

POLYTECHNIQUE MONTRÉAL

affiliée à l'Université de Montréal

Formulation et caractérisation de nanocapsules lipidiques chargées en vitamine D3

FAIZA YALAOUI

Institut de génie biomédical

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de *Maîtrise ès sciences appliquées*

Génie biomédical

Août 2019

© Faiza Yalaoui, 2019.

POLYTECHNIQUE MONTRÉAL

affiliée à l'Université de Montréal

Ce mémoire intitulé :

Formulation et caractérisation de nanocapsules lipidiques chargées en vitamine D3

présenté par **Faiza YALAOUI**

en vue de l'obtention du diplôme de *Maîtrise ès sciences appliquées*

a été dûment accepté par le jury d'examen constitué de :

Delphine PÉRIÉ-CURNIER, présidente

L'hocine YAHIA, membre et directeur de recherche

Mohamed Nabil KHALID, membre et codirecteur de recherche

Mircea-Alexandru MATEESCU, membre

DÉDICACE

Nul mot ne saurait exprimer mes profonds

Sentiments envers ma famille et mes ami(e)s qui je porte de l'amour, du respect, et de la reconnaissance.

À ma mère et mon père,

Aux meilleurs parents au monde

Vous m'avez généreusement comblé d'amour et de bienveillance.

Vous avez toujours fait de votre mieux pour m'assurer le confort.

Pour votre soutien infaillible et vos sacrifices innombrables.

Je vous dois tout et je ferais de mon mieux pour rester celle dont vous avez toujours été fiers sans jamais vous décevoir.

Je dédie ce modeste travail.

Que le dieu vous garde le plus longtemps parmi nous, vous procure santé, bonheur et sérénité et de vous protège de tout mal.

À mes sœurs, mon frère, mes beaux-frères, mes nièces et mes neveux

Votre amour ne m'a jamais fait défaut.

Votre présence, soutien et encouragement m'ont permis à dépasser les difficultés que j'ai pu rencontrer.

Qu'il me soit permis de vous exprimer toute mon adoration.

Que Dieu vous accorde une vie pleine de bonheur et de santé.

À mes amies

Imene, Fatiha, Meriem, Nihad et Ikram

Votre présence, soutien et amour m'ont toujours donné de la force

Que Dieu vous accorde une vie pleine de bonheur et de santé.

A tous ceux dont l'oubli du nom n'est pas celui du cœur

REMERCIEMENTS

Je voudrais tout d'abord adresser toute ma gratitude au Monsieur Abdulla Al Ghurair et à l'équipe de sa fondation « Al Ghurair pour l'éducation » de croire en moi et de me donner la chance d'être un membre de la famille « Al Ghurair pour l'éducation ». Merci à vous ce que je suis aujourd'hui.

La réalisation de ce travail a été possible grâce aux collaborateurs : l'école polytechnique de Montréal, le collège John Abbott, CRSNG et Pfizer et aussi aux plusieurs personnes à qui je voudrais témoigner toute ma reconnaissance.

À Monsieur L'hocine Yahia, professeur à l'école Polytechnique de Montréal, mon directeur de recherche, pour son encadrement, son soutien et son apport scientifique durant ma maîtrise de recherche ainsi que pour le temps qu'il a consacré aux corrections de ce manuscrit.

À Monsieur Mohamed Nabil Khalid, professeur au collège John Abbott, mon co-directeur de recherche, de m'avoir guidé et conseillé tout le long du projet. Un merci pour son soutien ainsi que tous les conseils scientifiques et personnelles qui m'ont tellement aidé à améliorer ma qualité professionnelle.

À Madame Delphine Périé-Curnier, professeur à l'école Polytechnique de Montréal, de me faire l'honneur d'être la présidente de mon mémoire.

À Monsieur Mirecea Alexander Mateescu, professeur à l'université du Québec à Montréal, de me faire l'honneur d'être membre de jury de mon mémoire.

J'adresse mes remerciements les plus sincères,

À Madame Guylaine Larocque, conseillère senior à l'école Polytechnique de Montréal, pour ses conseils, sa gentillesse, son soutien moral et à la confiance qu'elle a toujours sue m'accorder.

À Madame Amal Bennani, agente aux dossiers étudiants, pour son encouragement et sa gentillesse et ses conseils professionnels.

Je tiens à remercier spécialement,

Sylvain Majeur, le technicien du laboratoire de collègue John Abbott, pour son soutien, son aide et sa disponibilité le long de mon travail expérimental.

Anahita Hosseinpour et Thiviya Nagamathu, mes collègues du laboratoire, pour leur aide, leur soutien ainsi que les bons moments que nous avons partagés.

RÉSUMÉ

La vitamine D3 est un nutriment lipophile. Elle a été identifiée pour la première fois au 20ème siècle pour son implication dans la survenue du rachitisme. Elle est considérée comme une pro-hormone de la famille des stéroïdes. Ces dernières décennies, la vitamine D3 a attiré l'attention de nombreux chercheurs due à ses effets non seulement squelettiques (maintenance de la bonne minéralisation d'os) mais aussi extra-squelettiques comme la prévention de cancer, de diabète et même la réduction de taux de mortalité.

L'utilisation de la nanotechnologie dans le domaine pharmaceutique a suscité un intérêt considérable ces dernières années, notamment l'utilisation de nanovecteurs pour la délivrance d'agents thérapeutiques avec une meilleure biodisponibilité en diminuant leurs effets secondaires. Parmi ces nanovecteurs, on trouve les nanoémulsions sous forme des nanocapsules lipidiques (LNCs).

L'axe de recherche de ce mémoire est l'utilisation des nanocapsules lipidiques comme plateforme pour la délivrance de la vitamine D3. Un des objectifs est de développer des nanocapsules lipidiques avec une quantité optimale de la vitamine D3 dans 3 triglycérides à chaîne moyenne (TMC) (Labrafac, Tricaprylin et LC-810L). Une étude de stabilité physique a été faite sur des LNCs chargées en vitamine D3 et vides (Placebo) à l'état liquide et après lyophilisation. Par ailleurs, une étude de la cinétique de libération de la vitamine D3 in vitro a été aussi réalisée.

A la fin, les résultats ont montré qu'on arrive à solubiliser jusqu'à 10 % p/p de la vitamine D3 dans les trois TCM. En revanche, on a eu des nanoémulsions (chargées en vitamine D3 ainsi que vides) stables qu'avec Labrafac et Tricaprylin durant plus de 6 mois ainsi qu'une stabilité de LNCs lyophilisées durant plus de deux mois.

Mots clés : nanoémulsion, nanocapsules lipidiques, méthode d'inversion de phase et vitamine D3.

ABSTRACT

Vitamin D3 is a lipophilic nutrient. It was first identified in the 20th century for its involvement in the onset of rickets. It is considered as a pro-hormone of the steroid family. In recent decades, vitamin D3 has attracted the attention of many researchers due to its effects not only skeletal (maintenance of good bone mineralization) but also extra skeletal as the prevention of cancer and diabetes or even the reduction of mortality rates.

The use of nanotechnology in the pharmaceutical field has attracted considerable interest in recent years, including the use of nanovectors for the delivery of therapeutic agents to improve their bioavailability by decreasing their side effects. Among these nanovectors, we find the lipid nanocapsules (in the form of nanoemulsions).

The research focus of this paper is the use of lipid nanocapsules as a platform for vitamin D3 delivery. One of the objectives is to develop lipid nanocapsules with an optimal amount of vitamin D3 in 3 oils (Labrafac, Tricaprylin and LC-810L). A physical stability study was conducted on LNCs loaded with vitamin D3 and empty ones (Placebo) in the liquid state and after freeze-drying. In addition, a kinetic study of vitamin D3 release *in vitro* was also carried out.

In the end, the results showed that up to 10% w/w of vitamin D3 was soluble in the 3 oils. On the other hand, we had stable nanoemulsions (loaded with vitamin D3 and empty ones) as with Labrafac and Tricaprylin more than 6 months. The lyophilized LNCs have also showed a good stability after 2 months of the resuspension in water.

Key words: nanoemulsion, lipid nanocapsules, phase inversion temperature and vitamin D3.

TABLE DES MATIÈRES

DÉDICACE	III
REMERCIEMENTS	IV
RÉSUMÉ	VI
ABSTRACT.....	VII
TABLE DES MATIÈRES	VIII
LISTE DES TABLEAUX	XI
LISTE DES FIGURES	XII
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	XIII
CHAPITRE 1 INTRODUCTION.....	1
1.1 Motivation	1
1.2 Objectif principal	2
1.3 Objectifs spécifiques	2
1.4 Structure de mémoire	3
CHAPITRE 2 L'ÉTAT DE L'ART	4
2.1 La vitamine D	4
2.1.1 Biosynthèse de la vitamine D3	5
2.1.2 Métabolisme de la vitamine D3	6
2.1.3 Taux et dosage physiologiques de la vitamine D3.....	7
2.1.4 Les effets de la vitamine D	10
2.1.4.1 Les effets squelettiques de la vitamine D	10

2.1.4.2	Les effets extra-squelettiques	12
2.2	Systèmes nanoparticulaires et ses applications pour la délivrance de médicaments	15
2.2.1	Nanoparticules à base de polymères (NPs)	16
2.2.2	Nanoparticules inorganiques.....	17
2.2.3	Nanoparticules organiques (à base de lipides).....	18
2.3	Les nanocapsules lipidiques (LNCs).....	19
2.3.1	Techniques de la préparation de LNCs	20
2.3.1.1	La méthode d'inversion de phase (PIT).....	20
2.3.2	Applications des LNCs.....	24
2.4	La lyophilisation	26
CHAPITRE 3	MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	28
3.1	Matériels	28
3.2	Méthodes	28
3.2.1	Préparation des mélanges huile-vitamine D3	28
3.2.2	Préparation de LNCs	30
3.2.3	La lyophilisation de LNCs liquides.....	31
3.2.4	Caractérisation physico-chimique de LNCs	32
3.2.4.1	Mesure de taille	32
3.2.4.2	Potentiel Zéta	33
3.2.4.3	Étude de stabilité de LNCs à l'état liquide	34
3.2.4.4	Étude de l'effet de la lyophilisation sur les LNCs.....	35
3.2.4.5	Étude de cinétique de relargage des LNCs <i>in vitro</i>	35
CHAPITRE 4	RÉSULTATS	37
4.1	Solubilité de la vitamine D3 dans les triglycérides à chaîne moyenne	37

4.2	Caractérisation physico-chimique de LNCs.....	38
4.3	Stabilité physique des LNCs.....	39
4.3.1	Stabilité physique de LNCs à l'état liquide	39
4.3.2	Stabilité physique de LNCs lyophilisées.....	43
4.4	Étude de cinétique de relargage de la vitamine D3 <i>in vitro</i>	44
CHAPITRE 5	DISCUSSION GÉNÉRALE	46
CHAPITRE 6	CONCLUSION ET RECOMMANDATION	50
RÉFÉRENCES.....		53

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2.1: Concentrations sériques de 25 (OH) D avec impact sur la santé associé	8
Tableau 2.2: Apports nutritionnels de référence en vitamine D3 [21]	9
Tableau 2.3: Les effets des ingrédients des LNCs	23
Tableau 3.1: Propriétés physico-chimiques de la vitamine D3.....	29
Tableau 3.2: Composition de 03 huiles choisis.....	29
Tableau 3.3: Codes et quantités des formulations préparées	31
Tableau 4.1: Suivi de la solubilité de la vitamine D3 dans les 03 huiles (Labrafac, Tricaprylin et LC 810L).....	38
Tableau 4.2: Suivi de taille de LNCs.....	42

LISTE DES FIGURES

Figure 2.1: les deux formes de la vitamine D	4
Figure 2.2: La bio-production de la vitamine D3 [10]	5
Figure 2.3: Métabolisme de la vitamine D3 [16]	7
Figure 2.4: Les différents types de nanoparticules utilisés pour la délivrance de PA (d'après [47])	16
Figure 2.5: Schéma représentant la structure des LNCs [67]	19
Figure 2.6: Préparation des LNCs par la méthode PIT (d'après [77])	24
Figure 4.1: Mélange huile et vitamine D3 avec différentes concentrations après 1 mois de préparation. A) Tricaprylin en 5% - 7.5% - 10% vit D3, B) Labrafac en 5% - 7.5% - 10% vit D3, C) LC-810L en 5% - 7.5% - 10% vit D3.....	37
Figure 4.2: Formulations obtenues par la méthode d'inversion de phase L5, T5, LC5, LP, TP et LCP respectivement	39
Figure 4.3: Taille des LNCs chargées (10 % vit D3) en fonction du temps	40
Figure 4.4: Taille des LNCs chargées (7.5 % vit D3) en fonction du temps	41
Figure 4.5: Taille des LNCs chargées (5 % vit D3) en fonction du temps	41
Figure 4.6: Taille des LNCs vides en fonction du temps	42
Figure 4.7: A) Formulation liquide (Labrafac, 10 % p/p vit D3), B) Formulation lyophilisée, C- Observation sous microscope optique de produit lyophilisé.....	43
Figure 4.8: Taille des LNCs "Labrafac, 10 % vit D3" avant et après la lyophilisation	44
Figure 4.9: Courbe d'étalonnage de la vitamine D3 par Spectroscopie UV-Vis à 265 nm	45

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

ADME	Absorption, distribution, métabolisme et excrétion
ADN	Acide désoxyribonucléique
AVC	Accident vasculaire cérébral
BCS	Systèmes de classification biopharmaceutique
CaT1	Transporteurs de Calcium
DLS	Technique de diffusion de lumière dynamique
E/H	Émulsion Eau dans l'huile
ECaC	Canal épithélial calcique
ELD	Électrophorèse au Laser Doppler
FDA	Food and Drug Administration
H/E	Émulsion huile dans l'eau
HLB	Balance Hydrophile Lipophile de polymère
HPLC	Chromatographie Liquide à Haute Performance
IR	Infra rouge
LNCs	Nanocapsules lipidiques
NPs	Nanoparticules polymériques
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
P/P	Fraction massique

PA	Principe Actif
PCOS	Syndrome des ovaires polykystiques
PDI	Indice de Polydispersité
PEG	Polyéthylène glycol
PGA	Acide Poly Glycolique
PLA	Acide Poly Lactique
PLGA	Acide Poly Lactique co-Glycolique
PIT	Méthode d'inversion de phase
RSCa	Récepteurs sensibles au Calcium
SLN	Nanocapsules lipidiques solides
UI	Unité internationale
UVB	Rayonnements Ultraviolet B du soleil
TCM	Triglycérides à chaîne moyenne
V/V	Fraction volumique
VDR	Récepteurs de la vitamine D
ZIP	Zone d'inversion de phase

CHAPITRE 1 INTRODUCTION

1.1 Motivation

La vitamine D a été identifiée pour la première fois au 20^{ème} siècle pour son implication dans la survenue du rachitisme. C'est en réalité une pro-hormone de la famille des stéroïdes et non une vitamine au sens propre. Elle connaît aujourd'hui un regain d'intérêt, due à ses effets osseux intéressants dans la prévention des fractures ostéoporotiques et ses effets extra-osseux comme la réduction du risque de cancer, de maladies inflammatoires et même de taux de mortalité observés dans plusieurs études. La vitamine D existe sous 5 formes différentes numérotées de 1 à 5. Deux formes de vitamine D sont importantes pour l'homme : la vitamine D2 (ergocalciférol) et la vitamine D3 (cholécalfiérol). La vitamine D2 est synthétisée principalement par les plantes. La vitamine D3 est synthétisée par l'organisme lors de l'exposition au rayonnement ultraviolet (UV-b) du soleil. La vitamine D3 est également produite chimiquement par l'industrie et utilisée comme suppléments.

La vitamine D3 est un nutriment liposoluble qui est connu par son rôle important pour la santé de l'être humain tel que : l'absorption optimale de calcium dans les intestins et sa fixation au niveau de l'os, le fonctionnement des muscles, la croissance cellulaire [1]. En 2007, plus d'un milliard de personnes ont été carencées en cette vitamine dans le monde entier [2] et selon Statique Canada, en hiver, 40% des canadiens avaient une insuffisance en vitamine D3 en comparant avec la période estivale qui est de 25%. L'hypovitaminose D est un thème d'actualité récurrent; le dépistage et le traitement des carences en vitamine D3 constituent un enjeu de santé public à cause des nombreux problèmes liés à cette anomalie. On trouve le cancer [3], le diabète [4], les maladies cardiovasculaires [5], la dysfonction ovarienne et ovulatoire chez les femmes, la faible qualité des

spermatozoïdes chez les hommes qui peuvent impliquer par la suite des problèmes de subfertilité [6]. Le faible taux en vitamine D3 chez la femme enceinte ainsi pendant la lactation va non seulement s'associer à une hypocalcémie et une diminution du taux de vitamine D3 dans le lait maternel mais aussi à un rachitisme chez le nouveau-né, une plus petite taille et une malformation dentaire plus tard [7].

À la pointe des traitements existants, on trouve les suppléments sous forme de comprimés, de capsules, et d'huile buvable et même d'injection intra-musculaire. En outre, ces formes ne sont pas convenables aux personnes qui ont le problème d'avaler ou qui oublient de prendre les compléments oraux ou encore qui ont peur des injections douloureuses. Au Canada, la vitamine D3 est rajoutée au lait : un verre de lait contient 100 UI mais cette supplémentation reste encore insuffisante pour assurer un apport quotidien optimal qui est de 1000 UI.

À cause de la grande importance de la vitamine D3 pour la maintenance de la bonne santé et la prévention des maladies, elle présente donc un intérêt majeur en thérapeutique.

1.2 Objectif principal

Objectif principal de ce projet de recherche, est de développer une nanoémulsion de type huile dans l'eau pour encapsuler la vitamine D3 sous forme des nanocapsules lipidiques pour une administration par voie orale / injectable.

1.3 Objectifs spécifiques

Les objectifs spécifiques fixés pour notre projet de maîtrise sont i) sélection d'huile appropriée pour la phase interne parmi 03 candidats, le choix est basé sur la meilleure solubilité de la vitamine D3 ; ii) générer des nanocapsules lipidiques vides, des LNCs-vitamine D3 à l'état liquide et solide

après la lyophilisation ; iii) étude de la stabilité physique qui est basée sur la détermination de taille, le potentiel Zéta ainsi que l'observation microscopique ; iv) l'étude de la cinétique de relargage *in vitro*.

1.4 Structure de mémoire

Ce mémoire est organisé en cinq chapitres. L'introduction présente le contexte clinique, la problématique et les objectifs de ce projet. Le chapitre 2, « L'état de l'art » présente une revue de littérature joignant les thèmes de la vitamine D3 et ses effets, les nanocapsules lipidiques et un aperçu des études menées jusqu'à présent sur l'encapsulation de la vitamine D3 et de principes actifs lipophiles. Le chapitre 3, « Matériels et méthodes » introduit les principaux matériels et méthodologie utilisés pour la réalisation des objectifs. Le chapitre 4 et 5, « Résultats » et « discussion générale » présentent les résultats obtenus et les discussions concernant la caractérisation physico-chimique et l'évaluation des nanocapsules lipidiques vides et chargées en vitamine D3 à l'état liquide avant et après la lyophilisation. Finalement, on termine par une conclusion et des recommandations.

CHAPITRE 2 L'ÉTAT DE L'ART

2.1 La vitamine D

La vitamine D est un groupe des nutriments liposolubles. Elles sont synthétisées par la peau à partir d'un dérivé du cholestérol ou d'ergostérol lors de l'exposition aux rayonnements UVB du soleil et delà vient le nom de « vitamine du soleil » [8]. Cette vitamine est présentée sous deux formes chez l'humain (Figure 2.1) :

- L'ergocalciférol appelé vitamine D₂ qui est produit par les levures, les champignons et les céréales, et qui est non absorbable dans le tractus digestif [9].
- Le cholécalciférol appelé vitamine D₃, est d'origine de la synthèse photochimique au niveau de l'épiderme (80-90 %) ou animale présenté dans les huiles de foie de poisson et en teneur faible dans les poissons, le lait, le beurre, le fromage (10-20 %) [9].

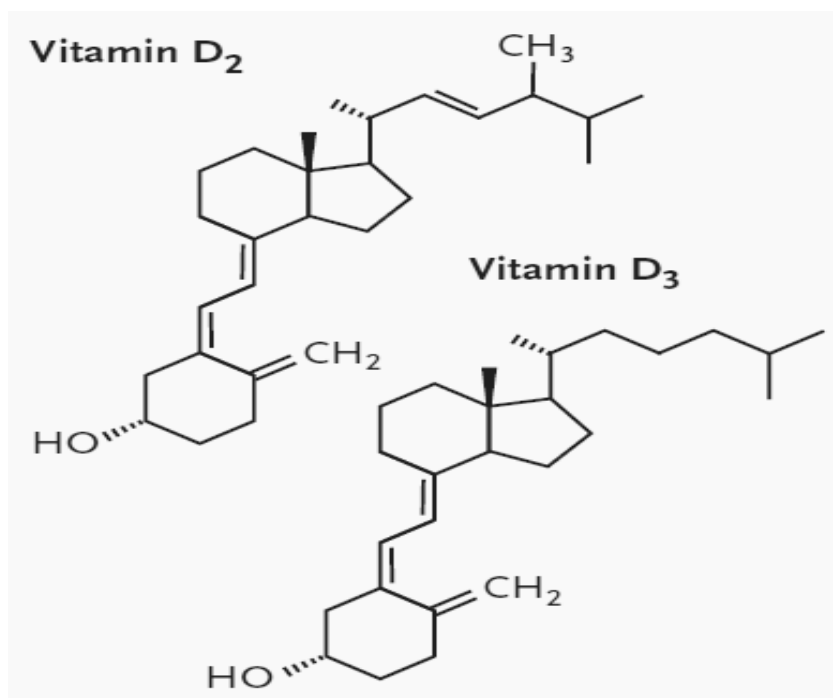


Figure 2.1: les deux formes de la vitamine D

2.1.1 Biosynthèse de la vitamine D3

Au niveau du derme et de l'épiderme, on trouve 7-déshydrocholestérol, un dérivé du cholestérol (également appelé pro-vitamine D3) dans les membranes des kératinocytes. À la présence des rayons ultraviolets B (UVB) du soleil, le 7-déshydrocholestérol (DHC) est transformé en pré-vitamine D3 [8]. L'énergie nécessaire pour cette réaction est fournie par des UVB avec une longueur d'onde entre 290 et 315 nm afin que le cycle B du 7-DHC s'ouvre par rupture de la liaison 9-10, suivie de la rotation à 180° du cycle A. Après deux heures et sous l'effet de la chaleur des rayonnements ultraviolets, la pré-vitamine D3 est isomérisée en vitamine D3 [2].

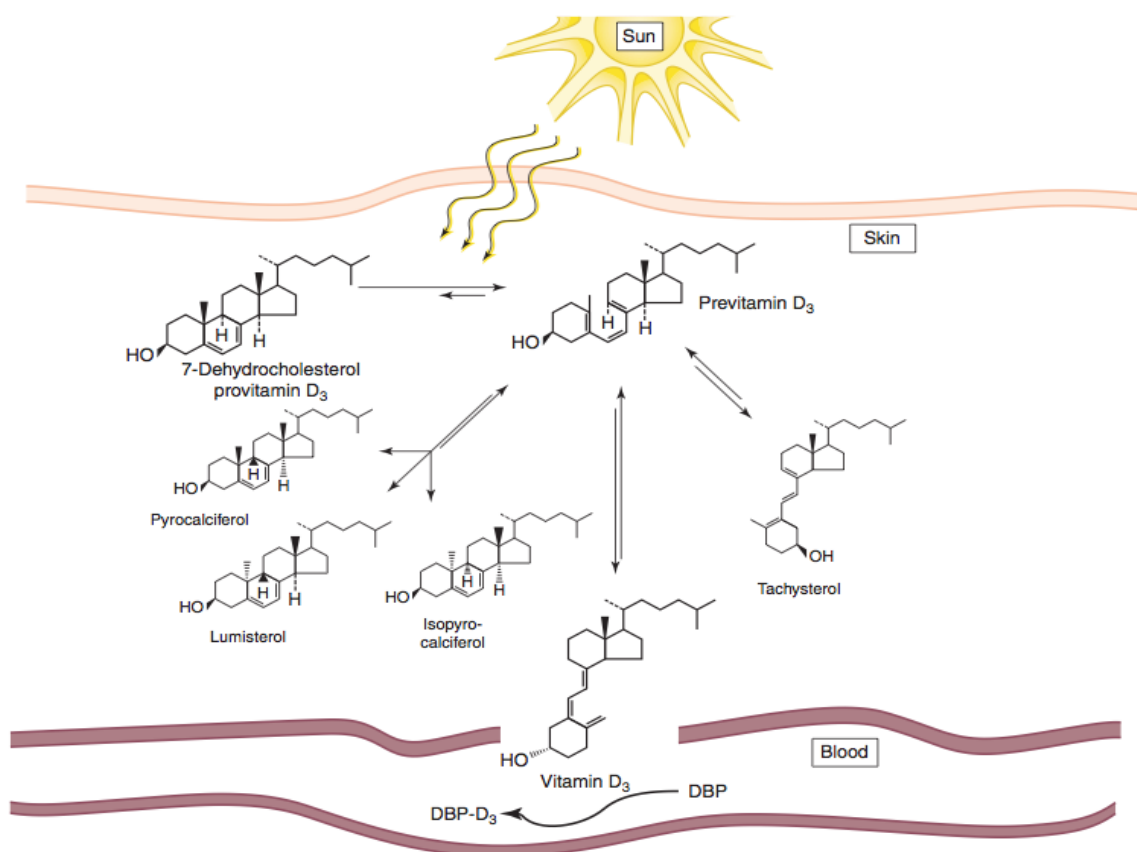


Figure 2.2: La bio-production de la vitamine D3 [10]

2.1.2 Métabolisme de la vitamine D3

Une fois que la vitamine D3 est synthétisée dans la peau, elle sera diffusée et libérée dans la circulation sanguine. Alors que pour la vitamine D3 exogène qui vient de l'alimentation et des suppléments oraux est lentement absorbée dans la partie proximale de l'intestin grêle afin d'arriver à la circulation systémique [11].

Après le brassage des aliments dans l'estomac, une émulsion sous forme des micelles mixtes hydrosolubles est formée par des acides gras et/ou des monoglycérides avec des sels biliaires afin de faciliter leur diffusion à travers la paroi des entérocytes [12]. L'inclusion de la vitamine D3 dans des chylomicrons, permet de quitter le pôle basal de la cellule de la paroi intestinale pour passer dans la circulation lymphatique, puis la circulation sanguine et le foie [13].

La vitamine D3 doit être métabolisée au niveau hépatique puis rénal pour devenir pleinement active [2] (Figure 2.3). Une fois que la vitamine D3 circule dans le sang, elle sera complexée par la vitamine D-binding protein (DBP). Au niveau de foie, la vitamine D3 est hydroxylée pour former la 25-hydroxyl vitamine D [25(OH) D]. C'est la principale forme circulante de vitamine D3 qui est un bon reflet du statut vitaminique D3 (Tableau 2.1). La deuxième hydroxylation s'effectue dans les tissus rénaux et extra-rénaux à l'aide de 1α -hydroxylase qui permet l'obtention de calcitriol [1,25(OH) 2D], la forme hormonale active de la vitamine D3 [14].

L'hormone 1,25(OH) 2D agit via le VDR (Vitamin D Receptor) qui est exprimé dans 2776 positions génomiques et modulent l'expression de 229 gènes dans plus de 30 tissus différents, tels que le squelette, le cerveau, le sein, le pancréas, les glandes parathyroïdes, les cellules immunitaires, les cardiomyocytes et les ovaires sauf les globules rouges, les cellules du muscle strié mature, et quelques cellules cérébrales très différenciées afin d'avoir un effet spécifique [15].

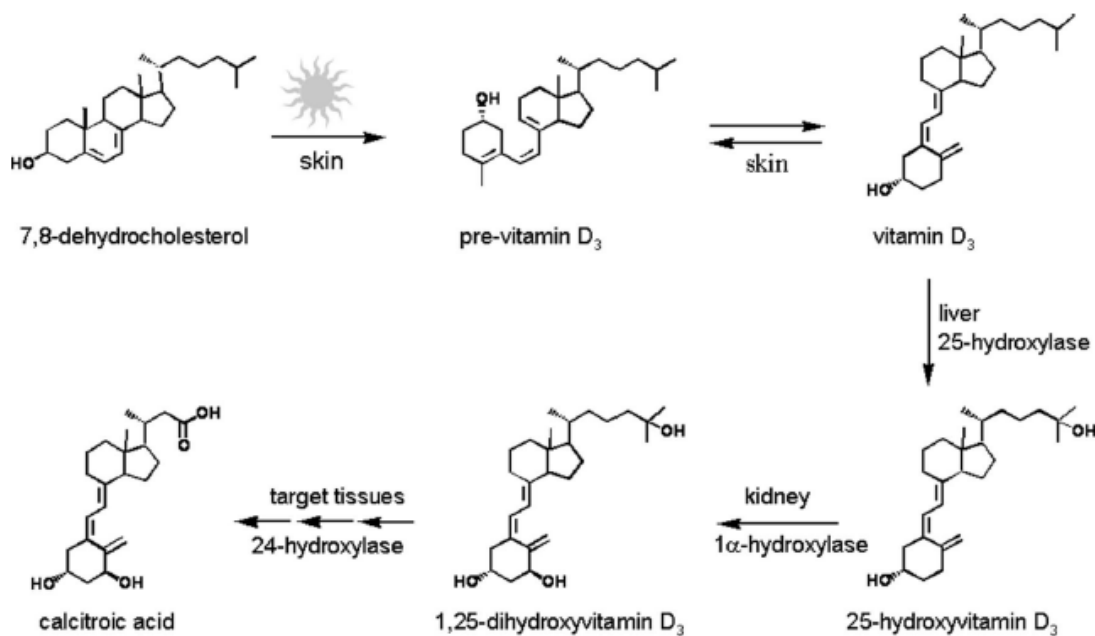


Figure 2.3: Métabolisme de la vitamine D3 [16]

2.1.3 Taux et dosage physiologiques de la vitamine D3

Les concentrations de 25 (OH) D ont été controversées pour bien distinguer les impacts sur la santé. Il a été montré qu'une concentration de 40 ng/ml (100 nmol/l) de 25 (OH) D soit requise pour une activité maximale de 1 α -hydroxylase de 50%. Alors que la majorité des études ont révélé que les concentrations optimales de 25 (OH) D sont comprises entre 30 et 50 ng/ml (75 et 125 nmol/l) qui sont proches de l'activité maximale de la 1 α -hydroxylase [17]. D'autre part, selon l'étude de Spedding et al (1996), la concentration minimale de 25 (OH) D associée à un risque plus faible des troubles osseux et des maladies non squelettiques est de 10 ng/ml (25 nmol/ml) [18]. Tandis qu'en dessous de 10 ng/ml (25 nmol/l), les cellules et les tissus sont exposés à une concentration pathologique avec des conséquences délétères sur la santé [19]. Le surdosage en vitamine D reste un phénomène exceptionnel. En cas de taux élevé, les excès sont convertis et excrétés au niveau du rein, limitant la toxicité (> 150ng/ml) et la rendant rare [20].

Tableau 2.1: Concentrations sériques de 25 (OH) D avec impact sur la santé

25 OH(D) (nmol/l)	25 OH(D) (ng/ml)	Statut
< 25	< 10	Carence
25 - 75	10 - 30	Insuffisance
75 - 125	30 - 50	Suffisance
> 375	> 150	Toxicité

La concentration de 25 (OH) D dépend d'un accès adéquat à la vitamine D. À cause des facteurs socioculturels et ethniques (style vestimentaire, utilisation excessive de la crème solaire, pigmentation de la peau) qui empêche la biosynthèse de la vitamine D. Donc l'objectif de la supplémentation en vitamine D est d'atteindre et de maintenir les concentrations optimales en 25 (OH) D sans effets indésirables. Le tableau 2.2 résume les apports nutritionnels de la vitamine D décrétés par Institutes of Medicine US en 2010 [21].

Tableau 2.2: Apports nutritionnels de référence en vitamine D3 [21]

Age	BME (IU*/jour)	ANR (IU/jour)	Quantité maximale (IU/jour)
Nourrisson 0-6 mois	200	200	1000
Nourrisson 6-12 mois	260	260	1500
1-3 ans	400	600	2500
4-8 ans	400	600	3000
9-13 ans	400	600	4000
14-18 ans			
19-30 ans			
31-50 ans			
51-70 ans femme			
51-70 ans homme			
14-18 ans (Enceinte et lactation)			
19-50 ans (Enceinte et lactation)	400	/	4000

BME: Besoin moyen estimé

ANR: Apport nutritionnel recommandé

*: UI (International Unit) où 40 UI = 1 µg

2.1.4 Les effets de la vitamine D

2.1.4.1 Les effets squelettiques de la vitamine D

Les effets squelettiques de la forme hormonale de la vitamine D interviennent au niveau de l'intestin, des reins et des glandes parathyroïdes et de l'os.

Le calcitriol (1,25(OH) 2D) est impliqué dans l'homéostasie du calcium et du phosphate. Il permet d'augmenter l'absorption intestinale du calcium et même du phosphate à cause de la présence des Vitamin D Receptors au niveau de l'intestin. En effet, la synthèse du transporteur de calcium (CaT1) qui est le mode d'action majeur pour l'absorption intestinale du calcium ainsi que la synthèse de la protéine calbindine qui favorise la diffusion passive des ions de calcium entre les cellules intestinales et le plasma, sont augmentées en présence de la vitamine D3 [22].

Le 1,25(OH) 2D a un rôle direct sur la réabsorption tubulaire du calcium au niveau du canal épithélial calcique (ECaC). Elle stimule aussi la réabsorption des phosphates indirectement par l'inhibition de la sécrétion de parathormone (PTH) produite par l'hypercalcémie associée à l'administration de vitamine D3 [13].

Le 1,25(OH) 2D joue un rôle de régulateur de la réponse des glandes parathyroïdes au calcium. Les glandes parathyroïdes détectent toute variation de calcémie à l'aide des récepteurs sensibles au calcium (RSCa). En cas d'une diminution de calcium circulant, une synthèse de parathormone (PTH) est effectuée, alors qu'une augmentation induit l'effet contraire en inhibant la croissance des cellules parathyroïdes par effet supresseur [15].

- L'effet sur l'ostéoporose

L'impact osseux de la vitamine D est l'un des plus documenté. Le 1,25(OH) 2D permet de maintenir les taux de calcium et de phosphore qui influencent la minéralisation de l'os. En cas de

déficience en vitamine D, une perte du volume et de la densité osseuse est observée avec une survenue fréquente d'hypominéralisation, d'ostéoporose et des microfissures. Le 1,25(OH) 2D agit sur les cellules responsables à la résorption osseuse par le remodelage. Ce remodelage est assuré par deux types de cellules, les ostéoclastes qui résorbent la matrice osseuse et les ostéoblastes (cellules de la matrice extracellulaire) qui synthétisent une nouvelle matrice. À des doses physiologiques, la 1,25(OH) 2D active la différenciation et la maturation des ostéoblastes qui synthétisent la matrice osseuse. À des doses importantes, l'effet est inverse. Les ostéoblastes activent la différenciation et la prolifération des ostéoclastes qui vont par la suite détruire la matrice osseuse [23], [24]. Les VDR présentent aussi au niveau de cytosol des Chondrocytes qui permet le développement du cartilage [12].

- **Effet sur l'ostéointégration des implants**

Dans le domaine d'implantologie dentaire, la vitamine D3 a été étudiée en tant que facteur qui influence sur le contact, l'intégration et la stabilité d'implant au niveau de l'os [25]. Notamment, parmi les effets de la vitamine D3 sur le métabolisme osseux, la régularisation positive de l'expression génique de l'ostéocalcine, de l'ostéopontine, de la formation améliorée de protéines de la matrice extracellulaire par les ostéoblastes et de la stimulation de l'activité des ostéoclastes [26], [27]. Au-delà, la vitamine D3 a un impact sur la réponse immunitaire innée et adaptative dans le domaine de l'ostéoimmunologie qui pourrait intervenir dans la guérison précoce des implants [28]. Une carence en vitamine D3 peut perturber l'équilibre entre le système immunitaire et le métabolisme osseux pendant l'intégration de l'implant en raison d'une altération de la fonction des ostéoclastes. Lors d'une carence en vitamine D3, le phénomène de l'élimination des débris osseux par les ostéoclastes pourrait être entravé, car la migration des monocytes précurseurs des ostéoclastes est contrôlée par la vitamine D3 [29]. D'autre part, le faible taux en vitamine D3 peut

modifier la libération des cytokines par les cellules immunitaires qui peut conduire à un déséquilibre de l'activation et de la différenciation des ostéoclastes [30]. Donc, un taux adéquat en vitamine D3 est nécessaire pour assurer une meilleure ostéointégration des implants.

2.1.4.2 Les effets extra-squelettiques

D'après nombreuses études, la carence en vitamine D3 est associée avec des nombreuses maladies comme les maladies hyper-prolifératives (le cancer), certaines infections, les maladies auto-immunes (le diabète, la polyarthrite rhumatoïde et la sclérose en plaques), les maladies cardiovasculaires (l'hypertension artérielle, l'insuffisance cardiaque), influence sur la fonction musculaire (diminution de la masse, de la force et la contractilité musculaire chez les personnes âgées).

- Cancer et la vitamine D3

La 1,25(OH)₂D agit comme une hormone stéroïde classique ciblant l'expression de plus de 200 gènes de façon directe ou indirecte, impliqués dans la régulation de la prolifération cellulaire, la différenciation, l'apoptose et l'angiogenèse [2]. Elle réduit la prolifération cellulaire des cellules saines et des cellules cancéreuses et induit leur différenciation terminale. Des études épidémiologiques prospectives et rétrospectives indiquent que la carence en vitamine D3 est associée à un risque accru de 30 à 50% d'incidence de cancers du côlon, de la prostate, du sein, du poumon, des ovaires, de l'utérus, du rein et de la vessie, ainsi que d'une mortalité plus élevée générée par ces cancers [31], [32]. Le calcitriol joue un rôle majeur dans l'évolution et le traitement des tumeurs cancéreuses. Par conséquent, plusieurs voies par laquelle le calcitriol peut prévenir, traiter ou arrêter la croissance tumorale, plus spécifiquement : (1) l'inhibition de la croissance des cellules tumorales; (2) inhibition de l'angiogenèse et des métastases tumorales ; (3) déclencher

l'apoptose ; (4) renforcer l'action thérapeutique des agents anticancéreux « traditionnels » [13] qui par la suite encourage l'utilisation de la vitamine D3 pour la prévention et le traitement du cancer.

- **Système immunitaire et la vitamine D3**

Des études épidémiologiques et expérimentales ont mis en relation la vitamine D3 et les maladies auto-immunes telles que la sclérose en plaques, le diabète (type I et II) et la polyarthrite rhumatoïde [33]. Les VDR sont présents au niveau des cellules de système immunitaire (inné et adaptatif), en particulier : le cytosol des macrophages, des lymphocytes B et T, des neutrophiles polynucléaires et des cellules dendritiques qui sont capables de synthétiser du calcitriol qui induit des effets immunomodulateurs [34], [35] et qui contribue à améliorer les réactions immunitaires naturelles du corps et à diminuer les effets d'inflammation.

Dans le cas de diabète, la carence en vitamine D3 est associée à une incapacité de réguler la glycémie (syndrome métabolique), une augmentation de l'insulinorésistance et une diminution de la production d'insuline, qui se traduit au diabète de type II [4]. Le calcitriol stimule les cellules bêta pour la synthèse d'insuline. Donc on peut utiliser la vitamine D3 et ses métabolites comme un traitement potentiel préventif ou curatif du diabète [36].

- **Les maladies cardiovasculaires et la vitamine D3**

Les VDR sont exprimés sur les cellules des muscles lisses, les cellules endothéliales des vaisseaux [33] dont le calcitriol exerce des effets sur le système rénine-angiotensine en inhibant l'expression du gène de la rénine, sur le contrôle glycémique, sur les cytokines inflammatoires, sur le système vasculaire et sur la régulation du taux d'hormones parathyroïdiennes et sur le dépôt de calcium dans le muscle lisse vasculaire [5]. Des études suggèrent, qu'une carence en vitamine D3 peut altérer le système cardiovasculaire. Le faible taux en vitamine D3 a été révélé comme un facteur de l'augmentation de la tension artérielle [5] et de risque d'accident vasculaire cérébral (AVC) [37].

Une publication de la Johns Hopkins University School of Medicine confirme également que la carence en vitamine D3 puisse être une cause de surmortalité par accident vasculaire cérébral (AVC) [37].

- **La vitamine D3 et l'infertilité chez la femme et l'homme**

Selon l'Organisation mondiale de la santé (OMS), l'infertilité est l'absence de grossesse après plus de 12 mois de rapports sexuels réguliers sans protection qui est associée avec des aspects médicaux, psychosociaux et économiques. D'après les études, les VDR et les enzymes de métabolisme de la vitamine D3 sont présents aussi dans les tissus impliqués dans la reproduction chez la femme (les cellules de la granulosa de l'ovaire, les cellules endométriales et la glande pituitaire) [38] et chez l'homme (prostate, testicule et les spermatozoïdes) [39]. Parmi les causes majeures de l'infertilité chez les femmes, on trouve le syndrome des ovaires polykystiques (PCOS) [40] et l'endométriose [41] et pour les hommes, la qualité des spermatozoïdes et la testiculopathie [39]. Des chercheurs ont trouvé que la carence en vitamine D3 est fréquente chez les sujets infertiles [42], [43] mais des études supplémentaires sont nécessaires pour définir clairement la pertinence de la vitamine D3.

- **La grossesse et la lactation**

Le taux de la vitamine D3 chez la femme enceinte ainsi pendant la lactation peut influencer sur la santé de l'enfant plus tard dans la vie d'une part et sur l'état de santé de la mère de l'autre. Pendant le dernier trimestre de la grossesse, le fœtus se développe rapidement et tend à épuiser la réserve de la vitamine D3 de la mère afin d'incorporer le calcium dans son squelette [44]. Une carence en vitamine D3 chez la mère va non seulement s'associer à une hypocalcémie et une diminution du taux de vitamine D3 dans le lait maternel mais aussi à un rachitisme chez le nouveau-né, une plus petite taille et au malformation dentaire plus tard. Il est donc très important que le taux de vitamine D3 chez la mère soit suffisant pour respecter ses propres besoins et ceux de son nourrisson [41].

2.2 Systèmes nanoparticulaires et ses applications pour la délivrance de médicaments

L'encapsulation fait référence aux technologies permettant d'enfermer un ou plusieurs constituant(s) au sein de particules présentant une géométrie et des propriétés spécifiques. Elle a un grand intérêt dans les industries de cosmétique, des peintures, du bâtiment et d'agriculture [45].

Dans le domaine médical et pharmaceutique, les médicaments conventionnels présentent certains inconvénients comme la petite fraction qui arrive à la cible (faible biodisponibilité) due au faible passage au niveau des différentes barrières biologiques ainsi que les effets secondaires sur l'organisme. Une nouvelle approche consiste à encapsuler les agents thérapeutiques dans des nanovecteurs. Un nanovecteur est une boîte nanométrique qui peut acheminer et transporter une charge moléculaire vers un endroit précis puis la relâcher. L'objectif principal des nanovecteurs est l'augmentation de la biodisponibilité, de l'efficacité, diminution de la cytotoxicité de médicaments par l'amélioration de leur forme d'administration [46].

Il existe une grande variété des nanovecteurs dont les nanoparticules organiques, inorganiques ou polymériques. Ils sont dédiés à améliorer les paramètres de l'ADMET (absorption, distribution, métabolisme, excrétion, toxicité) du principe actif (PA) dans l'organisme avec une emphase particulière sur l'étape de distribution. Ils permettent aussi de masquer les propriétés indésirables de PA, tel que le goût amer. Ils peuvent aussi protéger le PA contre la dégradation chimique et biologique, modifier et améliorer la libération ainsi que sa capacité à atteindre sa cible avec une libération appropriée (libération prolongée, accélérée, retardée) [46].

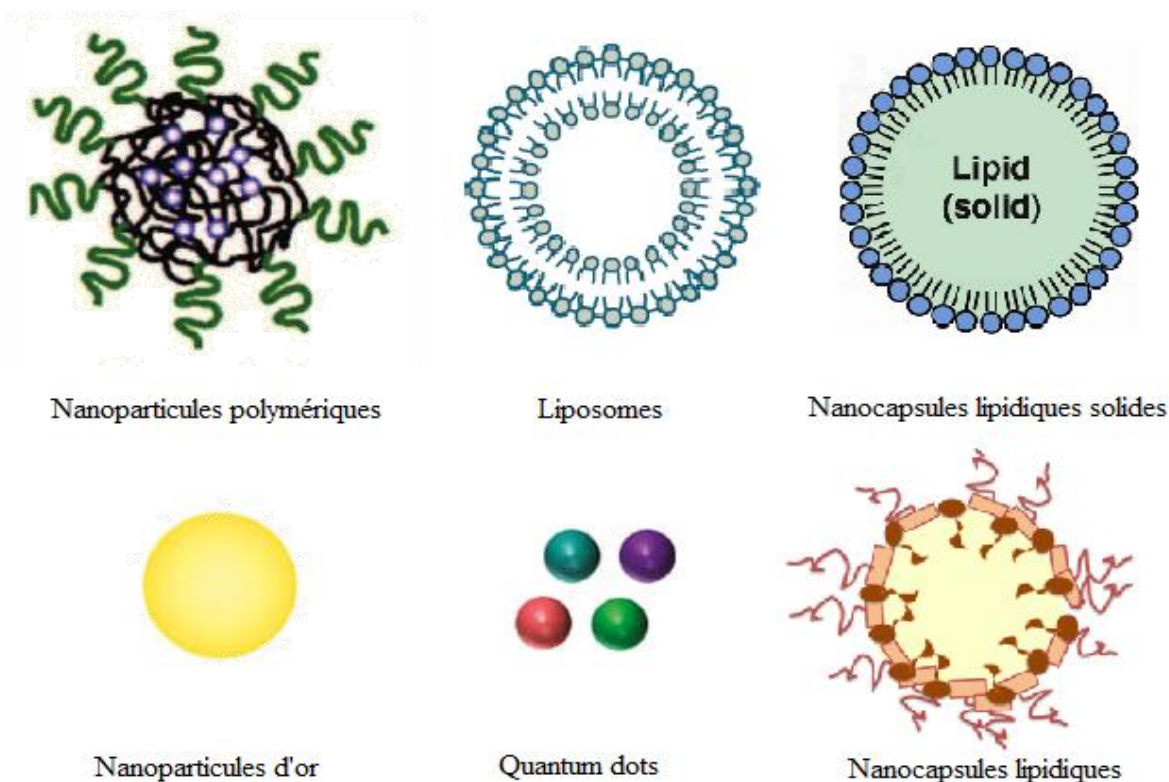


Figure 2.4: Les différents types de nanoparticules utilisés pour la délivrance de PA (d'après [47])

2.2.1 Nanoparticules à base de polymères (NPs)

Les nanoparticules polymériques sont des structures à base des polymères naturelles ou synthétiques. Les polymères les plus utilisés actuellement sont le poly (acide lactique) 'PLA', le poly (acide glycolique) 'PGA', le poly (acide lactic coglycolique) 'PLGA', le chitosane. Elles présentent une plateforme intéressante sur laquelle des traitements de la surface peuvent être réalisés. Parmi ces traitements, on trouve des modifications chimiques de la surface afin de modifier les propriétés physico-chimiques des NPs (exp : diminution de la cytotoxicité des NPs). Les NPs fonctionnalisées (dites de troisième génération) introduisent le concept de ciblage actif afin d'augmenter la spécificité pour un site donné et de contrôler la pharmacocinétique en fait associer à la surface des molécules (anticorps, ligand, chaîne de PEG). Mais, un des inconvénients

est la difficulté d'éliminer complètement le solvant organique résiduel au cours de la préparation [47], [48].

Depuis la synthèse des premiers nanovecteurs dans les années 1970, les NPs ont été utilisées avec succès pour la délivrance des agents antimicrobiens, des anticancéreux et même des nutriments. Le groupe de Carvalho et al (2013) [49] ont effectué une étude *in vivo* sur des souris ayant de leishmaniose cutanée afin de délivrer des NPS de PLGA-Amphotéricine B. Elles sont utilisées largement comme des vecteurs pour la délivrance ciblée des agents anti-cancéreux dans la chimiothérapie. Le groupe de Hitesh Kulharia et al (2014) [50] a travaillé sur des NPs de PLGA-Docetaxel conjuguées avec de peptide *in ex-vivo* sur des cellules cancéreuses du sein, le groupe de Lakshmi Pallavi Ganipineni et al (2018) [51] ont utilisé des NPs de PLGA-Paclitaxel avec ciblage magnétique des tumeurs de cerveau. Dans le cas des nutriments lipophiles, le groupe de Muriel Subirade (2015) [52] a encapsulé la vitamine D3 dans des NPs de β -lactoglobuline. Pradeep Vavia et son co-travailleurs (2017) [53] ont administré la vitamine D3 dans des microsphères biodégradables de PLGA par voie injectable. Behdad Delavari et al [54] ont délivré la vitamine D3 dans des NPs à la base de α -lactalbumine.

2.2.2 Nanoparticules inorganiques

Dans la catégorie des nanoparticules inorganiques, on trouve les nanoparticules métalliques, comme les nanoparticules d'oxyde de fer, d'or, d'argent ou encore des nanoparticules semi-conductrices qui possèdent des propriétés d'émission fluorescente (les quantum dots) afin de les utiliser dans les applications d'imagerie médicale à cause de leurs propriétés optiques ou magnétiques [55]. Une étude a été effectuée à l'Université de Montréal sous la direction de Professeur Yahia, ils ont utilisé des NPs d'oxyde de fer pour le traitement de l'athérosclérose [56].

Le groupe de Miqin Zhang [57] a montré l'utilisation des NPs magnétiques dans l'imagerie IRM et la délivrance ciblée.

2.2.3 Nanoparticules organiques (à base de lipides)

Dans cette catégorie, on trouve les liposomes, micelles, SLN, LNC. Le principal avantage de ces systèmes est l'utilisation des ingrédients non toxiques tels que les lipides physiologiques, les cires, les triglycérides ou les phospholipides [58]. En outre, ils sont capables d'encapsuler des molécules lipophiles ou hydrophiles et leur petite taille facilite leur diffusion tissulaire et leur endocytose [47].

- Les nanoparticules lipidiques solides (SLNs)

Les nanoparticules lipidiques solides sont des suspensions colloïdales de lipides en remplaçant le cœur huileux aqueux d'une émulsion huile/eau par un lipide solide ou un mélange de lipides solides [59]. Elles ont un meilleur contrôle du relargage du principe actif pour une administration orale à cause de la diminution de la mobilité moléculaire, la protection de principe actif contre les conditions sévères de tractus gastrointestinal [60], [61].

- Les liposomes

Les liposomes sont des particules colloïdales sphériques de quelques dizaines à quelques centaines de nanomètres constituées d'une ou plusieurs bicouches lipidiques composées de phospholipides avec un cœur aqueux. Ils ont la capacité d'encapsuler des molécules lipophiles dans la bicouche lipidique et hydrophiles grâce à leur cœur aqueux. Ce sont parmi les premiers systèmes commercialisés pour la chimiothérapie [62]. L'équipe de Vladimir Torchilin [63] a travaillé beaucoup sur les liposomes-anti-cancéreux (Doxorubicine). Dans le domaine alimentaire, Hamed Hamishehkar et ses co-travailleurs [64] ont encapsulé la vitamine D3 dans des liposomes afin de

fortifier les boissons. Avec le développement de la nanotechnologie, les liposomes deviennent plus en plus utilisés en clinique grâce à leur rôle important pour le traitement de diverses maladies.

2.3 Les nanocapsules lipidiques (LNCs)

Les LNCs sont des nanoparticules lipidiques de taille entre 20 à 100 nm, caractérisées par une structure hybride entre les nanoparticules polymériques et les liposomes [65]. Elles sont composées d'un noyau huileux liquide, correspondant à des triglycérides à chaîne moyenne, entouré par une enveloppe de tensioactifs lipophiles et hydrophiles par exemple un mélange de lécithine et d'un tensioactif pégylé [66].

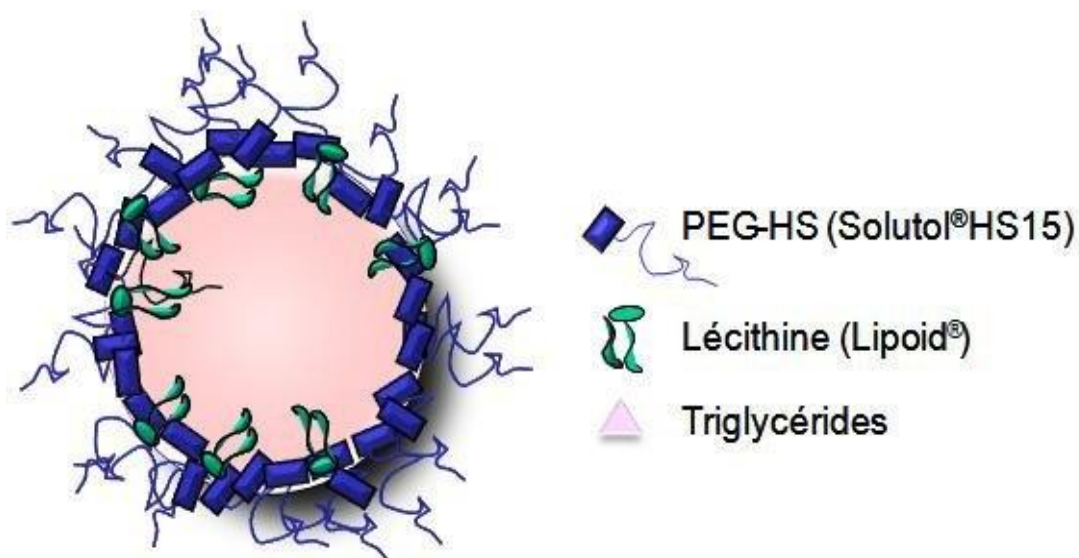


Figure 2.5: Schéma représentant la structure des LNCs [67]

Elles sont dotées de plusieurs avantages [66] :

- Des constituants biocompatibles et approuvés par la FDA (Food and Drug Administration) ;
- Une formulation simple et sans composés organiques volatils (COV);
- Le cœur huileux des LNCs permet d'encapsuler idéalement des principes actifs lipophiles

- Ces nanovecteurs ont une stabilité physique supérieure à 18 mois.

Parmi les études nécessaires pour le développement préclinique des LNCs en tant que véhicule pharmaceutique, est la détermination de la cytotoxicité et la génotoxicité des LNCs. D'après Gaël Le Roux et al [68], les résultats ont montré un effet de la taille de LNCs sur le profil de toxicité : plus les LNCs étaient petites, plus elles étaient toxiques. De plus, les LNCs n'étaient pas plus toxiques que leurs composants dans des mélanges simples montrant que le Solutol® HS15 était le seul constituant à présenter une cytotoxicité, sa CL50 a atteint 0,427 mg/ml. Alors que les tests de génotoxicité n'ont révélé aucun dommage à l'ADN des lymphocytes humains dans les tests in vitro de Comet utilisant des traitements de 4 heures et de 24 heures.

2.3.1 Techniques de la préparation de LNCs

Les LNCs peuvent être préparées par nombreux procédés tel que l'homogénéisation haute pression, la dispersion à chaud d'une microémulsion ou l'émulsification par microcanal mais certains de ces procédés nécessitent des apports énergétiques importants ou des solvants organiques. Les techniques à faible énergie sont basées sur la formation spontanée des nano-gouttelettes des mélanges huile, eau et émulsifiants lorsque leur composition ou les conditions environnementales sont altérées [69].

2.3.1.1 La méthode d'inversion de phase (PIT)

La méthode d'inversion de phase repose sur les changements de solubilité des surfactants non ioniques selon les variations de température. En variant le profil température-temps de certains mélanges d'huile, d'eau et de surfactant non ionique, une transformation contrôlée d'une émulsion d'un type à un autre (de E / H en H / E ou vice versa) à travers une phase bicontinue intermédiaire

[66], [70]. La force motrice de cette méthode est la modification de la balance hydrophile-lipophile (HLB) du tensioactif en fonction de la température [71].

Les trois principaux composés utilisés pour la préparation des LNCs obtenues par le procédé d'inversion de phase (PIT) sont une huile, tensioactif(s) non ionique(s) et de l'eau. L'huile utilisée est constituée essentiellement de triglycérides à chaînes moyennes, des acides capryliques (chaîne en C8) et acides capriques (chaîne en C10). Le tensioactif non ionique est un dérivé fortement polyéthoxylé, le Solutol HS15, comportant principalement du polyéthylène glycol 660 (PEG, 30%) et du PEG 660-12-hydroxystéarate (HS-PEG, 70%). Du chlorure de sodium est utilisé comme la phase aqueuse pour la détermination de type d'émulsion en fonction de la conductivité (phase aqueuse est la phase dispersée ou dispersante) ainsi qu'un tensioactif phospholipidique en faible proportion est également utilisé pour assurer la rigidité d'enveloppe de LNCs. Ce tensioactif est de Lipoid S75-3, une lécithine de soja contenant environ de 69% de phosphatidylcholine et 10% de phosphatidyléthanolamine. Tous ces composés ont été approuvés par la FDA pour une administration orale, topique ou parentérale [66].

La préparation des LNCs est réalisée en deux étapes [72] :

- Formation d'une microémulsion par inversions de phase successives ;
- Déstructuration de cette microémulsion pour former les LNCs proprement dites (nanoémulsion).

✓ **Formation de la microémulsion**

Elle est préparée par plusieurs inversions de phase entre une émulsion E/H et H/E. Ces inversions de phase sont réalisées par des cycles de chauffage et refroidissement [69]. L'inversion de phase s'accompagne d'un changement macroscopique du système, plus ou moins visible selon les

proportions de chaque constituant. La zone d'inversion de phase (ZIP) peut être déterminée par suivi de conductivité. Une conductivité très faible ($< 10^{-2} \mu\text{S/cm}$) identifie une émulsion E/H, tandis qu'une conductivité plus forte traduit une émulsion H/E. Cette étude permet de déterminer les températures de début et de fin d'inversion de phase (T_1 et T_2) ainsi que la température à atteindre avant dilution du système (T_d). Au cours de la ZIP, le système se présente sous la forme d'une structure bicontinue (domaines d'eau et d'huile interconnectés et toujours séparés par un film de tensioactifs). Pour une formulation donnée, les constituants sont mélangés sous agitation magnétique douce. Après homogénéisation, le système est progressivement chauffé jusqu'à la température maximale ($T_{\text{max}} > T_2$), puis refroidi jusqu'à la température minimale ($T_{\text{min}} < T_1$). Classiquement, trois cycles sont réalisés entre T_{min} et T_{max} . [73].

La PIT est régie par les modifications de solubilité du tensioactif polyéthoxylé en fonction de la température. Ces variations de solubilité sont liées aux différents degrés d'hydratation des groupements oxyde d'éthylène. À faible température, les dérivés polyéthoxylés sont hydrosolubles : des moments dipolaires induits permettent l'établissement de liaisons hydrogènes entre les molécules d'eau et les doublets non liant d'oxyde d'éthylène. Lors du chauffage au-dessus d'une température critique, l'agitation thermique provoque la disparition des moments dipolaires induits et les dérivés polyéthoxylés deviennent liposolubles. Cette température critique dépend du composé utilisé. Les températures à atteindre dans la zone d'inversion de température peuvent donc être modulées en modifiant le tensioactif polyéthoxylé utilisé, pour une salinité du milieu fixée. De même, l'augmentation de la quantité de tensioactif polyéthoxylé diminue la température d'inversion de phase [66].

La concentration de chlorure de sodium dans la phase aqueuse, ou salinité, modifie la solubilité du tensioactif polyéthoxylé et donc la température d'inversion de phase du système [69], [74]. Ce

paramètre permet par conséquent de moduler les températures à atteindre pour structurer la micro-émulsion au cours de la première étape de la formation des LNCs. Ainsi, une augmentation de la salinité permet de diminuer les températures nécessaires à l'inversion de phase. Les cycles de température permettent de stabiliser la micro-émulsion, qui sont en fonction de la concentration de tensioactif polyéthoxylé présent. Plus cette concentration est faible, plus un nombre élevé de cycles doit être réalisé pour garantir la taille et la monodispersité des LNCs [75]. Le nombre de cycles apparaît donc comme un paramètre crucial de la formulation [69]. Au sein de la zone de faisabilité de nanoémulsions, l'augmentation du nombre de cycles au-delà des trois réalisés classiquement n'apporte pas d'avantage en termes de réduction de la taille ou de la polydispersité des nanocapsules. Cependant, pour certaines proportions de constituants, un ou deux cycles suffisent pour garantir les caractéristiques finales des LNCs. Ces éléments permettent donc de moduler le procédé en diminuant les températures ou le nombre de cycles, afin d'encapsuler des molécules plus ou moins thermosensibles [75], [76].

Tableau 2.3: Les effets des ingrédients des LNCs

Facteurs	Effet
Tensioactif pegylé	Influence majeure sur la formation et la stabilité de LNCs
Nombre de cycles	Favoriser la formation de LNCs et améliorer la qualité de dispersion
Tensioactif phospholipidique	Stabilise la couche rigide de LNCs et favoriser la lyophilisation
Chlorure de Sodium	Diminuer le PIT
Phase huileuse	Influence sur la taille de LNCs

✓ Formation des nanocapsules

Après la réalisation de trois cycles de température, le système est refroidi jusqu'à une température T_d comprise dans la ZIP ($T_1 < T_d < T_2$). Il est alors figé par dilution dans un grand volume d'eau froide. Les nanocapsules lipidiques obtenues sont en suspension dans la phase externe aqueuse [69].

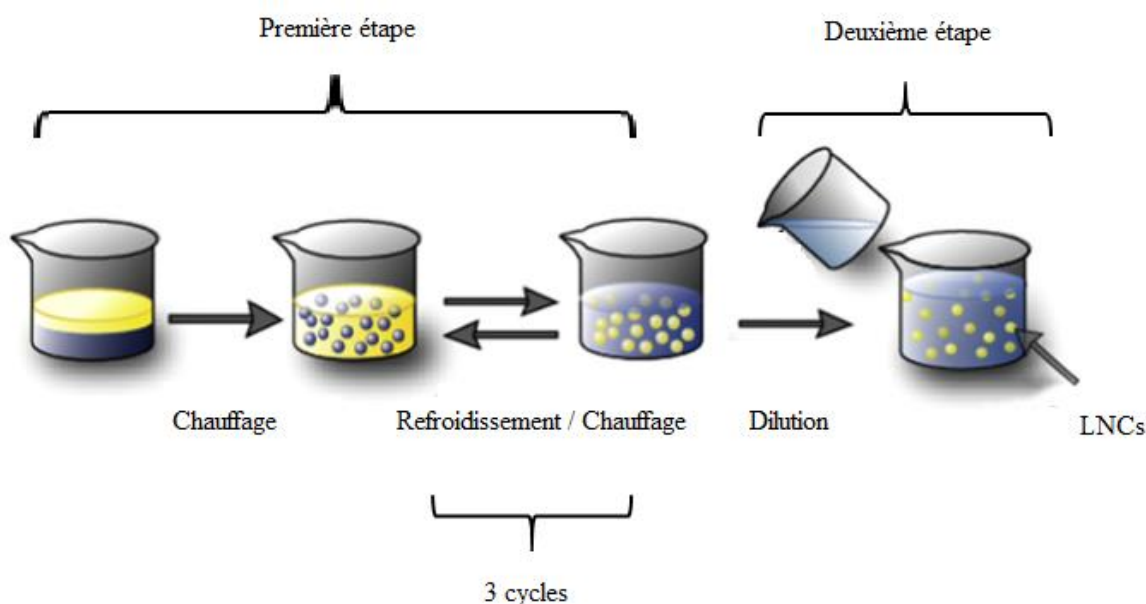


Figure 2.6: Préparation des LNCs par la méthode PIT (d'après [77])

2.3.2 Applications des LNCs

Des formulations de LNCs ont été préparées initialement en 2000 jusqu'à ce moment, avec nombreuses catégories de principes actifs lipophiles et amphiphiles. Alf Lamprecht et al, ont préparé de LNCs de diamètre de 45 à 60 nm pour faire dissoudre l'ibuprofène dans le labrafac. L'administration a été réalisée par voie orale et intraveineuse chez le rat. Ils ont trouvé que dans le cas de LNCs, un temps de présence dans le plasma ainsi qu'une libération prolongée par rapport aux solutions de l'ibuprofène [78]. Une étude comparative entre LNCs et les autres nanovecteurs pour l'administration intradermique de l'ibuprofène a été faite. Les résultats ont constaté que les

LNCs montrent une amélioration de la perméabilité par rapport aux NPs, alors que la perméabilité de LNCs a été similaire à celle du SLNs mais avec l'avantage d'une accumulation plus faible par voie intradermique [79].

Pour les molécules anticancéreuses, plusieurs études ont été réalisées par divers groupes, en citant les travaux de J.P Benoit et ses co-chercheurs. F.Lacoeuille *et al* (2007), ont utilisé le Paclitaxel pour former des LNCs chargées qui ont environ un diamètre de 50 nm. Ces LNCs ont révélé une efficacité améliorée à celle des formulations déjà commercialisées qui contiennent d'huile de ricin [80]. Dans le cas d'une administration orale, l'étape critique avant de passer à la circulation sanguine est évidemment l'étape d'absorption au niveau des muqueuses intestinales, Lacoeuille *et al* (2007), ont étudié les interactions entre les LNCs chargées de Paclitaxel et les muqueuses intestinales en *ex-vivo* utilisant les muqueuses de porc qui sont similaires aux humains. Les résultats ont montré que les LNCs améliorent le transport de Paclitaxel à travers les muqueuses par rapport à la forme commercialisée ainsi qu'elles ont une stabilité en contact avec les muqueuses pendant 3 heures à 37°C. Khalid *et al* (2006) ont préparé des LNCs- Docetaxel avec une couche de PEG pour le ciblage des tumeurs solides utilisant des souris comme un modèle animal. Les résultats ont montré qu'une augmentation considérable de la demi-vie de Docetaxel, tout en assurant une accumulation au site tumoral [81]. Les nutriments liposolubles ont été aussi encapsulés dans les LNCs comme la vitamine D3 afin de fortifier les produits alimentaires, Arezoo Kiani *et al* (2016) ont préparé des LNCs chargées en vitamine D3 de diamètre de 31.43 à 36.66 nm. Les résultats de l'étude de relargage *in vitro* de la vitamine D3 à partir de LNCs montrent que la libération de la vitamine D3 était prolongée dans le tractus gastrointestinal [72]. Comme conclusion, les LNCs sont des bon nanovecteurs prometteurs pour l'administration orale des molécules de classe IV (faible solubilité et faible perméabilité) selon Biopharmaceutical Classification Systems (BCS) tels que les anticancéreux [82].

2.4 La lyophilisation

La nanoémulsion est un système aqueux colloïdal qui présente certains problèmes, dont le risque de la contamination bactérienne en milieu aqueux et la faible stabilité physique à long terme. Donc pour cela, l'eau doit être éliminée et le procédé le plus utilisé et le plus adéquat qui permet de convertir des émulsions (ou suspensions) aqueuses en solide présentant une stabilité améliorée est la lyophilisation [83].

Le freeze drying (la lyophilisation) est le processus d'éliminer l'eau d'un échantillon congelé par sublimation. Il comprend principalement trois étapes : la congélation, le séchage primaire et le séchage secondaire.

La première étape sert à congeler la majeure partie du solvant qui est généralement de l'eau afin de former de la glace. Le long de la congélation, la phase de soluté devient plus en plus concentrée et est appelée « concentré de congélation » jusqu'à que la fraction d'eau liquide soit moins de 1% de l'eau totale dans la solution avant la formation de glace. Le séchage primaire (la sublimation de la glace) est effectué sous des paramètres de la pression et de la température bien déterminés afin de fournir une pression de chambre inférieure à la pression de vapeur de la glace (vacuum) ainsi une température suffisante ($> -50^{\circ}\text{C}$) pour que la sublimation se fasse où la glace est transférée du produit au condenseur par sublimation. Le séchage secondaire est l'étape de désorber l'eau qui est piégée dans le concentré de congélation (non congelée) [84], [85].

Dans le cas de nanoémulsion, le produit lyophilisé doit préserver certaines propriétés, notamment : i) les caractéristiques physiques et chimiques principales du produit, ii) les caractéristiques de gâteau (aspect élégant du gâteau, temps de reconstitution réduit, une distribution granulométrique limitée, une humidité relative acceptable, et iii) une stabilité à long terme [83].

Afin de protéger les nanocapsules des conditions du processus, un cryoprotecteur est généralement utilisé. Plusieurs sucres (trehalose, sucrose, glucose et mannitol) sont utilisés en tant que cryoprotecteurs qui ont démontré leur capacité à conserver les propriétés du produit [83].

En général, une concentration plus élevée de cryoprotecteur et une vitesse de congélation plus rapide entraînent une meilleure redispersabilité des nanoparticules. Cette redispersabilité se traduit en une capacité augmentée des nanocapsules à retourner à leur taille d'origine après la suspension de gâteau dans un milieu aqueux [86]. La lyophilisation est un des procédés non nocifs, bien utilisé dans le cas des mélanges aqueux moins stables qui contiennent des agents thérapeutiques sensibles.

CHAPITRE 3 MATÉRIELS ET MÉTHODES

3.1 Matériels

Le cholécalciférol (vitamine D3, 384.64 g/mol, pureté $\geq 98\%$), Glyceryl Trioctanoate (Triglycéride à chaîne moyenne, 470.68 g/mol) ont été achetés chez Sigma-Aldrich (USA). Labrafac lipophile WL 1349 (Triglycéride à chaîne moyenne), a été acheté chez Gattefossé (La France). LC-810L (Triglycéride à chaîne moyenne) a été commandé chez Peter Cremer North America (USA). Kolliphor HS15 (PEG 30% et du HS-PEG 70%) vient de BASF (Allemagne). Hydro Soy Pc (lécithine de soja, 783.774 g/mol, $\geq 99\%$) vient de Avanti Polar Lipids INC (USA). L'eau saline USP (0.9% p/v) est achetée de Baxter (Ontario, Canada). Pour la préparation de la solution standard pour la spectroscopie UV-Vis, Ethanol [pureté $\geq 99\%$ (v/v)] a été acheté chez Greenfield Global (Ontario, Canada). Mannitol a été acheté chez Galenova Inc (Québec, Canada).

3.2 Méthodes

3.2.1 Préparation des mélanges huile-vitamine D3

La première étape est de faire solubiliser la vitamine D3 dans les trois huiles (Labrafac, Tricaprylin et LC-810L) qui correspondent à la préformulation. Les fractions massiques sont déterminées selon l'intervalle de solubilité de la vitamine D3 dans les huiles qui est indiqué dans Merck index et USP. Donc on a choisi de préparer 10 mélanges allant de 1% jusqu'à 10% p/p pour chaque huile. Tout d'abord, on pèse 2 g de chaque huile dans des flacons stériles de 20 ml; en utilisant une balance de chez Sartorius Germany (modèle Practum313-1s / 0035750080). Par la suite, on rajoute la masse de la vitamine D3 qui correspond à chaque fraction massique. Les mélanges sont agités pendant 30 min à l'aide de wizard advanced IR vortex mixer (modèle F202A0175, Velp scientifica Italie) et

les laissés à l'abri de la lumière et à la température de la chambre (21 °C) au moins 48h avant de les observer s'il y a une recristallisation ou des interactions (exp : changement de couleur).

Tableau 3.1: Propriétés physico-chimiques de la vitamine D3 [87]

Propriété	Cholécalciférol / Vitamine D3
Formule brute	C ₂₇ H ₄₄ O
Masse molaire (g/mol)	384.64
Aspect	Cristaux blancs
Solubilité	Ethanol 96°, huiles
Solubilité (couleur)	Incolore à jaune pâle
Solubilité (turbidité)	Claire / transparent

Tableau 3.2: Composition de 3 huiles choisies [88]

Compositions (Wt%)	Labrafac	LC-810L	Tricaprylin
C6	NMT 2.0	0.0 (NMT 0.5)	/
C8	50,0 – 80,0	61 (NLT 53)	NLT 99
C10	20,0 – 50,0	39 (35 - 45)	/
C12	NMT 3,0	0.7 (NMT 1.5)	/

3.2.2 Préparation des LNCs

Les LNCs sont préparées par la technique d'inversion de phase (PIT). Pour cela, on prépare 12 formulations. On fait solubiliser 5%, 7.5% et 10% (p/p) de la vitamine D3 dans 2g des trois candidats afin d'obtenir la phase huileuse. La phase aqueuse utilisée est de l'eau saline [0.9% NaCl (p/v)]. Les quantités des ingrédients est basée sur la formulation utilisée dans le travail Khalid et al [81].

Les constituants sont pesés dans un flacon en verre, chauffés à environ 70°C et mélangés sous agitation magnétique douce (modèle F20500011, Velp Scientifica Italie). Après homogénéisation, on rajoute 10 ml de la solution de NaCl 0.9% (p/v); le système est progressivement chauffé jusqu'à la température maximale 85°C qui est au-dessus de la température d'inversion de phase (80°C), puis refroidi jusqu'à la température minimale 60°C. Trois cycles sont ainsi réalisés entre T_{\min} et T_{\max} .

Après la réalisation de trois cycles de température, la formulation a été rapidement refroidie en plaçant le flacon dans un bain de glace. Elle a encore été diluée avec 10 ml de NaCl (0.9% p/v). Une solution aqueuse laiteuse est obtenue.

Les formulations obtenues sont par la suite gardées dans un endroit à l'abri de la lumière et à la température de la chambre.

Tableau 3.3: Codes et quantités des formulations préparées

Code de formulation	Labrafac (mg)	Tricaprylin (mg)	LC-810L (mg)	Solutol HS15 (mg)	HSPC (mg)	Vitamine D3 (% p/p huile)
L10	504	/	/	504	75	10
L7.5	504	/	/	504	75	7.5
L5	504	/	/	504	75	5
T10	/	504	/	504	75	10
T7.5	/	504	/	504	75	7.5
T5	/	504	/	504	75	5
LC10	/	/	504	504	75	10
LC7.5	/	/	504	504	75	7.5
LC5	/	/	504	504	75	5
LP	504	/	/	504	75	/
TP	/	504	/	504	75	/
LCP	/	/	504	504	75	/

3.2.3 La lyophilisation de LNCs liquides

Pour cette partie, on prépare 5 formulations des LNCs avec Labrafac seulement, 10% p/p de vitamine D3 (FD1-5) par la méthode d'inversion de phase en gardant les mêmes conditions de préparation. Afin de protéger les LNCs contre les conditions sévères de congélation, on les rajoute de Mannitol à 15 % p/p comme cryoprotecteur [86] et on les mélange sous agitation magnétique

pendant 2 heures à 600 rpm ensuite pendant 12 heures à 50 rpm pour qu'on s'assure que le Mannitol a été bien dissout.

Les 5 formulations obtenues sont par la suite congelées à -80 °C pendant 2 heures avant de les mettre dans le lyophilisateur Millrock (modèle BT48A) où les formulations vont être par la suite lyophilisées pendant 24 heures à -50 °C et à 1485 mTorr. À la fin, le produit lyophilisé va être stocké à 4°C.

3.2.4 Caractérisation physico-chimique de LNCs

3.2.4.1 Mesure de taille

La diffusion dynamique de lumière (DDL) est une technique non invasive et bien connue pour la mesure de la taille et de la distribution de la taille des nanoparticules en suspension dans un liquide [89].

Lorsque le faisceau lumineux de laser atteint les nanoparticules placées dans la cuvette. Le mouvement brownien de ces NPs engendre la diffusion de la lumière de laser à différentes intensités. Le DLS analyse ces fluctuations d'intensité qui permet d'obtenir des informations sur la taille et la distribution de taille de NPs à l'aide de la relation de Stokes-Einstein [90] :

$$R_H = \frac{K T}{6 \pi \eta D}$$

Où le R_H est le rayon hydrodynamique, K est la constante de Boltzmann, T est la température, η est la viscosité de milieu et D est le coefficient de diffusion.

En plus de la taille, DLS permet aussi de déterminer l'indice de polydispersité (PDI). Le PDI est un indicateur qui est utilisé pour décrire le degré de non-uniformité d'une distribution de taille des nanoparticules. Une valeur de PDI entre 0.1 et 0.5 est caractérisée pour un échantillon qui a une

distribution de taille unimodale et sans agrégats, alors que les valeurs de PDI supérieures à 0,7 indiquent que l'échantillon présente une distribution de taille de nanoparticule très large et qu'il est probablement impropre à être analysé par le DLS [90].

Le diamètre moyen, la distribution de taille et le PDI de LNCs ont été déterminés par la technique de DLS en utilisant le Zétasizer Nano (modèle ZEN3600, Malvern, Royaume Uni) : 3-4 ml de la formulation est mis dans des cuvettes en polystyrène (Sarstedt, Allemagne) à 21°C. Les valeurs moyennes pour chaque échantillon ont été obtenues par triple mesures et chaque mesure a été effectuée avec 12 essais.

3.2.4.2 Potentiel Zéta

Le potentiel zéta est une propriété physique présentée par toute particule en suspension qui est la charge électrique acquise grâce au nuage d'ions qui l'entourent. Alors que ce potentiel représente la mesure de l'intensité de répulsion ou d'attraction électrostatique entre les particules [91].

Les nanoparticules en suspension ont tendance à s'agglomérer lors du stockage car elles présentent un système instable thermodynamiquement. La stabilisation d'une suspension est la clé pour maîtriser les performances d'une formule à long terme. Lorsque le potentiel Zéta tend vers zéro, les forces inter-particulaires diminuent. Les forces attractives deviennent alors prépondérantes et les particules s'agrègent et le système se déstabilise. Pour obtenir une suspension stable physiquement, l'objectif est donc d'obtenir le potentiel Zéta le plus élevé (en valeur absolue).

Le potentiel zéta est mesuré en utilisant une combinaison des techniques de mesure : électrophorèse et Laser Doppler Velocimetry, parfois appelée électrophorèse au laser Doppler (ELD). Ce procédé mesure la vitesse à laquelle une particule se déplace dans un liquide lorsqu'un champ électrique est appliqué [90].

Une fois la vitesse de la particule et le champ électrique appliqué sont connus, on peut calculer la mobilité électrophorétique (μ) en utilisant l'équation suivante :

$$\mu = \frac{v}{E}$$

Où, v est la vitesse de la particule et E le champ électrique.

Ensuite, la loi de Henry nous permet de calculer le-potentiel Zéta (ζ) [92] :

$$\mu = \frac{2 \varepsilon \zeta F(ka)}{3 \eta}$$

qui implique :

$$\zeta = \frac{3 \eta \mu}{2 \varepsilon F(ka)}$$

Où, μ est la mobilité électrophorétique ; ε la constante diélectrique du dispersant ; ζ le potentiel zéta ; $F(ka)$ est la fonction de Henry et η la viscosité.

Dans notre travail, on utilise le Zétasizer Nano (modèle ZEN3600, Malvern, Royaume Uni) qui fournit des mesures du potentiel zéta aussi par ELD. On a utilisé des cellules capillaires repliées de Malvern (Worcestershire, Royaume-Uni). Les valeurs moyennes pour chaque préparation ont été obtenues par des mesures en triple. Chaque mesure a été effectuée avec 12 essais.

3.2.4.3 Étude de stabilité de LNCs à l'état liquide

Afin d'évaluer la stabilité de LNCs à l'état liquide dans les conditions normales de stockage (21°C), on mesure la taille et la distribution de taille en utilisant la DLS. Les 12 formulations préparées sont stockées à la température de la chambre (21°C) et à l'abri de lumière. On a utilisé la technique

DLS à l'aide de Zétasizer pour évaluer toute modification au niveau de la taille et la distribution de taille des LNCs. Ces mesures sont réalisées comme suite ; chaque 2 jours pendant la première semaine, une fois chaque semaine pour une période de 6 mois.

3.2.4.4 Étude de l'effet de la lyophilisation sur les LNCs

Cette partie sert à déterminer les effets de la lyophilisation sur les caractéristiques physico-chimiques de LNCs. La première étape était de mesurer la taille, la distribution de taille ainsi le potentiel Zéta des LNCs avant la lyophilisation pour les comparer par la suite avec ceux après la lyophilisation. La deuxième étape est de resuspendre chacune des 5 formulations lyophilisées dans 20 ml de l'eau saline à 0.9 % p/v et de les agiter pendant 2 heures à 600 rpm. Après la dispersion totale des LNCs lyophilisées, on mesure la taille, distribution de taille et le potentiel Zéta pour déterminer l'effet de cryoprotecteur (Mannitol) et les paramètres de la lyophilisation sur la nanoémulsion (température, pression et durée). Comme dernière partie, on réalise une étude de stabilité physique des 5 formulations lyophilisées et redispersées qui est basée sur la mesure de taille et la distribution de taille des LNCs par la technique de DLS en utilisant le Zétasizer de la compagnie de Malvern pendant 2 mois.

3.2.4.5 Étude de cinétique de relargage des LNCs *in vitro*

Pour déterminer le profil de libération de la vitamine D3 à partir des LNCs, on a réalisé une étude de cinétique *in vitro* en imitant les conditions des milieux physiologiques. Dans notre projet, on s'intéresse à étudier la libération de la vitamine D3 dans le milieu de pH 6.8 qui est le pH du plasma sanguin. Pour cela, on prépare un tampon de pH 6.8 selon la USP qui contient un mélange deux solutions ; l'hydroxyde de sodium à 0.2 M et le phosphate de potassium monobasique à 0.2 M. On réalise trois batches avec des LNCs chargées en vitamine D3 (10% p/p) dans Labrafac et un comme

placebo avec les LNCs vides à 37°C et à 50 rpm. On prélève 8 échantillons de 10 ml après 10 – 20 – 30 min – 1 – 2 – 4 – 6 et 8 heures et on les centrifuge (4000 tr/min, Thermo Scientific) à 25°C pendant 40 minute. À ce stade, on obtient une phase opaque au fond, une phase micellaire claire et parfois une phase crémeuse surnageante. Une portion de 1 ml de la phase micellaire est mélangée avec 5 ml d'éthanol puis centrifugée à 1750 tr/min pendant 10 minutee pour extraire la vitamine D3. La phase surnageante est utilisée comme échantillon pour la quantification de la vitamine D3 [93] en utilisant la spectroscopie UV-Visible à 265 nm (Genesys 10S UV-Vis de Thermo Scientific). Afin de quantifier la vitamine D3 libérée, on a mesuré l'absorbance à 265 nm des différentes concentrations d'étalon de la vitamine D3 dans l'éthanol et on a construit la courbe d'étalonnage « absorbance en fonction de concentration de la vitamine D3 » [94].

CHAPITRE 4 RÉSULTATS

4.1 Solubilité de la vitamine D3 dans les triglycérides à chaîne moyenne

La première partie du projet était l'évaluation de la solubilité de la vitamine D3 dans les trois huiles (Labrafac, Tricaprylin et LC-810L) ainsi que la détermination de la concentration optimale de la vitamine D3 pour avoir un meilleur mélange avec le meilleur candidat. On a pu dissoudre jusqu'à 10 % p/p de la vitamine D3 sous agitation pendant 30 min et à température ambiante (21°C) dans les trois triglycérides à chaîne moyenne. À cette concentration et après un suivi de 4 mois (Tableau 4.1) des mélanges à la température ambiante et à l'abri de la lumière, on constate qu'il n'y avait pas de précipitation ou de recristallisation de la vitamine D3 dans les trois huiles (Labrafac, Tricaprylin et LC-810L). Cependant, les mélanges LC-810L et vitamine D3 ont changé de couleur après 1 mois de préparation de jaune pâle en orange plus foncé en fonction de la concentration de la vitamine D3 (Figure 4.1 «C»).

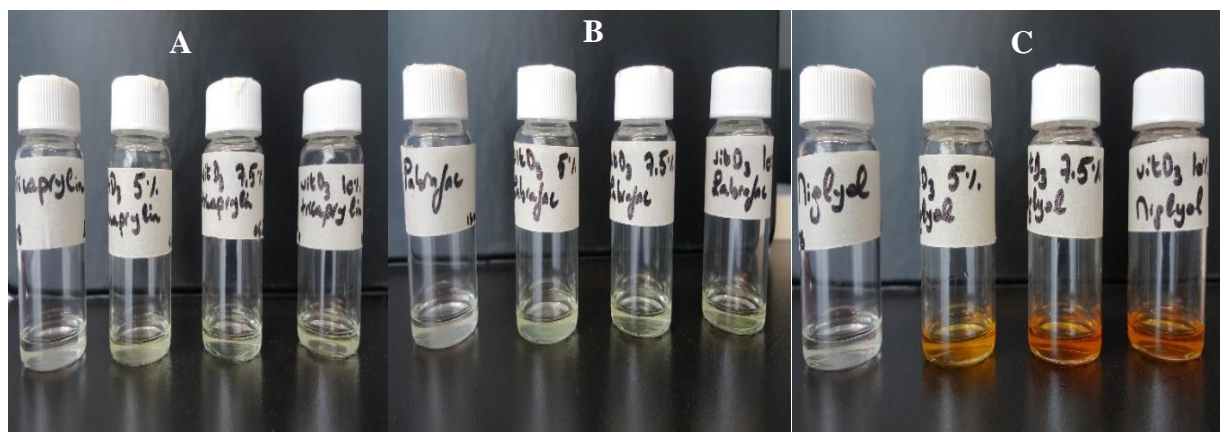


Figure 4.1: Mélange huile et vitamine D3 avec différentes concentrations après 1 mois de préparation. A) Tricaprylin en 5% - 7.5% - 10% vit D3, B) Labrafac en 5% - 7.5% - 10% vit D3, C) LC-810L en 5% - 7.5% - 10% vit D3

Tableau 4.1: Suivi de la solubilité de la vitamine D3 dans les 03 huiles (Labrafac, Tricaprylin et LC 810L)

Huile	vit D3 (%p/p)	Temps						
		2 jours	1 semaine	2 semaines	1 mois	2 mois	3 mois	4 mois
Labrafac	5	++	++	++	++	++	++	++
	7.5	++	++	++	++	++	++	++
	10	++	++	++	++	++	++	++
Tricaprylin	5	++	++	++	++	++	++	++
	7.5	++	++	++	++	++	++	++
	10	++	++	++	++	++	++	++
LC 810L	5	++	++	++	+-	+-	+-	+-
	7.5	++	++	++	+-	+-	+-	+-
	10	++	++	++	+-	+-	+-	+-

++ : Vitamine D3 est soluble

+ : Pas d'interactions

- : il y a des interactions

4.2 Caractérisation physico-chimique de LNCs

La deuxième étape du projet était de préparer les nanocapsules chargées en vitamine D3 et Placebo (vides) et de mesurer leurs propriétés physico-chimiques. Les résultats montrent qu'on a réussi à

formuler des nanoémulsions H/E sous forme d'une solution aqueuse laiteuse lors de l'utilisation de Labrafac et Tricaprylin pour la phase huileuse soit chargée de la vitamine D3 soit vide, tandis qu'on a eu une séparation de phase avec les formulations chargées en vitamine D3 ainsi Placebo qui contient le LC-810L comme phase huileuse (Figure 4.2). Les résultats de DLS montrent des particules de diamètre entre 65 nm et 100 nm avec un indice de polydispersité (PDI) autour de 0.3 (une distribution unimodale) indique que les formulations sont assez uniformes.



Figure 4.2: Formulations obtenues par la méthode d'inversion de phase L5, T5, LC5, LP, TP et LCP respectivement

4.3 Stabilité physique des LNCs

Parmi nos objectifs du projet, l'évaluation de la stabilité physique de nos formulations est importante pour déterminer leur durée de vie. Toutefois, la stabilité physique des nanoémulsions est basée sur le suivi de taille et la distribution de taille en temps réel afin de détecter et de diagnostiquer toute forme de déstabilisation. Pour cela, on a utilisé la technique de DLS pour mesurer la taille et la distribution de taille de nos formulations.

4.3.1 Stabilité physique de LNCs à l'état liquide

Les résultats de suivi de stabilité en temps réel de nos formulations chargées en vitamine D3 sont représentés dans les figures 4.3, 4.4 et 4.5 et les formulations Placebo dans la figure 4.6. Pour une

durée de 6 mois, le diamètre des formulations de Labrafac (L10, L7.5, L5 et LP) était entre 63.43 et 114.5 nm alors que pour celles de Tricaprylin (T10, T7.5, T5 et TP) était entre 73.47 et 109.4 nm.

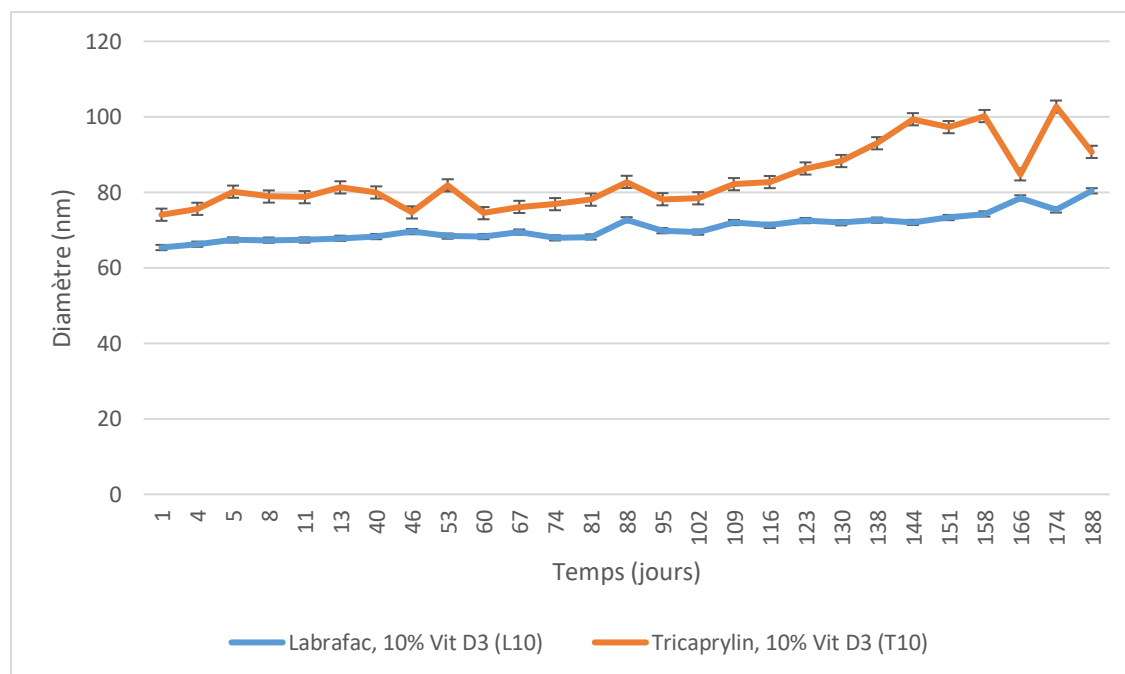


Figure 4.3: Taille des LNCs chargées (10 % vit D3) en fonction du temps

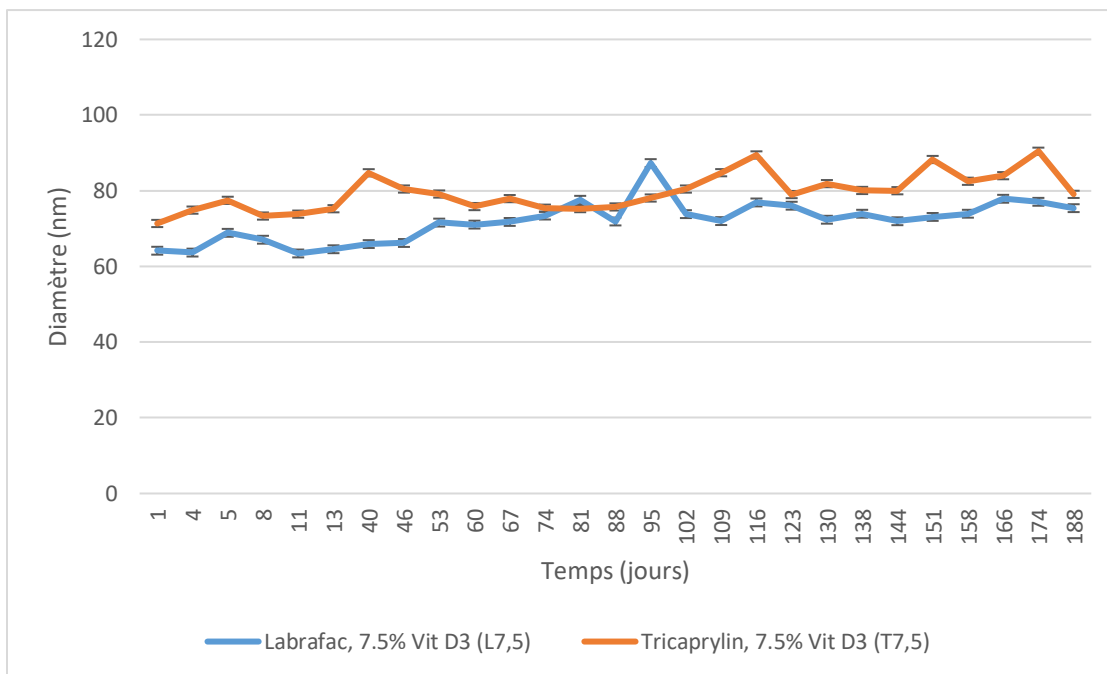


Figure 4.4: Taille des LNCs chargées (7.5 % vit D3) en fonction du temps

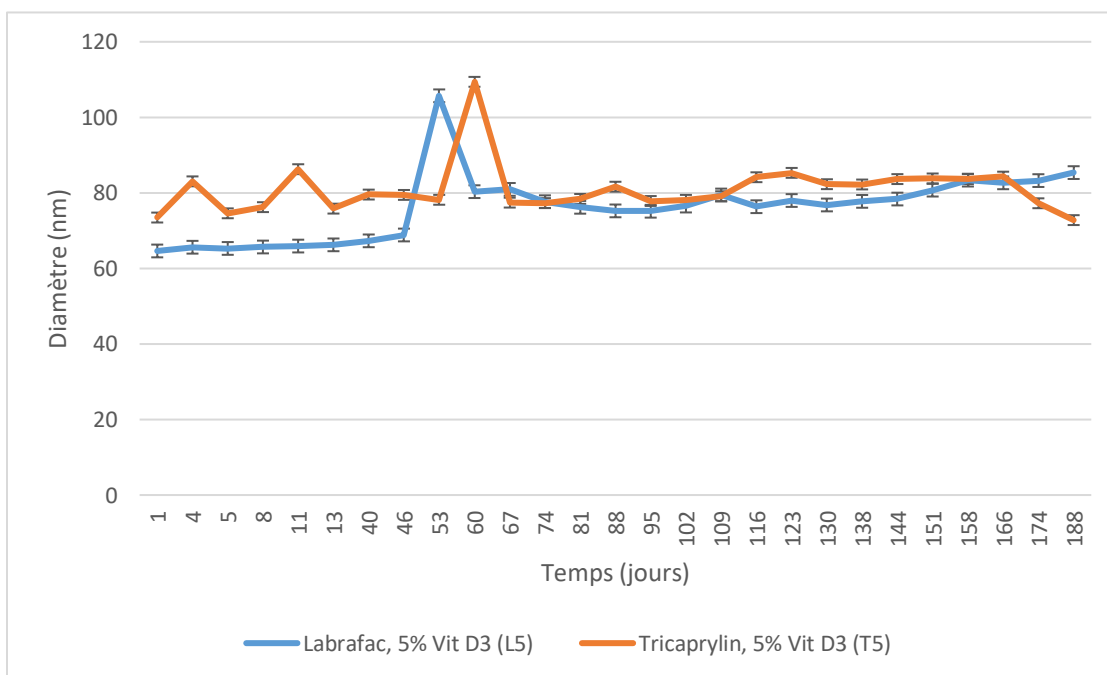


Figure 4.5: Taille des LNCs chargées (5 % vit D3) en fonction du temps

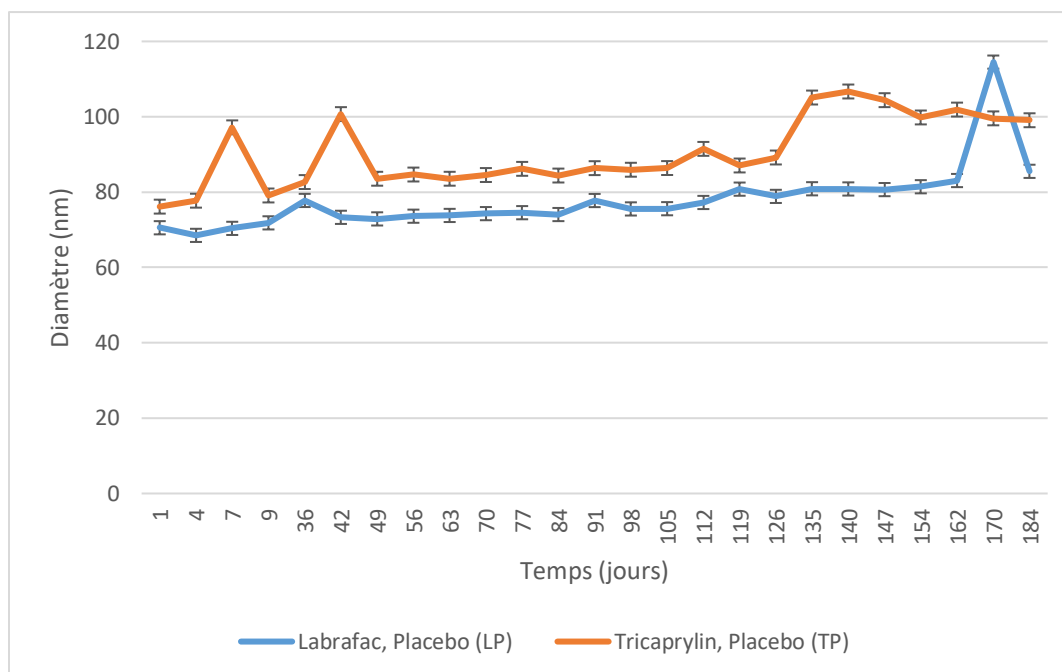


Figure 4.6: Taille des LNCs vides en fonction du temps

Le tableau 4.2 résume le diamètres moyen total de chaque formulation avec l'écart type.

Tableau 4.2: Suivi de taille de LNCs

Formulation	Diamètre† (nm)	Diamètre moyen total* (nm ± SD)
L10	65.38	70.66 ± 3.60
L7.5	64.15	71.95 ± 5.40
L5	64.62	76.26 ± 8.76
T10	70.47	83.61 ± 8.39
T7.5	71.35	79.57 ± 4.94
T5	73.47	90.93 ± 6.79
LP	70.53	77.92 ± 8.75
TP	76.14	90.53 ± 9.22

† diamètre mesuré le premier jour après la préparation de LNCs.

* diamètre moyen de toutes les mesures pendant 6 mois

4.3.2 Stabilité physique de LNCs lyophilisés

Dans cette partie, on a réussi à avoir un produit lyophilisé de bonne qualité macroscopique (texture et forme). D'autre part, les images du microscope optique nous montrent qu'il y a des pores au niveau des grains qui mettent en évidence l'élimination presque totale de l'eau (Figure 4.7B). Avant la lyophilisation, un diamètre de 68.57 nm est mesuré lors de l'ajout de mannitol aux formulations (15 % p/p). Après la lyophilisation et la reconstruction des nanoémulsions, une augmentation de taille a été observée de 68.57 nm à 88.69 nm qui est due principalement au gonflement léger des LNCs en présence de l'eau (réhydratation des LNCs). D'après les résultats de suivi de stabilité de 2 mois (Figure 4.8), les formulations lyophilisées et re-suspendues montrent une stabilité physique avec un diamètre moyen total de $131.8 \text{ nm} \pm 11,39$.

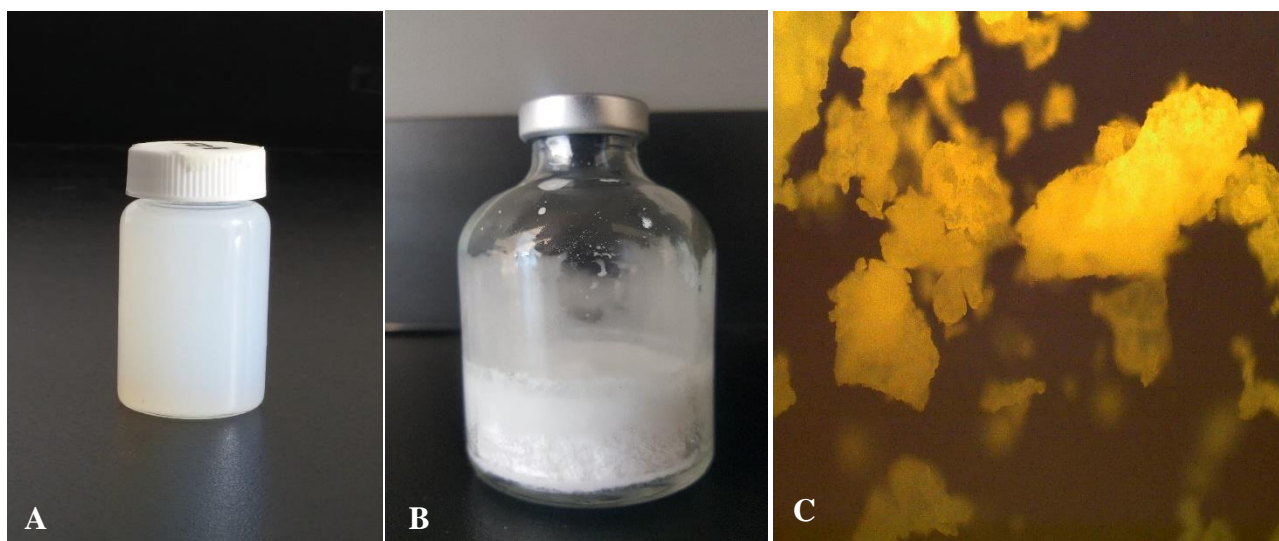


Figure 4.7: A) Formulation liquide (Labrafac, 10 % p/p vit D3), B) Formulation lyophilisée, C- Observation sous microscope optique de produit lyophilisé

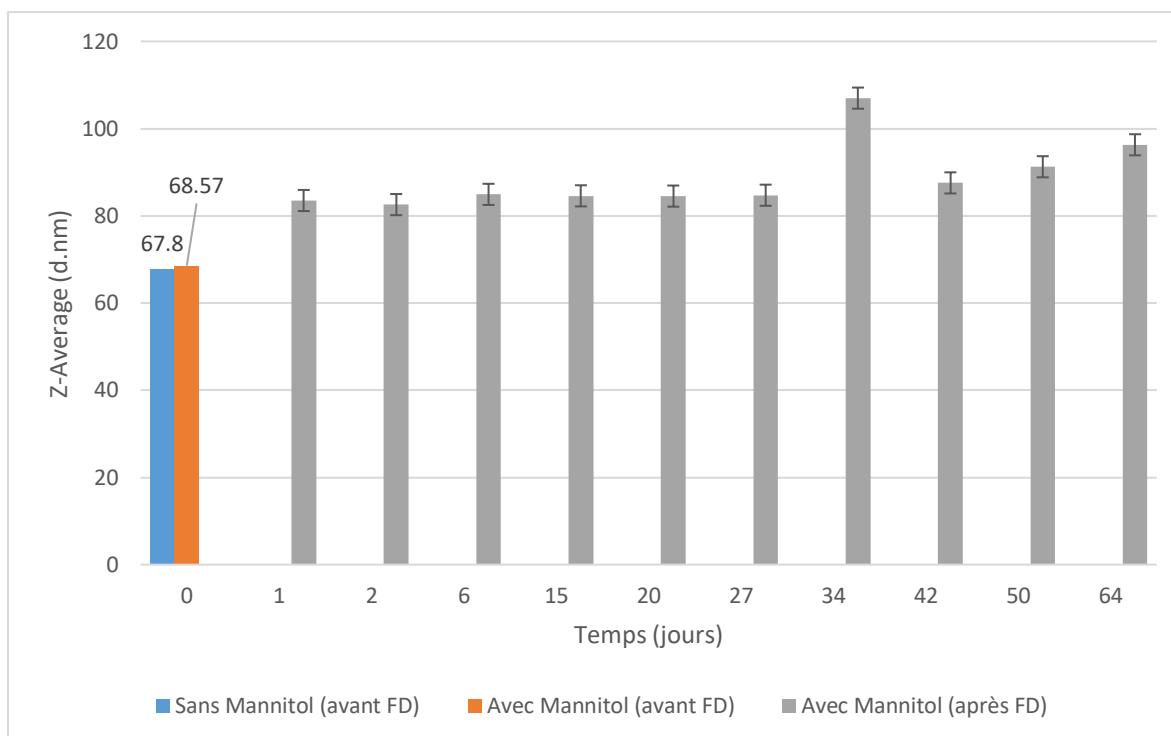


Figure 4.8: Taille des LNCs "Labrafac, 10 % vit D3" avant et après la lyophilisation

4.4 Étude de cinétique de relargage de la vitamine D3 *in vitro*

L'étude de cinétique de relargage de la vitamine D3 *in vitro* à partir de LNCs sert à construire la courbe « quantité de la vitamine D3 libérée en fonction du temps ». Cette quantité a été mesurée par la spectroscopie UV-visible. À 265 nm, on a obtenu la courbe d'étalonnage « absorbance en fonction de concentration de la vitamine D3 » qui est présentée dans la figure 4.9. En revanche, on a eu des valeurs aberrantes lors de la quantification de la vitamine D3 libérée à partir de LNCs. Pour cela, si on garde la même méthode de quantification, on doit l'optimiser pour donner des résultats acceptables sinon on utilise d'autres méthodes comme celle de la chromatographie liquide à haute performance (HPLC).

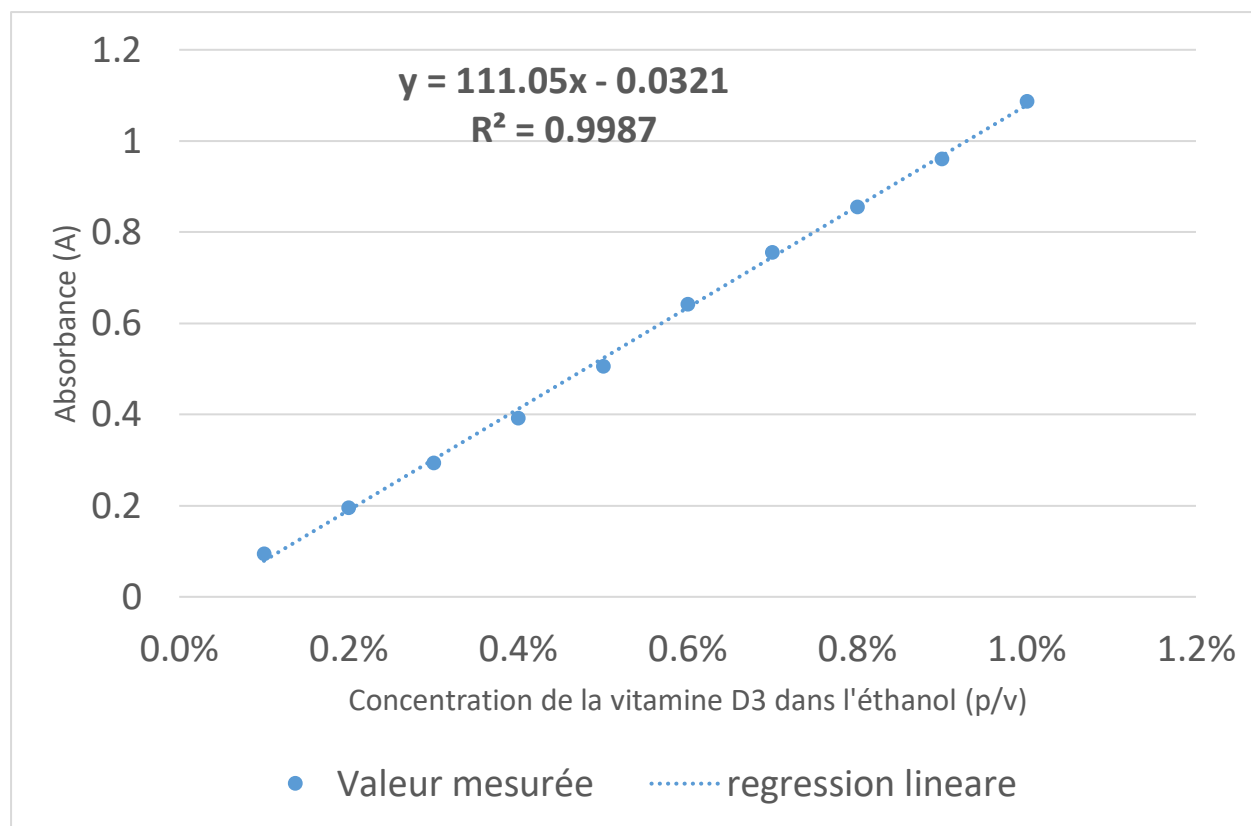


Figure 4.9: Courbe d'étalonnage de la vitamine D3 par Spectroscopie UV-Vis à 265 nm

CHAPITRE 5 DISCUSSION GÉNÉRALE

Le déficit en vitamine D3 est un désordre associé non seulement à des troubles squelettiques comme le rachitisme, l'ostéoporose, mais aussi à diverses pathologies comme le cancer, le diabète, les maladies cardiovasculaires et les troubles de système immunitaire (exp : échec d'implants dentaires). Cependant, ses formes médicamenteuses actuelles (suppléments oraux / injectables) ne sont pas bien appréciées par les patients. Ainsi, l'utilisation de la nanotechnologie peut résoudre ces problèmes liés à l'administration de vitamine D3, permettant d'avoir des quantités optimales en améliorant sa biodisponibilité. C'est dans ce contexte que nous nous sommes orientés dans le cadre de ce projet de recherche au développement des nanoémulsions sous forme des nanocapsules lipidiques pour l'administration de la vitamine D3. Ce système choisi est basé sur l'utilisation des ingrédients (triglycérides à chaîne moyenne, tensioactif pegylé et l'autre phospholipidique) biocompatibles et approuvés par la FDA [66]. Les LNCs ont été préparées et caractérisées afin de vérifier qu'elles sont convenables pour la délivrance de la vitamine D3.

Les triglycérides à chaîne moyenne sont des triglycérides où les 3 groupements hydroxyle du glycérol sont estérifiés par des acides gras à chaîne moyenne (6 à 12 carbones). Ils présentent le cœur huileux de LNCs où la vitamine D3 se solubilise. Sur le marché, on trouve plusieurs produits de triglycérides à chaînes moyennes (TCM) qui se différencient seulement au niveau de pourcentage des chaînes carbonées (chaîne de 6, 8, 10 et 12 carbones). Dans la littérature, Labrafac [69], Tricaprylin [82] et LC-810L [79] sont les 3 TMC les plus utilisés. Pour cela, le but de cette partie est d'évaluer la solubilité de la vitamine D3 dans ces 3 TMC (Labrafac, Tricaprylin et LC-810L) afin de déterminer la concentration optimale de la vitamine D3 dans le candidat approprié. Selon la pharmacopée américaine (USP), la vitamine D3 est légèrement soluble dans les huiles où « légèrement soluble » est définis comme le fait de 100 à 1000 parties de solvant est requises pour

1 partie de soluté (entre 0.1 et 1%) [95]. Pour notre étude, on a pu arriver à dissoudre 10 % p/p de la vitamine D3 dans les 3 candidats sans avoir recristallisée après 4 mois de préparation. Ce résultat montre qu'on est encore loin de saturation de mélange et qu'il n'y aura pas des problèmes lors de la formulation et de stockage des nanoémulsions par la suite. Cependant, il y avait un changement de couleur des solutions vitamine D3- LC-810L après 1 mois de préparation. Ce changement de couleur peut être due à 2 facteurs : 1) l'oxydation de la vitamine D3 ou d'huile, 2) l'interaction entre des impuretés de LC-810L et la vitamine D3.

La méthode de préparation utilisée est celle d'inversion de phase (PIT) qui est une méthode à faible énergie, facile et simple à réaliser [73]. On a réussi à préparer des nanoémulsions stables (chargées en vitamine D3 et vides) en utilisant Labrafac et Tricaprylin comme des phases huileuses. Tandis qu'on a eu une séparation de phase lors d'utilisation de LC-810L. En effet, le premier brevet de PIT a été approuvé et adapté pour tous les produits commerciaux de triglycérides à chaîne moyenne [96] en 2001 donc on peut dire qu'il y a un défaut dans le LC-810L (oxydation d'huile ou présence des impuretés). Ces changements sont capables de modifier les propriétés physicochimiques qui affectent le mélange tertiaire (huile, eau et tensioactif), la zone de faisabilité des nanoémulsions et empêchent aussi la formation des nanocapsules.

Parmi les techniques utilisées pour la mesure de taille, la distribution de taille ainsi que le potentiel Zéta ζ , on trouve la technique de diffusion de lumière dynamique (DLS). Nos résultats montrent que les LNCs préparées ont un diamètre entre 63.73 et 114.5 nm avec un indice de polydispersité de 0.3. Une telle taille est favorable pour faciliter le travers des membranes cytoplasmiques, échapper à la filtration rénale [97], à l'absorption par les macrophages du foie ou cellules de Kupffer (internalise préférentiellement des particules >140 nm) [98]. Un potentiel ζ différent de

zéro et une distribution de taille unimodale sont aussi requises pour assurer la non-coalescence des nanoémulsions à long terme [65].

Les nanoémulsions sont des systèmes colloïdaux qui sont instables du point de vue thermodynamique mais ils montrent une stabilité cinétique à long terme. D'après les résultats de suivi de diamètre ainsi que la distribution de taille pour une durée de 6 mois, on constate qu'il n'y avait pas de phénomène de séparation de phase irréversible (la coalescence). Alors qu'il y avait quelques fluctuations réversibles de taille qui n'ont pas contribué à des changements significatifs de la stabilité. Ces fluctuations sont dues principalement au mode d'agitation des échantillons avant de les caractériser par DLS d'un côté et au mouvement brownien des nanocapsules de l'autre. On constate aussi que la quantité de vitamine D3 encapsulée n'affecte pas les propriétés physico-chimiques de LNCs, ce qui va nous donner l'avantage d'avoir des LNCs bien concentrées en vitamine D3 (10 % p/p) sans augmentation de taille.

Parmi les inconvénients des formulations liquides, on trouve l'instabilité chimique de principe actif qui est l'un des grands problèmes de l'industrie pharmaceutique. Pour cela, le procédé de la lyophilisation a été introduit pour les formulations pharmaceutiques liquides comme un procédé non invasif qui protège le principe actif et qui améliore sa durée de vie. Un des défis de la lyophilisation est de garder les mêmes propriétés physico-chimiques du produit lyophilisé après la re-suspension que celles de produit initial. Cette stabilité est liée directement au bon choix des paramètres du procédé.

Toutefois, les résultats montrent que 15 % p/p de mannitol est suffisant pour bien protéger et préserver l'intégrité des LNCs et qu'il est bien adapté à nos nanoémulsions [86]. En revanche, lors de la congélation, le mannitol laisse une matrice vitreuse où les LNCs sont immobilisées, ce qui empêche leur agrégation et les protège contre les contraintes mécaniques des cristaux de glace [83].

D'autre part, la composition des nanocapsules lipidiques influence aussi sur leur capacité à la congélation où les résultats de l'étude de Claire Dulieu et Didier Bazile [99], ont montré que les formulations contenant au moins 5% de HSPC restent stables pendant le stockage, ce qui est le cas de nos formulations (7.7 % de HSPC).

Finalement et d'après les résultats obtenus, on peut valider les paramètres de la lyophilisation (quantité de cryoprotecteur, température et durée de congélation, température, pression et durée de sublimation).

CHAPITRE 6 CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

Le déficit en vitamine D est un problème bien connu dans le monde entier, associé à un risque accru de plusieurs maladies aiguës et chroniques. Il est une conséquence du mode de vie moderne (une prévalence élevée de l'obésité, une conscience accrue des effets néfastes des rayons UV, entraînant une protection accrue du soleil et son évitement) et de l'exposition insuffisante au soleil à cause des facteurs climatiques (les régions septentrionales) ou des facteurs socioculturelles (le mode vestimentaire des femmes arabes). La reconnaissance du fait que la carence en vitamine D en tant que risque pour la santé conduit au développement de nouveaux aliments fonctionnels et thérapies utilisant les nanotechnologies pour l'incorporation de la vitamine D dans les aliments et formulations pharmaceutiques sans réduire son activité pour la prévention et le traitement des pathologies liées à la carence en vitamine D.

Ces dernières années, la nanotechnologie est apparue comme une réponse appropriée à ces problèmes, permettant de tirer parti des effets bénéfiques de ce nutriment tout en améliorant ses formes d'administration (orales ou injectables). Les nanoémulsions sont des nanovecteurs prometteurs pour l'encapsulation des agents thérapeutiques lipophiles due au cœur huileux pour une administration par voie orale ou injectable. Elles offrent une protection contre les conditions extérieures et augmentent la stabilité et la solubilité de la molécule.

L'objectif de ce travail était de concevoir des nanocapsules lipidiques, furtives, et stables pour la délivrance des agents thérapeutiques lipophiles. Nous avons, pour y répondre, développé une nanoémulsion de type huile dans l'eau de diamètre entre 63.43 et 114.5 nm, dont la phase dispersée est composée d'un mélange de triglycéride à chaîne moyenne et de la vitamine D3, entourée par deux surfactants (lipophile et hydrophile). Tous ces ingrédients sont reconnus et approuvés par la

FDA comme des constituants biocompatibles pour une administration par voie orale et injectable chez l'être humain [66].

La technique de préparation des nanocapsules lipidiques est basée sur l'effet de la température sur la nature d'émulsion (E/H ou H/E). Elle permet d'obtenir facilement des nanocapsules avec une taille autour de 100 nm. D'autre part, la formulation est suffisamment souple pour permettre de modifier certains paramètres comme la composition de la phase dispersée, le type des triglycérides à chaîne moyenne utilisés (Labrafac, Tricaprylin) ainsi que la concentration en vitamine D3 (10 – 7.5 – 5 % p/p) sans altérer la stabilité de nanoémulsion.

Les nanoémulsions développées montrent une stabilité physique plus de 6 mois à la température ambiante (21°C). Aucune évolution significative de la distribution en taille des nanocapsules lipidiques ou du potentiel zêta n'a été observée. Cette stabilité physique est due principalement à l'utilisation de surfactant pegylé qui génère une barrière stérique autour de la phase dispersée, permettant par la suite de prévenir leur coalescence. En outre, l'utilisation des nanoémulsions permet d'avoir de bonnes propriétés physico-chimiques notamment, d'éviter l'insolubilité des agents thérapeutiques dans les milieux aqueux, d'avoir une libération prolongée de PA en améliorant l'ADME dans le cas d'une administration orale et même d'avoir une forme pharmaceutique injectable plus performante que les formes commerciales actuelles.

La majorité des médicaments se présente sous forme solide à cause de ses avantages en particulier la longue durée de vie (la stabilité) et un stockage plus facile. La lyophilisation est un procédé qui sert à éliminer l'eau d'une solution afin de la garder en bon état lors de stockage en améliorant sa stabilité physique d'un côté et d'avoir plus de choix de la voie d'administration (orale, intraveineuse, intramusculaire) de l'autre. Nos formulations lyophilisées ont démontré une stabilité physique plus de 2 mois avec un diamètre moyen de 88.69 nm.

Dans le domaine d'implantologie, nombreux chercheurs ont étudié les bienfaits de la vitamine D sur l'ostéointégration des implants, par des apports à la fois topiques et systémiques [25]-[30]. Ils ont constaté qu'une supplémentation de la vitamine D définitive est nécessaire pour les patients qui ont des implants. L'objectif n'est pas seulement de préparer le patient pour la chirurgie ou les soins mais de participer à une homéostasie plus constante au long terme. L'ostéointégration d'un implant, et la stabilité de l'os ou d'un traitement parodontal sont liées à un taux sérique adéquat de la vitamine D. Il apparaît évident que le dosage et la supplémentation de la vitamine D deviennent une nécessité avant et après toute intervention chirurgicale des patients en odontologie.

Les nanocapsules lipidiques préparées sont révélées être une nouvelle approche prometteuse pour la délivrance des agents thérapeutiques lipophiles comme celui de la vitamine D₃, des études supplémentaires sont nécessaires comme la prolongation de l'étude de stabilité jusqu'à 18 mois pour la forme liquide et lyophilisée, l'étude de la cinétique de relargage *in vitro* adéquate et *in vivo* en utilisant un modèle animal pour une administration par voie orale et injectable en comparant les deux voies.

RÉFÉRENCES

- [1] C. De Jaeger and P. Cherin, “Vitamine D : effets sur la santé . Recommandations de bon usage,” *Médecine & Longévité*, vol. 2, no. 4, pp. 182–199, Dec. 2010.
- [2] M. F. Holick, “Vitamin D Deficiency,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 357, no. 3, pp. 266–281, Jul. 2007.
- [3] R. Bouillon, G. Eelen, L. Verlinden, C. Mathieu, G. Carmeliet, and A. Verstuyf, “Vitamin D and cancer,” *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, vol. 102, no. 1–5, pp. 156–162, Dec. 2006.
- [4] K. C. Chiu, A. Chu, V. L. W. Go, and M. F. Saad, “Hypovitaminosis D is associated with insulin resistance and β cell dysfunction,” *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 79, no. 5, pp. 820–825, May 2004.
- [5] S. Judd and V. Tangpricha, “Vitamin D Deficiency and Risk for Cardiovascular Disease,” *National Institutes of Health.*, vol. 117, no. 4, pp. 503–511, 2009.
- [6] E. Lerchbaum and B. Obermayer-Pietsch, “Mechanisms in endocrinology - Vitamin D and fertility: A systematic review,” *Eur. J. Endocrinol.*, vol. 166, no. 5, pp. 765–778, 2012.
- [7] R. R. Watson, *handboob of vitamin D in human health*. 2013.
- [8] J. Reichrath, *Sunlight, Vitamin D and Skin Cancer*. New York, NY: Springer New York, 2014.
- [9] E. Murry, “Actualités sur la vitamine D et nouvelles perspectives thérapeutiques.”
- [10] PubChem, “Chemistry of Vitamin D,” *U.S. National Library of Medicine*, 2019. [Online]. Available: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Vitamin_D3.
- [11] société canadienne de la sclrose en Plaques, “Fiche de renseignements sur la vitamine D.”

- [12] P. Lips, "Vitamin D physiology," *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, vol. 92, no. 1, pp. 4–8, Sep. 2006.
- [13] J.-C. Souberbielle *et al.*, "Actualité sur les effets de la vitamine D et l'évaluation du statut vitaminique D Update on vitamin D and evaluation of vitamin D status," *Annales d'endocrinologie*, vol. 69, no. 6, pp. 501-510, 2008.
- [14] M. F. Holick, "Resurrection of vitamin D deficiency and rickets," *J. Clin. Invest.*, vol. 116, no. 8, pp. 2062–2072, Aug. 2006.
- [15] J. C. Souberbielle, G. Maruani, and M. Courbebaisse, "Vitamine D: Métabolisme et évaluation des réserves," *Presse Medicale*, vol. 42, no. 10, pp. 1343–1350, Oct-2013.
- [16] A. S. Dusso, A. J. Brown, and E. Slatopolsky, "Vitamin D," *American Journal of Physiology*, vol. 289, no. 1, pp. F8–F28, Jul. 2005.
- [17] A. W. Norman, "From vitamin D to hormone D : fundamentals of the vitamin D endocrine system essential for good health 1 – 4," *Am. Soc. Nutr.*, vol. 88, pp. 491S–9S, 2008.
- [18] S. Spedding, S. Vanlint, H. Morris, and R. Scragg, "Does Vitamin D Sufficiency Equate to a Single Serum 25-Hydroxyvitamin D Level or Are Different Levels Required for Non-Skeletal Diseases?," *Nutrients*, vol. 5, pp. 5127–5139, 2013.
- [19] P. Pludowski *et al.*, "Vitamin D supplementation guidelines," *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, vol. 175, pp. 125–135, 2018.
- [20] M. F. Holick, J. A. MacLaughlin, and S. H. Doppelt, "Regulation of Cutaneous Previtamin D3 Photosynthesis in Man : Skin Pigment Is Not an Essential Regulator," *Science (80-.)*, vol. 211, no. 4482, 1981.
- [21] A. C. Ross, C. L. Taylor, A. L. Yaktine, and H. B. Del Valle, *Dietary Reference Intakes for*

Vitamin D and Calcium. Washington: The national academies press, 2011.

- [22] R. St-Arnaud and R. P. Naja, "Vitamin D metabolism, cartilage and bone fracture repair," *Mol. Cell. Endocrinol.*, vol. 347, no. 1–2, pp. 48–54, Dec. 2011.
- [23] J. et coll E., "Osteoclast function is activated by osteoblastic cells through a mechanism involving cell-to-cell contact," *Endocrinology*, vol. 137, no. 8, pp. 2187–2190, 1996.
- [24] H. & coll Yasuda, "Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin — osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE — RANKL," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, vol. 95, no. March, pp. 3597–3602, 1998.
- [25] F. Javed, H. Malmstrom, and S. V. Kellesarian, "Ef fi cacy of Vitamin D3 Supplementation on Osseointegration of Implants," *Implant Dent.*, vol. 25, no. 2, pp. 1–7, 2016.
- [26] S. Lt, C. G. Bryce, and W. C. N. Macbeth, "Case Report Vitamin D deficiency as a suspected causative factor in the failure of an case report," *J R. Nav. Med. Serv.*, vol. 100, no. 3, pp. 328–332, 2014.
- [27] Q. Wan, T. Schoenmaker, I. D. C. Jansen, Z. Bian, T. J. De Vries, and V. Everts, "Osteoblasts of calvaria induce higher numbers of osteoclasts than osteoblasts from long bone," *Bone*, vol. 86, pp. 10–21, 2016.
- [28] M. T. Cantorna, L. Snyder, Y. Lin, and L. Yang, "Vitamin D and 1,25(OH)₂D Regulation of T cells," *Nutrients*, vol. 25, no. 7, pp. 3011–3021, 2015.
- [29] J. Kikuta *et al.*, "precursor monocyte migration is a critical point of control in antibone-resorptive action of active vitamin D," *PNAS*, vol. 110, no. 17, pp. 7009–7013, 2013.
- [30] C. L. Long and M. B. Humphrey, "Osteoimmunology: the expanding role of immunoreceptors in osteoclasts and bone remodeling," *Bonekey Rep.*, vol. 1, no. 4, pp. 1–7,

2012.

- [31] E. Giovannucci *et al.*, “Prospective Study of Predictors of Vitamin D Status and Cancer Incidence and Mortality in Men,” *JNCI J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 98, no. 7, pp. 451–459, Apr. 2006.
- [32] C. F. Garland *et al.*, “The Role of Vitamin D in Cancer Prevention,” vol. 96, no. 2, pp. 252–261, 2006.
- [33] K. Briot *et al.*, “Vitamine D : effet osseux et extra-osseux ; recommandations de bon usage,” pp. 43–54, 2009.
- [34] Y. Arnson, H. Amital, and Y. Shoenfeld, “Vitamin D and autoimmunity: new aetiological and therapeutic considerations,” vol. 25, 2007.
- [35] P. Lahalle, “Evolution des recommandations concernant la supplémentation et le statut en vitamine D de la population : état des lieux et étude des prescriptions dans une officine de Meurthe-et-Moselle,” Université de Lorraine, 2016.
- [36] E. Almouazen, “Développement de nanoparticules polymères pour le ciblage des macrophages et la modulation des leurs fonctions physiologiques,” Université Claude Bernard Lyon 1, 2014.
- [37] E. Murry, “Actualités sur la vitamine D et nouvelles perspectives thérapeutiques.”
- [38] P. Anagnostis, S. Karras, and D. G. Goulis, “Vitamin D in human reproduction: a narrative review,” *Int. J. Clin. Pract.*, vol. 67, no. 3, pp. 225–235, Mar. 2013.
- [39] J. Luk, S. Torrealday, G. Neal Perry, and L. Pal, “Relevance of vitamin D in reproduction,” *Hum. Reprod.*, vol. 27, no. 10, pp. 3015–3027, Oct. 2012.

- [40] M. Grundmann and F. von Versen-Höynck, “Vitamin D - roles in women’s reproductive health?,” *Reprod. Biol. Endocrinol.*, vol. 9, no. 1, p. 146, 2011.
- [41] O. D. E. Principes, “Les suppléments de vitamine D : Recommandations pour les mères et leur nourrisson au Canada,” *paediatrics & child health.*, vol. 12, no. 7, pp. 591–598, 2007.
- [42] C. He, Z. Lin, S. Robb, and A. Ezeamama, “Serum Vitamin D Levels and Polycystic Ovary syndrome: A Systematic Review and Meta-Analysis,” *Nutrients*, vol. 7, no. 6, pp. 4555–4577, Jun. 2015.
- [43] M. B. Jensen, “Vitamin D and male reproduction,” *Nat. Rev. Endocrinol.*, vol. 10, no. 3, pp. 175–186, Mar. 2014.
- [44] S. Pilz *et al.*, “The Role of Vitamin D in Fertility and during Pregnancy and Lactation: A Review of Clinical Data,” *Int. J. Environ. Res. Public Health*, vol. 15, no. 10, p. 2241, Oct. 2018.
- [45] Capsulae innovative microencapsulation, “Introduction aux Technologies d’encapsulations,” 2015.
- [46] V. Mohanraj, Y. Chen, and M. & Chen, “Nanoparticles,” *Trop. J. Pharm. Res. Trop J Pharm Res*, vol. 5, no. June, pp. 561–573, 2006.
- [47] A. H. Faraji and P. Wipf, “Nanoparticles in cellular drug delivery,” *Bioorganic Med. Chem.*, vol. 17, no. 8, pp. 2950–2962, 2009.
- [48] H. EIDI, “Cytotoxicité de nanoparticules polymériques , vecteurs de médicaments,” *L’UNIVERSITE HENRI POINCARÉ*.
- [49] R. Fontoura *et al.*, “Leishmanicidal activity of amphotericin B encapsulated in PLGA – DMSA nanoparticles to treat cutaneous leishmaniasis in C57BL / 6 mice,” *Exp. Parasitol.*,

- vol. 135, no. 2, pp. 217–222, 2013.
- [50] H. Kulhari, D. Pooja, S. Shrivastava, V. G. M. Naidu, and R. Sistla, “Peptide conjugated polymeric nanoparticles as a carrier for targeted delivery of docetaxel,” *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 117, pp. 166–173, 2014.
- [51] B. Ucakar, N. Joudiou, J. Bianco, P. Danhier, and F. Danhier, “Magnetic targeting of paclitaxel-loaded poly (lactic- co -glycolic acid) -based nanoparticles for the treatment of glioblastoma,” pp. 4509–4521, 2018.
- [52] F. Diarrassouba, G. Garrait, G. Remondetto, P. Alvarez, E. Beyssac, and M. Subirade, “Improved bioavailability of vitamin D 3 using a b -lactoglobulin-based coagulum,” *Food Chem.*, vol. 172, pp. 361–367, 2015.
- [53] L. Vora, V. G. Sita, and P. Vavia, “Zero order controlled release delivery of cholecalciferol from injectable biodegradable microsphere : In - vitro characterization and in - vivo pharmacokinetic studies,” *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 107, no. June, pp. 78–86, 2017.
- [54] B. Delavari, A. Akbar, M. Sadat, A. Ghasemi, A. A. Moosavi-movahedi, and T. Haertl, “Alpha-lactalbumin : A new carrier for vitamin D 3 food enrichment,” *Food Hydrocoll.*, vol. 45, pp. 124–131, 2015.
- [55] P. Pandey and M. Dahiya, “a Brief Review on Inorganic,” *J. Crit. Rev.*, vol. 3, no. 3, pp. 18–26, 2016.
- [56] A. Ruellan and L. Yahia, “Utilisation de nanoparticules d'oxyde de fer comme nouveau traitement potentiel pour l'arthérosclérose,” *Université de Montréal*, 2015.
- [57] C. Sun, J. S. H. Lee, and M. Zhang, “Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 60, pp. 1252–1265, 2008.

- [58] S. Lal, "Molecular Nanotechnology Synthesis of Organic Nanoparticles and their Applications in Drug Delivery and Food Nanotechnology: A Review," *Nanomater. Mol. Nanotechnol.*, no. September 2014, 2015.
- [59] M. Harms and C. C. Müller-Goymann, "Solid lipid nanoparticles for drug delivery," *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, vol. 21, no. 1, pp. 89–99, 2011.
- [60] S. Gohla, K. Ma, and R. H. Mu, "Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art," *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 50, 2000.
- [61] C. Lin, C. Chen, Z. Lin, and J. Fang, "Recent advances in oral delivery of drugs and bioactive natural products using solid lipid nanoparticles as the carriers," *J. Food Drug Anal.*, vol. 25, no. 2, pp. 219–234, 2017.
- [62] T. M. Allen and P. R. Cullis, "Liposomal drug delivery systems : From concept to clinical applications," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 65, no. 1, pp. 36–48, 2013.
- [63] S. Kumar Sriraman, G. Salzano, C. Sarisozen, and V. Torchilin, "Anti-Cancer Activity of Doxorubicin-Loaded Liposomes Co-Modified with Transferrin and Folic Acid," *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, pp. 40–49, 2017.
- [64] M. Mohammadi, B. Ghanbarzadeh, and H. Hamishehkar, "Formulation of Nanoliposomal Vitamin D3 for Potential Application in Beverage Fortification," *Adv. Pharm. Bull.*, vol. 4, no. Suppl 2, pp. 569–575, 2014.
- [65] A. Kiani, M. Fathi, and S. M. Ghasemi, *Production of novel vitamin D3 loaded lipid nanocapsules for milk fortification*, vol. 20, no. 11. 2017.
- [66] N. T. Huynh, C. Passirani, P. Saulnier, and J. P. Benoit, "Lipid nanocapsules: A new platform for nanomedicine," *Int. J. Pharm.*, vol. 379, no. 2, pp. 201–209, 2009.

- [67] E. Roger, “Représentation schématique des nanocapsules lipidiques. | Download Scientific Diagram.” [Online]. Available: https://www.researchgate.net/figure/Representation-schematique-des-nanocapsules-lipidiqes_fig3_43322439. [Accessed: 19-Apr-2019].
- [68] G. Le Roux, H. Moche, A. Nieto, J.-P. Benoit, F. Nesslany, and F. Lagarce, “Cytotoxicity and genotoxicity of lipid nanocapsules,” *Toxicol. Vitro.*, vol. 41, pp. 189–199, Jun. 2017.
- [69] N. Anton, P. Gayet, J.-P. Benoit, and P. Saulnier, “Nano-emulsions and nanocapsules by the PIT method: An investigation on the role of the temperature cycling on the emulsion phase inversion,” *Int. J. Pharm.*, vol. 344, no. 1–2, pp. 44–52, Nov. 2007.
- [70] N. Anton, J.-P. Benoit, and P. Saulnier, “Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates—A review,” *J. Control. Release*, vol. 128, no. 3, pp. 185–199, Jun. 2008.
- [71] K. Shinoda and H. Saito, “The Stability of O/W type emulsions as functions of temperature and the HLB of emulsifiers: The emulsification by PIT-method,” *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 30, no. 2, pp. 258–263, 1969.
- [72] A. Kiani, M. Fathi, and S. M. Ghasemi, “Production of novel vitamin D3 loaded lipid nanocapsules for milk fortification,” *Int. J. Food Prop.*, 2016.
- [73] B. J. P. Heurtault B., Saulnier P., Pech B., Proust J.E., “A novel phase inversion -based process for the preparation of lipid nanocarrier,” *Pharm. Res.*, vol. 19, no. 6, pp. 875–880, 2002.
- [74] N. Anton, P. Saulnier, A. Béduneau, and J.-P. Benoit, “Salting-Out Effect Induced by Temperature Cycling on a Water/Nonionic Surfactant/Oil System,” *J. Phys. Chem. B*, vol. 111, no. 14, pp. 3651–3657, Apr. 2007.

- [75] D. J. McClements, "Edible nanoemulsions: fabrication, properties, and functional performance," *Soft Matter*, vol. 7, no. 6, pp. 2297–2316, 2011.
- [76] B. Heurtault, P. Saulnier, B. Pech, M.C. Venier-Julienne, J.E. Proust, R. Phan-Tan-Luu, and J.P. Benoit, "The influence of lipid nanocapsule composition on their size distribution," *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 18, no. 1, pp. 55–61, Jan. 2003.
- [77] A. Paillard, F. Hindré, C. Vignes-Colombeix, J. Benoit, and E. Garcion, "Biomaterials The importance of endo-lysosomal escape with lipid nanocapsules for drug subcellular bioavailability," *Biomaterials*, vol. 31, no. 29, pp. 7542–7554, 2010.
- [78] A. Lamprecht, J. L. Saumet, J. Roux, and J. P. Benoit, "Lipid nanocarriers as drug delivery system for ibuprofen in pain treatment," *Int. J. Pharm.*, vol. 278, no. 2, pp. 407–414, 2004.
- [79] A. Abdel-mottaleb, Mona M A ; Neumann, Dirk ; Lamprecht, "Lipid nanocapsules for dermal application: A comparative study of lipid-based versus polymer-based nanocarriers," *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 79, no. 1, pp. 36–42, 2011.
- [80] F. Lacoeyille, F. Hindre, F. Moal, J. Roux, C. Passirani, O. Couturier, P. Cales, J.J. Le Jeune, A. Lamprecht and J. P. Benoit, "In vivo evaluation of lipid nanocapsules as a promising colloidal carrier for paclitaxel," *Int. J. Pharm.*, vol. 344, no. 1–2, pp. 143–149, 2007.
- [81] M. N. Khalid, P. Simard, D. Hoarau, A. Dragomir, and J. Leroux, "Long Circulating Poly(Ethylene Glycol)-Decorated Lipid Nanocapsules Deliver Docetaxel to Solid Tumors," *Pharm. Res.*, vol. 23, no. 4, pp. 752–758, Apr. 2006.
- [82] F. Lagarce *et al.*, "Fate of paclitaxel lipid nanocapsules in intestinal mucus in view of their oral delivery," *Int. J. Nanomedicine*, vol. 8, pp. 4291–4302, Nov. 2013.

- [83] W. Abdelwahed, G. Degobert, S. Stainmesse, and H. Fessi, "Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations☆," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 58, no. 15, pp. 1688–1713, Dec. 2006.
- [84] X. Tang and M. J. Pikal, "Design of freeze-drying processes for pharmaceuticals: practical advice.," *Pharm. Res.*, vol. 21, no. 2, pp. 191–200, 2004.
- [85] J. C. Kasper and W. Friess, "The freezing step in lyophilization: Physico-chemical fundamentals, freezing methods and consequences on process performance and quality attributes of biopharmaceuticals," *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 78, no. 2, pp. 248–263, 2011.
- [86] L. Min Kyung, K. Min Young, K. Sujung, and L. Jonghwi, "Cryoprotectants for Freeze Drying of Drug Nano-Suspensions: Effect of Freezing Rate," *J. Pharm. Sci.*, vol. 98, no. 12, pp. 4809–4817, 2009.
- [87] Sigma-Aldrich, "Product Specification (Cholecalciferol)," 2019.
- [88] Peter Cremer, "Product specification (LC-810L)," 2019.
- [89] J. Stetefeld, S. A. McKenna, and T. R. Patel, "Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences," *Biophys. Rev.*, vol. 8, no. 4, pp. 409–427, Dec. 2016.
- [90] Malvern, "Manual: Zetasizer Nano user manual (Man0317-5.0) inc addendum - (26-05-10)," May 2013.
- [91] SDTech Nano, "La mesure du potentiel Zêta pour comprendre , stabiliser et contrôler," 2017.

- [92] Malvern, "Zeta Potential An Introduction in 30 Minutes," *Zetasizer Nano series technical note*, 2000. [Online]. Available: www.materialstalks.com/wpcontent/uploads/2017/09/mrk65401_an_introduction_to_zeta_potential_v3.pdf.
- [93] B. Ozturk, S. Argin, M. Ozilgen, and D. J. McClements, "Nanoemulsion delivery systems for oil-soluble vitamins: Influence of carrier oil type on lipid digestion and vitamin D3 bioaccessibility," *Food Chem.*, vol. 187, pp. 499–506, 2015.
- [94] U.S pharmacopoeia, "USP Monographs_ Cholecalciferol," *USP29-NF24 page 502*, 2019. .
- [95] "Genral Notice and Requirements," in *United States Pharmacopeia 38*, 2015.
- [96] B. Heurtault, P. Saulnier, J.-P. Benoit, P. Jacques-Emile, B. Pech, and J. Richard, "Lipid nanocapsules, preparation process and use as medicine," US8057823B2, 2001.
- [97] H. S. Choi *et al.*, "Renal Clearance of Nanoparticles," *Natl. institutes Heal.*, vol. 25, no. 10, pp. 1165–1170, 2007.
- [98] S. R. Popielarski, S. Hu-lieskovan, S. W. French, T. J. Triche, and M. E. Davis, "A Nanoparticle-Based Model Delivery System To Guide the Rational Design of Gene Delivery to the Liver . 2 . In Vitro and In Vivo Uptake Results," *Bioconjugate Chem.*, vol. 16, pp. 1071–1080, 2005.
- [99] C. Dulieu and D. Bazile, "Influence of Lipid Nanocapsules Composition on Their Aptness to Freeze-Drying," *Pharm. Res.*, vol. 22, no. 2, pp. 285–292, Feb. 2005.