



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse III - Paul Sabatier
Discipline ou spécialité : Chimie - Biologie- Santé

Présentée et soutenue par Clara CHAOUAT
Le 22 février 2013
Titre :

Conception de nouveaux systèmes de formulation d'actifs dépigmentants, en vue de leur utilisation par voie cutanée

JURY

Pr Christine Ménager, Professeur à l'université Pierre et Marie CURIE, (Paris), Rapporteur
Pr Véronique Rataj, Professeur à l'université de Lille, Rapporteur
Pr Ange Polidori, Professeur à l'université d'Avignon et des Pays de Vaucluse, Examineur
Pr Myriam Malet - Martino, Professeur à l'université Paul Sabatier, (Toulouse), Examineur
Dr Stéphane Poigny, Ingénieur de recherche, Pierre Fabre (PFDC), Examineur
Dr Isabelle Rico- Lattes, Directrice de recherche, (CNRS, Toulouse), Directrice de thèse
Dr Emile Perez, Chargé de recherche (CNRS, Toulouse), Membre invité
Dr Sophie Franceschi-Messant, Maître de conférences, université Paul Sabatier, (Toulouse), Membre invité

Ecole doctorale : Sciences de la Matière
Unité de recherche : IMRCP – UMR UPS/CNRS 5623
Directeur(s) de Thèse : Dr Isabelle Rico-Lattes, Directrice de recherche (CNRS, Toulouse)



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse III - Paul Sabatier

Discipline ou spécialité : Chimie - Biologie- Santé

Présentée et soutenue par Clara CHAOUAT

Le 22 février 2013

Titre :

Conception de nouveaux systèmes de formulation d'actifs dépigmentants, en vue de leur utilisation par voie cutanée

JURY

Pr Christine Ménager, Professeur à l'université Pierre et Marie CURIE, (Paris), Rapporteur

Pr Véronique Rataj, Professeur à l'université de Lille, Rapporteur

Pr Ange Polidori, Professeur à l'université d'Avignon et des Pays de Vaucluse, Examineur

Pr Myriam Malet - Martino, Professeur à l'université Paul Sabatier, (Toulouse), Examineur

Dr Stéphane Poigny, Ingénieur de recherche, Pierre Fabre (PFDC), Examineur

Dr Isabelle Rico- Lattes, Directrice de recherche, (CNRS, Toulouse), Directrice de thèse

Dr Emile Perez, Chargé de recherche (CNRS, Toulouse), Membre invité

Dr Sophie Franceschi-Messant, Maître de conférences, université Paul Sabatier, (Toulouse), Membre invité

Ecole doctorale : Sciences de la Matière

Unité de recherche : IMRCP – UMR UPS/CNRS 5623

Directeur(s) de Thèse : Dr Isabelle Rico-Lattes, Directrice de recherche (CNRS, Toulouse)

REMERCIEMENTS

Les travaux décrits dans cette thèse ont pu être réalisés grâce à un financement des Laboratoires Pierre Fabre.

Ce travail a été réalisé au sein du groupe SMODD du laboratoire des interactions moléculaires et réactivité chimique et photochimique (IMRCP, UMR 5623, CNRS Université Paul Sabatier) en collaboration avec les laboratoires Pierre Fabre.

Je tiens à remercier le docteur Monique Mauzac, directeur du laboratoire des IMRCP pour m'avoir accueillie dans ces locaux.

Je souhaite également à exprimer ma gratitude à ma directrice de thèse, le docteur Isabelle Rico-Lattes pour l'intérêt et la confiance qu'elle a su m'accorder tout au long de ma thèse.

Je tiens également à adresser mes remerciements aux docteurs Emile Perez et Sophie Franceschi, leur rigueur et leurs compétences m'ont permis d'avancer et de dépasser les obstacles.

Je tiens également à remercier plusieurs personnes des laboratoires Pierre Fabre, notamment Anne-Marie Schmitt, Emmanuel Questel, Stéphane Poigny et Françoise Belaubre pour avoir encadré ce travail pendant ces trois ans.

Je souhaite ensuite remercier tous les membres de mon jury de thèse, dont particulièrement Mme Christine Ménager (Professeur à l'université Pierre et Marie Curie de Paris) et Mme Véronique Rataj (Professeur à l'université de Lille) pour avoir accepté d'être rapporteurs de ce manuscrit.

Mes remerciements s'adressent également à Mme Myriam Mallet-Martino (Professeur à l'université Paul Sabatier de Toulouse) et Mr Ange Polidori (Professeur à l'université d'Avignon et des pays du Vaucluse), pour avoir accepté de participer à ce jury de thèse en tant qu'examineurs.

Je tiens à saluer l'ensemble des personnes des services communs d'analyse : Marc Vedrenne (Résonance magnétique nucléaire), j'ai pris beaucoup de plaisir à travailler avec toi. Je te remercie grandement pour ta disponibilité et le temps que tu m'as accordé durant ces trois années. Mme Corinne Routaboul (spectrométrie IR) qui m'a été d'une grande aide au début de cette thèse.

Je souhaite également exprimé ma gratitude à Stéphanie Balor du plateau de microscopie électronique TRI de l'IBCG. Stéph, c'est toi qui m'as initié à ce monde particulier de la microscopie électronique. Merci pour tes compétences, ton professionnalisme, ton dynamisme, ta motivation, ta rigueur et ta sympathie... Cela a été un vrai plaisir de travailler avec toi.

Je souhaite à présent adresser mes remerciements à certains étudiants.

Stéphanie, tu vogues maintenant vers d'autres horizons mais j'en profite quand même pour te remercier de ta bonne humeur, ta sympathie et ton accueil particulièrement chaleureux au sein du laboratoire.

Stéphane, je tiens à te remercier pour ta bonne humeur et ta disponibilité à toute épreuve, tu m'as souvent dépanné et pour cela, merci.

Le meilleur pour la fin...Nathalie, tu sais déjà beaucoup de choses mais tu ne pouvais pas ne pas figurer à ce niveau. Je t'adresse un immense merci pour ton optimisme exemplaire qui remet du baume au cœur dans les moments difficiles, ton oreille toujours attentive et à l'écoute et pour les « fajitas party ».

Un immense merci à Nadia, je n'ai pas besoin de développer, tu sais déjà tout...

Un gros gros merci à Yann, toujours opérationnel et d'une redoutable efficacité.

Je remercie également pour les bonbons et les chocolats qui remontent le moral quand celui-ci est en berne.

Mes remerciements également s'adressent à Fernanda, toi aussi tu sais déjà beaucoup de choses...Un immense merci...

Enfin et bien évidemment, de chaleureux remerciements à l'égard de ma famille...

AVANT - PROPOS

Sommaire

SOMMAIRE	7
LISTE DES ABREVIATIONS	10
INTRODUCTION GENERALE	13
CHAPITRE I	17
MISE AU POINT BIBLIOGRAPHIQUE SUR LES HYPERPIGMENTATIONS ET LES STRATEGIES DEPIGMENTANTES	17
1. INTRODUCTION	17
2. LA PEAU ET SA FONCTION BARRIERE	18
2.1 Structure de la peau	18
2.2 Le film hydrolipidique	19
2.3 La pigmentation cutanée	21
3. LE PASSAGE TRANSCUTANE DES MOLECULES ACTIVES	27
3.1 Les différentes étapes du processus de perméation cutanée	27
3.2 Cinétique d'absorption percutanée	27
3.3 Les différentes voies de passage à travers le <i>Stratum corneum</i>	28
4. LES HYPERPIGMENTATIONS	30
4.1 Hyperpigmentations génétiques	30
4.2 Hyperpigmentations secondaires	32
5. LES ACTIFS DEPIGMENTANTS	35
5.1 Introduction	35
5.2 Les actifs d'origine synthétique	36
5.3 Actif d'origine fermentaire	43
5.4 Les actifs d'origine végétale	44
5.5 Les acides gras insaturés	46
6. CONCLUSION	49
CHAPITRE II	51
MISE AU POINT BIBLIOGRAPHIQUE SUR LA VECTORISATION DE MOLECULES ACTIVES	51
1. INTRODUCTION	51
2. LES FACTEURS INFLUENÇANT LA PENETRATION PERCUTANEE	52
3. MODIFICATION DE LA PERMEABILITE CUTANEE	53
3.1 Hydratation du <i>Stratum corneum</i>	53
4. PROMOTEURS CHIMIQUES DE PENETRATION CUTANEE	55
4.1 Introduction	55
4.2 Le diméthylsulfoxyde et ses dérivés	55
4.3 L'azone	55
4.4 Les acides et les alcools gras	56
4.5 Les huiles essentielles, terpènes et terpénoïdes	60
4.6 Le chitosan	61
5. LES SYSTEMES D'ENCAPSULATION	61
5.1 Introduction	61
5.2 Les systèmes vésiculaires	62
5.3 Les émulsions et nanoémulsions	69
5.4 Les systèmes particulaires	71
5.5 Les complexes moléculaires	77
6 CONCLUSION	78

CHAPITRE III	80
LE CHITOSAN AGENT D'ENCAPSULATION DE MOLECULES ACTIVES	80
1. INTRODUCTION	80
2. CHITINE ET CHITOSAN	81
2.1 Les sources de chitine	81
2.2 Structure chimique	82
2.3 Préparation de la chitine et du chitosan	82
2.4 Degré de désacétylation	84
2.5 Masse moléculaire	84
3. PROPRIETES DE LA CHITINE ET DU CHITOSAN	85
3.1 Solubilité	85
3.2 Polyélectrolytes en milieu acide	85
3.3 Propriétés physiques et chimiques	86
3.4 Propriétés biologiques	86
3.5 Biodégradabilité	87
3.6 Toxicité du chitosan	87
4. LES DIFFERENTS DERIVES DU CHITOSAN	88
5. LE CHITOSAN : AGENT D'ENCAPSULATION DE MOLECULES ACTIVES	89
5.1 Relargage de principes actifs	89
5.2 Complexes avec les ions métalliques	90
5.3 Complexes électrostatiques	91
5.5 Le chitosan en cosmétologie	94
6. CONCLUSIONS	95
CHAPITRE IV	97
ELABORATION ET CARACTERISATIONS D'UN VECTEUR DE BASE	97
1. PRESENTATION DE L'OBJECTIF DE L'ETUDE	97
1.1 Introduction	97
1.2 Les éléments du complexe	98
1.3 Conclusions	100
2 ELABORATION ET CARACTERISATIONS PHYSICO-CHIMIQUES DU VECTEUR DE BASE A PARTIR D'UN SEL DE CHITOSAN	101
2.1 Introduction	101
2.2 Voie du chlorhydrate de chitosan	101
2.3 Voie de l'acétate de chitosan	106
2.4 Voie du lactobionate de chitosan	108
3. CONCLUSIONS	118
CHAPITRE V	120
ELABORATION ET CARACTERISATION DE COMPLEXES BINAIRES DE LACTOCHITOSAN + ACIDE GRAS ET LACTOCHITOSAN + INGREDIENT ACTIF	120
1. INTRODUCTION	120
2. ELABORATION DE COMPLEXES BINAIRES DE LACTOCHITOSAN + ACIDE GRAS	121
2.1 Linoléate de lactochitosan	121
2.2 Oléate de lactochitosan	128
3. ELABORATION DE COMPLEXES BINAIRES DE LACTOCHITOSAN + INGREDIENTS ACTIFS	132
3.1 Formation de complexes binaires de lactochitosan + acide azélaïque	133
3.2 Formation de complexes binaire de lactochitosan + acide kojique	137
3.3 Formations de complexes binaires de lactochitosan + autres agents actifs	141
4. CONCLUSIONS	143
CHAPITRE VI	145
ELABORATION ET CARACTERISATIONS DE COMPLEXES TERNAIRES DE LINOLEATE OU OLEATE DE LACTOCHITOSAN + INGREDIENTS ACTIFS	145
1. INTRODUCTION	145

2. COMPLEXES TERNAIRES DE LINOLEATE DE LACTOCHITOSAN + INGREDIENT ACTIF	146
2.1 Modes opératoires	146
2.2 Elaboration et caractérisation de complexes ternaires de linoléate de lactochitosan + molécules actives	147
3. COMPLEXES TERNAIRES D'OLEATE DE LACTOCHITOSAN + INGREDIENT ACTIF	155
3.1 Complexes ternaires d'oléate de lactochitosan + R000342 via l'acide oléique	156
3.2 Complexes ternaires d'oléate de lactochitosan + R000342 via le sel d'oléate de sodium	160
3.3 Bilan des essais de formation de complexes ternaires	160
4. ETUDE APPROFONDIE DE L'ORGANISATION DES SYSTEMES TERNAIRES	162
4.1 Microscopie électronique à transmission (MET)	162
4.2 Utilisation d'un colorant	172
5. CONCLUSION	178
CHAPITRE VII	180
ACTIVITE BIOLOGIQUE DE DEUX FORMULATIONS BIOACTIVES DE L'ACIDE AZELAÏQUE	180
1. INTRODUCTION	180
2. EVALUATION DE L'EFFICACITE DE PROMOTION DE PENETRATION CUTANEE DES SYSTEMES TERNAIRES	182
2.1 Objectif de l'étude	182
2.2 Principe de l'étude	182
2.3 Eléments d'essai	182
2.4 Passage transcutané	183
2.5 Résultats	184
2.6 Conclusion	185
3. CONCEPTION ET CARACTERISATION DE VESICULES CATIONIQUES AUX PROPRIETES ANTIMICROBIENNES	186
3.1 Généralités sur les propriétés antimicrobiennes des vésicules cationiques	186
3.2 Formulation de vésicules cationiques	186
3.3 Caractérisation de vésicules cationiques	187
3.4 Conclusion	190
4. CONCLUSION	191
CONCLUSION GENERALE	194
PARTIE EXPERIMENTALE	197
1. CONCEPTION ET CARACTERISATION PHYSICO-CHIMIQUE DES COMPLEXES A BASE DE CHITOSAN	197
1.1 Produits commerciaux	197
1.2 Solvants	197
1.3 Techniques générales de caractérisation structurale	198
1.4 Techniques générales de caractérisation physico-chimique	199
1.5 Formulation et caractérisation des complexes à base de chitosan	199
2. CONCEPTION ET CARACTERISATION DE VESICULES CATIONIQUES	210
2.1 Produits commerciaux utilisés	210
2.2 Techniques de caractérisation physico-chimique	210
2.3 Evaluation de l'activité antimicrobienne des vésicules	211
2.4 Formulation des vésicules cationiques	213
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	216

Liste des abréviations

4-IPC	4-isopropylcatechol
AA	Acide azélaïque
ACTH	Adenocortico Tropin Hormon
ADN	Acide Désoxyribonucléique
AFM	Microscopie à force atomique
AHA	Alphahydroxyacide
AMM	Autorisation de Mise sur le Marché
AMP	L-ascorbyl-2-phosphate de magnésium
ARN	Acide Ribonucléique
ASES	Aerosol Solvent Extraction System
CAC	Concentration d'Agrégation critique
CD	Cyclodextrine
CMB	Concentration Minimale Bactéricide
CMC	Concentration Micellaire Critique
CMF	Concentration Minimale Fongicide
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
D₂O	Eau deutérée
DA	Degré d'acétylation
DD	Degré de désacétylation
DDT	Dichloro-diphényltrichloro-éthane
DLS	Dynamic Light Scattering
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DOPA	3,4-dihydroxyphénylalanine
DOSY	Diffusion Ordered Spectroscopy
DP	Degré de polymérisation
FGF	Fibroblast Growth Factor
H₂O₂	Eau oxygénée
HLB	Hydrophilic-lipophilic balance
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography
IM	Indométacine
IPD	Immediate Pigment Darkening
IR	Infrarouge
KMNO₄	Permanganate de potassium
LDC	Lipid Drug Conjugates
Log P	Coefficient de partage eau/éthanol
LUV	Large Unilamellar Vesicles
MDCK	Madin-Darbin Canine Kidney
MET	Microscopie électronique à transmission
MIH	Melanocyte Inhibiting Hormon
MLV	Multilamellar Vesicles
MM	Masse Moléculaire
MSH	Melanocyte Stimulating Hormon
NaBH₄	Borohydrure de sodium
NaOCl	Hypochlorite de sodium

NaOCl	Hypochlorite de sodium
NC	Nanocapsule
NDDEA	N-dodécyl-diéthanolamine
NFD	Nifidine
NLC	Nanostructured Lipid Carriers
NMF	Natural Moisturizing Factor
NS	Nanosphère
PEC	Polyélectrolytes de charges opposées
PIE	Perte insensible en eau
PNIPAAm	le poly(N-isopropylacrylamide)
POMC	Pro-opiomélanocortine
RESS	Rapid expansion of supercritical solutions
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
SC	Stratum Corneum
SCCP	Scientific Committee on Consumer Products
SDS	Sodium DodecylSulfate
SLN	Solid Lipid Nanoparticles
SUV	Small Unilamellar Vesicles
TPE®	Trioxopimélate d'éthyle
TRP	Tyrosinase Related Protein
UEM	Unité 2pidermique de mélanisation
UV	Ultra-Violet

INTRODUCTION GENERALE

Introduction générale

La peau se situant à l'interface entre l'individu et l'environnement, les soins esthétiques déjà très développés dans les sociétés antiques, ont pris au cours du XXIème siècle une importance toute particulière.

Prisés depuis longtemps dans les pays asiatiques où la blancheur de la peau est un critère esthétique, les produits éclaircissants et/ou dépigmentants sont aujourd'hui également très demandés par les occidentaux. Au cours de ces cinquante dernières années, le mode de vie et les critères de beauté ont beaucoup changé. Ainsi avoir un teint hâlé est devenu un critère esthétique majeur. Pour obtenir ce bronzage, les occidentaux utilisent souvent à outrance des lampes à ultraviolets ou s'exposent pendant des heures au soleil sans appliquer de protection quelconque. Cette exposition exagérée aux ultraviolets peut, non seulement entraîner l'apparition de cancer cutanés et accélérer le vieillissement cutané, mais aussi provoquer l'apparition de troubles pigmentaires qui, souvent, conduisent à une gêne esthétique plus ou moins bien tolérée. Il existe par ailleurs des pathologies provoquant des modifications de la pigmentation normale de la peau ; les dyschromies. Parmi ces dyschromies, il est possible de distinguer celles qui sont dues à une augmentation de la présence de pigments mélaniques ; les hypermélanoses. Les hypermélanoses se définissent comme l'augmentation de la pigmentation normale de la peau. La classification de ces hypermélanoses se fonde sur la topographie et sur le mécanisme de production de la mélanine. Il existe alors les hypermélanoses épidermiques qui donnent une couleur brune à la peau et qui peuvent être dues à une augmentation du nombre des mélanocytes, secondaires à une multiplication tumorale, ou à une augmentation de la synthèse et de la distribution de la mélanine aux kératinocytes. Il existe également les hypermélanoses dermiques donnant une coloration brune à bleutée à la peau du fait de la diffusion à travers les couches épidermiques de la coloration réfléchie du pigment. Ces troubles de la pigmentation cutanée peuvent entraîner des préjudices esthétiques importants, surtout si ceux-ci sont localisés au niveau du visage.

Pour faire face à ces désagréments, les outils actuellement à disposition peuvent être classés en trois groupes ; les peelings à visée dépigmentante, les lasers dépigmentants, pratiqués le plus souvent en centre spécialisé et les agents chimiques dépigmentants, utilisés sous forme de topiques locaux à domicile et qui seront en parti l'objet de cette thèse. Ces composés chimiques, naturels ou synthétiques peuvent agir selon plusieurs types de mécanismes, à différents stades de la synthèse de la mélanine (mélanogenèse). Les dépigmentants sont employés à titre thérapeutique et esthétique et entrent donc aussi bien dans la composition de préparations pharmaceutiques que cosmétiques. Les aspects thérapeutiques et esthétiques étant d'ailleurs souvent intimement liés dans la majeure partie des cas. L'utilité des dépigmentants d'un point de vue thérapeutique réside dans le traitement d'hyperpigmentations telles que le mélasma, les taches de rousseur ou les différentes formes de lentigo. Ils peuvent être également utilisés dans les cas de dépigmentations sévères, notamment chez les sujets mélanodermes, pour lesquels la repigmentation des zones atteintes est aléatoire et hasardeuse. Les dépigmentants sont également utilisés d'un point de vue strictement esthétique par les populations mélanodermes, ce qui constitue d'ailleurs dans certains pays d'Afrique noire, un véritable problème de santé publique. En effet compte tenu du caractère intensif de cette pratique et de la composition des

produits utilisés, les accidents cutanés tels que les brûlures, hypopigmentations, acné ou vergetures sont nombreux. Cette pratique étant très répandue et tenace, elle représente un marché important pour des entreprises proposant des cosmétiques dépigmentants de qualité comme alternative aux productions locales habituelles, bien souvent agressives.

Il existe de nos jours de nombreux produits aux propriétés dépigmentantes, mais ils sont souvent d'une efficacité moyenne et possèdent un délai d'action relativement élevé, plusieurs semaines sont en général nécessaires avant de commencer à voir apparaître les premiers signes d'efficacité et leurs effets sont réversibles à l'arrêt du traitement. Leur action n'est pas sans conséquence. En effet ces produits sont loin de présenter une parfaite innocuité et peuvent provoquer de nombreux effets indésirables.

Il paraît donc intéressant dans ce cas d'avoir recours à l'utilisation de systèmes d'encapsulation et de vectorisation pour les molécules actives aux propriétés dépigmentantes. De nombreuses approches ont été mises en place pour mettre au point des systèmes de transport de molécules actives jusqu'à leur cible biologique. Un vecteur doit garantir la conservation de l'activité thérapeutique du principe actif qu'il transporte puisqu'il garantit sa stabilité mais aussi sa biodisponibilité tout en optimisant son profil toxicologique. Les propriétés pharmacocinétiques de la molécule doivent quant à elles, être améliorées pour lui permettre de franchir les barrières anatomiques ou physiologiques afin d'atteindre sa cible. L'emploi de ces systèmes présente de multiples intérêts dans le cadre de cette étude ; dans un premier temps, on peut envisager de cibler la zone d'action des principes actifs (le mélanocyte), ce qui permettrait une meilleure efficacité du fait de la vectorisation. Il permettrait également de réduire la concentration en principe actif et donc de limiter l'apparition d'effets secondaires potentiels. Enfin, l'emploi de ce type de système permettrait soit de favoriser un effet réservoir à la surface de la peau soit de promouvoir le passage de la molécule active à travers la barrière cutanée. Depuis une trentaine d'années de nombreux systèmes d'encapsulation ont été mis au point. Cependant, peu d'entre eux ont pu atteindre l'objectif de commercialisation du fait de leur complexité intrinsèque ou de leur mise en œuvre, engendrant des coûts économiques ou environnementaux.

De ce fait et dans une logique de développement durable, l'utilisation de polysaccharides comme agent d'encapsulation de molécules actives dépigmentantes nous est apparu comme une voie intéressante. De par leur abondance, leurs sources d'origine renouvelable, leurs propriétés physico-chimiques et biologiques, les polysaccharides constituent des candidats de choix pour l'encapsulation de substances actives.

L'objectif de cette étude a donc été de mettre au point un vecteur à base de chitosan capable d'encapsuler et de transporter des molécules aux propriétés dépigmentantes.

Pour ce faire, nous avons entrepris dans un premier temps de mettre au point un vecteur de base constitué de chitosan avec lequel, nous avons envisagé de faire interagir dans un second temps un acide gras aux propriétés promotrices de pénétration cutanée et/ou un principe actif dépigmentant.

Dans un premier chapitre de mise au point bibliographique, nous résumerons l'ensemble des mécanismes impliqués dans les phénomènes d'hyperpigmentations ainsi que les molécules

dépigmentantes les plus couramment utilisées en thérapeutique afin de mieux appréhender les enjeux de notre étude.

Dans un second chapitre, nous exposerons les différentes stratégies existantes de promotion de pénétration cutanée. En effet, le mode d'administration des produits dépigmentants étant exclusivement sous forme topique, le franchissement de la barrière cutanée constitue un enjeu majeur dans l'efficacité des molécules employées.

Un troisième chapitre sera consacré au chitosan en tant qu'agent d'encapsulation de molécules actives. Nous expliquerons dans ce chapitre en quoi le chitosan constitue un élément de choix pour le transport et l'encapsulation de molécules actives.

Après cette étude fondamentale, nous détaillerons, dans le chapitre 4, l'élaboration et la caractérisation physico-chimique d'un vecteur de base constitué de chitosan qui sera employé par la suite pour la réalisation de complexes binaires (associant vecteur de base et acides gras ou ingrédients actifs) dont l'étude sera détaillée au niveau du chapitre 5. Puis, la réalisation et la caractérisation des complexes ternaires (associant vecteur de base, acide gras et ingrédient actif) seront décrites au niveau du chapitre 6.

Dans un dernier chapitre, l'efficacité d'un complexe ternaire d'acide azélaïque quant à ses capacités d'amélioration de promotion de la pénétration cutanée sera présentée. Le choix de cet actif a été fait par la société Pierre Fabre, au sein de laquelle ont été réalisés les essais préliminaires de pénétration cutanée. Au-delà des propriétés dépigmentantes de cet actif, les propriétés bactéricides de l'acide azélaïque, nous ont également conduits à évaluer l'activité antimicrobienne d'une formulation cationique bioactive à base d'acide azélaïque.

Enfin, les différents modes opératoires de formulation, de caractérisation physico-chimique, de même que les protocoles d'étude de passage transcutané et tests microbiologiques seront décrits dans la partie expérimentale de ce manuscrit.

CHAPITRE I :

MISE AU POINT BIBLIOGRAPHIQUE SUR LES HYPERPIGMENTATIONS ET LES STRATEGIES DEPIGMENTANTES

Chapitre I

Mise au point bibliographique sur les hyperpigmentations et les stratégies dépigmentantes

1. Introduction

Les hyperpigmentations sont des pathologies de plus en plus courantes à l'heure actuelle. Pourtant bénignes, ces pigmentations disgracieuses sont un motif fréquent de consultation. Sous la dépendance de facteurs intrinsèques (facteurs endocriniens, métaboliques ou génétiques) ou extrinsèques (agents photosensibilisants, physiques, chimiques, inflammatoires), ces troubles pigmentaires peuvent se scinder en deux groupes : les hyperpigmentations et les colorations anormales de la peau. Ils résultent de mécanismes physiopathologiques divers incluant des variations qualitatives et quantitatives du pigment mélanique, des anomalies de distribution de la mélanine ou des dérivés de l'hémoglobine, la présence anormale de pigment d'origine endogène ou exogènes ou un épaissement de l'épiderme. Pour faire face à ces mélanodermies, il existe différentes stratégies visant à rétablir une pigmentation normale et uniforme de la peau.

Parmi ces méthodes de dépigmentation, on retrouve l'usage de molécules à activité dépigmentante dont la recherche ne cesse de s'intensifier afin de proposer des solutions de plus en plus efficaces pour le traitement des hypermélanoses. Il s'agit de composés chimiques, naturels ou synthétiques qui ont la capacité d'agir à différents niveaux de la mélanogenèse. Ces composés agissent soit au niveau des mélanosomes en inhibant leur formation, par altération de leur structure, par interférence sur le transfert des mélanosomes aux kératinocytes, soit au niveau de la synthèse des mélanines par action sur la tyrosinase, soit par action cytotoxique sur les mélanocytes. Bien que ces agents dépigmentants soient très nombreux, peu d'entre eux sont utilisés du fait des effets indésirables observés au cours des années d'utilisation qui ont conduit au retrait définitif du marché de certains d'entre eux. Si certains actifs possèdent une réelle toxicité, pour d'autres les effets indésirables désastreux sont plutôt dus à leur mauvaise utilisation.

Dans le cadre de cette mise au point bibliographique, nous développerons les principaux mécanismes qui interviennent dans la synthèse de mélanine (mélanogenèse) qui permettront de mieux appréhender dans un second temps, les différents types d'hypermélanoses fréquemment rencontrées pour enfin décrire les principales molécules actives aux propriétés dépigmentantes.

2. La peau et sa fonction barrière

La peau est l'organe le plus étendu du corps humain puisqu'elle représente 13% de la masse totale d'un adulte et couvre environ une surface de 2 m² en moyenne. Véritable interface avec le milieu extérieur, la peau constitue bien plus qu'une enveloppe recouvrant notre corps, elle constitue le siège de nombreuses fonctions, aussi indispensables à la vie que complexes. Elle assure d'une part, une protection physique et biologique de l'organisme vis-à-vis des agressions extérieures, en constituant une barrière efficace contre la pénétration d'agents pathogènes et de nombreux xénobiotiques. Mais la peau permet d'autre part, de limiter les effets néfastes des rayons ultra-violet (UV) grâce aux mélanines produites par les mélanocytes.

2.1 Structure de la peau

2.1.1 L'épiderme

L'épiderme (figure I-1) comporte deux régions, la couche superficielle non viable, appelée couche cornée ou *Stratum corneum* et l'épiderme vivant.

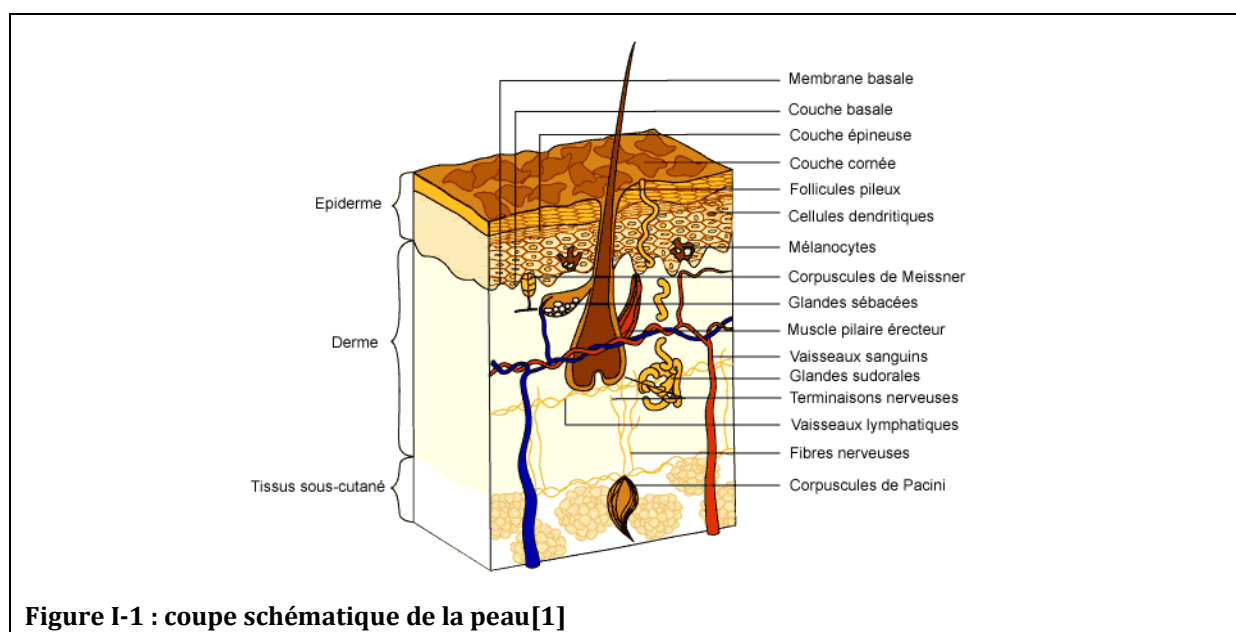


Figure I-1 : coupe schématique de la peau[1]

2.1.1.1 L'épiderme vivant

Quatre principaux types de cellules sont retrouvés au niveau de l'épiderme vivant (Tableau I-1)

Cellule	Représentation en nombre	Rôle
Kératinocytes	80%	Protection
Cellules de Langherans	4%	Immunologique
Cellules de Merkel	3%	Mécanorecepteur
Mélanocytes	13%	Production de mélanine

Tableau I-1 : cellules de l'épiderme vivant

Les kératinocytes subissent une différenciation particulière, appelée phénomène de kératinisation qui s'exerce de façon verticale de la lame basale (où se situent les cellules souches) vers l'extérieur. Ce processus biochimique aboutit à des cellules anucléées et aplaties qui desquament à l'extérieur. L'épiderme n'est pas vascularisé, les nutriments sont apportés aux cellules par le liquide intercellulaire provenant des vaisseaux du derme[2, 3].

2.1.1.2 Le Stratum corneum

Le *Stratum corneum* (SC), également appelé couche cornée est constitué uniquement de cornéocytes qui représentent le stade ultime de différenciation des kératinocytes. La prolifération des kératinocytes au niveau de la lame basale et leur différenciation rapide aboutit au renouvellement du SC toutes les trois à six semaines[2]. C'est le SC qui est responsable de la perméabilité de la peau. La membrane plasmique des cornéocytes est renforcée à l'intérieur par une enveloppe cornée constituée de protéines entrecroisées et liées entre elles par divers types de liaisons dont de nombreux ponts disulfures. Les cellules sont également entourées d'une enveloppe lipidique assurant l'interface entre les composants cellulaires hydrophiles et le milieu extracellulaire lipophile. Elle est composée en majorité d' ω -hydroxycéramides, d' ω -hydroxyacides et d'acides gras libres et est responsable de l'alignement des cornéocytes. La cohésion intercellulaire est assurée par les cornéodesmosomes qui sont de véritables ponts protéiques. Ce sont ces liens qui sont rompus par dégradation lors du processus de desquamation.

La jonction dermo-épidermique est constituée de fins feuillets (50 à 80 nm d'épaisseur) de matrice extracellulaire spécialisée qui séparent des cellules d'origine différente. Elle se distingue par la présence d'ancrages caractéristiques ; du côté de l'épiderme, les hemidesmosomes assurent la jonction entre les kératinocytes basaux et la lame basale, du côté du derme, les fibres d'ancrage interagissent avec la membrane basale et des fragments de celle-ci[2, 3].

2.1.2 Le derme

Le derme est un tissu conjonctif fibreux qui confère à la peau élasticité et tonicité. Il est le site d'implantation des annexes cutanées ainsi que des réseaux vasculaire, nerveux et lymphatique. Le type cellulaire majoritaire est le fibroblaste, dont la fonction principale est la production de la matrice extracellulaire. Celle-ci est composée de la substance fondamentale (eau, sels minéraux, glycoprotéines et glycosaminoglycanes) ainsi que des fibres de collagène et d'élastine. Quelques cellules immunitaires (macrophages, lymphocytes granulocytes) peuvent aussi y être mises en évidence[2].

Deux principaux éléments jouent un rôle majeur dans la fonction barrière de la peau : le film hydrolipidique d'une part et le mécanisme de pigmentation cutanée d'autre part, qui sera développé par la suite.

2.2 Le film hydrolipidique

Le film hydrolipidique est déposé à la surface du *Stratum corneum*, c'est une émulsion eau/huile[4]. L'eau est représentée par les sécrétions sudorales et les acides gras proviennent de la sécrétion sébacée (96% des lipides), de la sueur et des produits de dégradation des kératinocytes issus de la desquamation[4, 5]. Le tableau I-2 présente la composition de la phase lipophile du film hydrolipidique :

Constituants	Proportion massique (%)	Origine
Triglycérides	43	Sébum +++ Epiderme +
Acide gras libres	16	Sébum +++ Epiderme +
Cires	25	Sébum
Squalènes	12	Sébum
Cholestérol (libre et estérifié)	4	Epiderme

Tableau I-2 : Composition de la phase lipophile du film hydrolipidique

L'ensemble des triglycérides + acides gras représentent environ 60% du film lipidique et est constant chez tous les individus. Ce qui varie est la proportion de chacun selon l'activité enzymatique bactérienne de *Propionibacterium acnes*[6].

La phase aqueuse est constituée essentiellement de sueur. On y trouve des substances dissoutes qui peuvent être des substances minérales (chlorure de sodium, chlorure de potassium, calcium, ions phosphates et oligoéléments) mais également des substances organiques représentées par des composés azotés (urée, ammoniac, acides aminés) et des métabolites du glucose (acide lactique, acide pyruvique) [4, 6, 7]. De par sa composition en acides gras qui lui confère un pH entre 5 et 6, le film hydrolipidique joue un rôle dans le maintien du pH acide de la peau [4]. Sa composante lipophile crée une barrière à l'évaporation de l'eau et freine ainsi la perte insensible en eau. Ainsi, il joue un rôle dans l'établissement de la barrière cutanée en freinant également la pénétration de substances hydrophiles. En effet, comme le montre la figure I-2, les cornéocytes, cellules kératinisées et très allongées, se recouvrent entre elles selon un modèle de « brique et mortier » et sont reliées les unes avec les autres par un ciment lipophile[4, 8].

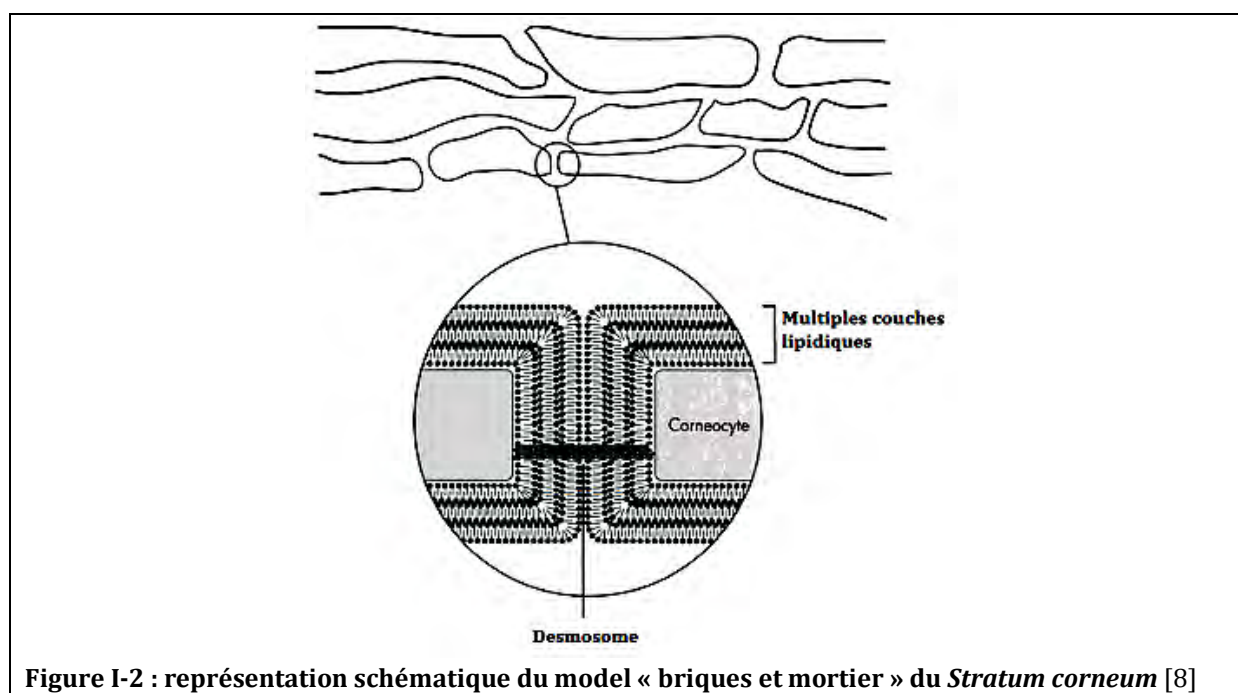


Figure I-2 : représentation schématique du modèle « briques et mortier » du Stratum corneum [8]

Ainsi, les substances chimiques ne pourront se frayer un chemin à travers cette structure qu'en ayant la capacité à s'intégrer à la membrane des cellules ou en s'intégrant au ciment lipophile afin de passer entre les cellules. Ce passage ne sera donc possible que si les propriétés physico-chimiques de ces substances le permettent [4].

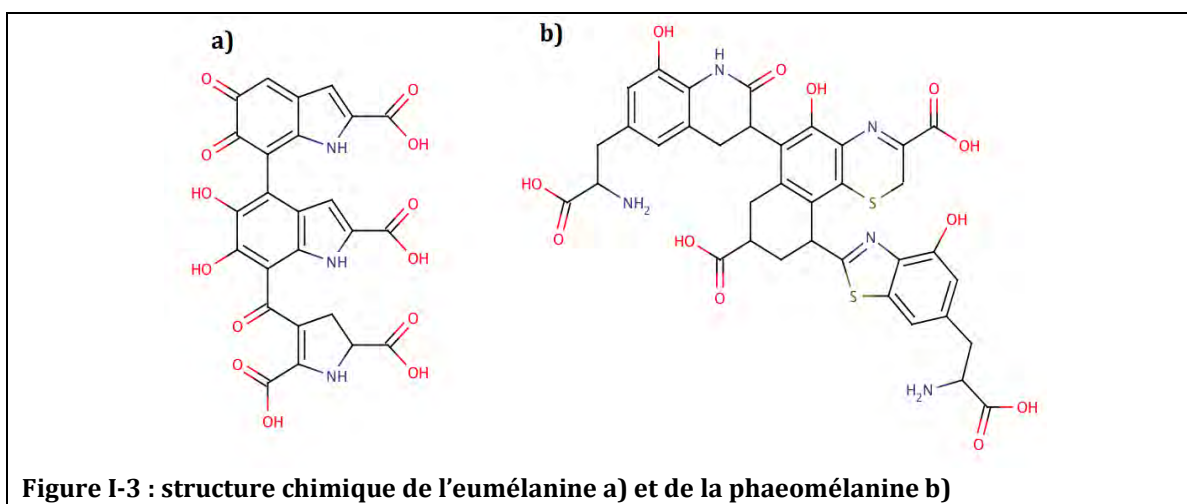
2.3 La pigmentation cutanée

Le phénomène de pigmentation cutanée constitue un élément fondamental dans la protection de la peau. La couleur de la peau résulte de la superposition de 4 couleurs : le jaune des caroténoïdes, le rouge de l'oxyhémoglobine des capillaires dermiques, le bleu de l'hémoglobine des veinules dermiques et surtout le brun de la mélanine des kératinocytes [9, 10]. Celle-ci est responsable de la pigmentation cutanée qui s'intensifie sous l'effet des rayonnements solaires, c'est le phénomène de bronzage qui assure la photoprotection de la peau. Un ensemble de structures sont impliquées dans le phénomène de pigmentation cutanée.

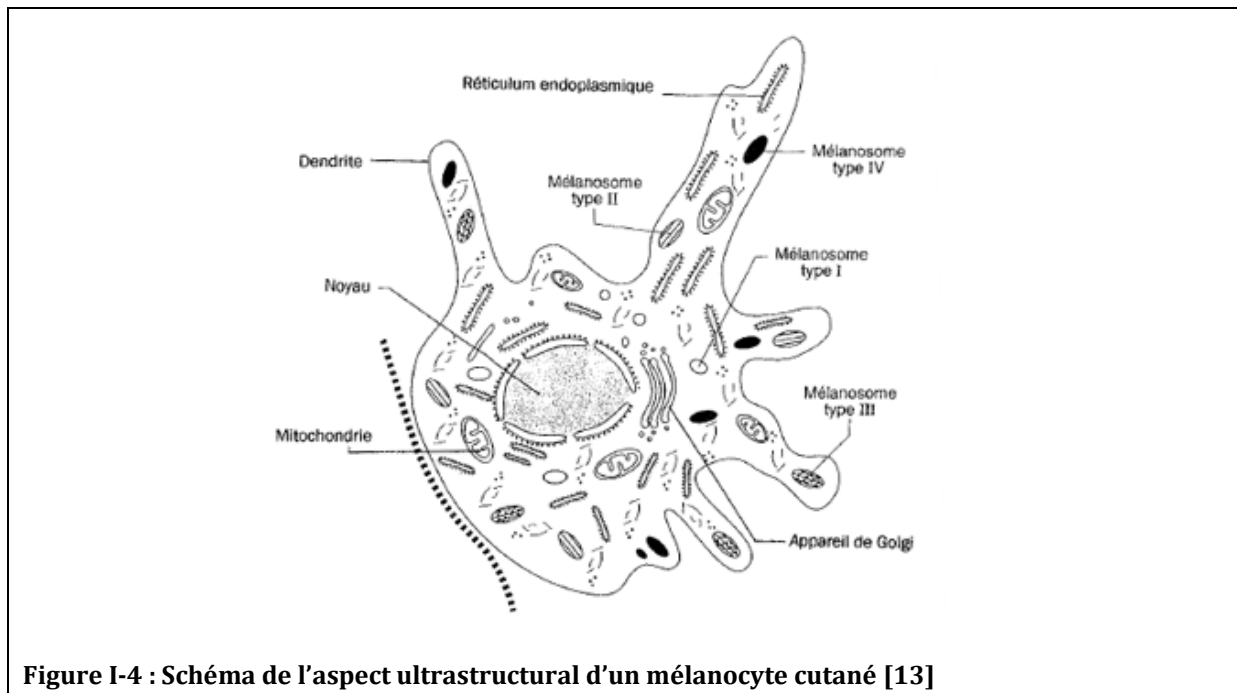
2.3.1 Les mélanines

La pigmentation, c'est-à-dire la couleur des pigments mélaniques dépend essentiellement de facteurs génétiques [1]. La différence de couleur de peau entre les individus s'explique alors par la qualité et la quantité de pigments produits par les cellules [11]. Les mélanines jouent un rôle prépondérant dans le déterminisme de la couleur de la peau. Le rôle de la mélanine est de protéger la peau contre les rayonnements ultraviolets du soleil qui accentuent le processus de vieillissement et les risques de cancer. Les mélanines ont la propriété essentielle d'absorber le rayonnement qui n'a pas été réfléchi à la surface de la peau. Elles constituent un groupe hétérogène de pigments représenté par deux familles, dont les structures chimiques sont représentées au niveau de la figure I-3 :

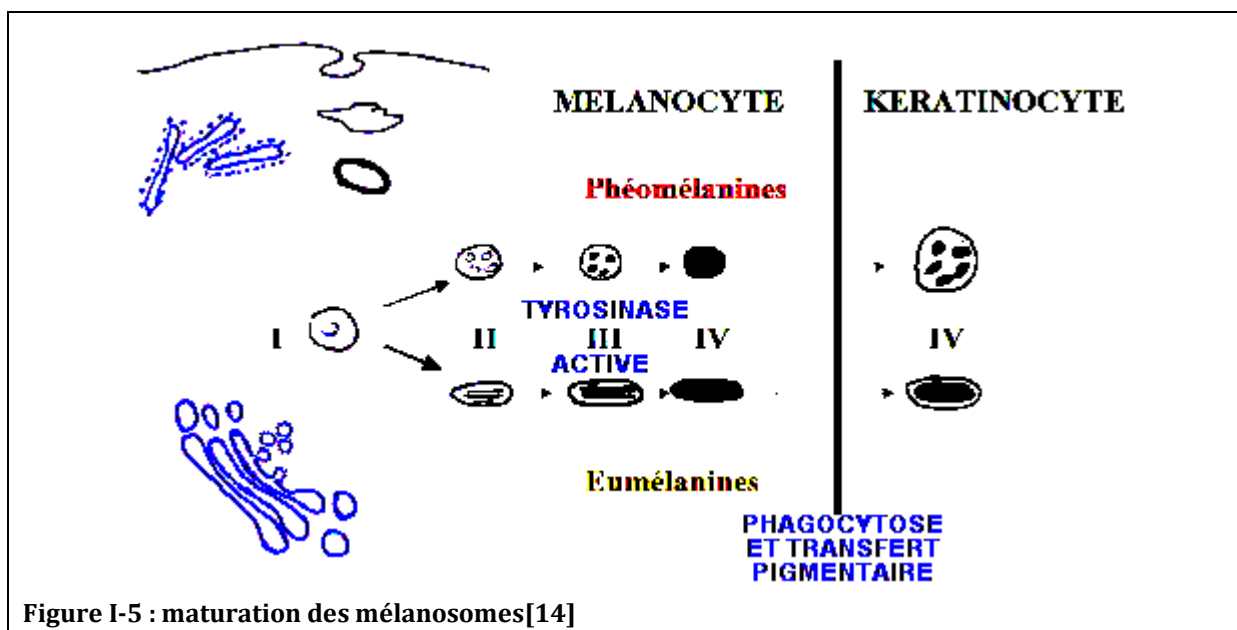
- ⇒ Les phaéomélanines : de couleur jaune ou rouge, riches en soufre prédominant chez les sujets roux. Elles sont synthétisées à partir de deux acides aminés : la tyrosine et la cystéine [6, 9, 12].
- ⇒ Les eumélanines : de couleur noire ou marron, pauvres en soufre, présentes chez les sujets bruns et noirs. Elles sont synthétisées chez les sujets noirs [6, 9, 12].



La plupart des individus synthétisent les deux familles mais une seule prédomine. La mélanine est synthétisée par les mélanocytes (figure I-4) situés dans la couche basale. Elle se présente sous la forme de particules solides sphériques de 20 à 40 nm de diamètre, ce sont les mélanosomes [9].



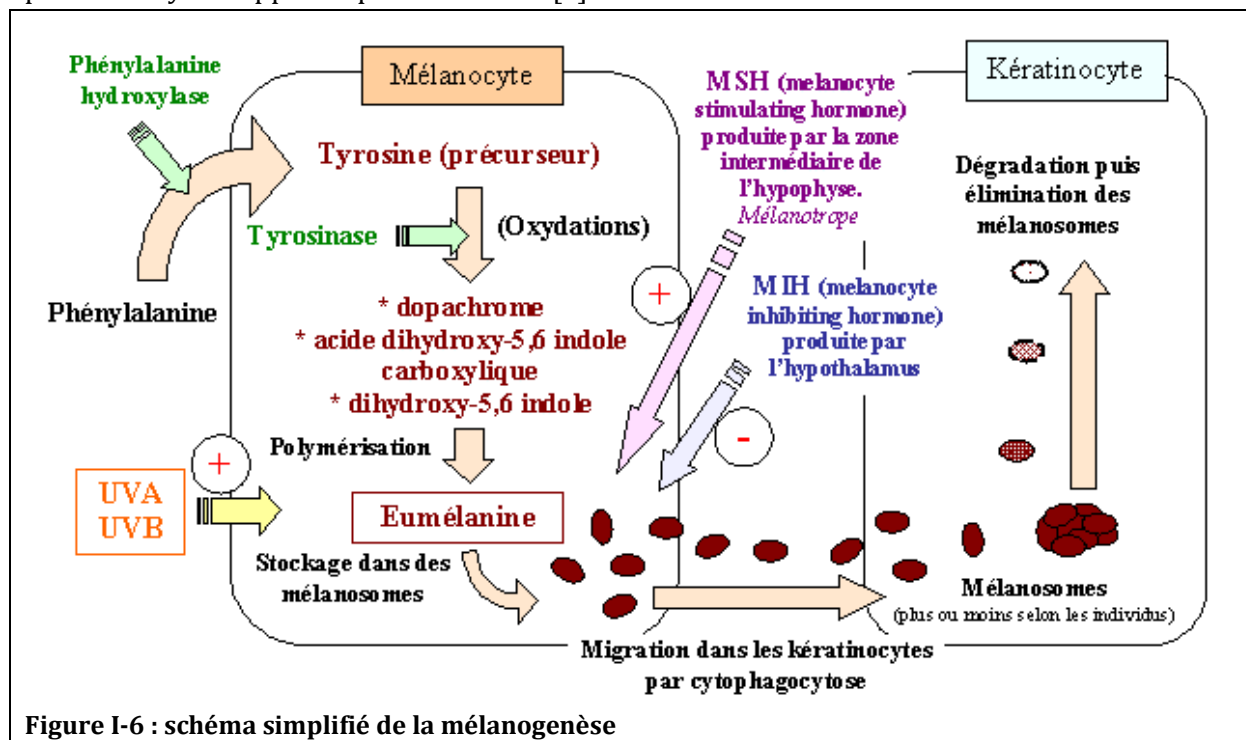
La couleur de la peau ne dépend pas du nombre de mélanocytes mais de leur fonctionnement, c'est-à-dire du nombre et de la taille des mélanosomes[5, 6]. Les mélanosomes des individus à peau foncée sont plus gros et plus volumineux que ceux des individus à peau claire. Ainsi, la quantité de mélanine synthétisée est supérieure chez les individus à peau foncée[1].



Les mélanosomes sont synthétisés sous forme de prémélanosomes (figure I-5) dérivant du réticulum endoplasmique lisse, puis subissent une maturation dans l'appareil de Golgi. Ces derniers contiennent un empilement de mélanofilaments où la mélanine est déposée de manière ordonnée. Les mélanosomes ainsi pigmentés sont transférés aux kératinocytes avoisinants[5, 12].

2.3.2 Mécanisme de la pigmentation

A l'origine de la synthèse de mélanine (figure I-6) se trouve une hormone : la POMC (Pro-Opiomélanocortine). Elle est sécrétée par la glande pituitaire des mammifères et clivée en MSH (Melanocyte stimulating Hormon ou Mélanotropine) et ACTH (Adénocortico Tropic Hormon) par des enzymes appelées proconvertases[6].

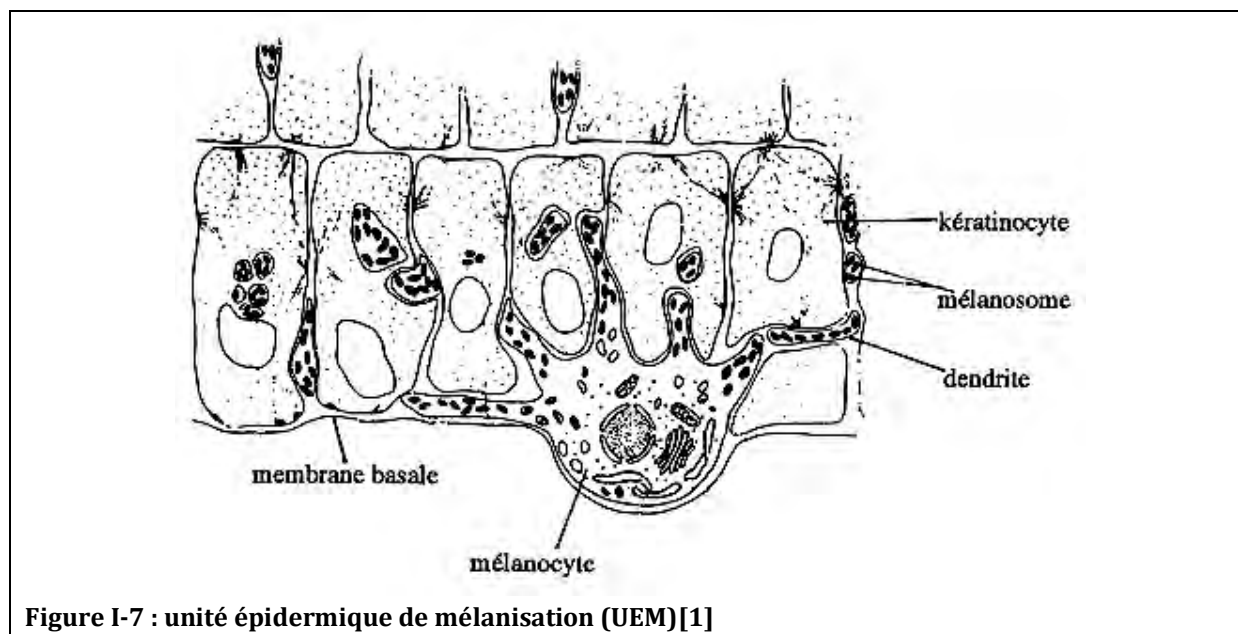


L' α et la β -MSH se lient à des récepteurs situés sur diverses cellules. Les récepteurs présents sur la membrane des mélanocytes sont les MC1-R [6]. En se liant au récepteur, la MSH stimule la mélanogénèse[6]. Après liaison de la MSH, il y a oxydation de la tyrosine en DOPA (dihydroxyphénylalanine) par une enzyme, la tyrosinase. Cette enzyme, oxyde ensuite la DOPA en dopaquinone. A partir de ce point, deux voies métaboliques bien distinctes apparaissent, l'une conduisant aux eumélanines, l'autre aux phaéomélanines[6].

Deux hormones et une vitamine interviennent également dans ce processus :

- Les œstrogènes, responsables notamment du masque de grossesse car hypersécrétés durant cette période.
- La vitamine D, dont le récepteur se situe dans le cytoplasme des mélanocytes. Elle active la phospholipase qui aide à la formation d'acide arachidonique. Ceci conduit à la formation de prostaglandines stimulant la division des mélanocytes[4, 6].
- Les leucotriènes stimulant les mitoses des mélanocytes[6].

Au cours du mécanisme de pigmentation, les mélanocytes transportent les mélanosomes et les transfèrent aux kératinocytes avoisinants grâce aux prolongements cellulaires (dendrites) qu'ils émettent en direction de ces derniers, au sein de la couche basale [4, 6, 9]. Les dendrites contiennent de l'actine et des microtubules qui jouent un rôle dans le mouvement des mélanosomes. Ce phénomène a lieu au sein de l'unité épidermique de mélanisation (UEM)[6], présentée sur la figure I-7.



Le transfert des mélanosomes aux kératinocytes s'effectue selon 3 mécanismes :

- ⇒ Par cytophagocytose : le kératinocyte phagocyte l'extrémité du dendrite mélanocytaire,
- ⇒ Par injection directe du mélanosome au kératinocyte par fusion des membranes plasmiques des deux cellules et communication des cytoplasmes,
- ⇒ Par libération du mélanosome dans l'espace intercellulaire puis capture par le kératinocyte [4, 6, 9].

Le mélanosome va ensuite subir une dégradation au sein du kératinocyte, par des enzymes lysosomiales dont des phosphatases alcalines, contenues dans le phagolysosome. La mélanine est ensuite éliminée soit à la surface de l'épiderme par desquamation des kératinocytes soit éliminée par voie lymphatique, au niveau du derme.

2.3.3 Régulation de la mélanogenèse

Le contrôle de l'activité des mélanocytes est sous la dépendance de nombreux facteurs. Certes, le fonctionnement de l'unité épidermique de mélanisation dépend du programme génétique de l'individu, mais il peut être également influencé par l'environnement. Ainsi, la synthèse de mélanine et son évolution sont fonction de l'intensité de l'exposition solaire, des facteurs hormonaux et des stimulations endocriniennes.

2.3.3.1 Les rayons ultraviolets

Par convention, les rayonnements ultraviolets (UV) sont divisés en trois bandes :

- ✓ Les UVA (320 à 400 nm) : ils traversent l'épiderme en grande majorité mais seule une partie (20 à 30%) atteint le derme, du fait de l'absorption par la mélanine. Les UVA sont dits mélanogènes.
- ✓ Les UVB (290 à 320 nm) : ils sont absorbés pour la plus grande partie par la couche cornée, mais seulement 10% atteignent le derme. Les UVB sont dits érythématogènes car responsables de l'érythème actinique ou « coup de soleil ».
- ✓ Les UVC (230-290 nm) : ils sont totalement absorbés par la couche d'ozone et la haute atmosphère et n'atteignent pas la surface de la terre.

Il existe deux phénomènes de pigmentation :

La pigmentation immédiate ou directe

Dans les minutes qui suivent l'irradiation solaire, une pigmentation légère apparaît, mais elle n'est que transitoire et disparaît en quelques heures. Cette pigmentation rapide ou phénomène de Meironsky, est induite principalement par les UVA et la lumière visible.

D'un point de vue biochimique, il s'agit d'une photo-oxydation superficielle, non enzymatique de la mélanine préexistante ou de ses précurseurs et non pas d'une néo synthèse de pigments. Il n'y a donc pas d'augmentation du nombre de mélanocytes, ni d'activation de la tyrosinase. Le phénomène de pigmentation immédiate est le résultat d'une augmentation du nombre de mélanosomes, d'un allongement des dendrites, d'une dispersion et d'une modification de la répartition des mélanosomes dans les kératinocytes [15-18].

La pigmentation retardée ou indirecte

La pigmentation retardée correspond au bronzage et est essentiellement déclenchée par les UVA et les UVB. Contrairement au phénomène de pigmentation immédiate, il s'agit d'une véritable néo synthèse de mélanine avec une profonde photo-oxydation enzymatique, au cours de laquelle tous les stades de la mélanogenèse sont stimulés

2.3.3.2 Les facteurs génétiques

Chez l'homme, cinq gènes principaux seraient impliqués dans la régulation des variations de pigmentation de la peau. Ces derniers contrôleraient pratiquement tous les stades de la mélanogenèse en codant pour la migration des mélanocytes, la tyrosinase, la taille des mélanosomes, la synthèse des protéines de structure du mélanosome, le transport du cuivre et la migration des mélanosomes vers les kératinocytes. Les caractéristiques du mélanosome sont codées par des gènes de l'ADN du mélanocyte. La mélanogenèse débute lorsque la synthèse d'ADN mélanocytaire est terminée.

Les principaux gènes identifiés sont les suivants :

- Le gène de la tyrosinase : locus albino

Ce gène est situé sur le chromosome 11. Des mutations dans ce gène conduisent à une absence d'expression ou perte de l'activité enzymatique. Ceci explique les différentes formes d'albinisme caractérisées par une absence totale de mélanine.

- Le gène TRP1 (Tyrosinase Related Protein) : locus brown

Il est situé sur le chromosome 9. Une mutation de ce gène serait à l'origine de la canitie chez l'homme.

2.3.3.3 Les hormones sexuelles

Le rôle des hormones sexuelles dans la pigmentation a été mis en évidence d'après des observations faites chez des femmes enceintes. Une hyperpigmentation des zones mamelonnaires, génitales et du visage a été notée chez des femmes enceintes. Ceci est expliqué par une augmentation des mélanocytes actifs. Seulement les mélanocytes de certaines zones localisées seraient sous influence hormonale.

2.3.3.4 Les peptides proiomélanocortiques

L' α MSH et l'ACTH sont largement impliquées dans la régulation de la mélanogénèse chez les mammifères : ce sont les plus puissants activateurs de la mélanogénèse. Ces hormones mélanotropes hypophysaires sont des polypeptides issus du clivage d'un précurseur de plus haut poids moléculaire, la proiomélanocortine (POMC). Ces hormones peuvent être libérées dans la circulation ou sécrétées par les kératinocytes. L' α MSH et l'ACTH se fixe sur un récepteur spécifique, MC1 R, situé à la surface du mélanocyte. Ce récepteur transmembranaire est couplé à une protéine G de type α s. La protéine activée stimule l'adénylate cyclase qui entraîne l'augmentation du taux d'AMPc qui par conséquent active la tyrosinase. Ainsi, l' α -MSH et l'ACTH sont capables de stimuler la prolifération des mélanocytes, l'eumélanogénèse, l'activité de la tyrosinase et d'induire une dendricité.

2.3.3.5 La mélatonine

Cette hormone sécrétée par l'épiphyse inhiberait la sécrétion de l' α -MSH, hormone mélanotrope synthétisée par l'hypophyse. Ainsi, la mélanine contrôlerait indirectement la mélanogénèse. Ce phénomène est à l'origine des changements de pelage des animaux.

2.3.3.6 Le monoxyde d'azote (NO)

Dans l'épiderme, les UV activent une NO synthase de type neuronal et augmentent la production de NO impliqué dans l'apparition d'érythèmes cutanés et dans la transmission du signal mélanogénique des UV. Le NO, produit par les kératinocytes et les mélanocytes, stimulent la mélanogénèse des mélanocytes en culture. Le NO active une guanylate cyclase intramélanocytaire, entraînant une augmentation de la production de GMP cyclique par les mélanocytes. L'augmentation du contenu intramélanocytaire en GMPc entraîne l'augmentation de l'expression et de l'activité de la tyrosinase et par conséquent la stimulation de la mélanogénèse. Le NO n'a pas d'effet sur la croissance mélanocytaire, sa cible reste la tyrosinase, enzyme clé [15-17].

2.3.4 Rôle de barrière vis-à-vis des rayons solaires

Parallèlement au mécanisme de pigmentation, plusieurs phénomènes vont apparaître afin de limiter la pénétration des rayons solaires à travers la peau et par conséquent les dommages occasionnés tant au niveau cellulaire que tissulaire :

- Épaississement de la barrière cornée : l'irradiation UVB induit une augmentation du nombre et de l'épaisseur des différentes couches des kératinocytes dans l'épiderme vivant, une kératinisation accrue et un épaississement de la couche cornée[4]. Le nombre de cornéocytes se trouvent pratiquement doublé. Le but de cet épaississement est de

soustraire les cellules de la couche basale (où ont lieu toutes les mitoses des cellules épidermiques, permettant son élaboration) à atteindre des UV les moins pénétrants, ceux-ci étant épuisés avant d'atteindre la couche germinative[12]. Avec la répétition des expositions, moins d'UVB responsables d'érythème parviennent dans les papilles dermiques et le matériel génétique est soustrait à l'action mutagène des UV[12]. Cependant, certaines études montrent que le rôle photoprotecteur de l'épaisseur de la couche cornée est néanmoins modeste[4].

- *Acide urocanique et lipide de surface* : l'acide urocanique est sécrétée à la surface de la peau par la sueur eccrine. Il est produit par la désamination de l'histidine sous l'influence d'une histidinase activée par les UV. Cette molécule absorbe les UVB et les UVC. L'exposition aux UVA et UVB induit une augmentation des lipides, en particulier, des céramides, dans le *Stratum corneum*. ; ceux-ci contribuent à absorber les UVB[4, 5, 9].

3. Le passage transcutané des molécules actives

3.1 Les différentes étapes du processus de perméation cutanée

Le passage transcutané d'un composé chimique, quel qu'il soit, résulte d'une succession d'étapes de distribution et de diffusion[4]. Un composé chimique est habituellement appliqué sur la peau dans un véhicule. Il peut s'agir d'un simple solvant (eau, solvant hydrophile ou lipophile), d'un gel, d'une formulation pâteuse ou d'un dispositif transdermique. La première étape de la perméation cutanée est la distribution entre le véhicule et le film hydrolipidique de surface. Elle dépend de l'affinité du composé chimique pour l'un ou l'autre des milieux mais aussi de la diffusion du composé dans le véhicule. En effet, seules les molécules présentes à l'interface entre les deux milieux peuvent passer dans les tissus. La nature de la formulation joue donc ici un rôle important. Ainsi, un principe actif diffusera-t-il moins rapidement dans l'adhésif d'un patch que dans un gel, ce qui se traduit par une cinétique de perméation retardée pour le patch avec un temps de latence[4, 9]. Puis, la molécule diffuse dans les différentes couches de l'épiderme totalement hydratées pour ensuite continuer à diffuser dans le derme, également hydrophile[4]. La diffusion d'une couche à l'autre est appelée « perméation ». Au niveau du derme, les molécules entrent en contact avec le système vasculaire capillaire qui se charge d'en résorber une partie, qui passe alors dans la circulation générale pour fournir une action systémique. C'est la « résorption ». La diffusion peut se poursuivre dans le derme et même dans les tissus sous-cutanés[4]. Chaque étape se caractérise par une vitesse propre et la vitesse du processus global dépendra surtout de l'étape la plus lente [5].

3.2 Cinétique d'absorption percutanée

L'étude de la cinétique de diffusion d'une molécule à travers la peau montre que le flux ne devient constant qu'après un temps de latence variable d'une substance à l'autre. La courbe devient ensuite linéaire en atteignant un état d'équilibre [4]. La vitesse de diffusion d'une substance à travers une membrane semi-perméable est proportionnelle à la différence de concentration de part et d'autre de la membrane. Elle obéit à la loi de Fick.

La vitesse d'absorption transcutanée est fonction de plusieurs processus pouvant se développer simultanément :

- Diffusion de la molécule active dans le véhicule
- Libération de la molécule de son véhicule
- Changement du taux d'hydratation de la peau
- Diffusion de la molécule dans la couche cornée
- Diffusion de la molécule dans les autres couches cutanées.

3.3 Les différentes voies de passage à travers le *Stratum corneum*

Plusieurs voies de passage à travers le *Stratum corneum* existent. Deux voies majoritaires se détachent : la voie intercellulaire et la voie transcellulaire (figure I-8), sont les voies les plus empruntées. Une troisième voie minoritaire est la voie empruntant les annexes cutanées.

3.3.1 Le passage intercellulaire

Il s'agit du passage à travers le *Stratum corneum* par diffusion dans les lipides intercellulaires (lipides du ciment lipidique). Même si le chemin parcouru est plus long et tortueux, cette voie est la plus rapide pour de nombreux composés car leur coefficient de diffusion dans le milieu intercellulaire est plus grand. Il s'agit d'un milieu lipidique continu, structuré en bicouches. Il offre donc à la fois des régions hydrophiles et des régions lipophiles, qui correspondent respectivement aux voies de passage des composés lipophiles et hydrophiles [4, 19, 20].

3.3.2 Le passage transcellulaire

Ce passage est beaucoup plus rarement emprunté. Il ferait intervenir la voie des cornéosomes qui réalisent des pontages entre les cellules et peuvent, étant donné leur nature protéique, devenir suffisamment amphiphiles[4]. De plus, les substances empruntant cette voie, doivent être capables de s'intégrer à la double couche de phospholipides constituant les membranes cellulaires pour pouvoir y pénétrer[21]. Cette voie pourrait donc être suivie par des molécules amphiphiles ou plus ou moins lipophiles.

3.3.3 La voie annexielle

Les annexes cutanées représentent environ 1% de la surface de la peau. Cette voie n'est donc pas majoritaire. La voie annexielle correspond :

- au passage transfolliculaire. Etant donné que les follicules pilosébacés sont situés dans des invaginations profondes de l'épiderme dans le derme, ils peuvent conduire les molécules jusqu'au derme réticulaire[4]. De plus, les appareils pilosébacés n'ont pas une couche cornée très développée d'où une pénétration facilitée à ce niveau[6].
- Au passage par le canal sudoripare des glandes eccrines. Celui-ci est possible mais rarement démontré[4]. C'est le cas pour le chlorure d'aluminium qui pénètre dans les conduits sudoraux et diminue l'écoulement de la sueur en les obturant d'où son emploi en tant qu'anti-transpirant[5, 19]. Cependant, le passage par la voie sudoripare semble bien minime, les substances y pénétrant devant diffuser contre le flux de sueur qui se dirige vers la surface cutané [22].

Cette voie présente une importance pour les composés très hydrophiles, à haut poids moléculaire, les ions et pour les systèmes d'encapsulation comme les nanoparticules, les cyclodextrines et les liposomes[20].

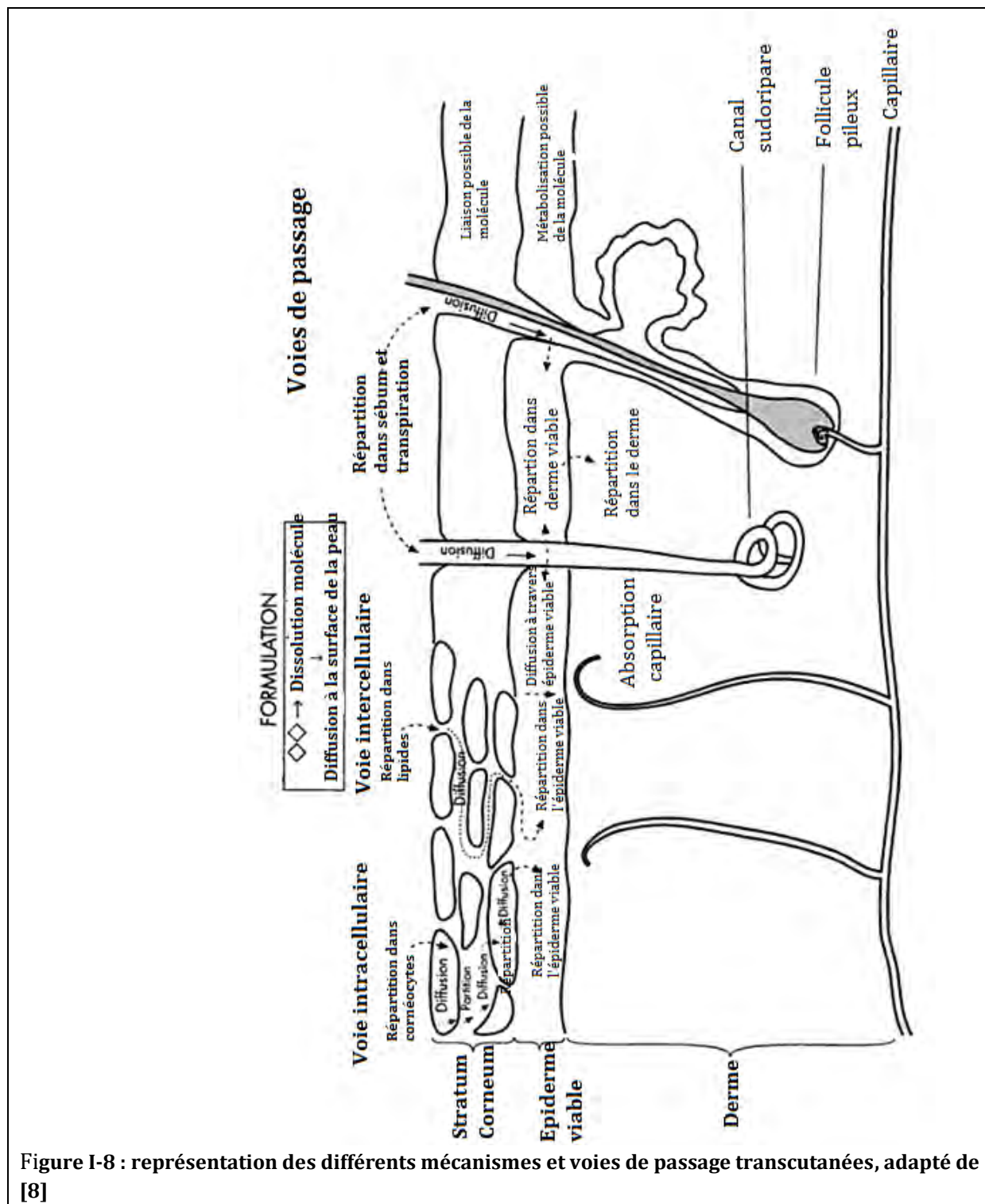


Figure I-8 : représentation des différents mécanismes et voies de passage transcutanées, adapté de [8]

4. Les hyperpigmentations

Les hyperpigmentations résultent d'une accumulation ou d'une mauvaise répartition du pigment au niveau de la peau. Ce pigment est soit un pigment normal de la peau soit un autre pigment non présent au niveau de la peau en temps normal. Les hyperpigmentations sont sous la dépendance de facteurs intrinsèques (facteurs endocriniens, génétiques, inflammatoires...), parfois étroitement liés et difficiles à préciser. Si la plupart des hyperpigmentations résultent d'un trouble de la mélanogenèse, avec activité accrue au niveau des mélanosomes, certaines sont la conséquence d'un transfert plus important du pigment dans les kératinocytes de la couche de Malpighi, d'autres d'une accumulation de mélanine dans le derme.

4.1 Hyperpigmentations génétiques

4.1.1 Hyperpigmentations génétiques épidermiques

4.1.1.1 *Les éphélides ou taches de rousseur*

Les éphélides sont la marque d'une manifestation cutanée physiologique dénuée de signification pathologique. Elles sont transmises comme caractères autosomique dominant et sont fréquentes chez les sujets blonds ou roux à phototype clair. Ce sont des macules localisées de petite taille et de couleur orange. On les retrouve essentiellement sur les zones exposées comme le visage, les avant-bras, le dos des mains, décolleté et haut du dos. Absentes à la naissance, elles apparaissent généralement dans l'enfance vers 3-5 ans et sont permanentes, leur nombre augmentant avec l'âge. Chez l'adulte, les éphélides ont tendance à disparaître.

Leur coloration s'accroît avec l'exposition solaire et s'éclaircissent à distance de l'exposition. Ainsi, les éphélides s'assombrissent considérablement et deviennent plus larges en été, alors qu'elles pâlisent ou peuvent presque disparaître en hiver.

Sur le plan histologique, les éphélides sont dues à une accumulation de pigment dans les cellules de la couche basale de l'épiderme. En effet, elles correspondent à une hypermélaninose épidermique, c'est-à-dire à un nombre normal de mélanocytes, mais ayant une hyperactivité aboutissant à une surcharge en mélanines par augmentation de sa synthèse. Ces mélanocytes possèdent également de volumineux mélanosomes arrondis, comparables à ceux retrouvés chez les sujets de race noire, à contenu granuleux[23].

4.1.1.2 *Les lentigines ou grains de beauté*

Les lentigos sont des macules de petites tailles (généralement moins de 5 mm, mais il y a des exceptions), bien limitées, de teinte brun foncé à noir. Histologiquement, ils sont en rapport avec une hypermélanocytose associée à une élongation des crêtes épidermiques. Le lentigo simplex et le lentigo actinique sont les deux principaux types de lentigos. Les lentiginoses sont des syndromes rares comportant des lentigos multiples avec une disposition particulière. Certaines de ces lentiginoses comportent en plus des anomalies extra-cutanées spécifiques[24]. Les lentigines sont bénignes et ne risquent pas d'évoluer en cancer.

- Lentigo simplex

Le terme lentigo simplex désigne tout lentigo survenant indépendamment de l'exposition solaire. Les lentigos simplex peuvent survenir sur n'importe quel endroit de la peau y compris

les paumes de mains et les plantes de pieds, sur les muqueuses orale ou génitale ainsi que dans l'ongle [24].

- Lentigo actinique

Le terme lentigo actinique désigne tout lentigo induit par les rayons UV. Les lentigos actiniques surviennent donc sur les régions exposées au soleil, en particulier le visage et le dos des mains et persistent ensuite même en l'absence d'exposition solaire. Ils ont une taille variable de quelques millimètres à quelques centimètres. Ils sont présents chez 90% des sujets caucasiens de plus de 60 ans. En théorie, la distinction clinique entre lentigo actinique et éphélides repose sur l'âge de survenue et la persistance ou non en l'absence de soleil, mais en pratique, cette distinction n'est pas facile [24].

4.1.1.3 Les taches café au lait

Les taches café au lait se présentent comme des macules brun clair ou bistre, de couleur homogènes, de forme arrondie ou ovale et à contours réguliers ou parfois même déchiquetés. Leur taille peut varier de quelques centimètres à plusieurs dizaines de centimètres.

De siège ubiquitaire, elles sont préférentiellement localisées sur le thorax, les lombes et parfois les membres ; elles respectent les muqueuses. Ces lésions sont, le plus souvent, présentes dès la naissance, ou peuvent apparaître dans les premières années de la vie. Elles sont en général isolées et peu nombreuses. Leur taille est stable, mais augmente avec la croissance. Elles ne dégénèrent jamais au cours de leur évolution[25].

Toutefois, les taches café au lait peuvent également être le signe cutané de maladie générale lorsqu'au moins 5 taches sont présentes. En effet, elles sont associées à de nombreux syndromes polymalformatifs complexes dont les principaux sont la neurofibromatose de Von Recklinghausen et le syndrome de Mac Cune-Albright.

Histologiquement ces taches correspondent à une hypermélaninose épidermique avec un nombre normal de mélanocytes produisant une quantité excessive de pigment et parfois présence de macromélanose (qui sont toutefois rares dans le syndrome d'Albright)[26].

4.1.2 Hyperpigmentations génétiques dermiques

4.1.2.1 Les taches mongoliques

Ce sont des macules gris-bleuté, localisées au niveau des fesses et de la région lombo-sacrée. On les retrouve chez les populations noires et asiatiques. Ces taches bénignes sont présentes à la naissance et disparaissent à la petite enfance. Histologiquement, elles correspondent à la présence de mélanocytes pigmentés dans le derme réticulaire profond. L'embryogenèse l'expliquerait par un arrêt de la migration des mélanoblastes entre la crête neurale de la peau [23].

4.1.2.2 Les naevi d'Ota et de Ito

Il s'agit de macules pigmentées bleu ardoisé ou grisâtres, avec une localisation unilatérale. Elles sont congénitales, apparaissent le plus souvent à la naissance ou quelque fois à l'adolescence

mais ne disparaissent pas avec l'âge, ayant même parfois tendance à foncer (à la différence des taches mongoliques). Ces lésions sont beaucoup plus fréquentes chez les asiatiques et en particulier, les femmes [27]. Histologiquement, ces hyperpigmentations correspondent à une hyperprolifération des mélanocytes au niveau du derme papillaire. Quelques rares cas de mélanomes malins développés à partir de naevus d'Ota ont été rapportés[28].

Leur siège est évocateur du diagnostic.

Le naevus d'Ota siège au niveau de la région du visage innervée par les branches supérieures du trijumeau (front, pommettes, paupières), touchant aussi les structures oculaires (sclérotiques, conjonctive, cornée, iris, rétine) et les muqueuses aérodigestives supérieures [27].

Le naevus d'Ito, quant à lui, correspond à une atteinte oculaire similaire à celle du naevus d'Ota, est caractérisé par sa topographie acromio-deltoïdienne[29].

4.1.2.3 Le naevus bleu

Il s'agit d'une lésion nodulaire acquise, arrondie, bien limitée, de petite taille, de surface lisse et de couleur bleue, bleu foncé ou presque noire. De prédominance féminine, elle siège le plus souvent sur les extrémités (régions dorsales des mains et des pieds) ou sur le visage. En règle générale, ce naevus est bénin, sauf en cas de localisation fessière où la dégénérescence en mélanome malin est rare mais possible.

4.1.3 Hyperpigmentations génétiques de classement difficile

Ce sont par exemple :

- L'acromélanose, caractérisée par une hyperpigmentation diffuse des doigts survenant chez l'enfant, des sujets de race noire ou mongoloïde.
- L'hyperpigmentation familiale progressive de Chernosky, hypermélanose diffuse en gouttes, en traînées ou en tourbillons pouvant atteindre la totalité du tégument ainsi que les muqueuses.
- L'anémie de Fanconi, se traduisant par une hyperpigmentation diffuse, criblée d'une multitude de tâches achromiques et de rares tâches pigmentées.
- L'acanthosis nigricans bénin ou juvénile, caractérisé par un épaissement du tégument, une hypertrophie épidermique et une hyperpigmentation d'aspect grisâtre, chamois ou brunâtre, pouvant même être noire intense[30].

4.2 Hyperpigmentations secondaires

4.2.1 Les hyperpigmentations d'origine métabolique

Une hyperpigmentation, localisée ou diffuse, peut s'observer dans un grand nombre d'affections métaboliques. Dans ces cas là, elle résulte le plus souvent d'un double mécanisme, d'une part, d'un dépôt d'un métal ou d'un métabolite dans la peau, ou d'une hypermélanose réactionnelle d'autre part.

L'hémochromatose constitue un bon exemple. Lors de cette anomalie affectant le métabolisme du fer, on retrouve dans 90% des cas une hyperpigmentation diffuse. Les raisons pour lesquelles l'augmentation de la teneur en fer accélère la mélanogenèse sont inconnues[29, 31].

4.2.2 Hyperpigmentations d'origine endocrinienne

Une hyperpigmentation localisée ou diffuse, peut être observée dans un grand nombre d'affections endocriniennes, le plus souvent surrénaliennes comme la maladie d'Addison. De plus, au cours de l'hyperthyroïdie, on peut observer une soit une hyperpigmentation diffuse, soit une hyperpigmentation des régions périorbitaires[23].

Le mélasma également appelé chloasma ou masque de grossesse réalise une pigmentation en nappe du visage, survenant chez une femme à peau mate le plus souvent (phototype III et IV). Il s'agit de nappes hyperpigmentées à contours irréguliers siégeant sur le front (mais n'atteignant pas la bordure du cuir chevelu), les joues, parfois les tempes, la lèvre supérieure, le menton et le nez[32].

Une étude récente distingue trois types cliniques en fonction de la localisation des lésions :

- Un type centrofacial, le plus fréquent (63% des cas) : front, joues, nez, menton,
- Un type malaire (21% des cas) : joues, nez,
- Un type maxillaire (16% des cas) : parties supérieure des joues.

Le mélasma s'observe au cours de la deuxième moitié de la grossesse. Classiquement surnommé « masque de grossesse », il s'associe habituellement à une pigmentation de la ligne blanche sous-ombilicale, de l'aréole des seins, des grandes lèvres de la région péri-anale. Cette hyperactivité est due à l'intense production d'œstrogènes et de progestérone pendant la grossesse. Il y a ainsi des dépôts de mélanine dans les couches basales et suprabasales de l'épiderme.

Il s'atténue ou disparaît totalement lors du post-partum, au retour des menstruations. Toutefois, une pigmentation résiduelle est fréquente et peut persister pendant des mois ou des années.

Il peut également survenir en cas de prise d'oestro-progestatifs. Selon les études, sont concernés 5 à 30% des femmes utilisant des contraceptifs oraux. Comme pour le mélasma de la grossesse, on note le rôle favorisant des expositions solaires.

Histologiquement, il s'agit d'une hypermélaninose épidermique, par hyperfonctionnement des mélanocytes dont le nombre reste inchangé [33, 34].

4.2.3 Les hyperpigmentations mélaniques carencielles

Les états de carences alimentaires sélectives ou globales peuvent être responsables de troubles pigmentaires principalement chez les personnes âgées et/ou dénutris. Ces troubles pigmentaires peuvent être l'avitaminose A, la pellagre, le scorbut, ou encore l'anémie de Biermer[26].

4.2.4 Les hyperpigmentations toxiques et médicamenteuses

Elles sont fréquentes et un certain nombre de médicaments administrés (tableau I-3), qu'ils soient utilisés par voie topique ou par voie générale, sont susceptibles d'induire une

pigmentation cutanée de couleur variable. Ce sont des hypermélanoses localisées ou diffuses, d'aspect polymorphe, parfois assez évocatrices, voire spécifiques des médicaments en cause.

Hyperpigmentations d'origine toxi-médicamenteuse	
Antipaludéens de synthèse	
Phénothiazines	
Hydantoïnes (mésantoïne)	
Furantoïnes et dérivés	
Amiodarone	
ACTH	
Oestro-progestatifs	
Tétracyclines :	- Chlorydrate de tétracycline
	- Minocycline
Agents antitumoraux :	- Busulfan
	- Bléomycine
	- Doxorubicine
	- Daunorubicine
	- Melphalan
	- Cyclophosphamide
	- 5- fluoro-uracile
	- Méchloroéthamine
	- BICNU
Acide nicotinique	
Corticostéroïdes	
Dibromomannitol	
Tabac	
Métaux lourds :	- mercure
	- argent
	- bismuth
	- arsenic
	- or
	- plomb

Tableau I-3 : Agents toxiques et médicamenteux responsables d'hyperpigmentations

Les mécanismes mis en jeu et responsables de la pigmentation ne sont pas toujours connus et sont souvent imbriqués.

Il peut s'agir d'une induction ou d'une modulation de la synthèse de la mélanine par le médicament, d'une surcharge ou d'un dépôt dermique du toxique, d'une formation de complexes entre le médicament ou l'un de ses métabolites avec la mélanine, d'une action sur la synthèse d'ACTH ou de MSH, ou d'une pigmentation post-inflammatoire après un épisode de toxidermie [28, 35-37].

4.2.5 Les hyperpigmentations de photosensibilisation

Les taches pigmentées lors de certaines photodermatoses de contact sont le résultat d'une stimulation mélanocytaire mais également de la fuite mélanique dans le derme, consécutive à une réaction phototoxique, médiée par des psoralènes au cours d'une exposition solaire[38, 39]. La dermite des prèrs fait partie de cette catégorie. Il s'agit d'une phytophotodermatose, survenant après contact de la peau avec un végétal contenant des furocoumarines[38-40]. La dermite pigmentaire ou dermite en breloques fait également partie de cette catégorie d'hyperpigmentation. Il s'agit d'une pigmentation en coulées, siégeant au niveau du cou, de la nuque, des bras et derrière les oreilles survenant à la suite de la vaporisation d'un parfum formulé avec des huiles essentielles riches en psoralènes (huile essentielle de bergamote, par exemple)[41].

5. Les actifs dépigmentants

5.1 Introduction

Composés naturels, chimiques ou synthétiques, les agents dépigmentants peuvent agir selon plusieurs types de mécanismes :

- Bloquer les facteurs entraînant la synthèse de la tyrosinase au niveau génétique,
- Inhiber la glycosylation de la tyrosinase nécessaire à son absorption par les mélanosomes,
- Inhiber le transfert de la tyrosinase dans les prémélanosomes,
- Bloquer les précurseurs de la mélanine dans les réactions d'oxydation,
- Inhiber la synthèse de l' α -MSH, hormone responsable de la synthèse de mélanine,
- Réduire ou bloquer l'activité des mélanocytes,
- Stimuler l'activité cellulaire entraînant une exfoliation plus rapide des kératinocytes, Détruire les mélanocytes [42].

Il est généralement admis que les agents dépigmentants connus agissent par une combinaison de plusieurs de ces modes d'action. Il faut noter qu'à l'heure actuelle, le mécanisme d'action de certains dépigmentants n'est pas complètement déterminé. D'autres composés agissent selon un mode d'action différent de ceux présentés ci-dessus. Par exemple, les oxydants comme l'eau oxygénée (H_2O_2) ou l'hypochlorite de sodium ($NaOCl$) provoquent une dépigmentation des cheveux mais pas de l'épiderme, par dégradation des eumélanines, elles-mêmes.

Mêmes si les substances actives sont de plus en plus efficaces, les traitements dépigmentants sont toujours très longs. L'éclaircissement n'est visible qu'après plusieurs semaines, voire plusieurs mois. De plus, les résultats obtenus ne sont jamais définitifs, les taches d'hyperpigmentation réapparaissent à l'arrêt du traitement[42].

Les différentes stratégies pour éliminer les taches sont :

- ✦ Renforcer la prévention : les rayons UVA et UVB contribuent pour beaucoup à la synthèse de mélanine. C'est pourquoi, des écrans solaires, sont intégrés à chaque formulation de produits dépigmentants.
- ✦ Favoriser la desquamation : le processus de desquamation permet d'éliminer la mélanine présente dans les couches supérieures de l'épiderme, les taches s'éclaircissent en faisant disparaître une grande partie de leur pigment. C'est le mode principal d'action des acides.
- ✦ Limiter l'oxydation : l'oxydation joue un rôle très important dans tous phénomènes de vieillissement et de pigmentation. Il convient donc de la réduire au maximum à l'aide de substances antiradicalaires.

Les dépigmentants sont utilisés à titre thérapeutique et esthétique et entrent donc aussi bien dans la composition de préparations pharmaceutiques que cosmétiques. Les aspects thérapeutiques et esthétiques sont d'ailleurs intimement liés dans la majeure partie des cas [43].

5.2 Les actifs d'origine synthétique

5.2.1 Les catéchols

4-isopropylcatéchol (4-IPC)(figure I-9)

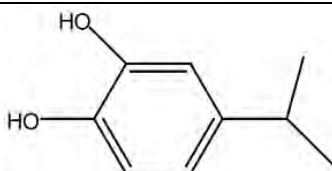


Figure I-9 : structure du 4-isopropylcatéchol (4-IPC)

C'est un produit mélanotoxique. Il agirait par interaction compétitive avec des précurseurs de la mélanine et comme substrat de la tyrosinase [44-48].

Le 4-IPC s'utilise à des concentrations comprises entre 1% et 3% et ce une fois par jour. L'effet thérapeutique se manifeste à partir de la troisième semaine de traitement. Cet actif est efficace sur la totalité des mélasmas et 40% des hyperpigmentations post-inflammatoires [49].

Les effets secondaires relevés sont très importants : sensation de brûlure, desquamation, érythème, eczéma de contact. De plus, certains sujets ont développé une dépigmentation en confetti localisée au niveau du site d'action.

Le 4-IPC de formule brute $C_9H_{12}O_2$ possède une masse molaire de 152,19 g/mol. Il se caractérise par une valeur de Log P (calculée) de 2,2 et est soluble dans l'eau.

5.2.2 L'acide azélaïque

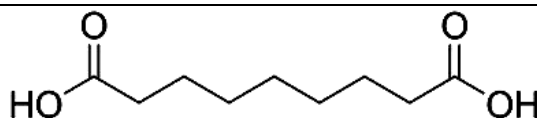


Figure I-10 : structure chimique de l'acide azélaïque

L'acide azélaïque (figure I-10) est un acide gras saturé qui a été mis en évidence dans les lipides de la surface de la peau, au niveau de lésions hypochromes de *pytirisias versicolor*. Il est obtenu par dégradation oxydative de l'acide ricinoléique [42]. Il est antibactérien et diminue la prolifération des kératinocytes, ce qui explique son usage dans le traitement de l'acné, qui est la seule indication officielle.

Principalement utilisé en application topique pour le traitement de différentes maladies de la peau telles que l'acné ou les hyperpigmentations cutanées, l'acide azélaïque inhibe la tyrosinase selon un double mécanisme d'action :

- ⇒ Mécanisme d'action direct inhibition compétitive de l'enzyme
- ⇒ Mécanisme d'action indirect : inhibition de la thioredoxine reductase , enzyme responsable de la réduction et/ou l'oxydation de la thioredoxine provoquant ainsi une augmentation intracellulaire de thioredoxine réduite, substance inhibitrice de la tyrosinase.

L'acide azélaïque agit sélectivement sur les mélanocytes anormaux et hyperactifs de l'épiderme. L'acide azélaïque a montré une efficacité pour le traitement du mélasma, les hyperpigmentations post-inflammatoires ou secondaires à des agents physiques ou chimiques[50].

L'emploi de l'acide azélaïque en cosmétique est autorisé. Cependant son association à l'hydroquinone et aux stéroïdes topiques est interdite dans ce domaine [42].

Cette molécule possède par ailleurs des propriétés bactéricides qui peuvent également présenter un intérêt[51].

L'acide azélaïque est relativement bien toléré. Les effets indésirables les plus fréquents sont un érythème transitoire et une irritation cutanée caractérisée par l'apparition de squames, d'un prurit et d'une légère sensation de brûlure.

D'un point de vue physico-chimique, L'acide azélaïque, de formule brute $C_9H_{16}O_4$ présente la particularité structurale de posséder deux fonctions acide carboxylique. Il se caractérise par une masse molaire de 188,22 g/mol et une valeur de Log P (calculée) de 1,20. L'acide azélaïque est soluble dans l'eau (2,14 g/L à 20°C).

5.2.3 L'acide ascorbique ou vitamine C

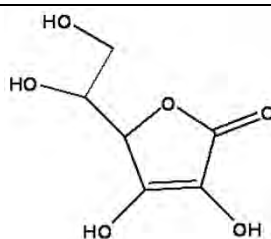


Figure I-11 : structure chimique de l'acide ascorbique

Connue depuis longtemps pour ses effets blanchissants, la vitamine C (figure I-11) du jus de citron ou d'autres plantes (persil, oignon...) est recommandée et utilisée en cosmétologie pour éclaircir le teint ou atténuer certaines hyperpigmentations. Cependant, son emploi est délicat en raison de son instabilité : l'oxydation facile de ce réducteur puissant conduit à une modification des caractères organoleptiques (changement de couleur, production de gaz) de la préparation. De plus, son caractère hydrosoluble rend son absorption cutanée très difficile.

C'est pourquoi, la vitamine C est souvent utilisée sous la forme de dérivés plus stables comme le palmitate d'ascorbyle (liposoluble) et le L-ascorbyl-2-phosphate de magnésium : AMP (hydrosoluble) ou sous forme micro-encapsulée [48, 52-54].

L'acide ascorbique prévient la formation excessive de mélanine en inhibant l'auto-oxydation de la DOPA en dopamine. Ses propriétés réductrices agissent directement sur la mélanine pigmentée (forme oxydée) pour la transformer en mélanine peu pigmentée (forme réduite). L'acide ascorbique de par sa nature chimique (acide), favorise la desquamation cutanée.

Introduit dans des préparations à une concentration d'environ 4% mais pouvant aller jusqu'à 15-20%, la vitamine C et ses dérivés agissent lentement et donnent des résultats encourageants au long terme. Il est donc intéressant de les associer à d'autres substances dépigmentantes. On observe une action positive sur les taches séniles et le mélasma[55] .

En utilisation topique, la vitamine C ne présente pas d'effet secondaire.

L'acide ascorbique de formule brute $C_6H_8O_6$ possède une masse molaire de 176, 12 g/mol. Il possède une valeur de Log P (calculée) de -2,4 et est soluble dans l'eau.

5.2.4 4-n-butylrésorcinol

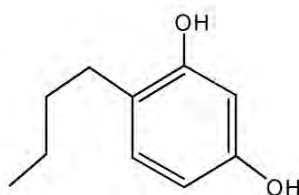


Figure I-12 : structure chimique du 4-n-butylrésorcinol

Le 4-n-butylrésorcinol (Rucinol®) (figure I-12) est une molécule brevetée, utilisée qui se révèle être très efficace en termes d'activité dépigmentante.

Il inhibe puissamment les deux enzymes clé de la mélanogenèse, d'une part, la tyrosinase en réduisant la quantité de mélanine produite et d'autre part, la TRP-1 impliquée dans les étapes de synthèse des eumélanines.

Le 4-n-butylrésorcinol montre une efficacité dépigmentante dans le traitement des hyperpigmentations du mélasma, des lentigos séniles et actiniques, des séquelles pigmentaires ainsi que des phénomènes inflammatoires ou cicatriciels [56].

Les effets secondaires sont de faible intensité : sècheresse cutanée, desquamation et érythèmes.

Concernant ses propriétés physico-chimiques, le 4-n-butyl résorcinol, de formule brute, $C_{10}H_{14}O_2$, se caractérise par une masse molaire de 166, 22 g/mol. Il est soluble dans l'éthanol et possède une valeur de Log P (calculée) de 2,7.

5.2.5 Le R000342

Le R000342 que nous avons également étudié, est un dérivé phénolique qui fait partie de la famille du résorcinol (analogue aromatique). Cette molécule nous a été fournie par la société Pierre Fabre. Elle se caractérise par une masse molaire de 214,27 g/mol et par une valeur de Log P (calculée) de 3,0. C'est une molécule soluble dans l'eau à une concentration inférieure à 3,95 g/mol et dans l'éthanol. Pour des raisons de confidentialité, la structure chimique de cette molécule ne sera pas détaillée.

5.2.6 Trioxopimélate d'éthyle (TPE®)

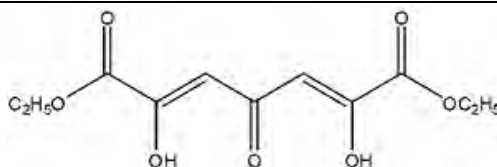


Figure I-13 : structure chimique du trioxopimélate d'éthyle

Le TPE® (figure I-13) bloque la synthèse excessive de la mélanine en inhibant l'action de la tyrosinase par un double mécanisme. En effet, le TPE® est constitué de deux molécules tautomères : une molécule de structure cétone vraie (forme oxydée) et une molécule de structure cétoénolique (forme réduite). Ces deux formes sont responsables de l'action anti-tyrosinasique à deux niveaux :

- Les formes cétoénoliques sont très réactives : elles vont capter les électrons nécessaires aux réactions de réduction catalysées par la tyrosinase, pour se transformer en forme cétone vraie (tricétone ayant un fort pouvoir réducteur). Les oxydations de la tyrosine en DOPA et de la DOPA en DOPA quinone sont ainsi inhibées.

- Le TPE, sous sa forme énolique, est un grand chélateur d'ions métalliques. Il séquestre alors les ions cuivriques, lesquels neutralisés, ne vont plus pouvoir activer la tyrosinase, qui devient inopérante[57].

Après deux mois de traitement, une diminution de la pigmentation est observée due à une réduction de la quantité de mélanine dans les cellules. Afin d'obtenir une plus grande activité, le TPE® est utilisé sous forme de liposomes à différentes concentrations dans les produits cosmétiques[58].

Le TPE® ne provoque pas d'irritation cutanée. Les tests de mutagénicité, d'hypoallergénicité ont été réalisés ; aucun effet négatif n'a été constaté.

5.2.7 L'acide rétinoïque ou trétinoïne

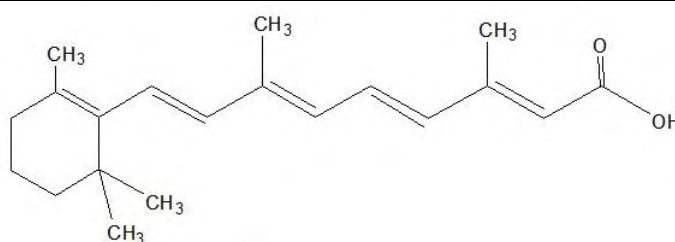


Figure I-14 : structure chimique de l'acide rétinoïque

La trétinoïne (figure I-14) est un métabolite actif de la vitamine A (rétinol).

Son mécanisme d'action est mal connu mais elle agirait en diminuant l'hypertrophie et l'hyperplasie mélanocytaire. Elle pourrait également disperser les granules de pigments mélaniques dans les kératinocytes et augmenter le phénomène de renouvellement cellulaire. L'acide rétinoïque est généralement encapsulé afin d'en augmenter sa pénétration cutanée[59]. C'est un dépigmentant efficace dans les hyperpigmentations liées aux troubles de la vieillesse et aux phénomènes post-inflammatoires. A une concentration de 0,1%, la trétinoïne a une action positive sur les taches séniles, les taches actiniques, le mélasma, les hyperpigmentations post-inflammatoires.

La tolérance est généralement bonne mais certains effets secondaires transitoires peuvent apparaître en début de traitement. On note : des sensations de brûlures, de picotements, de sécheresse cutanée et l'apparition de rougeurs et de desquamations.

D'un point de vue physico-chimique, l'acide rétinoïque de formule brute $C_{20}H_{28}O_2$ se caractérise par une masse molaire de 300,44 g/mol et une valeur de Log P (calculée) de 6,2. L'acide rétinoïque est soluble dans les solvants organiques.

5.2.8 L'hydroquinone et ses dérivés

L'hydroquinone (figure I-15) et ses dérivés sont de substances phénoliques utilisées pour leurs propriétés dépigmentantes depuis des années. Et c'est à partir de 1961 que l'hydroquinone est largement utilisée pour traiter les hyperpigmentations cutanées en dermatologie[60].

✦ L'hydroquinone



Figure I-15 : structure chimique de l'hydroquinone

Contexte réglementaire

L'hydroquinone est utilisée en thérapeutique depuis 1961 dans les hypermélanoses acquises. Son action est moins puissante que celle des autres dérivés phénoliques mais ce fut pendant longtemps l'actif dépigmentant le plus prescrit par les dermatologues. Son efficacité est proportionnelle à sa concentration, qui varie de 2 à 5% voire 10%.

L'hydroquinone agit de diverses manières. D'une part, elle est susceptible de diminuer le contenu épidermique en mélanine : en effet, elle inhibe l'action de la tyrosinase en entrant en compétition avec son substrat endogène, la tyrosine. Elle inhibe la synthèse d'ADN et d'ARN des mélanocytes. D'autre part, elle augmenterait aussi la formation d'espèces oxygénées réactives, à l'intérieur du mélanocyte, ce qui conduirait à des dommages et des dysfonctionnements des lipides. Il est à rappeler que la tyrosinase est une protéine liée à la membrane et qu'une dégradation de la membrane lipidique peut avoir des effets sur la fonction de celle-ci.

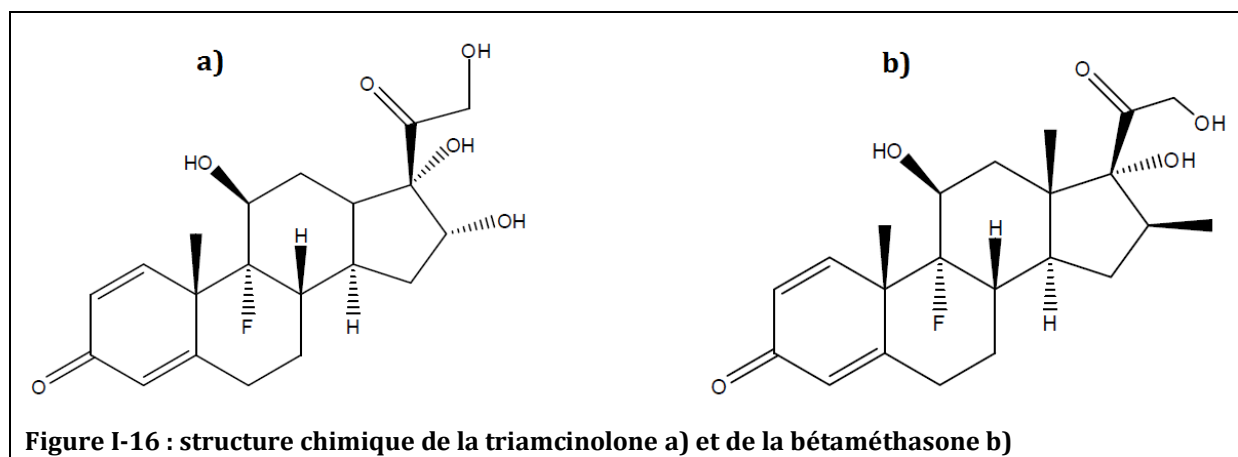
Ce dépigmentant a démontré son efficacité dans le traitement du mélasma, des éphélides et des lentignes séniles. Par contre, cette molécule s'avère peu efficace dans les cas d'hypermélanoses post-inflammatoires ou de taches café au lait [33, 46, 47, 61-63].

Les effets indésirables des produits éclaircissants à base d'hydroquinone sont essentiellement de type cutané et sont dose dépendant. Le phénomène d'**irritation** est pratiquement constant à la concentration de 10% mais diminue d'environ un tiers pour les préparations dosées à 5% et devient pratiquement nulle à 2%. Il est également possible d'observer des **eczémas de contact** et des **réactions allergiques**. Ont également été rapportées, des colorations brunâtres des ongles. La disparition spontanée de cette coloration pendant la période hivernale suggère un rôle implorant de la lumière dans ce phénomène 41, 54, 58, 59].

L'usage de l'hydroquinone est interdit en cosmétique.

D'un point de vue physico-chimique, l'hydroquinone de formule brute $C_6H_6O_2$, se caractérise par une masse molaire de 110,11 g/mol et par une valeur de Log P (calculée) de 0,6. L'hydroquinone est soluble dans l'eau.

5.2.9 Les corticostéroïdes



Les corticostéroïdes (figure I-16), tels que la triamcinolone et la bétaméthasone (Figure x), utilisés seuls ou en association, ont un fort pouvoir dépigmentant.

Ils possèdent une puissante action anti-inflammatoire, une action anti-proliférative, anti-mitotique et anti-synthétique qui s'exercent sur tous les constituants cellulaires de la peau et par conséquent sur les mélanocytes. Le résultat est une dépigmentation à long terme.

Le traitement sous corticostéroïdes doit obligatoirement se faire sous surveillance médicale en raison d'un grand nombre d'effets secondaires locaux et généralisés. Ils sont proportionnels à la puissance du corticostéroïde et de la durée d'utilisation. Ces effets secondaires ne disparaissent que très progressivement et sont parfois irréversibles. On note, entre autre :

Les effets locaux :

- Une atrophie cutanée,
- Des ecchymoses,
- Des vergetures,
- Un ralentissement de la cicatrisation,

Les effets systémiques :

Ils sont dus au passage transcutané des corticoïdes. Ils sont la conséquence d'une utilisation prolongée de ces produits sur une large surface du corps. On note :

- Un syndrome de Cushing,
- Un retard de la croissance,
- Une hyperglycémie.

Les corticostéroïdes sont interdits en cosmétique [49].

Les caractéristiques physico-chimiques de la triamcinolone et de la bétaméthasone sont résumées dans le tableau suivant :

Nom chimique	Formule brute	Masse molaire (g/mol)	Log P (calculée)	Solubilité
Triamcinolone	C ₂₁ H ₂₇ FO ₆	394.43	0,5	Chloroforme
Bétaméthasone	C ₂₂ H ₂₉ FO ₅	392.46	2,0	Méthanol

Tableau I-4 : caractéristiques physico-chimiques de la triamcinolone et de la bétaméthasone

5.3 Actif d'origine fermentaire

L'acide kojique

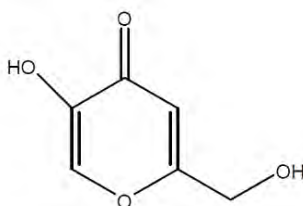


Figure I-17 : structure chimique de l'acide kojique

L'acide kojique, (figure I-17) obtenu par fermentation du glucose à l'aide de la souche *Aspergillus oryzae* sur milieu de culture, se présente sous la forme d'une poudre blanche hydrosoluble.

Il possède une action dépigmentante car il inhibe la tyrosinase en chélatant les ions cuivriques, cofacteurs essentiel de l'enzyme.

Utilisé dans une crème à la concentration de 2 ou 3%, l'acide kojique permet d'obtenir une atténuation de la pigmentation après 4 semaines d'application biquotidienne du produit. Il est efficace dans le traitement des taches de sénescence[57].

Récemment, l'innocuité de l'acide kojique a été réévaluée par le comité scientifique européen sur les produits de consommation (SCCP), à la demande de la commission européenne. Après une inspection détaillée du profil toxicologique, incluant la mutagénicité, la génotoxicité, la cancérogénicité et la toxicité pour la reproduction, la substance a finalement été identifiée comme sensibilisateur mais pas photosensibilisateur. Par ailleurs, la pénétration transcutanée du produit est assez élevée et une exposition répétée chez le rat a abouti à des niveaux d'acide kojique dans le sang supérieurs à ceux résultant d'une seule administration. Selon le SCCP « Chez L'humain, l'exposition répétée de produits blanchissants peut aboutir à une exposition systémique supérieure à celle résultant d'une administration en une dose unique. » Sur la base des informations à sa disposition, le comité scientifique a calculé des marges de sécurité qui

selon lui laissent penser que l'utilisation de l'acide kojique a une concentration maximale de 1% dans les soins de la peau pose un risque pour la santé des consommateurs[42].

L'acide kojique, de formule brute $C_6H_6O_4$ possède une masse molaire de 142,11 g/mol. Il se caractérise par une valeur de Log P (calculée) de -0,6, il est insoluble dans l'éthanol et soluble dans l'eau.

5.4 Les actifs d'origine végétale

5.4.1 Dérivés de l'hydroquinone

- L'arbutine

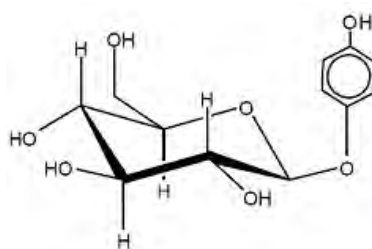


Figure I-18 : structure chimique de l'arbutine

L'arbutine ou arbutoside (figure I-18) était initialement extraite de *Berberia crassifolia*, Saxifragacées. L'arbutine est essentiellement présente dans les plantes de la famille des Ericacées. Ainsi, on la retrouve dans la feuille de la busserole ou raisin d'ours, l'arbousier, l'airelle ou myrtille, la bruyère, la callune et la canneberge.

L'arbutine est un glucoside d'hydroquinone, stable et moins agressif que celle-ci et qui ne provoque pas de sensibilisation, ni d'irritation. Cet actif présente l'avantage de pouvoir être utilisé sur de longues périodes, à de fortes concentrations et ce sans effet secondaire.

L'arbutine, par hydrolyse naturelle sous l'action d'une β -glucosidase, se décompose rapidement en hydroquinone et glucose. L'arbutine inhibe la synthèse de mélanine en bloquant la tyrosinase : l'inhibition de l'activité enzymatique est une inhibition compétitive. Son action est ciblée, puisqu'elle agit seulement sur les mélanocytes qui effectuent une synthèse excessive de mélanine et elle est aussi beaucoup moins agressive que l'hydroquinone[48, 53].

L'arbutine ne provoque pas d'effets indésirables.

L'arbutine, de formule brute $C_{12}H_{16}O_7$, se caractérise par une masse molaire de 272,25 g/mol. Cet ingrédient actif possède une valeur de log P (calculée) de -1,3 et est soluble dans l'eau.

5.4.2 Plantes à flavonoïdes

Certaines plantes possèdent des propriétés dépigmentantes grâce aux flavonoïdes qu'elles contiennent.

En voici quelques exemples :

- ✓ L'artichaut (*Cynara scolymus* L.), l'achillée millefeuille (*Achillea millefolium* L.), la matricaire (*Matricaria recutita* L.) de la famille des Astéracées.

Ces plantes contiennent de la lutéoline (ou lutéolol) (Figure I-19)

La lutéoline

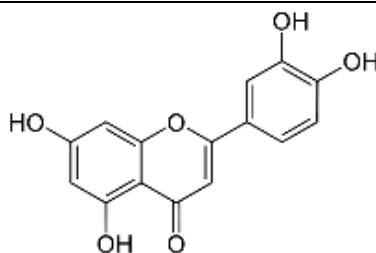


Figure I-19 : structure chimique de la lutéoline

La lutéoline agit en provoquant la perte de relation spatiale entre mélanocytes et les kératinocytes et en affaiblissant la cohésion entre ces différentes cellules. A ce terme, ce phénomène réduit le transfert des mélanosomes vers les kératinocytes. De plus, la présence d'une fonction catéchol dans la molécule de lutéoline pourrait faire de ce flavonoïde un substrat de la tyrosinase, aboutissant à la formation de métabolites mélanotoxiques [47, 48, 64].

Aucune réaction de photosensibilisation n'a été rapportée et la tolérance du produit est excellente.

La lutéoline de formule brute $C_{15}H_{10}O_6$ possède une masse molaire de 286,24 g/mol. Cette molécule se caractérise par une valeur de Log P (calculée) de 2,7 et est soluble dans l'eau à la concentration de 388 mg/l, à 25°C.

5.4.3 Les alphahydroxyacides (AHA)

Les AHA sont des acides organiques extrêmement répandus dans le règne végétal et particulièrement dans les fruits d'où leur nom d'acides de fruits. Les principaux AHA sont :

- L'acide glycolique (cane à sucre ou synthèse à partir d'acide oxalique),
- L'acide lactique (lait fermenté, miel),
- L'acide malique (pomme coing, sorbier),
- L'acide citrique (agrumes : orange, citron, pamplemousse... ou fermentation de mélasse par *Aspergillus niger*),
- L'acide gluconique (fermentation oxydative du glucose par *Aspergillus niger*, *A. fumigatus*),
- L'acide tartrique (raisin),
- L'acide mandélique (amande amère).

Les AHA entreraient en compétition avec certaines enzymes : les sulfotransférases, impliquées dans la formation de liaisons ioniques au niveau des cornéocytes. Le rôle de ces enzymes est de fixer des groupements sulfates et phosphates électronégatifs à la surface des cellules cornées. Les AHA, en se substituant aux enzymes, empêcherait la fixation de ces groupes, d'où une diminution de leur densité, conduisant à une chute de leur électronégativité. Ceci affaiblit les forces de cohésion intercornéocytaires, provoquant ainsi une augmentation du processus de desquamation. Le renouvellement cellulaire par conséquent, est accéléré et l'épaisseur de la couche cornée est réduite. Cette action exfoliante de surface des AHA va permettre l'élimination rapide des mélanines accumulées dans les couches superficielles de l'épiderme.

Efficacité et indications

L'activité des AHA dépend de leur dosage. Les préparations commerciales à usage cosmétique contiennent le plus souvent de l'acide glycolique ou de l'acide lactique à des concentrations maximales de 15%.

Suivant la dose, les effets des AHA évoluent :

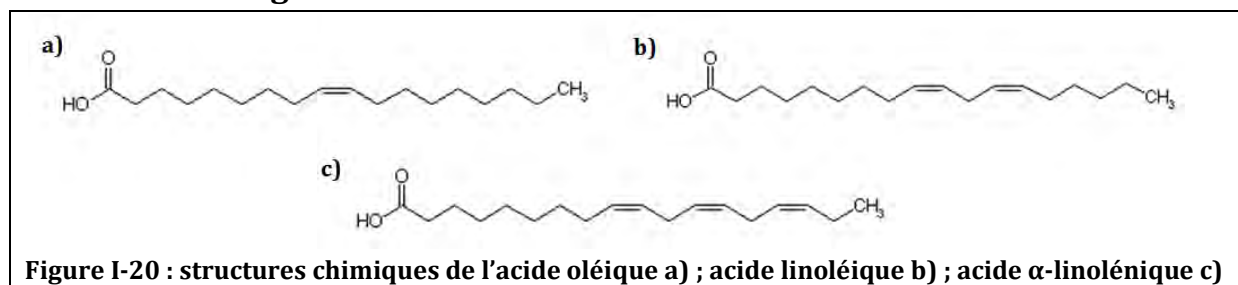
- A faibles concentrations < 2% : effet hydratant ;
- A concentrations moyennes de 2% à 5% : effet exfoliant doux ;
- A concentrations fortes > 5% : effet kératolytique et dépigmentant.

Entre 20% et 25%, les AHA exercent des effets sur l'épiderme et probablement sur le derme. A très fortes concentrations > 40%, ils peuvent entraîner une épidermolyse totale et doivent donc être utilisés sous contrôle médical strict. C'est le cas des peeling à base d'acide glycolique comme le LIGHTENING PEEL® (Mène & Moy system) qui contient 50% d'acide glycolique et 10% d'acide kojique ;il doit être réalisé par un spécialiste [65].

Effets indésirables

De légers picotements, des sensations de cuisson et l'apparition d'érythème peuvent se produire au moment de l'application et en début de traitement. Ceci témoigne de l'efficacité des AHA et n'est pas forcément signe d'une intolérance. En plus de la concentration, ces réactions sont fonction de la sensibilité individuelle.

5.5 Les acides gras insaturés



Il existe quelques études, notamment menées par Ando et al [66] démontrant l'effet des acides gras insaturés (figure I-20) sur différentes étapes de la mélanogenèse. Une première étude porte sur l'effet des acides insaturés sur l'hyperpigmentation induite par les rayonnements ultraviolets de type B. Cette étude met en évidence l'effet éclaircissant de l'acide linoléique et de l'acide α -linoléique après application topique sur peaux de porcs de Guinée préalablement exposés à des rayons UVB. Dans cette étude, il a été démontré que le nombre de mélanocytes présents au niveau des peaux traitées sont similaires à ceux contenus dans la peau contrôle, indiquant que l'effet dépigmentant observé n'est pas dû à une diminution du nombre de mélanocytes mais à une diminution de la synthèse de mélanine.

Par ailleurs, des expériences *in vitro* sur des cultures de mélanocytes de murins montrent que l'inhibition de la production de mélanine est plus efficace avec par ordre d'efficacité, l'acide α -linoléique suivi par l'acide linoléique et enfin de l'acide oléique. De plus, l'étude démontre également que le renouvellement cellulaire au niveau du *Stratum corneum* qui joue un rôle important dans l'élimination de la mélanine au niveau de l'épiderme est accéléré par l'acide linoléique et l'acide α -linoléique. Pris dans leur ensemble, les résultats suggèrent que l'effet éclaircissant de l'acide linoléique et l'acide α -linoléique est dû d'une part à l'inhibition de la production de mélanines par les mélanocytes et d'autre part, à une accélération du renouvellement cellulaire au niveau de l'épiderme conduisant à une élimination plus rapide de la mélanine à ce niveau[66] .

Une seconde étude, également menée par Ando et al publiée en 2004 s'est intéressée à l'effet des acides gras insaturés sur l'activité de la tyrosinase et en particulier à leur effet sur la voie de l'ubiquitine-protéasome. La voie de l'ubiquitine-protéasome est la voie de dégradation des protéines de toutes les cellules de l'organisme humain. Il s'agit d'un mécanisme très spécifique, étroitement régulé et contrôlé dans le temps, jouant un rôle primordial dans tous les aspects les plus fondamentaux de la vie cellulaire. Cette étude a permis de mettre en évidence une diminution de la synthèse de mélanine par dégradation de la tyrosinase via la voie de l'ubiquitine protéasome, par les acides oléique, linoléique, α -linoléique alors les acides stéarique et palmitique exerceraient un effet inverse. Les acides oléique, linoléique et α -linoléique agiraient comme facteurs intrinsèques modulant la dégradation par le système du protéasome, des glycoprotéines membranaires comme la tyrosinase et vraisemblablement d'autres protéines membranaires. Les mécanismes intervenant dans la régulation de la mélanogenèse par les acides gras insaturés sont donc multiples. Enfin, ces études mettent également en évidence que l'inhibition de la production de mélanine par les acides gras est plus efficace par ordre d'efficacité suivant : acide α -linoléique > acide linoléique > acide oléique [67].

Les caractéristiques physico-chimiques de l'acide oléique et linoléique sont résumées dans le tableau suivant :

Acide gras	Formule brute	Masse molaire	Log P (calculé)	Solubilité
Acide linoléique	$C_{18}H_{32}O_2$	280,44	7,0	Solvants organiques
Acide oléique	$C_{18}H_{34}O_2$	282,26	7,4	Solvants organiques
Acide α -linoléique	$C_{18}H_{30}O_2$	278,42	6,5	Solvants organiques

Tableau I-5 : caractéristiques physico-chimiques des acides oléique, linoléique et α -linoléique

6. Conclusion

Les hyperpigmentations cutanées sont nombreuses et d'origine variée, entraînant une gêne esthétique plus ou moins importante et étant parfois mal supportée par les patientes. Les cas les plus fréquents correspondent aux désirs de voir disparaître les taches séniles et solaires, le masque de grossesse, le mélasma apparu sous contraception et les dermites en breloques, conséquences de l'application de parfum concomitante à une exposition solaire.

Afin de remédier aux préjudices esthétiques causés par les hyperpigmentations, de nombreuses molécules au pouvoir dépigmentant, d'origine naturelle ou synthétique ont été isolées. Ces molécules agissent à différents niveaux de la mélanogénèse, détruisant les mélanocytes, en diminuant ou altérant leur pouvoir de synthèse de la mélanine ou encore en bloquant la tyrosinase.

Cependant, l'effet souhaité est assez long à obtenir. En général, plusieurs semaines sont nécessaires pour obtenir un résultat satisfaisant car ces dépigmentants sont généralement d'une efficacité moyenne et réversible à l'arrêt du traitement. Elles provoquent par ailleurs de nombreux effets indésirables. Face aux difficultés de manipulations et aux risques que représentent les actifs d'origine chimique, ceux-ci sont progressivement délaissés au profit des substances dépigmentantes d'origine végétale. C'est pourquoi, le recours à des systèmes d'encapsulation pour ces molécules, permettrait d'une part, d'envisager une meilleure efficacité en limitant les phénomènes de dégradation ou en aidant au franchissement de la barrière cutanée et d'autre part de réduire les concentrations en actif limitant de ce fait la survenue d'effets indésirables.

CHAPITRE II :

MISE AU POINT BIBLIOGRAPHIQUE SUR LA VECTORISATION DE MOLECULES ACTIVES

Chapitre II

Mise au point bibliographique sur la vectorisation de molécules actives

1. Introduction

La peau agit comme une barrière physiologique dont les principales fonctions sont de limiter la perte en eau (perte insensible en eau : PIE), en électrolytes et autres constituants de l'organisme par diffusion passive, dans le but de conserver une homéostasie indispensable à la survie de l'organisme. Elle joue également un rôle de protection en empêchant la pénétration dans l'organisme de substances nuisibles ou indésirables provenant de l'environnement extérieur ou encore en constituant un système de défense vis-à-vis des agressions mécaniques. Cette membrane ne permet donc à aucune molécule de passer facilement. De ce fait, les capacités de pénétration d'une molécule à travers le *stratum corneum* seront fonction d'un certain nombre de facteurs comme les propriétés physico-chimiques de la substance active (poids moléculaire, coefficient de partage eau/huile, ionisation, concentration), la formulation du composé actif, (solubilité, vecteur, polarité, promoteurs d'absorption), l'application du composé (surface de peau exposée, durée de contact, occlusion) et de l'état de la peau sur laquelle cette formulation sera appliquée, (âge, sexe, site anatomique, température, hydratation de la couche cornée). De ce fait, l'efficacité d'une substance active repose sur certains facteurs à prendre en considération lors de la formulation de celle-ci. Pour être réellement efficace, une substance active doit être délivrée au niveau du bon site d'action et cela à une concentration efficace pendant une durée suffisante. Ces objectifs constituent les réels enjeux d'un mode de formulation visant à modifier la perméabilité cutanée.

Dans le but de parer aux barrières physico-chimiques et anatomiques de la peau et d'optimiser l'efficacité d'une substance active, plusieurs stratégies de formulation visant à modifier la perméabilité cutanée et à potentialiser l'activité d'un composé actif sont envisageables.

Nous nous attacherons dans ce chapitre à décrire deux stratégies employées pour favoriser la pénétration cutanée et accroître l'efficacité des molécules actives ; l'ajout de molécules promotrices de pénétration cutanée, d'une part et l'utilisation de systèmes d'encapsulation, d'autre part.

2. Les facteurs influençant la pénétration percutanée

Plusieurs facteurs influencent l'absorption des substances dans la peau humaine (tableau II-1). Il s'agit de facteurs physiologiques relatifs à la cible et de facteurs galéniques avec notamment les caractéristiques physico-chimiques de formulation[68]. Seules les caractéristiques physico-chimiques relatives au principe actif sont abordées dans cette partie (tableau II-1).

Eléments	Paramètres
Propriétés physico-chimiques du perméat	Poids moléculaire Coefficient de partage eau/huile Ionisation Concentration Distribution dans la couche cornée
Formulation	Solubilité -Polarité Volatilité Excipients Vecteurs Promoteurs d'absorption pH
Application	Surface de peau exposée Dose par unité de surface Durée de contact Occlusion Applications multiples
Peau	Age, race, sexe Site anatomique Température Hydratation de la couche cornée Métabolisme Vitesse de desquamation

Tableau II-1 : principaux facteurs influençant l'absorption percutanée[69].

Tout d'abord, un principe actif administré par voie transdermique doit être capable de diffuser dans le *Stratum corneum* lipophile, puis dans l'épiderme vivant dont la teneur en eau est supérieure pour atteindre sa cible. Idéalement, il est à la fois hydrophile et lipophile. Il a été montré que les composés capables de franchir la barrière cutanée ont un Log P compris entre 1 et 3[70, 71].

De plus, la diffusion dans le SC, ne suit pas la loi de Stokes qui régit la diffusion de particules sphériques dans un milieu continu car le SC est assimilable à une matrice lipidique dont la viscosité est celle d'un gel. Les molécules se déplacent entre les « trous » de la matrice. Par conséquent, la diffusivité des principes actifs dans le SC décroît exponentiellement avec leur volume moléculaire, selon : $D_m = D_0 \times e^{-\beta \cdot MV}$ avec D_m , la diffusion moléculaire du principe actif, assimilé à une sphère, D_0 le coefficient de diffusion d'une molécule de poids moléculaire nul, β une constante caractéristique de la membrane et MV le volume moléculaire du principe actif. La diffusion des principes actifs dans le SC est donc limitée de façon très importante par leur taille. Ainsi, seules les molécules de masse moléculaire inférieure à 500 Da sont susceptibles de franchir la barrière cutanée[70] [71].

Enfin, l'état d'ionisation de la molécule influe également sur sa perméation cutanée à travers le SC. La perméation cutanée d'une espèce ionique est considérée, souvent à raison comme peu probable du fait de la très faible solubilité des ions dans le milieu extracellulaire très lipophile. Cependant, tous les paramètres doivent être considérés. Les ions peuvent emprunter la voie transfolliculaire mais le passage transcutané sera toujours inférieur à celui de la forme non ionisée. Le flux de passage à travers la peau dépend du coefficient de perméation cutanée mais aussi de la solubilité du principe actif dans le véhicule. Ainsi, l'espèce non ionisée peut avoir un coefficient de perméation important mais une faible solubilité dans le véhicule alors que la forme ionisée permettra d'appliquer une plus grande différence de concentration entre le véhicule et le SC, ce qui peut aboutir à des flux équivalents dans les deux situations [8, 72, 73]. Le tableau suivant résume les caractéristiques optimales d'un principe actif pour le franchissement de la barrière cutanée :

Propriétés	Valeur
Solubilité dans l'eau	> 1mg/ml
Le caractère lipophile	$1 < \text{Log } P < 3$
Masse moléculaire	< 500 Da
Point de fusion	< 200°C
pH de la solution aqueuse saturée	5-9

Tableau II-2 : Caractéristiques favorables du perméat au passage cutané

3. Modification de la perméabilité cutanée

3.1 Hydratation du *Stratum corneum*

Une peau saine est un tissu partiellement hydraté qui maintient une teneur constante en eau approximative de 5 à 15 %, indifféremment des variations d'humidité de l'environnement.

La couche superficielle de l'épiderme, le *Stratum corneum*, joue un double rôle en réduisant la perte insensible en eau (PIE) et en empêchant la pénétration de substances indésirables et toxiques de par son importante imperméabilité. L'état d'hydratation de la peau possède une influence sur la perméabilité du *Stratum corneum* et de ce fait, celle-ci peut être simplement modifiée en augmentant la teneur en eau du *Stratum corneum*. L'eau, employée afin d'augmenter la perméabilité cutanée, ne provoque aucune irritation et n'est aucunement toxique vis-à-vis de la peau. L'hydratation de la peau peut être obtenue simplement en lui appliquant un solvant occlusif ou en incorporant des agents d'hydratation spécifiques dans un solvant approprié [74].

3.1.1 Hydratation du *Stratum corneum* par occlusion

La teneur normale en eau du *Stratum corneum* est fonction d'une balance entre la rétention et la perte en eau des tissus. Une diffusion passive de l'eau de l'intérieur de l'organisme vers le *Stratum corneum* puis vers l'environnement extérieur se produit du fait du gradient de

concentration en eau dans le *Stratum corneum*. Tout autre facteur externe qui retient l'eau dans les tissus ou qui retarde l'évaporation de l'eau à la surface de la peau, aboutit à une hyperhydratation du *Stratum corneum*. Ce phénomène d'hyperhydratation est associé à une hypertrophie des cornéocytes et à une augmentation de la teneur en eau de la bicouche lipidique inter-cornéocytaire. Ces deux phénomènes associés facilitent la pénétration de substances actives à travers les tissus et de façon totalement réversible. Par ailleurs, le principe d'occlusion de la peau, retient de façon mécanique les diverses substances actives administrées et de ce fait en favorise leur pénétration à travers la peau. Les formes les plus adéquates pour obtenir un effet occlusif sont celles qui renferment le plus de composés lipophiles ; les émulsions, pommades et gels représentent les formes les plus classiquement employées pour obtenir un effet occlusif efficace [74].

3.1.2 Hydratation du *Stratum corneum* par des agents chimiques

Au niveau du *Stratum corneum*, les substances responsables d'un maintien d'un niveau correct d'hydratation sont représentées par l'ensemble des substances constituant le NMF ou natural moisturizing factor. Le NMF représente environ 10% du poids sec de *stratum corneum* et est principalement composé d'acides aminés (40%), d'acide pyrrolidone carboxylique (12%), d'acide lactique (12%), d'urée (8%), de sels (18%) et d'autres substances (10%), encore non identifiées. Les composants du NMF se retrouvent principalement au sein des cornéocytes et sont formés au cours du processus de différenciation de l'épiderme. Le processus de kératinisation joue un rôle important dans la formation des composants du NMF, en inhibant la pression osmotique élevée et en attirant les molécules d'eau au niveau de l'environnement cellulaire. La liaison de l'eau aux composants du NMF (contenus dans les cornéocytes) constitue un aspect statique de l'hydratation cutanée. L'aspect dynamique des composants du NMF est représenté par l'effet qu'exercent ces composés sur les propriétés de barrières des bicouches lipidiques intercellulaires. Les composés du NMF seraient délivrés au niveau des domaines intercellulaires, leur propriété hygroscopique leur permettant d'accroître l'hydratation de ces bicouches, perturbant donc leur organisation et augmentant la perméabilité du *Stratum corneum*.

Certaines tentatives de formulations cosmétiques ont été entreprises en se basant sur ce phénomène d'hydratation par les composants du NMF, en mettant au point des formules contenant des substances hydrophiles capables d'attirer et de retenir l'eau.

Certains des composants du NMF ont également été étudiés en tant que promoteur de pénétration cutanée. L'urée se révèle être un bon agent facilitant l'hydratation du *Stratum corneum* en formant un canal de diffusion hydrophile à travers la barrière lipidique et en agissant comme un agent kératolytique pouvant affecter l'adhésion des cornéocytes au *Stratum corneum*.

En conclusion, le phénomène d'hydratation naturelle de la peau peut être exploité pour faciliter la pénétration cutanée de substances actives. La technique de l'occlusion demeure la plus pratique pour obtenir une réduction de l'effet barrière. Par ailleurs, une simple augmentation de la teneur en eau du *Stratum corneum*, n'est pas suffisante pour améliorer la pénétration cutanée de substances actives pour lesquelles une concentration minimale est requise pour être efficaces [74].

4. Promoteurs chimiques de pénétration cutanée

4.1 Introduction

Les promoteurs d'absorption ou « enhancer », sont des excipients qui sont ajoutés en faible proportion dans une formulation afin d'augmenter le taux d'absorption du principe actif. Différents types de molécules sont utilisés dans cet objectif et leurs mécanismes d'action sont variés. Leur action peut s'exercer sur la concentration en principe actif, effectivement disponible dans la formulation, pour le passage transcutané, le coefficient de partition entre la formulation et le SC ou le coefficient de diffusion du principe actif dans le SC. Ils agissent souvent sur les bicouches lipidiques intercellulaires. Les promoteurs d'absorption n'ont pas la même efficacité avec tous les principes actifs. Idéalement, un promoteur d'absorption est un composé non toxique, non irritant, non allergène et sans effet pharmacologique. Ils doivent agir rapidement, de façon reproductible en entraînant que des modifications réversibles de la barrière cutanée. Ils doivent également être compatibles avec les autres constituants de la formulation. Il est difficile de sélectionner rationnellement un promoteur d'absorption en fonction d'un principe actif donné. Les promoteurs agissant sur un grand nombre de principes actifs sont donc préférés[75].

4.2 Le diméthylsulfoxyde et ses dérivés

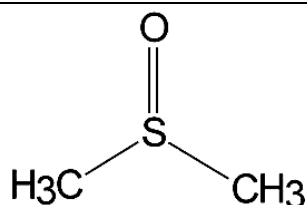


Figure II-1 : structure chimique du diméthylsulfoxyde

Le diméthylsulfoxyde (DMSO) (figure II-1) est un puissant solvant aprotique hygroscopique, très connu de part sa qualité de solvant universel.

Des études ont été menées sur les capacités promotrices de pénétration du DMSO montrant qu'il exerce une action promotrice à la fois pour des substances lipophiles et d'autres hydrophiles. Le mécanisme d'action du DMSO est complexe, il implique entre autre une dénaturation des protéines, des interactions avec les lipides intercellulaires et une désorganisation des bicouches lipidiques[76]. Le DMSO agit de façon rapide, mais ses effets sont concentration dépendant et il doit généralement être employé à plus de 60% pour exercer un effet promoteur acceptable. A de telles concentrations, le DMSO peut provoquer une toxicité cutanée et systémique.

4.3 L'azone

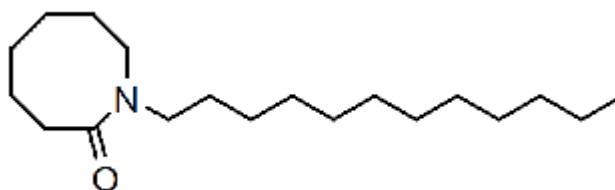


Figure II-2 : structure chimique de l'azone

L'azone ou 1-dodécylazacycloheptan-2-one (figure II-2), est le promoteur de pénétration cutanée le plus connu. C'est un liquide sans odeur, sans couleur possédant un toucher doux, huileux mais non gras, lipophile, soluble dans l'éthanol et compatible avec la plupart des solvants organiques y compris les alcools et le propylène glycol qui ne présente pas de caractère irritant ou toxique.

L'azone améliore la pénétration cutanée de nombreux actifs médicamenteux comme les stéroïdes, les antibiotiques et les agents antiviraux. Il permet de véhiculer des composés lipophiles et hydrophiles. Son efficacité est dépendante de la concentration utilisée et du choix du solvant dans lequel il est dissous. Bien que ce promoteur de pénétration cutanée soit connu depuis de nombreuses années, son mécanisme d'action n'est pas encore totalement élucidé, il interagirait avec les domaines lipidiques du *Stratum corneum*. Du fait de sa structure amphiphile, une tête polaire hydrophile liée à une chaîne alkyle hydrophobe, il pourrait s'insérer entre les bicouches des lipides membranaires perturbant ainsi leur organisation et facilitant donc la pénétration de composés actifs à travers le *Stratum corneum* [76].

4.4 Les acides et les alcools gras

4.4.1 Les acides gras

Les acides gras ont été largement étudiés en tant que molécules promotrices de pénétration cutanée pour le développement de formules à application topique ou transdermique contenant différents types de substances actives. D'un point de vue structural, les acides gras sont constitués d'une chaîne carbonée aliphatique et d'un groupement carboxyl terminal. Ils diffèrent de part leur longueur de chaîne, le nombre et la position de leur(s) double(s) liaison(s) et leur éventuelle ramification. Leur mécanisme d'action consiste à se rassembler en phases distinctes et en formant des passages au sein des bicouches lipidiques. Ils sont efficaces sur des nombreux principes actifs et à faible concentration. Il est par ailleurs possible de moduler l'action promotrice par des changements sur la chaîne carbonée. Les acides gras en C12 et C14 présentent un équilibre optimal entre le coefficient de partage et l'affinité pour la peau, l'acide oléique (C18) est l'acide gras le plus étudié en tant que promoteur de pénétration cutanée.

Le tableau II-3 décrit l'ensemble des acides gras, saturés et insaturés utilisés en tant que promoteur de pénétration cutanée :

Noms chimiques	Noms communs	Poids moléculaires (g/mol)
Acides gras saturés à chaînes carbonées linéaires		
Pentanoïque	Valérique	102.1
Hexanoïque	Caproïque	116.1
Octanoïque	Caprylique	144.2
Nonanoïque	Pélargonique	158.2
Décanoïque	Caprique	172.3
Dodécanoïque	Laurique	200.3
Tétradécanoïque	Myristique	228.4
Hexadécanoïque	Palmitique	256.4
Octadénoïque	Stéarique	284.4
Eicosanoïque	Arachidique	412.5
Docosanoïque	Béhénique	340.5
Tetracosanoïque	Lignocérique	368.6
Acides gras saturés à chaînes carbonées ramifiées		
Pentane-2-oïque	Isovalérique	102.1
2,2 diméthylpentanoïque	Néoheptanoïque	130.2
2,2 diméthylheptanoïque	Néononanoïque	158.2
2,2 diméthyl octanoïque	Néodécanoïque	172.3
2-heptylundécanoïque	Isostéarique	284.4
Acide gras insaturés		
Acide cis-9-tétradécanoïque	Myristoléique	226.4
Acide cis-9-hexadécanoïque	Palmitoléique	254.4
Acide tout cis-9, 12,15-octadécadiénoïque	α -linoléique	278.4
Acide tout cis-6, 9 et 12-octadécatriénoïque	γ -linoléique	278.4
Acide cis-9, 12-octadécadiénoïque	Acide linoléique	280.4
Acide cis-11-octadécanoïque	Acide asclepique	282.4
Acide cis-6-octadécanoïque	Acide pétrosélénique	282.4
Acide trans-9-octadécanoïque	Acide élaïdique	282.4
Acide cis-9-octadécanoïque	Acide oléique	282.4
Acide tout cis-5,8,11 et 14-eicosatétranoïque	Acide arachidonique	304.5
Acide cis-11-eicosanoïque	Acide gondoïque	310.5
Acide cis-13-docosénoïque	Acide érucique	338.6

Tableau II-3 : Acides gras référencés comme promoteurs de pénétration cutanée, adapté de [77]

Les acides gras constituent des promoteurs de pénétration cutanée pour des composés lipophiles ou hydrophiles. Dans la plupart des cas, le solvant possède une forte influence sur l'efficacité des acides gras ; les solvants comme le propylène glycol ou l'éthanol lorsqu'ils sont associés aux acides gras provoquent une synergie du phénomène de pénétration cutanée.

Le tableau II-4 présente les études dans lesquelles les acides gras ont été utilisés en tant que promoteur de pénétration cutanée pour des substances actives présentant diverses propriétés physico-chimiques :

Médicament	Acide gras	Véhicule	Type de peau	Facteur de multiplicatif de la pénétration cutanée
Chlorphénéramine base Nicotine base	Acide undécylénique (11%)	Myristate d'isopropyle	Humaine	1,4
	Acide isostéarique (24%)	Myristate d'isopropyle		1,6
Interféron 2β	Acide palmitique	Gel méthylcellulose (0,1%)	Humaine	1,84
Oxymorphone	Acide linoléique (5%)	Propylène glycol Gel carbopol (0,3%) Avec Tween20® (2%)	Souris sans poils	13,33
	Acide linoléique (10%)			17,17
	Acide linoléique (20%)			22,22
	Acide linoléique (5%)			27,56
	Acide linoléique (10%)			34,09
	Acide linoléique (20%)			32,24
Acétate de noréthindrone	Acide oléique (6%) et acide linoléique (12%)	Ethylcellulose	Porc	1,5
Molsidomine	Acide laurique 10%	Propylène Glycol	Cadavre humain	15,0

Tableau II-4 : Brevets dans lesquels les acides et les alcools gras sont employés comme promoteur de pénétration cutanée, adapté de [77]

- **Effet de la longueur de la chaîne carbonée de l'acide gras**

Hsu et al [77], ont étudié l'influence de la longueur de la chaîne de l'acide gras sur l'efficacité de la promotion de la pénétration cutanée du piroxicam. Ils ont testé différents acides gras possédant une longueur de chaîne allant de C12 à C18. L'efficacité de promotion cutanée diminue avec l'augmentation de la longueur de la chaîne. Il a été proposé que les acides gras ayant une longueur de chaîne moyenne de 12 carbones possèdent une balance coefficient de partage, paramètres de solubilité et affinité pour la peau optimale. Les acides gras possédant de plus petites longueurs de chaîne, ne possèdent pas un caractère lipophile suffisant pour pénétrer à travers la peau alors que ceux présentant de plus longues chaînes ont quant à eux une telle affinité vis-à-vis de la peau qu'ils retardent leur propre pénétration cutanée ainsi que celle des substances actives qu'ils véhiculent[77].

- **Effet de l'insaturation**

Il a été établi que les acides gras insaturés constituaient de meilleurs promoteurs de pénétration cutanée que les acides gras saturés. Parmi les acides gras saturés (acides caprique, laurique et myristique), seul l'acide laurique est efficace en tant que promoteur de pénétration cutanée. L'acide linoléique, montre la meilleure efficacité en tant que promoteur de pénétration cutanée suivi par l'acide oléique, palmitoléique, linoléique et arachidonique. Fang et al [77], ont évalué l'efficacité des acides gras pour la promotion de la pénétration cutanée du flurbiprofène, à travers de la peau de souris. Ils ont mis en évidence que les acides gras sont les meilleurs promoteurs de pénétration cutanée en comparaison aux terpènes et à l'azone. Ils ont mis en évidence que le flux d'ibuprofène augmentait avec le nombre de doubles liaisons présentent au niveau des acides gras insaturés testés (acide linoléique, acide linoléique, acide oléique). En

revanche, ils ont également mis en évidence, que l'acide oléique produit un meilleur effet réservoir. De plus Gwak et al ont démontré que si l'on ajoute le propylène glycol à de l'acide oléique ou linoléique pour la promotion de la pénétration de l'odensétron, le facteur de pénétration est augmenté respectivement de 1250 et de 450 [77].

- **Effet du nombre de doubles liaisons et de leur position**

Lorsque le nombre de doubles liaisons augmente de un (acide oléique) à deux (acide linoléique), le flux de naloxone augmente à travers la peau. Cependant, lorsque le nombre de double liaison atteint trois (acide linoléique), aucune augmentation du flux n'est constatée[77]. Golden et al [78] ont étudié l'influence de la position et la conformation de la double liaison (18 :1) d'acides gras insaturés, sur l'efficacité de promotion de la pénétration cutanée. Cette étude a mis en évidence que les isomères cis sont d'efficaces promoteurs de pénétration cutanée alors que les isomères trans ne présentent pas d'effet promoteur de pénétration particulier.

4.4.2 Les alcools gras

Les alcools gras ont en général un point de fusion plus bas et une solubilité plus élevée que les acides gras correspondant.

Le tableau II-5 présente l'ensemble des alcools gras utilisés en tant que promoteur de pénétration cutané

Nom chimique	Nom commun	Formule chimique
n-alcools		
1-décanol	Alcool caprique	C ₁₀ H ₂₁ OH
1-dodécanol	Alcool laurylique	C ₁₂ H ₂₅ OH
1-tétradécanol	Alcool myristilique	C ₁₄ H ₂₉ OH
1-hexadécanol	Alcool cétylique	C ₁₆ H ₃₃ OH
1-Octadécanol	Alcool stéarylique	C ₁₈ H ₃₇ OH
Iso-alcools		
10-Méthyl-1-undécanol	Alcool isolaurilique	C ₁₂ H ₂₅ OH
12-Méthyl-1-tridécanol	Alcool isomyristilique	C ₁₄ H ₂₉ OH
14-Méthyl-1-pentadécanol	Alcool isomalmytilique	C ₁₆ H ₃₃ OH
16-Méthyl-1-heptadécanol	Alcool isostéarylique	C ₁₈ H ₃₇ OH

Tableau II-5 : Alcools gras utilisés en tant que promoteurs de pénétration cutanée

Pour les principes actifs peu solubles, les alcools gras augmentent leur solubilité dans la formulation et évite les phénomènes de déplétion. En s'évaporant, les alcools gras provoquent un état de super-saturation du principe actif dans la formulation. Ils ont par ailleurs la capacité de modifier la solubilité du principe actif en diffusant dans le *Stratum corneum*.

De nombreuses études ont été menées corrélant la longueur de chaîne alkyle et le nombre d'insaturations de l'alcool à l'efficacité de promotion de pénétration cutanée d'un actif. En fonction de la nature de la substance active introduite, il existe une relation entre efficacité de promotion de pénétration cutanée et longueur de la chaîne carbonée de l'alcool gras. Par ailleurs, il est intéressant de souligner que la position du groupement hydroxyle joue également un rôle dans l'efficacité de promotion de pénétration cutanée [77].

4.5 Les huiles essentielles, terpènes et terpénoïdes

Les terpènes, retrouvés dans les huiles essentielles, sont des composés non aromatiques contenant uniquement les éléments carbone, hydrogène et oxygène. Au sein de cette famille, les mécanismes d'action dépendent du composé considéré ; il peut s'agir d'une accélération de la diffusion du principe actif dans le SC, d'une désorganisation des bicouches lipidiques ou de la création de passages dans le milieu intercellulaire. Williams et Barry [76] ont démontré l'efficacité de l'huile essentielle d'eucalyptus en tant que promoteur de pénétration cutanée du 5-fluorouracil *in vitro*, cette huile essentielle multiplie le coefficient de perméabilité de la molécule par 34. Le composant principal de l'huile essentielle d'eucalyptus est le 1,8-cinéol (eucalyptol) (Figure II-3), recensée parmi une série de 17 monoterpènes et terpénoïdes évalués comme promoteur de pénétration cutanée du 5-fluorouracil *in vitro*.



Figure II-3 : structure chimique du 1,8 - cinéol

Il existe des relations structure-activité concernant ces composés, mais ces relations sont dépendantes de l'actif introduit ; ainsi le D-limonène (figure II-4) est le composé terpénique le plus efficace pour la pénétration de composés stéroïdes.

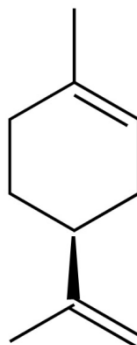


Figure II-4 : structure chimique du D - limonène

Comme pour, la plupart des composés promoteurs de pénétration cutanée, il existe un effet synergique des composés terpéniques avec le solvant dans lequel ils sont dissous. L'efficacité du promoteur dépend beaucoup du couple promoteur-principe actif [76].

4.6 Le chitosan

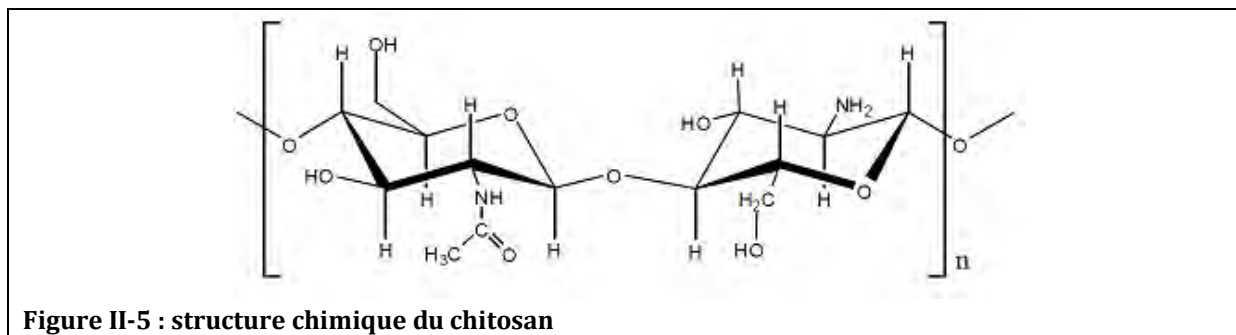


Figure II-5 : structure chimique du chitosan

Plusieurs études ont démontré les propriétés promotrices de pénétration cutanées du chitosan (figure II-5). Hombach et Bernkop-Schnürch ont mené une étude sur le potentiel de promotion de pénétration cellulaire de cellules MDCK (Madin-Darby Canine Kidney, utilisées comme modèle de barrière hémato encéphalique) de solutions et de particules de chitosan.

Leur étude a permis de mettre en évidence que l'efficacité de promotion de pénétration cellulaire du chitosan est fonction de son poids moléculaire, plus les particules de chitosan utilisées sont petites meilleure est la pénétration de celles-ci à travers les cellules [79].

De plus, cette étude a révélé l'importance du pH de la solution sur l'efficacité de promotion de pénétration ; les particules qui possèdent un pH physiologique de 7,4 présentent une meilleure efficacité de promotion que les particules formulées à pH 6,4 [79]. Par ailleurs, He et al [80] ont quant à eux étudié le mécanisme selon lequel le chitosan et ses dérivés, le N-triméthylchitosan, à différents degrés de quaternisation et le mono-N-carboxyméthylchitosan agissent sur la promotion de la pénétration transdermique de substances actives. Ils ont pu mettre en évidence grâce à différentes techniques les propriétés promotrices du chitosan et de ses dérivés. Dans un premier temps, ils modifient la structure secondaire de la kératine contenue dans le *Stratum corneum*, augmentant ainsi la teneur en eau de celui-ci. Puis, ils diminuent le potentiel membranaire des cellules cibles et enfin augmentent la fluidité des membranes cellulaires [80].

5. Les systèmes d'encapsulation

5.1 Introduction

La microencapsulation regroupe l'ensemble des technologies qui permettent la préparation de microparticules individualisées, constituées d'un matériau enrobant contenant un principe actif. Cette encapsulation consiste à créer une membrane qui isole le principe actif du milieu environnant. Dans les applications cosmétiques, l'encapsulation de substances actives permet d'atteindre éventuellement les objectifs suivants :

- Une protection de l'ingrédient encapsulé contre une dégradation due à l'environnement (oxygène, lumière, humidité)
- Une amélioration de sa biodisponibilité,
- Un pouvoir de pénétration accru,

- Une amélioration de la substantivité vis-à-vis de la peau,
- Une diminution de la toxicité des actifs,
- Améliorer la présentation du produit pour faciliter le dosage, le transport, l'utilisation.
- Masquer un goût, une odeur.

L'encapsulation permet également d'avoir une libération contrôlée du principe actif et une orientation spécifique de ce dernier vers la cible à atteindre. Les conséquences sont alors respectivement la possibilité :

- ✓ De maîtriser le profil de libération d'une matière active pour obtenir un effet prolongé,
- ✓ D'augmenter l'efficacité du traitement en diminuant les doses nécessaires et par conséquent les risques d'effets secondaires[81].

Les systèmes d'encapsulation présentent une grande variété de structures internes. En fonction de leur structure, ils sont classés en deux grands types :

- Les systèmes vésiculaires
- Les systèmes particulaires

5.2 Les systèmes vésiculaires

Les systèmes vésiculaires sont des systèmes colloïdaux caractérisés par une cavité hydrophile ou hydrophobe, délimitée par une membrane d'assemblages de lipides, de polymères ou de tensio-actifs assemblés en bicouches[82].

5.2.1 Les liposomes



Figure II-6 : représentation schématique d'un liposome

5.2.1.1 Caractéristiques générales

Les liposomes (figure II-6) sont des structures vésiculaires constituées de bicouches de molécules amphiphiles qui délimitent un compartiment aqueux interne ou cavité aqueuse. Les méthodes de préparation des liposomes sont nombreuses et peuvent aboutir à la formation de plusieurs types de vésicules (tableau II-5) différant par leur taille, leur structure et leur capacité d'encapsulation. Selon la méthode utilisée, il est possible d'obtenir des vésicules de type multi ou unilamellaires. Les liposomes multilamellaires (MLV multilamellar vesicles) ont un diamètre

moyen qui varie généralement de 400 nm à quelques μm . Les liposomes unilamellaires peuvent être de grande taille (LUV ou "large unilamellar vesicles") avec un diamètre moyen allant de 80 nm à 1 μm ou de petite taille (SUV ou "small unilamellar vesicles") avec un diamètre moyen variant de 20 à 80 nm.

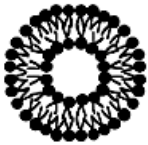
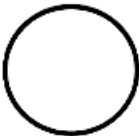


			
DENOMINATION	LUV	MLV/OLV	SUV
DIAMETRE (nm)	80-1000	100-4000	20-80

Tableau II-5 : caractéristiques des principaux types de liposomes[83]

5.2.1.2 Les différents modes de préparation des liposomes

Pour toute formulation de liposomes, le choix de la méthode de préparation dépend non seulement de la composition lipidique, de la structure des liposomes (uni ou multilamellaires) et de leur taille mais aussi en fonction de critères de stabilité et de devenir *in vivo*. Les volumes et les taux d'encapsulation doivent être élevés si l'on veut encapsuler des quantités importantes de macromolécules tout en limitant les volumes à administrer. La méthode de préparation ne doit pas être agressive vis-à-vis des substances à encapsuler. Enfin, la simplicité, la rapidité ainsi que la possibilité de mise en œuvre à l'échelle industrielle sont aussi des paramètres importants. La plupart des méthodes de préparation des liposomes font appel aux étapes suivantes:

- dissolution des lipides dans un solvant organique;
- élimination du solvant organique (évaporation sous vide, filtration dialysante);
- dissolution de la substance à encapsuler dans la solution organique ou dans la solution aqueuse en fonction de sa balance hydrophile/lipophile;
- élimination des substances non encapsulées par des techniques de séparation: filtration sur gel, dialyse, centrifugation. Les méthodes de préparation des liposomes décrites diffèrent généralement par le mode de dispersion des phospholipides dans la phase aqueuse. Il existe trois principaux modes de préparation des liposomes :

Méthodes de préparation par réhydratation de film suite à l'évaporation du solvant organique

Cette technique initiée dès les années 1960 par Bangham et al.[84] consiste à évaporer une solution organique (généralement du chloroforme) de phospholipides sur les parois du récipient avant de le réhydrater à une température supérieure à la température de transition de phase gel-cristal liquide des phospholipides utilisés dans la préparation. Au cours de la préparation, le film phospholipidique, au contact de la solution aqueuse, gonfle, puis se décolle des parois du ballon pour former spontanément des vésicules de type MLV. Le diamètre des vésicules obtenues par cette méthode est très élevé, de l'ordre de quelques micromètres et la distribution de taille des vésicules est très hétérogène. Le faible volume aqueux encapsulé peut être augmenté par addition de lipides chargés[83].

Méthodes fondées sur la dispersion d'une solution organique

Injection d'une solution organique de phospholipides

Cette technique consiste à former spontanément des liposomes unilamellaires de petite taille à la suite d'une injection d'une solution organique de lipides dans une solution aqueuse et de l'élimination du solvant organique par évaporation sous pression réduite ou par dialyse. Les faibles diamètres et polydispersités des liposomes sont obtenus à des vitesses d'injection et d'agitation rapides ainsi qu'à des concentrations en phospholipides réduites. Cette méthode facilement transposable à l'échelle industrielle a une utilisation limitée par la solubilité des phospholipides dans les solvants organiques tels que l'éthanol, le mélange éther éthylique/méthanol ou le diméthylsulfoxyde[85].

Evaporation en phase inverse

Les liposomes obtenus par cette méthode sont des LUV (également appelés R.E.V. pour « reverse phase évaporation vesicles »). Le principe de cette méthode est de dissoudre les phospholipides dans un solvant ou un mélange de solvants organiques (éther propylique/chloroforme 1/1 par exemple) et d'y ajouter la phase aqueuse dans un rapport phase aqueuse/phase organique allant de 1/3 à 1/6. A ce stade, les phospholipides se placent à l'interface entre les deux phases non miscibles.

L'élimination du solvant organique par évaporation sous pression réduite entraîne un rapprochement des micelles inverses puis la formation d'un gel. Au cours de l'étape suivante, la pression est réduite davantage pour favoriser l'évaporation totale de l'éther et entraîner la rupture de la phase gel. A ce moment, les monocouches de phospholipides se rapprochent pour former les bicouches des liposomes. Les vésicules ainsi obtenues ont un volume d'encapsulation 4 fois supérieur à celui des MLV obtenues par hydratation d'un film lipidique. On peut obtenir une encapsulation maximale de 65% de la phase aqueuse permettant d'encapsuler un grand choix de macromolécules hydrosolubles avec une grande efficacité. Cette méthode reste cependant complexe et est inadaptée à la production industrielle [86].

Méthodes basées sur l'utilisation de détergents : dispersion de micelles mixtes

Dans cette méthode, les phospholipides sont d'abord solubilisés, en milieux aqueux, à l'aide d'un détergent (Tween 20®, Triton® x100). Il se forme alors des micelles mixtes. Le détergent est ensuite éliminé et les micelles s'enrichissent peu à peu en phospholipides pour former des vésicules unilamellaires de type SUV ou LUV. L'élimination du détergent peut se faire par dialyse, par chromatographie d'exclusion-diffusion ou par adsorption sur des résines hydrophobes. Ce sont des méthodes souvent longues et offrant un taux d'encapsulation généralement bas[83].

Des techniques complémentaires permettent ensuite d'optimiser la taille et la charge en principe actif des liposomes formés [83] (tableau II-6).

Ultrasons	Petites vésicules de taille homogène.	Inadaptée à la production industrielle. Préparation préalable de MLV. Faibles taux d'encapsulation. Contamination par des particules de métal. Production d'aérosol pouvant être toxique pour le manipulateur.
Extrusion sur filtres de polycarbonate	Rapide non agressive et reproductible. Taille des liposomes homogène et adaptable en fonction du filtre utilisé. Concentrations en lipides et taux d'encapsulation élevés.	Inadaptée à la production industrielle de grands volumes. Préparation préalable de MLV.

Tableau II-6 : les différentes méthodes de réduction de taille des liposomes[83]

5.2.1.3 Méthodes de caractérisation des liposomes

Les propriétés physicochimiques des liposomes sont en relation avec leur capacité d'encapsulation et de stockage du principe actif d'une part, mais interviennent aussi sur les interactions avec les membranes biologiques et les profils de libération. Ces propriétés sont principalement la distribution de taille, la nature et l'épaisseur de la membrane, la charge en surface, l'hydrophobie. La mesure du taux d'encapsulation ainsi que les études de libération du principe actif in vitro permettent aussi de caractériser les nanoparticules.

- **Taille, distribution de taille et morphologie**

La taille et la distribution de taille des liposomes sont généralement mesurées par des techniques de granulométrie laser en milieu dilué, basées sur la diffusion quasi élastique de la lumière associée au mouvement Brownien des particules. En effet, les liposomes en suspension sont en mouvement constant et aléatoire de part leur faible taille.

La taille des particules peut également être déterminée par observation microscopique et analyse des images obtenues. La microscopie électronique (à balayage ou à transmission) est nécessaire pour atteindre la résolution suffisante à l'observation des liposomes. La microscopie électronique à transmission (MET) permet d'obtenir des informations basiques sur la morphologie et leurs caractéristiques de surface. La microscopie électronique à balayage (MEB) est plus utilisée pour déterminer la distribution de taille et la structure des particules, elle peut être associée à une étape de préalable de cryofracture. De manière complémentaire la diffraction des rayons X aux petits angles et la RMN permettent d'obtenir des renseignements sur la lamellarité des structures vésiculaires. Des techniques de fluorescence au moyen de sondes et la résonance paramagnétique électronique rendent accessible le volume de la cavité aqueuse interne.

- **Capacité d'encapsulation**

Les liposomes ayant généralement une taille beaucoup plus grande que le matériel incorporé la séparation des molécules non encapsulées peut donc utiliser des techniques fondées sur la

différence de taille des composés à séparer telles que la chromatographie d'exclusion diffusion, la centrifugation, la dialyse ou l'ultrafiltration.

- **Stabilité**

Une attention particulière doit être portée à la stabilité des liposomes après leur préparation en raison de leurs instabilités d'origine chimique ou physique qui peuvent modifier d'une manière importante l'activité biologique des principes actifs encapsulés. En effet, des phénomènes d'oxydation et d'hydrolyse des phospholipides sont susceptibles de se produire une fois les liposomes mis au point. Toutefois, les risques sont relativement minces lorsque les précautions de conservation et d'utilisation des phospholipides décrites sont prises. Les liposomes doivent être conservés à +4°C sous argon, dans des tubes scellés de manière hermétique. La lyophilisation en présence de cryoprotecteurs permet d'améliorer la conservation des liposomes même si l'intégrité des liposomes en terme de taille et de rétention des molécules encapsulées, après reconstitution du lyophilisat est difficile à retrouver.

5.2.2 Les niosomes

Les niosomes sont des vésicules délimitées par une paroi de tensio-actifs non ioniques organisés en bicouches. Ces vésicules constituent un système de vectorisation permettant d'améliorer l'accumulation de substances actives au niveau de la peau. Les niosomes sont des bicouches formées à partir de molécules amphiphiles, synthétiques, en milieu aqueux[87].

Plusieurs types de tensio-actifs peuvent être employés pour formuler ce type de vésicules.

La fraction hydrophobe du tensio-actif doit contenir au moins un groupement alkyl (C12-C18) ou perfluoroalkyl (C10) alors que la fraction hydrophile peut être un oxyde d'éthylène, du glycérol, un groupement polyhydroxyl ou un sucre. Les groupements hydrophiles et hydrophobes sont généralement reliés par une liaison éther, ester ou amine. Dans certains cas, la présence de cholestérol est indispensable pour la formation de vésicules.

La méthode de préparation des niosomes est similaire à celle des liposomes, une des techniques la plus fréquemment utilisée consiste en l'hydratation d'un mélange de tensio-actif et de lipides à température élevée, suivi d'une éventuelle réduction de taille (par sonification, extrusion, homogénéisation, etc.) pour obtenir un mélange, une dispersion colloïdale homogène et la séparation de la substance active non piégée.

La stabilité des formulations de niosomes dépend de plusieurs facteurs comme leur méthode de préparation, la température de stockage, la nature de la substance active encapsulée, les tensio-actifs introduits ainsi que les divers additifs incorporés à la préparation [88]. Les niosomes offrent certains avantages sur les liposomes. En effet, les phospholipides constitutifs des liposomes sont chimiquement instables par dégradation oxydative, alors que la paroi synthétique des niosomes reste stable. Néanmoins, comme pour les liposomes, leurs propriétés dépendent à la fois de la composition de la bicouche et de la méthode de production utilisée[87].

5.2.3 Les transfersomes ou liposomes ultradéformables

La rigidité des parois du liposome le rend souvent fragile et peu disposé à diffuser. L'ajout d'un tensio-actif permet ainsi d'augmenter la « déformabilité » de la vésicule.

Les principaux constituants des transfersomes sont des phospholipides, un agent stabilisateur (comme le cholate de sodium), de l'eau et parfois une petite concentration d'éthanol ($\leq 7\%$). Les

transfersomes sont préparés selon le même procédé que les liposomes, procédé suivi d'une homogénéisation, d'une sonication ou d'une autre technique visant à réduire la taille des vésicules lipidiques[87].

Ce type de vésicules a montré lors de sa perméation, une meilleure fusion lipidique assurant une modification et un décompactage des lipides intercornéocytaires [87].

Le mécanisme de promotion de la pénétration cutanée par les transfersomes, impliquent de nombreux procédés ; les transfersomes déshydratent la surface de la peau par évaporation provoquant une différence de pression osmotique entre la région fortement concentrée en eau à l'intérieur de la peau et la surface de la peau plus sèche.

Les lipides vésiculaires des transfersomes agiraient en évitant la pression osmotique par déshydratation et ainsi ouvrir les pores cellulaires étroits du *Stratum corneum*, franchissant donc la barrière cutanée[87].

5.2.4 Les vésicules catanioniques

Les vésicules catanioniques sont des systèmes réservoirs composés d'une bicouche de tensioactifs catanioniques (figure II-7), c'est-à-dire résultant de l'association de tensioactifs de charges opposées.

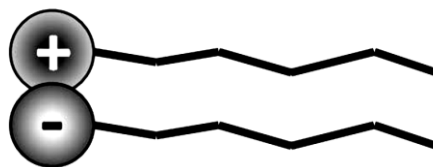


Figure II-7 : Représentation schématique d'un tensioactif catanionique bicaténaire

Ces tensioactifs catanioniques sont reconnus pour leur capacité à former spontanément des vésicules dans l'eau. Ces assemblages peuvent encapsuler des principes actifs hydrophiles dans leur cœur aqueux et des principes actifs hydrophobes au sein de leur structure membranaire. De telles structures ont connu un intérêt croissant durant ces dernières années pour leurs propriétés physico-chimiques d'auto-association spontanée [89-91].

Les mélanges de tensioactifs chargés qui libèrent leurs propre contre-ions en solution lors de leur association sont à distinguer des paires d'ions amphiphiles où les contre-ions sont éliminés, voire inexistant[92].

Il existe quatre voies de synthèse de paires d'ions pures actuellement décrites dans la littérature [93-95]. Les trois premières éliminent les sels résiduels par des méthodes d'extraction par solvant organique, par précipitation ou par échange d'ions. La dernière méthode, mise au point au laboratoire[96, 97], fait intervenir un échange de protons entre deux tensioactifs précurseurs, l'un porteur d'un groupement acide, l'autre d'un groupement amine. La réaction acido-basique permet l'ionisation mutuelle des deux espèces et leur association catanionique en l'absence de contre-ions. Cette méthode de conception de tensioactifs catanioniques s'inscrit dans une démarche de synthèse verte, la réaction spontanée a lieu dans l'eau, sans ajout de solvants organiques et ne nécessitant aucune méthode physique, consommatrice d'énergie pour la purification des paires d'ions. Cette stratégie a donné lieu à des applications industrielles, dans le cadre d'applications thérapeutiques, dans laquelle l'un des tensioactifs joue un rôle de

principe actif[98, 99]. L'originalité du concept repose ainsi sur la participation du principe actif à sa propre formulation, on peut alors parler de « formulation bioactive ».

Par ailleurs, en fonction des besoins, la structure des tensioactifs catanioniques est modifiable, notamment si l'on souhaite faciliter leur solubilisation dans l'eau, l'utilisation d'amphiphiles glycosidiques à forte hydrophilie a été développée (figure II-8)[100].

Cette tête sucre présente l'avantage d'être biocompatible, propriété qui a notamment été exploitée dans la conception d'analogues du galactosylcéramide dans le cadre d'une thérapie anti-VIH[96, 101].

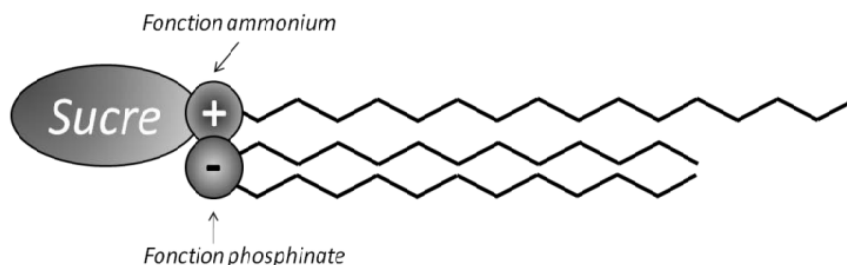


Figure II-8 : Représentation schématique d'un tensioactif catanionique tricaténaire dérivé de sucre

Au contraire, si l'on souhaite augmenter l'effet hydrophobe, une troisième chaîne lipidique peut être ajoutée, donnant ainsi naissance à un tensioactif tricaténaire. Dans cet dynamique, un troisième actif a été introduit[102]. L'acide phosphinique introduit, ayant un caractère acide plus fort que l'acide carboxylique, déplace l'équilibre de la réaction dans le sens d'une réaction totale.

5.2.5 Les sphérulites®



Figure II-9 : représentation schématique d'une sphérulite®

Les sphérulites® (figure II-9) sont des microvésicules concentriques, composées d'une alternance de bicouches de tensio-actifs et d'interface aqueuse [103]. Les Sphérulites® sont des vésicules plurilamellaires constituées de plusieurs couches de tensioactifs disposées de façon concentrique. On entend par phase lamellaire, une phase solide hydratée dans lequel plusieurs bicouches sont disposées en un réseau parallèle, séparées par des couches d'eau ou d'une solution aqueuse. Les dimensions de ces vésicules sont généralement de l'ordre de 1 à 50 μm de diamètre. Les Sphérulites® sont obtenues par cisaillement modéré d'un mélange de tensioactifs

et d'eau suivie d'une étape de dilution avec une solution aqueuse. De structure très comparable aux liposomes MLV, les Sphérulites® possèdent leurs propres caractéristiques:

- Une méthode de préparation ne nécessitant pas de solvant organique,
- Un taux d'encapsulation élevé,
- Un arrangement lamellaire concentrique dans lequel les bicouches de tensioactifs sont séparées par une distance bien précise[103].

Ces microstructures sont capables d'encapsuler une large gamme d'actifs hydrophiles et lipophiles, respectivement dans les phases aqueuses ou à l'intérieur des bicouches de tensioactifs. Afin de répondre spécifiquement aux besoins de la peau, les sphérulites® permettent de véhiculer l'actif encapsulé au cœur de sa zone d'action. Ces vésicules sont principalement utilisées en cosmétologie étant donné leur fort rendement d'encapsulation et leur propriété stabilisante lors de la préparation d'émulsion.

Il existe différentes sortes de sphérulites ; les sphérulites non ioniques et les sphérulites cationiques.

Les sphérulites non ioniques favorisent la pénétration de ces actifs à travers les couches de l'épiderme. La faible taille des microvésicules (0,1 à 50 μm) leur permet de pénétrer et de diffuser entre les différentes strates de la peau, voire même franchir une barrière naturelle : la jonction dermo-épidermique. La technologie potentialise l'activité de molécules actives au niveau des couches profondes de la peau[103].

Les sphérulites cationiques constituent un excellent vecteur pour les composés destinés à rester à la surface de la peau car elle y adhèrent de façon efficace. Cette parfaite affinité est issue des interactions électrostatiques entre les surfaces biologiques naturellement chargées négativement et les vésicules chargées positivement par addition d'un polymère cationique. En libérant spécifiquement l'actif à la surface de la peau, elles garantissent ainsi un effet réservoir au niveau du *Stratum corneum* [103].

Au contact de surfaces biologiques, les microvésicules s'ouvrent progressivement par action des enzymes cutanées ou par évaporation de l'eau. L'ouverture de chacune des membranes conduit à une libération progressive des actifs, pour une efficacité prolongée dans le temps[103].

En véhiculant les actifs jusqu'à leur zone cible, les sphérulites potentialisent leur efficacité tout en évitant le surdosage dans les formulations cosmétiques, réduisant ainsi les coûts de formulation et les risques d'irritation. Cette optimisation des performances des actifs cosmétiques est d'autant plus importante que la technologie permet une rémanence de l'efficacité des actifs, par libération progressive de ces derniers au fil de la journée [103].

5.3 Les émulsions et nanoémulsions

5.3.1 Les émulsions multiples

Les émulsions multiples sont des émulsions dans lesquelles les gouttelettes de la phase dispersée encapsulent des globules de plus petites tailles, qui dans la plupart des cas, sont de nature identique à ceux de la phase continue.

Il existe deux types d'émulsion multiples ; l'émulsion eau/huile/eau, dans laquelle les phases aqueuses internes et externes sont séparées par une phase huileuse ou à l'inverse l'émulsion huile/eau/huile dans laquelle l'eau sépare les deux phases externes huileuses. En cosmétique, ce sont les émulsions de type eau/huile/eau qui sont le plus couramment utilisées.

Bien que les émulsions multiples possèdent un potentiel élevé pour le contrôle de la libération de substances actives, leur emploi est limité du fait de leur manque de stabilité.

Les émulsions multiples consistent en une émulsion eau/huile et une émulsion huile/eau et nécessitent au final deux tensio-actifs, un tensio-actif possédant une faible valeur de HLB pour former l'émulsion primaire et un autre tensio-actif ayant une valeur de HLB plus élevée pour obtenir la seconde émulsion.

Deux principaux mécanismes ont été proposés pour expliquer le transport de composés actifs au moyen d'émulsions multiples. La première hypothèse consiste à penser que la substance active est libérée dans la phase interne avec la rupture des multiples globules huileux. Dans la seconde hypothèse, la substance active encapsulée diffuse à travers la membrane huileuse. Ce mécanisme est dépendant de plusieurs facteurs ; comme le partage de la substance active, sa perméabilité et son taux de diffusion à travers la membrane lipophile, la viscosité de l'émulsion, la taille des particules et leur distribution [88].

5.3.2 Les émulsions de Pickering

Les émulsions de Pickering sont des émulsions sans tensioactif, stabilisées par des particules colloïdales (argile, carbonate, silice). Ces systèmes connaissent un regain d'intérêt d'une part, parce qu'il est préférable de limiter l'utilisation des tensioactifs de synthèse pour des raisons écologiques, et d'autre part, parce que la fonctionnalisation de particules a connu des avancées récentes. En effet, les particules sont fonctionnalisées pour leur conférer un caractère "amphiphile" et permettre leur adsorption aux interfaces.

Du fait de la présence de particules fortement ancrées aux interfaces, les émulsions de Pickering présentent des propriétés très originales comparées à celles des émulsions classiques, stabilisées par des molécules tensioactives. Il est possible de fabriquer très simplement des émulsions calibrées de taille contrôlée, allant du micromètre au centimètre, en exploitant un phénomène dit de "coalescence limitée". Les matériaux obtenus sont beaucoup plus stables que leurs homologues classiques, stabilisées par des molécules tensioactives. Les émulsions présentent une élasticité hors du commun. Ces propriétés macroscopiques peuvent se comprendre par la modification de la nature de l'interface. En effet, dans le cas classique des émulsions stabilisées par des molécules tensioactives, les interfaces sont "liquides" tandis que pour les émulsions de Pickering, la présence des particules rend l'interface "solide" et très robuste. Ces émulsions révèlent une bonne tolérabilité cutanée. Les spécifications précisent également que les émulsions stabilisées par des particules sont remarquablement stables en présence d'électrolytes autorisant la formation de systèmes contenant des composés astringents et des composés antibactériens [88].

5.3.3 Les nanoémulsions

Les nanoémulsions sont de très fines dispersions huile/eau dans lesquelles sont dispersées des gouttelettes de taille inférieure à 100 nm. Comparées aux microémulsions, elles se trouvent dans un état métastable et sont par nature des systèmes très fragiles.

Leur structure dépend du procédé mis en œuvre pour leur préparation. Elles peuvent être préparées selon un procédé d'émulsification spontanée comme l'émulsification par température d'inversion de phase ou à l'aide d'un dispositif de cisaillement élevé, permettant un meilleur contrôle de la taille des particules et un large choix de composition. Les nanoémulsions sont fréquemment utilisées en cosmétique car elles possèdent de remarquables propriétés sensorielles et biophysiques (pouvoir hydratant). Elles conduisent à une large variété de produits [88].

5.4 Les systèmes particulaires

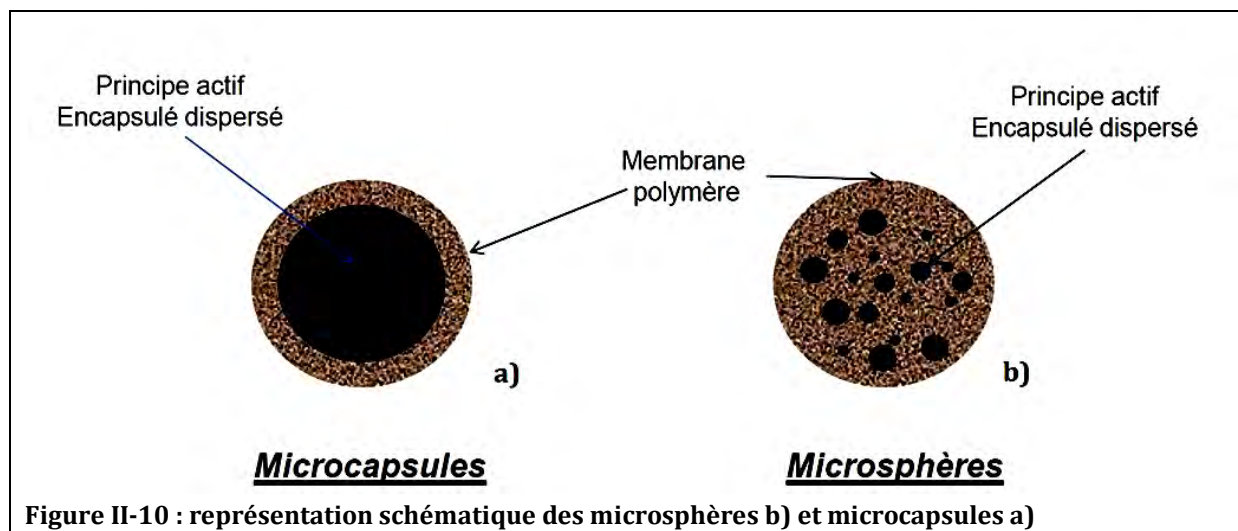
5.4.1 Les microparticules

5.4.1.1 Structure et taille

Les microsphères sont des particules sphériques constituées d'une matrice polymérique dans laquelle le principe actif est dispersé ou adsorbé (figure II-10).

Les microcapsules sont des systèmes réservoirs composés d'une enveloppe polymérique continue entourant un cœur liquide (huileux ou aqueux) (figure II-10). Le principe actif des capsules est généralement un solide, un liquide ou parfois un gaz. Il peut être dissous dans la cavité interne ou la constituer, être finement dispersé dans l'enveloppe du polymère ou se trouver à la fois dans la cavité centrale et dans la matrice des polymères [104].

L'avantage principal des microcapsules par rapport aux microsphères est leur grande capacité d'encapsulation permettant ainsi d'atteindre des rapports actif/polymère très élevés. Les microcapsules sont par contre plus fragiles et moins stables [83].



Les polymères formant le matériau enrobant peuvent être d'origine naturelle (gélatine, chitosane, alginate de sodium, agarose...), hémisynthétique (dérivés de la cellulose...) ou synthétique comme les copolymères des acides lactique et glycolique couramment utilisés. Selon le domaine d'application des microparticules, des propriétés de biocompatibilité et/ou de biodégradabilité seront requises. Les lipides (acides gras, alcools gras, glycérides, cholestérol...) seront plutôt utilisés sous forme solide, de même que les cires naturelles ou minérales. D'autres

matériaux tels que des stabilisants (tensioactifs, dispersants, antimottants...) ou des cryoprotecteurs peuvent être ajoutés à la formulation des microparticules.

L'ensemble des composés va intervenir dans le profil de libération de la matière active[103].

5.4.1.2 Encapsulation et cinétique de libération

Les microparticules contiennent de manière très variable entre 1 et 90% en masse de matière active. Les taux d'encapsulation déterminés par HPLC ou spectrophotométrie sont généralement plus élevés au sein des réservoirs formés par les microcapsules. Différents facteurs physico-chimiques tels que la charge électrique de surface, la mouillabilité, la porosité et le degré de gonflement des microparticules, ainsi que les polymères utilisés (caractérisés par analyse calorimétrique différentielle ou chromatographie d'exclusion stérique) peuvent influencer la libération du principe actif encapsulé. L'état physique de ce dernier est également un facteur à connaître. En effet, une dispersion moléculaire de matière active encapsulée ne se libérera pas de la même manière que des cristaux et n'aura pas non plus la même stabilité au sein du système. Certaines particules fabriquées pour l'encapsulation de cellules, d'enzymes ou de bactéries sont destinées à garder leur contenu. D'autres doivent le libérer de manière brutale comme dans le domaine des autocopiants en papeterie, par exemple. Dans ce cas, la membrane doit être étanche et la libération se fera par éclatement ou fusion de la particule sous les effets respectifs de la pression ou de la température. Lorsque la libération de la matière active doit être prolongée, deux mécanismes principaux existent et peuvent cohabiter : diffusion passive et dégradation ou dissolution du matériau enrobant. Les cinétiques de libération obtenues par diffusion passive pour des microcapsules suivent logiquement les lois de Fick et sont généralement d'ordre 0 ou 1. Dans ce dernier cas, la vitesse initiale de libération peut être soit accélérée (« burst ») si beaucoup de matière active se trouve à la surface de la particule, soit retardée si au contraire, un laps de temps est nécessaire pour que la matière active imprègne la membrane de la microcapsule, étape indispensable à sa libération dans le milieu extérieur.

5.4.1.3 Modes de préparation des microparticules

Il existe une variété de matériaux enrobant composant les microparticules. Cette variété de matériaux implique de multiples applications des microparticules et par conséquent une diversité de procédés de préparation (tableau II-7). L'ensemble des matériaux et procédés les plus couramment utilisés en microencapsulation sont résumés dans le tableau suivant :

Matériaux enrobants	Procédés	Applications principales
Homopolymères et copolymères des acides lactique et glycolique (PLA, PLGA)	Evaporation-extraction de solvant Milieu supercritique Spray-drying Coacervation simple Extrusion-broyage-sphéronisation	Libération prolongée de petites molécules ou de peptides par voie parentérale
Copolymères acryliques	Evaporation-extraction de solvant Spray-drying, Spray-coating	Libération prolongée, gastrique, entérique et masquage de goût par voie orale
Ethylcellulose Hydroxypropylméthylcellulose Esters de cellulose	Coacervation simple Spray-drying, Spray-coating Evaporation-extraction de solvant	Masquage de goût et libération prolongée par voie orale
Gélatine / Polysaccharides	Coacervation complexe	Pharmacie – Parfums – Arômes
Chitosane	Coacervation complexe Gélification ionique Spray-drying, Spray-coating	Libération gastrique et masquage de goût par voie orale
Alginate de sodium	Coacervation complexe Gélification ionique	Encapsulation de cellules et levures. Parfums – Arômes Cosmétiques – Agro alimentaire
Cires	Milieu supercritique Spray-coating	Masquage de goût. Chimie – Cosmétique
Corps gras solides (esters, alcools, acides gras)	Milieu supercritique Congélation de gouttes	Masquage de goût. Chimie – Cosmétique
Glycérides	Gélification thermique (Hot melt)	Masquage de goût. Chimie – Cosmétique
Amidon	Spray-drying	Ferments – Epices - Huiles – Vitamines
Polyurée (diamine+diisocyanate)	Polycondensation interfaciale	Phytoprotecteur

Tableau II-7 : matériaux les plus couramment utilisés en microencapsulation[83]

En fonction de l'application recherchée, des matériaux à utiliser et des problématiques de taille et de structure des microparticules souhaitées, certaines techniques paraissent plus adaptées que d'autres. Le tableau II-8 résume l'ensemble des avantages et des inconvénients de chaque technique employée :

Procédés	Structure	Taille (µm)	Avantages	Limites
Coacervation simple	MS*/MC*	20-200	Forts rendements production et encapsulation	Nécessité d'un savoir-faire
Coacervation complexe	MC	5-200	Pas de solvant organique Rendement de production très élevé	Choix limité de couples d'électrolytes Difficulté à encapsuler des PA* hydrosolubles
Evaporation-extraction de solvant	MS	0,5-200	Rendement de production proche de 100% Procédé facile à mettre en œuvre Pas d'équipement sophistiqué	Traces de solvant organique résiduel Volumes de solvant organique évaporé à recycler
Gélification thermique	MS	30-300	Procédé simple Transposition d'échelle simple	Polymorphisme de certains lipides pouvant entraîner des formes cristallines non souhaitées
Gélification ionique	MS	>200	Procédé réalisable à température ambiante Adapté aux cellules vivantes	Choix limité des polymères Taille élevée des MS
Polycondensation interfaciale	MC	0,5-100	Membrane polymère semi-perméable Activité biologique protégée	Réaction possible entre le PA et les monomères Solubilité possible du PA dans les solvants
Polymérisation en milieu dispersé	MS	0,1-15	Technologie bien établie Coût relativement faible	Conditions de production industrielle incompatibles avec les normes pharmaceutiques
Spray-coating	MC	>100	Capacité de production élevée Coût de revient faible Simplicité de mise en œuvre	Agglomération des particules < 100µm Faible homogénéité de l'enrobage Contraintes mécaniques
Spray-drying	MS/MC	1-50	Procédé facilement industrialisable	Pertes importantes sur les parois de l'appareil Morphologie irrégulière et PA en surface
ASES	MS	1-50	Bons rendements de fabrication PA polaire	Traces potentielles de solvant résiduel
RESS	MS	0,5-20	Absence de tout solvant Température de mise en œuvre peu élevée	Matière première doit être soluble dans le CO ₂ supercritique (polarité proche de l'hexane) MS très poreuses
Extrusion-broyage-sphéronisation	MS	>50	Absence de tout solvant Appareillage facilement disponible	PA doit être stable entre 70 et 150°C Nécessité d'un savoir-faire
Congélation de gouttes	MS	>200	Transposition d'échelle simple Distribution granulométrique très étroite	Taux d'encapsulation faibles Taille élevée des MS

* MS : microsphères, MC : microcapsules, PA : principe actif

ASES: Aerosol solvent extraction system/ RESS : rapid expansion of supercritical solutions

Tableau II-8 : avantages et limites des procédés de microencapsulation[83]

5.4.2 Les nanoparticules

5.4.2.1 Caractéristiques générales

Les nanoparticules sont des systèmes colloïdaux dont la taille est comprise entre 10 et 1000 nm, à base de polymères généralement biodégradables, ou de lipides capables de retenir une ou des molécules actives par séquestration et/ ou absorption. Leur taille réduite, impose que l'actif y soit dissous, piégé, encapsulé ou encore attaché à la matrice.

Cette famille est constituée de nombreux objets :

- Les nanoparticules polymériques biodégradables,
- Les micelles polymériques,
- Les nanoparticules inorganiques non biodégradables,
- Les Solid Lipid Nanoparticles (SLN),
- Les Nanostructured Lipid Carriers (NLC),
- Les Lipid Drug Conjugates (LDC),
- Les nanoliposomes,
- Les ferrofluides : solutions colloïdales de nanoparticules ferromagnétiques,

- Les dendrimères : molécules arborescentes capables de fixer d'autres molécules,
- Les nanoparticules magnétiques,
- Les nanocristaux[87].

Les nanoparticules peuvent être de type matriciel (le principe actif est dispersé ou dissous dans la matrice de polymère ou de lipides) : on parle de nanosphères (NS).

Les nanoparticules peuvent aussi être de type réservoir, il s'agit alors de nanocapsules (NC) constituées d'un cœur généralement liquide entouré d'une fine membrane de polymère dont l'épaisseur ne dépasse pas quelques nanomètres (figure II-11).

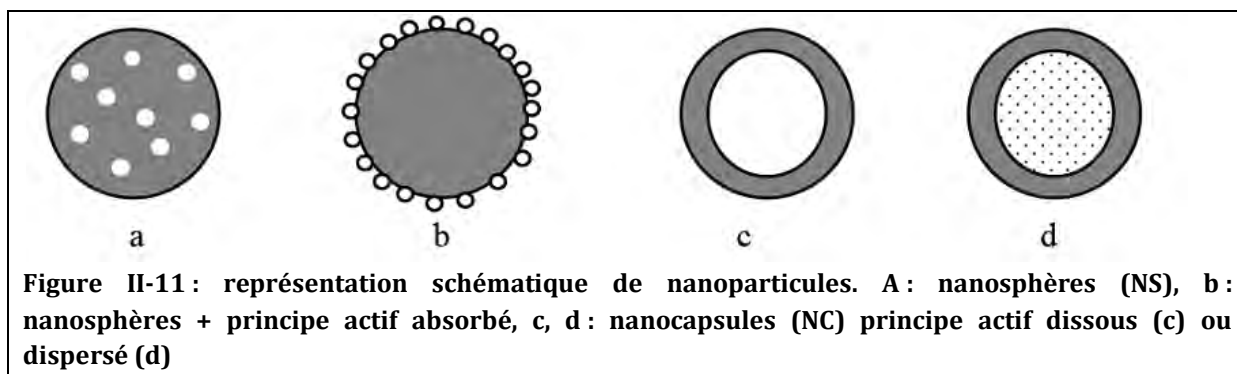


Figure II-11 : représentation schématique de nanoparticules. A : nanosphères (NS), b : nanosphères + principe actif absorbé, c, d : nanocapsules (NC) principe actif dissous (c) ou dispersé (d)

De nombreuses techniques existent pour la préparation de nanoparticules, ce qui a l'avantage d'offrir la possibilité de produire des nanoparticules de structure et propriétés physico-chimiques désirées. Le choix de la méthode dépend essentiellement des propriétés du principe actif (solubilité, coefficient de partage) et du matériau encapsulant (polymère ou monomère) ainsi que des propriétés souhaitées pour les particules. Pour le matériau encapsulant, le choix est déterminé principalement par des critères comme la biocompatibilité, la biodégradation, la voie d'administration et le profil de libération de principe actif. Les méthodes de préparation des nanoparticules polymères sont basées soit sur des mécanismes de polymérisation de monomères soit sur l'utilisation de polymères préformés, afin de contourner les inconvénients liés à la polymérisation in situ. Les méthodes de préparation des nanoparticules lipidiques peuvent nécessiter quant à elles la mise en œuvre de méthodes spécifiques [105].

Les nanoparticules sont par exemple employées en parfumerie, pour l'encapsulation de parfums. Une étude a été menée pour tester l'intérêt de la vectorisation de parfums, consistant en l'application sur la peau de composés odorants ; encapsulés dans des nanoparticules d'une part et non encapsulés d'autre part. Les composés encapsulés restent trois fois plus longtemps sur la peau que ceux qui ne le sont pas [106].

5.4.2.2 Méthodes de caractérisation des nanoparticules

- **Distribution de taille et structure**

Pour des raisons identiques aux liposomes, la taille et la structure des nanoparticules est déterminée à l'aide de techniques identiques à celles utilisées pour les liposomes. La taille des nanoparticules est déterminée à l'aide des techniques de diffusion quasi-élastique de la lumière associée au mouvement Brownien des particules. En ce qui concerne la morphologie des nanoparticules, celle-ci est étudiée à l'aide de techniques de microscopie électroniques comme la microscopie électronique à transmission ou à balayage. La microscopie à force atomique (AFM) peut être utilisée pour accéder aux détails de la morphologie elle conduit à des images en trois dimensions de la surface des particules.

- **Propriétés de surface**

La surface des nanoparticules possède une charge qui influence la stabilité des systèmes d'une part et leurs interactions avec le milieu biologique d'autre part. La caractérisation de surface des particules passe par la mesure du potentiel Zéta qui représente le potentiel de surface dû à la présence de charges provenant du polymère ou des tensio actifs adsorbés. Le potentiel Zéta permet de prédire la stabilité des nanoparticules en suspension et les interactions par attractions électrostatiques. Il est généralement admis qu'une valeur élevée, supérieure à 30mV en valeur absolue, est nécessaire pour garantir la stabilité de la dispersion [83].

- **Capacité d'encapsulation**

La capacité d'encapsulation dépend à la fois des propriétés du principe actif et du procédé utilisé. Elle est généralement supérieure pour les principes actifs lipophiles sauf si la production des particules se fait en phase externe organique. La mesure de l'efficacité d'encapsulation se fait après séparation des nanoparticules du milieu par ultrafiltration et/ou ultracentrifugation. La quantité de principe actif contenue dans les particules est alors dosée après dissolution, la quantité de principe actif non encapsulé dans la phase externe peut également être dosée. L'efficacité d'encapsulation est alors décrite comme le rapport entre la quantité de principe actif initialement introduite dans la formule et la quantité incorporée dans les nanoparticules. Elle dépend de la solubilité du principe actif dans le cœur huileux pour les nanocapsules, de son coefficient de partage entre les phases organique et aqueuse, de la concentration initiale et des interactions éventuelles polymère/principe actif[83].

- **Stabilité**

La capacité d'incorporation est très supérieure pour les nanocapsules, le rapport principe actif/polymère est alors élevé (>1) alors qu'il est généralement inférieur à 0,5 pour les nanosphères. La stabilité chimique peut être suivie par mesure de la variation éventuelle de la masse molaire du polymère ou par une modification du pH du milieu. Il est également nécessaire de s'assurer de la permanence de l'encapsulation, en vérifiant que la charge des nanoparticules en principe actif n'évolue pas au cours du temps au stockage et qu'il n'y a pas de dégradation du principe actif encapsulé[83].

Les éléments les plus utilisés dans l'industrie cosmétique sont probablement les SLN et les NLC.

5.5 Les complexes moléculaires

Ces systèmes sont basés sur des associations entre une molécule de transport et un actif[87].

5.1.1 Les cyclodextrines

Les cyclodextrines (figure II-12) sont des oligosaccharides cycliques obtenus à partir de la dégradation enzymatique de l'amidon.

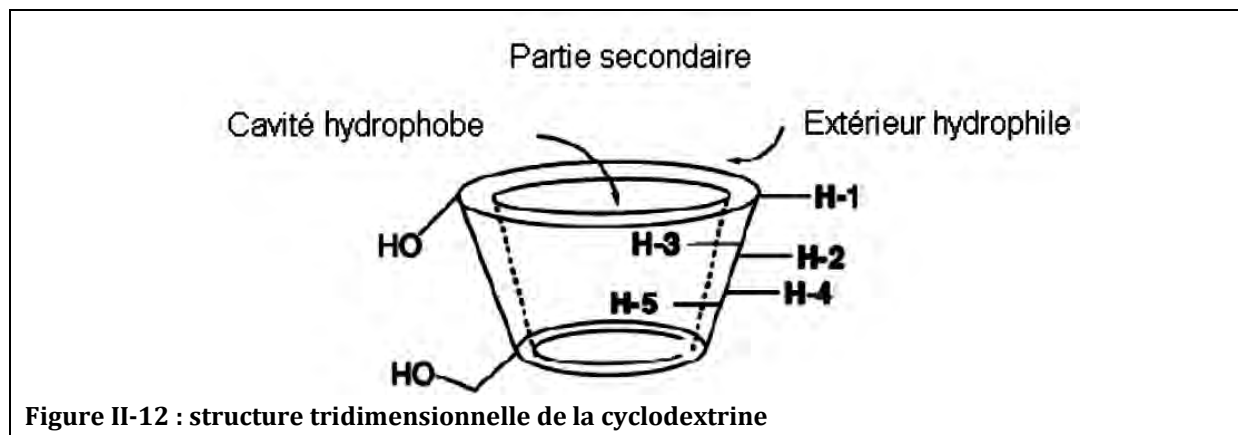


Figure II-12 : structure tridimensionnelle de la cyclodextrine

Les cyclodextrines sont constituées par l'association de plusieurs unités de glucose par des liaisons α 1-4. On distingue trois cyclodextrines différentes selon le nombre d'unités glucose mises en jeu : α -cyclodextrines, β -cyclodextrines, et γ -cyclodextrines (respectivement 6, 7 et 8 unités). La structure tridimensionnelle représente la molécule comme un cône tronqué avec une cavité permettant d'accueillir la substance active hydrophobe. L'hydrophilie de la surface externe de la cyclodextrine facilite la mise en solution du complexe.

La formation ou la dissociation du complexe dépend d'une réaction d'équilibre qui s'effectue selon les concentrations de substances actives et de cyclodextrines. Le composé actif doit se dissocier de la cyclodextrine pour agir [83].

Le recours à l'utilisation des cyclodextrines dans l'industrie pharmaceutique et cosmétique est de plus en plus utilisé pour améliorer la solubilité de principes actifs hydrophobes.

Le mécanisme de l'inclusion n'est pas totalement connu mais on admet qu'en milieu aqueux, il y a d'abord déshydratation de la cavité de la cyclodextrine puis de la molécule à encapsuler, cette dernière venant ensuite se loger à l'intérieur de la cavité de la cyclodextrine.

5.1.2 Complexes phospholipidiques

Les complexes phospholipides permettent quant à eux d'associer des actifs lipophiles ou hydrophiles à un mélange de phospholipides. Ce système, une fois hydraté donne spontanément un objet de type liposome où l'élément actif est selon sa polarité, soit lié aux têtes polaires, soit lié aux chaînes lipidiques des phospholipides. Ces systèmes restent assez instables au sein de la formulation car contrairement aux liposomes vrais, leur paroi n'est pas stabilisée.

6 Conclusion

Il est rare que l'industrie produise de nouveaux principes actifs spécialement adaptés à la voie dermique ou transdermique. Par conséquent, les propriétés physico-chimiques des molécules actives ne sont pas parfaitement adaptées à leur passage à travers la peau, préalable souvent indispensable à leur efficacité. Cela signifie que des efforts considérables doivent être consacrés à la conception appropriée d'une formulation pour acheminer assez de principe actif jusqu'au site d'action souhaité. Afin de remédier à cette problématique, les formulateurs peuvent voir recours à l'utilisation de molécules qui augmentent la pénétration des substances actives à travers la peau ; les promoteurs de pénétration cutanée. En fonction de leur structure chimique, ces molécules ont la capacité de modifier l'organisation des lipides du *Stratum corneum* de différentes façons. Le choix du promoteur va dépendre des caractéristiques physico-chimiques du principe actif à véhiculer ainsi que des autres ingrédients de la formulation.

Par ailleurs, il existe également différents types de vecteurs utilisés en cosmétologie pour augmenter l'efficacité de principe actif administrés par voie topique. Ces vecteurs présentent divers intérêts ; en fonction de leur nature, ils ont la capacité de protéger un composé actif vis-à-vis de la dégradation qu'elle soit enzymatique, chimique ou physique. De plus, ces systèmes permettent de parer les problématiques d'incompatibilités physico-chimiques entre ingrédients d'une même formulation. Ces systèmes permettent également d'acheminer une substance active jusqu'à sa zone d'action indépendamment de ses propriétés physico-chimiques.

Enfin, le recours à l'encapsulation de molécules actives permet de contrôler la libération de l'actif dans le temps, procurant la possibilité d'envisager des formulations à libération d'actifs prolongée dans le temps.

Dans cette dynamique, le chapitre suivant de cette thèse explique comment les multiples propriétés du chitosan, polysaccharide d'origine naturelle peuvent être exploitées à des fins d'encapsulation.

CHAPITRE III :

LE CHITOSAN AGENT D'ENCAPSULATION DE MOLECULES ACTIVES

Chapitre III

Le chitosan agent d'encapsulation de molécules actives

1. Introduction

La société a pris progressivement conscience que notre civilisation matérielle repose sur l'utilisation massive de ressources fossiles et qu'elle engendre également des impacts immédiats ou différés sur la qualité de l'environnement. Or, nous savons que les réserves en pétrole et en gaz s'épuisent et que ces ressources sont de plus en plus onéreuses. Il importe par conséquent de trouver de nouvelles sources de matériaux organiques qui pourront être substituées au pétrole dans toutes ces applications non énergétiques. En outre, l'idée de puiser dans les matières premières renouvelables répond aux exigences de développement durable. Parmi les matériaux les plus étudiés, les polysaccharides pourraient être les matériaux de demain. Ces polymères sont des substances uniques dans le sens où elles sont naturelles, abondantes, issues de ressources renouvelables et présentant de nombreuses propriétés à la fois physico-chimiques et biologiques.

Parmi les polysaccharides d'intérêt pour l'homme, la chitine et son principal dérivé, le chitosan, occupent une place de plus en plus importante. Présente dans de nombreux organismes vivants, la chitine est le polysaccharide le plus abondant après la cellulose, bien qu'une faible fraction de cette production soit réellement exploitable économiquement. La chitine et le chitosan sont en effet, extraits des carapaces de crustacés telles que le crabe et la crevette et l'intérêt de leur production industrielle provient de l'importante quantité de ressources naturelles produites par l'industrie de la pêche[107].

Depuis une vingtaine d'années, de nombreuses études ont été réalisées sur ces biopolymères et de nombreux brevets déposés. Il existe à leur sujet une abondante et récente littérature scientifique. Ce sont deux biopolymères biodégradables et biorésorbables, deux propriétés primordiales à notre époque où la protection de l'environnement et de la santé humaine jouent un rôle important. De ce fait l'utilisation de vecteurs colloïdaux fabriqués à partir de polysaccharides hydrophiles comme le chitosan s'est imposée comme une alternative prometteuse pour améliorer le transport de molécules à travers les membranes biologiques. En étudiant les systèmes de relargage contrôlé à base de chitosan, des chercheurs ont prouvé qu'en plus de sa biocompatibilité, sa biodégradabilité et sa faible toxicité, le chitosan excellait à améliorer le transport de produits chimiques à travers les membranes cellulaires. Après un rappel sur leurs sources et modes de préparation, nous insisterons sur les nombreuses propriétés physico-chimiques et biologiques qui font de ce biopolymère un candidat privilégié pour l'encapsulation de molécules actives.

2. Chitine et chitosan

2.1 Les sources de chitine

La chitine est produite par les insectes (blattes, coléoptères, fourmis), les arachnides (scorpions, araignées), les animaux marins (crabes, crevettes, homards, langoustines, calamars) et les champignons [108] (tableau III-1). Dans le règne animal, la chitine est un élément de soutien des téguments de certains invertébrés (insectes, crustacés, mollusques, nématodes). On la retrouve en particulier dans la composition de leur cuticule et à un degré moindre au niveau de la paroi intestinale, du tube digestif, des trachées, des tendons musculaires, et du squelette interne.

La chitine est également un constituant majeur des endosquelettes des céphalopodes comme les sèches et les calamars. Au niveau des autres règnes biologiques, elle est signalée dans les parois cellulaires des champignons et de certaines algues chlorophycées. La chitine est également présente dans certaines levures et bactéries [107, 109-111].

Sources	Sites de présence	Teneur en chitine (en % *)
Arthropodes : - Crustacés - Insectes - Arachnides	- Exosquelette - Cuticule	2 - 72
Mollusques : - Seiches - Pieuvres/calamars	- Coquille	6 - 40
Pogonophores	- Tubes	33
Cnidaires	- Capsules d'œuf - Membranes	3 - 30
Annélides : - Sangsue - Lombric	- Soies	0,2 - 38
Brachiopodes	- Cuticules - Coquilles	4 - 30
Champignons - Levures - Ascomycètes - Pénicillium - Blastocladiacés - Chytridiacés	- Paroi cellulaire - Tige - Spore	3 - 20

Le % de chitine est donné par rapport à la masse sèche

Tableau III-1 les principales sources de chitine[112]

Le choix de la méthode d'obtention de la chitine est fonction de la proportion de polysaccharide contenu dans la source considérée [109-111, 113]. Chez les insectes, la chitine constitue environ 1% de la masse fraîche de l'animal, ce qui explique que son exploitation commerciale ne soit pas envisagée. Chez les micro-organismes, le pourcentage de la chitine peut atteindre plus de 20% de la masse fraîche de la cellule. Toutefois, l'extraction à partir de microorganismes, n'a jusqu'ici été effectuée qu'à titre expérimental. Les avancées récentes dans la technologie de la

fermentation suggèrent néanmoins la production de chitosan à partir de la culture de moisissures (*Aspergillus niger* par exemple). Ceci pourrait être une source alternative de chitosan dans un proche avenir, en particulier pour des applications biomédicales (le syndrome de la vache folle conduit certaines autorités de tutelle à rejeter des matériaux d'origine animale). Le meilleur rendement d'extraction de la chitine est actuellement observé chez les crustacés qui en constituent donc la principale source au niveau industriel [112].

2.2 Structure chimique

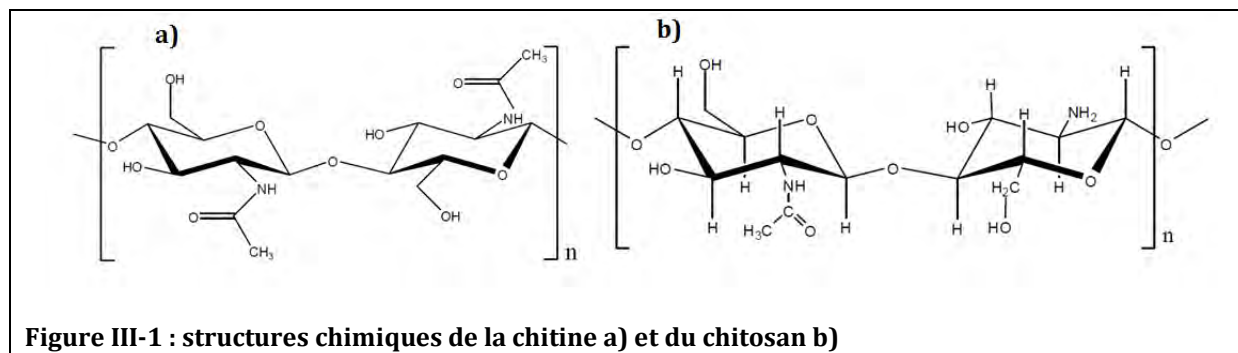


Figure III-1 : structures chimiques de la chitine a) et du chitosan b)

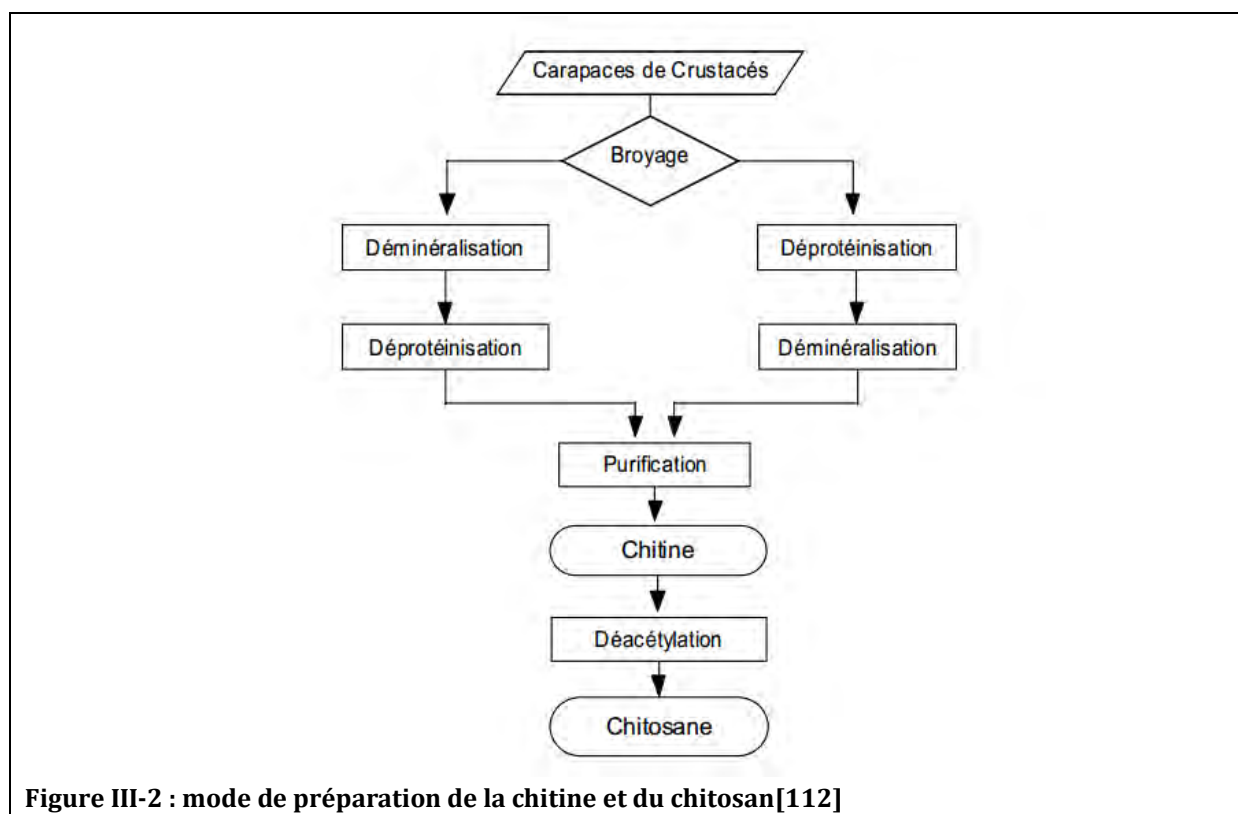
La chitine est un biopolymère linéaire qui a une structure similaire à la cellulose, mais c'est un polysaccharide ayant des groupements acétamide en position C-2 à la place des hydroxyles (figure III-1). Sa structure chimique est un enchaînement d'unités monomères N-acétyl-β-D-glucosamines reliées par une liaison glycosidique (1→4). La nomenclature définit cette structure comme celle d'un poly[β-(1→4)-2 acétamido-2déoxy-D-glucopyranose]. En fait, le terme chitine est donné à tout copolymère formé d'unités constitutives N-acétyl-Dglucosamine et D-glucosamine dont le degré d'acétylation est supérieur à 50%. La désacétylation en milieu basique de la chitine permet d'obtenir le chitosan qui est un copolymère linéaire à arrangement aléatoire d'unités D-glucosamine et d'unités N-acétyl-D-glucosamine reliées par des liaisons β-(1→4). Le chitosan est un polysaccharide appartenant à la famille des glycosaminoglycane. L'une des caractéristiques importantes à retenir est que le chitosan commercial est un copolymère avec des distributions de motifs aléatoires. La réaction industrielle de désacétylation de la chitine est en effet, rarement complète ce qui signifie que tous les groupements amide de la chitine ne sont pas hydrolysés.

Le terme de chitosan est donné à tout copolymère dont le degré d'acétylation (DA) est inférieur à 50%. Ainsi, chaque lot est caractérisé par la fraction de groupements N-acétamide résiduel (DA) ou par la quantité relative de groupements acétylés retirés à la macromolécule de chitine lors de sa préparation (DD). Les propriétés du chitosan seront donc dépendantes du DD et de la masse molaire (MM)[112].

2.3 Préparation de la chitine et du chitosan

Le procédé de préparation de la chitine et du chitosan est résumé dans la figure III-2. Pour obtenir la chitine, les déchets sont d'abord broyés, puis les protéines, ainsi qu'une partie des colorants naturels sont extraits par une solution d'hydroxyde de sodium de concentration variable (en général 0,1-5 M) ; la température et la durée du traitement peuvent également varier. Cette étape de désacétylation peut également se faire par voie enzymatique. Le carbonate

de calcium présent dans la carapace est ensuite extrait par dissolution dans une solution d'acide chlorhydrique (concentration 1-10 M) à température ambiante (la durée du traitement acide est variable). Le résidu, une fois séché constitue la chitine brute (faiblement désacétylée, DD ~20-30%) qui peut être stocké comme un intermédiaire stable. A la fin de ces deux traitements (déprotéinisation et déminéralisation), il peut subsister une coloration due à des pigments incomplètement éliminés[109], on effectue alors une étape de décoloration par un agent oxydant ($KMnO_4$, $NaOCl$ ou H_2O_2) avec un risque de dépolymérisation et/ou oxydation des unités situées aux extrémités de la chaîne polymérique. La désacétylation en milieu basique de la chitine, va permettre ensuite d'obtenir le chitosan, qui est son principal dérivé. A ce stade, il faut noter que les caractéristiques des différents lots de chitine (notamment en terme de degré de désacétylation et de masse moléculaire) peuvent varier considérablement, en raison des conditions expérimentales choisies qui peuvent être sensiblement différentes[109, 112].



Il existe une multitude de méthodes de préparation du chitosan. En général, le chitosan est produit par une désacétylation partielle de la chitine brute dans une solution d'hydroxyde de sodium concentrée, à une température de 110-115°C durant quelques heures, en atmosphère inerte et en présence d'un agent réducteur ($NaBH_4$). Le chitosan obtenu est alors séché puis redissous dans une solution d'acide organique afin de le purifier. La solution acidifiée est alors filtrée et séchée. Le chitosan obtenu possède un taux de désacétylation moyen de 70-80%. Il se présente sous la forme d'un solide amorphe ayant une couleur orange brun. La qualité du chitosan varie selon la qualité de la matière première utilisée (crabe, crevettes, calamars...) et de la procédure expérimentale d'extraction. En effet, il est à noter, que les trois étapes d'extraction de la chitine (déprotéinisation, déminéralisation et décoloration) ainsi que l'étape de désacétylation influencent la qualité du produit fini. Des conditions trop drastiques conduisent à

une dégradation physique du biopolymère (avec une chute importante de la masse moléculaire et/ou une oxydation des extrémités réductrices des chaînes macromoléculaires), alors que des conditions trop douces ne permettent pas une désacétylation suffisante. Ceci permet d'expliquer parfois, la difficulté d'obtenir de façon reproductible des produits de composition prédéterminée[112]. La qualité des échantillons commerciaux peut être évaluée entre autres par leur couleur.

On peut également préparer des glucosamines ou des oligomères de chitine et de chitosan (oligosaccharides, chitosan « purifié »...). C'est un domaine en plein développement actuellement. La chitine et le chitosan peuvent être en effet hydrolysés par voie enzymatique en utilisant des enzymes (chitinases, chitosanases) pour donner des fragments d'acétylglucosamine, qui à leur tour sont dégradés. On produit alors des oligomères de masse moléculaire spécifique avec des plages de masse parfaitement définies, pour des applications à très hautes valeurs ajoutées (pansements thérapeutiques ou biofongicide par exemple).

La production mondiale de chitine est estimée entre 2000 et 3000 tonnes par an, dont 60-70% sert à produire le chitosan.

2.4 Degré de désacétylation

Le traitement alcalin conduit généralement à une désacétylation partielle. En effet, pour aboutir à une désacétylation totale, il conviendrait de procéder à une série de traitements successifs avec le risque de voir diminuer de manière dramatique la masse moléculaire du polymère. Hors des applications spécifiques, l'utilisateur recherche du chitosan à moindre coût avec comme corollaire une désacétylation incomplète[111]. En pratique, le chitosan et la chitine sont considérés comme des copolymères de même structure chimique globale constitués d'unités N-acétyl-glucosamine, dont la répartition fixe le degré de désacétylation (DD). Ils ne se distinguent que par la valeur du DD. Le paramètre DD est extrêmement important car il influence les propriétés des chaînes macromoléculaires des polymères et leur comportement en solution [114-120] à savoir :

- la solubilité du chitosan,
- la flexibilité des chaînes macromoléculaires,
- la conformation du polymère,
- et donc la viscosité des solutions.

Le degré de désacétylation peut être déterminé par analyse élémentaire (analyse du % d'azote)[109], par titrages potentiométriques ou conductimétriques, par diffraction des rayons X, par spectrophotométrie infra-rouge à transformée de Fourier et UV ([121, 122] ou encore par résonance magnétique nucléaire (RMN) liquide ou solide (essentiellement proton ^1H et carbone ^{13}C). La technique infra-rouge est la plus adaptée pour une caractérisation rapide et simple et la technique RMN, la plus précise, dès lors que le polymère est parfaitement soluble dans l'eau deutérée en présence d'acide chlorhydrique.

2.5 Masse moléculaire

La seconde caractéristique importante est la masse moléculaire (MM), en masse ou en nombre, ou mieux encore la distribution des masses moléculaires [112]. La détermination de la MM du

polymère qui nécessite la mise en solution du polymère, peut se faire par des mesures viscosimétriques ou par chromatographie par perméation de gel (chromatographie d'exclusion stérique) couplée à des techniques de détection comme des mesures de pouvoir rotatoire de diffusion de la lumière. La valeur de la masse moléculaire d'un chitosan dépend fortement du procédé de fabrication car, comme nous l'avons signalé, celui-ci peut induire une dépolymérisation des chaînes macromoléculaires et/ou une dégradation lors de sa production. Les chaînes de chitosan ont des masses très élevées. Celles-ci, dépendent, en fait, du type d'application désirée : par exemple, dans le cas du chitosan commercial pour des applications dans le traitement des eaux la MM est généralement comprise entre 100 et 500 kDa. En effet, il n'est pas nécessaire d'utiliser des chitosan avec des MM élevées pour avoir des résultats intéressants[109].

La MM affecte la solubilité du chitosan et ses propriétés rhéologiques notamment sa viscosité. Elle peut également influencer significativement sur les propriétés du polymère en solution, comme le paramètre DD [115, 116, 123]. Ainsi, en augmentant la masse moléculaire du chitosan, on augmente sa viscosité et on diminue sa solubilité.

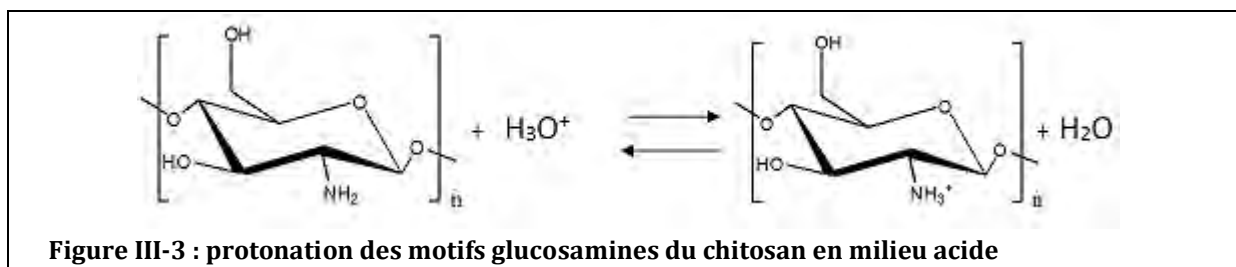
3. Propriétés de la chitine et du chitosan

3.1 Solubilité

La chitine est une substance insoluble dans l'eau et également dans la plupart des solvants, comme la cellulose [124, 125]. Les acides concentrés la dégradent. Le chitosan est, par contre, soluble dans la plupart des solutions organiques acides[112]. L'acide le plus couramment utilisé pour préparer une solution de chitosan est l'acide acétique dilué. En général, le chitosan est parfaitement soluble dans des solutions diluées (0,1 % -1%) d'acide nitrique et chlorhydrique. En effet, les groupes aminés du chitosan sont protonés à partir de pH 3-4 et le polymère chargé positivement devient soluble. Le chitosan est insoluble dans les solvants purs et les acides concentrés, en raison de l'impossibilité d'hydrater le matériau. Il est donc relativement stable en milieu acide concentré, même s'il se dégrade après une longue exposition. En revanche, en présence d'une faible quantité d'acide, il est soluble dans les mélanges aqueux contenant par exemple 60% de méthanol ou 40% d'acétone. Cependant, il faut noter que la solubilité du chitosan est un paramètre très difficile à contrôler [107] car la valeur du DD influence fortement sa solubilité. En général, on utilise du chitosan avec un DD supérieur à 70% pour augmenter sa solubilité. Celle-ci dépend également de la force ionique, du pH, de la nature de l'acide utilisé et de la distribution des groupes acétyles le long de la chaîne macromoléculaire[115, 116, 120].

3.2 Polyélectrolytes en milieu acide

Le chitosan est l'un des rares polyélectrolytes naturels cationiques. En milieu acide, il se comporte comme un polycation (figure III-3), à forte densité de charge et dont l'état d'ionisation est décrit par l'équilibre suivant :



Le chitosan est une base faible de pKa voisin de 6,3-6,7, valeurs moyennes des échantillons commerciaux [112]. Il se dissout donc en milieu acide par protonation des fonctions amine présentes sur la molécule. La plupart des groupes aminés sont protonés en milieu acide (pH < 5,5). Lorsque le pH devient inférieur au pKa, le chitosan devient cationique et par conséquent, soluble dans l'eau. Le chitosan se distingue ainsi de la cellulose par sa structure moléculaire chargée positivement. Comme pour tout polyélectrolyte, le pKa du chitosan dépend tout particulièrement du degré de neutralisation des groupes NH_3^+ , auquel ce pKa est déterminé et donc du DD. En général, la valeur du pKa augmente, lorsque le DD diminue [112].

3.3 Propriétés physiques et chimiques

Le chitosan est un matériau non poreux ayant des surfaces spécifiques de l'ordre de quelques m^2/g à quelques centaines de m^2/g sous des formes physiquement modifiées [126, 127]. C'est un matériau très stable en phase solide (sèche) et il a une conservation quasi infinie. En solution, il est relativement fragile et dégradé. Il possède un degré de réactivité chimique élevé dû à sa fonction amine primaire libre qui lui confère une forte densité de charges positives (transformation de NH_2 en NH_3^+ en milieu acide). De plus, la présence de la fonction amine, le long de la chaîne macromoléculaire, permet comparativement à la cellulose, de réaliser des réactions chimiques spécifiques de cette fonction telle que la N-acylation ou N-carboxylation. Une autre propriété intéressante du chitosan (et également de la chitine), concerne son aptitude à interagir avec d'autres substances chimiques (ions, molécules, macromolécules) grâce à une structure chimique particulière qui permet d'entrevoir des capacités à interagir, complexer ou absorber [123, 128]. Ce comportement est essentiellement attribué :

- Aux propriétés hydrophiles des chaînes macromoléculaires dues à la présence de nombreux groupements hydroxyles au niveau des unités glucose (possibilité de ponts hydrogène et de liaisons intra et/ou inter-macromoléculaires),
- A la présence de plusieurs groupes fonctionnels (hydroxyle, acétamide et amine) et à leur grande réactivité,
- Et à la structure flexible des chaînes de polymères qui pourra être modulée en fonction du pH et de la température.

3.4 Propriétés biologiques

Bien que l'intérêt porté à la chitine et au chitosan ne date réellement que d'une trentaine d'années, les études sur ces applications dans le domaine biomédical ne cessent de se développer [111, 127] ceci étant dû au fait que la chitine et le chitosan sont non toxiques, biodégradables et surtout bioactifs [125]. Le chitosan est biocompatible, c'est-à-dire que sa

présence dans un organisme entraîne des réactions inflammatoires et des réactions de rejet très limitées. Il est bio-résorbables avec des cinétiques faibles et contrôlées.

3.5 Biodégradabilité

En général, les polysaccharides sont dégradés par une hydrolyse enzymatique. Le chitosan n'échappe pas à cette règle. Le chitosan non modifié chimiquement est considéré comme un polymère biodégradable, après biofragmentation enzymatique par des chitosanases. Il est également considéré comme biocompatible. Après évaluation de la cytotoxicité des systèmes à base de chitosan, aucune toxicité au niveau des kératinocytes et des fibroblastes n'a été relevée, confirmant ainsi la biocompatibilité de ce matériau[129]. Il est de plus, dégradé par les lysozymes, enzyme protéolytique spécifique, notamment sécrété par les fluides physiologiques en grande quantité.

3.6 Toxicité du chitosan

Concernant la toxicité du chitosan, les études actuelles démontrent que d'une façon générale le chitosan est un produit biocompatible et n'est relativement pas toxique. De plus, il paraît important de préciser que les écailles de chitosan ne sont naturellement pas des produits exempts de germes, 500 000 germes par gramme de produit brut sont dénombrés ce qui correspond aux composés polysaccharidiques obtenus à partir d'algues par exemple[130]. Les études réalisées avec des doses aiguës et des doses répétées de chitosan et autres composés de la même famille (incluant des copolymères de glucosamine de chitosan et du *N*-acétylglucosamine) montrent que pour des doses de l'ordre du gramme par kilogramme, le chitosan n'est pas toxique (sans effet évident sur un organe cible en particulier)[129, 131, 132]. Le chitosan ne semble pas provoquer de phénomène d'irritation locale ni de réaction immunologique, autre que celle naturellement induite suite à l'introduction d'un élément étranger dans l'organisme. Cependant, il serait intéressant d'effectuer des tests de sensibilisation pour évaluer la potentialité de survenue d'éventuelles réactions allergiques qui seraient légitimes compte tenu de son origine (crustacées)[129].

De nombreuses études *in vitro*, de biocompatibilité ont montré que le chitosan pouvait s'avérer être cytotoxique et par ailleurs provoquer une lyse des érythrocytes, bien que d'autres travaux n'aient démontré aucune cytotoxicité sur des cultures cellulaires [130, 133, 134].

Du fait de son activité biologique, le chitosan est capable de provoquer un phénomène de coagulation aboutissant à la formation de thrombus et à l'induction d'un phénomène d'agrégation plaquettaire [129, 135-137].

De plus, des travaux ont démontré que l'ingestion de chitosan par l'homme en tant que supplémentation orale diététique, à des doses de l'ordre du gramme ne montre aucun effet néfaste sur l'organisme [138-140].

En outre, le chitosan qui pénètre dans l'organisme par absorption n'est susceptible de causer une quelconque accumulation/rétention dans l'organisme puisque le polymère est naturellement converti en dérivés de type glucosamine qui sont soit excrétés soit intégrés dans le stock de sucres aminés de l'organisme.

4. Les différents dérivés du chitosan

Il est possible d'élargir le champ des applications du chitosan par divers types de modifications (fonctionnalisation et/ou réticulation).

D'une manière générale, l'utilisation du chitosan est restreinte par ses propriétés mécaniques insuffisantes à l'état natif, pour des applications plus larges dans divers domaines, tels que les domaines pharmaceutique ou biomédical. Le chitosan est un composé très versatile, la moindre modification de ses propriétés structurales peut induire d'importants changements dans ses interactions avec les composants des tissus biologiques ou les médicaments. Les propriétés biologiques du chitosan sont étroitement liées à ses propriétés physico-chimiques.

Le tableau suivant présente les différentes possibilités de dérivatisation de la chitine et du chitosan [141]:

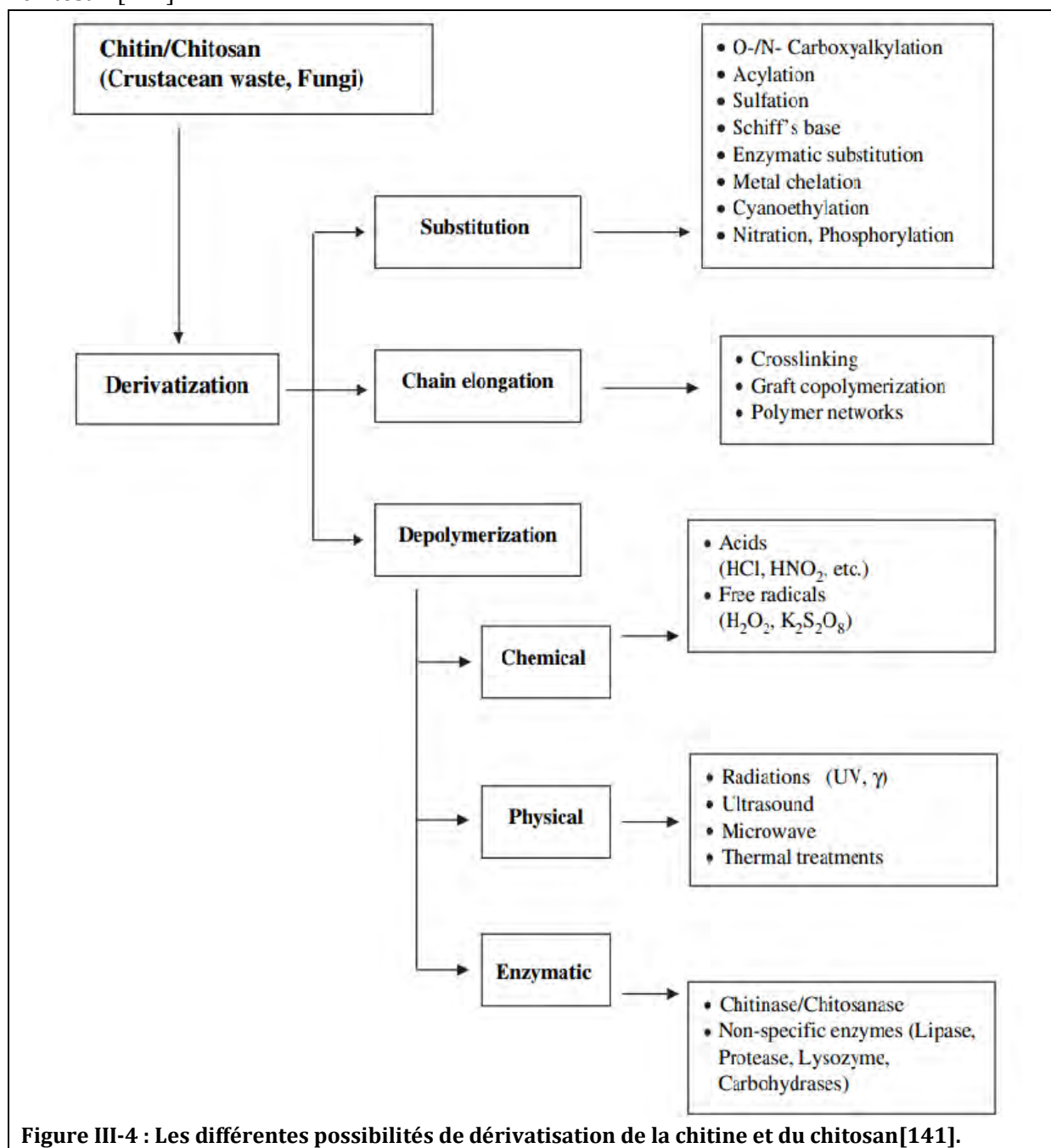


Figure III-4 : Les différentes possibilités de dérivatisation de la chitine et du chitosan[141].

L'élaboration de dérivés de chitosan présente de nombreux avantages et permet d'élargir les champs d'application de ce polymère. Lorsque l'on procède à la dérivatisation des groupements fonctionnels du chitosan, davantage de paramètres sont ajoutés pour influencer les propriétés de solubilité de celui-ci. La nature du substituant et le degré de substitution peut influencer de nombreuses propriétés physico-chimiques et biologiques[142].

L'obtention de dérivés permet de modifier les propriétés physico-chimiques du chitosan en élargissant par exemple la gamme de pH dans laquelle le chitosan peut se solubiliser, c'est notamment le cas du O-et N-Carboxyméthylchitosan ou encore de copolymères greffés de chitosan.

Par ailleurs, certaines modifications confèrent de nouvelles propriétés au polymère, c'est notamment le cas de l'ammonium de triméthylchitosan qui montre de bonnes propriétés de floculation avec des dispersions de kaolin suggérant ainsi des applications éventuelles dans la fabrication de papier ou encore de dérivés quaternaires qui possèdent des propriétés antistatiques. Enfin, l'alkylation du polymère permet d'augmenter la biodégradabilité[107].

5. Le chitosan : agent d'encapsulation de molécules actives

5.1 Relargage de principes actifs

Le chitosan peut être utilisé pour transporter et libérer des substances médicamenteuses. Dans ce type d'application, il est important que le chitosan soit hydrosoluble et chargé positivement. Ces propriétés lui permettent d'interagir avec des polymères chargés négativement (protéines par exemple) et les polyanions présents dans des environnements aqueux. Cependant, la rapide absorption d'eau et le fort degré de gonflement en milieu aqueux constituent deux inconvénients majeurs pour la préparation de systèmes de relargage contrôlé à base de chitosan. Ce gonflement se traduit par un relargage rapide des médicaments, incompatible avec les objectifs thérapeutiques envisagés. Ces problèmes disparaissent lorsqu'on utilise du chitosan greffé. Une abondante littérature porte sur les applications pharmaceutiques du chitosan. Par exemple, on a montré que le chitosan et ses dérivés tels que le N-triméthyl chitosan ou le N-carboxylméthyl chitosan, ont la capacité d'adhérer aux muqueuses, ce qui est utile pour le relargage de substances médicamenteuses [112, 142]. Des chitosans modifiés par l'acide acrylique utilisable comme polymères ayant des propriétés hydrophiles et mucoadhésives ont été récemment décrits [112, 130]. Des particules de chitosan greffés par l'acide poly(acrylique) ont été proposées comme transporteurs de médicaments et de protéines. Kumbar et al[143] ont préparé des microsphères réticulées de chitosan avec du GLU greffé de poly (acrylamide) et utilisé pour encapsuler l'indométacine (IM), un anti-inflammatoire non stéroïdien utilisé dans le traitement de l'arthrite. L'antidépresseur nifidine (NFD) peut être encapsulé dans des microsphères de chitosan réticulées par du GLU. Le N-laurylcarboxyméthylchitosane possédant des groupes hydrophobes et hydrophiles a été étudié pour le relargage du taxol dans des tissus cancéreux [144]. D'autres composés hydrophobes comme la bléomycine peuvent être complexés et transportés[145]. Divers travaux portant sur le relargage intracellulaire pour la thérapie génique utilisent ces matériaux. Par exemple, l'acide désoxycholique, qui est le composant principal des acides biliaires, a été utilisé pour rendre hydrophobe le chitosan afin d'obtenir des assemblages macromoléculaires à propriétés contrôlées pour le relargage de gènes non viraux. Le matériau permet d'introduire efficacement de l'ADN exogène dans des cellules de reins de singe[146]. Ce processus de transfert de gènes est efficace. Des billes de chitosan thiolé ont été

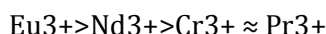
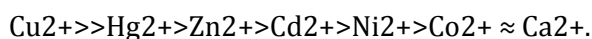
synthétisées pour être utilisées comme vecteur de médicaments sensibles au pH[147]. On a montré que ces billes de P-chitosan ont un grand potentiel pour être utilisé comme moyen de relargage ciblé de médicaments par voie orale afin d'éviter la forte acidité que l'on peut rencontrer dans l'estomac.

Des chitosan greffés par la β -cyclodextrine (CD) ont été proposés pour le relargage de principes actifs. En raison de la présence de motifs de β -CD, ces matériaux permettent un relargage plus lent du principe actif hydrophobe encapsulé. Enfin, les hydrogels de chitosan greffés ont montré une capacité plus grande pour encapsuler le médicament et un meilleur comportement au niveau du relargage[148]. En particulier, les systèmes qui combinent le chitosan et le poly(N-isopropylacrylamide) (PNIPAAm) ont montré des profils particulier de relargage qui peuvent être contrôlés en jouant sur le pH et la température, ce qui en fait des matériaux très prometteurs[149].

5.2 Complexes avec les ions métalliques

Le chitosan est connu pour posséder de bonnes propriétés chélatantes ; les groupements amines $-NH_2$ retrouvés sur les chaînes saccharidiques montrent de fortes interactions avec les ions métalliques. Un grand nombre de publications porte sur le potentiel lié aux interactions entre le chitosan et les métaux. La nature de l'ion métallique est importante car les mécanismes d'interactions varient.

Des études effectuées par *Rhazi et al* [150], ont montré la différence d'affinité qui existe entre le chitosan (sous forme de films) et des cations divalents et trivalents :



Plusieurs facteurs affectent la formation de complexes avec le chitosan dont le pH et le degré de polymérisation (DP). La nature de l'ion et du contre-ion joue aussi un rôle important dans l'interaction entre les unités glucosamine et le cation. Enfin, la complexation dépend de l'état physique du chitosan (film, fibre, gel, poudre ou solution) [151, 152].

D'après des études réalisées par *Rhazi et al* [150], le cuivre (II), cation montrant la plus grande affinité avec le chitosan, forme à $pH > 5$ un complexe de type I et à $pH < 5.8$, un complexe de type II (figure III-5). Cette équipe a démontré par des études potentiométriques et de dichroïsme circulaire (CD), la formation de complexes de type I lorsque le degré de polymérisation des chitooligosaccharides est inférieur à 6 et de type II pour le chitosan (polymère). Les propriétés chélatantes du chitosan sont appliquées notamment pour le traitement des eaux usées ou encore pour le développement de phases stationnaires chromatographiques pour la séparation des protéines et des saccharides [153, 154].

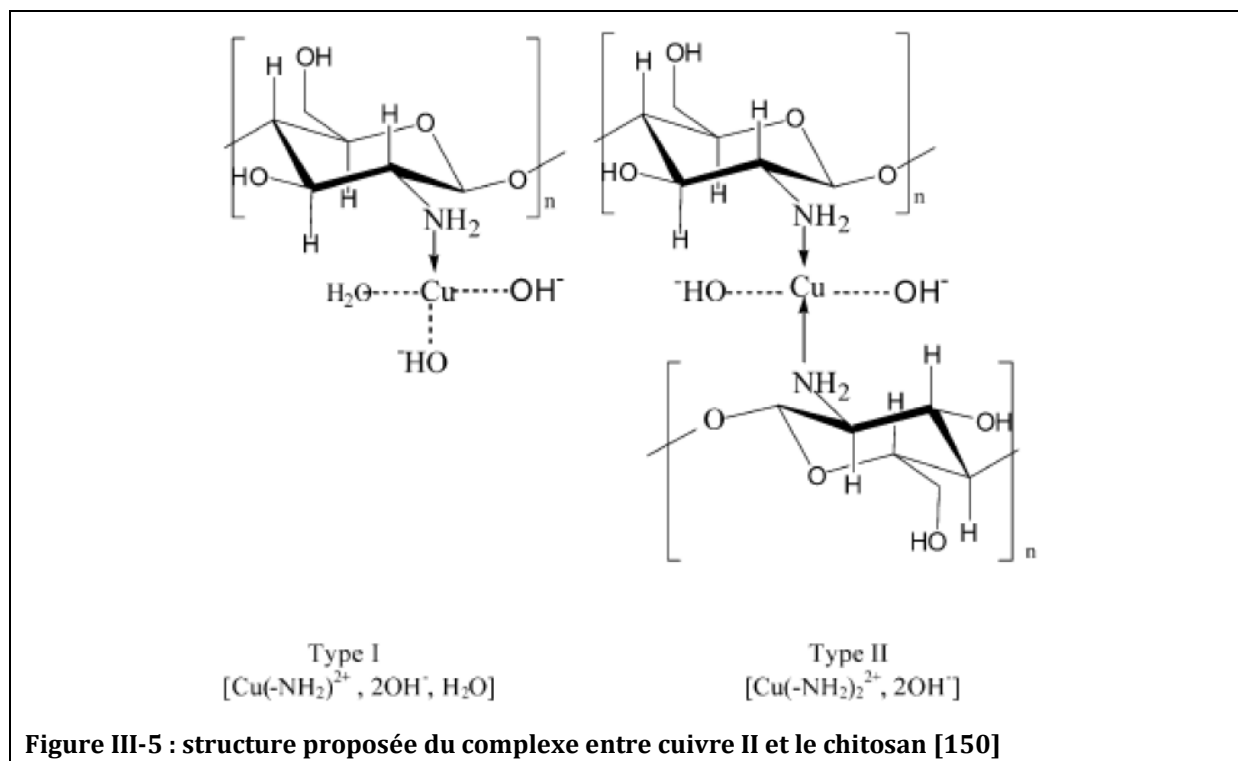


Figure III-5 : structure proposée du complexe entre cuivre II et le chitosan [150]

5.3 Complexes électrostatiques

Le chitosan a la capacité de former des complexes électrostatiques dans des conditions acides. On reconnaît deux différents types de complexes électrostatiques : la complexation avec des surfactants de charges opposées et la complexation avec des polyélectrolytes de charges opposées (PEC).

L'acidification des groupements fonctionnels du chitosan peut donner des groupements ammonium quaternaire qui vont former des liaisons hydrogène avec les fonctions hydroxyles de surface des pigments utilisés en cosmétologie. Le chitosan est précipité avec le pigment. Cette technique permet l'enrobage de certains pigments. Ce système d'enrobage présente l'avantage de disperser plus de 50% des pigments (lipophile) dans l'eau, d'être stable à des températures supérieures à 90°C et de stabiliser les émulsions[155].

5.3.1 Interactions avec les tensioactifs

Le chitosan à fort degré de désacétylation forme avec le dodécylsulfate de sodium (SDS) un système micellaire stable présentant une concentration d'agrégation critique (CAC) 100 fois plus petite que la concentration micellaire critique (CMC) du tensioactif lui-même[33, 34].

De plus, l'association entre une solution de chitosan et le SDS se caractérise par la formation de nanostructures ordonnées. Un système réticulé se crée entre une couche de gel de chitosan et les charges portées par le tensioactif.

5.3.2 Interactions avec divers polyélectrolytes

Plusieurs complexes sont répertoriés dans la littérature entre le chitosan et certains polymères d'origine naturelle ou synthétique. Les études se basent sur la relation qui existe entre la « stabilité » du système polymérique et la nature des groupements ioniques entrant en jeu. On trouve divers complexes électrostatiques formés avec l'acide polyacrylique, le xanthane, certains

carragénanes, l'alginate, la pectine, l'héparine, l'acide hyaluronique ou encore la chondroïtine [156-158]. Selon les conditions expérimentales, la complexation avec l'alginate ou l'acide hyaluronique montre l'interaction entre les groupements carboxylates ($-\text{COO}^-$) et les fonctions amines protonées ($-\text{NH}_3^+$) du chitosan [159].

Lors de formulations thérapeutiques orales sous formes de billes ou des comprimés, le chitosan peut créer une couche protectrice hydratée à pH gastrique. Ceci permet la libération de substances thérapeutiques par contrôle de la dissolution de l'alginate à pH élevés (milieu intestinal), pH pour lequel le chitosan devient insoluble. L'association peut également se faire à l'aide d'ions du type cationique, tel que le calcium (Ca^{2+}), permettant d'obtenir ainsi des complexes stables chitosan-alginate pH dépendants [160-162]. On retrouve un grand nombre de polyélectrolytes au niveau cellulaire notamment sur l'ADN. Plusieurs articles mentionnent les potentiels de complexation entre l'ADN et le chitosan, en particulier celui de faible masse moléculaire ou sous forme d'oligomères.

5.4 Vectorisation de siARN

5.4.1 Les propriétés du chitosan employé en tant que vecteur de siARN

Bien que l'efficacité *in vitro* de la technique de l'ARN interférence ait été prouvée, le challenge du franchissement des barrières extra et intracellulaires restent à surmonter pour que le siARN atteigne sa cible cellulaire.

De nombreuses études ont mis en évidence la difficulté pour les acides nucléiques comme les siARN de circuler dans la circulation générale, franchir les barrières cellulaires, échapper à la dégradation par l'endosome et le lysosome

Dans les conditions physiologiques, le chitosan peut aisément être dégradé par les lysozymes ou par des chitinases qui peuvent être produits par la flore commensale intestinale humaine, ou naturellement présente dans le sang.

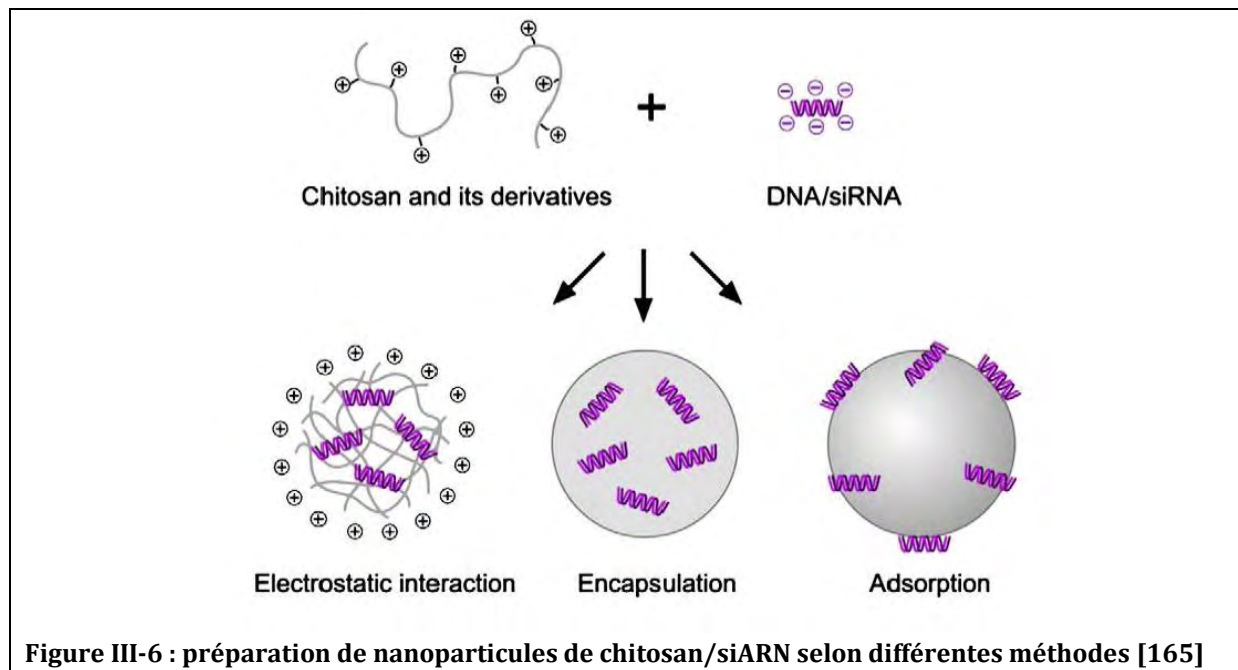
Par conséquent, le chitosan est un polymère largement employé dans les travaux de recherche de nombreuses industries et notamment, l'industrie pharmaceutique en tant que vecteur de molécules actives, il a même été proposé comme une alternative sûre à d'autres vecteurs non viraux comme les lipides cationiques pour la vectorisation d'acides nucléiques [163].

5.4.2 Formation de nanoparticules de siARN

Les caractéristiques essentielles du chitosan qui font de ce biopolymère, un vecteur potentiel de siARN sont ses propriétés cationiques. A pH acide, en dessous de la valeur du pKa, les fonctions amine primaire de la molécule deviennent chargées positivement permettant ainsi au chitosan de se lier via des interactions électrostatiques aux charges négatives portées par les fonctions phosphate du siARN. Ces interactions électrostatiques aboutissent à la formation spontanée de complexes appelés polyplexes, en milieu aqueux. Il existe trois méthodes de formation de complexes Chitosan/siARN, comme le montre la figure III-6, une méthode de complexation simple, une autre de gélification électrostatique (encapsulation de siARN) et une d'adsorption des siARN à la surface de nanoparticules de chitosan. La méthode la plus efficace, en termes d'efficacité de transfection et de force d'interaction entre chitosan et siARN, selon *Katas et Oya Alpar* étant celle de la gélification électrostatique [164].

Katas et Oya Alpar expliquerait la faible efficacité de transfection des complexes chitosan/siARN formés par simple complexation par la faiblesse des interactions électrostatiques créées entre

chitosan et siARN comparée aux interactions existantes au sein de complexes formés par la technique de gélification électrostatiques.



Plusieurs études ont tenté d'expliquer la faiblesse des interactions électrostatiques chitosan/siARN formées au cours de la technique de simple complexation, elles comparent la différence de forces des interactions électrostatiques existant au sein de complexes chitosan/ADN plasmidique et au sein de complexes chitosan/ siARN. Les résultats de cette étude suggèrent que le siARN se lie au chitosan d'une manière différente de celle de l'ADN plasmidique. Il a été reporté d'une part que le volume occupé par l'ADN plasmidique une fois condensé est 10 000 fois moins important que celui occupé lorsque l'ADN ne l'est pas et que d'autre part, une longueur minimale de 800 paires de bases pour que le processus de condensation ait lieu. Ces études mettent en valeur le fait que contrairement à l'ADN plasmidique, les siARN sont de petite taille (21 paires de bases) et moins linéaires contribuant aux faibles interactions avec le chitosan. Les auteurs suggèrent d'associer au chitosan plusieurs copies de siARN par entité cationique facilitant ainsi les interactions entre ces deux composés.

En milieu neutre ou alcalin, lorsque le chitosan est très faiblement chargé, les études d'électrophorèse sur gel mettent en évidence d'autres types d'interactions (non électrostatiques) entre le chitosan et les siARN. Les interactions sont de types hydrogènes ou hydrophobes permettant par ailleurs la formation de complexes entre chitosan et siARN.

De plus, les siARN peuvent également être encapsulées dans des matrices de chitosan en utilisant la méthode de préparation de nanoparticules.

D'après ce qui précède, il est possible d'avancer qu'il existe un rapport de charge azote sur phosphate optimal (N : P) pour lequel le chitosan a la capacité de condenser les siARN en des particules de taille adéquate pour permettre d'une part la pénétration cellulaire ou d'autre part la protection des acides nucléiques encapsulés.

Par ailleurs, il est important de préciser que de fortes interactions électrostatiques entre le chitosan et le siARN peuvent aboutir à une difficulté de relargage des acides nucléiques au niveau du cytoplasme de la cible [165].

5.5 Le chitosan en cosmétologie

Dans l'industrie cosmétique, les évolutions des réglementations françaises et européennes vis-à-vis de la santé publique et de l'environnement et la pression des consommateurs ont entraîné l'intégration de substances d'origine naturelle à la fois au niveau des produits, des formulations et des procédés. Le chitosan présente un réel intérêt en cosmétique du fait d'un cumul de fonctions. Compte tenu de sa structure chimique, il présente l'avantage, contrairement à la majorité des produits classiques, de posséder un caractère polycationique. De ce fait les molécules chargées négativement peuvent interagir avec la macromolécule de chitosan. C'est le cas de protéines de la peau, des lipides, des tensioactifs, des détergents et des graisses du cheveux[107]. Le chitosan peut donc être utilisé en tant qu'agent antistatique, émoullissant et/ou humectant[166, 167]. De plus, comme la plupart des polysaccharides, le chitosan, grâce à la liaison glycosidique est un polymère semi-rigide et donc un bon agent épaississant. La possibilité de formation de ponts hydrogène inter-macromoléculaires augmente encore ses performances allant jusqu'à un comportement de type gel physique[107]. Un autre avantage du chitosan est que ces propriétés viscoélastiques peuvent varier de façon significative même pour des petites quantités de polymères. Toutes ces interactions lui confèrent d'excellentes propriétés filmogènes. Intégré à des crèmes ou à des pommades, il donne également des propriétés antiseptiques et cicatrisantes à ces produits pour la peau, ainsi que des propriétés de régénération cellulaire.

Par ailleurs, le chitosan est également employé pour l'encapsulation de substances actives en cosmétologie. Gomma et al. [168] ont exploité les propriétés du chitosan afin d'encapsuler un filtre UV, l'acide phenylbenzimidazole sulfonique (PBSA). Ces microparticules ont été mises au point grâce à un procédé de réticulation par émulsion en utilisant le glutaraldéhyde et montrent une réelle efficacité en termes de protection solaire. Yenilmez et al[169] ont quant à eux étudié les caractéristiques de libération et évalué le pouvoir antioxydant *in vivo* et *in vitro*, de la vitamine E incorporée dans des microsphères de chitosan pour une application topique. L'objectif de leur étude est de mettre au point un système stable d'encapsulation de la vitamine E capable de franchir la barrière du *Stratum corneum* afin d'exercer son action antioxydante. En utilisant la technique du spray-drying, ils ont réussi à mettre au point des microparticules stables de chitosan encapsulant de la vitamine E et possédant un pouvoir antioxydant et pouvant être incorporés dans des formulations cosmétiques anti-âge.

6. Conclusions

La demande du public en matière de produits renouvelables et biodégradables croît de jour en jour avec la sensibilisation à la protection de l'environnement. Il existe une recherche active visant à produire des matériaux plus respectueux de l'environnement et de la santé. Parmi les matières premières bon marché, renouvelables et non nocives pour l'environnement, on retrouve les polysaccharides qui suscitent un intérêt croissant pour le développement de particules biodégradables pour la délivrance de principes actifs. L'incorporation de molécules actives dans des systèmes particulaires à base de polysaccharide, permet la protection de ces dernières contre les phénomènes de dégradation *in vitro* et *in vivo*, l'augmentation de l'efficacité thérapeutique, la prolongation et le contrôle de l'effet dans le temps. Les microparticules à base de polymère attirent particulièrement l'attention des chercheurs de par leur flexibilité à obtenir un profil de délivrance de principe actif contrôlé, leur faible coût, la facilité de modification de leur structure et leur large gamme de propriétés physico-chimiques. Parmi les polysaccharides qui ont retenu l'attention des chercheurs dans le domaine de la délivrance de principes actifs, on retrouve la chitine et son principal dérivé, le chitosan. Ses propriétés exceptionnelles que nous avons précédemment énumérées expliquent l'engouement pour ces macromolécules naturelles, extraites de carapaces de crustacés, considérées il y a encore peu comme des déchets. Il s'est en effet avéré que ces coproduits d'origine marine, très bon marché, peuvent participer à l'élaboration de produits commerciaux à haute valeur ajoutée. En pratique, toutes les applications du chitosan sont intimement liées à son caractère polycationique qui est unique parmi les polymères naturels. De nombreux secteurs industriels sont concernés, allant des cosmétiques à l'industrie agroalimentaire, en passant par la pharmacie et l'ingénierie biomédicale. Les perspectives sont variées et nombreuses. De nouveaux marchés prometteurs sont également susceptibles de s'ouvrir, comme par exemple dans le domaine des biotechnologies.

Les nombreux avantages que possède le chitosan ont particulièrement retenu notre attention afin d'utiliser ce polymère pour la mise au point d'un système d'encapsulation de molécules actives, son caractère biocompatible en faisant un élément de choix pour des applications cosmétiques.

CHAPITRE IV :
ELABORATION ET CARACTERISATION D'UN
VECTEUR DE BASE

Chapitre IV

Elaboration et caractérisations d'un vecteur de base

1. Présentation de l'objectif de l'étude

1.1 Introduction

Ce projet introduit un concept novateur d'auto-microformulation spontanée basée sur le principe de l'économie moléculaire qui suppose de faire jouer à un même produit, le rôle de réactif et d'agent constitutif du milieu[170]. Ce concept a été largement exploité au sein de l'équipe SMODD à travers la formation spontanée de vésicules en solution aqueuse. Ces travaux, que nous avons évoqué au niveau de la partie 4.5.2.4, consistent à associer un principe actif amphiphile à un tensio-actif dérivé de sucre biocompatible afin d'obtenir un assemblage catanionique bioactif[171, 172].

Dans cette dynamique, l'objectif de ce projet est de sélectionner divers ingrédients capables de s'auto-assembler dans l'eau par l'intermédiaire d'interactions faibles (Interactions électrostatiques, hydrophobes ou liaisons hydrogène) afin d'aboutir à la formation de microparticules auto-formulées.

Dans le cas précis de ce projet, une préparation dépigmentante sera microformulée en utilisant les ingrédients suivant :

- Un promoteur de pénétration cutané ; l'acide oléique ou l'acide linoléique,
- Un ingrédient actif aux propriétés dépigmentantes,
- Un liant et un transporteur d'actif ; le chitosan,

Chaque élément joue un rôle clé susceptible d'apporter une efficacité maximale au système. Dans un premier temps, le promoteur de pénétration cutanée doit permettre au système de franchir les différentes couches de l'épiderme. L'agent actif devra donc franchir les quatre couches de l'épiderme (*Stratum corneum*, *Stratum lucidum*, *Stratum granulosum* et *Stratum spinosum*) avant d'atteindre sa cible, le mélanocyte qui se situe au niveau de la couche basale de l'épiderme. Puis le transporteur, aura quant à un lui pour objectif de véhiculer l'actif au niveau de son site d'action afin d'obtenir une efficacité dépigmentante optimale.

Les particules de complexes ternaires ainsi auto-formulées seront à la fois le contenu et le contenant.

1.2 Les éléments du complexe

1.2.1 Oligomère de chitosan

Le chitosan a particulièrement retenu notre attention du fait de ces remarquables propriétés en solution, comme nous l'avons décrit dans le chapitre III, qui font de ce polymère un élément clé pour la réalisation de nos objectifs.

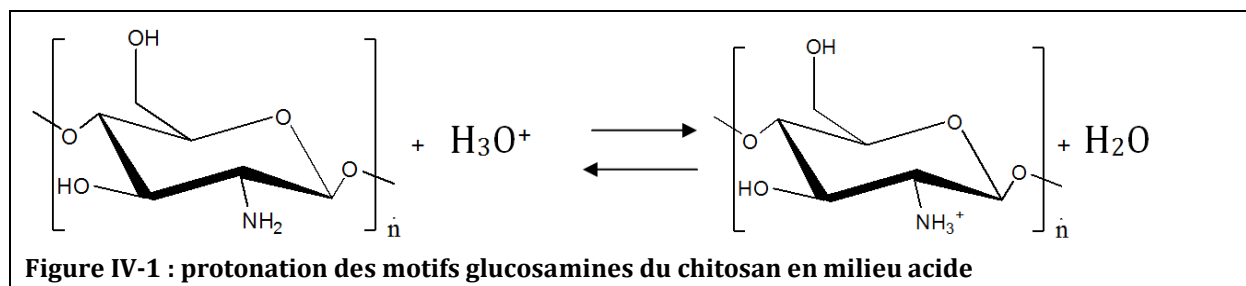
Dans un premier temps, le chitosan joue un **rôle de transporteur** d'ingrédient actif capable de s'associer à ce dernier et faire en sorte qu'il atteigne sa cible.

Le chitosan est souvent considéré comme un copolymère cationique, linéaire et flexible. Cependant, il ne faut pas oublier que cette notion de rigidité dépend également du degré de désacétylation (DD), car la rigidité diminue avec le (DD) [119]. Rinaudo et al. [173] et Pa et Yu [174] ont étudié l'effet du pH et du (DD) sur la viscosité du chitosan en solution. En particulier, Pa et Yu [174] ont montré que les chaînes de chitosan dont le (DD) est égale à 85 % sont flexibles seulement pour les pH inférieurs à 3. Il convient également de remarquer que le (DD) n'est pas le seul paramètre qui influe sur les propriétés du polymère [107, 175].

Dans un second temps, le chitosan joue un **rôle de liant** au sein de notre complexe. En effet, par l'intermédiaire de ces fonctions amines protonées et de ces fonctions carbonyles, le chitosan interagit avec les différents éléments du complexe, jouant ainsi un rôle de matrice d'ancrage aux différents éléments du système.

Par ailleurs, le chitosan est connu pour être capable de compacter de grosses molécules comme l'ADN ou l'ARN [163, 164].

Le chitosan est l'un des rares polyélectrolytes naturels cationiques [117, 133]. Cette propriété lui confère la capacité de former, en solution, des complexes électrostatiques. En milieu acide, il se comporte comme un polycation à forte densité de charge et dont l'état d'ionisation est décrit par l'équilibre suivant (Figure IV-1) :



Mises à part les interactions électrostatiques, le chitosan est susceptible de former des complexes par d'autres types d'interactions faibles. Ainsi, la présence de groupements acétylés lui confère un caractère amphiphile [111, 128] ce qui lui permet de former des complexes par interactions hydrophobes. Par ailleurs, la présence de nombreux sucres lui permet de former des complexes par l'intermédiaire de liaisons hydrogènes ou par chélation [150-154].

1.2.2 Les acides gras

L'acide oléique et l'acide linoléique (tableau IV-1) ont été sélectionnés pour être intégrés dans le complexe. Ces deux acides ont été choisis pour leur double propriété de promoteur de pénétration cutanée et d'agent dépigmentant.

En effet, ces deux acides gras ont été largement étudiés en tant que molécules promotrices de pénétration cutanée pour le développement de formules à application topique ou transdermique contenant différents types de substances actives, propriété qui a été développée précédemment [176].

Concernant le mode d'interaction entre l'acide gras et le chitosan ; d'un point de vue structural, les acides gras sont composés d'une chaîne carbonée aliphatique et hydrophobe et d'un groupement carboxyle pouvant s'ioniser et ainsi apporter une charge négative pouvant interagir avec la fonction ammonium NH_3^+ du chitosan, en solution acide.

Par ailleurs, le caractère hydrophobe de la longue chaîne carbonée en C18 permet d'envisager des interactions de type hydrophobe et notamment avec les groupements acétyles du chitosan. Le groupement carboxyle permet également d'envisager des interactions de types électrostatiques avec les sels de chitosan chargés positivement.

Dans notre étude, nous exploiterons toutes ces caractéristiques afin d'établir des interactions avec le chitosan.

D'autres acides gras ont également été testés en vue de leur intégration aux complexes. Le tableau suivant résume l'ensemble des acides gras utilisés dans cette étude.

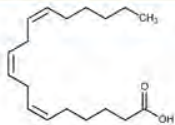



Acide gras	Structure chimique	Formule brute	Log P (Calculé)
Acide linoléique		$\text{C}_{18}\text{H}_{30}\text{O}_2$	6,5
Acide linoléique		$\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{O}_2$	7,0
Acide oléique		$\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{O}_2$	7,4
Acide stéarique		$\text{C}_{18}\text{H}_{36}\text{O}_2$	7,8

Tableau IV-1 : récapitulatif des acides gras utilisés au cours de l'étude

1.2.3 Ingrédients actifs aux propriétés dépigmentantes

Le troisième élément de ce complexe ternaire est une molécule active aux propriétés dépigmentantes. Différentes molécules sont testées (tableau IV-2). En fonction des

caractéristiques structurales de cette molécule, celle-ci interagit avec le chitosan par le biais de liaisons électrostatiques, hydrophobes ou hydrogènes.

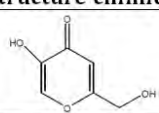
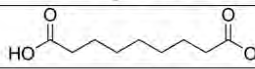
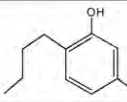
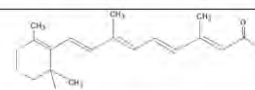
Ingrédients actifs	Structure chimique	Log P
Acide kojique		- 0,6
Acide azélaïque		1,2
N-butyl resorcinol		2,7
R000342		3,0
Acide rétinoïque		6,2

Tableau IV-2 : récapitulatif des ingrédients actifs utilisés au cours de l'étude

1.3 Conclusions

L'objectif de ce travail est résumé sur la figure suivante :

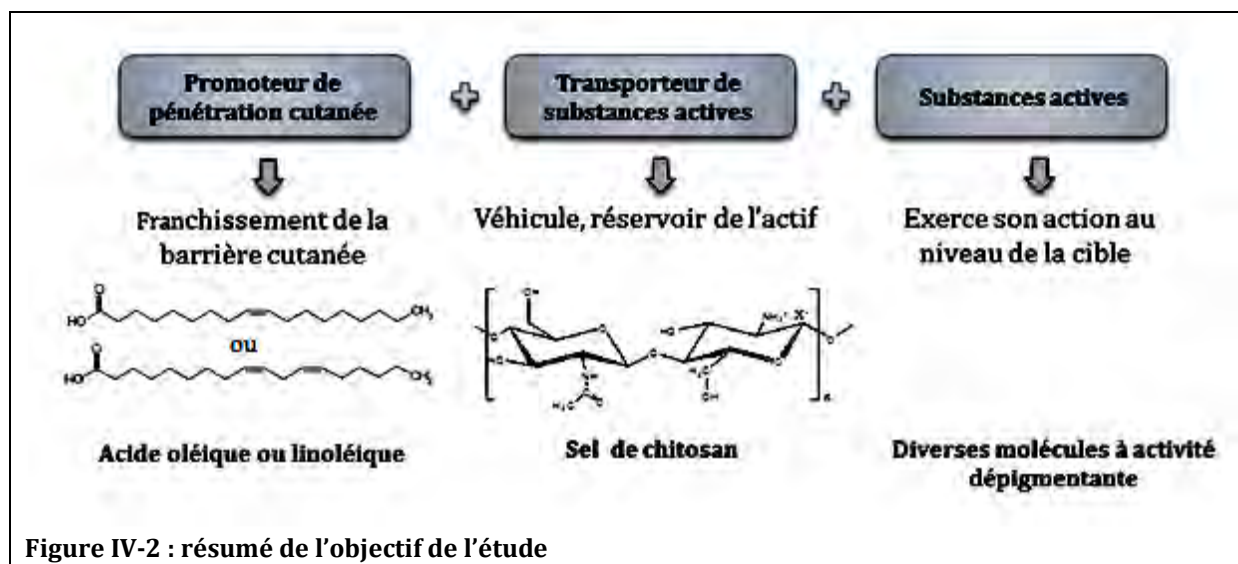


Figure IV-2 : résumé de l'objectif de l'étude

Pour ce faire, nous avons procédé par étape ; dans un premier temps, il s'est agi de mettre au point et de caractériser un vecteur de base à partir d'un sel de chitosan que l'on va faire interagir dans un second temps avec un acide gras ; l'acide oléique ou linoléique pour former un complexe binaire qui sera à son tour caractérisé d'un point de vue physico-chimique. Enfin, la dernière étape de ce travail consiste à intégrer au sein de ce complexe binaire de linoléate ou oléate de lactochitosan une substance active aux propriétés dépigmentantes afin de former un complexe ternaire.

2 Elaboration et caractérisations physico-chimiques du vecteur de base à partir d'un sel de chitosan

2.1 Introduction

La première partie de cette étude consiste en la mise au point du vecteur de base, constitué d'un sel de chitosan qui joue le rôle de transporteur de substances actives. Afin de réaliser cet objectif, différentes voies de préparation ont été testées et les objets formés, caractérisés. Dans cette partie de l'étude, sont donc détaillées l'ensemble des voies de préparation qui ont permis d'aboutir à l'élaboration du vecteur de base, sous forme de sel de chitosan. Les critères d'évaluation de ces différentes voies de préparation du vecteur de base sont, premièrement, la capacité du sel de chitosan préparé, à former des objets en solution, deuxièmement, le taux d'intégration d'acide gras capable de se fixer au vecteur de base et enfin la capacité de ce vecteur à se redisperser en solution aqueuse, après lyophilisation. Pour ce faire, nous avons utilisé des solutions acides de nature différentes, pour solubiliser le chitosan, cette solubilisation se faisant grâce à la protonation des fonctions amines du chitosan (NH_3^+), susceptibles d'interagir avec les fonctions carboxylates (COO^-) de l'acide gras, par un système d'échange de contre-ions.

2.2 Voie du chlorhydrate de chitosan

Dans un premier temps, le chitosan est solubilisé dans une solution d'acide chlorhydrique. Les fonctions amines (NH_2) du chitosan se protonent pour donner des fonctions ammonium (NH_3^+). Dans un second temps, nous faisons interagir le chlorhydrate de chitosan formé avec l'acide oléique, afin de tester les capacités d'interaction entre ces deux éléments.

2.2.1 Mode opératoire

Préparation du chlorhydrate de chitosan (Figure IV-3)

Le chlorhydrate de chitosan est préparé en solubilisant une masse (m) de chitosan dans une solution d'acide chlorhydrique. Le chitosan se solubilise en milieu acide par protonation de ses fonctions amine libres.

Pour ce faire, on utilise un oligomère de chitosan de faible viscosité, caractérisé par un poids moléculaire moyen de 168,15 g/mol (Environ 20 motifs, cette masse moléculaire moyenne a été calculée en tenant compte du degré de désacétylation du chitosan utilisé) et un degré de désacétylation de 85 % que l'on solubilise dans une solution d'acide chlorhydrique 0,3 N.

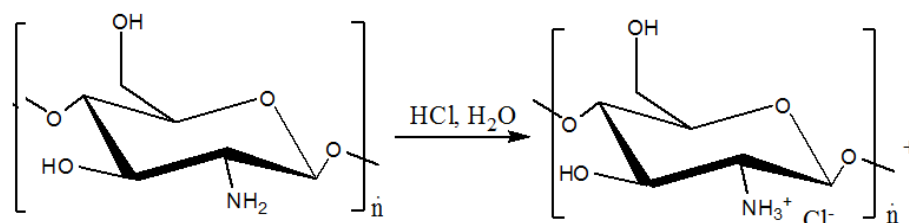


Figure IV-3 : réaction de formation de sels de chlorhydrate chitosan

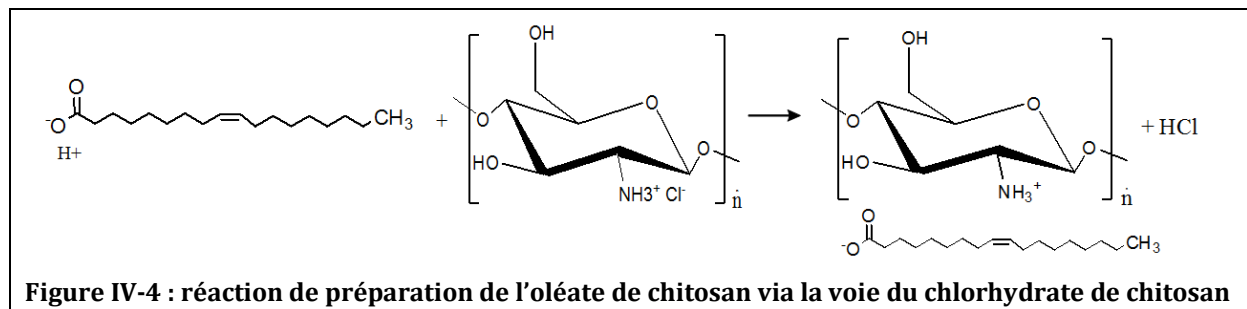
Le chitosan, sous forme d'oligomère et l'acide chlorhydrique sont introduits dans les proportions stœchiométriques suivantes :



Une fois le chlorhydrate de chitosan obtenue, nous cherchons à le faire interagir avec l'acide oléique, afin de former de l'oléate de chitosan.

Préparation de l'oléate de chitosan via le chlorhydrate de chitosan :

La réaction de préparation de l'oléate de chitosan (figure IV-4) est fondée sur le possible échange de contre-ions entre les ions carboxylates de l'acide oléique (COO^-) et l'ion chlorure (Cl^-) provenant du sel de chlorhydrate de chitosan. Une acidification du milieu a lieu en cours de réaction par formation d'acide chlorhydrique. Toutefois, la formation d'HCl en cours de réaction peut être un facteur limitant, cette forte acidité pouvant déplacer l'oléate vers sa forme acide.



L'acide oléique est introduit de sorte à se situer dans les proportions suivantes :



2.2.2 Caractérisations physico-chimiques

2.2.2.1 Aspect macroscopique de la dispersion obtenue

Après lyophilisation, le produit obtenu est redispersible dans l'eau, dans laquelle il se présente sous la forme d'une dispersion laiteuse et stable.

2.2.2.2 Suivi de pH au cours de la réaction

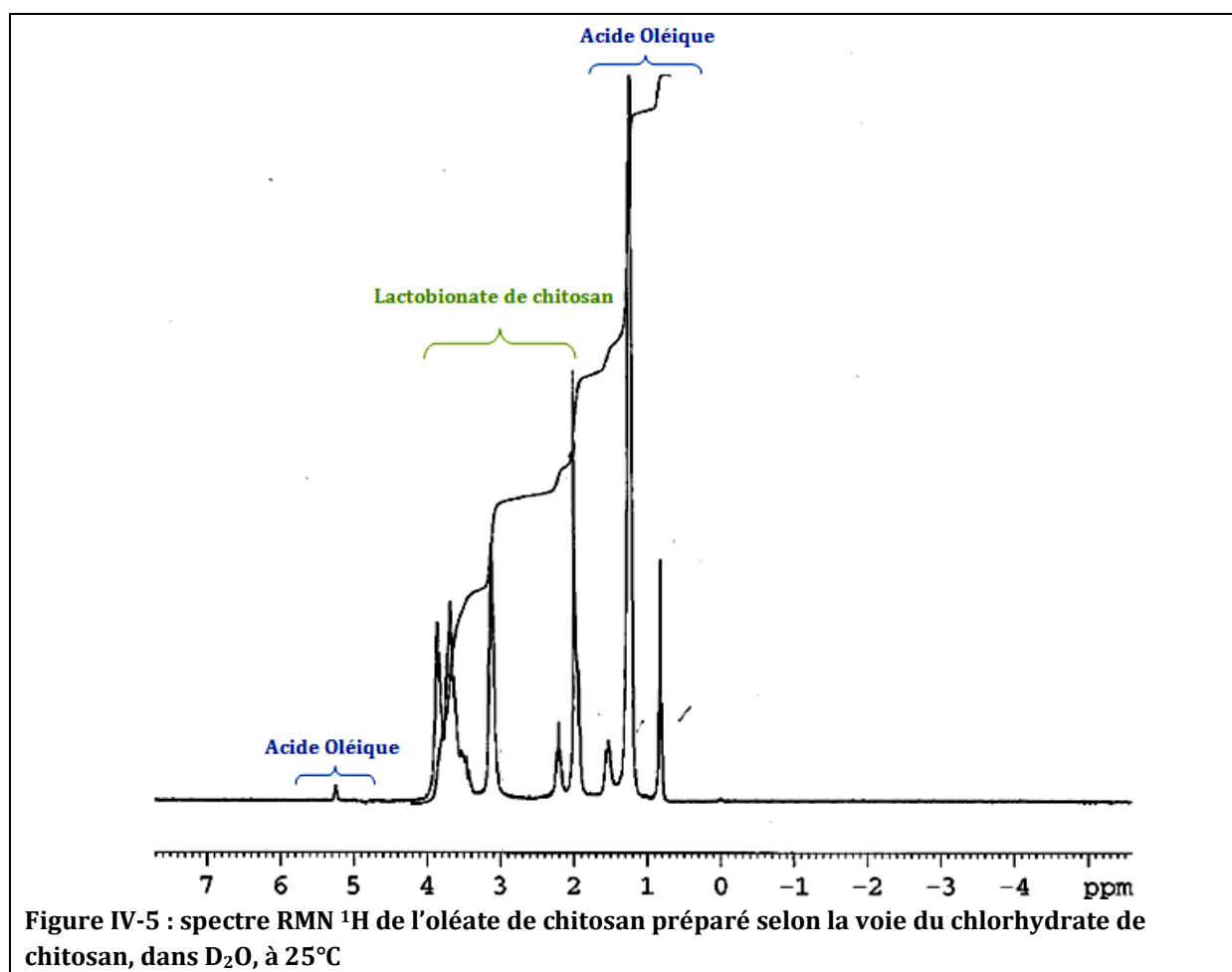
Au cours la réaction, on observe une évolution du pH de 3,2 à 2,2. Cette acidification du milieu réactionnel peut s'expliquer par le fait qu'il y a formation d'HCl au cours de la réaction de préparation de l'oléate de chitosan. Ce phénomène d'acidification provoque un déplacement de l'équilibre acide oléique/ion oléate vers la forme acide, défavorisant ainsi les interactions de type électrostatique qui peuvent avoir lieu entre l'oléate et le chlorhydrate de chitosan, par échange de contre-ion Cl^- et oléate.

2.2.2.3 Résonance magnétique nucléaire (RMN)

Les analyses de RMN présentent plusieurs intérêts :

- ✓ Identification des fonctions chimiques présentes au sein du complexe d'oléate de chitosan,
- ✓ Contrôle de l'intégrité chimique des fonctions introduites,
- ✓ Détermination du taux de fixation d'acide oléique sur le chitosan. En effet, en utilisant le proton anomérique du chitosan qui intègre pour 1, il est possible d'évaluer la quantité d'acide oléique qui a interagi avec le chlorhydrate de chitosan.
- ✓ Contrôle du degré de désacétylation du chitosan en fin de réaction afin de s'assurer que celui-ci n'a pas subi de dégradation chimique au cours de la réaction de préparation du complexe.

La figure suivante présente le spectre RMN ^1H du complexe d'oléate de chitosan :



Par l'interprétation de ce spectre, il est possible de confirmer la présence du chitosan et de l'acide oléique, tous deux présentant une bonne intégrité chimique. En effet l'acide oléique possède une double liaison éthylénique particulièrement sensible aux phénomènes d'oxydation. La présence du déplacement chimique à 5,3 ppm caractéristique des protons éthyléniques permet de s'assurer de l'intégrité chimique de l'acide oléique. Par ailleurs, il est également possible de calculer le degré de désacétylation (ou d'acétylation) du chitosan. En effet, le degré d'acétylation du chitosan est calculé en faisant le rapport des intégrations de la partie acétylée

du chitosan sur le total des intégrations de la partie acétylée et désacétylée. Le résultat de ce calcul montre que le taux d'acétylation du chitosan est de 10% (donc un taux de désacétylation de 90%), ce qui témoigne du fait que le chitosan n'a donc pas subi de dégradation en cours de réaction. Enfin, il est également possible de déterminer le taux de fixation d'acide oléique sur le sel de chitosan. Le taux de fixation d'acide oléique sur le chitosan est calculé en faisant le rapport des intégrations de l'acide oléique sur le proton anomérique du chitosan. Le taux d'acide gras fixé est alors de 14% (pour rappel : il a été introduit en proportion molaire, deux fois moins d'acide linoléique que de fonctions amine du chitosan).

Ce faible taux de fixation peut s'expliquer par le fait que le chitosan utilisé dans nos travaux possède un degré d'acétylation de 15 % et donc peu de fonction acétyle susceptibles d'interagir avec la longue chaîne carbonée hydrophobe de l'acide oléique.

2.2.2.4 Spectroscopie infrarouge (IR)

La spectroscopie IR est une méthode que nous avons employée pour caractériser les complexes acides gras/chitosan formés car elle nous permet d'obtenir différentes informations concernant les propriétés structurales de ces complexes.

L'observation des différentes bandes d'absorption IR permet dans un premier d'identifier les fonctions chimiques présentes au niveau du complexe formé et éventuellement de s'assurer de la formation d'un complexe entre l'acide gras et le chitosan.

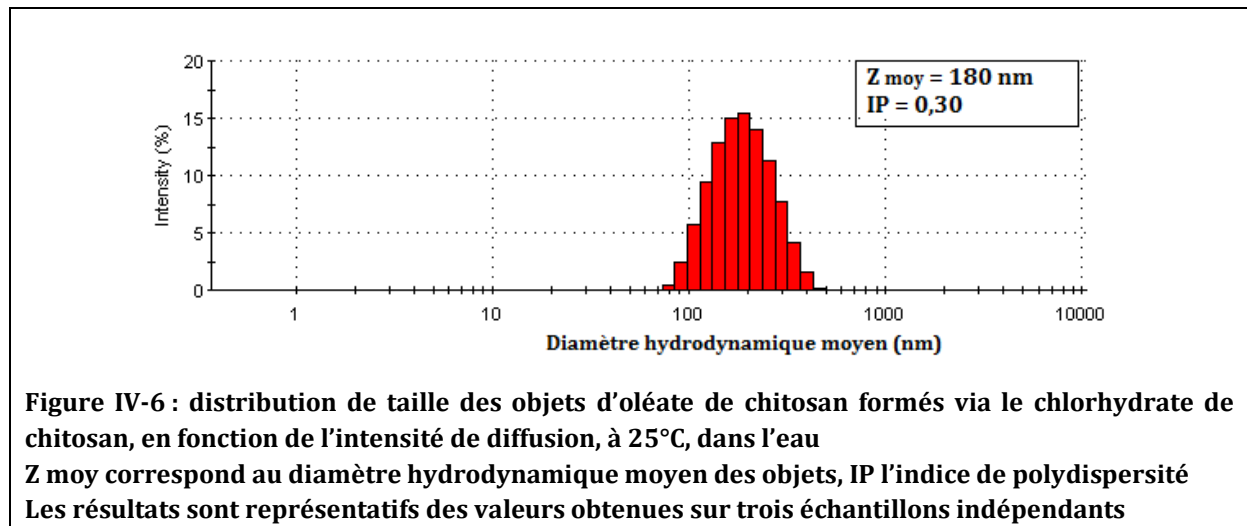
Par ailleurs, cette technique permet de caractériser le type d'interaction qui s'établit entre l'acide gras introduit et le chitosan. Par conséquent, grâce à cette méthode spectroscopique, nous sommes en mesure de préciser si les interactions qui s'établissent au sein des complexes formés sont de type électrostatique, hydrophobe ou les deux.

L'absence de bande d'absorption caractéristique de la fonction carboxylate (COO^-) ($\nu_{\text{COO-}}$ Carboxylate = 1419; 1529; 1616 cm^{-1}) permet d'en déduire que l'acide oléique et le chlorhydrate de chitosan forment un complexe par l'intermédiaire d'interactions de type hydrophobe. En effet, la présence de bandes d'absorption spécifiques de la fonction carboxylate aurait témoigné d'un échange entre la fonction carboxylate de l'acide oléique et l'ion chlorure, ce qui n'est pas le cas. De ce fait, nous en déduisons que cette complexation intervient grâce aux interactions entre la longue chaîne carbonée, hydrophobe de l'acide oléique et les fonctions acétyles du chitosan.

2.2.2.5 Taille des complexes formés

La technique de la diffusion dynamique de la lumière (DLS) a été exploitée pour déterminer la taille et la distribution de taille des objets formés.

Les complexes formés présentent une taille de l'ordre de 200 nm avec un indice de polydispersité de 0,3. Les résultats de ces mesures sont présentés sur la figure ci-dessous :



2.2.2.6 Morphologie des complexes formés

Les objets ont été observés en solution aqueuse, en microscopie électronique à transmission (MET) et présentent une morphologie sphérique et un aspect homogène comme en témoigne les clichés suivants :

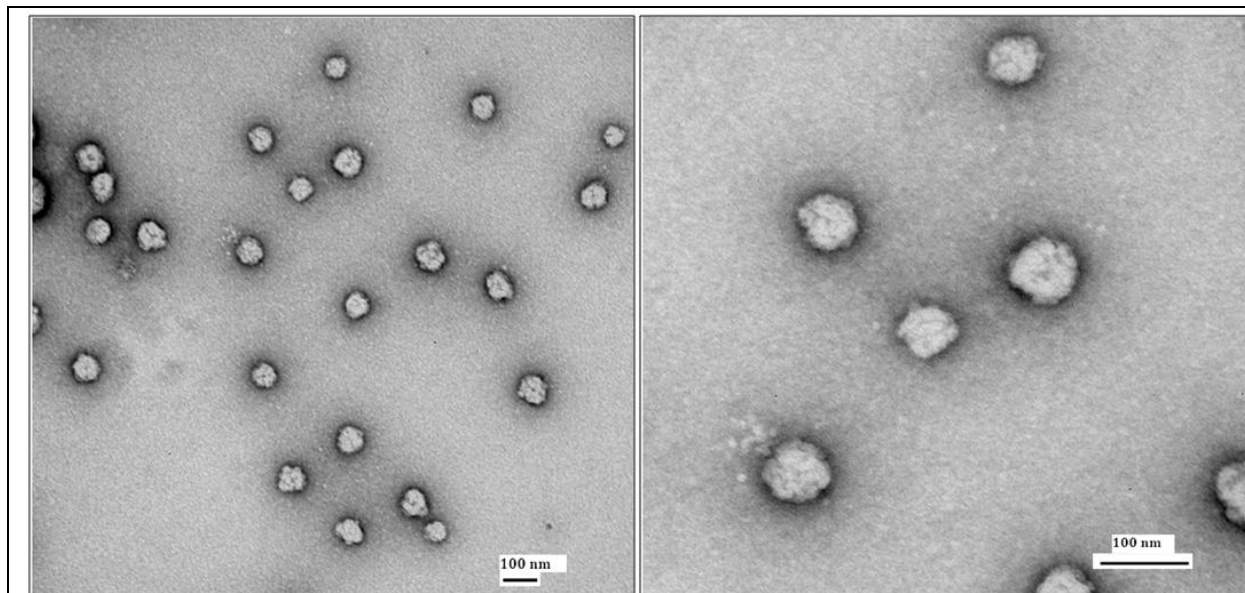


Figure IV-7 : Clichés de microscopie électronique à transmission des complexes d'oléate de chitosan formés via le chlorhydrate de chitosan

Les complexes formés présentent une morphologie sphérique et une taille moyenne de l'ordre de 200 nm.

Afin d'augmenter le taux de fixation d'acide gras sur le chitosan, il est impératif de favoriser l'échange entre l'ion chlorure et l'ion oléate et par conséquent, d'éviter une acidification du milieu au cours de la réaction. Pour ce faire, il est préférable de remplacer l'acide chlorhydrique qui est un acide fort par un acide faible ne provoquant pas de forte acidification du milieu réactionnel ce qui déplacera davantage l'équilibre acide oléique/ ion oléate vers la forme déprotonée.

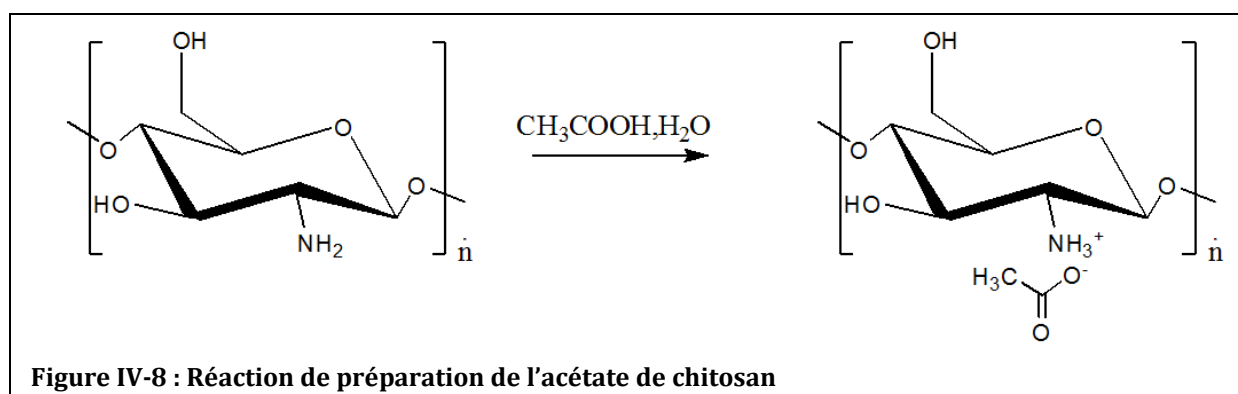
2.3 Voie de l'acétate de chitosan

Afin d'éviter une acidification trop forte du milieu réactionnel et donc permettre un meilleur échange de contre-ions entre l'ion carboxylate de l'acide oléique (COO^-) et le contre-ion chlorure du sel de chitosan, la solution d'acide chlorhydrique a été remplacée par une solution d'acide acétique. Le protocole est identique à celui évoqué dans la voie chlorhydrate de chitosan, excepté le fait qu'au cours de la réaction, il n'y a pas formation d'un acide tel que HCl.

2.3.1 Mode opératoire

Préparation de l'acétate de chitosan (Figure IV-8) :

L'acétate de chitosan est préparé selon le même mode opératoire que le chlorhydrate de chitosan à partir d'une solution d'acide acétique 17,4 N.



De façon similaire à la voie du chlorhydrate de chitosan, les quantités d'acide acétique ainsi que de chitosan sont introduites de sorte à se situer dans des conditions stœchiométriques :

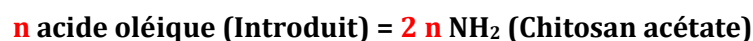


Le mode opératoire suivi pour synthétiser l'acétate de chitosan est identique à celui suivi pour la préparation du chlorhydrate du chitosan.

Préparation de l'oléate de chitosan via l'acétate de chitosan :

La réaction est fondée sur l'échange de contre-ions entre l'ion carboxylate (COO^-) de l'acide oléique et l'ion acétate (CH_3COO^-).

Au niveau des quantités de matières introduites, nous procédons de façon identique à la partie 2.3.1.



Le mode opératoire suivi est identique à celui décrit dans la partie 2.3.1 (figure IV-9).

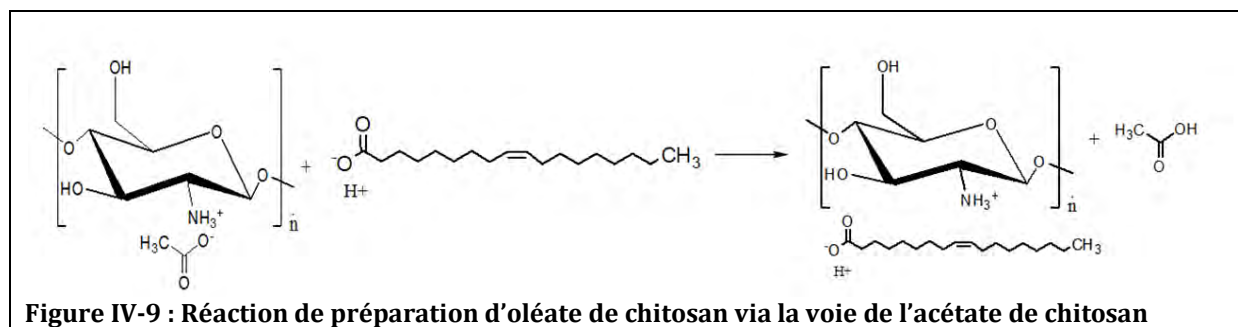


Figure IV-9 : Réaction de préparation d'oléate de chitosan via la voie de l'acétate de chitosan

La caractérisation des complexes formés est basée dans un premier temps sur l'observation visuelle de la présence ou non d'un précipité.

2.3.2 Caractérisations physico-chimiques

Le produit obtenu après lyophilisation précipitant dans l'eau, seule une analyse en spectroscopie IR a pu être réalisée sur l'échantillon obtenu.

❖ Suivi du pH au cours de la réaction

L'évolution du pH au cours de la réaction est faible et reste favorable au déplacement de l'équilibre acide oléique/ oléate vers la forme oléate, puisque celui-ci évolue de 4,6 en début de réaction à 5,0 en fin de réaction. Cette évolution de pH est en faveur d'échanges de contre ions entre l'oléate et le contre-ion du sel de chitosan et donc à l'établissement d'interactions électrostatiques entre ces deux éléments.

❖ Spectroscopie infrarouge

Des bandes d'absorption caractéristiques de la présence de certaines fonctions, nous permettent de supposer la fixation d'acide oléique sur le chitosan aboutissant donc à la formation d'un complexe binaire. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau suivant :

Ingrédients	Fonctions chimiques	Bandes d'absorption (cm ⁻¹)
Chitosan	C=O (amide)	1635
	NH (amide)	1462
	OH (alcool lié)	3447
	OH (chitosan)/ C-H(sp ³)	Plus faible
Acide acétique/ion acétate	C=O (acide)	1707 (peu intense)
	COO- (Acétate)	1558 et 1412 cm ⁻¹
Acide oléique	C=O (acide)	1707 (peu intense)

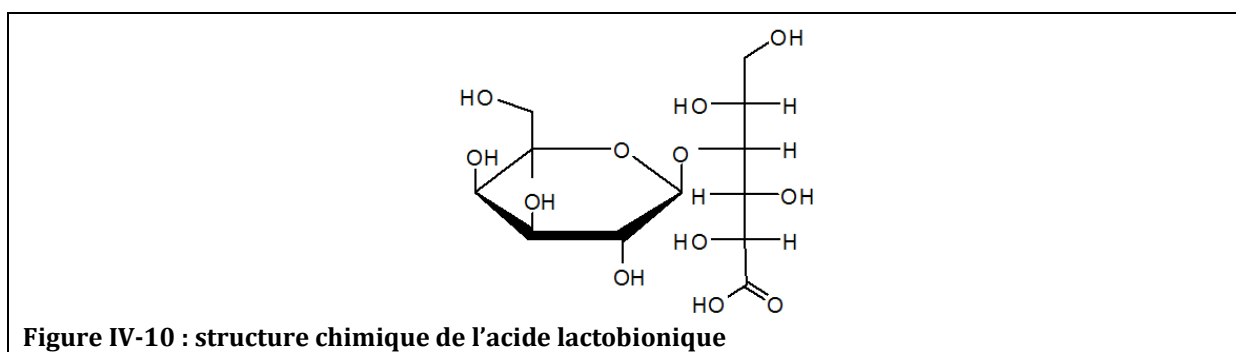
Tableau IV-3 : bandes d'absorption caractéristiques des fonctions présentes au sein du complexe

Le produit obtenu précipitant dans l'eau, nous pouvons supposer un fort taux de fixation d'acide oléique sur le chitosan, allant dans le sens de l'établissement d'interactions de type électrostatiques entre ces deux éléments.

Pour pouvoir confirmer cette hypothèse, nous avons cherché à identifier la bande d'absorption caractéristique de la présence de fonctions carboxylate. Toutefois, cette dernière se trouve au même niveau d'absorption que celle caractéristique de la fonction acétate. Cependant, le rapport d'intensité des bandes d'absorption caractéristiques des fonctions hydroxyles du chitosan et celles caractéristiques de la longue chaîne de l'acide oléique par la voie acétate de chitosan étant moins important que celui obtenu par la voie chlorhydrate de chitosan, nous pouvons conclure que la voie acétate de chitosan permet une fixation plus importante d'acide oléique sur le chitosan. De plus la diminution de l'intensité de la bande d'absorption caractéristique de la fonction carboxyle de l'acide carboxylique (de l'acide oléique) nous laisse supposer la présence d'interactions électrostatiques.

La voie acétate de chitosan permet certes de fixer une quantité plus importante d'acide oléique sur le chitosan mais elle aboutit à la formation d'un précipité. Ce fort taux de fixation s'explique par le fait qu'au cours de la réaction, des interactions de type électrostatiques s'établissent entre les deux éléments du complexe formé. Par ailleurs, ce manque de solubilité peut être attribué à la faible hydrophilie du contre-ion acétate. Dans cette optique, il s'agit d'ajuster la force de l'acide, afin de complexer un maximum d'acide gras, sans qu'il y ait précipitation.

2.4 Voie du lactobionate de chitosan

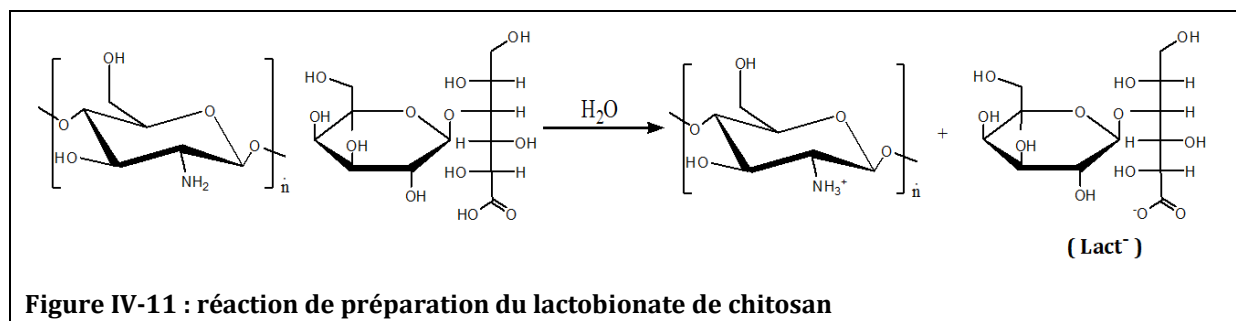


Des travaux antérieurs réalisés au laboratoire des IMRCP, concernant l'influence de la nature du contre-ion (Chlorure, acétate, lactobionate) sur la morphologie des complexes polynorbornène ammonium/ADN, ont montré l'influence bénéfique du contre-ion lactobionate [177-179]. En effet, la forte hydrophilie du contre-ion, liée à sa nature disaccharidique, lui permet de mieux compenser les pertes de solubilité lors à la formation du polyélectrolyte. De ce fait, l'acide lactobionique (Figure IV-10) qui reste un acide faible nous a semblé le candidat idéal. De plus, l'acide lactobionique est non toxique et présente d'intéressantes propriétés cosmétiques (antioxydant, exfoliant...).

2.4.1 Mode opératoire

Préparation du lactobionate de chitosan ou « lactochitosan »

Le lactochitosan est préparé selon le même mode opératoire que celui utilisé pour la préparation du chlorhydrate de chitosan (2.2.1) (Figure IV-11).



L'acide lactobionique et le chitosan sont introduits dans des proportions stœchiométriques :

$$n \text{ Acide lactobionique} = n \text{ NH}_2 \text{ (Chitosan)}$$

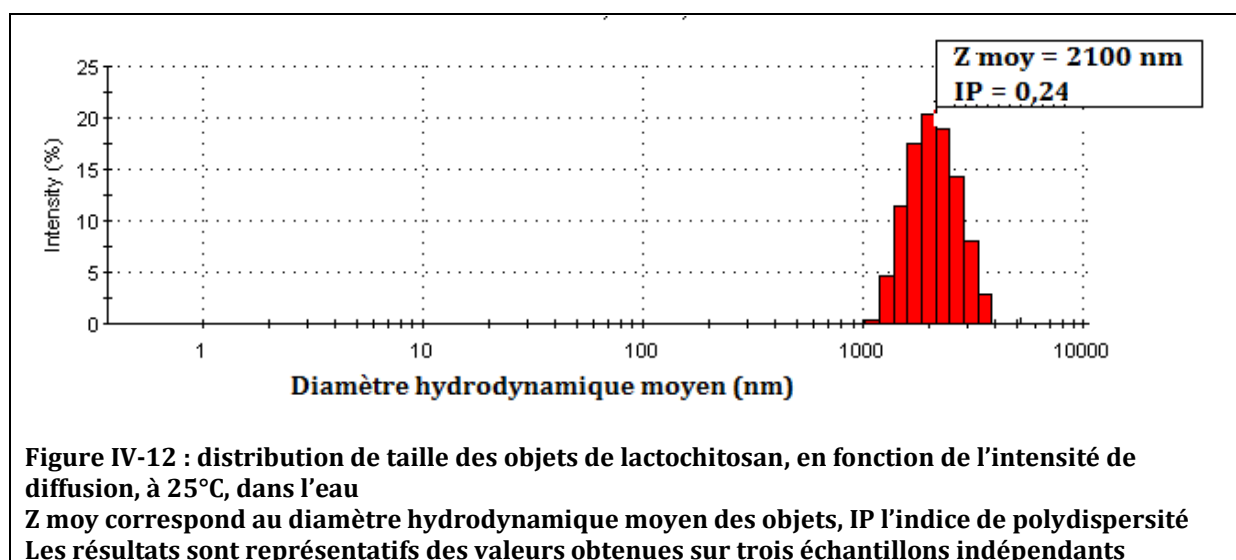
2.4.2 Caractérisation physico-chimiques

2.4.2.1 Aspect macroscopique de la solution obtenue

La solution obtenue présente un aspect stable et translucide. Le lactobionate de chitosan ou lactochitosan se disperse facilement dans l'eau après lyophilisation.

2.4.2.2 Taille des objets formés

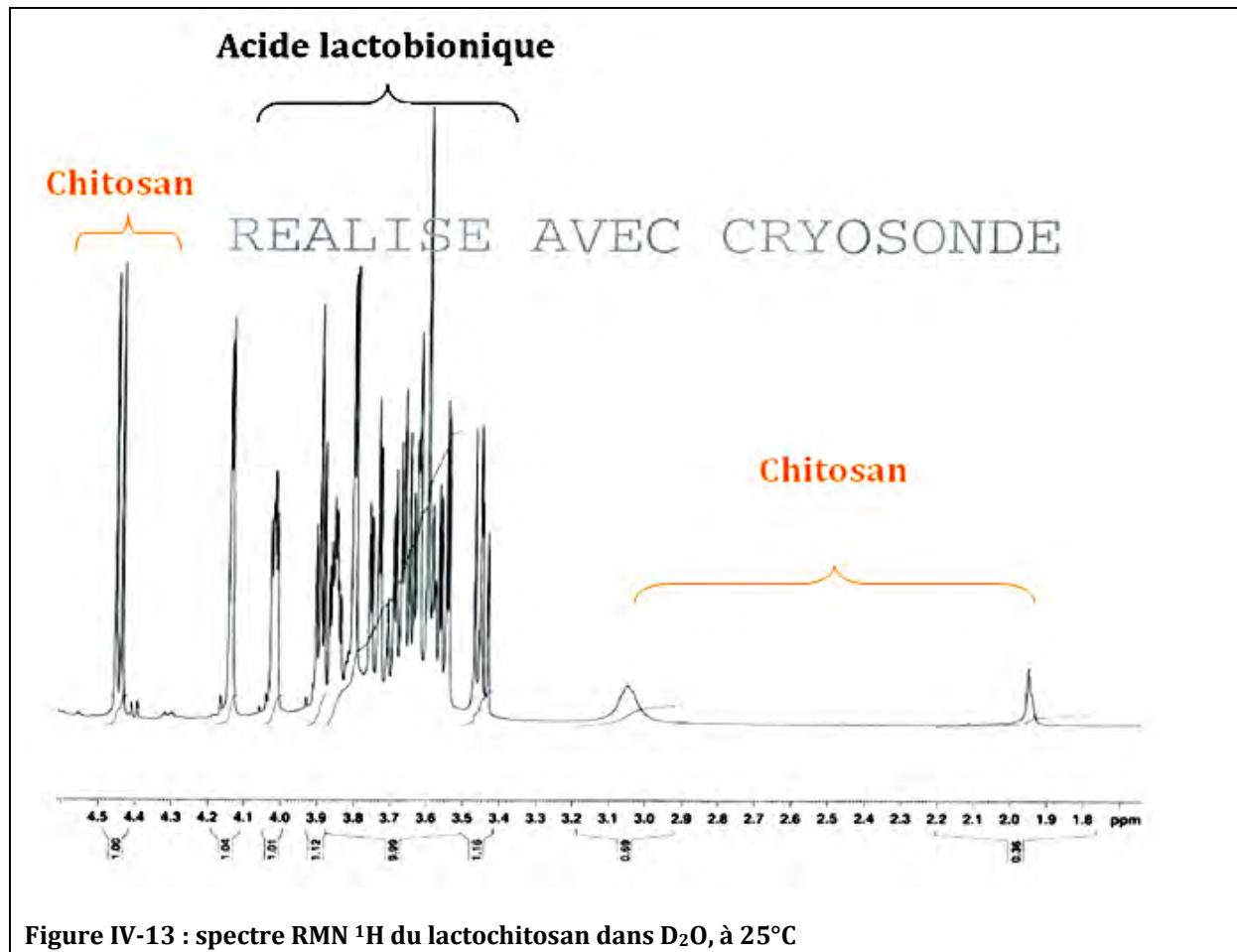
L'appareil de diffusion dynamique de la lumière (DLS) détecte des objets ayant un diamètre moyen de 2,1 μm avec un indice de polydispersité de 0,24. Les résultats des mesures de DLS sont présentés sur la figure ci-dessous :



2.4.2.3 Résonance magnétique nucléaire (RMN)

✦ RMN ¹H

Des analyses RMN¹H du lactochitosan ont été réalisées dans D₂O. Les résultats de ces analyses figurent sur le spectre suivant :



Cette analyse permet de mettre en évidence la présence d'une part de l'acide lactobionique et d'autre part du chitosan. Par ailleurs, cette analyse permet également de vérifier l'intégrité de ces deux éléments qui n'ont donc pas subi de dégradation au cours de la réaction.

✦ RMN DOSY (Diffusion Ordered Spectroscopy)

Intérêt de la technique

L'intérêt majeur de la RMN DOSY est son utilisation pour l'analyse de mélanges complexes. Divers mélanges complexes peuvent être analysés par cette méthode, tels que les biofluides, les huiles, les arômes, les produits pétroliers ou les matrices alimentaires. Par ailleurs, cette technique présente l'avantage de ne pas nécessiter de traitement physique préalable et ne provoque pas de dégradation de l'échantillon. Cette méthode d'analyse permet donc de discriminer les éléments libres ou liés au complexe. La séparation sera donc d'autant plus aisée que les poids moléculaires mis en jeu seront différents[180].

Principe de la technique

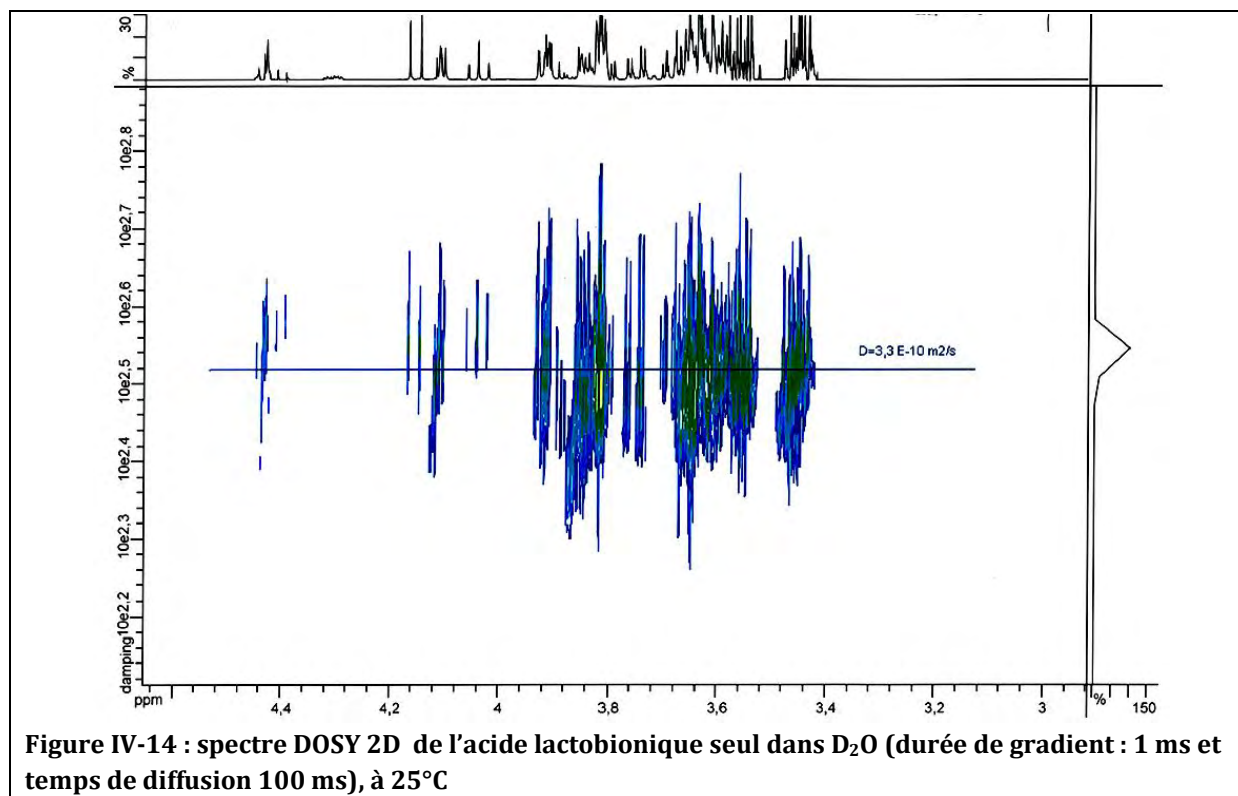
L'analyse de RMN DOSY (Diffusion Ordered Spectroscopy) correspond à une mesure de coefficient de diffusion translationnelle par RMN. La RMN DOSY est une technique fondée sur l'utilisation d'impulsions de gradient de champ magnétique. Elle offre, en plus des données classiques de la RMN telles que les déplacements chimiques et les constantes de couplage de

mesurer les coefficients de diffusion des espèces en solution. En effet, chaque espèce présente un coefficient de diffusion qui lui est propre si elle n'interagit pas avec un autre composé. De ce fait, une des caractéristiques les plus importantes de la technique de RMN DOSY est sa capacité à séparer les signaux de différents composés, présents dans un mélange en fonction de leur coefficient de diffusion qui en fait, reflète leur taille et leur forme, permettant ainsi une séparation virtuelle des composés présents au sein du mélange. Cette méthode nous permet donc de discriminer les éléments liés ou libres du complexe [181, 182].

Nous avons réalisé des expériences de RMN DOSY sur les éléments purs ; chitosan, acide lactobionique et sur les éléments associés. Les coefficients de diffusion des éléments purs et des éléments mis en association sont ensuite comparés. Une variation de valeurs de coefficients des éléments purs ou associés traduira une modification d'environnement chimique des éléments lorsqu'ils se trouvent en association, cela nous permettant donc de déduire une interaction entre ces éléments.

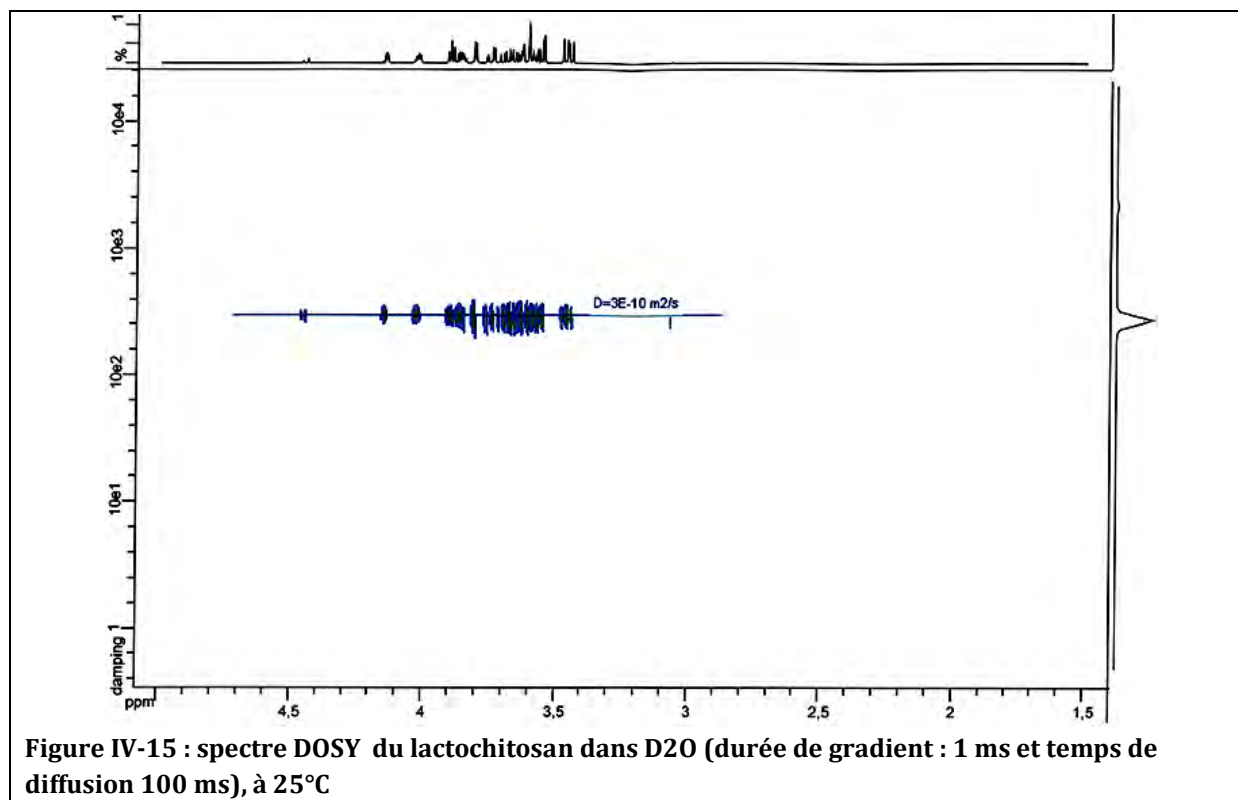
Afin de confirmer l'interaction entre acide lactobionique et chitosan des mesures de DOSY ont été effectuées. Celles-ci ont été réalisées avec une durée de gradient de 1 ms et un temps de diffusion de 100 ms et une durée de gradient de 6 ms et un temps de diffusion de 800 ms pour les molécules les plus lipophiles.

Une première expérience de DOSY sur l'acide lactobionique pur dans D_2O a été réalisée afin de déterminer son coefficient de diffusion. Les résultats sont présentés sur la figure suivante :



Cette analyse de DOSY met en évidence un coefficient de diffusion de l'acide lactobionique de $3,3 \cdot 10^{-10} m^2/s$. Cette valeur sera comparée plus loin à celle du lactochitosan.

Une seconde analyse de DOSY a été menée sur le lactochitosan, suivant les mêmes conditions opératoires que précédemment. Les résultats sont présentés ci-dessous :



Cette carte DOSY met en évidence la valeur du coefficient de diffusion du lactochitosan qui est de $3,0 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$. La différence de valeur, bien que faible, entre le coefficient de diffusion de l'acide lactobionique seul ou en contact avec le chitosan pourrait aller dans le sens d'une modification de l'environnement chimique de ce dernier. Par ailleurs, en observant les déplacements chimiques, au niveau de l'axe horizontal, de l'acide lactobionique et du chitosan, il est possible de remarquer que ces derniers se situent au même niveau de diffusion. Cette observation constitue un argument supplémentaire qui va dans le sens d'une interaction entre acide lactobionique et chitosan.

2.4.2.4 Microscopie électronique à transmission (MET)

Afin d'observer la taille et la morphologie des complexes de lactochitosan formés, la technique de microscopie électronique à transmission (MET) a été utilisée. Les échantillons ont été observés à l'aide d'un microscope électronique à transmission de type Jeol 120Kv sur grilles non ionisées en utilisant l'acétate d'uranyle en tant que contrastant. Les images observées sont présentées sur les photographies suivantes :

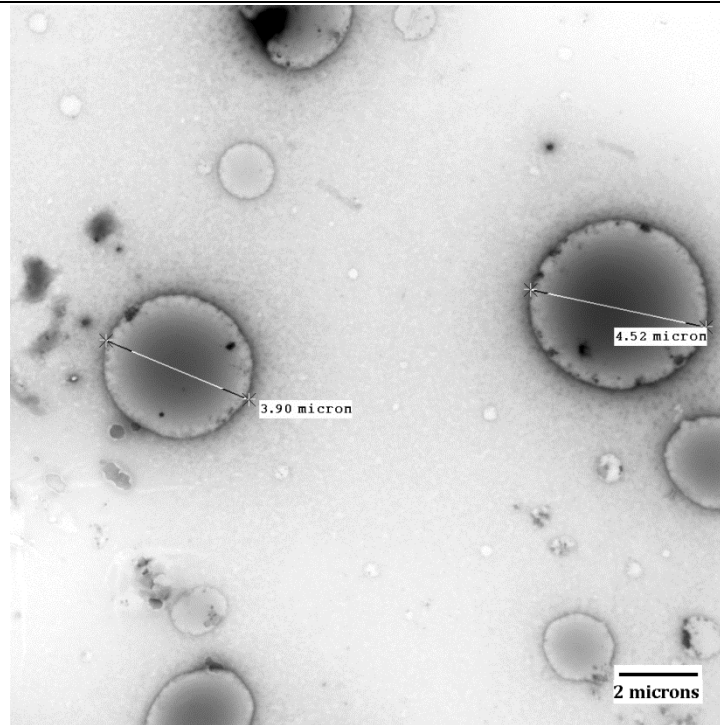


Figure IV-16 : Observations microscopiques des particules de lactochitosan

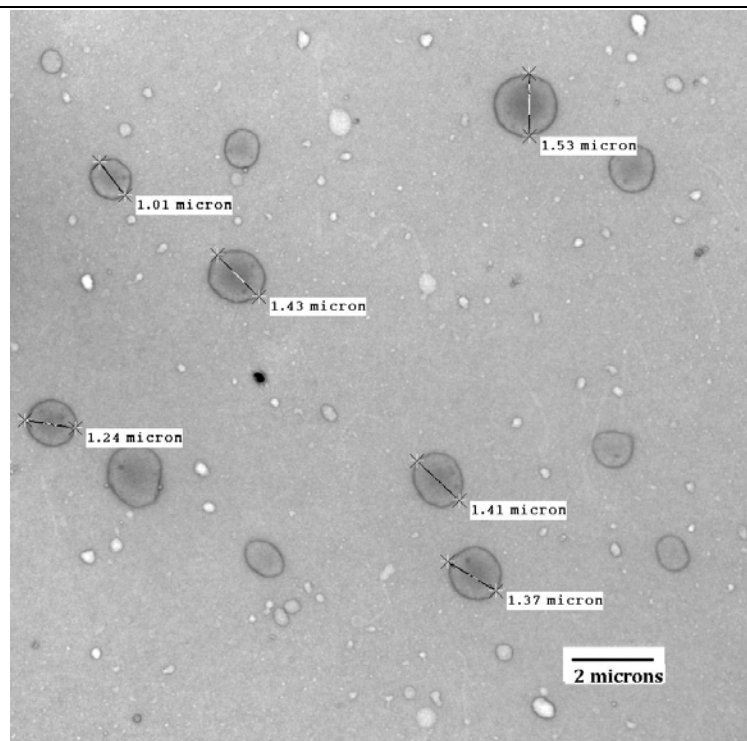


Figure IV-17 : Observations microscopiques des particules de lactochitosan.

La caractérisation en microscopie électronique du lactochitosan permet d'observer des objets de morphologie relativement sphériques et présentant un diamètre moyen de 2 μm .

La voie du lactobionate de chitosan a permis de mettre au point un vecteur de base, le lactochitosan auquel il est possible d'associer un second élément ; soit un acide gras, soit un ingrédient actif, afin de former un complexe binaire. La formation de complexes binaires de lactochitosan + ingrédient actif ou de lactochitosan+ acide gras, sera détaillée dans le chapitre suivant.

2.4.3 Substitution du chitosan d'origine animale

Suite aux évolutions des réglementations françaises et européennes et face à la pression des consommateurs concernant l'utilisation d'ingrédients d'origine animale dans les produits cosmétiques, nous avons cherché à substituer le chitosan d'origine animale, habituellement utilisé, au cours de ce travail, par du chitosan d'origine végétale. Pour ce faire, deux échantillons de chitosan d'origine végétale ont été testés et comparés au chitosan d'origine animale : un premier caractérisé par une masse moléculaire moyenne de 10-20 kDa et un second possédant une masse moléculaire moyenne de 50-80 kDa. Pour comparer ces trois types de chitosan, du lactochitosan a été préparé avec chacun d'entre eux.

2.4.3.1 Mode opératoire suivi pour la préparation des lactochitosan

Le mode opératoire employé pour la réalisation des différents échantillons de lactochitosan est décrit au niveau de la figure suivante :

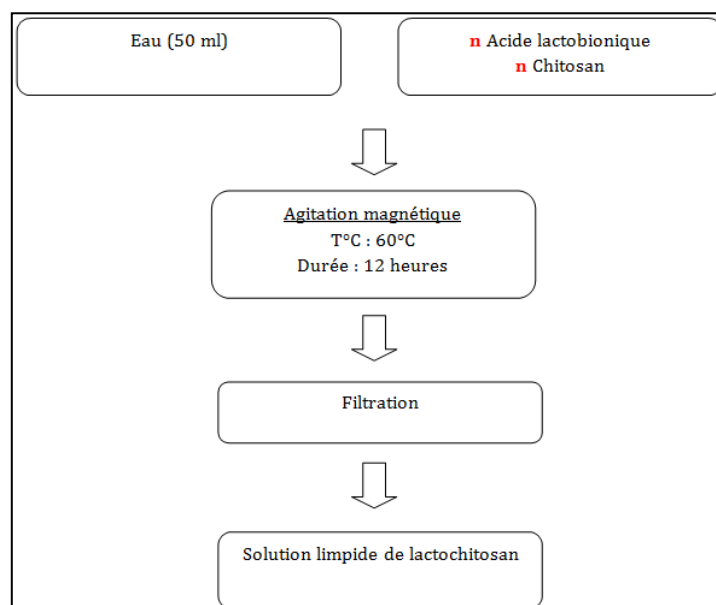


Figure IV-18 : mode opératoire utilisé pour la préparation de lactobionate de chitosan

Du fait d'un manque d'information fournisseur notamment concernant le degré de désacétylation des échantillons de chitosan végétaux fournis, nous avons transposé le mode opératoire suivi pour la préparation de lactochitosan avec un chitosan d'origine animale. Les échantillons de lactochitosan obtenus à partir de chitosan d'origine végétale ont été caractérisés d'un point de vue physico-chimique. Les résultats de la caractérisation figurent dans la partie suivante :

2.4.3.2 Caractérisations physico-chimiques

Les échantillons de lactochitosan d'origine végétale ont suivi un protocole de caractérisation physico-chimique identique à celui préparé à partir de chitosan d'origine animale.

- **Aspect visuel de la solution obtenue**

Les aspects des solutions de lactochitosan, à température ambiante, obtenus à partir de différents chitosan sont résumés dans le tableau suivant :

	Aspect visuel de la solution de lactochitosan obtenue
Chitosan	
Animal (4 kDa)	Stable et translucide
Végétal (50-80 kDa)	Stable et translucide
Végétal (10-20 Kda)	Stable très légèrement trouble

Tableau IV-4 : résumé de l'aspect visuel des solutions de lactochitosan obtenue en fonction de leur origine et de leur poids moléculaire

Le lactochitosan d'origine végétale caractérisé par un poids moléculaire de **50-80 kDa** possède strictement le même aspect visuel que le lactochitosan préparé à partir de chitosan d'origine animal.

- **pH fin de réaction**

Les interactions électrostatiques étant la base de la formation du vecteur de lactochitosan, le pH du milieu a également été relevé en fin de réaction. Les résultats sont résumés dans le tableau suivant :

	pH du milieu en fin de réaction (15°C)
Chitosan	
Animal (4 kDa)	4,08
Végétal (50-80 kDa)	4,10
Végétal (10-20 Kda)	4,01

Tableau IV-5 : résumé des valeurs de pH en fin de réaction en fonction des échantillons de chitosan

Ce tableau permet de mettre en évidence que les pH des milieux en fin de réaction en fonction du type de chitosan utilisé sont comparables. Nous pouvons par conséquent supposer que les interactions électrostatiques qui s'établissent entre l'acide lactobionique et le chitosan (d'origine végétale) ne sont pas perturbées.

- **Taille des objets formés**

Des mesures de diffusion dynamique de la lumière (DLS) ont été réalisées afin de détecter ou non la formation d'objets entre l'acide lactobionique et le chitosan d'origine végétale. Les résultats de ces mesures sont présentés dans le tableau suivant :

	Diamètre des objets formés (nm)	Indice de polydispersité
Chitosan		
Animal (4 kDa)	2800	0,120
Végétal (50-80 kDa)	2013	0,424
Végétal (10-20 Kda)	564	0,550

Tableau IV-6 : récapitulatif des mesures de DLS réalisés sur les échantillons de lactochitosan.

Une fois de plus, le lactochitosan qui se rapproche le plus des caractéristiques physico-chimiques du lactochitosan préparé à partir de chitosan d'origine animale est celui qui possède un poids moléculaire de 50-80 kDa. En terme de caractéristiques physico-chimiques, ces deux types de lactochitosan présentent des caractéristiques comparables. Les analyses de RMN permettront d'affiner la caractérisation des échantillons de lactochitosan préparés à partir de chitosan d'origine végétale afin de s'assurer que le chitosan d'origine animale puisse être substitué par un des chitosan d'origine végétale.

- **Technique de résonance magnétique nucléaire**

Des analyses de résonance magnétique nucléaire ont été réalisées sur les échantillons de lactochitosan. Les échantillons ont été solubilisés dans D₂O, les résultats sont présentés au niveau de la (figure IV-7)

RMN ¹H

Les spectres RMN présentés ci-dessous sont strictement comparables. Il est donc possible de conclure que le lactochitosan préparé à partir de chitosan végétal présente un comportement identique au lactochitosan préparé à partir de chitosan d'origine animale.

Dans le cadre d'une application industrielle, il sera possible d'envisager la substitution du chitosan d'origine animale par du chitosan d'origine végétale puisque le lactochitosan préparé à partir de ces deux sources de chitosan possède des caractéristiques physico-chimiques quasi identiques.

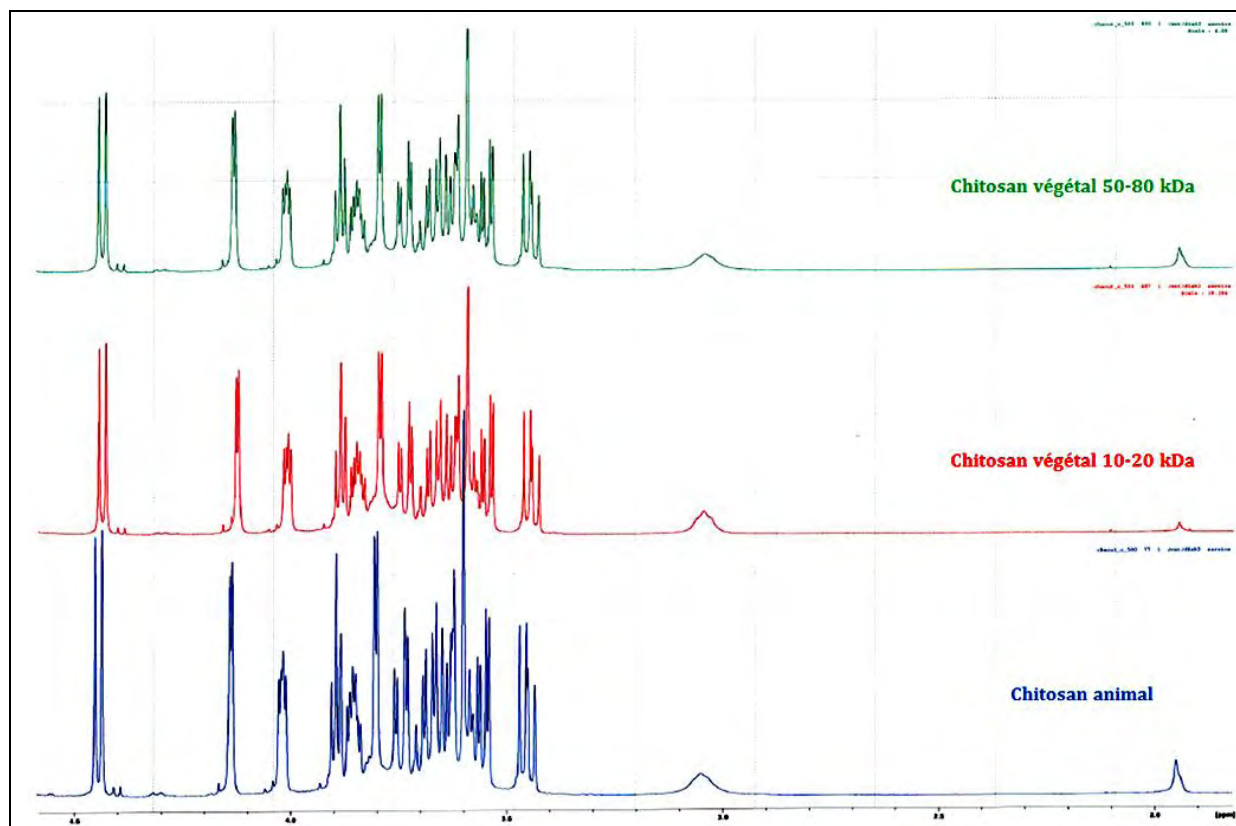


Figure IV-7 : comparaison des spectres RMN ^1H des échantillons de lactochitosan préparés à partir de chitosan d'origines différentes, dans D_2O , à 25°C

3. Conclusions

La voie du lactobionate de chitosan apparaît comme la plus prometteuse pour l'élaboration d'un vecteur de base, transporteur de substances actives. En effet l'acide lactobionique présente l'avantage d'être un acide faible, ne provoquant pas de forte acidification de milieu en cours de réaction, permettant ainsi un bon échange de contre-ion entre les éléments. De plus, l'acide lactobionique possède un caractère suffisamment hydrophile pour permettre la redispersion des complexes dans l'eau. Le vecteur de base ainsi formé, résulte d'interactions électrostatiques qui s'établissent entre le chitosan, chargé positivement en milieu acide par le biais de ses fonctions ammonium et l'acide lactobionique, chargé négativement par le biais de ces fonctions carboxylates. Les objets résultant de ces interactions se caractérisent par une morphologie sphérique et un diamètre moyen de l'ordre de deux microns

Par ailleurs, il a également été mis en évidence la capacité du vecteur de base à interagir avec d'autres éléments, comme des acides gras, l'acide oléique ou l'acide linoléique et ce avec des taux de fixation tout à fait convenable, aboutissant à la formation de complexes binaires de linoléate ou d'oléate de lactochitosan. L'acide gras participant à sa propre formulation. Enfin, la possibilité de substitution du chitosan d'origine animale par du chitosan d'origine végétale permet de se conformer à la réglementation cosmétique, de plus en plus restrictive concernant l'utilisation d'ingrédients d'origine animale.

Le vecteur de base mise au point, nous allons dans le chapitre suivant, étudier de façon approfondie les capacités de celui-ci à interagir avec d'autres éléments, soit une acide gras, soit un ingrédient actif aux propriétés dépigmentantes.

CHAPITRE V :

ELABORATION ET CARACTERISATION DE
COMPLEXES BINAIRES DE LACTOCHITOSAN +
ACIDE GRAS ET LACTOCHITOSAN +
INGREDIENT ACTIF

Chapitre V

Elaboration et caractérisation de complexes binaires de lactochitosan + acide gras et lactochitosan + ingrédient actif

1. Introduction

La mise au point du vecteur de base étant réalisée, nous avons ensuite envisagé la mise au point d'un complexe binaire en ajoutant un nouvel élément au complexe de base de lactochitosan. En effet, à ce niveau, il s'agit de faire interagir la vecteur de lactochitosan avec un acide gras qui aura pour rôle de favoriser la pénétration cutanée du complexe ternaire au sein des différentes couches de la peau et/ou avec un ingrédient actif, le but étant d'étudier les capacités du lactochitosan à interagir avec une molécule active. Dans cette partie, sont donc décrites dans un premier temps, les capacités du lactochitosan à interagir avec un acide gras et dans un second temps, la possibilité de formation de complexes binaires entre lactochitosan et molécules actives. Les acides gras testés sont l'acide oléique, l'acide linoléique, l'acide α -linoléique et l'acide stéarique. Les molécules actives utilisées dans ce chapitre sont l'acide azélaïque, l'acide kojique et le R000342 et l'acide rétinoïque.

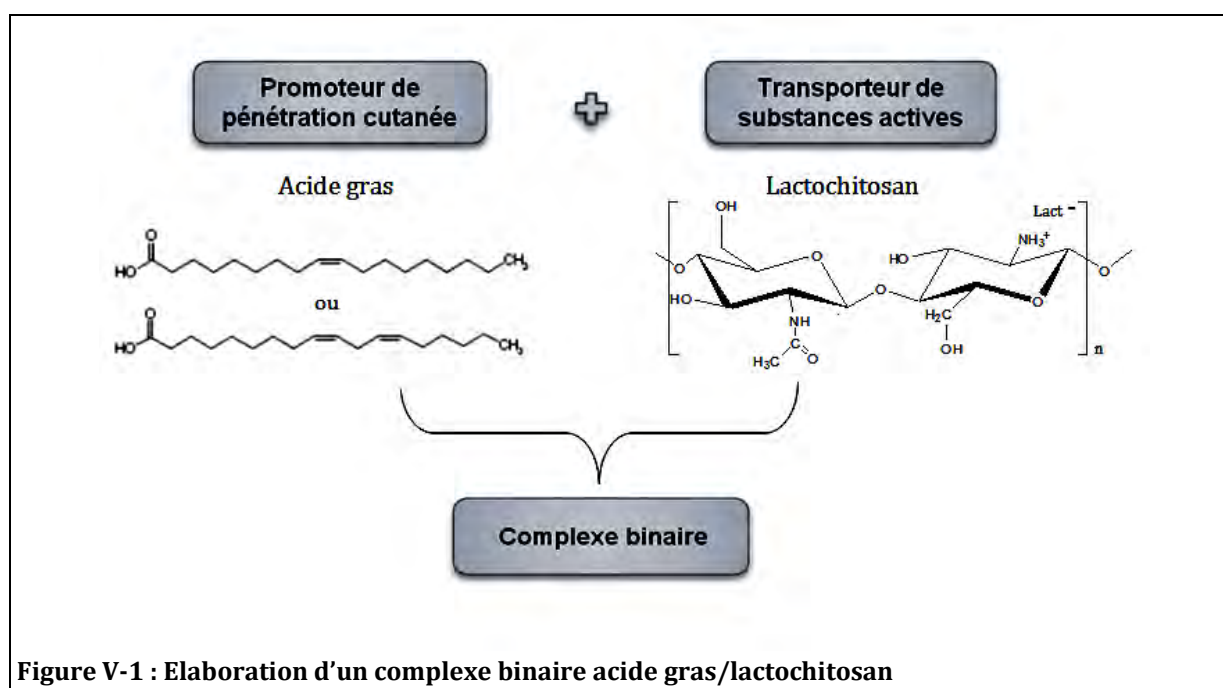


Figure V-1 : Elaboration d'un complexe binaire acide gras/lactochitosan

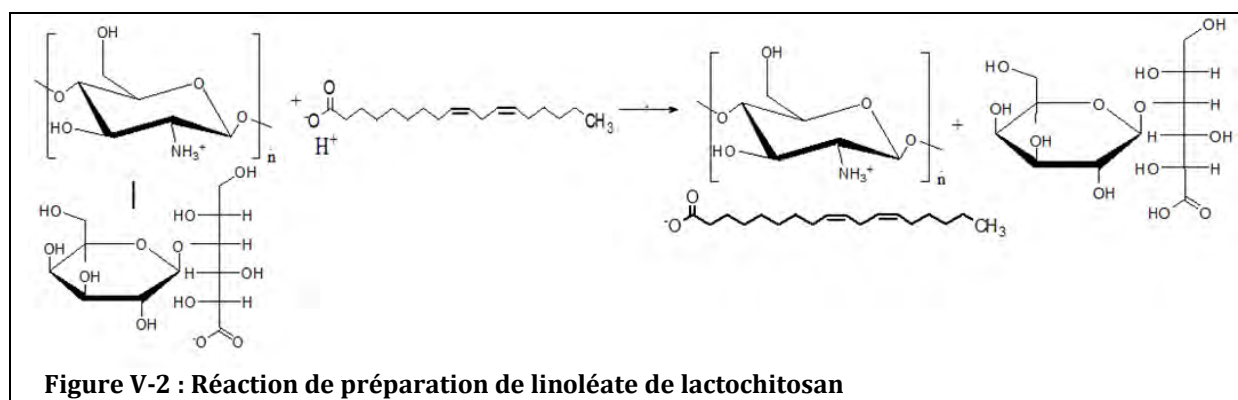
2. Elaboration de complexes binaires de lactochitosan + acide gras

Il s'agit de mettre au point un complexe binaire de lactochitosan + acide gras (figure V-1). Pour ce faire, nous avons essayé de faire interagir différents acides gras avec le vecteur de base de lactochitosan. Cette association binaire repose sur deux types d'interactions qui peuvent s'exercer séparément ou simultanément. Le premier concerne les interactions électrostatiques qui ont lieu lorsque l'acide gras se trouvant sous forme COO^- interagit par échange de contre-ion avec les fonctions ammonium NH_3^+ du chitosan solubilisé en milieu acide. La seconde voie d'interaction entre les deux composés repose sur de possibles interactions hydrophobes entre la longue chaîne carbonée en C18 de l'acide gras et les groupements acétyles du chitosan.

2.1 Linoléate de lactochitosan

Dans un premier temps, il s'agit de faire interagir l'acide linoléique avec le lactochitosan. L'acide linoléique a été sélectionné pour sa double propriété d'agent de dépigmentation et de promoteur de pénétration cutanée, comme cela été décrit dans la partie bibliographique [66, 67, 77]. Pour rappel, l'acide linoléique possède un Log P de 7,01.

2.1.1 Mode opératoire



Au cours de la préparation de linoléate de lactochitosan (Figure V-2), nous avons fait varier la quantité d'acide gras introduite afin de déterminer la quantité maximale d'acide gras qu'il est possible de faire interagir avec le lactochitosan.

2.1.2 Evaluation de la quantité maximale d'acide linoléique susceptible d'interagir avec le lactochitosan

Nous avons cherché à déterminer la proportion maximale d'acide linoléique qu'il est possible de faire interagir avec le lactochitosan afin d'obtenir d'une part une suspension stable après 48 heures à température ambiante et d'autre part, redispersible après lyophilisation.

Pour ce faire, nous avons mis en interaction différentes quantités d'acide linoléique avec le lactochitosan. L'aspect de la dispersion obtenue est observé après avoir laissé reposer l'échantillon pendant 48 heures, à température ambiante.

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau suivant :

N° Formule	Acide gras (AG)	Quantité d'AG introduite/Quantité chitosan (n mol)	Aspect de la solution
(014)	Acide linoléique	0,125 n	Laiteux, stable
(017)	Acide linoléique	0,25 n	Laiteux, stable
(018)	Acide linoléique	0,50 n	Laiteux, instable

Tableau V-1 : Résultats des essais de préparation de linoléate de chitosan obtenu par la voie du lactobionate de chitosan.

Ces résultats indiquent que jusqu'à 25% d'acide linoléique, les dispersions présentent un aspect stable et laiteux alors qu'à une concentration initiale de 50 %, il se forme un précipité.

2.1.3 Caractérisations physico-chimiques des complexes binaires de linoléate de lactochitosan

- **Aspect visuel de la dispersion obtenue**

La dispersion obtenue présente un aspect stable et laiteux.

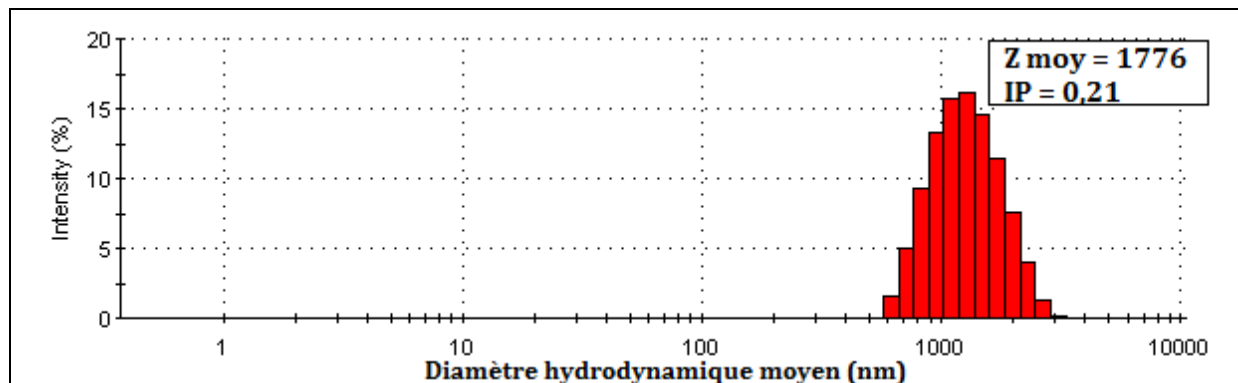
- **Taille des complexes formés**

Dans cette étude, nous avons mesuré les tailles des complexes binaires de linoléate de lactochitosan contenant des quantités différentes d'acide linoléique allant de 0% à 25% (molaire) par rapport à la quantité de chitosan introduite. Ces mesures ont été réalisées sur les échantillons bruts. Les résultats de ces mesures sont présentés dans le tableau suivant :

Quantité Acide linoléique introduite (en % massique/Chitosan)	Diamètre moyen des objets formés d.nm	Indice de polydispersité
0	2130	0,20
6	1265	0,25
12,5	1776	0,21
25	1692	0,25

Tableau V-2 : taille des complexes binaires formés, dispersés dans l'eau, mesurée par diffusion de la lumière.

Grâce à cette étude, il est possible de mettre en évidence une influence de la quantité d'acide linoléique introduite sur la taille moyenne des complexes binaires formés. En effet, jusqu'à une quantité de 12,5% d'acide linoléique introduite, on note une augmentation sensible de taille des complexes binaires formés. Au-delà de cette quantité de 12,5%, un effet « Plateau » dans l'augmentation de taille des complexes semble être atteint. La figure ci-dessous représente la distribution de taille des objets de linoléate de lactochitosan à 12,5% d'acide linoléique :

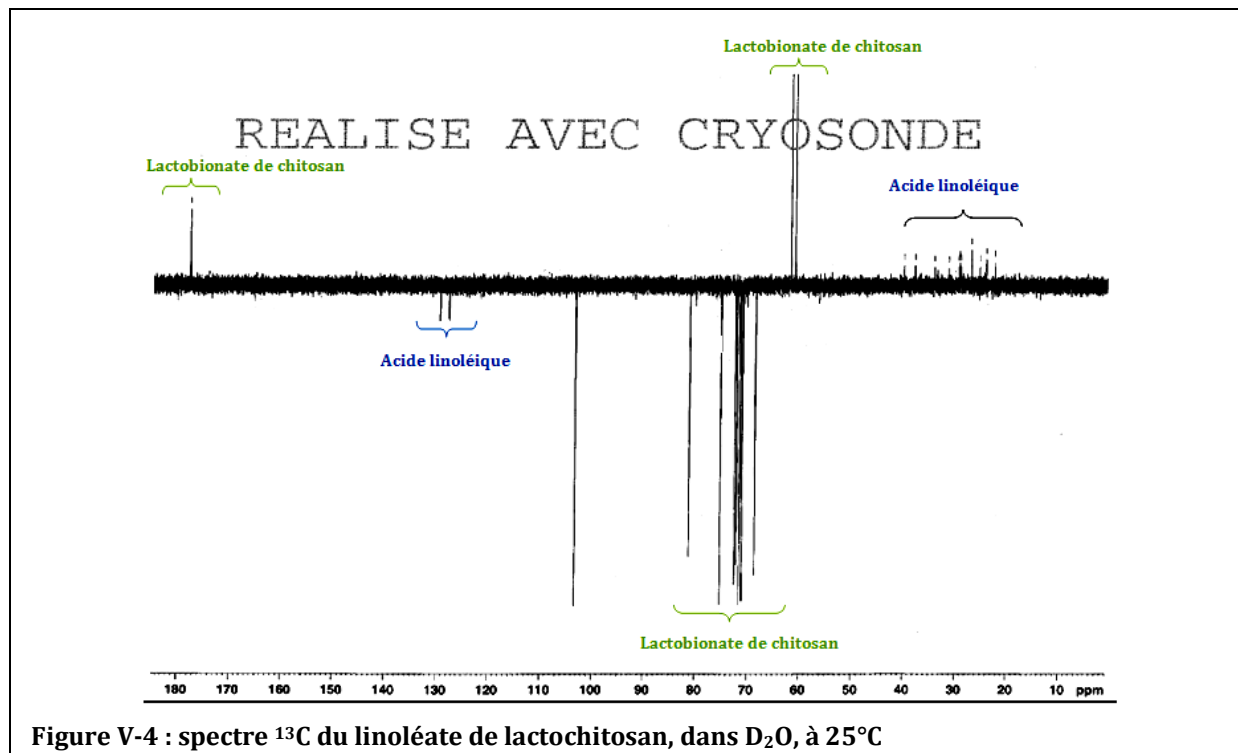


- **Résonance magnétique nucléaire (RMN)**

Plusieurs techniques de résonance magnétique nucléaire ont été exploitées afin de prouver l'existence d'un complexe binaire de linoléate de lactochitosan. La RMN permet de vérifier l'intégrité chimique des ingrédients présents dans le mélange et de quantifier la quantité d'acide gras fixée sur le lactochitosan.

- ✦ **RMN ¹³C**

Le spectre ¹³C du linoléate de lactochitosan (figure V-4), réalisé dans D₂O permet de repérer la fonction carboxyle de l'acide linoléique dans le complexe à 179 ppm. Le signal unique du carboxyle dans le cas du complexe binaire indique la présence d'une seule espèce (COO⁻ ou COOH). Toutefois, le déplacement chimique observé ne serait pas en faveur d'une fonction COO⁻, mais plutôt COOH, blindée par l'interaction avec le lactochitosan. Cette conclusion s'appuie sur un effet de blindage lié à l'environnement, ce qui reste à démontrer par d'autres expériences de RMN. Par ailleurs, les quatre déplacements chimiques situés entre 127 et 129 ppm, correspondant aux carbone éthyléniques, confirment leur intégrité chimique de l'acide linoléique.



Enfin, il est possible de noter que la fonction acide de l'acide lactobionique lorsque celui-ci est pur se caractérise par un déplacement chimique à 173 ppm alors que sur le spectre ci-dessus, cette même fonction se situe à 177 ppm. Cette observation va dans le sens d'une transformation de la fonction carboxyle en fonction carboxylate du fait d'un déblindage plus important.

✦ RMN DOSY

La large différence de poids moléculaire entre le lactochitosan et l'acide gras incorporé implique que ce dernier aura un coefficient de diffusion plus faible s'il est lié au lactochitosan que s'il est libre en dispersion dans l'eau.

L'expérience de DOSY suivante a été réalisée sur un échantillon de linoléate de lactochitosan contenant une proportion de 25% d'acide linoléique (molaire par rapport au chitosan) dilué dans D_2O . Lors des expériences de DOSY, une durée de gradient de 1 ms et un temps de diffusion de 100 ms ont été appliqués.

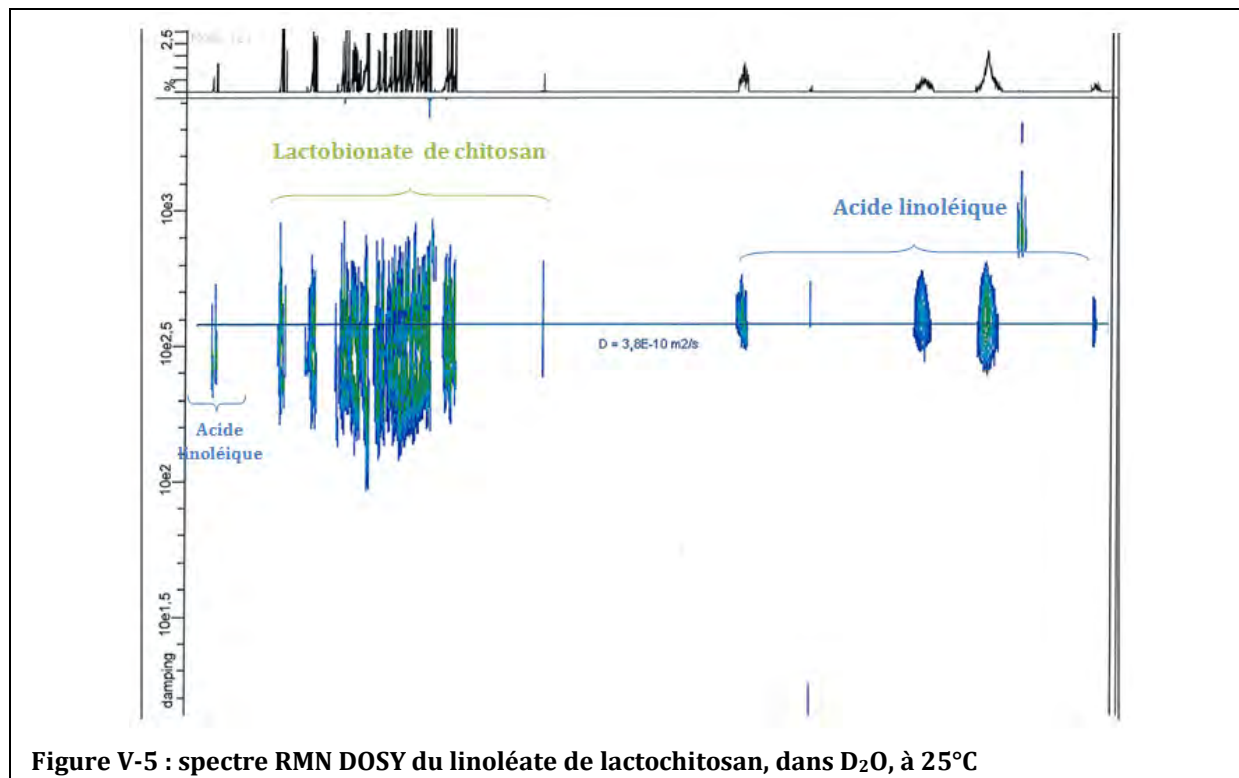


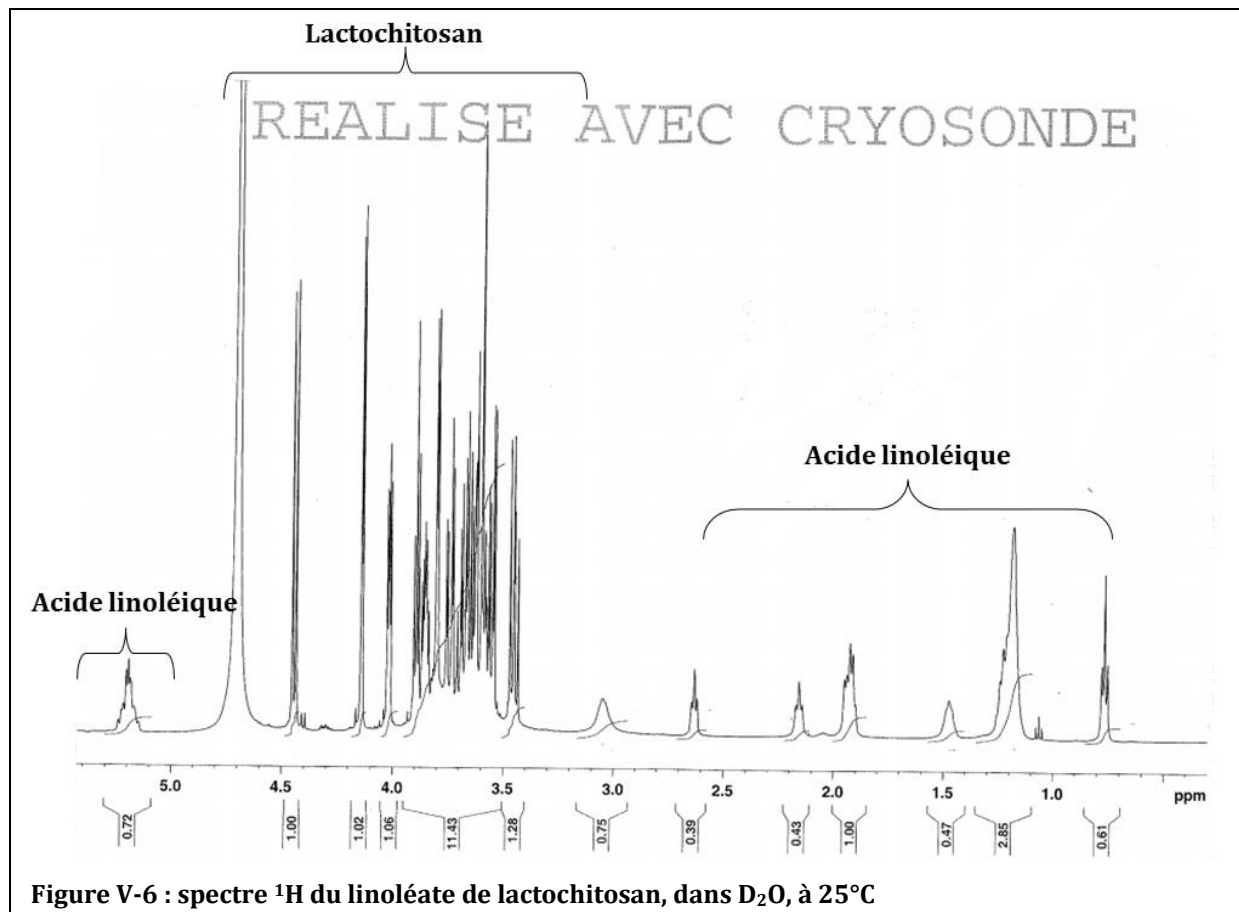
Figure V-5 : spectre RMN DOSY du linoléate de lactochitosan, dans D₂O, à 25°C

Grâce à ce spectre, il est possible d'observer que le lactochitosan et l'acide linoléique ont des profils de diffusion identiques. L'acide linoléique et le lactochitosan possèdent le même coefficient de diffusion, $3,8 \cdot 10^{-2} \text{ m}^2/\text{s}$ ces derniers diffusent comme une entité unique. On peut conclure, grâce à la RMN DOSY que le lactochitosan et l'acide linoléique sont en interaction l'un avec l'autre pour former un complexe binaire.

✦ RMN ¹H

Les expériences de RMN ¹H permettent dans un premier temps, de vérifier la présence des ingrédients au sein de l'échantillon, puis de s'assurer de l'intégrité chimique de chaque élément. En effet, l'acide linoléique se caractérise d'un point de vue structural par la présence d'insaturations particulièrement sensibles aux phénomènes d'oxydation. Le déplacement chimique situé à 5,3 ppm permet de confirmer l'intégrité des fonctions éthyléniques de l'acide linoléique. De plus la RMN permet de quantifier la quantité d'acide gras associée au lactochitosan. En effet, le déplacement chimique situé à 4,4 ppm qui correspond au proton anomérique du chitosan intègre pour 1 et sert de référence pour l'évaluation de la quantité d'acide linoléique qui interagit avec le lactochitosan.

La figure suivante présente le spectre RMN ¹H du linoléate de lactochitosan :



Ce spectre permet de confirmer la présence au sein de l'échantillon du lactochitosan et de l'acide linoléique. Par ailleurs, il est possible de mettre en évidence la bonne intégrité chimique de chaque élément. En effet, le déplacement chimique à 5,3 ppm, caractéristique des protons éthyléniques de l'acide linoléique, permettent de confirmer que celui-ci n'a pas subi de dégradation au cours de la réaction. Enfin, les intégrations des signaux permettent de déterminer le pourcentage d'acide linoléique fixé sur le lactochitosan. En suivant le même raisonnement que pour l'oléate de lactochitosan, le rapport d'intégration des signaux des protons éthyléniques de l'acide linoléique sur le proton anomérique du chitosan, permet de conclure que ce taux de fixation est de 18% (en molaire par rapport à la quantité de lactochitosan), pour une quantité introduite de 25%.

- **Morphologie des complexes formés**

Les complexes binaires formés ont été observés selon des conditions opératoires identiques à celles utilisées pour l'observation du lactobionate de chitosan.

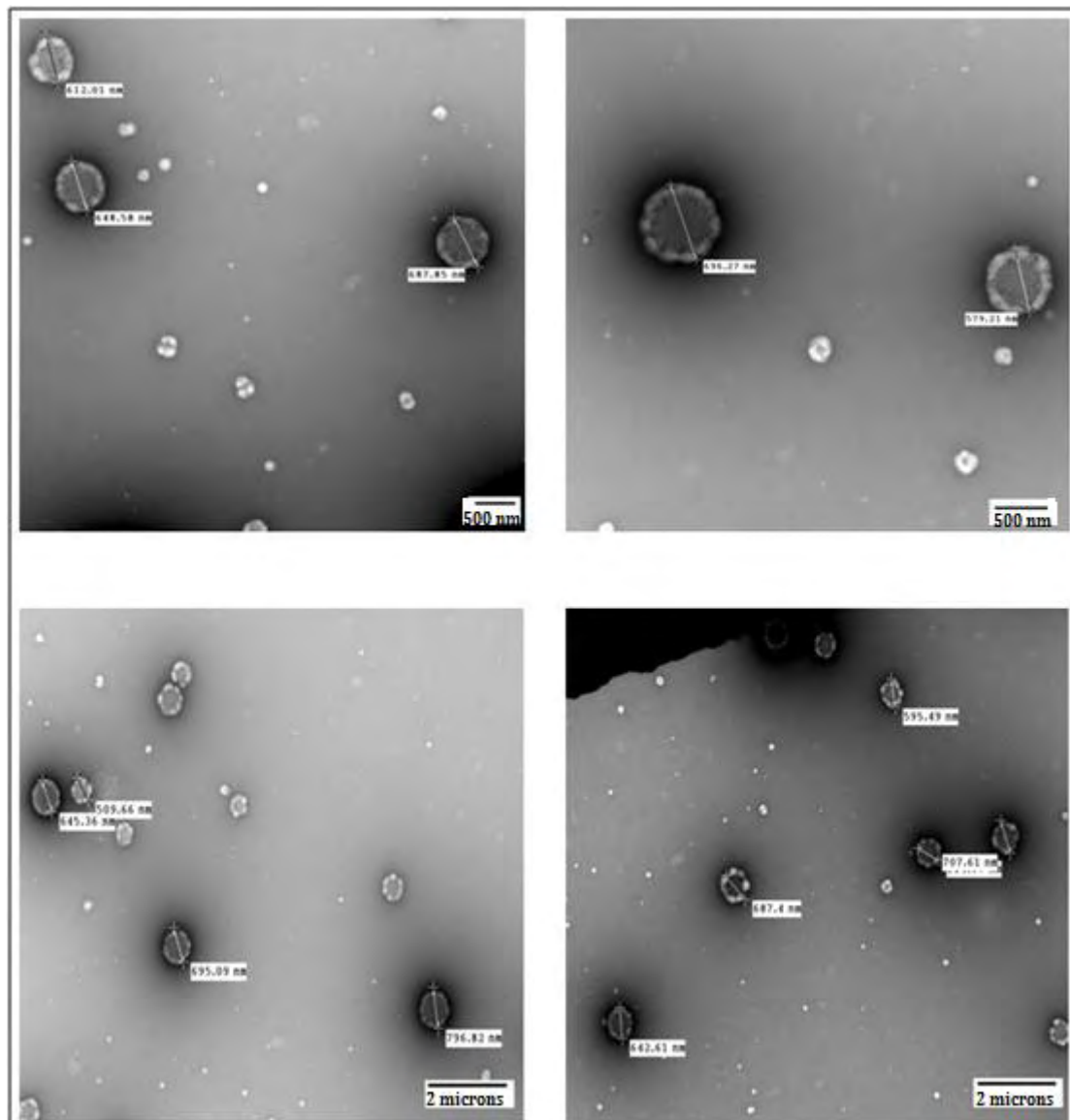


Figure V-7 : Observations microscopiques à différents grossissements des complexes de linoléate chitosan

L'étude par MET des complexes formés entre le lactochitosan et l'acide linoléique (figure V-7) en solution dans l'eau montre la présence d'objets sphériques bordés par une couronne apparaissant plus claire. Les tailles des objets formés s'échelonnent de 571 nm à 1,30 μ m. Les objets formés présentent une morphologie différente de celle observée pour le lactobionate de chitosan et irait dans le sens d'une intégration de l'acide linoléique dans le complexe.

A ce niveau, il est possible de conclure que nous avons bien formé des complexes binaires associant lactochitosan et acide linoléique afin de former des complexes binaires de linoléate de lactochitosan. De ce fait, dans la suite de cette étude, il s'agira d'évaluer les capacités du lactochitosan à former des complexes binaires avec différents acides gras. Pour ce faire, l'acide

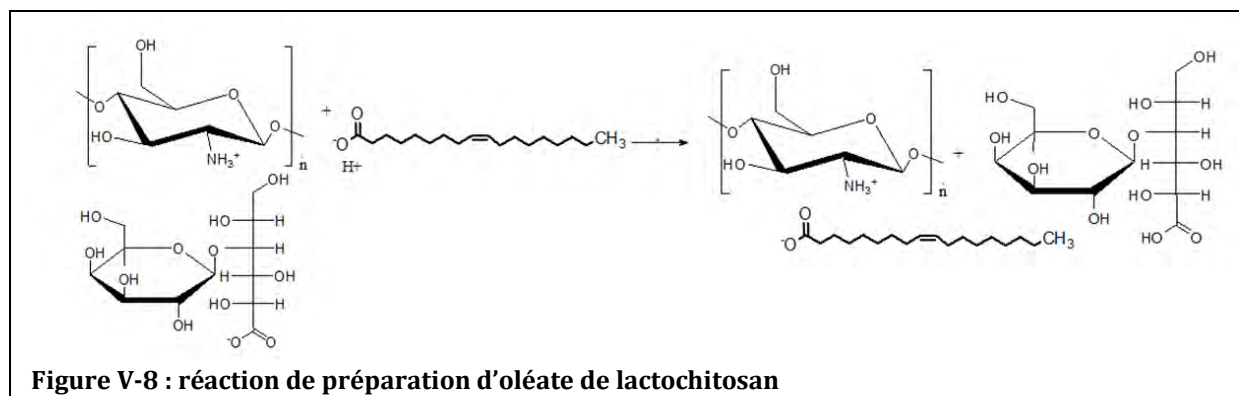
oléique, linoléique, stéarique et béhénique seront testés et caractérisés en suivant la même démarche que celle utilisée pour l'acide linoléique.

2.2 Oléate de lactochitosan

Des essais identiques d'incorporation d'acide oléique au sein du lactochitosan ont été réalisés, selon la même démarche que celle utilisée pour le linoléate de lactochitosan. Pour rappel, l'acide oléique se caractérise par un Log P de 7,4.

2.2.1 Mode opératoire

La préparation d'oléate de lactochitosan est présentée sur la figure suivante :



L'oléate de lactochitosan est préparé suivant le même mode opératoire que celui employé pour la préparation du linoléate de lactochitosan. La quantité d'acide oléique introduite au sein de l'échantillon est de **25%** (molaire par rapport à la quantité de lactochitosan).

2.2.2 Caractérisations physico-chimiques des complexes binaires d'oléate de lactochitosan

Le complexe binaire d'oléate de lactochitosan a été caractérisé en utilisant les mêmes techniques de caractérisation que celles employées pour le linoléate de lactochitosan.

- **Aspect visuel de la dispersion obtenue**

La dispersion obtenue présente un aspect stable et laiteux, identique à celle de linoléate de lactochitosan.

- **Taille des complexes formés**

L'appareil de DLS détecte des objets présentant un diamètre moyen de **2016 nm** et un indice de polydispersité de 0,15. Les résultats de ces mesures sont présentés sur la figure ci-dessous :

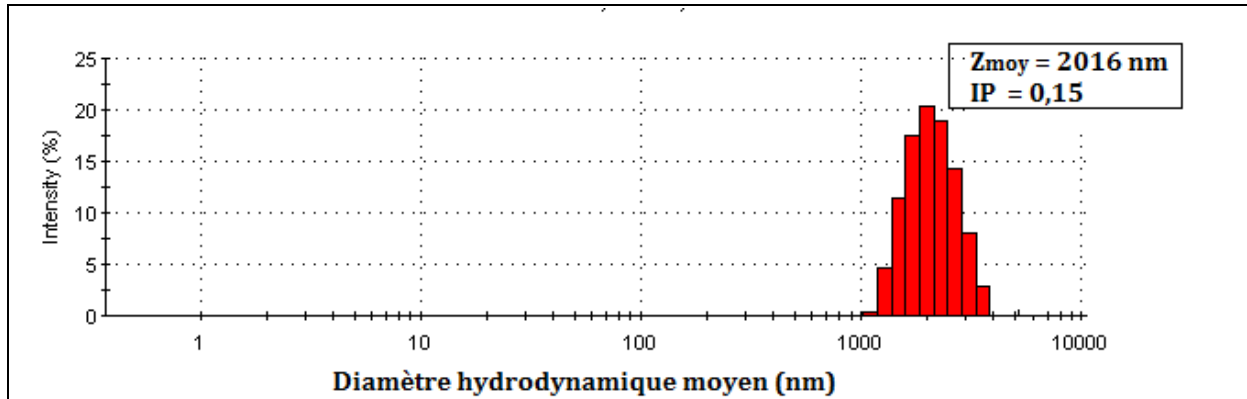


Figure V-9 : distribution de taille des complexes d'oléate de lactochitosan, en fonction de l'intensité de diffusion, à 25°C, dans l'eau
Les résultats présentés sont représentatifs des valeurs obtenues sur trois échantillons indépendants

- **Résonance magnétique nucléaire (RMN)**

L'échantillon obtenu a été caractérisé par RMN

- ✦ **RMN ¹H**

Le spectre ¹H de l'échantillon d'oléate de lactochitosan réalisé dans D₂O est présenté ci-dessus :

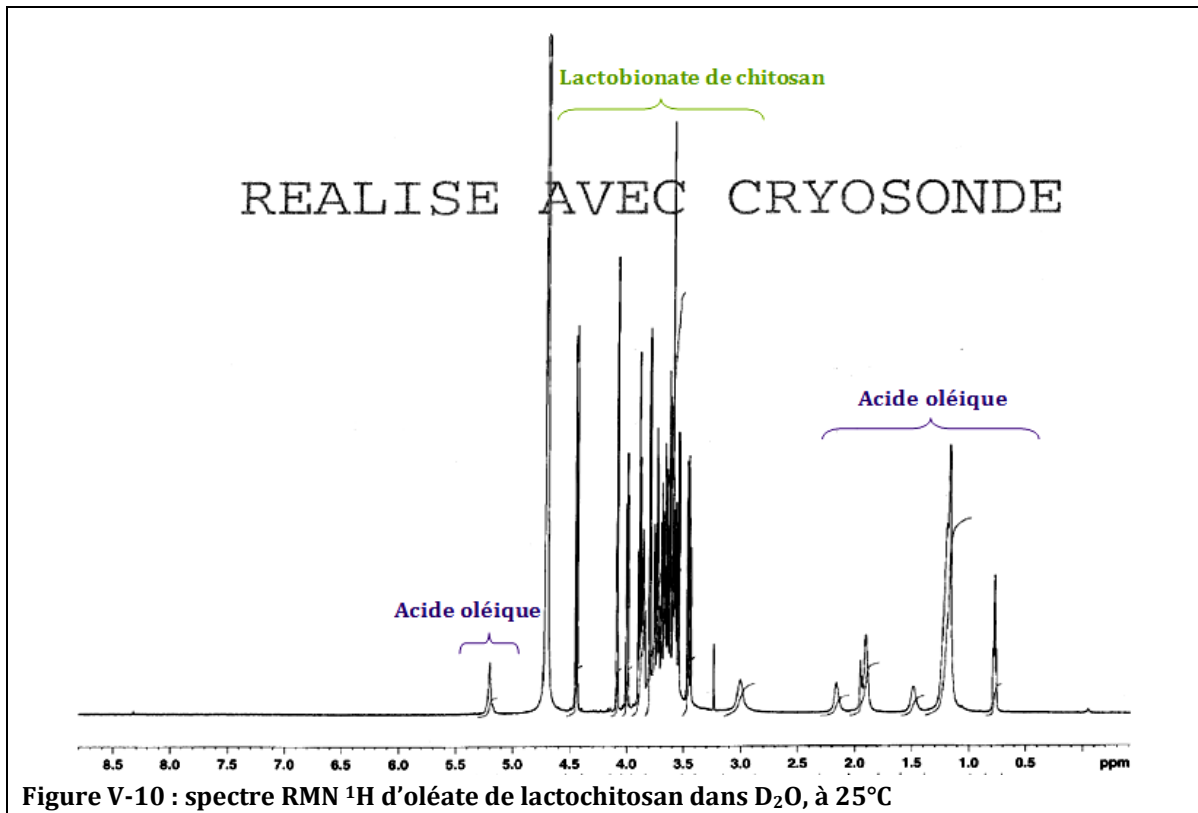
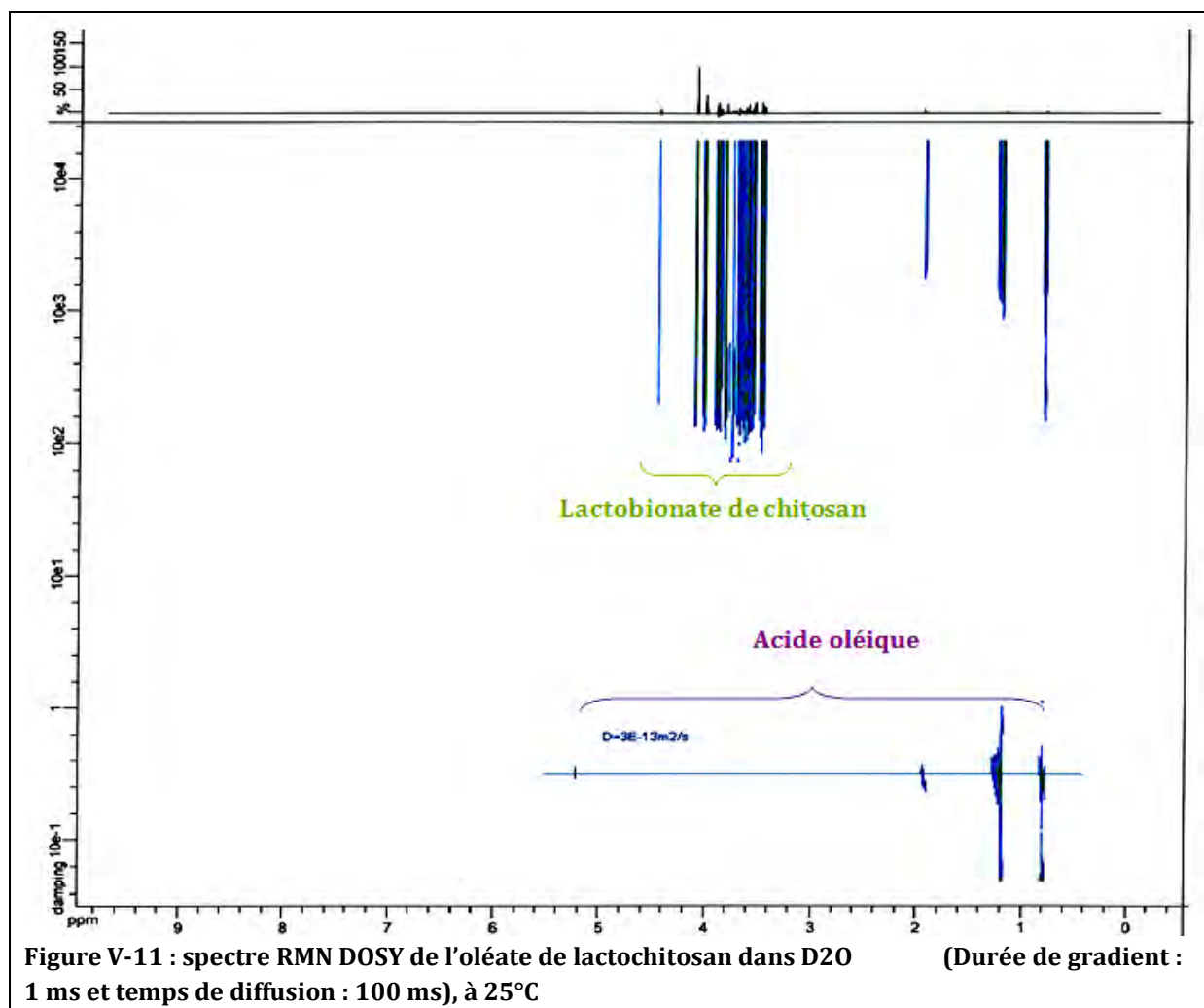


Figure V-10 : spectre RMN ¹H d'oléate de lactochitosan dans D₂O, à 25°C

Ce spectre permet de mettre en évidence la présence du lactochitosan et de l'acide oléique. Par ailleurs, cette analyse permet de confirmer la bonne intégrité chimique de l'acide oléique (également sensible aux phénomènes d'oxydation), notamment grâce à la présence du signal à 5,5 ppm, caractéristiques des protons éthyléniques. Enfin, il est également possible à partir de ce spectre de déterminer le pourcentage d'acide linoléique présent au sein de l'échantillon ; celui-ci est de 13,5% pour 25% introduit.

✦ RMN DOSY

Les paramètres de DOSY ont dû être ajustés afin de mettre en évidence la diffusion de l'acide oléique. En effet, l'acide oléique présente une très faible diffusion dans D₂O du fait de sa forte lipophilie. De ce fait, une durée de gradient de 6 ms et un temps de diffusion de 800 ms ont été appliqués.



Cette expérience de DOSY (figure V-11) met en évidence, deux coefficients de diffusion ; un à $3,2 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$, caractéristique de la diffusion du lactochitosan, un autre à $3 \cdot 10^{-13} \text{ m}^2/\text{s}$ relatif à la diffusion de l'acide oléique au sein de l'échantillon.

Complexe binaire	Eléments du complexe	Coefficient de diffusion des éléments complexés	Solvant	Coefficient de diffusion des éléments seuls	Solvant
Oléate de lactochitosan	Lactochitosan	$3,0.10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$	D ₂ O	$3,3.10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$	D ₂ O
	Acide oléique	$3,0.10^{-13} \text{ m}^2/\text{s}$	D ₂ O	$7,0.10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$	D ₂ O

Tableau V-3 : récapitulatif des résultats de RMN DOSY du complexe binaire d'oléate de lactochitosan.

Le tableau ci-dessus montre que le coefficient de diffusion de l'acide oléique lorsque ce dernier est mis en contact avec le lactochitosan est très largement inférieur à son coefficient de diffusion lorsque celui-ci est seul. Cette variation de valeur de coefficient de diffusion témoigne d'une modification de l'environnement chimique de l'acide oléique, traduisant donc une interaction entre le lactochitosan et l'acide oléique. A ce niveau, il est possible de conclure que le lactochitosan et l'acide oléique interagissent l'un avec l'autre pour former l'oléate de lactochitosan. Par ailleurs, il est également possible de souligner que l'acide oléique et linoléique ne présentent pas le même profil de diffusion lorsque ces derniers interagissent avec le lactochitosan. En effet, comme nous l'avons souligné dans la partie caractérisation physico-chimique du linoléate de lactochitosan, l'acide linoléique diffuse au même niveau que le lactochitosan, ce qui n'est pas le cas de l'acide oléique. Cette différence pourrait s'expliquer par le fait que l'encapsulation de l'acide oléique par le lactochitosan est partielle. En effet, si tel était le cas, la valeur de coefficient de diffusion de l'acide oléique au sein de l'échantillon serait alors une moyenne des valeurs de coefficients de l'acide oléique pur et de l'acide oléique lié au lactochitosan.

2.2.3 Elaboration de complexes binaires avec différents acides gras en C18

Après avoir démontré la capacité du chitosan à former des complexes binaires avec l'acide oléique et l'acide linoléique, nous avons voulu évaluer les capacités du vecteur à former des complexes avec d'autres acides gras en C18. Pour ce faire, nous avons fait réagir séparément l'acide linoléique et l'acide stéarique avec le lactochitosan afin d'observer ou non la formation de complexe entre le lactochitosan et l'acide gras. Les résultats de ces essais sont présentés sur le tableau suivant :

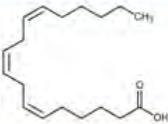

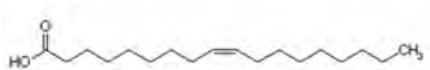
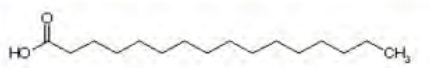
Acide gras	Structure chimique	Formule brute	Log P (Calculé)	Quantité d'acide gras intégrée (en % molaire/quantité lactochitosan)
Acide α -linoléique		$C_{18}H_{30}O_2$	6,5	6
Acide linoléique		$C_{18}H_{32}O_2$	7,0	18
Acide oléique		$C_{18}H_{34}O_2$	7,4	13
Acide stéarique		$C_{18}H_{36}O_2$	7,8	14

Tableau V-4 : récapitulatif des essais d'interaction entre lactochitosan et différents acides gras pour une quantité d'acide introduite de 25% par rapport au lactochitosan

Ce tableau met en évidence une interaction entre le lactochitosan et l'acide α -linoléique d'une part et l'acide stéarique d'autre part. Il est possible de souligner que le taux de fixation de l'acide α -linoléique est très faible puisque pour 25% d'acide linoléique introduit, seulement 6% interagissent avec le lactochitosan. Ce résultat peut probablement être attribué à la conformation « coudée » de l'acide α -linoléique défavorisant son interaction avec le lactochitosan. Concernant l'acide stéarique, son taux d'intégration au sein du lactochitosan est relativement bon, puisque pour une quantité introduite de 25% d'acide stéarique (en molaire par rapport à la quantité de lactochitosan), 14% interagissent avec le lactochitosan.

2.2.4 Conclusions sur la formation de complexes binaires de sels d'acides gras + lactochitosan

Pour des valeurs de Log P comprises entre 7,0 et 7,8, il y a une bonne interaction entre le lactochitosan et l'acide gras, les taux d'incorporation de ces derniers étant compris entre 13 et 18%. Par ailleurs, le faible taux d'incorporation d'acide α -linoléique laisse à penser que la conformation de l'acide gras est également un facteur à prendre en compte lorsque l'on cherche à faire interagir un acide gras et le lactochitosan. Les capacités d'interaction du lactochitosan avec un acide gras étant évaluées, il s'agit maintenant d'étudier les possibilités d'interaction du lactochitosan avec des ingrédients actifs aux propriétés dépigmentantes.

3. Elaboration de complexes binaires de lactochitosan + ingrédients actifs

Dans cette partie, nous avons étudié les capacités du vecteur à base de lactochitosan à former des complexes binaires avec un ingrédient actif aux propriétés dépigmentantes. Les interactions

entre ces deux éléments peuvent se faire soit par le biais d'interactions électrostatiques (figure V-12).

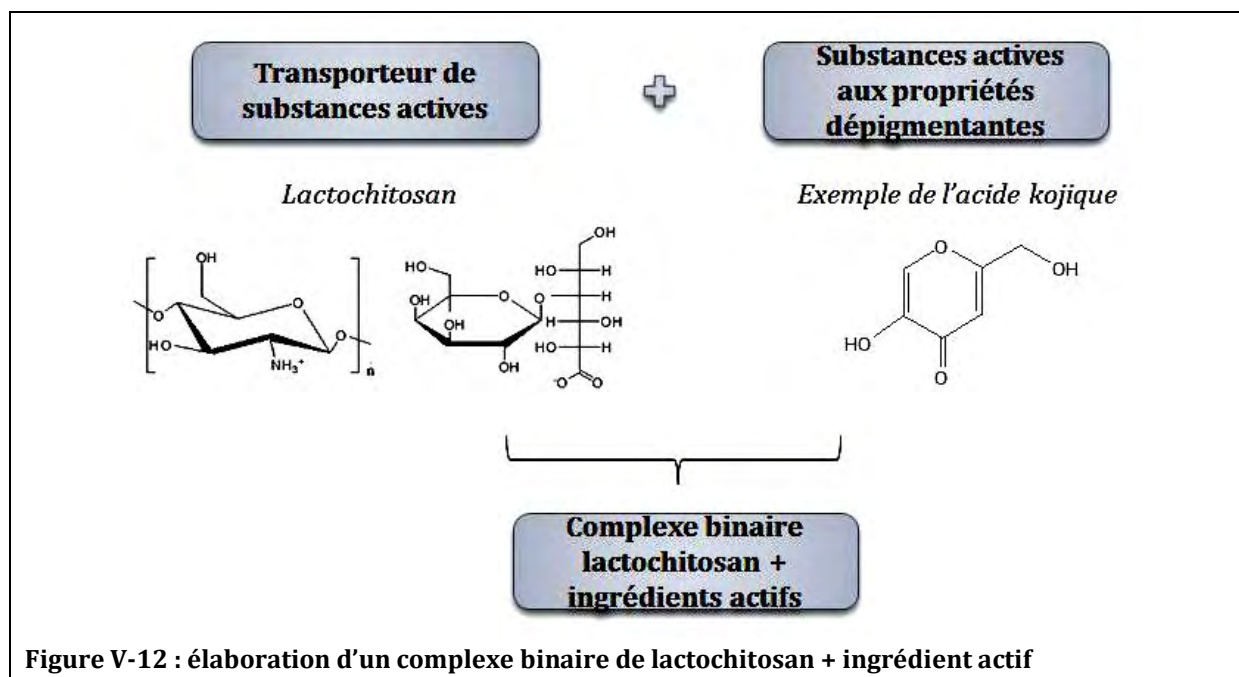


Figure V-12 : élaboration d'un complexe binaire de lactochitosan + ingrédient actif

Plusieurs ingrédients actifs ont été testés, l'acide azélaïque, l'acide kojique, le R000342 et l'acide rétinol. Ces molécules ayant des Log P différents, ont été sélectionnées afin d'étudier l'influence de ce paramètre sur leur capacité à interagir avec le lactochitosan.

3.1 Formation de complexes binaires de lactochitosan + acide azélaïque

3.1.1 Mode opératoire

L'ingrédient actif est simplement ajouté par sonication pendant 4 minutes à une solution de lactochitosan. Une masse de 40 mg d'acide azélaïque a été introduite, cette quantité correspondant à 30% molaire d'acide azélaïque par rapport à la quantité de lactochitosan. Pour rappel, l'acide azélaïque possède une valeur de Log P de 1,2

3.1.2 Caractérisations physico-chimiques du complexe binaire de lactochitosan + acide azélaïque

- **Aspect visuel de la dispersion obtenue**

La dispersion obtenue présente un aspect stable et translucide.

- **Taille des objets obtenus**

Les objets formés présentent un diamètre moyen de 960 nm avec un indice de polydispersité de 0,55. Il est important de souligner que ce diamètre est différent du diamètre du lactochitosan seul ce qui est en faveur d'une interaction entre lactochitosan et acide azélaïque. Les résultats des mesures de DLS sont présentés sur la figure ci-dessous :

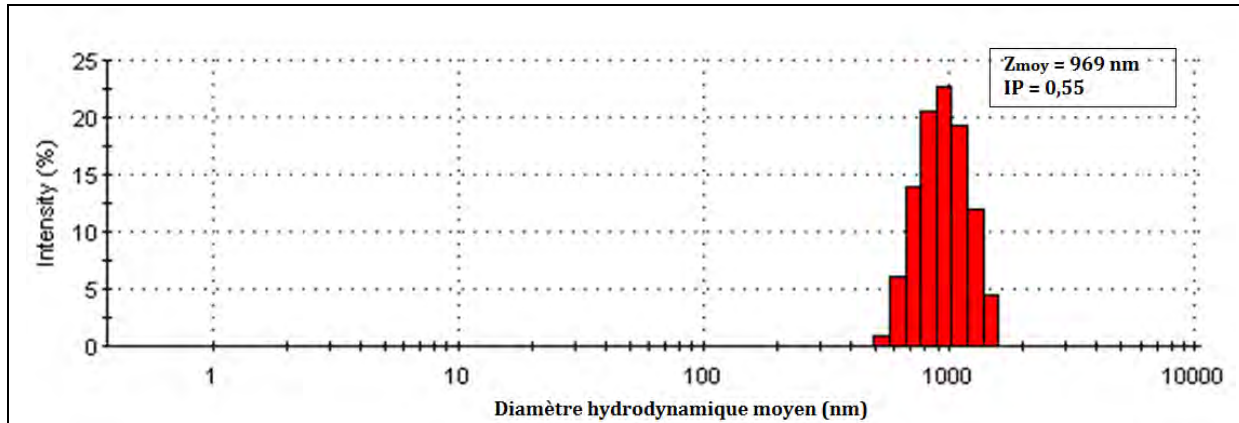


Figure V-13 : distribution de taille des objets de lactochitosan + acide azélaïque, en fonction de l'intensité de diffusion, à 25°C, dans l'eau
Les résultats présentés sont représentatifs des valeurs obtenues sur trois échantillons indépendants

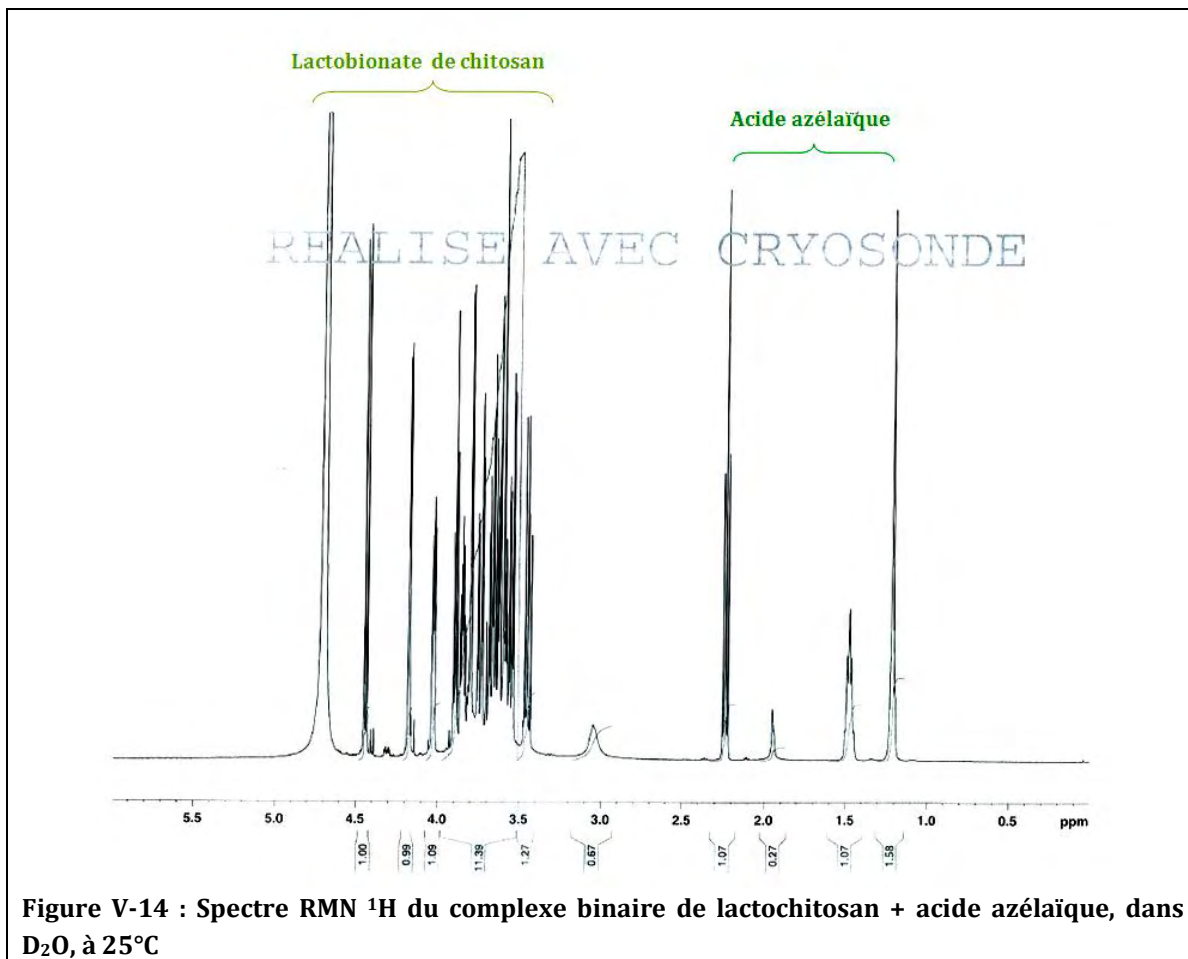
- **Résonance magnétique nucléaire (RMN)**

L'échantillon obtenu a été caractérisé par RMN

- ✦ **RMN ¹H**

L'intérêt de cette analyse est de repérer les fonctions caractéristiques de l'acide azélaïque et du lactochitosan pour confirmer la présence des deux éléments au sein du complexe. Par ailleurs, ce spectre permet également d'évaluer la quantité d'acide azélaïque au sein de la préparation. Le résultat est présenté sur la figure suivante :

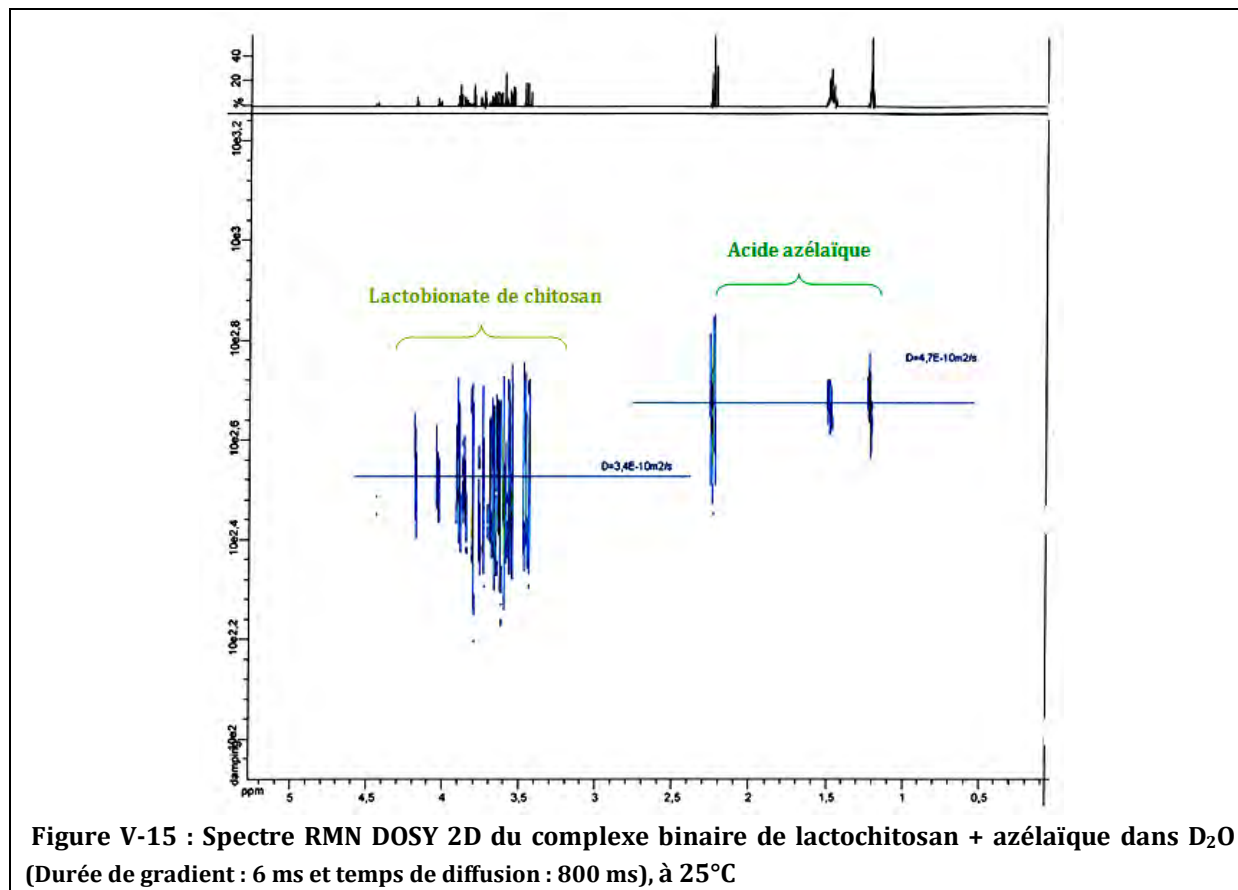
Le spectre ¹H de l'échantillon de lactochitosan + acide azélaïque, réalisé dans D₂O est présenté sur la figure suivante :



Le spectre RMN ^1H du complexe binaire de lactochitosan + acide azélaïque confirme la présence des deux éléments au sein du complexe binaire. Par ailleurs, il est également possible de souligner que la quantité d'acide azélaïque présente au sein de la préparation est de 27% (ce taux de fixation a été déterminé en suivant la même démarche que pour les essais précédents).

✦ RMN DOSY

Une analyse de RMN DOSY a été effectuée, suivant des conditions expérimentales identiques. Aux expériences réalisées précédemment Les résultats sont présentés sur la figure suivante :



Ce spectre permet de mettre en évidence les valeurs de coefficients de diffusion des deux éléments (acide azélaïque et lactochitosan) introduits au sein de la préparation. Ces valeurs sont ensuite comparées à celles de ces deux mêmes éléments seul en solution dans D₂O d'une part et lorsqu'ils sont introduits au sein du complexe ternaire d'autre part afin de déterminer l'existence ou non d'un complexe binaire de lactochitosan + acide azélaïque.

Le tableau suivant résume les valeurs des coefficients de diffusion de l'acide azélaïque et du lactochitosan en fonction des préparations dans lesquelles ils sont incorporés.

		Coefficients de diffusion dans D ₂ O	
		Eléments purs	Complexe binaire
Eléments du complexe	Acide azélaïque	5,0.10 ⁻¹⁰ m ² /s	4,7.10 ⁻¹⁰ m ² /s
	Lactochitosan	3,0.10 ⁻¹⁰ m ² /s	3,4.10 ⁻¹⁰ m ² /s

Tableau V-5 : Récapitulatif des valeurs de coefficients de diffusion de l'acide azélaïque et du lactochitosan en fonction de la préparation dans laquelle ils sont incorporés.

Ce tableau permet de mettre en évidence plusieurs éléments ; dans un premier temps, il est possible d'observer que les coefficients de diffusion du lactochitosan et de l'acide azélaïque incorporés au sein de la préparation binaire sont légèrement différents de ceux des éléments

seuls. Cette petite différence serait en faveur d'une partielle association entre le lactochitosan et l'acide azélaïque.

- **Microscopie électronique à transmission**

Par la suite, nous avons cherché à observer la préparation en microscopie électronique à transmission en suivant les mêmes conditions opératoires que précédemment. Les clichés de ces observations sont présentés sur les figures suivantes :

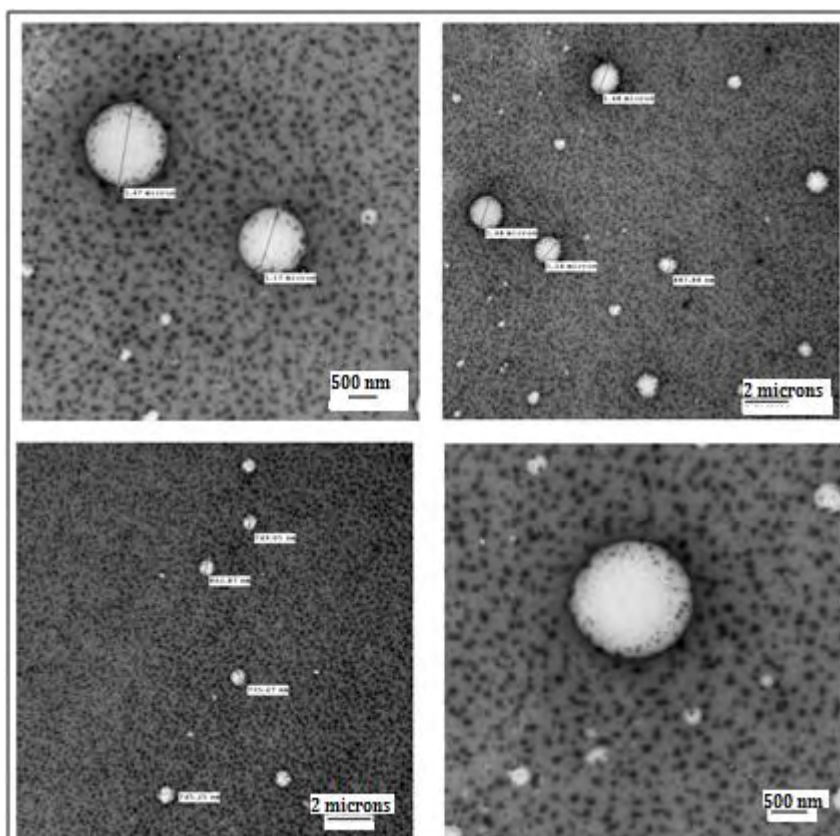


Figure V-16 : Clichés des observations en microscopie électronique à différents grossissements de la préparation de lactobionate de chitosan + Acide azélaïque, contrasté à l'acétate d'uranyle.

Les clichés de microscopie électronique présentés ci-dessus mettent en évidence des objets de morphologie sphérique présentant une taille comprise entre 700 nm et 1 micron.

En conclusion, l'ensemble des techniques de caractérisation physico-chimiques semblent indiquer une intégration partielle de l'acide azélaïque dans le complexe binaire. De ce fait, dans la suite de cette partie, la capacité du lactochitosan à interagir avec d'autres ingrédients actifs va être évaluée.

3.2 Formation de complexes binaire de lactochitosan + acide kojique

A ce niveau, nous cherchons à évaluer les capacités du lactochitosan à interagir avec un agent actif très hydrophile, l'acide kojique. L'intérêt de ce test est d'étudier le comportement de cet

agent actif qui du fait de sa forte hydrophilie aura davantage tendance à rester en solution aqueuse.

3.2.1 Mode opératoire

L'acide kojique étant insoluble dans l'éthanol, le complexe binaire de lactochitosan + acide kojique a été préparé suivant un mode opératoire identique à celui utilisé pour la préparation du complexe binaire de lactochitosan + acide azélaïque. L'acide kojique se caractérise par une valeur de Log P (calculée) de -0,6.

Une quantité de 30 mg d'acide kojique a été introduite au sein du complexe, cette quantité correspondant à 30% molaire d'acide kojique par rapport à la quantité de lactochitosan.

3.2.2 Caractérisations physico-chimiques du complexe binaire de lactochitosan + acide azélaïque

- **Aspect visuel de la dispersion obtenue**

La dispersion obtenue présente un aspect stable et translucide.

- **Taille des objets obtenus**

L'appareil de diffusion dynamique de la lumière détecte des objets présentant une taille de 1111 nm avec un indice de polydispersité de 0,71. Ces résultats sont présentés sur la figure suivante :

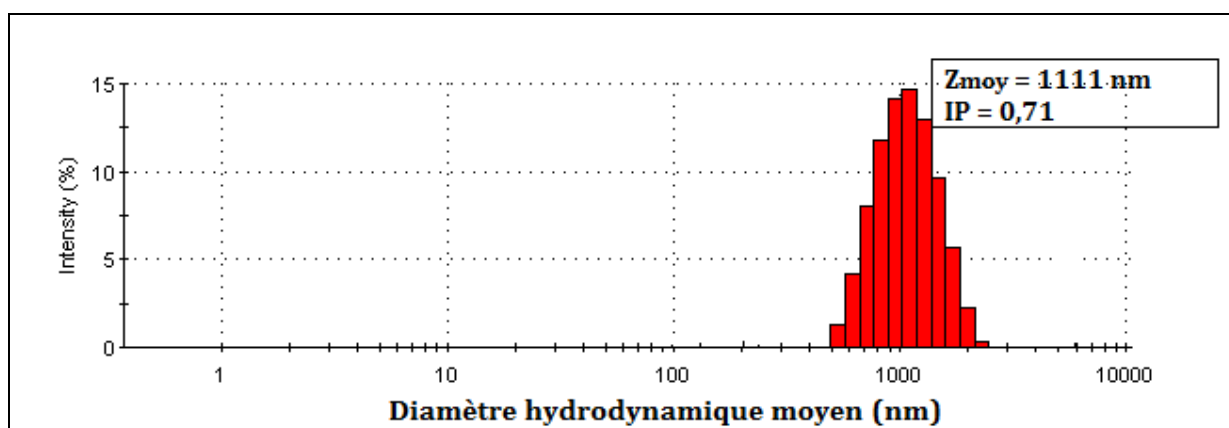


Figure V-17 : distribution de taille de l'échantillon de lactochitosan + acide kojique, en fonction de l'intensité de diffusion, à 25°C, dans l'eau

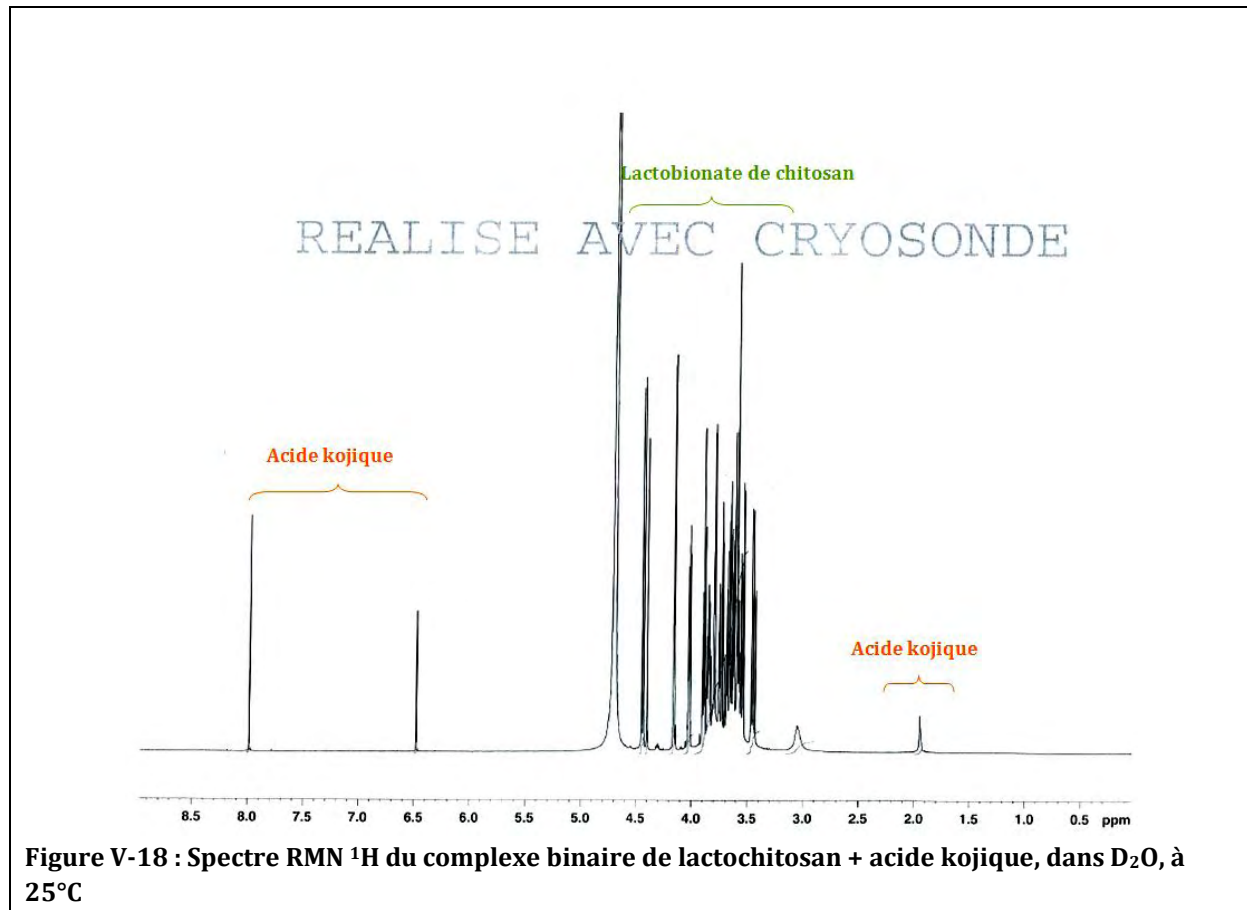
Les résultats présentés sont représentatifs des valeurs obtenues sur trois échantillons indépendants

- **Résonance magnétique nucléaire (RMN)**

L'échantillon obtenu a été caractérisé en RMN

RMN ¹H

Le spectre ¹H de l'échantillon obtenu est présenté sur la figure suivante :



Le spectre RMN ^1H du complexe binaire de lactochitosan + acide kojique confirme la présence et la bonne intégrité chimique de l'acide kojique et du lactochitosan. L'interaction éventuelle entre ces deux éléments est étudiée dans la partie suivante grâce aux expériences de RMN DOSY.

DOSY

Une expérience de RMN DOSY a été réalisée afin de caractériser les interactions entre lactochitosan et acide kojique et de mettre en évidence les valeurs des coefficients de diffusion de l'acide kojique et du lactochitosan. Le résultat de cette analyse est présenté sur la figure suivante :

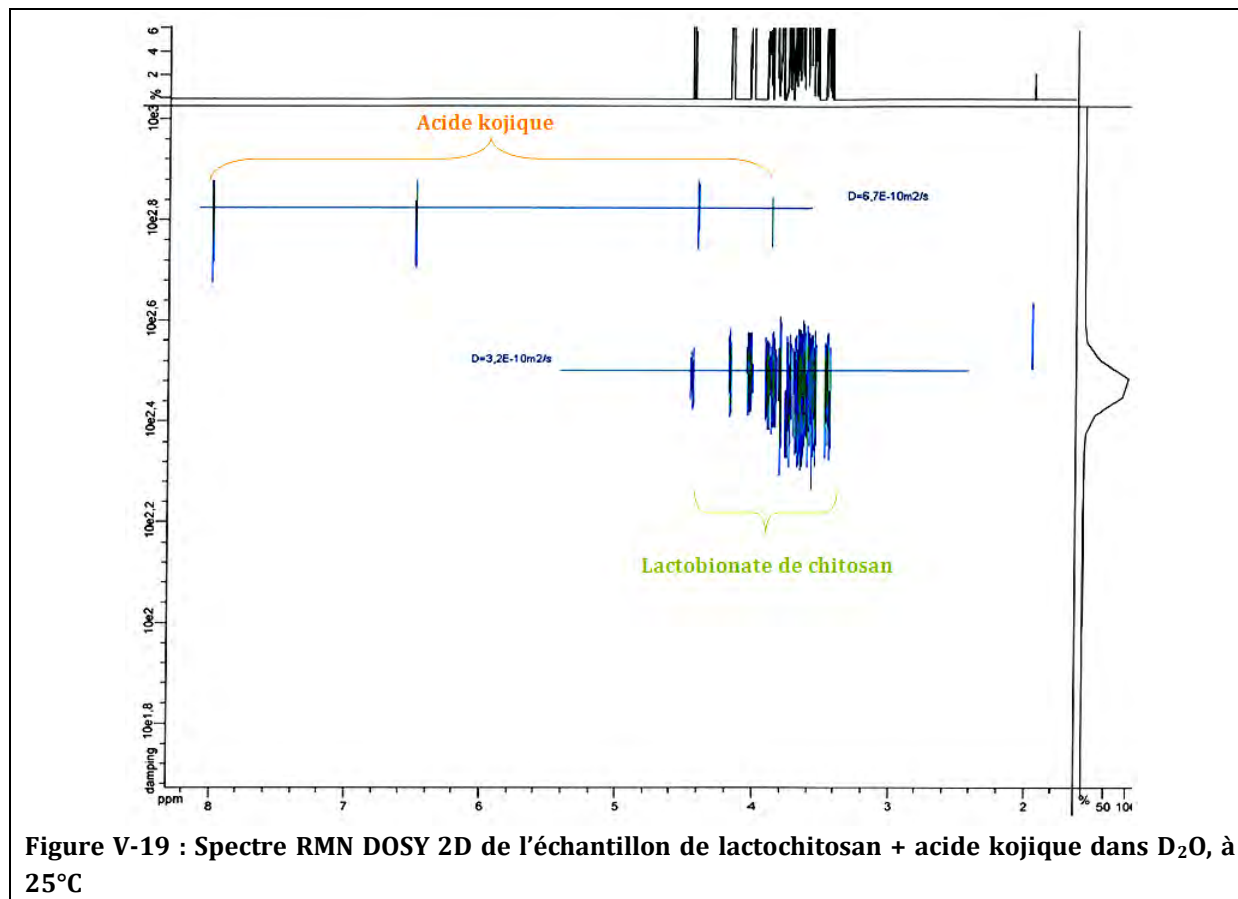


Figure V-19 : Spectre RMN DOSY 2D de l'échantillon de lactochitosan + acide kojique dans D₂O, à 25°C

Ce spectre permet de mettre en évidence les valeurs de coefficients de diffusion des deux éléments (acide kojique et lactochitosan) introduits au sein de la préparation. Ces valeurs sont ensuite comparées à celles de ces deux mêmes éléments seuls en solution dans D₂O afin de déterminer l'existence ou non d'un complexe binaire de lactochitosan + acide kojique.

Le tableau suivant résume les valeurs des coefficients de diffusion de l'acide kojique et du lactobionate de chitosan en fonction des préparations dans lesquelles ils sont incorporés.

		Coefficients de diffusion dans D ₂ O	
		Éléments purs	Complexe binaire
Éléments du complexe	Acide kojique	6,7.10 ⁻¹⁰ m ² /s	6,7.10 ⁻¹⁰ m ² /s
	Lactochitosan	3,0.10 ⁻¹⁰ m ² /s	3,2.10 ⁻¹⁰ m ² /s

Tableau V-6 : Récapitulatif des valeurs de coefficients de diffusion de l'acide kojique et du lactochitosan purs et au sein de l'échantillon.

En observant les résultats figurant dans le tableau ci-dessus, nous remarquons que l'acide kojique se caractérise par la même valeur de coefficient de diffusion qu'il se trouve pur dans D₂O ou introduit avec le lactochitosan. Cette observation indique que l'acide kojique n'interagit pas

avec le lactochitosan. L'acide kojique, très hydrophile, reste préférentiellement en solution dans l'eau et n'établit pas d'interaction avec le lactochitosan.

3.3 Formations de complexes binaires de lactochitosan + autres agents actifs

A ce niveau, il s'agit de déterminer les caractéristiques physico-chimiques des molécules actives susceptibles d'interagir avec le lactochitosan. Pour cela, nous avons évalué les capacités des différents ingrédients actifs à interagir avec le lactochitosan. Nous avons donc testé un autre principe actif, le R000342. Les résultats de ces essais sont récapitulés dans le tableau suivant :

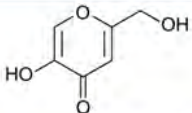
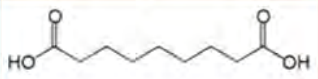
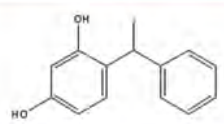
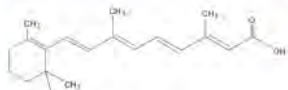
Actif	Structure chimique	Formule brute	Log P (Calculé)	Quantité d'actif introduite (en % molaire / quantité de lactochitosan introduite)	Quantité d'actif intégrée (en % molaire/quantité lactochitosan)
Acide kojique		C ₆ H ₆ O ₄	-0,6	33	0
Acide azélaïque		C ₉ H ₁₆ O ₄	1,2	33	27
R000342		C ₁₄ H ₁₄ O ₂	3,0	33	21
Acide rétinol		C ₂₀ H ₂₈ O ₂	6,2	1	0

Tableau V-7 : récapitulatif des essais d'incorporation de molécules actives au sein de lactochitosan en fonction du log P.

NB : les taux de fixation des ingrédients actifs ont été déterminés par RMN 1H suivant la même logique, précédemment décrite.

Ce tableau met en évidence que les interactions entre lactochitosan et molécules actives sont possibles mais dans une gamme de valeurs de log P bien définie. On remarque d'une part, que si la molécule introduite possède un caractère hydrophile marquée (et donc une faible valeur de Log P), celle-ci aura tendance à rester en solution dans l'eau et n'interagira pas avec le lactochitosan. C'est notamment le cas de l'acide kojique qui avec une valeur de Log P de -0,6 n'interagit pas avec le lactochitosan pour former des complexes. D'autre part, il est également possible de souligner qu'une molécule ayant une valeur de Log P élevée et donc un fort caractère lipophile, ne sera pas non plus capable d'établir des interactions avec le lactochitosan. En effet, le caractère lipophile du lactochitosan provient des fonctions acétyles du chitosan. Or, le chitosan utilisé dans cette étude possède un degré de désacétylation de 85% et ne possède par conséquent que très peu de groupements acétyles. C'est pourquoi, l'acide rétinol qui se caractérise par un Log P de 6,2 n'interagit pas avec le lactochitosan. L'encapsulation de

molécules actives par le lactochitosan est possible mais pour des molécules ayant des valeurs de Log P compris dans un intervalle bien définie comme le montre la figure suivante :

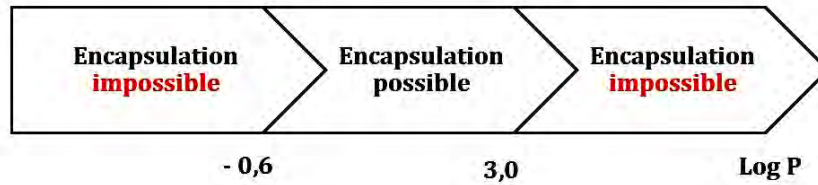


Figure V-20 : intervalle de valeurs de Log P pour lesquelles l'encapsulation de molécules actives par le lactochitosan est possible

4. Conclusions

Le lactochitosan constitue un vecteur de base pour l'encapsulation de molécules actives, puisque celui-ci est capable d'interagir par le biais d'interactions électrostatiques et/ou hydrophobes avec des molécules actives et des acides gras afin de former des complexes binaires de linoléate, oléate, stéarate ou α -linoléate de lactochitosan ou de lactochitosan + molécules actives. Les objets ainsi formés, se caractérisent par une taille de l'ordre du micron (inférieure à celle du vecteur de lactochitosan) et présentent une morphologie et un aspect tout à fait caractéristique. En effet, les objets de linoléate de lactochitosan formés présentent une morphologie sphérique délimitée par une « couronne » possédant un aspect différent. Cependant, celui-ci ne constitue pas un vecteur universel puisqu'il n'est pas capable d'interagir avec toutes les molécules. En effet, il a été possible d'observer au cours de ces différents essais d'encapsulation de molécules actives par le lactochitosan que les molécules possédant un caractère hydrophile trop prononcé avaient tendance à rester préférentiellement en solution dans l'eau, c'est notamment le cas de l'acide kojique qui possède une valeur de Log P de -0,6. A l'inverse, il a également été mis en évidence que les molécules à fort caractère hydrophobe ne sont pas capables d'établir des liaisons avec le lactochitosan, c'est le cas de l'acide rétinoïque qui se caractérise par une valeur de Log P de 6,2. Dans ce cas de figure, le lactochitosan ne possédant pas une hydrophobie suffisante pour établir des interactions avec des molécules au caractère hydrophobe marqué. En effet le chitosan utilisé au cours de ces essais possède un degré de désacétylation de 85% et ne possède donc que 15% de fonctions acétyle pouvant apporter un caractère hydrophobe. Par conséquent, il est possible d'avancer à ce niveau que le lactochitosan constitue un vecteur pour des molécules possédant une valeur de log P ni trop importante, ni trop faible.

De plus, la possibilité de formation de complexes entre lactochitosan et acide gras met en évidence la capacité de stabilisation par le lactochitosan, d'éléments hydrophobes en solution dans l'eau. Cette capacité est également conditionnée par les caractéristiques structurales et physico-chimiques de l'acide gras introduit. En effet, il semblerait que la configuration spatiale de l'acide gras possède une influence sur le taux de fixation de ce dernier sur le lactochitosan. L'acide α -linoléique qui possède une configuration spatiale coudée interagit avec le lactochitosan avec un taux de fixation plus faibles que les autres acides gras.

La possibilité de formation de complexes binaires à partir de lactochitosan ayant été démontrée, nous allons alors tenter d'intégrer un troisième élément au système afin de mettre au point des systèmes ternaires d'oléate/linoléate de lactochitosan + molécules actives.

CHAPITRE VI :

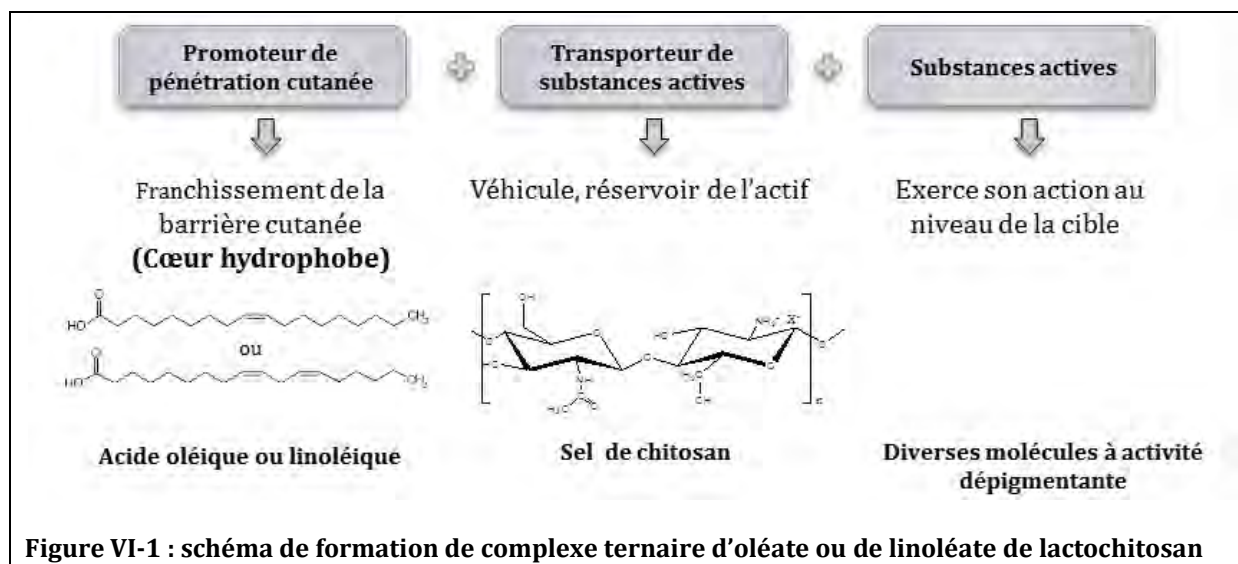
**ELABORATION ET CARACTERISATION DE
COMPLEXES TERNAIRES DE LINOLEATE OU
D'OLEATE DE LACTOCHITOSAN +
INGREDIENTS ACTIFS**

Chapitre VI

Elaboration et caractérisations de complexes ternaires de linoléate ou oléate de lactochitosan + ingrédients actifs

1. Introduction

Les capacités d'encapsulation d'ingrédients actifs aux propriétés dépigmentantes et de stabilisation d'émulsion sans ajout de tensio-actif du lactochitosan démontrées, la suite de cette étude s'est naturellement orientée vers la formation de complexes ternaires composés d'oléate ou de linoléate de lactochitosan + ingrédients actifs. Pour mener à bien cet objectif, nous nous sommes appuyés sur l'expérience acquise au cours des essais précédents, tant sur les modes opératoires que sur les techniques de caractérisations physico-chimiques.



Dans ce chapitre, nous allons tenter de former différents systèmes ternaires (figure VI-1) en faisant varier aussi bien la nature de l'acide gras que la nature de l'ingrédient actif afin de réaliser une étude physico-chimique approfondie de ces systèmes. Pour ce faire, nous étudierons dans un premier temps des systèmes ternaires de linoléate de lactochitosan + ingrédient actif puis des systèmes d'oléate de lactochitosan + ingrédient actif.

2. Complexes ternaires de linoléate de lactochitosan + ingrédient actif

L'objectif à ce niveau est de mettre au point et de caractériser des complexes ternaires de linoléate de chitosan + ingrédient actif. Les molécules actives testées possédant des caractéristiques physico-chimiques différentes, différents modes opératoires sont envisagés. Afin de préparer les systèmes ternaires, nous utilisons la technique de diffusion de solvant, celle-ci supposant la solubilité de l'ingrédient actif dans l'éthanol.

2.1 Modes opératoires

Comme nous l'avons expliqué dans la partie précédente, deux modes opératoires sont envisagés, en fonction de la solubilité ou non de la molécule active dans l'éthanol. Par ailleurs, il est important de préciser que tous les complexes ternaires de linoléate de lactochitosan + agent actif, sont élaborés avec 25% d'acide linoléique (pourcentage molaire par rapport à la quantité de lactochitosan) et à température ambiante, les acides gras insaturés étant sensibles à la chaleur.

2.1.1 Molécules solubles dans l'éthanol (Voie 1)

Afin d'incorporer les molécules actives au sein des systèmes, nous utilisons la technique de diffusion de solvant précédemment décrite. Après avoir solubilisé l'acide linoléique et la molécule active dans un millilitre d'éthanol, l'ensemble est introduit goutte à goutte, à l'aide d'une seringue à une solution de lactochitosan, comme le décrit la figure ci-dessous :

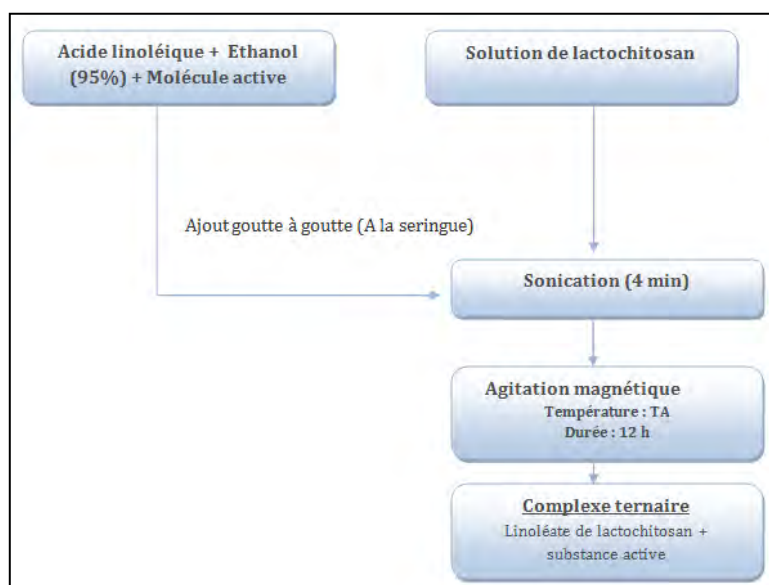


Figure VI-2 : mode opératoire suivi pour la préparation de complexe ternaire de linoléate de lactochitosan + molécule active soluble dans l'éthanol (voie 1)

2.1.2 Molécules insolubles dans l'éthanol et soluble dans l'eau (Voie 2)

Pour la préparation de linoléate de lactochitosan + molécules actives insolubles dans l'éthanol et soluble dans l'eau, le mode opératoire utilisé est décrit sur la figure suivante :

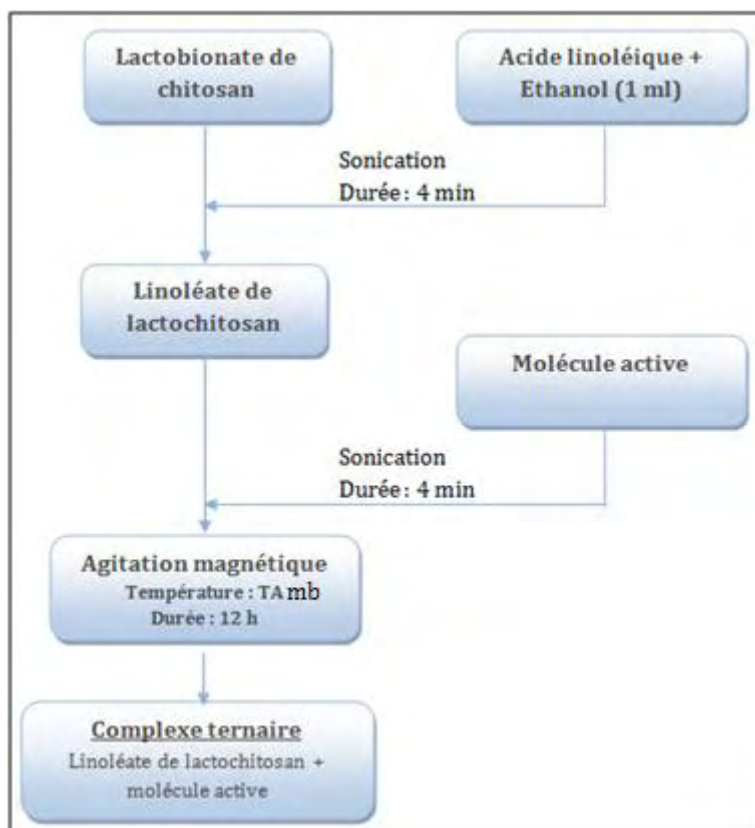


Figure VI-3 : mode opératoire suivi pour la préparation de complexe ternaire de linoléate de lactochitosan + molécule active insoluble dans l'éthanol et soluble dans l'eau (voie 2)

En fonction des caractéristiques physico-chimiques des molécules actives employées, l'une des voies sera utilisée pour la préparation des systèmes ternaires.

2.2 Elaboration et caractérisation de complexes ternaires de linoléate de lactochitosan + molécules actives

2.2.1 Complexes ternaires de linoléate de lactochitosan + R000342

2.2.1.1 Mode opératoire

Le R000342 étant soluble dans l'éthanol, la voie de préparation n°1 est utilisée pour élaborer le complexe. Une proportion de 33% (molaire par rapport à la quantité de lactochitosan introduite) de R000342 est introduite au sein du complexe. Le R000342 se caractérise par une valeur de Log P (calculée) de 3,0.

2.2.1.2 Caractérisations physico-chimiques

- Aspect visuel de la dispersion obtenue

La dispersion obtenue présente un aspect stable et laiteux.

- Taille des objets obtenus

Les objets formés présentent une taille de **2618** nm avec un indice de polydispersité de **0,25**.
Les résultats de ces mesures sont présentés sur la figure ci-dessous :

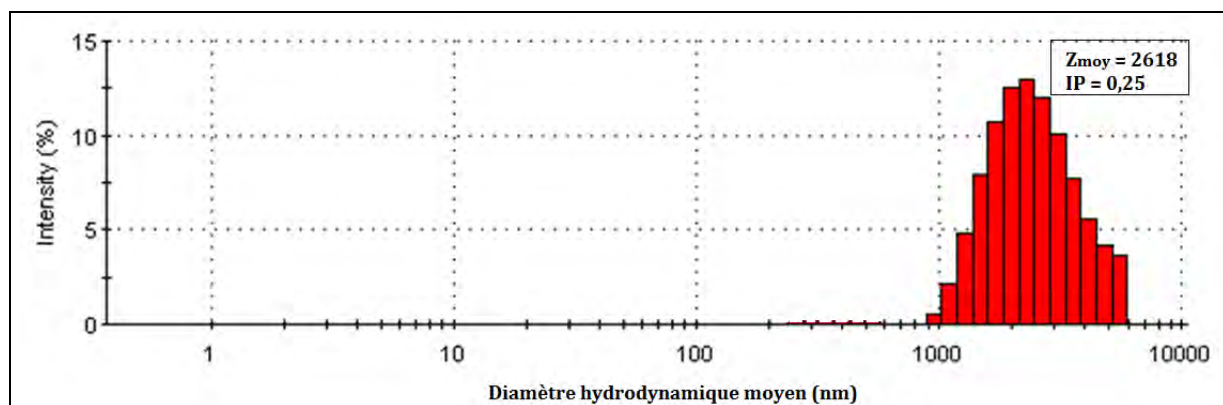


Figure VI-4 : distribution de taille des complexes de linoléate de lactochitosan + R000342, en fonction de l'intensité de diffusion, à 25°C, dans l'eau
Les résultats présentés sont représentatifs des valeurs obtenues sur trois échantillons indépendants

- *Technique de résonance magnétique nucléaire*

RMN ¹H

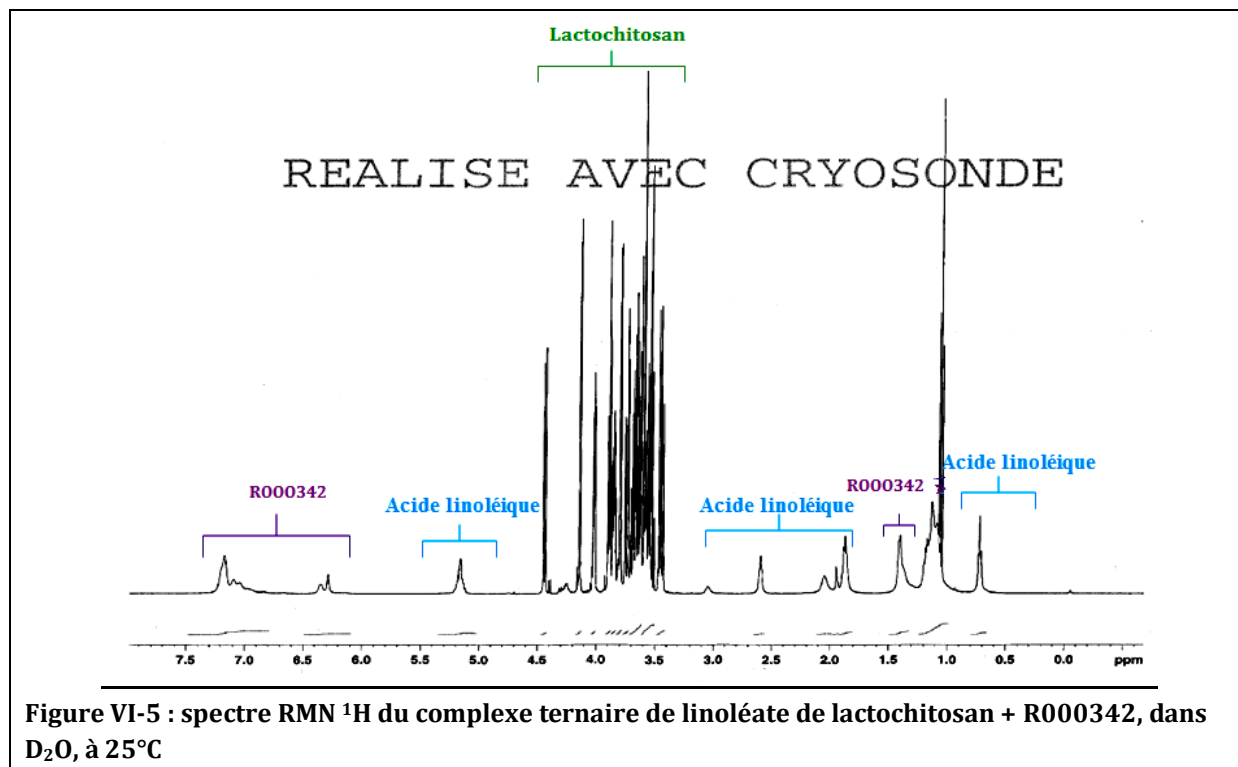


Figure VI-5 : spectre RMN ¹H du complexe ternaire de linoléate de lactochitosan + R000342, dans D₂O, à 25°C

Le spectre ci dessus met en évidence la présence des trois éléments de l'association ternaire (lactochitosan, acide linoléique ainsi que le R000342) au sein de la préparation. Cette analyse RMN permet également de déterminer le taux de fixation d'agent actif en interaction avec le lactochitosan, celui-ci est de **20%** (molaire par rapport à la quantité de lactochitosan introduite). Le taux d'acide linoléique intégré au vecteur est de 18% (par rapport à une quantité introduite de 25%). Le déplacement chimique à 5,2 ppm permet de s'assurer de la bonne intégrité chimique de l'acide linoléique.

DOSY

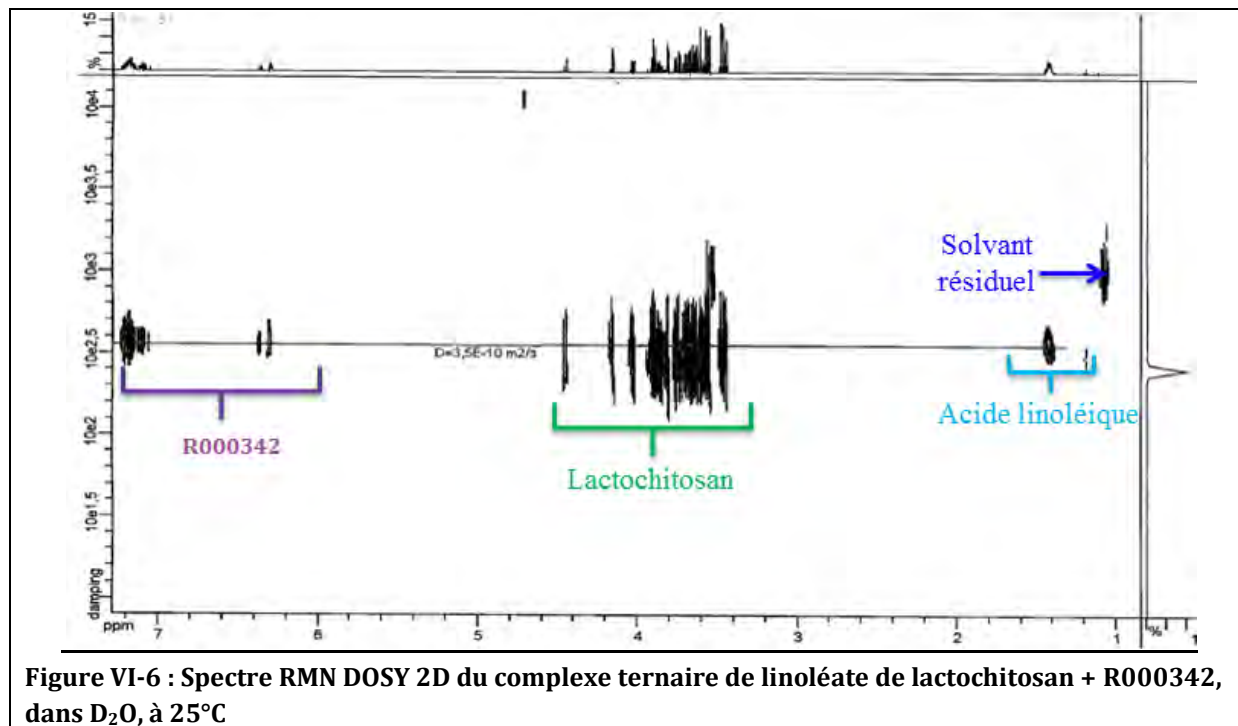


Figure VI-6 : Spectre RMN DOSY 2D du complexe ternaire de linoléate de lactochitosan + R000342, dans D₂O, à 25°C

Cette expérience (figure VI-6) permet de mettre en évidence des coefficients de diffusion identiques que ce soit pour le lactochitosan, l'acide linoléique ou encore le R000342. Les trois éléments ayant le même coefficient de diffusion ($3,5 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$), nous pouvons conclure que ces trois éléments sont en interaction les uns avec les autres. Par ailleurs, soulignons que dans ce cas, le R000342 se trouve au même niveau de diffusion que le lactochitosan. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que l'interaction du R000342 avec le lactochitosan dans ce cas serait totale, ce qui pourrait expliquer des profils de diffusion identiques entre lactochitosan et molécule active.

2.2.2 Complexes ternaires de linoléate de lactochitosan + acide azélaïque

2.2.2.1 Caractéristiques de l'acide azélaïque

2.2.2.2 Mode opératoire

L'acide azélaïque étant instable dans l'éthanol, la voie de préparation utilisée pour l'élaboration de ce complexe est la voie 2. Une masse de 40 mg d'acide azélaïque a été introduite, correspondant à 33% en molaire de lactochitosan. Pour rappel, l'acide azélaïque se caractérise par une valeur de Log P (calculée) de 1,2.

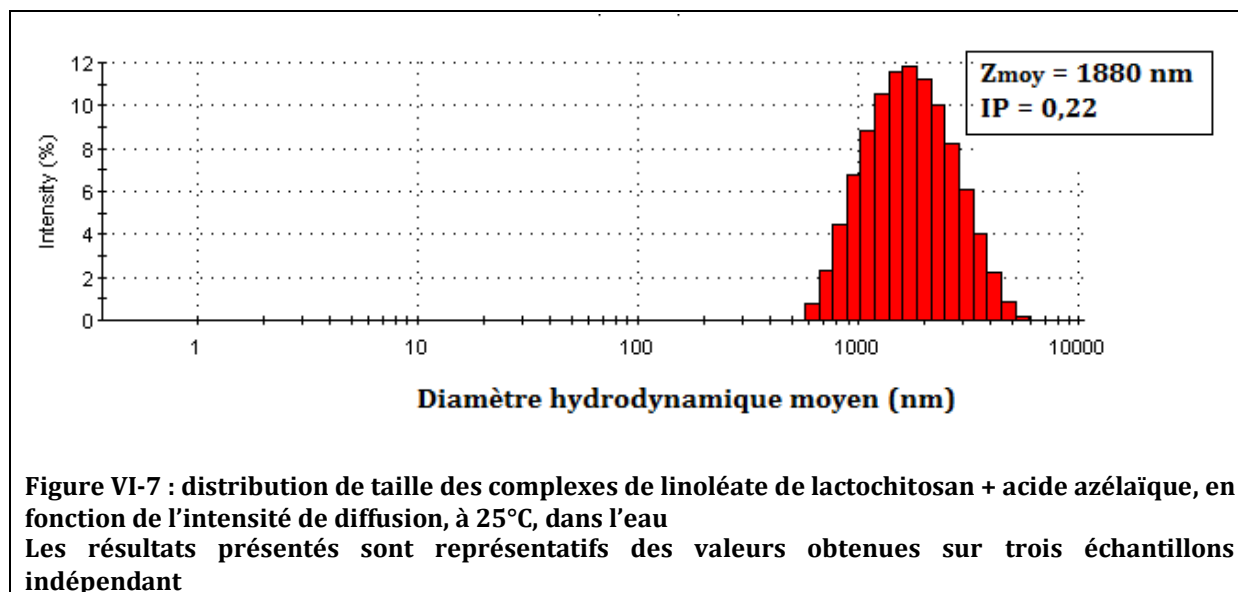
2.2.2.3 Caractérisations physico-chimiques

- *Aspect visuel de la dispersion obtenue*

La dispersion obtenue présente un aspect stable et laiteux après une agitation magnétique de 12 h, température ambiante.

- *Taille des objets obtenus*

Les objets formés présentent une taille de 1880 nm avec un indice de polydispersité de 0,22. Les résultats des mesures sont présentés sur la figure ci-dessous :



- *Technique de résonance magnétique nucléaire*

RMN ¹H

Le spectre (figure VI-8) nous permet dans un premier temps, de mettre en évidence la présence des trois éléments de l'association (Lactochitosan, acide linoléique et acide azélaïque) au sein du complexe ternaire.

Par ailleurs, le déplacement chimique caractéristique des protons éthyléniques à 5,2 ppm permet de s'assurer de l'intégrité chimique de l'acide linoléique, celui-ci n'a donc pas subi de dégradation au cours de la préparation du complexe ternaire.

En ce qui concerne les taux de fixation d'acide linoléique et d'acide azélaïque, celui d'acide linoléique est de **15%** (par rapport à une quantité introduite de 25% en molaire par rapport à la quantité de lactochitosan introduite) et celui de l'acide azélaïque est de **30%** (par rapport à une quantité introduite de 33% molaire par rapport à une quantité de lactochitosan introduite).

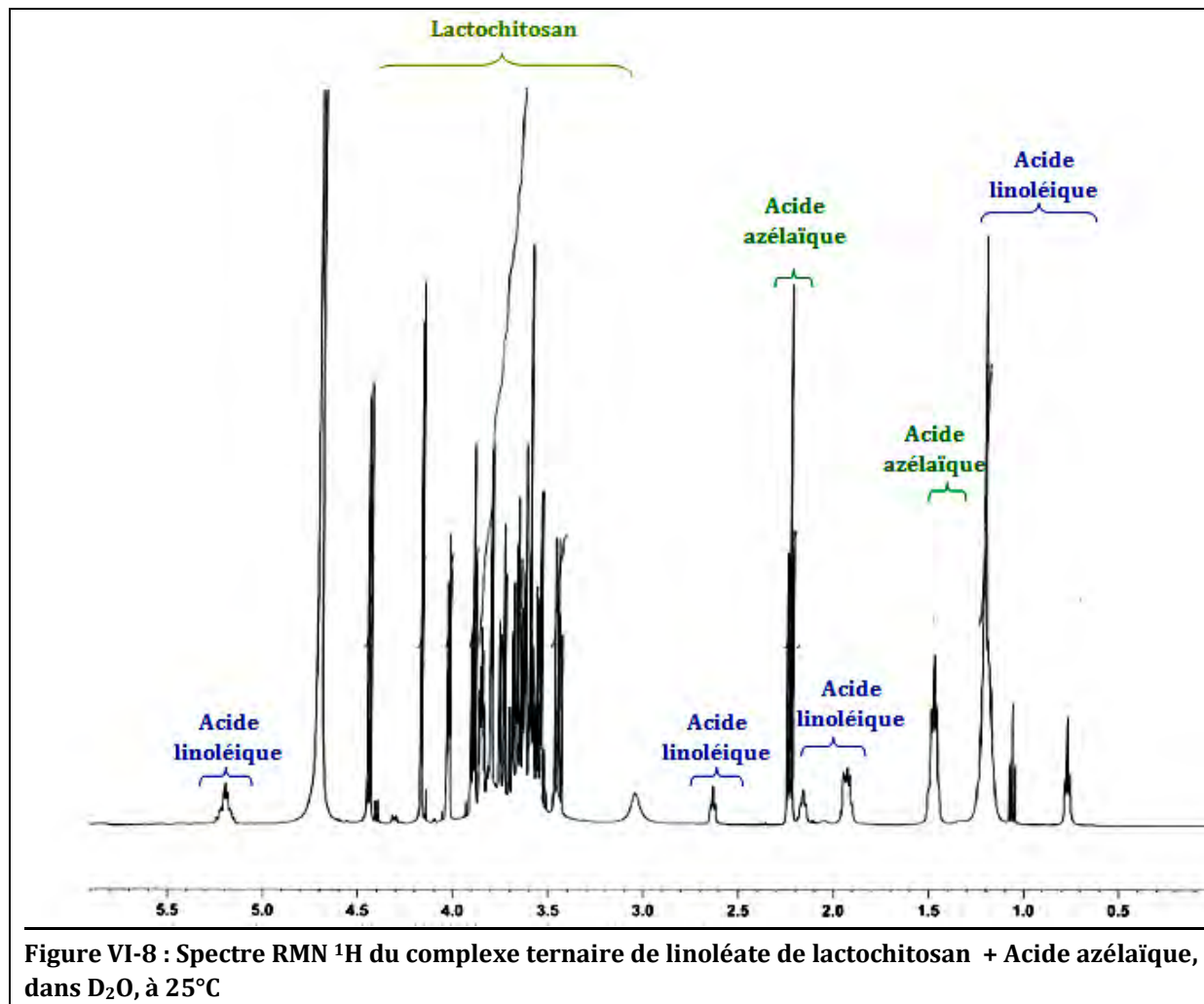
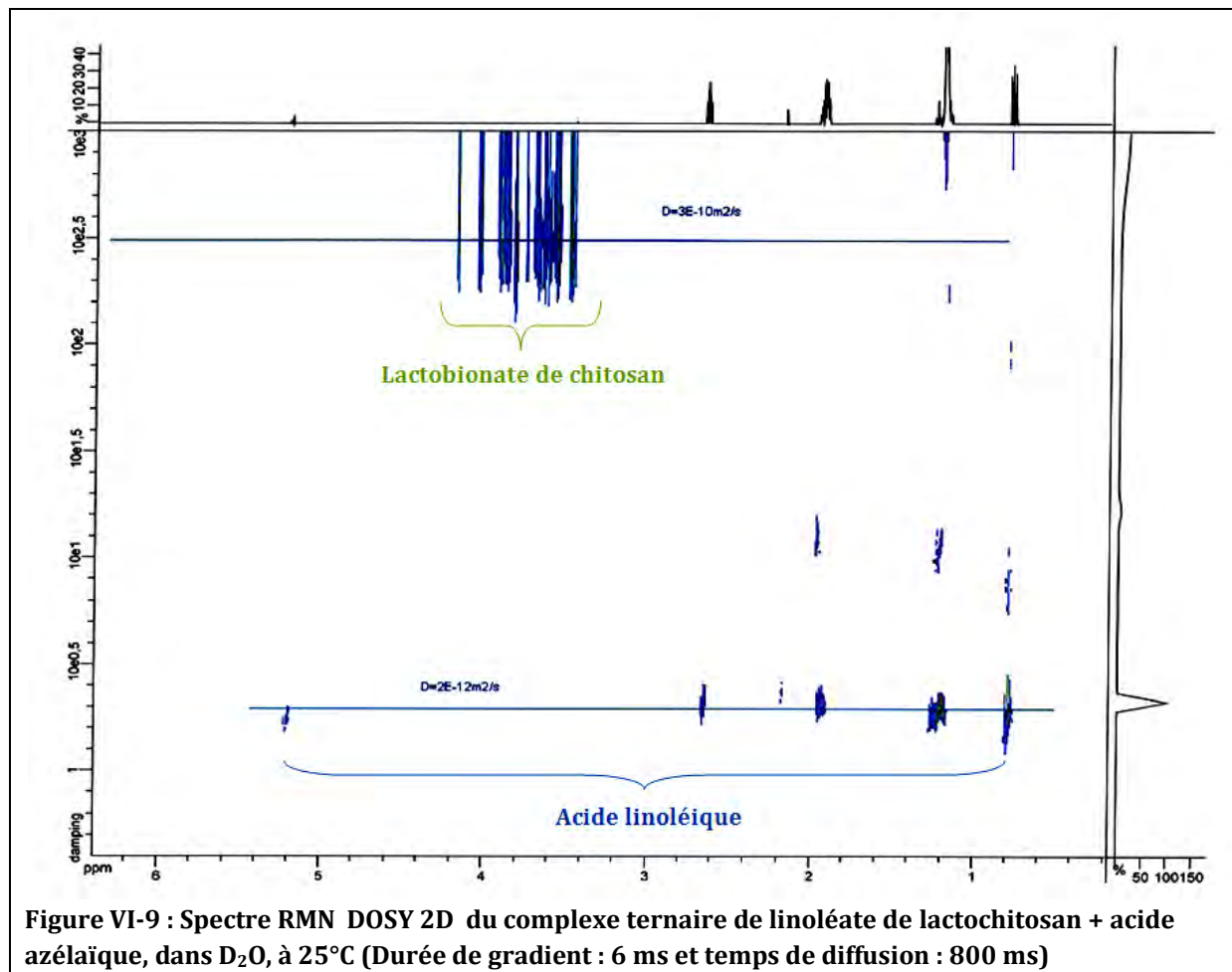


Figure VI-8 : Spectre RMN ¹H du complexe ternaire de linoléate de lactochitosan + Acide azélaïque, dans D₂O, à 25°C

DOSY

Afin d'analyser le profil de diffusion de l'association ternaire de linoléate de lactochitosan + acide azélaïque, des analyses de DOSY ont été réalisées ; une première expérience a été effectuée avec une durée de gradient de 6 ms et un temps de diffusion de 800 ms, conditions opératoires adéquates pour observer la diffusion de l'acide linoléïque. Les résultats de cette expérience sont présentés sur la figure suivante :



Cette carte DOSY permet de mettre en évidence deux valeurs de coefficients de diffusion différentes. D'une part, un premier coefficient de diffusion de $3,0 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ correspondant au lactochitosan en association avec l'acide azélaïque. D'autre part, le coefficient de diffusion de l'acide linoléique à $2,0 \cdot 10^{-12} \text{ m}^2/\text{s}$.

Puis, une seconde expérience de DOSY a été menée afin de déterminer le coefficient de diffusion de l'acide azélaïque dans D₂O lorsque celui-ci est introduit au sein du complexe. Pour ce faire les conditions opératoires de la DOSY ont été ajustées et l'analyse a donc été réalisée avec une durée de gradient de 1 ms et un temps de diffusion de 100 ms. Les résultats de cette analyse sont présentés sur la carte DOSY suivante :

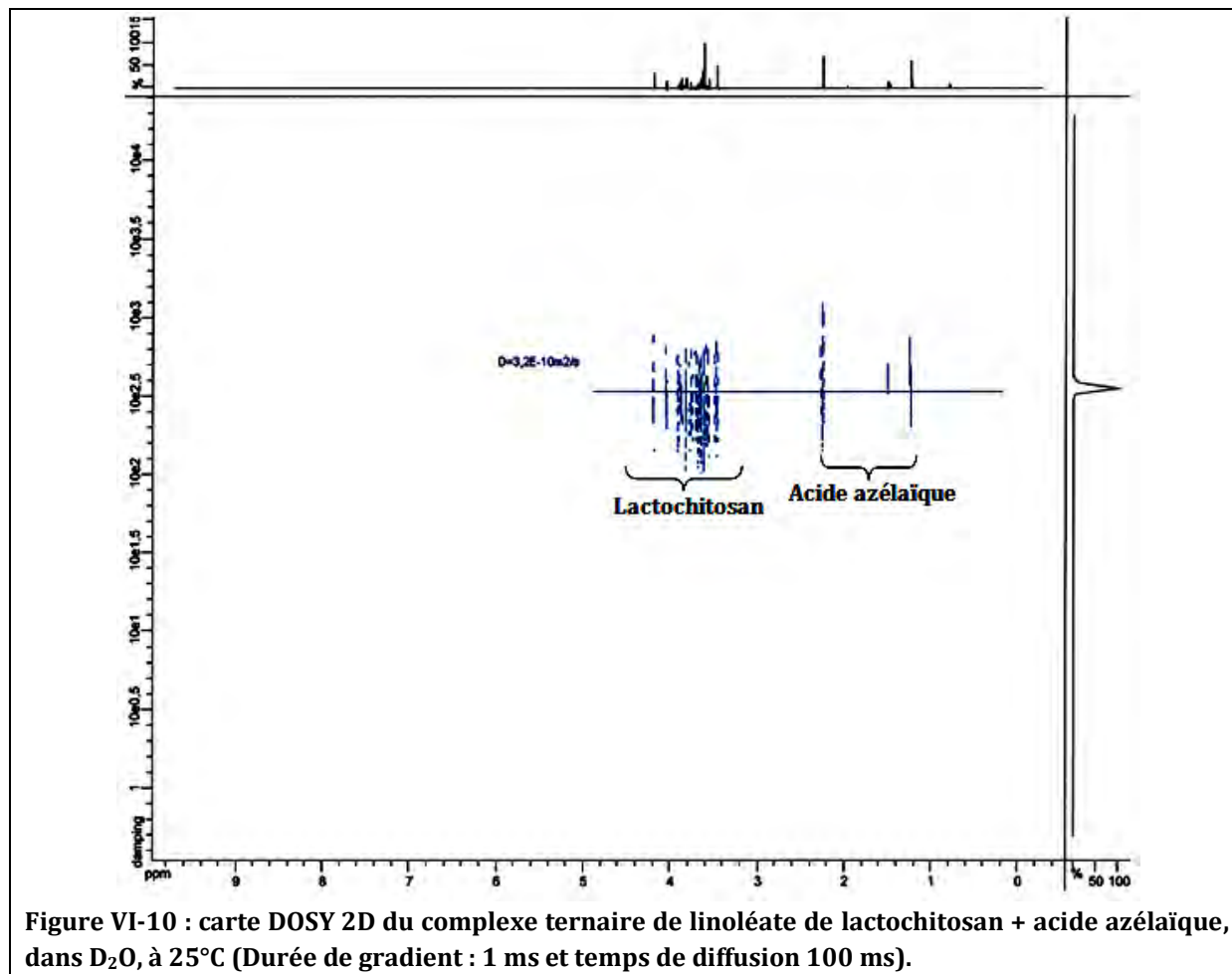


Figure VI-10 : carte DOSY 2D du complexe ternaire de linoléate de lactochitosan + acide azélaïque, dans D₂O, à 25°C (Durée de gradient : 1 ms et temps de diffusion 100 ms).

Cette analyse de DOSY permet de déterminer la valeur du coefficient de diffusion de l'acide azélaïque dans D₂O, celui-ci possède un coefficient de diffusion de $3,2 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ lorsqu'il est introduit au sein du complexe ternaire alors que lorsque cet agent actif se trouve pur dans D₂O il est caractérisé par une valeur de coefficient de diffusion de $5,0 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$.

Récapitulatif résultats DOSY :

Le tableau suivant résume les coefficients de diffusion du lactochitosan, de l'acide linoléique et de l'acide azélaïque purs et au sein des complexes :

Complexe ternaire	Eléments du complexe	Coefficient de diffusion des éléments complexés	Coefficient de diffusion des éléments purs	Solvant
Linoléate de lactochitosan + acide azélaïque	Lactochitosan	$3,2 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$	$3,3 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$	D ₂ O
	Acide azélaïque	$3,2 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$	$5,0 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$	D ₂ O
	Acide linoléique	$2,0 \cdot 10^{-12} \text{ m}^2/\text{s}$	$8,0 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$	D ₂ O

Tableau VI-1 : Récapitulatif des résultats de RMN DOSY du complexe ternaire de linoléate de lactochitosan + acide azélaïque, dans D₂O.

Les spectres DOSY ci-dessus mettent en évidence des profils de diffusion identiques pour l'acide azélaïque et pour le lactochitosan, puisque ces derniers ne se trouvent au même niveau de diffusion. Cette observation est en faveur d'une interaction entre l'acide azélaïque et le lactochitosan. Par ailleurs, la différence de coefficient de diffusion entre l'acide linoléique lorsqu'il est pur et lorsqu'il est introduit au sein de l'échantillon témoigne d'une modification de l'environnement chimique de celui laissant penser à une interaction avec le lactochitosan. De plus, la différence de profil de migration de l'acide azélaïque lorsqu'il est introduit avec le lactochitosan et lorsqu'il est introduit avec le lactochitosan et l'acide linoléique laisse à penser que l'acide linoléique joue un rôle dans l'interaction entre lactochitosan et acide azélaïque.

2.2.2.4 Conclusions

A ce niveau, il est possible d'avancer que le lactochitosan est capable de former des complexes ternaires de linoléate de lactochitosan + acide azélaïque.

2.2.3 Complexes ternaires de linoléate de lactochitosan + autres agents actifs

Actif	Log P (Calculé)	Quantité d'actif introduite (en % molaire / quantité de lactochitosan introduite)	Quantité d'actif intégrée (en % molaire/quantité lactochitosan)	Quantité d'acide gras introduite (en % molaire par rapport à la quantité de lactobionate de chitosan)	Quantité acide gras intégrée (en % molaire/quantité lactobionate de chitosan)
Acide kojique	-0,6	30	0	25	12
Acide azélaïque	1,2	33	30	25	15
n-butyl-résorcinol	2,7	42	21	25	21
R000342	3,0	33	20	25	17

Tableau VI-2 : récapitulatif des essais d'encapsulation de molécules actives par du linoléate de lactochitosan

En analysant le tableau ci-dessus, il est possible d'affirmer que l'encapsulation de molécules actives par du linoléate de lactochitosan est fonction des caractéristiques physico-chimiques de la molécule mise en jeu. En effet, si la molécule active possède un caractère hydrophile marqué (c'est le cas de l'acide kojique), celle-ci aura tendance à rester en solution dans l'eau plutôt que d'interagir avec le linoléate de lactochitosan.

3. Complexes ternaires d'oléate de lactochitosan + ingrédient actif

Après avoir démontré la possibilité de formation de complexe ternaire à partir de linoléate de lactochitosan, il s'agit maintenant d'étudier la possibilité de formation de complexes ternaires intégrant l'acide oléique comme promoteur de pénétration cutanée. Pour ce faire, nous allons tenter d'élaborer des complexes ternaires d'oléate de lactochitosan + R000342, dans un premier temps via l'acide oléique et dans un second temps via le sel d'oléate de sodium.

3.1 Complexes ternaires d'oléate de lactochitosan + R000342 via l'acide oléique

3.1.1 Mode opératoire

L'acide oléique étant soluble dans l'éthanol, la voie de préparation n°1, décrite au niveau de la partie 2.1.1, a été employée pour la réalisation de ce complexe ternaire. L'acide oléique est introduit à 25% et le R000342 à 33% (pourcentage molaire par rapport à la quantité de lactochitosan introduite).

3.1.2 Caractérisation physico-chimiques

3.1.2.1 Aspect visuel de la dispersion obtenue

La dispersion présente un aspect stable et laiteux, comparable à celui du linoléate de lactochitosan + R000342.

3.1.2.2 Taille des objets obtenus

L'appareil de DLS détecte des objets présentant un diamètre de 2041 nm avec un indice de polydispersité de 0,24. Les résultats des mesures sont présentés sur la figure suivante :

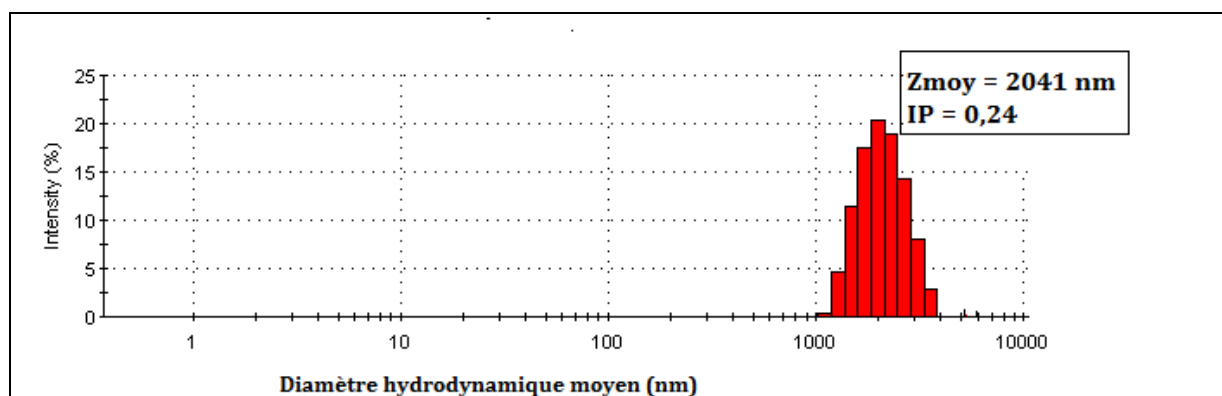


Figure VI-11 : distribution de taille des complexes d'oléate de lactochitosan + R000342, en fonction de l'intensité de diffusion, à 25°C, dans l'eau
Les résultats présentés sont représentatifs des valeurs obtenues sur trois échantillons indépendants

3.1.2.3 Technique de résonance magnétique nucléaire

RMN 1H

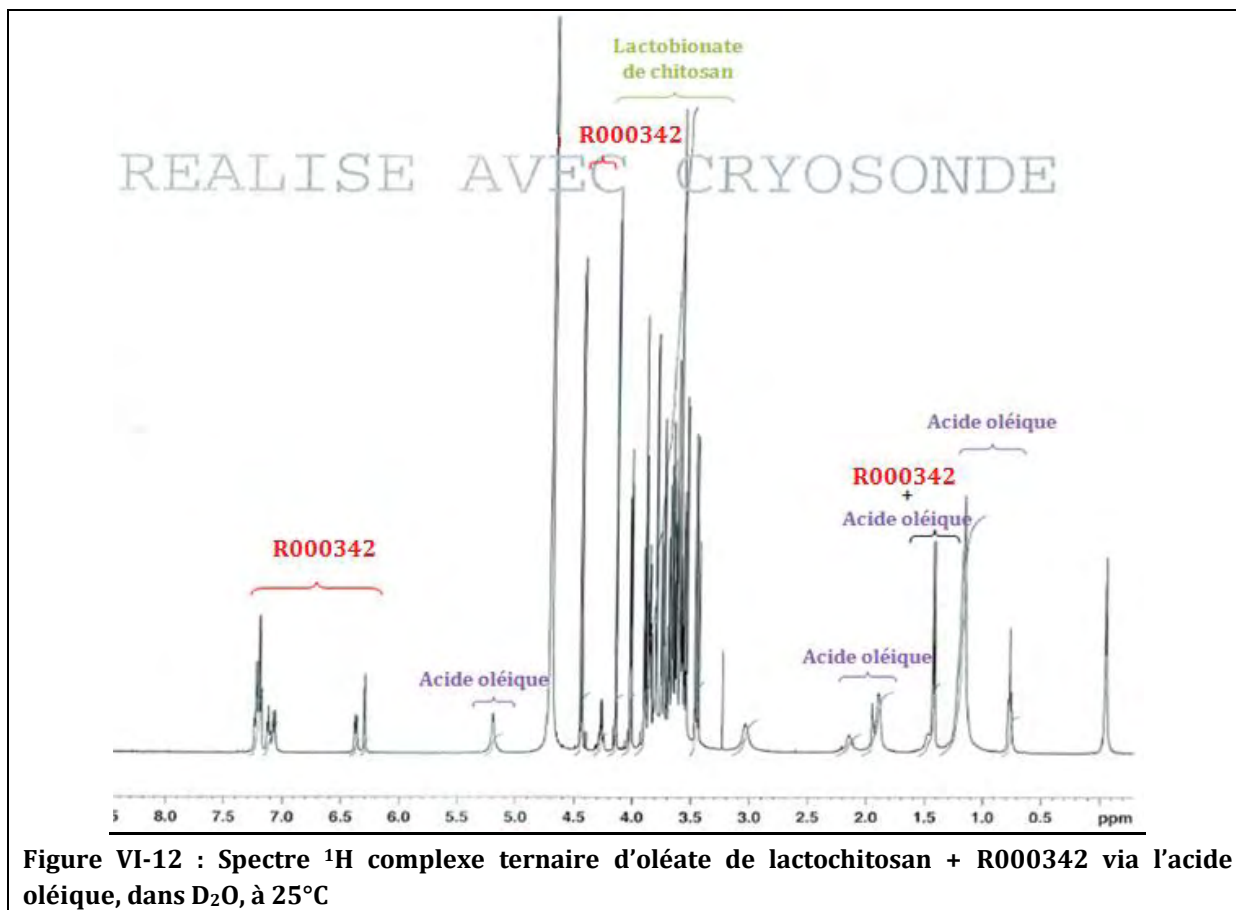


Figure VI-12 : Spectre ^1H complexe ternaire d'oléate de lactochitosan + R000342 via l'acide oléique, dans D_2O , à 25°C

Ce spectre ^1H (figure VI-12) permet de mettre en évidence différentes informations ; dans un premier temps, il permet de confirmer la présence des trois éléments de l'association ternaire (Lactochitosan, R000342 et acide oléique) au sein de l'échantillon. Par ailleurs, il est possible d'évaluer les quantités d'agent actif et d'acide oléique incluses au sein de l'association ; le R000342 est présent à **25%**, par rapport à une quantité introduite de **30%** (les valeurs évoquées représentent les pourcentages molaire par rapport à la quantité de lactochitosan introduite) et la quantité d'acide oléique associée au complexe est de **17%** (pour une quantité introduite de **25%**). Enfin, cette analyse RMN permet de s'assurer de l'intégrité chimique de l'ingrédient actif d'une part et d'autre part de l'acide oléique (notamment par l'intermédiaire du déplacement chimique à 5,2 ppm caractéristique des protons éthyléniques).

Par ailleurs, des expériences de RMN DOSY ont été réalisées sur cet échantillon, celles-ci ayant pour objectif de confirmer l'interaction entre les trois éléments. Les résultats sont présentés dans ce qui suit.

DOSY

Dans un premier temps, afin de mettre en évidence la diffusion de l'acide oléique au sein de l'échantillon dans D₂O, la préparation a été soumise une durée de gradient de 6 ms et à un temps de diffusion de 800 ms. Les résultats de cette analyse figurent sur la carte DOSY suivante :

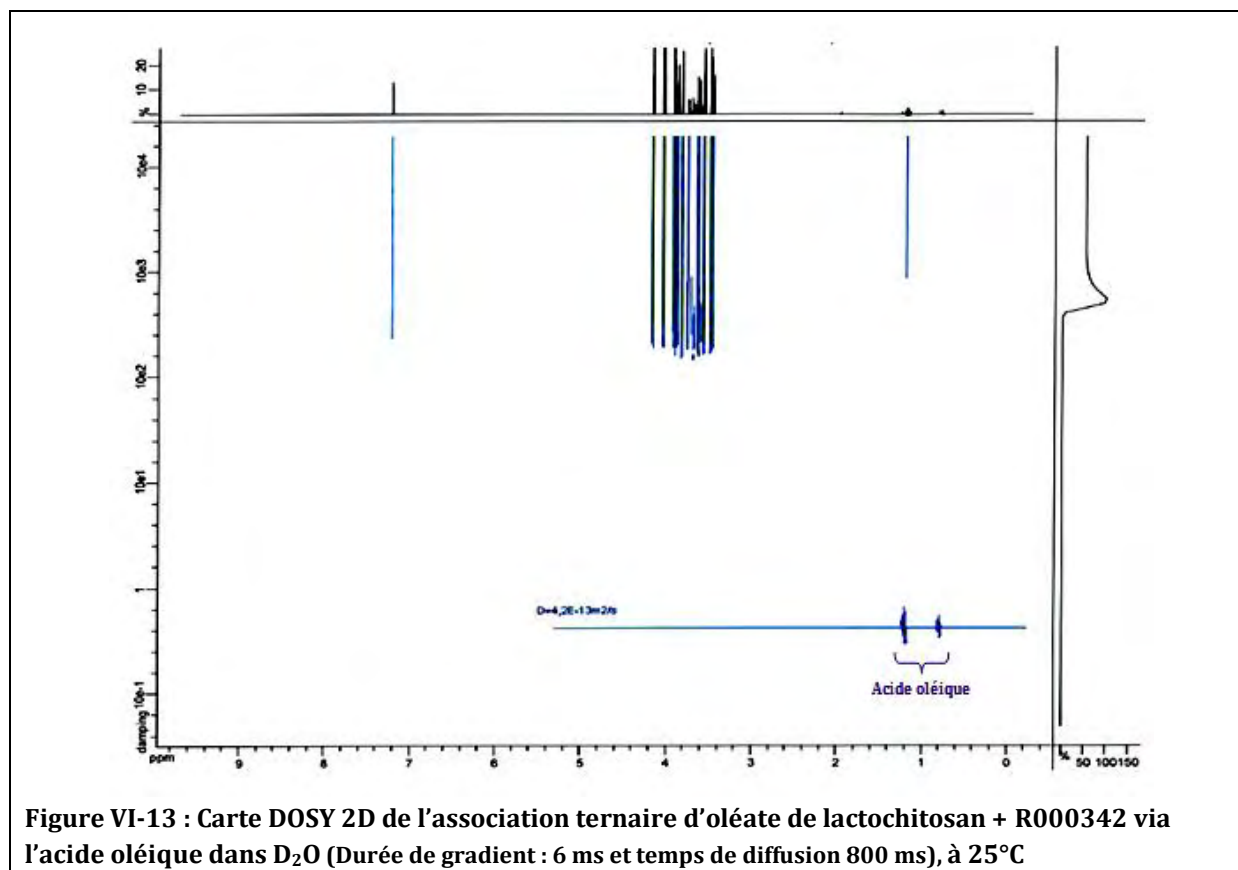


Figure VI-13 : Carte DOSY 2D de l'association ternaire d'oléate de lactochitosan + R000342 via l'acide oléique dans D₂O (Durée de gradient : 6 ms et temps de diffusion 800 ms), à 25°C

Cette analyse permet de déterminer la valeur du coefficient de diffusion de l'acide oléique. Lorsque l'acide gras est associé au sein du complexe ternaire son coefficient de diffusion est de **$4,2 \cdot 10^{-13} \text{ m}^2/\text{s}$** alors que lorsqu'il est intégré au sein de l'association binaire d'oléate de chitosan (via acide oléique) l'acide oléique possède un coefficient de diffusion de **$2,0 \cdot 10^{-13} \text{ m}^2/\text{s}$** .

Une seconde analyse de DOSY a été réalisée en ajustant les conditions opératoires afin de caractériser le profil de diffusion du lactochitosan et du R000342. Pour ce faire, l'échantillon a été soumis à une durée de gradient de 1 ms et à un temps de diffusion de 100 ms. Les résultats de cette expérience sont présentés sur la figure suivante :

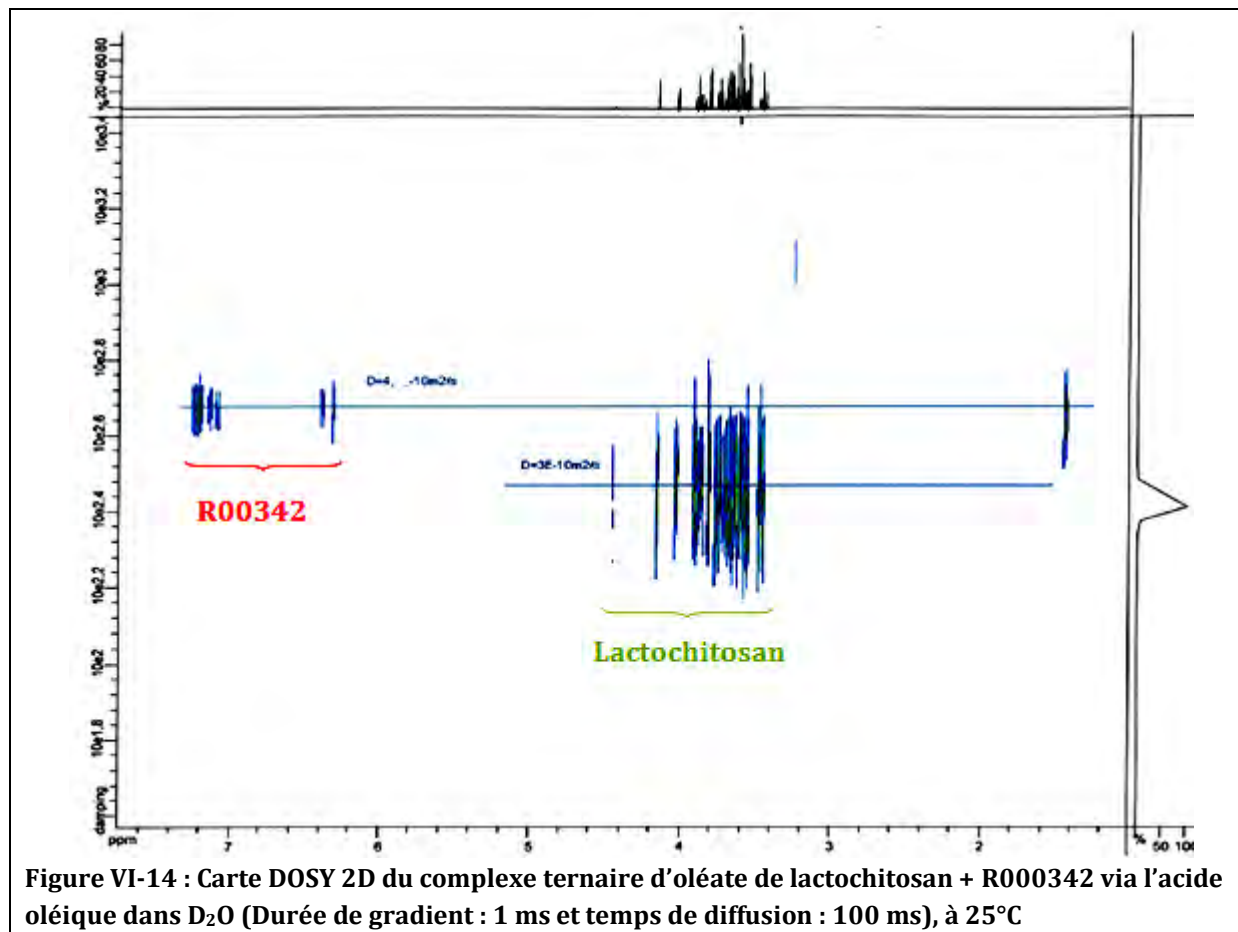


Figure VI-14 : Carte DOSY 2D du complexe ternaire d'oléate de lactochitosan + R000342 via l'acide oléique dans D₂O (Durée de gradient : 1 ms et temps de diffusion : 100 ms), à 25°C

La carte DOSY présentée ci-dessus permet de mettre en évidence les coefficients de diffusion du R000342 et du lactochitosan dans D₂O. L'agent actif est caractérisé par une valeur de coefficient de diffusion de $4,7 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ lorsqu'il se trouve au sein de l'association ternaire, dans D₂O alors que lorsque ce même ingrédient actif présente un coefficient de diffusion de $5,0 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ lorsqu'il se trouve pur dans D₂O. Le lactochitosan possède un coefficient de diffusion de $3,0 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ qu'il se trouve associé au sein du complexe ternaire que pur dans D₂O.

Récapitulatif résultats DOSY :

Complexe ternaire	Éléments du complexe	Coefficient de diffusion des éléments complexés	Coefficient de diffusion des éléments purs	Solvant
Oléate de lactochitosan + R000342	Lactochitosan	$3,0 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$	$3,3 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$	D ₂ O
	R000342	$4,0 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$	$5,0 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$	D ₂ O
	Acide oléique	$4,2 \cdot 10^{-13} \text{ m}^2/\text{s}$	$7,0 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$	D ₂ O

Tableau VI-2 : Récapitulatif des résultats de RMN DOSY du complexe ternaire d'oléate de lactochitosan + R000342, dans D₂O.

La différence de valeur entre le coefficient de diffusion du R000342 lorsqu'il est seul ou mis en contact avec les éléments du complexe (tableau VI-2) est faible mais va dans le sens d'une intégration partielle du R000342 au sein de l'oléate de chitosan.

Les expériences réalisées permettent d'affirmer qu'il est également possible de réaliser des complexes ternaires d'oléate de lactochitosan + agent actif via l'acide oléique. De plus, il paraît important de souligner les différences d'interaction entre acide linoléique et acide oléique et le R000342. En effet dans le cas de l'interaction avec acide linoléique, les trois éléments du complexe se trouvent au même niveau de diffusion, alors que dans le cas de l'interaction avec l'acide oléique, on observe trois profils de diffusion différents. Par conséquent, il est possible d'avancer que la nature de l'acide exerce une influence sur l'interaction avec la molécule active. Cette différence pourrait s'expliquer par la différence de configuration spatiale entre les deux acides gras. En effet, la configuration coudée de l'acide linoléique pourrait favoriser les interactions avec la molécule active. Par ailleurs, le nombre d'insaturations de l'acide gras pourrait également être à l'origine de cette différence. La double insaturation de l'acide linoléique pourrait favoriser les interactions de type hydrophobes avec la molécule active.

Dans la partie suivante, nous allons tenter d'élaborer des complexes ternaires d'oléate de lactochitosan + R000342 mais cette fois ci via le sel d'oléate de sodium.

3.2 Complexes ternaires d'oléate de lactochitosan + R000342 via le sel d'oléate de sodium

L'idée à ce niveau est d'évaluer l'importance de la forme sous laquelle se trouve l'acide oléique au moment de son introduction au sein du complexe. En effet, il paraît intéressant d'observer si la forme sel favorise les interactions électrostatiques entre les éléments.

3.2.1 Mode opératoire

Un complexe binaire d'oléate de lactochitosan via de l'oléate de sodium a été préparé selon la voie de préparation n°1. Une masse de 54 mg d'oléate de sodium (correspondant à 25% molaire de lactochitosan) a été introduite.

L'oléate de sodium n'étant pas soluble dans l'éthanol, celui-ci a été solubilisé dans un volume de 2 ml de méthanol.

3.2.2 Caractérisations physico-chimiques

3.2.2.1 Aspect visuel de la dispersion obtenue

Après une agitation magnétique de 12h, à température ambiante, la préparation présente des agrégats blancs non solubilisés.

L'élaboration de complexes ternaires d'oléate de lactochitosan + R000342 ne paraît pas réalisable.

3.3 Bilan des essais de formation de complexes ternaires

A l'issue de l'ensemble des expériences que nous avons décrites concernant l'élaboration de complexes ternaires, il est possible de dresser un bilan (tableau VI-3) récapitulant l'influence de certains paramètres sur la formation de complexes ternaires.

Actif	Quantité d'actif introduite (en % molaire / quantité de lactochitosan introduite)	Quantité d'actif intégrée (en % molaire/quantité lactochitosan)	Acide gras	Quantité acide gras intégré (en % molaire/quantité lactochitosan)	Taille des objets formés (nm)
R000342	33	20	Acide linoléique	18	2618
N-butyl-résorcinol	30	21	Acide linoléique	21	2015
Acide kojique	30	0	Acide linoléique	12	-
Acide azélaïque	33	30	Acide linoléique	15	1880
R000342	33	25	Acide oléique	17	2041

Tableau VI-3 : récapitulatif des taux d'intégration d'agent actif et d'acide gras au sein des associations ternaires.

3.3.1 Influence de la nature de l'acide gras et de la molécule active sur la taille des objets formés

L'acide gras intégré, que se soit l'acide oléique ou linoléique est introduit dans une proportion initiale de 25% molaire par rapport à la quantité de lactochitosan introduite. Dans un premier temps, nous pouvons constater que pour des molécules actives équivalentes (R000342), les complexes ternaires formés avec l'acide linoléique se caractérisent par une taille plus importante. Par ailleurs, en considérant les complexes ternaires formés à partir de l'acide linoléique, ceux qui présentent la taille la plus importante sont ceux qui intègrent le R000342 comme agent actif et les plus petits objets formés sont ceux qui intègrent l'acide azélaïque. Il est donc possible d'avancer à ce niveau que la nature de la molécule active a une influence sur la taille des complexes ternaires formés.

3.3.2 Influence des quantités d'acide gras et d'ingrédient actif intégrées au complexe en fonction des quantités introduites

Quelque soit la nature de l'acide gras intégré, ce dernier l'a été dans une proportion de 25% molaire par rapport à la quantité de lactochitosan introduite. Les ingrédients actifs quant à eux ont été introduits dans des proportions variables précisées dans le tableau VI-3.

Le tableau VI-3 permet d'analyser le comportement du complexe ternaire par rapport à la nature et la quantité d'ingrédient actif intégré mais également d'étudier l'influence de la nature de l'acide gras incorporé à l'association.

En analysant attentivement ce tableau, on remarque que la nature de l'acide gras introduit au sein de l'association ternaire joue un rôle sur le taux de fixation de l'ingrédient actif. A actif

identique (R000342), les complexes élaborés à l'aide d'acide oléique permettent un taux de fixation d'agent actif un peu plus important que les associations préparées à l'aide d'acide linoléique. La nature de l'acide gras utilisé dans la préparation des complexes ternaires semble donc jouer un rôle dans le taux de fixation de l'ingrédient actif. Par ailleurs, il est également possible de souligner que le complexe ternaire qui intègre le plus fort taux d'ingrédient actif est également celui qui intègre le plus faible taux d'acide gras (complexe ternaire de linoléate de lactochitosan + acide azélaïque). Cette observation laisserait à penser qu'il existe une compétition entre l'acide gras et la molécule active dans l'interaction avec le lactochitosan. Il est donc possible d'avancer d'une part que la nature de l'acide gras et de l'ingrédient actif ainsi que leur quantité introduite présentent une influence sur le taux d'intégration de ces éléments au sein de l'association ternaire et d'autre part que l'agent actif et l'acide gras se retrouvent en compétition au moment de l'interaction avec le lactochitosan.

3.3.3 Conclusion

L'encapsulation des différents actifs via le linoléate ou l'oléate de lactochitosan (préparé à partir de lactochitosan et d'acide linoléique ou oléique introduit à 25% molaire par rapport à la quantité de lactochitosan introduite) permet comme le démontrent les différentes techniques de résonance magnétique nucléaire, l'encapsulation des différents actifs testés à l'exception de l'acide kojique. En effet, l'intégration de l'acide kojique au sein du complexe ne semble pas efficace ceci faisant apparaître les limites de cette méthode d'encapsulation. Ce dernier résultat s'explique par le fait que parmi tous les ingrédients actifs testés, l'acide kojique est celui qui présente la plus grande hydrosolubilité. Ce constat fait apparaître les limites de notre méthode d'encapsulation à des ingrédients actifs qui possèdent une valeur de Log de P \geq -0,6. En revanche, l'encapsulation des ingrédients actifs comme l'acide kojique peut être envisagée par d'autres types de vecteurs comme des liposomes à cœur aqueux.

4. Etude approfondie de l'organisation des systèmes ternaires

4.1 Microscopie électronique à transmission (MET)

Après avoir prouvé l'existence d'une interaction entre le lactochitosan, l'acide linoléique et l'agent actif aboutissant à la formation d'objets, nous nous sommes concentrés sur une étude approfondie de l'organisation de ces systèmes. Cette étude consiste à localiser les différents éléments au sein de l'objet et à identifier leur agencement.

Pour ce faire, nous avons exploité les techniques de microscopie électronique à transmission et plus particulièrement la technique de la coloration négative, à l'aide de différents contrastants permettant ainsi de mettre en évidence différents éléments des complexes en fonction de leurs caractéristiques structurales. Cette technique permet de renforcer le contraste des préparations, notamment des dispersions. La coloration négative est une technique rapide de renforcement du contraste pour des échantillons transparents aux électrons qui ne pourraient pas être visualisés directement, c'est en général le cas de matériaux constitués d'éléments légers (C,O,H,N...). Elle ne peut être appliquée qu'aux échantillons divisés qui sont dispersés en phase liquide, de préférence, l'eau. Elle consiste à entourer l'échantillon d'un corps chimique dense aux électrons, ce qui permettra d'observer les structures en clair sur fond noir. Elle est réalisée par un dépôt homogène d'une solution saline comportant un élément chimique lourd. C'est une

technique qui présente également l'avantage de ne pas provoquer de réaction chimique entre le contrastant et l'échantillon. Nous avons donc utilisé différents contrastants afin de révéler les caractéristiques structurales de chaque élément dans le but de les localiser et ainsi de les différencier au sein du complexe.

Dans un premier temps, les échantillons ont été contrastés par l'acétate d'uranyle (1% dans l'eau) seul puis par le tétraoxyde d'osmium et enfin des observations ont également été menées en combinant les deux types de contrastants.

4.1.1 Contraste à l'acétate d'uranyle (1% dans l'eau)

Dans cette partie, nous faisons un rappel des observations réalisées des complexes contrastés par l'acétate d'uranyle.

❖ Lactochitosan

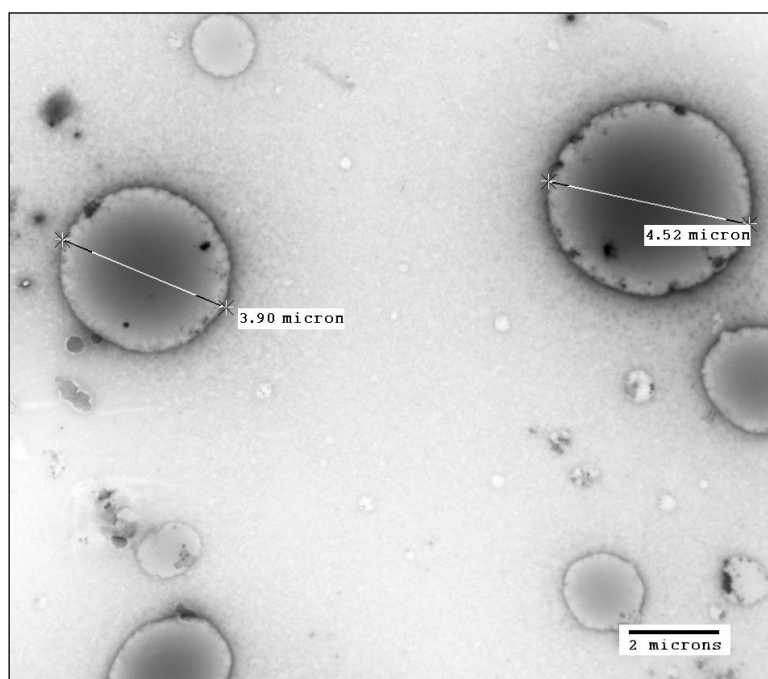


Figure VI-15 : observations microscopiques à différents grossissements des complexes de lactochitosan contrastés à l'acétate d'uranyle (1%).

Ces clichés permettent d'apprécier la morphologie caractéristique du vecteur de base, le lactobionate de chitosan contrasté par l'acétate d'uranyle. Ces clichés seront comparés plus loin à ceux du même échantillon mais contrasté par le tétraoxyde d'osmium seul et par un mélange acétate d'uranyle/tétraoxyde d'osmium.

❖ **Complexe de linoléate de lactochitosan**

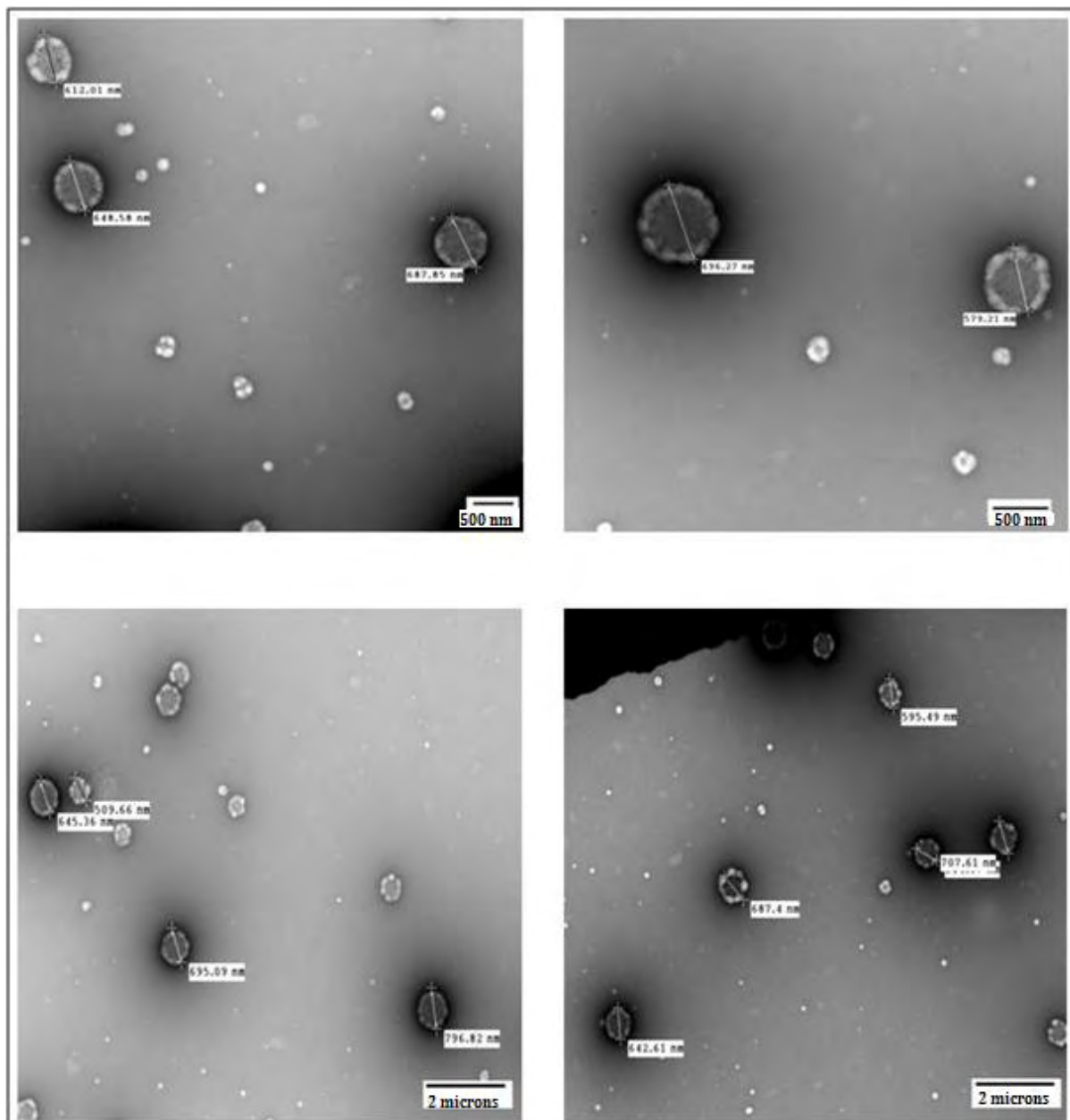


Figure VI-16 : observations microscopiques à différents grossissements des complexes de linoléate lactochitosan contrastés à l'acétate d'uranyle (1%)

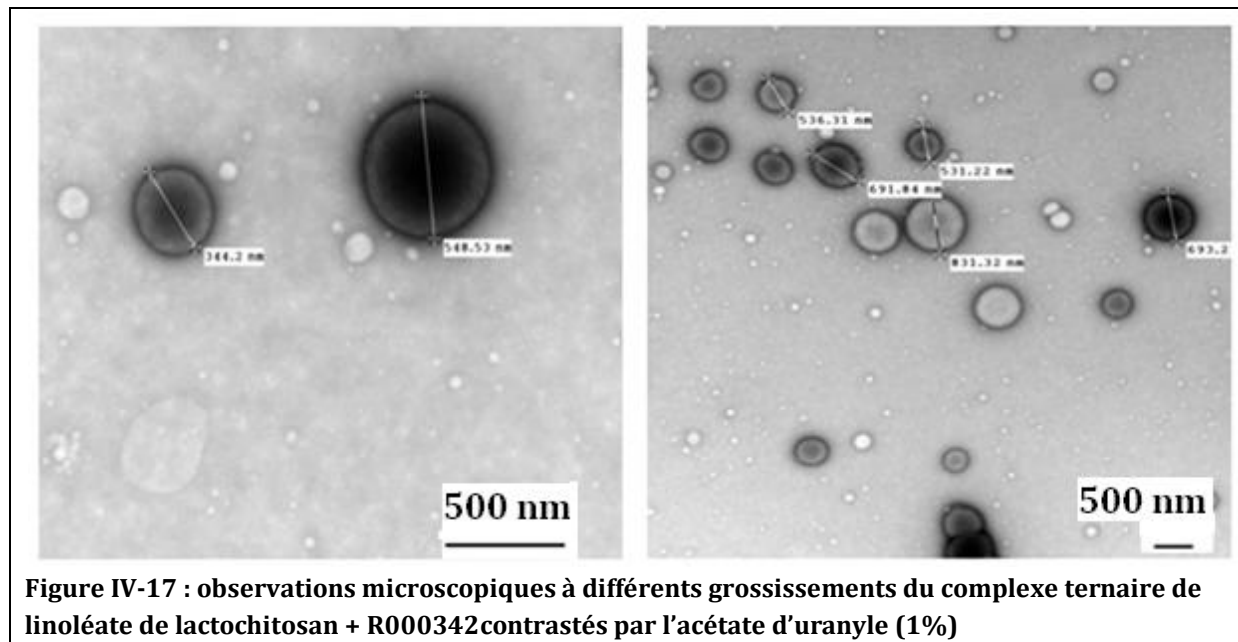
Des observations du complexe ternaire de linoléate de lactochitosan ont été réalisées. Les clichés obtenus sont présentés dans la figure ci-dessus.

Comme nous l'avons précédemment présenté, les objets formés de linoléate de lactochitosan sont caractérisés par une morphologie sphérique. Ces clichés permettent également de mettre en évidence une sorte de « Couronne » claire entourant un cœur sombre. Il est possible de remarquer que les objets observés ci-dessus présentent une morphologie différente de celle qui caractérise le lactochitosan, confirmant ainsi la formation d'objets entre lactochitosan et acide linoléique. Ces clichés seront comparés par la suite à ceux obtenus en observant le même

échantillon mais en utilisant un contrastant différent nous permettant de différencier et ainsi d'identifier l'acide gras d'une part et le lactochitosan d'autre part.

❖ Complexe ternaire de linoléate de lactochitosan + R000342(33%)

Des observations microscopiques ont également été réalisées sur les échantillons de linoléate de lactochitosan + R000342 (33%). Les clichés sont présentés au niveau de la figure suivante :



Les complexes de linoléate de lactochitosan + R000342 (33%) se caractérisent également par une morphologie sphérique, présentant une surface plus régulière que celle des objets formés par le linoléate de chitosan. Ces objets sont également caractérisés par un cœur sombre entourés d'une couronne apparaissant un peu plus claire.

Par la suite, nous avons réalisé des observations de ces mêmes échantillons mais en utilisant un contrastant différent ; le tétraoxyde d'osmium.

4.1.2 Contraste au tétraoxyde d'osmium (4%)

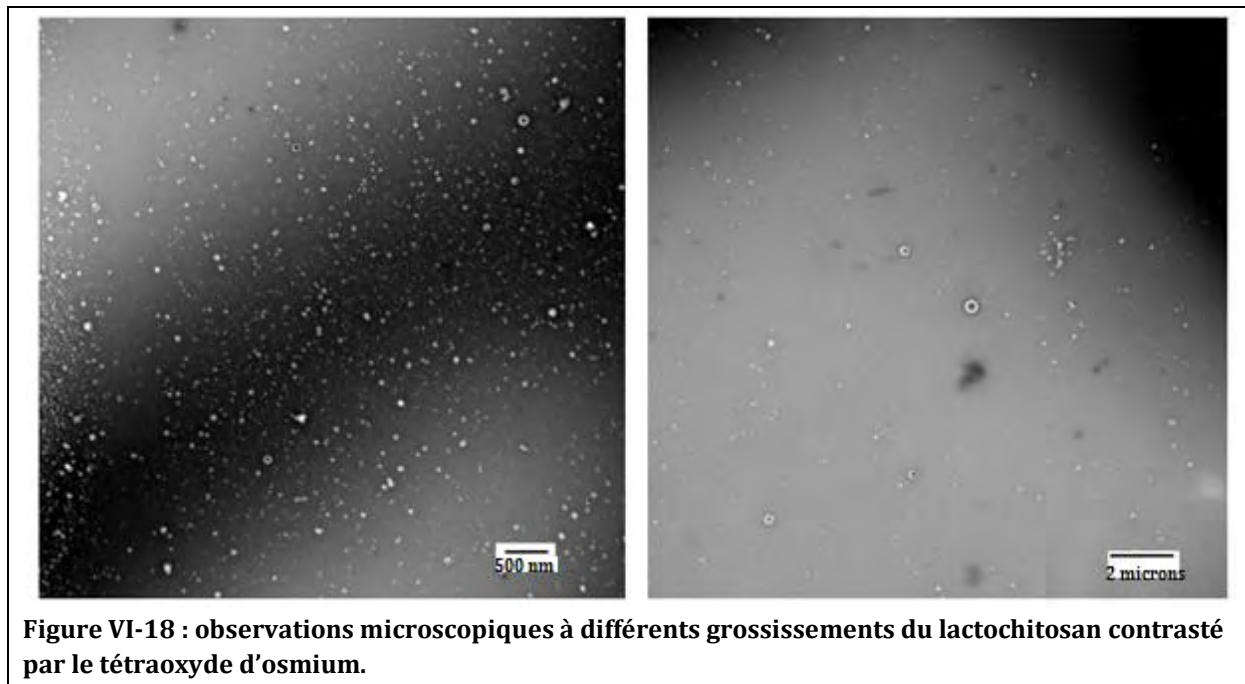
Dans un second temps, nous avons réalisé des observations sur les mêmes objets que ceux présentés précédemment mais en utilisant un contrastant différent ; le tétraoxyde d'osmium. La réaction de ce fixateur avec les lipides est due aux doubles liaisons qui forment des esters d'osmium instables qui se décomposent pour donner naissance à des oxydes ou des hydroxydes d'osmium. Cet agent de contraste est utilisé afin de mettre en évidence la présence de l'acide linoléique dans le système et de visualiser son agencement au sein du complexe.

❖ Lactochitosan

Cet échantillon sert de témoin négatif pour les observations suivantes. En effet, le lactochitosan n'est pas censé se contraster au contact du tétraoxyde d'osmium.

L'échantillon de lactochitosan a été mis en contact avec les vapeurs de tétraoxyde d'osmium pendant une durée de 50 secondes puis ont directement été observés au microscope.

Les observations obtenues sont présentées sur les figures suivantes :



Aucun objet n'est observé sur la grille, le lactochitosan ne réagit pas avec le tétraoxyde d'osmium et donc ne permet pas de contraster celui-ci. Cette information sera exploitée pour les prochaines observations.

❖ **Lactochitosan + R000342 (33%)**

Par la suite, un second témoin négatif a été observé. Il s'agit du complexe de lactochitosan + R000342 (33%). Celui-ci a été préparé comme précédemment, afin de vérifier que l'association agent actif et lactochitosan n'interagissait pas avec le tétraoxyde d'osmium.

Les clichés obtenus sont présentés au niveau des figures suivantes :

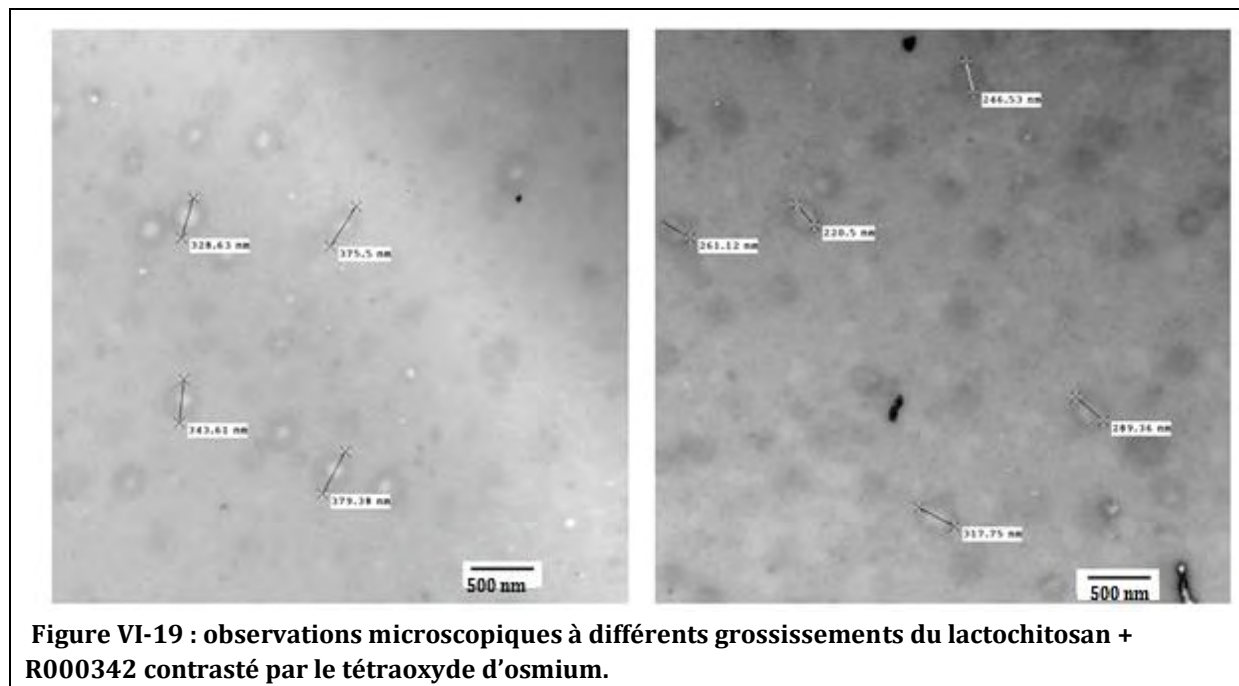


Figure VI-19 : observations microscopiques à différents grossissements du lactochitosan + R000342 contrasté par le tétraoxyde d'osmium.

Ces clichés laissent entrevoir la présence d'objets relativement sphériques. Malgré tout, la discrétion du contraste par le tétraoxyde d'osmium nous permet de conclure que le complexe formé de lactochitosan + R000342 (33%) ne réagit pas avec le tétraoxyde d'osmium.

❖ Linoléate de lactochitosan

Par la suite, nous avons observé un échantillon de linoléate de lactochitosan contrasté par le tétraoxyde d'osmium. Les clichés sont présentés au niveau de la (figure VI-20).

Ces clichés mettent en évidence des objets de forme sphérique, composés d'un « cœur » très contrasté par le tétraoxyde d'osmium, entourés d'une « couronne » beaucoup moins contrastée. Les objets observés présentent un diamètre moyen de 1 micron. Du fait de la spécificité du tétraoxyde d'osmium pour les doubles liaisons, il est possible d'avancer que le « cœur » de l'objet est composé d'acide linoléique entouré par une « couronne » de lactochitosan.

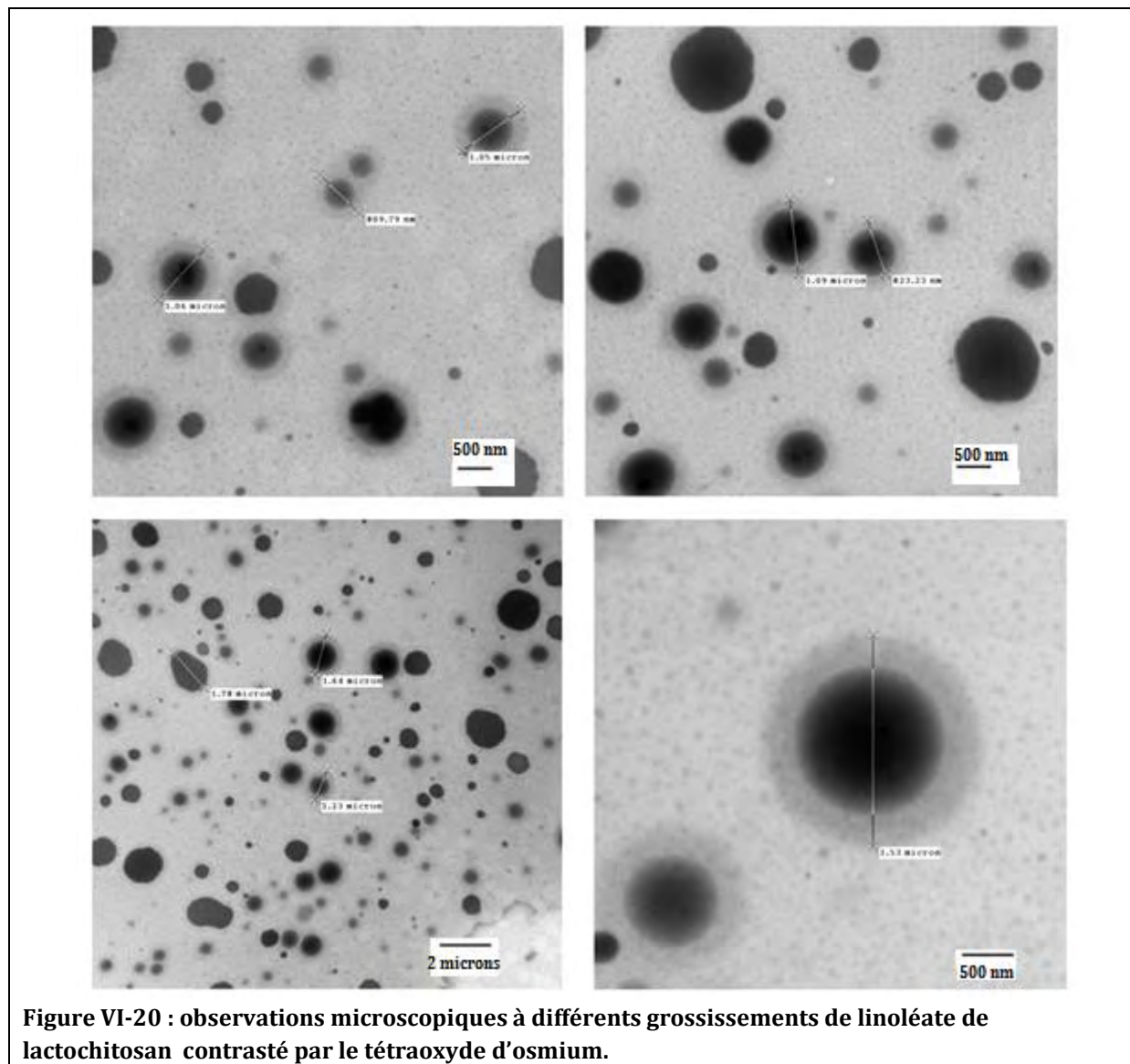


Figure VI-20 : observations microscopiques à différents grossissements de linoléate de lactochitosan contrasté par le tétraoxyde d'osmium.

4.1.3 Contraste à l'acétate d'uranyle (1%) + tétraoxyde d'osmium (4%)

Dans un dernier temps, nous avons réalisé des observations des mêmes échantillons que ceux observés précédemment mais cette fois, en utilisant les deux contrastants ; un mélange d'acétate d'uranyle (1%) et de tétraoxyde d'osmium (4%). Pour ce faire, les grilles sur lesquelles sont déposés les échantillons sont dans un premier temps mis en contact direct avec l'acétate d'uranyle (1%) pendant deux minutes et 30 secondes puis dans un second temps au contact des vapeurs de tétraoxyde d'osmium (4%) pendant 50 secondes. Les clichés obtenus seront comparés avec les clichés obtenus précédemment. L'intérêt de l'utilisation des deux contrastants est de mettre en évidence simultanément les éléments contrastés par l'acétate d'uranyle et ceux contrastés par le tétraoxyde d'osmium. En comparant ces observations avec celles obtenues en utilisant l'acétate d'uranyle seul d'une part et le tétraoxyde d'osmium d'autre part, nous serons en mesure de distinguer les différents éléments du complexe ternaire et ainsi définir l'agencement de ces éléments les uns par rapport aux autres.

❖ Lactochitosan

Un échantillon de lactochitosan a été observé après contraste par l'acétate d'uranyle et le tétraoxyde d'osmium. Les clichés obtenus sont présentés au niveau de la figure suivante :

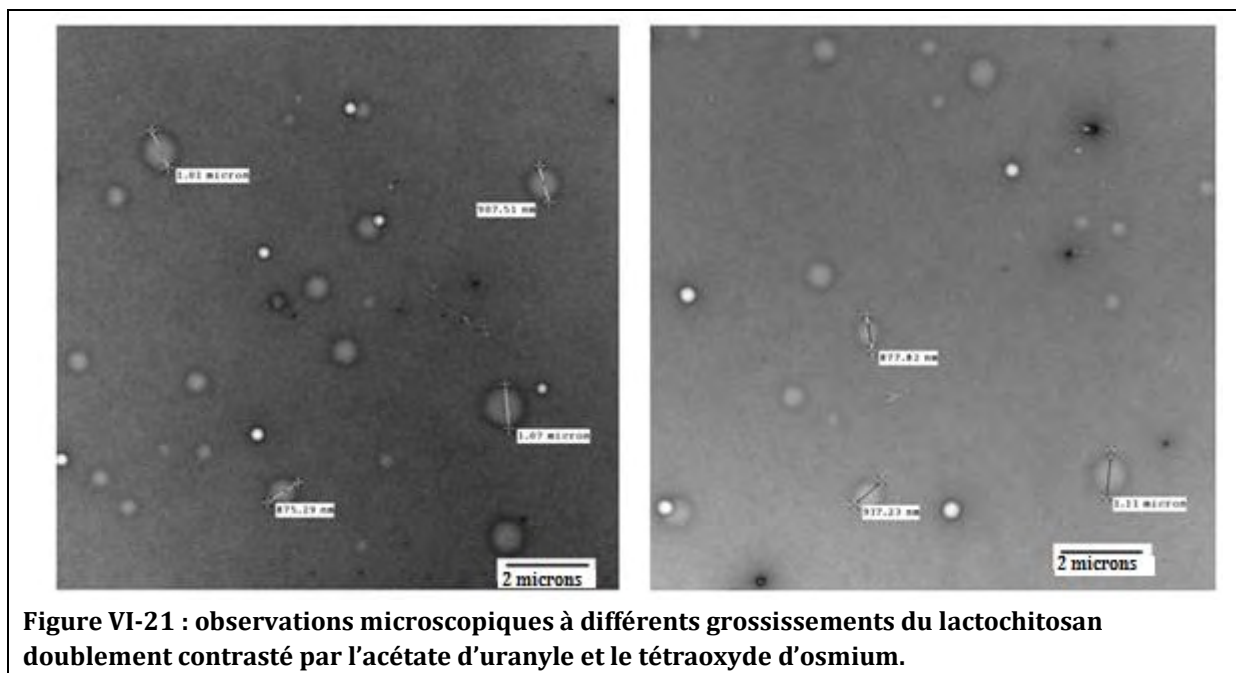


Figure VI-21 : observations microscopiques à différents grossissements du lactochitosan doublement contrasté par l'acétate d'uranyle et le tétraoxyde d'osmium.

Ces clichés mettent en évidence la morphologie du lactochitosan doublement contrasté par l'acétate d'uranyle et le tétraoxyde d'osmium. Le double contraste ne fait pas apparaître d'éléments supplémentaires par rapport au simple contraste à l'acétate d'uranyle ou au tétraoxyde d'osmium. Le lactochitosan forme des objets sphériques, caractérisés par une taille moyenne de 1,5 micron et faiblement contrasté. Ces observations seront comparées plus loin à celles obtenues lors des observations du linoléate de lactochitosan et du complexe ternaire afin de déterminer l'agencement du lactochitosan par rapport aux autres éléments du complexe ternaire.

❖ Linoléate de lactochitosan

En suivant le même protocole que précédemment, nous avons observé un échantillon de linoléate de lactochitosan doublement contrasté par l'acétate d'uranyle et par le tétraoxyde d'osmium. Les clichés de ces observations sont présentés au niveau de la (figure VI-22).

Ces clichés mettent en évidence des objets de morphologie sphérique, présentant un diamètre moyen de 1,5 micron. En observant attentivement les images, il est possible de souligner que ces objets sont composés d'un cœur intensément contrasté, entouré d'une « couronne » plus claire.

En comparant ces clichés avec les précédents, il est possible d'avancer que le « cœur » de l'objet est constitué d'acide linoléique, entouré par une « couronne » de lactochitosan. L'acide linoléique serait donc situé au centre du complexe, confiné par le lactochitosan.

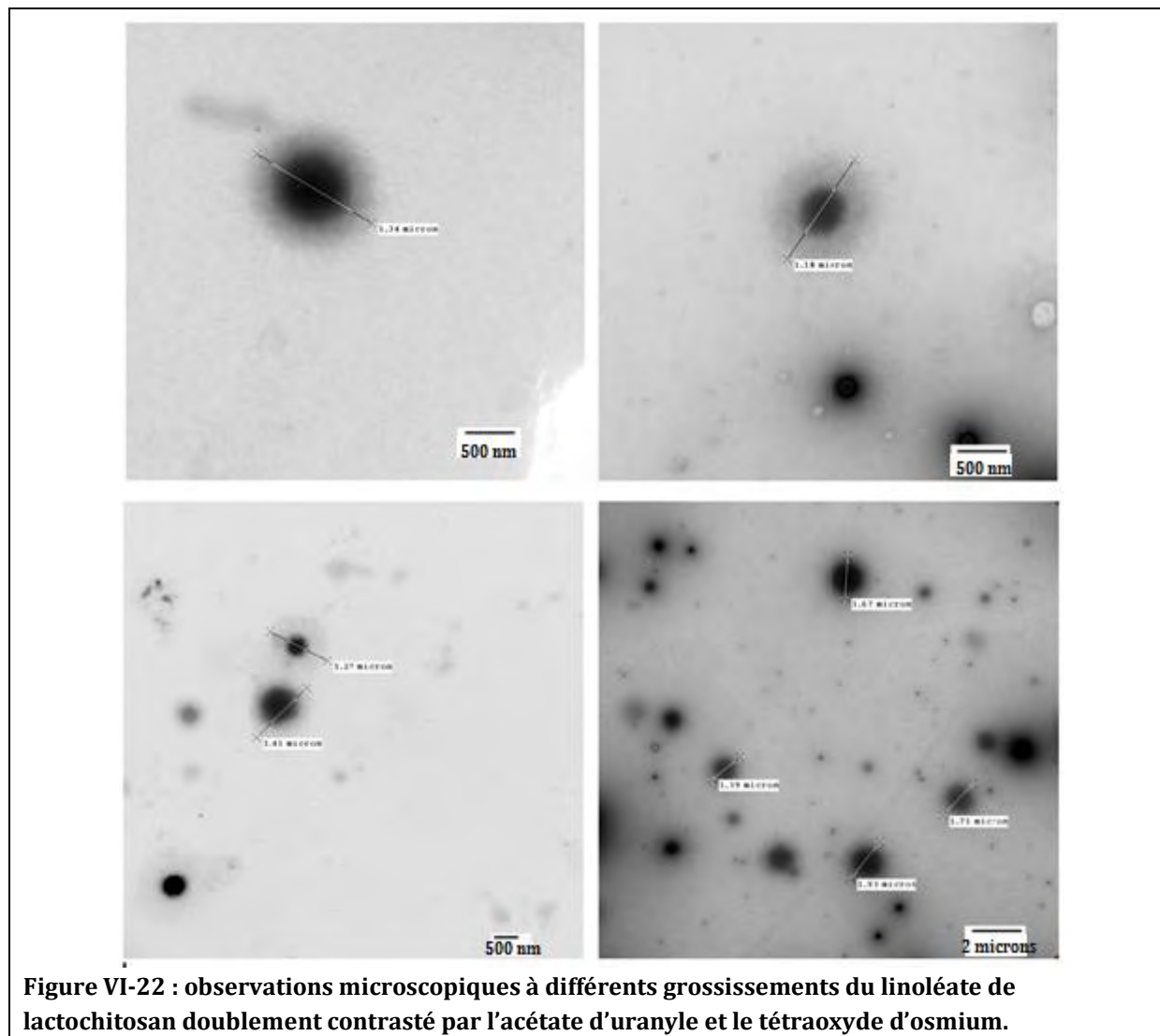
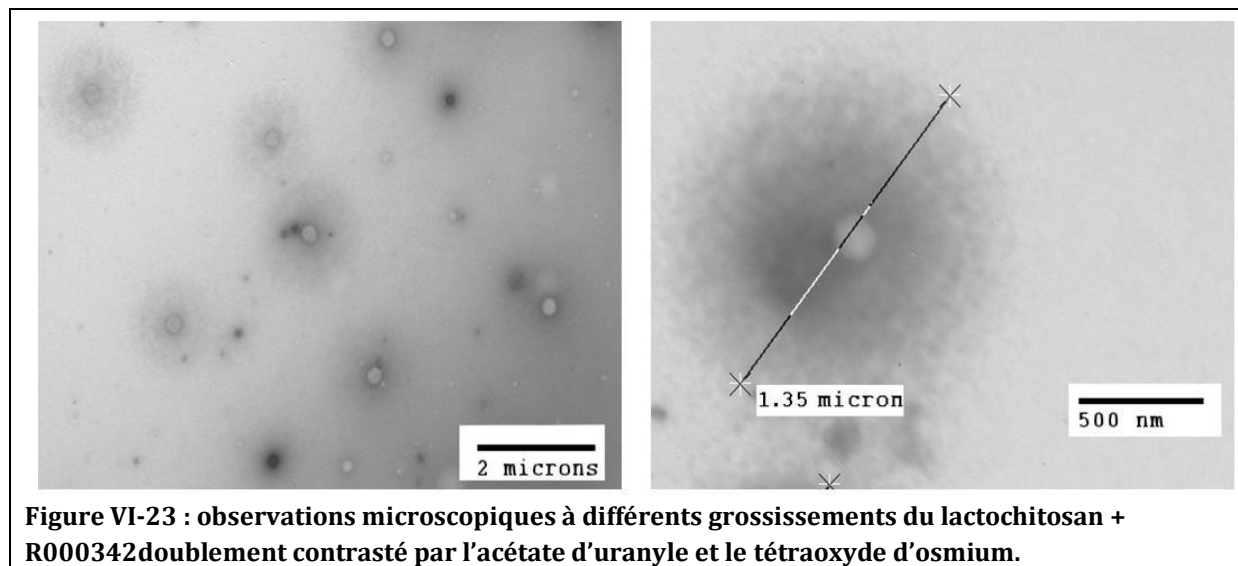


Figure VI-22 : observations microscopiques à différents grossissements du linoléate de lactochitosan doublement contrasté par l'acétate d'uranyle et le tétraoxyde d'osmium.

❖ Lactochitosan + R000342

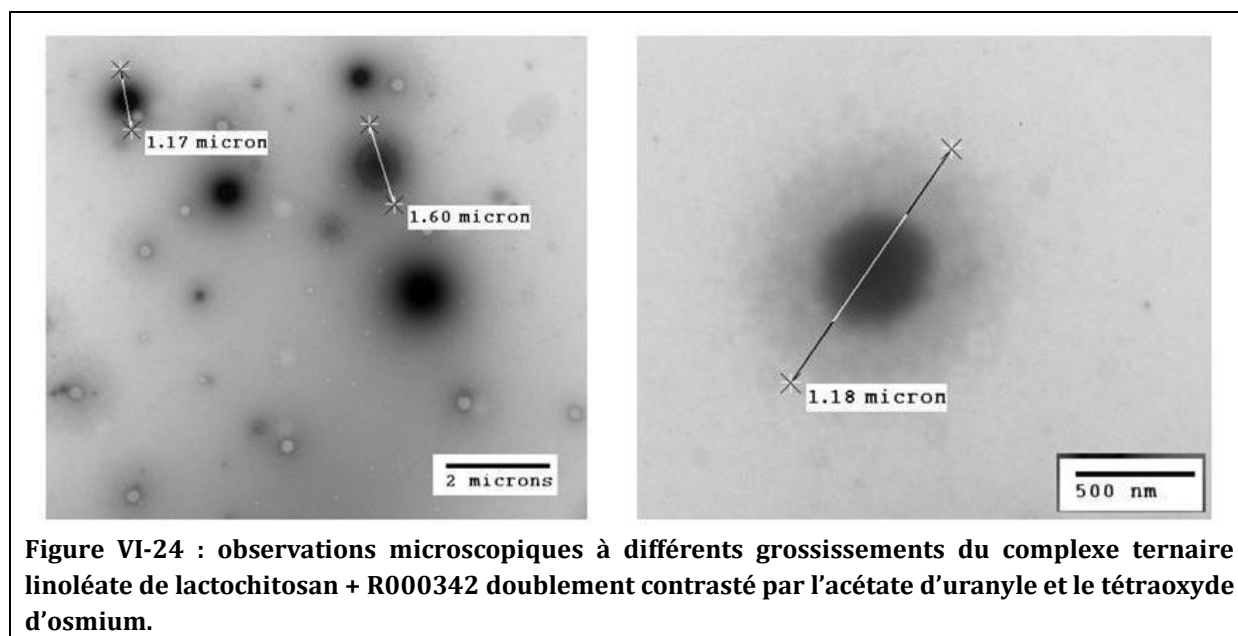
Un complexe de lactochitosan + R000342a été observé grâce à la technique du double contraste (figure VI-23).

Ces clichés mettent en évidence des objets de morphologie sphérique, caractérisés par une taille de l'ordre du micron. Ces images permettent mettre en évidence que les objets se composent d'un élément central entouré d'une « couronne » périphérique.



❖ Complexe ternaire de linoléate de lactochitosan + R000342

Afin de déterminer l'agencement de l'ingrédient actif au sein du complexe ternaire, nous avons également observé ce dernier en utilisant la technique du double contraste par l'acétate d'uranyle et le tétraoxyde d'osmium. Les clichés obtenus sont présentés au niveau de la figure suivante :



On observe grâce à ces clichés des objets qui se caractérisent par une morphologie sphérique, possédant une taille moyenne de 1,8 micron. D'après ce qui a été expliqué précédemment, nous pouvons avancer que le « cœur de l'objet est constitué d'acide linoléique, bordé par le lactochitosan. Le R000342 n'apparaît pas distinctement sur ces clichés.

L'étude approfondie de microscopie électronique à transmission nous a permis d'obtenir de plus amples informations quant à l'agencement des éléments qui composent le complexe. En effet, grâce à ces expériences, nous avons pu mettre en évidence la position centrale de l'acide linoléique au sein du complexe. L'étude a par ailleurs permis de mettre en évidence la position périphérique du lactochitosan par rapport à l'acide gras. En revanche, concernant l'ingrédient actif, s'il est en partie intégré, sa localisation au sein du complexe n'a pas pu être déterminée précisément.

4.2 Utilisation d'un colorant

Dans un second temps, nous avons eu l'idée d'utiliser un colorant hydrophobe, le rouge Nil afin de conforter la preuve de l'incorporation de l'acide linoléique au sein du complexe.

4.2.1 Objectif de l'essai

A ce niveau, il s'agit d'intégrer le rouge Nil à différentes étapes de la préparation du complexe ternaire de linoléate de lactochitosan + R000342, afin d'observer une éventuelle différence de coloration en fonction de l'étape de préparation au cours de laquelle le colorant est intégré. L'observation d'une variation de coloration entre les préparations confirmerait le confinement de l'acide linoléique au sein du complexe ternaire, prouvant ainsi l'intégration de l'acide gras au sein du complexe. Pour ce faire, le rouge Nil a été intégré à deux étapes différentes de la préparation des complexes ternaires.

4.2.2 Caractéristiques du rouge Nil

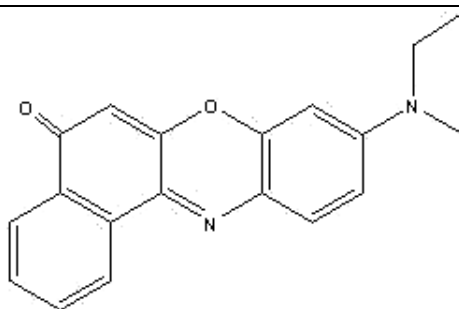


Figure VI-25 : structure chimique du rouge Nil

Le rouge Nil (Figure VI-25), de formule brute $C_{20}H_{18}N_2O_2$ possède une masse molaire de 318,37 g/mol. Le rouge Nil est une molécule hydrophobe, non chargée, photostable et fortement fluorescente lorsqu'elle se trouve en contact avec des substances hydrophobes. Le rouge Nil se caractérise par un spectre d'absorbance situé entre 400 et 650 nm et par un spectre de fluorescence situé entre 550 nm et 750 nm. Ce colorant lipophile est en général utilisé pour la détection des gouttelettes lipidiques intracellulaire par microscopie par fluorescence ou par cytométrie de flux.

4.2.3 Intégration du rouge Nil au moment de la préparation du complexe ternaire

Plusieurs essais d'intégration du rouge Nil ont été réalisés. Dans un premier temps, le colorant a été incorporé au moment de la préparation classique du complexe ternaire selon la voie 1, en solubilisant celui-ci dans la solution contenant l'éthanol, le R000342 et l'acide linoléique.

❖ Mode opératoire

La figure suivante décrit le mode opératoire suivi au cours de cet essai :

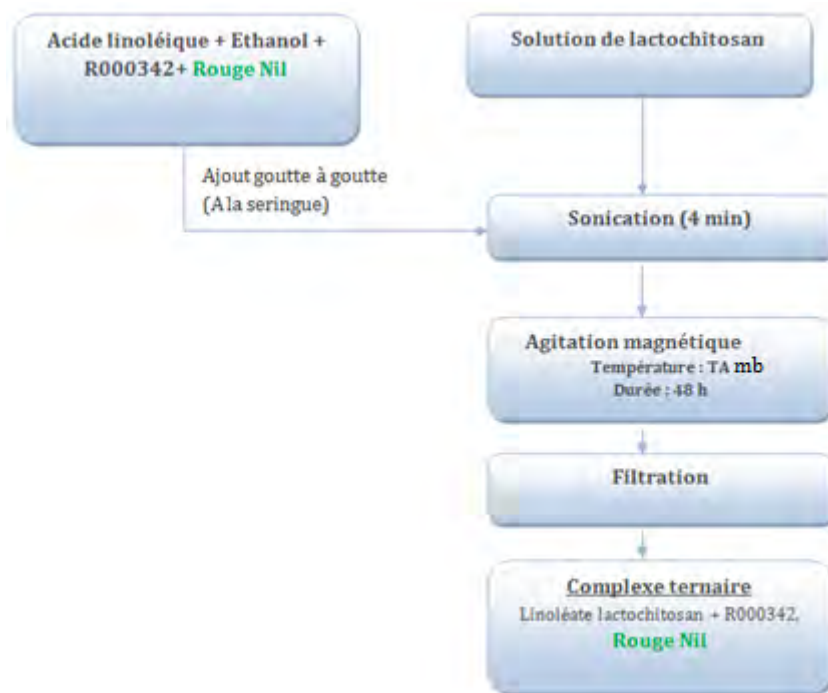


Figure VI-26 : mode opératoire suivi, selon la voie 1 pour la préparation du complexe ternaire de linoléate de lactochitosan + R000342, intégrant le rouge Nil.

Au cours de cet essai, le rouge Nil a été solubilisé dans l'acide linoléique dans la solution contenant l'éthanol et l'ingrédient actif. La solution contenant le rouge Nil a été classiquement ajoutée à une solution de lactochitosan, l'ensemble étant par la suite soumis à une étape de sonication pendant une durée de 4 min. La dispersion obtenue a été agitée pendant 48 heures, le temps pour que le colorant établisse des interactions avec l'acide linoléique. Après 48 heures, la dispersion obtenue a été filtrée sur papier filtre et laissée reposer.

❖ Résultats

Après avoir laissé reposer la préparation, nous obtenons une dispersion stable d'aspect laiteux, présentant une coloration rose fuchsia, comme en témoigne la photo ci dessous.



Figure VI-27 : photographie de la dispersion de linoléate de lactochitosan + R000342, intégrant le rouge Nil, obtenue selon le mode de préparation n°1.

4.2.4 Intégration du rouge Nil après préparation du complexe

En parallèle de la manipulation précédente, nous avons réalisé une autre préparation mais cette fois-ci en ajoutant le colorant une fois le complexe ternaire préparé, afin d'apprécier l'accessibilité de l'acide linoléique.

❖ **Mode opératoire**

Le mode opératoire suivi pour cet essai est décrit au niveau de la figure suivante :

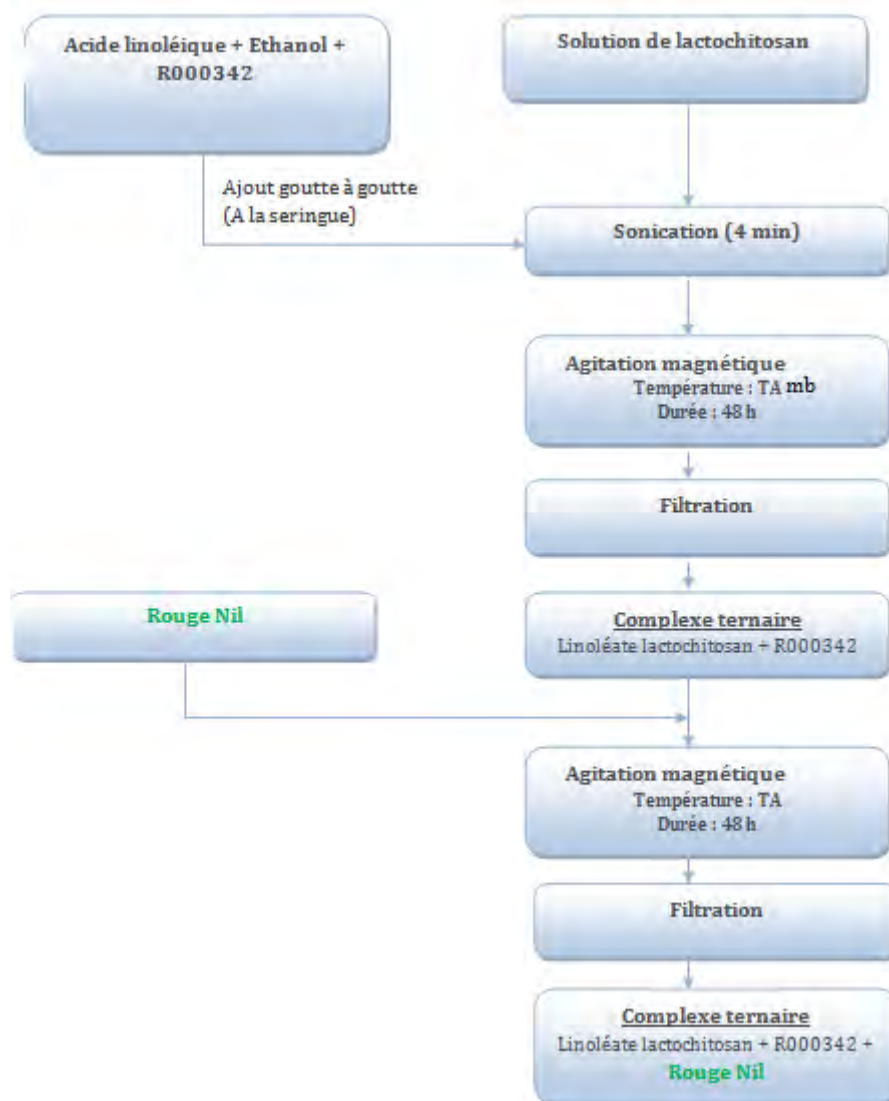


Figure VI-28 : mode opératoire suivi pour l'intégration du rouge Nil après formation du complexe ternaire.

Dans un premier temps, un complexe ternaire de linoléate de lactochitosan + R000342 a été préparé, selon le mode classique de préparation n°1. Une fois le complexe ternaire préparé, le rouge Nil a été ajouté à la dispersion puis laissé agiter 48 heures à température ambiante. L'échantillon a été par la suite filtré sur papier filtre puis laissé reposer.

La dispersion obtenue présente l'aspect suivant :



Figure VI-29 : photographie de la dispersion de linoléate de lactochitosan + R000342, intégrant le rouge Nil, après préparation du complexe ternaire.

❖ Résultats

La dispersion obtenue présente un aspect stable, laiteux et est caractérisée par une coloration violette foncée, différente de celle obtenue avec la première expérience. Cette différence d'aspect et notamment de coloration permet de mettre en évidence la différence d'« accessibilité » de l'acide linoléique au cours des deux expériences. En effet, lors de la première expérience, le colorant étant directement mis en contact avec l'acide linoléique lors de la préparation de l'échantillon, l'accessibilité du colorant par rapport à l'acide gras est facilitée. En revanche, lors de la seconde préparation, l'acide linoléique étant déjà intégré au complexe ternaire, ce dernier apparaît alors moins accessible au colorant que lors de la première expérience, l'échantillon présentant alors une coloration différente. Cette expérience permet de mettre en évidence le confinement de l'acide linoléique au sein du système et constitue ainsi une preuve supplémentaire confirmant l'intégration de l'acide gras au complexe ternaire.

4.2.5 Intégration du rouge Nil au complexe de lactochitosan + R000342

Une expérience témoin a été réalisée. Celle-ci consiste à mettre en contact le rouge Nil avec un complexe de lactochitosan + R000342. Cette expérience a pour but de s'assurer qu'il ne s'établit aucune interaction ni entre le colorant et lactochitosan ni entre le colorant et le R000342.

❖ Mode opératoire

Le colorant a été introduit dans une dispersion contenant du lactochitosan + R000342, dans les proportions habituellement utilisées pour la préparation du complexe ternaire.

L'échantillon a été soumis à une agitation magnétique à température ambiante, pendant 48 heures puis laisser reposer.

❖ Résultats



Figure VI-30 : photographie de l'échantillon de lactochitosan + R000342+ rouge Nil.

L'échantillon (Figure VI-30) ne présente qu'une très légère coloration fuchsia que l'on peut considérer comme négligeable, nous permettant d'aboutir à la conclusion que ni le lactochitosan, ni l'ingrédient actif n'interagissent avec le colorant.

Ces expériences nous ont permis de confirmer d'une part l'intégration de l'acide linoléique au sein du complexe ternaire et d'autre part, apportent des informations supplémentaires pour comprendre l'agencement de l'acide linoléique au sein du complexe ternaire. En effet, les variations de coloration des échantillons observées au niveau 4.2.3 et 4.2.4 nous permettent d'avancer que l'acide linoléique se trouve relativement confiné au sein du complexe ternaire diminuant ainsi son accessibilité une fois le complexe formé. Les conclusions de cette étude apparaissent en accord avec celles émises lors des expériences de microscopie électronique puisque ces dernières mettent bien en évidence la position « centrale » et confinée de l'acide linoléique eu sein du complexe ternaire.

Cette étude d'organisation des systèmes ternaires a permis de fournir de riches informations quant à l'agencement des éléments au sein du système. En effet, la combinaison des études de microscopie électronique à transmission et de l'utilisation d'un colorant permet d'affirmer que l'acide linoléique occupe une position centrale au sein du complexe. Le lactochitosan, quant à lui occupe une position périphérique. En effet, le lactochitosan entoure l'acide linoléique, formant une sorte de « couronne » autour de l'acide gras. Cependant, la position de l'agent actif quant à elle n'a pas pu être déterminée avec précision avec les études de microscopie électronique, celui-ci pouvant se trouver à l'interface entre acide gras et lactochitosan mais la structure chimique de l'agent actif ne pouvant pas être caractérisée par un contrastant en particulier, sa position reste à déterminer. De plus, le recours à l'utilisation du rouge Nil, permet de conforter les affirmations quant à l'agencement des éléments du système. En effet, les différents essais réalisés, permettent de confirmer le confinement de l'acide linoléique au sein du système de par son accessibilité réduite au colorant.

5. Conclusion

En conclusion de ce chapitre, les techniques de caractérisation physico-chimiques ainsi que l'utilisation du rouge Nil permettent d'affirmer que l'encapsulation de molécules actives par du linoléate ou de l'oléate de lactochitosan est possible. Cependant, les différentes expériences réalisées ont permis de mettre en évidence un certain nombre de critères dans l'efficacité d'encapsulation du système. Dans un premier temps, nous avons remarqué que la nature de l'acide gras intégré au système joue un rôle important dans l'interaction avec les molécules actives. En effet, à molécule active identique, les systèmes formés avec l'acide linoléique intègrent un taux plus important de molécule active et présentent un diamètre plus élevé que les systèmes formés avec l'acide oléique. De plus, les analyses de DOSY mettent en évidence des différences dans les interactions entre acide gras et molécule active dans le cas de l'acide oléique ou dans le cas de l'acide linoléique.

Dans un second temps, nous avons pu observer que l'efficacité d'encapsulation du linoléate ou de l'oléate de lactochitosan dépend des caractéristiques physico-chimiques de la molécule active ; une molécule qui possède un caractère hydrophile important, aura tendance à rester en solution dans l'eau et n'interagira ni avec le linoléate ni avec l'oléate de lactochitosan. Par ailleurs, concernant les caractéristiques physico-chimiques des complexes ternaires formés, il a été mis en évidence l'influence de la nature de la molécule active et de l'acide gras sur le diamètre des objets formés, les complexes formés avec l'acide linoléique présentent un diamètre plus important que les complexes formés avec l'acide oléique.

En ce qui concerne l'étude approfondie de l'organisation des systèmes ternaires, celle-ci a permis de révéler l'agencement du lactochitosan et de l'acide linoléique au sein des complexes. Cette étude met en évidence la position périphérique du lactochitosan au sein du système celui-ci formant une « couronne » autour de l'acide linoléique qui occupe donc quant à lui, une position centrale au sein de l'objet. Enfin, la position des molécules n'a pas pu être déterminée, ces dernières ne possédant pas de particularités structurales pouvant être mises en évidence par un contrastant, leur agencement au sein du système reste à déterminer.

CHAPITRE VII :

**ACTIVITE BIOLOGIQUE DE DEUX
FORMULATIONS BIOACTIVES DE L'ACIDE
AZELAÏQUE**

Chapitre VII

Activité biologique de deux formulations bioactives de l'acide azélaïque

1. Introduction

L'acide azélaïque est une molécule aux activités biologiques multiples. Utilisé à l'origine pour ces propriétés antibiotiques et kératolytiques en première intention dans le traitement de l'acné, ce principe actif a également prouvé son efficacité dans le traitement de certains cas d'hyperpigmentations, comme nous l'avons développé au niveau de la mise au point bibliographique du chapitre I. Nous avons donc voulu, dans ce chapitre, évaluer les différentes propriétés de l'acide azélaïque, intégré au sein de deux systèmes différents. Tout d'abord au sein des systèmes ternaires précédemment caractérisés. En effet, l'étude physico-chimique des complexes à base de chitosan développés dans les chapitres précédents a validé leur intérêt pour encapsuler des actifs aux propriétés dépigmentantes et/ou des acides gras, en fonction des caractéristiques physico-chimiques de chacun. Cette étude a permis de définir les complexes formés en terme de taille, de morphologie et de capacité d'encapsulation.

Par ailleurs, comme nous l'avons détaillé dans le chapitre II de mise au point bibliographique sur la vectorisation de molécules actives, l'un des rôles d'un vecteur de molécules actives est de l'aider à franchir la barrière cutanée. Nous nous sommes intéressés dans un premier temps, à évaluer l'efficacité des systèmes développés en ce qui concerne leur efficacité de promotion de pénétration cutanée des molécules actives encapsulées. Pour ce faire, nous avons étudié le passage transcutané de l'acide azélaïque (préalablement radiomarqué) encapsulé au sein d'un complexe de linoléate de lactochitosan, que nous avons comparé au passage transcutané de l'acide azélaïque non encapsulé. Le choix du complexe ternaire à base d'acide azélaïque a été défini selon deux critères. D'une part, parce que l'acide azélaïque non encapsulé présente un très faible taux de passage transcutané et qu'il sera donc plus aisé de mettre en évidence l'intérêt du système d'encapsulation. D'autre part, le choix de ce complexe a permis de faciliter la mise en œuvre de l'étude. L'intérêt de cette étude de passage permettra alors de révéler, soit un effet réservoir du système ternaire, assurant ainsi un profil de libération de l'acide azélaïque, prolongée. Au contraire, l'étude permettra également de révéler un éventuel effet de promotion de pénétration cutanée du système mis au point.

En complément de ce travail de thèse, nous avons voulu simultanément évaluer l'efficacité d'un système de vésicules catanioniques au pouvoir antimicrobien, contenant de l'acide azélaïque. Les vésicules catanioniques sont des systèmes largement décrits par le laboratoire des IMRCP, qui permettent l'encapsulation de substances actives par auto-association spontanée d'éléments en solution aqueuse. L'objectif de cette étude est de mettre au point un système de vésicules

catanioniques au pouvoir antimicrobien. La conception de ces vésicules consiste en l'association de trois éléments ; l'acide azélaïque, l'acide décanoïque et un tensioactif cationique ; le N-dodécyl-diéthanolamine. L'intérêt d'introduire un tensioactif de type cationique au sein de l'association est qu'il appartient à une classe de tensioactifs possédant une activité antimicrobienne décrite. En effet, il a été décrit que les tensioactifs de type ammonium, interagissent de par leur charge positive avec la paroi membranaire des microorganismes chargée négativement. Une fois l'interaction établie, l'hydrophobie du tensioactif lui permet de pénétrer au niveau de la membrane hydrophobe du microorganisme, provoquant alors une fuite du matériel cytoplasmique et la mort de celui-ci.

Ce chapitre sera donc divisé en deux parties ; une première consacrée à l'évaluation du passage transcutané d'un système ternaire de linoléate de chitosan + acide azélaïque, dans lequel nous décrirons le protocole employé pour évaluer le passage de l'acide azélaïque à travers la peau. Une seconde partie, traitera de la mise au point, de la caractérisation et de l'évaluation de l'efficacité antimicrobienne d'un système de vésicules catanioniques contenant de l'acide azélaïque.

Soulignons que dans les deux cas, il s'agit bien de formulations bioactives de l'acide azélaïque ; la première associant un agent dépigmentant et un promoteur de pénétration cutanée, la seconde associant plusieurs actifs bactéricides.

2. Evaluation de l'efficacité de promotion de pénétration cutanée des systèmes ternaires

Les résultats préliminaires des essais de passage transcutané suivants sont issus d'une étude récente (août 2012), menée en interne, au sein de la société Pierre Fabre.

2.1 Objectif de l'étude

Le but de cette étude est d'évaluer le passage transcutané de l'acide azélaïque radiomarqué, encapsulé ou non, dans un complexe de linoléate de lactochitosan. L'acide azélaïque, (encapsulé ou non), est incorporé à 0,2% dans une formulation de type gel aqueux. La quantification de la présence d'acide azélaïque radiomarqué au C14 est réalisée dans les différents compartiments de la peau (surface, *Stratum corneum*, épiderme vivant, derme, milieu récepteur) après une application de 24 heures.

2.2 Principe de l'étude

L'étude est réalisée en condition de dose finie (dépôt de 10 mg/cm² de formulations), sur une période de 24 heures, sur la peau humaine.

A l'issue de la cinétique, les échantillons de peau sont lavés et le *stratum corneum* est arraché à l'aide d'adhésif (tape-striping). L'épiderme vivant est séparé du derme à l'aide d'une lame de scalpel. Les milieux récepteurs collectés, les solutions de lavage, les échantillons d'épiderme et de derme ainsi que les tape-striping sont analysés par comptage à scintillation liquide afin de déterminer la quantité d'acide azélaïque présente dans les différents compartiments.

L'étude est réalisée sur 6 échantillons distincts.

Le milieu récepteur est composé de NaCl à 0,9% dans l'eau.

Le lavage de surface est effectué avec 1 ml de Tween 80® à 10% et 9 ml d'eau, à l'aide de cotons – tiges.

Le dosage dans le *stratum corneum* est effectué après digestion des tapes-strips avec du Soluène®.

Le dosage dans la peau est effectué après digestion avec du Soluène®.

2.3 Eléments d'essai

Les deux formulations testées contiennent 0,2% (m/m) d'acide azélaïque. Le tableau suivant résume l'ensemble des ingrédients utilisés, ainsi que leur concentration :

	Formulation encapsulée	Formulation non encapsulée
Hexylène glycol à 25% dans l'eau	4,95 ml	4,90 ml
Natrosol 250 M	66,0 mg	64,9 mg
Acide azélaïque	NA	9,8 mg
Complexe de chitosan contenant l'acide azélaïque	114,6 mg	NA
Teneur en acide azélaïque	1,93 mg/g de formulation	1,97 mg/g de formulation

Tableau VII-1 : récapitulatif des ingrédients ainsi que leur concentration, introduits dans la formulation

2.4 Passage transcutané

2.4.1 Préparation des échantillons de peau

La peau utilisée, issue de chirurgie abdominale est congelée à -20°C , jusqu'au jour de l'étude. Le jour de l'expérimentation, la peau est décongelée et coupée longitudinalement à une épaisseur d'environ $300\ \mu\text{m}$ ($> 200\ \mu\text{m}$) à l'aide d'un dermatome électrique. Des échantillons de peau de $2 \times 2\ \text{cm}^2$ sont ensuite découpés en vue de leur mise en place sur les cellules. L'échantillon de peau ainsi prélevé comprend l'ensemble de l'épiderme (environ 20 à $40\ \mu\text{m}$ d'épaisseur) et une partie du derme.

2.4.2 Descriptif des cellules de diffusion

Les cellules de diffusion (figure VII-1) utilisées pour l'étude sont dites « statiques ». Elles se composent de deux compartiments, donneur et récepteur. Le fragment de peau préparé est placé horizontalement de part et d'autre de ces compartiments, le derme côté récepteur et l'épiderme, contenant le *stratum corneum*, côté donneur. Le compartiment donneur, en verre avec une surface de peau de $2\ \text{cm}^2$ reçoit les formulations à étudier. Le compartiment récepteur de faible volume (environ $7\ \text{ml}$) contient le milieu récepteur dont la fonction est de solubiliser les composés ayant diffusé à travers la peau. Le milieu récepteur est une solution aqueuse de NaCl à $0,9\ \%$. Le jour de l'expérimentation, les explants de peau sont placés sur les cellules de diffusion. Les cellules sont thermostatées à $32^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

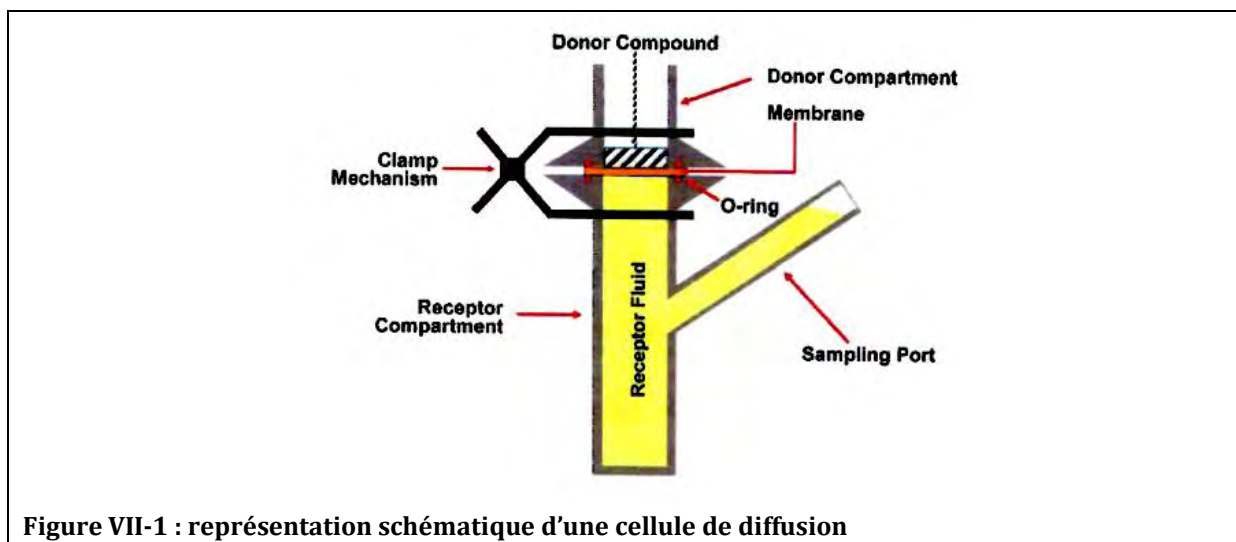


Figure VII-1 : représentation schématique d'une cellule de diffusion

2.4.3 Application des formulations

Après environ une heure de stabilisation en température, la PIE (perte insensible en eau) est mesurée afin de vérifier l'intégrité de la barrière cutanée. Les formulations sont ensuite déposées sur les échantillons de peau à l'aide d'une micropipette. Les éléments d'essai sont appliqués en dose finie, doit un dépôt de 20 mg par cellule.

2.4.4 Fin de l'étude

A l'issue des 24 heures, les échantillons de milieux récepteurs sont récupérés. Les lavages de surface sont réalisés à l'aide de Tween 80® à 10% et de 9 ml d'eau, la surface étant essuyée à l'aide d'un coton-tige après chaque lavage. Trois tape-strips sont réalisés. L'épiderme vivant est séparé du derme à l'aide d'une lame de scalpel.

2.5 Résultats

2.5.1 Bilan des quantités retrouvées à 24 heures

La figure suivante présente les résultats des quantités d'acide azélaïque radiomarqué encapsulé ou non, dosées au sein des différents compartiments de la peau après 24 heures.

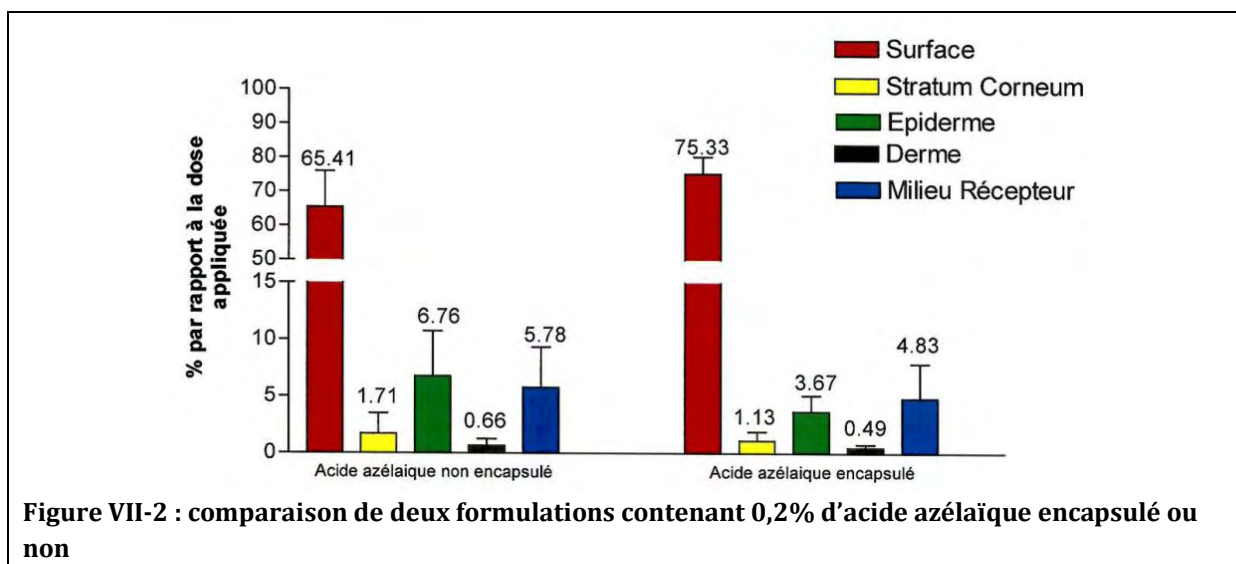


Figure VII-2 : comparaison de deux formulations contenant 0,2% d'acide azélaïque encapsulé ou non

Ces essais mettent en évidence que la quantité d'acide azélaïque récupérée dans le milieu récepteur, c'est-à-dire ayant franchi toutes les couches de la peau, est identique que la molécule active soit encapsulée ou non. Le système d'encapsulation ne semble donc pas améliorer la pénétration cutanée de l'acide azélaïque.

En revanche, il est possible de mettre en évidence que la quantité d'acide azélaïque restant à la surface de la peau est plus importante dans le cas où l'acide azélaïque se trouve sous forme encapsulée. Le système d'encapsulation favoriserait donc le maintien de la molécule active en surface.

2.5.2 Quantités cumulées dans le milieu récepteur

Les quantités cumulées dans le milieu récepteur après 24 heures sont présentées sur la figure suivante :

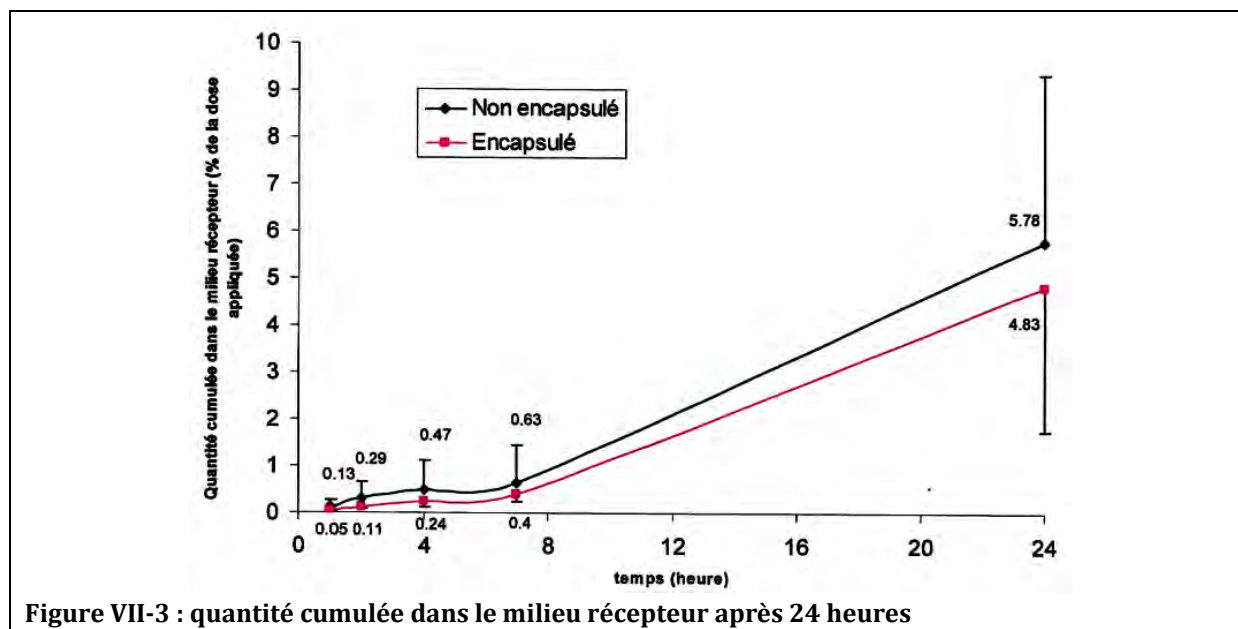


Figure VII-3 : quantité cumulée dans le milieu récepteur après 24 heures

2.6 Conclusion

Le passage transcutané de l'acide azélaïque encapsulé ou non a été évalué en condition de dose finie (10 mg/cm²) sur une modèle de peau humaine durant 24 heures en appliquant deux formulations à 0,2% en acide azélaïque.

Les résultats ne montrent pas de différence significative entre les deux formulations contenant l'acide azélaïque encapsulé ou non, que ce soit au niveau du bilan à 24 heures ou du profil cinétique des quantités cumulées dans le milieu récepteur.

Cependant, il serait intéressant d'approfondir cette étude en modulant la quantité d'acide azélaïque et en envisageant de tester le système avec une autre molécule active comme par exemple le R000342.

3. Conception et caractérisation de vésicules catanioniques aux propriétés antimicrobiennes

3.1 Généralités sur les propriétés antimicrobiennes des vésicules catanioniques

L'objectif de cette étude est de mettre au point des vésicules catanioniques aux propriétés antimicrobiennes, constitués d'éléments ayant chacun une activité antimicrobienne propre pouvant être potentialisée au sein d'un assemblage catanionique.

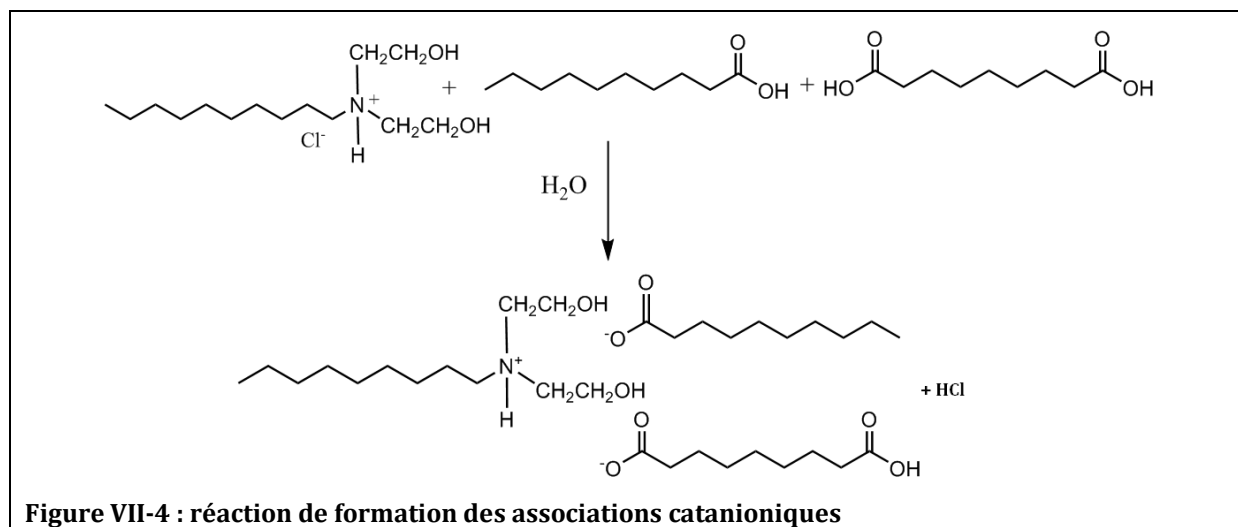
Pour expliquer l'activité antimicrobienne des tensioactifs cationiques, de nombreux mécanismes ont été proposés. Les tensioactifs de type ammonium exercent une action antimicrobienne en perturbant l'organisation de la membrane cytoplasmique des microorganismes provoquant ainsi leur mort[183]. Ce phénomène s'explique par le fait que la surface la plus externe de la membrane bactérienne porte une charge négative conduisant à une forte interaction avec des tensioactifs chargés positivement. La partie hydrophobe du tensioactif pénètre ensuite au niveau de la région hydrophobe de la membrane du microorganisme provoquant une fuite progressive du contenu cytoplasmique ce qui affecte la croissance des bactéries (effet bactériostatique) ou entraîne la mort de celles-ci (effets bactéricide). Cependant, le recours à ce type de tensioactifs en tant qu'agent antimicrobien a favorisé l'apparition de phénomènes de résistance [184, 185]. Dans le but de parer à ce phénomène, l'utilisation de liposomes ou de vésicules cationiques pour la délivrance d'antimicrobiens a démontré son efficacité[186, 187].

Dans cette dynamique, le but de ce travail est d'étudier les propriétés antimicrobiennes d'une dispersion de vésicules catanioniques, formée par association acido-basique de trois composés sélectionnés pour leurs propriétés antimicrobiennes ; l'acide azélaïque, l'acide décanoïque et la N-dodécyl-diéthanolamine[51, 188-190].

3.2 Formulation de vésicules catanioniques

Les vésicules catanioniques ont été synthétisées par réaction acido-basique entre la N-dodécyl-diéthanolamine, introduite sous forme de chlorhydrate et les acides décanoïque et azélaïque, dans l'eau. Dans cette synthèse, nous exploitons la capacité des tensioactifs catanioniques à s'auto-assembler spontanément dans l'eau, sous forme de vésicules. La formation des vésicules catanioniques (Figure VII-4) doit sa formation à des interactions électrostatiques entre la fonction ammonium de la N-dodécyl-diéthanolamine et les fonctions carboxylates des acides décanoïque et azélaïque. Les composés ont été introduits dans les proportions molaires suivantes :

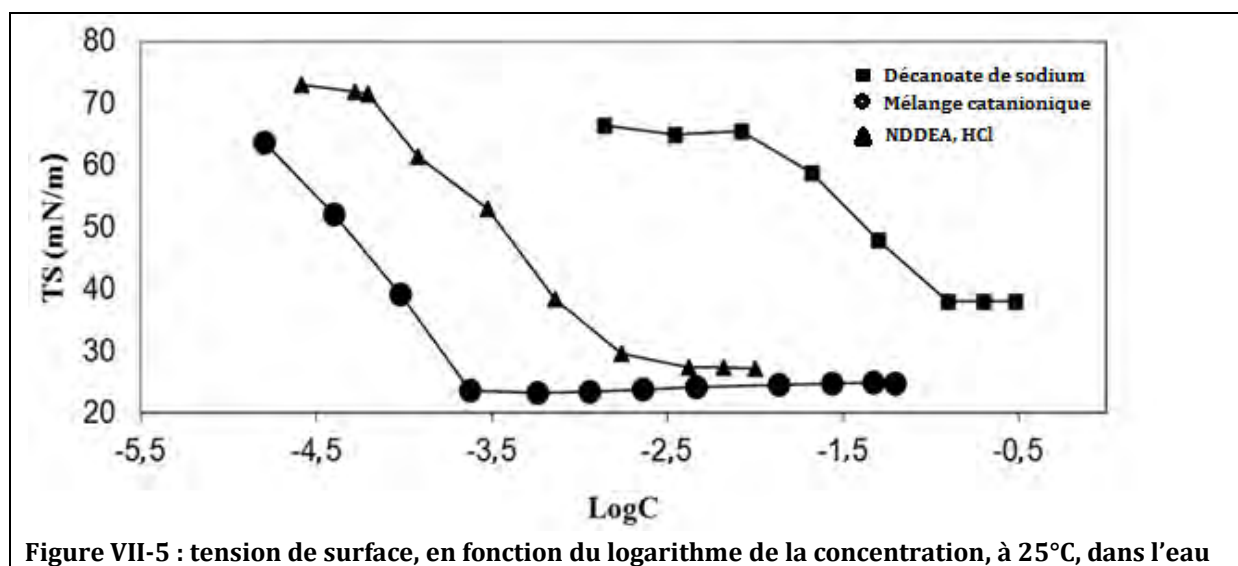
$$n \text{ N-dodécyl-diéthanolamine} = \frac{1}{2} n \text{ Acide décanoïque} + \frac{1}{2} n \text{ Acide azélaïque}$$



3.3 Caractérisation de vésicules catanioniques

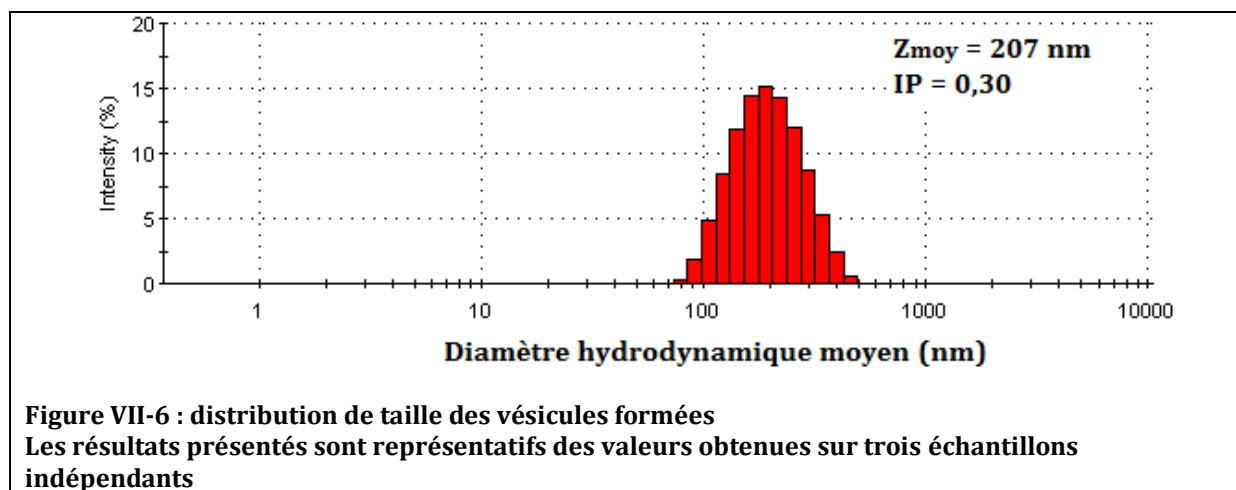
3.3.1 Détermination de la concentration d'agrégation critique (CAC)

Afin de caractériser la formation de vésicules catanioniques, nous avons cherché à déterminer une concentration d'agrégation critique correspondant à la concentration en tensioactif au dessus de laquelle la formations de vésicules à lieu (Figure VII-5). Au dessus de cette concentration, seront déterminées la taille, la distribution de taille des vésicules formées et enfin leur activité antibactérienne. La valeur de CAC des vésicules catanioniques a été comparée aux valeurs de CAC de l'acide décanoïque, sous forme de décanoate de sodium et de la N-dodécyl-diéthanolamine pure, ceci afin de mettre en évidence la synergie lors de l'association vésiculaire. Les résultats des mesures de CAC sont présentés sur la (figure VII-5). La dispersion catanionique formulée, présente une valeur de CAC de $2,6 \cdot 10^{-4}$ mol/l, inférieure à celles du décanoate de sodium ($3,32 \cdot 10^{-2}$) et du chlorhydrate de N-dodécyl-diéthanolamine ($2,73 \cdot 10^{-3}$). Cette valeur de CAC pour l'association catanionique montre clairement la synergie lors de la formation de vésicules.



3.3.2 Détermination de la taille et de la distribution de taille des vésicules formées

Les mesures précédentes de CAC ont permis de déterminer une valeur de concentration au delà de laquelle on observe la formation spontanée de vésicules catanioniques entre la N-dodécyl-diéthanolamine d'une part et les acides azélaïque et décanoïque d'autre part. Il s'agit ensuite de déterminer la taille et la distribution de taille des vésicules formées. Les vésicules ainsi formées ont été caractérisées par diffusion dynamique de la lumière, en se plaçant à une concentration supérieure à la CAC ($2,6 \cdot 10^{-4}$ mol/l). La (figure VII-6) présente la distribution de taille des vésicules, dans l'eau, à 25°C.



Les trois composants du système interagissent entre eux par le biais d'interactions électrostatiques aboutissant à la formation de vésicules présentant un diamètre moyen de 207 nm et un indice de polydispersité de 0,3.

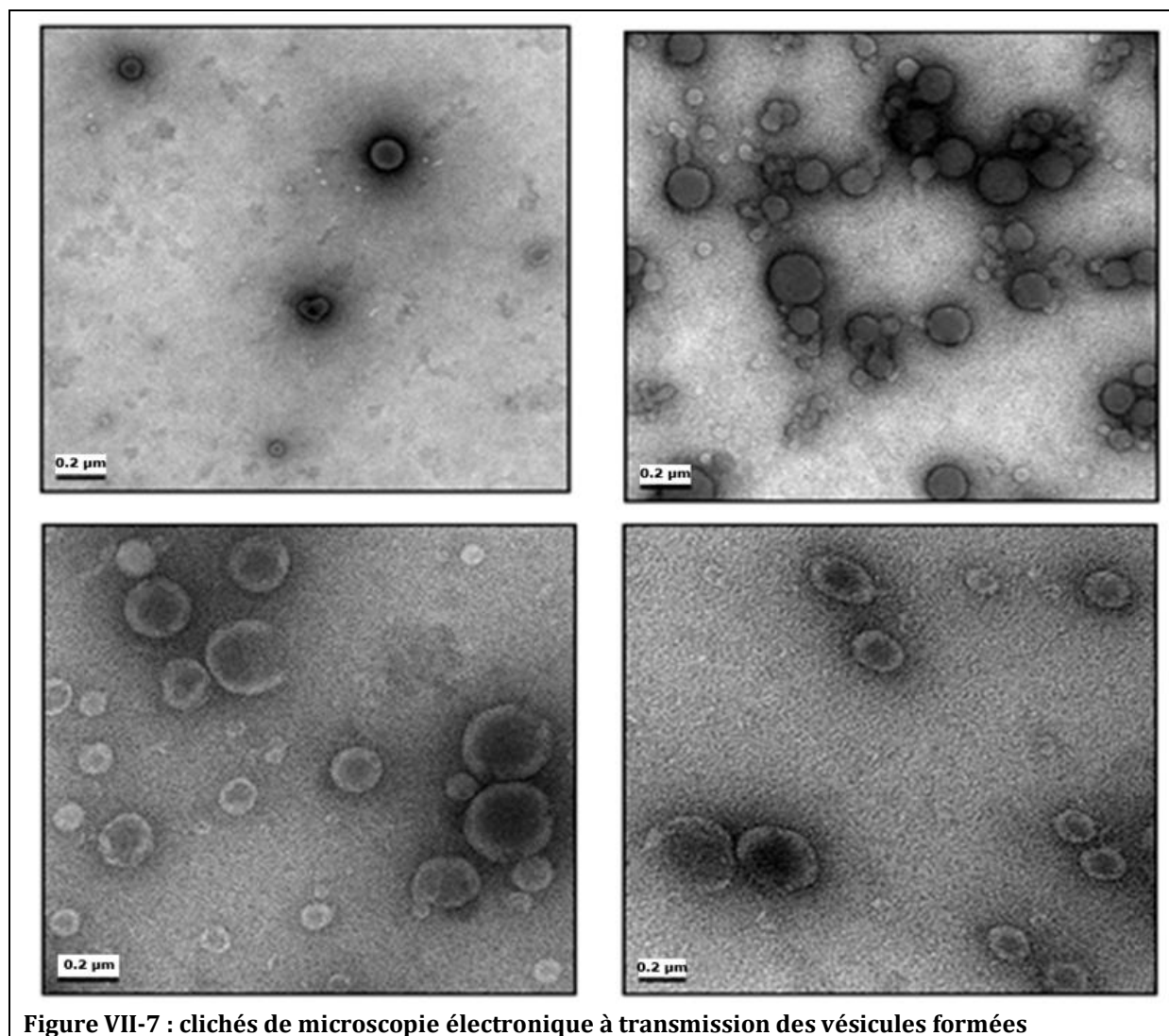
3.3.3 Charge de surface des vésicules

Bien qu'elles soient constituées d'un mélange équimolaire de cations et d'anions, le potentiel ζ des vésicules présente une charge positive de + 22 mV. Cette charge est probablement due à une répartition spatiale inhomogène des charges apportées par la N-dodécyl-diéthanolamine. Cette charge positive de surface apparaît comme un élément favorable à l'atteinte de notre objectif, puisque cette dernière va faciliter les interactions membranaires avec les bactéries.

3.3.4 Morphologie des vésicules

La morphologie des vésicules formées est observée en microscopie électronique à transmission. Cette technique permet également de corrélérer les résultats obtenus en diffusion dynamique de la lumière. Les clichés sont présentés sur la (figure VII-7).

Les clichés de microscopie électronique confirment la formation de vésicules sphériques. Les vésicules observées présentent un aspect et une taille moyenne comprise entre 100 et 200 nm relativement homogène.



3.3.5 Evaluation de l'activité antimicrobienne

L'activité antimicrobienne de la dispersion de vésicules a été évaluée et comparée à celle des composants purs afin d'observer le potentiel synergique des vésicules. La dispersion catanionique a été testée à la concentration de $2,20 \cdot 10^{-3}$ mol/l et mise en contact avec différentes souches microbiennes. Les résultats de ces essais sont présentés sur le tableau VII-2.

Ce tableau met en évidence que sur les souches *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Propionibacterium acnes* et *Candida albicans*, la dispersion catanionique possède non seulement une activité antimicrobienne renforcée sur les souches testées mais également un effet synergique de la dispersion.

Microorganismes	Composés CMI (mol/l)
<i>Staphylococcus aureus</i> [188]	Dispersion de vésicules : $1.37.10^{-4}$ AA : $5.31.10^{-4}$ [51] AD : $2.90.10^{-3}$ [188-190]
<i>E.coli</i>	Dispersion de vésicules : $1.37.10^{-4}$ NDDEA : $3.40.10^{-5}$ [30]
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Dispersion de vésicules : $6.89.10^{-5}$ AA : 0.125 [51] AD : $2.90.10^{-3}$ [188-190]
<i>Probionibaterium acnes</i>	Dispersion de vésicules : $6.89.10^{-5}$ - $1,37.10^{-4}$ AA : > 0.25 [51]
<i>Candida albicans</i>	Dispersion de vésicules : $2.75.10^{-4}$ AD : $5.80.10^{-4}$ [188-190]

AA : acide azélaïque, AD : acide décanoïque, NDDEA : N-dodécyl-diéthanolamine

Tableau VII-2 : activité antimicrobienne de la dispersion de vésicules et des composés seuls

3.4 Conclusion

L'auto-assemblage par simple réaction acido-basique de trois molécules antimicrobiennes, la N-dodécyl-diéthanolamine, l'acide décanoïque et l'acide azélaïque conduit à la formation de vésicules catanioniques stables. La charge globale positive portée des vésicules permet de potentialiser l'interaction de ces dernières avec la membrane des bactéries chargée négativement. Les tensioactifs constitutifs des vésicules catanioniques peuvent ainsi exercer leur effet antibactérien en désorganisant la membrane des bactéries. Les vésicules catanioniques ainsi formées possèdent non seulement un fort pouvoir antimicrobien mais élargissent également le spectre d'action à de nombreuses souches.

4. Conclusion

Dans un premier temps, l'étude de passage transcutané ne montre pas de différence significative entre l'acide azélaïque encapsulé et l'acide azélaïque non encapsulé. Cela signifie d'une part, que le complexe ternaire de linoléate de lactochitosan + acide azélaïque ne favorise pas particulièrement le passage transcutané de l'acide azélaïque et ne présente donc pas d'efficacité en termes de promotion de pénétration cutanée. D'autre part, les résultats de cette étude n'ont également pas permis de mettre en évidence un éventuel effet réservoir du système puisque les quantités cumulées d'acide azélaïque retrouvées dans le milieu récepteur après 24 heures sont identiques. Ces observations peuvent être interprétées par le fait que comme nous l'avons montré au niveau de l'étude approfondie de l'organisation des systèmes ternaires, le promoteur de pénétration cutanée, l'acide linoléique occupe une position centrale. Cette position semblerait empêcher l'acide linoléique d'exercer son rôle de promoteur de pénétration cutanée en améliorant le passage de l'acide azélaïque à travers les différentes couches de la peau. De plus, l'efficacité des complexes ternaires en ce qui concerne leur efficacité de promotion de pénétration cutanée ou leur effet réservoir ne peut se limiter qu'à l'étude d'un seul système, c'est pourquoi, il serait également intéressant de tester d'autres complexes ternaires, celui par exemple qui incorpore le R000342 qui présente une meilleure efficacité d'encapsulation de l'agent actif constituerait un bon candidat pour tester l'efficacité du système qui paraît malgré les résultats des essais sur l'acide azélaïque prometteur. Cependant, ce système d'encapsulation a par ailleurs montré son intérêt dans le maintien à la surface de la peau de l'acide azélaïque, laissant par conséquent entrevoir les potentielles applications du système pour l'encapsulation de molécules actives destinées à exercer leur action sur la surface cutanée.

Dans un second temps, nous avons par ailleurs pu mettre en évidence l'efficacité antimicrobienne d'un système de vésicules catanioniques. Le mélange des trois molécules que sont l'acide azélaïque, l'acide décanoïque et le N-dodécyl-diéthanolamine, (introduit sous forme de chlorhydrate) aboutit à l'auto-association spontanée, dans l'eau, par l'intermédiaire d'une simple réaction acido-basique de ces trois éléments, sous forme de vésicules catanioniques stables. Cette réaction apparaît donc comme très avantageuse puisqu'elle ne nécessite aucun solvant que très peu d'énergie, s'inscrivant donc dans une dynamique de développement durable. L'étude physico-chimique réalisée sur cette dispersion a permis de mettre en évidence qu'à une certaine concentration (concentration d'agrégation critique), ces trois molécules sont capables de réagir entre elles pour former spontanément des vésicules, dans l'eau. Ces vésicules se caractérisent par une taille et une morphologie bien spécifique qui ont pu être mises en évidence par des études de caractérisation physico-chimique. Par ailleurs, cette étude a permis de révéler la charge globale positive des vésicules catanioniques. Cette charge globale positive portée par les vésicules va permettre de potentialiser l'interaction de ces dernières avec la membrane bactérienne chargée négativement. Une fois la bactérie et le système de vésicules en interaction, ce dernier peut exercer son action antibactérienne, largement décrite, en désorganisant la membrane de microorganisme, provoquant ainsi leur mort.

Enfin, les essais microbiologiques mettent non seulement en évidence la conservation des effets antimicrobiens des différents éléments sur les souches cibles sur lesquelles la bibliographie décrit un effet mais également un effet synergique des vésicules catanioniques sur certaines souches.

L'association catanionique présente une réelle valeur ajoutée en termes de pouvoir antimicrobien. De plus, ces résultats montrent l'intérêt des vésicules catanioniques dans les formulations bioactives. De tels systèmes pourraient donc être étudiés ultérieurement en dermo-cosmétique, en association avec les particules de chitosan, après optimisation d'un système mixte polyélectrolytes/ vésicules catanioniques.

CONCLUSION GENERALE

Conclusion générale

L'objectif de ce travail s'est inscrit dans la réalisation d'un système biocompatible et bioactif, capable d'encapsuler simultanément des actifs aux propriétés dépigmentantes et des promoteurs de pénétration cutanée (acides gras) en vue de leur utilisation en dermo-cosmétique.

Dans un premier temps nous avons mis au point un vecteur de base, le lactochitosan capable d'interagir avec d'autres ingrédients. Ce vecteur résulte de l'association en milieu aqueux d'un oligomère de chitosan avec de l'acide lactobionique, par le biais d'interactions électrostatiques qui s'établissent entre les fonctions ammonium du chitosan et les fonctions carboxylates de l'acide lactobionique. Nous avons ensuite montré que ce vecteur de lactochitosan est capable d'établir des interactions de type hydrophobes et/ou électrostatiques avec un acide gras et/ou un principe actif dépigmentant, en formant des complexes binaires qui possèdent une taille et une morphologie adéquate pour l'encapsulation de principes actifs. Cette étude a également permis de mettre en évidence des propriétés d'aide à la formulation que pouvait constituer le lactochitosan. En effet, la possibilité de formation de complexes binaires entre lactochitosan et acide oléique, linoléique, α -linoléique et stéarique a permis de révéler les propriétés stabilisantes du lactochitosan puisque ce dernier est capable de maintenir en dispersion dans l'eau certains acides gras. Cette capacité serait conditionnée par la conformation spatiale des acides gras puisque les conformations de type coudées diminueraient les interactions avec le lactochitosan.

Dans un second temps, nous avons alors mis au point des complexes ternaires d'oléate ou de linoléate de lactochitosan et de principes actifs dépigmentants, l'intérêt d'intégrer un acide gras au complexe est de favoriser la pénétration cutanée du vecteur. Les essais réalisés en faisant varier les natures des acides gras et des molécules actives incorporés ont révélé l'existence d'un certain nombre de critères dans l'efficacité du système. En effet, une molécule active possédant un caractère hydrophile très marqué aura tendance à rester en solution dans l'eau, comme c'est le cas de l'acide kojique, dont nous avons montré l'incapacité de ce dernier à interagir avec le lactochitosan. A l'inverse, un principe actif très hydrophobe ne pourra établir d'interaction avec le lactochitosan, celui-ci ne l'étant pas suffisamment. En effet, le caractère hydrophobe du lactochitosan est apporté par les fonctions acétyles du chitosan qui dans le cadre de cette étude possède un degré de désacétylation de 85% et donc très peu de fonctions acétyles. De plus, la nature de l'acide gras incorporé aura une influence sur les interactions entre acide gras et molécules actives. En fonction de l'acide gras incorporé au système, les complexes formés auront une taille et un taux d'encapsulation de principe actif différents. L'étude approfondie de l'organisation des systèmes ternaires a permis de révéler l'organisation des éléments du système les uns par rapport aux autres. Le lactochitosan occupe une position périphérique et forme une « couronne » autour de l'acide gras qui se positionne donc au sein cœur du système.

La mise au point des complexes ternaires étant achevée, nous nous sommes intéressés à leur activité biologique. Nous avons donc dans un premier temps sélectionné le complexe ternaire de linoléate de lactochitosan + acide azélaïque afin d'évaluer son efficacité de passage transcutané

par rapport à l'acide azélaïque non encapsulé. L'étude préliminaire réalisée n'a cependant pas permis de mettre en évidence l'intérêt du système d'encapsulation à base de lactochitosan par rapport au passage transcutané. Ce résultat peut s'expliquer par le fait que le promoteur de pénétration cutanée, l'acide linoléique occupe une position centrale, l'empêchant d'exercer sa fonction de promotion. L'acide azélaïque étant une molécule aux multiples propriétés, nous avons voulu, cependant, dans un second temps, évaluer l'efficacité antimicrobienne de l'acide azélaïque intégré au sein d'un autre système bioactif de type vésicule catanionique. Après avoir mis au point la préparation du système catanionique multi-actif, l'étude physico-chimique a permis de mettre évidence la formation de vésicules catanioniques stables, portant une charge globale positive. Nous nous sommes par la suite, intéressés au pouvoir antimicrobien de ces vésicules. L'évaluation du pouvoir antimicrobien des systèmes catanioniques a permis de mettre en évidence non seulement un effet antimicrobien des vésicules catanioniques sur toutes les souches testées mais également un pouvoir synergique sur certaines souches. Les vésicules catanioniques formées élargissent donc le spectre d'action de chaque élément constitutif du système.

En envisageant de poursuivre cette étude, il serait intéressant de tester d'autres systèmes. Un système mixte couplant le lactochitosan et des vésicules catanioniques pour des applications dermo-cosmétiques différentes. Par ailleurs, il pourrait également être possible d'envisager une méthode de séparation au sein des échantillons du principe actif encapsulé et non encapsulé afin de réaliser les études de passage transcutané avec uniquement la fraction de l'actif encapsulé au sein du système.

PARTIE EXPERIMENTALE

Partie expérimentale

1. Conception et caractérisation physico-chimique des complexes à base de chitosan

1.1 Produits commerciaux

L'ensemble des produits commerciaux utilisés au cours de ce travail sont listés dans le tableau suivant :

Produit	N° CAS	Fournisseur	Pureté
Chitosan (origine animale)	9012-76-4	Sigma-Aldrich	Degré de désacétylation : 85%
Chitosan 10-20 kDa (origine végétale)	9012-76-4	Pierre Fabre	Degré de désacétylation : non fourni
Chitosan 50-80 kDa (origine végétale)	9012-76-4	Pierre Fabre	Degré de désacétylation : non fourni
Acide oléique	112-81-1	Sigma-Aldrich	≥ 99%
Acide linoléique	60-33-3	Sigma-Aldrich	≥ 99%
Acide α -linoléique	463-40-1	Sigma-Aldrich	≥ 99%
Acide stéarique	57-11-4	Sigma-Aldrich	≥ 95%
Acide lactobionique	96-82-2	Sigma-Aldrich	97%
Acide kojique	501-30-4	Sigma-Aldrich	Non fournie
Acide azélaïque	123-99-9	Sigma-Aldrich	98%
R000342	85-27-8	Pierre Fabre	Non fournie
Acide rétinoïque	302-79-4	Pierre Fabre	Non fournie
n-butyl résorcinol	18979-61-8	Sigma-Aldrich	Non fournie

Tableau A-1 : produits commerciaux utilisés

1.2 Solvants

Les solvants utilisés pour réaliser ces travaux sont listés dans le tableau suivant :

Nom du solvant	N° CAS	Fournisseur	Pureté
Acide chlorhydrique	7647-01-0	SDS	1N
Acide acétique	64-19-7	VWR	100%
Ethanol	64-17-5	VWR	95%

Tableau A-2 : liste des solvants utilisés au cours des travaux

1.3 Techniques générales de caractérisation structurale

1.3.1 Résonance magnétique nucléaire (RMN)

Les spectres de résonance magnétique nucléaire (RMN) ont été enregistrés sur un spectromètre Bruker® Avance fonctionnant à 500 MHz équipé d'une cryosonde TCI de 5 mm. Toutes les expériences ont été réalisées à la température de 25°C. Les expériences ont été enregistrées avec les paramètres suivants :

- **RMN ¹H**
 - Accumulation : 16 scans
 - Délai de relaxation : 8,3 secondes
- **Jmod ¹³C**
 - Accumulation : 6000-8000 scans
 - Délai de relaxation : 3,4 secondes
- **DOSY**

Les expériences de DOSY ont été réalisées avec les conditions suivantes :

- Temps de diffusion : 100 ou 800 ms
- Durée de gradient : 1ms ou 6 ms
- Nombre de gradients : 16
- Nombre de scans : entre 16 et 32

Les déplacements chimiques sont exprimés en partie par million (ppm) par rapport au tétraméthylsilane. Les fréquences sont exprimées en hertz (Hz).

Les spectres ont été réalisés pour des concentrations de 30 à 60 mg/ml.

NB : les abréviations suivantes sont utilisées pour décrire la multiplicité des signaux obtenus sur le spectre RMN du proton : « s » pour singulet, « d » pour doublet, « t » pour triplet, « q » pour quadruplet et « m » pour multiplet.

1.3.2 Spectroscopie Infra-Rouge (IR)

Les spectres infra-rouge (IR) ont été enregistrés par un appareil Perkin Elmer® FT-IR 1760-X. Les échantillons solides ont été préparés en pastille de bromure de potassium (KBr) avec une concentration massique de 0,5%.

1.4 Techniques générales de caractérisation physico-chimique

1.4.1 Microscopie électronique à transmission (MET)

La microscopie électronique à transmission (MET) est une méthode basée sur l'effet d'écran que peut produire un objet soumis à un faisceau d'électrons. L'objet est placé sur une grille de cuivre dont l'épaisseur ne doit pas dépasser un micron. L'absorption plus ou moins importante des électrons incidents par les particules de l'échantillon donne naissance à une image électronique, transformée en une image optique contrastée par projection sur un écran fluorescent.

Afin de renforcer les différences de densité électronique au sein de l'échantillon et permettre ainsi une meilleure visualisation de celui-ci, nous avons eu recours à la technique de la coloration négative.

Pour ce faire, une solution aqueuse d'acétate d'uranyle (1% massique dans l'eau), a été utilisée pour caractériser le vecteur de base, les complexes binaires et ternaires. Par ailleurs, nous avons utilisé le tétraoxyde d'osmium afin de déterminer l'agencement des éléments au sein du système. Ce contrastant étant spécifique des doubles liaisons carbone-carbone, permet de repérer l'acide linoléique ou oléique au sein du système.

Le microscope utilisé pour ces analyses est un appareil Jeol® JEM 1011 à 120 Kv. Les échantillons sont déposés sur des grilles de cuivre Formwar® couvertes d'un film de carbone.

1.4.2 Diffusion dynamique de la lumière

La taille et la distribution de taille des objets formés est déterminée par la technique de diffusion dynamique de la lumière. Le principe de cette technique consiste à mesurer les fluctuations de concentrations locales induites par le mouvement brownien des particules en solution. Elle permet d'évaluer le coefficient de diffusion des particules par l'analyse de l'intensité de la lumière diffusée à 173°, ceci permettant de déterminer le rayon hydrodynamique de ces particules supposées sphériques.

Les mesures ont été réalisées sur un appareil Malvern Instruments® Nano ZS ZEN3600, équipé d'un laser He-Ne émettant une lumière monochromatique de longueur d'onde 633 nm. Les limites de détermination de taille de l'appareil sont comprises entre 0,6 nm et 6 µm.

Les échantillons contenant les objets ont été analysés par diffusion dynamique de la lumière sans préparation spécifique préalable.

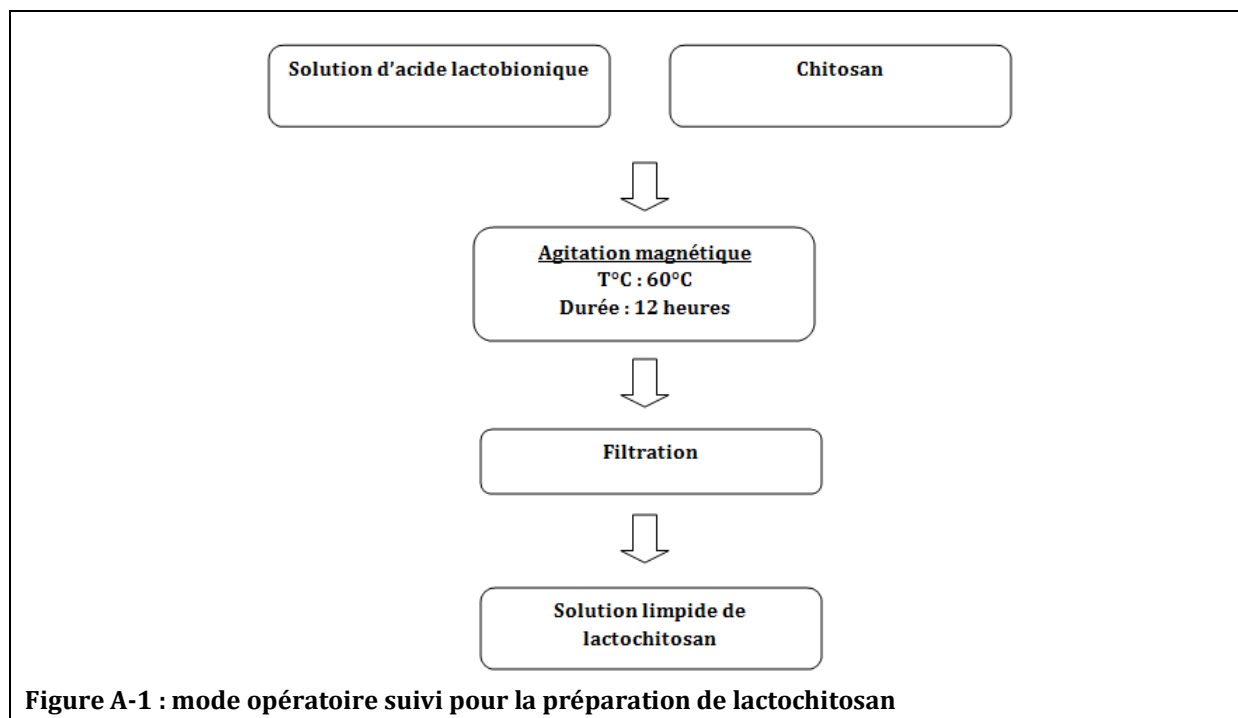
1.5 Formulation et caractérisation des complexes à base de chitosan

1.5.1 Formulation du vecteur de base : le lactochitosan

- **Mode opératoire**

La préparation du lactochitosan est décrite au niveau de la figure A-1 et comprend les étapes successives suivantes :

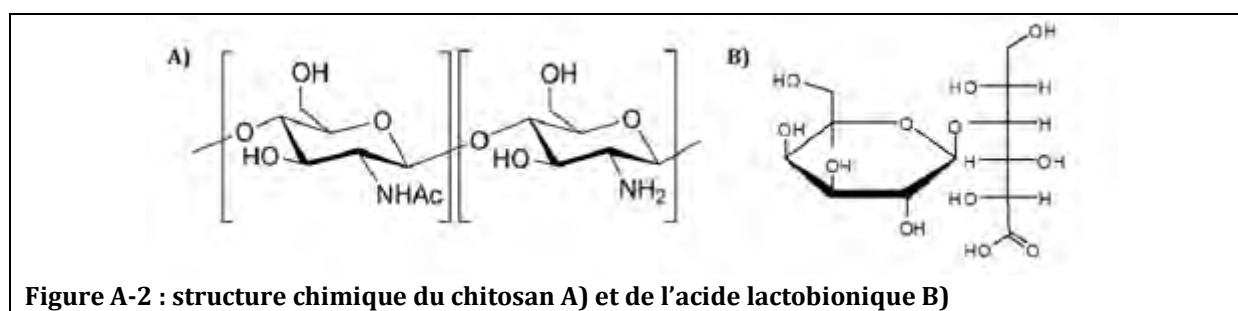
Le lactochitosan est préparé en solubilisant l'oligomère de chitosan ($m=0,120 \text{ g} / C = 7,13 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}$), de faible viscosité, caractérisé par une masse moyenne de 4 kDa et un degré de désacétylation de 85% dans 50 ml d'une solution aqueuse d'acide lactobionique ($1,4 \cdot 10^{-2} \text{ mol/L}$). La concentration de la solution d'acide lactobionique est ajustée de sorte à ce que le chitosan et l'acide lactobionique se trouvent dans des proportions stœchiométriques.



La préparation est agitée pendant 12 heures, à 60°C, filtrée à l'aide d'un papier filtre (8-10 μm). L'échantillon obtenu présente un aspect stable et limpide.

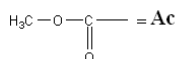
1.5.2 Caractérisation physico-chimique

Pour rappel, les structures chimiques du chitosan et de l'acide lactobionique sont présentées sur la figure A-2.



RMN ^1H (D_2O , 500 MHz), à 25°C

Les déplacements chimiques caractéristiques du lactochitosan, en RMN ^1H sont présentés dans le tableau suivant :



Molécule	Déplacements chimiques δ (ppm)	Multiplicité	Fonctions chimiques	Nombre de protons
Chitosan	1,95	s	CH ₃	3
	1,99	s	Ac (OH)	3
	4,62	s	GluNAc	1
	4,92	s	H1 de GluNH ₂	1
Chitosan et acide lactobionique	entre 3,40 et 4,2	m	H	

Tableau A-3 : déplacements chimiques caractéristiques du lactochitosan, en RMN¹H

RMN ¹³C (D₂O, 500 MHz), à 25°C

Les déplacements chimiques caractéristiques du lactochitosan en RMN ¹³C sont présentés sur le tableau ci-dessous :

Molécule	Déplacements chimiques δ (ppm)	Fonctions chimiques
Acide lactobionique	173	COOH
Lactochitosan	177	COO ⁻

Tableau A-4 : déplacements chimiques caractéristiques du lactochitosan, en RMN¹³C

RMN DOSY (D₂O, 500 MHz), à 25°C : coefficient de diffusion en m²/s : 3,3.10⁻¹⁰ m²/s (acide lactobionique pur) ; 3,0.10⁻¹⁰ m²/s (acide lactobionique sous forme de lactobionate de chitosan).

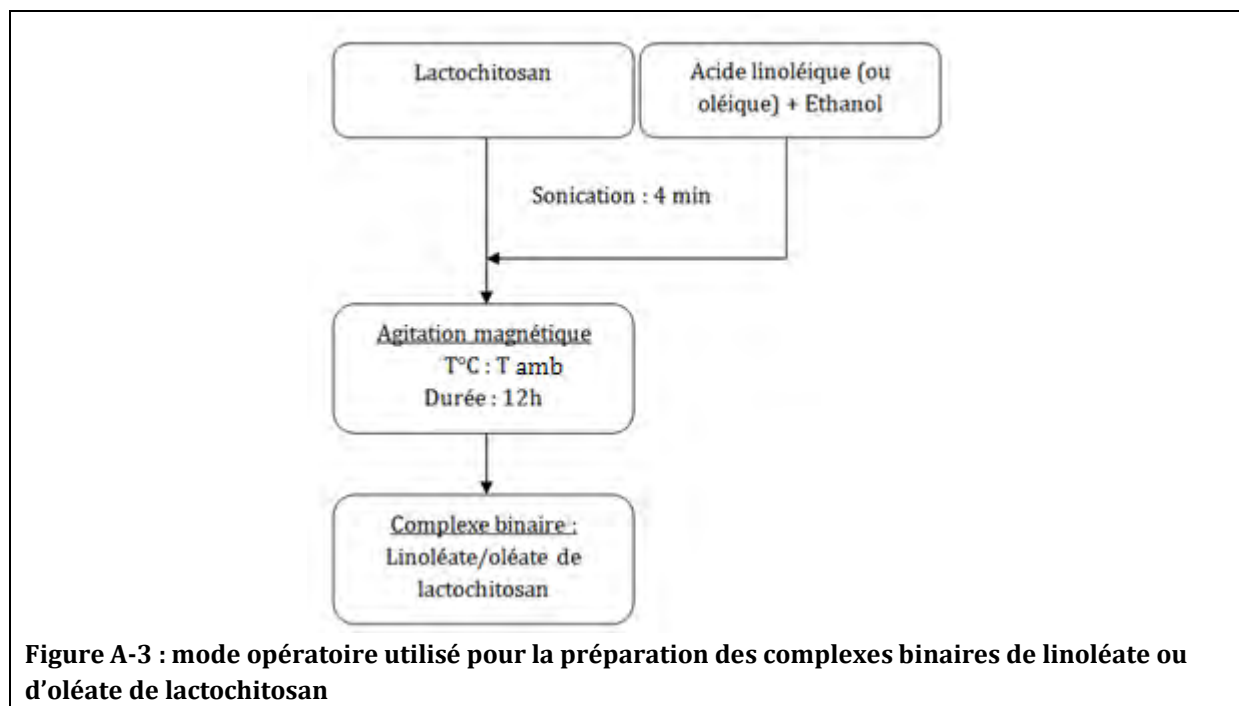
1.5.3 Préparation et caractérisation des complexes binaires

1.5.3.1 Linoléate de lactochitosan

- **Mode opératoire**

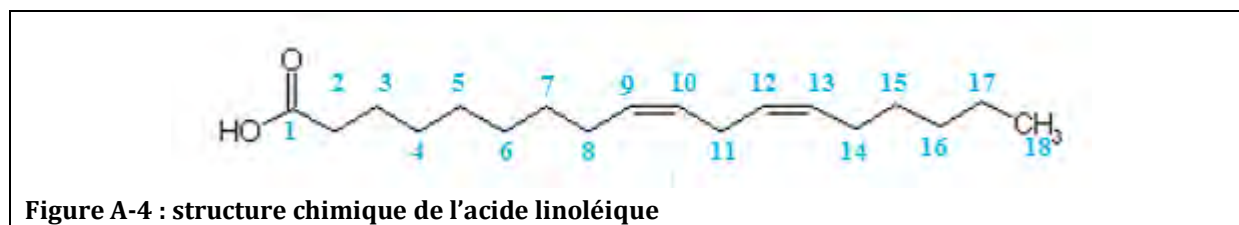
Le mode opératoire utilisé pour réaliser les complexes binaires de linoléate de lactochitosan est décrit au niveau de la figure A-3.

Pour la préparation de linoléate de lactochitosan, nous avons eu recours à la technique de diffusion de solvant. L'acide gras (m=50 mg) dans un faible volume d'éthanol (95%) (V=1ml) et additionné goutte à goutte à l'aide d'une seringue, parallèlement à une étape de sonication (4 minutes), à une solution de lactochitosan (C=1,4.10⁻² mol/L). La préparation est ensuite agitée pendant 12 heures à température ambiante.



- **Caractérisation physico-chimique**

La formule de l'acide linoléique est rappelée au niveau de la figure suivante :



RMN ^1H (D_2O , 500 MHz), à 25°C

Le tableau ci-dessous présente les déplacements chimiques caractéristiques du linoléate de lactochitosan en RMN ^1H :

Molécule	Déplacements chimiques δ (ppm)	Multiplicité	Fonctions chimiques	Nombre de protons
Acide linoléique	0,90	t	CH ₃	3
	1,30	m	CH ₂ (aliphatiques)	14
	1,80	t	CH ₂ (aliphatiques)	2
	2,10 – 2,60	m	CH ₂ aliphatiques	8
	5,30	m	CH éthyléniques	4
Lactochitosan	entre 3,0 et 4,50	m	H du lactochitosan	

Tableau A-5 : déplacements chimiques caractéristiques du linoléate de lactochitosan, en RMN¹HRMN ¹³C (D₂O, 500 MHz), à 25°C

Le tableau ci-dessous présente les déplacements chimiques caractéristiques du linoléate de lactochitosan en RMN ¹³C :

Molécule	Déplacements chimiques δ (ppm)	Fonctions chimiques
Linoléate	126, 127, 129, 131	C=C
	179	COO ⁻
Lactochitosan	177	COO ⁻

Tableau A-6 : déplacements chimiques caractéristiques du linoléate de lactochitosan, en RMN¹³CRMN DOSY (D₂O, 500 MHz), à 25°C

Le tableau suivant présente les résultats des mesures de DOSY du linoléate de lactochitosan :

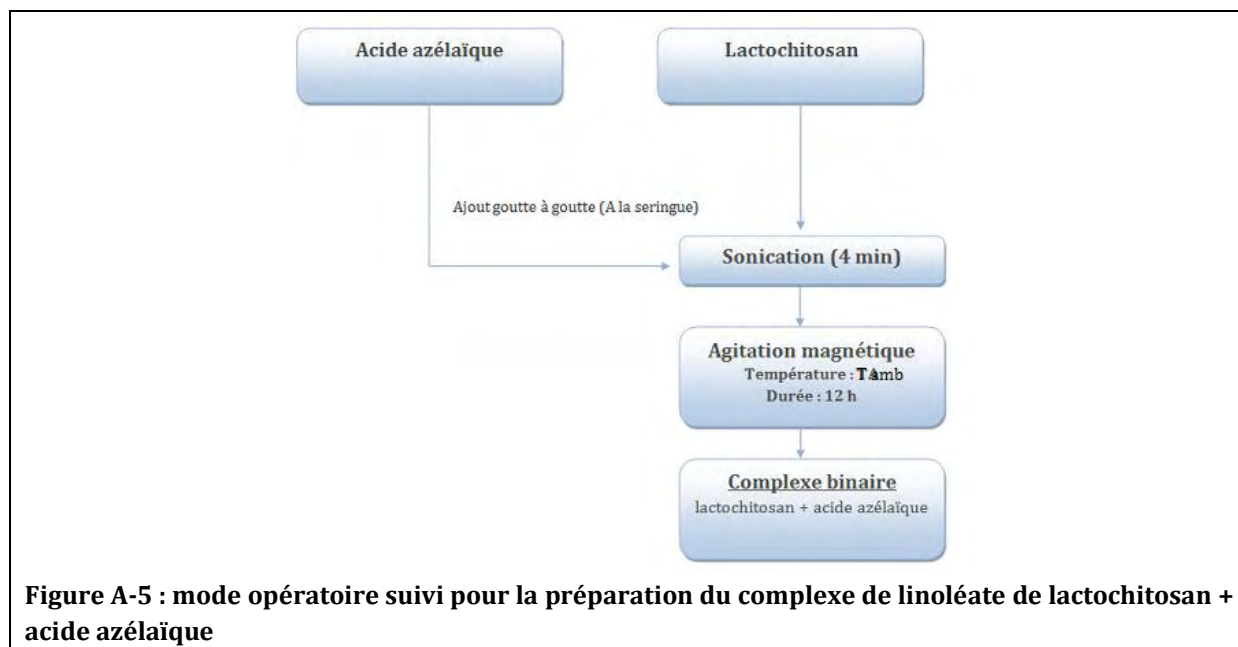
Complexe	Eléments du complexe	Coefficient de diffusion des éléments complexés (m ² /s)	Coefficient de diffusion des éléments purs (m ² /s)
Linoléate de lactochitosan	lactochitosan	3,8.10 ⁻¹⁰	3,0.10 ⁻¹⁰
	Acide linoléique	3,8.10 ⁻¹⁰	8,0.10 ⁻¹⁰

Tableau A-7 : résultats des analyses de RMN DOSY sur un échantillon de linoléate de lactochitosan, dans D₂O

1.5.3.2 Lactochitosan + acide azélaïque

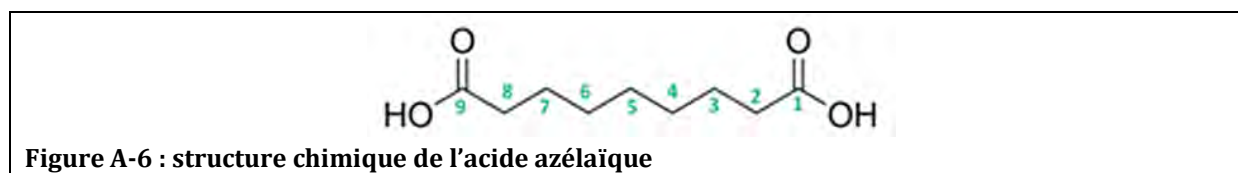
- **Mode opératoire**

L'ingrédient actif (l'acide azélaïque) est ajouté par sonication pendant 4 minutes à une solution aqueuse de lactochitosan ($C=1,4 \cdot 10^{-2}$ mol/L ; $V=50$ ml). L'acide azélaïque ($m = 40$ mg ; $n = 2,12 \cdot 10^{-4}$ mol) a été introduit, soit 30% molaire d'acide azélaïque par rapport à la quantité de lactochitosan. La préparation est agitée à température ambiante, pendant 12 heures. Le mode opératoire suivi pour la préparation de l'échantillon est décrit sur la figure ci-dessous :



- **Caractérisation physico-chimique**

Pour rappel, la structure chimique de l'acide azélaïque est présentée sur la figure ci-dessous :



RMN ^1H (D $_2\text{O}$, 500 MHz)

Les déplacements chimiques caractéristiques du lactochitosan + acide azélaïque, en RMN ^1H sont présentés dans le tableau suivant :

Molécule	Déplacements chimiques δ (ppm)	Multiplicité	Fonctions chimiques	Nombre de protons
lactochitosan	1,95	s	CH ₃	3
	1,99	s	Ac(OH)	3
	4,62	s	GluNAc	1
	4,92	s	H1 de GluNH ₂	1
	entre 3,40 et 4,20	m	H	
Acide azélaïque	1,20 -1,40	m	CH ₂	10
	3,50	t	CH ₂	4

Tableau A-8 : déplacements chimiques caractéristiques du complexe de lactochitosan + acide azélaïque, en RMN¹H

RMN ¹³C (D₂O, 500 MHz), à 25°C

Le tableau ci-dessous présente les déplacements chimiques caractéristiques du lactochitosan + acide azélaïque en RMN ¹³C :

Molécule	Déplacements chimiques δ (ppm)	Fonctions chimiques
Acide azélaïque	180	COO ⁻
Lactochitosan	177	COO ⁻

Tableau A-9 : déplacements chimiques caractéristiques du lactochitosan + acide azélaïque, en RMN¹³C

RMN DOSY (D₂O, 500 MHz), à 25°C

Le tableau suivant présente les résultats des mesures de DOSY du lactochitosan + acide azélaïque :

Complexe	Eléments du complexe	Coefficient de diffusion des éléments complexés (m ² /s)	Coefficient de diffusion des éléments purs (m ² /s)
Lactochitosan+ acide azélaïque	lactochitosan	3,0.10 ⁻¹⁰	3,4.10 ⁻¹⁰
	Acide azélaïque	5,0.10 ⁻¹⁰	4,7.10 ⁻¹⁰

Tableau A-10 : récapitulatif des mesures de RMN DOSY, sur l'échantillon de lactochitosan + acide azélaïque, dans D₂O

1.5.4 Préparation et caractérisation des complexes ternaires

1.5.4.1 Linoléate de lactochitosan + acide azélaïque

- **Mode opératoire**

Le mode opératoire utilisé pour préparer le complexe ternaire de linoléate de lactochitosan + acide azélaïque est décrit sur la figure A-7. A une solution aqueuse d'acide lactobionique $C=1,4.10^{-2}$ mol/L ; $V=50$ ml), a été solubilisée de l'acide azélaïque ($m= 40$ mg ; $n=2,65.10^{-4}$ mol) puis a été ajoutée de l'acide linoléique ($m=50$ mg ; $C= 1,78.10^{-4}$ mol) dans 1 ml d'éthanol (95%), simultanément à une étape de sonication pendant 4 minutes. La préparation a été agitée pendant 12 heures, à température ambiante.

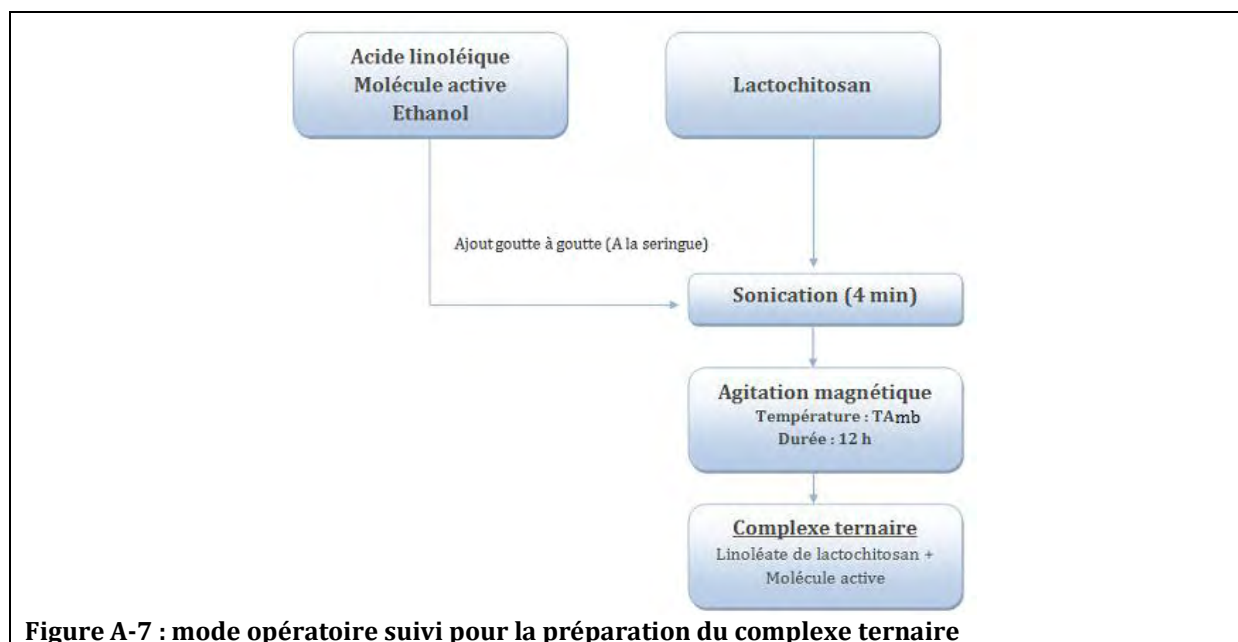


Figure A-7 : mode opératoire suivi pour la préparation du complexe ternaire

- **Caractérisation physico-chimique**

RMN ^1H (D_2O , 500 MHz), à 25°C

Les déplacements chimiques caractéristiques du linoléate de lactochitosan + acide azélaïque, en RMN ^1H sont présentés sur le tableau suivant :

Molécule	Déplacements chimiques δ (ppm)	Multiplicité	Fonctions chimiques	Nombre de protons
lactochitosan	1,95	s	CH ₃	3
	1,99	s	Ac (OH)	3
	4,62	s	GluNAc	1
	4,92	s	H1 de GluNH ₂	1
	entre 3,40 et 4,20	m	H	
Acide azélaïque	1,20	s	CH ₂	6
	1,40	m	CH ₂	4
	3,50	t	CH ₂	4
Acide linoléique	0,90	t	CH ₃	3
	1,30	m	CH ₂ (aliphatiques)	14
	1,80	t	CH ₂ (aliphatiques)	2

Tableau A-11 : déplacements chimiques caractéristiques du complexe de linoléate de lactochitosan + acide azélaïque, en RMN¹H

RMN ¹³C (D₂O, 500 MHz), à 25°C

Le tableau ci-dessous présente les déplacements chimiques caractéristiques du linoléate de lactochitosan + acide azélaïque en RMN ¹³C :

Molécule	Déplacements chimiques δ (ppm)	Fonctions chimiques
Acide azélaïque	180	COO ⁻
Lactochitosan	177	COO ⁻
Linoléate	179	COO ⁻

Tableau A-12 : déplacements chimiques caractéristiques du linoléate de lactochitosan + acide azélaïque, en RMN¹³C

RMN DOSY (D₂O, 500 MHz), à 25°C

Le tableau suivant présente les résultats des mesures de DOSY du linoléate de lactochitosan + acide azélaïque :

Complexe	Éléments du complexe	Coefficient de diffusion des éléments complexés (m ² /s)	Coefficient de diffusion des éléments purs (m ² /s)
Linoléate de lactochitosan+ acide azélaïque	lactochitosan	3,2.10 ⁻¹⁰	3,3.10 ⁻¹⁰
	Acide azélaïque	3,2.10 ⁻¹⁰	5,0.10 ⁻¹⁰
	Acide linoléique	2,0.10 ⁻¹²	8,0.10 ⁻¹⁰

Tableau A-13 : récapitulatif des mesures de RMN DOSY, sur l'échantillon du linoléate de lactochitosan + acide azélaïque, dans D₂O

1.5.4.2 Complexes ternaires de linoléate et d'oléate de lactochitosan + R000342

- **Mode opératoire**

Le mode opératoire suivi pour la préparation de ces complexes est identique à celui décrit pour la préparation du complexe de linoléate de chitosan + acide lipoïque.

RMN ¹³C (D₂O, 500 MHz), à 25°C

Le tableau ci-dessous présente les déplacements chimiques caractéristiques du linoléate et d'oléate de lactochitosan + R000342 en RMN ¹³C :

Molécule	Déplacements chimiques δ (ppm)	Fonctions chimiques
Lactochitosan	177	COO ⁻
Linoléate	126, 127, 129, 131	C=C
	179	COO ⁻
Oléate	129-130	C=C
	179	COO ⁻

Tableau : déplacements chimiques caractéristiques de linoléate et d'oléate de lactochitosan + R000342, en RMN¹³C

RMN ¹H (D₂O, 500 MHz), à 25°C

Les déplacements chimiques caractéristiques du linoléate et de l'oléate de lactochitosan + R000342, en RMN¹H sont présentés sur le tableau suivant :

Molécule	Déplacements chimiques δ (ppm)	Multiplicité	Fonctions chimiques	Nombre de protons
lactochitosan	1,95	s	CH ₃	3
	1,99	s	Ac (OH)	3
	4,62	s	GluNAc	1
	4,92	s	H1 de GluNH ₂	1
	entre 3,40 et 4,20	m	H	
R000342	1,43	d	CH ₃	3
	4,27	m	CH (aromatiques)	1
	6,30	d	CH (aromatiques)	1
	6,38	d	CH (aromatiques)	1
	7,06	d	CH (aromatiques)	1
	7,12	m	CH (aromatiques)	1
	7,18	m	CH (aromatiques)	2
7,20	m	CH (aromatiques)	2	
Acide linoléique	0,90	t	CH ₃	3
	1,30	m	CH ₂ (aliphatiques)	14
	1,80	t	CH ₂ (aliphatiques)	2
Acide oléique	1,87	t	CH ₃	3
	1,27 - 2,34	m	CH ₂ (aliphatiques)	20
	5,34	m	CH ₂ (éthyléniques)	2

Tableau A-14 : déplacements chimiques caractéristiques du complexe de linoléate et d'oléate de lactochitosan + R000342, en RMN¹H

RMN DOSY (D₂O, 500 MHz), à 25°C

Les tableaux suivants présentent les résultats des mesures de DOSY du linoléate et de l'oléate de lactochitosan + acide R000342 :

Complexe	Eléments du complexe	Coefficient de diffusion des éléments complexés (m ² /s)	Coefficient de diffusion des éléments purs (m ² /s)
Linoléate et oléate de lactochitosan+ R000342	lactochitosan	3,0.10 ⁻¹⁰	3,2.10 ⁻¹⁰
	R000342	4,7.10 ⁻¹⁰	1,9.10 ⁻⁹
	Acide linoléique	2,0.10 ⁻¹²	8,0.10 ⁻¹⁰

Tableau A-15 : récapitulatif des mesures de RMN DOSY, sur l'échantillon de linoléate de lactochitosan + R000342, dans D₂O

Complexe	Éléments du complexe	Coefficient de diffusion des éléments complexés	Coefficient de diffusion des éléments purs
Oléate de lactochitosan + R000342	Lactochitosan	$3,0 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$	$3,3 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$
	R000342	$4,0 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$	$5,0 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$
	Acide oléique	$4,2 \cdot 10^{-13} \text{ m}^2/\text{s}$	$7,0 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$

Tableau A-16 : récapitulatif des mesures de RMN DOSY, sur l'échantillon d'oléate de lactochitosan + R000342, dans D₂O

2. Conception et caractérisation de vésicules catanioniques

2.1 Produits commerciaux utilisés

L'ensemble des produits commerciaux utilisés au cours de ce travail sont listés dans le tableau suivant :

Produit	N° CAS	Fournisseur	Pureté
Acide azélaïque	123-99-9	Sigma-Aldrich	98%
N-dodecyldiethanolamine (NDDEA)	1541-67-9	TCI® Europe	> 95 %
Acide décanoïque	334-48-5	Sigma-Aldrich	≥ 98%

Tableau A-17 : produits commerciaux utilisés

2.2 Techniques de caractérisation physico-chimique

2.2.1 Détermination de la concentration d'agrégation critique

La concentration d'agrégation critique des vésicules formées a été déterminée avec un tensiomètre KRUSS®K20 EasyDyne à 25°C, à l'aide de la méthode de la lame de Wilhelmy. Cette méthode consiste à immerger une lame mince de platine dans la solution et à mesurer le poids du ménisque qui se forme le long de son périmètre. L'appareil est paramétré comme suit :

- Limites de lecture 15 mesures
- Vitesse : 50%
- Ecart-type maximal : 0,1 Mm/m
- Intervalle entre deux mesures : 2s
- Périmètre immergé : 40,20 mm
- Hauteur d'immersion : 3 mm

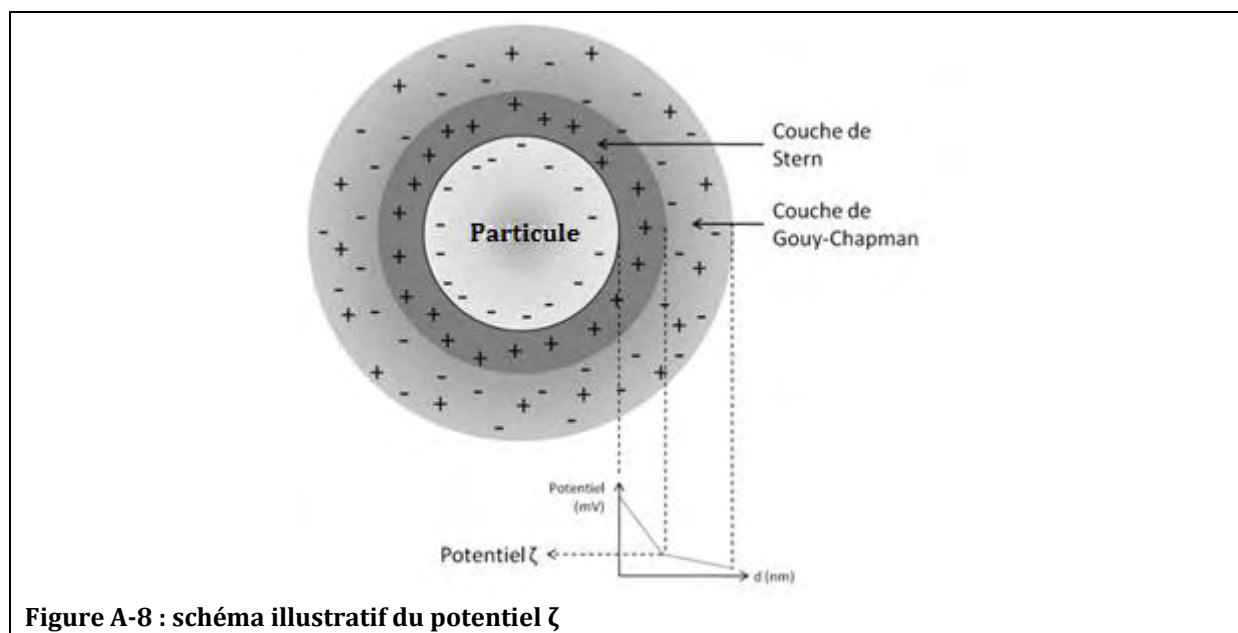
2.2.2 Diffusion dynamique de la lumière

La taille et la distribution de taille des objets formés sont déterminées par la technique de diffusion dynamique de la lumière à l'aide de l'appareil décrit précédemment.

Les échantillons contenant les objets ont été analysés par diffusion dynamique de la lumière à la concentration de $2.6.10^{-4}$ mol/l.

2.2.3 Zétamétrie

Comme toute particule colloïdale, les vésicules catanioniques possèdent une charge globale à leur surface qui attire les ions de charge opposé présents dans la solution aqueuse. Ceux-ci constituent une couche ionisée dense, appelée couche de Stern, qui attire à son tour une couche plus diffuse d'ions de charges opposée, dite couche de Gouy-Chapman (figure A-8). La différence de potentiel entre la couche de Stern et la couche de Gouy-Chapman est appelée potentiel zêta (ζ). Cette grandeur caractérise donc la répartition des charges électriques que les vésicules acquièrent sur leur surface grâce aux ions qui l'entourent quand elles ont en solution [191, 192].



L'appareil de zétamétrie applique un champ électrique à travers l'échantillon. Les vésicules catanioniques migrent vers l'électrode de charge opposée avec une vitesse proportionnelle à l'amplitude du potentiel ζ qui est alors mesuré. L'appareil utilisé pour réaliser les mesures de potentiel zêta est identique à celui employé en diffusion dynamique de la lumière.

2.2.4 Microscopie électronique à transmission

Le microscope utilisé pour ces analyses est un appareil Jeol® JEM 1011 à 120 Kv, identique à celui décrit précédemment. Un volume de 20 μ l d'échantillon est déposé sur des grilles de cuivre Formwar® couvertes d'un film de carbone, pendant 2 minutes. L'acétate d'uranyle (1%) a été utilisé en tant qu'agent contrastant.

2.3 Evaluation de l'activité antimicrobienne des vésicules

L'objectif de ces essais est de détecter une activité antimicrobienne des vésicules formées, sur un panel de 5 souches.

Une solution aqueuse à 1000µg/ml a été préparée à partir de l'échantillon de vésicules formées.

2.3.1 Souches-test

Les souches tests sont les suivantes :

- *Staphylococcus aureus* (CIP 4.83)
- *Escherichia coli* (CIP 53126)
- *Staphylococcus epidermidis* (CIP 68.21)
- *Propionibacterium acnes* (CIP 53117T)
- *Candida albicans* (IP 48.72)

2.3.2 Milieux de culture

Les milieux de culture pour l'entretien des souches et la réalisation des essais sont les suivants :

Entretien

S. aureus, E. coli, S. epidermidis

Gélose trypticase soja,

Incubation à 36±1°C en atmosphère aérobie

P. acnes

Gélose Columbia + 5% de sang de mouton stérile

Incubation à 37°C ± 2°C en atmosphère anaérobie

C. albicans

Gélose Sabouraud

Incubation à 22,5±2,5°C en atmosphère aérobie

Essai (CMI/CMB/CMF)

S. aureus, E. coli, S. epidermidis

Bouillon et gélose Muller Hinton

Incubation à 37°C ± 2°C en atmosphère aérobie

P. acnes

Bouillon Muller Hinton + 10% de serum de veau fœtal et gélose Columbia + 5% de sang de mouton stérile

Incubation à 37°C ± 2°C en atmosphère anaérobie

C. albicans

Bouillon et gélose Sabouraud

Incubation à 30±1°C en atmosphère aérobie.

2.3.3 Méthode de détermination de l'activité antimicrobienne

CMI (Concentration minimale inhibitrice)

Les souches sont entretenues sur milieu gélosé, selon les indications décrites ci-dessus. Une suspension est préparée extemporanément dans du Tryptone sel et ajustée à 10^8 bactéries/ml et 10^7 spore fongiques/ml. En parallèle, 100 μ l de milieu liquide sont déposés dans chaque puits d'une microplaque stériles à 96 puits. 100 μ l de solution mère sont déposés dans le premier puits de deux lignes de la microplaque et des dilutions de raison 2 sont réalisées des colonnes 1 à 10 incluse. L'ensemble de la microplaque est ensemencé par repiquage de 1 à 3 μ l de suspension dans chaque puits de la microplaque à l'exception de la colonne 11 (Témoin de stérilité). Les microplaques sont incubées dans les conditions définies. La CMI d'un produit est définie visuellement comme la plus petite concentration avec absence de croissance.

CMB (Concentration minimale bactéricide) ou CMF (Concentration minimale fongicide)

Après lecture des CMI, l'ensemble de la microplaque est repiqué à l'aide d'un ensemencneur multipoint Denley sur milieu gélosé correspondant à la souche-test. Les boîtes sont incubées dans les conditions définies. La CMB ou (CMF) d'un produit est définie visuellement comme la plus petite concentration avec absence de croissance.

L'ensemble des essais est réalisé en duplicate. Un essai est considéré valide lorsque l'activité est détectée pour la même concentration de produit ou à une dilution d'écart.

2.4 Formulation des vésicules catanioniques

La formation des vésicules catanioniques s'appuie sur une réaction acido-basique entre le N-dodécyl-diéthanolamine, sous forme de chlorhydrate, l'acide azélaïque et l'acide décanoïque, dans l'eau. L'échantillon est soumis à une agitation magnétique pendant 12 heures à température ambiante. La figure ci-dessous rappelle la réaction chimique mis en jeu au cours de la préparation des vésicules.

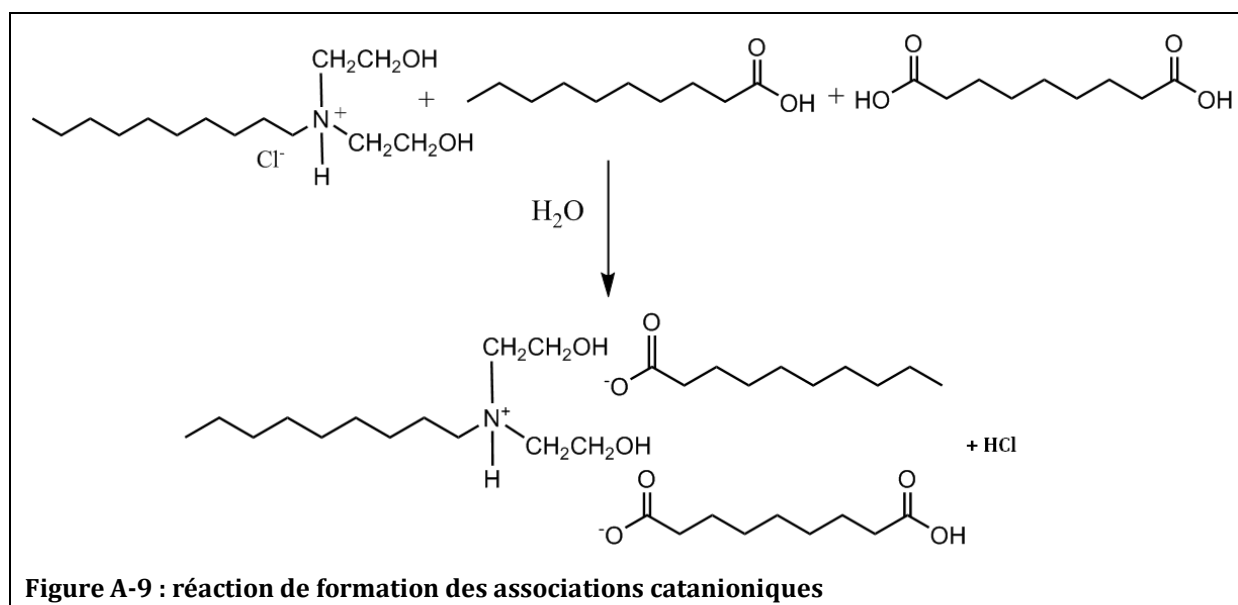


Figure A-9 : réaction de formation des associations catanioniques

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. MELISSOPOULOS, A. and C. LEVACHER, *La peau : Structure et physiologie*. ed. 1998, Paris: Tec&Doc.
2. MARIEB, E.N., *Anatomie et physiologie humaine*. 1999, Paris: Bruxelles : DeBoeck Université.
3. FALSON-RIEG, F., V. FAIVRE, and F. PIROT, *Nouvelles formes médicamenteuses*. 2004, Paris: Tec&Doc, éditions médicales internationales.
4. MARTINI, M.C., *Introduction à la dermatopharmacie et à la cosmétologie*. 2003, Paris: Editions médicales internationales.
5. ROBERT, P., *Dermopharmacologie clinique*. Sainte-Hyacinthe : Ediserm, 1985: p. 313.
6. FREINKEL, R.K. and D.T. WOODLEY, *The biology of skin*. 2001, New York: The partenon publishing group.
7. GARSON, J.C. and J. DOUCET, *Oriented structure in human stratum corneum revealed by X-Ray diffraction*. Journal of Investigative Dermatology, 1991. **96**: p. 43-49.
8. WILLIAMS, A., *Theoretical aspects of transdermal drug delivery*, in *Transdermal and topical drug delivery from theory to clinical practice*. 2003, Pharmaceutical press. p. 28-39.
9. AGACHE, P. and al, *Physiologie de la peau et explorations fonctionnelles cutanées*. 2000: Cachan éditions médicales internationales.
10. ORTONNE, J.P., *Biologie du système mélanocytaire de la peau*, in *Encyclopédie Médico Chirurgicale Dermatologie*. 1984. p. 11.
11. DONIDA BARTOLI , L. and al, *Physiopathologie of melasma*. Anais Brasileiros de Dermatologia, 2009. **84**(6): p. 186-1997.
12. PRUNIERAS, M., *Précis de cosmétologie et dermatologie*. 1981, Paris: Masson.
13. POIRIER, J., et al., *Histologie moléculaire, textes et atlas*. 1999, Paris: Masson.
14. BERLOLOTTO, C. and J.Y. BALOTTI, *Mélanocytes et pigmentation cutanée*, in *Biologie et pathologie des épithéliums*. 2000, EDK édition médicales scientifiques: Paris. p. 139-146.
15. BALLOTI, R., *La pigmentation mélanique cutanée : régulation et signalisation*. Vol. 7,6. 1998: Bdec.
16. BERLOLOTTO, C., *L'AMPC est un régulateur de la pigmentation de la peau*. International Journal of Medical Sciences, 2001. **17**: p. 85-177.
17. CARSBURG, C.J. and al, *Ultraviolet radiation-induced melanogenesis in human melanocytes. Effects of modulating protein kinase C*. Journal of Cell Science, 1994. **107**: p. 2591-2597.
18. BALLOTI, R. and J.P. ORTONNE, *Contrôle de la mélanogenèse : les mécanismes moléculaires de mieux en mieux connus*. Cosmétologie, 1997. **16**: p. 32-35.
19. SCHAEFER, T. and E. REDELMEIER, *Skin barrier : principes of percutaneous absorption*. 1996, Bâles: Karger.
20. SHAEFER, U.F. and al, *Models for skin absorption and skin toxicity*, in *Drug absorption studies*. 2008, Springer: New York.
21. PONEC, M. and A. WEERHEIM, *New acylceramide in native and reconstructed epidermidis*. Journal of investigative Dermatology, 2003. **120**: p. 581- 588.
22. HADGRAFT, J., *Skin, the final frontier*. International Journal of Pharmaceutics, 2001. **224**: p. 1-18.
23. GAUTHIER, Y., *Troubles pigmentaires cutanés : de la clinique au traitement*, ed. MED'COM. 2005, Paris: Collection Guide Pratique de Dermatologie.

24. CRIBIER , B., "Vous avez dit lentigo?". *Annales de Dermatologie et Vénérologie*, 2003. **130**: p. 597-600.
25. LACOUR, J.P., *Taches cafés au lait*. *Annales de dermatologie et de vénéréologie* 1999. **126**(10): p. 749-754.
26. LIPSKER, D. and E. GROSSHANS, *Hyperpigmentations*, in *Encyclopédie Médico Chirurgicale, Dermatologie*, Elsevier, Editor. 1999: PARIS. p. 15.
27. CHEVALLIER, J., *Naevus de Ota*. *Les Nouvelles dermatologies*, 1996. **15**(6): p. 473.
28. SAURAT, J.H., et al., *Dermatologie et vénéréologie*. 1981, Paris: Masson.
29. ORTONNE , J.P., *Anomalies de la pigmentation cutanée*, in *Traité de médecine*, M.S. Flammarion, Editor. 1996: Paris. p. 731-737.
30. DANIEL, F., et al., *Dictionnaire de dermatologie*. 1992, Paris: Masson.
31. PADONOU, F., R. DARBOUX, and H. YEDOMON *Pathologie courante en Dermatologie Vénérologie au bénin*. <http://www.apprentoile.u-bordeaux2.fr/wderm/toxiderm.htm>.
32. HASSAN, I., et al., *Hormonal milieu in the maintenance of melasma in fertile women*. *The Journal of Dermatology*, 1998. **25**(8): p. 510-512.
33. ORTONNE , J.P. and E. GROSSHANS, *Les troubles de la pigmentation cutanée*, in *Dermatologie et maladies sexuellement transmissibles* Masson, Editor. 1999: Paris. p. 407-426.
34. LACOUR , J.P., *Le mélasma : physiopathologie et traitement*. *Réalités thérapeutiques en Dermatologie et Vénérologie*, 1996. **62**: p. 7-17.
35. ORTONNE, J.P. and R. BALLOTI, *Mélanogenèse*, in *Encycl Méd Chir, Cosmétologie et Dermatologie Esthétique*. 2001: Paris. p. 6.
36. DEREURE, O. and B. DEGAVRE, *Hypopigmentations, hyperpigmentations*. *Objectif peau*, 1995. **Volume I-IV**.
37. BOLOGNIA, J. and I.M. BRAVERMAN, *Manifestations cutanées des maladies générales*. 1995, Paris: Arnette Blackwell.
38. BEANI, J.C. and P. AMBLARD, *Peau et soleil*, in *Dermatologie et maladies sexuellement transmissibles*, Masson, Editor. 1999: Paris. p. 363-374.
39. MANCIER, J.R., *photodermatose*, in *Encyclopédie Medico Chirurgicale*, Elsevier, Editor. 1998: Paris. p. 7.
40. CASTANET , J. and J.P. ORTONNE *Lésions pigmentées*, in *Encyclopédie Médico Chirurgicale*, A.E. Pratique, Editor. 1998, Elsevier: Paris.
41. TOURANIER, R. and J. REVUZ, *Dermatologie clinique et vénéréologie*, ed. Masson. 1981, Paris.
42. BATCHILY-PLAT, F., *Dépigmentants*, in *Actifs et additifs en cosmétologie*, LavoisierTech&Doc, Editor. 2006: Paris. p. 697-724.
43. (MARTINI, M.C., *Dépigmentation et dépigmentants*, in *BTS-esthétique cosmétique*, E. Masson, Editor. 2003.
44. BALOTTI, R., *Les dépigmentants sont à manier avec précaution*. *Cosmétologie*, 2000. **25**: p. 31-34.
45. GRIMES, P.E., *Melasma : etiologic and therapeutic considerations*. *Archives of Dermatology*, 1995. **131**(12): p. 1453-1457.
46. PICARD, C., *Des préparations dépigmentantes : avantages et inconvénients*. *La gazette médicale*, 1990. **97**(8): p. 51-54.
47. SCHATZ-GOUGEROT, A., *Les dépigmentants*. *Revue Européenne de Dermatologie et de MST*, 1992. **4**: p. 341-346.
48. THIOLY BENSOUSSAN, D., *Les actifs à visée dépigmentante*. *Skinbody*, 1996. **3**(6-1): p. 12-13.
49. GORLIER, C. and J.P. ORTONNE, *Produits dépigmentants*, in *Cosmétologie et dermatologie esthétique* E.M. Chirurgicale, Editor. 2001.
50. BALINA, L.M. and K. GRAUPE, *The treatment of melasma : 20% azelaic acid versus 4% hydroquinone cream*. *International Journal of Dermatology*, 1991. **30**(12): p. 893-895.

51. CHAMOCK, C., B. BJAME, and K. KLAVENESS, *Evaluation of the antibacterial efficacy of diester of azelaic acid*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2004. **21**: p. 589-596.
52. BOBIER-RIVAL, C. and N. SELCAN TOKGOZ, *Les vitamines, in Actifs et additifs en cosmétologie*, L. Tech&Doc, Editor. 1999: Paris. p. 353-384.
53. COIFFARD, C. and L. COIFFARD, *Dépigmentants : ces molécules qui blanchissent la peau, in Porphyre*. 1998. p. 16-18.
54. FOUKS, N., *Le point sur les dépigmentants*. Les nouvelles esthétiques, 1997. **481**: p. 56-59.
55. CHAVIGNY, C., *Dépigmentants-Whitening*. Parfums et cosmétiques actualités, 2004. **175**: p. 41.
56. KATAGIRI, T. and al, *Novel melanogenic enzymes inhibitor for controlling hyperpigmentation*. 20 th IFSCC, 1998. **39**(1): p. 1-11.
57. CHAVIGNY, C., *Dépigmentants : de nouvelles voies en perspectives*. Parfums et cosmétiques actualités, 2000. **155**: p. 44-53.
58. Trioxopimélate-d'éthyle-(TPE^R), *French patent 98 403 097 3*. Ales groupe. **5 962 529**.
59. PRIBILSKY, C. and M. Seiller, *Hyperpigmentations cutanées et dépigmentants utilisés en cosmétologie*. Cosmétologie, 1995. **3**: p. 52-54.
60. PALUMBO, A., M. D'ICHIA, and G. MISURACA, *Mechanism of inhibition of melanogenesis by hydroquinone*. Biochimica et Biophysica Acta, 1991. **1073**(1): p. 85-92.
61. GUERSON, M., *Les crèmes éclaircissantes*. La revue prescrire, 1989. **9**(89): p. 393-394.
62. KRISHER, J. and J. SAURAT, *Dermatoses de la grossesse, in Dermatologie et maladies sexuellement transmissibles*, Masson, Editor. 1999: Paris. p. 838-842.
63. THOMAS, P., *Dépigmentants, in Thérapeutique dermatologie*, M.S. Flammarion, Editor. 1991: Paris. p. 753-756.
64. GROSSHANS, E., J.F. FARQUE, and C. WASSER, *Les substances dépigmentantes naturelles*. Médecine et hygiène, 1989. **47**: p. 688-693.
65. laboratoires, M.M., *Fiche produit LIGHTENING PEEL*.
66. ANDO, H. and al, *Linoleic acid and alpha-linolenic acid lightens ultraviolet-induced hyperpigmentation of the skin*. Archives of Dermatological Research, 1998. **290**: p. 375-381.
67. ANDO, H. and al, *Fatty acid regulate pigmentation via proteasomal degradation of tyrosinase-A new aspect of ubiquitin-proteasome function*. The journal of biological chemistry, 2004. **279**: p. 15427-15433.
68. BRONAUGH, R.L. and H.I. MAIBACH, *Percutaneous Absorption : Drugs-Cosmetics-Mechanisms-Methodology*. 2005: Informa Healthcare.
69. ROBERTS, M.S., S.E. CROSS, and M.A. PELLETT, *Skin transport, in Dermatological and Transdermal Formulations*. 2002, Marcel Dekker Inc: New York. p. 89-195.
70. NAIK, A., Y.K. KALIA, and R.H. GUY, *Transdermal drug delivery : overcoming the skin's barrier function*. Pharmaceutical Science and Technology Today, 2000. **3,9**.
71. BOUWSTRA, J., et al., *New aspects of the skin barrier organization*. Skin Pharmacology and Skin applied Physiology, 2001. **14 (Suppl 1)**: p. 52 - 62.
72. JAMOULLE, J.C., *La pénétration cutanée*. Annales de dermatologie et de vénéréologie, 1988. **115**: p. 627-640.
73. HADGRAFT, J. and C. VALENTA, *pH, pK(a) and dermal delivery*. International Journal of Pharmaceutics, 2000. **200**: p. 243-247.
74. ZHANG, J. and al, *Penetration enhancement by skin hydration, in Percutaneous penetration enhancer* E.W. Smith and H.I. MAIBACH, Editors. 2006, Taylor & Francis Group: Boca Raton.
75. BARRY, B.W., *Penetration enhancer classification, in Percutaneous penetration enhancer*. 2006, CRC press Taylor&Francis group: Boca Raton.
76. WILLIAMS, A.C. and B.W. BARRY, *Chemical permeation enhancement in Enhancement in Drug Delivery*, T. ELKA and B. BRIAN, Editors. 2007: Boca Raton. p. 233-252.

77. BABU, R.J., *Fatty alcohols and fatty acids in Penetration enhancers*. 2006, Taylor & Francis group company Boca Raton p. 137-154.
78. GOLDEN, G.M., J.E. MCKIE, and R. POTTS, *Role of the stratum corneum lipid fluidity in transdermal drug flux*. International Journal of Pharmaceutics, 1987. **76**: p. 25-28.
79. HOMBACH, J. and A. BERNKOP-SCHNÜRCH, *Chitosan solutions and particules : evaluation of their permeation enhancing potential on MDCK cells used as blood carrier model*. International Journal of Pharmaceutics, 2009: p. 104-109.
80. HE, W. and al, *Study on mechanisms of chitosan and its derivatives used as transdermal penetration enhancers*. International Journal of Pharmaceutics, 2009: p. 234-243.
81. VINCENT, M., *Vectorisation, clé de l'efficacité des actifs*. Parfums et cosmétiques actualités, 2009. **208**: p. 115-126.
82. SOUSSAN, E., et al., *Drug delivery by soft matter : matrix and vesicular carriers*. Angewandte Chemie International, 2009. **48(2)**: p. 274-288.
83. WHERLE, P., *Pharmacie galénique : formulation et technologie pharmaceutique*. 2007, Paris: Maloine.
84. BANGHAN, A., M. STANDISH, and J. WATKINS, *Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids*. Journal of Molecular Biology, 1965. **13**: p. 238-252.
85. DEAMER, D. and A. BANGHAM, *Large volume liposomes by an ether vaporization method*. Biochimica and Biophysica Acta 1976. **443**: p. 629-634.
86. SZOKA, F., et al., *Preparation of unilamellar liposomes of intermediate size (0,1-0,2 µm) by a combination of reverse phase evaporation and extrusion through polycarbonate membranes*. Biochimica and Biophysica Acta, 1980: p. 1-18.
87. LAFFORGUE, C., *Les nouveaux modes galéniques de pénétration cutanée*, in *Progrès en dermato-allergologie : Montpellier 2011*, J.L. Eurotext, Editor. 2011, Gerda: Montpellier.
88. TOUITOU, E. and B. GODIN, *Vesicular carriers for enhanced delivery through the skin*, in *Enhancement in drug delivery*, T. ELKA and B. BRIAN, Editors. 2007, Taylor & Francis group: Boca Raton.
89. VIVARES, D., et al., *Sugar derived tricatener catanionic surfactant : self assembly and aggregation behavior in the cationic rich side of the system*. Langmuir, 2008. **24**: p. 9260-9267.
90. SOUSSAN, E., et al., *Sugar-derived tricatener catanionic surfactant : synthesis, self-assembly properties and hydrophilic probe encapsulation by vesicles*. Langmuir, 2008. **24(6)**: p. 2226-2230.
91. VLACHY, N., et al., *Anion specificity influencing in catanionic surfactant mixtures with an excess of catanionic surfactant*. Comptes rendus de chimie, 2009. **12(1-2)**: p. 30-37.
92. TONDRE, C. and C. CAILLET, *Properties of the amphiphilic films in mixed catanionic/anionic vesicles : a comprehensive view from a literature analysis*. Advances in Colloid and Interface Science, 2001. **93(1-3)**: p. 115-134.
93. KHAN, A. and E. MARQUES, *Specialist surfactants*, ed. Chapman&Hall. 1997, London, UK.
94. DUBOIS, M., et al., *Self-assembly of regular hollow icosahedra in salt-free catanionic solutions*. Nature, 2001. **411**: p. 6726-675.
95. ZEMB, T.H., et al., *Self-assembly of flat nanodiscs in salt-free cationic surfactant solutions*. Science, 1999. **283**: p. 816-819.
96. BLANZAT, M., et al., *Synthesis and anti-HIV activity of catanionic analogs of galactosylceramide*. New Journal of Chemistry, 1999. **23(11)**: p. 1063-1065.
97. BLANZAT, M., et al., *New catanionic glycolipids.1.Synthesis, characterization and biological activity of double-chain and gemini catanionic analogs of galactosylceramide* Langmuir, 1999. **15**: p. 6163-6169.

98. CONSOLA, S., et al., *Design of original bioactive formulations based on sugar-surfactant/non-steroidal anti-inflammatory catanionic self assemblies: a new way of dermal drug delivery*. Chemistry-A-European Journal, 2007. **13**(11): p. 3039-3047.
99. CONSOLA, S., et al., *Intermolecular association complex of a carrier preferably an N-alkylamino-1-desoxylactitol and of an active ingredient in Société Pierre Fabre dermocosmétique/CNRS/UPS*. 2005, Brevet français n°0507856: France.
100. RICO-LATTES, I., et al., *Catanionic sugar derived surfactants, polymers and dendrimers : from molecules to targeted self-organized systems*. Comptes rendus de chimie, 2005. **8**: p. 807-814.
101. BLANZAT, M., et al., *Correlation between structure, aggregation behavior and cellular toxicity of anti-HIV catanionic analogues of galactosylceramide*. Chemical Communications, 2003. **2**: p. 244-245.
102. SOUSSAN, E., et al., *Physical study of the arrangement of pure catanionic glycolipids and interaction with phospholipids in support of the optimization of anti-HIV therapies*. Colloids and Surfaces, 2007. **303**: p. 55-72.
103. CAMUZAT, C. and al, *Les sphérulites, la vectorisation flexible*. Parfums et cosmétiques actualités, 2008. **199**: p. 81-83.
104. BENITA, S., *Microencapsulation : methods and industrial applications*. 2003: CRC Press.
105. HANS, M.L. and A.M. LOWMAN, *Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting*. Current opinion in solid state and material science, 2002. **6**: p. 319-327.
106. PATRAVALE, V.B. and S.D. MANDAWGADE, *Novel cosmetic delivery system : an application update*. International of Cosmetic Science, 2008. **30**: p. 19-33.
107. RINAUDO.M, *Chitin and Chitosan: Properties and applications*. Progress in Polymer Science, 2006. **31**: p. 603-632.
108. NWE, N. and W.F. STEVENS, *chitosane by solid substrate fermentation followed by enzymatic extraction*. . Biotechnoly Letter, 2002. **24**: p. 131-134.
109. JACQUOT, C., *Chitosane*, in *Actifs et additifs en cosmétologie*, M.C. Martini and M. Seiller, Editors. 2006, Lavoisier Tec&Doc: Paris. p. 315-333.
110. ABUZAYTOUN.RSHAHIDI.F, *Chitin, Chitosan, and co-products:Chemistry, Production, Applications, And Health Effects in Advances in Food and Nutrition Research*, Elsevier, Editor. 2005: St.John's. p. 94.
111. SANDFORD.P.A, *Commercial sources of chitin and chitosan and their utilization*, in *Advances in chitin sciences*, K. VARUM, A. DOMARD, and O. SMIDROD, Editors. 2003: Trondheim.
112. CRINI, G., P.M. BADOT, and G. GUIBAL, *Chitine et Chitosan, du biopolymère à l'application*. 2009: Presses universitaire de Franche Comté.
113. BOUGH, V.A. and W.L. SALTER, *Influence of manufacturing variables on the characteristics and effectiveness of chitosan products.I.Chemical composition, viscosity, and molecular-weight distribution of chitosan product*. Biotechnology and Bioengineering, 1978. **20**: p. 1931-1943.
114. HUDSON, S. and J. DW, *Chitin and Chitosan*, Wiley, Editor. 2003: New York.
115. VARUM, K. and O. SMIDROD, *Structure-properties relationship in chitosans*, in *Polysaccharides. Structural diversity and functional versatility*, M.D. 2nd, Editor. 2005, Dumitriu, S: New York. p. 625.
116. RINAUDO, M. and A. DOMARD, *Solution properties of chitosan*, in *Chitin and chitosan. Sources, chemistry, biochemistry, physical properties and applications*, Elsevier, Editor. 1989.
117. BERTH, G. and H. DAUTZENBERG, *The degree of acetylation of chitosan and its effect on the chain conformation in aqueous solution*. Carbohydrate Polymers, 2002. **47**(1): p. 39-51.
118. AIBA, S.I., *1.Determination of the degree of N-acetylation of chitosan by ultraviolet spectrophotometry and gel permeation chromatography*. International Journal of Biological Macromolecules, 1986. **8**: p. 173-176.

119. ANTHONSEN, M.W., K.M. VARUM, and O. SMIDSRØD, *Solution properties of chitosans : conformation and chain stiffness of chitosans with different degrees of N-acetylation*. Carbohydrate Polymers, 1993. **22**(3): p. 193-201.
120. AUSTIN, P., *Chitin solvents and solubility parameters*, in *Chitin and chitosan and related enzymes*. 1984, Orlando Academic Press.
121. DOMARD, A. and M. RINAUDO, *Preparation and characterization of fully deacetylated chitosan*. International Journal of Macromolecules, 1983. **5**: p. 49-51.
122. DOMARD, A., *Determination of N-acetyl-content in chitosan samples by C.d measurements*. International Journal of Biological Macromolecules, 1987. **9**: p. 333-336.
123. NO, H. and S. MEYERS, *Preparation of chitin and chitosan*, in *Chitin handbook*, A. Edizioni, Editor. 1997: London and New York.
124. MUZZARELLI.R;MUZZARELLI.C, *Chitosan chemistry: relevance to the biomedical sciences*. Advances in polymer Sciences, 2005. **186**: p. 151-209.
125. ROBERTS;G.A.F, *Chitin chemistry*, in *Macmillian Press*. 1992: Houndmills, UK.
126. GUIBAL, E. and T. VINCENT, *Adsorption d'ions métalliques sur chitosan et produits dérivés*, in *Traitement des épurations des eaux industrielles polluées*, P.U. Franche-Comté, Editor. 2007.
127. RAUCH, F. and M. DORNISH, *Chitosan*, in *An introduction to biomaterials*. 2006, CRC press.
128. BADE, M., *Structure and isolation of native animal chitins*, in *Applications of chitin and chitosan*, Lancaster, Editor. 1997, Technomic Publishing.
129. BALDRICK, P., *The safety of chitosan as a pharmaceutical excipient*. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2009. **56**(3): p. 290-299.
130. KEAN, T. and M. THANOU, *Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2010. **62**: p. 3-11.
131. NAM, K.S. and al, *Evaluation of the antimutagenic potential of chitosan oligosaccharide:Rec, Ames and Umu tests*. Biotechnology Letters, 2001. **23**(12): p. 971-975.
132. QUIN, C. and al, *Safety evaluation of short-term exposure to chito oligomers from enzymic preparation*. Food and Chemical Toxicology, 2006. **44**(6): p. 855-861.
133. RICHARDSON, S.C. and al, *Potential of low molecular mass chitosan as a DNA delivery system:biocompatibility,body distribution and ability to complex and protect DNA*. International Journal of Pharmaceutics, 1999. **178**: p. 231-243.
134. SGOURAS, D., *The evaluation of biocompatibility of soluble polymers and assessment of their potential as specific drug delivery systems*, in *Pharmacy*. 1990, University of Keele: Keele.
135. CARRENO-GOMEZ, R. and al, *Evaluation of the biological properties of soluble chitosan and chitosan microspheres*. International Journal of Pharmaceutics, 1997. **148**: p. 231-240.
136. CHAE, S.Y. and al, *Influence of the molecular weight on oral absorption of water soluble chitosans*. Journal of Controlled Release, 2005. **102**(2): p. 383-394.
137. OPANASOPIT, P., *Effect of salt forms and molecular weight of chitosans on in vitro permeability enhancement in intestinal cells (Caco-2)*. Pharmaceutical Development and Technology, 2007. **12**(5): p. 447-455.
138. GADES, M.D. and J.S. STERN, *Chitosan supplementation and fecal fat excretion in men*. Obesity Research, 2003. **11**(5): p. 683-688.
139. TAPOLA, N.S. and al, *Safety aspects and cholesterol-lowering efficacy of chitosan tablets*. Journal of the American College of Nutrition, 2008. **27**(1): p. 22-30.
140. YLITALO, R. and al, *Cholesterol-lowering properties and safety of chitosan*. Arzneimittelforschung, 2002. **52**(1): p. 1-7.
141. HARISH PRASHANTH, K.V. and R.N. THARANATHAN, *Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential-an overview*. Food science & Technology, 2007. **18**: p. 117-131.

142. THANOU, M. and H.E. JUNGINGER, *Pharmaceutical Applications of Chitosan and Derivatives*, in *Polysaccharides, structural diversity and functional versatility*, S. DUMITRIU, Editor. 2005, Marcel Dekker: New York. p. 661-677.
143. KUMBAR, S.G., S. KUMARESH, and M. TEJRAJ, *Synthesis and characterization of polyacrylamide-grafted chitosan hydrogel microspheres for the controlled release of indomethacin*. *Journal of Applied Polymer Science*, 2003. **87**(9): p. 1525-1536.
144. YOSHIOKA, H., et al., *Chitosan-derived polymer-surfactant and their micellar properties*. *Bioscience, biotechnologie and biochemistry*, 1995. **59**(10): p. 1901-1904.
145. MIWA, A., et al., *Development of novel chitosan derivatives as micellar carriers of taxol*. *Pharmaceutical Research*, 1998. **15**(12): p. 1844-1850.
146. KIM, H.Y., et al., *Structural characteristics of size-controlled self aggregates of deoxycholic acid-modified chitosan and their application as DNA delivery carrier*. *bioconjugate chemistry*, 2001. **12**(6): p. 932-938.
147. JAYAKUMAR, R., R.L. REIS, and J.F. MANO, *Synthesis and characterization of ph-sensitive thiol containing chitosan beads for controlled drug delivery applications*. *Drug delivery*, 2007. **14**(1): p. 9-17.
148. PRABAHARAN, M. and J.F. MANO, *Stimuli-responsive hydrogels based on polysaccharides incorporated with thermo-responsive polymers as novel biomaterials*. *Macromolecular Bioscience*, 2006. **6**(12): p. 991-1008.
149. BAHATTARAI, N., et al., *PEG-grafted chitosan as an injectable thermosensitive hydrogel for sustained protein release*. *Journal of Controlled Released*, 2005. **103**: p. 609-624.
150. RHAZY, M. and al, *Contribution to the study of the complexation of copper by chitosan and oligomers*. *Polymer*, 2002. **43**: p. 1267-1276.
151. PENICHE-COVAS, C. and al, *The adsorption of mercuric ions by chitosane*. *Journal of applied polymer science*, 1992. **46**: p. 1147-1150.
152. MITANI, T., *Effect of counter ions (SO_4^{2-} and Cl^-) on the adsorption of copper and nickel ions by swollen chitosan beads*. *Agricultural biological chemistry*, 1991. **55**(9): p. 2419.
153. CARUNCHIO, V., *Chitosan-coated silica gel as a new support in high performance liquid chromatography* *Chromatographia*, 1987. **23**: p. 731-735.
154. JINNO, K. and TAKAYARNA, *Separation of saccharides on cross linked chitosan beads with microcolumn liquid chromatography*. *Journal of microcolumn separations*, 1989. **1**: p. 195-199.
155. SEU - SALERNO, M., *Pigments traités*, in *Actifs et additifs en cosmétologie*. 2006, Tec & Doc: Paris.
156. VASILIU, S., *Polyelectrolyte capsules made of two biocompatible natural polymers* *European Polymer Journal*, 2005. **41**: p. 923-932.
157. PENICHE, C. and al, *Chitosan based polyelectrolyte complexes*. *Macromolecular Symposia*, 2001. **168**: p. 103-116.
158. GOYCOOLEA, F. and al, *Chitin and chitosan. Novel macromolecules in food systems*, in *G. DOXASTAKIS and V. KIOSSEOGLU*. 2000, Ed. *Developments in food science* Elsevier Amsterdam. p. 265-308.
159. ARGUELLES-MONAL, W. and al, *Conductimetric study of the interpolyelectrolyte reaction between chitosan and polygalacturonic acid* *Polymer*, 2000. **41**: p. 2373-2378.
160. FWU-LONG MI, H., *Drug release from ChitosanAlginate complex beads reinforced by a naturally occurring crossing-linking agent*. *Carbohydrate Polymers* 2002. **48**: p. 61-72.
161. HUGUET, M.L. and al, *Hemoglobin encapsulation in chitosan/calcium alginate beads*. *Journal of Applied Polymer Science*, 1994. **51**: p. 1427-1432.
162. HARI, P.R., *Chitosan/calcium-alginate beads for oral delivery of insulin*. *Journal of Applied Polymer Science*, 1996. **59**: p. 1795-1801.

163. LIU W and K. YAO, *Chitosan and its derivatives-a promising non-viral vector for gene transfection*. Journal of Controlled Released, 2002. **83**(1): p. 1-11.
164. KATAS, H. and H. OYA ALPAR, *Development and characterisation of chitosan nanoparticles for siRNA delivery*. Journal of Controlled Released, 2006. **115**: p. 216-225.
165. MAO, S., W. SUN, and T. KISSEL, *Chitosan-based formulations for the delivery of DNA and siRNA*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2010. **62**(1): p. 12-27.
166. STRUSZCZYK, M.H., *Chitin and chitosan : Part II : Applications of chitosan*. Polimery, 2002. **47**(6): p. 396-403.
167. RAVI KUMAR, M.N.V., *A review of chitin and chitosan applications*. Reactive & Functional Polymers, 2000. **46**: p. 1-27.
168. GOMAA, Y.A., et al., *Chitosan microparticles incorporating a hydrophilic sunscreen agent*. Carbohydrate Polymers, 2010. **81**: p. 234-242.
169. YENILMEZ, E., E. BASARAN, and Y. YAZAN, *Release characteristics of vitamin E incorporated chitosan microspheres and in vitro - in vivo evaluation for topical application*. Carbohydrate Polymers, 2011. **84**: p. 807-811.
170. LESTEL, L., *Itinéraires de chimistes*. EDP sciences. 2007: Société Française de Chimie.
171. CONSOLA, S., et al., *Design of original bioactive formulations based on sugar-surfactant/Non steroidal anti-inflammatory cationic self assemblies : a new way of derma drug delivery*. European Journal of Chemistry, 2007. **51**(11): p. 3039-3047.
172. RICO-LATTES, I., et al., *Cationic sugar amphiphiles : from molecules to targeted biomimetic systems*. Biophysical Reviews and letter, 2006. **1**(423).
173. RINAUDO, M., G. PAVLOV, and J. DESBRIERE, *Influence of acetic acid concentration on the solubilization of chitosan*. Polymer Journal, 1999. **40**: p. 7029-7032.
174. PA, J. and T. YU, *Light scattering study of chitosan in acetic acid aqueous solutions*. Macromolecular Chemistry and Physics, 2001 **202**(7): p. 985-991.
175. GUIBAL, E. and T. VINCENT, *Adsorption d'ions métalliques sur chitosan et produits dérivés*, in *Traitement des épurations des eaux industrielles polluées*, P.u. Franche-Comté, Editor. 2007, CRINI, G BADOT, M. p. 137.
176. BABU, R.J. and al, *Fatty alcohols and fatty acids*, in *Penetration enhancers*. 2006, Taylor & Francis group company: Boca Raton. p. 137-154.
177. ASGATAY, S. and al, *Polynorbornene polycationic polymers as gene transfer agents Influence of the counterion for in vitro transfection*. International Journal of Pharmaceutics, 2004. **285**: p. 121-133
178. FRANCESCHI, S. and al, *Highly Compacted DNA-Polymer Complexes Obtained via New Polynorbornene Polycationic Latexes with Lactobionate Counterion*. Langmuir, 2002. **18**: p. 1743-1747.
179. NOEL, T. and al, *High Compacted DNA-Polymer Complexes via New Polynorbornene Polycationic Latexes with Acetate Counterion*. Langmuir, 2000. **16**: p. 8980-8983.
180. JOHNSON, C.S., *Diffusion ordered nuclear magnetic resonance spectroscopy : principles and applications*. Progress in Nuclear Resonance Spectroscopy, 1999. **34**: p. 288-298.
181. HOLZGRABE, U. and I. WAWER, *NMR Spectroscopy in pharmaceutical analysis*. 2008, Oxford: Elsevier.
182. PRICE, W.C., *NMR studies of translational motion*. 2009, Cambridge: Cambridge university press.
183. SCHARFF, T.G. and W. MAUPIN, *Correlation of the metabolic effects of benzalkonium chloride with its membrane effect in yeast*. Biochemical Pharmacology, 1960. **5**: p. 79-86.

184. NAGAKI, K., et al., *Biochemical characterization of Pseudomonas Fluorescens stain isolated from a benzalkonium chloride solution*. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 1996. **12**(873-875).
185. NAKATA, K., et al., *All genomic mutations in the antimicrobial surfactant resistant mutant, Escherichia coli OW66*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010. **87**(1895-1905).
186. CHOU, H.T., et al., *Interaction of cationic peptides with phospholipid vesicles and their antibacterial activity*. Peptides, 2010. **31**: p. 1811-1820.
187. CAMPANHA, M.T.N., E.M. MAMIZUKA, and A.M. CARMONA-RIBEIRO, *Interactions between cationic liposomes and bacteria : the physical chemistry of the bacterial action*. Journal of Lipid Research, 1999. **40**: p. 1495-1500.
188. SYLVAIN, L.S.K., L. VANNINI, and M.E. GUERZONI, *Effect of alpha-linolenic, capric and lauric acid on the fatty acid biosynthesis in Staphylococcus aureus*. International Journal of Food Microbiology, 2009. **129**: p. 288-294.
189. HUANG, C.B., et al., *Short and medium chain fatty acids exhibit antimicrobial activity for oral microorganisms*. Archives of Oral Biology, 2011. **56**: p. 650-654.
190. KABARA, J.J., et al., *Fatty acids and derivatives as antimicrobial agents*. Antimicrob Agents Chemother, 1972. **2**: p. 23-28.
191. LECKBAND, D. and J. ISRAELACHVILI, *Intermolecular forces in biology*. Quaterly Reviews of Biophysics, 2001. **34**: p. 105-267.
192. ISRAELACHVILI, J. and H. WENNERSTROM, *Role of hydration and water structure in biological and colloidal interactions*. Nature, 1996. **379**: p. 219-225.

AUTHOR: Clara CHAOUAT

TITRE: Design of new systems depigmenting agents, for dermal use.

Ph.D SUPERVISOR: Isabelle RICO-LATTES

PLACE AND DATE OF DEFENSE: Université Toulouse III, the 22 th February 2013

SPECIALITE: Chemistry – Biology - Health

ABSTRACT:

The encapsulation of active molecules is central to the toolbox of the formulator of the third millennium. The use of this technique is increasingly used because it has many advantages; controlled release of active molecules in their environment, decrease the toxicity of assets or carry the active ingredient to the target.

The skin which is a physiological barrier function is to protect biological and physiological preventing the penetration of pathogens and xenobiotics. The industry does not develop new active molecules specifically designed to topically; the major challenge of this mode of administration is to find techniques to counter the disadvantages of this route of administration.

This work done in collaboration with Pierre Fabre Laboratories consists in developing new systems depigmenting agents, to use topically. To do this we wanted to operate numerous properties of chitosan, polysaccharide biocompatible, biodegradable, to place this work in a sustainable development approach. It is then, in this work, to develop systems combining active depigmenting skin penetration enhancer, salt encapsulated chitosan to form complexes with depigmenting properties. Complexes formed, may through penetration enhancer facilitate the passage of the active molecule through the different layers of the epidermis, to facilitate the delivery of the asset to its site of action, the melanocyte.

These original systems are then used to develop new bioactive formulations that can be used in therapy hyperpigmentation.

KEYWORDS: encapsulation of active ingredients, chitosan, hyperpigmentation, depigmenting agents, skin penetration

DOCTORAL SCHOOL: Sciences de la matière

RESEARCH UNIT: Laboratoire des IMRCP- UMR UPS/CNRS 5623

Université Paul Sabatier – Bât 2R1 – 118 route de Narbonne – 31062
Toulouse

AUTEUR : Clara CHAOUAT

TITRE : Conception de nouveaux systèmes d'actifs dépigmentants, en vue de leur utilisation par voie cutanée.

DIRECTEUR DE THESE : Dr. Isabelle RICO-LATTES

LIEU ET DATE DE SOUTENANCE : Université Toulouse III, le 22 février 2013

SPECIALITE : Chimie – Biologie - Santé

RESUME :

L'encapsulation de molécules actives est au centre de la boîte à outils du formulateur du troisième millénaire. Le recours à cette technique est de plus en plus employée car cette dernière présente de nombreux avantages ; libération contrôlée de molécules actives de leur environnement, diminution de la toxicité des actifs ou encore véhiculer le principe actif jusqu'à sa cible.

La peau qui constitue une barrière physiologique a pour fonction d'assurer une protection biologique et physiologique en empêchant la pénétration d'agents pathogènes et de xénobiotiques. L'industrie ne développant pas de nouvelles molécules actives spécialement destinée à la voie topique, l'enjeu majeur de ce mode d'administration est de trouver des techniques pour parer aux inconvénients de cette voie d'administration.

Ce travail réalisé en collaboration avec les laboratoires Pierre Fabre consiste en la mise au point de nouveaux systèmes d'actifs dépigmentants, en vue de leur utilisation par voie topique. Pour ce faire nous avons voulu exploiter les nombreuses propriétés du chitosan, polysaccharide biocompatible, biodégradable, afin d'inscrire ce travail dans une démarche de développement durable. Il s'agit alors, dans ce travail, de mettre au point de systèmes associant actifs dépigmentants et promoteur de pénétration cutanée, encapsulés par un sel de chitosan, afin de former des complexes aux propriétés dépigmentantes. Les complexes formés, pourront grâce au promoteur de pénétration faciliter le passage de la molécule active à travers les différentes couches de l'épiderme, afin de favoriser l'acheminement de l'actif jusqu'à son site d'action, c'est-à-dire, le mélanocyte.

Ces systèmes originaux sont alors mis à profit pour l'élaboration de nouvelles formulations bioactives qui pourront être utilisés dans le cadre de thérapies des hyperpigmentations.

MOTS-CLES : encapsulation de principes actifs, chitosan, hyperpigmentations, actifs dépigmentants, pénétration cutanée

ECOLE DOCTORALE : Sciences de la matière

UNITE DE RECHERCHE : Laboratoire des IMRCP- UMR UPS/CNRS 5623

Université Paul Sabatier – Bât 2R1 – 118 route de Narbonne – 31062

Toulouse