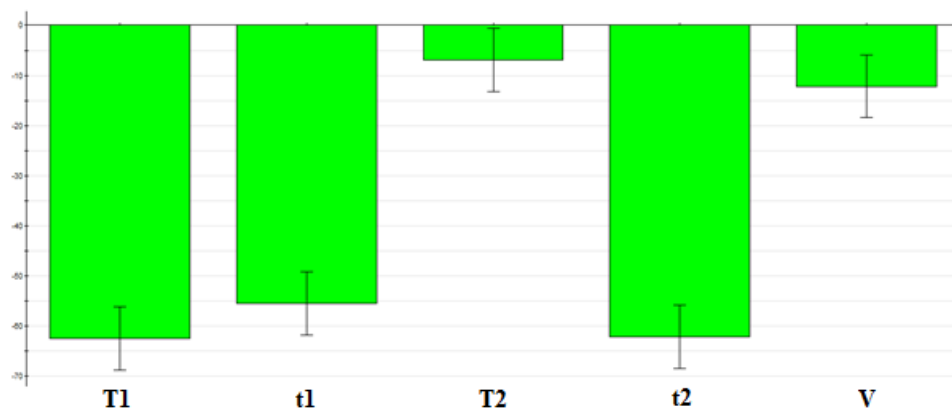


Figure II. 3. Histogrammes de l'influence des coefficients sur la taille des particules.

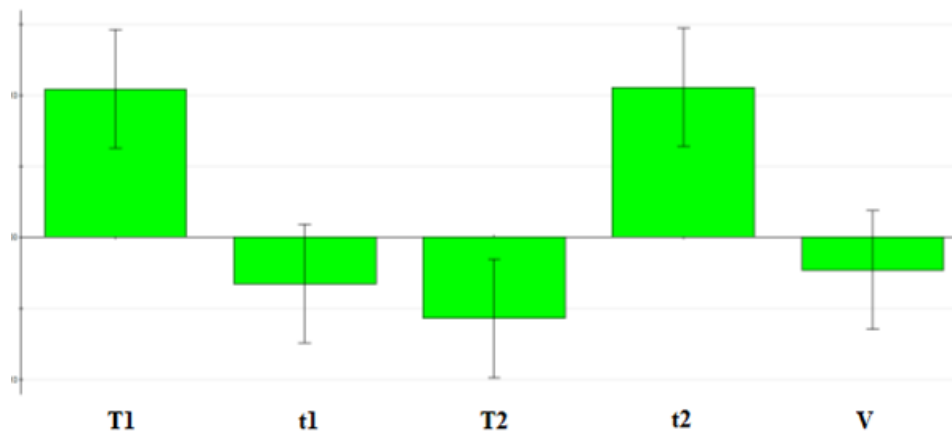


Figure II. 4. Histogrammes de l'influence des coefficients sur l'indice de polydispersité.

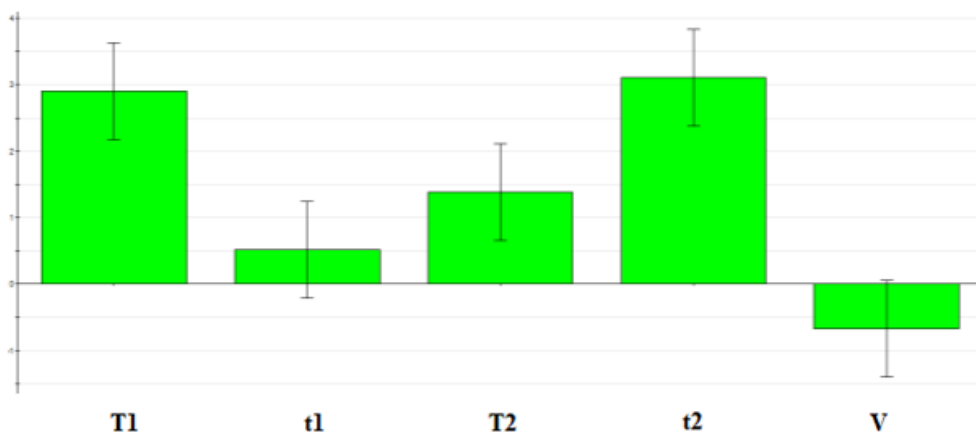


Figure II. 5. Histogrammes de l'influence des coefficients sur le potentiel zêta.

Il en ressort de cette analyse complète, que seuls quatre facteurs sont retenus pour l'étude des surfaces de réponse. Il s'agit de T°_1 , t_1 , T°_2 et t_2 . La vitesse du mélange est considérée à sa valeur la plus élevée expérimentalement, à savoir 1200 trs/min, pour son effet négatif très léger sur la taille des particules. Ce résultat concorde avec les données de la littérature (Solè 2006).

En ce qui concerne le temps de mélange (t_1), la durée requise pour que tous les composants de la phase organique soient en équilibre doit être suffisante. Plus ce dernier est élevé, plus l'équilibre est atteint, ceci se reflète par une réduction de taille des gouttelettes. Travailler sous chauffage permet également d'atteindre cet objectif (figure II.3).

4.3.2 Analyse des surfaces de réponses (optimisation)

Nous avons considéré durant l'étape du criblage quatre variables opératoires à fort impact sur les attributs qualité de la NE, en l'occurrence T°_1 , t_1 , T°_2 et t_2 .

L'étude de l'optimisation du procédé de préparation des NEs désirées se fait suite à une planification établie par le Modde[®]6, à travers un plan composite centré cubique. Les conditions opératoires (en valeurs codées) ainsi que les réponses enregistrées sont présentées dans le tableau II.7. Rappelons que toutes les caractérisations sont faites après 24 heures de repos.

Tableau II. 7. Matrice du plan composite centré cubique et réponses enregistrées.

N°	T ^o ₁	t ₁	T ^o ₂	t ₂	Y1 (nm)	Y2	Y3 (mV)
	Valeurs codées						
1	-1	-1	-1	-1	1640	0,686	-22,3
2	1	-1	-1	-1	31,64	0,758	-21,8
3	-1	1	-1	-1	725,3	0,519	-23,5
4	1	1	-1	-1	18,45	0,835	-22,1
5	-1	-1	1	-1	1732	1	-21,1
6	1	-1	1	-1	26,55	0,696	-15,6
7	-1	1	1	-1	259	1	-25,7
8	1	1	1	-1	23,74	0,594	-19,5
9	-1	-1	-1	1	1299	0,671	-24,9
10	1	-1	-1	1	20,38	0,575	-15,6
11	-1	1	-1	1	270,4	0,763	-25,3
12	1	1	-1	1	30,84	0,656	-27,1
13	-1	-1	1	1	1795	0,926	-21,2
14	1	-1	1	1	24,22	0,803	-14
15	-1	1	1	1	53,63	0,663	-23,8
16	1	1	1	1	30,34	0,578	-17,1
17	-1	0	0	0	47,81	0,825	-23,6
18	1	0	0	0	21,24	0,598	-15,5
19	0	-1	0	0	23,98	0,666	-19,1
20	0	1	0	0	23,99	0,676	-20,9
21	0	0	-1	0	22,04	0,568	-20
22	0	0	1	0	25,49	0,616	-15
23	0	0	0	-1	25,08	0,724	-22,5
24	0	0	0	1	58,88	0,646	-23,8
25	0	0	0	0	22,39	0,695	-16,6
26	0	0	0	0	23,88	0,799	-17,3
27	0	0	0	0	24,07	0,659	-15,9
28	0	0	0	0	24,28	0,683	-16,5
29	0	0	0	0	23,77	0,749	-16,4

Pour l'analyse statistique, nous la considérons uniquement pour la réponse taille des particules (Y1). Concernant les réponses Y2 et Y3 (PdI et potentiel zêta, respectivement), les résultats du tableau II.7 sont fournis à titre indicatif.

L'analyse des tendances, en variant les paramètres opératoires de +1 à -1 (en passant par 0), sur les réponses Y1, est clairement illustrée dans la figure II.6.

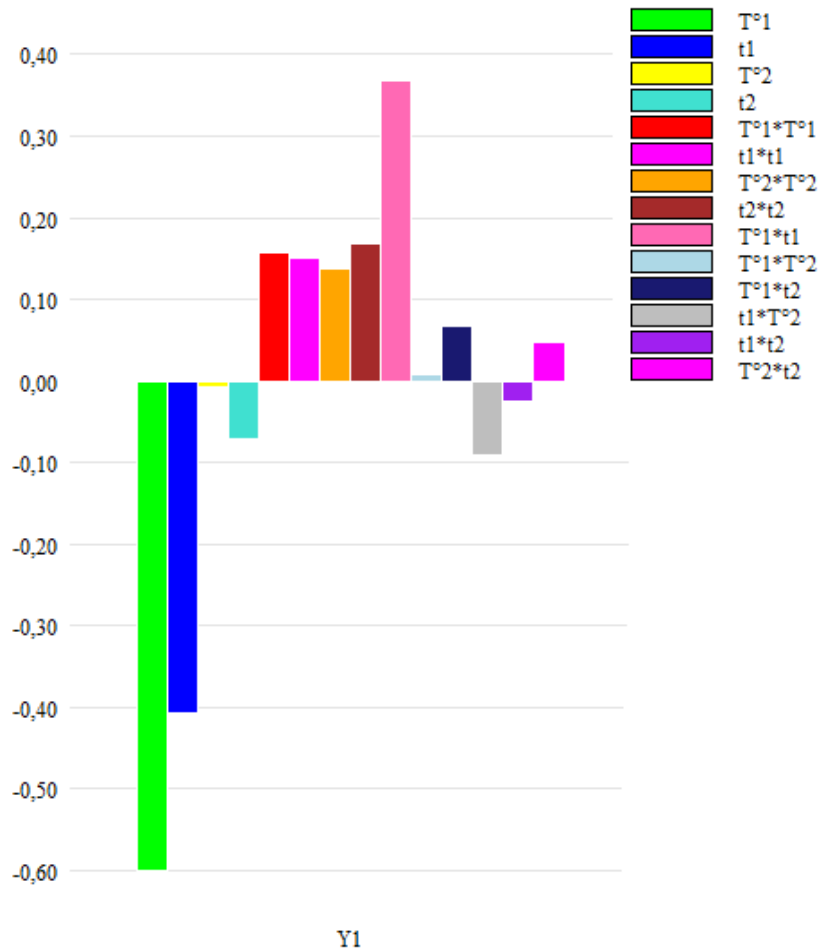


Figure II. 6. Représentation groupée des coefficients par facteur pour l'analyse de surface de réponses pour Y1 et l'optimisation du process.

Nous retrouvons les mêmes influences que celles des essais de criblage, qui montre l'effet négatif de la température (T°_1) et du temps de mélange de la phase organique (t_1) sur la taille des particules, ainsi que l'effet non négligeable de l'interaction $T^{\circ}_1*t_1$. Ceci confirme encore qu'il est important que les constituants de la phase organique puissent atteindre l'équilibre permettant de garantir la stabilité de l'émulsion finale.

Dans cette partie, la réduction de la taille des particules est la réponse objective recherchée à travers l'exécution du procédé et l'optimisation de ses paramètres.

4.3.2.1 Validation du modèle proposé

Les valeurs R^2 égale à 0,914 et R^2 ajusté égale à 0,828, signifient que la réponse Y1 est très bien expliquée par le modèle, ce qui est clairement illustré par la figure II.7. En effet, les résultats obtenus confirment que les valeurs enregistrées sont très proches des valeurs prédites. Cette tendance se traduit par une courbe ayant l'allure d'une droite. Les valeurs observées sont donc jugées acceptables.

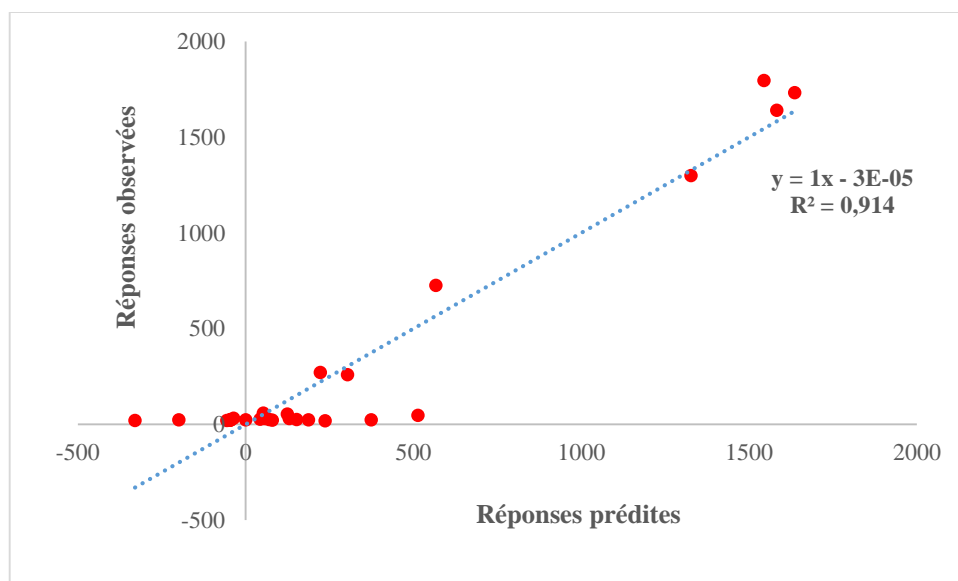


Figure II. 7. Représentation graphique des valeurs observées en fonction des valeurs estimées de la taille des particules.

4.3.2.2 Facteurs significatifs

Au seuil de signification de 5%, les facteurs significatifs pour la taille des particules sont les termes linéaires T°_1 et t_1 avec leur interaction $T^{\circ}_1*t_1$ (figure II.8).

Ce constat vient conforter l'intérêt de moduler les paramètres opératoires de la préparation de la phase organique. En effet, la réorganisation de ces différents composants, ainsi que l'équilibre architectural, sont des conditions indispensables pour garantir l'obtention de NEs stables.

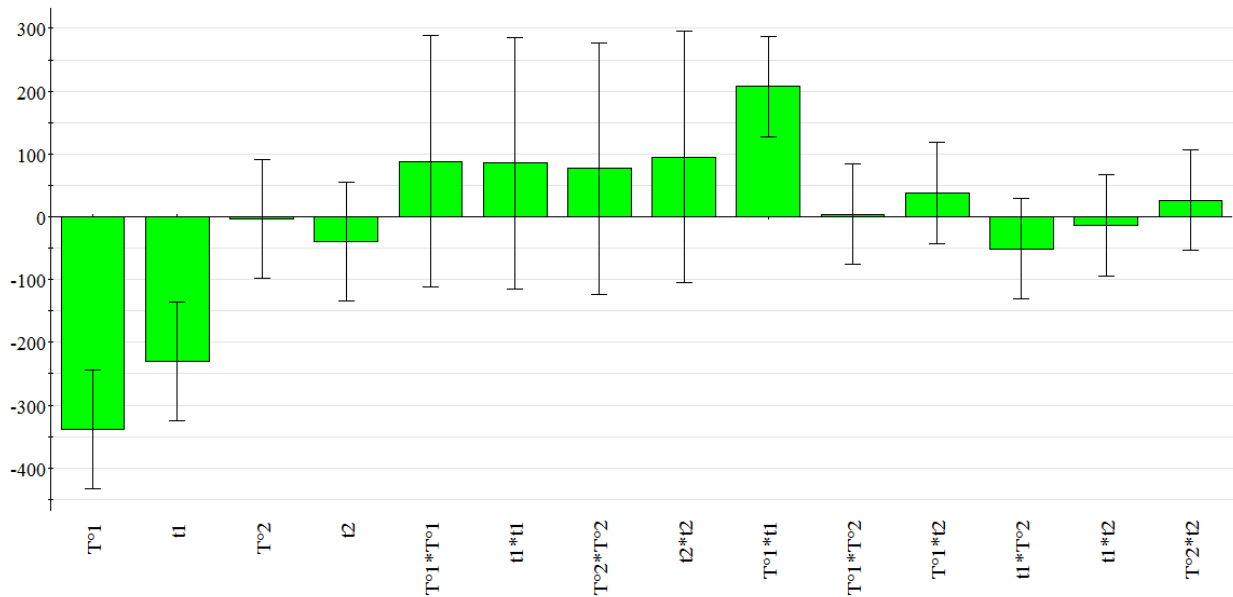


Figure II. 8. Histogrammes de l'influence des coefficients par facetur sur la taille des particules.

4.3.2.3 Analyse de la variance

Dans cette analyse, on compare le F-value ($F_{\text{observé}}$) avec le F_{critique} de la table de Fisher. Si le F de Fisher expérimental ($F_{\text{observé}}$) est supérieur à la valeur F de Fisher donnée par les tables (F_{critique}), les variations des réponses mesurées sont bien dues aux variations des facteurs et le modèle est jugé valide.

Soit :

$$H_0 : F_{\text{observé}} = F_{\text{critique}}$$

$$H_1 : F_{\text{observé}} \geq F_{\text{critique}}$$

Test de l'hypothèse H_1 :

Si $F_{\text{observé}} \geq F_{\text{critique}}$, l'hypothèse H_1 est acceptée pour $F_{\text{critique}} = F(\alpha, v_1, v_2)$.

où :

α est le risque d'acceptation de l'hypothèse H_1 , fixé à 5%.

v_1 et v_2 sont les degrés de liberté du numérateur et respectivement du dénominateur de l'équation suivante (pour le calcul de F_{critique}) :

$F_{\text{Critique}} = F(\text{SCF/SCE}) = F(0.05, 14, 14) = 2,48$; au seuil de signification $\alpha = 0,05$ (voir table de Fisher-Snedecor en annexe 1).

La valeur F est calculée, en établissant le rapport du carré moyen du modèle (579884) à celui des résidus (54592,2). La valeur correspond à celle fournit par le logiciel (tableau II.8).

Rappelons qu'un modèle avec des valeurs de *P*-value proche de zéro est statistiquement significatif et possède donc une bonne qualité descriptive de la réponse étudiée. Selon le tableau ci-dessous, le *P*-value est égal à zéro et le $F_{\text{observé}}$ est supérieur au F_{critique} (valeurs en gras dans les colonnes respectives).

Tableau II. 8. Analyse de la variance pour la réponse Y1 (taille des particules).

	<i>Sommes des carrés</i>	<i>DDL</i>	<i>carré moyen</i>	<i>F-value</i>	<i>F_{critique}</i>	<i>P-value</i>
Régression	8,11838e+006	14	579884	10,6221	2,48	0,000
Résidus	764290	14	54592,2			
Constant	2,40272e+006	1	2,40272e+006			
Total	3,3	29	389151			

Comme $F_{\text{observé}} \geq F_{\text{critique}}$, le modèle est valide.

En ce qui concerne les effets des facteurs et leurs interactions, le tableau II.9 confirme l'effet significatif des facteurs T°_1 et t_1 pour la réponse Y1 (valeurs en gras dans la colonne *P*-value).

Tableau II. 9. Les effets des facteurs pour la réponse Y1 (taille des particules).

<i>Variable</i>	<i>P-value (Y1)</i>
T°_1	2,26736e-006
t_1	0,000133351
T°_2	0,93071
T_2	0,380278
$T^{\circ}_1 * T^{\circ}_1$	0,360827
$t_1 * t_1$	0,377932
$T^{\circ}_2 * T^{\circ}_2$	0,423248
$t_2 * t_2$	0,326605
$T^{\circ}_1 * t_1$	7,55273e-005

T^*1*T^*2	0,914439
T^*1*t2	0,329248
$t1*T^*2$	0,197673
$t1*t2$	0,71358
T^*2*t2	0,492988

4.3.2.4 Analyse des résidus

L'analyse des résidus faite par le logiciel Modde[®]6, décrit une distribution aléatoire et normale. On conclut que les résidus sont normalement distribués et que seules des causes aléatoires y sont incriminées.

La figure II.9 présente l'évolution des résidus en fonction des valeurs prédites, elle décrit bien cette tendance normale de distribution aléatoire.

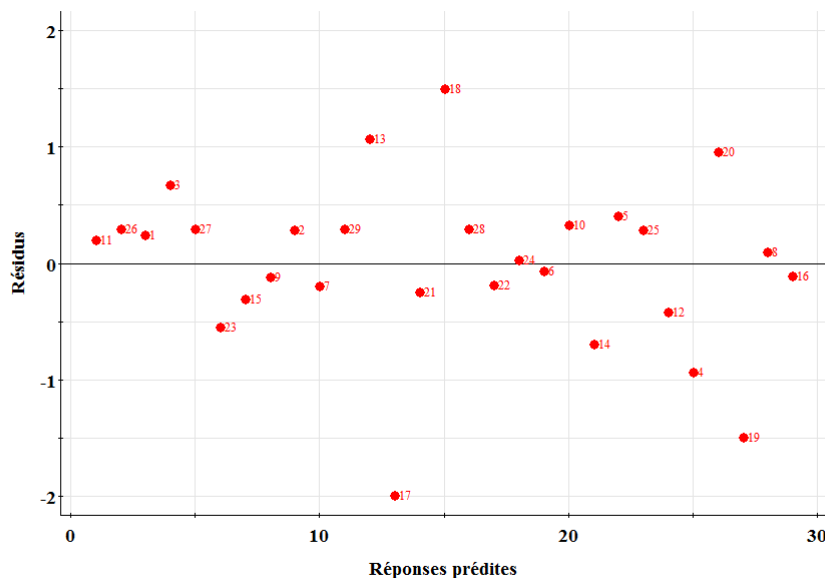


Figure II. 9. Evolution des résidus en fonction des réponses prédites de Y1.

4.3.2.5 Expression du modèle mathématique

L'analyse statistique des résultats montre qu'au seuil de 5%, la réponse Y1 « taille des particules » peut être décrite par le modèle ci-dessous, en excluant les facteurs non significatifs.

$$Y_1 = \beta_0 + \beta_1 * T^*1 + \beta_2 * t1 + \beta_{1-2} * T^*1 * t1 \quad (\text{éq.N}^\circ 1)$$

Il en résulte de l'application numérique :

$$Y_1 = -45,5603 - 338,162 * T^{\circ}1 - 229,832 * t1 + 88,2434 * T^{\circ}1 * t1$$

D'après l'équation du modèle polynomial, la réduction de la taille des particules est grandement influencée par des valeurs élevées de température $T^{\circ}1$ et un temps d'agitation prolongé de la phase organique t_1 . On conclut donc qu'une bonne préparation de la phase organique qui contient l'huile vectrice, le tensioactif stabilisateur ainsi que l'éthanol, permet de garantir un bon mécanisme de diffusion de tous ces composants dans la phase aqueuse hôte. En effet, ces derniers vont se réorganiser en très fines gouttelettes de taille nanométrique. On rajoute à cela la composition du tissu polymérique qui viendra stabiliser ces dernières et empêcher la survenue du phénomène de mûrissement d'Ostwald et par la même occasion assurer la stabilité physique de la NE.

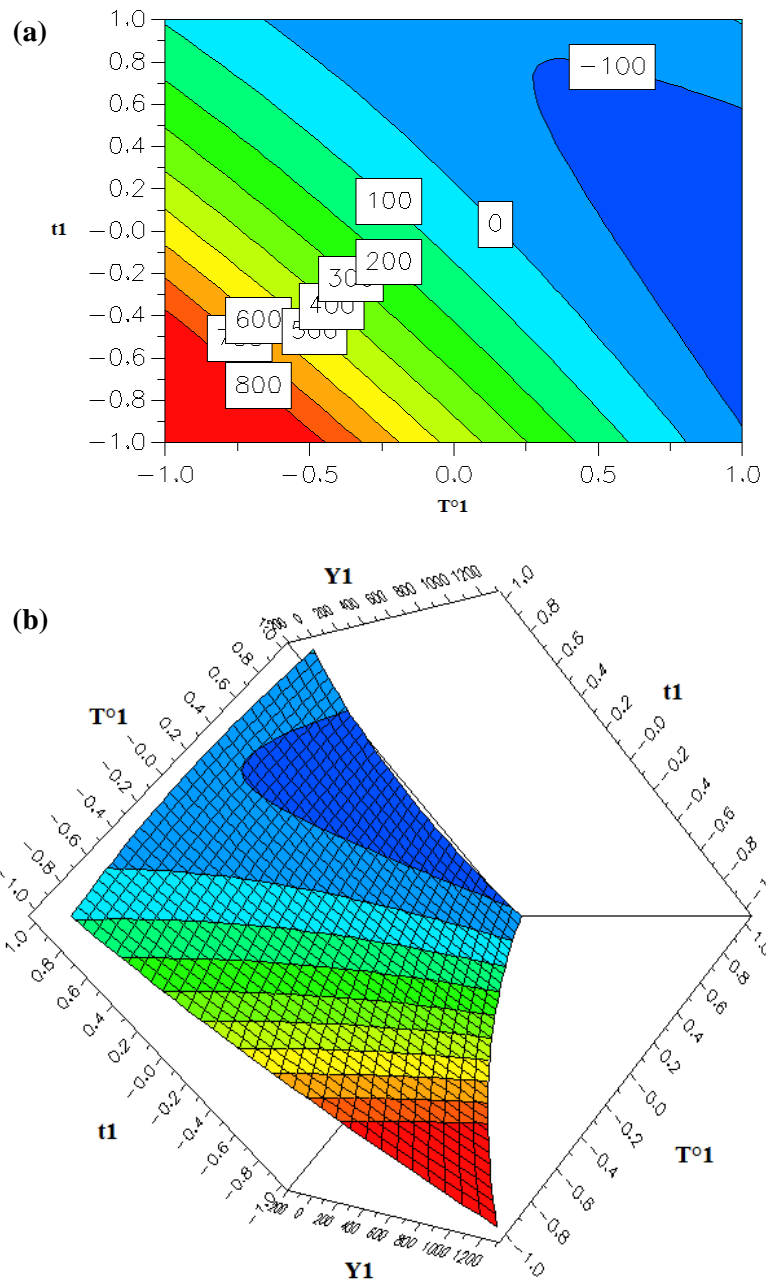


Figure II. 10. Courbes iso-réponse pour la taille des particules (Y1), (a) représentation graphique en 2D des variations de la réponse en fonction des variations des facteurs (b) représentation graphique en 4D des variations de la réponse en fonction des variations des facteurs $T^{\circ}1$ et $t1$.

La figure II.10 représente les surfaces de réponse pour les effets significatifs des interactions des facteurs vis-à-vis de la réponse Y1. Elles nous permettent de compléter l'analyse statistique par une analyse des surfaces de réponses en mettant en action les variables opératoires. Les différentes représentations graphiques décrivent les tendances enregistrées qui s'accordent avec nos conclusions faites.

Selon la même figure, on remarque que la taille des particules diminue avec l'augmentation de la T°_1 et du temps d'agitation t_1 (figure II.10 a). La zone optimale se situe dans la plage « bleu ciel ».

4.3.2.6 Phase d'optimisation

L'objectif est de déterminer les paramètres opératoires optimaux pour réussir le procédé de préparation des NEs. Pour ce faire, nous allons activer les recherches à travers le module « Optimizer » du Modde®6. Le logiciel opère un ensemble de compromis acceptables, de manière analytique pour optimiser la fonction de désirabilité globale, en tenant compte des contraintes du système.

Les propriétés désirées pour la formule (contraintes du système), ainsi que les réponses renvoyées par le logiciel sont illustrées dans la figure II.11.

a)

	Factor	Role	Value	Low Limit	High Limit
1	T°_1	Free		-1	1
2	t_1	Free		-1	1
3	T°_2	Free		-1	1
4	t_2	Free		-1	1

b)

	Response	Criteria	Weight	Min	Target	Max
1	Y1	Target	1	20	50	200
2	Y2	Exclude				
3	Y3	Exclude				

c)

Iteration: 50 Iteration slider: _____

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	T°_1	t_1	T°_2	t_2	Y1	Y2	Y3	iter	log(D)
1	-0,7	0,7	-0,4056	1	93,5539	0,6787	24,4409	0	-1,0741
2	-0,8574	0,9988	-0,3994	0,9997	50,179	0,6896	25,8504	14	-5,8467
3	-1	1	-0,4056	0,791	68,7869	0,6969	25,3816	10	-1,8045
4	-0,6299	0,8	-0,4056	1	42,858	0,6743	24,5329	50	-1,2466
5	-0,8299	0,9	-0,4056	0,991	71,0661	0,6869	25,4107	6	-1,705

Figure II. 11. Phase d'optimisation exécutée par le logiciel et solutions proposées à travers l'image scannée du logiciel, (a) propriétés désirées pour les réponses Y1, (b) solutions proposées par l'optimiseur, (c) Solutions renvoyées par l'optimiseur du logiciel Modde®6.

Le module fournit 5 solutions possibles, elles sont reprises dans la figure II.11 c, qui indique la proposition « 2 » comme étant celle sélectionnée par l'optimiseur. Les valeurs des paramètres opératoires apparaissent codées.

Les conditions proposées sont acceptées en termes de faisabilité et sont en accord avec la littérature. En effet, il faut mélanger jusqu'à l'équilibre des composants de la phase organique à des températures ne dépassant pas la TIP (Tadros 2004 ; Tadros 2013). Ces conditions sont adaptées à la formulation et exécutées sur cette dernière 3 fois. Ensuite, nous opérons la mesure de la taille des particules à laquelle nous rajoutons l'indice de polydispersité et le potentiel zêta, ainsi que la turbidité et le pH, comme mesures complémentaires. Les résultats sont présentés dans le tableau II.10.

Tableau II. 10. Résultats de la caractérisation physico-chimique de la proposition « 2 ».

<i>Préparation</i>	<i>Taille des particules (nm)</i>	<i>Indice de polydispersité</i>	<i>Potentiel zêta (mV)</i>	<i>Turbidité (NTU)</i>	<i>pH</i>
1	50,71	0,745	-26	19,23	7,21
2	51,11	0,779	-26	21,03	7,23
3	49,48	0,676	-25	19,73	7,26

Préalablement à la caractérisation physico-chimique, l'aspect macroscopique de la NE obtenue doit être apprécié, surtout en termes de transparence. La figure II.12, indique clairement que le produit répond à ce critère commun à la majorité des NEs. En effet, nous pouvons apprécier et percevoir nettement les croix noires au travers du contenant transparent.



Figure II. 12. Nanoémulsion obtenue après optimisation des paramètres opératoires.

Nous souhaitons comparer la moyenne des mesures de Y1 à celle prédite par le logiciel en effectuant le test de Student. Les résultats de l'analyse indiquent qu'il n'y a pas de différence significative entre les deux valeurs, voir annexe 5. Les valeurs obtenues de la taille des particules correspondent bien aux attentes et aux valeurs prédites par le logiciel, voir figure II.11. Ce qui nous permet encore une fois de valider le modèle pour la réponse étudiée Y1.

D'autre part, les valeurs du potentiel zêta indiquent à chaque fois que la NE est stable. Les valeurs du pH indiquent que la préparation est restée neutre. Aussi, les résultats de la turbidité sont très appréciables et affirment encore une fois que la combinaison quantitative choisie garantit la transparence caractéristique des NEs.

En ce qui concerne l'indice de polydispersité, il est supérieur à 0,25. Ce qui peut indiquer que les dispersions sont non monodispersées. Toutefois, cette mesure n'est prise en considération que si les échantillons sont correctement filtrés, car elle est très sensible à la présence des agrégats (Hansali 2012).

Conclusion

Nous avons formulé avec succès une NE stable chimiquement et physiquement. La démarche entreprise repose sur le concept de Quality by Design (QbD), qui met en avant l'usage des plans d'expériences.

La méthodologie des plans d'expériences commence généralement par une phase de criblage, qui nous a permis d'identifier les variables potentiellement influençantes. La phase d'optimisation par surfaces de réponses nous a permis de finaliser la phase de développement du produit, par la sélection d'une zone optimale avec modélisation des réponses. La même démarche a été reconduite sur les variables opératoires tels que la température et le temps du mélange.

Les caractérisations physico-chimiques de l'émulsion obtenue à chaque étape, confirment que les composants mis en jeu, ainsi que le procédé de fabrication par émulsification spontanée, permet d'obtenir un système nanodispersé avec des tailles avoisinant 50 nm et un potentiel zêta plus que satisfaisant avec une valeur moyenne de -25,7 mV.

CHAPITRE III :
Encapsulation de
principes actifs
faiblement solubles
dans l'eau et essais in
vivo

Introduction

Dans le chapitre I et II, nous avons décrit la préparation des NEs et étudié l'impact des différents facteurs de formulation ainsi que d'ordre opératoire, afin d'en tirer les plus influençant. Les NEs formulées sont de type H/E, dont les nanogouttelettes sont recouvertes d'une couche interfaciale qui stabilise ces dernières et les maintient en suspension. Ce film est composé de Tween[®]80 et de SDS, l'ensemble est entouré et stabilisé par le PVA. Cette coque hydrophile empêche les gouttelettes de coalescer, en les maintenant uniformément distribuées dans la phase continue.

Les expériences ont été conduites en 3 étapes (préformulation, formulation et préparation proprement dite). En effet, pas moins de 90 synthèses ont été réalisées tout au long du développement pharmaceutique de cette NE (essais d'orientation non inclus). Les mesures faites sur le Zetasizer Nano ZS[®] montrent que les émulsions sont de l'ordre du nanomètre. Aussi, la taille des gouttelettes semble fortement influencée par l'augmentation de la température et du temps de mélange de la phase organique, ainsi que du SOR en rapport avec la concentration en Tween[®]80. A ce stade du développement, nous avons obtenu une formule optimale qui sera reconduite pour l'encapsulation de 3 molécules actives peu solubles dans l'eau.

Bien qu'elles puissent répondre aux objectifs de taille et de potentiel zêta, exigés pour une administration parentérale, nous avons convenu d'utiliser ces NEs pour une administration orale. Car, en plus d'être moins invasive, la voie orale permet une meilleure biodisponibilité des molécules lipophiles.

Enfin, on peut dire que la méthode de nanoémulsification que nous avons conduite est suffisamment optimisée en termes de conditions opératoires et de composition. La méthodologie de surface de réponses, nous a permis le contrôle de tous les paramètres suscités pour donner naissance à des NEs stables et transparentes, capables de véhiculer des molécules faiblement solubles dans l'eau. Elles peuvent éventuellement servir de « Template » pour la production de gelisphères qui seront par la suite lyophilisées.

Dans ce chapitre, nous allons présenter les résultats de la formulation et la caractérisation de la NE avec 3 principes actifs peu solubles dans l'eau, il s'en suivra la sélection de la meilleure

formulation en termes de taille moyenne des particules et de potentiel zêta. Cette dernière fera l'objet d'une investigation par le biais des essais in vivo sur modèle animal.

1 Nanoémulsion à base de PVA-Tween®80 et SDS pour encapsuler des molécules faiblement solubles dans l'eau

Les nanoémulsions sont reformulées cette fois en encapsulant trois molécules candidates. Ces dernières sont choisies selon leur critère de solubilité. L'atorvastatine, le fénofibrate et l'acide folique sont, respectivement, un hypocholestérolémiant, un antilipidémiant de classe BCS II (Tziomalos 2006; Kevadiya 2018) et une vitamine faiblement soluble, également classée BCS II (Nguyen 2017), alors qu'une classification provisoire de BCS IV est attribuée selon l'étude menée par Hofsäss et al. (Hofsäss 2017). Voir fiche technique en annexe 6.

Une fois les substances encapsulées, les NEs subiront une caractérisation physico-chimique, qui nous permettra de sélectionner un principe actif modèle pour les études in vivo. Cette sélection se fera sur la base de la taille moyenne des gouttelettes, mais aussi de leur potentiel zêta. Elle sera confirmée plus tard par le taux d'encapsulation déterminé par le biais des essais de dissolution.

1.1 Protocole expérimental et mode d'encapsulation

L'introduction de la molécule active se fait dans la phase organique. Elle sera au préalable dissoute dans l'éthanol, 50 ml étant le volume final de la NE. Nous rajoutons par la suite l'ensemble des composants, à savoir l'huile et le Tween®80. Le mélange est soumis aux conditions opératoires fixées lors de la dernière étude d'optimisation, détaillée dans le Chapitre II.

La présence de la molécule dans la phase organique lui permet d'être rapidement encapsulée dès la mise en contact des deux phases, organique et aqueuse (Hansali 2012). En effet, toutes les molécules choisies sont peu solubles dans l'eau, ce qui favorise les interactions hydrophobes. L'éthanol présent dans la phase organique va rapidement diffuser dans la phase aqueuse et entraîner avec lui la phase huileuse contenant la molécule à encapsuler.

Par ailleurs, le rapport phase dispersée/phase dispersante (H/E) est un élément à prendre en considération lors d'une encapsulation (Mehta 1996; Li 1999). En effet, le passage d'un rapport (H/E) faible à un rapport plus faible, ou bien l'usage d'un grand volume de phase dispersante, permet de mieux décomposer la phase organique et d'améliorer l'encapsulation.

Enfin, nous allons reconduire les mêmes caractérisations faites sur les NEs placebo (taille moyenne des gouttelettes, indice de polydispersité et potentiel zêta). Toutes les mesures sont répétées trois fois après 24 heures de repos.

1.2 Détermination de la taille moyenne des gouttelettes et du potentiel zêta après encapsulation des molécules candidates

La détermination de la taille moyenne des nanogouttelettes et du potentiel zêta s'est faite sur le Zetasizer Nano ZS[®] Malvern.

1.3 Résultats et discussions

Les résultats des mesures sont présentés dans le tableau ci-dessous.

Tableau III. 1. Valeurs et moyenne de taille des gouttelettes, de l'indice de polydispersité et du potentiel zêta des NEs de l'atorvastatine, fénofibrate et acide folique.

Code formule	Taille des gouttelettes (nm)	Moyenne ± écart type	Indice de polydispersité	Moyenne ± écart type	Potentiel zêta (mV)	Moyenne ± écart type
NE-AF	129,5	112,6±20,2	0,763	0,806±0,037	-27,5	-27,1±0,3
	118,2		0,827		-27,0	
	90,21		0,827		-27,0	
NE-ATR	277,5	285,16±35,03	1	1	-26,3	-25,8±0,4
	323,4		1		-25,6	
	254,6		1		-25,6	
NE-FB	49,71	48,94±0,67	0,738	0,755±0,015	-26,5	-26,4±0,2
	48,64		0,767		-26,6	
	48,47		0,761		-26,2	

NE-AF: nanoémulsion encapsulant l'acide folique ; NE-ATR : Nanoémulsion encapsulant l'atorvastatine ; NE-FB : nanoémulsion encapsulant le fénofibrate.

Les résultats de la taille des gouttelettes des NEs obtenues après encapsulation des molécules candidates attestent qu'il s'agit bien de nanoémulsions.

D'autre part, les valeurs du potentiel zêta sont très proches les unes des autres, elles varient entre -27 et -25 mV. Ces résultats sont très satisfaisants et concordent avec les résultats d'optimisation.

Par ailleurs, l'indice de polydispersité est supérieur à 0,25 pour toutes les formes testées ($0,25 < \text{PdI} < 0,5$). Rappelons qu'aucune filtration n'a été effectuée et que les mesures faites sont sensibles à la présence d'agréats, ce qui peut expliquer les résultats obtenus.

Après encapsulation, nous pouvons observer une légère modification des caractéristiques initiales (voir chapitre I et II). En effet, la taille des particules de NE-ATR et NE-AF se trouve légèrement augmentée. Alors que la NE encapsulant le fénofibrate présente une taille moyenne des particules ne dépassant pas 50 nm. En revanche, l'encapsulation des trois molécules candidates n'a pas eu une grande influence sur le potentiel zêta et sur le PdI des NEs obtenues.

Les trois NEs ont une taille de particules acceptables. Nous avons sélectionné le fénofibrate pour la suite des travaux vu qu'elle présente le plus faible diamètre moyen des particules (48,94 nm), un bon potentiel zêta (-26,4 mV) et un indice de polydispersité bas comparé aux deux autres formes. Le fénofibrate se trouve être la molécule la mieux adaptée à nos conditions de synthèse et répondant favorablement aux attributs qualité recherchés.

2 Essais in vivo pour l'évaluation de l'efficacité des NEs encapsulant le fénofibrate

Les recherches en cours sur l'évaluation de la biodisponibilité des molécules faiblement solubles dans l'eau, se font pour la plupart sur des systèmes micrométriques ou nanométriques, telle que les NEs de type H/E (Sessa 2011). Les NEs ont prouvé leur potentiel thérapeutique à travers différentes études pour s'assurer de la mise à disposition in vivo du PA, utilisant les cultures cellulaires Caco-2 (Sessa 2011), les études pharmacocinétique et pharmacodynamique sur les souris blanches (Prokhorov 2014), ou encore dans des conditions qui dépendent de l'activité thérapeutique de la molécule encapsulée telle que l'induction d'une hyperglycémie (Mostafa 2015; Tanjir Islam 2016). Les animaux tests reçoivent généralement la molécule ou la combinaison thérapeutique développée parallèlement à un autre groupe « témoin » qui reçoit

la molécule inchangée ou commercialisée, alors qu'un troisième groupe est destiné à recevoir la solution saline en même volume, comme placebo (Prokhorov 2014).

On atteste que les molécules encapsulées dans des NEs dont la taille des particules est en dessous de 500 nm, voient leur biodisponibilité améliorée (Acosta 2009), avec une augmentation du taux d'absorption à travers la paroi intestinale par un mécanisme passif (Luo 2006). Par exemple, les études comparatives des paramètres pharmacocinétiques et pharmacodynamiques entre la carbamazépine encapsulée dans une NE à base d'huile de soja et la carbamazépine seule, montrent une meilleure activité anticonvulsivante avec une biodisponibilité relative 1,6 fois plus élevée et une concentration maximale 2 fois supérieure à celle de la molécule non encapsulée (Prokhorov 2014).

Tout médicament doit se soumettre à des essais précliniques, généralement faits sur des modèles biologiques dits « essais in vitro », mais aussi à des « essais in vivo » conduits sur des modèles expérimentaux de la maladie (des animaux de laboratoires), dont l'objectif est de mesurer l'activité du produit et prouver son efficacité (Hansali 2012).

En effet, la NE-FB formulée dans les conditions optimales sera conduite pour des essais in vivo sur des rats de laboratoires, afin d'attester ou non de son efficacité et par la même occasion valider encore une fois la formulation.

Selon la littérature, la composante qualitative et quantitative de notre NE (en termes de tensioactifs) améliore la solubilité du fénofibrate. Goke et al., affirment que la solubilité du PA est 600 fois plus élevée en présence du Tween[®]80, à raison de 2% et 70 fois plus élevée, lorsque ce tensioactif est associé au PEG. Pour résumer, la solubilisation de cette molécule active dans les micelles du polysorbate 80 à partir de 2%, peut contribuer à promouvoir sa mise à disposition dans l'organisme (Göke 2017). Des résultats de solubilité similaires ont été publiés, cette fois ci en présence de solutions de SDS, qui ont permis d'augmenter de 2000 fois la solubilité et d'un facteur de 500 la vitesse de dissolution (Granero 2005).

Dans notre formulation, le Tween[®]80 et le SDS constituent la phase interfaciale qui entoure le fénofibrate. A travers l'étude qui va suivre, nous allons apporter les preuves biopharmaceutiques nécessaires à l'amélioration de la solubilité et par conséquent de l'efficacité thérapeutique de la NE-FB.

2.1 Prérequis des essais in vivo

Les essais in vivo conduits sur les rats doivent répondre au préalable à des exigences. Ces animaux doivent être préparés à toutes sortes de manipulations : pesée, prélèvements, injections, administrations par gavage qu'elles soient alimentaires ou médicamenteuses et éventuellement l'anesthésie. Cette dernière doit être validée par un personnel compétent et qualifié, afin de prévenir la douleur reliée à une injection ou à un prélèvement.

Il s'agit d'animaux extrêmement émotifs, ce qui peut influencer la conduite des essais ainsi que les résultats.

Avant toute opération :

- Tout animal doit être identifié, son état général doit être vérifié ;
- Toute anomalie observée doit être notée ;
- Avant toute anesthésie, l'animal doit être pesé ;
- Chaque animal doit recevoir une dose identique de l'alloxane pour éviter un sous-dosage ou un surdosage ;
- Vérifier que la seringue contient le volume approprié et qu'il y'a absence de bulles d'air ;
- Toute substance administrée doit être amenée à la température ambiante ;
- Pour l'administration par voie orale, on préconise un volume allant de 2,5 ml à 3 ml ;
- Le nombre d'administration per os est limité à une seule fois par jour ;
- Utiliser une aiguille pour gavage en acier inoxydable ou en plastique, de longueur appropriée à la grosseur de l'animal ;
- La longueur requise se mesure des lèvres de l'animal aux dernières côtes ;
- Une même aiguille peut être utilisée pour plusieurs rats dans le cas de la voie per os ;
- Selon cette même voie, la grosseur de l'aiguille appropriée est de 16 ;
- La pointe de l'aiguille doit être arrondie ;
- Maintenir l'animal fermement en croisant ses pattes avant, afin d'éviter qu'il ne bouge et qu'il se blesse (bonnes pratiques d'appréhension) ;
- Entrer l'aiguille à côté des incisives avec un angle de 45°C, en longeant le palais ;
- Ne pas forcer à la descente et retirer lentement après administration du volume requis ;
- Si le sang apparait, retirer l'aiguille délicatement et recommencer.

2.2 Matières premières, matériels et méthodes

2.2.1 Molécule candidate

Dans les essais in vivo qui vont suivre, il s'agit d'évaluer l'efficacité de la NE encapsulant le fénofibrate, une molécule faiblement soluble dans l'eau, de classe BCS II. Cette dernière a été gracieusement fournie par les laboratoires MM d'Annaba.

- **Classe pharmacothérapeutique** : hypocholestérolémiant et hypotriglycéridémiant ;
- **Indications thérapeutiques** : le fénofibrate est administré chez l'adulte en complément d'un régime alimentaire ou encore dans le cadre d'une perte de poids. Il est indiqué dans le cas d'une hypertriglycéridémie associée ou non à un faible taux de HDLc, mais aussi dans le cas d'une hyperlipidémie mixte, lorsque les statines sont contre indiquées ou non tolérées (ANSM 2020).
- **Propriétés pharmacodynamiques** : Le fénofibrate est un dérivé de l'acide fénofibrique dont les effets rapportés sur les paramètres lipidiques chez l'homme sont expliqués par l'activation du Peroxisome Proliferator Activated Receptor de type alpha (PPAR α), qui entraîne une lipolyse et l'élimination du plasma des particules athérogènes riches en triglycérides, par activation de la lipoprotéine lipase et la réduction de la production d'Apoprotéine CIII.

Le PPAR α conduit également à la synthèse des apoprotéines AI et AII et par voie de conséquence à une augmentation des fractions de haute densité (HDL) qui les contiennent. Le fénofibrate est connu pour abaisser de 20 à 25 % le cholestérol et la triglycéridémie de 40 à 50 %. Les effets du fénofibrate sur les lipoprotéines conduisent à une baisse des fractions de faible densité (VLDL et LDL) contenant l'apoprotéine B. Vu son effet sur le LDL cholestérol et les triglycérides, le traitement par le fénofibrate devrait être bénéfique pour les patients atteints d'hypercholestérolémie avec ou sans hypertriglycéridémie (ANSM 2014).

- **Propriétés pharmacocinétiques** : les concentrations plasmatiques optimales sont obtenues au bout de 4 à 5 heures après administration par voie orale et deviennent stables en traitement continu. L'administration concomitante de nourriture augmente l'absorption du fénofibrate.

L'acide fénofibrique est fortement lié à la sérumalbumine à raison de >99%.

Le fénofibrate est hydrolysé par les estérases en acide fénofibrique (métabolite actif) ; ce dernier à une demi-vie plasmatique de 20 heures. Quant au fénofibrate inchangé, il est impossible de le doser dans le sérum. Le médicament est excrété complètement et essentiellement par voie urinaire au bout de 6 jours, sous forme d'acide fénofibrique et de son dérivé glucuroconjugué (ANSM 2014).

2.2.2 Autres

Héparine[®] 5000 UI/ml, diéthyl éther (Sigma Aldrich) ; Alloxane monohydrate 98% (Alfa Aesar).

2.2.3 Petits matériels et verreries

- Gants.
- Gaze.
- Coton.
- Pipette de 200µl.
- Pipette pasteur.
- Seringue de 2,5ml.
- Embouts pour pipette.
- Cônes Eppendorf.
- Gourde.
- Sciure de bois.
- Cages pour rats et grille de protection.
- Seringue pour gavage.
- Fioles, béchers et flacons.
- Bandelettes réactives pour contrôler la glycémie.
- Appareil de contrôle de la glycémie portatif.
- Tubes héparines.
- Balance analytique.
- Centrifugeuse.

2.2.4 Matériel biologique et sélection des groupes d'animaux de laboratoire

Le choix du rat comme sujet animal est largement répandu dans des études similaires, retrouvées dans la littérature. Le rat du désert peut être intéressant pour cette étude mais sa

fragilité et son caractère rendent ce modèle peu commode. La souris obèse est un autre modèle envisageable, mais qui coûte cher. Le modèle choisi pour cette étude est un rat Wistar, au pelage blanc et aux yeux rouges globuleux. Possédant un métabolisme et une physiologie semblables à celles de l'homme. Ils sont dociles, peu agressifs et faciles d'entretien. L'étude de l'efficacité in vivo de la NE est réalisée sur les rats femelles de laboratoires, pesant entre 150 et 250 g.

2.2.4.1 Conditions d'élevage et préparation des lots

Tous les rats ont été préparés aux conditions expérimentales en observant une période d'adaptation d'une semaine au minimum, avant le début de l'expérimentation. Ces derniers reçoivent toute l'attention nécessaire pour leur éviter le stress qui pourrait compromettre l'étude en question (N.A.S 2011).

Pendant toute la durée de l'expérimentation, les rats furent maintenus dans une animalerie bien ventilée à une température ambiante de 25°C, placés aléatoirement dans des cages en matière plastique à couvercle en acier inoxydable et soumis à un cycle de lumière/obscurité de 12/12h, pour le respect de leur horloge biologique.

Une couche de sciure en bois est déposée au fond de chaque cage et renouvelée tous les deux jours.

Les animaux ont libre accès à l'eau potable et à la nourriture qui se compose de granulés standards. Leur poids est quotidiennement vérifié ; leur queue est marquée afin qu'ils puissent être identifiés.

La règle des 3R (Réduire, Remplacer et Raffiner) élaborée par Russell and Burch en 1959 (Russell 1959), constitue la démarche éthique appliquée à l'expérimentation animale, qui a été progressivement adoptée par les institutions, puis dans la réglementation. Le nombre de rats de l'étude est justifié car la technique est considérée comme invasive, vue le type de prélèvement à réaliser (*animal care and use program University of California, Berkeley animal care and use committee, Guidelines for Justification of animal numbers, last revised 5/7/2012, p.1-5*). Le nombre de rats choisis dépend essentiellement de la nature de l'étude. Selon ce même document, cette étude est considérée comme une étude pilote qui nécessite un petit lot. Pour ce faire, les rats sont répartis en 4 groupes, constitué chacun de 5 rats au minimum. Souvent, le 5^{ème} rat est considéré comme un animal de remplacement.

Dans notre travail, nous avons considéré les rats du lot 5, comme rats de remplacement.

Groupe 1 : groupe de rats malades (150 mg/kg d'alloxane en IP), non traités, eau et pellets *ad libitum*.

Groupe 2 : groupe de rats malades (150 mg/kg d'alloxane en IP), traités avec la molécule de référence seule.

Groupe 3 : groupe de rats malades (150 mg/kg d'alloxane en IP), traités avec la NE-FB.

Le fénofibrate administré à raison de 72,5g/70kg est considérée comme efficace chez l'homme (Tanjir 2016). Selon l'Agence Nationale de la Sécurité et du Médicament, la dose recommandée pour un poids moyen de 70 kg est de 160 mg/jour (ANSM 2014).

Groupe 4 : groupe de rats malades (150 mg/kg d'alloxane en IP), traités avec le produit commercialisé (rats témoins).

Groupe 5 : rats de remplacement.

Tous les lots sont identifiés et les rats codifiés (R : rat ; L : lot ; A/B : sous-groupes de lot) et marqués au niveau de la queue avec un stylo indélébile (Figure III.1).

2.2.4.2 Pesée des rats

Les rats doivent passer par une phase d'adaptation afin de s'acclimater et de prendre attache avec le personnel, car tout changement brusque peut nuire à leur état général. Les rats malades sont mis à l'écart et rapidement remplacés par d'autres qui seront soumis aussitôt aux mêmes traitements.

Tous les rats sont pesés quotidiennement et leurs cages nettoyés régulièrement. La pesée est effectuée sur une balance analytique de précision à partir de 9h du matin jusqu'à la fin des essais.

2.2.5 Méthodologie expérimentale

2.2.5.1 Induction du diabète de type 1 et contrôles des paramètres biochimiques

Pour atteindre l'objectif fixé dans notre travail, à savoir prouver l'efficacité de la NE encapsulant le fénofibrate, nous avons induit chimiquement un diabète de type I. en effet, certaines substances chimiques peuvent induire un diabète chimique, à travers une nécrose sélective des cellules B de Langerhans du pancréas. L'alloxane (Etuk 2010) et la streptozocine (Anderson 1974; Povoski SP. 1993), sont des analogues au glucose utilisés comme outils standards en recherche pour induire un diabète expérimental chez l'animal de laboratoire.

Après mise à jeun pendant 12 heures, l'injection de la streptozotocine (STZ) chez les rats permet d'induire le diabète, en dose unique de 60 mg/kg du poids (Pellegrino 1998; Hayashi 2006; Mostafa 2015). Pour ce faire, elle est dissoute dans un tampon citrate à raison de 0,1 mol/L, pH= 4,5 et injectée à jeun en intrapéritonéale. Cette molécule cause la destruction des cellules B du pancréas. La sécrétion de l'insuline entravée va causer l'accumulation du glucose libre et entraîner ainsi une hyperglycémie (Krishnakumar 1999; Dhamush 2012).

En effet, le diabète pancréatique ou diabète de type 1 s'accompagne d'hyperlipémie et d'hypercholestérolémie, car l'insuline, outre son effet hypoglycémiant, exerce une action directe sur le métabolisme lipidique. Avec un taux >250 mg/dL, le rat est diabétique (Szkudelski 2001; Chhabra 2011). Pour d'autres (Akbarzadeh 2007; Al-Khalifa 2009), un rat avec un taux de 180 mg/dl présente bien une hyperglycémie. Alors que dans certains cas, une valeur de 160 mg/dl est considérée comme élevée (Belhadj 2013).

Aussi, ce trouble métabolique voulu est mis en évidence soit par pancréatectomie ou bien par injection intraveineuse d'un autre analogue au glucose, l'alloxane. La première intervention pouvant être fatale pour le sujet animal, on opte souvent pour l'injection de l'alloxane, causant ainsi le « diabète alloxanique ». Ce dernier s'installe lorsque à la suite de lésion des cellules des îlots de Langerhans, la sécrétion d'insuline est suffisamment réduite et l'hyperglycémie s'installe au bout du 2^{ème} jour (Simonnet 1954). La perturbation métabolique du glucose et des lipides est induite par injection de l'alloxane à raison de 120 mg/Kg, car les voies influençant le métabolisme des glucides sont également celles responsables du métabolisme lipidique (Jenkins 1995). Cette dose peut être insuffisante chez le rat, lorsqu'elle est inférieure à 150 mg/Kg (Szkudelski 2001).

Selon la littérature, chez un sujet diabétique, on note une augmentation du cholestérol et des triglycérides (Iams 1977; Sharma 1996). Ainsi, après injection de l'alloxane, nous observons une baisse du HDL_C associée à une augmentation du LDL_C et des TG. On appelle cela une dyslipidémie de diabète de type 1 (Vergès 2013).

La streptozosine et l'alloxane sont deux molécules capables d'induire une hypoglycémie fatale pour le rat (Pribac 2007). Ce dernier étant très sensible s'il est à jeun (T. Szkudelski 2001). Afin de prévenir cet incident, les rats doivent recevoir juste après l'injection une solution glucosée à

5% pendant une nuit à côté de leur alimentation habituelle (Pribac 2007). Par ailleurs, les rats diabétiques doivent recevoir durant toute l'étude une quantité suffisante d'apport hydrique. En effet, la polydipsie est un signe qui accompagne le sujet diabétique, il en résulte une déshydratation qui stimule les centres hypothalamiques de la soif (Maried 1999).

Le choix de l'analogue du glucose se base sur les données de la littérature. La streptozosine est le chef de file avec 69% de participation dans les études relatives aux molécules qui induisent le diabète dit chimique, s'en suit l'alloxane avec un taux de participation de 31% (Maqsood 2008). Ce dernier est néanmoins le plus largement utilisé pour induire le diabète expérimental de type 1 chez les animaux tels que les rats (Etuk 2010). L'alloxane est injectée en dose unique en intrapéritonéale, sous forme de solution saline à 120 mg/kg (Jenkins 1995), ou bien à 150 mg/kg du poids corporel moyens des rats (Belhadj 2013), voir figure III.2 et III.3.



Figure III. 1. Préparation des groupes de rats à l'essai in vivo.



Figure III. 2. Préparation de la solution d'alloxane à raison de 150mg/Kg.

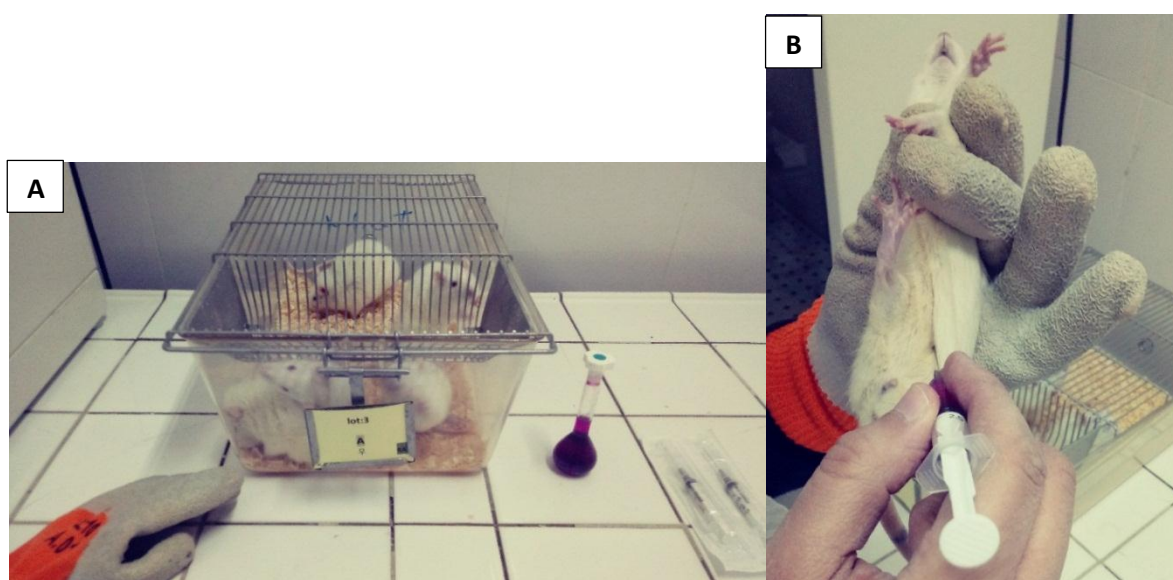


Figure III. 3. Préparation du plan de travail (A); Induction du diabète expérimental chez les rats par injection IP de l'alloxane (B).

2.2.5.1.1 Dosage de la glycémie

Pour vérifier que le diabète a été bel et bien instauré, le lendemain de l'injection nous trions les rats par dosage de la glycémie à l'aide de bandelettes réactives. L'évolution de la glycémie se fait selon un programme préétabli. Toutes les mesures sont effectuées en même temps que le prélèvement oculaire. Nous recueillons le sang par adsorption au niveau de l'extrémité de la bandelette puis lecture par l'appareil portatif de contrôle de la glycémie (glucomètre), qui affiche aussitôt la valeur.

L'effet hypoglycémiant est également évalué tout au long de l'essai. La mesure se fait, en complément du prélèvement sanguin rétrobulbaire du rat, après l'avoir mis à jeun pendant 12 heures.

2.2.5.1.2 Dosage des paramètres biochimiques après administration médicamenteuse

Des prélèvements sanguins sont effectués à des intervalles réguliers (14 jours), au niveau de la veine oculaire, après anesthésie générale. Tous les prélèvements sont récoltés sur tubes héparinés puis centrifugés. Les sérums sont de suite identifiés et congelés, puis transportés pour analyses biochimiques.

Les paramètres biochimiques de notre étude consistent en une exploration du bilan lipidique (triglycérides, cholestérol total) et dosage glycémique. Des taux de cholestérol supérieurs aux normes indiquent qu'une hyperlipidémie est instaurée.

2.2.5.2 Traitement médicamenteux

Le traitement est administré aux cobayes comme indiqué précédemment (voir titre 2.2.4.1). Il est instauré à partir du 3^{ème} jour de l'administration de l'alloxane. Après 14 jours de traitement, un bilan sanguin est effectué sur tous les rats, après anesthésie au diéthyl éther (figure III.5). Les échantillons sont centrifugés pour enfin récupérer leur sérum, qui sera immédiatement stocké avant analyse.

La dose de fénofibrate recommandée pour un poids moyen de 70 kg est de 160 mg/jour (ANSM 2014). Après administration, l'animal est remis en cage en ayant libre accès à la nourriture et à l'eau. Une administration unique par animal est réalisée. Avant chaque administration, un contrôle pondéral est effectué (voir figure III.6).



Figure III. 4. Préparation de la charge médicamenteuse (A), administration per os de la dose médicamenteuse au rat (B).

Jour 0 (semaine 1): prélèvement de tous les rats à jeun;

Jour 7 (semaine 2) : injection de l'alloxane et administration per os d'une solution glucosée à 5% pour éviter le choc hypoglycémique ;

Jour 10 : après 72 heures, nous vérifions l'état général des rats et faisons un prélèvement sanguin (série N°1) et mesurons la glycémie au moyen du glucomètre pour vérifier l'induction du diabète de type I ; puis screening des rats et regroupement de ces derniers en groupes de plus de 5 rats/lot ;

Jour 24 (semaine 4): phase de screening complétée et introduction du traitement journalier au sein des groupes ;

A partir du Jour 38 (semaine 6): prélèvements de tous les rats en respectant des intervalles de 14 jours par série de prélèvements (série N°2, 3 et 4).

2.2.6.1 Conduite des prélèvements

Les prélèvements de sang rétrobulbaire, sont faits après anesthésie au diéthyl éther en veillant à ne pas dépasser deux prélèvements par œil.

Les prélèvements se font au moyen de pipettes pasteur en verre, héparinées (figure III.7 et III.8). Après prélèvement, le saignement est stoppé avec de la gaze stérile. Le prélèvement sanguin est transféré dans des tubes pour une centrifugation à 6000 g (1500 g pendant 15 minutes à 4°C). Le sérum est recueilli dans des cônes en polypropylène pour être conservé à -4°C.



Figure III. 7. Préparation des rats anesthésiés au prélèvement.

2.2.6.2 Dosage des paramètres biochimiques

Ces prélèvements sont effectués dans le but du dosage des paramètres d'intérêt. Nous nous basons principalement sur le profil lipidique des rats, en dosant dans le sérum le cholestérol total (CHOLT), les triglycérides (TG) mais encore la glycémie (G).

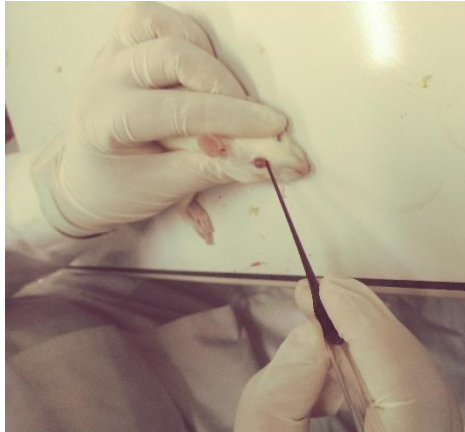


Figure III. 8. Prélèvement rétrobulbaire chez le rat.

2.3 Résultats et discussions

L'injection intrapéritonéale de l'alloxane à raison de 150 mg/kg, induit le diabète dit alloxénique. En appliquant le protocole précédemment décrit, nous ressortons avec les résultats et interprétations suivantes.

2.3.1 Evolution de l'état général des rats et de leur poids corporel

Une fois les lots de rats réceptionnés, ces derniers se sont vite adaptés à l'environnement dans lequel ils ont été placés (local climatisé et ventilé). Pendant la période d'adaptation qui a duré 14 jours, aucune morbidité n'a été signalée. Cependant, une légère perte pondérale est observée qui est vite rattrapée à la fin de la phase d'adaptation pour tous les lots.

Après les 24 heures qui suivent l'injection de l'alloxane, nous pouvons noter une polyurie et polydipsie chez tous les rats. Ces signes cliniques sont caractéristiques d'un diabète. Par ailleurs et durant les 72 heures d'observations, il y'a eu pour certains rats une chute brutale du poids avec dégradation de l'état général (grande fatigue, yeux creux, peau moins élastique), qui ont fini par engager le pronostic vital de ces derniers. Alors que d'autres cas de morbidité sont dus essentiellement à un état hyperosmolaire hyperglycémique, qui se caractérise par une hyperglycémie majeure, et une hyperosmolarité sérique importante qui entraînent

inévitablement un coma, des convulsions et la mort de l'animal. Un cas de cannibalisme a également été observé.

Durant toute cette période d'étude, le contrôle du poids individuel des rats est un paramètre important, évalué avant injection de l'alloxane et pendant toute la phase diabétique. En effet, ce suivi nous renseigne sur l'état de santé du sujet modèle et nous permet d'appréhender l'étude correctement.

A partir de la semaine 4 (phase de screening), les rats morts sont vite remplacés par les rats du lot 5, après contrôle de leur glycémie et avant la phase de médication qui se déroule à partir de la semaine 5 jusqu'à la semaine 10.

Les remplacements se font comme suit :

- L5R2A Remplace L4R2B.
- L5R3A remplace L4R4B.
- L5R5B remplace L3R5B.
- L5R2B remplace L3R4B.
- L5R4B remplace L2R4B.
- L5R5A remplace L1R5B.

La variation du poids corporel individuel et moyen des rats de chaque lot est représentée dans les tableaux suivants, suivis de leurs histogrammes et courbes.

Tableau III. 2. Variation du poids moyen du lot 1.

	S5	S6	S7	S8	S9	S10	Poids moyen (g)	Ecart type
R1A	165,2	185,4	176,8	175,8	189,7	189,8	180,4	9,6
R2A	133,4	152,4	144,3	143,4	167,8	-	-	-
R3A	154,8	170,6	158,6	161,3	163,9	161,6	161,8	5,3
R4A	179,2	187,2	185,7	184,0	188,2	184,4	184,8	3,2
R5A	188,2	202,4	200,3	196,9	206,1	198,9	198,8	6,1
R1B	195,5	208,1	208,5	204,0	203,0	202,0	203,5	4,8
R2B	183,6	190,4	190,1	188,1	194,5	197,2	190,7	4,8
R3B	178,5	184,5	174,1	179,0	181,2	177,7	179,2	3,5
R5B	220,2	227,9	224,0	224,0	227,1	225,7	224,8	2,8
PM	177,6	189,9	184,7	184,1	191,3	192,2	190,5	5,6

R : Rat

(-) : Rat mort

S: Semaine

PM : poids moyen

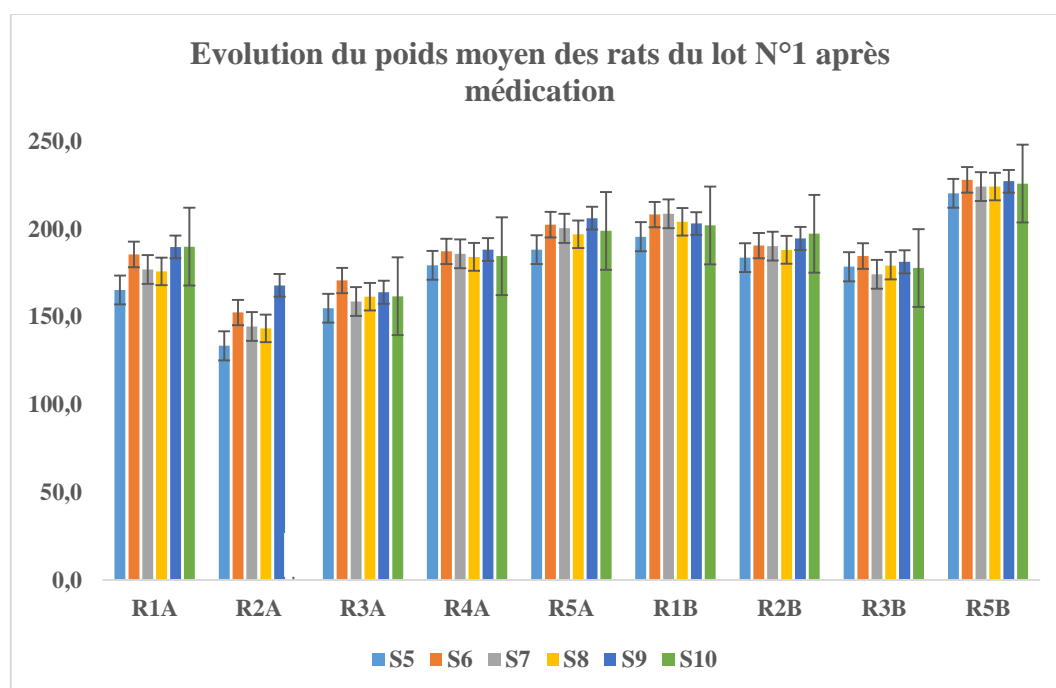


Figure III. 9. Evolution du poids moyen de chaque rat du lot 1 en fonction du temps.

Tableau III. 3. Variation du poids moyen du lot 2.

	S5	S6	S7	S8	S9	S10	Poids moyen (g)	Ecart type
R2A	151,7	172,7	169,9	175,7	172,7	-	-	-
R3A	159,4	173,8	173,9	173,1	175,9	171,8	171,3	6,0
R4A	186,8	193,7	192,9	198,9	199,8	197,8	195,0	4,9
R5A	152,9	164,9	157,9	159,7	159,5	159,5	159,1	3,9
R2B	136,3	126,3	-	-	-	-	-	-
R3B	154,5	167,5	164,5	170,8	169,1	171,2	166,3	6,3
R4B	222,0	213,5	204,0	207,4	213,5	211,7	212,0	6,2
R5B	160,9	168,1	163,7	166,5	164,6	166,7	165,1	2,6
PM	165,544	172,57	175,24	178,89	179,3	179,77	178,1	5,5

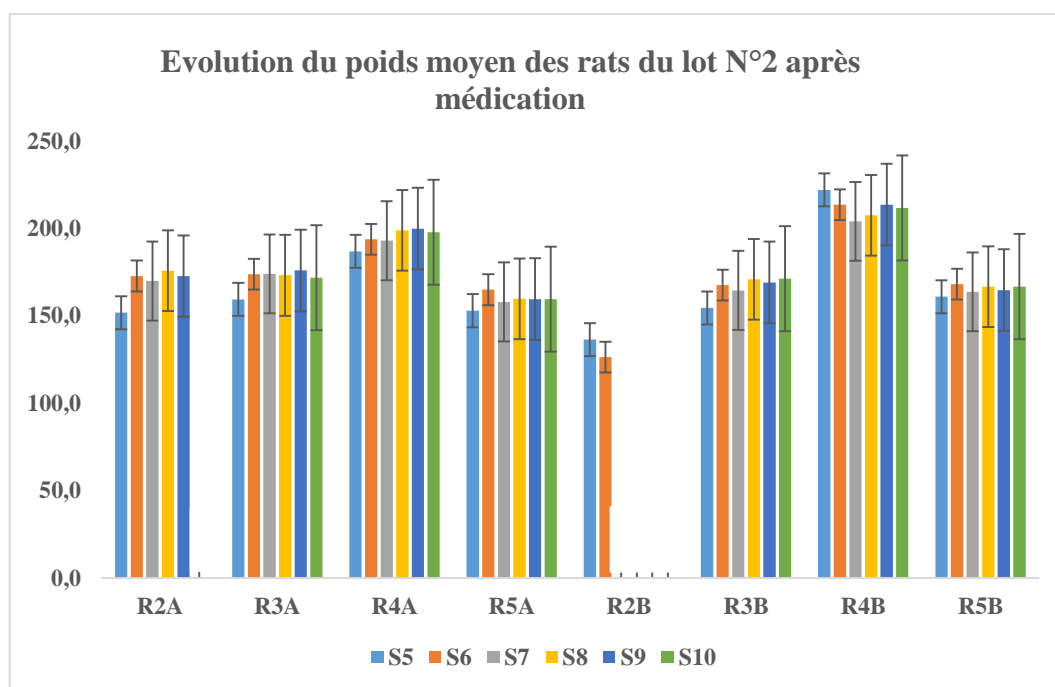


Figure III. 10. Evolution du poids moyen de chaque rat du lot 2 en fonction du temps.

Tableau III. 4. Variation du poids moyen du lot 3.

	S5	S6	S7	S8	S9	S10	Poids moyen total	Ecart type
R1A	139,9	149,1	136,3	-	-	-	-	6,6
R2A	188,8	175,6	169,4	185,0	185,0	177,1	180,1	7,3
R3A	174,9	189,4	179,5	190,6	189,8	180,9	184,2	6,6
R4A	198,0	195,1	186,0	189,0	185,1	176,5	188,3	7,7
R5A	186,0	193,9	183,0	191,9	185,9	175,0	185,9	6,8
R1B	164,8	167,5	151,2	162,4	167,1	167,3	-	6,3
R2B	142,7	153,0	137,1	153,3	150,0	156,9	-	7,5
R3B	165,7	173,6	157,5	170,1	170,6	167,5	167,5	5,6
R4B	123,4	138,7	135,5	151,4	150,9	147,3	141,2	10,9
R5B	197,3	201,6	186,5	202,7	201,2	200,1	198,2	6,0
PM	168,1	173,8	162,2	177,4	176,2	172,0	177,9	5,7

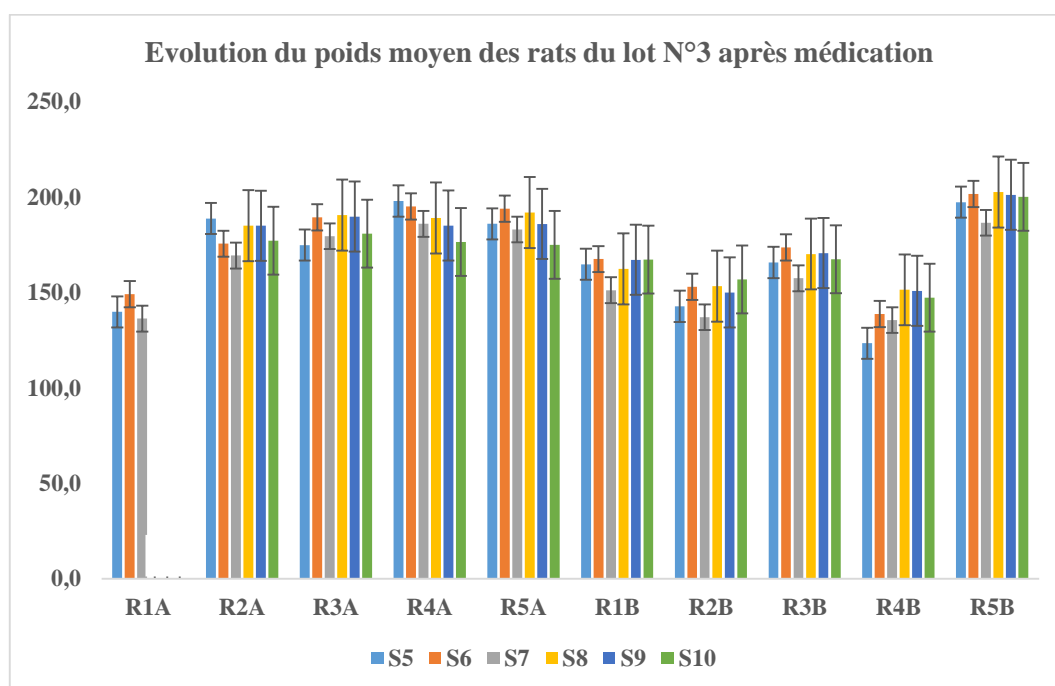


Figure III. 11. Evolution du poids moyen de chaque rat du lot 3 en fonction du temps.

Tableau III. 5. Variation du poids moyen du lot 4.

	S5	S6	S7	S8	S9	S10	Poids moyen total	Ecart type
R1A	142,4	156,7	169,2	156,5	160,5	167,0	158,7	9,6
R2A	138,4	151,4	161,4	144,7	156,0	164,7	152,8	10,0
R3A	155,3	175,5	178,6	166,9	172,8	172,2	170,2	8,3
R4A	178,0	197,8	198,1	184,6	195,1	196,0	191,6	8,3
R5A	185,4	194,5	193,8	181,2	190,7	190,3	189,3	5,1
R1B	133,5	107,9	-	-	-	-	-	-
R2B	164,8	195,4	196,3	184,8	193,5	199,5	189,0	12,9
R3B	133,3	135,5	141,4	125,6	137,7	143,5	136,2	6,4
R4B	186,8	201,0	200,9	179,3	198,3	203,4	194,9	9,7
R5B	196,8	207,8	199,6	192,6	204,9	201,1	200,5	5,5
PM	161,5	172,3	182,1	168,5	178,8	182,0	175,9	8,3

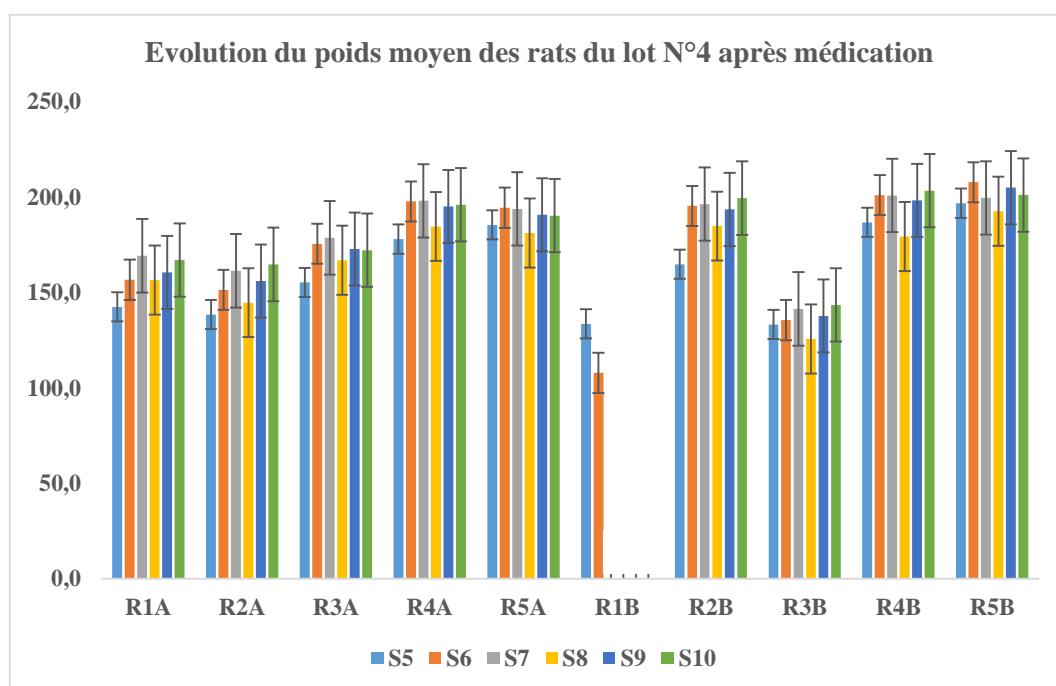


Figure III. 12. Evolution du poids moyen de chaque rat du lot 4 en fonction du temps.

Tableau III. 6. Comparaison du poids moyen des rats de l'étude par lot.

	LOT N°1		LOT N°2		LOT N°3		LOT N°4	
	T0	T10S	T0	T10S	T0	T10S	T0	T10S
R1A	177,2	189,8	-	-	-	-	183,9	167,0
R2A	-	-	-	-	189,1	177,1	174,9	164,7
R3A	172,9	161,6	174,8	171,8	177,5	180,9	168,9	172,2
R4A	160,0	184,5	186,3	197,8	199,9	176,5	206,5	196,0
R5A	170,2	198,9	173,5	159,5	199,2	175,0	200,6	190,3
R1B	164,3	202,0	-	-	170,9	167,3	-	-
R2B	170,9	197,2	-	-	194,5	156,9	171,2	199,5
R3B	175,4	177,7	163,3	171,2	181,2	167,5	168,9	143,5
R4B	153,3	-	176,5	211,7	183,7	147,3	180,6	203,4
R5B	203,4	225,8	177,8	166,7	220,5	200,1	190,8	201,1
PM du lot	172,0	192,2	175,4	179,8	190,7	172,0	182,9	182,0
ET	14,1	18,9	7,4	20,3	14,9	14,2	13,8	20,9

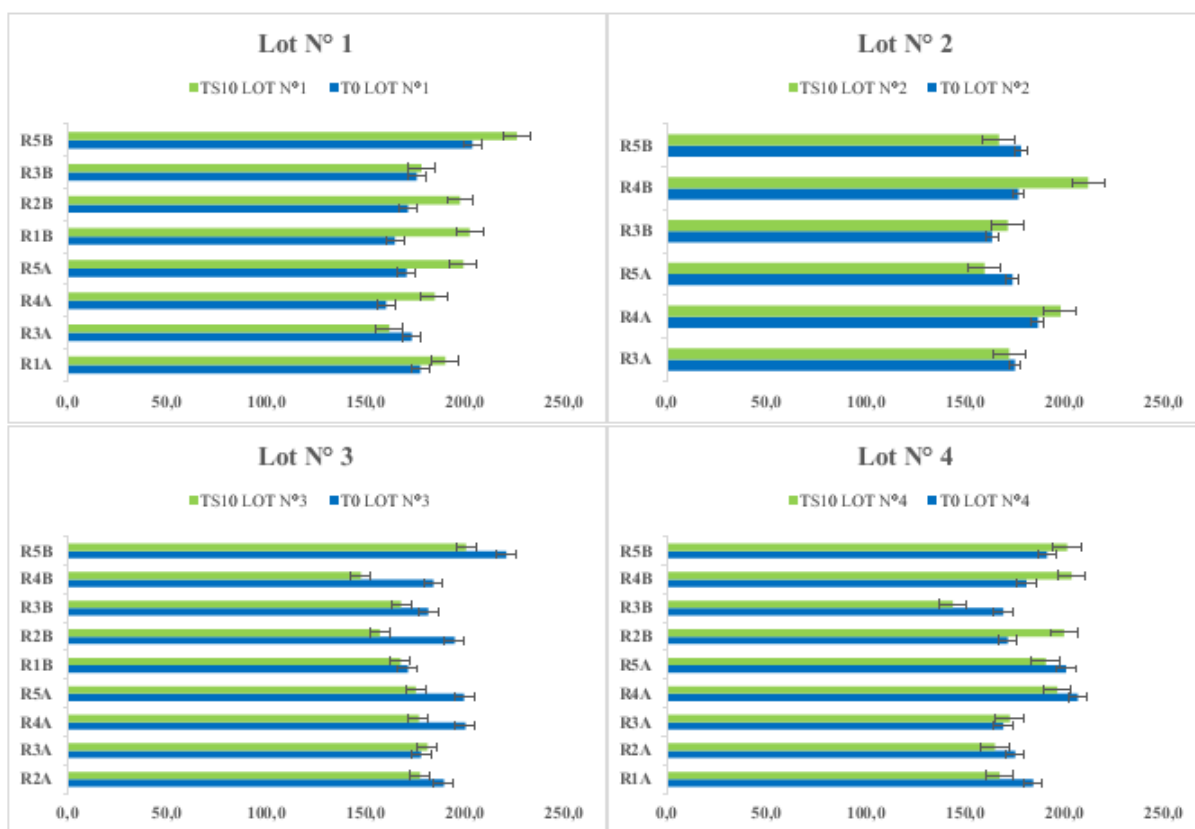


Figure III. 13. Comparaison de l'évolution du poids moyen de chaque rat par lot (T0 : avant induction du diabète, TS10 : à la fin de l'étude).

Tableau III. 7. Evolution du poids moyen de chaque lot au cours de l'étude.

	S5	S6	S7	S8	S9	S10	Ecart type
LOT 1	177,6	189,9	184,7	184,1	191,3	192,2	5,55
LOT 2	165,5	172,6	175,2	178,9	179,3	179,8	5,50
LOT 3	168,1	173,8	162,2	177,4	176,2	172,0	5,65
LOT 4	161,5	172,3	182,1	168,5	178,8	182,0	8,29

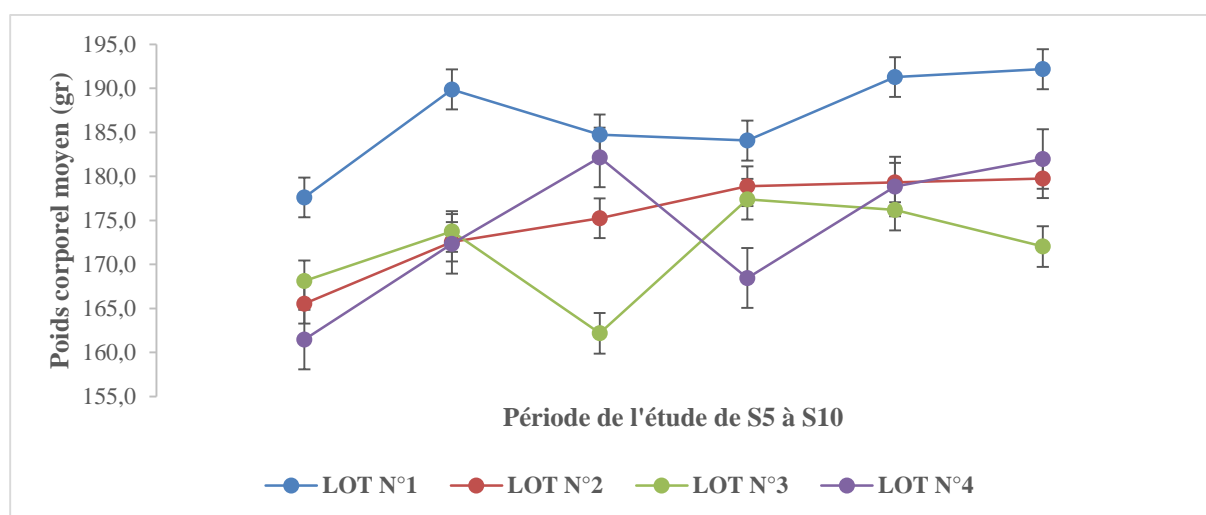


Figure III. 14. Evolution du poids moyen de chaque lot de rats en fonction du temps.

Selon les figures ci-dessus et les données présentées dans les tableaux relatifs à chaque lot de rats, nous pouvons observer une chute des poids individuels et moyen de chaque lot de rats pour les raisons suivantes :

- Changement d'environnement.
- Injection de l'Alloxane : les animaux peuvent ne pas survivre à une hypoglycémie qui survient généralement 24 heures après l'injection.
- L'administration par gavage entraîne un état de stress chez l'animal.
- Acte de prélèvement.

En effet, un changement brusque du milieu ou de l'habitat de l'animal entraîne un stress physiologique qui peut conduire à une perte de poids. Nous avons dès lors jugé nécessaire d'étendre la phase d'adaptation à 14 jours au lieu de 7 jours.

D'autre part, tout acte d'administration par invasion (gavage, injection) ou de prélèvement, a entraîné une légère perte de poids. Après 48 heures d'injection de l'alloxane, nous constatons

une morbidité liée à une hyperglycémie majeure. Suite à cela, les rats du lot 5 ont servis de rats de remplacement.

Les prélèvements sont effectués comme suit : semaine 3, semaine 5 puis semaine 7 et semaine 9, notés respectivement série 1, série 2, série 3 et série 4.

Selon la figure III.11 et III.12, à partir de la semaine 5, il y'a stabilisation du poids pour les lots 3 et 4, qui reçoivent le traitement à base de la NE-FB et le produit commercialisé, respectivement. En revanche, ce qui diffère entre ces deux lots, c'est la perte de poids observée les jours qui suivent l'acte de prélèvement et qui est rapidement rattrapé dans la semaine qui suit pour le lot 3 (semaine 6), voir tableau III.4 et III.7. Alors que pour le lot 4, cette récupération est plus tardive, elle apparait dans la semaine 7.

Cette prise de poids semble plus importante dans le lot 4 comparativement au lot 3. En effet, le poids moyen varie de 168,1gr à 176,2gr pour le lot 3, tandis que pour le lot 4 les valeurs du poids moyen varient de 161,5gr à 182,0gr (tableau III.7). Quant aux lots 1 et 2 qui reçoivent respectivement, la solution saline et le fénofibrate seul, il y'a augmentation notable du poids moyen de 177,6 gr à 191,3gr et de 165,5 gr à 179,3 gr, respectivement.

L'étude comparative de l'évolution individuelle du poids moyen (tableau III.6 et figure III.13), indique que la prise de masse est faite de manière contrôlée pour les rats du lot 3, alors que tous les rats du lot 1 (témoin) ont un poids à T_{S10} supérieur à celui enregistré à T_0 (excepté pour R3A). Tandis que pour les lots 4 et 2, cette tendance est moins prononcée.

A l'issue de ces résultats, vis-à-vis du contrôle pondéral, nous pouvons dire que l'efficacité de la NE-FB est comparable à celle de la molécule commercialisée avec un effet plus précoce de notre formulation (NE-FB) et un meilleur contrôle de la prise pondérale.

2.3.2 Evolution du taux glycémique

Les valeurs de la glycémie des rats des groupes d'étude sont présentées dans les tableaux ci-dessous. La glycémie est mesurée au glucomètre après prélèvements rétrolobulaires, par dépôt d'une goutte de sang sur la bandelette réactive.

D'après les tableaux III.9 et III.10, suite à l'injection de l'alloxane, tous les rats de l'étude présentent une hyperglycémie nettement exprimée (série 1), qui peut parfois entraîner la mort

de l'animal (cases jaunes). Des valeurs de glycémie très élevées sont observées pour les lots : 1, 3, 4 et 5.

On peut dire que les résultats du suivi de la glycémie ont montré qu'avec une injection de l'alloxane à raison de 150mg/kg, l'hyperglycémie s'exprime clairement au bout de 72 heures. A partir de ce moment, tous les rats du lot 3 et 4 peuvent recevoir la charge médicamenteuse, parallèlement à la solution saline (lot 1) et le fénofibrate seul (lot 2), pour poursuivre l'investigation. Le contrôle de la glycémie reste toujours effectif à côté des autres paramètres biochimiques (triglycérides et cholestérol).

Tableau III. 8. Valeurs de la glycémie contrôlée au glucomètre avant injection de l'alloxane.

	LOT 1	LOT 2	LOT 3	LOT 4	LOT 5
R1A	0,87	0,75	0,98	1,18	1,33
R2A	0,9	0,97	1,01	0,81	1,27
R3A	0,91	0,84	1,09	1,08	0,86
R4A	0,75	1,05	0,96	1,14	1,25
R5A	1,02	1,1	1,12	1,11	1,17
R1B	1,13	1,01	1,14	0,95	1,08
R2B	1,21	1,1	0,88	0,87	0,98
R3B	0,96	1	0,79	1,21	1,23
R4B	1,37	0,98	1,33	1	0,99
R5B	1	0,97	1,1	0,76	0,77

Tableau III. 9. Valeurs de la glycémie (g/dL) contrôlée au glucomètre 72 heures après injection de l'alloxane (série 1).

	LOT 1	LOT 2	LOT 3	LOT 4	LOT 5
R1A	1,87	-	HIGH	4,1	HIGH
R2A	1,71	3,89	1,85	3,38	1,83
R3A	3,51	1,33	4,42	2,5	2,16
R4A	1,64	1,5	2,45	1,46	-
R5A	1,97	1,92	1,73	2,23	1,92
R1B	4,6	2,93	-	HIGH	3,89
R2B	1,34	1,15	1,78	-	1,67
R3B	4,33	1,42	-	HIGH	5,13
R4B	HIGH	2,36	4,56	1,22	1,39
R5B	-	2,72	-	1,79	2,22

HIGH Mention affichée lorsqu'il y a hyperglycémie majeure

(-) Rat mort après prélèvement

(-) Rat mort avant contrôle

Au cours de l'étude, nous pouvons également apprécier la réduction du taux de glucose pour certains rats (voir les tableaux III.11, III.12 et III.13).

Tableau III. 10. Valeurs de la glycémie contrôlée au glucomètre (série 2).

	LOT 1	LOT 2	LOT 3	LOT 4
R1A	1,27	-	2,61	1
R2A	0,98	1,4	0,84	0,82
R3A	1,85	1,74	2,5	1,23
R4A	1,34	1,32	1,74	1,07
R5A	1,46	1,91	1,76	1,3
R1B	0,9	-	0,81	-
R2B	1,1	0,96	1,07	1,07
R3B	1,95	2,51	1,36	1,76
R4B	-	1,2	1,09	1,26
R5B	1,5	2,23	1,48	1,74

Pour la série 3, nous avons contrôlé uniquement la glycémie des rats qui présentaient des valeurs élevées à la série 2 (voir tableaux suivants).

Tableau III. 11. Valeurs de la glycémie contrôlée au glucomètre (série 3).

	LOT 1	LOT 2	LOT 3	LOT 4
R1A	1,18	-	4,27	/
R2A	1,5	1,46	0,69	/
R3A	1,61	1,31	0,93	/
R4A	0,87	1,1	0,43	/
R5A	0,73	1,34	0,28	/
R1B	/	-	/	-
R2B	1,11	/	/	/
R3B	1,34	2,22	1,03	1,26
R4B	-	/	/	/
R5B	1,29	2,19	0,77	/

Tableau III. 12. Valeurs de la glycémie contrôlée au glucomètre (série 4).

	LOT 1	LOT 2	LOT 3	LOT 4
R1A	1,04	-	-	1,35
R2A	1,69	1,13	1,24	1,21
R3A	1,95	0,94	1,35	1,11
R4A	1,18	1,2	1,24	1,15
R5A	1,08	1,59	1,13	0,91
R1B	1,02	-	1,31	-
R2B	0,75	-	0,97	0,97
R3B	1,23	1,59	1,05	1,18
R4B	-	0,95	1,06	0,77
R5B	0,76	1,63	1,35	1,15

Les figures suivantes, montrent l'évolution de la glycémie en fonction du temps avec des valeurs ne dépassant pas 2 g/dl pour les rats des lots 1 et 2 (voir figure III.15 et III.16). Ceci est probablement dû à l'effet placebo.

En considérant les valeurs supérieures à 1,1 g/dl, 44% des rats restent diabétiques pour le lot 1, tandis que pour le lot 2 on observe un taux de rats diabétiques de 71%.

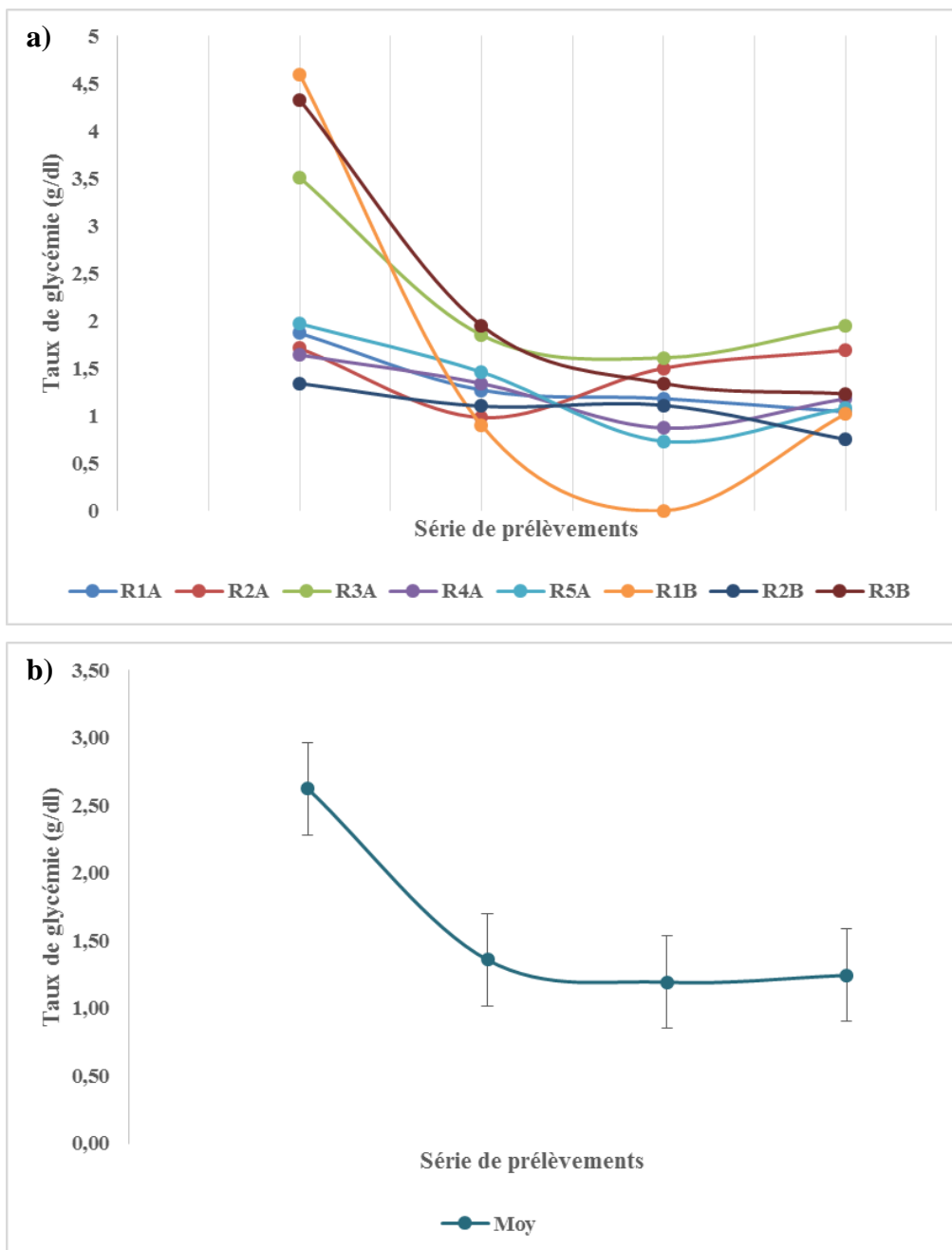


Figure III. 15. Evolution de la glycémie du lot 1 pendant l'étude. Les rats portant code R4B, R5B ne sont pas représentés dans le graphe (a) et sa moyenne (b).

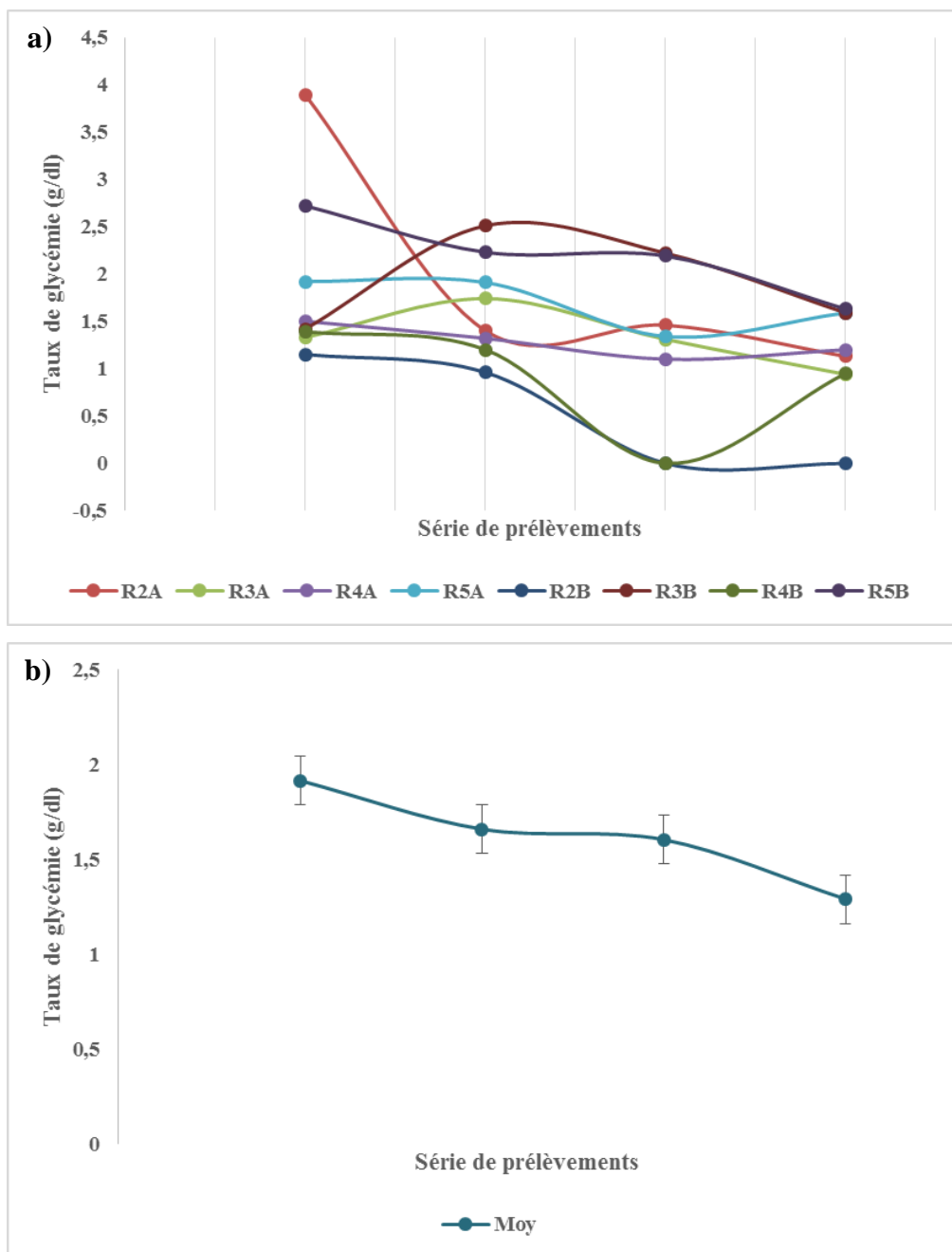


Figure III. 16. Evolution de la glycémie du lot 2 pendant l'étude. Les rats portant code R1A, R1B ne sont pas représentés dans le graphe (a) et sa moyenne (b).

Selon les figures III.17 et III.18, nous apprécions une baisse de la glycémie à partir de la semaine 7 (qui correspond à la série 3), pour des valeurs inférieures à 2 g/dl pour les lots 3 et 4. A la fin de l'étude (semaine 10), tous les rats présentent des taux de glycémies acceptables. Ces valeurs oscillent de 0,97 à 1,35 g/dl pour le lot 3 et de 0,91 à 1,35 g/dl pour le lot 4 avec 67% de rats restés diabétiques pour ces deux lots.

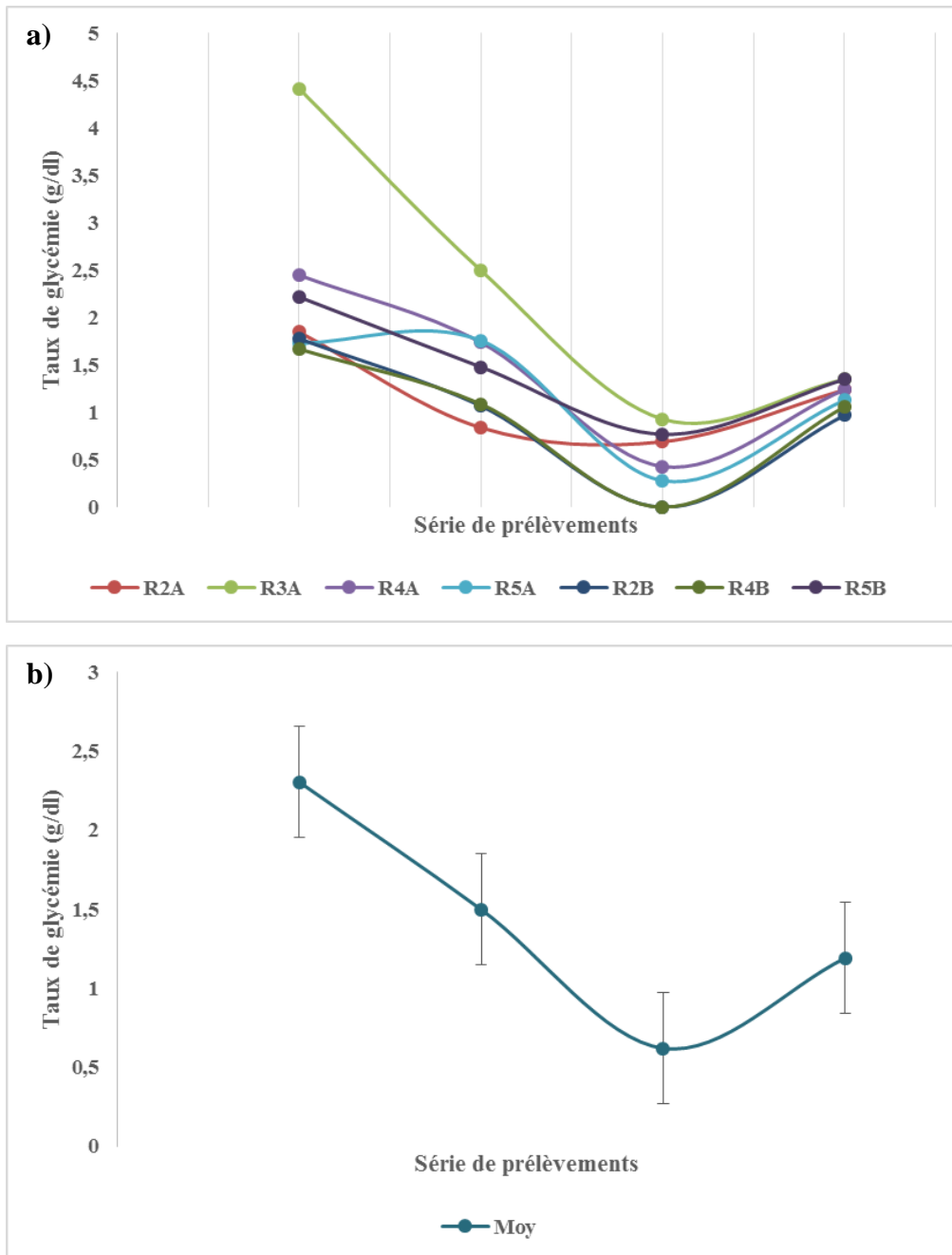


Figure III. 17. Evolution de la glycémie du lot 3 pendant l'étude. Les rats portant code R1A, R1B et R3B ne sont pas représentés dans le graphe (a) et sa moyenne (b).

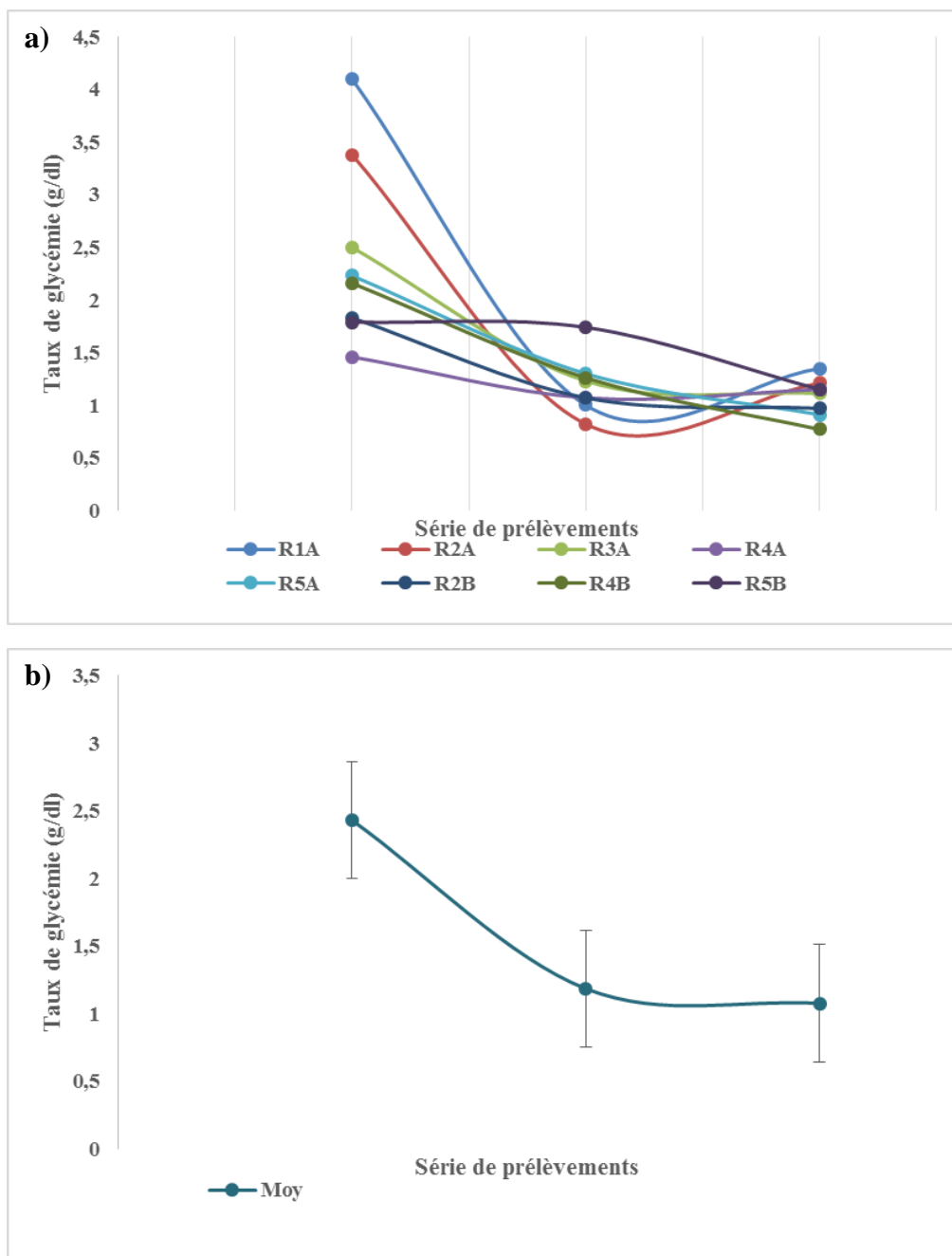


Figure III. 18. Evolution de la glycémie du lot 4 pendant l'étude. Les valeurs de la série 3 ainsi que les rats portant code R1B et R3B ne sont pas représentés dans le graphe (a) et sa moyenne (b).

Comparées aux valeurs initiales, cette étude montre que notre formulation NE-FB est autant efficace que le produit commercialisé en matière de réduction et de régulation du taux de la glycémie, comme le montre le tableau III.13. Selon les mêmes figures, les valeurs convergent toutes vers la normalité avec une réduction allant de 9% à 69% pour les rats du lot 3 et de 9% à 67% pour les rats du lot 4. Les résultats obtenus sont satisfaisants, ce qui pourra donner une bonne corrélation avec le bilan lipidique.

Tableau III. 13. Pourcentages de réduction du taux de glycémie pour les lots 3 et 4.

	LOT 3	LOT 4
R1A	-	67%
R2A	33%	64%
R3A	69%	56%
R4A	49%	21%
R5A	35%	59%
R2B	46%	9%
R3B	23%	33%
R4B	37%	64%
R5B	9%	36%

2.3.3 Etudes de l'évolution des paramètres sanguins lipidiques

Les données de dosage des paramètres du bilan lipidique sont rapportées dans le tableau III.14. En effet, les rats subissent après mesure de leur dernière glycémie un prélèvement sanguin pour exploration des données de leurs profils lipidiques.

Tableau III. 14. Taux moyen des triglycérides sériques et du cholestérol total.

	TRIGLYCERIDES (g/l)				CHOLESTEROL (g/l)			
	LOT 1	LOT 2	LOT 3	LOT 4	LOT 1	LOT 2	LOT 3	LOT 4
SERIE 1	0,55±0,44	0,5±0,29	0,99±0,53	0,85±0,67	0,33±0,22	0,27±0,11	0,85±0,61	0,47±0,16
SERIE 2	0,85±0,31	0,8±0,32	0,91±0,35	0,68±0,26	0,68±0,17	0,58±0,17	0,57±0,15	0,67±0,29
SERIE 3	0,66±0,23	0,7±0,36	0,42±0,18	0,49±0,21	0,68±0,16	0,66±0,23	0,61±0,12	0,54±0,20
SERIE 4	0,3±0,08	0,36±0,11	0,35±0,10	0,51±0,10	0,65±0,12	0,61±0,12	0,62±0,11	0,62±0,11

Valeurs usuelles chez le rat: TG (0,17-0,48 g/l), CHOL (0,31-0,59 g/l) (Delwatta 2018).

Les résultats indiqués dans le tableau montrent que les triglycérides sont augmentés à partir de la série 2 pour les lots 1 et 2 à raison de 54,5% et 60 %, respectivement. Quant aux lots 3 et 4, les valeurs les plus élevées sont observées à partir de la série 1 (72 heures après injection de l'alloxane), cela confirme que l'hypertriglycéridémie est causée par le diabète expérimental. En effet, l'absence de l'insuline conduit à une inactivation de la lipoprotéine lipase, il y'a dès lors lipolyse avec augmentation des acides gras libres plasmatiques et de ce fait une synthèse élevée de triglycérides (Vergès 2013).

Après traitement, la valeur moyenne des TG du lot 3, recevant la NE-FB, varie de 0,99 g/l à 0,35 g/l, soit une diminution moyenne de 64,6%. Alors que pour le lot 4 qui a reçu le médicament commercialisé, la valeur moyenne des TG varie de 0,85 g/l à 0,51 g/l, ce qui correspond à une diminution de l'ordre de 40%.

Par ailleurs, les valeurs enregistrées du taux de cholestérol sont basses chez tous les lots, exceptés pour le lot 3 dont l'effet ne se manifeste qu'au bout de la série 2 (qui correspond à la semaine 7). Ce qui témoigne de l'efficacité de l'injection de l'Alloxane. La valeur moyenne du cholestérol total augmente par la suite légèrement pour les lots 1, 2 et 4. Le pourcentage de réduction du taux de cholestérol observé est de 4,4%, 7% et 22,4%, respectivement. Alors que pour le lot 3, la valeur moyenne du taux de cholestérol total varie en décroissance dès le début avec une variation allant de 0,85 g/l à 0,62 g/l, soit une réduction moyenne de 27%.

Ces résultats sont en parfait accord avec les données de la littérature (ANSM 2014). En effet, le Fénofibrate encapsulé dans la nanoémulsion a montré un effet hypocholestérolémiant puissant (>25%) avec une réduction du taux moyen des TG à raison de 64,7% (> 50%) chez les rats du lot 3.

Par ailleurs la comparaison des valeurs moyennes des triglycérides et du cholestérol total des lots 3 et 4 par le test de Student, révèle une différence significative en ce qui concerne les triglycérides et une efficacité similaire entre les deux lots pour le cholestérol (Voir annexe 7).

L'évolution du taux des TG et du Cholestérol au cours de l'étude est très bien illustrée dans les figures III.19 et III.20.

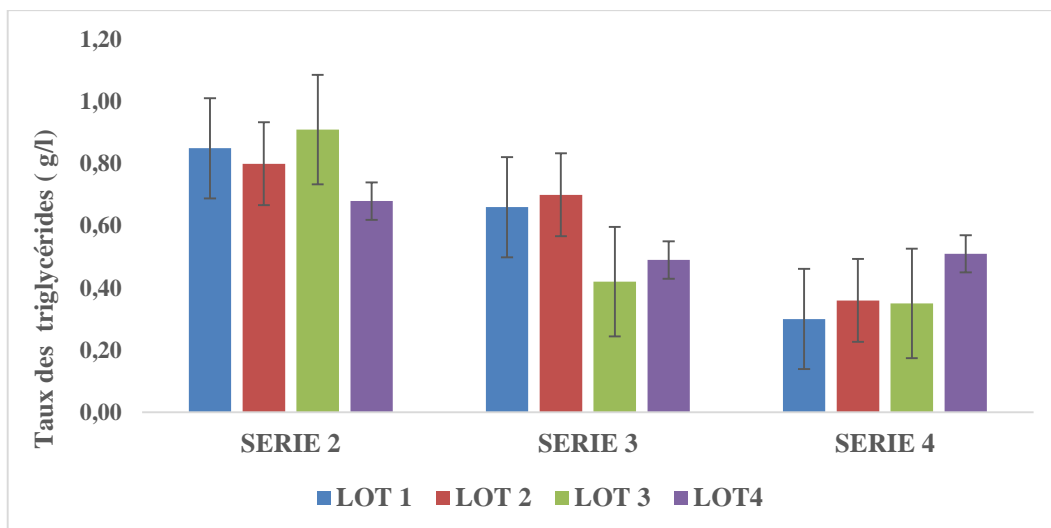


Figure III. 19. Evolution du taux des triglycérides chez les rats pendant toute la durée d'étude.

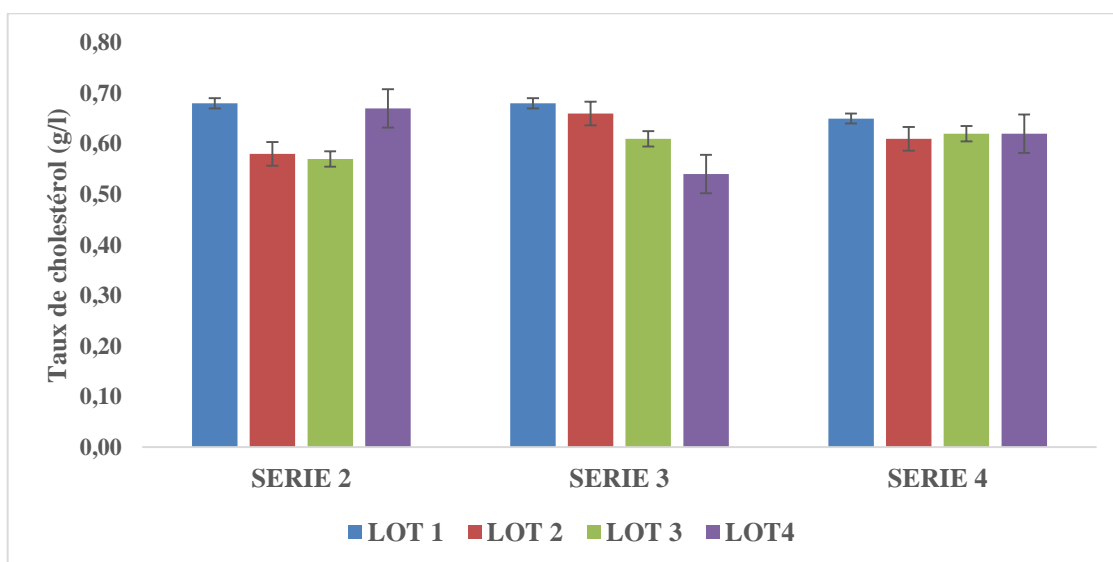


Figure III. 20. Evolution du taux de cholestérol chez les rats pendant toute la durée d'étude.

Conclusion

Dans ce travail, nous avons voulu mettre en évidence l'efficacité de la nanoformulation à base de fénofibrate, à travers des essais in vivo chez des rats rendus diabétiques, qui sont répartis aléatoirement dans des groupes parallèles et recevant respectivement, la solution saline, le PA seul, la NE-FB et le produit commercialisé.

Après cinq semaines de traitement, les paramètres d'intérêts (glycémie, triglycérides et cholestérol total) furent dosés à des intervalles réguliers de temps. A l'issue de cette étude,

l'effet antihyperglycémiant, antitriglycéridémiant et anticholestérolémiant, a été confirmé pour les rats du lot 3 et 4. Aussi, les résultats prometteurs obtenu pour le lot 3 laissent sous-entendre que la formule développée potentialise ces effets et a permis de corriger les désordres métaboliques engendrés par l'alloxane.

Ainsi, il est clairement défini que la restauration du profil lipidique est nettement satisfaisante chez les rats du groupe 3 comparé aux rats du groupe 4, avec une réduction du taux des TG de 64,7% contre 40% et une réduction du taux de cholestérol total de 27% contre 22,4%.

Ajouté à cela, les pesées quotidiennes indiquent qu'il y'a une meilleure maîtrise de la prise pondérale au cours du traitement par la NF-FB comparé au produit commercialisé. Ce qui revient à dire, que notre nanoformulation est plus efficace que ce dernier en termes de biodisponibilité relative.

Pour conclure, ces essais in vivo ont permis de prouver l'efficacité de la nanoémulsion encapsulant le fénofibrate, administrée à des rats chez lesquels un trouble métabolique a été induit. On a démontré à travers une exploration du profil lipidique du modèle animal recevant la NE-FB, que la réduction des taux des triglycérides et du cholestérol total engendrée est satisfaisante.

CHAPITRE IV :
Approche de
lyophilisation et
application aux
nanoémulsions

1 Problématique et approche proposée pour la lyophilisation de la nanoémulsion

Les NEs sont préparées selon deux approches : méthodes de basse énergie ou méthodes de haute énergie. Elles peuvent alors être conservées telles quelles ou bien servir de « template » pour d'autres formes généralement sèches à la même grandeur d'échelle, à savoir les nanoparticules (Jafari 2007).

La NE obtenue ne peut subir une lyophilisation directe. Un nombre de cycles de lyophilisation a été conduit dans l'objectif d'obtenir une émulsion sèche et pouvoir garantir la stabilité de cette dernière. Toutes les tentatives conduites directement sur cette dernière ont été infructueuses car les attributs qualité du produit obtenu ne répondaient pas aux attentes préétablies par le formulateur. En effet, le produit semble dépourvu de son eau, mais de texture pâteuse et huileuse en même temps (figure IV.1).

Au cours de nos recherches pour la lyophilisation de nanodispersions, nous avons constaté que tous les cycles de lyophilisation proposés s'appliquaient à des formulations contenant uniquement des solvants organiques et exemptes de bases huileuses, ou du moins en contenant de très faibles proportions (El-Messery 2020; Mohammady 2020).

L'objectif était de développer une formulation sèche d'une nanoémulsion H/E, à base d'huile végétale par lyophilisation. Cependant, en raison de la présence de fortes proportions en Tween[®]80 comparé au PVA dans la formulation, il n'a pas été possible d'obtenir les caractéristiques connus d'un lyophilisat (poudre sèche exempte d'humidité résiduelle).

Pour palier ce problème, l'ajout d'un autre cryoprotecteur et d'un stabilisant s'avère nécessaire. En effet, le choix s'effectue sur une large gamme d'excipients choisis parmi les carbohydrates et les polymères. Ces derniers sont connus pour être utilisés dans la formulation lors de la lyophilisation.

Pour toutes ces raisons, nous avons revu la conception de notre formulation et décidé d'immobiliser les nanogouttelettes sur un support polymérique, en rajoutant un mélange de polymère et de CaCl₂ à la NE mise au point. L'aspect final du produit après lyophilisation sera caractérisé et évalué microscopiquement.

L'ensemble NE-polymère- CaCl_2 est soumis à un mélange vigoureux pour obtenir au final une masse homogène qui sera congelée. Les résultats sont acceptables avec un produit sec qui s'effrite et qui garde son volume initial (figure IV.2). La poudre recueillie est ensuite conservée dans un tube à essai clos. Cependant, pour valider cette démarche, nous nous sommes assuré que l'hydrogel à base NE-Polymère- CaCl_2 , reprenne son aspect de départ après reconstitution. En effet, après ajout de l'eau, le lyophilisat reprend son aspect initial instantanément au bout de quelques secondes (figure IV.3).



Figure IV. 1. *Tentative de lyophilisation directe de la nanoémulsion.*

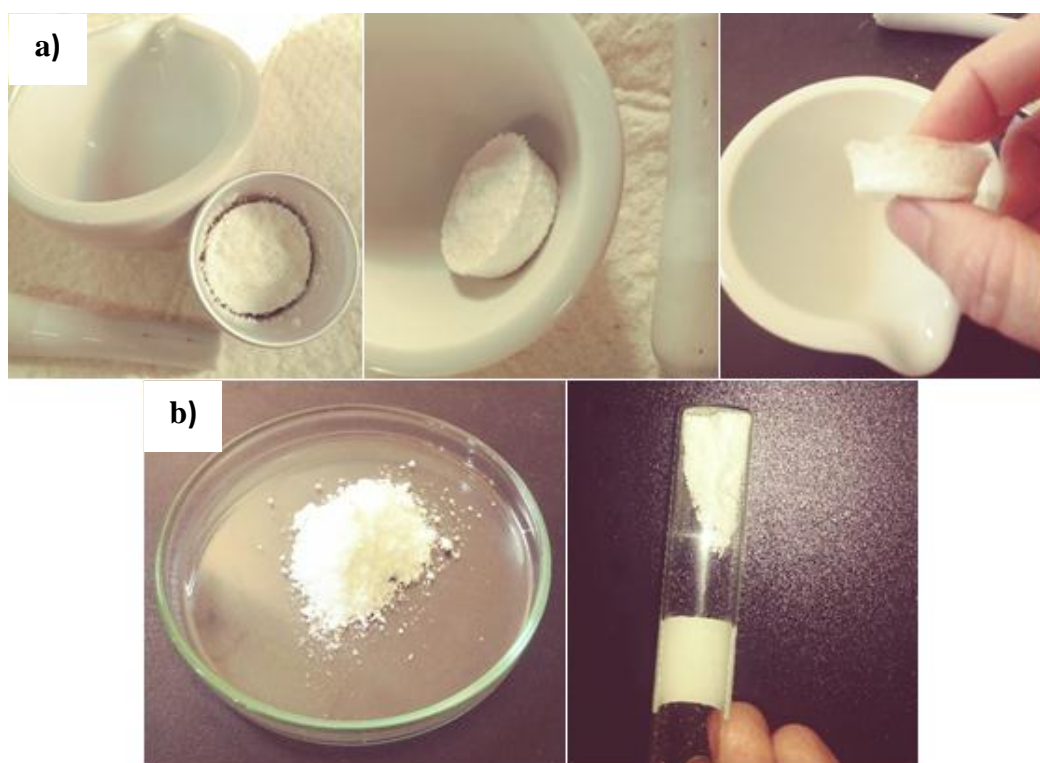


Figure IV. 2. *Lyophilisation d'un composite NE-Polymère- CaCl_2 . a) Obtention d'une pastille. b) Obtention d'une poudre après broyage.*

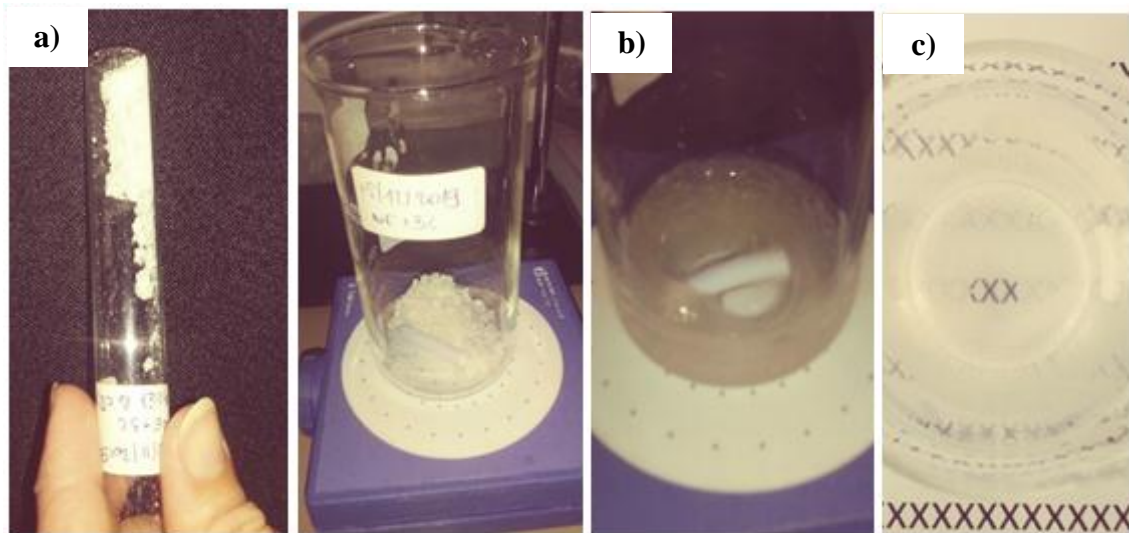


Figure IV. 3. Reconstitution du composite. a) Poudre de composite, b) ajout de l'eau et reconstitution, c) obtention de l'hydrogel de départ.

Nous avons mis au point une série d'opérations, faisant appel au principe de réticulation d'un polymère par des ions divalents. Ce procédé est appelé « gélification ionotropique » (Ching 2017; Fernando 2020). L'objectif est d'obtenir des formes multiparticulaires parfaitement individualisées et poreuses.

A partir de ce constat, nous avons alors développé une approche permettant de contenir la NE dans des microsphères appelées « Gelisphères ». La technique repose sur le principe de gélification en goutte après émulsification. Il s'agit d'une réticulation d'une base polymérique par le calcium. Les « Gelisphères » peuvent alors être définies comme étant des entités de polymère hydrophiles, réticulées à leur surface et pouvant gonfler au contact des bio-fluides (Katouzian 2016).

La NE chargée de molécule active et contenant une base polymérique sera introduite dans une solution aqueuse d'ions réticulants. Immédiatement après contact, les gouttelettes seront enveloppées, sphériques, parfaitement individualisées et indéformables. Cette technique est également appelée « prilling » car elle décrit la production de gouttes par extrusion d'un liquide dans un autre, à travers un injecteur ou un orifice. Les gouttes produites ont une distribution de taille étroite (Poncelet 2007). En effet, l'approche choisie représente une solution optimale puisqu'elle assure une satisfaction globale en garantissant la réussite du procédé et obtenant à la fin un produit sec.

L'excipient choisi pour générer des matrices polymériques par prilling est l'alginate de sodium. Ce dernier est le polymère le plus utilisé. Des billes pleines ou de type « cœur-membrane » peuvent être générées selon la concentration du polymère mis en jeu (Del Gaudio 2005). Aussi, en présence d'ions divalents tels que le calcium ou encore le barium, l'alginate de sodium qui présentent des groupements carboxyliques dans sa structure, interagit fortement avec ces derniers. Il en résulte alors une réticulation ionique (Zhang 2014). La fabrication de structures « cœur huileux-membrane d'alginate » résulte dans la plupart des cas de l'émulsification d'une phase huileuse dans une solution d'alginate de sodium et gélification (Chan 2011; Li, Y., 2011; Abang 2012).

L'un des objectifs communément étudiés est l'utilisation de ces formes en tant que système de relargage de principes actifs pour une administration orale. Del Gaudio et al. ont démontré la capacité de ces billes à libérer deux P.A. en milieu intestinal simulé (libération totale en 2h pour le kétoprofène lysinate et en 4h pour le kétoprofène (Del Gaudio 2009)).

Dans notre travail, On introduit l'alginate de sodium dans la phase dispersante de la NE. L'alginate va alors créer un réseau polymérique aux côtés du PVA, immobilisant les nanogouttelettes qui seront ensuite encapsulées dans des gélisphères, en injectant le mélange préparé dans une solution réticulante de chlorure de calcium (CaCl_2). Il s'en suivra une étape de séchage qui est faite par lyophilisation. La lyophilisation a un double avantage, celui de stabiliser la NE dans un réseau polymérique d'une part et celui de moduler la libération du PA d'autre part.

Dans un premier temps, la faisabilité de la méthode a été validée pour une marge de concentrations d'alginate de sodium et de calcium. A l'issue de cette démarche, nous obtenons des billes humides parfaitement individualisées et sphériques, qui seront alors soumises à une cryodessiccation. A titre comparatif, une série de billes sera séchée à l'air libre pendant 24 heures. Les résultats des essais comparatifs seront présentés ultérieurement.

En effet, les conditions de séchage ont une grande influence sur la forme et la morphologie des billes y compris la surface, ainsi que sur les caractéristiques de la structure interne des billes. Les billes lyophilisées sont les plus grosses car elles conservent la même taille qu'avant le séchage (billes hydratées). Elles sont plus sphériques, présentant une surface rugueuse et leur structure interne très poreuse, les rendant friables au toucher. Ces caractéristiques générales des

billes lyophilisées sont dues à la sublimation rapide de l'eau congelée à partir de la matrice d'alginate qui entraîne la formation de pores dans les zones d'anciens cristaux de glace, sans avoir le temps de rétrécir. Quant aux billes séchées à l'air libre, elles se rétrécissent et sont donc plus petites. Le séchage qui s'y produit est plus lent, ce qui rend le retrait de l'eau plus uniforme (Srnđel 2008). Contrairement aux billes lyophilisées, ces dernières sont très dures.

En ce qui concerne la taille des gelisphères, la présence de tensioactifs au sein de l'hydrogel facilite grandement l'extrusion à travers la buse ou l'orifice de l'aiguille, les rendant plus uniforme (Ching 2017).

Après formulation, les billes seront d'abord contrôlées au microscope optique à caméra après séchage, afin d'apprécier leur forme et leur état de surface. Elles sont ensuite soumises aux essais *in vitro* (cinétique de dissolution), pour étudier leur aptitude à libérer le PA. La présence de pores au sein du réseau polymérique construit autour de la NE, ont un intérêt dans la promotion et la modulation du processus de libération du PA. De ce fait, une série de clichés détaillés au microscope électronique à balayage (MEB) des billes obtenues (sèches et lyophilisées), seront exposées et confrontés aux caractérisations précédentes.

D'une manière générale, nous proposons une alternative intéressante en couplant la technique du prilling à la nanoémulsification, qui sera suivie d'une lyophilisation. Dans la catégorie des systèmes de délivrance de molécules faiblement solubles dans l'eau, le premier objectif est la stabilisation du système pour une mise à disposition optimale du PA.

2 Mise au point des microsphères à base d'alginate de sodium et de calcium véhiculant la nanoémulsion chargée en fénofibrate

2.1 Description des conditions de travail

2.1.1 Préparation de la nanoémulsion encapsulant le fénofibrate

La préparation de la nanoémulsion de type H/E fait appel à l'émulsification spontanée générée par la présence du Tween[®]80. Sous agitation mécanique, dont la vitesse d'agitation et la température ont été optimisées, il y'a introduction de la phase organique dans la phase aqueuse. Au préalable, les deux phases sont préparées individuellement ; la phase organique contient les composants véhiculant 20 mg de fénofibrate et l'ensemble est mis en équilibre sous agitation magnétique. Quant à la phase aqueuse, elle contient la phase continue stabilisatrice à

base de PVA et de SDS. Tous les détails de formulation et de procédé opératoire sont donnés dans les chapitres I et II.

2.1.2 Procédé de gélification ionotropique

Les conditions opératoires sont décrites et énumérées dans la figure IV.4. Il s'agit de préparer des hydrogels qui donneront naissance à des gélisphères. Le principe repose sur la technique du prilling appelée aussi « gélification ionotropique ». Le polymère d'alginate de sodium présente une affinité variable vis-à-vis de certains ions (Obeid 2015; Ben Messaoud 2018), mais c'est le Ca^{2+} qui est le plus couramment utilisé (Obeid 2015). La figure IV.5 illustre le principe donnant naissance au modèle de « boîte à œuf ». Il s'agit dès lors d'une gélification externe, qui se produit de l'extérieur vers l'intérieur de la goutte (Ching 2017).

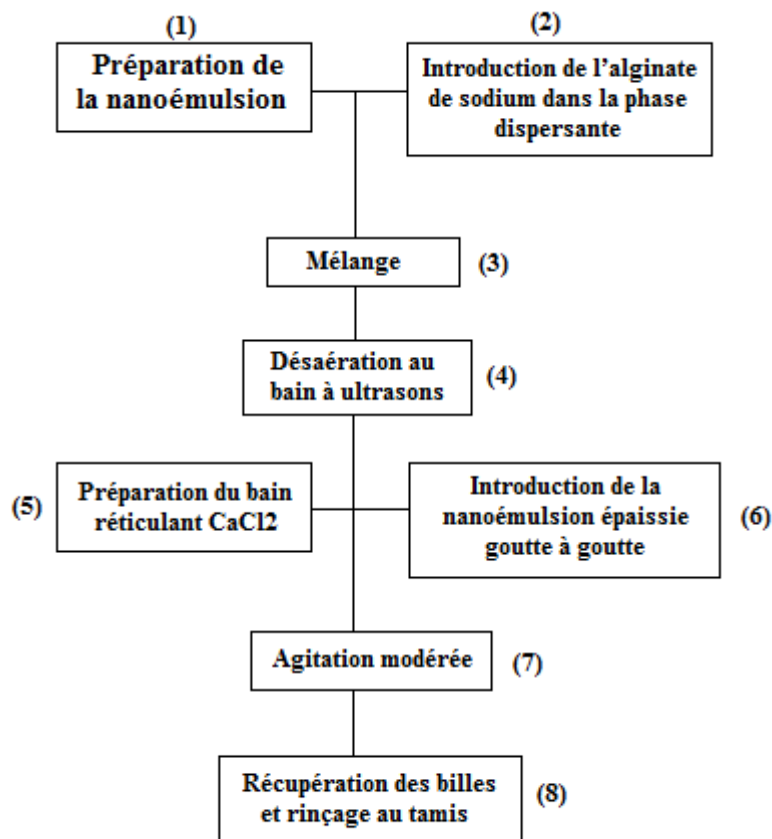


Figure IV. 4. Etapes de préparation des microsphères d'alginate de calcium.

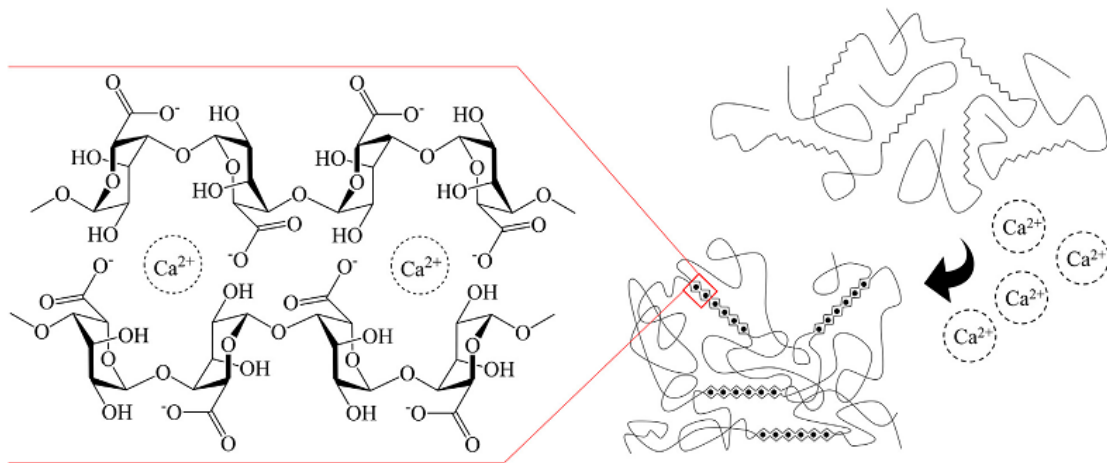


Figure IV. 5. Principe de réticulation de l'alginate par les ions calcium pour former le modèle de « boîtes à œuf » (Fernando 2020).

Les essais préliminaires ont conduit à des résultats très satisfaisants. Les billes obtenues étaient de tailles microscopiques, suffisamment sphériques. Toutes les variables (concentration en alginate de sodium C1, concentration en CaCl_2 en l'occurrence C2 et distance d'injection D) ont été étudiées minutieusement, afin de délimiter le domaine expérimental de l'étude d'optimisation. La figure IV.6 décrit le type de gélisphère qu'on peut alors obtenir.

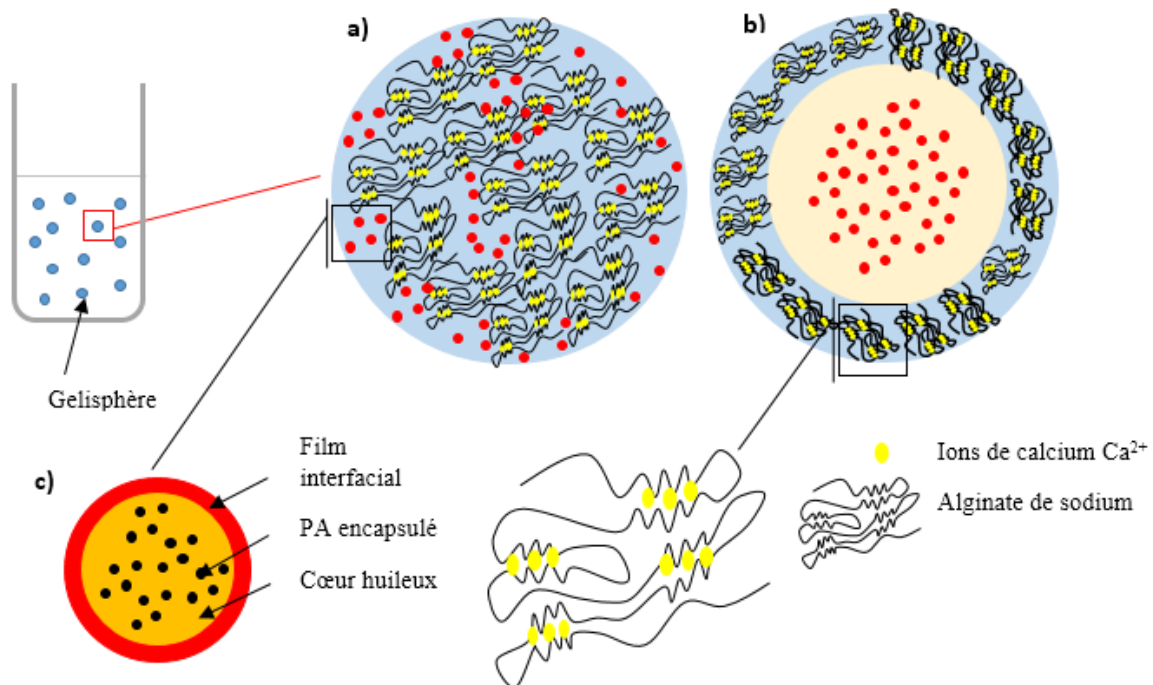


Figure IV. 6. Schéma représentatif de la structure interne des gélisphères, a) structure matricielle des billes formées ; b) structure cœur-membrane des billes après réticulation ; c) représentation schématique de la composition d'une nanogouttelette.

2.1.3 Lyophilisation des billes d'alginate de calcium encapsulant la nanoémulsion

La lyophilisation ou cryodessiccation est une technique de séchage qui présente beaucoup d'avantages. Elle permet de stabiliser la forme finale tout en protégeant certains PA fragiles. Elle est très recommandée pour les PA thermolabiles car à basse température, aucune dégradation n'est possible.

Les produits obtenus après lyophilisation sont appelés « lyophilisats » et sont extrêmement lyophiles. Ce procédé est parfaitement adapté à ces formes multiparticulaires. En effet, parmi les techniques de séchage proposées, on peut citer (Srnidel 2008):

- Le séchage en lit d'air fluidisé qui est effectué en enceinte close. Il permet un séchage rapide avec des billes qui se rétrécissent pour devenir très petites. En revanche, ces dernières sont repliées sur elles-mêmes.
- Le séchage à l'air libre peut durer au minimum 24 heures. Les billes obtenues sont plus petites et plus sphériques que les billes séchées en lit d'air fluidisé, car l'élimination de l'eau se fait plus lentement, ce qui entraînerait un retrait plus lent et plus uniforme.

En termes de porosité, ces techniques de séchage sont limitantes. Au contraire, les billes lyophilisées ont une structure poreuse, une taille et une absorption d'eau plus importantes par rapport aux billes séchées sous vide ou séchées à l'air. Une telle différence d'absorption d'eau pourrait avoir un impact non négligeable sur la cinétique de libération du médicament (Srnidel 2008).

Les conditions de séchage ont également une grande influence sur la forme et la morphologie des billes, y compris la surface ainsi que sur les caractéristiques de la structure interne des billes. Les billes lyophilisées sont les plus grosses, parce qu'elles conservent la même taille de départ. Elles sont plus sphériques, présentant une surface rugueuse dite « spongieuse » et leur structure interne est très poreuse, les rendant friable au toucher.

Le choix de la lyophilisation comme méthode de séchage est motivé par la stabilité qu'elle offre aux formes finales qui peuvent être commercialisées, mais également la faible densité et la porosité qui peut faciliter la libération du PA et promouvoir sa cinétique de dissolution.

Nous allons assurer la lyophilisation d'une nanoémulsion pour garantir sa stabilité. Il s'agit de combiner une gélification ionotropique pour encapsuler notre NE et une lyophilisation pour sécher les billes humides obtenues. Cette approche fut appliquée par Chan pour la préparation de l'émulsion à base d'Alginate de sodium de type H/E (Chan 2011).

2.2 Matières premières, matériels et méthodes

2.2.1 Matières premières

- Alginate de sodium (voir fiche technique dans l'annexe 8).
- Chlorure de calcium.
- Tampon phosphate de pH=6.8 (pour sa préparation, voir annexe 9).
- Milieu acide de pH=1.2 (pour sa préparation, voir annexe 9).
- Autres : voir tableau IV.1.

Tableau IV. 1. Réactifs utilisés dans la préparation des solutions de travail.

Réactifs	Provenance	Données physicochimiques	Précautions/ Pictogrammes
Eau distillée	Préparée avec distillateur	Formule brute : H ₂ O M : 18g/mol	/
Phosphate monobasique	SIGMA-ALDRICH®	Formule brute : KH ₂ PO ₄ M : 136,09 g/mol	/
Hydroxyde de sodium	SIGMA-ALDRICH®	Formule brute : NaOH M : 40g/mol	
Acide chlorhydrique 36.5-38%	SIGMA-ALDRICH®	Formule brute : HCl M : 36,46g/mol	
Potassium chlorure	LABOSI®	Formule brute : KCl M : 74,56g/mol	/
Ethanol 96%	BIOCHEM®	Formule brute : C ₂ H ₆ O M : 46,07g/mol	

2.2.2 Matériels

Les équipements de préparation et de contrôles sont respectivement listés :

- Balance électronique de précision KERN PLT 2000-3DM.
- Agitateur magnétique STUART heat-stir SB162.
- Agitateur à hélice de marque DLAB OS40-Pro.
- Microscope à caméra OPTIKA.

- Lyophilisateur Cryo-Christ 2-4 LD plus.
- Balance à infrarouges Mettler Toledo™ MJ33 Moisture Analyzer.
- Dissolutest type 2 à palette de marque SOTAX AT7 Smart.
- Filtres seringue 0.45 µm.
- Bain à ultrasons Fisher Brand.
- PH mètre five easy plus, de marque METTLER TOLEDO préalablement étalonné.
- Spectrophotomètre UV-Vis à double faisceau PERKIN ELMER, avec cuve en quartz de 1 cm de trajet optique.
- Verrerie de laboratoire : Verre à montre, spatule, béchers, seringue de 2.5cc, passoire métallique en acier inoxydable, micropipettes, papier filtre, fioles jaugées, tubes à essais.

2.2.3 Méthodologie et protocole expérimental de la production des microsphères à partir de la NE

Le procédé consiste à extruder à travers d'une aiguille de seringue ou d'une buse, une solution aqueuse d'Alginate de sodium, dans laquelle la matière active est dispersée ou émulsionnée. Les gouttelettes formées sont réceptionnées dans une phase liquide réticulante, pour se transformer en particules de gel sphériques, récupérées par filtration et séchées (Merakchi 2012; Hadher 2017). C'est la technique la plus simple et la plus largement utilisée pour la synthèse de formes dites microparticulaires (Uyen 2019).

L'optimisation des conditions de formulation et opératoires repose sur l'étude paramétrique d'un ensemble de formulations randomisées. En effet, nous avons fait varier la composition quantitative et les conditions opératoires comme l'indique le tableau IV.2.

La matrice d'expériences comporte 11 formules en valeurs codées, avec comme variables d'étude : la concentration en alginate de sodium (C1) qui varie de 4 à 6% (w/v), la concentration en chlorure de calcium (C2) qui varie de 2 à 4% (w/v) et le temps de maturation (T) qui varie de 10 à 30 minutes.

Nous avons étudié la taille des billes produites (Y1), taux de dissolution en milieu acide (Y2) et taux de dissolution en milieu basique (Y3). Ce dernier représente également l'efficacité d'encapsulation (EE) de ces microsphères et dépend fortement de la technique d'encapsulation mais aussi de la composition quantitative.

Toutes les billes obtenues seront contrôlées sous microscopie optique à caméra d'une part et soumises à une cinétique de dissolution d'autre part, afin d'apprécier leur capacité à libérer et mettre à disposition du milieu, le PA lipophile encapsulé dans la NE. En complément, la microscopie électronique à balayage constitue un atout majeur de caractérisation et d'interprétation.

Tableau IV. 2. Présentation de la matrice expérimentale en vue de l'optimisation de la mise au point des microsphères.

N°	C1 (%)	C2 (%)	T (minutes)	Y1 (μm)	Y2(%)	Y3 (%)
11	-1	-1	-1	Y1 ₁	Y2 ₁	Y3 ₁
8	1	-1	-1	Y1 ₂	Y2 ₂	Y3 ₂
9	-1	1	-1	Y1 ₃	Y2 ₃	Y3 ₃
4	1	1	-1	Y1 ₄	Y2 ₄	Y3 ₄
10	-1	-1	1	Y1 ₅	Y2 ₅	Y3 ₅
3	1	-1	1	Y1 ₆	Y2 ₆	Y3 ₆
6	-1	1	1	Y1 ₇	Y2 ₇	Y3 ₇
7	1	1	1	Y1 ₈	Y2 ₈	Y3 ₈
5	0	0	0	Y1 ₉	Y2 ₉	Y3 ₉
2	0	0	0	Y1 ₁₀	Y2 ₁₀	Y3 ₁₀
1	0	0	0	Y1 ₁₁	Y2 ₁₁	Y3 ₁₁

2.2.3.1 Cryodessiccation des billes d'alginate de calcium chargées en nanoémulsion

Le séchage des billes se fait par lyophilisation, qui est une technique de séchage reposant sur l'abaissement simultané de la température et de la pression.

La cryodessiccation, communément appelée lyophilisation est une technique de séchage qui s'effectue en trois étapes successives :

- Congélation ;
- Dessiccation primaire ;
- Dessiccation secondaire.

Elle est conduite sur un lyophilisateur de marque Christ[®], ALPHA 2-4 LD plus. La chambre de lyophilisation est composée de plateaux superposés, destinés à accueillir les échantillons préalablement congelés. Les valeurs sont reportées manuellement sur le tableau de bord (figure

IV.7). L'équipement est relié à une pompe à vide permettant de créer une dépression au sein de la chambre.



Figure IV. 7. Préparation de la lyophilisation des billes d'Alginate de calcium encapsulant le fénofibrate. a) lyophilisateur Cryo-Christ® 2-4 LD plus avant sa mise en marche, b) mise en place de l'échantillon et fermeture de l'enceinte, c) édition des valeurs de consignes pour la dessiccation secondaire.

Le protocole que nous avons développé est le suivant :

- Congélation à -4°C pendant 24 heures ;
- Dessiccation primaire : -76°C pendant 2 heures à 10^{-3} mbar;
- Dessiccation secondaire : -20°C pendant 1 heure à 1,0 mbar.

Le protocole de lyophilisation a été validé en termes de capabilité (centrage et reproductibilité du procédé). Voir annexe 10.

2.2.3.2 Préparation des microsphères d'alginate contenant la NE-FB

Les microsphères d'alginate de calcium serviront d'hôte récepteur à la nanoémulsion encapsulant le fénofibrate. Toutes les étapes de préparations de ces dernières sont illustrées dans la figure IV.8.

a) Préparation de la solution d'alginate

Le fénofibrate est la molécule candidate pour cette étude. Cette dernière a été préalablement encapsulée avec succès dans une nanoémulsion de type H/E. Un volume de 50 ml de notre émulsion contenant 20 mg de fénofibrate, est chauffé à une température de 50°C et mis sous agitation. Une quantité d'alginate précise qui correspond à une concentration précédemment fixée (tableau IV.2), est introduite par petite quantité jusqu'à dissolution totale et obtention d'une solution visqueuse. La solution est passée au bain à ultrasons pour éliminer les bulles d'air formées in situ.

b) Préparation de la solution de chlorure de calcium

La solution est préparée par dissolution d'une quantité prédéterminée de CaCl_2 (voir tableau IV.2), dissoute dans 100 ml d'eau distillée. Le rapport de volume alginate/ CaCl_2 est de 1/2.

c) Formulation des microsphères d'alginate de calcium

L'émulgel est versé goutte à goutte dans le bain gélifiant, à l'aide d'une seringue de 2.5cc, en respectant une distance de 1cm entre la pointe de l'aiguille et la surface de la solution de réticulation. Les billes formées sont laissées mûrir pendant un temps T, à compter de la dernière goutte versée. Les microsphères sont mises sous agitation modérée afin d'éviter leur agglomération et garantir leur individualisation.

d) Filtration et lyophilisation

Une fois le temps de maturation écoulé, les billes sont filtrées, lavées trois fois avec de l'eau distillée, puis étalées sur du papier absorbant et laissées quelques minutes à l'air libre, afin d'enlever l'excès d'eau. Elles seront par la suite congelées pour enfin être lyophilisées selon le protocole décrit précédemment.

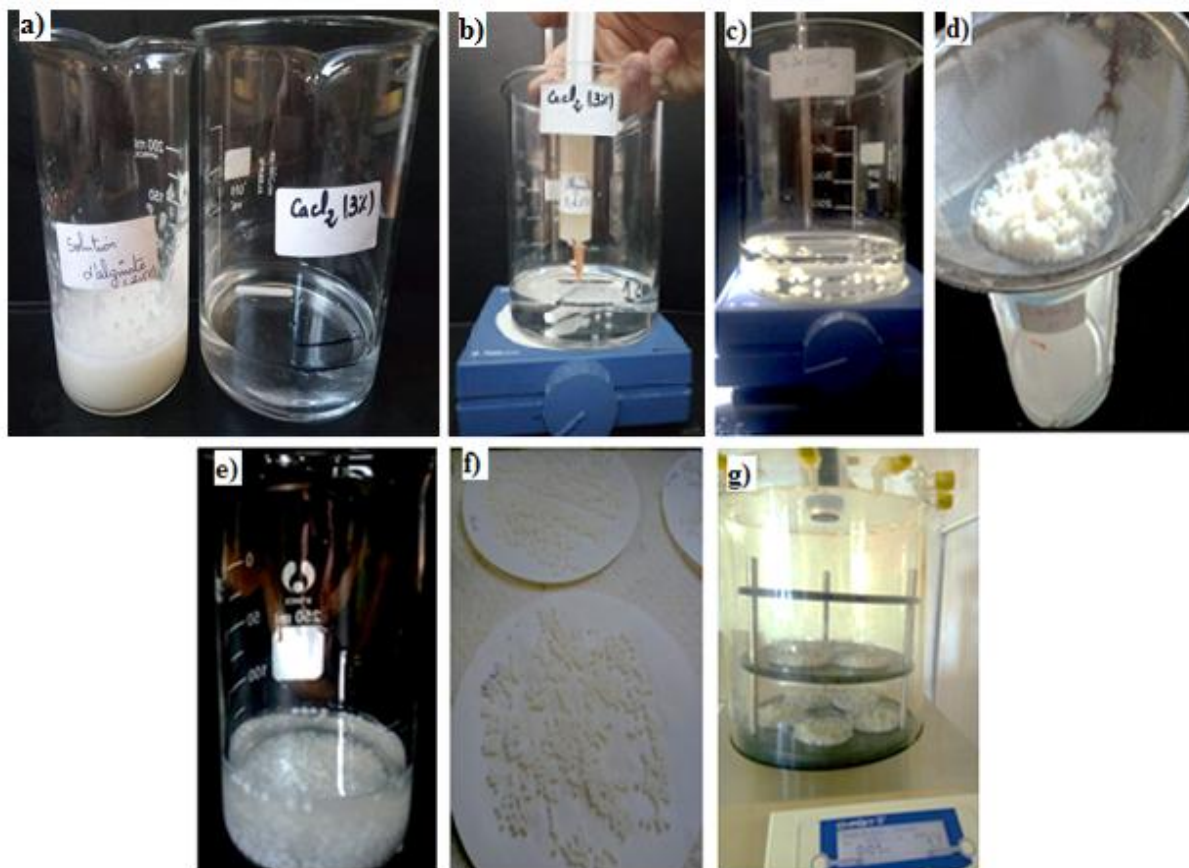


Figure IV. 8. *Etapes de formulation des billes d'alginate de calcium par la méthode de gélification en goutte. a) Préparation des solutions, b) mise en forme des billes, c) maturation, d) filtration, e) lavage, f) Séchage de quelques minutes sur papier filtre, g) lyophilisation.*

2.3 Caractérisation des billes d'Alginate de calcium chargées de nanoémulsion contenant le Fénofibrate (B-NE-FB)

Hormis l'aspect macroscopique et l'analyse au microscope à caméra qui seront réalisés sur les 11 formulations, les autres caractérisations sont réalisées uniquement sur la formule optimale.

2.3.1 Aspect macroscopique

Une fois les billes mises au point, elles sont appréciées à l'œil nu. Leur forme, l'état de surface ainsi que leur couleur sont enregistrés. Par ailleurs, une comparaison est faite entre les billes humides et les billes une fois lyophilisées.

2.3.2 Observation au microscope optique à caméra

L'observation microscopique des billes a pour but d'étudier et d'apprécier la distribution de tailles des microparticules obtenues. Elle est faite au microscope optique préalablement calibré (figure IV.9), doté d'une caméra (4083-B5. DIGITAL.CAMERA) qui est reliée à un ordinateur et d'une échelle micrométrique intégrée. La caméra permet une capture directe des images, ces dernières sont traitées à l'aide du logiciel vision lite 2.1. Les diamètres moyens et l'écart type sont déterminés au moyen d'un tableur EXCEL, sur un ensemble de 50 particules.



Figure IV. 9. Analyse de la taille des microsphères au microscope optique à caméra OPTIKA®.

2.3.3 Détermination du taux d'humidité résiduelle sur balance infrarouge

Le lyophilisat est un produit qui doit être non seulement poreux mais dépourvu d'humidité. Ce dernier caractère est apprécié en faisant passer 1g de billes lyophilisées dans une balance ou dessiccateur à infrarouge de marque Mettler Toledo® (figure IV.10), selon une méthode prédéfinie. Un taux entre 1% et 3% est tout a fait acceptable et optimale.



Figure IV. 10. Dessicateur à infrarouges Mettler Toledo®TM HB43-S Halogen.

L'analyse est faite uniquement sur les billes préparées aux conditions optimales qui correspond à la formule 1,2 et 5 (tableau IV.2).

2.3.4 Observation au microscope électronique à balayage (MEB)

La microscopie électronique à balayage est l'une des techniques les plus avancées qui consiste en une nouvelle génération d'instruments venus compléter la microscopie classique. C'est une technique essentiellement utilisée pour l'observation détaillée et l'analyse du microrelief d'un échantillon (topographie). Par rapport à la microscopie optique, l'importance de la MEB réside dans la très grande profondeur de champ (de l'ordre de 100 à 1000 fois plus grande) (Ruste 2013).

Deux séries de billes ont été préparées aux conditions optimales: billes séchées à l'air libre pendant 24 heures et des billes lyophilisées. Une observation du microrelief ainsi que de la structure interne faisant suite à une coupe transversale, ont permis d'apprécier à la fois l'état de surface des billes mais aussi la microarchitecture polymérique du réseau interne. Par ailleurs, la recherche de particules nanométriques faisant référence à la nanoémulsion à été conduite à différents grossissements. Cette analyse est faite sur un microscope de marque FEI® Versa 3D, par simple dépôt de nos échantillons sur des pastilles de carbone qui permettent de rendre ces derniers conducteurs (figure IV.11 et IV.12).



Figure IV. 11. Microscope électronique à balayage FEI® Versa 3D.



Figure IV. 12. Ecran d'observation de l'analyse de la surface d'un échantillon de billes au microscope électronique à balayage.

2.4 Résultats et discussions

Différentes techniques de caractérisation ont été utilisées pour décrire ces microsphères.

2.4.1 Aspect macroscopique

Les billes obtenues sont blanchâtres, parfaitement sphériques, à contours réguliers et sans rugosité apparente (figure IV.13). Une fois lyophilisées, on peut leur attribuer une porosité visible à l'œil nu. Au toucher, elles sont spongieuses et moins denses, comme l'illustre la figure

IV.14. Nous remarquons que ces dernières conservent leur volume initial, contrairement aux billes qui sont séchées à l'air libre.

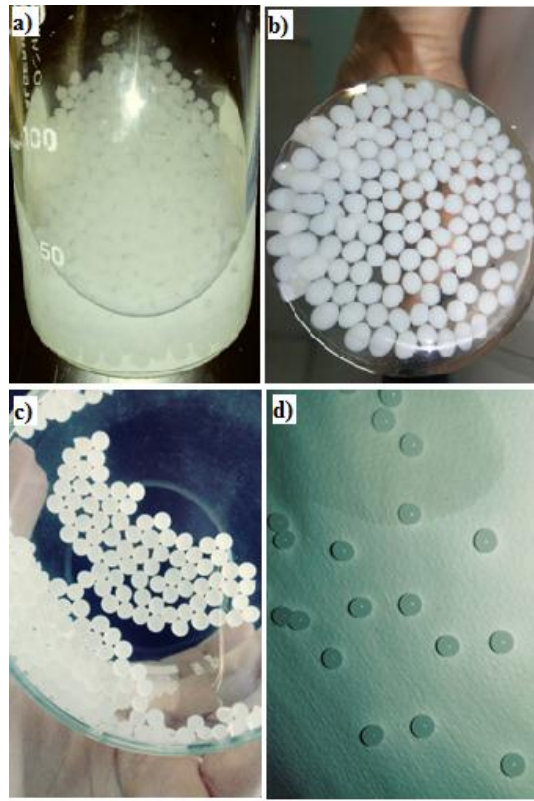


Figure IV. 13. Différentes étapes de traitement des billes d'alginate et contrôle macroscopique. a) formation de billes de calcium d'Alginate dans le bain réticulant, b) étape de maturation des billes, c) récupération des billes après rinçage multiple à l'eau distillée, d) éliminer l'excès d'eau au moyen de papier filtre.



Figure IV. 14. Aspect des billes lyophilisées (a), test à l'écrasement (b), reprise de la taille initiale à la levée de la contrainte (c).

2.4.2 Observation au microscope optique à caméra

Au préalable, les billes humides sont séchées quelques minutes sur un papier absorbant afin d'éliminer l'excès d'eau, puis prises en photo. Les billes obtenues sont sphériques et parfaitement individualisées, de surface lisse et régulière, comme le montrent les clichés de la figure IV.15.

En seconde partie, les billes sont directement observées après lyophilisation, au microscope optique muni d'une échelle micrométrique intégrée. Les résultats de l'analyse ainsi que les clichés correspondants sont présentés dans la figure IV.15.

L'observation de leur aspect microscopique nous permet de distinguer une rugosité spécifique qui signe la présence de pores au sein de ces microsphères, ainsi que leur sphéricité et taille conservées (figure IV.16).

Les diamètres moyens des billes obtenues sont calculés sur un nombre de 50 particules pour chaque expérience et présentés dans le tableau IV.3. En termes de taille granulométrique, les billes lyophilisées présentent en majorité une taille moyenne de l'ordre du micromètre.

Tableau IV. 3. Tailles moyennes des billes lyophilisées.

Expérience N°	Diamètre moyen (µm)	Ecart type	Expérience N°	Diamètre moyen (µm)	Ecart type
1	366	0,016	7	323	0,023
2	363	0,017	8	351	0,022
3	349	0,026	9	363	0,020
4	336	0,019	10	388	0,019
5	362	0,019	11	402	0,019
6	345	0,019	/	/	/

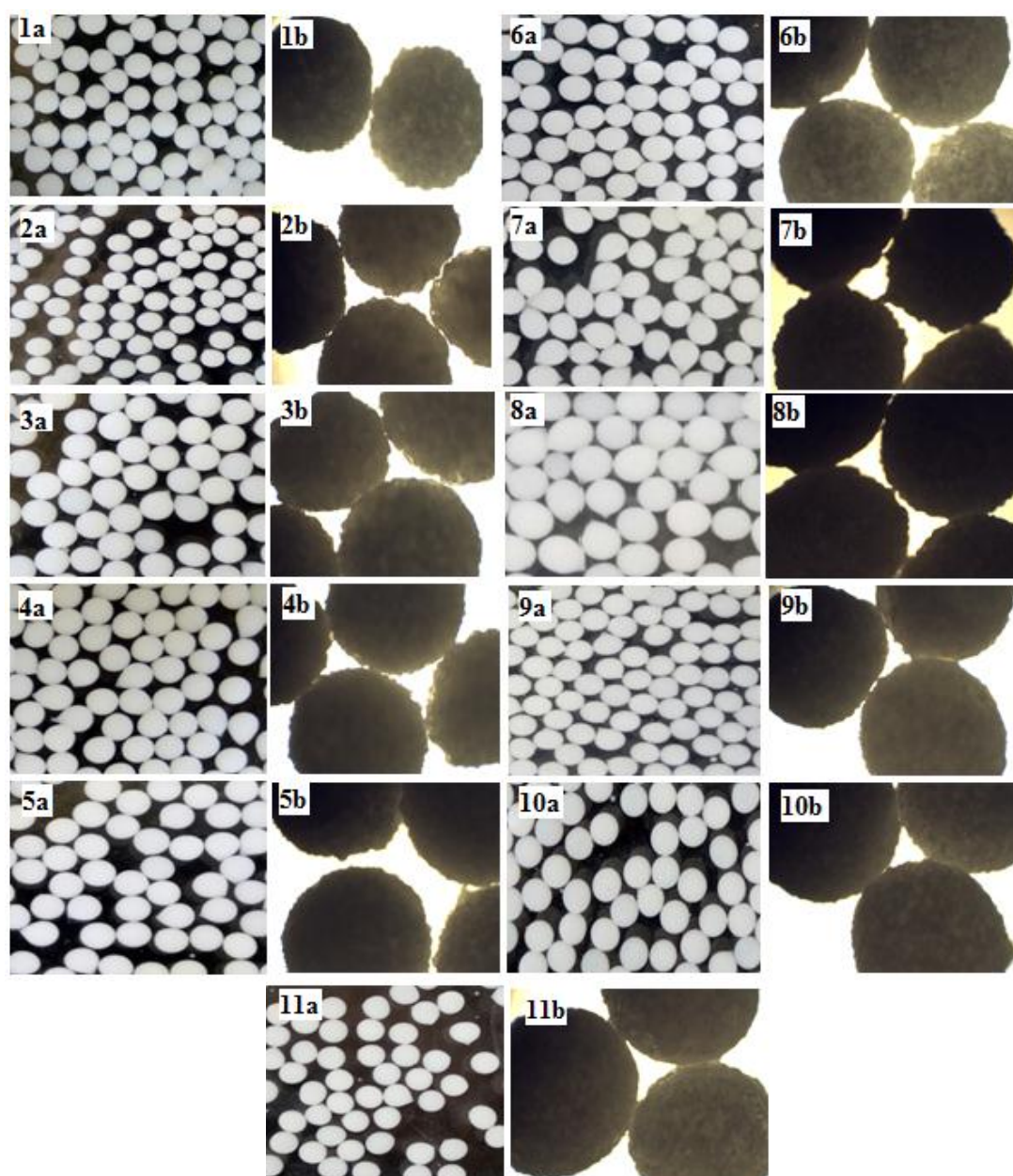


Figure IV. 15. Résultats de l'observation macroscopique des billes humides (a) et microscopique après lyophilisation (b) des billes préparées encapsulant le fénofibrate.

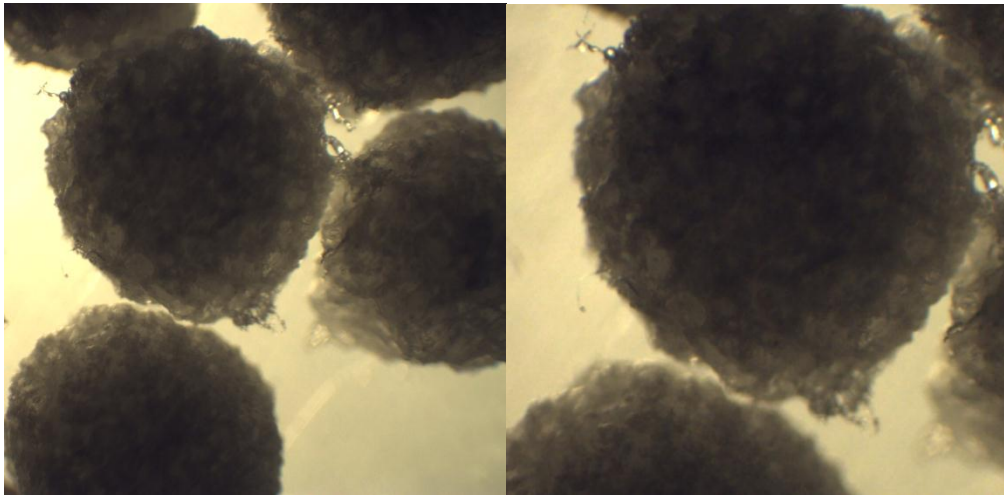


Figure IV. 16. Appréciation de la structure poreuse et de la sphéricité conservée des microsphères après lyophilisation.

2.4.3 Détermination du taux d'humidité résiduelle sur balance infrarouge

La valeur de l'humidité résiduelle illustrée dans la figure IV.17 (1,78%), permet de valider le procédé de lyophilisation sur les billes d'Alginate de calcium encapsulant la NE-FB.

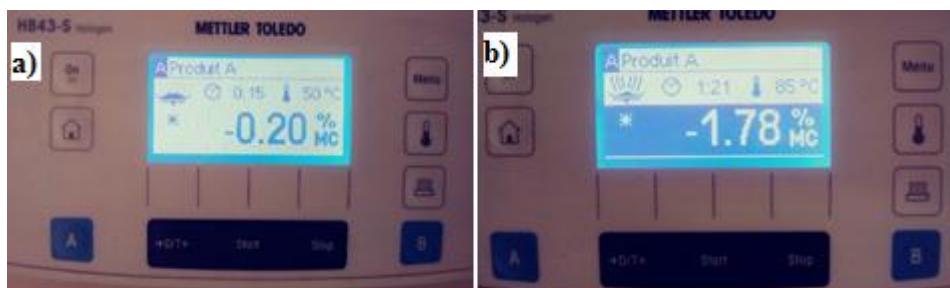


Figure IV. 17. Conduite de l'essai de détermination du taux d'humidité résiduelle sur balance infrarouge. a) lecture en cours, b) stabilisation de la valeur et résultat final.

2.4.4 Observation au microscope électronique à balayage (MEB)

L'usage du MEB nous a permis d'observer l'aspect des microbilles obtenues, leur état de surface, leur structure puis leur architecture interne. Cette description permettra par la suite de comprendre les mécanismes d'acheminement de la molécule active à travers ce réseau polymérique.

En outre, l'objectif principal de cette caractérisation est de pouvoir s'assurer de la présence des nanogouttelettes au sein de cette structure, mais aussi d'identifier leur position (en surface, en

interne ou les deux). La présence des nanogouttelettes dans les billes obtenues signifie la réussite de l'encapsulation.

Les images de l'observation en MEB montrent clairement que les billes obtenues après lyophilisation sont porteuses de pores. Cette porosité est uniformément distribuée sur toute la surface des billes (figure IV.19). Par ailleurs, la structure interne des billes est constituée d'un ensemble de canicules qui s'illustrent parfaitement dans la figure IV.20 et 21.

Après encapsulation du fénofibrate, l'aspect général des billes reste identique avec conservation de sa porosité et de sa structure interne, comme cela est indiqué dans la figure IV.22.

A des grossissements beaucoup plus importants, nous pouvons apprécier les détails au sein de la structure interne et noter la présence de nanogouttelettes, comme indiqué dans la figure IV.23. Ces dernières sont parfaitement individualisées et sphériques (figure IV.24 et 25), leur taille moyenne est mesurée grâce à une échelle intégrée au MEB (figure IV.26). Les valeurs affichées par le MEB et par endroit, s'accordent parfaitement avec la taille moyenne des particules de la NE optimale enregistrée par le Nanosizer[®] (voir chapitre II).

L'intégrité de ces nanogouttelettes indique que la molécule d'intérêt (fénofibrate) est restée encapsulée à l'intérieur, sans qu'elles ne soient altérées par la lyophilisation.

Cette approche est doublement avantageuse :

- elle permet le piégeage de la phase dispersée de la NE au sein d'un réseau polymérique qui est en fait sa phase dispersante, auquel nous avons rajouté l'alginate de sodium qui sera ensuite réticulé par le CaCl₂. Cet ensemble constitue la matrice à travers laquelle le fénofibrate va diffuser ;
- théoriquement, aucune déperdition de dose ne devrait être observée.

Ce dernier point, sera évalué dans la partie qui va suivre en conduisant une étude des performances in vitro dans les liquides gastrique et intestinal simulés.

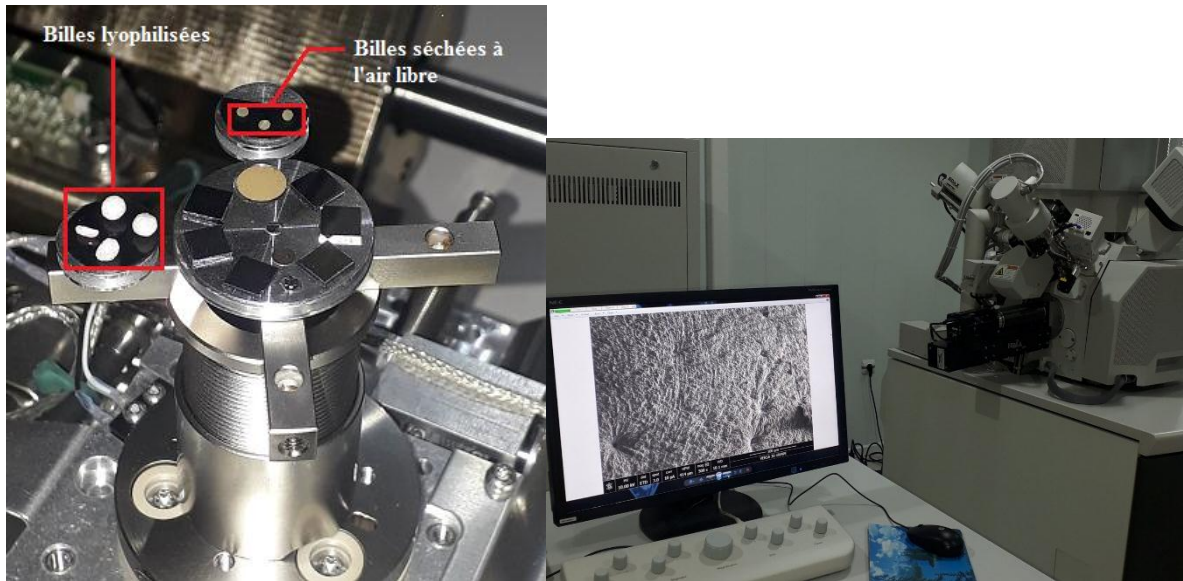


Figure IV. 18. Préparation de l'échantillon pour analyses microscopiques et traitement d'images.

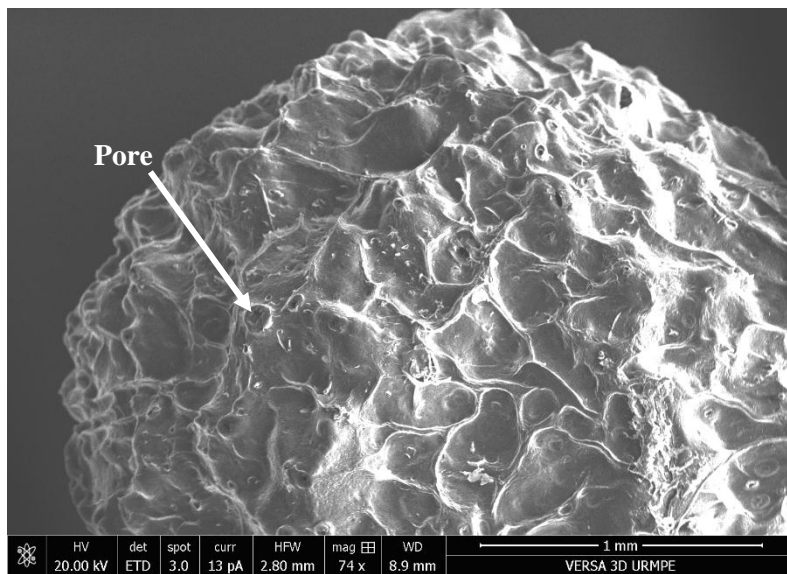


Figure IV. 19. Microporosité des billes d'alginate de sodium.

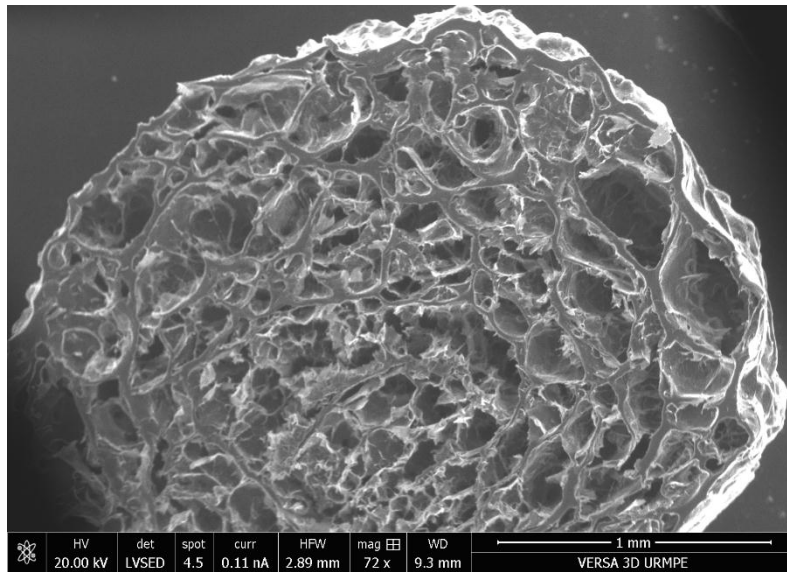


Figure IV. 20. Coupe transversale de la microbille montrant l'organisation interne du réseau polymérique.

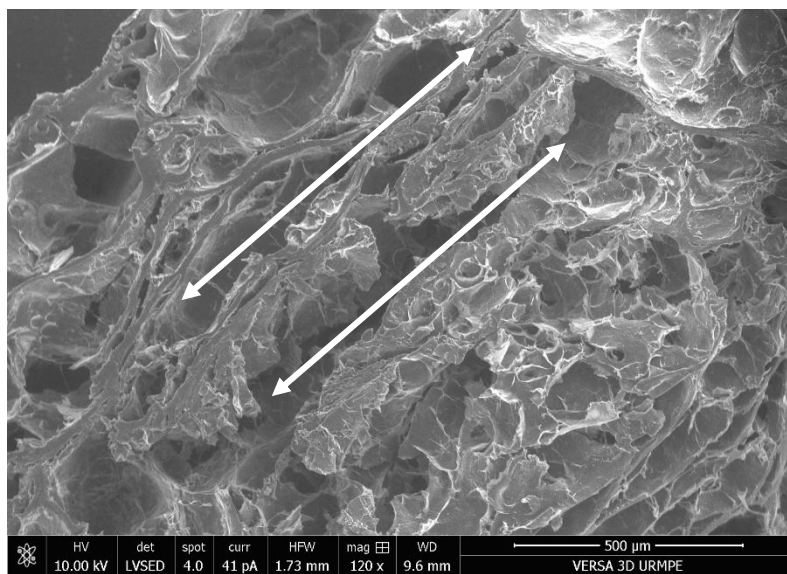


Figure IV. 21. Coupe radiale montrant les canalicules du réseau (flèches blanches).

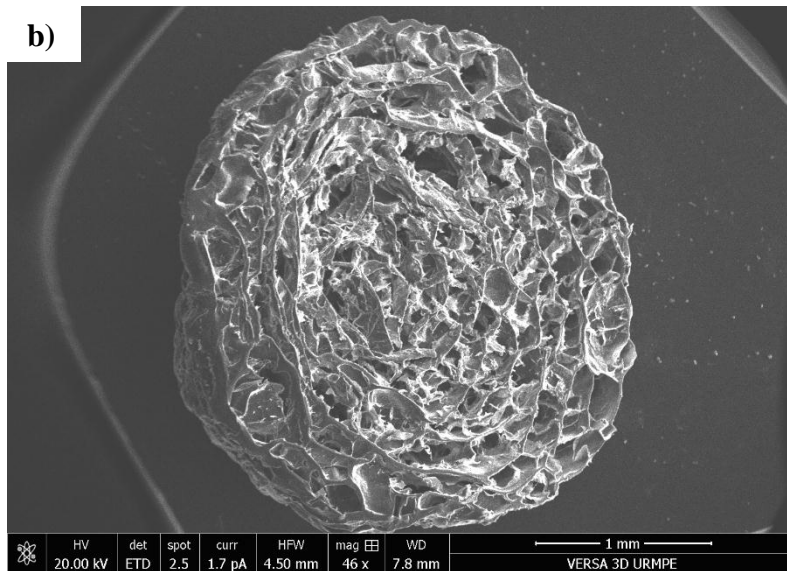
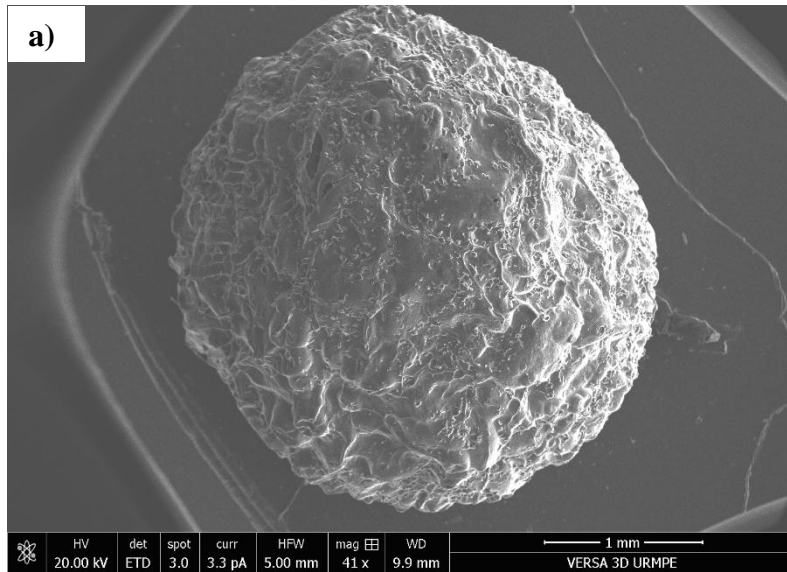


Figure IV. 22. a) Billes contenant NE-FB et b) sa coupe transversale.

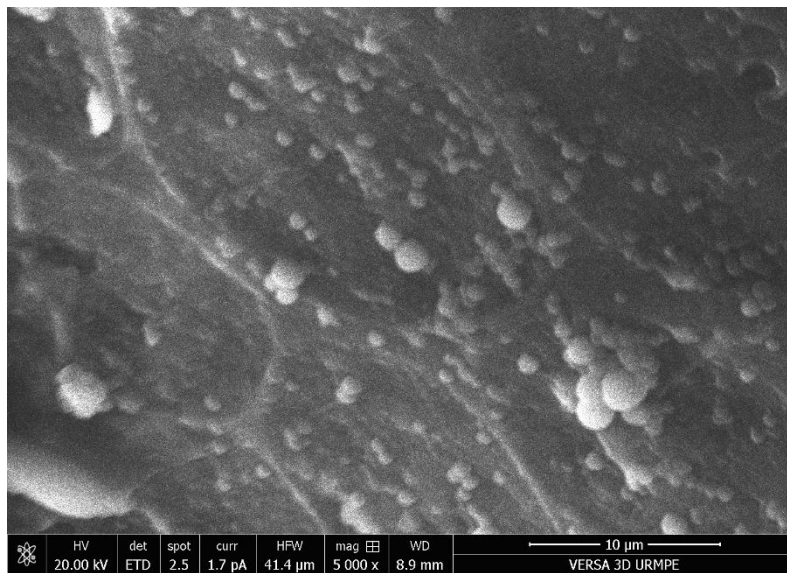
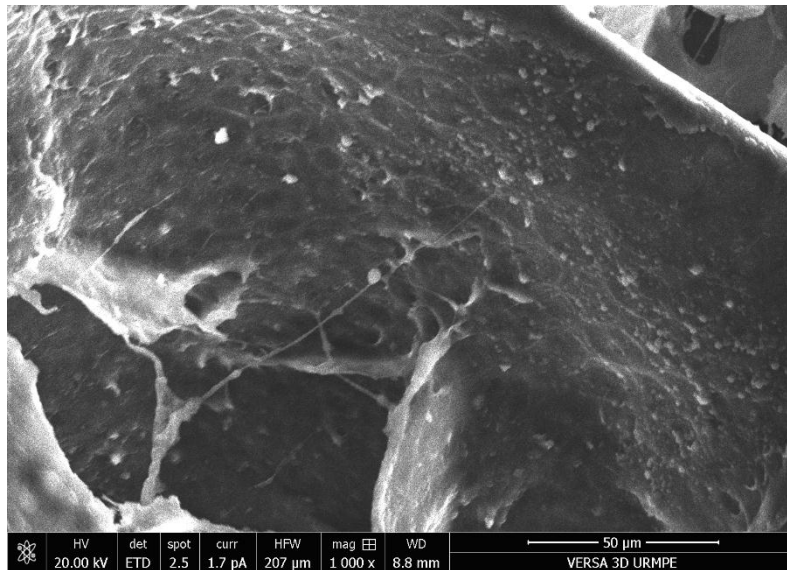


Figure IV. 23. *Nanogouttelettes tapissant la structure interne de la microbille.*

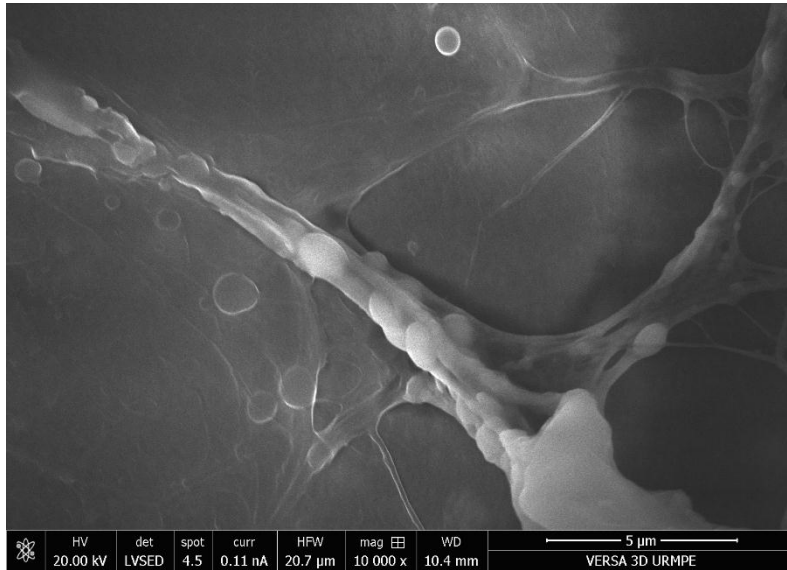


Figure IV. 24. Cliché montrant la localisation des nanogouttelettes.

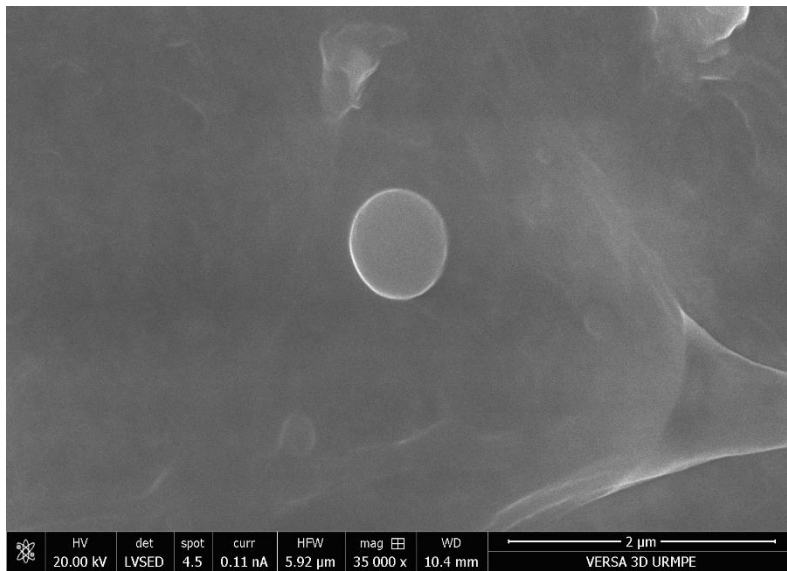


Figure IV. 25. Nanogouttelette huileuse à l'intérieur du réseau polymérique.

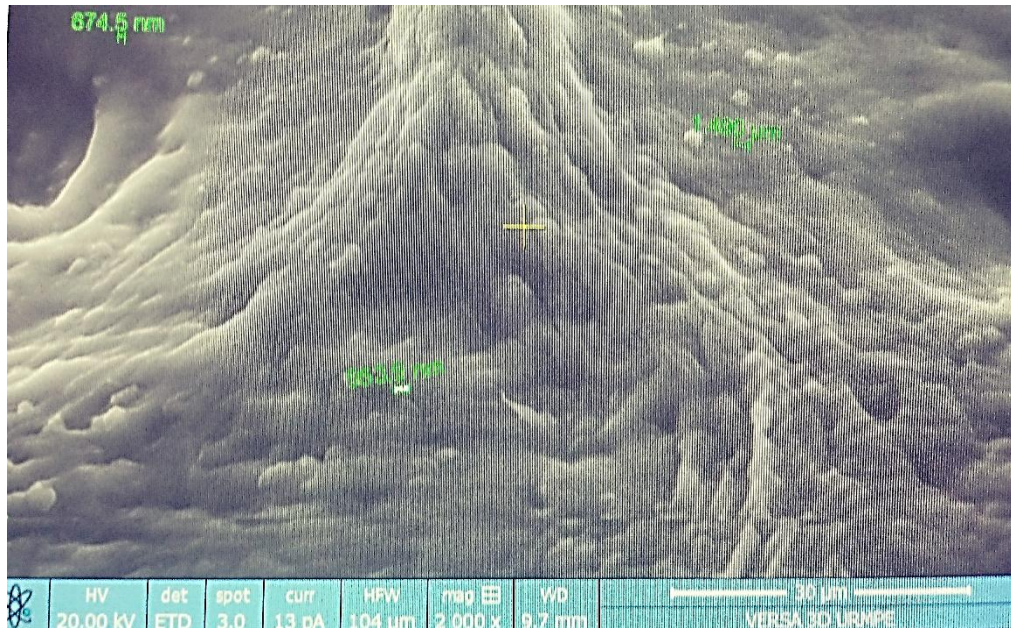


Figure IV. 26. Tailles des particules telles que mesurées par l'échelle intégrée du MEB.

En résumé,

La NE qui encapsule le fénofibrate est elle-même piégée dans un réseau polymérique sous forme de microsphères. Ces dernières lyophilisées offrent les attributs qualité recherchés, à savoir un ensemble des microbilles individualisées et parfaitement sphériques grâce au procédé de gélification ionotropique, un taux d'humidité résiduelle optimal et une structure poreuse piégeant les nanogouttelettes dont l'analyse granulométrique au MEB vient confirmer la taille moyenne des particules.

Cette nouvelle approche qui consiste en une série d'opérations pharmaceutiques consécutives : nanoémulsification, gélification ionotropique et lyophilisation permet non seulement de garantir la stabilité de la NE, mais aussi de promouvoir le devenir in vitro de la molécule d'intérêt.

3 Evaluation des performances in vitro des billes d'alginate de calcium contenant la NE-FB

3.1 Intérêts de l'étude et principe

Pour cette partie, nous avons étudié la libération du PA à travers les microsphères mises au point, en milieux gastrique et intestinal simulés. Dans notre travail, il ne s'agit pas d'émettre des hypothèses sur le mécanisme de libération du PA, mais plutôt d'apprécier l'aptitude de ces

formes à pouvoir libérer le PA et à quel moment ceci se produit, sans oublier de calculer le taux de libération observé.

En effet, l'étude de la libération du principe actif dans des milieux physiologiques simulés est indispensable afin d'établir le profil biopharmaceutique de la formulation. Pour cela, le test de dissolution est généralement effectué dans deux milieux, un milieu acide à pH=1.2, simulant le milieu gastrique physiologique qui permet d'amorcer ou pas la diffusion de la molécule active et un autre milieu basique à pH=6.8, simulant le milieu intestinal. Les gélisphères entament alors leur gonflement en milieu acide pour laisser le PA diffuser, puis finissent par s'éroder en milieu basique pour libérer la totalité du PA encapsulé.

3.2 Démarche opératoire et méthodologie

3.2.1 Cinétique de dissolution

Afin d'évaluer l'aptitude des billes d'alginate à laisser diffuser le PA mais aussi d'apprécier son taux de libération en fonction du temps, une étude de la cinétique de dissolution est conduite sur les 11 expériences initiales (tableau IV.2), elle est alors appelée *Série N°1*, puis sur les deux séries de billes préparées aux conditions optimales retenues (séchées et lyophilisées), pour une étude comparative qui est appelée *Série N°2*.

Le test de dissolution est réalisé sur un dissolutest à palette tournante (type USP II) de marque SOTAX® au niveau du laboratoire de Pharmacie galénique de la faculté de médecine de Tizi Ouzou, voir figure IV.27.

Le dosage du fénofibrate se fait par spectrophotométrie UV-Visible sur deux milieux de simulation gastro-intestinale (pH=1,2 et pH=6,8). Le spectrophotomètre UV-Visible utilisé est de marque SHIMADZU UV-1601 (figure IV.28).



Figure IV. 27. Dissolutest de marque SOTAX® AT7 Smart.



Figure IV. 28. Spectrophotomètre UV-Visible à double faisceau SHIMADZU® UV-1601.

3.2.2 Prérequis à l'évaluation des performances in vitro des billes d'alginate de calcium

Les prérequis à cette étude sont listées ci-dessous :

- Préparation des milieux de dissolution : tampon acide pH=1,2 et tampon phosphate pH=6,8 ;

Autres paramètres : volume du milieu 500 ml ; température $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$; vitesse d'agitation 100 tours/min ; points d'échantillonnage : 5min, 10min, 20min, 30min, 1h, 1h30, 2 heures en milieu acide, puis en un seul point (après 24 heures) en milieu basique.

- Toutes les billes sont introduites dans les vases contenant au préalable le milieu de dissolution.

- La quantification de la libération de la molécule active dans le milieu de dissolution est effectuée à des temps prédéfinis en milieu acide pour une durée de 2 heures afin de définir le comportement des gélisphères et tracer leur cinétique de dissolution. Il s'en suit la quantification en milieu basique après 24 heures en vue d'estimer le taux d'encapsulation pour toutes les formules. Par ailleurs, une étude comparative des performances biopharmaceutiques des billes séchées et lyophilisées, préparées aux paramètres optimums, est réalisée en milieu acide et en milieu basique à des intervalles de temps réguliers pour les deux formes et dans les mêmes conditions opératoires précédentes.
- Les échantillons sont prélevés manuellement et soumis à une filtration, puis à une dilution : 5 mL sont prélevés du milieu de dissolution puis passés à travers un filtre millipore de 0,45 µm et dilués dans 50% d'éthanol. Un volume égal du milieu de dissolution est immédiatement remplacé, après chaque prélèvement.
- Préparation des standards et élaboration de la courbe d'étalonnage : afin de déduire les différentes concentrations du fénofibrate qui a été relarguée au cours des temps prédéfinis, une droite d'étalonnage doit être établie. Le balayage spectral de la molécule solubilisée dans chaque milieu de dissolution a été réalisé entre 200 et 400 nm, les pics d'absorption ont été observés à 286 nm et 290 nm, pour le milieu pH=1,2 et pH=6,8 respectivement. Sept solutions standards de concentrations suivantes : 0,2 µg/ml, 1 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 15 µg/ml, 20 µg/ml, 24 µg/ml, ont été préparées et leurs absorbances mesurées contre un blanc composé à chaque fois du milieu de dissolution concerné et d'éthanol 96° (1:1).
- Méthode analytique : le dosage est fait sur spectrophotomètre UV-Visible à une longueur d'onde de 286 nm en milieu acide (pH = 1,2), puis à 290 nm en milieu alcalin (pH = 6,8), voir figure IV.29.

En annexe 10, protocole et rapport de validation de l'essai de dissolution.

3.2.2.1 Formules de calculs

Les différentes concentrations des échantillons sont obtenues par extrapolation des densités optiques (DO) sur la courbe d'étalonnage et nous permettent de calculer le pourcentage du principe actif libéré à chaque instant t, selon la formule générale suivante :

$$\%PA = \frac{m_t}{m_i} \times 100$$

Où :

m_t : la masse du PA libérée au temps t.

m_i : la masse initiale en principe actif ou dose encapsulée (20 mg).

A partir des densités optiques mesurées avec le spectrophotomètre UV-Visible, le taux de dissolution a été calculé en appliquant la formule suivante :

$$T\%_{pH=1,2} = \frac{DO_{ech} \times C_{std}}{DO_{std}} \times \frac{V_{diss} \times P}{Dose} \times f \quad \text{éq.1}$$

Avec :

DO_{ech} : absorbance de l'échantillon,

DO_{std} : absorbance du standard,

C_{std} : concentration du standard,

V_{diss} : volume de dissolution qui est égal à 500 ml,

P : pureté de la substance active considérée comme 100%,

f : facteur de dilution.



Figure IV. 29. Lecture des échantillons après filtration et dilution.

En ce qui concerne le taux d'encapsulation (TE), ce dernier est estimé après dissolution totale du PA. Une fois les deux heures du test de dissolution dans le milieu acide sont écoulées, les billes de chaque expérience sont passées directement dans 500ml du milieu basique (tampon phosphate pH=6,8) et laissées pendant 24 heures (*Série N°1*). La mesure de l'absorbance de chaque échantillon s'est faite trois fois par spectrophotométrie UV-Visible à 290 nm.

L'équation N°3 est une formule détaillée pour le calcul du taux de dissolution à pH=6,8 :

$$T\%_{pH=6,8} = \frac{DO_{ech} \times C_{std}}{DO_{std}} \times \frac{V_{diss} \times P}{\left[Dose - \left(T\%_{02H, pH=1,2} \times Dose / 100 \right) \right]} \times f \quad \text{éq.2}$$

De la même manière, la concentration du PA ainsi que le taux de dissolution à T₂₄ heures sont déduits par extrapolation sur une courbe d'étalonnage préétablie. Le taux de dissolution représente la quantité totale contenue dans les billes, c'est à dire la somme des quantités du PA libérées dans les deux milieux, selon la formule générale suivante :

$$T = \text{quantité du PA au milieu acide à T2h} + \text{quantité du PA au milieu basique à T24h} \quad \text{éq.3}$$

A l'issue des résultats obtenus, notre sélection se portera sur la formule ayant une cinétique de dissolution maîtrisée avec un bon taux d'encapsulation.

$$TE = \frac{\text{Taux de dissolution total} \times \text{Dose mesurée}}{\text{masse introduite} \times 100} \quad \text{éq.4}$$

Pour l'étude comparative des performances in vitro, la formule optimale sera reprise avec deux modes de séchage différents (séchage à l'air libre et lyophilisation). Les taux de dissolution mesurés à des intervalles réguliers, en milieu acide ou en milieu basique nous ont permis de comparer le profil de dissolution des billes séchées à l'air libre et celui des billes lyophilisées pour faire ressortir l'importance du procédé de lyophilisation comme méthode de séchage et de stabilisation (*Série N°2*).

3.2.2.2 Expression des résultats

Les résultats obtenus sont exprimés sous formes de figures, de tableaux et de graphiques de l'évolution de la concentration du fénofibrate (exprimée en pourcentages), en fonction du temps.

Dans une seconde partie, ces résultats seront confrontés aux données de la microscopie électronique (MEB).

3.2.3 Mode opératoire des essais de performance in vitro

Pour mener à bien cet essai, les étapes sont les suivantes (figure IV.30) :

- Allumer le dissolutest.
- Préparer les milieux de dissolution et dégazer si nécessaire.
- Introduire le volume prescrit dans chaque vase.
- Chauffer le milieu de dissolution jusqu'à atteindre la température de $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$.
- Régler la vitesse de rotation du mobile tournant (palette).
- Placer une unité de prise au fond du récipient.
- Mettre immédiatement en marche l'appareil et déclencher le chronomètre.
- Au moment prescrit, prélever une quantité du milieu de dissolution et filtrer rapidement.
- Effectuer des prélèvements dans une zone située à mi-distance entre la surface du milieu et le haut de la palette, à 10 mm au moins de la paroi du récipient.
- Faire les dilutions.
- Analyser les échantillons.
- Faire les calculs nécessaires.

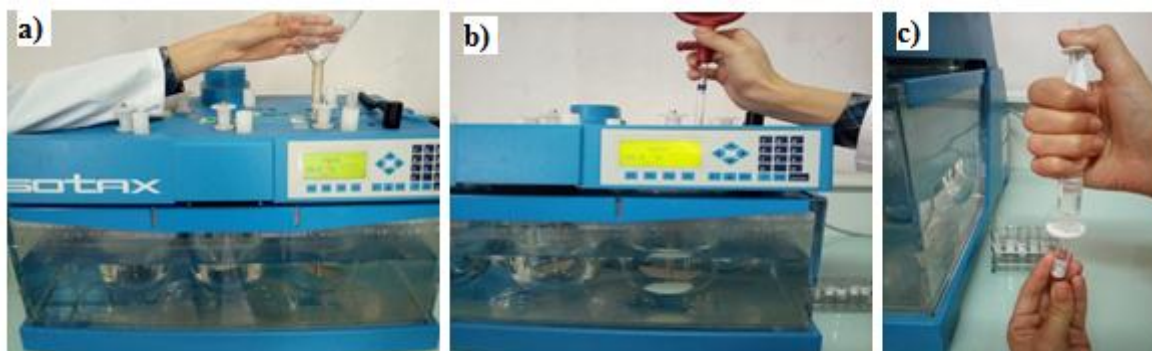


Figure IV. 30. Les différentes étapes du test de performance *in vitro*. a) Introduction des billes dans le vase, b) prélèvements des échantillons, c) filtration des échantillons.

3.3 Résultats et discussions

Le test de dissolution est incontestablement le test pharmacotechnique de référence en matière d'évaluation des performances *in vitro* d'une forme galénique et permet de prédire le comportement de cette dernière *in vivo* et par voie de conséquence valider la formule optimale.

Dans cette partie, nous présentons les résultats en deux parties, ceux de la Série N°1 puis ceux de la Série N°2.

3.3.1 Analyse des résultats de l'étude de performance *in vitro* de la Série N°1

L'intérêt de ce test est de pouvoir estimer la libération du PA de sa forme galénique, en l'occurrence des billes chargées en NE-FB.

Les résultats sont exprimés sous formes de tableaux et de graphiques de l'évolution de la concentration du fénofibrate (exprimée en pourcentages) en fonction du temps.

Tableau IV. 4. Préparation et lecture des absorbances des étalons.

	$\mu\text{g/ml}$	$\text{pH}=1,2$	$\text{pH}=6,8$
120%	24	1,210	1,047
100%	20	0,998	0,877
75%	15	0,78	0,698
50%	10	0,552	0,467
25%	5	0,298	0,3
20%	1	0,114	0,101
10%	0,2	0,021	0,09

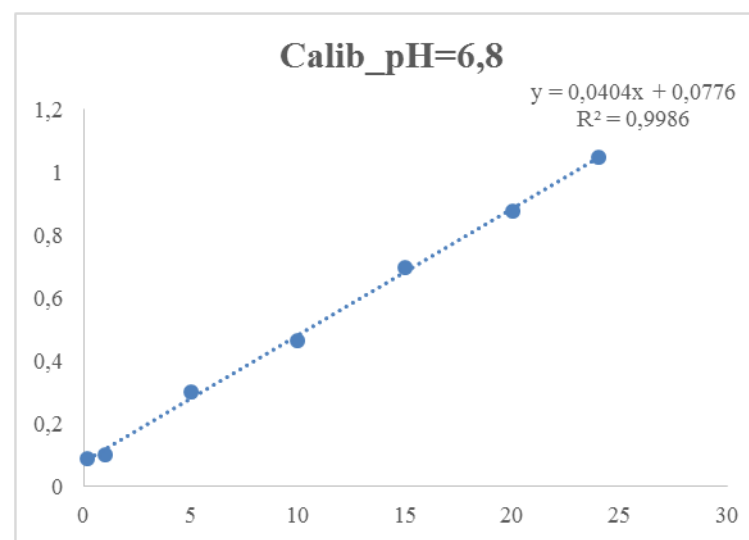
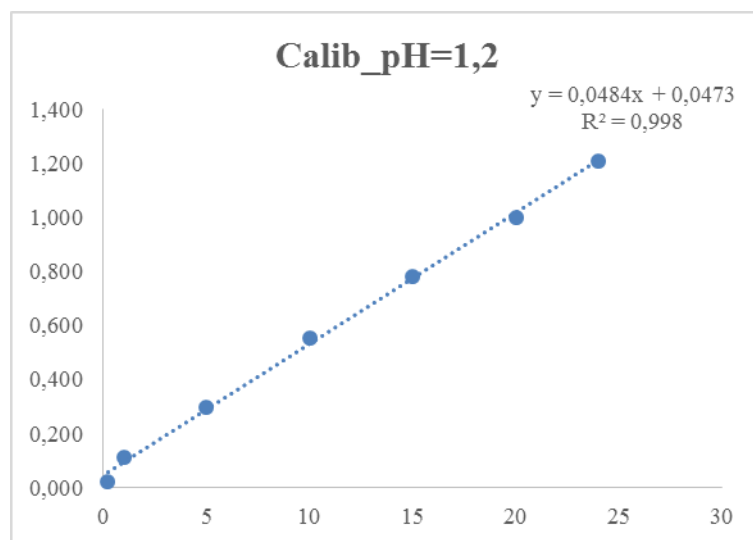


Figure IV. 31. Courbes d'étalonnage à $\text{pH} = 1,2$ (à gauche) et à $\text{pH}=6,8$ (à droite), avec un coefficient de corrélation proche de 1.

Tableau IV. 5. Résultats des mesures des absorbances des 11 formulations de la Série N°1 à pH=1,2 et pH=6,8.

	Temps /Formule	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11
Milieu acide pH=1,2	10	0,436	0,43	0,161	0,086	0,422	0,09	0,101	0,112	0,226	0,124	0,252
	15	0,605	0,549	0,21	0,09	0,497	0,104	0,106	0,122	0,254	0,138	0,308
	30	0,617	0,555	0,278	0,095	0,5	0,101	0,119	0,132	0,291	0,144	0,324
	60	0,624	0,669	0,344	0,096	0,687	0,101	0,118	0,138	0,301	0,156	0,349
	90	0,677	0,69	0,322	0,102	0,7	0,107	0,143	0,141	0,341	0,169	0,366
	120	0,689	0,695	0,341	0,106	0,719	0,127	0,146	0,144	0,341	0,177	0,375
Milieu basique pH=6,8	T 24heures	0,353	0,345	0,178	0,329	0,329	0,282	0,507	0,364	0,281	0,205	0,281

F : Formule

Tableau IV. 6. Résultats des calculs du taux de dissolutions du fénofibrate à pH=1,2 et pH=6,8 (Série N°1).

Temps	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11
10	40,1	39,5	11,8	4,1	38,7	4,5	5,6	6,8	18,5	8,0	21,2
15	57,5	51,8	16,9	4,5	46,4	6,0	6,2	7,8	21,4	9,5	27,0
30	58,8	52,4	23,9	5,0	46,7	5,6	7,5	8,8	25,2	10,1	28,6
60	59,5	64,1	30,7	5,1	66,0	5,6	7,4	9,5	26,3	11,3	31,2
90	64,9	66,3	28,4	5,7	67,3	6,3	10,0	9,8	30,4	12,7	32,9
120	66,2	66,8	30,4	6,2	69,3	8,3	10,3	10,1	30,4	13,5	33,9
24heures	100,9	99,8	18,0	33,2	101,5	27,7	59,2	39,5	36,2	18,3	38,2

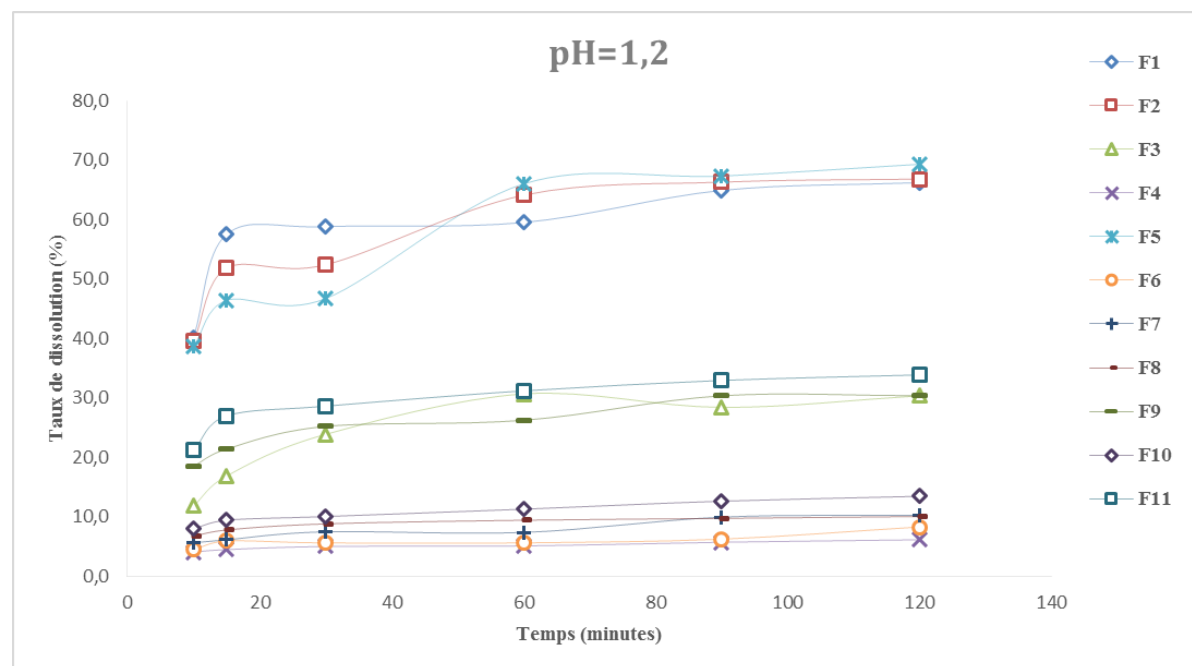


Figure IV. 32. Profils de dissolution du fénofibrate dans le milieu acide des billes d'alginate chargée de fénofibrate (Série N°1).

3.3.2 Interprétation des résultats

Selon la figure IV.32 et le tableau IV.6, l'étude des profils de dissolution nous permet de subdiviser les formules en 3 groupes :

- 1^{er} groupe : F4, F6, F7, F8, F10. Ces formules présentent un taux de dissolution entre 18,3 et 59,2% et un taux de dissolution en milieu acide qui varie de 6 à 13,5% ;
- 2^{ème} groupe : F3, F9, F11. Ces formules présentent un taux de dissolution qui varie de 18 à 38% et un taux de dissolution en milieu acide autour de 30 % ;
- 3^{ème} groupe : F1, F2, F5. Ces formules encapsulent la totalité de la molécule et libèrent plus de la moitié dans le milieu acide (66,2 à 69,3%).

Selon le tableau IV.7, toutes les formules du groupe 1 et 2 présentent des taux de libération très faibles, seule la formule 7 présente un taux d'environ 59%, avec un rapport C1/C2 égal à 1,5 (6/4). En revanche, si on opte pour une libération soutenue avec un bon taux d'encapsulation, les trois points au centre de la matrice du plan d'expérience (F1, F2 et F5) semblent parfaits avec un taux supérieur à 90% (100,9 %, 99,8 % et 101,5%, respectivement).

Les résultats supérieurs à 100% sont acceptables et répondent aux exigences en termes de validation de la qualité des résultats (centrage et répétabilité). Voir support de validation en annexe 11. Aussi, les critères d'acceptation pour l'uniformité posologique (voir le chapitre général USP-NF <905> Uniformité des formes pharmaceutiques) sont compris entre 85,0 % et 115,0 % de la dose théorique.

Au bout de 20 minutes de temps de maturation et un rapport C1/C2 de (5/3), ces billes libèrent plus de leur moitié en charge médicamenteuse. Répétées trois fois, ces formules présentent le même profil de dissolution (zone encadrée en rouge).

Pour toutes les formules, nous pouvons noter une stabilisation des valeurs dès 90 minutes du lancement du test de dissolution, dans le milieu acide. En effet, la libération de la molécule active fait suite à une diffusion puis érosion de la matrice (Hwang 1995). La désintégration des billes est pH dépendante, elle se fait en totalité dans le milieu basique.

A l'issue de ces résultats, nous ressortons avec une zone d'expérimentation optimale, dont les concentrations en alginate de sodium peuvent varier de 5% à 6%, alors que celle du CaCl₂ peut osciller entre 3% et 4%. De son côté, le temps de maturation doit impérativement se situer entre 20 et 30 minutes.

Ci-dessous un tableau récapitulatif des caractéristiques obtenues lors de cette évaluation.

Tableau IV. 7. Tableau récapitulatif des réponses enregistrées des 11 formules des billes encapsulant le fénofibrate.

<i>Run Order</i>	<i>C1 (%)</i>	<i>C2 (%)</i>	<i>Temps de maturation (minutes)</i>	<i>Taille moyenne des particules (µm)</i>	<i>Taux de dissolution à pH=1,2 (%)</i>	<i>Taux de dissolution à pH=6,8 (%)</i>
<i>11</i>	-1	-1	-1	402	33,9	38,2
<i>8</i>	1	-1	-1	351	10,1	39,5
<i>9</i>	-1	1	-1	363	30,4	36,2
<i>4</i>	1	1	-1	336	6,2	33,2
<i>10</i>	-1	-1	1	388	13,5	18,3
<i>3</i>	1	-1	1	349	30,4	18
<i>6</i>	-1	1	1	345	8,3	27,7
<i>7</i>	1	1	1	323	10,3	59,2
<i>5</i>	0	0	0	358	69,3	101,4
<i>2</i>	0	0	0	338	66,8	99,8
<i>1</i>	0	0	0	340	66,2	100,9

En résumé,

Toutes les billes formées sont sphériques, poreuses et de taille micrométrique. Une série de formules randomisées a été lancée dans le but d'étudier leur cinétique de dissolution en milieu pH=1,2 et d'estimer le taux d'encapsulation en déterminant le taux de dissolution en milieu pH=6,8 ; après y avoir laissé les billes 24 heures. Ce qui nous a permis d'avoir un domaine expérimental de formules optimales.

Les profils de dissolutions que nous avons enregistrés précédemment sont similaires à ceux décrits dans la littérature (Bamyan 2013). Ces microparticules sont d'excellents vecteurs médicamenteux et permettent non seulement de contrôler la libération du PA, mais aussi de promouvoir leur mise à disposition (Kakkar 1995).

Cependant, pour garantir l'encapsulation totale de la molécule, les formules F1, F2 et F5, qui répondent aux mêmes conditions de préparation, semblent parfaites avec une taille moyenne de 345 µm et un profil de dissolution correspondant à une libération plutôt soutenue et pH-dépendante, avec plus de 60% de matière active libérée en milieu acide, en affichant le meilleur taux d'encapsulation (tableau IV.7). Aussi, la moitié du taux d'encapsulation a pu être diffusée

au bout de 15 minutes (tableau IV.6). Ces microparticules sont produites avec 5% d'alginate de sodium et 3% de CaCl₂.

3.3.3 Analyse des résultats de l'étude de performance in vitro de la Série N°2

Nous avons voulu apprécier les avantages que peut offrir une lyophilisation par rapport à un mode de séchage classique (air libre pendant 24 heures), à travers une étude comparative des performances in vitro en reprenant la formule optimale (F1,F2 ou F5).

Le mode de séchage influence le devenir in vitro de la molécule encapsulée, ceci a été clairement démontré par une étude comparative des profils de dissolution des billes séchées à l'air libre par rapport aux billes lyophilisées. En effet, dans le tableau IV.8 et la figure IV.33, nous constatons que les profils de dissolution sont complètement différents entre les deux types de billes et remarquons que le séchage à l'air libre donne lieu à une diffusion graduelle du PA en fonction du temps, sans individualisation de plateau.

Au contraire, grâce à la porosité des billes lyophilisées, il y'a facilité de diffusion de PA à travers les canalicules de la matrice polymérique. En effet, un peu plus de la moitié est alors déversé dans le milieu acide. Ce qui est également confirmée par la littérature, avec une libération beaucoup plus précoce pour les formes lyophilisées (Sriamornsak 1998). C'est grâce à sa microstructure et à sa porosité que ces dernières sont facilement imbibées du milieu acide avec lequel elles sont mises en contact. Elles gonfleront rapidement et laisseront diffuser le PA.

L'allure de la courbe laisse ensuite apparaître un plateau correspondant à sa cinétique de libération en milieu basique. Pour les deux modes de séchage, la désintégration des billes se fait en totalité dans le milieu basique par érosion de la matrice polymérique.

Aussi, la MEB a indiqué que les billes lyophilisées sont poreuses et de taille plus importante par rapport aux billes séchées à l'air libre. Sa porosité très marquée entraîne également une plus grande absorption d'eau. Une telle différence d'absorption d'eau pourrait avoir un impact non négligeable sur la cinétique de libération du médicament (Smrdel 2008). Les figures de la microscopie électronique nous permettent de comprendre l'impact de la structure sur le devenir et l'acheminement de la molécule d'intérêt à travers ces microparticules (figure IV.34 et 35).

La dissolution du PA est totale au bout de 4 heures pour les deux modes de séchage (tableau IV.8). Toutefois, on note une libération mieux contrôlée pour les billes lyophilisées grâce à leur porosité, alors que pour celles séchées à l'air libre elle présente un phénomène de « burst effect » en milieu basique (130 minutes).

Tableau IV. 8. Comparaison des taux de dissolution en milieu acide et basique des billes séchées à l'air libre et des billes lyophilisées.

<i>Milieu</i>	<i>Time (min)</i>	<i>Absorbance</i>		<i>Taux de dissolution(%)</i>	
		<i>B.séchées à l'air</i>	<i>B.lyophilisées</i>	<i>B.séchées à l'air</i>	<i>B.lyophilisées</i>
<i>Milieu acide pH=1,2</i>	5	0,116	0,476	7,2	44,2
	10	0,117	0,509	7,3	47,6
	15	0,221	0,617	18,0	58,7
	30	0,273	0,617	23,4	58,7
	60	0,307	0,687	26,9	66,0
	90	0,383	0,691	34,7	66,3
	120	0,431	0,740	39,7	71,4
<i>Milieu basique pH=6,8</i>	125	0,084	0,089	1,4	5,2
	130	0,264	0,094	38,3	7,4
	135	0,406	0,177	67,4	43,3
	150	0,502	0,194	87,1	50,6
	180	0,541	0,279	95,1	87,3
	210	0,550	0,298	96,9	95,6
	240	0,566	0,310	100,2	100,7

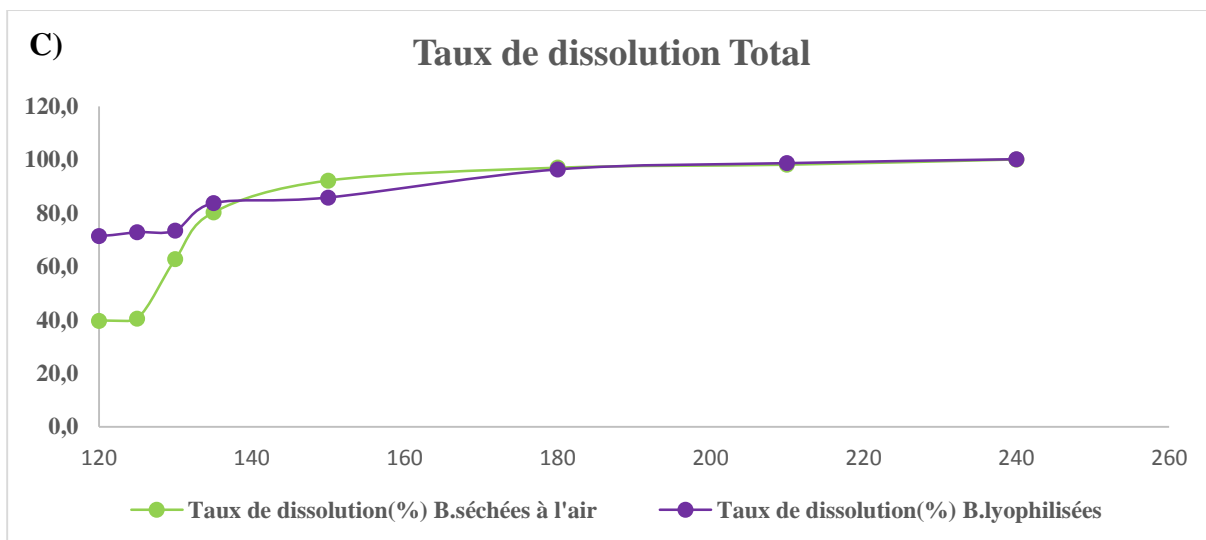
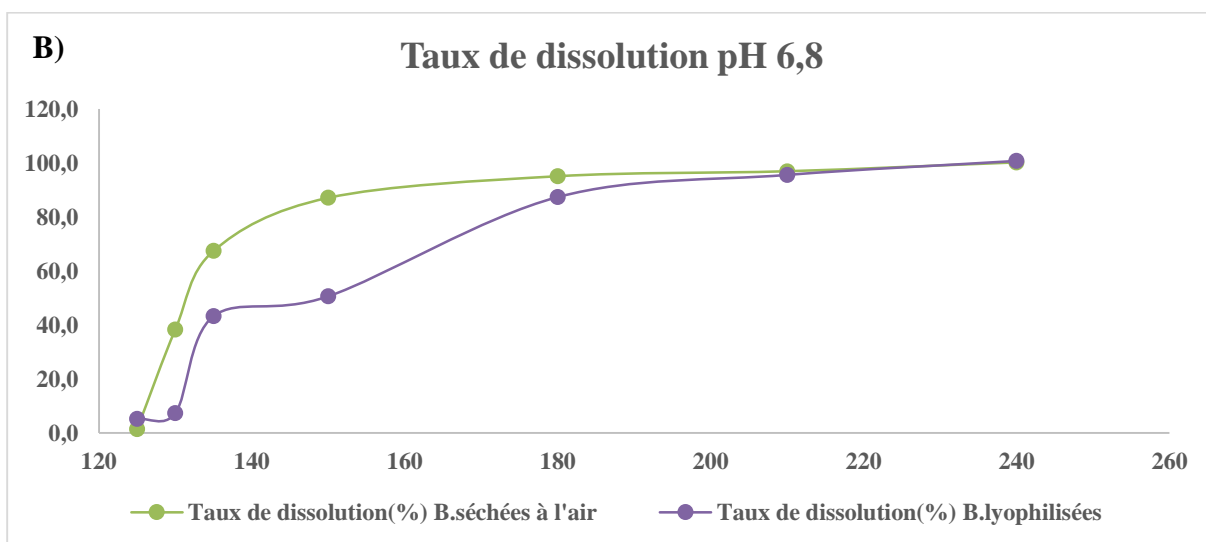
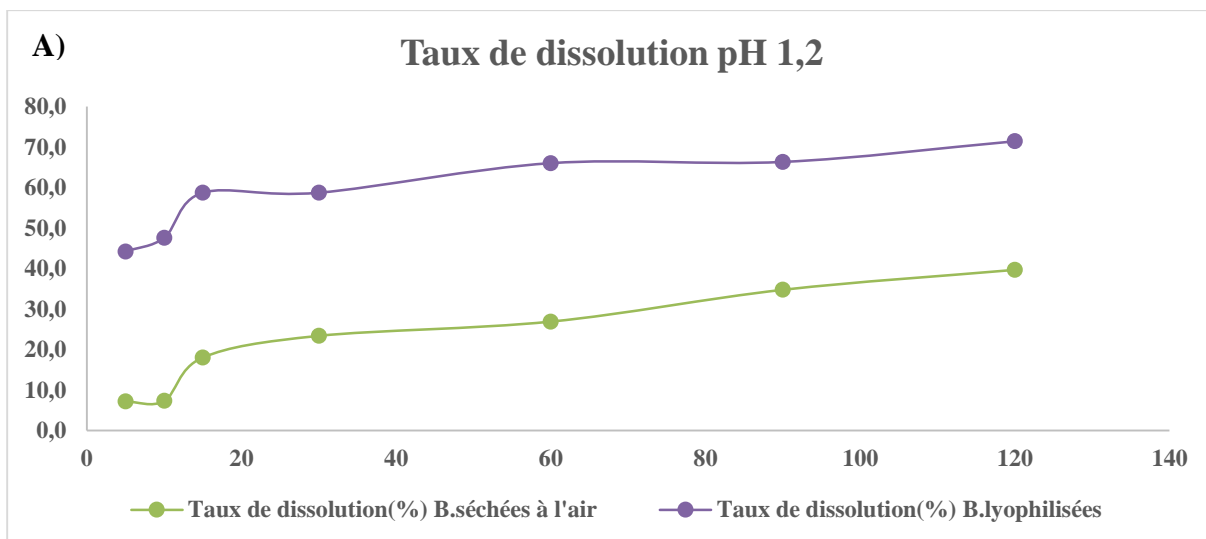


Figure IV. 33. Comparaison des profils de dissolution des billes lyophilisées et des billes séchées à l'air libre en milieu acide pH=1,2 (A) et basique pH=6,8 (B). Profils de dissolution totale (C).

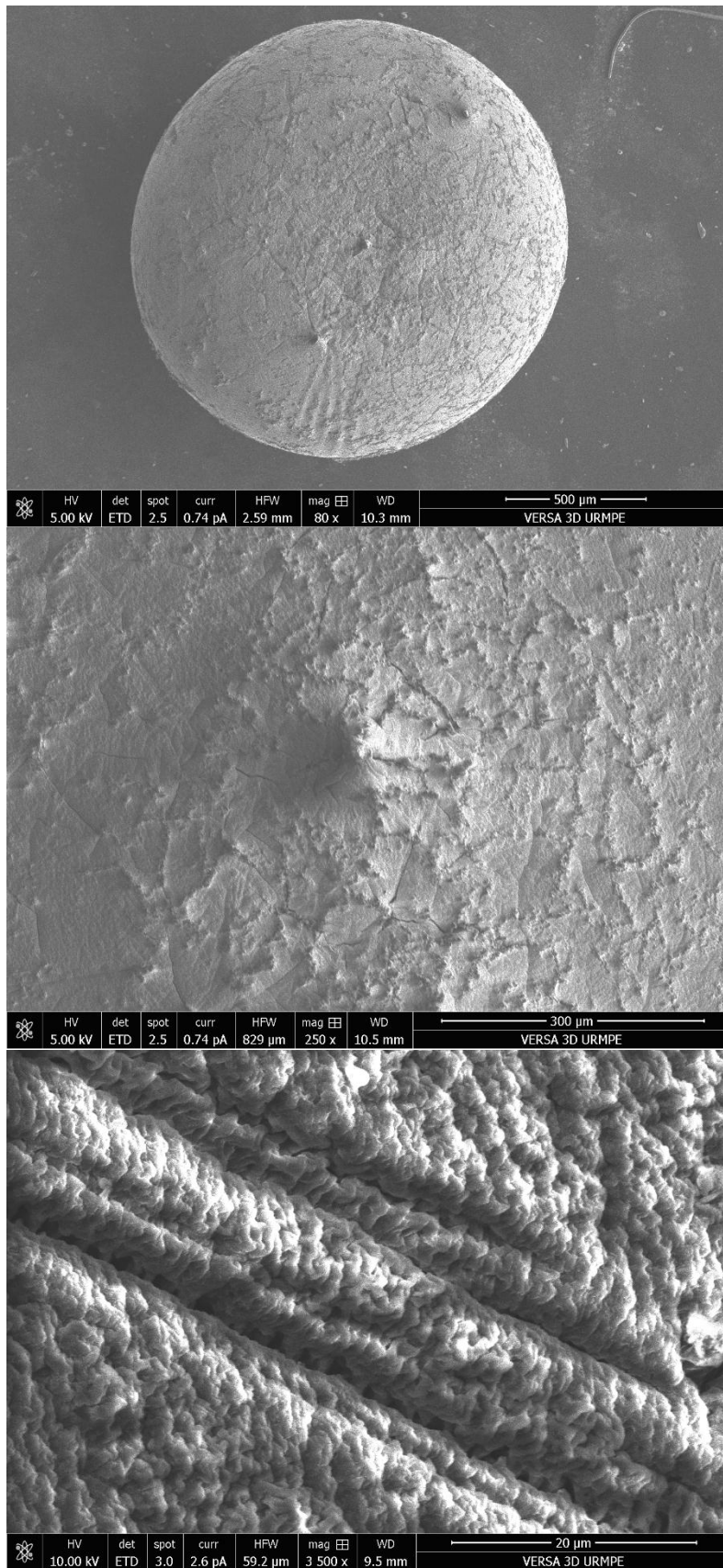


Figure IV. 34. Etat de surface et microrelief des billes séchées à l'air libre (aucune porosité).

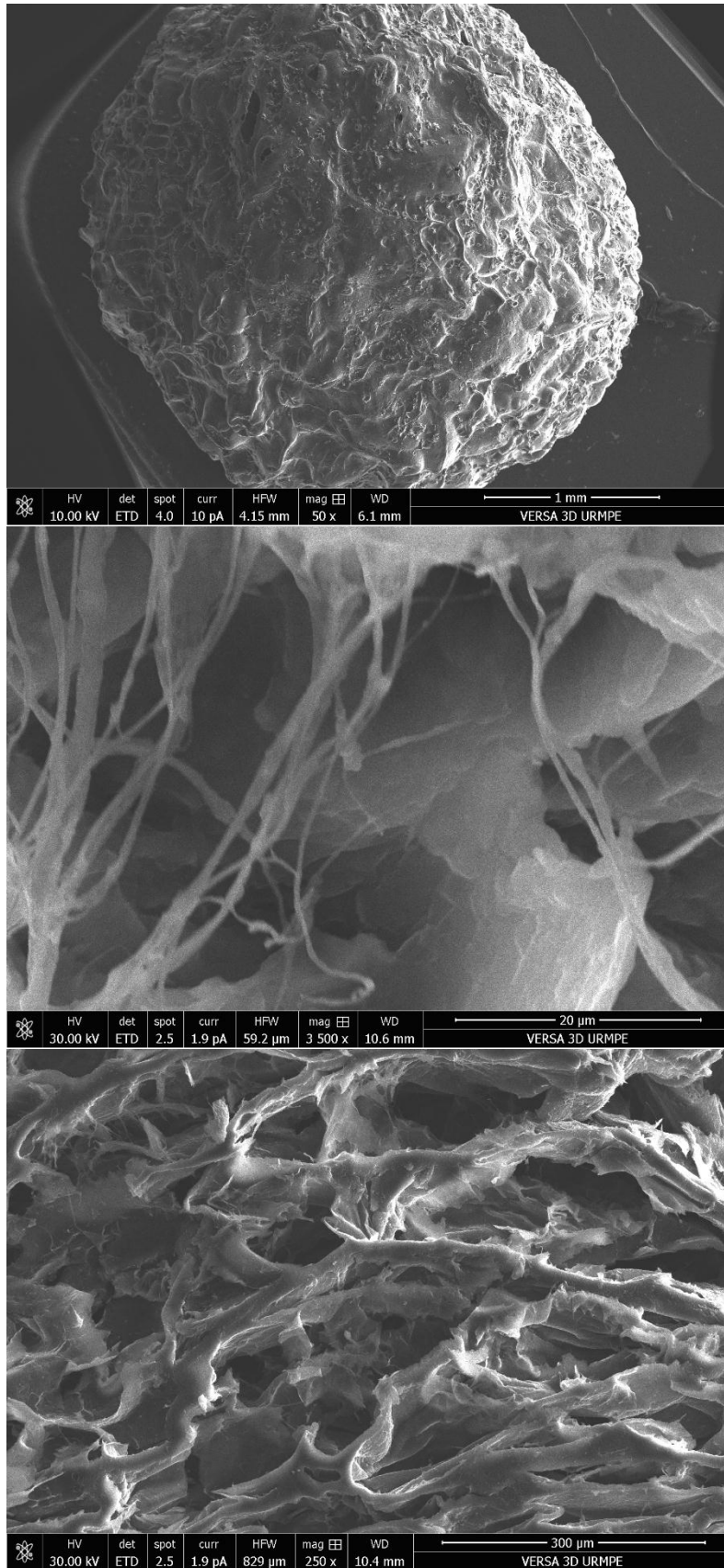


Figure IV. 35. Etat de surface et microrelief des billes lyophilisées (porosité élevée).

Ainsi, la technique de lyophilisation appliquée comme procédé de séchage et de stabilisation est entièrement justifiée en répondant à toutes les exigences :

- Taille de particule conservée [323-402] μm ;
- Taux d'humidité résiduelle satisfaisant (1,78%);
- Une microporosité sur toute la surface des microbilles ;
- Un réseau de canalicules internes facilitant la diffusion du PA ;
- Un taux d'encapsulation idéal ($\geq 99,8\%$);
- Un support matriciel stabilisant des nanogouttelettes médicamenteuses ;
- Une cinétique de dissolution idéalement contrôlée sans « burst effect ».

Discussion des résultats

L'étude que nous avons menée dans ce chapitre vise à adapter le procédé de lyophilisation sur la NE-FB et à justifier son application. Le procédé fut appliqué sur des microsphères chargées de cette NE produites par gélification ionotropique.

Cette démarche consiste à développer une alternative à une lyophilisation directe, qui peut être nuisible à la stabilité de la NE, en la protégeant dans une matrice de polymère réticulée par un agent divalent (Ca^{2+}). Le processus engagé est connu sous le nom de gélification en goutte ou réticulation ionotropique ou encore prilling. L'avantage de ce procédé est qu'il est applicable sur une nanoémulsion déjà stable, en dispersant le polymère dans cette dernière de manière homogène, avant de réintroduire toute la préparation dans une solution réticulante pour enfin obtenir des billes bien sphériques.

Pour ce genre d'approche, il est primordial de bien établir le protocole et définir toutes les conditions opératoires. Par ailleurs, l'optimisation des paramètres de composition en alginate de sodium et en calcium, est un point essentiel à la réussite de ce procédé.

La lyophilisation de la NE-FB passe inévitablement par ce procédé intermédiaire qu'est la gélification ionotropique, qui a permis non seulement d'immobiliser le fénofibrate et d'éviter sa déperdition, mais aussi d'obtenir des formes multiparticulaires parfaitement sphériques et particulièrement intéressantes à explorer. Ces supports galéniques sont très stables, biocompatibles et contribuent de manière significative à une meilleure performance de la formulation. Le succès de cette démarche s'illustre par les résultats de l'imagerie au microscope

électronique à balayage, le taux d'humidité résiduelle observé, la cinétique de dissolution obtenue et le taux d'encapsulation enregistré.

Il est tout à fait possible d'envisager une gélification en goutte d'une nanoémulsion tout en s'assurant que les propriétés biopharmaceutiques seront atteintes en matière de dissolution. Ceci est parfaitement illustré par les résultats des courbes des cinétiques de dissolution obtenues, qui prévoient un taux de 50% au bout de 15 minutes, une fois les billes introduites dans le milieu biologique. Ces propriétés dépendent aussi de la taille des particules qui varient en fonction de la formulation et de son procédé.

D'autre part, le taux d'encapsulation de la formule optimale avoisine les 100%, avec une cinétique de libération soutenue pour les formes lyophilisées. En effet, la matrice relargue à travers sa structure poreuse le fénofibrate par diffusion, jusqu'à atteindre plus de 60% au bout de 2 heures en milieu acide. Après son passage en milieu basique, il y a épuisement de toute la matière active. Au contraire, les billes séchées à l'air libre présentent un taux de dissolution de 39% en milieu acide et ne libèrent que 18% au bout de 15 minutes.

Pour conclure, cette approche d'encapsulation et de stabilisation est très intéressante et peu coûteuse. Elle peut être facilement soumise à une transposition à échelle industrielle car elle requiert peu d'énergie, sans fortes agitations ni surchauffe.

Par ailleurs, la succession de procédés est souvent difficile à exécuter sans altérer ou détruire le système. Nous avons réussi à travers cette technique à passer d'une nanoémulsification à une gélification ionotrope, ensuite à une lyophilisation sans perdre les propriétés de chaque système et tout en protégeant la molécule encapsulée. Les contrôles effectués au fur et à mesure sont parfaitement représentatifs des attentes et objectifs que nous nous sommes fixés. La molécule semble se libérer parfaitement du système auquel elle appartenait, pour enfin se retrouver dans le milieu de dissolution. Les résultats obtenus sont très encourageants et laissent envisager une meilleure stabilité du système.

Conclusion générale et perspectives

Les nanoémulsions sont une sous classe des émulsions, elles sont thermodynamiquement instables mais stables du point de vue cinétique (jusqu'à plusieurs mois). Dans la littérature il n'y a pas de consensus concernant l'intervalle de taille. Toutefois, cette dernière ne dépasserait pas des centaines de nanomètre. Le développement des NEs a longtemps suscité l'intérêt des formulateurs pour leur administration par voie orale et représente un grand défi pour l'industrie pharmaceutique (Porter 2007; Di Maio 2011). En effet, Les principes actifs en développement font le plus souvent partie de la classe II ou IV de BCS, connus pour être faiblement solubles. Le recours aux NEs pour les encapsuler est motivé par la mise à disposition du PA sous forme de nanogouttelettes lipidiques (surface de contact élevée avec les liquides biologiques), en assurant ainsi leur biodisponibilité. Les NEs type H/E sont plus adaptées aux molécules lipophiles, elles ont pour avantage de les encapsuler et de les véhiculer jusqu'à leur site d'absorption, grâce à leur taille nanométrique.

Leur mode de fabrication peut être hautement énergétique, mettant en œuvre des équipements particuliers, ou au contraire des méthodes faiblement énergétiques (émulsification spontanée), mettant à profit les propriétés physicochimiques des composants de la formulation.

L'objectif principal de notre travail est d'obtenir une NE stable ayant le potentiel d'encapsuler des molécules faiblement solubles dans l'eau. Nous avons commencé par une phase de développement consacrée aux essais d'orientation, qui nous ont permis le choix des différents composants. Au cours des essais de formulation, nous avons varié la concentration des différents composants pour étudier les éventuelles influences sur les attributs qualité de notre NE. En effet, lors du criblage, seuls quatre facteurs sont retenus à savoir les rapports T80/PVA, SOR, H/E et H/S.

L'évaluation de l'effet des paramètres opératoires nous a permis de compléter cette étude en appliquant un plan type « Plackett et Burman » avec 5 facteurs lors du criblage, qui sont : le temps requis pour la préparation de la phase organique, la température, le temps du mélange des deux phases, la température du mélange et la vitesse d'agitation. Seuls les quatre premiers facteurs furent déclarés influençant. Ils sont reconduits dans un autre plan de type composite centré cubique.

L'application de la méthodologie de surface de réponse fut d'une grande utilité, puisque nous avons planifié et conduit 90 expériences, réalisées dans des conditions de formulation et de

préparation bien définies. L'analyse statistique conduite par le Logiciel Modde®6, nous a permis de corréler les résultats obtenus aux données de la littérature en sélectionnant d'abord les facteurs les plus sensibles, pour ensuite nous mettre dans des conditions optimales de préparation de la NE. Cette dernière présente toutes les caractéristiques voulues, à savoir une forme transparente, avec une taille avoisinant les 50 nm et un très bon potentiel zêta. De même la turbidité et le pH ne semblent pas moins satisfaisants.

La sélection de la molécule modèle pour les essais *in vivo*, passe par des critères de sélection reposant essentiellement sur la taille moyenne des gouttelettes et du potentiel zêta du système. Le premier critère est justifié par la réussite de la mise à disposition du PA qui est directement liée à la taille des particules (plus elle est petite, plus elle est biodisponible). En effet, l'encapsulation affecte peu les caractéristiques des NEs, excepté la taille des gouttelettes qui varie avec la nature et structure de la molécule encapsulée. En ce qui concerne le deuxième critère, c'est un indicateur de stabilité du système (plus la valeur absolue est élevée, plus le système est stable). Sur trois molécules faiblement solubles, seul le fénofibrate a répondu aux deux critères.

Par ailleurs, les performances *in vivo* de cette NE sont évaluées par gavage chez des rats comparées à une référence commerciale non lipidique. Cette étude nous a permis d'apprécier les résultats satisfaisants de l'influence de la formulation encapsulant le fénofibrate du point de vue lipidique.

La lyophilisation de la NE est très difficile à réaliser à cause de la forte proportion en tensioactif présente dans la formulation en rapport avec le stabilisateur (PVA). L'ajout d'un autre polymère dans la structure permet non seulement de stabiliser le système grâce à son effet épaississant mais aussi permettre sa lyophilisation.

Les techniques de caractérisation telle que la MEB nous a permis de comprendre comment les microsphères d'alginate obtenues se comportent au contact des fluides digestives et libèrent leur contenu médicamenteux. Les profils de dissolution sont étroitement liés à la forme et la structure des microsphères. En effet, l'observation de la structure interne a permis de déceler des nanogouttelettes dispersées au sein du réseau polymérique, rendu poreux par lyophilisation. Cet agencement particulier semble modifier la cinétique de libération du PA encapsulé. La

lyophilisation a permis non seulement de contenir et stabiliser toutes les nanogouttelettes au sein des microsphères avec zéro déperdition de la dose, mais aussi d'obtenir des formes divisées facilement manipulables.

Les microsphères d'alginate de sodium ont alors pour avantage d'avoir deux niveaux de divisions : (i) un système microparticulaire constituant le réseau polymérique, et une (ii) nanoémulsion constituée de nanoparticules lipidiques ancrées dans ce réseau. Elles semblent particulièrement adaptées pour encapsuler des molécules lipophiles comme le fénofibrate et en assurer la libération contrôlée. De plus, leur mise au point ne nécessitent pas d'équipements sophistiqués et repose essentiellement sur le principe de réticulation du polymère par des ions divalents (Ca^{2+}) selon la méthode de gélification ionotropique. Elles se forment instantanément sous l'action d'une simple agitation orbitale en un temps très court.

Cette stratégie est doublement avantageuse et prometteuse, puisqu'elle permet non seulement de stabiliser une forme liquide sous forme sèche mais aussi de moduler la libération du PA encapsulé. L'évaluation des performances des billes *in vitro* a été réalisée afin de vérifier la potentialité d'encapsuler des molécules hydrophobes dans des nanogouttelettes. Les résultats des taux d'encapsulation et de dissolution du fénofibrate laissent envisager la possibilité d'encapsuler d'autres molécules d'intérêt thérapeutique.

Par ailleurs, il y'a corrélation des données de l'évaluation *in vivo* de la NE avec les données de l'évaluation *in vitro* des microsphères chargées, en ce qui concerne le potentiel de mise à disposition de la molécule active en totalité chez le rat et dans les milieux gastrique et intestinal simulés. L'analyse du bilan lipidique (triglycérides et cholestérol) des rats rendus diabétiques avec troubles métaboliques sont encourageants, comparée à la molécule commercialisée. D'autre part, l'étude du comportement des billes dans les milieux gastrique et intestinal simulés indique une libération pH-dépendant et contrôlée. Après hydratation de la matrice en milieu acide, le reste du fénofibrate est libéré en totalité par érosion de la surface et diffusion dans le milieu basique.

La libération du fénofibrate *in vitro* est modulable par un simple changement du mode de séchage (lyophilisation contre un séchage à l'air libre). La lyophilisation est l'option la plus appropriée sous réserve de garantir un conditionnement étanche et à l'abri de l'humidité. En

revanche, le séchage à l'air libre donne des microsphères très dures et laisse apparaître en surface un exsudat d'huile qui les rend difficilement manipulables.

Au cours de notre travail, nous avons montré qu'il était possible d'encapsuler totalement une molécule faiblement soluble dans une nanoémulsion stable et d'en moduler la libération à travers une forme lyophilisée parfaitement poreuse. Les essais *in vivo* et *in vitro* ont été concluants.

En perspective, il serait intéressant de :

- Poursuivre une étude de stabilité des billes séchées dans différentes conditions de conservations ;
- Envisager l'encapsulation d'autres molécules faiblement solubles notamment celles appartenant à la classe IV ;
- Explorer d'autres voies d'administration et d'autres systèmes vecteurs en faisant une étude comparative ;
- Explorer l'effet d'autres polymères tels que la pectine, le chitosan...etc;
- Il serait intéressant de prolonger les essais *in vivo* pour étudier de plus près l'évolution de tout le bilan lipidique y compris le HDLc et le LDLc ;
- Faire une étude histologique du foie et du pancréas pour corréler les données cliniques et histologiques aux données biologiques et mieux visualiser les dommages tissulaires induits par le diabète expérimental et l'effet protecteur du fénofibrate ;
- Procéder à des essais de bioéquivalence en complément des essais *in vivo* ;
- Envisager leur utilisation pour d'autres applications (cosmétique, agroalimentaire) ;
- Faire une étude de stabilité et du comportement rhéologique de la nanoémulsion ;
- Etudier la possibilité d'une transposition d'échelle.

Références bibliographiques

Abang, S., Chan, E.-S., Poncelet, D. (2012). "Effects of process variables on the encapsulation of oil in ca-alginate capsules using an inverse gelation technique." *J. Microencapsul* 29: 417-428.

Abbas, S., Hayat, K., Karangwa, E., Bashari, M., Zhang, X. (2013). "An overview of ultrasound-assisted food-grade nanoemulsions." *Food Eng Rev* 5: 139-157.

Abd-Elsalam, K. A., Khokhlov, A. R. (2015). "Eugenol oil nanoemulsion: antifungal activity against *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* and phytotoxicity on cottonseeds." *Applied Nanoscience* 5(2), 255-265.

Abdelwahed, W., Degobert, G., Stainmesse, S., Fessi, H. (2006). "Freeze-drying of nanoparticles: formulation: process and storage considerations." *Adv. Drug Deliv. Rev.* 58: 1688-1713.

Abismail, B., Canselier, J.P., Wilhelm, A.M., Delmas, H., Gourdon, C. (1999). "Emulsification by ultrasound: drop size distribution and stability." *Ultrason. Sonochem* 6: 75-83.

Aboofazeli, R. (2010). "Nanometric-Scaled Emulsions (Nanoemulsions)." *Iran. J. Pharm. Res.* 9: 325-326.

Acosta, E. (2009). "Bioavailability of nanoparticles in nutrient and nutraceutical delivery." *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 14(1): 3-15.

Aggarwal, P., Hall, J.B., McLeland, C.B., Dobrovolskaia, M.A., McNeil, S.E. (2009). "Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy." *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61: 428-437.

Ahmed, M. A., Ramadan, W., Rambhu, D., Shakeel, F. (2008). "Potential of nanoemulsions for intravenous delivery of rifampicin." *Pharmazie* 63(11): 806-811.

Akbarzadeh, A., Norouzian, D., Mehrabi, MR., Jamshidi, SH., Farhangi, A., Verdi, A., et al. (2007). "Induction of diabetes by streptozotocin in rats." *Indian Journal of Clinical Biochemistry*. 22(2): 60-64.

Al-Edresi S., Baie, S. (2009). "Formulation and stability of whitening VCO-in-water nano-cream." *Int. J. Pharm.* 373: 174-178.

Ali, A. (2016a). "Nanoémulsions d'intérêt pharmaceutique stabilisées par la bêta-lactoglobuline." Ecole Doctorale Innovation thérapeutique : du fondamental à l'appliqué (ITFA), PARIS-SACLAY. Doctorat : Pharmaceutique et biopharmacie: 225.

Ali, A., Mekhloufi, G., Huang, N., Agnely, F. (2016b). "Beta-lactoglobulin stabilized nanemulsions-formulation and process factors affecting droplet size and nanoemulsion stability." *Int. J. Pharm.* 500: 291-304.

Ali, M. S., Alam, M.S., Alam, N., Siddiqui, M.R. (2014). "Preparation, characterization and stability study of dutasteride loaded nanoemulsion for treatment of benign prostatic hypertrophy." *Iran. J. Pharm. Res.* 13: 1125-1140.

Al-Khalifa, A., Mathew, T. C., Al-Zaid, N. S., Mathew, E., & Dashti, H. M. (2009). "Therapeutic role of low-carbohydrate ketogenic diet in diabetes." *Nutrition*, 25(11-12), 1177-1185.

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, Backstory of BCS." *Pharm Res* 12: 413-420.

An, Y., Yan, X., Li, B., Li, Y. (2014). "Microencapsulation of capsanthin by self-emulsifying nanoemulsions and stability evaluation." *European Food Research and Technology* 239: 1077-1085.

Anderson, T., Schein, P.S., McMenamin, M.G., Cooney, DA. (1974). "Streptozotocin Diabetes: Correlation with extent of depression of pancreatic islet nicotinamide adenine dinucleotide." *Journal of clinical investigation.* 54: 672-677.

Ansels, H.C., Allen, L.V. (2005). "Pharmaceutical Dosage forms and drug delivery systems."

ANSM (2014). "Résumé des caractéristiques du produit -LIPANTHYL 160 mg."

ANSM (2020). "Résumé des caractéristiques du produit-Fénofibrate TEVA 300 mg, gélule."
ANSM: 19.

Anton, N., Benoit, J-P., Saulnier, P. (2008). "Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates - A review." *Journal of Controlled Release*: 185-199.

Anton, N., Gayet, P., Benoit, J-P., Saulnier, P. (2007). "Nano-emulsions and nanocapsules by the PIT method: An investigation on the role of the temperature cycling on the emulsion phase inversion." *International Journal of Pharmaceutics* 344(1-2): 44-52.

Anton, N., Vandamme, T.F. (2009). "The universality of low-energy nano-emulsification." *International Journal of Pharmaceutics* 377(1-2): 142-147.

Anuchapreeda, S., F. Y., Okonogi, S., Chikawa, H. (2012). "Preparation of lipid nanoemulsions incorporating curcumin for cancer therapy." *J. Nanotechnol.* 11.

Aranow, R. H., Witten, L. (1963). "Effect of diffusion on interfacial Taylor instability." *Phys. Fluids* 6(4): 535-542.

Araújo, F. A., Kelmann, R. G., Araújo, B. V., Finatto, R. B., Teixeira, H. F., Koester, L. S. (2011). "Development and characterization of parenteral nanoemulsions containing thalidomide." *European Journal of Pharmaceutical Sciences.* 42(3): 238-245.

Asthana, S., Jaiswal, A.K., Gupta, P.K., Pawar, V.K., Dube, A., Chourasia, M.K. (2013). "Immunoadjuvant chemotherapy of visceral leishmaniasis in hamsters using amphotericin B-encapsulated nanoemulsion template-based chitosan nanocapsules." *Antimicrob. Agents Chemother* 57: 1714-1722.

Aulton, M. (2001). "Pharmaceutics: The science of dosage form design." Churchill Livingstone: 704.

Aungst, B. J. (1993). "Novel formulation strategies for improving oral bioavailability of drugs with poor membrane permeation or presystemic metabolism." *J Pharm Sci* 82: 979-987.

Baboota, S., Shakeel, F., Ahuja, A., Ali, J., Shafiq, S. (2007). "Design Development and Evaluation of Novel Nanoemulsions Formulations for Transdermal Potential of Celecoxib." *Acta Pharmaceutica* 8: 316-332.

Baccarin, T., Mitjans, M., Lemos-Senna, E., Vinardell, M.P. (2015). "Protection against oxidative damage in human erythrocytes and preliminary photosafety assessment of Punica granatum seed oil nanoemulsions entrapping polyphenol-rich ethyl acetate fraction." *Toxicol. in Vitro* 30: 421-428.

Bawa, R., Audette, G.F., Reese, B. (2016). "Handbook of Clinical Nanomedicine: Law, Business, Regulation, Safety, and Risk." C. Press, CRC Press.

Belhadj, S., Hentati, O., Elfeki, A., & Hamden, K. (2013). "Inhibitory activities of *Ulva lactuca* polysaccharides on digestive enzymes related to diabetes and obesity." *Archives of physiology and biochemistry* 119(2): 81-87.

Ben Messaoud, G. (2018). "Structuration et contrôle de l'architecture de capsules à cœur liquide à base d'hydrogel d'alginate par association de biopolymères." Université de Lorraine. Thèse de doctorat: 180.

Benichou, A., Aserin, A., Garti, N. (2004). "Double emulsions stabilized with hybrids of natural polymers for entrapment and slow release of active matters." *Advances in Colloid and Interface Science* 108-109: 29-41.

Benoist, D., Tourbier, Y., et al. (1995). "Plans d'expériences : construction et analyse." 700.

Bibette, J., Goutayer, M., Texier-Nogues, I., (2008). "Procédé de préparation de nanoémulsions." EP 2 129 455 B1.

Bogdani, E. "Etude expérimentale et optimisation du procédé de lyophilisation de l'ibuprofène en milieu organique." Ecole doctorale de chimie, Université Claude Bernard Lyon 1. 187.

Borhade, V., Pathak, S., Sharma, S., Patravale, V. (2012). "Clotrimazole nanoemulsion for malaria chemotherapy. Part I: preformulation studies, formulation design and physicochemical evaluation." *Int. J. Pharm.* 431:138-148.

Bordas, F., d'Arsonval, M., (1906). *C. R. Acad. Sci. Paris* 142, 1058 and 1079; 143, 567.

Bouchemal, K., Briançon, S., Perrier, E., Fessi, H. (2004). "Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimisation." *International Journal of Pharmaceutics* 280: 241-251.

Brochette, P. (2013). "Emulsification : élaboration et études des émulsions." *Techniques de l'ingénieur*: J 2150.

Brüsewitz, 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: 173-181.

Burapapadh, K., Kumpugdee-Vollrath, M., Chantasart, D., Sriamornsak, P. (2010). "Fabrication of pectin-based nanoemulsions loaded with itraconazole for pharmaceutical application." *Carbohydr. Polym.* 82: 384-393.

Burapapadh, K., Takeuchi, H., Sriamornsak, P. (2012). "Novel pectin-based nanoparticles prepared from nanoemulsion templates for improving in vitro dissolution and in vivo absorption of poorly water-soluble drug." *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 82: 250-261.

Bussemer, T., Peppas, N. A., Bodmeier, R. (2003). "Evaluation of the swelling, hydration and rupturing properties of the swelling layer of a rupturable pulsatile drug delivery system." *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 56: 261-270.

Campani, V., Biondi, M., Mayola, L., Cilurzo, F., Pitaro, M., De Rosa, G. (2016). "Development of nanoemulsions for topical delivery of vitamin K1." *International Journal of Pharmaceutics* 511: 170-177.

Caude, M., Rosset, R. (1989). "Automatisation de la détermination de l'acide folique dans les produits diététiques par CLHP." *Analisis* 17-(6): 315-318.

21 CFR 610.13, Code of Federal Regulations. (1989).

Chaix, C., Pacard, E., Elaïssari, A., Hilaire, J.F., Pichot, C. (2003). "Surface functionalization of oil-in-water nanoemulsion with a reactive copolymer: colloidal characterization and peptide immobilization." *Coll. Surf. B: Biointerfaces* 29(1): 39-52.

Chan, E.-S. (2011). "Preparation of Ca-alginate beads containing high oil content: Influence of process variables on encapsulation efficiency and bead properties." *Carbohydr. Polym.* 84: 1267-1275.

Chang, Y., McClements, D.J. (2014). "Optimization of orange oil nanoemulsion formation by isothermal low-energy methods: influence of the oil phase, surfactant, and temperature." *J. Agric. Food Chem* 62: 2306-2312.

Chang, Y., McLandsborough, L., McClements, D.J. (2013). "Physicochemical properties and antimicrobial efficacy of carvacrol nanoemulsions formed by spontaneous emulsification." *J. Agric. Food Chem* 61: 8906-8913.

Chang, Y., McLandsborough, L., McClements, D.J. (2012). "Physical properties and antimicrobial efficacy of thyme oil nanoemulsions: influence of ripening inhibitors." *J. Agric. Food Chem* 60: 12056-12063.

Chatterjee, B. (2019). "Targeted drug delivery to the brain via intranasal nanoemulsion: Available proof of concept and existing " International Journal of Pharmaceutics 565(30): 258-268.

Chemat F, G. I., Costes P, Moutoussamy L, Sing ASC, Smadja J. (2004). "High power ultrasound effects on lipid oxidation of refined sunflower oil." Ultrason. Sonochem. 11(5): 281-285.

Chen, C., Han, D., Cai, C., Tang, X. (2010). "An overview of liposome lyophilization and its future potential." J. Control. Release. 142: 299-311.

Chhabra, G., Chuttani, K., Mishra, A.K., Pathak, K. (2011). "Design and development of nanoemulsion drug delivery system of amlodipine besilate for improvement of oral bioavailability." Drug Dev. Ind. Pharm. 37: 907-916.

Ching, S. H., Bansal, N., Bhandari, B. (2017). "Alginate gel particles—A review of production techniques and physical properties." Critical Reviews in Food Science and Nutrition 57(6): 1133-1152.

Chou, Y. J., El-Aasser, M.S., Wanderhoff, J.W. (1980). "Mechanism of emulsification of styrene using hexadecyltrimethylammonium bromide-cetyl alcohol mixtures." J.Dispersion Sci.Technol 1:129-150.

Chu, B.S., Ichikawa, S., Kanafusa, S., Nakajima, M. (2007). "Preparation of protein-stabilized β -carotene nanodispersions by emulsification-evaporation method." Journal of the American Oil Chemists Society 84(11): 1053-1062.

Clark, A. M., Jepson, M.A., Hirst, B.H. (2001). "Exploiting M Cells for Drug and Vaccine Delivery." Advanced Drug Delivery Reviews 50(1-2): 81-106.

Clint, J.H. (1992). "Micelle formation.Chapter 5." Surfactant aggregation: 82-129.

Combrinck, J., Otto, A., du Plessis, J. (2014). "Whey protein/polysaccharide-stabilized emulsions: effect of polymer type and pH on release and topical delivery of salicylic acid." AAPS PharmSciTech: 588-600.

Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. (2011). "Guide for the care and use of laboratory animals", National Institute of Health (US): 246.

Connolly, J. R. (2007). "XRD for Dummies: From Specimen to analyzed sample with minimal math. In Introduction to X-ray Powder Diffraction." 1-9. <http://epswww.unm.edu/xrd/xrdclass/01-XRD-Intro.pdf>

Cook, C. 2007. "La lyophilisation des artefacts archéologiques." Notes de l'ICC 4/2, Institut Canadien de Conservation.

Cortes-Munoz, M., Chevalier-Lucia, D., Dumay, E. (2009). "Characteristics of submicron emulsions prepared by ultra-high pressure homogenisation: effect of chilled or frozen storage." *Food Hydrocolloids* 23: 640-654.

Cunha, S., Pina Costa, C., Loureiro, J.A., Alves, J., Peixoto, A.F., Ben Forbes, B., Lobo, J.M.S., Silva, A.C. (2020). "Double Optimization of Rivastigmine-Loaded Nanostructured Lipid Carriers (NLC) for Nose-to-Brain Delivery Using the Quality by Design (QbD) Approach: Formulation Variables and Instrumental Parameters." *pharmaceutics* 12(7): 1-27.

Dahan, A., Duvdevani, R., Shapiro, I., Elmann, A., Finkelstein, E., Hoffman, A. (2008). "The oral absorption of phospholipid prodrugs: in vivo and in vitro mechanistic investigation of trafficking of a lecithin-valproic acid conjugate following oral administration." *J Control Release* 126: 1-9.

Dai, L., Li, W., Hou, X. (1997). "Effect of the molecular structure of mixed nonionic surfactants on the temperature of miniemulsion formation." *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 125(1): 27-32.

D'Angelo, M., Fioretto, D., Onori, G., Palmieri, L., Santucci, A. (1996). "Dynamics of water-containing sodium bis (2-ethylhexyl) sulfosuccinate (AOT) reverse micelles: A high-frequency dielectric study." *Phys. Rev. E.* 54: 993-996.

Danielsson, I., Lindman, B. (1981). "The definition of micro-emulsion" *Colloids and Surfaces*, Volume 3: 391-392.

Del Gaudio, P., Colombo, P., Colombo, G., Russo, P., Sonvico, F. (2005). "Mechanisms of formation and disintegration of alginate beads obtained by prilling." *Int. J. Pharm.* 302: 1-9.

Del Gaudio, P., Russo, P., Rosaria Lauro, M., Colombo, P., Aquino, R. (2009). "Encapsulation of Ketoprofen and Ketoprofen Lysinate by Prilling for Controlled Drug Release." *AAPS PharmSciTech* 10: 1178-1185.

Delmas, T., Piraux, H.L.N., Couffin, A.C., Texier, I., Vinet, F.O., Poulin, P., Cates, M.E., Bibette, J.R.M. (2011). "How to prepare and stabilize very small nanoemulsions." *Langmuir* 27: 1683-1692.

Delwatta, S.L., Gunatilake, M., Baumans, V., Seneviratne, M.D., Dissanayaka, M.L.B., Batagoda, S.S., Udagedara, A.H., Walpola, P.B. (2018). "Reference values for selected hematological, biochemical and physiological parameters of Sprague-Dawley rats at the Animal House, Faculty of medicine, University of Colombo, Sri Lanka." *Animal models and experimental medicine* 1 (4):250-254.

Desai, N. (2012). "Challenges in development of nanoparticle-based therapeutics." *AAPS J.* 14: 282-295.

Dhamush, K. B., Rao, S., Satyanarayana, M.L. (2012). "Serum insulin levels and lipid profiles of streptozotocin induced diabetic wistar rats." *J. Ind. Vet. Assoc.* 10: 22-26.

Di Maio, S., Carrier, R. L. (2011). "Gastrointestinal contents in fasted state and post-lipid ingestion: In vivo measurements and in vitro models for studying oral drug delivery." *J Control Release*, 151: 110-122.

Dickinson, E. (2003). "Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems." *Food Hydrocoll.* 17(1): 25-39.

Dickinson, E., Leser, ME. (2013). "Food colloids today...understanding structural change during processing, storage, eating and digestion." *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 18(4): 245-248.

Dokoumetzidis, A., Macheras, P. (2006). "A century of dissolution research: From Noyes and Whitney to the Biopharmaceutics Classification System." *Inter. J. Pharm.* : 1-11.

Donsi, F., Annunziata, M., Sessa, M., Ferrari, G. (2011a). "Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods." *LWT Food Sci. Technol.* 44(9): 1908-1914.

Donsi, F., Sessa, M., Ferrari, G. (2011b). "Effect of emulsifier type and disruption chamber geometry on the fabrication of food nanoemulsions by high pressure homogenization." *Ind. Eng. Chem. Res.* 51(22): 7606-7618.

Edwards, K. A., Baeumner, A.J., (2006). "Analysis of liposomes." *Talanta* 68: 1432-1441.

El Kinawy, OS., Petersen, S., Ulrich, J. (2012). "Technological aspects of nanoemulsion formation of low-fat foods enriched with vitamin E by high-pressure homogenization." *Chem. Eng. Technol.* 35(5):937-940.

El-Messery, T.M., Altuntas, U., Gokce Altin, G., Ozçelik, B. (2020). "The effect of spray-drying and freeze-drying on encapsulation efficiency, in vitro bioaccessibility and oxidative stability of krill oil nanoemulsion system." *Food Hydrocolloids* 106: 1-9.

Emanuele, M., Balasubramaniam, B. (2014). "Differential effects of commercial-grade and purified poloxamer 188 on renal function." *Drugs R D*: 73-83.

Erramreddy, V. V., Ghosh, S. (2014). "Influence of emulsifier concentration on nanoemulsion gelation." *Langmuir* 30: 11062-11074.

Esquena, J., Sankar, GR., Solans, C. (2003). "Highly concentrated W/O emulsions prepared by the PIT method as templates for solid foams." *Langmuir* 19(7): 2983-2988.

Etuk, E. (2010). "Animals models for studying diabetes mellitus." *Agric. Biol. J. N. Am.*, 1(2): 130-134.

European Pharmacopeia. (2019). 10^{ème} Edition.

Fanun, M. (2010a). "Microemulsions with Mixed Nonionic Surfactants and Flavor Oil." *Journal of surfactants and detergents; Heidelberg* 13(3): 321-328.

Fanun, M. (2010b). "Properties of microemulsions with mixed non-ionic surfactants and citrus oil." *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp* 382: 226-231.

Fernando, I. P. S., Lee, W.W, Han, E.J., Ahn, G. (2020). "Alginate-based nanomaterials: Fabrication techniques, properties, and applications." *Chemical Engineering Journal* 391: 123823.

Fissore, D., Pisano, R., Barresi, A.A. (2014). "Applying quality-by-design to develop a coffee freeze-drying process." *Journal of Food Engineering* 123: 179-187.

Flanagan, J., Kortegaard, K., Pinder, DN., Rades, T., Singh, H. (2006b). "Solubilisation of soybean oil in microemulsions using various surfactants." *Food Hydrocolloids* 20: 253-260.

Flanagan, J., Singh, H. (2006a). "Microemulsions: a potential delivery system for bioactives in food." *Crit Rev Food Sci Nutr* 46: 221-237.

Florence, A.T., Siepmann, J. (2009). "Modern Pharmaceutics Drug and the pharmaceutical sciences." *I. h. care.* 1.

Forgiarini, A., Esquena, J., Gonzalez, C., Solans, C. (2001). "Formation of nanoemulsions by low-energy emulsification methods at constant temperature." *Langmuir* 17: 2076-2083.

Franks, F. (1998). "Freeze-drying of bioproducts: putting principles into practice." *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 45, 221-229.

Freitas, S., Hielscher, G., Merkle, H.P., Gander, B. (2006). "Continuous contact- and contamination-free ultra-sonic emulsification: a useful tool for pharmaceutical development and production." *Ultrason. Sonochem.* 13 (1):76-85.

Fryd, M. M., Mason T.G. (2011). "Time-dependent nanoemulsion droplet size reduction by evaporative ripening." *J. Phys. Chem. Lett.* 1: 3349-3353.

Gad, S. C. (2008). "Pharmaceutical Manufacturing Handbook Production and Processes." Wiley Interscience: 1384.

Ganachaud, F., Katz, J.L. (2005). "Nanoparticles and nanocapsules created using the Ouzo effect: spontaneous emulsification as an alternative to ultrasonic and high-shear devices." *Chem Phys Chem* 6(2): 209-216.

Ganta, S., Sharma, P., Paxton, J.W., Baguley, B.C., Garg, S. (2010). "Pharmacokinetics and pharmacodynamics of chlorambucil delivered in long-circulating nanoemulsion." *J. Drug Target.* 18: 125-133.

Gao, F., Zhang, Z., Bu, H., Huang, Y., Gao, Z., Shen, J., Zhao, C., Li, Y. (2011). "Nanoemulsion improves the oral absorption of candesartan cilexetil in rats: performance and mechanism." *J. Control. Release* 149: 168-174.

Gasco, M. R., Gallarate, M., Pattarino, F. (1999). "In Vitro Permeation of Azelaic Acid from Viscosized Microemulsions." *International Journal of Pharmaceutics* 69: 193-196.

Gbassi, G. K. (2010). "Aspects physico-chimiques de l'encapsulation et de la désencapsulation des probiotiques." Université de Strasbourg. Doctorat:160.

Ghosh, V., Mukherjee, A., Chandrasekaran, N. (2014). "Eugenol-loaded antimicrobial nanoemulsion preserves fruit juice against, microbial spoilage." 114: 392-397.

Gidley, M.J. (2013). "Hydrocolloids in the digestive tract and related health implications.18(4):." *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*: 371-378.

Goddard, E.D. (2002). "Polymer/surfactant interaction: interfacial aspects." *J. Colloid Interface Sci.* 256(1): 228-235.

Göke, K., Bunjes, H. (2017). "Parameters influencing the course of passive drug loading into lipid nanoemulsions." *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 126: 123-131.

Goupy, J., Creighton, L. (2006). *Introduction Aux Plans D'expériences*. P. Dunod: 82.

Granero, G. E., Ramachandran, C., Amidon, G.L. (2005). "Dissolution and solubility behavior of fenofibrate in sodium lauryl sulfate solutions." *Drug Dev. Ind. Pharm.* 31: 917-922.

Grant, N., Zhang, H., (2011). "Poorly water-soluble drug nanoparticles via an emulsion-freeze-drying approach." *Journal of Colloid and Interface Science* 356 :573-578.

Gupta, S., Chavhan, S., Sawant, K.K. (2011). "Self-nanoemulsifying drug delivery system for adefovir dipivoxil Design, characterization, in vitro and ex vivo evaluation." *Colloids Surf. A Eng. Asp.* 392: 145-155.

Gupta, A., Eral, H.B., Hatton, T.A., Doyle, P.S. (2016). "Nanoemulsions: formation, properties and applications." *Soft matter* 12(11): 2826-2841.

Gursoy, R. N., Benita, S. (2004). "Self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) for improved oral delivery of lipophilic drugs." *Biomed. Pharmacotherap.* 58: 173-182.

Gutiérrez, J. M., González, C., Maestro, A., Solè, I., Pey, C.M., Nolla, J. (2008). "Nanoemulsions: New applications and optimization of their preparation." *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 13: 245-251.

Guttoff, M., Saberi, A.H., McClements, D.J. (2015). "Formation of vitamin D nanoemulsion-based delivery systems by spontaneous emulsification: factors affecting particle size and stability." *Food Chem* 171: 117-122.

Guzey, D., McClements, DJ. (2006). "Formation, stability and properties of multilayer emulsions for application in the food industry." *Adv. Colloid Interface Sci.* 128(130): 227-248.

Hadher, G., Mahdi, B. (2017). "Formulation et caractérisation des microparticules à base de biopolymères." *Université A. Mira, Bejaia*.

Hak, S., Garaiova, Z., Olsen, L.T., Nilsen, A.M., de Lange Davies, C. (2015). "The effects of oil-in-water nanoemulsion polyethylene glycol surface density on intracellular stability, pharmacokinetics, and biodistribution in tumor bearing mice." *Pharm. Res.* 32: 1475-1485.

Hak, S., Helgesen, E., Hektoen, H.H., Huuse, E.M., Jarzyna, P.A., Mulder, W.J., Haraldseth, O., Davies C de L. (2012). "The effect of nanoparticle polyethylene glycol surface density on ligand-directed tumor targeting studied in vivo by dual modality imaging." *ACS Nano*: 5648-5658.

Håkansson, A., Fuchs, L., Innings, F., Revstedt, J., Tragårdh, C., Bergenståhl, B. (2011). "On flow-fields in a high pressure homogenizer and its implication on drop fragmentation." *Procedia Food Sci.* 1(0): 1353-1358.

Hamoudi, M. (2011). "Evaluation d'une forme galénique à base d'alpha cyclodextrine et d'huile végétale pour l'administration par voie orale de molécules actives peu solubles dans l'eau." *Faculté de pharmacie de Châtenay-Malabry Paris-sud 11 Doctorat*: 200.

Hamoudi, M., Fattal, E., Gueutin, C., Nicolas, V., Bochet, A. (2011). "Beads made of cyclodextrin and oil for the oral delivery of lipophilic drugs: In vitro studies in simulated gastro-intestinal fluids." *International Journal of Pharmaceutics* 416: 507-514.

Han, F., Li, S., Yin, R., Liu, H., Xu, L. (2008). "Effect of surfactants on the formation and characterization of a new type of colloidal drug delivery system: Nanostructured lipid carriers." *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects.* 315(1-3): 210-216.

Hansali, F. (2012). "Synthèse par polymérisation en miniémulsion et caractérisation physico-chimique de nanoparticule de n-butyl cyanoacrylate pour la libération d'un principe actif modèle." *chimie, Oran Doctorat*: 163.

Hasenhuettl, G., Hartel, RW. (2008). "Food Emulsifiers and Their Applications." *Springer. Sci.* 2.

Hayashi, K., Kojima, R., Ito, M. (2006). "Strain differences in the diabetogenic activity of streptozotocin in mice." *Biol. Pharm. Bull.* 29: 1110-1119.

He, W., Tan, Y., Tian, Z., Chen, L., Hu, F., Wu, W. (2011). "Food protein-stabilized nanoemulsions as potential delivery systems for poorly water-soluble drugs: preparation, in vitro characterization, and pharmacokinetics in rats." *Int. J. Nanomedicine* 6: 521-533.

Hoar, T. P., Schulman, J.H. (1943). "Transparent water in oil dispersions: oleopathic hydro-micelle." *Nature* 152: 102-103.

Hofsäss M.A., Souza, J.de., Silva-Barcellos, N.M., Bellavinha, K.R., Abrahamsson, B., Cristofolletti, R., Groot, D.W., Parr, A., Langguth, P., Polli, J.E., Shah, V.P., Tajiri, T., Mehta, M.U., Dressman, J. B. (2017). "Biowaiver Monographs for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms: Folic Acid." *Journal of Pharmaceutical Sciences* 106(12): 3421-3430.

<http://patentstorm.us>.

<http://www.pharmacast.com>

<https://go.drugbank.com/>

Hu, Q., Gerhard, H., Upadhyaya, I., Venkitanarayanan, K., Luo, Y. (2016). "Antimicrobial eugenol nanoemulsion prepared by gum arabic and lecithin and evaluation of drying technologies." *International Journal of Biological Macromolecules* 87: 130-140.

Hutin, A. (2019). "Application notes-Theory: 3.Detergency»

Hwang, S. J., Rhee, G.J., Lee, K.M., Oh, K.H., Kim, C.K. (1995). "Release characteristics of ibuprofen from excipient-loaded alginate gel beads." *International Journal of Pharmaceutics* 116(1): 125-128.

Iams, S. G., Wexler, B.C. (1977). "Alloxan diabetes in spontaneously hypertensive rats; Gravimetric, metabolic and histopathological alterations." *Br.J.Exp.Pathol.*, 58: 177-199.

ICH thème Q6A, Spécifications : Méthodes analytiques et critères d'approbation pour les nouvelles substances médicamenteuses et les nouveaux produits pharmaceutiques : substances chimiques. (2016). 49 p.

ICH theme Q8 (R2), Pharmaceutical development (2009). 29 p.

Ingvarsson, P.T., Yang, M., Nielsen, H.M., Rantanen, J., Foged, C. (2011). "Stabilization of liposomes during drying." *Expert Opin. Drug Deliv.* 8: 375-388.

International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC). (1972) "Manual of Colloid Science." London: Butterworth.

Izquierdo, P., Esquena, J., Tadros, T.F., Dederen, J.C., Feng, J., Garcia-Celma, M.J., Azemar, N., Solans, C. (2004). "Phase behavior and nano-emulsion formation by the phase inversion temperature method." *Langmuir* 20: 6594-6598.

Izquierdo, P., Feng, J., Esquena, J., Tadros, T.F., Dederen, J.C., Garcia, M.J., Azemar, N., Solans, C. (2005). "The influence of surfactant mixing ratio on nano-emulsion formation by the pit method." *J. Colloid Interface Sci.* 285: 388-394.

Jadhav, C., Kate, V., Payghan, S.A. (2015). "Investigation of effect of non-ionic surfactant on preparation of griseofulvin non-aqueous nanoemulsion." *J. Nanostruct. Chem.* 5: 107-113.

Jafari, S. M., He, Y., Bhandari, B. (2007). "Optimization of nano-emulsions production by microfluidization." *European Food Research and Technology* 225: 733-741.

Jafari, S., Assadpoor, E., He, Y., Bhandari, B. (2008). "Re-coalescence of emulsion droplets during high-energy emulsification." *Food Hydrocoll.* 22(7): 1191-1202.

Jenkins, D. J., Jenkins, A.L., Wolever, T.M., Vuksan, V., Rao, A.V., Thompson, L.U., Josse, R.G. (1995). "Effect of reduced rate of carbohydrate absorption on carbohydrate and lipide metabolism." *Eur.J.Clin.Nutr* 49: S68-S73.

Jiang, S.-P., He, S.-N., Li, Y.-L., Feng, D.-L., Lu, X.-Y., Du, Y.-Z., Yu, H.-Y., Hu, F.-Q., Yuan, H. (2013). "Preparation and characteristics of lipid nanoemulsion formulations loaded with doxorubicin." *Int. J. Nanomedicine* 8: 3141-3150.

Jo, Y.-J., Kwon, Y.-J. (2014). "Characterization of β -carotene nanoemulsions prepared by microfluidization technique." *Food Sci. Biotechnol.* 23: 107-113.

Jönsson, B., Lindman, B., Holmberg, K. (1998). *Surfactants and Polymers in Aqueous Solution* J. Wiley&Sons: 450.

Jonsson, B. L., Holmberg, K., Kronberg, B. (1999). "Behaviour of concentrated surfactant systems. Chapter 3." *Surfactants and Polymers in Aqueous Solution*. J. Wiley&Sons: 61-89.

Jordanovska, S. (2015). "Les nanoparticules dans l'industrie pharmaceutique: comparaison des méthodes de fabrication." Doctorat: U.F.R. Des sciences pharmaceutiques, Université de Bordeaux. p. 61.

Kakkar, A. (1995). "Characterization of ibuprofen loaded microcapsules prepared by ionotropic gelation." *Indian J. Pharm. Sci.* 57: 56-60.

Kakumanu, S., Tagne, J.B., Wilson, T.A., Nicolosi, R.J. (2011). "A nanoemulsion formulation of dacarbazine reduces tumor size in a xenograft mouse epidermoid carcinoma model compared to dacarbazine suspension." *Nanomedicine* 7: 277-283.

Kale, S. N., Deore, S.L. (2017). "Emulsion Micro Emulsion and Nano Emulsion: A Review." *Systematic Reviews in Pharmacy*: 39-47.

Kanaan, G. (2007). "Conception, modélisation et optimisation d'un procédé continu d'élaboration d'une dispersion stabilisée de particules de polystyrène dans un polyéther polyol." Institut national polytechnique de Lorraine, Université de Nancy. Doctorat: 189.

Kansal, S., Tandon, R., Dwivedi, P., Misra, P., Verma, P.R., Dube, A., Mishra, P.R. (2012). "Development of nanocapsules bearing doxorubicin for macrophage targeting through the phosphatidylserine ligand: a system for intervention in visceral leishmaniasis." *J. Antimicrob. Chemother.* 67: 2650-2660.

Katouzian, I., Jafari, S.M. (2016). "Nano-encapsulation as a promising approach for targeted delivery and controlled release of vitamins." *Trends in Food Science and Technology* 53: 34-48.

Kelmann, R., Kuminek, G., Teixeira, H., Koester, L.S. (2007). "Carbamazepine parenteral nanoemulsions prepared by spontaneous emulsification process." *International Journal of Pharmaceutics* 342(1-2): 231-239.

Kentish, S., Wooster, T.J., Ashokkumar, M., Balachandran, S., Mawson, R., Simons, L. (2008). "The use of ultrasonics for nanoemulsion preparation." *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 9(2):170-175.

Kevadiya, B. B., M.; Zhang, L.; Anovadiya, A.; Brahmabhatt, H.; Paul, P.; Tripathi, C. (2018). "Fenofibrate Nanocrystals Embedded in Oral Strip-Films for Bioavailability Enhancement." *Bioengineering* 5(16).

Khan, A., Talegaonkar, S., Iqbal, Z., Ahmed, F.J., Khar, R.K., (2006). "Multiple emulsions: an overview." *Curr Drug deliv.* 3(4): 429-443.

Khandavilli, S., Panchagnula, R., (2007). "Nanoemulsions as versatile formulations for paclitaxel delivery: peroral and dermal delivery studies in rats." *J. Investig. Dermatol.* 127: 154-162.

Kislukhin, A. A., Xu, H., Adams, S.R., Narsinh, K.H., Tsien, R.Y., Ahrens, E.T. (2016). "Paramagnetic fluorinated nanoemulsions for sensitive cellular fluorine-19 magnetic resonance imaging." *Nat. Mater.* 15 662-668.

Klang, V., Valenta, C. (2011). "Lecithin-based nanoemulsions." *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 21: 55-76.

Komaiko, J. S., McClements, D.J. (2016). "Formation of Food-Grade Nanoemulsions Using Low-Energy Preparation Methods: A Review of Available Methods." *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety.* 15: 331-352.

Komaiko, J., McClements, D.J. (2014). "Optimization of isothermal low-energy nanoemulsion formation: hydrocarbon oil, non-ionic surfactant, and water systems." *J. Colloid Interface Sci.* 425: 59-66.

Komaiko, J., McClements, D.J. (2015b). "Food-grade nanoemulsion filled hydrogels formed by spontaneous emulsification and gelation: optical properties, rheology, and stability." *Food Hydrocolloids* 46: 67-75.

Komaiko, J., McClements, D.J., (2015a). "Low-energy formation of edible nanoemulsions by spontaneous emulsification: Factors influencing particle size." *Journal of Food Engineering* 146: 122-128.

Koroleva, M., Yurtov, EV. (2012). "Nanoemulsions: the proper-ties, methods of preparation and promising applications." *Russian Chem Rev* 81: 21-43.

Krishnakumar, K., Augusti, K.T., Vijayammal, P.L. (1999). "Hypoglycaemic and anti-oxidant activity of *Salacia oblonga* Wall.extract in streptozotocin-induced diabetic rats." *Indian J. Physiol. Pharmacol.* 43: 510-514.

Kriwet, K., Muller-Goymann, C.C. (1995). "Diclofenac Re-lease from Phospholipid Drug Systems and Permeation through Excised Human Stratum Corneum." *International Journal of Pharmaceutics* 125(2): 231-242.

Ktistis, G., Niopas, I. (1998). "A Study on the In-Vitro Percutaneous Absorption of Propranolol from Disperse Systems." *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 50: 413-418.

Kuhn, D. A., Vanhecke, D., Michen, B., Blank, F., Gehr, P., Petri-Fink, A., Rothen Rutishauser, B. (2014). "Different endocytotic uptake mechanisms for nanoparticles in epithelial cells and macrophages." *Beilstein J. Nanotechnol.* : 51625-51636.

Kumar, M., Misra, A., Babbar, A.K., Mishra, A.K., Pathak, K. (2008). "Intranasal Nanoemulsion Based Brain Targeting Drug Delivery System of Risperidone." *International Journal of Pharmaceutics* 358(1-2): 285-291.

Lavaud, C. (2013). "Traitement d'effluents aqueux par complexation en milieu micellaire et précipitation par voie sol-gel." Université Montpellier II - Sciences et Techniques du Languedoc. Doctorat : Chimie-Physique. 255.

Leal-Calderon, F., Schmitt, V., Bibette, J. (2007). "Emulsion Science Basic Principles." Springer: 236.

Lee, L., Norton, IT. (2013). "Comparing droplet breakup for a high-pressure valve homogeniser and a microflu-idizer for the potential production of food-grade nanoemulsions." *J. Food Eng.* 114(2): 158-163.

Lee, M.K., Kim, M.Y., Kim, S., Lee, J. (2009). "Cryoprotectants for freeze drying of drug nano-suspensions: effect of freezing rate." *J. Pharm. Sci.* 98: 4808-4817.

Lee, S.J., McClements, D.J. (2010). "Fabrication of protein-stabilized nanoemulsions using a combined homogenization and amphiphilic solvent dissolution/evaporation approach." *Food Hydrocoll.* 24: 560-569.

Leong, T., Wooster, TJ. , Kentish, SE., Ashokkumar, M. (2009). "Minimising oil droplet size using ultrasonic emulsification." *Ultrason Sonochem* 16: 721-727.

Lepadatu, D. (2006). "Optimisation des procédés de mise en forme par approche couplée plans d'expériences, éléments finis et surface de réponse." Ecole doctorale d'Angers, Angers. Doctorat: 218.

Leser, M., Sagalowicz, L., Michel, M., Watzke, HJ. (2006). "Self-assembly of polar food lipids." *Adv Colloid Interface Sci* 123-126: 125-136.

Li, F., Wang, T., He, H.B., Tang, X. (2008). "The properties of bufadienolides-loaded nano-emulsion and submicro-emulsion during lyophilization." *Int. J. Pharm.* 349: 291-299.

Li, X., Anton, N., Ta, T.M.C., Zhao, M., N. Messaddeq, N., Vandamme, T.F. (2011a). "Microencapsulation of Nano-emulsions: Novel Trojan Particles for Bioactive Lipid Molecule Delivery." *International Journal of Nanomedicine* (6): 1313-1325.

Li, X., Deng, X., Yuan, M., Xiong, C., Huang, Z., Zhang, Y., Jia, W. (1999). "Investigation on Process Parameters Involved in Preparation of poly-DL-lactide-poly (ethylene Glycol) Microspheres Containing *Leptospira Interrogans* Antigens." *International Journal of Pharmaceutics* 178(2): 245-255.

Li, X., Du, L., Wang, C., Liu, Y., Mei, X., Jin, Y. (2011b). "Highly efficient and lowly toxic docetaxel nanoemulsions for intravenous injection to animals." *Pharmazie* 66: 479-483.

Li, X., Qi, J., Xie, Y., Zhang, X., Hu, S., Xu, Y., Lu, Y., Wu, W. (2013). "Nanoemulsions coated with alginate/chitosan as oral insulin delivery systems: preparation, characterization, and hypoglycemic effect in rats." *Int. J. Nanomedicine* 23-32.

Li, Y., Hu, M., Du, Y., Xiao, H., McClements, D.J. (2011). "Control of lipase digestibility of emulsified lipids by encapsulation within calcium alginate beads." *Food Hydrocoll.* 25: 122-130.

Li, Y., Hu, M., Xiao, H., Du, Y., Decker, E.A., McClements, D.J. (2010). "Controlling the functional performance of emulsion-based delivery systems using multi-component biopolymer coatings." *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 76(1): 38-47.

Li, Y., Zheng, J., Xiao, H., McClements, DJ. (2012). "Nanoemulsion-based delivery systems for poorly water-soluble bioactive compounds: influence of formulation parameters on polymethoxyflavone crystallization." *Food Hydrocoll.* 27(2):517-528.

Liang, R., Shoemaker, CF., Yang, X., Zhong, F., Huang, Q. (2013). "Stability and bioaccessibility of β -carotene in nanoemulsions stabilized by modified starches." *J. Agric. Food Chem* 61(6):1249-1257.

Liang, R., Xu, S., Shoemaker, CF., Li, Y., Zhong, F., Huang, Q. (2012). "Physical and antimicrobial properties of peppermint oil nanoemulsions." *J. Agric. Food Chem* 60(30): 7548-7555.

Lim, S. S., Baik, M. Y., Decker, E. A., Henson, L., Michael Popplewell, L., McClements, D. J., & Choi, S. J. (2011). "Stabilization of orange oil-in-water emulsions: A new role for ester gum as an Ostwald ripening inhibitor." *Food Chemistry*, 128(4), 1023-1028.

Lin, C., Lin, HY. , Chen, HC., Yu, MW., Lee, MH. (2009). "Stability and characterisation of phospholipid-based curcumin-encapsulated microemulsions." *Food Chem* 16: 923-928.

Lin, Y., Böker, A., Skaff, H., Cookson, D., Dinsmore, A.D., Emrick, T., Russell, T.P. (2005). "Nanoparticle Assembly at Fluid Interfaces: Structure and Dynamics." *Langmuir* 21(1): 191-194.

Lindenberg, M., Kopp, S., Dressman, J.B. (2004). "Classification of orally administered drugs on the World Health Organization Model list of Essential Medicines according to the biopharmaceutics classification system." *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 58: 265-278.

Liu, S., Sun, C., Xue, Y., Gao, Y. (2016). "Impact of pH, freeze-thaw and thermal sterilization on physicochemical stability of walnut beverage emulsion." *Food Chem* 196: 475-485.

Liu, W., Sun, D., Li, C., Liu, Q., Xu, J. (2006). "Formation and stability of paraffin oil-in-water nano-emulsions prepared by the emulsion inversion point method." *J. Colloid Interface Sci.* 303(2): 557-563.

Lohith Kumar, D. H., Sarkar, P. (2018). "Encapsulation of bioactive compounds using nanoemulsions." *Environmental chemistry letters*: 59-70.

Lovelyn, C., Attama, A. A. (2011). "Current State of Nanoemulsions in Drug Delivery." *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*: 626-639.

Luo, Y., Chen, D., Ren, L., Zhao, X., & Qin, J. (2006). "Solid lipid nanoparticles for enhancing vinpocetine's oral bioavailability." *Journal of Controlled Release*, 114(1): 53-59.

Luykx, D.M.A.M., Peters, R.J.B., van Ruth, S.M., Bouwmeester, H. (2008). "A review of analytical methods for the identification and characterization of nano delivery systems in food." *J. Agr, Food Chem.* 56: 8231-8247.

Maher, P. G., Fenelon, M.A., Zhou, Y., Kamrul Haque, M., Roos, Y.H. (2011). "Optimization of beta-casein stabilized nanoemulsions using experimental mixture design." *J. Food Sci.* 76: C1108-C1117.

Mannhold, E.R., Kubinyi, H., Folkers, G. (2002). "Methods and Principles in Medicinal Chemistry." John Wiley and Sons. p. 462.

Mansour, H. M., Rhee, Y.S., Xiao, W. (2009). "Nanomedicine in Pulmonary Delivery." *International Journal of Nano-medicine* 4: 299-319.

Maqsood, A., Zaman, F., Tanveer, S., Zabta, M. (2008). "Antidiabetic and Hypolipidemic Effects of Aqueous Methanolic Extract of *Acacia Nilotica* Pods in Alloxan-Induced Diabetic Rabbits." *Scand. J. Lab. Anim. Sci.* 35(1): 29-34.

Maranhao, R. C., Graziani, S.R., Yamaguchi, N., Melo, R.F., Latrilha, M.C., Rodrigues, D.G., Couto, R.D., Schreier, S., Buzaid, A.C. (2002). "Association of carmustine with a lipid emulsion: in vitro, in vivo and preliminary studies in cancer patients." *Cancer Chemother.Pharmacol.* 49: 487-498.

Maranhao, R. C., Roland, I.A., Toffoletto, O., Ramires, J.A., Goncalves, R.P., Mesquita, C.H., Pileggi, F. (1997). "Plasma kinetic behavior in hyperlipidemic subjects of a lipidic microemulsion that binds to low density lipoprotein receptors." *Lipids* 32: 627-633.

Marieb, E.N. (1999). "Anatomie et physiologie humaines." 4ème Edition du renouveau pédagogique, inc. Canada: 618.

Marin, M., René, F. (2012). "Lyophilisation." *Techniques de l'ingénieur.* 9.

Mason, T. G., Graves, S.M., Wilking, J.N., Lin, M.Y. (2006b). "Extreme emulsification: formation and structure of nanoemulsions." *Condensed Matter Physics:* 193-199.

Mason, T. G., Wilking, J.N., Meleson, K., Chang, C.B., Graves, S.M. (2006a). "Nanoemulsions: formation, structure, and physical properties." *Journal of physics: condensed matter* 18: R635-R666.

Mayer, S., Weiss, J., McClements, D.J. (2013). "Vitamin E-enriched nanoemulsions formed by emulsion phase inversion: Factors influencing droplet size and stability." *Journal of Colloid and Interface Science* 402: 122-130.

McClements, D.J. (2011a). "Edible nanoemulsions: fabrication, properties, and functional performance." *Soft Matter* 7 (6): 2297-2316.

McClements, D.J., Rao, J. (2011b). "Food-grade nanoemulsions: formulation, fabrication, properties, performance, biological fate, and potential toxicity." *Crit Rev Food Sci Nutr.* 51(4): 285-330.

McClements, D.J. (2002a). "Colloidal basis of emulsion color." *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 7(5-6): 451-455.

McClements, D.J. (2002b). "Lipid-Based Emulsions and Emulsifiers." *Food Lipids.* CRC Press.

McClements, D.J. (2005b). "Theoretical analysis of factors affecting the formation and stability of multilayered colloidal dispersions." *Langmuir* 21(21): 9777-9785.

McClements, D.J. (2010). "Emulsion design to improve the delivery of functional lipophilic components." *Ann. Rev. Food Sci. Technol.* 1(1): 241-269.

McClements, D.J. (2012). "Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities." *Soft matter* 8: 1719-1729.

McClements, D., Zou, L., Zhang, R., Salvia-Trujillo, L., Kumosani, T., Xiao, H. (2015). "Enhancing nutraceutical performance using excipient foods: designing food structures and compositions to increase bioavailability." *Compr.Rev. Food Sci. Food Saf.* 14(6): 824-847.

McClements, D.J. (2000). "Isothermal titration calorimetry study of pectin - ionic surfactant interactions." *J. Agric. Food Chem.* 48:5604-5611.

McClements, D.J., Decker, E.A., Weiss, J. (2007). "Emulsion-Based Delivery Systems for Lipophilic Bioactive Components." *Journal of food science* 72(8): 109-124.

McClements, D.J., Xiao, H. (2012). "Potential biological fate of ingested nanoemulsions: influence of particle characteristics." *Food Funct.* 3: 202-220.

McClements, D.J., Zou, L., Zhang, R., Salvia-Trujillo, L., Kumosani, T., Xiao, H. (2005a). "Food emulsions: principles, practice, and techniques." F. C. P. Boca Raton.

Mehnert, W., Mader, K. (2001). "Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications." *Adv Drug Deliv Rev* 47: 165-196.

Mehta, R. C., Thanoo, B.C., Deluca, P.P. (1996). "Peptide containing microspheres from low molecular weight and hydrophilic poly (d, l-lactide-co-glycolide)." *Journal of Controlled release* 41: 249-257.

Merakchi, A. (2012). "Etude de la formulation d'un principe actif (la metformine) dans des polymères biodégradables." Université A.Mira.

Mirkovic, D., Ibric, S., Balanc, B., Knez, Z., Bugarski, B. (2017). "Evaluation of the impact of critical quality attributes and critical process parameters on quality and stability of parenteral nutrition nanoemulsions." *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 39: 341-347.

Mishra, B., Patel, B. B., Tiwari, S. (2010). "Colloidal nanocarriers: a review on formulation technology, types and applications toward targeted drug delivery." *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 6(1): 9-24.

Mistry, A., Stolnik, S., Illum, L. (2009). "Nanoparticles for Direct Nose-to-Brain Delivery of Drugs." *International Journal of Pharmaceutics* 379(1): 146-157.

Mohammady, M., Mohammadi, Y., Yousefi, G. (2020). "Freeze-drying of pharmaceutical and nutraceutical nanoparticles: the effects of formulation and technique parameters on nanoparticles characteristics." *Journal of Pharmaceutical Sciences*: 1-13.

Mollet, H., Grubenmann, A. (2001). "Emulsions, properties and production. Chapter 2" *Formulation technology, emulsions, suspensions, solid forms*. Wiley VCH: 59-104.

Montenegro, L., Lai, F., Offerta, A., Sarpietro, M.G., Micicche, L., Maccioni, A.M., Valenti, D., Fadda, A.M. (2016). "From nanoemulsions to nanostructured lipid carriers: A relevant development in dermal delivery of drugs and cosmetics." *Journal of Drug Delivery Science and Technology*: 100-112.

Mora-Huertas, C. E., Fessi, H., Elaissari, A. (2011). "Influence of process and formulation parameters on the formation of submicron particles by solvent displacement and emulsification diffusion methods: critical comparison." *Adv. Colloid Inter-face Sci.* 163(2): 90-122.

Morais Diane, J. M., Burgess, J. (2014). "Vitamin E nanoemulsions characterization and analysis." *Int. J. Pharm.* 465: 455-463.

Mostafa, D. M., Abd El-Alim, S.H., Hasanin Asfour, M., Youssef Al-Okbi, S., Mohamed, D.A., Awad, G. (2015). "Transdermal nanoemulsions of *Foeniculum vulgare* Mill. essential oil: Preparation, characterization and evaluation of antidiabetic potential." *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 29: 99-106.

Mou, D., Chen, H., Du, D., Mao, C., Wan, J., Xu, H., Yang, X. (2008). "Hydrogel-thickened nanoemulsion system for topical delivery of lipophilic drugs." *International Journal of Pharmaceutics* 353(1-2): 270-276.

Moussa, O. (2019). "Etude, par diagnostics optiques, des conditions menant à la micro-explosion d'une goutte d'émulsion eau/huile". Ecole doctorale N° 602, Sciences pour l'Ingénieur, Université de Nantes. Doctorat : Energétique, Thermique, Combustion. 160.

Mulik, R.S., Mönkkönen, J., Juvonen, R.O., Mahadik, K.R., Paradkar, A.R. (2010). "Transferrin mediated solid lipid nanoparticles containing curcumin: enhanced in vitro anticancer activity by induction of apoptosis." *Int. J. Pharm.* 398:190-203.

Müller, R. H., Schmidt, S., Buttle, I., and al. (2004). "SolEmuls® enovel technology for the formulation of i.v. emulsions with poorly soluble drugs." *Int. J. Pharm.* 269: 293-302.

Nakajima, H., Solans, C., Konieda, H. (1997). "Industrial Applications of Microemulsions." N. Y. Marcel Dekker.

Nakajima, H., Tomomossa, S., Okabe, M. (1993). "First Emulsion Conference." Paris, France.

Nam, Y. S., Kim, J.W, Shim, J., Han, S.H., Kim, H.K. (2010). "Nanosized emulsions stabilized by semisolid polymer interphase." *Langmuir* 26: 13038-13043.

Nguyen, T.T.L. (2017). "Extrusion- spheronization of pharmaceutical products: system for the delivery of active ingredients which are poorly soluble by oral route." Ecole doctorale des sciences chimiques, Université de Strasbourg. Doctorat: 163.

Nicolet, T. (2001). " Introduction to Fourier Transform Infrared Spectrometry." <http://mmrc.caltech.edu/FTIR/FTIRintro.pdf>.

Obeid, L. (2015). "Synthèse et caractérisation de matériaux magnétiques pour l'adsorption de polluants présents dans les eaux." Université Pierre et Marie Curie. Thèse de doctorat : 245.

Olivier, J.-C. (2005). "Drug Transport to Brain With Targeted Nanoparticles." *Journal of The American Society for Experimental Neurotherapeutics* 2(1): 108-119.

Olla, M., Monduzzi, M., Ambrosone, L. (1999). "From nanoemulsions to nanostructured lipid carriers: a relevant development in dermal delivery of drugs and cosmetics." *Colloid Surf. A* 160:23-36.

O'Neil, M.J., Smith, A., Budavari, S. (2001). "The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals." Merck & Co Inc. 13th Edition.

Orive, G., Hernández, R.M., Gascón, A.R., Domínguez-Gil, A., Pedraz, J.L. (2003). « Drug delivery in biotechnology: present and future. » *Current Opinion in Biotechnology*. 14 (6): 659 -664.

Orr, M.T., Kramer, R.M., Barnes, L.V., Dowling, Q.M., Desbien, A.L., Beebe, E.A., Laurance, J.D., Fox, C.B., Reed, S.G., Coler, R.N., Vedvick, T.S. (2014). "Elimination of the cold-chain dependence of a nanoemulsion adjuvanted vaccine against tuberculosis by lyophilization". *J. Control. Release*. 177: 20-26.

Ostertag, F., Weiss, J., McClements, D.J. (2012). "Low-energy formation of edible nanoemulsions: factors influencing droplet size produced by emulsion phase inversion." *J. Colloid Interface Sci.* 388(1): 95-102.

Ozturk, B., Argin, S., Ozilgen, M., McClements, DJ. (2015). "Formation and stabilization of nanoemulsion-based vitamin e delivery systems using natural biopolymers: whey protein isolate and gum arabic." *Food Chem* 188: 256-263.

Parthasarathi, S., Anandharamakrishnan, C. (2016). "Enhancement of oral bioavailability of vitamin E by spray-freeze drying of whey protein microcapsules ." *Food and Bioproducts Processing.* 100: 469-476.

Patel, N., Schmid, U., Lawrence, M.J., (2006). "Phospholipid-based microemulsions suitable for use in foods." *J Agric Food Chem* 54: 7817-7824.

Patel, R., Patel, K.P. (2010). "Advances in Novel Parenteral Drug Delivery Systems." *Asian Journal of Pharmaceutics* 4(3): 193-199.

Pawar, V. K., Panchal, S.B., Singh, Y., Meher, J.G., Sharma, K., Singh, P., Bora, H.K., Singh, A., Datta, D., Chourasia, M.K. (2014). "Immunotherapeutic vitamin E nanoemulsion synergies the antiproliferative activity of paclitaxel in breast cancer cells via modulating Th1 and Th2 immune response." *J. Control. Release* 196: 295-306.

Pellegrino, T. C., Bayer, B.M. (1998). "Modulation of immune cell function following fluoxetine administration in rats." *Pharmacol. Biochem. Behav.* 59: 151-157.

Pérez-Mosqueda, L. M., et al. (2015). "Formulation and optimization by experimental design of eco-friendly emulsions based on d-limonene." *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 128: 127-131.

Persson A.M., N. R. G., Hansson G.I., Löfgren L.J., Libäck F., Knutson L., Abrahamsson B., Lennernäs H. (2006). "A clinical single-pass perfusion investigation of the dynamic in vivo secretory response to a dietary meal in human proximal small intestine." *Pharm. Res.* 23: 742-751.

Pey, C., Maestro, A., Sole, I., Gonzalez, C., Solans, C., Gutierrez, J.M. (2006). "Optimization of nano-emulsions prepared by low-energy emulsification methods at constant temperature using a facto-rial design study." *Colloid Surf A Physicochem Eng Asp* 288: 144-150.

Piorkowski, D., McClements, DJ. (2014). "Beverage emulsions: recent developments in formulation, production, and applications." *Food Hydrocolloids* 42: 5-41.

Polychniatou, V., Tzia, C. (2014). "Study of formulation and stability of co-surfactant free water-in-olive oil nano- and submicron emulsions with food grade non-ionic surfactants." *J. Am. Oil Chem. Soc.* 91: 79-88.

Poncelet, D., Dreffier, C. (2007). "Les méthodes de microencapsulation de A à Z (ou presque)." *Microencapsulation: Des Sciences Aux Technologies* : 23-33.

Porod, G., Glatter, O., and Kratky, O. (1982). "Small angle X-ray scattering." Academic Press: 17-51.

Porras, M., Solans, C., González, C., Gutiérrez, J.M. (2008). "Properties of water-in-oil (W/O) nano-emulsions prepared by a low-energy emulsification method." *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 324(1-3): 181-188.

Porter, C. J. H., Pouton, C. W., Cuine, J. F. and Charman, W.N. (2008). "Enhancing intestinal drug solubilisation using lipid-based delivery systems." *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60: 673-691.

Porter, C. J., Trevaskis, N.L., Charman, W.N. (2007). "Lipids and lipid-based formulations: optimizing the oral delivery of lipophilic drugs." *Nat. Rev. Drug Discov.* : 231-248.

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: 47-58.

Povoski, SP., McCullough, PJ., Zhou, W., Bell, R.H. (1993). "Induction of diabetes mellitus in Syrian Golden Hamster using stored equilibrium solutions of streptozotocin." *American association for laboratory animal science.* 43(4): 310-314.

Preetz, C., Hauser, A., Hause, G., Kramer, A., & Mäder, K. (2010). "Application of atomic force microscopy and ultrasonic resonator technology on nanoscale: Distinction of nanoemulsions from nanocapsules." *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 39(1-3), 141-151.

Pribac, G., Craciun, C., Szoke-Nagy, T., Simeoni, I., Lang, C., Rosioru, C., et al. (2007). "Comparative ultrastructural study of pancreatic beta cells from diabetic rats treated with fenugreek seed flour or ganoderma." *Annals of RSCB.* XVI (1): 62-80.

Prokhorov, D. I., Sariev, A.K., Abramov, D.A., Voronina, T.A., Kapitsa, I.G., Zhuravko, A.S., Shiriaeva, M.V., Kaplun, A.P., Seifulla, R.D. (2014). "Experimental Investigation of Pharmacodynamics and Pharmacokinetics of Carbamazepine Nanoemulsion." *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 157: 742-746.

Qadir, A., Faiyazuddin, M.D., Hussain, T., Alshammari, T.A.; Shakeel, F. (2016). "Critical steps and energetics involved in a successful development of a stable nanoemulsion." *Journal of Molecular Liquids*: 7-18.

Qian, C., Decker, E. A., Xiao, H., & McClements, D. J. (2012). "Nanoemulsion delivery systems: influence of carrier oil on β -carotene bioaccessibility." *Food Chem.* 135(3): 1440-1447.

Qian, C., McClements, D.J. (2011). "Formation of nanoemulsions stabilized by model food-grade emulsifiers using high-pressure homogenization: factors affecting particle size." *Food Hydrocolloids* 25(5): 1000-1008.

Ragelle, H., Crauste-Manciet, S., Seguin, J., Brossard, D., Scherman, D., Arnaud, P., Chabot, G.G. (2012). "Nanoemulsion formulation of fisetin improves bioavailability and antitumour activity in mice." *Int. J. Pharm.* 427:452-459.

Ramreddy S., Kandadi, P., Veerabrahma K. (2012). "Formulation and pharmacokinetics of diclofenac lipid nanoemulsions for parenteral application." *PDA J. Pharm. Sci. Technol.* 66: 28-37.

Rao, J., Mc Clements, D.J. (2011a). "Formation of flavor oil microemulsions, nanoemulsions and emulsions: Influence of composition and preparation Method." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59: 5026-5035.

Rao, J., McClements, D.J. (2011b). "Food-grade microemulsions, nanoemulsions and emulsions: fabrication from sucrose mono-palmitate and lemon oil." *Food Hydrocolloids* 25: 1413-1423.

Rao, J., McClements, D.J. (2012d). "Lemon oil solubilization in mixed surfactant solutions: rationalizing microemulsion & nanoemulsion formation." *Food Hydrocolloids* 26(1): 268-276.

Rapoport, N., Christensen, D.A., Kennedy, A.M., Nam, K. (2010). "Cavitation properties of block copolymer stabilized phase-shift nanoemulsions used as drug carriers." *Ultrasound Med. Biol.* 36: 419-429.

Ravi, T. P. U., Padma, T. (2011). "Nanoemulsions for Drug Delivery through Different Routes." *Research in Biotechnology* 2(3): 1-13.

Rodrigues, D. G., Maria, D.A., Fernandes, D.C., Valduga, C.J., Couto, R.D., Ibanez, O.C., Maranhao, R.C. (2005). "Improvement of paclitaxel therapeutic index by derivatization and association to a cholesterol-rich microemulsion: in vitro and in vivo studies." *Cancer Chemother. Pharmacol.* 55: 565-576.

Rouessac, F., Rouessac, A. (2007). "Chemical Analysis: Modern Instrumentation Methods and Techniques" Wiley. 2nd Edition.

Rowe, R. C., Sheskey, P.J., Owen, S.C. (2006). "Handbook of Pharmaceutical Excipients" The Pharmaceutical Press, 5th Edition: 945.

Ruozi, B., Torzi, G., Forni, F., Fresta, M., Vandelli, M.A. (2005). "Atomic force microscopy and photon correlation spectroscopy: two techniques for rapid characterization of liposomes" *Eur. J. Pharm. Sci.* 25: 81-89.

Ruozi, B., Tosi, G., Forni, F., Fresta, M., Vandelli, M.A. (2005). *Eur. J. Pharm. Sci.* 25: 81-89.

Russell, W. M. S., Burch, R. (1959). "The Principles of Humane Experimental Technique". London, UK: Methuen.

Ruste, J. (2013). "Microscopie électronique à balayage -Images, applications et développements." *Dossier Techniques de l'ingénieur.*

Saberi, A. H., Fang, Y., McClements, D. J. (2013a). "Effect of Glycerol on Formation, Stability, and Properties of Vitamin - E Enriched Nanoemulsions Produced Using Spontaneous Emulsification." *Journal of Colloid and Interface Science* 411: 105-113.

Saberi, A. H., Fang, Y., McClements, D.J. (2013b). "Fabrication of vitamin E-enriched nanoemulsions: factors affecting particle size using spontaneous emulsification." *J Colloid Interface Sci* 391: 95-102.

Saberi, A. H., Fang, Y., McClements, D.J. (2014a). "Stabilization of vitamin E-enriched nanoemulsions: influence of post-homogenization cosurfactant addition." *J Agric Food Chem* 62: 1625-1633.

Saberi, A. H., Fang, Y., McClements, D.J. (2014b). "Effect of salts on formation and stability of vitamin E-enriched mini-emulsions produced by spontaneous emulsification." *J Agric Food Chem* 62: 11246-11253.

Sagalowicz, L., Leser, ME. (2010). "Delivery systems for liquid food products." *Curr Opin Colloid Interface Sci* 15: 61-72.

Salager, J.-L. (2006). *Emulsion Phase Inversion Phenomena. Emulsions and emulsion stability.* J.Sjoblom Ed. London, Taylor and Francis.

Salvia-Trujillo, L., Rojas-Grau, A., Soliva-Fortuny, R., Martin-Belloso, O. (2012). "Physicochemical characterization of lemongrass essential oil-alginate nanoemulsions: effect of ultrasound processing parameters." *Food and Bioproducts Processing* 6:2439-2446.

Salvia-Trujillo, L., Rojas-Grau, M., Soliva-Fortuny R, Martin-Belloso, O. (2014). "Impact of microfluidization or ultrasound processing on the antimicrobial activity against *Escherichia coli* of lemongrass oil-loaded nanoemulsions." *Food Control* 37: 292-297.

Salvia-Trujillo, L., Rojas-Grau, MA. , Martin-Belloso, O., Soliva-Fortuny, R. (2013b). "Effect of processing parameters on physicochemical characteristics of microfluidized lemongrass essential oil-alginate nanoemulsions." *Food Hydrocoll.* 30:401-407.

Salvia-Trujillo, L., Soliva-Fortuny, R., Rojas-Grau, M.A., McClements, D.J., Martin-Belloso, O. (2017). "Edible Nanoemulsions as Carriers of Active Ingredients: A Review." *Annual Review of Food Science and Technology*: 20-28.

Salvia-Trujillo, L., Quian, C., Martin-Belloso, O., McClements, DJ. (2013a). "Modulating β -carotene bioaccessibility by controlling oil composition and concentration in edible nanoemulsions." *Food Chem.* 139(1-4): 878-884.

Samah, N. A., Williams, N., & Heard, C. M. (2010). "Nanogel particulates located within diffusion cell receptor phases following topical application demonstrates uptake into and migration across skin." *International Journal of Pharmaceutics*, 401(1-2), 72-78.

Santana, R. C., Perrechil, F.A., Cunha, R.L. (2013). "High- and Low-Energy Emulsifications for Food Applications: A Focus on Process Parameters." *Food Engineering Reviews* 5(2): 107-122.

Sari, T. P., Mann, B., Kumar, R., Singh, R.R.B., Sharma, R., Bhardwaj, M., Athira, S., (2015). "Preparation and characterization of nanoemulsion encapsulating curcumin." *Food Hydrocolloids* 43: 540-546.

Sarker, D. K. (2005). "Engineering of Nanoemulsions for Drug Delivery." *Current Drug Delivery* 2: 297-310.

Schalbart, P., Kawaji, M. (2013). "Comparison of paraffin nanoemulsions prepared by low-energy emulsification method for latent heat storage." *Int. J. Therm. Sci.* 67: 113-119.

Scheller, K.J., Williams, S.J., Lawrence, A.J., Jarrott, B., Djouma, E. (2014). "An improved method to prepare an injectable microemulsion of the galanin-receptor 3 selective antagonist, SNAP 37889, using Kolliphor® HS 15." *MethodsX* 1 212-216.

Schramm, L. L. (2006). *Interfacial energetics. Emulsions, Foams, and Suspensions.* Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: 53-100.

Schulman, JH. , Stoeckenius, W., Prince, LM. (1959). "Mechanism of Formation and Structure of Micro Emulsions by Electron Microscopy." *J. Phys. Chem.* 63(10): 1677-1680.

Seekkuarachchi, I., Tanaka, K., Kumazawa, H. (2006). "Formation and characterization of submicrometer oil-in-water (O/W) emulsions, using high-energy emulsification." *Ind. Eng. Chem. Res.* 45(1): 372-390.

Sessa, M., Tsao, R., Liu, R. H., Ferrari, G., & Donsì, F. (2011). "Evaluation of the stability and antioxidant activity of nanoencapsulated resveratrol during in vitro digestion." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(23): 12352-12360.

Shafiq, S., Faiyaz, S., Sushma, T., Ahmad, F.J., Khar, R.K., Ali, M. (2007a). "Development and Bioavailability Assessment of Ramipril Nanoemulsion Formulation." *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 66(2): 227-243.

Shafiq, S., Shakeel, F., Talegaonkar, S., Ali, J., Baboota, S., Ahuja, A., Khar, R.K., Ali, M. (2007b). "Formulation development and optimization using nanoemulsion technique: A technical note." *AAPS Pharm. Sci. Tech* 8: E28.

Shah, R. B., Zidam, A.S., Funck, T., Tawakkul, M.A., Nguyenpho, A., Khan, M.A. (2007). "Quality by design: characterization of self-nanoemulsified drug delivery systems (SNEDDS) using ultrasonic resonator technology." *International Journal of Pharmaceutics* 341: 189-194.

Shakeel, F., Baboota, S., Ahuja, A., Ali, J., Faisal, M.S., and Shafiq, S. (2008a). "Stability Evaluation of Celecoxib Nanoemulsion Containing Tween 80" *Thailand Journal of Pharmaceutical Science* 32: 4-9.

Shakeel, F., Baboota, S., Ahuja, A., Ali, J., Aqil, M., Shafiq, S. (2007). "Nanoemulsions as Vehicles for Transdermal De-livery of Aceclofenac." *AAPS PharmSciTech* 8(4): 191-199.

Shakeel, F., Baboota, S., Ahuja, A., Ali, J., Shafiq, S. (2008b). "Skin Permeation Mechanism of Aceclofenac Using Novel Nanoemulsion Formulation." *Pharmazie* 63(8): 580-584.

Shakeel, F., Baboota, S., Ahuja, A., Ali, J., Shafiq, S. (2008c). "Celecoxib nanoemulsion: skin permeation mechanism and bioavailability assessment." *J. Drug Target.* 16: 733-740.

Shakeel, F., Haq, N., El-Badry, M., Alanazi, F.K., Alsarra, I.A. (2013). "Ultra fine super self-nanoemulsifying drug delivery system (SNEDDS) enhanced solubility and dissolution of indometacin." *J. Mol. Liq.* 180: 89-94.

Shakeel, F., Ramadan, W. (2010). "Transdermal delivery of anticancer drug caffeine from water-in-oil nanoemulsions." *Colloids Surf. B: Biointerfaces* 75: 356-362.

Sharif Makhmalzadeh, B., Torabi, S., Azarpanah, A. (2012). "Optimization of ibuprofen delivery through rat skin from traditional and novel nanoemulsion formulations." *Iran J.Pharm. Res.* 11: 47-58.

Sharma, S. R., Dwivedi, S.K., Swarup, D. (1996). "Hypoglycemic and hypolipidemic effects of *Cinnamomum tomala* nees leaves." *Indian J.Exp.Biol.*, 34: 372-374.

Shegokar, R. (2020). *Delivery of drugs: expectations and realities of multifunctional drug delivery systems*, 1st Edition, Elsevier.

Shi, S., Chen, Z., Rizzo, J.M., Semple, A., Mittal, S., K Cheung, J., Richardson, D., Antochshuk, V., Shameem, M. (2015). "A Highly Sensitive Method for the Quantitation of Polysorbate 20 and 80 to Study the Compatibility between Polysorbates and m-Cresol in the Peptide Formulation." *Journal of Analytical & Bioanalytical Techniques* 6(3): 8.

Shively, M. L. (1993). "Characterization of Oil-in-Water Emulsions Prepared from Solid-State Emulsions-Effect of Matrix and Oil Phase." *Pharm. Res.* 10: 1153-1156.

Shukat, R., Relkin, P. (2011). "Lipid nanoparticles as vitamin matrix carriers in liquid food systems: on the role of high-pressure homogenization, droplet size and adsorbed materials." *Colloids Surf. B Biointerfaces* 86(1):119-124.

Silva, H. D., Cerqueira, M.A., Vicente, A.A. (2015). "Influence of surfactant and processing conditions in the stability of oil-in-water nanoemulsions." *Journal of Food Engineering* 167: 89-98.

Silva, H.D., Cerqueira, M.A., Souza, B.W.S., Ribeiro, C., Avides, M.C., Quintas, M.A.C., Coimbra, J.S.R., Carneiro-da-Chunha, M.G., Vicente, A.A. (2011). "Nanoemulsions of β -carotene using a high-energy emulsification-evaporation technique." *J. Food Eng.* 102: 130-135.

Simon, M., Wittmar, M., Bakowsky, U., Kissel, T. (2004). "Self-assembling nanocomplexes from insulin and water-soluble branched polyesters, poly [(vinyl-3-(diethylamino)-propylcarbamate-co-(vinyl acetate)-co-(vinyl alcohol)]-graft-poly (L-lactic acid): a novel carrier for transmucosal delivery of peptides." *Bioconj. Chem* 15:841-849.

Simonnet, H., Le Bars, H. (1954). "Les régulations hormonales des métabolismes chez les animaux domestiques." *Institut national Agronomique et École Nationale Vétérinaire d'Alfort*: 42.

Simonnet, J. T., Richart, P., Aubrun, O., L'alloret, F. (2004). "Nanoformulation des corps gras. Nanocapsules, nanoémulsions." *Oléagineux, Corps gras, Lipides* 11(6): 448-453.

Simonnet, J.-T., Legret, S., Sonnevile, O. (2001). "Nanoémulsion à base de citrates d'alkylether et ses utilisations dans les domaines cosmétique, dermatologique, pharmaceutique et/ou ophtalmologique." *EP 1 020 219 B1*.

Singh, Y., Meher, J.G., Raval, K., Ali Khan, F., Chaurasia, M., Jain, N.K., Chourasia, M.K. (2017). "Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery." *Journal of Controlled Release* 252: 28-49.

Singodia, D., Gupta, G. K., Verma, A., Singh, V., Shukla, P., Misra, P., Sundar, S., Dube, A., Mishra, P. R. (2010). "Development and Performance Evaluation of Amphotericin B Transfersomes Against Resistant and Sensitive Clinical Isolates of Visceral Leishmaniasis." *Journal of Biomedical Nanotechnology* 6(3): 293-302.

Smrdel, P., Bogataj, M., Mrhar, A. (2008). "The Influence of Selected Parameters on the Size and Shape of Alginate Beads Prepared by Iontropic Gelation." *Scientia Pharmaceutica* 76(1): 77-89.

Solans, C., Izquierdo, P., Nolla, J., Azemar, N., Garcia-Celma, M.J. (2005). "Nano-emulsions." *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 10(3-4): 102-110.

Solans, C., Sole, I., (2012). "Nano-emulsions: formation by low-energy methods." *Curr.Opin. Colloid Interface Sci.* 17(5): 246-254.

Solè, I., Maestro, A., Gonzalez, C., Solans, C., Gutiérrez, J.M. (2006). "Optimization of Nano-Emulsion Preparation by Low-Energy Methods in an Ionic Surfactant System." *Langmuir* 22(20): 8326-8332.

Solè, I., Pey, CM., Maestro, A., Gonzalez, C., Porras, M., Solans, C., Gutierrez, JM. (2010). "Nano-emulsions prepared by the phase inversion composition method: preparation variables and scale up." *J Colloid Interface Sci* 344: 417-423.

Sonneville-Aubrun, O., Simonnet, J.T., L'Alloret, F. (2004). "Nanoemulsions: A New Vehicle for Skincare Products." *Advances in Colloids and Interface Science* 108-109: 145-149.

Springinsfeld, F. (2009). "Mécanismes de gélification et comportement rhéologique d'émulsions d'alcanes partiellement cristallisés." *Chimie-physique, Université Pierre et Marie Curie-Paris VI. Doctorat* 217.

Sriamornsak, P. (1998). "Investigation of pectin as a carrier for oral delivery of proteins using calcium pectinate gel beads." *Int J Pharm*: 213-220.

Suciati, T., Aliyandi, A., Satrialdi. (2014). "Development of transdermal nanoemulsion formulation for simultaneous Delivery of protein vaccine and artin-m adjuvant." *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 6(6): 536-546.

Sukanya, G., Mantry, S., Anjum, S. (2013). "Review on naoemulsions." *Int. J. Innov. Pharm. Sci. Res.* 1: 192-205.

Sun, H., Liu, K., Liu, W., Wang, W., Guo, C., Tang, B., Gu, J., Zhang, J., Li, H., Mao, X., Zou, Q., Zeng, H. (2012). "Development and characterization of a novel nanoemulsion drug-delivery system for potential application in oral delivery of protein drugs." *Int. J.Nanomedicine* 7: 5529-5543.

Szkudelski, T., (2001). "The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas." *Physiol. Res.* 50: 537-546.

Tabibiazar, M., Davaran, S., Hashemi, M., Homayonirad, A., Rasoulzadeh, F., Hamishehkar, H., Mohammadifar, M.A. (2015). "Design and fabrication of a food-grade albumin-stabilized nanoemulsion." *Food Hydrocolloids* 44: 220-228.

Tadros, T. (2013). "Emulsion Formation, Stability, and Rheology." Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.: 76.

Tadros, T., Izquierdo, P., Esquena, J., Solans, C. (2004). "Formation and stability of nano-emulsions." *Advances in Colloid and Interface Science*: 303-318.

Tagne, J.-B., Kakumanu, S., Nicolosi, R.J. (2008). "Nanoemulsion preparations of the anticancer drug dacarbazine significantly increase its efficacy in a xenograft mouse melanoma model." *Mol. Pharm.* 5: 1055-1063.

Taha, E., Al-Saidam, S., Samy, AM., Khan, MA. (2004). "Preparation and in vitro characterization of self-nanoemulsified drug delivery system (SNEDDS) of all-trans-retinol acetate." *International Journal of Pharmaceutics* 285: 109-119.

Taha, E., Samy, A.M., Kassem, A.A., Khan, MA. (2004). "Response surface methodology for the development of self-nanoemulsified drug delivery system (SNEDDS) of all-trans-retinol acetate." *Pharmaceutical Development and Technology* 10: 363-370.

Tan, T. B., Yussof, N.S., Abas, F., Mirhosseini, H., Arbi Nehdi, I., Tan, C.P. (2016). "Comparing the formation of lutein nanodispersion prepared by using solvent displacement method and high-pressure valve homogenization: Effects of formulation parameters." *Journal of Food Engineering*: 65-71.

Tanjir Islam, M., Towheedur Rahman, A.F.M., Sarwar, Md. S., Asaduzzaman, Md., Ali, Y., Zannah, S., Rashid, M. (2016). "Fenofibrate Potentiates the Antihyperglycemic, Antidyslipidemic and Hepatoprotective Activity of Pioglitazone on Alloxan-Induced Diabetic Rats." *Pharmacologia* 7: 53-59.

Tarimala, S., Dai, L.L. (2004). "Structure of Microparticles in Solid-Stabilized Emulsions." *Langmuir* 20(9): 3492-3494.

Taylor, P. (1998). "Ostwald ripening in emulsions." *Advances in Colloid and Interface Science* 75(2): 107-116.

Tolosa, L., Forgiarini, A., Moreno, P., Salager, J.L. (2006). "Combined effects of formulation and stirring on emulsion drop size in the vicinity of three-phase behavior of surfactant-oil water systems." *Ind Eng Chem Res* 45: 3810-3814.

Troncoso, E., Aguilera, J.M., McClements, D.J. (2012a). "Influence of particle size on the in vitro digestibility of protein-coated lipid nanoparticles." *J. Colloid Interface Sci.* 382(1): 110-116.

Troncoso, E., Aguilera, J.M., McClements, D.J. (2012b). "Fabrication, characterization and lipase digestibility of food-grade nanoemulsions." *Food Hydrocoll.* 27(2):355-363.

Tsai, Y., Lee, K., Huang, Y., Wu, P. (2010). "In Vitro Permeation and in Vivo Whitening Effect of Topical Hesperetin Microemulsion Delivery System." *International Journal of Pharmaceutics* 388(1-2): 257-262.

Tziomalos, K. A., V.G., (2006). "Fenofibrate: A novel formulation (Triglide-) in the treatment of lipid disorders: A review." *Int. J. Nanomed.* 1: 129-147.

Ugwoke, M. I., Agu, R.U., Verbeke, N., Kinget, R. (2005). "Nasal Mucoadhesive Drug Delivery: Background, Applications, Trends, and Future Perspectives." *Advanced Drug Delivery Reviews* 57(11): 1640-1665.

Uluata, S., Decker, E.A., McClements, D.J. (2016). "Optimization of nanoemulsion fabrication using microfluidization: role of surfactant concentration on formation and stability." *Food Biophysics* 11: 52-59.

Umetrics AB (2001). MODDE 6.0 Pro. M. D. A. Solutions.

United States Pharmacopeia 42-NF 37. (2019). USP Monographs.

United States Pharmacopeia Chapter 729. (2013). "Globule Size Distribution in Lipid Injectable Emulsions." M. Rockville, USA: 321-323.

Uyen, N.T.T., Hamid, Z.A.A., Tram, N.X.T., Ahmad, N.B. (2019). "Fabrication of alginate microspheres for drug delivery: a review." *International Journal of Biological Macromolecules*. doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.10.233.

Vatsraj, S., Chauhan, K., Pathak, H. (2014). "Formulation of a novel nanoemulsion system for enhanced solubility of a sparingly water soluble antibiotic, Clarithromycin." *Journal of Nanoscience*: 1-7.

Vauthier, C., Dubernet, C., Fattal, E., Pinto-Alphandary, H., Couvreur, P. (2003). "Poly (alkylcyanoacrylates) as biodegradable materials for biomedical applications." *Advanced drug delivery reviews* 55(4): 519-548.

Venkateshwarlu, I., Prabhakar, K., Ali, M., Kishan, V. (2010). "Development and in vitro cyto-toxic evaluation of parenteral docetaxel lipid nanoemulsions for application in cancer treatment." *PDA J. Pharm. Sci. Technol.* 64:233-241.

Vergès, B. (2013). "Lipides et diabète type 1." *Médecines des maladies métaboliques* 7(5): 437-442.

Villarreal, A.M., Fernandez, C., Forgiarini, A., Márquez, L., Nielloud, F., Salager, J-L. (2010). "Cahier de Formulation - Nanoencapsulation de filtres solaires via nanoémulsions." 15: 14.

Vyas, T. K., Shahiwala, A., Amiji, M.M. (2008). "Improved oral bioavailability and brain trans-*port* of saquinavir upon administration in novel nanoemulsion formulations." *Int. J.Pharm.* 347: 93-101.

Walstra, P. (1993). "Principles of emulsion formation." *Chem. Eng. Sci.* 48(2): 333-349.

Wang, W. (2000). "Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals." *Int. J. Pharm.* 203: 1-60.

Wang, X., Jiang, Y., Wang, Y.-W., Huang, M.-T., Ho, C.-T., Huang, Q. (2008). "Enhancing anti-inflammation activity of curcumin through O/W nanoemulsions." *Food Chem.* 108: 419-424.

Wang, Z. L. (2000). "Transmission Electron Microscopy of Shape-Controlled Nanocrystals and Their Assemblies." *The Journal of Physical Chemistry B*, 104(6), 1153-1175.

Wooster, T., Augustin, MA. (2006). "B-lactoglobulin–dextran maillard conjugates: their effect on interfacial thickness and emulsion stability." *J Colloid Interface Sci* 303: 564-572.

Wooster, T., Golding, M., Sanguansri, P. (2008). "Impact of oil type on nanoemulsion formation and ostwald ripening stability. *Langmuir* 24(22):12758–65." *Langmuir* 24(22): 12758-12765.

Wu, H., Ramachandran, C., Weiner, N.D., Roessler, B.J. (2001). "Topical transport of hydrophilic compounds using water-in-oil nanoemulsions." *Int. J. Pharm.* 220: 63-75.

Wulff-Perez, M., Torcello-Gomez, A., Galvez-Ruiz, M., Martin-Rodriguez, A. (2009). "Stability of emulsions for parenteral feeding: preparation and characterization of o/w nanoemulsions with natural oils and pluronic f68 as surfactant." *Food Hydrocolloids* 23: 1096-1102.

Xu, J., et al. (2010). "The Preparation of Neem Oil Microemulsion (*Azadirachta indica*) and the Comparison of Acaricidal Time between Neem Oil Microemulsion and Other Formulations in Vitro " *Veterinary Parasitology* 169(3-4): 399-403.

Yagmur, A., Aserin, A., Garti, N. (2002). "Phase behavior of microemulsions based on food-grade nonionic surfactants: effect of polyols and short-chain alcohols." *Colloid Surf A Physico-chem Eng Asp* 209: 71-81.

Yang, Q., Xin, X., Wang, L., Lu, H., Ren, H., Tan, Y., Xu, G. (2014a). "Modification of the stability of oil-in-water nano-emulsions by polymers with different structures." *Colloid and Polymer Science* 292(6): 1297-1306.

Yang, X., Wang, D., Ma, Y., Zhao, Q., Fallon, J.K., Liu, D., Xu, X.E., Wang, Y., He, Z., Liu, F. (2014b). "Theranostic nanoemulsions: codelivery of hydrophobic drug and hydrophilic imaging probe for cancer therapy and imaging." *Nanomedicine* 9:2773-2785.

Yang, Y., Marshall-Breton, C., Leser, M.E., Sher, A.A., McClements, D.J. (2012). "Fabrication of ultrafine edible emulsions: comparison of high-energy and low-energy homogenization methods." *Food Hydrocoll.* 29(2): 398-406.

Yi, S. W., Yune, T.Y., Kim, T.W., Chung, H., et al. (2000). "A Cationic Lipid Emulsion/DNA Complex as a Physically Stable and Serum-Resistant Gene Delivery System." *Pharmaceutical Research* 17(3): 314-320.

Yildirim, S. T., Oztop, M.H., Soyer, Y. (2017). "Cinnamon oil nanoemulsions by spontaneous emulsification: Formulation, characterization and antimicrobial activity." *LWT - Food Science and Technology* 84: 122-128.

Yu, H., Huang, Q. (2012). "Improving the oral bioavailability of curcumin using novel organogel-based nanoemulsions,." *J. Agric. Food Chem.* 60: 5373-5379.

Yu, L. X., Amidon, G. L., Polli, J. E., Zhao, H., Mehta, M. U., Conner, D. P., Shah, V. P., Lesko, L. J., Chen, M. L., Lee, V. H. and Hussain, A. S. (2002). "Biopharmaceutics classification system: the scientific basis for biowaiver extensions." *Pharm Res* 19: 921-925.

Yuan, J., Ansari, M., Samaan, M., Acosta, E.J. (2008). "Linker-based lecithin microemulsions for transdermal delivery of lidocaine." *Int J Pharm* 349: 130-143.

Yukuyama, M.N., Ghisleni, D.D.M., Pinto, T.J.A., Bou-Chacra, N.A. (2016). "Nanoemulsion: process selection and application in cosmetics-a review." *International Journal of Cosmetic Science* 38: 13-24.

Zhang, J., Bing, L., Reineccius, G. A. (2016). "Comparison of Modified Starch and Quillaja Saponins in the Formation and Stabilization of Flavor Nanoemulsions." *Food Chemistry* 192: 53-59.

Zhang, T., Dong, D., Lu, D., Wang, S., Wu, B. (2016). "Cremophor EL-based nanoemulsion enhances transcellular permeation of emodin through glucuronidation reduction in UGT1A1-overexpressing MDCKII cells." *Int. J. Pharm.* 501: 190-198.

Zhang, Y., Shang, Z., Gao, C., Du, M., Xu, S., Song, H., Liu, T. (2014). "Nanoemulsion for solubilization, stabilization, and in vitro Release of pterostilbene for oral delivery." *AAPS PharmSciTech* 15: 1000-1008.

Zhang, Z., Kohn, J. (2014). *Biodegradable Polymers Chapter 18; in Principles of Tissue Engineering.*

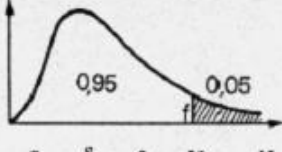
Ziani, K., Chang, Y., McLandsborough, L., McClements, DJ. (2011). "Influence of surfactant charge on antimicrobial efficacy of surfactant-stabilized thyme oil nanoemulsions." *J. Agric. Food Chem.* 59(11): 6247-6255.

Zidam, A. S., Sammour, O.A., Hammad, M.A., Megrab, N.A., Habib, M.J., Khan, M.A. (2007). "Quality by design: understanding the formulation variables of cyclosporine a self-nanoemulsified drug delivery system by Box–Behnken design and desirability function." *International Journal of Pharmaceutics* 332: 55-63.

Annexes

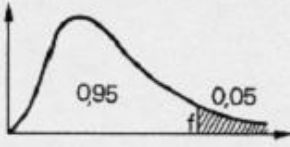
Annexe 1 : Tables de Fisher-Snedecor

Valeurs f de la variable de Fisher-Snédecór $F(\nu_1; \nu_2)$ ayant la probabilité 0,05 d'être dépassées



$\nu_1 \backslash \nu_2$	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1	161	200	216	225	230	234	237	239	241	242	243	244	245	245	246	246	247	247
2	18.5	19.0	19.2	19.2	19.3	19.3	19.4	19.4	19.4	19.4	19.4	19.4	19.4	19.4	19.4	19.4	19.4	19.4
3	10.1	9.55	9.28	9.12	9.01	8.94	8.89	8.85	8.81	8.79	8.76	8.74	8.73	8.71	8.70	8.69	8.68	8.67
4	7.71	6.94	6.59	6.39	6.26	6.16	6.09	6.04	6.00	5.96	5.94	5.91	5.89	5.87	5.86	5.84	5.83	5.82
5	6.01	5.79	5.41	5.19	5.05	4.95	4.88	4.82	4.77	4.74	4.70	4.68	4.66	4.64	4.62	4.60	4.59	4.58
6	5.09	5.14	4.76	4.53	4.39	4.28	4.21	4.15	4.10	4.06	4.03	4.00	3.98	3.96	3.94	3.92	3.91	3.90
7	5.59	4.74	4.35	4.12	3.97	3.87	3.79	3.73	3.68	3.64	3.60	3.57	3.55	3.53	3.51	3.49	3.48	3.47
8	5.32	4.46	4.07	3.84	3.69	3.58	3.50	3.44	3.39	3.35	3.31	3.28	3.26	3.24	3.22	3.20	3.19	3.17
9	5.12	4.26	3.86	3.63	3.48	3.37	3.29	3.23	3.18	3.14	3.10	3.07	3.05	3.03	3.01	2.99	2.97	2.96
10	4.90	4.10	3.71	3.48	3.33	3.22	3.14	3.07	3.02	2.98	2.94	2.91	2.89	2.86	2.85	2.83	2.81	2.80
11	4.84	3.98	3.59	3.36	3.20	3.09	3.01	2.95	2.90	2.85	2.82	2.79	2.76	2.74	2.72	2.70	2.69	2.67
12	4.75	3.89	3.49	3.26	3.11	3.00	2.91	2.85	2.80	2.75	2.72	2.69	2.66	2.64	2.62	2.60	2.58	2.57
13	4.67	3.81	3.41	3.18	3.03	2.92	2.83	2.77	2.71	2.67	2.63	2.60	2.58	2.55	2.53	2.51	2.50	2.48
14	4.60	3.74	3.34	3.11	2.96	2.85	2.76	2.70	2.65	2.60	2.57	2.53	2.51	2.48	2.46	2.44	2.43	2.41
15	4.54	3.68	3.29	3.06	2.90	2.79	2.71	2.64	2.59	2.54	2.51	2.48	2.45	2.42	2.40	2.38	2.37	2.35
16	4.49	3.63	3.24	3.01	2.85	2.74	2.66	2.59	2.54	2.49	2.46	2.42	2.40	2.37	2.35	2.33	2.32	2.30
17	4.45	3.59	3.20	2.96	2.81	2.70	2.61	2.55	2.49	2.45	2.41	2.38	2.35	2.33	2.31	2.29	2.27	2.26
18	4.41	3.55	3.16	2.93	2.77	2.66	2.58	2.51	2.46	2.41	2.37	2.34	2.31	2.29	2.27	2.25	2.23	2.22
19	4.38	3.52	3.13	2.90	2.74	2.63	2.54	2.48	2.42	2.38	2.34	2.31	2.28	2.26	2.23	2.21	2.20	2.18
20	4.35	3.49	3.10	2.87	2.71	2.60	2.51	2.45	2.39	2.35	2.31	2.28	2.25	2.22	2.20	2.18	2.17	2.15
21	4.32	3.47	3.07	2.84	2.68	2.57	2.49	2.42	2.37	2.32	2.28	2.25	2.22	2.20	2.18	2.16	2.14	2.12
22	4.30	3.44	3.05	2.82	2.66	2.55	2.46	2.40	2.34	2.30	2.26	2.23	2.20	2.17	2.15	2.13	2.11	2.10
23	4.28	3.42	3.03	2.80	2.64	2.53	2.44	2.37	2.32	2.27	2.23	2.20	2.18	2.15	2.13	2.11	2.09	2.07
24	4.26	3.40	3.01	2.78	2.62	2.51	2.42	2.36	2.30	2.25	2.21	2.18	2.15	2.13	2.11	2.09	2.07	2.05
25	4.24	3.39	2.99	2.76	2.60	2.49	2.40	2.34	2.28	2.24	2.20	2.16	2.14	2.11	2.09	2.07	2.05	2.04
26	4.23	3.37	2.98	2.74	2.59	2.47	2.39	2.32	2.27	2.22	2.18	2.15	2.12	2.09	2.07	2.05	2.03	2.02
27	4.21	3.35	2.96	2.73	2.57	2.46	2.37	2.31	2.25	2.20	2.17	2.13	2.10	2.08	2.06	2.04	2.02	2.00
28	4.20	3.34	2.95	2.71	2.56	2.45	2.36	2.29	2.24	2.19	2.15	2.12	2.09	2.06	2.04	2.02	2.00	1.99
29	4.18	3.33	2.93	2.70	2.55	2.43	2.35	2.28	2.22	2.18	2.14	2.10	2.08	2.05	2.03	2.01	1.99	1.97
30	4.17	3.32	2.92	2.69	2.53	2.42	2.33	2.27	2.21	2.16	2.13	2.09	2.06	2.04	2.01	1.99	1.98	1.96
32	4.15	3.29	2.90	2.67	2.51	2.40	2.31	2.24	2.19	2.14	2.10	2.07	2.04	2.01	1.99	1.97	1.95	1.94
34	4.13	3.28	2.88	2.65	2.49	2.38	2.29	2.23	2.17	2.12	2.08	2.05	2.02	1.99	1.97	1.95	1.93	1.92
36	4.11	3.26	2.87	2.63	2.48	2.36	2.28	2.21	2.15	2.11	2.07	2.03	2.00	1.98	1.95	1.93	1.92	1.90
38	4.10	3.24	2.85	2.62	2.46	2.35	2.26	2.19	2.14	2.09	2.05	2.02	1.99	1.96	1.94	1.92	1.90	1.88
40	4.08	3.23	2.84	2.61	2.45	2.34	2.25	2.18	2.12	2.08	2.04	2.00	1.97	1.95	1.92	1.90	1.89	1.87
42	4.07	3.22	2.83	2.59	2.44	2.32	2.24	2.17	2.11	2.06	2.03	1.99	1.96	1.93	1.91	1.89	1.87	1.86
44	4.06	3.21	2.82	2.58	2.43	2.31	2.23	2.16	2.10	2.05	2.01	1.98	1.95	1.92	1.90	1.88	1.86	1.84
46	4.05	3.20	2.81	2.57	2.42	2.30	2.22	2.15	2.09	2.04	2.00	1.97	1.94	1.91	1.89	1.87	1.85	1.83
48	4.04	3.19	2.80	2.57	2.41	2.29	2.21	2.14	2.08	2.03	1.99	1.96	1.93	1.90	1.88	1.86	1.84	1.82
50	4.03	3.18	2.79	2.56	2.40	2.29	2.20	2.13	2.07	2.03	1.99	1.95	1.92	1.89	1.87	1.85	1.83	1.81
55	4.02	3.16	2.77	2.54	2.38	2.27	2.18	2.11	2.06	2.01	1.97	1.93	1.90	1.88	1.85	1.83	1.81	1.79
60	4.00	3.15	2.76	2.53	2.37	2.25	2.17	2.10	2.04	1.99	1.95	1.92	1.89	1.86	1.84	1.82	1.80	1.78
65	3.99	3.14	2.75	2.51	2.36	2.24	2.15	2.08	2.03	1.98	1.94	1.90	1.87	1.85	1.82	1.80	1.78	1.76
70	3.98	3.13	2.74	2.50	2.35	2.23	2.14	2.07	2.02	1.97	1.93	1.89	1.86	1.84	1.81	1.79	1.77	1.75
80	3.96	3.11	2.72	2.49	2.33	2.21	2.13	2.06	2.00	1.95	1.91	1.88	1.84	1.82	1.79	1.77	1.75	1.73
90	3.95	3.10	2.71	2.47	2.32	2.20	2.11	2.04	1.99	1.94	1.90	1.86	1.83	1.80	1.78	1.76	1.74	1.72
100	3.94	3.09	2.70	2.46	2.31	2.19	2.10	2.03	1.97	1.93	1.89	1.85	1.82	1.79	1.77	1.75	1.73	1.71
125	3.92	3.07	2.68	2.44	2.29	2.17	2.08	2.01	1.96	1.91	1.87	1.83	1.80	1.77	1.75	1.72	1.70	1.69
150	3.90	3.06	2.66	2.43	2.27	2.16	2.07	2.00	1.94	1.89	1.85	1.82	1.79	1.76	1.73	1.71	1.69	1.67
200	3.89	3.04	2.65	2.42	2.26	2.14	2.06	1.98	1.93	1.88	1.84	1.80	1.77	1.74	1.72	1.69	1.67	1.66
300	3.87	3.03	2.63	2.40	2.24	2.13	2.04	1.97	1.91	1.86	1.82	1.78	1.75	1.72	1.70	1.68	1.66	1.64
500	3.86	3.01	2.62	2.39	2.23	2.12	2.03	1.96	1.90	1.85	1.81	1.77	1.74	1.71	1.69	1.66	1.64	1.62
1000	3.85	3.00	2.61	2.38	2.22	2.11	2.02	1.95	1.89	1.84	1.80	1.76	1.73	1.70	1.68	1.65	1.63	1.61
∞	3.84	3.00	2.60	2.37	2.21	2.10	2.01	1.94	1.88	1.83	1.79	1.75	1.72	1.69	1.67	1.64	1.62	1.60

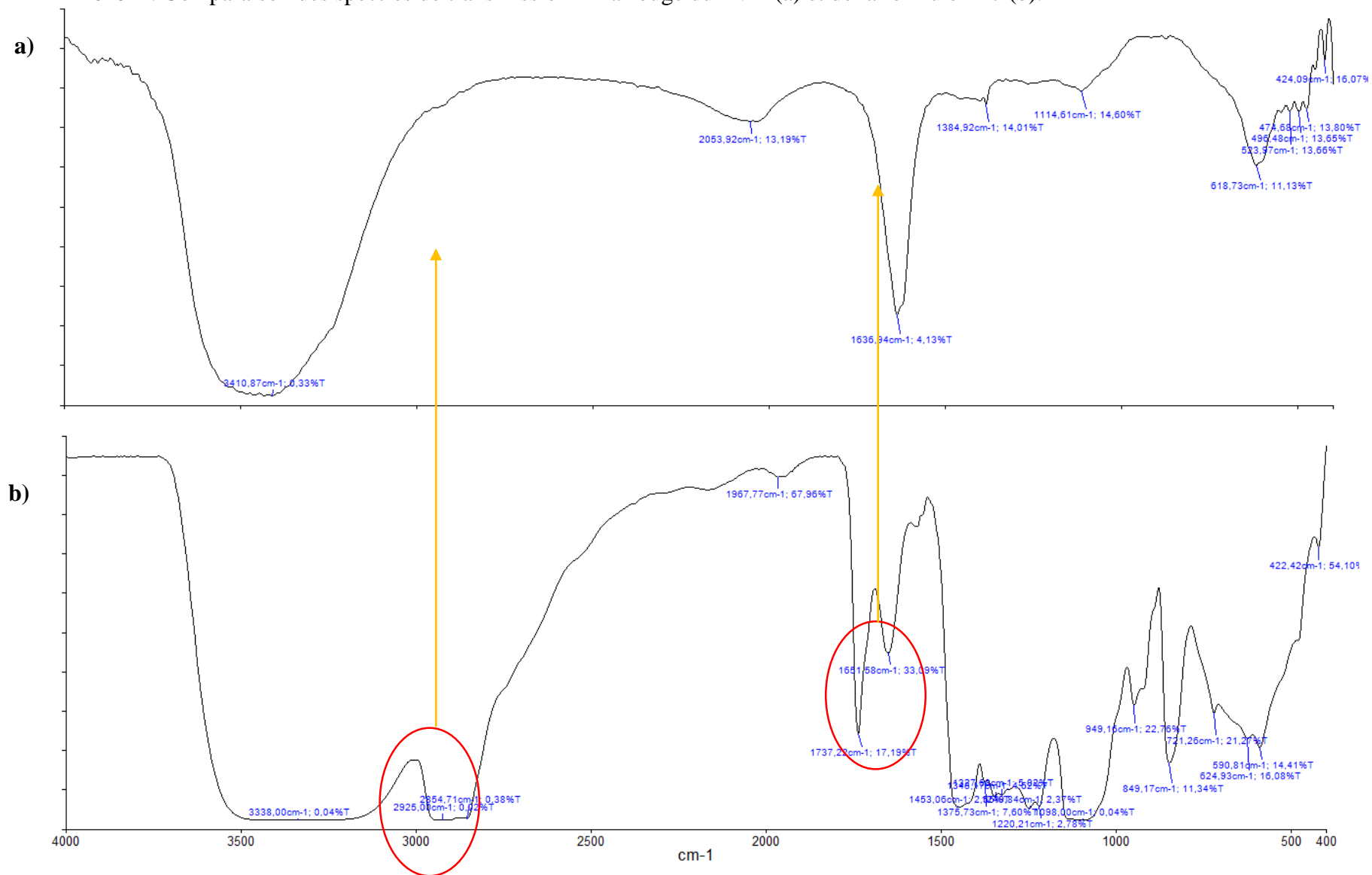
Valeurs f de la variable de Fisher-Snédecor $F(\nu_1; \nu_2)$ ayant la probabilité 0.05 d'être dépassées (suite)



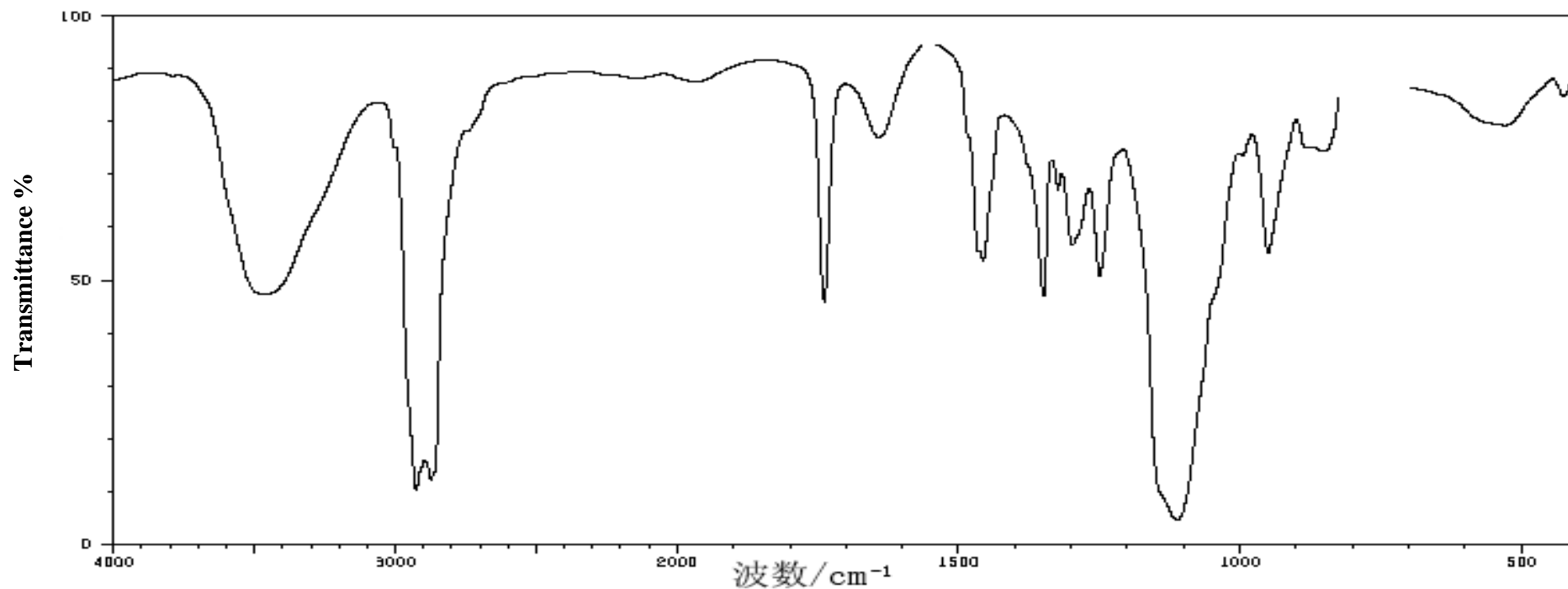
$\nu_2 \backslash \nu_1$	10	20	22	24	26	28	30	35	40	45	50	60	80	100	200	500	∞
1	2.48	2.48	2.49	2.49	2.49	2.50	2.50	2.51	2.51	2.51	2.52	2.52	2.52	2.53	2.54	2.54	2.54
2	19.4	19.4	19.5	19.5	19.5	19.5	19.5	19.5	19.5	19.5	19.5	19.5	19.5	19.5	19.5	19.5	19.5
3	8.67	8.66	8.65	8.64	8.63	8.62	8.62	8.60	8.59	8.59	8.58	8.57	8.56	8.55	8.54	8.53	8.53
4	5.81	5.80	5.79	5.77	5.76	5.75	5.75	5.73	5.72	5.71	5.70	5.69	5.67	5.66	5.65	5.64	5.63
5	4.57	4.56	4.54	4.53	4.52	4.50	4.50	4.48	4.46	4.45	4.44	4.43	4.41	4.41	4.39	4.37	4.37
6	3.88	3.87	3.86	3.84	3.83	3.82	3.81	3.79	3.77	3.76	3.75	3.74	3.72	3.71	3.69	3.68	3.67
7	3.46	3.44	3.43	3.41	3.40	3.39	3.38	3.36	3.34	3.33	3.32	3.30	3.29	3.27	3.25	3.24	3.23
8	3.16	3.15	3.13	3.12	3.10	3.09	3.08	3.06	3.04	3.03	3.02	3.01	2.99	2.97	2.95	2.94	2.93
9	2.95	2.94	2.92	2.90	2.89	2.87	2.86	2.84	2.83	2.81	2.80	2.79	2.77	2.76	2.73	2.72	2.71
10	2.78	2.77	2.75	2.74	2.72	2.71	2.70	2.68	2.66	2.65	2.64	2.62	2.60	2.59	2.56	2.55	2.54
11	2.66	2.65	2.63	2.61	2.59	2.58	2.57	2.55	2.53	2.52	2.51	2.49	2.47	2.46	2.43	2.42	2.40
12	2.56	2.54	2.52	2.51	2.49	2.48	2.47	2.44	2.43	2.41	2.40	2.38	2.36	2.35	2.32	2.31	2.30
13	2.47	2.46	2.44	2.42	2.41	2.39	2.38	2.36	2.34	2.33	2.31	2.30	2.27	2.26	2.23	2.22	2.21
14	2.40	2.39	2.37	2.35	2.33	2.32	2.31	2.28	2.27	2.25	2.24	2.22	2.20	2.19	2.16	2.14	2.13
15	2.34	2.33	2.31	2.29	2.27	2.26	2.25	2.22	2.20	2.19	2.18	2.16	2.14	2.12	2.10	2.08	2.07
16	2.29	2.28	2.25	2.24	2.22	2.21	2.19	2.17	2.15	2.14	2.12	2.11	2.08	2.07	2.04	2.02	2.01
17	2.24	2.23	2.21	2.19	2.17	2.16	2.15	2.12	2.10	2.09	2.08	2.06	2.03	2.02	1.99	1.97	1.96
18	2.20	2.19	2.17	2.15	2.13	2.12	2.11	2.08	2.06	2.05	2.04	2.02	1.99	1.98	1.95	1.93	1.92
19	2.17	2.16	2.13	2.11	2.10	2.08	2.07	2.05	2.03	2.01	2.00	1.98	1.96	1.94	1.91	1.89	1.88
20	2.14	2.12	2.10	2.08	2.07	2.05	2.04	2.01	1.99	1.98	1.97	1.95	1.92	1.91	1.88	1.86	1.84
21	2.11	2.10	2.07	2.05	2.04	2.02	2.01	1.98	1.96	1.95	1.94	1.92	1.89	1.88	1.84	1.82	1.81
22	2.08	2.07	2.05	2.03	2.01	2.00	1.98	1.96	1.94	1.92	1.91	1.89	1.86	1.85	1.82	1.80	1.78
23	2.06	2.05	2.02	2.00	1.99	1.97	1.96	1.93	1.91	1.90	1.88	1.86	1.84	1.82	1.79	1.77	1.76
24	2.04	2.03	2.00	1.98	1.97	1.95	1.94	1.91	1.89	1.88	1.86	1.84	1.82	1.80	1.77	1.75	1.73
25	2.02	2.01	1.98	1.96	1.95	1.93	1.92	1.89	1.87	1.85	1.84	1.82	1.80	1.78	1.75	1.73	1.71
26	2.00	1.99	1.97	1.95	1.93	1.91	1.90	1.87	1.85	1.84	1.82	1.80	1.78	1.76	1.73	1.71	1.69
27	1.99	1.97	1.95	1.93	1.91	1.90	1.88	1.86	1.84	1.82	1.81	1.79	1.76	1.74	1.71	1.69	1.67
28	1.97	1.96	1.93	1.91	1.90	1.88	1.87	1.84	1.82	1.80	1.79	1.77	1.74	1.73	1.69	1.67	1.65
29	1.96	1.94	1.92	1.90	1.88	1.87	1.85	1.83	1.81	1.79	1.77	1.75	1.73	1.71	1.67	1.65	1.64
30	1.95	1.93	1.91	1.89	1.87	1.85	1.84	1.81	1.79	1.77	1.76	1.74	1.71	1.70	1.66	1.64	1.62
32	1.92	1.91	1.88	1.86	1.85	1.83	1.82	1.79	1.77	1.75	1.74	1.71	1.69	1.67	1.63	1.61	1.59
34	1.90	1.89	1.86	1.84	1.82	1.80	1.80	1.77	1.75	1.73	1.71	1.69	1.66	1.65	1.61	1.59	1.57
36	1.88	1.87	1.85	1.82	1.81	1.79	1.78	1.75	1.73	1.71	1.69	1.67	1.64	1.62	1.59	1.56	1.55
38	1.87	1.85	1.83	1.81	1.79	1.77	1.76	1.73	1.71	1.69	1.68	1.65	1.62	1.61	1.57	1.54	1.53
40	1.85	1.84	1.81	1.79	1.77	1.76	1.74	1.72	1.69	1.67	1.66	1.64	1.61	1.59	1.55	1.53	1.51
42	1.84	1.83	1.80	1.78	1.76	1.74	1.73	1.70	1.68	1.66	1.65	1.62	1.59	1.57	1.53	1.51	1.49
44	1.83	1.81	1.79	1.77	1.75	1.73	1.72	1.69	1.67	1.65	1.63	1.61	1.58	1.56	1.52	1.49	1.48
46	1.82	1.80	1.78	1.76	1.74	1.72	1.71	1.68	1.65	1.64	1.62	1.60	1.57	1.55	1.51	1.48	1.46
48	1.81	1.79	1.77	1.75	1.73	1.71	1.70	1.67	1.64	1.62	1.61	1.59	1.56	1.54	1.49	1.47	1.45
50	1.80	1.78	1.76	1.74	1.72	1.70	1.69	1.66	1.63	1.61	1.60	1.58	1.54	1.52	1.48	1.46	1.44
55	1.78	1.76	1.74	1.72	1.70	1.68	1.67	1.64	1.61	1.59	1.58	1.55	1.52	1.50	1.46	1.43	1.41
60	1.76	1.75	1.72	1.70	1.68	1.66	1.65	1.62	1.59	1.57	1.56	1.53	1.50	1.48	1.44	1.41	1.39
65	1.75	1.73	1.71	1.69	1.67	1.65	1.63	1.60	1.58	1.56	1.54	1.52	1.49	1.46	1.42	1.39	1.37
70	1.74	1.72	1.70	1.67	1.65	1.64	1.62	1.59	1.57	1.55	1.53	1.50	1.47	1.45	1.40	1.37	1.35
80	1.72	1.70	1.68	1.65	1.63	1.62	1.60	1.57	1.54	1.52	1.51	1.48	1.45	1.43	1.38	1.35	1.32
90	1.70	1.69	1.66	1.64	1.62	1.60	1.59	1.55	1.53	1.51	1.49	1.46	1.43	1.41	1.36	1.32	1.30
100	1.69	1.68	1.65	1.63	1.61	1.59	1.57	1.54	1.52	1.49	1.48	1.45	1.41	1.39	1.34	1.31	1.28
125	1.67	1.65	1.63	1.60	1.58	1.57	1.55	1.52	1.49	1.47	1.45	1.42	1.39	1.36	1.31	1.27	1.25
150	1.66	1.64	1.61	1.59	1.57	1.55	1.53	1.50	1.48	1.45	1.44	1.41	1.37	1.34	1.29	1.25	1.22
200	1.64	1.62	1.60	1.57	1.55	1.53	1.52	1.48	1.46	1.43	1.41	1.39	1.35	1.32	1.26	1.22	1.19
300	1.62	1.61	1.58	1.55	1.53	1.51	1.50	1.46	1.43	1.41	1.39	1.36	1.32	1.30	1.23	1.19	1.15
500	1.61	1.59	1.56	1.54	1.52	1.50	1.48	1.45	1.42	1.40	1.38	1.34	1.30	1.28	1.21	1.16	1.11
1000	1.60	1.58	1.55	1.53	1.51	1.49	1.47	1.44	1.41	1.38	1.36	1.33	1.29	1.26	1.19	1.13	1.08
∞	1.59	1.57	1.54	1.52	1.50	1.48	1.46	1.42	1.39	1.37	1.35	1.32	1.27	1.24	1.17	1.11	1.00

d'après Fisher et Yates, *Statistical tables for biological, agricultural, and medical research* (Oliver and Boyd, Edinburgh)

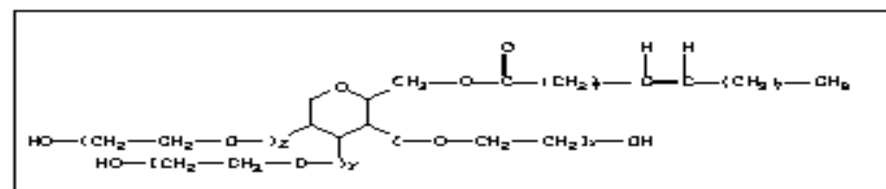
Annexe 2 : Comparaison des spectres de transmission infra-rouge du PVA (a) et de la formule F17 (b).



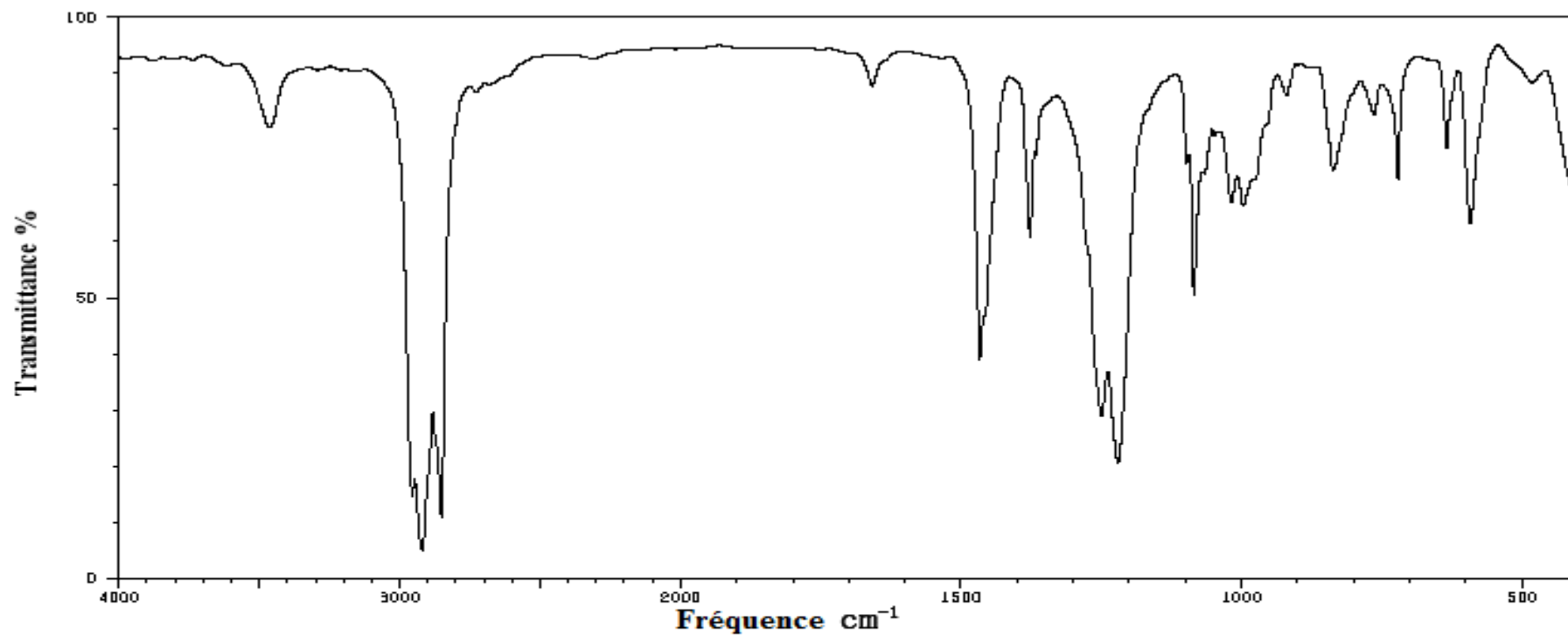
Annexe 3 : Spectre FTIR du polysorbate 80 (https://www.chemicalbook.com/spectrumen_9005-65-6_ir1.htm)



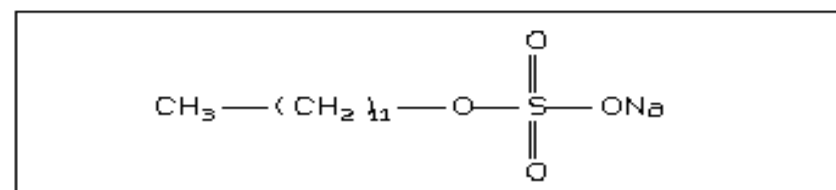
3461	46	1660	96	1297	66
2926	10	1545	95	1250	49
2875	12	1540	95	1111	4
1739	44	1464	63	960	63
1642	74	1457	52	425	81
1560	95	1349	46		
1555	95	1323	64		



Annexe 4 : Spectre IR du SDS (http://www.hanhonggroup.com/ir/ir_en/D78011.html)



3461	77	1366	72	998	64	721	68
2955	13	1250	27	991	66	635	74
2920	4	1220	20	920	84	593	60
2851	10	1097	70	837	70	482	84
1659	84	1085	49	771	81		
1467	37	1068	70	764	79		
1378	68	1019	64	759	81		



Annexe 5 : Comparaison de deux moyennes (taille des particules)_test de Student.

Validation du modèle d'optimisation du process_Taille de particules

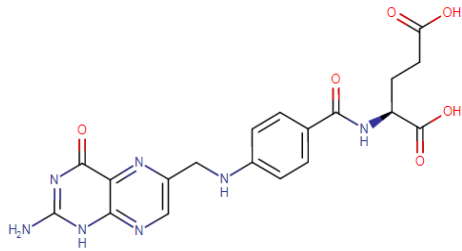
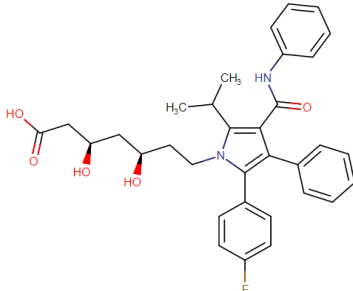
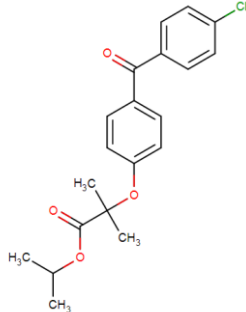
Réalisé par KESSAL FETTA

Hypothèse H0 : La taille expérimentale ne diffère pas significativement de la taille prédite par le modèle

Taille prédite nm	50,179		
Tailles exp nm	50,71	51,11	49,48
t.calculé	0,299395308		
t.tabulé(0,05;3,2)	4,30265273		

Conclusion	Pas de différence significative
-------------------	--

Annexe 6 : Principales caractéristiques de l'acide folique, atorvastatine et fénofibrate.

	<i>Acide folique</i>	<i>Atorvastatine</i>	<i>Fénofibrate</i>
Structure	 (Drug bank)	 (Drug bank)	 (Drug bank)
Dénomination IUPAC	(2S)-2-[(4-[(2-amino-4-oxo-1,4-dihydropteridin-6-yl) methyl] amino} phenyl)formamido]pentanedioic acid (Drug bank, USP2019)	(3R,5R)-7-[2-(4-fluorophenyl)-3-phenyl-4-(phenylcarbamoyl)-5-(propan-2-yl)-1H-pyrrol-1-yl]-3,5-dihydroxyheptanoic acid (Drug bank, USP2019)	Isopropyl 2-[p-(p-chlorobenzoyl)phenoxy]-2-methylpropanoate (Drug bank, USP2019)
Formule chimique	C ₁₉ H ₁₉ N ₇ O ₆ (USP 2019)	C ₃₃ H ₃₅ FN ₂ O ₅ (USP 2019)	C ₂₀ H ₂₁ ClO ₄ (USP 2019)
pKa	4,65 ; 6,75 et 9,00 (Caude 1989)	4.46 (Drug bank)	-4,9 (Drug bank)
Point de fusion	250°C (O'Neil 2001)	176 °C (Drug bank, USP2019)	79°C-82°C (Drug bank, USP2019)
Solubilité dans l'eau (mg/ml)	0,0016 mg/ml (O'Neil 2001)	Practically insoluble 0.00063 mg/ml (Drug bank)	Practically insoluble 0.000707 mg/ml (Drug bank)

Annexe 7 : Comparaison de deux moyennes (TG/CHOL)_test de student.

Efficacité comparative TG [Lot3 Vs Lot4]

Test de Student Welch [hétéroscédasticité]

	Lot3	Lot4	
Moyenne	0,35333333	0,508	H0: Efficacité similaire
Ecart Type	0,10187138	0,14344	H1: Meilleure efficacité du lot 3
Student calculé	2,77996863		Test uni latéral
Student tabulé à 5%(18;0,05)	2,44500562		H0 non confirmé
			H1 : Confirmée

Efficacité comparative Cholesterol [Lot3 Vs Lot4]

Test de Student Welch [hétéroscédasticité]

	Lot3	Lot4	
Moyenne	0,62444444	0,62444	H0: Efficacité similaire
Ecart Type	0,10111722	0,10925	H1: Meilleure efficacité du lot 3
Student calculé	0		Test uni latéral
Student tabulé à 5%(18;0,05)	2,44500562		H0 confirmé (Efficacité similaire)

Annexe 8 : Fiche technique de l'alginate de sodium.



Certificate Of Analysis

SODIUM ALGINATE (low viscosity)
Laboratory Reagent

Manufacture date : 06/2018
Expiry date : 06/2023

Product code: 319790500
C.A.S. : 9005-38-3
Batch N°: 319790500-0618-011

Analysis :

	<i>Specifications:</i>	<i>Results:</i>
Description	Creamish yellow coloured powder	Creamish yellow coloured powder
Viscosity of 1% W/V solution at 25°C	5.5 ± 2.0 cps	5.4 cps
Heavy metals (as Pb)	Max.0.003%	<0.003%
Chloride (Cl)	Max.1%	0.9%
E.coli & salmonella	Absent	Absent

Complies with EP standard.

The product is certified by *Biochem* Chemopharma laboratory.

BIOCHEM Chemopharma France

Tél: +33(3)86.27.24.96

E-m ail: technical@biochemopharm a.fr

Annexe 9 : Préparations des solutions tampons.

La préparation des solutions tampons des milieux digestifs simulés se fait telle qu'elle est indiquée dans la pharmacopée américaine USP.

Les solutions tampons allant de pH = 1,2 à pH=10,0 peuvent être préparées en mélangeant d'autres solutions. Les volumes indiqués sont pour un volume total de 200 ml de solution tampon.

- 1.** Pour la préparation du tampon acide à pH=1,2, en terme anglo-saxon SGF (Simulated Gastric Fluid) : Placez 50 ml de la solution de chlorure de potassium 0,2 M (dissoudre 14.91 g de KCl dans l'eau et compléter jusqu'à 1000 ml). Dans une fiole jaugée de 200 ml, ajoutez le volume spécifié de la solution d'acide chlorhydrique (85 ml, 0,2M), puis compléter avec de l'eau au volume indiqué plus haut.

- 2.** Pour la préparation du tampon phosphate à pH=6,8, en terme anglo-saxon SIF (Simulated Intestinal Fluid) : Placez 50 ml de la solution de phosphate de potassium monobasique 0.2 M (dissoudre 27.22 g de phosphate de potassium monobasique (KH₂PO₄) dans l'eau et compléter le volume à 1000 ml) dans une fiole jaugée de 200 ml, ajoutez le volume spécifié de la solution d'hydroxyde de sodium (22,4 ml, 0,2 M), puis compléter avec de l'eau jusqu'à atteindre 200 ml.

Annexe 10 : Validation du procédé de lyophilisation.

Paramètres du procédés

	Congélation	Dessiccation I	Dessiccation II
Température process (°C)	-4	-76	-20
Température produit (°C)	A surveiller	A surveiller	A surveiller
Pression (mbar)	1000	0,001	1
Temps (heure)	24	2	1

Attributs qualité du produit

Paramètre	Mesure	Cible / V.Nominale	EMT
Etat physique (Polymorphisme)	DSC	NA	NA
Aspect macroscopique	Visuelle & effet mémoire [Volume] en mL		15 ± 1,00
HR	Balance IR (%)		2 ± 1,00
Temps de reconstitution	Mesure de temps (Secondes)		30 ± 10,00
Masse	Mesure de la masse (g)		11,2 ± 0,50
Densité apparente	Masse/Volume (g/mL)		0,75 ± 0,10
pH	Mesure après reconstitution		7 ± 0,50
Taille de particules	Microscopé à caméra (Microns)		365 ± 50,00
Taux de dissolution	Cinétique de disso. SOTAX (%)		90 ± 15,00

Capabilité process

	Cp	CpK	Validation
T_Cong	3,29	0,81	Bonne capabilité
T_DI	3,27	0,82	Bonne capabilité
T_DII	3,14	0,78	Bonne capabilité
T_Cong_Prod	2,46	0,61	Procédé capable à contrôler
T_DI_Prod	1,99	0,49	Procédé capable à contrôler
T_DII_Prod	3,68	0,91	Bonne capabilité
P_Cong	2,39	0,59	Procédé capable à contrôler
P_DI	2,71	0,68	Bonne capabilité
P_DII	3,33	0,82	Bonne capabilité

Essais & contrôle produit

Réalisé par KESSAL FETTA

Répétition	HR	Masse	Volume	Densité	Granulométrie	Reconstitution	pH	Dissolution
n.1	1,75	11,17	14,92	0,75	359	35	7,07	102,3
n.2	1,70	11,30	14,97	0,75	365	33	7,16	102,5
n.3	1,72	11,30	14,71	0,77	366	34	7,08	102,1
n.4	1,80	11,24	15,05	0,75	361	34	7,03	97,4
n.5	1,74	11,20	14,73	0,76	369	35	6,91	105,3
n.6	1,72	11,10	15,04	0,74	363	35	7,02	99,7
n.7	1,90	11,22	14,62	0,77	364	36	7,07	102,8
n.8	1,67	11,39	14,98	0,76	361	34	6,90	98,4
n.9	1,82	11,26	14,51	0,78	352	34	6,94	100,3
n.10	1,62	11,11	14,55	0,76	358	36	6,91	99,4
n.11	1,77	11,11	14,72	0,75	354	35	7,00	98,7
n.12	1,79	11,12	14,87	0,75	364	35	7,08	100,9
n.13	1,65	11,13	15,02	0,74	363	36	7,11	99,3
n.14	1,82	11,19	15,29	0,73	367	34	7,11	99,5
n.15	1,83	11,17	14,43	0,77	354	36	6,79	102,4
n.16	1,79	11,09	15,03	0,74	371	34	7,12	102,7
n.17	1,84	11,07	14,60	0,76	358	34	6,99	101,6
n.18	1,89	11,23	14,84	0,76	356	34	7,06	99,1
n.19	1,74	11,22	14,74	0,76	363	36	7,14	102,8
n.20	1,68	11,12	14,88	0,75	360	34	6,87	101,1
n.21	1,88	11,15	14,90	0,75	363	35	6,94	96,0
n.22	1,79	11,24	14,76	0,76	363	35	6,99	101,4
n.23	1,67	11,21	14,93	0,75	365	35	7,06	103,7
n.24	1,87	11,15	14,81	0,75	369	35	7,17	100,7
n.25	1,82	11,12	14,39	0,77	355	34	6,98	100,5
n.26	1,79	11,20	14,83	0,76	365	36	7,14	101,1
n.27	1,93	11,17	14,76	0,76	371	33	7,04	100,2
n.28	1,89	11,42	15,00	0,76	362	35	7,03	101,9
n.29	1,83	11,34	14,92	0,76	369	35	7,08	100,4
n.30	1,71	11,21	14,85	0,76	362	36	7,02	97,6
Moyenne	1,78	11,20	14,82	0,76	362	35	7,03	100,7
Ecart type	0,08	0,09	0,20	0,01	5,16	0,85	0,09	2,01
Cp	4,09	1,91	1,66	3,12	3,23	3,94	1,79	2,48
CpK	3,19	1,91	1,36	2,84	3,06	2,08	1,69	0,71
Validation	Excellent	Excellent	Capable à contrôler	Excellent	Excellent	Excellent	Excellent	Capable à contrôler

Réinitialiser l'étude

Réinitialiser la matrice

Réinitialiser l'analyse

Lyo - CARTE DE CONTROLE

Localisation	Lab.Galénique	Date	17/07/2019	
Paramètre	Température cong.	Responsable	KESSAL FETTA	
Cible ou valeur nominale	-4	EMT	0,5	Réfrenciel SOP
Tolérance Max.	-3,5			
Tolérance Min.	-4,5			
Périodicité	Heure	Enregistrements	24	Points 10

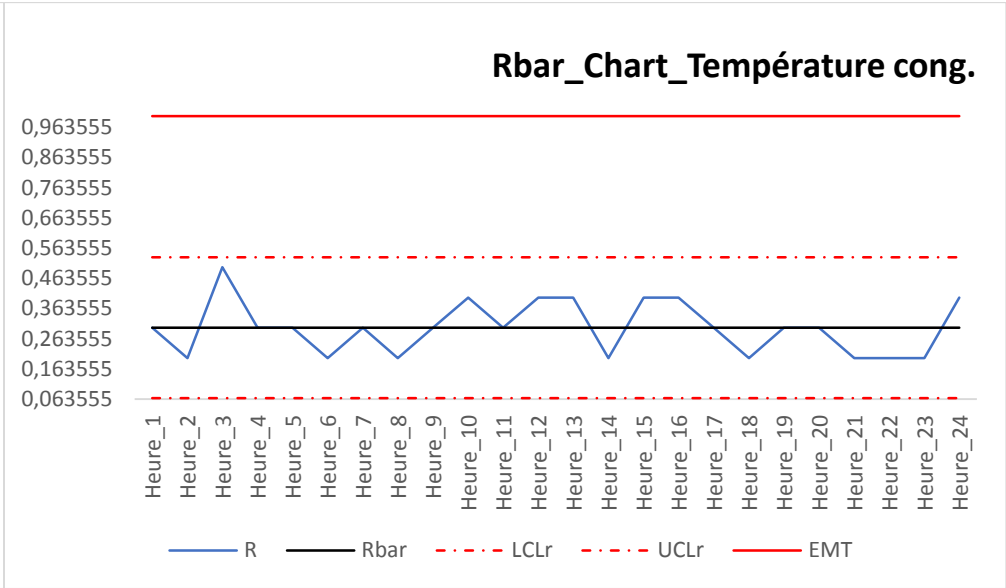
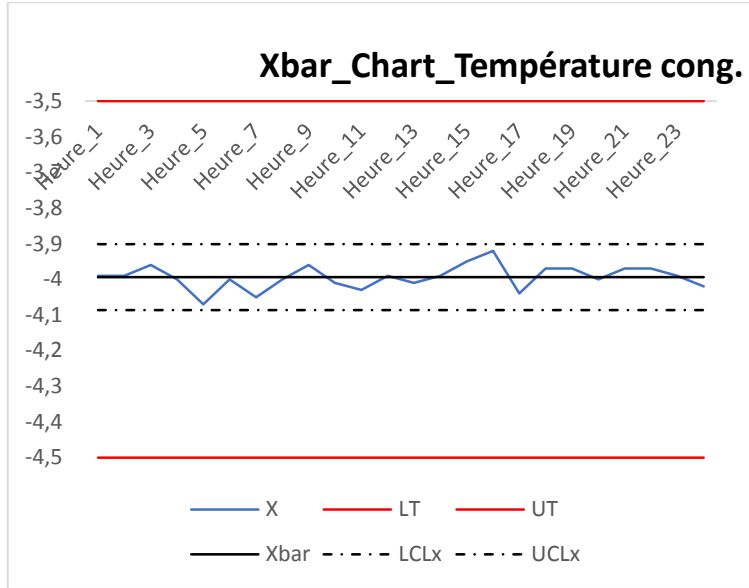
	Xbar	Rbar
LIC	-4,08615	0,0669
LSC	-3,90135	0,5331
Moyenne	-3,99375	0,3

Construire la matrice

Analyser

Heure_1	Heure_2	Heure_3	Heure_4	Heure_5	Heure_6	Heure_7	Heure_8	Heure_9	Heure_10	Heure_11	Heure_12
-4,0	-4,1	-4,1	-4,1	-4,3	-3,9	-4,0	-4,0	-4,1	-4,0	-4,1	-3,9
-4,1	-3,9	-3,9	-4,1	-4,0	-3,9	-4,1	-3,9	-4,0	-4,0	-4,1	-4,0
-3,8	-4,0	-4,2	-4,1	-4,2	-4,0	-4,0	-3,9	-4,1	-4,1	-4,1	-4,0
-4,1	-3,9	-4,1	-4,1	-4,1	-4,0	-4,0	-4,0	-4,1	-3,9	-3,9	-4,1
-4,0	-3,9	-3,8	-4,0	-4,1	-4,1	-4,1	-4,1	-4,1	-3,8	-3,9	-3,8
-3,9	-4,1	-4,0	-3,8	-4,0	-4,0	-4,2	-4,1	-3,8	-4,1	-4,0	-4,1
-4,1	-4,0	-4,1	-4,1	-4,0	-4,0	-4,1	-4,0	-3,9	-4,2	-4,1	-3,9
-3,9	-4,0	-3,8	-3,8	-4,0	-4,1	-3,9	-4,0	-3,9	-4,1	-4,2	-4,2
-4,0	-4,0	-3,9	-3,9	-4,0	-3,9	-4,0	-4,1	-3,9	-4,0	-3,9	-3,9
-4,0	-4,0	-3,7	-4,0	-4,0	-4,1	-4,1	-3,9	-4,0	-3,8	-4,0	-4,0

Heure_13	Heure_14	Heure_15	Heure_16	Heure_17	Heure_18	Heure_19	Heure_20	Heure_21	Heure_22	Heure_23	Heure_24
-4,1	-4,1	-4,0	-3,8	-4,0	-4,0	-4,0	-4,0	-3,9	-4,0	-4,0	-4,0
-4,0	-4,0	-3,8	-4,2	-4,0	-4,0	-4,0	-4,1	-3,9	-4,1	-4,1	-3,8
-4,1	-4,1	-3,9	-3,9	-4,0	-4,0	-4,1	-4,1	-4,0	-4,0	-4,0	-4,0
-4,0	-4,0	-4,1	-3,9	-4,0	-3,9	-3,9	-4,0	-4,1	-4,0	-3,9	-4,1
-3,9	-4,0	-4,0	-3,9	-4,1	-3,9	-3,9	-4,0	-4,0	-4,0	-4,0	-4,0
-4,2	-4,0	-4,0	-4,0	-3,9	-4,1	-4,0	-4,0	-3,9	-3,9	-4,0	-3,9
-4,0	-3,9	-3,7	-3,8	-4,0	-3,9	-4,0	-4,0	-4,1	-3,9	-3,9	-4,0
-3,8	-3,9	-4,0	-3,9	-4,1	-4,0	-3,8	-3,8	-3,9	-4,0	-4,0	-4,1
-4,0	-3,9	-4,0	-3,8	-4,2	-4,0	-4,0	-3,9	-3,9	-3,9	-4,0	-4,2
-4,0	-4,0	-4,0	-4,0	-4,1	-3,9	-4,0	-4,1	-4,0	-3,9	-4,0	-4,1



Réinitialiser l'étude

Réinitialiser la matric

Réinitialiser l'analyse

Lyo - CARTE DE CONTROLE

Localisation	Lab.Galénique	Date	17/07/2019	
Paramètre	T° Dessic.I	Responsable	KESSAL FETTA	
Cible ou vaeu	-76	EMT	0,5	Réfrenciel SOP
Tolérance Ma:	-75,5			
Tolérance Mir	-76,5			
Périodicité	tps(5min)	Enregistremen	24	Points 10

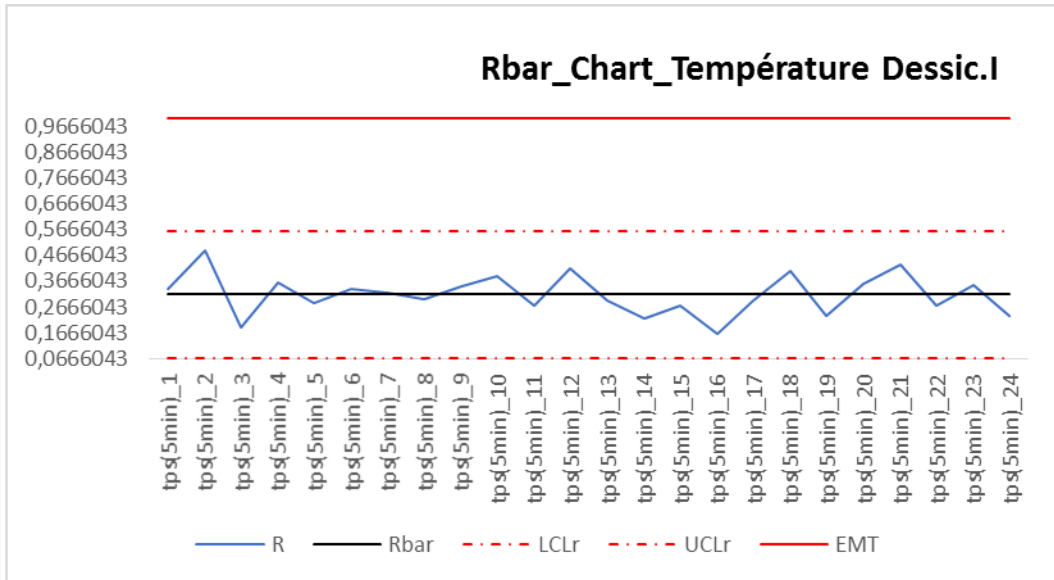
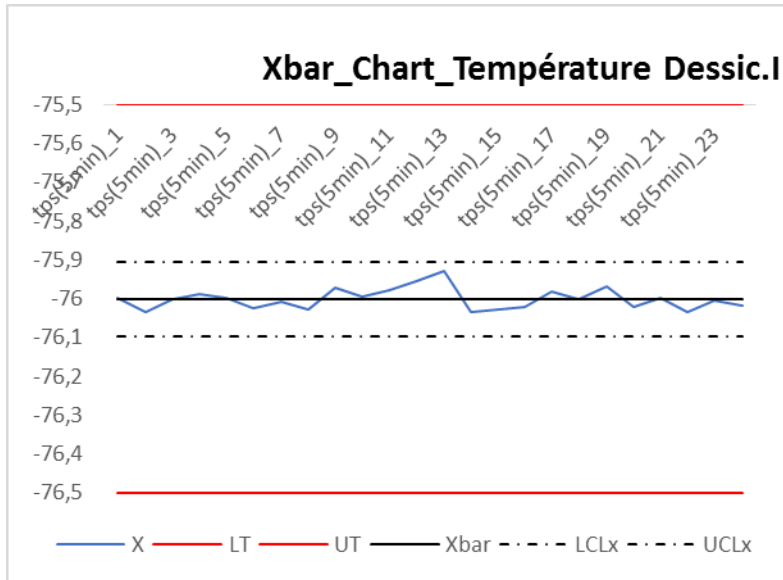
	Xbar	Rbar
LIC	-76,09782467	0,070109827
LSC	-75,90415807	0,558677859
Moyenne	-76,00099137	0,314393843

Construire la matrice

Analyser

tps(5min)_1	tps(5min)_2	tps(5min)_3	tps(5min)_4	tps(5min)_5	tps(5min)_6	tps(5min)_7	tps(5min)_8	tps(5min)_9	tps(5min)_10	tps(5min)_11	tps(5min)_12
-76,0	-75,8	-76,0	-76,1	-76,0	-75,9	-76,0	-76,1	-75,8	-76,0	-76,0	-75,9
-76,1	-76,0	-76,0	-76,0	-75,9	-76,0	-76,0	-76,1	-75,9	-76,0	-76,0	-75,8
-76,0	-76,0	-75,9	-76,0	-76,0	-76,2	-76,2	-75,9	-76,0	-75,7	-76,0	-75,9
-76,1	-75,9	-76,0	-76,0	-76,0	-76,1	-76,1	-76,1	-76,1	-76,1	-76,1	-76,2
-75,8	-76,0	-76,1	-76,1	-76,0	-76,0	-76,0	-75,9	-76,1	-75,9	-75,9	-76,1
-76,0	-76,1	-76,0	-75,8	-76,1	-76,0	-76,0	-76,1	-75,9	-76,1	-75,9	-76,0
-76,0	-76,2	-75,9	-76,0	-75,9	-75,9	-75,8	-75,9	-76,0	-76,0	-76,1	-75,9
-75,9	-76,0	-75,9	-76,0	-76,1	-76,0	-76,0	-76,2	-75,9	-76,1	-76,0	-75,9
-76,2	-76,2	-76,1	-76,0	-75,9	-76,2	-75,9	-76,0	-76,0	-76,0	-75,9	-75,9
-75,9	-76,3	-76,0	-76,0	-76,1	-76,0	-76,1	-75,9	-76,0	-76,0	-75,9	-76,0

tps(5min)_1	tps(5min)_1	tps(5min)_1	tps(5min)_1	tps(5min)_1	tps(5min)_1	tps(5min)_1	tps(5min)_2	tps(5min)_2	tps(5min)_2	tps(5min)_2	tps(5min)_2
-76,1	-76,1	-76,2	-76,0	-76,1	-76,1	-76,0	-75,9	-75,9	-75,9	-76,2	-75,9
-76,0	-75,9	-76,2	-76,1	-76,1	-75,8	-75,9	-75,9	-75,8	-76,0	-76,0	-76,1
-76,0	-76,1	-76,0	-76,1	-76,1	-75,9	-76,1	-75,9	-76,3	-76,0	-75,8	-75,9
-76,0	-75,9	-76,0	-75,9	-75,8	-76,2	-76,0	-75,9	-75,9	-76,1	-75,9	-76,1
-75,8	-76,0	-76,0	-76,0	-75,9	-76,1	-75,9	-76,1	-76,0	-75,9	-75,9	-76,0
-76,0	-76,1	-76,0	-76,0	-76,0	-76,1	-76,1	-76,1	-76,0	-76,2	-76,0	-76,0
-75,8	-76,1	-76,0	-76,0	-75,9	-76,0	-75,8	-76,1	-76,1	-75,9	-76,1	-76,1
-75,9	-75,9	-75,9	-75,9	-76,0	-75,8	-76,1	-76,0	-76,0	-76,1	-76,1	-75,9
-75,9	-76,1	-76,0	-76,0	-75,9	-76,1	-75,9	-76,2	-76,2	-76,1	-75,9	-76,1
-75,9	-76,0	-76,1	-76,1	-76,0	-76,0	-75,9	-76,1	-75,9	-76,1	-76,1	-76,0



Réinitialiser l'étude

Réinitialiser la matrice

Réinitialiser l'analyse

Lyo - CARTE DE CONTROLE

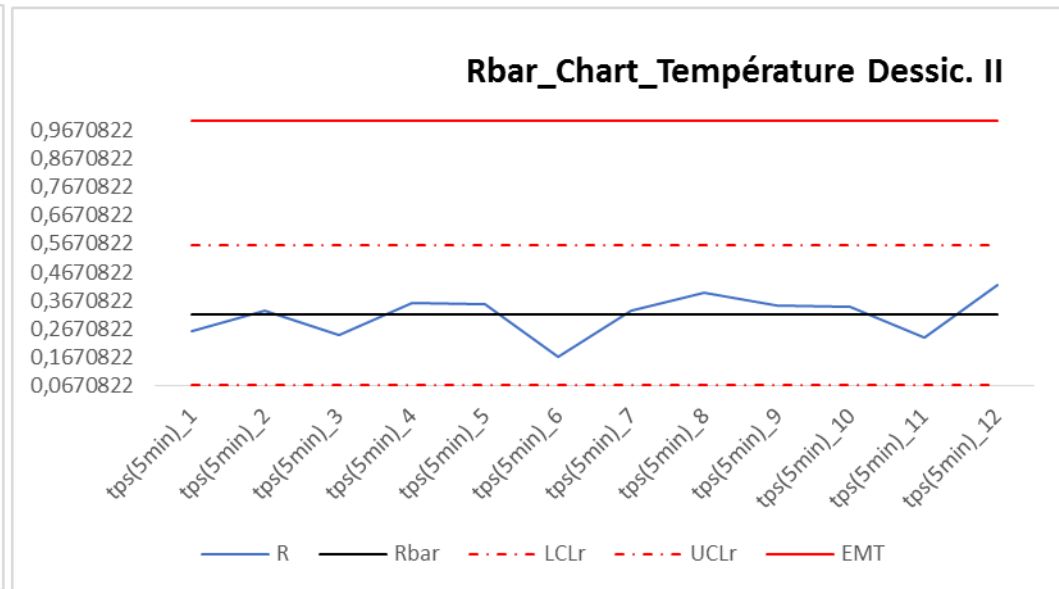
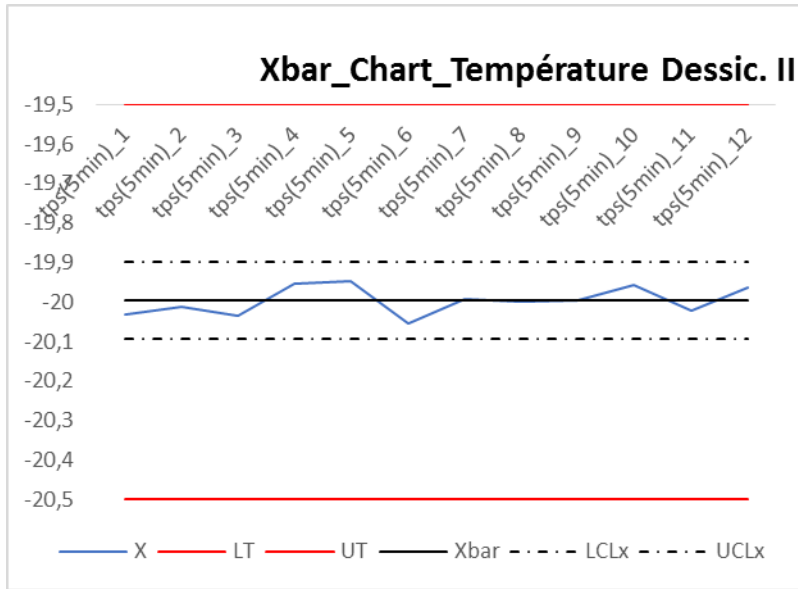
Localisation	Lab.Galénique	Date	17/07/2019	
Paramètre	T° Dessic. II	Responsable	KESSAL FETTA	
Cible ou valeur	-20	EMT	0,5	Réfrenciel SOP
Tolérance Max	-19,5			
Tolérance Min	-20,5			
Périodicité	tps(5min)	Enregistremen	12	Points 10

	Xbar	Rbar
LIC	-20,09423769	0,070612844
LSC	-19,89918159	0,562686207
Moyenne	-19,99670964	0,316649526

Construire la matrice

Analyser

tps(5min)_1	tps(5min)_2	tps(5min)_3	tps(5min)_4	tps(5min)_5	tps(5min)_6	tps(5min)_7	tps(5min)_8	tps(5min)_9	tps(5min)_10	tps(5min)_11	tps(5min)_12
-20,1	-20,2	-20,0	-20,0	-20,1	-20,1	-19,9	-20,0	-20,1	-19,8	-19,9	-20,0
-20,0	-20,0	-20,0	-20,1	-20,0	-20,0	-20,0	-20,0	-19,8	-19,9	-20,1	-20,1
-19,9	-20,0	-19,9	-19,9	-19,9	-20,1	-19,9	-20,1	-20,2	-19,8	-20,0	-20,2
-20,0	-19,8	-20,1	-20,0	-20,1	-20,1	-20,0	-20,2	-19,9	-20,0	-20,0	-20,0
-20,0	-19,9	-20,1	-20,0	-19,8	-20,0	-20,0	-19,8	-20,0	-19,8	-20,0	-20,0
-20,2	-20,0	-20,1	-19,8	-19,9	-20,1	-19,9	-19,9	-20,0	-19,8	-20,0	-19,8
-20,0	-20,1	-20,1	-19,8	-19,9	-20,1	-20,2	-20,2	-19,9	-20,1	-20,0	-20,0
-20,1	-20,0	-20,0	-19,9	-19,9	-20,1	-20,1	-19,9	-20,0	-20,1	-20,2	-19,7
-20,1	-20,0	-19,9	-20,0	-19,8	-20,0	-20,0	-19,8	-20,0	-20,1	-19,9	-20,0
-20,0	-20,1	-20,1	-20,1	-19,9	-20,1	-20,0	-20,2	-20,0	-20,0	-20,2	-20,0



Réinitialiser l'étude

Réinitialiser la matrice

Réinitialiser l'analyse

Lyo - CARTE DE CONTROLE

Localisation	Lab.Galénique	Date	17/07/2019	
Paramètre	T° cong. Produit	Responsable	KESSAL FETTA	
Cible ou valeur nominale	-4	EMT	2	Réfrenciel SOP
Tolérance Max.	-2			
Tolérance Min.	-6			
Périodicité	Heure	Enregistrements	24	Points 10

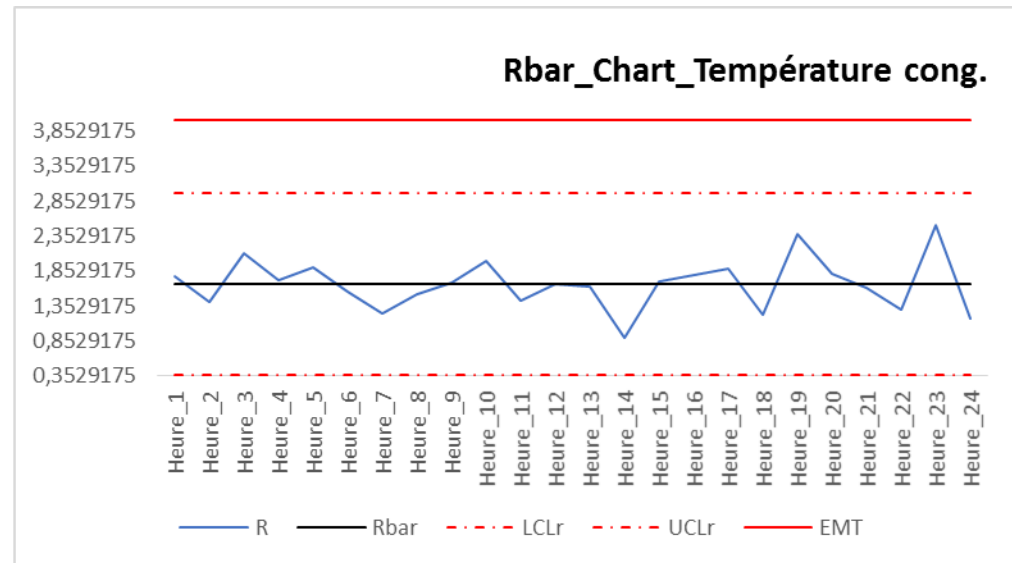
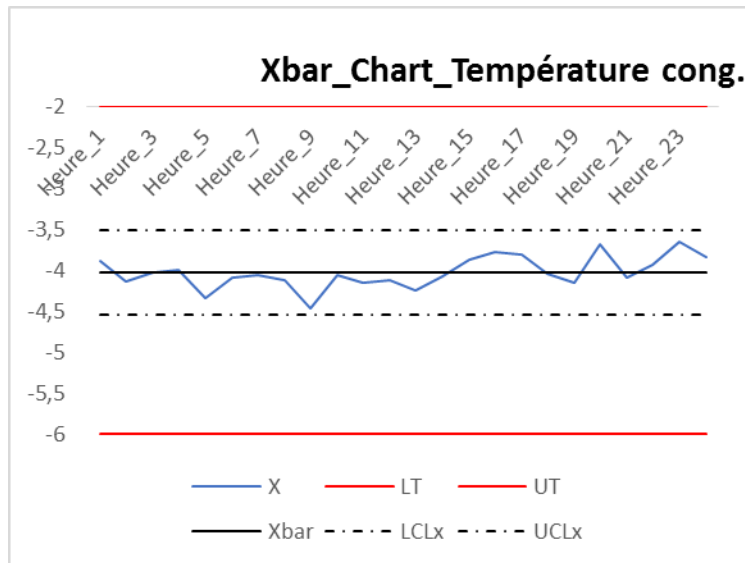
	Xbar	Rbar
LIC	-4,536568223	0,371492109
LSC	-3,510383743	2,960275683
Moyenne	-4,023475983	1,665883896

Construire la matrice

Analyser

Heure_1	Heure_2	Heure_3	Heure_4	Heure_5	Heure_6	Heure_7	Heure_8	Heure_9	Heure_10	Heure_11	Heure_12
-4,0	-3,8	-2,8	-4,2	-4,3	-3,6	-4,1	-3,7	-4,9	-3,4	-4,6	-3,8
-3,4	-4,4	-4,4	-3,1	-5,3	-4,6	-4,3	-3,3	-4,8	-5,0	-4,7	-4,5
-3,8	-4,1	-4,3	-4,2	-3,5	-4,9	-4,4	-3,8	-4,6	-4,1	-4,0	-3,7
-3,8	-4,0	-4,6	-3,5	-4,4	-4,5	-4,0	-3,8	-4,1	-4,0	-4,7	-3,8
-4,0	-4,8	-4,9	-4,3	-4,6	-3,8	-3,5	-4,0	-5,1	-4,7	-4,5	-4,0
-4,9	-4,1	-3,5	-3,9	-4,6	-4,5	-4,5	-4,6	-3,4	-3,6	-3,7	-4,6
-3,3	-4,3	-3,4	-4,8	-4,4	-3,7	-3,3	-3,9	-4,7	-3,9	-3,2	-3,0
-4,8	-3,4	-4,0	-4,3	-3,4	-3,8	-3,9	-4,8	-4,5	-3,0	-4,6	-4,7
-3,2	-4,0	-4,4	-3,9	-4,5	-3,3	-4,1	-4,6	-4,8	-4,3	-3,6	-4,6
-3,6	-4,4	-3,8	-3,8	-4,4	-4,2	-4,4	-4,8	-3,8	-4,5	-3,9	-4,6

Heure_13	Heure_14	Heure_15	Heure_16	Heure_17	Heure_18	Heure_19	Heure_20	Heure_21	Heure_22	Heure_23	Heure_24
-3,7	-3,6	-4,2	-3,4	-4,6	-4,3	-4,1	-4,1	-4,1	-4,0	-3,1	-4,2
-5,3	-4,1	-3,9	-3,4	-3,7	-3,9	-3,8	-4,2	-3,9	-4,0	-3,8	-4,3
-4,1	-4,0	-3,3	-3,6	-3,5	-3,7	-4,1	-3,3	-4,1	-3,6	-5,0	-4,2
-4,6	-4,2	-3,7	-4,3	-4,8	-4,6	-4,5	-4,8	-3,1	-3,9	-4,0	-3,7
-3,6	-3,6	-3,2	-4,5	-3,8	-4,6	-4,7	-3,3	-4,0	-3,4	-3,7	-4,0
-4,4	-4,1	-3,3	-3,4	-3,2	-4,2	-3,3	-3,8	-4,1	-3,3	-4,5	-3,1
-4,6	-4,4	-3,8	-4,7	-3,2	-3,4	-2,8	-2,9	-4,0	-4,2	-2,9	-3,7
-4,0	-4,3	-4,3	-2,9	-2,9	-4,2	-5,2	-3,0	-4,3	-4,6	-3,9	-3,5
-4,3	-4,5	-5,0	-3,6	-4,6	-3,7	-4,5	-4,0	-4,6	-3,9	-2,4	-4,0
-4,0	-4,0	-3,9	-4,1	-3,7	-3,8	-4,7	-3,3	-4,7	-4,4	-3,1	-3,6



Réinitialiser l'étude

Réinitialiser la matrice

Réinitialiser l'analyse

Lyo - CARTE DE CONTROLE

Localisation	Lab.Galénique	Date	17/07/2019	
Paramètre	T° Dessic. I_Prod.	Responsable	KESSAL FETTA	
Cible ou valeur	-76	EMT	15	Réfrenciel SOP
Tolérance Max	-61			
Tolérance Min.	-91			
Périodicité	tps(5min)	Enregistremen	24	Points 10

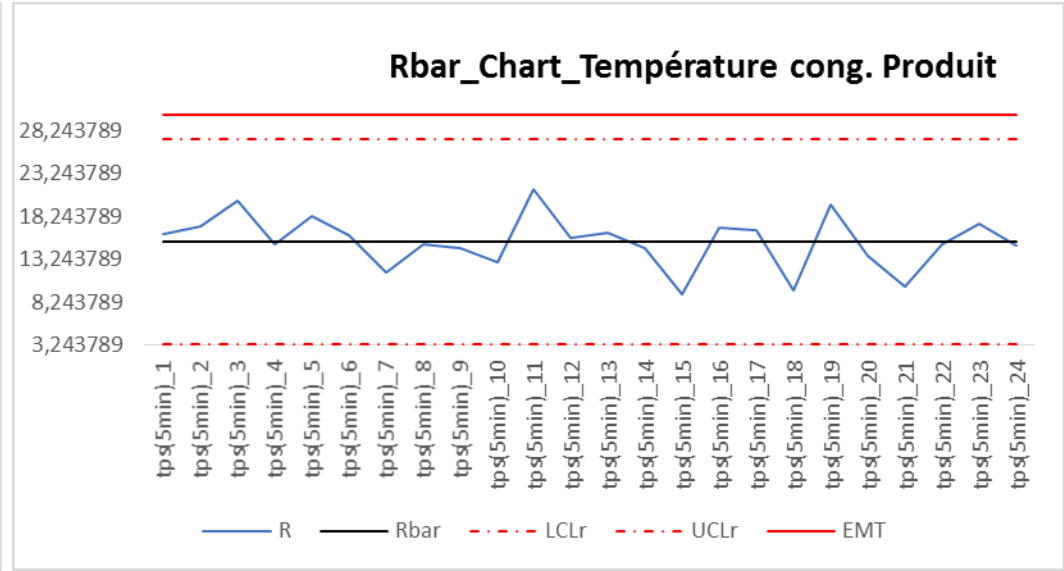
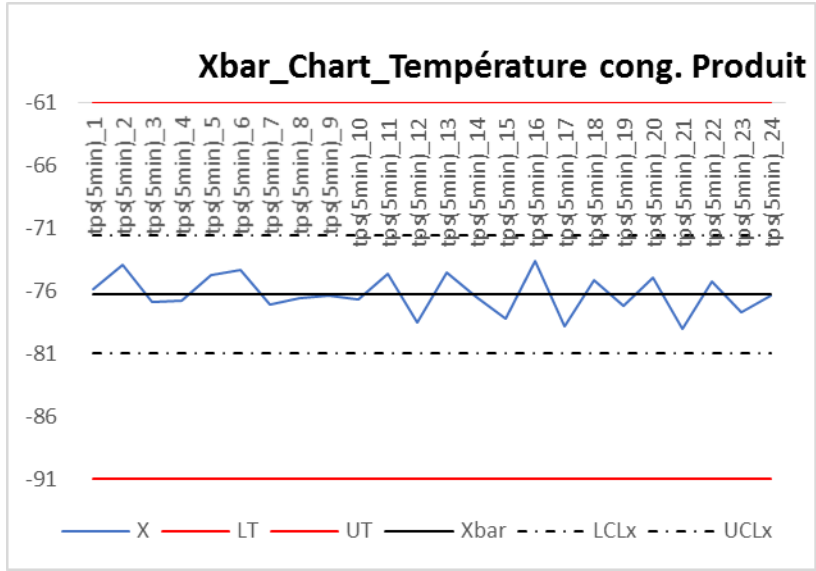
	Xbar	Rbar
LIC	-80,97206197	3,414514733
LSC	-71,54003921	27,20893579
Moyenne	-76,25605059	15,31172526

Construire la matrice

Analyser

tps(5min)_1	tps(5min)_2	tps(5min)_3	tps(5min)_4	tps(5min)_5	tps(5min)_6	tps(5min)_7	tps(5min)_8	tps(5min)_9	tps(5min)_10	tps(5min)_11	tps(5min)_12
-77,7	-73,2	-84,1	-78,2	-66,7	-77,1	-80,4	-77,0	-75,1	-80,2	-70,5	-70,8
-80,4	-72,5	-64,0	-79,7	-71,9	-75,7	-83,9	-79,4	-77,7	-81,8	-71,2	-78,0
-74,2	-77,5	-78,9	-76,4	-66,0	-76,6	-74,2	-73,2	-84,9	-82,3	-65,5	-77,7
-76,8	-66,5	-80,7	-83,9	-78,3	-77,3	-75,1	-71,9	-78,0	-74,3	-76,2	-79,9
-75,0	-71,1	-74,7	-78,9	-75,1	-77,1	-79,2	-86,8	-77,1	-72,8	-76,6	-81,9
-80,0	-79,1	-82,5	-71,5	-76,4	-80,7	-73,4	-74,3	-71,5	-77,2	-86,9	-80,0
-64,3	-81,6	-76,8	-74,7	-84,4	-69,0	-81,7	-78,5	-70,3	-76,6	-76,5	-86,6
-78,7	-79,5	-73,5	-68,9	-77,8	-64,7	-73,6	-73,1	-76,4	-78,5	-75,1	-75,0
-77,0	-73,8	-76,3	-81,0	-71,1	-74,9	-77,3	-74,5	-75,9	-73,7	-70,7	-83,6
-74,4	-64,6	-77,6	-74,9	-80,3	-70,4	-72,2	-77,6	-76,9	-69,4	-77,7	-71,8

tps(5min)_1	tps(5min)_1	tps(5min)_1	tps(5min)_1	tps(5min)_1	tps(5min)_1	tps(5min)_1	tps(5min)_2	tps(5min)_2	tps(5min)_2	tps(5min)_2	tps(5min)_2
-73,1	-82,5	-81,5	-69,0	-72,9	-75,0	-69,1	-70,8	-79,3	-69,3	-82,2	-69,2
-77,4	-79,3	-80,2	-77,1	-72,9	-76,1	-73,8	-83,4	-82,4	-67,7	-86,4	-77,9
-64,8	-76,1	-75,9	-79,5	-75,0	-70,0	-75,8	-75,6	-80,3	-81,2	-83,3	-78,0
-79,5	-75,2	-75,1	-74,9	-79,9	-74,9	-67,7	-73,1	-80,0	-77,7	-75,0	-83,1
-78,0	-80,6	-75,8	-71,6	-78,0	-79,5	-78,0	-72,1	-82,7	-80,1	-80,7	-75,8
-77,6	-81,3	-73,7	-81,5	-78,7	-78,4	-85,1	-77,1	-77,8	-80,8	-82,2	-68,8
-71,5	-69,0	-82,2	-71,4	-82,6	-71,8	-75,4	-76,9	-72,6	-75,0	-78,6	-74,4
-69,4	-68,0	-75,8	-66,7	-74,9	-77,4	-77,1	-71,3	-78,4	-68,0	-70,3	-83,3
-81,2	-74,5	-78,9	-79,6	-83,8	-69,9	-83,2	-69,7	-74,9	-70,0	-69,0	-70,1
-73,1	-78,4	-83,0	-64,6	-89,5	-78,7	-87,2	-80,0	-81,8	-82,7	-69,0	-83,6



Réinitialiser l'étude

Réinitialiser la matrice

Réinitialiser l'analyse

Lyo - CARTE DE CONTROLE

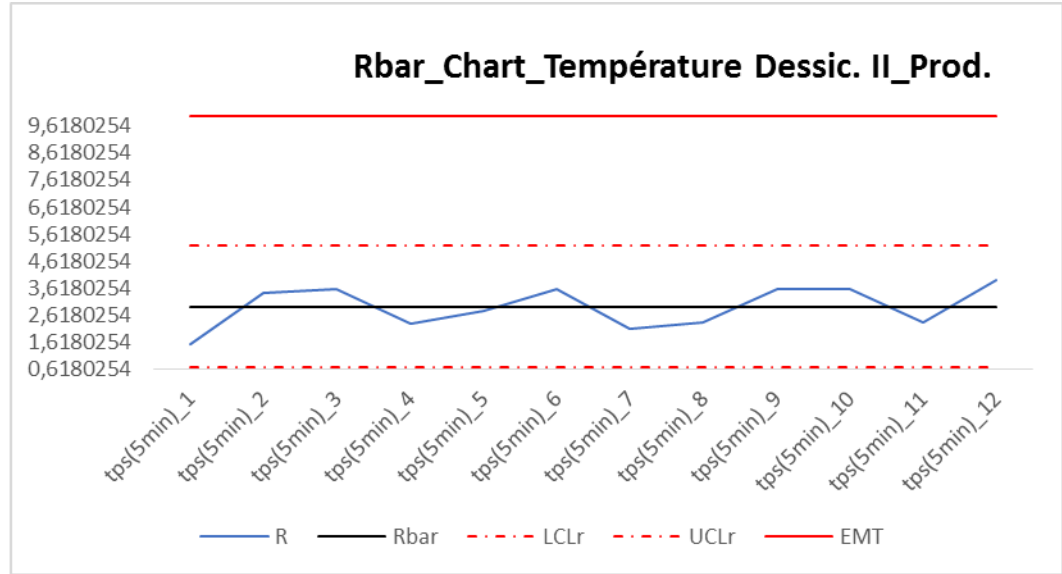
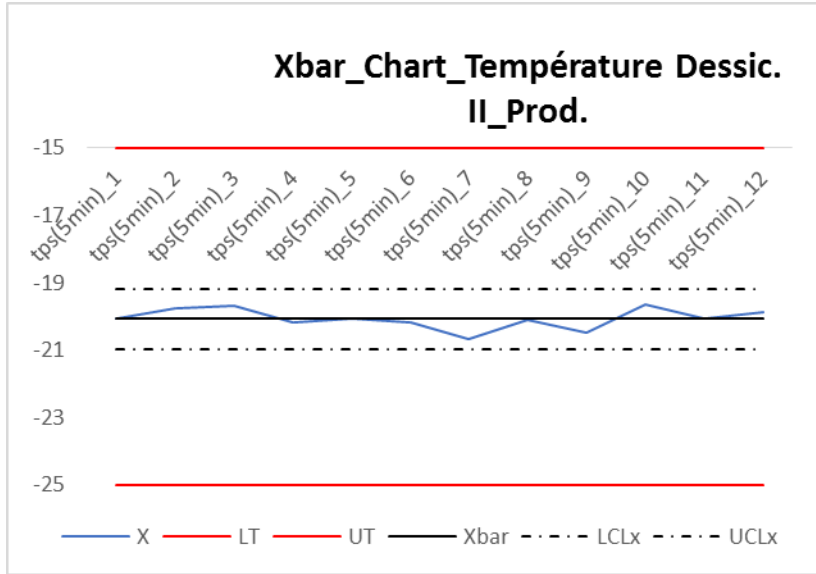
Localisation	Lab.Galénique	Date	17/07/2019	
Paramètre	T° Dessic. II_Prod.	Responsable	KESSAL FETTA	
Cible ou valeur	-20	EMT	5	Réfrenciel SOP
Tolérance Max	-15			
Tolérance Min.	-25			
Périodicité	tps(5min)	Enregistremen	12	Points 10

	Xbar	Rbar
LIC	-20,96542075	0,650553067
LSC	-19,1683773	5,184003587
Moyenne	-20,06689903	2,917278327

Construire la matrice

Analyser

tps(5min)_1	tps(5min)_2	tps(5min)_3	tps(5min)_4	tps(5min)_5	tps(5min)_6	tps(5min)_7	tps(5min)_8	tps(5min)_9	tps(5min)_10	tps(5min)_11	tps(5min)_12
-19,7	-19,7	-18,7	-20,2	-20,7	-20,2	-20,8	-19,1	-18,4	-21,6	-21,2	-20,3
-20,6	-20,1	-20,2	-20,0	-21,9	-20,7	-21,5	-19,3	-19,9	-20,0	-20,4	-20,3
-20,1	-19,7	-18,4	-20,4	-19,8	-20,4	-21,2	-19,6	-19,1	-19,1	-21,0	-19,7
-20,6	-20,3	-20,1	-19,1	-19,5	-19,4	-20,9	-20,9	-20,3	-19,5	-18,9	-19,9
-19,1	-19,8	-21,9	-20,4	-20,1	-18,3	-19,5	-20,0	-21,5	-18,7	-19,1	-19,4
-20,2	-22,0	-19,8	-19,7	-19,1	-20,4	-21,5	-21,0	-21,0	-20,3	-20,5	-17,5
-20,1	-18,9	-18,3	-21,4	-19,4	-19,8	-19,9	-21,4	-20,6	-19,7	-20,1	-21,4
-19,6	-18,7	-19,0	-20,9	-19,9	-19,5	-21,2	-19,1	-20,4	-18,0	-20,1	-20,5
-20,7	-18,5	-20,6	-20,1	-20,5	-21,9	-21,0	-20,8	-21,6	-19,5	-19,6	-20,2
-20,0	-19,8	-19,8	-19,6	-19,6	-21,3	-19,4	-19,8	-22,0	-20,1	-20,0	-19,7



Réinitialiser l'étude

Réinitialiser la matrice

Réinitialiser l'analyse

Lyo - CARTE DE CONTROLE

Localisation	Lab.Galénique	Date	17/07/2019		
Paramètre	Pression cong.	Responsable	KESSAL FETTA		
Cible ou valeur nomina	1000	EMT	20	Réfrenciel	SOP
Tolérance Max.	1020				
Tolérance Min.	980				
Périodicité	Heure	Enregistrements	24	Points	10

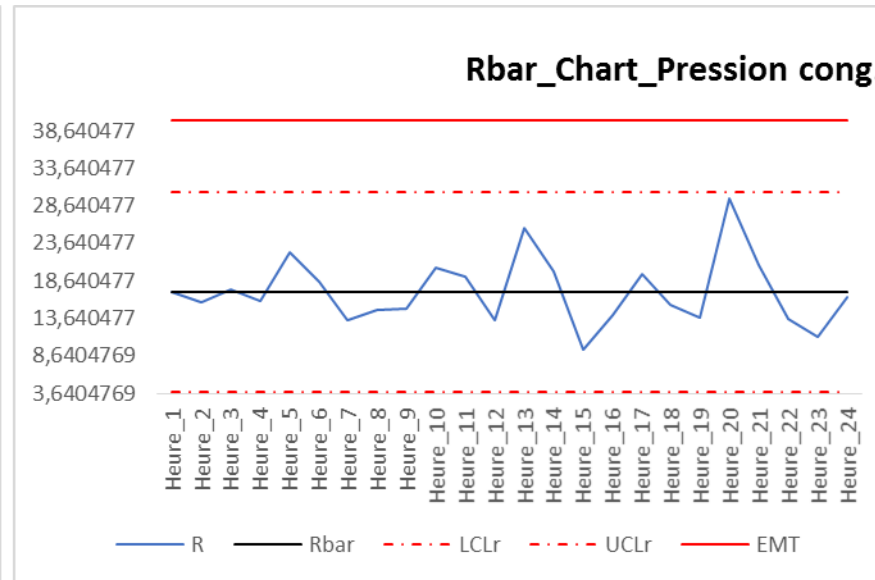
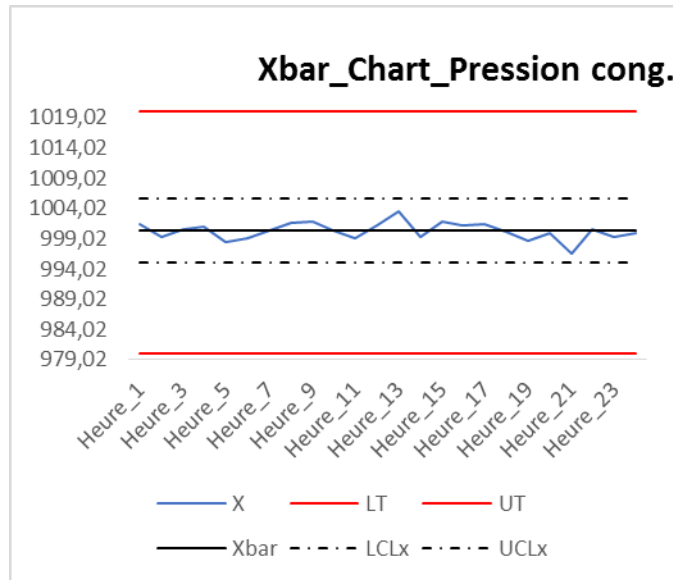
	Xbar	Rbar
LIC	994,9852426	3,832080942
LSC	1005,570722	30,536358
Moyenne	1000,277982	17,18421947

Construire la matrice

Analyser

Heure_1	Heure_2	Heure_3	Heure_4	Heure_5	Heure_6	Heure_7	Heure_8	Heure_9	Heure_10	Heure_11	Heure_12
1007	997	1001	998	997	992	1001	996	993	998	996	998
1002	1004	997	1003	987	994	998	998	997	996	1011	1005
990	996	993	997	994	999	995	1011	1008	989	992	1006
999	997	1004	1002	994	998	1001	1011	1008	1010	1002	994
1007	1010	996	1002	1005	1010	1002	1004	1003	1000	995	1002
998	994	999	992	1001	994	1006	998	1000	1008	994	1006
996	994	1010	1003	996	1000	1001	998	1001	999	1005	1007
1003	1002	996	998	1009	995	997	997	1008	1003	998	1001
1004	996	1007	1005	998	1002	995	1006	1001	994	995	996
1007	1003	1004	1008	1003	1006	1008	997	998	1007	1004	998

Heure_13	Heure_14	Heure_15	Heure_16	Heure_17	Heure_18	Heure_19	Heure_20	Heure_21	Heure_22	Heure_23	Heure_24
1007	1003	1006	998	1002	1009	1002	997	999	995	1002	1005
1001	1009	997	1002	1000	1001	993	994	995	1008	995	996
997	998	1001	1000	1011	996	999	992	1003	999	1003	999
991	995	1004	1008	998	996	1000	1014	990	1005	996	1001
1011	995	1006	1004	1007	1000	1002	985	1007	999	994	1010
1002	999	1001	1000	997	1002	997	1014	1003	1000	1004	997
1000	996	999	994	1002	1001	1005	1006	986	999	993	1002
1017	1005	1006	1004	1012	1002	1000	994	992	999	1003	995
1009	1002	997	995	993	1001	998	998	988	1003	1004	993
999	989	1003	1006	993	994	991	1005	1003	999	1000	1002



Réinitialiser l'étude

Réinitialiser la matrice

Réinitialiser l'analyse

Lyo - CARTE DE CONTROLE

Localisation	Lab.Galénique	Date	17/07/2019		
Paramètre	Pression Desic. I	Responsable	KESSAL FETTA		
Cible ou valeur nominale	0,001	EMT	0,0002	Réfrenciel	SOP
Tolérance Max.	0,0012				
Tolérance Min.	0,0008				
Périodicité	tps(5min)	Enregistrements	24	Points	10

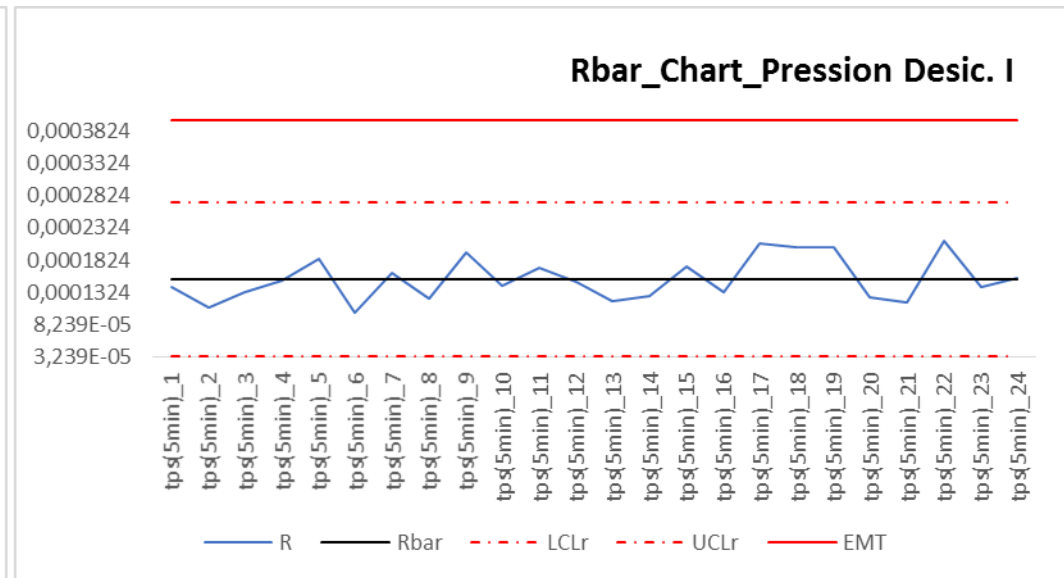
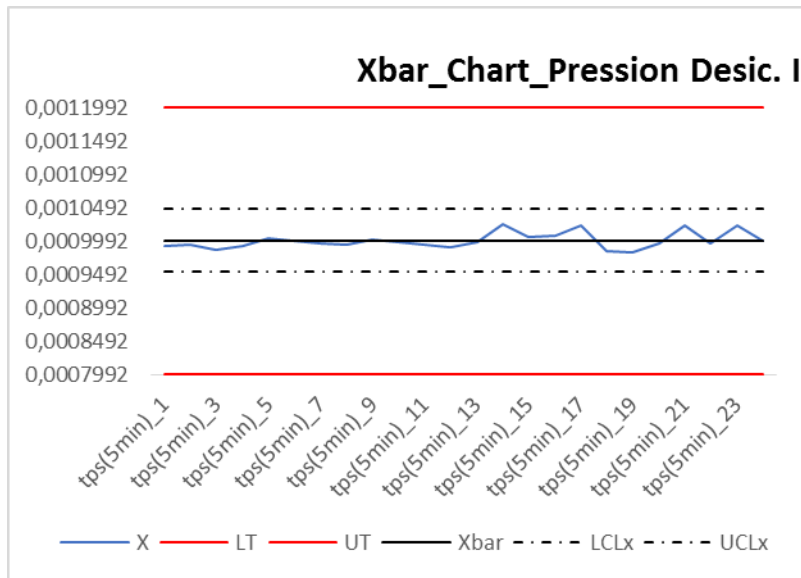
	Xbar	Rbar
LIC	0,000953025	3,40903E-05
LSC	0,001047194	0,000271653
Moyenne	0,001000109	0,000152871

Construire la matrice

Analyser

tps(5min)_1	tps(5min)_2	tps(5min)_3	tps(5min)_4	tps(5min)_5	tps(5min)_6	tps(5min)_7	tps(5min)_8	tps(5min)_9	tps(5min)_10	tps(5min)_11	tps(5min)_12
0,0011	0,0010	0,0010	0,0009	0,0010	0,0010	0,0010	0,0010	0,0011	0,0010	0,0010	0,0010
0,0009	0,0010	0,0009	0,0010	0,0009	0,0010	0,0011	0,0010	0,0010	0,0010	0,0010	0,0009
0,0010	0,0010	0,0010	0,0010	0,0010	0,0009	0,0010	0,0010	0,0010	0,0010	0,0011	0,0010
0,0010	0,0010	0,0010	0,0010	0,0011	0,0010	0,0010	0,0010	0,0009	0,0010	0,0010	0,0010
0,0010	0,0009	0,0010	0,0010	0,0010	0,0010	0,0010	0,0010	0,0009	0,0010	0,0010	0,0009
0,0011	0,0010	0,0010	0,0010	0,0010	0,0010	0,0010	0,0009	0,0009	0,0010	0,0009	0,0010
0,0010	0,0010	0,0010	0,0010	0,0010	0,0010	0,0009	0,0010	0,0010	0,0010	0,0010	0,0011
0,0010	0,0010	0,0010	0,0010	0,0010	0,0010	0,0010	0,0010	0,0010	0,0010	0,0010	0,0010
0,0010	0,0010	0,0009	0,0009	0,0010	0,0010	0,0011	0,0010	0,0010	0,0010	0,0009	0,0009
0,0010	0,0010	0,0010	0,0011	0,0010	0,0010	0,0009	0,0010	0,0011	0,0009	0,0010	0,0010

tps(5min)_13	tps(5min)_14	tps(5min)_15	tps(5min)_16	tps(5min)_17	tps(5min)_18	tps(5min)_19	tps(5min)_20	tps(5min)_21	tps(5min)_22	tps(5min)_23	tps(5min)_24
0,0010	0,0011	0,0010	0,0010	0,0011	0,0009	0,0010	0,0010	0,0010	0,0010	0,0010	0,0010
0,0010	0,0011	0,0010	0,0010	0,0010	0,0010	0,0010	0,0010	0,0010	0,0011	0,0010	0,0009
0,0010	0,0010	0,0011	0,0010	0,0011	0,0009	0,0010	0,0010	0,0010	0,0009	0,0010	0,0010
0,0010	0,0010	0,0009	0,0010	0,0011	0,0010	0,0010	0,0009	0,0010	0,0009	0,0010	0,0010
0,0010	0,0011	0,0010	0,0010	0,0011	0,0010	0,0009	0,0010	0,0011	0,0011	0,0011	0,0010
0,0010	0,0010	0,0011	0,0010	0,0010	0,0009	0,0010	0,0010	0,0011	0,0010	0,0011	0,0010
0,0010	0,0010	0,0010	0,0011	0,0010	0,0010	0,0010	0,0009	0,0010	0,0010	0,0010	0,0010
0,0010	0,0010	0,0011	0,0009	0,0010	0,0010	0,0009	0,0010	0,0010	0,0009	0,0010	0,0011
0,0011	0,0010	0,0009	0,0010	0,0009	0,0010	0,0009	0,0010	0,0010	0,0010	0,0011	0,0011
0,0009	0,0010	0,0009	0,0010	0,0010	0,0011	0,0011	0,0010	0,0010	0,0010	0,0010	0,0010



Réinitialiser l'étude

Réinitialiser la matrice

Réinitialiser l'analyse

Lyo - CARTE DE CONTROLE

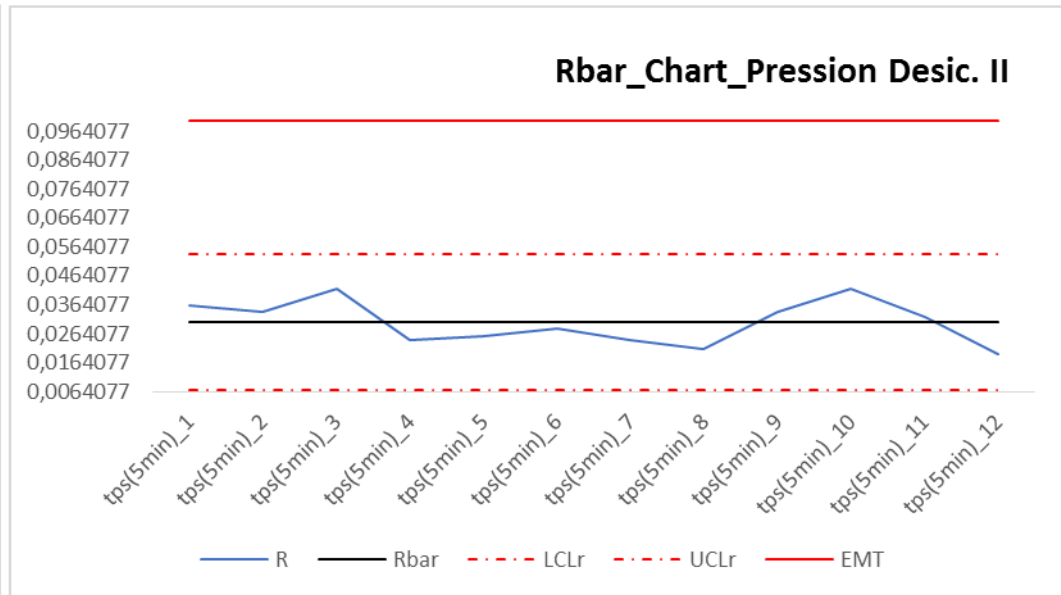
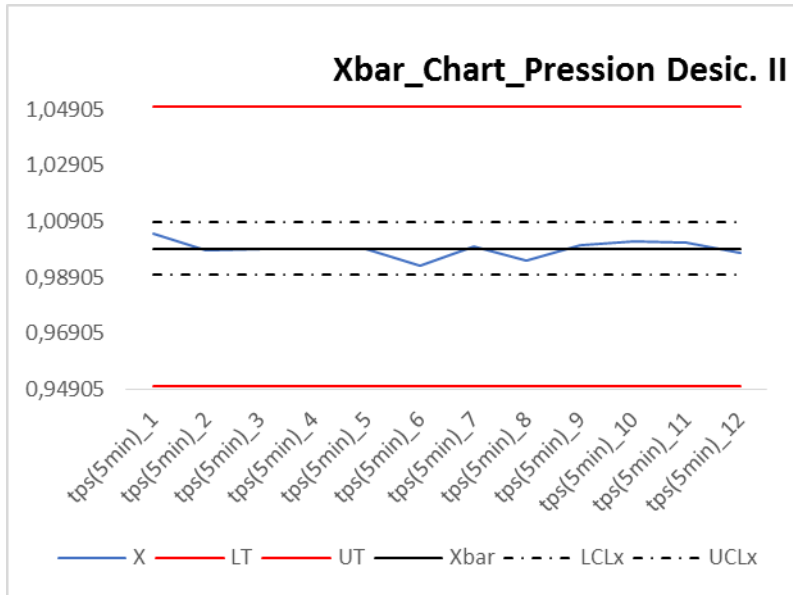
Localisation	Lab.Galénique	Date	17/07/2019	
Paramètre	Pression Desic. III	Responsable	KESSAL FETTA	
Cible ou valeur nomina	1	EMT	0,05	Réfrenciel SOP
Tolérance Max.	1,05			
Tolérance Min.	0,95			
Périodicité	tps(5min)	Enregistrements	12	Points 10

	Xbar	Rbar
LIC	0,989985961	0,006744989
LSC	1,008617858	0,053748183
Moyenne	0,99930191	0,030246586

Construire la matrice

Analyser

tps(5min)_1	tps(5min)_2	tps(5min)_3	tps(5min)_4	tps(5min)_5	tps(5min)_6	tps(5min)_7	tps(5min)_8	tps(5min)_9	tps(5min)_10	tps(5min)_11	tps(5min)_12
0,99	1,01	0,99	0,99	1,00	0,99	0,99	0,98	0,99	0,99	0,99	0,99
1,00	1,01	0,99	1,01	1,00	0,99	1,00	0,99	0,98	0,99	1,00	1,01
1,01	1,02	1,00	0,99	0,99	1,00	1,00	1,00	0,99	1,02	1,00	1,00
1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,99	0,98	1,00	1,00
1,00	0,98	1,01	1,00	1,00	0,99	0,98	1,01	1,00	1,02	1,00	1,00
1,01	0,99	1,00	1,01	1,00	1,00	1,00	1,00	1,02	1,02	1,01	1,00
1,03	1,00	1,01	1,00	1,00	1,00	1,01	1,00	1,01	0,99	1,01	0,99
1,01	0,99	0,98	0,99	1,01	1,00	1,01	1,00	1,00	1,01	0,99	1,00
1,01	1,00	0,99	0,99	0,99	0,98	1,01	1,00	1,00	1,00	0,99	1,00
1,00	0,98	1,02	1,00	1,00	0,98	1,00	0,99	1,01	1,00	1,02	0,99



Annexe 11 : Validation du test de dissolution.

VALIDATION [Dissolution NE]_Protocole

Réalisé par KESSAL FETTA

Paramètre	Protocole & Principe	Contraintes	Interprétations
Spécificité	Comparer lecture standard Vs Placébo Réaliser 6 répétitions du standards à 100% Préparer un placebo Lecture	S'assurer de l'adéquation du système : RSD standard inf. 2%	Calculer la sélectivité Si Sélectivité sup. 98 % : Méthode spécifique
Linéarité	Sur Standard : Matrice : 7 niveaux X 5 répétitions Refaire avec les NE reconstituées	Vérifier l'homogénéité des variances Recherche et élimination des valeurs aberrantes Régression linéaire	Test de validité de la droite & R2 Test de pente et de l'ordonnée à l'origine Comparaison des pentes et des ordonnées l'origine : Si différent = effet matrice
Intervalle de linéarité	NA	Définir un intervalle de confiance Éliminer les valeurs aberrantes	Intervalle défini par l'intersection des ratios Réponse/Variable avec les limites calculées de l'intervalle de confiance
LOD & LOQ	NA	NA	Ratio élargi écart type de l'intersection/pente
Justesse et profil d'exactitude	Reprendre les données de l'étude de la linéarité sur la forme reconstituée et calculer les concentrations prédites par la courbe d'étalonnage	Vérifier l'homogénéité des variances Recherche et élimination des valeurs aberrantes	Calculer les recouvrements par niveaux et estimer le recouvrement moyen de la méthode. Si Rc Sup. 95% : Méthode exacte Tracer le profil d'exactitude par niveau et vérifier la fluctuation du recouvrement
Précision	Réaliser sur 10 répétitions du standards Refaire sur trois jours pour estimer la répétabilité intermédiaire	Vérifier l'homogénéité des variances Recherche et élimination des valeurs aberrantes	Calculer les RSD de la répétabilité et de la précision intermédiaire

VALIDATION_[Dissolution NE]_Spécificité

Réalisé par KESSAL FETTA

	Pesées (mg)	Dilution (1/mL)	Concentration (mg/mL)
Fénofibrate pH 1,2	10,5	500	0,0200
Fénofibrate pH 6,8	10,5	500	0,0200
Placébo	1000	500	NA

	Titre (%)	Teneur en eau (%)
Fénofibrate	99,00	4,00

Lecture_Standard	pH 1,2	pH 6,8
1	0,999	0,878
2	0,998	0,877
3	0,996	0,877
4	0,998	0,88
5	0,999	0,872
6	0,998	0,879
Moyenne	0,998	0,877
RSD (%)	0,11	0,32
Placébo	0,001	0,002

Sélectivité	99,9	99,8
-------------	------	------

Adéquation du système vérifié et conforme.

La méthode détecte spécifiquement le Fénofibrate dans les milieux pH 1,2 et 6,8.

VALIDATION_[Dissolution NE]_Etalonnage

Réalisé par KESSAL FETTA

	Dose (mg)	Volum e (mL)	Teneur en Titre (%)	Teneur en eau (%)	Plan d'expérience	
Fénofibrate	10,5	250	Fénofibrate	99,00	4	Niveaux 7
Fénofibrate	10,5	250				Répétition 5

Préparations

Niveaux	Concentrations théoriques		Pesées théoriques (mg)		Pesées pratiques (mg)		Volume (mL)	Dilutions (mL)	Concentration (mg/mL)	
	pH 1,2	pH 6,8	pH 1,2	pH 6,8	pH 1,2	pH 6,8			pH 1,2	pH 6,8
10%	0,0042	0,0042	1,05	1,05	1,1	1,1	250,00	2,000	0,0020	0,0020
20%	0,0084	0,0084	2,10	2,10	2,1	2,1	250,00	2,000	0,0040	0,0040
25%	0,0105	0,0105	2,63	2,63	2,6	2,6	250,00	2,000	0,0050	0,0050
50%	0,0210	0,0210	5,25	5,25	5,3	5,3	250,00	2,000	0,0100	0,0100
75%	0,0315	0,0315	7,88	7,88	7,9	7,9	250,00	2,000	0,0150	0,0150
100%	0,0420	0,0420	10,50	10,50	10,5	10,5	250,00	2,000	0,0200	0,0200
120%	0,0504	0,0504	12,60	12,60	12,6	12,6	250,00	2,000	0,0240	0,0240

Essais Résultats

Niveaux	pH 1,2		pH 6,8	
	Concentration (mg/mL)	DO n	Concentration (mg/mL)	DO
10%	0,0020	0,018	0,0020	0,090
10%	0,0020	0,023	0,0020	0,089
10%	0,0020	0,025	0,0020	0,092
10%	0,0020	0,019	0,0020	0,090
10%	0,0020	0,021	0,0020	0,090
20%	0,0040	0,111	0,0040	0,103
20%	0,0040	0,117	0,0040	0,103
20%	0,0040	0,117	0,0040	0,101
20%	0,0040	0,111	0,0040	0,101
20%	0,0040	0,112	0,0040	0,102
25%	0,0050	0,296	0,0050	0,298
25%	0,0050	0,298	0,0050	0,301
25%	0,0050	0,297	0,0050	0,301
25%	0,0050	0,297	0,0050	0,302
25%	0,0050	0,301	0,0050	0,300
50%	0,0100	0,551	0,0100	0,471
50%	0,0100	0,552	0,0100	0,470
50%	0,0100	0,553	0,0100	0,467
50%	0,0100	0,550	0,0100	0,462
50%	0,0100	0,553	0,0100	0,465
75%	0,0150	0,780	0,0150	0,699
75%	0,0150	0,780	0,0150	0,700
75%	0,0150	0,779	0,0150	0,697
75%	0,0150	0,780	0,0150	0,694
75%	0,0150	0,779	0,0150	0,701
100%	0,0200	0,997	0,0200	0,878
100%	0,0200	1,000	0,0200	0,878
100%	0,0200	0,995	0,0200	0,874
100%	0,0200	0,997	0,0200	0,876
100%	0,0200	1,002	0,0200	0,878
120%	0,0240	1,210	0,0240	1,046
120%	0,0240	1,210	0,0240	1,047
120%	0,0240	1,209	0,0240	1,047
120%	0,0240	1,210	0,0240	1,046
120%	0,0240	1,209	0,0240	1,048

Traitement des données

Homogénéité des variances Cochran

	pH 1,2	pH 6,8
Qc	0,3111	0,4607
Qt(5%;7;5)	0,4310	0,4310

Homogénéité des moyennes : Grubbs simple

	pH 1,2	pH 6,8
Gc(total)	1,424	1,425
Gt(0,05;7)	2,02	2,02

Homogénéité des moyennes : Dixon multiple

	pH 1,2	pH 6,8
Q'c(total)	0,229	0,283
Qt(0,05;7;5)	0,370	0,370

Régression linéaire : moindre des carrées

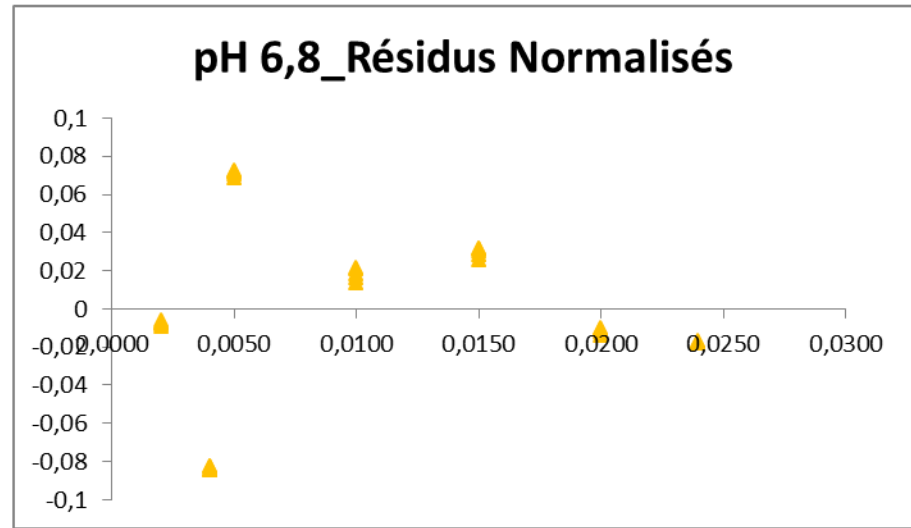
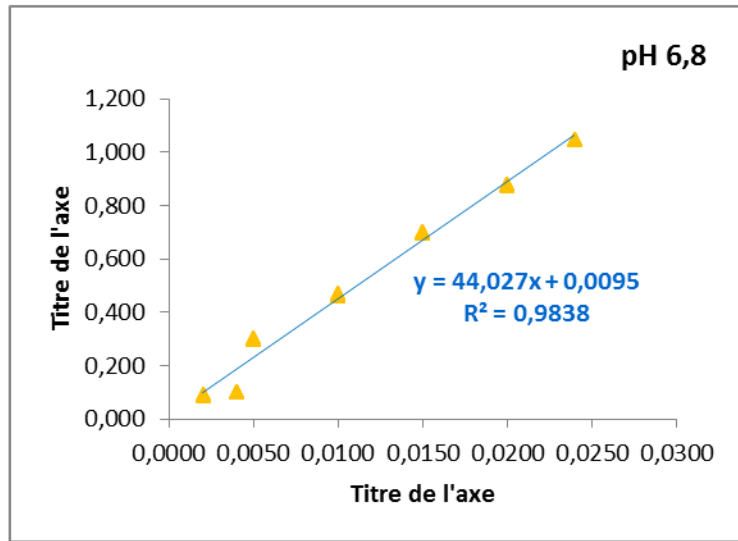
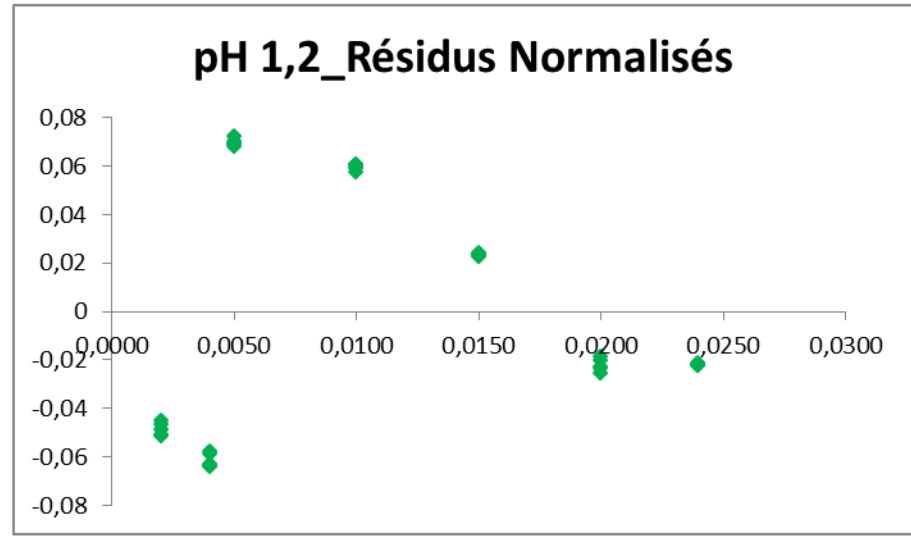
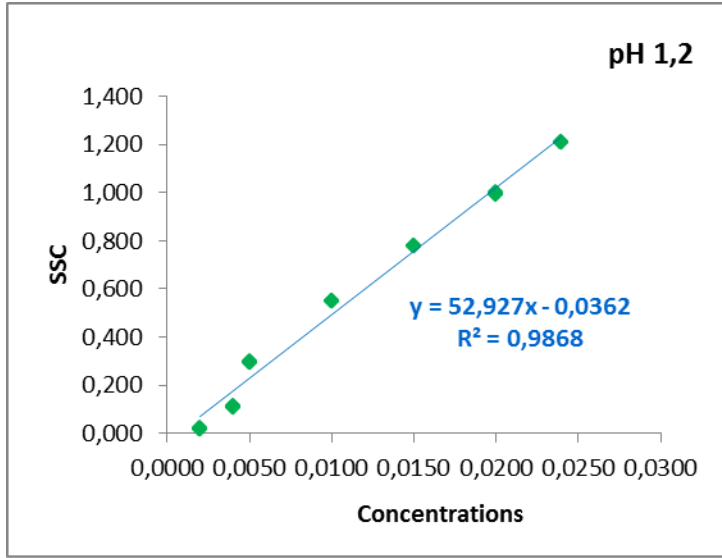
	pH 1,2		pH 6,8	
Pente et intersection	52,93	-0,04	44,03	0,01
Ecartypes	1,07	0,01	0,98	0,01
r2 et ecartype	0,987	0,05	0,984	0,05
F (pente) et ddl	2465,70	33,00	1998,73	33,00
SCE_R et SCE_res.	6,02	0,08	4,17	0,07
F(0,05, 1,33)	4,15		4,15	
IC (pente et inter.)	2,50	0,03	2,31	0,03
min (pente et inter.)	50,42	-0,07	41,71	-0,02
max (pente et inter.)	55,43	0,00	46,34	0,04

Test de validité de la droite

pH 1,2	4145,607695
pH 6,8	4049,648212
F(0,05;3)	2,45

Test de la pente et de l'ordonnée à l'origine

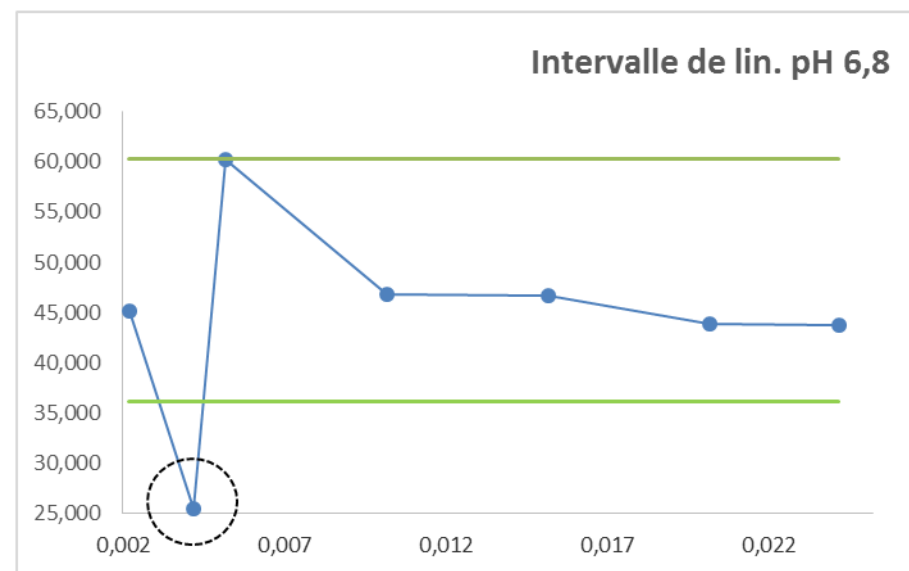
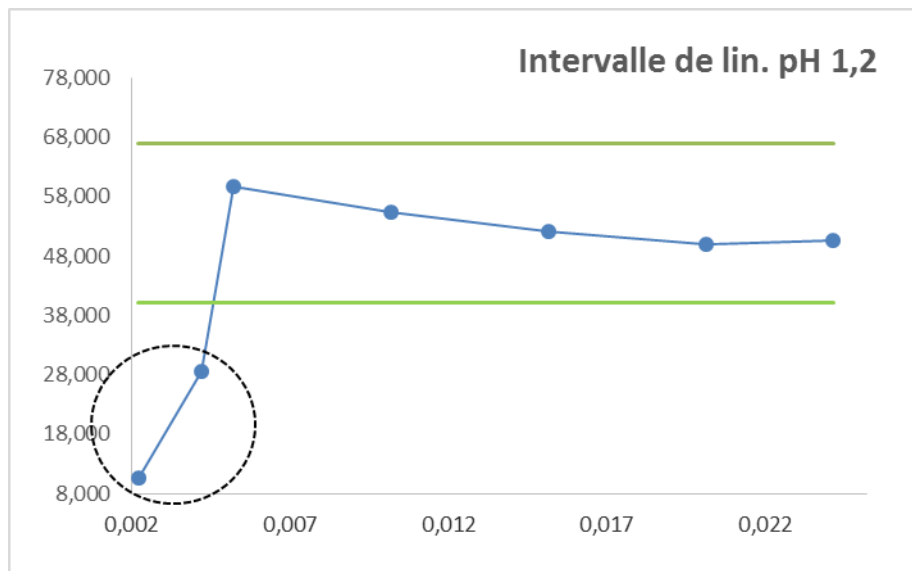
	Pente	Ordonnée
pH 1,2	49,65579	2,45104
pH 6,8	44,70714	24,5143
t(0,05;33)	2,02	2,02



VALIDATION_[Dissolution NE_ Intervalle de linéarité

Réalisé par KESSAL FETTA

Niveaux	pH 1,2		pH 6,8		IC [%] : ± 25
	Concentration	DO	Concentration	DO	
10%	0,002	0,021	0,002	0,090	
20%	0,004	0,114	0,004	0,102	
25%	0,005	0,298	0,005	0,300	
50%	0,010	0,552	0,010	0,467	
75%	0,015	0,780	0,015	0,698	
100%	0,020	0,998	0,020	0,877	
120%	0,024	1,210	0,024	1,047	



VALIDATION_[Dissolution NE]_LOD & LOQ

Réalisé par KESSAL FETTA

	pH 1,2	pH 6,8
LOD (mg/mL)	0,00092	0,00102
LOQ (mg/mL)	0,00279	0,00310

VALIDATION_[Dissolution NE]_Linéarité NE reconstituée

Réalisé par KESSAL FETTA

	Dose (mg)	Volume (mL)
Fénofibrate pH 1,2	20	500
Fénofibrate pH 6,8	20	500

Plan d'expérience	
Niveaux	7
Répétitions	5

Préparations

Niveaux	Concentrations théoriques		Pesées théoriques (mg)		Pesées pratiques (mg)		Volume (mL)	Dilutions (mL)	Concentration (mg/mL)	
	pH 1,2	pH 6,8	pH 1,2	pH 6,8	pH 1,2	pH 6,8			pH 1,2	pH 6,8
10%	0,0040	0,0040	2,00	2,00	2,2	2,2	500,00	2,000	0,0022	0,0022
20%	0,0080	0,0080	4,00	4,00	4,4	4,4	500,00	2,000	0,0044	0,0044
25%	0,0100	0,0100	5,00	5,00	5,5	5,5	500,00	2,000	0,0055	0,0055
50%	0,0200	0,0200	10,00	10,00	11,0	11,0	500,00	2,000	0,0110	0,0110
75%	0,0300	0,0300	15,00	15,00	16,5	16,5	500,00	2,000	0,0165	0,0165
100%	0,0400	0,0400	20,00	20,00	22,1	22,1	500,00	2,000	0,0221	0,0221
120%	0,0480	0,0480	24,00	24,00	26,5	26,5	500,00	2,000	0,0265	0,0265

Essais Résultats

Niveaux	pH 1,2		pH 6,8	
	C (mg/mL)	DO	C (mg/mL)	DO
10%	0,0022	0,073	0,0022	0,095
10%	0,0022	0,073	0,0022	0,094
10%	0,0022	0,073	0,0022	0,097
10%	0,0022	0,071	0,0022	0,095
10%	0,0022	0,072	0,0022	0,095
20%	0,0044	0,192	0,0044	0,193
20%	0,0044	0,195	0,0044	0,193
20%	0,0044	0,196	0,0044	0,191
20%	0,0044	0,192	0,0044	0,191
20%	0,0044	0,192	0,0044	0,192
25%	0,0055	0,259	0,0055	0,253
25%	0,0055	0,258	0,0055	0,256
25%	0,0055	0,270	0,0055	0,263
25%	0,0055	0,260	0,0055	0,259
25%	0,0055	0,261	0,0055	0,255
50%	0,0110	0,541	0,0110	0,499
50%	0,0110	0,532	0,0110	0,498
50%	0,0110	0,543	0,0110	0,495
50%	0,0110	0,538	0,0110	0,490
50%	0,0110	0,543	0,0110	0,493
75%	0,0165	0,810	0,0165	0,747
75%	0,0165	0,819	0,0165	0,748
75%	0,0165	0,820	0,0165	0,745
75%	0,0165	0,805	0,0165	0,742
75%	0,0165	0,838	0,0165	0,749
100%	0,0221	1,127	0,0221	0,973
100%	0,0221	1,130	0,0221	0,973
100%	0,0221	1,125	0,0221	0,970
100%	0,0221	1,119	0,0221	0,972
100%	0,0221	1,122	0,0221	0,973
120%	0,0265	1,270	0,0265	1,226
120%	0,0265	1,268	0,0265	1,250
120%	0,0265	1,369	0,0265	1,227
120%	0,0265	1,259	0,0265	1,230
120%	0,0265	1,262	0,0265	1,228

Traitement des données

Homogénéité des variances Cochran

	pH 1,2	pH 6,8
Qc	0,9078	0,7261
Qt (5%;7;5)	0,4310	0,4310

Homogénéité des moyennes : Grubbs simple

	pH 1,2	pH 6,8
Gc (total)	1,415	1,544
Gt (0,05;7)	2,02	2,02

Homogénéité des moyennes : Dixon multiple

	pH 1,2	pH 6,8
Q'c (total)	0,602	0,412
Qt (0,05;7;5)	0,370	0,370

Régression linéaire : moindre des carrées

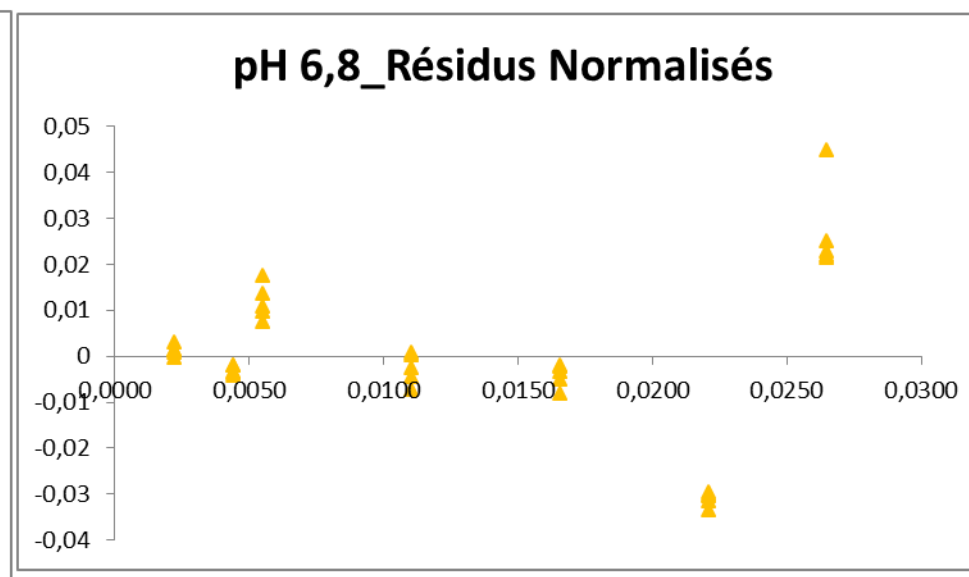
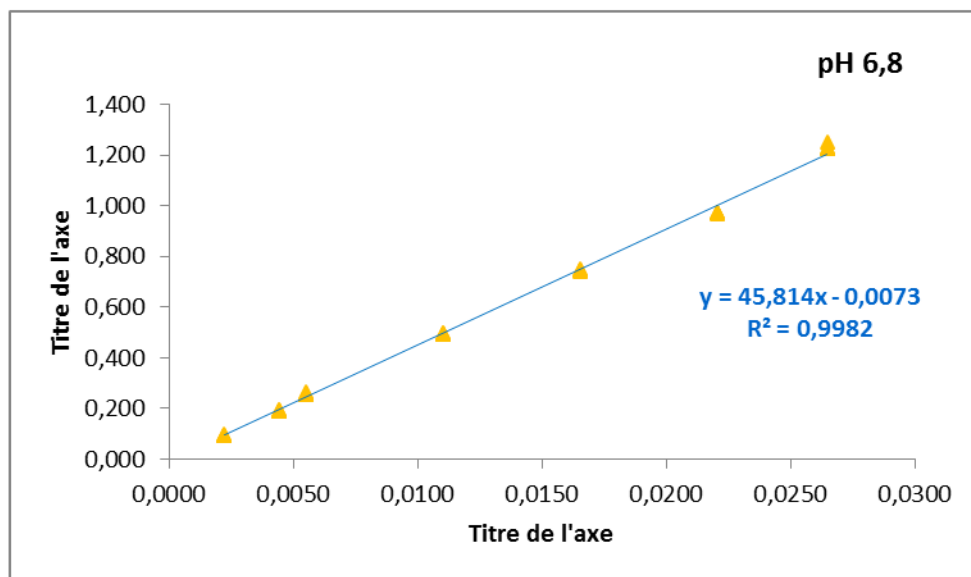
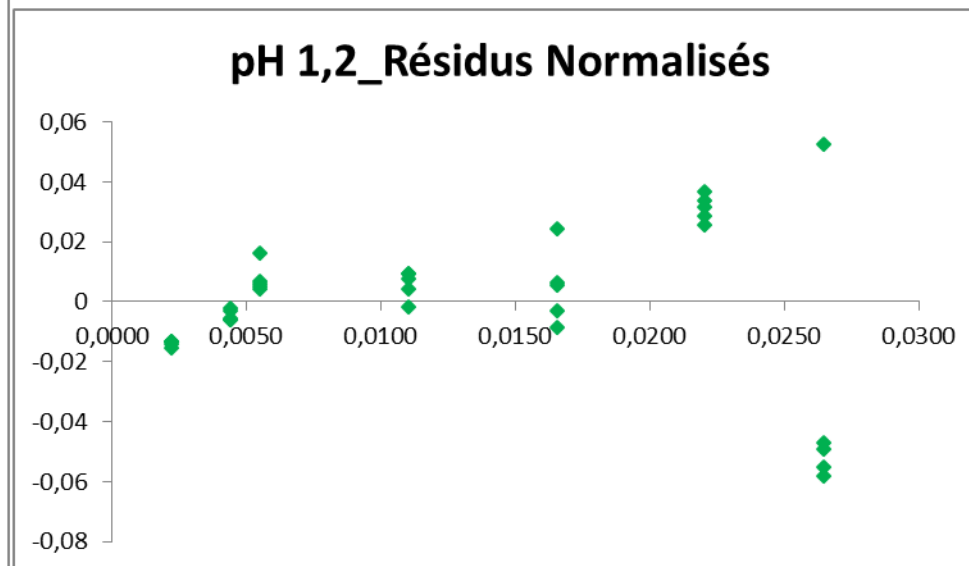
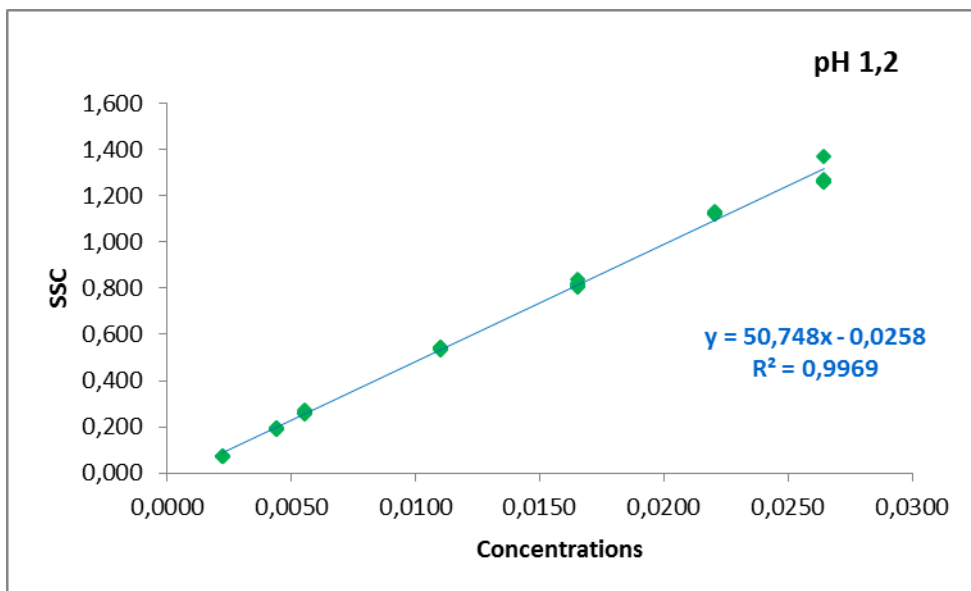
	pH 1,2		pH 6,8	
Pente et intersection	50,75	-0,03	45,81	-0,01
Ecartypes	0,49	0,01	0,34	0,01
r2 et ecartype	0,997	0,03	0,998	0,02
F (pente) et ddl	10516,00	33,00	18279,81	33,00
SCE_R et SCE_res.	6,76	0,02	5,51	0,01
F(0,05, 1,33)	4,15		4,15	
IC (pente et inter.)	1,16	0,02	0,80	0,01
min (pente et inter.)	49,59	-0,04	45,02	-0,02
max (pente et inter.)	51,91	-0,01	46,61	0,00

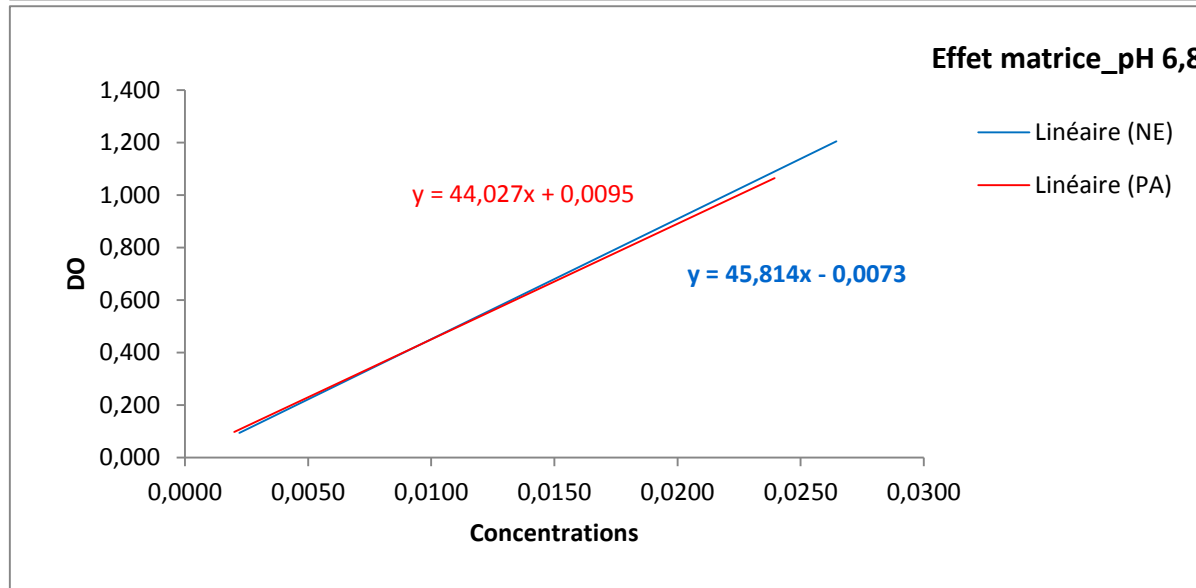
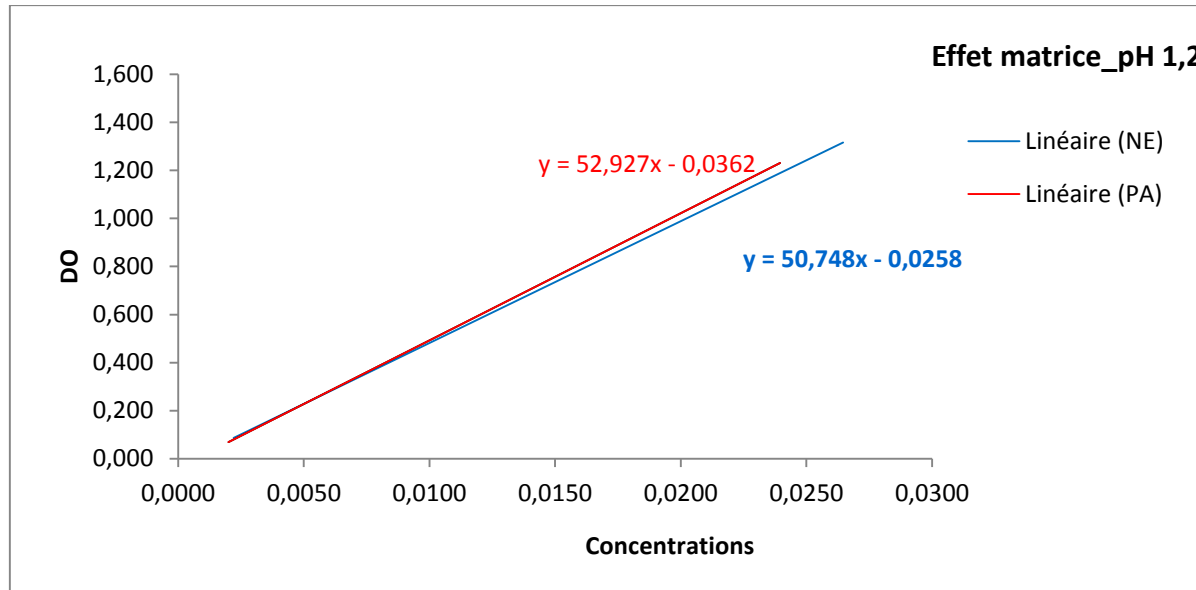
Test de validité de la droite

pH 1,2	7,046800339
pH 6,8	102,0007018
F(0,05;3;25)	2,45

Test de la pente et de l'ordonnée à l'origine

	Pente	Ordonnée
pH 1,2	102,5475533	3,40611671
pH 6,8	135,2028319	49,138363
t(0,05;33)	2,02	2,02





VALIDATION [Dissolution NE] Justesse Profil d'exactitude

Réalisé par KESSAL FETTA

Essais Résultats

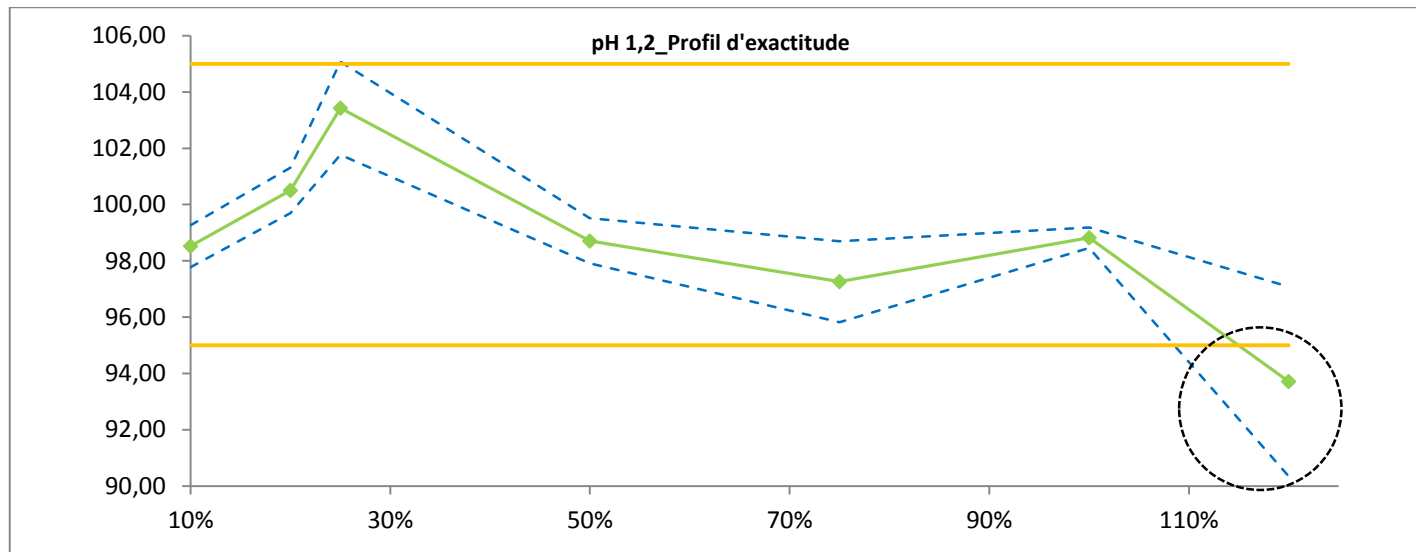
Niveaux	pH 1,2			pH 6,8		
	C Réelles	C Prédites	Recouvrement	C Réelles	C Prédites	Recouvrement
10%	0,0022	0,0022	98,93	0,0022	0,0021	94,67
10%	0,0022	0,0022	98,93	0,0022	0,0021	93,49
10%	0,0022	0,0022	99,12	0,0022	0,0021	96,91
10%	0,0022	0,0021	97,34	0,0022	0,0021	95,11
10%	0,0022	0,0022	98,28	0,0022	0,0021	95,19
20%	0,0044	0,0044	99,87	0,0044	0,0043	97,04
20%	0,0044	0,0045	101,14	0,0044	0,0043	97,04
20%	0,0044	0,0045	101,56	0,0044	0,0042	96,18
20%	0,0044	0,0044	99,87	0,0044	0,0042	96,00
20%	0,0044	0,0044	100,08	0,0044	0,0043	96,41
25%	0,0055	0,0057	102,56	0,0055	0,0056	102,02
25%	0,0055	0,0056	102,26	0,0055	0,0057	103,37
25%	0,0055	0,0059	106,28	0,0055	0,0058	106,10
25%	0,0055	0,0057	102,90	0,0055	0,0058	104,47
25%	0,0055	0,0057	103,13	0,0055	0,0057	102,87
50%	0,0110	0,0109	99,01	0,0110	0,0111	100,81
50%	0,0110	0,0107	97,45	0,0110	0,0111	100,71
50%	0,0110	0,0109	99,32	0,0110	0,0110	100,13
50%	0,0110	0,0109	98,46	0,0110	0,0109	99,16
50%	0,0110	0,0110	99,33	0,0110	0,0110	99,72
75%	0,0165	0,0159	96,35	0,0165	0,0167	100,75
75%	0,0165	0,0161	97,32	0,0165	0,0167	100,92
75%	0,0165	0,0161	97,43	0,0165	0,0166	100,54
75%	0,0165	0,0158	95,74	0,0165	0,0166	100,14
75%	0,0165	0,0164	99,46	0,0165	0,0167	100,97
100%	0,0221	0,0218	99,02	0,0221	0,0217	98,44
100%	0,0221	0,0219	99,28	0,0221	0,0217	98,51
100%	0,0221	0,0218	98,86	0,0221	0,0216	98,12
100%	0,0221	0,0217	98,36	0,0221	0,0217	98,33
100%	0,0221	0,0217	98,61	0,0221	0,0217	98,47
120%	0,0265	0,0245	92,60	0,0265	0,0274	103,46
120%	0,0265	0,0245	92,46	0,0265	0,0279	105,45
120%	0,0265	0,0264	99,61	0,0265	0,0274	103,52
120%	0,0265	0,0243	91,83	0,0265	0,0275	103,76
120%	0,0265	0,0244	92,04	0,0265	0,0274	103,57

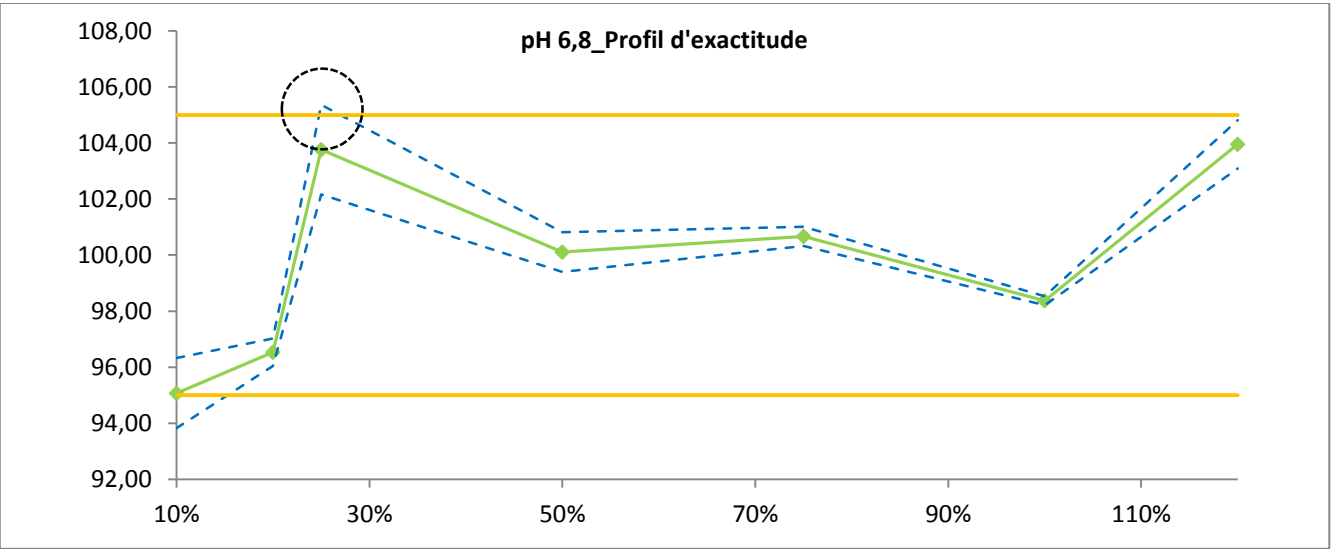
Traitement des données

Homogénéité des variances : Cochran		
	pH 1,2	pH 6,8
Qc	0,6256	0,4453
Qt (5%;7;5)	0,4310	0,4310

Homogénéité des myennes : Dixon	
pH 1,2	24,4507677
pH 6,8	100,9549863
F (0,05;5;30)	2,71

Recouvrement moyen_IC du recouvrement moyen			
	Recouvrement	IC_min	IC_max
pH 1,2	98,71	97,62	99,80
pH 6,8	99,78	98,64	100,93





VALIDATION_[Dissolution NE]_Précision

Réalisé par KESSAL FETTA

Echantillons Résultats Paramètre : Temps Cible : 100%

Répétitions	Jour_1				Jour_2				Jour_3			
	pH 1,2		pH 6,8		pH 1,2		pH 6,8		pH 1,2		pH 6,8	
	DO	Taux	DO	Taux	DO	Taux	DO	Taux	DO	Taux	DO	Taux
1	0,997	97,05	0,872	97,28	0,990	96,46	0,889	99,18	1,004	97,72	0,881	98,26
2	1,000	97,34	0,877	97,84	0,978	95,33	0,890	99,26	1,012	98,48	0,881	98,26
3	0,995	96,88	0,877	97,84	0,969	94,45	0,890	99,26	1,026	99,76	0,880	98,19
4	0,997	97,09	0,878	97,91	0,966	94,22	0,895	99,82	1,008	98,13	0,884	98,62
5	1,002	97,52	0,878	97,98	0,984	95,86	0,892	99,52	1,011	98,40	0,884	98,62
6	0,998	97,16	0,874	97,55	0,996	97,02	0,892	99,52	1,016	98,86	0,888	99,11
7	0,999	97,25	0,876	97,78	0,966	94,18	0,888	99,05	0,983	95,78	0,892	99,52
8	0,994	96,79	0,878	97,93	0,970	94,54	0,882	98,40	1,008	98,09	0,881	98,30
9	1,05	102,01	0,87	97,06	0,968	94,38	0,886	98,81	0,993	96,70	0,880	98,17
10	1,022	99,40	0,879	98,06	1,012	98,47	0,886	98,81	0,989	96,28	0,880	98,17

Traitement des données

Homogénéité des variances : Cochran

	pH 1,2	pH 6,8
Qc	0,4271	0,4320
Q(0,05;3;10)	0,6025	0,6025

Résultats

	pH 1,2	pH 6,8
Var_Répétabilité	2,10	0,16
Var_Precision intermédiaire	3,72	0,67
RSD_Répétabilité	1,49	0,42
Limite répétabilité	4,05	1,14
RSD_Precision intermédiaire	1,99	0,84
Limite précision intermédiaire	5,40	2,28

Homogénéité des moyennes : Dixon multiple

	pH 1,2	pH 6,8
Q'c	0,39	0,38
Q'(0,05;3;10)	0,94	0,94

Homogénéité des moyennes : Grubbs simple

	pH 1,2	pH 6,8
Gc(total)	0,588	0,959
Gt(0,05;5)	1,155	1,155

Résumé

Les nanoémulsions (NEs) sont des systèmes dispersés de l'ordre du nanomètre, très répandues au cours de ces dernières années. On peut distinguer deux voies de fabrication : les méthodes hautement énergétiques qui mettent en jeu l'apport technologique et les méthodes de basse énergie qui dépendent essentiellement de la formulation. L'objectif de ce travail est de formuler une nanoémulsion de type huile dans l'eau pouvant encapsuler en son système des principes actifs faiblement solubles. La NE formulée est à base d'huile végétale (H) dispersée à l'aide du Polysorbate 80 (T80) et en présence d'éthanol (S) dans une phase dispersante aqueuse, contenant un tensioactif anionique à savoir le sodium dodecyl sulfate (SDS) et un stabilisateur à savoir l'alcool polyvinylique (PVA). La méthode de préparation fait appel à une émulsification spontanée, une méthode de basse énergie. Le choix des proportions de ces différents composants ainsi que l'optimisation des paramètres de la méthode de préparation sont soumis aux plans d'expériences. La NE obtenue est transparente avec une turbidité moyenne de $20,0 \pm 0,4$ NTU, une taille moyenne des gouttelettes de $50,11 \pm 4,81$ nm avec un indice de polydispersité de $0,621 \pm 0,057$ et un potentiel zêta de $-23,7 \pm 0,6$ m.V. Les données numériques de la taille des nanogouttelettes concordent avec l'analyse au microscope électronique à transmission (MET). L'optimisation des paramètres opératoires sur la NE obtenue à travers un plan composite centré cubique a conduit à un processus avec des températures ne dépassant pas la température d'inversion de phase (TIP). A ce stade de développement, les résultats obtenus sont satisfaisants en termes de taille moyenne des gouttelettes et de potentiel zêta ($50,43 \pm 0,85$ nm et $-25,7 \pm 0,6$ m.V, respectivement). La turbidité, l'indice de polydispersité et le pH varient très peu. Dans une seconde étape, on a pu sélectionner la molécule modèle pour les essais in vivo, sur la base de la taille des nanogouttelettes. En effet, les essais sont conduits sur des rats rendus diabétiques afin d'explorer l'effet antilipidémiant du fénofibrate encapsulé (NE-FB). Les résultats de l'étude ont été concluants avec une réduction de 27% du taux de cholestérol et de 64% du taux des triglycérides. Enfin, pour lyophiliser et stabiliser la NE, un réseau polymérique est créé autour des nanogouttelettes en mettant au point des microsphères à base d'alginate de sodium. L'appréciation de l'efficacité d'encapsulation s'est faite à travers une cinétique de dissolution de 4 heures sur des milieux gastrique et intestinal simulés à pH=1,2 et pH=6,8. La totalité du FB est libérée de manière contrôlée. L'interprétation des résultats est associée à la microscopie électronique à balayage (MEB).

Mots clés : nanoémulsion, émulsification spontanée, taille des gouttelettes, potentiel zêta, lyophilisation.

Abstract

Nanoemulsions (NEs) are dispersed systems in the nanometer range, which have become widely used in recent years. Two manufacturing routes can be distinguished: high-energy methods involving technological input and low-energy methods that depend mainly on the formulation. The objective of this work is to formulate an oil-in-water nanoemulsion that can encapsulate poorly soluble active ingredients. The formulated NE is based on vegetable oil (H) dispersed with Polysorbate 80 (T80) and ethanol (S) in an aqueous dispersing phase, containing an anionic surfactant namely sodium dodecyl sulfate (SDS) and a stabilizer namely polyvinyl alcohol (PVA). The preparation method involves spontaneous emulsification, a low energy method. The choice of the proportions of these different components as well as the optimization of the parameters of the preparation method are subject to design of experiments. The obtained NE is transparent with an average turbidity of 20.0 ± 0.4 NTU, an average droplet size of 50.11 ± 4.81 nm with a polydispersity index of 0.621 ± 0.057 and a zeta potential of -23.7 ± 0.6 m.V. The data of the nanodroplet size is in agreement with the transmission electron microscope (TEM) analysis. Optimization of the operating parameters on the NE obtained through a cubic centred composite plane led to a process with temperatures not exceeding the phase inversion temperature (PIT). At this stage of development, the results obtained are satisfactory in terms of average droplet size and zeta potential (50.43 ± 0.85 nm and -25.7 ± 0.6 m.V, respectively). No significant variation of turbidity, polydispersity index and pH is observed. In a second step, it was possible to select the model molecule for the in vivo investigation, based on the size of the nanodroplets. Indeed, the tests are conducted on diabetic rats in order to explore the antilipidemic effect of encapsulated fenofibrate (NE-FB). The results of the study were successful with a reduction of 27% and 64% in cholesterol and triglyceride levels, respectively. Finally, to freeze-dry and stabilize the NE, a polymeric network is created around the nanodroplets by developing sodium alginate-based microspheres. The assessment of the encapsulation efficiency was done through a 4-hours dissolution kinetics on simulated gastric media at pH=1.2 and pH=6.8. The results showed that all FB is released in a controlled way. The interpretation of the results is associated with data of scanning electron microscopy (SEM).

Keywords: nanoemulsion, spontaneous emulsification, droplet size, zeta potential, freeze drying.

ملخص

مستحلبات النانو (NEs) هي أنظمة مشتتة في نطاق النانومتر، والتي أصبحت مستخدمة على نطاق واسع في السنوات الأخيرة. يمكن التمييز بين طريقتين للتصنيع: طرق عالية الطاقة تتضمن مدخلات تكنولوجية وطرق منخفضة الطاقة تعتمد بشكل أساسي على التركيبة. الهدف من هذا العمل هو صياغة مستحلب نانو (زيت في ماء) يمكنه تغليف المكونات النشطة ضعيفة الذوبان. تعتمد تركيبة NE على الزيت النباتي (H) المشتت مع Polysorbate 80 (T80) والإيثانول (S) في مرحلة التشتت المائي، والتي تحتوي على عامل خافض للتوتر السطحي الأنيوني وهو كبريتات دوديسيل الصوديوم (SDS) ومثبت وهو كحول البولي فينيل (PVA). تتضمن طريقة التحضير الاستحلاب التلقائي، وهي طريقة منخفضة الطاقة. يخضع اختيار نسب هذه المكونات المختلفة وكذلك تحسين معلمات طريقة التحضير لتصميم التجارب. يكون NE الذي تم الحصول عليه شفافاً بمتوسط تعكر يبلغ 0.4 ± 20.0 NTU، ومتوسط حجم القطرة 4.81 ± 50.11 نانومتر مع مؤشر التشتت المتعدد 0.057 ± 0.621 وإمكانية زيتا 0.6 ± 23.7 مللي فولت. تتوافق بيانات حجم القطرات النانوية مع تحليل المجهر الإلكتروني النافذ (TEM). أدى تحسين معلمات التشغيل على NE الذي تم الحصول عليه من خلال مستوى مركب مركز مكعب إلى عملية بدرجات حرارة لا تتجاوز درجة حرارة انقلاب الطور (PIT). في هذه المرحلة من التطور، النتائج التي تم الحصول عليها مرضية من حيث متوسط حجم القطرة و Zeta potential (0.85 ± 50.43 نانومتر و 0.6 ± 25.7 مللي فولت، على التوالي). لم يلاحظ أي اختلاف كبير في التعكر ومؤشر التشتت المتعدد ودرجة الحموضة. في الخطوة الثانية، كان من الممكن تحديد الجزيء النموذجي للتحقيق في الجسم الحي، بناءً على حجم القطرات النانوية. في الواقع، يتم إجراء الاختبارات على الفئران المصابة بداء السكري من أجل استكشاف التأثير المضاد للدهون لفينوفبيرات المغلف (NE-FB). كانت نتائج الدراسة ناجحة مع انخفاض بنسبة 27% و 64% في مستويات الكوليسترول والدهون الثلاثية على التوالي. أخيراً، لتجميد وتجفيف واستقرار NE، يتم إنشاء شبكة بوليميرية حول القطرات النانوية عن طريق تطوير كريات مجهرية تعتمد على ألجينات الصوديوم. تم تقييم كفاءة التغليف من خلال حركيات الذوبان لمدة 4 ساعات على وسط معدي محاكى عند $pH = 1.2$ و $pH = 6.8$. أظهرت النتائج أن FB يتم تحريره بطريقة مضبوطة. يرتبط تفسير النتائج ببيانات المسح المجهر الإلكتروني (SEM).

الكلمات المفتاحية: مستحلب نانو، استحلاب تلقائي، حجم القطرة، Zeta potential، تجفيف بالتجميد.

Résumé

Les nanoémulsions (NEs) sont des systèmes dispersés de l'ordre du nanomètre, très répandues au cours de ces dernières années. On peut distinguer deux voies de fabrication : les méthodes hautement énergétiques qui mettent en jeu l'apport technologique et les méthodes de basse énergie qui dépendent essentiellement de la formulation. L'objectif de ce travail est de formuler une nanoémulsion de type huile dans l'eau pouvant encapsuler en son système des principes actifs faiblement solubles. La NE formulée est à base d'huile végétale (H) dispersée à l'aide du Polysorbate 80 (T80) et en présence d'éthanol (S) dans une phase dispersante aqueuse, contenant un tensioactif anionique à savoir le sodium dodecyl sulfate (SDS) et un stabilisateur à savoir l'alcool polyvinylique (PVA). La méthode de préparation fait appel à une émulsification spontanée, une méthode de basse énergie. Le choix des proportions de ces différents composants ainsi que l'optimisation des paramètres de la méthode de préparation sont soumis aux plans d'expériences. La NE obtenue est transparente avec une turbidité moyenne de $20,0 \pm 0,4$ NTU, une taille moyenne des gouttelettes de $50,11 \pm 4,81$ nm avec un indice de polydispersité de $0,621 \pm 0,057$ et un potentiel zêta de $-23,7 \pm 0,6$ m.V. Les données numériques de la taille des nanogouttelettes concordent avec l'analyse au microscope électronique à transmission (MET). L'optimisation des paramètres opératoires sur la NE obtenue à travers un plan composite centré cubique a conduit à un processus avec des températures ne dépassant pas la température d'inversion de phase (TIP). A ce stade de développement, les résultats obtenus sont satisfaisants en termes de taille moyenne des gouttelettes et de potentiel zêta ($50,43 \pm 0,85$ nm et $-25,7 \pm 0,6$ m.V, respectivement). La turbidité, l'indice de polydispersité et le pH varient très peu. Dans une seconde étape, on a pu sélectionner la molécule modèle pour les essais in vivo, sur la base de la taille des nanogouttelettes. En effet, les essais sont conduits sur des rats rendus diabétiques afin d'explorer l'effet antilipidémiant du fénofibrate encapsulé (NE-FB). Les résultats de l'étude ont été concluants avec une réduction de 27% du taux de cholestérol et de 64% du taux des triglycérides. Enfin, pour lyophiliser et stabiliser la NE, un réseau polymérique est créé autour des nanogouttelettes en mettant au point des microsphères à base d'alginate de sodium. L'appréciation de l'efficacité d'encapsulation s'est faite à travers une cinétique de dissolution de 4 heures sur des milieux gastrique et intestinal simulés à pH=1,2 et pH=6,8. La totalité du FB est libérée de manière contrôlée. L'interprétation des résultats est associée à la microscopie électronique à balayage (MEB).

Mots clés : nanoémulsion, émulsification spontanée, taille des gouttelettes, potentiel zêta, lyophilisation.

Abstract

Nanoemulsions (NEs) are dispersed systems in the nanometer range, which have become widely used in recent years. Two manufacturing routes can be distinguished: high-energy methods involving technological input and low-energy methods that depend mainly on the formulation. The objective of this work is to formulate an oil-in-water nanoemulsion that can encapsulate poorly soluble active ingredients. The formulated NE is based on vegetable oil (H) dispersed with Polysorbate 80 (T80) and ethanol (S) in an aqueous dispersing phase, containing an anionic surfactant namely sodium dodecyl sulfate (SDS) and a stabilizer namely polyvinyl alcohol (PVA). The preparation method involves spontaneous emulsification, a low energy method. The choice of the proportions of these different components as well as the optimization of the parameters of the preparation method are subject to design of experiments. The obtained NE is transparent with an average turbidity of 20.0 ± 0.4 NTU, an average droplet size of 50.11 ± 4.81 nm with a polydispersity index of 0.621 ± 0.057 and a zeta potential of -23.7 ± 0.6 m.V. The data of the nanodroplet size is in agreement with the transmission electron microscope (TEM) analysis. Optimization of the operating parameters on the NE obtained through a cubic centred composite plane led to a process with temperatures not exceeding the phase inversion temperature (PIT). At this stage of development, the results obtained are satisfactory in terms of average droplet size and zeta potential (50.43 ± 0.85 nm and -25.7 ± 0.6 m.V, respectively). No significant variation of turbidity, polydispersity index and pH is observed. In a second step, it was possible to select the model molecule for the in vivo investigation, based on the size of the nanodroplets. Indeed, the tests are conducted on diabetic rats in order to explore the antilipidemic effect of encapsulated fenofibrate (NE-FB). The results of the study were successful with a reduction of 27% and 64% in cholesterol and triglyceride levels, respectively. Finally, to freeze-dry and stabilize the NE, a polymeric network is created around the nanodroplets by developing sodium alginate-based microspheres. The assessment of the encapsulation efficiency was done through a 4-hours dissolution kinetics on simulated gastric media at pH=1.2 and pH=6.8. The results showed that all FB is released in a controlled way. The interpretation of the results is associated with data of scanning electron microscopy (SEM).

Keywords: nanoemulsion, spontaneous emulsification, droplet size, zeta potential, freeze drying.