

Thèse pour le
DIPLÔME D'ETAT DE
DOCTEUR EN PHARMACIE

Par
Carmen LEMOINE

Présentée et soutenue publiquement le 16 mars 2012

Evaluation de l'intérêt de la peau de porc et de la peau de souris
comme modèles pour les études *in vitro* de perméation cutanée dans
un contexte de formulation de médicaments à administration
transdermique

Président du jury : Mme Christine Herrenknecht, Professeur de Chimie Analytique
Membres du jury : Mme Laurence Coiffard, Professeur de Cosmétologie
Mme Francine Dozolme, Chef de Service Développement Analytique

Table des matières

REMERCIEMENTS	ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.
TABLE DES MATIERES	1
INTRODUCTION	4
1. LA VOIE TRANSDERMIQUE.....	5
1.1. LE SITE D'ADMINISTRATION : LA PEAU.....	5
1.1.1. <i>Ses fonctions</i>	5
1.1.2. <i>Sa structure</i>	5
1.1.3. <i>Le film hydrolipidique de surface</i>	7
1.1.4. <i>L'épiderme</i>	7
1.1.4.1. L'épiderme vivant :	7
1.1.4.2. Le <i>Stratum corneum</i> (SC)	8
1.1.5. <i>La jonction dermo-épidermique</i>	8
1.1.6. <i>Le derme</i>	8
1.1.7. <i>Les annexes de la peau</i>	9
1.1.7.1. Le poil	9
1.1.7.2. La glandes sébacée	10
1.1.7.3. Les glandes sudoripares	10
1.1.7.3.1. La glande sudoripare eccrine	10
1.1.7.3.2. La glande sudoripare apocrine	10
1.1.8. <i>La fonction barrière de la peau</i>	10
1.2. INTERET ET LIMITES DE LA VOIE TRANSDERMIQUE	11
1.2.1. <i>Intérêts</i>	11
1.2.2. <i>Limites</i>	11
1.3. LES MEDICAMENTS TRANSDERMIQUES	11
1.3.1. <i>Exemples de produits commercialisés</i>	11
1.3.2. <i>Les différents types de médicaments transdermiques</i>	12
1.3.2.1. Les préparations liquides et semi-solides pour application cutanée.....	12
1.3.2.2. Les dispositifs transdermiques	13
1.3.2.2.1. Définition.....	13
1.3.2.2.2. Structure	13
1.3.2.3. Perspectives	14
1.3.2.3.1. Elargissement du nombre des principes actifs concernés.....	14
1.3.2.3.2. Progrès dans le domaine des adhésifs	14
1.3.2.3.3. Perspectives grâce aux nanostructures.....	14
1.3.2.3.4. Développement des systèmes transdermiques actifs.....	15
1.4. LE PASSAGE TRANSCUTANE DES MEDICAMENTS	16
1.4.1. <i>Mécanismes de passage des principes actifs à travers la peau</i>	16
1.4.1.1. Les différentes étapes du processus de perméation cutanée	16
1.4.1.2. Les différentes voies de passage à travers le <i>Stratum corneum</i>	17
1.4.1.2.1. La voie intercellulaire	17
1.4.1.2.2. La voie transcellulaire.....	17
1.4.1.2.3. Les shunts à travers les annexes cutanées	17
1.4.2. <i>Facteurs influençant la perméation</i>	18
1.4.2.1. Facteurs liés au patient	18
1.4.2.1.1. L'aire cutanée concernée	18
1.4.2.1.2. L'âge du patient.....	18
1.4.2.1.3. L'existence de pathologies associées	18
1.4.2.1.4. L'hydratation cutanée	19
1.4.2.2. Facteurs liés au médicament	19
1.4.2.2.1. Caractéristiques du principe actif.....	19
1.4.2.2.2. Les caractéristiques de la formulation	20
1.4.2.3. Facteurs liés aux conditions d'application du médicament.....	22
1.4.2.3.1. Occlusion.....	22
1.4.2.3.2. Concentration en principe actif à la surface de la peau	22
1.4.2.3.3. Durée de contact et lavage éventuel de la peau	22

1.5.	OUTILS A DISPOSITION POUR L'ÉTUDE DU PASSAGE TRANSDERMIQUE.....	22
1.5.1.	<i>L'étude de la perméation cutanée : domaines d'application</i>	22
1.5.2.	<i>Les études in vivo</i>	23
1.5.2.1.	Les modèles animaux	23
1.5.2.2.	Les méthodes	23
1.5.2.2.1.	Etudes pharmacocinétiques.....	23
1.5.2.2.2.	Le « tape stripping ».....	23
1.5.2.2.3.	La microdialyse.....	24
1.5.3.	<i>Etude ex vivo sur organe isolé perfusé</i>	24
1.5.4.	<i>Les études de perméation cutanée in vitro</i>	24
1.5.4.1.	Principe des études <i>in vitro</i>	25
1.5.4.2.	La cellule de diffusion	25
1.5.4.3.	Caractéristiques du milieu donneur	26
1.5.4.4.	Caractéristiques du milieu receveur.....	27
1.5.4.5.	Caractéristiques des membranes	27
1.5.4.5.1.	Détermination de l'intégrité des membranes	27
1.5.4.5.2.	La peau excisée	28
1.5.4.5.3.	La peau humaine reconstituée.....	28
1.5.4.5.4.	Les membranes synthétiques.....	29
1.5.4.6.	Conditions opératoires	29
1.5.4.6.1.	La température et l'agitation	29
1.5.4.6.2.	La durée de l'expérience et l'échantillonnage	29
1.5.4.7.	Les méthodes d'analyse	29
1.5.5.	<i>Estimation de la perméation cutanée par un modèle mathématique</i>	30
1.5.5.1.	Les modèles empiriques.....	30
1.5.5.1.1.	Mesures de K_p	31
1.5.5.1.2.	Bases de données de valeurs de K_p	31
1.5.5.1.3.	Les modèles de QSPR (quantitative structure-permeation relationship).....	31
1.5.5.1.4.	Les nouveaux modèles	32
1.5.5.2.	Les modèles mécanistiques.....	32
1.6.	CONCLUSION : PLACE DES ETUDES DE PERMEATION CUTANEE IN-VITRO DANS LE DEVELOPPEMENT D'UN MEDICAMENT	33
2.	EVALUATION DE LA PEAU DE PORC ET DE LA PEAU DE SOURIS COMME MODELE POUR LES ETUDES DE PERMEATION CUTANEE DANS UN CONTEXTE DE FORMULATION DE MEDICAMENTS TRANSDERMIQUES.....	34
2.1.	OBJECTIF	34
2.2.	REPRESENTATIVITE DU MODELE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	34
2.2.1.	<i>Comparaison de la peau de porc et de la peau de souris par rapport à la peau humaine sur le plan physiologique</i>	34
2.2.2.	<i>Comparaison de la peau de porc à la peau humaine en termes de perméabilité</i>	36
2.3.	CAPACITE DISCRIMINANTE : ETUDE EXPERIMENTALE SUR DES PATCH DE NICOTINE.....	38
2.3.1.	<i>Objectif</i>	38
2.3.2.	<i>Matériels et méthodes</i>	38
2.3.2.1.	Choix de la nicotine et description des lots étudiés	38
2.3.2.1.1.	Propriétés physico-chimiques, pharmacocinétiques et pharmacologiques de la nicotine et justification du choix de cette molécule comme référence	38
2.3.2.1.2.	Description des lots étudiés	39
2.3.2.2.	Caractéristiques des membranes étudiées	40
2.3.2.3.	Attribution des cellules.....	40
2.3.2.3.1.	Etude de 2004 sur peau de souris	40
2.3.2.3.2.	Etude de 2011 sur peau de porc	40
2.3.2.4.	Conditions opératoires	40
2.3.2.5.	Traitement des résultats	41
2.3.3.	<i>Résultats</i>	42
2.3.3.1.	Etude de la variabilité de la PIE	42
2.3.3.2.	Cinétiques de perméation	43
2.3.3.3.	Étude statistique.....	44
2.3.3.3.1.	Résultats bruts	44
2.3.3.3.2.	Données analysées.....	44
2.3.3.3.3.	Résultats des comparaisons de moyennes.....	44

2.3.4.	<i>Discussion et conclusions</i>	45
2.3.4.1.	Variabilité de perméabilité des peaux.....	45
2.3.4.1.1.	Origine de la variabilité.....	45
2.3.4.1.2.	Amélioration de la variabilité.....	45
2.3.4.2.	Molécules de référence utilisée.....	46
2.3.4.3.	Type de peau de porc testée.....	46
2.3.4.4.	Utilisation respectives de la peau de porc et de la peau de souris dans la littérature.....	46
CONCLUSION	48
ANNEXE 1.	ETUDES DE PERMEATION CUTANEE IN VITRO PUBLIEES ENTRE 2009 ET 2011	49
ANNEXE 2.	EXEMPLE DE DEROULEMENT D'UN ESSAI DE PERMEATION CUTANEE	54
ANNEXE 3.	COMPARAISON DE LA VARIABILITE DE LA PERTE INSENSIBLE EN EAU SUR PEAU DE SOURIS ET PEAU DE PORC	56
ANNEXE 4.	ANALYSE STATISTIQUE	60
ANNEXE 5.	RECHERCHE DE CORRELATION ENTRE LES VALEURS DE PIE ET LES VALEURS DE QUANTITE CUMULEES OBTENUES SUR PEAU DE PORC ET SUR PEAU DE SOURIS	65
LISTE DES FIGURES	67
LISTE DES TABLEAUX	68
BIBLIOGRAPHIE	69

Introduction

L'exploration de nouvelles voies d'administration pour des principes actifs déjà connus n'est pas aussi spectaculaire que le lancement d'une molécule inédite mais c'est un axe d'innovation thérapeutique tout aussi pertinent. Bien que les formes transdermiques soient encore peu nombreuses sur le marché par rapport aux formes orales, elles intéressent les industriels pour leurs avantages pharmacocinétiques et cliniques. Leur développement se heurte cependant à différentes difficultés, en premier lieu le passage de la barrière cutanée qui fait intervenir des mécanismes complexes. Depuis la sélection de principes actifs candidats jusqu'aux études cliniques finales en passant par l'optimisation de la formulation, le développement d'un médicament transdermique s'appuie sur des études de perméation cutanée.

A l'étape de formulation, le galéniste s'appuie sur des résultats obtenus *in vitro*. L'un des défis principaux de ce type d'étude est la construction de modèles *in vitro* assurant des résultats fiables et répondant aux enjeux éthiques du remplacement des animaux de laboratoire. Ce travail s'intéresse au modèle membranaire le plus performant pour cette application.

Après une description de la peau en tant que voie d'administration, des médicaments transdermique et de leurs voies de passage à travers cette barrière, les différentes alternatives pour l'étude du passage transcutané seront détaillées. Dans une dernière partie, deux modèles seront évalués pour l'étude de la perméation cutanée dans un contexte de formulation, la peau de souris et la peau de porc, selon deux critères principaux, la représentativité vis-à-vis de la peau humaine et la capacité discriminante vis-à-vis du choix de formules.

1. La voie transdermique

1.1. Le site d'administration : la peau

1.1.1. Ses fonctions

La peau est l'organe le plus étendu du corps humain puisqu'elle représente 13% de la masse totale d'un adulte et couvre une surface de 2 m² en moyenne (1).

Cette interface avec le milieu extérieur assure une protection physique et biologique de l'organisme vis-à-vis des agressions extérieures. Elle assure une barrière efficace contre les agents pathogènes et de nombreux xénobiotiques. La mélanine produite par les mélanocytes limite l'effet des radiations solaires, notamment celle des ultra-violets (UV). La peau s'oppose à la perte liquidienne et joue un rôle dans la thermorégulation grâce aux poils, au tissu sous-cutané et aux glandes sudorales.

Elle est le siège des terminaisons nerveuses des sensations tactiles, thermiques et algiques. Enfin, elle assure certaines fonctions métaboliques (métabolisme lipidique et synthèse de la vitamine D).

1.1.2. Sa structure

La structure de la peau est observable sur une coupe histologique (Figure 1). Son épaisseur varie entre 1,5 et 4 mm (1). Elle est composée de deux couches, l'épiderme et le derme qui reposent sur l'hypoderme (tissu adipeux) et de plusieurs annexes : le follicule pileux, la glande sébacée, les glandes sudoripares apocrines et eccrines.

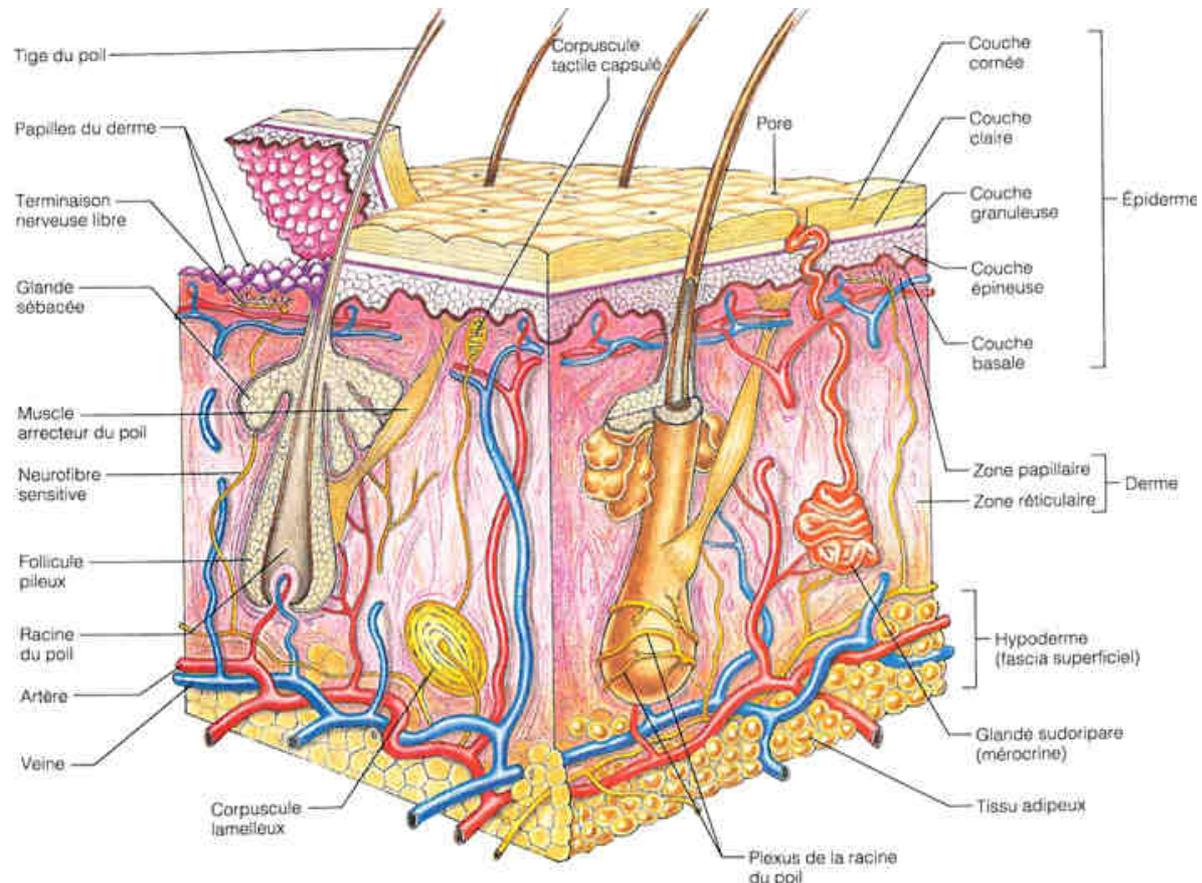
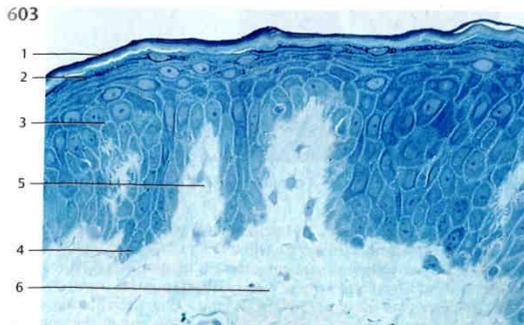


Figure 1 : Structure de la peau (1)

La structure de la peau varie en fonction de la région anatomique concernée (Figures 2 et 3). Ainsi, sont décrits deux types de peau, la peau fine et la peau épaisse. La peau fine est la peau de tout le corps à l'exception de la plante des pieds et de la paume des mains. Les variations observables en fonction de la région anatomique concernent la densité, le calibre et la longueur des poils ainsi que la prépondérance relative des glandes sudoripares eccrines et apocrines (1; 2).



- 1 : Couche cornée
- 2 : Couche granuleuse
- 3 : Couche spino-cellulaire
- 4 : Couche basale
- 5 : Papilles dermiques
- 6 : Derme papillaire

Figure 2 : Coupe verticale de la paroi latérale du thorax
(Coloration bleu de méthylène, x 400) (2)



- 1 : Follicule pileux
- 2 : Tissu adipeux de l'hypoderme
- 3 : Muscle arrecteur du poil
- 4 : Glande sébacée
- 5 : Aponévrose épicroânienne

Figure 3 : Coupe verticale de cuir chevelu
(Coloration benzopurpurine, x 15) (2)

La peau épaisse (Figure 4) est la peau des régions palmo-plantaires, sa couche cornée est plus importante que sur le reste du corps, les follicules pileux y sont absents mais les glandes sudoripares nombreuses. Les papilles dermiques provoquent des élévations de l'épiderme qui forment des sillons visibles à l'œil nu à sa surface et correspondent aux empreintes digitales (1; 2).



- 1 : Epiderme à crêtes épidermiques
- 2 : Derme papillaire
- 3 : Derme réticulaire
- 4 : Hypoderme avec des lobules adipeux
- 5 : Glandes sudoripares eccrines

Figure 4 : Peau épaisse, pulpe du doigt
(coloration benzopurpurine, x 16) (2)

1.1.3. Le film hydrolipidique de surface

La surface de la peau est recouverte d'un film liquide hydrolipidique qui provient du mélange entre le sébum sécrété par les glandes sébacées et la sueur produite par les glandes sudoripares. Il module l'évaporation de l'eau et donc l'hydratation des couches cutanées supérieures (3).

1.1.4. L'épiderme

L'épiderme comporte deux régions, la couche superficielle non viable, appelée couche cornée ou *Stratum corneum* et l'épiderme vivant.

1.1.4.1. L'épiderme vivant :

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

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

Tableau 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 (1; 4).

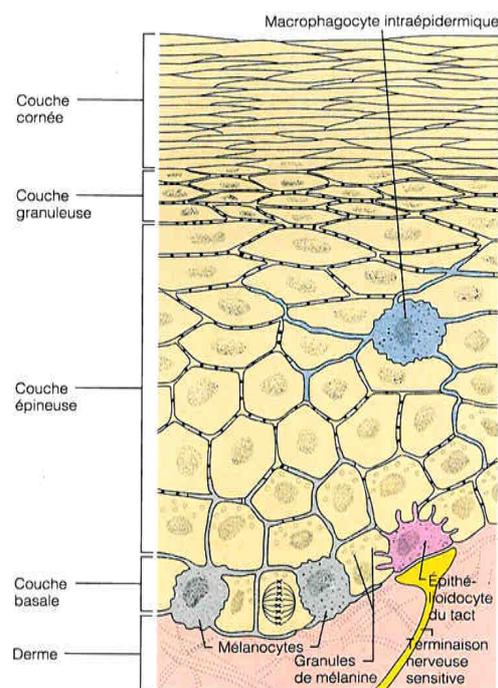


Figure 5 : Structure de l'épiderme (1)

1.1.4.2. Le *Stratum corneum* (SC)

Le *Stratum corneum* (SC), appelé aussi couche cornée est constitué uniquement de cornéocytes, 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 (1).

C'est le SC qui est responsable de l'imperméabilité de la peau. La membrane plasmique des cornéocytes est renforcée par l'intérieur d'une enveloppe cornée constituée de protéines entrecroisées et liées entre elles par divers types de liaison, 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.

Les lipides intercellulaires proviennent de structures intracellulaires, les corps lamellaires qui sont expulsés dans le milieu extracellulaires lors du processus de kératinisation. Il s'agit de lipides polaires (glycosphingolipides, stérols libres et phospholipides) qui sont transformés sous l'action d'enzymes en lipides apolaires (cholestérol, acides gras libres et céramides) et s'organisent en structures lamellaires grâce à leurs sites de liaisons intermoléculaires (Figure 6) (3; 5).

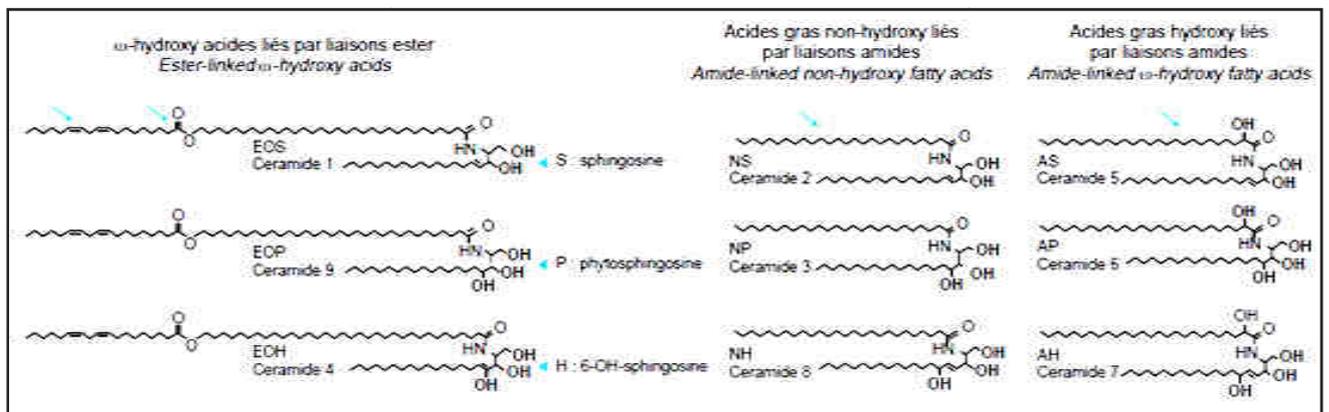


Figure 6 : Structure chimique des céramides du SC (d'après (5))

1.1.5. La jonction dermo-épidermique

La jonction dermo-épidermique est visible sur une coupe histologique, c'est une ligne ondulée par des invaginations du derme dans l'épiderme, appelées les papilles dermiques. Elle est le siège des échanges entre les deux couches cutanées (1; 4).

1.1.6. 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 extra-cellulaire. Celle-ci est composée de la substance fondamentale (eau, sels

minéraux, glycoprotéines et glycosaminoglycanes) ainsi que de fibres de collagène et d'élastine. Quelques cellules immunitaires (macrophages, lymphocytes, granulocytes) peuvent aussi y être mises en évidence.

Sur une coupe histologique, il est possible de distinguer le derme papillaire, qui représente 20 % du volume total du derme, et le derme réticulaire, qui en représente 80 %. Au niveau du derme papillaire, les fibres de collagène et d'élastine sont fines, lâches et orientées perpendiculairement par rapport à la surface cutanée. Les cellules y sont nombreuses et la substance fondamentale y est abondante pour assurer les échanges nutritifs avec l'épiderme. Au niveau du derme réticulaire, les fibres de collagène sont denses, enchevêtrées horizontalement et constituent une véritable charpente de soutien compressible, élastique et extensible (1).

1.1.7. Les annexes de la peau

1.1.7.1. Le poil

Toute la surface du corps, à l'exception des lèvres, des mamelons et de certaines parties des organes génitaux externes, est recouverte de poils. Le cuir chevelu en porte environ 100 000. Les poils fins et pâles sont appelés duvet et les poils longs et foncés sont appelés poils adultes (poils du cuir chevelu et des sourcils par exemple). La pousse des poils s'effectue par cycle et dépend de la région anatomique concernée. En moyenne, sa vitesse est de 2 mm par semaine.

Le poil est produit par le follicule pileux. Il est composé de cellules kératinisées qui ne desquament pas. Le follicule pileux s'étend de la surface de l'épiderme au derme, voir jusqu'à l'hypoderme. Sa base est appelée bulbe et renferme la papille de chorion (de même structure histologique que la papille dermique) qui produit les cellules du poil (Figure 7). L'extérieur de la paroi du follicule est formé de tissu conjonctif provenant du derme et l'intérieur est tapissé d'un tissu épithélial dérivé de l'épiderme. Cette paroi s'amincit au niveau de la base du follicule (1). La principale fonction du poil chez l'être humain réside dans son rôle sensoriel.

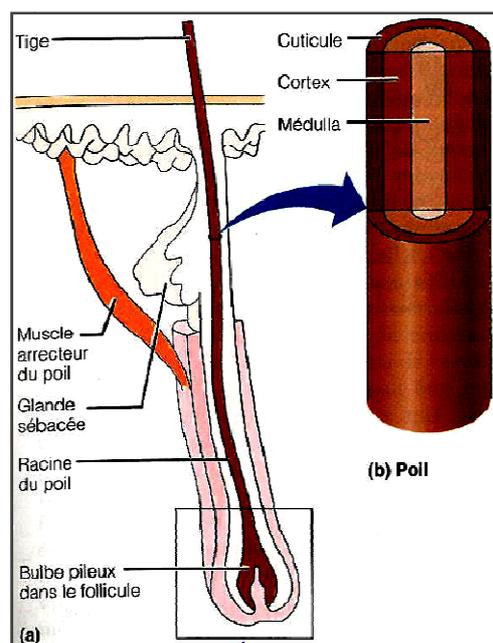


Figure 7 : Follicule pileux (a) et poil (b) (1)

1.1.7.2. La glandes sébacée

Les glandes sébacées sont des glandes exocrines holocrines qui sont présentes sur toute la surface du corps sauf au niveau de la paume des mains et de la plante des pieds. Un centimètre carré de peau en comporte en moyenne une quinzaine. Elles sont sous contrôle hormonal (influence notamment des androgènes à partir de la puberté).

Elles sont associées à un follicule pileux et sécrètent une substance lipophile, le sébum. Les cellules du centre des alvéoles produisent des lipides jusqu'à engorgement et éclatement. Le mélange de lipides et de débris cellulaires qui en résulte est sécrété dans le follicule pileux. Le sébum lubrifie les poils et la peau, limite l'évaporation d'eau et a une action bactéricide (1).

1.1.7.3. Les glandes sudoripares

Les glandes sudoripares sont présentes sur toute la surface du corps à l'exception des mamelons et de certaines parties des organes génitaux externes. Il en existe en moyenne 100 par cm² de peau. Elles sont de deux types. Les glandes sudoripares eccrines sont les plus nombreuses, particulièrement au niveau de la paume des mains, de la plante des pieds et du front. Les glandes sudoripares apocrines, quant à elles, sont présentes presque uniquement au niveau des aisselles et du périnée (1).

1.1.7.3.1. La glande sudoripare eccrine

Il s'agit d'une glande tubulaire dont la partie enroulée dans le derme sécrète la sueur qui est conduite par le canal excréteur jusqu'au pore à la surface de la peau. La sueur est un filtrat hypotonique au sang, c'est donc un milieu aqueux qui va par la suite former une émulsion avec le sébum pour donner le film hydrolipidique de surface. Son pH est acide (Il se situe entre 4 et 6). La production de sueur est intervient dans la thermorégulation. Si la quantité de sueur produite par jour en condition de repos et de température extérieure inférieure à 32°C est de 500 mL, elle peut augmenter jusqu'à 12 L (1).

1.1.7.3.2. La glande sudoripare apocrine

Les glandes apocrines sont plus grosses que les glandes eccrines et leur conduit débouche dans un follicule pileux. En plus des composants de base de la sueur, leur sécrétion contient des lipides et des protéines qui, une fois transformés par des bactéries de la flore cutanée, sont responsables d'une odeur déplaisante (1).

1.1.8. La fonction barrière de la peau

L'efficacité de la barrière cutanée tient à la structure de la couche cornée. Celle-ci a d'ailleurs souvent été assimilée à la structure d'un mur dont les briques sont les cornéocytes et le mortier le milieu intercellulaire lipophile. Les efforts de recherche sur la structure de ce tissu complexe se sont tournés vers les lipides extracellulaires et leur organisation à l'échelle nanométrique (4; 6; 7).

1.2. Intérêt et limites de la voie transdermique

1.2.1. Intérêts

L'administration des médicaments par voie transdermique a de nombreux avantages.

Bien que certaines précautions soient à préciser au patient (retirer le film protecteur, ne pas superposer deux dispositifs transdermiques, etc...), cette forme pharmaceutique est d'utilisation facile.

La libération du principe actif est très souvent prolongée par rapport à une administration orale, ce qui permet de diminuer la fréquence des doses et donc favorise l'observance.

D'un point de vue pharmacocinétique, cette forme permet une libération continue et prolongée de principe actif dans la circulation générale. Il n'y a pas d'effet de premier passage hépatique, ce qui permet de diminuer les doses administrées et les effets secondaires. L'effet pharmacologique peut être facilement stoppé par retrait du dispositif (4; 8; 9).

1.2.2. Limites

La mise au point de formes transdermiques se heurte cependant à certaines limites.

Le passage transdermique des médicaments est sujet à une grande variabilité interindividuelle et ne concerne qu'un petit nombre de principes actifs.

Le coût des matières premières et les faibles rendements de fabrication rendent les dispositifs transdermiques plus coûteux à produire que les formes orales.

En clinique, les inconvénients majeurs des formes transdermiques (crèmes, gels, patchs) est le risque d'irritation cutanée ou de sensibilisation et l'éventuel décollement du patch. Enfin, même après utilisation, les patchs peuvent présenter un risque domestique car les concentrations en principe actif rémanentes sont souvent importantes (4; 8; 9).

1.3. Les médicaments transdermiques

1.3.1. Exemples de produits commercialisés

L'idée que la peau puisse être une voie d'administration générale est antérieure au vingtième siècle puisqu'au Codex de 1884, figurent des écussons ou épithèmes d'opium à activité antispasmodique (4). Toutefois, c'est seulement en 1985 que les premiers dispositifs transdermiques (*Transdermal Drug Delivery System, TDS*) sont conçus, permettant ainsi l'administration systémique contrôlée et prolongée de principes actifs. La société ALZA met tour à tour sur le marché Scopoderm TTS® (scopolamine destiné au traitement des symptômes liés au mal des transports), Nitriderm TTS® (trinitrine dans la crise d'angor) et Estraderm TTS® (œstradiol destiné au traitement des carences en œstrogènes liées à la ménopause) (9; 10). Quelques années plus tard, les patchs de nicotine font une apparition remarquée. Aujourd'hui, le marché des patchs concerne principalement les traitements nicotiques, hormonaux et l'administration de la trinitrine.

Le Tableau 2 regroupe les principales molécules administrées par voie transdermique, disponibles en France (4; 10; 11).

Principe actif	Spécialité	Forme galénique	Indication	Intérêt de l'administration transdermique
Estradiol	CLIMARA [®] , ESTRADERM TTS [®] , OESCLIM [®] , VIVELLE [®] ...	Patch	Carence en œstrogène chez la femme ménopausée	Eviter la dégradation digestive
	OESTRODOSE [®] OESTROGEL [®]	Gel		
Fentanyl base	DUROGESIC [®]	Patch	Douleur	Obtenir une concentration plasmatique constante et une action prolongée
Estro-progestatif	COMBIPATCH [®] , ESTALIS [®] , FEMSEPT COMBI [®] ...	Patch	Contraception	Diminuer le risque d'oubli de la pilule
Nicotine	NICOPATCH [®] , NICOTINELL [®] , NICORETTE [®] , NIQUITIN [®] ...	Patch	Sevrage tabagique	Faciliter l'observance
Trinitrine	CORDIPATCH [®] , DIAFUSOR [®] ...	Patch	Angor	Pallier à une courte demi-vie
Scopolamine base	SCOPODERM [®] , TRANSCOP [®]	Patch	Mal des transports	/

Tableau 2 : Exemples d'applications de systèmes transdermiques

1.3.2. Les différents types de médicaments transdermiques

1.3.2.1. Les préparations liquides et semi-solides pour application cutanée

Ces préparations sont destinées à être appliquées sur la peau afin d'exercer une action locale ou transdermique de principes actifs.

Les pommades sont constituées d'une base monophasique dans laquelle sont dispersés les principes actifs.

Les crèmes sont des émulsions, composées d'une phase lipophile et d'une phase hydrophile.

Les gels sont constitués par des liquides gélifiés à l'aide d'agents gélifiants (le plus souvent polymériques).

Les pâtes sont des préparations semi-solides contenant une forte proportion de poudre finement dispersées dans l'excipient (6; 12).

Ces formes sont plus souvent proposées pour des actions locales que générales.

1.3.2.2. Les dispositifs transdermiques

1.3.2.2.1. Définition

La Pharmacopée Européenne 7^e édition et l'*U.S. Pharmacopeia* 34 définissent le dispositif transdermique comme une préparation souple qui appliquée sur la peau est destinée à libérer un ou plusieurs principe(s) actif(s) dans la circulation générale (13; 14).

Le terme de patch, connu du grand public correspond, quand à lui, à un concept plus général. Pour la *Food and Drug Administration* (FDA), un patch est un système d'administration qui comporte un support externe adhésif et permet à ses composants de diffuser à partir du site externe d'application (4). Certains patchs sont destinés à un usage local, d'autres permettent une administration systémique. Lorsque la peau est le site externe d'application et que l'action est générale il s'agit d'un dispositif transdermique.

1.3.2.2.2. Structure

Plusieurs types de dispositifs transdermiques existent aujourd'hui sur le marché. Tous comportent les éléments suivants :

- un support imperméable externe ;
- un compartiment contenant le principe actif (PA) ;
- une membrane de contrôle de la libération du PA ;
- un adhésif ;
- un film protecteur à retirer au moment de l'emploi.

Ils sont classés selon le positionnement de l'élément de contrôle. On distingue ainsi les patchs réservoirs, des patchs matriciels (Figure 8) (6).

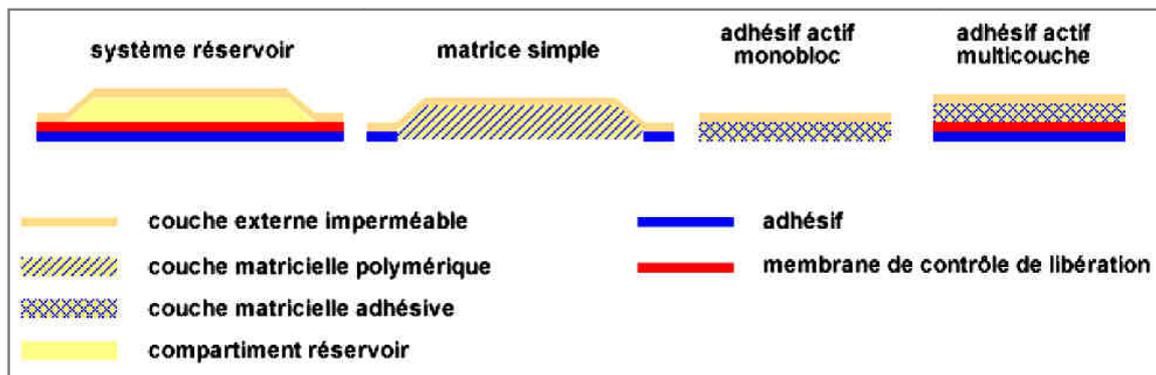


Figure 8 : Structure des systèmes transdermiques (d'après (4))

1.3.2.2.2.1. Les patchs réservoirs

Si des exemples subsistent sur le marché, ce type de patch est aujourd'hui tombé en désuétude. Le réservoir renferme une solution ou une suspension de principe actif dans un véhicule liquide. Une membrane de contrôle régule la libération, qui suit une cinétique d'ordre 0 (la vitesse de libération est constante dans le temps) (4; 8; 9).

1.3.2.2.2. Les patchs matriciels

Le principe actif est dissout ou dispersé dans une masse polymérique qui est elle-même l'élément de contrôle de la libération. Cette dernière ne suit généralement pas une cinétique linéaire. L'adhésif peut faire partie intégrante de la matrice, il s'agit alors d'un type dit « adhésif actif ». Ce type de patch est largement préféré aujourd'hui du fait de sa simplicité, de sa faible épaisseur et de sa grande souplesse (8; 9; 10).

1.3.2.3. Perspectives

1.3.2.3.1. Elargissement du nombre des principes actifs concernés

La voie transdermique concerne actuellement un petit nombre de principes actifs, aptes à franchir la barrière cutanée et pour lesquels des arguments médico-marketing sont avancés en faveur de cette voie (marché potentiel, effet de premier passage hépatique, courte demi-vie...). L'avènement récent des patchs contraceptifs a augmenté considérablement le nombre des spécialités concernées. D'autres types de principes actifs sont étudiés par les laboratoires pharmaceutiques, par exemple, la rotigotine (15), le palonosetron (16) et la tamsulosine (17) sont cités dans des brevets concernant des formes transdermiques (18).

1.3.2.3.2. Progrès dans le domaine des adhésifs

Les fournisseurs d'adhésifs proposent aujourd'hui une large gamme de solutions qui permettent la mise au point de formulations optimales pour le principe actif considéré (10). Ainsi, les patchs sont-ils de plus en plus discrets et performants.

Les axes d'amélioration des adhésifs concernent principalement la compatibilité avec les principes actifs, la stabilité, les propriétés adhésives et de contrôle de la libération.

1.3.2.3.3. Perspectives grâce aux nanostructures

1.3.2.3.3.1. Les microémulsions

Les microémulsions sont des formulations fluides transparentes ou légèrement opalescentes, colloïdales, composées d'une phase hydrophile, une phase lipophile, un émulsionnant et un co-émulsionnant. Ce sont des émulsions dont les gouttelettes de phase dispersée ont un diamètre compris entre 20 et 100 nm.

Elles ont l'avantage d'augmenter la pénétration transdermique des principes actifs lipophiles et hydrophile grâce à leur grande capacité de solubilisation. Les principales difficultés du développement de telles formulations résident dans le choix des tensio-actifs pour en diminuer la concentration et en améliorer la tolérance cutanée (19; 20).

1.3.2.3.3.2. Les vésicules lipidiques

Les liposomes sont des vésicules lipidiques de taille nanométrique constitués de cholestérol, de phospholipides ou d'autres lipides amphiphiles. De forme sphérique, ils peuvent être de type unilamellaire ou multilamellaire selon le nombre de bicouches lipidiques qui en constituent la paroi et le procédé utilisé pour les fabriquer.

En fonction des additifs introduits dans leur structure, ce type de vésicule est appelé transferome, flexosome, éthosome, niosome, vésosome, invasome ou encore polymerosome (19).

Pour le transport percutané des molécules, ce sont les transféromes (liposomes ayant une grande capacité à se déformer) et les ethosomes qui ont montré le plus grand potentiel. Ils sont donc très étudiés (21; 22) mais leur réelle efficacité reste encore à démontrer (19).

1.3.2.3.4. Développement des systèmes transdermiques actifs

Les formes transdermiques décrites jusqu'ici sont appelés systèmes transdermiques passifs en opposition aux systèmes actifs. Ces derniers ont encore peu de représentants sur le marché (11) mais font l'objet de nombreuses recherches. Ils induisent le passage du principe actif mécaniquement ou par apport d'énergie électrique, thermique ou ultra-sonique.

1.3.2.3.4.1. Les dispositifs à micro-aiguilles

Dans ce cas, le dispositif a l'aspect d'un patch traditionnel, mais sa surface est recouverte de micro-aiguilles permettant de forcer le passage du *Stratum corneum*. Le processus est totalement indolore puisque les micro-aiguilles n'atteignent pas les terminaisons nerveuses. Ce type de dispositif est proposé pour l'administration de vaccins en remplacement des injections intra-dermiques mais aussi pour la libération continue de médicament (23). Le principe actif est placé soit dans le corps du patch, soit à la surface des aiguilles (24). Les deux acteurs principaux du marché sont ALZA Inc. et 3M.

1.3.2.3.4.2. Iontophorèse

L'iontophorèse repose sur le mouvement d'ions à travers une membrane sous l'effet d'une différence de potentiel. Ce phénomène peut donc être mis à contribution pour l'administration de principes actifs ionisables, dont l'absorption passive à travers la peau est souvent très faible. Il peut aussi être utilisé pour des molécules non chargées grâce à deux mécanismes : l'électro-osmose et la diminution de la perméabilité de la peau sous l'influence du flux électrique. L'iontophorèse est une voie d'administration des peptides et des molécules de hauts poids moléculaires (25). La différence de potentiel appliquée à l'aide de deux électrodes induit un courant de l'ordre de 0,5 mA/cm². Comme le flux de principe actif est proportionnel à la différence de potentiel appliquée, il est possible d'ajuster cette dernière pour chaque patient (26). Les difficultés principales du développement de dispositifs transdermiques iontophorétiques sont leur complexité et leur coût (27).

Les applications actuelles sont développées par Iomed Inc. (Phoresor[®], dispositif pour l'administration d'anesthésiques locaux) et Alza Inc. (E-Trans[®], dispositif évalué dans le cadre de l'administration du fentanyl) (28).

1.3.2.3.4.3. Electroporation

L'électroporation est une forme d'iontophorèse. Il s'agit, en appliquant un haut potentiel électrique (> 100 V) de très faible durée (< 1 milliseconde), de créer des pores dans la membrane plasmique des cellules et de désorganiser les lipides épidermiques, de façon réversible. L'électroporation pourrait être combinée à l'iontophorèse pour l'administration de peptides mais ce procédé reste encore à tester *in vivo* (26).

1.3.2.3.4.4. Sonophorèse

La sonophorèse met à profit l'énergie des ultrasons (de l'ordre de 1 MHz et 0,5 W/cm²) pour rompre les bicouches lipidiques de l'épiderme et y forger des passages pour les molécules hydrophiles (29). Quatre mécanismes d'action sont synergiques. L'onde sonore induit des variations de pression qui favorisent la formation de cavités gazeuses. Le milieu intercellulaire est fluidifié par augmentation de la température et des flux apparaissent, induisant des phénomènes de transport convectif. Enfin, les variations sinusoïdales de pression provoquant un stress de la membrane et une désorganisation des bicouches lipidiques.

Comme l'iontophorèse, la sonophorèse permettrait d'administrer une plus grande gamme de principes actifs, de contrôler les doses administrées et les cinétiques de passage. Cette technique, utilisée à l'hôpital après application de crème ou de gel sur la peau à l'aide d'un sonicateur est couteuse en temps de personnel soignant (30).

Des systèmes d'administration de peptides par sonophorèse sont développés par Sontra Medical Inc. (28).

1.4. Le passage transcutané des médicaments

1.4.1. Mécanismes de passage des principes actifs à travers la peau

1.4.1.1. 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.

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 hydro-lipidique de surface. Elle dépend de l'affinité du composé chimique pour l'un ou l'autre des deux 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 et notamment sa viscosité 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.

La deuxième étape du processus est la diffusion du composé dans le *Stratum corneum*. Pour la plupart des molécules, cette étape est limitante. Plusieurs voies de passage à travers le *Stratum corneum* existent (Figure 9). Trois voies majoritaires se détachent : la voie intercellulaire, la voie transcellulaire et la voie empruntant les annexes cutanées. Deux nouvelles étapes de distribution et diffusion permettent le passage dans le derme, suivies d'une étape de distribution dans les capillaires pour rejoindre la circulation générale.

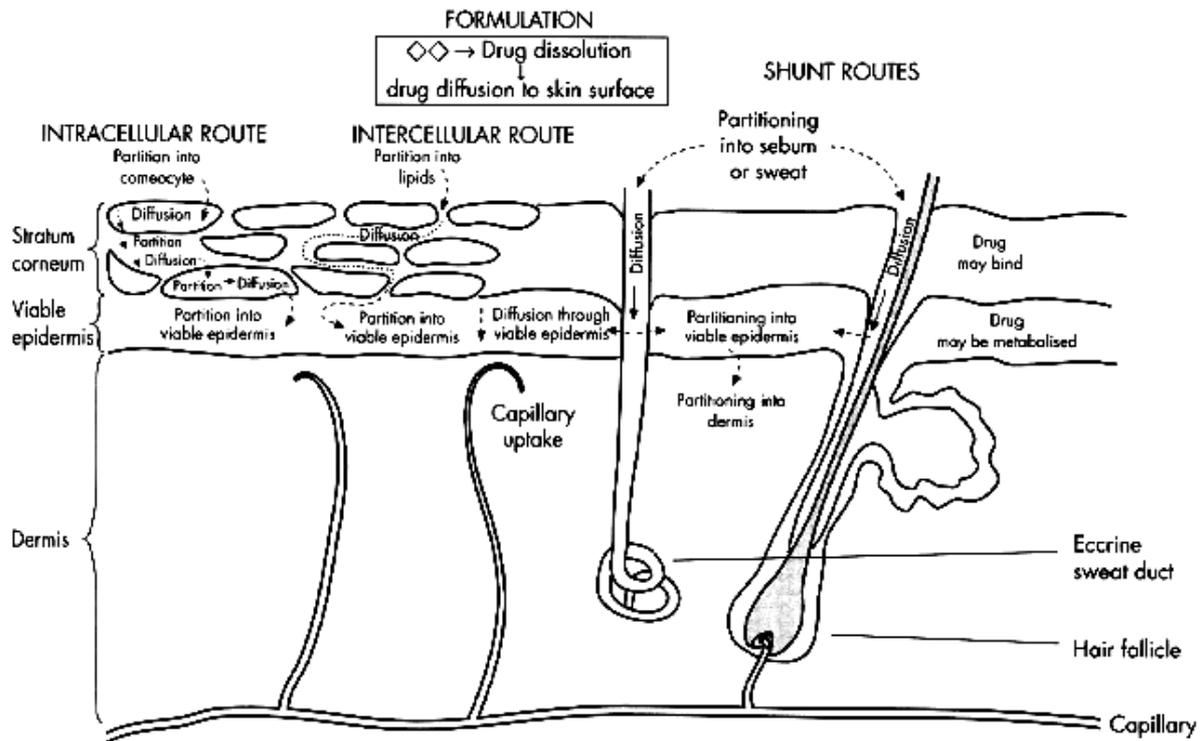


Figure 9 : Mécanismes de passage des principes actifs à travers la peau (31)

1.4.1.2. Les différentes voies de passage à travers le *Stratum corneum*

1.4.1.2.1. La voie intercellulaire

Il s'agit du passage à travers le *Stratum corneum* par diffusion dans les lipides intercellulaires. 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 (cf. 1.1.4.2). 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 (32).

1.4.1.2.2. La voie transcellulaire

Cette voie est beaucoup plus rarement la voie préférentielle. Elle suppose en effet le passage des interfaces successives lipides intercellulaires / intérieur des cornéocytes. Cependant, elle peut exister sous l'effet de certains promoteurs d'absorption, comme l'urée, qui altèrent la structure de la kératine et augmentent la perméabilité des cornéocytes (32).

1.4.1.2.3. Les shunts à travers les annexes cutanées

Les annexes cutanées représentent environ 0,1 % de la surface de la peau. Cette voie n'est donc pas majoritaire. Cependant, elle a son importance dans certains cas :

- avant l'établissement de l'équilibre de diffusion à travers le *Stratum corneum* ;
- pour les composés très hydrophiles, à haut poids moléculaires et les ions ;
- pour les nanoparticules, les cyclodextrines et les liposomes (32).

1.4.2. Facteurs influençant la perméation

Les processus de diffusion et de distribution qui font la perméation cutanée sont influencés par de nombreux facteurs qui peuvent être rangés en deux catégories : ceux qui font varier l'efficacité de la barrière cutanée d'une part et ceux qui influent sur le comportement du perméant vis-à-vis de cette barrière.

1.4.2.1. Facteurs liés au patient

Pour proposer l'administration transdermique d'un médicament, il est important de maîtriser la variabilité intra- et interindividuelle de la perméabilité cutanée.

1.4.2.1.1. L'aire cutanée concernée

La peau n'est pas identique sur toute la surface du corps. La taille des cornéocytes, l'épaisseur de la couche cornée, la teneur en lipide ou le nombre de follicules pilo-sébacés peuvent varier ce qui entraîne des différences de perméabilité. D'une façon générale, la peau du scrotum est la plus perméable et la peau de la région palmo-plantaire la moins perméable. Ces variations anatomiques ont été décrites chez l'homme pour la perméation de l'hydrocortisone, des organophosphorés, de l'acide benzoïque et de l'eau (33).

La variabilité intra-individuelle due à la zone anatomique peut même être plus grande que la variabilité interindividuelle. Ce résultat a été observé avec l'eau (34).

1.4.2.1.2. L'âge du patient

Le vieillissement cutané se caractérise par la diminution de son épaisseur, un assèchement et une diminution de la teneur en lipides et des altérations du fonctionnement des glandes sébacées. Cependant, cela ne semble pas avoir d'influence significative sur l'absorption des médicaments (33; 34; 35).

C'est à l'autre extrémité de la vie que l'âge a une influence considérable sur la perméabilité cutanée puisque chez le prématuré, la barrière cutanée est beaucoup moins efficace que celle du nouveau-né à terme, et ce proportionnellement au degré de prématurité (33).

1.4.2.1.3. L'existence de pathologies associées

De nombreuses affections dermatologiques peuvent influencer la biodisponibilité de molécules administrées par voie cutanée, soit en modifiant le drainage sanguin, soit en affectant l'équilibre kératine/ lipide de la couche cornée.

Par exemple, un érythème provoque une augmentation du flux sanguin au niveau de la microcirculation cutanée, ce qui augmente la clairance des molécules. Lors d'un psoriasis, caractérisé par une parakératose et une élévation du flux sanguin cutané, il a été démontré que la concentration en hydrocortisone dans la peau est plus importante au niveau des plaques psoriatiques que dans les zones saines et l'absorption systémiques est plus grande (8; 33).

1.4.2.1.4. L'hydratation cutanée

Plus la teneur en eau de la couche cornée est importante, plus la pénétration des principes actifs est facilitée. L'eau fluidifie le ciment intercellulaire en s'immiscuant dans les bicouches lipidiques et les kératinocytes gonflent. Le coefficient de partage couche cornée/véhicule peut donc s'en trouver modifié de façon plus ou moins importante selon la molécule considérée (33).

1.4.2.2. Facteurs liés au médicament

1.4.2.2.1. Caractéristiques du principe actif

1.4.2.2.1.1. Sa lipophilie

Un principe actif administré par voie transdermique doit être capable de diffuser dans le SC lipophile, puis dans l'épiderme vivant dont la teneur en eau est supérieure, pour rejoindre la circulation systémique. Idéalement, il est à la fois lipophile et hydrophile. Il a été montré que les composés capables de franchir la barrière cutanée ont un coefficient de partition octanol/eau compris entre 10 et 1000 (36).

1.4.2.2.1.2. Son volume moléculaire

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 des « trous » de la matrice. Par conséquent, la diffusivité des principes actifs dans le SC décroît exponentiellement avec leur volume moléculaire, selon : $D_m = D_0 \times e^{-\beta.MV}$ 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 molaire inférieure à 500 Da sont-elles susceptibles de franchir la barrière cutanée (36).

1.4.2.2.1.3. Ses capacités d'ionisation

La perméation cutanée d'une espèce ionisée 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-elle 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 (31).

1.4.2.2. Les caractéristiques de la formulation

1.4.2.2.1. Les éléments de contrôle de la libération

Dans un patch matriciel, le contrôle de la libération est assuré par le polymère constitutif de la matrice. Les polymères utilisés pour les dispositifs transdermiques sont des polymères naturels ou semi-synthétiques (dérivés de la cellulose, gélatine, gomme chitosan...), des élastomères synthétiques (polybutadiène, polyisobutylène, nitriles, acrylonitrile...) ou des polymères synthétiques (polyéthylène, polypropylène, polyacrylate, polyamide, polyvinylpyrrolidone...) (37).

1.4.2.2.2. Les promoteurs d'absorption

Les promoteurs d'absorption sont des excipients qui, ajoutés en faible proportion dans la formulation, augmentent le taux d'absorption du principe actif.

Différents types de molécules sont utilisés dans ce but et leurs mécanismes d'action sont variés. Leur action peut s'exercer sur la concentration en PA dans la formulation effectivement disponible pour le passage transcutané, le coefficient de partition entre la formulation et le SC ou le coefficient de diffusion du PA 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 et non allergénique, sans effet pharmacologique, qui agit rapidement et de façon reproductible en n'entraînant que des modifications réversibles de la barrière cutanée. Il doit aussi être compatible avec les autres constituants de la formulation. Le Tableau 3 regroupe les principaux promoteurs d'absorption, leur mécanisme d'action, leur intérêt et leurs limites.

Il est difficile de sélectionner rationnellement un promoteur d'absorption en fonction d'un principe actif donné. Les promoteurs « à large spectre de PA » sont donc préférés. Des études de perméation cutanée *in vitro* sur modèles animaux sont souvent menées pour choisir le promoteur et optimiser sa concentration (38).

Type de molécule	Mécanisme d'action	Avantages / inconvénients
<p>Sulfoxydes (DMSO, DMF...)</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;"> <chem>CC1=CC=CC=C1S(=O)(=O)C1=CC=CC=C1</chem> Diméthyl- sulphoxyde (DMSO) </div> <div style="text-align: center;"> <chem>CC(=O)N(C)C</chem> Diméthyl- acétamido (DMA) </div> <div style="text-align: center;"> <chem>CC(=O)N(C)C</chem> Diméthyl- formamido (DMF) </div> </div>	<p>Le mécanisme d'action est complexe, il implique entre autres une dénaturation des protéines, des interactions avec les lipides intercellulaires, une désorganisation des bicouches lipidique</p>	<p>Ils ont une toxicité cutanée et systémique</p>
<p>Azone</p> <div style="text-align: center;"> <chem>CCCCCCCCCCCCCCCC(=O)N1CCCCC1</chem> <i>Azone</i> </div>	<p>Plusieurs hypothèses sont proposées pour son action sur les lipides du SC.</p>	<p>Sa toxicité est très faible. Elle est compatible avec de nombreux solvants. Elle augmente la perméation d'un grand nombre de molécules, et est active à faible concentration</p>
<p>Pyrrolidones</p>	<p>Les molécules se dissolvent dans le milieu extracellulaire et induisent un effet réservoir qui prolonge la durée d'action du médicament.</p>	<p>Elles sont souvent source d'effets secondaires (érythèmes).</p>
<p>Acides gras</p> <div style="text-align: center;"> <chem>CCCCCCCC=CCCCCCCCCCCCCCCC(=O)O</chem> <i>Acide oléique</i> </div>	<p>Les molécules d'acide gras se rassemblent en phases distinctes et forment des passages au sein des bicouches lipidiques.</p>	<p>Ils sont efficaces sur de nombreux principes actifs et à faible concentration. Il est possible de moduler l'action promotrice par des changements sur la chaîne carbonée.</p>
<p>Alcools, alcool gras et glycols</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;"> <chem>CCO</chem> <i>Ethanol</i> </div> <div style="text-align: center;"> <chem>CCCCCCCCCO</chem> <i>1-octanol</i> </div> <div style="text-align: center;"> <chem>CC(O)CO</chem> <i>Propylène glycol</i> </div> </div>	<p>Pour les PA peu solubles, l'alcool augmente la solubilité dans la formulation et évite les phénomènes de déplétion. En s'évaporant, il provoque un état de super-saturation du PA dans la formulation. En diffusant dans le SC, il y modifie la solubilité du PA.</p>	<p>L'éthanol est un solvant de choix pour les patchs. L'action promoteur est observée sur de nombreux PA et il est possible de les associer à d'autres promoteurs pour un effet synergique.</p>
<p>Emulsifiants</p>	<p>Les tensio-actifs solubilisent le PA dans les phases lipophiles du SC.</p>	<p>Ils provoquent des dommages cutanés (irritation, interactions avec la kératine) et leur efficacité est souvent insuffisante.</p>
<p>Urée</p> <div style="text-align: center;"> <chem>NC(=O)N</chem> </div>	<p>L'urée a des propriétés hydratantes et kératolytiques.</p>	<p>Pour de nombreuses molécules, les propriétés promotrices sont faibles.</p>
<p>Huiles essentielles, terpènes et terpénoïdes</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;"> <chem>CC1=CC=C(C=C1)C(C)=C</chem> <i>d-Limonene</i> </div> <div style="text-align: center;"> <chem>CC1=CC=C(C=C1)C(C)=C</chem> <i>Nerolidol</i> </div> <div style="text-align: center;"> <chem>CC1=CC=C(C=C1)C(C)=C</chem> <i>1-8-Cineole</i> </div> </div>	<p>Au sein de cette famille, les mécanismes dépendent du composé considéré, il peut s'agir d'une accélération de la diffusion du PA dans le SC, d'une désorganisation des bicouches lipidiques ou de la création de passages dans le milieu intercellulaire.</p>	<p>L'efficacité du promoteur dépend beaucoup du couple promoteur-PA. Les terpènes peuvent avoir des effets pharmacologiques.</p>

Tableau 3 : Principaux promoteurs d'absorption (38)

1.4.2.3. Facteurs liés aux conditions d'application du médicament

1.4.2.3.1. Occlusion

L'occlusion facilite la pénétration de nombreuses molécules actives, hydrophiles et lipophiles par deux mécanismes : la rétention de l'eau d'évaporation dans la couche cornée et l'élévation de la température à la surface de la peau. Un pansement occlusif permet aussi d'augmenter le temps de contact avec la surface cutanée pour les molécules volatiles (33; 35).

1.4.2.3.2. Concentration en principe actif à la surface de la peau

La posologie d'une préparation à administration transdermique s'exprime par unité de surface. Contrairement à ce que prédit la loi de Fick, l'absorption globale de principe actif n'est pas toujours proportionnelle à la quantité administrée, pour une durée de contact déterminée (33). L'absorption globale de principe actif, pendant une durée déterminée résulte directement du flux de principe actif à travers la peau, flux qui dépend directement du gradient de concentration entre la surface et l'intérieur de l'épiderme. Il s'agit de la différence entre les fractions dissoutes de principe-actif dans la formulation et dans le SC.

Des formulations différentes du même principe actif, si elles sont à saturation, atteignent le même flux à l'équilibre.

1.4.2.3.3. Durée de contact et lavage éventuel de la peau

La pénétration cutanée se perpétue aussi longtemps qu'il reste de principe actif à la surface de la peau. L'élimination de celui-ci par retrait du dispositif ou par lavage peut être suivie d'un phénomène de rémanence du produit dans la couche cornée. Des études chez l'animal ont montré que le lavage peut dans certains cas augmenter l'absorption en hydratant ou en agressant la peau (33).

1.5. Outils à disposition pour l'étude du passage transdermique

1.5.1. L'étude de la perméation cutanée : domaines d'application

Ces études concernent aussi bien les médicaments (médicaments à administration locale et générale) que des cosmétiques et des produits chimiques.

Pour les cosmétiques et les produits chimiques, elles servent à prouver l'innocuité du produit et sont règlementées par des lignes directrices éditées par les autorités compétentes comme celle de l'OCDE (Organisation de Coopération et de Développement Economique) pour les essais de produits chimiques (39; 40; 41).

La perméation cutanée concerne de nombreuses étapes du développement des médicaments transdermiques. Elles peuvent servir à la sélection de nouveaux candidats à l'administration transdermique, apporter un support à la formulation, évaluer la biodisponibilité du médicament et son profil pharmacocinétique ou encore apporter la preuve de la bioéquivalence d'un médicament générique. En raison des différents objectifs, les méthodes employées ne sont pas toujours les mêmes. Elles se regroupent en trois grandes catégories : les études *in vivo*, les études *in vitro* et les études *in silico*.

1.5.2. Les études *in vivo*

1.5.2.1. Les modèles animaux

Le rat est l'espèce la plus utilisée mais les études peuvent être réalisées sur d'autres espèces. Pour la constitution d'un groupe d'individus homogène, il faut considérer le sexe, l'âge et la lignée des animaux ainsi que leur poids et leur état de santé (40).

1.5.2.2. Les méthodes

1.5.2.2.1. Etudes pharmacocinétiques

1.5.2.2.1.1. Dosage dans les excréta

Il s'agit d'appliquer le produit à étudier sur la peau de l'animal et de recueillir ses urines pendant 120 h. Le principe actif est ensuite injecté par voie intraveineuse (IV) et les urines recueillies à nouveau pendant 120 h. Le rapport des quantités excrétées dans les urines pendant 120 h lors de l'administration cutanée et lors de l'administration IV est appelé « biodisponibilité absolue par voie topique ». Il donne deux renseignements principaux : le pourcentage de la quantité appliquée éliminée dans les urines et le pourcentage de la quantité appliquée retenue ou métabolisée dans la peau. Cette méthode très lourde est peu utilisée mais elle a permis des comparaisons entre principes actifs, entre sites d'application ou encore entre espèces animales (42).

1.5.2.2.1.2. Suivi du taux plasmatique

Il s'agit de réaliser le dosage plasmatique du principe actif au cours du temps, après administration cutanée. Elle peut être analysée sur une échelle semi-logarithmique.

La concentration plasmatique du principe actif à un instant donné après administration cutanée, est la résultante du flux de passage transdermique et de la clairance d'élimination. Le dosage plasmatique du principe actif au cours du temps, après administration cutanée, permet d'établir la pharmacocinétique du médicament et de distinguer trois phases : la phase d'absorption où ce processus est majoritaire, la phase d'équilibre et la phase d'élimination où la quantité absorbée ne compense plus les quantités transformées ou excrétées (42).

1.5.2.2.2. Le « tape stripping »

Dans ce cas, le produit à étudier est appliqué pendant une durée définie à la surface de la peau puis éliminé par lavage. Une quinzaine de couches successives du *Stratum corneum* sont arrachées à l'aide d'un ruban adhésif puis dosées. C'est le stockage au niveau du SC qui est ainsi mesuré. La biodisponibilité du produit est déduite du stockage du SC par une relation valable quels que soient la substance considérée, les excipients, la concentration et la surface d'application : pour 15 couches retirées, après 30 minutes d'application, le rapport entre la quantité absorbée et la quantité dans le SC est de 1,8. Cette relation ne s'applique pas en cas d'adsorption ou de métabolisation de l'actif dans le SC (42).

1.5.2.2.3. La microdialyse

Cette méthode permet de déterminer la cinétique de passage d'une molécule dans le milieu extracellulaire d'un tissu ou d'un organe. Un fin cathéter de dialyse, dans lequel circule une solution physiologique, est inséré sous le derme. La molécule d'intérêt est ainsi extraite du liquide interstitiel par dialyse puis dosée en sortie du cathéter (Figure 10).

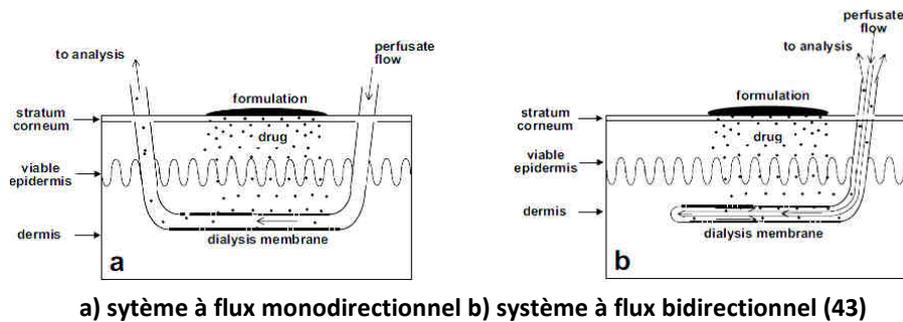


Figure 10 : Deux systèmes de microdialyse

Les molécules de hauts poids moléculaire ne sont pas filtrées par la membrane de dialyse, ce qui limite les dégradations enzymatiques et les interférences analytiques. Le nombre d'échantillon est illimité, puisque les tissus ne sont pas endommagés par les prélèvements. Cette méthode permet donc d'établir une cinétique des concentrations en principe actif au niveau du derme, ce qui présente un intérêt pour les études de biodisponibilité des formes topiques (43).

1.5.3. Etude *ex vivo* sur organe isolé perfusé

Le modèle est un organe isolé vascularisé artificiellement. Il offre donc l'avantage de permettre de travailler sur un tissu vivant dont la dynamique vasculaire et les fonctions métaboliques sont maintenues. Dans la littérature, sont décrits des travaux sur pis de vache, oreille de souris hairless, de lapin, de porc, patte antérieure de porc ou peau de porc isolée. Ce dernier modèle présente l'avantage de ne pas nécessiter le sacrifice de l'animal (32).

1.5.4. Les études de perméation cutanée *in vitro*

La mise en œuvre d'études *in vivo* de la perméation cutanée se heurte à des problèmes éthiques et des limites de coût. Au niveau européen, l'utilisation des animaux pour les tests de laboratoire en général est encadrée par des directives (86/609/CEE). Elles s'articulent autour de trois principes, c'est la règle dite des trois R (réduire, raffiner, remplacer). Les industriels sont appelés à réduire le nombre d'animaux utilisés pour tester leurs produits, à raffiner les tests utilisés, c'est-à-dire améliorer le rapport entre les dommages animaux et les informations obtenues, ainsi qu'à remplacer les tests sur les animaux par des solutions alternatives *in vitro* ou *in silico*.

1.5.4.1. Principe des études *in vitro*

Il s'agit de modéliser *in vitro* le phénomène de passage transdermique à l'aide d'une cellule de diffusion. Le passage du composé depuis un milieu donneur vers un milieu receveur, à travers un système membranaire (peau excisée, peau reconstruite, membrane synthétique...) est suivi par dosages réguliers dans le milieu receveur.

1.5.4.2. La cellule de diffusion

Les protocoles et les conditions opératoires pour les études *in vitro* de perméation cutanée ne sont pas standardisés et varient beaucoup d'un laboratoire à l'autre.

Il existe plusieurs types de cellule. Tous comportent un compartiment donneur, séparé du compartiment receveur par la membrane d'étude (44). Le choix de la cellule dépend du produit à analyser. Dans le cas d'une solution saturée, le schéma de type horizontal (*side-by-side*, Figure 11) permet l'agitation constante du milieu donneur et évite l'accumulation de particules solides à la surface de la membrane d'étude. Cette cellule est aussi intéressante pour l'étude de produits dans une phase gazeuse.

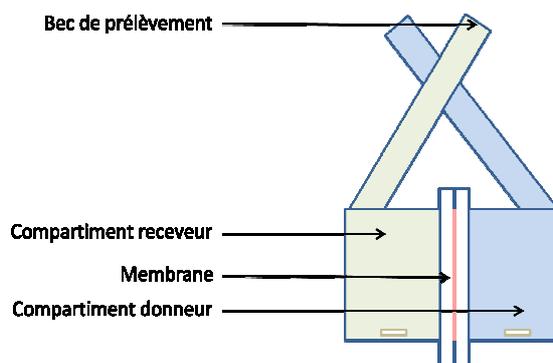


Figure 11: Cellule de diffusion horizontale (conditions statiques) (44)

Les cellules verticales (type cellules de Franz, Figure 12) sont, quant à elles, plus à même de simuler les conditions *in vivo*. Elles permettent l'étude de produits semi-solides et donnent le choix de travailler en condition occlusive ou non.

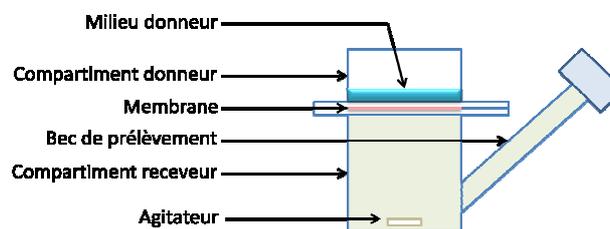


Figure 12 : Cellule de Franz (conditions statiques) (44)

Les dimensions de la cellule sont définies en fonction de la surface d'échange et des volumes des compartiments donneur et receveur souhaités.

Pour les membranes biologiques, la perméabilité n'est pas toujours homogène. Augmenter la surface d'échange permet de limiter l'impact de cette variabilité, c'est pourquoi le choix de la surface d'échange est un compromis entre coût et maîtrise de la variabilité.

En régime statique, le milieu receveur n'est pas renouvelé en cours d'expérimentation. L'accumulation de composés passés à travers la membrane peut entraîner un ralentissement de la diffusion. Pour s'affranchir de ce phénomène, il est indispensable de se placer dans les conditions SINK : la concentration dans le milieu receveur est maintenue à tout moment en dessous de 10 % de la solubilité à saturation (45; 46). Ainsi, la dissolution du composé dans le milieu receveur n'est-elle pas significativement influencée par l'augmentation de sa concentration. Les paramètres à ajuster ici sont les quantités initiales déposées, la composition et le volume de milieu receveur.

En régime dynamique, le milieu receveur est renouvelé en flux continu (cellules à flux continu, Figure 13).

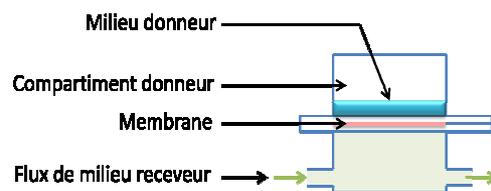


Figure 13 : Cellule à flux continu (44)

Les conditions SINK sont assurées, ce qui facilite l'étude de composés à faible solubilité dans le milieu receveur. Cependant, la dilution occasionnée oblige à s'assurer que la méthode de dosage est suffisamment sensible et que sa limite de quantification est faible.

1.5.4.3. Caractéristiques du milieu donneur

Le choix du milieu donneur est très important car il influence la première étape de distribution du composé vers le SC (cf 1.4.1.1). L'étape suivante de diffusion du composé dans le SC peut elle aussi dépendre de la composition du véhicule. Par exemple, certains promoteurs d'absorption modifient la structure des lipides intercellulaires ou des protéines intracellulaires et orientent la voie de passage majoritaire du composé étudié.

Un paramètre à contrôler est la dose appliquée. Il est possible de travailler soit en condition dite de « dose finie », soit en « dose infinie ». La technique de dose infinie consiste à appliquer une dose suffisante pour que les changements de concentration du milieu donneur, causés par la diffusion ou l'évaporation soient négligeables (44). Le calcul du coefficient de perméation (K_p) est alors possible sur la partie linéaire de la cinétique de perméation en appliquant la loi de Fick. La dose finie reproduit les conditions réelles d'utilisation, la cinétique présente un ralentissement final témoignant de la déplétion du milieu donneur.

Le compartiment donneur peut être fermé (conditions occlusives) ou non (conditions non occlusives). Les conditions non occlusives permettent les échanges avec le milieu extérieur et notamment l'évaporation et donc la concentration du milieu donneur. Les conditions occlusives peuvent, quant à elles, favoriser une hydratation importante de la peau donc majorer l'absorption.

1.5.4.4. Caractéristiques du milieu receveur

Le milieu receveur doit remplir trois conditions principales, il doit permettre le respect des conditions SINK, il ne doit pas altérer la membrane et ne doit pas interférer au niveau analytique.

La composition du milieu receveur est donc ajustée en fonction de la molécule étudiée, pour assurer une solubilité suffisante pour le respect des conditions SINK (cf 1.5.4.2). Ce milieu doit être le plus simple possible, aqueux, isotonique (le plus souvent grâce à 0,9 % m/v de NaCl) et tamponné à pH 7,4 (le plus souvent grâce à un tampon phosphate). Dans le cas où la substance d'essai n'est pas suffisamment soluble en milieu aqueux, de l'éthanol ou un tensio-actif peuvent être utilisés (46). Dans le cas où l'étude se prolonge au-delà de 48h, en présence de membranes biologiques, un conservateur peut être ajouté dans le milieu receveur (azide de sodium, formaldéhyde...) pour éviter la prolifération bactérienne.

Le milieu receveur le plus utilisé dans les études de perméation *in vitro* est un tampon phosphate pH 7,4 (cf. Annexe 1).

1.5.4.5. Caractéristiques des membranes

1.5.4.5.1. Détermination de l'intégrité des membranes

Les résultats des études de perméation cutanée peuvent être biaisés si l'une des membranes utilisée est lésée. Pour s'assurer de l'intégrité des membranes, le test de référence est la mesure de la perte insensible en eau (PIE) (39; 47).

La perte insensible en eau est un phénomène passif de transfert d'eau au travers de la peau sous l'influence du gradient de pression de vapeur d'eau de part et d'autre de la membrane. La description mathématique de ce phénomène dérive de la loi de Fick :

$$J = -K_m \times D \times \frac{\Delta C}{\Delta \delta}$$

Avec J, le flux d'eau à travers la peau, K_m , le coefficient de partage de l'eau entre le *Stratum corneum* et l'épiderme vivant, D, le coefficient de diffusion de l'eau dans le *Stratum corneum* et $\Delta C / \Delta \delta$, le gradient de tension de vapeur d'eau à travers la peau (48).

Comme il s'agit d'un phénomène passif, la perte insensible en eau se produit aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*. Dans le cadre des études de perméation cutanée réalisées *in vitro*, sa valeur absolue dépend de nombreux paramètres opératoires, en particulier la température du milieu receveur, l'humidité relative de l'air ambiant ou encore le type de peau et son épaisseur. C'est pourquoi elle est exploitée de façon relative : une valeur de PIE qui s'écarte significativement de la moyenne est le signe d'une peau lésée.

La mesure de la PIE s'effectue selon la méthode du « cylindre ouvert » à l'aide d'un appareil spécifique comme le Tewamètre® commercialisé par la société Courage + Khazaka electronic GmbH. La sonde de mesure (Figure 14) est constituée d'une chambre cylindrique dans laquelle sont placées deux électrodes parallèles à la surface cutanée, respectivement à 3 et 9 mm de cette surface.

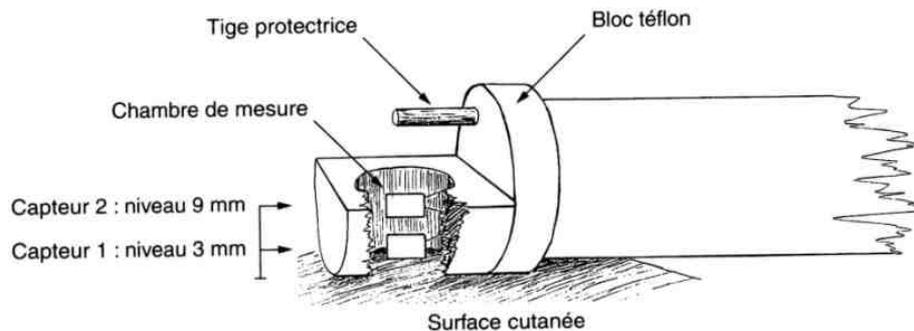


Figure 14 : Sonde de mesure de la PIE (48)

Ces électrodes sont constituées d'un semi-conducteur et permettent de mesurer l'humidité relative à chaque niveau. L'appareil en déduit la différence de tension de vapeur entre les deux électrodes et donc la PIE correspondante, exprimée en g/m^2h (48).

1.5.4.5.2. La peau excisée

La peau humaine est le modèle le plus représentatif de la réalité clinique. Les échantillons de peau utilisés proviennent de services de chirurgie (chirurgie plastique, amputations) ou de cadavres (49) et sont obtenus après autorisation de l'Agence de Biomédecine (50).

Outre les problèmes éthiques, l'utilisation de peau humaine pose des problèmes de coût et de disponibilité, si bien que l'expérimentateur contrôle difficilement le site de prélèvement ou les caractéristiques individuelles des donneurs (âge, sexe, pathologie...).

Les peaux animales sont une alternative intéressante en regard de ces inconvénients. Les espèces les plus citées sont la souris, le rat, le cochon d'Inde et le porc (49) mais on relève aussi utilisation de peau de singe, de lapin ou encore de serpent (51).

Il est possible de travailler avec toute l'épaisseur de la peau, c'est-à-dire derme et hypoderme. Cependant, *in vivo*, lorsqu'un composé est absorbé à travers la peau, il rejoint la circulation sanguine au niveau des capillaires du derme. *In vitro*, le derme représente donc une barrière supplémentaire absente *in vivo*. Pour s'en affranchir, la peau peut être sectionnée parallèlement à la surface, à épaisseur constante, à l'aide d'un dermatome ou traitée par la chaleur pour séparer l'épiderme du derme.

Les études peuvent être réalisées sur peau fraîche, ce qui permet de conserver l'activité métabolique de la peau ou sur peau congelée à température inférieure à $-20^{\circ}C$ (49).

1.5.4.5.3. La peau humaine reconstituée

Les peaux reconstituées ont été développées comme alternative aux peaux excisées. Il s'agit de tissus obtenus *in vitro* à partir de kératinocytes cultivés sur un substrat qui peut être du « derme dé-épidermisé », une matrice de collagène ou un filtre inerte et contenant ou non des fibroblastes. La différenciation des kératinocytes est reproduite grâce à l'utilisation de supports et de milieux de culture spécifiques, ce qui donne une structure très proche de la peau humaine mais sans les annexes cutanées. Les deux produits commerciaux principaux sont EpiSkin® (L'Oréal) et Epiderm® (MatTek).

Comme il s'agit de modèles vivants, ils donnent des résultats fiables pour les études d'irritation et de métabolisme cutané (5; 49). Cependant, pour la plupart des principes actifs, leur perméabilité est supérieure à celle de la peau humaine (51). Par des techniques de

cristallographie, il a été montré que les lipides extra-cellulaires des peaux natives et ceux des peaux reconstituées ne sont pas organisés selon le même schéma cristallin, ce qui pourrait expliquer les différences de perméabilité observées (5).

1.5.4.5.4. Les membranes synthétiques

Il s'agit de membranes de silicone, de membranes de cellulose de type membrane de dialyse, de membranes en polycarbonates, de filtres nylon (0,45 µm) ou encore de membranes carbosil.

Elles peuvent faire partie intégrante de plaques multipuits (type 96 puits), notamment pour des études de criblage.

Les membranes synthétiques sont facilement disponibles et donnent des résultats très reproductibles, mais ne permettent pas de simuler la structure complexe de la peau. Elles sont utilisées en contrôle qualité des formes topiques (49).

1.5.4.6. Conditions opératoires

1.5.4.6.1. La température et l'agitation

Les études sont habituellement conduites à une température voisine de celle de la surface de la peau (32°C ± 3°C). Il est possible de réaliser un gradient de température entre la surface de la peau (32°C) et le milieu receveur (37°C) pour se rapprocher des conditions *in vivo* (39; 46).

Le milieu receveur doit être agité en continu pour permettre le respect des conditions SINK.

1.5.4.6.2. La durée de l'expérience et l'échantillonnage

La durée de l'expérience et les temps de prélèvement du milieu receveur dépendent de l'objectif de l'étude, le but étant souvent d'atteindre l'état d'équilibre. Dans les études *in vitro* publiées entre 2009 et 2011 (Annexe 1), la durée de l'expérience varie de 6 à 72 h. Les temps de prélèvements sont, dans la majorité des cas, plus rapprochés en début d'expérience, pour une meilleure résolution de la courbe des quantités cumulées en phase ascendante.

La ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques recommande une période d'échantillonnage de 24h pour ce type d'étude sachant que les membranes biologiques non viables peuvent commencer à se détériorer à partir de 24h (39).

A la fin de l'expérience, un dosage du principe actif dans la peau et le compartiment donneur peut être réalisé pour avoir des informations supplémentaires sur la biodisponibilité du produit. La ligne directrice de l'OCDE sur les essais de produits chimiques recommande une telle procédure en fin d'expérimentation (39).

1.5.4.7. Les méthodes d'analyse

Tous les éléments sont susceptibles d'être analysés : compartiment donneur, produits de rinçage de la surface de la peau, peau et fluide receveur.

Pour le dosage du principe actif dans le milieu receveur, les exigences de performance de la méthode d'analyse dépendent de l'objectif visé. Pour optimiser le temps d'analyse des échantillons (souvent nombreux), il est préférable que la méthode analytique soit applicable

directement aux prélèvements, sans traitement de l'échantillon, et automatisable. Pour pouvoir être capable de quantifier le principe actif même si son passage transcutané est très faible, elle doit avoir une limite de quantification la plus faible possible et une large plage de linéarité. Le dosage n'a pas pour objectif de séparer d'éventuelles impuretés. Il doit cependant être spécifique du principe actif considéré : ni les excipients contenus dans la formulation étudiée, ni les substances relarguées par la peau, ni les constituants du milieu récepteur ne doivent interférer.

Dans la majorité des études de perméation cutanée *in vitro* (Annexe 1), un dosage par chromatographie liquide haute performance (HPLC) du principe actif dans le milieu receveur est proposé.

Une quantification par spectrométrie d'absorption UV a l'avantage d'être simple mais risque de nécessiter des prélèvements plus importants et d'être moins facilement automatisable.

Pour le test toxicologique d'absorption cutanée des produits chimiques, l'OCDE recommande le radio-marquage de la substance d'essai (39). Il s'agit d'utiliser un principe actif radio-marqué pour les essais (avec, par exemple du carbone 14) (52) et de doser les prélèvements par scintillation liquide.

1.5.5. Estimation de la perméation cutanée par un modèle mathématique

Comme tous les phénomènes d'absorption, la perméation cutanée a fait l'objet de modélisations mathématiques dans le but de réaliser des prédictions rapides à moindre coût.

Les équations de perméation sont établies selon deux approches principales : l'approche empirique, basée sur l'exploitation des données expérimentales d'un grand nombre de molécules et l'approche mécanistique qui utilise la connaissance de la peau et des voies de passage des molécules à travers celle-ci (53).

Dans tous les cas, la perméabilité d'une molécule est décrite par le coefficient de perméabilité K_p , selon :

$$K_p = \frac{K \cdot D}{h}$$

avec K, le coefficient de distribution entre le véhicule et le SC, D, le coefficient de diffusion du composé dans le SC, et h, l'épaisseur du *Stratum corneum*.

1.5.5.1. Les modèles empiriques

La modélisation empirique a pour but d'établir une relation quantitative entre la structure des molécules et leur paramètre de perméation (K_p). Les relations sont obtenues par régression statistique à partir de bases de données expérimentales d'études *in vitro* d'un grand nombre de molécules.

1.5.5.1.1. Mesures de K_p

K et D/h^2 sont déduits des quantités cumulées dans le milieu receveur (Q) grâce à la seconde loi de Fick, selon l'équation suivante :

$$Q = KhC_v \left(\frac{D}{h^2} t - \frac{1}{6} - \frac{2}{\pi^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{(-1)^n}{n^2} e^{\left(\frac{-Dn^2\pi^2 t}{h^2} \right)} \right)$$

avec Q , la quantité cumulée passée par unité de surface en fonction du temps t et C_v , la concentration en composé dans le milieu donneur. Ainsi, K_p peut être déduit (53).

1.5.5.1.2. Bases de données de valeurs de K_p

Le statisticien dispose de plusieurs bases de données de valeurs de K_p . La plus utilisée est la base de données de Flynn qui comprend 97 composés de masses molaires (MM) comprises entre 18 et 765 et de coefficient de partition octanol/eau ($K_{o/w}$) compris entre -3 et +6 (54). Ces données sont issues d'études de perméation réalisées *in vitro* sur peau humaine à partir d'une solution aqueuse du produit étudié. Les limites de la base de données de Flynn sont :

- la faible proportion de composés hydrophiles ;
- la faible proportion de composés fortement lipophiles ;
- l'absence de prise en considération de l'état d'ionisation des molécules ;
- l'absence de prise en considération de la température d'étude (53).

Plus récente, la base de données européenne EDETOX (Evaluation et prédiction de l'absorption cutanée des substances chimiques toxiques) comprend 300 études sur peau humaine et permet des comparaisons de type peau humaine *versus* peau de rat, étude statique *versus* dynamique, dose finie *versus* dose infinie... etc (55).

1.5.5.1.3. Les modèles de QSPR (quantitative structure-permeation relationship)

Le modèle le plus cité est celui de Potts et Guy qui est une régression linéaire entre les données de masse molaire (MM) et de coefficient de partage octanol-eau ($K_{o/w}$) et les données de K_p de la base de données de Flynn. Le meilleur ajustement est obtenu avec l'équation suivante :

$$\log K_p (cm \cdot h^{-1}) = -2,72 + 0,71 \cdot \log K_{o/w} - 0,0061 \cdot MM$$

Le coefficient de corrélation trouvé par ces auteurs est de 0,67.

Les principales limites de ce modèle sont la surestimation de la perméabilité des composés très lipophiles et le fait que l'ionisation des molécules n'est pas prise en compte (56).

Ce modèle a été évalué et recalculé dans des travaux plus récents. Des modèles utilisant d'autres variables explicatives ont été calculés. Par exemple, Buchwald et Bodor, pour s'affranchir de la colinéarité des deux variables $\log P$ et MM, ont proposé de les remplacer par N , la capacité des composés à former des liaisons hydrogènes et V_e , leur volume effectif de Van der Waals (57).

La forte variance résiduelleⁱ de ces modèles s'explique par l'hétérogénéité des données analysées qui proviennent d'études réalisées dans des conditions différentes, sur des peaux d'origine différentes... etc.

Les écarts d'ajustements (r^2)ⁱ, quant à eux, mettent en évidence l'hétérogénéité de structure chimique des composés présents dans les bases de données. Souvent, l'un ou l'autre de ces modèles est plus fiable pour une famille de composés donnée (58).

1.5.5.1.4. Les nouveaux modèles

D'autres modèles, moins utilisés, ont été mis au point. Par exemple, une relation quantitative entre les paramètres de rétention en chromatographie micellaire et les paramètres de perméation a pu être établie. Des techniques statistiques différentes peuvent être utilisées. C'est le cas de l'analyse en composantes principales et de l'analyse par réseaux neuronaux artificiels qui permettent d'explorer des relations non linéaires entre les paramètres ou bien de l'approche par *fuzzy modelling* qui consiste à attribuer aux composés chimiques des degrés d'appartenance à un groupe pour simplifier les analyses (53; 59).

Ce type d'approche très complexe pose des problèmes car elle ne présente aucun modèle ou algorithme de calcul formel (60).

1.5.5.2. Les modèles mécanistiques

Les modèles mécanistiques dérivent des connaissances théoriques du passage transcutané des molécules.

Pour décrire la barrière cutanée, trois modèles ont été retenus :

- le *Stratum corneum* seul en tant que membrane finie ;
- le *Stratum corneum* en tant que membrane semi-infinie ;
- le *Stratum corneum* et l'épiderme viable comme une membrane composite finie (Figure 15).

Le calcul s'appuie sur la *scaled particle theory* selon laquelle, la diffusion des composés dans l'espace intercellulaire dépend de la densité et de l'organisation des bicouches lipidiques, mais aussi du rayon moléculaire du soluté. Le modèle obtenu est très proche du modèle de Potts et Guy (53).

ⁱ Les modèles sont déterminés par régression linéaire multiple où une variable expliquée (le K_p) est la combinaison linéaire de variables explicatives ($\log P$, MM, N, V_e ...). Une analyse de variance de la régression (ANOVA) est ensuite réalisée. La variabilité totale des K_p (variance totale) de la base de données est modélisée comme la somme de variabilités due à chacune des variables explicatives (variance du $\log P$, variance de la MM... etc.) et de la variabilité aléatoire (variance résiduelle). L'ajustement du modèle est évalué par le coefficient de corrélation (r^2).

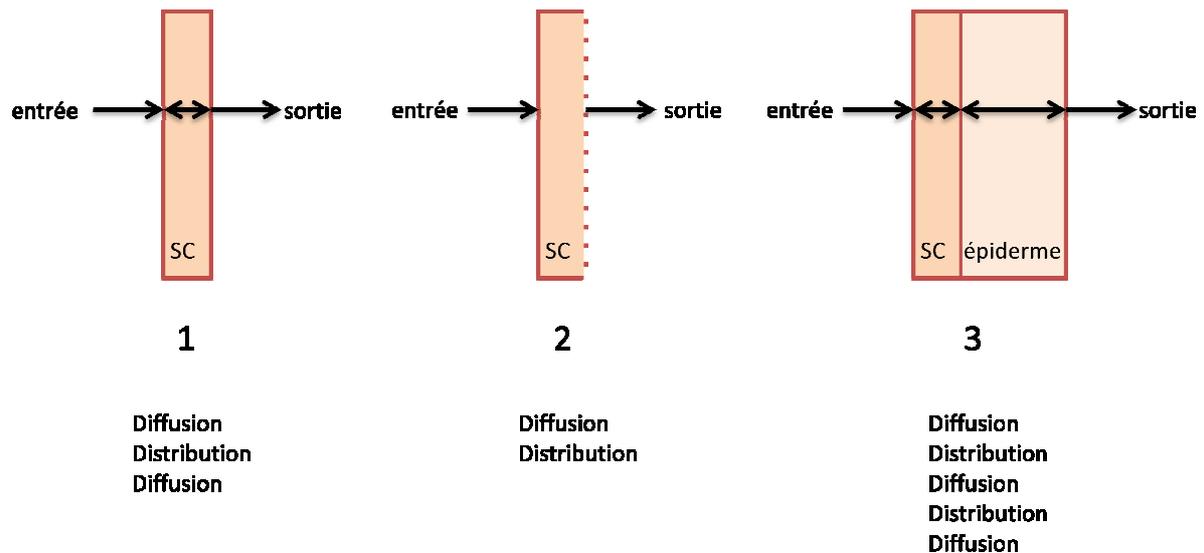


Figure 15 : Modélisation de la barrière cutanée pour les modèles mécanistiques

1.6. Conclusion : place des études de perméation cutanée in-vitro dans le développement d'un médicament

Le passage transdermique dépend des caractéristiques physicochimiques des molécules : ionisation, hydrophilie, masse molaire. Dans la littérature, sont décrits des travaux de modélisation statistique qui permettent de prédire le passage d'une molécule à partir de ses caractéristiques physicochimiques. Ces équations ont été établies à partir des données de perméation d'un grand nombre de molécules.

Cependant, de tels modèles ne s'avèrent pas assez fiables, et bien qu'ils permettent de sélectionner des candidats médicaments, une confirmation est nécessaire par des études *in vitro*. Ces dernières sont les méthodes de choix pour le criblage de formules. Elles peuvent être un critère d'évaluation pertinent de la stabilité des formes transdermiques ou servir à étudier l'influence de divers facteurs, comme l'hydratation cutanée, sur la cinétique de perméation. En final, le dossier d'AMM ne peut pas se passer d'études toxicologiques et pharmacocinétiques *in vivo*.

2. Evaluation de la peau de porc et de la peau de souris comme modèle pour les études de perméation cutanée dans un contexte de formulation de médicaments transdermiques

2.1. Objectif

Comme il a été exposé en première partie, le galéniste dispose aujourd’hui de technologies pointues pour optimiser la formule d’un dispositif transdermique. Il a cependant besoin d’un critère d’évaluation de ses formulations : le profil de perméation cutané. Dans ce type d’application, les études *in vitro* sont les méthodes de choix car elles permettent l’étude comparative d’un grand nombre d’échantillons. L’objectif est de déterminer la formule présentant le meilleur profil. Souvent, il s’agit d’atteindre le plus rapidement possible un état d’équilibre où le flux de passage du principe actif est constant et durable.

La capacité discriminante du modèle est donc un critère majeur de performance pour ce type d’étude.

L’objectif de ma thèse d’exercice est de comparer la peau de souris et la peau de porc en tant que modèle pour ce type d’étude *in vitro*. Deux critères d’évaluation ont été choisis : la représentativité du modèle vis-à-vis de la peau humaine et sa capacité discriminante vis-à-vis de formulations différentes.

2.2. Représentativité du modèle : étude bibliographique

2.2.1. Comparaison de la peau de porc et de la peau de souris par rapport à la peau humaine sur le plan physiologique

D’un point de vue physiologique et histologique, la peau de porc est plus proche de la peau humaine que la peau de souris.

La peau de souris présente un épiderme plus fin que celle de l’homme et du porc. La jonction dermo-épidermique ne présente pas de papilles dermiques (cf. 1.1.5). Les cellules épidermiques de la lame basale ont toutes la même morphologie là où, chez l’homme, deux formes cellulaires peuvent être distinguées (61).

La structure de la peau de porc a été beaucoup étudiée dans le but de la comparer à la peau humaine. Pour cela, de nombreuses méthodes d’analyse physico-chimiques et biologiques ainsi que des techniques d’imagerie ont été utilisées.

D’un point de vue macroscopique, la peau du porc présente une similitude avec la peau humaine qui n’est pas retrouvée chez les autres espèces : il s’agit des microreliefs qui parcourent la surface cutanée (62).

Si l’épiderme de la plupart des Mammifères (dont les rongeurs et les singes) est plus fin que celui de l’homme, celui du porc a une épaisseur voisine. Cette observation peut être reliée au fait que comme l’homme, le porc possède des poils très épars qui ne jouent pas le rôle protecteur, comme c’est le cas du pelage des autres Mammifères (61; 62). L’épiderme porcine induit une réponse positive aux anticorps anti-kératine et aux anticorps contre la protéine S-100 des mélanocytes humains (61).

Chez le porc domestique adulte, une couche cornée très épaisse, correspondant à une hyperkératinisation connue chez l'homme est observable en microscopie optique. Une couche cornée d'épaisseur semblable au *Stratum corneum* humain est retrouvée au niveau de l'oreille de porc adulte (63) ou chez le porc nouveau-né (64; 65) (cf. Tableau 4).

Origine de la peau	Épaisseur moyenne du <i>Stratum corneum</i> (± écart-type)	Nombre de poil / cm ² (± écart-type)	Référence
Peau de porc adulte	26,4 ± 0,4, n = 35	11 ± 1, n = 6	(64)
Peau de porc nouveau-né (flanc)	13,4 ± 0,5 µm, n = 12	1256 ± 60, n = 10	(64)
Peau d'oreille de porc adulte	21 µm, n = 6	20, n = 6	(63)
Peau humaine	16,8 ± 0,7 µm, n = 16	11 ± 1 n = 6	(64)

Tableau 4 : Comparaison de l'épaisseur des *Stratum corneum* humain et porcine et de la pilosité des deux espèces

La jonction dermo-épidermique du porc ressemble beaucoup à celle de l'homme. Les papilles dermiques sont observables et la lame basale de l'épiderme présente une hétérogénéité de morphologie cellulaire avec coexistence de cellules dentelées et non dentelées (61; 62). La structure du derme porcine est proche de celle de l'homme par l'organisation des fibres de collagène et d'élastine (61). Chez le porc, on observe une structure protectrice autour des mastocytes qui n'existe pas chez l'homme. Les structures vasculaires se ressemblent et les endothéliums porcins induisent une réponse positive aux anticorps anti facteur VIII humain. La vascularisation est cependant plus pauvre chez le porc (61; 62).

La taille et le diamètre du poil et du follicule pileux sont semblables (63). Les pilosités des deux espèces sont équivalentes (62; 66), sauf dans le cas du porc nouveau-né qui possède une densité de poils plus importante (63) (cf. Tableau 4). Le follicule pileux très vascularisé chez l'homme ne l'est pas du tout chez le porc. Chez l'homme, à l'exception de certaines régions particulières, les glandes sudoripares eccrines sont prédominantes (1.1.7.3) alors qu'elles n'existent pas chez le porc qui possède des glandes sudoripares apocrines sur toute la surface du corps. Ces glandes ne sont pas liées au follicule pileux comme les glandes sudoripares apocrines de l'homme (cf. 1.1.7.3.2) mais existent indépendamment (62).

Enfin, la composition lipidique de l'épiderme porcine est très voisine de celle de la peau humaine, notamment sa teneur en glycosphingolipides et en céramides (51).

En conclusion, même si des différences sont à prendre en compte, la peau de porc est physiologiquement plus proche de la peau humaine que celle des autres mammifères, dont la souris.

2.2.2. Comparaison de la peau de porc à la peau humaine en termes de perméabilité

Différents auteurs ont comparé la perméabilité *in vitro* de la peau de porc et de la peau humaine vis-à-vis de molécules variées (Tableau 5). Pour cela, ils ont calculé un facteur de différence en faisant le rapport entre les flux à l'équilibre obtenus sur peau de porc et sur peau humaine. Même si les conditions opératoires utilisées dans les différentes études (type de cellule de diffusion, véhicule donneur, milieu récepteur... etc.) sont différentes, elles sont à chaque fois identiques pour une même étude, ce qui permet de comparer les facteurs de différence entre eux. Il faut cependant tenir compte du fait que la structure physiologique de la peau peut varier en fonction du type de peau utilisée (cf. 2.2.1).

Avec des facteurs de différence inférieurs à 5 pour de nombreuses molécules, la peau de porc est unanimement reconnue comme possédant une perméabilité très proche de celle de la peau humaine (Tableau 5).

Référence	Type de peau de porc	Produit testé	Facteur de différence : $J_{eq(porc)}/J_{eq(homme)}$	
(64)	Flanc de <i>Sus Scrofa</i> décédé peu de temps après la naissance 1,4-1,8 kg, peau entière d'épaisseur 600 µm	Eau	1,1	
		Mannitol	28,5	
		Propranolol HCl	1,5	
(66)	Dos de Göttingen minipig de 1,5 mois (3 kg), dermatomée à 765 µm	Nicotine	1,1	
		Acide salicylique	1,0	
		Testostérone	1,6	
	Dos de Göttingen minipig de 3 mois (7 kg), dermatomée à 765 µm	Nicotine	0,8	
		Acide salicylique	0,7	
		Testostérone	0,4	
	Dos de Göttingen minipig de 6 mois (13 kg), dermatomée à 765 µm	Nicotine	1,0	
		Acide salicylique	1,1	
		Testostérone	0,7	
	Dos de porc domestique de deux ans (20 kg), dermatomée à 765 µm	Nicotine	1,0	
		Acide salicylique	1,9	
		Testostérone	1,1	
(67)	Dos de miniporc Yucatan de moins de 6 mois, peau entière d'épaisseur 2 mm	Ibuprofène	0,2	
		Indométhacine	0,6	
		Ketoprofène	0,1	
		Diclophénac (de Na)	0,6	
		Antipyrine	0,3	
	Flanc de miniporc Yucatan de moins de 6 mois, peau entière d'épaisseur 1,5 mm	Ibuprofène	0,3	
		Indométhacine	0,6	
		Ketoprofène	0,2	
		Diclophénac (de Na)	0,6	
		Antipyrine	0,3	
		Terbinafine	/ ⁱⁱ	
		Clotrimazole	1,0	
(68)	Porc domestique ⁱ Femelle de 5 mois Dermatomée 600 µm	Hydrocortisone	0,5	
		Acide salicylique	0,6	
		Terbinafine	/ ⁱⁱ	
		Clotrimazole	1,0	
	Miniporc Göttingen ⁱ Femelle de 5 mois Dermatomée 600 µm	Hydrocortisone	0,4	
		Acide salicylique	0,4	
		Eau	2,7	
		Mannitol	28,3	
(69)	Oreille de porc (Cheshire White) Peau entière ⁱⁱⁱ	Paraquat	8,5	
		Eau	2,4	
		Mannitol	21,3	
	Oreille de porc (Cheshire White) Épiderme ⁱⁱⁱ	Paraquat	23,5	
		Carbaryl	1,2	
		Aldrin	2,8	
		Fluazifop-butyl conc	5,4	
		Fluazifop-butyl aq	4,3	
		benzoxazinone	0,7	
		6-méthyl benzoxazinone	1,1	
	(65)	Peau de porc hybride Golland-Pietran nouveau-né (quelques heures) ⁱ 1,2 kg Tissu adipeux sous-cutané éliminé ⁱⁱⁱ	6-hydroxy benzoxazinone	1,2
			6-méthoxy benzoxazinone	0,8
6-chloro benzoxazinone			1,7	
7-méthoxy benzoxazinone			1,9	
7 chloro benzoxazinone			0,5	

Tableau 5 : Comparaison des peaux humaine et porcine en termes de perméabilité à différentes molécules

ⁱ La zone anatomique dermatomée n'est pas disponible

ⁱⁱ Le flux à l'équilibre sur la peau humaine est inférieur à la limite de quantification 0,01 µg/cm²/h.

ⁱⁱⁱ L'épaisseur de la peau utilisée n'est pas disponible

2.3. Capacité discriminante : étude expérimentale sur des patch de nicotine

2.3.1. Objectif

La capacité discriminante d'un modèle de perméation *in vitro* dépend de la membrane utilisée car elle est directement reliée à la variabilité de la perméabilité de celle-ci. En effet, lors d'une comparaison statistique de moyennes, la plus petite différence significative est d'autant plus grande que les écarts-types sont grands.

Cette étude expérimentale a été réalisée dans le cadre de mon stage de Master 2 au Service de Développement Analytique à l'Institut de Recherche et Développement Pierre Fabre à Toulouse. Elle a pour but de comparer la peau de porc et la peau de souris en termes de variabilité et de discriminance.

Comme la PIE est un bon indicateur de l'intégrité de la peau, le coefficient de variation des PIE est un bon indicateur de la variabilité de la perméabilité des peaux.

Lors d'une étude antérieure réalisée à l'Institut de Recherche et Développement Pierre Fabre en 2004, une différence significative avait été mise en évidence entre différents patch de nicotine du commerce dont les formules sont différentes (Nicotinell[®], Niquitin[®], Nicopatch[®], Nicorette[®]). Cette étude expérimentale, réalisée en 2011, compare les résultats de perméation obtenus avec ces quatre patchs sur peau de porc avec l'étude de 2004. Si la peau de porc permet de conclure elle aussi à une différence significative, alors le modèle sera considéré comme suffisamment discriminant pour des études de screening en formulation.

Le Tableau 6 résume les critères évalués lors de cette étude expérimentale :

Critère d'évaluation	Objectif
Coefficient de variation des PIE	Décrire la variabilité due à la peau
Cinétique de perméation des spécialités Nicotinell [®] , Niquitin [®] , Nicopatch [®] et Nicorette [®]	Décrire la discriminance du modèle entre des formules proches pour des molécules à fort passage transdermique

Tableau 6 : Critères d'évaluation retenus pour l'étude

2.3.2. Matériels et méthodes

2.3.2.1. Choix de la nicotine et description des lots étudiés

2.3.2.1.1. Propriétés physico-chimiques, pharmacocinétiques et pharmacologiques de la nicotine et justification du choix de cette molécule comme référence

La nicotine est un alcaloïde présent dans deux espèces de tabac, *Nicotinia tabacum* et *Nicotinia rustica* (famille des Solanacées). La Figure 16 : Structure chimique de la nicotine présente la structure chimique de la nicotine. Le stéréo-isomère naturel est la l-nicotine (stéréo-isomère S).

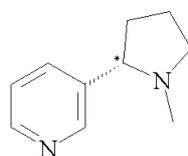


Figure 16 : Structure chimique de la nicotine

Sous forme base, la nicotine est un liquide visqueux incolore soluble dans l'eau et miscible à l'éthanol. Elle possède deux pKa à 6,16 et 10,96. C'est une molécule lipophile de logP 1,17. Son sel de ditartrate (dihydrate) est une poudre cristalline soluble dans l'eau et l'alcool. Son sel de résinate est une poudre blanche ou légèrement jaunâtre pratiquement insoluble dans l'eau (70).

La nicotine est considérée comme le principal constituant de la fumée de tabac responsable de ses effets, et notamment de l'addiction tabagique.

Lors de l'inhalation de fumée de tabac, la nicotine est rapidement absorbée par les muqueuses buccales, nasales et pulmonaires. Le pic de concentration plasmatique est atteint au bout de 10 min en moyenne. La nicotine est retrouvée au niveau du système nerveux central où elle a une action sur les récepteurs nicotiniques à l'acétylcholine.

La biodisponibilité de la nicotine par voie orale, n'est que de 30 à 40 %, en raison de son métabolisme hépatique.

Grâce à ses propriétés amphiphiles et à sa petite taille (son poids moléculaire est de 162 g.mol⁻¹), la nicotine passe à travers les membranes biologiques, dont la peau.

La nicotine est métabolisée principalement au niveau du foie. La demi-vie d'élimination est de deux heures.

La nicotine provoque une dépendance en stimulant la production de neuromédiateurs comme la dopamine qui alimentent le « système de récompense ». Elle provoque aussi une accoutumance qui conduit le fumeur à augmenter les doses.

Le but des traitements substitutifs (patches, gommes à mâcher...) est de diminuer les symptômes de sevrage sans alimenter la boucle de renforcement grâce à une cinétique d'absorption plus lente (71).

La nicotine a été choisie comme substance de référence pour cette étude car son passage transdermique est établi et de nombreux dispositifs transdermiques à la nicotine existent sur le marché.

2.3.2.1.2. Description des lots étudiés

Les quatre mêmes spécialités commercialisées ont été étudiées en 2004 (sur peau de souris) et en 2011 (sur peau de porc) (Tableau 7).

Nom commercial	Dosage	Quantité de nicotine par dispositif (72)	Laboratoire	Année d'obtention de la dernière AMM (11)
Nicotinell®	14 mg / 24 h	35 mg	Novartis	1992
Niquitin®	14 mg / 24 h	78 mg	GlaxoSmithKline	2001
Nicopatch®	14 mg / 24 h	35 mg	Pierre Fabre	2008
Nicorette®	10 mg / 16 h	16,6 mg	Johnson&Johnson	2010

Tableau 7 : Les patches à base de nicotine étudiés

2.3.2.2. Caractéristiques des membranes étudiées

Lors de l'étude de 2004, les tests ont été conduits sur un seul lot de peaux de souris hairless d'origine IFFA-CREDO. Les souris sont des mâles âgés de 7 semaines élevés dans des conditions identiques. Il s'agit d'échantillons de peau entière, reçus congelés. Les peaux seront découpées avant d'être montées sur les cellules, selon le protocole en Annexe 2 à raison de 1 disque par individu.

L'essai de perméation de 2011 a été réalisé avec des disques prédécoupés de 2 cm² de peau de porc dermatomée à 500 µm (Biopredic). Les disques proviennent d'abdomen de 6 individus différents âgés de moins de 3 mois sans autre restriction.

2.3.2.3. Attribution des cellules

2.3.2.3.1. Etude de 2004 sur peau de souris

Chaque lot est testé sur 7 cellules de Franz horizontales comme suit :

- Cellules 1 à 7 : Nicorette®
- Cellules 8 à 14 Nicopatch®
- Cellules 15 à 21 Nicotinell®
- Cellules 22 à 28 : Niquitin®
- Cellules 29 à 35 : Niquitin Clear®

Le volume du milieu receveur est de 22,5 mL et la surface d'échange de 4,95 cm².

2.3.2.3.2. Etude de 2011 sur peau de porc

Les systèmes de perméation sont montés selon la procédure habituelle au laboratoire (cf Annexe 1), en utilisant des cellules de 4,5 mL et de 1,02 cm² de surface d'échanges. La série comporte 4 lots et 6 répétitions par lot (n = 6). Les peaux disponibles proviennent de 6 animaux différents. Par lot, chacune des six cellules est montée avec un disque de peau provenant d'un individu différent.

2.3.2.4. Conditions opératoires

Les conditions opératoires mises en œuvre dans les deux études sont résumées dans le Tableau 8.

		Peau de souris (étude de 2004)	Peau de porc (étude de 2011)
Milieu receveur		NaCl 0,9 %	
Volume de milieu receveur		22,5 mL (grandes cellules)	5,0 mL (petites cellules)
Surface de contact		4,9 cm ²	1,02 cm ²
Température		32°C	
Vitesse d'agitation du milieu receveur		500 tours/min	
Dépôt		4,62 cm ² (découpe de 24 mm de diamètre)	1,53 cm ² (découpe de 14 mm de diamètre)
Nombre de cellule par lot de patch		7	6
Prélèvement		300 µL à T = 3 ; 6 ; 9 ; 12 ; 16 ; 20 ; 24 h	
Dosage :	Colonne	X-Terra RP18, 5µm, 4,6*100 mm (Waters)	
	Phase mobile	Eau / acétonitrile / triéthylamine 900/100/1 (v/v/v)	
	Mode d'élution	Isocratique	
	Débit de phase mobile	1,0 mL/min	
	Température de la colonne	25°C	
	Longueur d'onde de détection	261 nm	
	Volume d'injection	5 µL	
	Temps d'analyse	10 min	

Tableau 8 : Conditions opératoires des deux études

2.3.2.5. Traitement des résultats

Séparément, pour les deux études, les PIE sont enregistrées et le coefficient de variation (CV) est calculé ainsi que les flux à l'équilibre pour chaque lot. Une comparaison multiple des moyennes des flux à l'équilibre est mise en œuvre à l'aide du logiciel SigmaStat® (ANOVA à un facteur + test de la plus petite différence significative de Tuckey / $\alpha = 5\%$).

2.3.3. Résultats

2.3.3.1. Etude de la variabilité de la PIE

L'objectif de l'étude statistique des valeurs de PIE est de décrire et comparer la variabilité de perméabilité de la peau de porc et de la peau de souris.

Contrairement aux valeurs de PIE des peaux de souris, celles des peaux de porc ne sont pas distribuées normalement (test de Shapiro-Wilk, $\alpha = 5\%$). Pour la peau de porc, la moyenne est de 16,7 g/cm²/h, l'écart-type est de 6,7 g/cm²/h. Pour la peau de souris, la moyenne est de 42,3 g/cm²/h, l'écart-type est de 6,0 g/cm²/h (cf. Annexe 3). Comme la PIE varie avec les conditions expérimentales, notamment l'humidité relative de l'air ambiant, il n'est pas pertinent de comparer les valeurs de PIE des deux études (cf. 1.5.4.5.1).

En revanche, la variabilité des PIE est un bon indicateur de la variabilité de perméabilité des deux types de peau. Le CV des PIE des peaux de porc (40 %) est plus élevé que celui des peaux de souris (14 %) (cf. Annexe 3). Le CV des PIE des peaux de souris est la résultante d'une variabilité interindividuelle puisque chaque valeur est issue d'un individu différent. Pour la peau de porc, le CV calculé est la résultante d'une variabilité intra-individuelle et interindividuelle puisque plusieurs valeurs sont mesurées sur un même individu. Dans le but d'évaluer la part de variabilité due à la variabilité intra-individuelle, les CV sont calculés par individu (Annexe 3 ; Tableau 9).

individu	moyenne	écart-type	CV
F	14,6	1,7	12%
E	16,3	7,6	48%
D	12,3	2,6	21%
C	20,3	7,5	37%
B	14,0	5,9	42%
A	22,9	8,0	35%

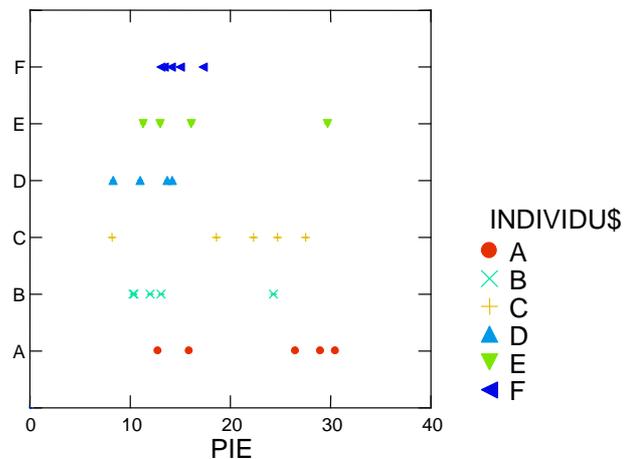


Tableau 9 : Variabilité de la PIE (exprimée en g/cm²/h) en fonction de l'individu (peau de porc)

L'individu pour lequel le CV est le plus petit est l'individu F (12 %), celui pour lequel le CV est le plus grand est l'individu E (48 %). La variabilité intra-individu de la perméabilité de la peau de porc est donc entre ces deux valeurs. Elle a donc un rôle majeur dans la variabilité totale observée sur ce type de peau (CV de 40 %).

Le fort CV des PIE observé sur peau de porc tend donc autant à une variabilité intra-individuelle qu'interindividuelle de la perméabilité.

2.3.3.2. Cinétiques de perméation

Les Figure 17 et Figure 18 présentent les cinétiques de perméation obtenues sur les deux types de peau.

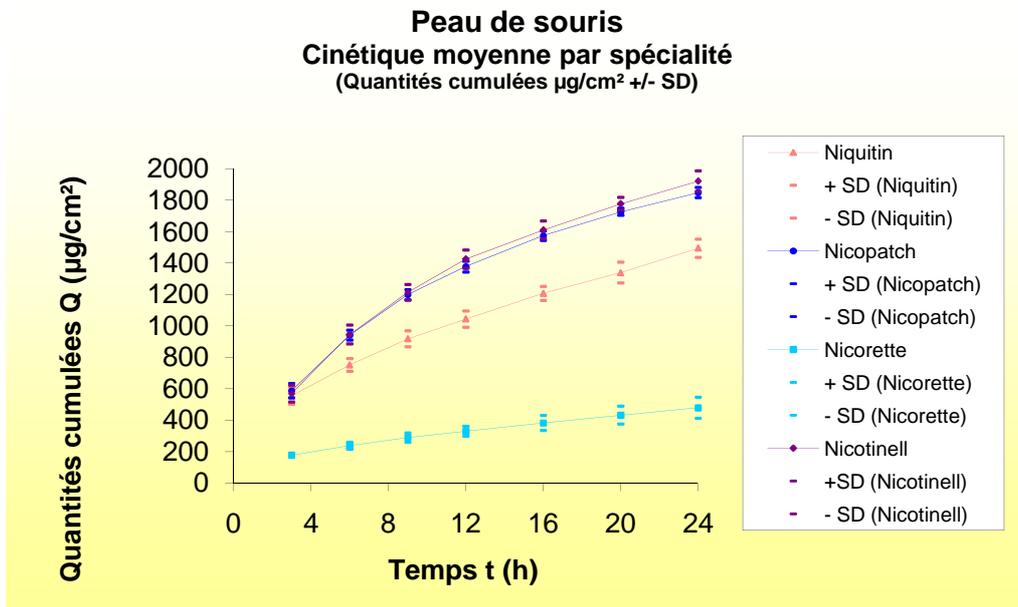


Figure 17 : Capacité discriminante du modèle (peau de souris) vis-à-vis de patches de nicotine

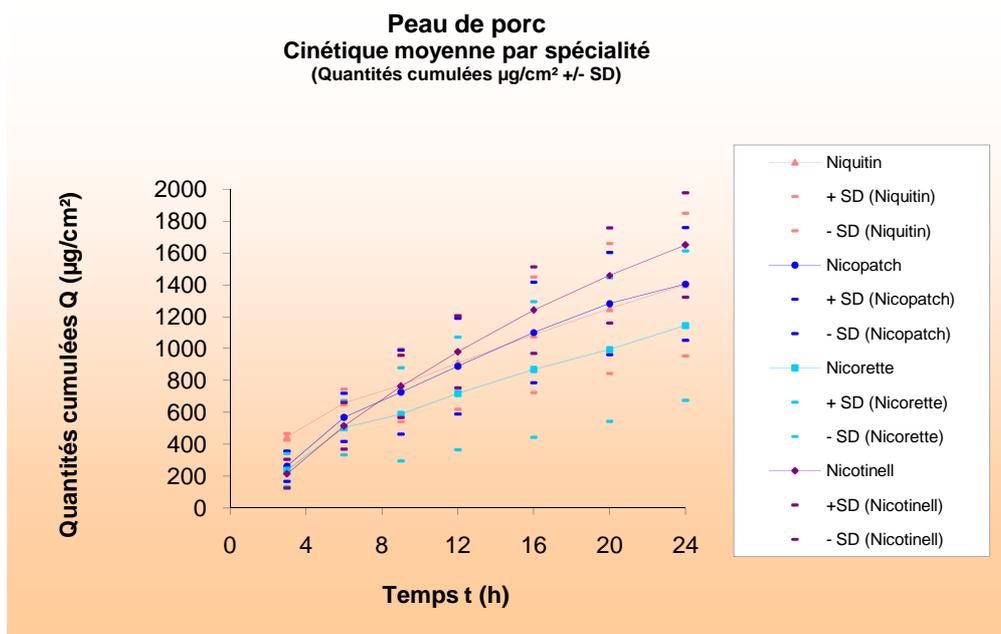


Figure 18 : Capacité discriminante du modèle (peau de porc) vis-à-vis de patches de nicotine

Bien que la peau de souris soit connue pour être plus perméable, les valeurs finales de quantité cumulée (à 24h) sont du même ordre de grandeur pour les deux types de peau (1500–2000 µg/cm², Figure 17 et Figure 18). Ces observations peuvent s'expliquer par les très bonnes capacités de pénétration de la nicotine.

L'ordre des valeurs des quantités cumulées entre les spécialités est le même pour les deux types de peau, à savoir :

Nicotinell® < Nicopatch® < Niquitin® < Nicorette®

Cependant, les courbes sont plus rapprochées pour la peau de porc : au temps 16h, la différence entre les quantités cumulées moyennes de Nicorette® et Nicotinell® est de 372 µg/cm² sur peau de porc et de 1228 µg/cm² sur peau de souris.

Les différences de CV entre les deux types de peau sont visibles sur les graphiques, ceux-ci sont en effet plus grands sur peau de porc que sur peau de souris. Sur peau de porc, les CV des quantités cumulées sont compris entre 4,7 % (Niquitin® au temps 3h) et 49,6 % (Nicorette® au temps 9h). Sur peau de souris les CV sont compris entre 1,29 % (Nicopatch® au temps 20h) et 9,8 % (Niquitin® au temps 3h). Ces observations laissent supposer une plus grande difficulté à être discriminant sur peau de porc.

2.3.3.3. Étude statistique

2.3.3.3.1. Résultats bruts

L'Annexe 4 regroupe les résultats bruts obtenus avec le logiciel SigmaStat® pour les différentes comparaisons de moyenne réalisées, ainsi que les tableaux de données correspondants.

2.3.3.3.2. Données analysées

Dans un premier temps, une étude statistique est réalisée à partir des données de 2004 obtenues avec les quatre spécialités Nicotinell®, Nicopatch®, Niquitin® et Nicorette®.

Dans un second temps, une étude statistique semblable est réalisée avec les données de l'étude de 2011 sur peau de porc. La cellule n°6 (Niquitin®, peau 3104) a été exclue de cette analyse statistique car les valeurs obtenues sont visiblement aberrantes. Un test de Dixon sur les valeurs aberrantes ($\alpha = 5\%$) permet de confirmer cette exclusion (cf. Annexe 4).

2.3.3.3.3. Résultats des comparaisons de moyennes

La comparaison de moyennes a été réalisée à chaque temps d'analyse et sur la pente de la courbe des quantités cumulées entre 9h et 16h (flux à l'équilibre).

Sur peau de souris, une différence significative ($\alpha = 5\%$) est détectée entre les flux à l'équilibre de toutes les spécialités deux à deux, sauf pour le couple Nicotinell® / Nicopatch®. Sur peau de porc, seules les spécialités Nicotinell® et Nicorette® diffèrent entre elles. La peau de porc est donc moins performante pour détecter des différences entre des formules proches.

Les résultats obtenus pour chaque temps d'analyse, détaillés en Annexe 4, vont dans le même sens que ceux des flux à l'équilibre.

2.3.4. Discussion et conclusions

2.3.4.1. Variabilité de perméabilité des peaux

2.3.4.1.1. Origine de la variabilité

Expérimentalement (paragraphe 2.3.3.3.3), il a été montré que pour les quatre mêmes formulations, les cinétiques moyennes de perméation apparaissent comme non significativement différentes sur peau de porc alors qu'elles le sont sur peau de souris. L'origine de cette moins grande capacité discriminante réside dans la plus grande variabilité de perméabilité mesurée sur la peau de porc par rapport à la peau de souris. Pour expliquer la variabilité de ces modèles cutanés, il faut se tourner vers les conditions d'obtention des échantillons, qui ne sont pas les mêmes pour les deux types de peau.

Les peaux de souris sont issues d'élevages en batterie réalisés dans des conditions extrêmement reproductibles (alimentation, exercice) et à partir d'une même souche de souris. Les peaux de porc quand à elles sont obtenues à partir de prélèvements d'animaux issus des abattoirs qui peuvent donc présenter une épaisseur d'épiderme ou une pilosité différente.

Comme la peau de souris est très fine, elle est utilisée dans son intégralité (épiderme, derme et hypoderme) alors que pour le porc ces échantillons sont dermatomés à 500 μm d'épaisseur, ce qui comprend l'épiderme et le derme. Les peaux de souris présentent donc, a priori une épaisseur plus variable. Cependant, dans les deux cas, le modèle comprend l'intégralité de l'épiderme, qui est la principale barrière à la perméation de substances chimique. C'est pourquoi l'épaisseur ne semble pas influencer sur la variabilité de perméabilité observée.

2.3.4.1.2. Amélioration de la variabilité

2.3.4.1.2.1. Utilisation la peau d'un même individu pour toute l'étude

L'expérimentation sur peau de souris oblige à utiliser un échantillon de peau d'un animal différent pour chaque cellule. Chez le porc, la surface de peau prélevée est plus grande et un individu peut servir pour monter plusieurs cellules (jusqu'à une dizaine). Il serait ainsi possible de s'affranchir d'une variabilité interindividuelle en réalisant l'intégralité des études avec la peau d'un même individu. Cependant, dans cette étude, la variabilité intra-individuelle observée (en prenant comme critère la PIE) s'avère presque aussi importante que la variabilité totale (cf. 2.3.3.1). Le modèle le plus reproductible est donc la peau de souris.

2.3.4.1.2.2. Correction des résultats de perméation par les valeurs de PIE

La PIE étant le reflet de la perméabilité de la peau à l'eau et la variabilité de la PIE étant le reflet de la variabilité de la perméabilité de la peau, il est légitime de rechercher une corrélation entre les valeurs de PIE et la perméabilité de la peau aux principes actifs. En effet ces deux paramètres jaugent l'intégrité de la barrière cutanée et augmentent quand celle-ci

est altérée. Les tentatives d'établissement de corrélation (qualitative ou quantitative) entre PIE et absorption transdermique de substances chimique ne sont pas toujours fructueuses (73). Pour la nicotine, aucune corrélation simple n'a pu être montrée, comme l'indiquent les graphiques présentés en Annexe 5.

2.3.4.2. Molécules de référence utilisée

La capacité discriminante du modèle a été testée en prenant la nicotine comme molécule de référence. Or toutes les substances chimiques n'ont pas le même comportement vis-à-vis de la barrière cutanée ni les mêmes voies de passage (cf. 1.4.1.2). La nicotine est une molécule hydrophile passant très bien la barrière cutanée. Une étude similaire sur un principe actif lipophile comme la testostérone qui a une perméabilité plus faible pourrait être envisagée.

2.3.4.3. Type de peau de porc testée

Cette étude expérimentale de la capacité discriminante a été réalisée sur abdomen de porc. L'étude d'un autre type de peau pourrait être intéressante. La peau d'oreille de porc adulte est un modèle porcin fréquent (63) qui, comme la peau de porc nouveau-né présente une épaisseur du *Stratum corneum* proche de celle observée chez l'homme. Elle présente l'avantage de ne pas nécessiter de dermatome car l'épaisseur de l'hypoderme est moins importante que sur le dos et l'abdomen. La peau de porc nain (miniporc) pourrait présenter une reproductibilité plus grande (66) car les animaux sont élevés en animaleries dans des conditions contrôlés et sont tous issus d'une même souche.

2.3.4.4. Utilisation respectives de la peau de porc et de la peau de souris dans la littérature

Ce travail a permis de montrer que si la peau de porc donne des résultats plus prédictifs en termes de perméation des principes actifs (cf. 2.2.2), la peau de souris est un modèle plus discriminant qui présente un intérêt pour les études de formulation de médicaments transdermiques.

Ainsi, la peau de porc est-elle un modèle qui peut être intéressant pour étudier le potentiel de perméation intrinsèque de principes actifs, c'est-à-dire, leur capacité à passer la barrière cutanée lorsqu'ils sont appliqués dans un véhicule non promoteur. Ce type d'étude, intervenant avant les étapes de formulation et servant à sélectionner et confirmer des molécules candidates à l'administration transdermique est cependant souvent réalisé sur peau de souris, c'est le cas de 4 des études décrites dans les 27 publications de l'Annexe 1 (Figure 19).

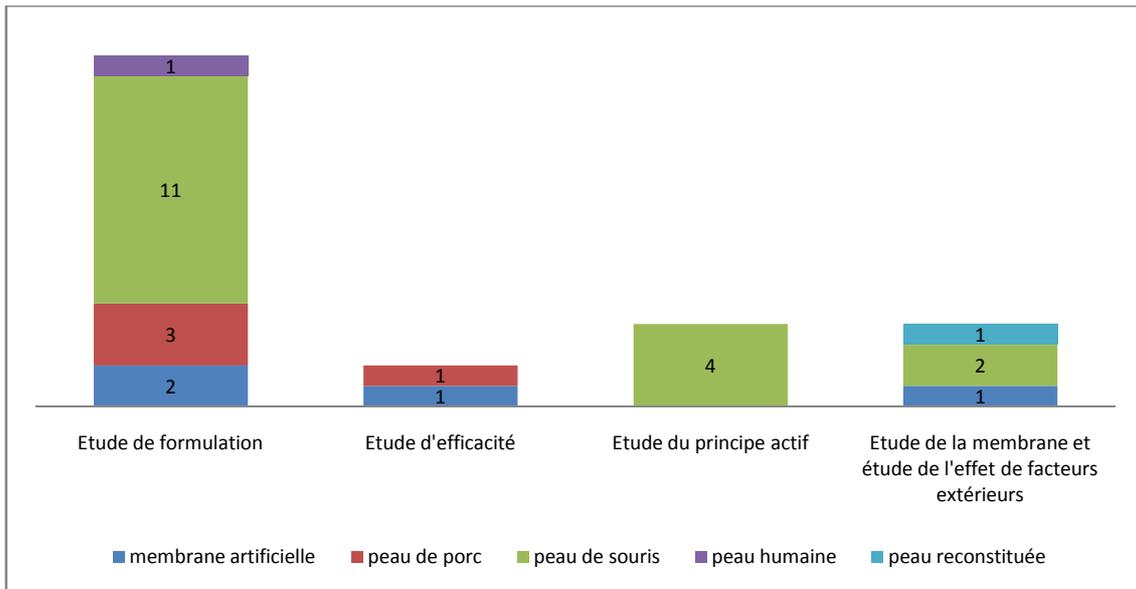


Figure 19 : Répartition des études de perméation cutanée de l'annexe 1 en fonction de l'objectif de l'étude et du modèle membranaire (études réalisées entre 2009 et 2011)

La peau de porc est aussi un modèle plus fiable que la peau de souris quand il s'agit de proposer des mécanismes et d'étudier les voies de passage des principes actifs.

Pour les applications en formulation de produits transdermiques, la peau de souris est cependant la membrane de choix. Sur 17 études de perméation réalisées dans un but d'optimisation de formule, 11 utilisent la peau de souris pour modèle (Figure 19). Il s'agit, selon les cas, de comparer des formulations entre elles, d'étudier l'effet de promoteurs d'absorption, l'effet de la concentration en tensio-actif dans une microémulsion... etc. L'étude est parfois réalisée en parallèle sur peau de porc ou sur peau humaine.

Conclusion

Lors du développement galénique des médicaments transdermiques, les études de perméation cutanée menées *in vitro* permettent d'obtenir des critères pertinents pour l'évaluation de formulations.

La peau de souris est un modèle discriminant permettant de faire des choix efficaces de formulation par comparaison des résultats obtenus, même si les résultats absolus obtenus ne peuvent pas être extrapolés à l'homme.

Ce travail permet de montrer que les modèles *in vitro* d'étude de phénomènes biologiques doivent répondre à des exigences différentes en fonction de l'utilisation qui en est faite. Pour donner des résultats fiables et exploitables, il faut non seulement que le modèle soit proche de la réalité mais aussi qu'il soit reproductible. Or, plus un modèle cutané est proche de la réalité chez l'homme, plus il est variable. C'est pourquoi, la peau de souris et la peau de porc sont utilisées dans des applications différentes.

Annexe 1. Etudes de perméation cutanée in vitro publiées entre 2009 et 2011

Référence	Principe actif	Objectif	Membrane	Cellule	Surface d'échange (cm ²)	Volume ou flux ⁱ de receveur	Donneur	Quantité déposée mg/cm ² /mL de receveur	Receveur
(74)	Ondansetron	Etude de formulation	peau de souris	Cellule de Franz ⁱⁱⁱ	2,01	16 mL	gel	/	PBS pH 7,4
(75)	Carvedilol	Etude de formulation	peau de souris membrane artificielle	Cellule de Franz verticale	3,14	25 mL	gel proniosomes	/	propylène glycol /éthanol / PBS (tampon phosphate) pH 7,4 15/40/45
(76)	Acide coumarinique	Etude d'efficacité	peau de porc	Cellule de Franz horizontale	ND ^{iv}	3 mL	crème	/	PBS
			membrane artificielle	plaque de perméabilité 96 puits MultiScreen (Millipore)	ND	ND	solution dans DMSO/PBS, pH 7.4 (5/95)	/	5% DMSO dans PBS pH 7,4
(77)	Valsartan	Etude de formulation	peau de souris peau de porc	ND	1,3	7 mL		/	ND
(78)	AINS	Etude de l'effet de la température extérieure	peau de souris	Cellule de Franz horizontale	3,14	4,8 mL	patch matriciel + eau distillée dans le compartiment donneur	/	PBS pH 7,4
(79)	Donepezil	Etude de formulation	peau de souris peau humaine	cellule de diffusion de Keshary-Chien	2,14	ND	solution dans le PG (polyéthylène glycol) avec ou sans 1% d'acide gras	/	PBS 20mM pH 7,4

ⁱ Dans le cas d'études statiques

ⁱⁱ Dans le cas d'études dynamiques

ⁱⁱⁱ Les auteurs ne précisent pas si la cellule est verticale ou horizontale mais le terme de « Cellule de Franz » sous-entend souvent une géométrie verticale.

^{iv} ND : donnée non disponible

Référence	Principe actif	Objectif	Membrane	Cellule	Surface d'échange (cm ²)	Volume ou flux ⁱⁱ de receveur	Donneur	Quantité déposée mg/cm ² /mL de receveur	Receveur
(80)	Piroxicam	Etude de formulation	peau de souris	Cellule de Franz verticale	1,77	7 mL	suspension PA dans tampon acétate 0,1 M	/	PBS pH 7,4
(81)	Apomorphine	Etude de formulation	peau de souris	Cellule de Franz verticale	0,785	ND	PEG/eau 3:7 ou glycérol/eau 3:7 ou huile minérale ou émulsion lipidique	/	30% EtOH dans tampon citrate-phosphate pH 7,4
(82)	Prochlorperazine	Etude du principe actif	peau de souris	Cellule de Franz modifiée	2,01	16 mL	gels aqueux avec L-menthol (2% m/m), avec ou sans alcool (isopropanol, éthanol, 20 %)	0,311	PBS pH 7,4 Bridj 4%
(83)	Hydrocortisone	Etude de la membrane	peau de souris peau reconstituée membrane artificielle	Cellule de Franz verticale	3,8	14 mL	4 crèmes, 1 pommade, 1 gel, 1 lotion	0,18 ; 0,26	25% EtOH dans l'eau
(84)	Minoxidil	Etude de formulation	peau de souris	Cellules de Franz	0,636	ND	suspension de PA	/	PBS pH 7,4
(85)	Risedronate	Etude du principe actif	peau de souris	Cellule de Franz	2,01	ND	solution aqueuse pH 7,4	/	Sérum physiologique (NaCl 0,9%)
(86)	acetaminophène naltrexone	Etude du principe actif	peau de souris	ND	ND	ND		/	
(87)	Zolmitriptan	Etude de formulation	peau de souris	Cellule à flux continu	ND	ND	Patch	/	tampon pH 6
(88)	Acide 5-aminolevulinique	Etude de formulation	peau de porc	Cellule de Franz	0,785	5,5 mL	nanoémulsion eau dans huile et huile dans eau	/	PBS pH 7,4

Référence	Principe actif	Objectif	Membrane	Cellule	Surface d'échange (cm ²)	Volume ou flux ⁱⁱ de receveur	Donneur	Quantité déposée mg/cm ² /mL de receveur	Receveur
(89)	Lidocaïne	Etude de formulation	peau de souris	Cellule à flux continu, verticale	1	5 mL/h	solution ou suspension de PA à pH différents avec ou sans sucre promoteur	1,000	PBS pH 7,4
(90)	5-FU	Etude de formulation	peau de souris	Cellule de Franz verticale	3,14	25 mL	Emulsion	0,016	PBS 7,4 / 0,11% formaldéhyde (conservateur)
(91)	Seleginine	Etude de formulation	membrane artificielle	Cellule de Franz	0,785	5,5 mL	Gel	/	PBS pH 7,4
			peau de souris						
			peau de porc						
(92)	Geniposide	Etude du principe actif	peau de souris	Cellule de Franz	2,98	15 mL	Solution	/	Sérum physiologique pH 7,4
(93)	Phosphonate nucléosidique acyclique	Etude du principe actif	peau de porc	Cellule de Franz	1	17 mL	Solution dans le PBS avec ou sans enhancer, à pH différents	0,009; 0,09; 0,26; 0,44	PBS pH 7,4 : 10 mM phosphate, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,000 unités de penicilline, 1 mg/mL de streptomycine 2,5 µg/mL d'amphotericine B
			peau humaine						10 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES)-buffered Hanks balanced salt solution (HBSS) à pH 7,4 sans rouge de phénol, 1,000 unités penicilline /mL, 1 mg/mL de streptomycine et 2,5 µg/mL d'amphotericin B

Référence	Principe actif	Objectif	Membrane	Cellule	Surface d'échange (cm ²)	VOLUME ou flux ⁱⁱ de receveur	Donneur	Quantité déposée mg/cm ² /mL de receveur	Receveur
(94)	acide férulique	Etude du principe actif	peau de porc peau de souris	Cellule de Franz	0,785	5,5 mL	tampon aqueux à pH 6 et pH 9,9	/	tampon citrate-phosphate pH 7,4 / 30% EtOH
(95)	Cisplatine	Etude des voies de pénétration du PA	peau de porc	Cellule de Franz	0,8	6 mL	PG contenant 5; 10 ou 20 % de monooléine	0,052	PBS isotonique pH 7,4
(96)	acide salicylique caféine	Etude de la fonction barrière de la peau	peau de porc	Cellule de Franz	1,86	3 mL	solution dans 50/50 (v/v) EtOH/eau	0,054	PBS pH 7,4 dans l'eau, 1% sérum d'albumine bovine 0,04 gentamycine sulfate
(97)	Lidocaïne	Etude de formulation	peau de porc	Cellule MatTek	2,46	5 mL	Microémulsion	1,2 à 1,6	PBS 0,01 M phosphate, 0,137 M NaCl, pH 7,4
(98)	aciclovir minoxidil	étude de formulation	peau de porc	ND	ND	ND	liposomes enrobés ou non	/	PBS pH 7,4
(99)	Diclofenac	étude de formulation	peau de porc	Cellule de Franz	0,635	ND		/	PBS pH 7,2
(100)	Ketoprofen lidocaïne caféine	Etude de formulation	peau de porc	Cellule de Franz	ND	5,1 mL	microémulsion , contrôle : solution dans PG	/	PBS

Annexe 2. Exemple de déroulement d'un essai de perméation cutanée

Etape 1. Montage des cellules



La peau est préalablement décongelée 10 minutes à température ambiante et découpée à l'emporte-pièce pour correspondre à la taille de la cellule.



Elle est ensuite placée entre les compartiments donneur et receveur. L'ensemble est fixé à l'aide d'un système adapté. Le milieu receveur est rempli à l'aide d'une seringue.



Les cellules prêtes sont mises 1h à conditionner en température sur le rack thermostaté à 34°C, pour atteindre une température à la surface de la peau équilibrée à 32°C.

Etape 2. Vérification de l'intégrité des peaux



Le critère de contrôle de l'intégrité de la peau est la perte insensible en eau (PIE), déterminée à l'aide d'un tewamètre (capteur d'humidité relative). Si la PIE d'une peau s'écarte de la moyenne, elle est remplacée car considérée comme altérée.

Etape 3. Programmation des prélèvements et dépôt de la formulation à tester

Les prélèvements sont programmés *via* le logiciel pilotant le robot : nombre de cellules, temps et volumes de prélèvement. Une quantité définie de produit à tester est alors déposée à la surface de la peau au moment indiqué par le robot (qui correspond au T_0).

Etape 4. Prélèvements



La suite de l'essai est réalisée automatiquement par le robot : prélèvements aux temps indiqués et transfert en vial, prêts à être dosés par HPLC.

Etape 5. Dosage

La séquence de l'essai de perméation est longue : pour quatre formulations étudiées, cinq répétitions par formulation et sept temps de prélèvement, 140 vials doivent être dosés. La séquence comporte aussi des injections régulières de témoins et un test de conformité du système. Le dosage peut donc durer plus de 16h, d'où la nécessité d'un injecteur automatique.

Annexe 3. Comparaison de la variabilité de la perte insensible en eau sur peau de souris et peau de porc

Peau de porc			Peau de souris	
Cellule	Individu	PIE	Cellule	PIE
1	D	13,7	1	49,3
2	A	26,5	2	46,4
3	E	29,7	3	34,1
4	D	11,0	4	45,6
5	C	24,7	5	42,1
6	D	14,2	6	38,4
7	C	22,3	7	50,6
8	F	14,1	8	41,5
9	A	30,5	9	37,8
10	E	13,0	10	42,4
11	B	13,1	11	34,7
12	F	13,4	12	43,1
13	D	14,2	13	49,6
14	D	8,3	14	51,3
15	F	17,3	15	39,0
16	B	10,3	16	51,8
17	F	13,1	17	40,8
18	B	24,3	18	43,3
19	E	11,3	19	44,9
20	F	15,0	20	34,1
21	E	16,1	21	33,0
22	C	8,2	22	36,3
23	A	29,0	23	31,9
24	E	11,3	24	32,3
25	C	18,6	25	44,9
26	B	12,0	26	50,8
27	A	12,8	27	50,2
28	B	10,4	28	41,3
29	A	15,9	29	46,0
30	C	27,5	30	38,8
/		/	31	47,8
/		/	32	47,7
/		/	33	35,7
/		/	34	45,5
/		/	35	39,2
Coefficient de variation		40,3%	Coefficient de variation	14,2%

Tableau 10 : Données de PIE sur peau de porc et peau de souris

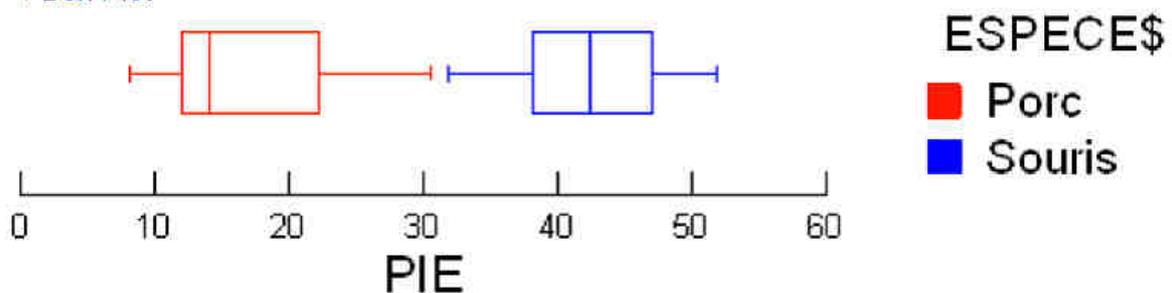
Statistiques descriptives et test de Normalité de la variable PIE dans chacun des deux groupes «peau de porc » et « peau de souris»

Les résultats suivants ont été obtenus avec le logiciel MYSTAT® à partir des données du Tableau 10 :

▼ Descriptive Statistics

	PORC	SOURIS
N of Cases	30	35
Minimum	8,200	31,900
Maximum	30,500	51,800
Range	22,300	19,900
Median	14,150	42,400
Arithmetic Mean	16,727	42,349
Standard Error of Arithmetic Mean	1,229	1,022
95,0% Lower Confidence Limit	14,212	40,273
95,0% Upper Confidence Limit	19,241	44,425
Standard Deviation	6,733	6,043
Variance	45,334	36,524
Coefficient of Variation	0,403	0,143
Shapiro-Wilk Statistic	0,868	0,954
Shapiro-Wilk p-value	0,001	0,148

▼ Box Plot



La PIE des peaux de souris est distribuée de façon normale (p de Shapiro-Wilk $>0,05$) contrairement à celle des peaux de porc ($p < 0,05$).

Peau de porc : Statistiques descriptives par individu

Les données du Tableau 10 concernant la peau de porc sont analysées séparément par individu. Toutes les valeurs de PIE sont en g/cm²/h.

Results for INDIVIDU\$ = A

	PIE
N of Cases	5
Minimum	12,800
Maximum	30,500
Arithmetic Mean	22,940
Standard Error of Arithmetic Mean	3,598
95,0% Lower Confidence Limit	12,950
95,0% Upper Confidence Limit	32,930
Standard Deviation	8,046
Coefficient of Variation	0,351
Shapiro-Wilk Statistic	0,860
Shapiro-Wilk p-value	0,230

Results for INDIVIDU\$ = B

	PIE
N of Cases	5
Minimum	10,300
Maximum	24,300
Arithmetic Mean	14,020
Standard Error of Arithmetic Mean	2,622
95,0% Lower Confidence Limit	6,739
95,0% Upper Confidence Limit	21,301
Standard Deviation	5,864
Coefficient of Variation	0,418
Shapiro-Wilk Statistic	0,721
Shapiro-Wilk p-value	0,016

Results for INDIVIDU\$ = C

	PIE
N of Cases	5
Minimum	8,200
Maximum	27,500
Arithmetic Mean	20,260
Standard Error of Arithmetic Mean	3,350
95,0% Lower Confidence Limit	10,958
95,0% Upper Confidence Limit	29,562
Standard Deviation	7,492
Coefficient of Variation	0,370
Shapiro-Wilk Statistic	0,911
Shapiro-Wilk p-value	0,473

Results for INDIVIDU\$ = D

	PIE
N of Cases	5
Minimum	8,300
Maximum	14,200
Arithmetic Mean	12,280
Standard Error of Arithmetic Mean	1,159
95,0% Lower Confidence Limit	9,062
95,0% Upper Confidence Limit	15,498
Standard Deviation	2,592
Coefficient of Variation	0,211
Shapiro-Wilk Statistic	0,820
Shapiro-Wilk p-value	0,117

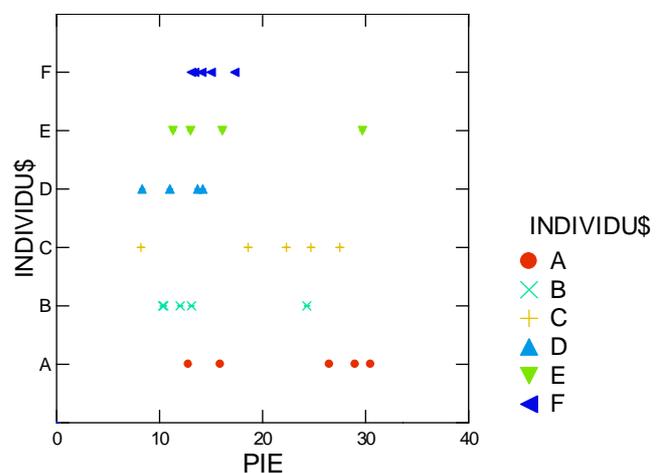
Results for INDIVIDU\$ = E

	PIE
N of Cases	5
Minimum	11,300
Maximum	29,700
Arithmetic Mean	16,280
Standard Error of Arithmetic Mean	3,468
95,0% Lower Confidence Limit	6,652
95,0% Upper Confidence Limit	25,908
Standard Deviation	7,754
Coefficient of Variation	0,476
Shapiro-Wilk Statistic	0,745
Shapiro-Wilk p-value	0,027

Results for INDIVIDU\$ = F

	PIE
N of Cases	5
Minimum	13,100
Maximum	17,300
Arithmetic Mean	14,580
Standard Error of Arithmetic Mean	0,755
95,0% Lower Confidence Limit	12,485
95,0% Upper Confidence Limit	16,675
Standard Deviation	1,687
Coefficient of Variation	0,116
Shapiro-Wilk Statistic	0,887
Shapiro-Wilk p-value	0,341

individu	moyenne	écart-type	CV
F	14,6	1,7	12%
E	16,3	7,6	48%
D	11,8	2,7	23%
C	20,3	7,5	37%
B	14,0	5,9	42%
A	22,9	8,0	35%



ANOVA des PIE de peau de porc : effet du facteur « individu »

▼ Analysis of Variance

Effects coding used for categorical variables in model.
The categorical values encountered during processing are

Variables	Levels				
INDIVIDU\$ (6 levels)	A	B	C	D	E
	F				

1 case(s) are deleted due to missing data.

Dependent Variable	PIE
N	29
Multiple R	0,562
Squared Multiple R	0,316

Analysis of Variance

Source	Type III SS	df	Mean Squares	F-ratio	p-value
INDIVIDU\$	412,986	5	82,597	2,122	0,099
Error	895,108	23	38,918		

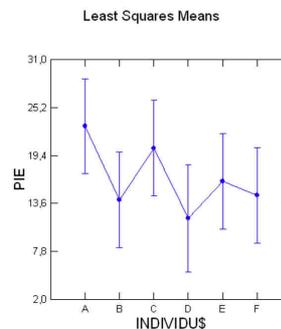
Test for Homogeneity

	Test Statistic	p-value
Levene's Test	2,330	0,074

Test for Normality

	Test Statistic	p-value
Shapiro-Wilk Test	0,981	0,849

Durbin-Watson D Statistic	2,223
First Order Autocorrelation	-0,143



Les PIE sont distribuées de façon normale (p de Shapiro-Wilk > 5 %) et l'homogénéité des variances dans les 6 groupes est vérifiée (p de Levene > 5%). L'ANOVA montre un effet non significatif du facteur « individu » (p > 5 %). La PIE ne diffère donc pas significativement d'un individu à l'autre ($\alpha = 5\%$).

Méthode statistique de comparaison des moyennes

Pour chaque temps d'analyse t, et pour J_{éq} (le flux à l'équilibre qui correspond à la pente de la régression calculée sur les cinétiques de perméation entre 9h et 16h), une ANOVA a un facteur est mise en œuvre pour comparer les moyennes des flux à l'équilibre des quatre spécialités.

Le facteur étudié est le facteur « spécialité ».

L'hypothèse H₀ suivante est testée : « Il n'existe pas de différence significative (à 5 %) entre les moyennes des quantités cumulées à t (ou J_{éq}) des quatre spécialités ».

L'hypothèse alternative H₁ est la suivante : « Au moins deux spécialités présentent des moyennes de quantités cumulées à t (ou J_{éq}) significativement différentes (à 5 %) ».

Si une différence significative est mise en évidence, l'ANOVA est suivie d'un test de Tuckey de comparaison deux à deux des moyennes. Ce test compare la différence entre un couple de moyenne (par exemple Nicotinell®-Niquitin® ou Nicotinell®-Nicorette®) et la « plus petite différence significative de Tuckey » (à 5 %).

Elimination de la cellule 6 (étude de 2011 sur peau de porc) : test de Dixon sur les valeurs aberrantes

Groupe : Niquitin®

Valeurs de flux :

Cellule	Q 3h µg/cm ²	Q 6h µg/cm ²	Q 9h µg/cm ²	Q 12h µg/cm ²	Q 16h µg/cm ²	Q 20h µg/cm ²	Q 24h µg/cm ²	Pente 9h-16h
6	458,7	499,6	315,6	336,3	369,9	442,0	506,5	7,79
17	424,6	640,0	801,0	931,7	1139,7	1315,6	1488,3	48,58
19	457,4	701,4	855,3	1032,8	1211,4	1394,9	1508,0	50,53
22	423,2	655,9	812,1	962,2	1130,1	1309,2	1528,4	45,24
26	435,1	728,1	942,7	1135,9	1353,0	1535,4	1692,7	58,39
29	475,1	730,3	891,3	1057,3	1311,5	1505,3	1682,2	60,22

La cellule 6 est mise en doute.

$$r_{\text{pente}} = (y_2 - y_1) / (y_n - y_1) = (45,24 - 7,79) / (60,22 - 7,79) = 0,71$$

$$r_{3h} = 0,03$$

$$r_{6h} = 1,3$$

$$r_{9h} = 0,77$$

$$r_{12h} = 0,74$$

$$r_{16h} = 0,77$$

$$r_{20h} = 0,79$$

$$r_{24h} = 0,86$$

$$r_{\text{table}} (r_{10} / \alpha = 5\% / n = 6) = 0,56$$

Il est justifié d'éliminer la valeur de la cellule 6 pour l'analyse des résultats à partir de 6h et pour l'analyse du flux à l'équilibre (« pente ») car $r > r_{\text{table}}$.

Données analysées

	1-Spécialité	2-3 h	3-6 h	4-9 h	5-12 h	6-16 h	7-20 h	8-24 h	re 9h-16h (m/c)
1	Nicopatch	151,1200	419,6300	669,2200	884,3900	1138,5300	1363,0000	1540,1700	66,8546
2	Nicopatch	214,6200	421,2600	390,1400	486,2200	684,1300	843,7600	973,2800	42,4028
3	Nicopatch	404,9400	723,1900	803,0900	947,4500	1213,8200	1417,6600	1595,2100	59,1036
4	Nicopatch	189,2400	456,2600	477,1200	616,3600	799,8200	1045,1200	1105,6400	46,0873
5	Nicopatch	290,5200	682,5200	1008,5000	1104,3400	1218,5700	1250,5300	1280,2500	29,9315
6	Nicopatch	324,3300	712,5200	1012,2800	1293,9300	1549,6700	1771,9900	1932,9500	76,0762
7	Nicorette	104,8100	324,8700	493,5200	644,2600	757,2000	843,3300	1014,8000	37,1586
8	Nicorette	140,9700	277,1500	213,7700	272,8500	397,5200	522,1200	712,6800	26,5158
9	Nicorette	299,8800	504,8300	332,6400	383,3300	411,2600	489,6900	551,4600	11,0018
10	Nicorette	390,0400	691,0200	687,7100	818,0200	988,5700	1190,3000	1286,1800	42,9615
11	Nicorette	228,2400	572,4300	838,8800	1010,0300	1231,5800	1309,8000	1583,4400	56,0615
12	Nicorette	260,1400	652,2400	958,6400	1182,9300	1428,0400	1608,4800	1717,9600	66,7447
13	Niquitin	424,6300	639,9700	801,0400	931,6900	1139,7100	1315,6300	1488,2600	48,5773
14	Niquitin	457,3700	701,4100	855,3400	1032,7800	1211,3700	1394,9200	1508,0100	50,5255
15	Niquitin	423,2100	655,8600	812,1200	962,1700	1130,1100	1309,2100	1528,3800	45,2411
16	Niquitin	435,1200	728,0800	942,6700	1135,8700	1353,0100	1535,4100	1692,6900	58,3857
17	Niquitin	475,1000	730,2800	891,3000	1057,3400	1311,5300	1505,2500	1682,2400	60,2228
18	Nicotinell	193,0100	494,9600	734,3100	963,6200	1234,0600	1494,9300	1702,1000	71,1884
19	Nicotinell	157,2900	369,8300	526,1900	674,6100	854,8000	982,1900	1114,3000	46,8418
20	Nicotinell	307,6700	654,7600	935,1700	1178,3700	1486,0900	1725,4500	1911,1500	78,6070
21	Nicotinell	343,5400	724,8700	1043,8800	1290,6000	1599,1300	1801,4400	2045,7700	79,2031
22	Nicotinell	165,2800	467,2400	724,4000	955,3100	1204,4600	1453,4200	1602,5300	68,2399
23	Nicotinell	120,8800	378,1400	612,9500	815,2900	1070,3600	1294,5300	1520,3500	65,2591

Tableau 11 : Données pour l'analyse statistique - Peau de porc

	1-Spécialité	2-3 h	3-6 h	4-9 h	5-12 h	6-16 h	7-20 h	8-24 h	re 9h-16h (ua/c)
1	Nicopatch	600,4500	980,5100	1240,2000	1426,5500	1573,3400	1744,5800	1870,2400	47,0026
2	Nicopatch	571,3200	943,1600	1220,7300	1340,7400	1532,9000	1720,5400	1851,5000	44,7819
3	Nicopatch	584,8600	943,8000	1150,5500	1390,5800	1544,6500	1716,8900	1819,0300	55,3388
4	Nicopatch	506,5900	886,8000	1168,5300	1350,8200	1594,8800	1711,3700	1858,4600	60,9130
5	Nicopatch	568,8600	911,9900	1175,6000	1341,4700	1555,8400	1690,0700	1800,4500	54,2807
6	Nicopatch	619,5000	954,5300	1211,4200	1376,0700	1617,3400	1734,8100	1897,7500	58,1145
7	Nicopatch	651,9500	964,2400	1217,1200	1412,2800	1596,1200	1756,6600	1831,2900	53,7005
8	Nicorette	168,9500	249,7100	303,3200	347,5700	415,7600	468,8900	521,0200	16,1161
9	Nicorette	171,0500	240,1900	299,0000	342,7300	415,0800	478,1600	519,0100	16,6642
10	Nicorette	161,5500	254,5600	308,2600	350,2600	396,8000	459,6800	506,6900	12,5938
11	Nicorette	189,3200	233,2100	272,4600	303,4300	363,9900	388,7200	434,3900	13,1873
12	Nicorette	178,9100	240,0700	305,5100	344,1900	379,4200	422,7100	496,9500	10,4639
13	Nicorette	175,9100	248,5300	299,7200	342,4100	412,0300	470,0700	525,8000	16,1178
14	Nicorette	192,5500	187,0200	227,0300	265,9900	283,2400	324,1900	341,4500	7,8291
15	Niquitin	534,9100	744,3100	922,7300	1018,3100	1182,7700	1335,2500	1473,0200	37,3630
16	Niquitin	474,7300	706,7800	878,0800	1002,7100	1208,4900	1309,9800	1498,6600	47,4308
17	Niquitin	499,6800	686,6600	818,7700	959,2100	1121,3300	1208,3500	1374,1600	43,0773
18	Niquitin	621,9100	789,3800	958,8400	1087,7000	1257,6500	1361,3600	1536,8200	42,6764
19	Niquitin	582,8200	766,2300	932,7000	1045,6700	1213,0300	1353,7600	1505,7900	40,1441
20	Niquitin	604,8600	784,0200	959,9100	1099,5100	1244,3000	1386,4700	1538,6400	40,3877
21	Niquitin	559,4100	775,4600	941,4300	1082,2400	1212,6800	1413,4900	1524,9100	38,4181
22	Nicotinell	591,4500	937,0700	1183,4100	1394,0100	1535,9800	1738,5600	1817,4400	49,5631
23	Nicotinell	633,8600	1006,7200	1266,7600	1422,0900	1646,0800	1789,5500	1911,2300	54,2864
24	Nicotinell	613,4100	1023,0900	1296,8000	1550,1700	1687,0000	1851,4800	2033,9600	54,5788
25	Nicotinell	552,2300	901,5400	1185,1000	1389,1500	1567,5700	1759,8600	1913,8000	54,0962
26	Nicotinell	587,4500	975,6500	1200,7800	1424,2000	1654,8400	1789,6200	1956,9700	64,4762
27	Nicotinell	503,7700	894,3200	1184,0000	1390,8600	1615,7300	1778,1200	1923,7200	61,3807
28	Nicotinell	493,3600	868,6700	1169,5700	1399,7000	1558,8200	1727,4200	1881,9500	54,7516

Tableau 12 : Données pour l'analyse statistique - Peau de souris

Résultats des tests statistiques de comparaison de moyennes

DS : différence significative au risque α de 5 %

DNS : différence non significative au risque α de 5 %

Q_{Xh} : Quantité cumulée de nicotine dans le milieu receveur au temps X heures

$J_{\text{éq}}$: Flux de nicotine à travers la peau à l'équilibre (entre les temps 9h et 16h)

Peau de souris :

Critère de comparaison	Q_{3h}	Q_{6h}	Q_{9h}	Q_{12h}	Q_{16h}	Q_{20h}	Q_{24h}	$J_{\text{éq}}$
Comparaison des 4 groupes « spécialité »								
Normalité	Oui (p=0,16)	Oui (p=0,40)	Oui (p=0,71)	Oui (p=0,23)	Oui (p=0,34)	Non (p=0,1)	Non (p=0,1)	Oui (p=0,98)
Egalité des variances des 4 groupes (spécialités)	Non (p=0,1)	Non (p=0,1)	Oui (p=0,75)	Oui (p=0,61)	Oui (p=0,43)	Test non réalisé	Test non réalisé	Oui (p=0,68)
Test réalisé pour la comparaison des 4 moyennes	ANOVA sur les rangs (Kruskal-Wallis)	ANOVA sur les rangs (Kruskal-Wallis)	ANOVA	ANOVA	ANOVA	ANOVA sur les rangs (Kruskal-Wallis)	ANOVA sur les rangs (Kruskal-Wallis)	ANOVA
Résultat du test de comparaison de moyennes	DS (p<0,01)	DS (p<0,01)	DS (p<0,01)	DS (p<0,01)	DS (p<0,01)	DS (p<0,01)	DS (p<0,01)	DS (p<0,01)
Comparaisons deux à deux								
Test mis en œuvre	Tukey sur les rangs	Tukey sur les rangs	Tukey	Tukey	Tukey	Tukey sur les rangs	Tukey sur les rangs	Tukey
Niquitin® / Nicotinell®	DNS	DNS	DS	DS	DS	DS	DS	DS
Niquitin® / Nicorette®	DS	DNS	DS	DS	DS	DNS	DNS	DS
Niquitin® / Nicopatch®	DNS	DNS	DS	DS	DS	DNS	DNS	DS
Nicopatch® / Nicotinell®	DNS	DNS	DNS	DNS	DNS	DNS	DNS	DNS
Nicopatch® / Nicorette®	DS	DS	DS	DS	DS	DS	DS	DS
Nicorette® / Nicotinell®	DS	DS	DS	DS	DS	DS	DS	DS

Tableau 13 : Tests statistiques réalisés sur les données de l'étude de 2004 sur peau de souris

Peau de porc :

Critère de comparaison	Q _{3h}	Q _{6h}	Q _{9h}	Q _{12h}	Q _{16h}	Q _{20h}	Q _{24h}	J _{éq}
Comparaison des 4 groupes « spécialité »								
Normalité	Oui (p=0,60)	Oui (p=0,30)	Oui (p=0,57)	Oui (p=0,84)	Oui (p=0,60)	Oui (p=0,69)	Oui (p=0,69)	Oui (p=0,98)
Egalité des variances des 4 groupes (spécialités)	Oui (p=0,33)	Oui (p=0,17)	Non (p=0,1)	Oui (p=0,18)	Oui (p=0,19)	Oui (p=0,13)	Oui (p=0,12)	Oui (p=0,28)
Test réalisé pour la comparaison des 4 moyennes	ANOVA	ANOVA	ANOVA sur les rangs (Kruskal-Wallis)	ANOVA	ANOVA	ANOVA	ANOVA	ANOVA
Résultat du test de comparaison de moyennes	DS (p=0,002)	DNS (p=0,15)	DNS (p=0,41)	DNS (p=0,26)	DNS (p=0,18)	DNS (p=0,18)	DNS (p=0,10)	DS (p=0,04)
Comparaisons deux à deux								
Test mis en œuvre	Tukey							Tukey
Niquitin® / Nicotinell®	DS							DNS
Niquitin® / Nicorette®	DS							DNS
Niquitin® / Nicopatch®	DS	Test non réalisé	Test non réalisé	Test non réalisé	Test non réalisé	Test non réalisé	Test non réalisé	DNS
Nicopatch® / Nicotinell®	DNS							DNS
Nicopatch® / Nicorette®	DNS							DNS
Nicorette® / Nicotinell®	DNS							DS

Tableau 14 : Tests statistiques réalisés sur les données de l'étude de 2011 sur peau de porc

Annexe 5. Recherche de corrélation entre les valeurs de PIE et les valeurs de quantité cumulée obtenues sur peau de porc et sur peau de souris

Dans cette annexe, sont présentées les représentations graphiques de quantités cumulées en fonction de la PIE de la peau.

Peau de souris :

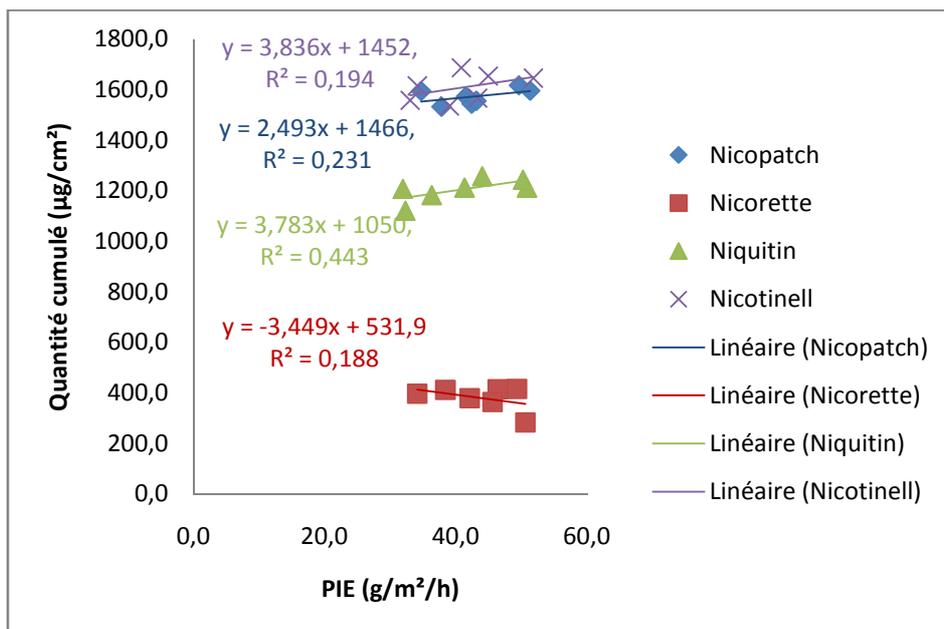
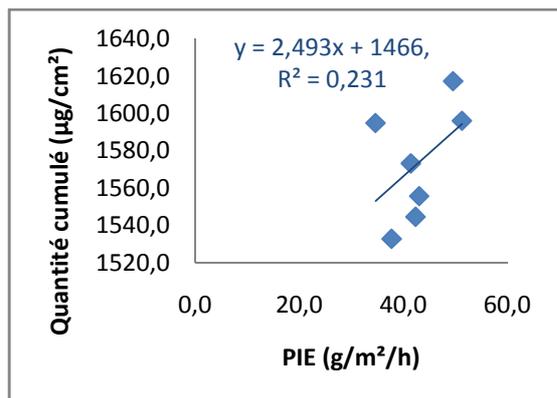
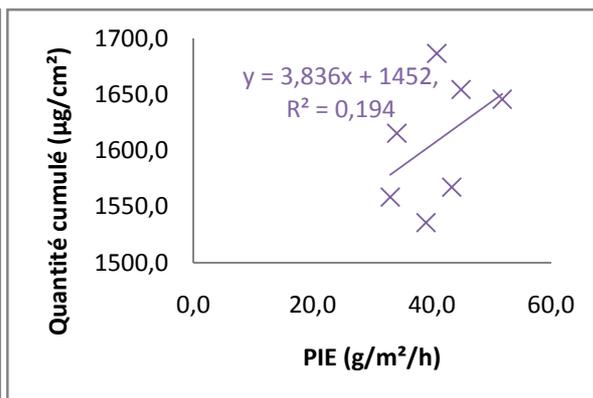


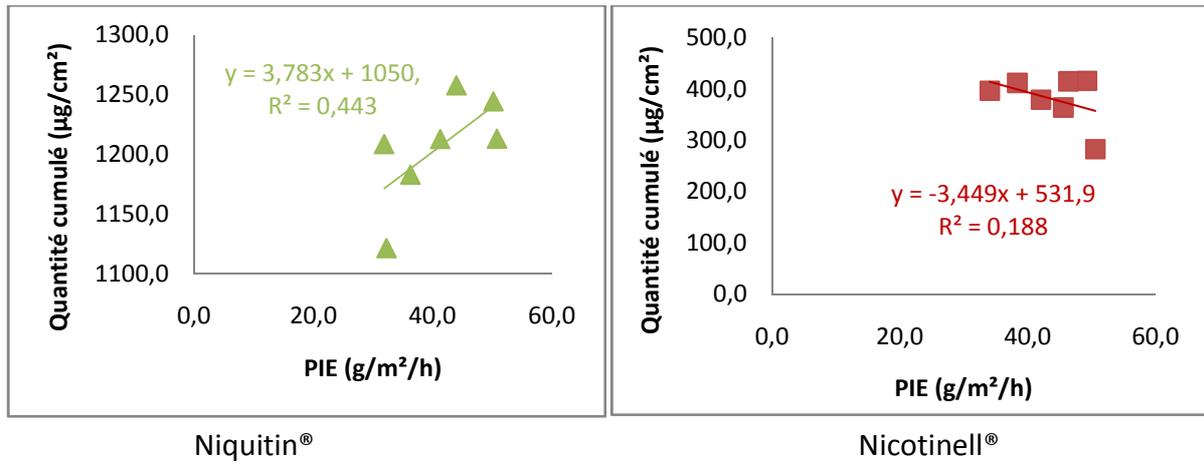
Figure 20 : Recherche de corrélation entre la Quantité cumulé de nicotine dans le milieu receveur à 16h et la PIE de la peau – peau de souris (données de 2004)



Nicopatch®



Nicorette®



Peau de porc :

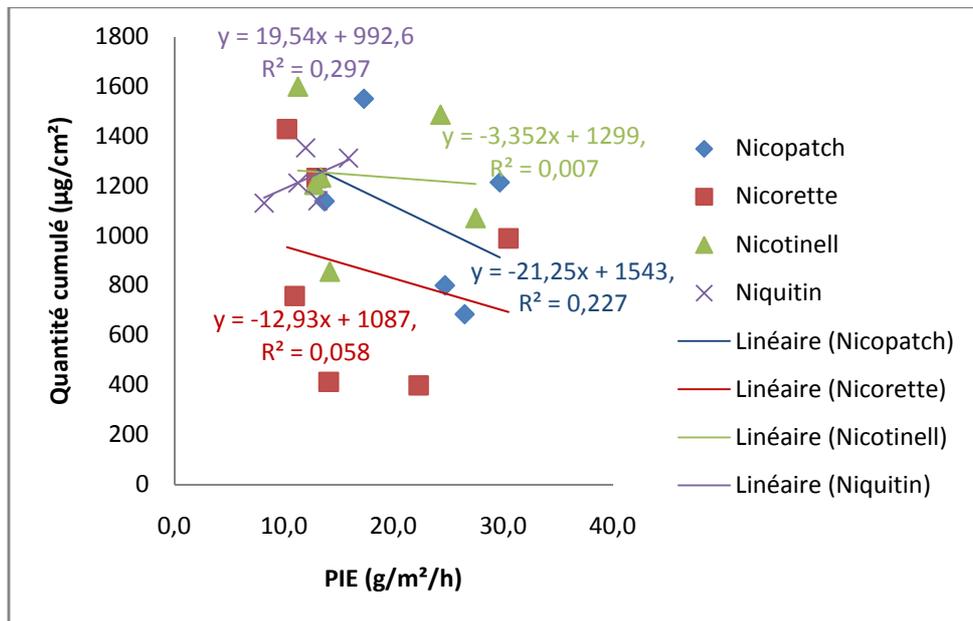


Figure 21 : Recherche de corrélation entre la Quantité cumulé de nicotine dans le milieu receveur à 16h et la PIE de la peau – peau de porc (données de 2011)

Liste des figures

Figure 1 : Structure de la peau(1).....	5
Figure 2 : Coupe verticale de la paroi latérale du thorax.....	6
Figure 3 : Coupe verticale de cuir chevelu	6
Figure 4 : Peau épaisse, pulpe du doigt	6
Figure 5 : Structure de l'épiderme(1).....	7
Figure 6 : Structure chimique des céramides du SC (d'après (5)).....	8
Figure 7 : Follicule pileux (a) et poil (b) (1).....	9
Figure 8 : Structure des systèmes transdermiques (d'après (4)).....	13
Figure 9 : Mécanismes de passage des principes actifs à travers la peau (31).....	17
Figure 10 : Deux systèmes de microdialyse	24
Figure 11: Cellule de diffusion horizontale (conditions statiques) (44).....	25
Figure 12 : Cellule de Franz (conditions statiques) (44).....	25
Figure 13 : Cellule à flux continu (44).....	26
Figure 14 : Sonde de mesure de la PIE(48).....	28
Figure 15 : Modélisation de la barrière cutanée pour les modèles mécanistiques.....	33
Figure 16 : Structure chimique de la nicotine	38
Figure 17 : Capacité discriminante du modèle (peau de souris) vis-à-vis de patches de nicotine	43
Figure 18 : Capacité discriminante du modèle (peau de porc) vis-à-vis de patches de nicotine	43
Figure 19 : Répartition des études de perméation cutanée de l'annexe 1 en fonction de l'objectif de l'étude et du modèle membranaire (études réalisées entre 2009 et 2011)	47
Figure 20 : Recherche de corrélation entre la Quantité cumulé de nicotine dans le milieu receveur à 16h et la PIE de la peau – peau de souris (données de 2004)	65
Figure 21 : Recherche de corrélation entre la Quantité cumulé de nicotine dans le milieu receveur à 16h et la PIE de la peau – peau de porc (données de 2011).....	66

Liste des tableaux

Tableau 1 : Cellules de l'épiderme vivant.....	7
Tableau 2 : Exemples d'applications de systèmes transdermiques.....	12
Tableau 3 : Principaux promoteurs d'absorption (38).....	21
Tableau 4 : Comparaison de l'épaisseur des <i>Stratum corneum</i> humain et porcin et de la pilosité des deux espèces.....	35
Tableau 5 : Comparaison des peaux humaine et porcine en termes de perméabilité à différentes molécules.....	37
Tableau 6 : Critères d'évaluation retenus pour l'étude.....	38
Tableau 7 : Les patchs à base de nicotine étudiés.....	39
Tableau 8 : Conditions opératoires des deux études.....	41
Tableau 9 : Variabilité de la PIE (exprimée en g/cm ² /h) en fonction de l'individu.....	42
Tableau 10 : Données de PIE sur peau de porc et peau de souris.....	56
Tableau 11 : Données pour l'analyse statistique - Peau de porc.....	61
Tableau 12 : Données pour l'analyse statistique - Peau de souris.....	62
Tableau 13 : Tests statistiques réalisés sur les données de l'étude de 2004 sur peau de souris.....	63
Tableau 14 : Tests statistiques réalisés sur les données de l'étude de 2011 sur peau de porc.....	64

Bibliographie

1. **Marieb, E. N.** *Anatomie et physiologie humaine*. Paris, Bruxelles : DeBoeck Université, 1999.
2. **Kühnel, W.** *Atlas de poche d'histologie 4e édition*. Paris : Flammarion, 2009.
3. **Lafforgue, C.** Lipides épidermiques et Stratum corneum. *Réalités thérapeutiques en dermato-vénéréologie*. 2008, 179, cahier 2.
4. **Falson-Rieg, F., Faivre, V. et Pirot, F.** *Nouvelles formes médicamenteuses*. Paris : Editions TEC et Doc, Editions Médicales Internationales, 2004.
5. **Ponec, M.** Skin constructs for replacement of skin tissues for in vitro testing. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2002, 54 Suppl. 1.
6. **Wehrlé, P.** *Pharmacie Galénique - Formulation et technologie pharmaceutique*. Paris : Maloine, 2007.
7. **Pirot, F.** Physiologie de la fonction barrière de la peau. [auteur du livre] Pierre Agache. *Physiologie et explorations fonctionnelles cutanées*. Paris : Techniques et Documentation, 2000.
8. **Wilkosz, M. F. et Bogner, R. H.** Transdermal Drug Delivery - Part 1 : Current Status. *U.S. Pharmacist*. Jobson, 2003, Vol. 28, 04.
9. **Kumar, J. A., et al.** Transdermal drug delivery system: an overview. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*. 2010, Vol. 3, 2.
10. **Sournac, M.** Les dispositifs transdermiques : états des lieux et perspectives. *Kératin*. Privat, 2004, 8.
11. **CNHIM (Centre national Hospitalier d'Information sur le Médicament)**. Thériaque. [En ligne] [Citation : 15 10 2011.] http://www.theriaque.org/InfoMedicaments/home.cfm?menu_info_medicaments=rechercheMulti.
12. **Le Hir, A., Chaumeil, J.-C. et Brossard, D.** *Pharmacie Galénique* . Paris : Masson 9e édition, 2009.
13. **DEQM (Direction Européenne de la Qualité du Médicament)**. Pharmacopée Européenne 7.0 - Dispositifs transdermiques. Strasbourg : s.n., 2010.
14. **United States Pharmacopeia - National Formulary**. USP 34 NF29. <1151> *Pharmaceutical dosage forms / general Information*. Rockville : s.n., 2011. Vol. 1.
15. **MYLAN-technologies**. *Amorphous Rotigotine Transdermal System*. WO 2010/042152 A2 2010.
16. **Inc, Hisamitsu Pharmaceutical**. *Transdermal Preparation containing Palonosetron*. EP 2 286 814 A1 Europe, 2011.
17. **Inc, Corinum International**. *Transdermal Administration of Tamsulosin*. WO 2010 083035 A2 2010 .
18. **INPI**. espacenet. [En ligne] [Citation : 17 02 2012.] <http://fr.espacenet.com/>.
19. **Neubert, R. H.H.** Potentials of new nanocarriers for dermal and transdermal drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2011, 77 p.1-2.

20. **Heushkel, S., Goebel, A. et Neubert, R. H. H.** Microemulsions—Modern Colloidal Carrier for dermal and transdermal drug delivery. *J Pharm Sci.* 2008, 97 p. 603-631.
21. **Xingyan, L. et al.** Preparation of a ligustrazine ethosome patch and its evaluation in vitro and in vivo. *International Journal of Nanomedicine.* 2011, 6 p.241-247.
22. **El Maghraby, G. M. M. et al.** Oestradiol skin delivery from ultradeformable liposomes: refinement of surfactant concentration. *International Journal of Pharmaceutics.* 2000, 196 p. 63–74.
23. **Prausnitz, M. R.** Microneedles for transdermal drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* 56 (2004) 581– 587. 2004, 56 p. 581-587.
24. **Harvinder, S. G. et Prausnitz, M. R.** Coated microneedles for transdermal delivery. *Journal of Controlled Release.* 2007, 117 p. 227-237.
25. **Parminder, S. et Maibach, H. I.** Iontophoresis: an alternative to the use of carriers in cutaneous drug delivery. *Advanced drug delivery review.* 1996, 18 p. 379-394.
26. **Kanikkannan, N.** Iontophoresis-based transdermal delivery systems. *Biodrugs.* 2002, Vol. 5, 16.
27. **Yogeshvar, N. K., et al.** Iontophoretic drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 2004, 56.
28. **Bogner, R. H. et al.** Transdermal Drug Delivery - Part 2 : Upcoming development. *U.S. Pharmacist.* 2003, Vol. 28, 5.
29. **Pahade, A., Jadhav, V. M. et Kadam, V. J.** Sonophoresis : an overview. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research.* 2010, Vol. 3, 2.
30. **Escobar-Chávez, J. J. et al.** The Use of Sonophoresis in the Administration of Drugs Throughout the skin. *J Pharm Pharmaceutic Science.* 2009, Vol. 1, 12 p. 88-115.
31. **Williams, A.** 2 theoretical aspects of transdermal drug delivery. [auteur du livre] Adrian Williams. *Transdermal and topical drug delivery from theory to clinical practice.* s.l. : Pharmaceutical Press, 2003, pp. 28-39.
32. **Shaefer, U. F. et al.** Chapitre I Models for Skin Absorption and Skin Toxicity Testing. [auteur du livre] K. Kwang-Jin E. Karsten. *Drug Absorption Studies.* New York : Springer, 2008.
33. **Marty, J-P.** Pénétration cutanée et biodisponibilité. [auteur du livre] M-C. Martini M. Seillier. *Formes pharmaceutiques pour application locale.* Paris : TEC et Doc, Lavoisier, 1996.
34. **Meidan, V. M. et Roper, C. S.** Inter- and intra-individual variability in human skin barrier function : a large scale retrospective study. *Toxicology in Vitro.* 2008, 22.
35. **Tanner, T. et Marks, R.** Delivering drugs by the transdermal route: Review and Comments. *Skin Research and Technology.* 2008, 14.
36. **Naik, A., Kalia, Y. K. et Guy, R. H.** Transdermal drug delivery: overcoming the skin's barrier function. *Pharmaceutical Science and Technology Today.* 2000, Vol. 3, 9.
37. **Dipen, M. . et Kavitha, K.** Formulation and evaluation aspects of transdermal drug delivery systems. *International Journal of Pharmaceutical Science Review and Research.* 2011, Vol. 6, 2.
38. **William, A. C. et Barry, B. W.** Penetration Enhancers. *Advanced drug delivery reviews.* 2004, 56.
39. **OCDE.** *Guidance document for the conduct of skin absorption studies number 28.* 2004. recommandation n°45.

40. —. *Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques n°427 - Absorption cutanée : méthodes in vivo*. 2004.
41. **SCCP (Scientific Committee on Consumer Products)**. *Opinion on BASIC CRITERIA FOR THE IN VITRO ASSESSMENT OF DERMAL ABSORPTION OF COSMETIC INGREDIENTS - updated March 2006*. s.l. : European commission C7 - Risk Assessment , 2006.
42. **Agache, P.** Fonction Barrière - Mesure de l'absorption cutanée chez l'homme in vivo. [auteur du livre] Pierre Agache. *Physiologie de la peau et explorations fonctionnelles cutanées*. s.l. : Techniques et Documentation, 2000.
43. **Herkenne, C., et al.** In vivo Methods for the Assessment of Topical Drug Bioavailability. *Pharmaceutical Research*. 2008, Vol. 25, 1.
44. **Brain**. Dermatological and transdermal formulation - Methods for studying percutaneous absorption. *Drugs and the pharmaceutical science*. 2002, Vol. 119.
45. **DEQM (Direction de la Qualité du Médicament du conseil de l'Europe)**. 5.7.1 Recommendations sur l'essai de dissolution. *Pharmacopée Européenne 7e édition*. 2011.
46. **Skelly**. FDA and AAPS Report of the Workshop on Principles and Practices of In Vitro Percutaneous Penetration Studies : Relevance to Bioavailability and Bioequivalence. *Pharmaceutical Research*. 1987, Vol. 4, 3.
47. **OCDE**. Ligne directrice pour les essais de produits chimiques. *Absorption cutanée : méthodes in vitro*. 2004. 428. recommandations n° 11 et 12.
48. **Gabard, B. et Treffel, P.** Mesure de la perte insensible en eau. [auteur du livre] Pierre Agache. *Physiologie de la peau et explorations fonctionnelles cutanées*. s.l. : Techniques et Documentation, 2000.
49. **Colombo, P., et al.** Biological In Vitro Models for Absorption by Nonoral Routes. *Comprehensive Medicinal Chemistry II*. s.l. : Elsevier, 2007.
50. **Agence de Biomédecine**. [En ligne] [Citation : 5 12 2011.] <http://www.juridique-biomedecine.fr/code-de-la-sante/chapitre-1-prlvement-et-collecte.html#article-l-1241-6>.
51. **Godin, B. et Tuitou, E.** Transdermal skin delivery: Predictions for humans from in vivo, ex vivo and animal models. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2007, 59.
52. **Van de Stant, J.J.** In vitro predictions of skin absorption of caffeine, testostérone and benzoic acid: a multi-centre comparison study. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2004, 39.
53. **Guy, R. H. et Russel, L. M.** Measurement and prediction of the rate and extent of drug delivery into an through the skin. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2009, Vol. 6, 4.
54. **Flynn, G. L.** Physicochemical Determinants of Skin Absorption. [auteur du livre] T. R. Gerrity et C. J. Henry. *Principles of Route-to-Route Extrapolation for Risk Assessment*. s.l. : Elsevier, 1990.
55. **Univerity of Newcastle**. EDETOX. [En ligne] <http://edetox.ncl.ac.uk/>.
56. **Potts, R. O. et Guy, R. H.** Predicting skin permeability. *Pharmaceutical Research*. 1992, Vol. 9, 5.
57. **Buchwald, P. et Bodor, N. J.** A simple, predictive, structure-based skin permeability model. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2001, Vol. 53, 8.
58. **Geinoz, S., et al.** Quantitative Structure-Permeation Relationship (QSPeRs) to Predict Skin Permeation: A Critical Evaluation. *Pharmaceutical Research*. 2004, Vol. 21, 1.

59. **Degim, I. T.** New tools and approaches for predicting skin permeability. *Drug Discovery Today*. 2006, Vol. 11, 11/12.
60. **Cronin, M.T.D. et Hewitt, M.** In Silico Models to Predict Passage through the skin and other Barrier. *Comprehensive Medicinal Chemistry II - vol 5*. s.l. : Elsevier, 2007.
61. **Lavker, R. M., et al.** Hairless Micropig Skin - A Novel Model for Studies of Cutaneous Biology. *American Journal of Pathology*. 1991, Vol. 138, 3.
62. **Montagna, W. et Yun, J. S.** The Skin of The Domestic Pig. *The Journal of investigative Dermatology*. 1964, 43.
63. **Jacobi, U., et al.** Porcine ear skin: an in vitro model for human skin. *Skin Research and Technology*. 2007, 3.
64. **Songkro, S., et al.** Investigation of newborn pig skin as in vitro animal model for transdermal drug delivery. *S.T.P. Pharma Science*. 2003, Vol. 13, 2.
65. **Cilurzo, F. et al.** Newborn Pig Skin as Model Membrane in In Vitro Drug Permeation Studies: A Technical Note. *AAPS PharmSciTech*. 2007, Vol. 8, 4.
66. **Qvist, M. H., et al.** Evaluation of Göttingen minipig for transdermal in vitro permeation studies. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2000, 11.
67. **Fujii, M., et al.** Evaluation of Yucatan Micropig Skin for Use as in Vitro Model for Skin permeation Study. *Biol. Pharm. Bull.* 1997, Vol. 20, 3.
68. **Schmook, F. P., Meingassner, J. G. et Billich, A.** Comparaison of human skin or epidermis models with human and animal skin in in vitro percutaneous absorption. *international Journal of Pharmaceutics*. 2001, 215.
69. **Dick, I. P. et Scott, R. P.** Pig Ear Skin as an In Vitro Model for Human Skin Permeability. *J. Pharm. Pharmacol.* 1992, 44.
70. **Enguehard-Gueiffier, C. et Gueiffier, A.** Médicaments du sevrage tabagique. [auteur du livre] AFECT. *Médicaments actifs sur le système nerveux centrale*. s.l. : Lavoisier, 2011.
71. **INSERM.** *Tabac : comprendre la dépendance pour agir - expertise collective*. 2004.
72. **AFSSAPS.** Répertoire des médicaments. [En ligne] <http://afssaps-prd.afssaps.fr/php/ecodex/index.php>.
73. **Levin, J. et Maibach, H.** The correlation between transepidermal water loss and percutaneous absorption: an overview. *Journal of Controlled Release*. 2005, Vol. 103, 2.
74. **Obata, Y., Ashitakaa, Y. et Kikuchia, S.** A statistical approach to the development of a transdermal delivery system for ondansetron. *International Journal of Pharmaceutics*. 2010, 399.
75. **Aboelwafa, A. et al.** Comparative Study on the Effects of Some Polyoxyethylene Alkyl Ether and Sorbitan Fatty Acid Ester Surfactants on the Performance of Transdermal Carvedilol Proniosomal Gel Using Experimental Design. *AAPS PharmSciTech*. 2010, Vol. 11, 4.
76. **Song, K., et al.** Comparison of the antimelanogenic effects of p-coumaric acid and its methyl ester and their skin permeability. *Journal of Dermatological Science*. 2011, 63.
77. **Nishida, N., et al.** Development and evaluation of a monolithic drug-in-adhesive patch for valsartan. *International Journal of Pharmaceutics*. 2010, 402.
78. **Tominaga, K. et Tojo, K.** Effect of Environmental Temperature on Transdermal Drug Penetration. *Biol. Pharm. Bull.* 2010, Vol. 33, 12.

79. **Joonho, C. et al.** Effect of fatty acids on the transdermal delivery of donepezil: In vitro and in vivo evaluation. *International Journal of Pharmaceutics*. 2011.
80. **Moribe, K., et al.** Effect of Particle Size on Skin Permeation and Retention of Piroxicam in aqueous suspension. *Chem. Pharm. Bull.* 2010, Vol. 58, 8.
81. **Liu, K-S., et al.** Enhancement of transdermal apomorphine delivery with a diester prodrug strategy. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2011, 78.
82. **Obata, Y., Otake, Y. et Takayama, K.** Feasibility of Transdermal Delivery of Prochlorperazine. *Biol. Pharm. Bull.* 2010, Vol. 33, 8.
83. **Christensen, J. M. et al.** Hydrocortisone Diffusion Through Synthetic Membrane, Mouse Skin and Epiderm (TM) Cultured Skin. *Archives of Drug Information*. 2011, 4.
84. **Kwon, T. K. et Kim, J. C.** In vitro skin permeation of monoolein nanoparticles containing hydroxypropyl beta-cyclodextrin/minoxidil complex. *International Journal of Pharmaceutics*. 2010, 392.
85. **Nam, S. H., et al.** Ion pairs of risedronate for transdermal delivery and enhanced permeation rate on hairless mouse skin. *International Journal of Pharmaceutics*. 2011, 419.
86. **Devarajan-Ketha, H. et Sloan, K. B.** N,N0-Dialkylaminoalkylcarbonyl (DAAC) prodrugs and aminoalkylcarbonyl(AAC) prodrugs of 4-hydroxyacetanilide and naltrexone with improved skin permeation properties. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2011, 21.
87. **Subedi, R. K., et al.** Influence of formulation variables in transdermal drug delivery system containing zolmitriptan. *International Journal of Pharmaceutics*. 2011, 419.
88. **Zhang, Li-Wen, et al.** Oil components modulate the skin delivery of 5-aminolevulinic acid and its ester prodrug from oil-in-water and water-in-oil nanoemulsions. *International Journal of Nanomedicine*. 2011, 6.
89. **Okamoto, H, et al.** Sugar Ester J-1216 Enhances Percutaneous Permeation of Ionized Lidocaine. *JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES*. 2011, Vol. 100, 10.
90. **ElMeshad, A. N. et Tadros, M. I.** Transdermal Delivery of an Anti-Cancer Drug via W/O Emulsions Based on Alkyl Polyglycosides and Lecithin: Design, Characterization, and In Vivo Evaluation of the Possible Irritation Potential in Rats. *AAPS PharmSciTech*. 2011, Vol. 12, 1.
91. **Chen, C. et al.** Transdermal delivery of selegiline from alginate–Pluronic composite thermogels. *International Journal of Pharmaceutics*. 2011, 15.
92. **Wang, Y., et al.** Transdermal permeation of geniposide in the herbal complex liniment in vivo and in vitro. *International Journal of Pharmaceutics*. 2010, 392.
93. **Vávrová, K., et al.** Enhanced Topical and Transdermal Delivery of Antineoplastic and Antiviral Acyclic Nucleoside Phosphonate cPr-PMEDAP. *Pharm Res*. 2011.
94. **Zhang, L-W., et al.** A comparison of skin delivery of ferulic acid and its derivatives: Evaluation of their efficacy and safety. *International Journal of Pharmaceutics*. 2010, 399.
95. **Simonetti, L. D.D., et al.** Assessment of the percutaneous penetration of cisplatin: The effect of monoolein and the drug skin penetration pathway. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2009, 73.
96. **Rubio, L., et al.** Barrier function of intact and impaired skin: percutaneous penetration of caffeine and salicylic acid. *International Journal of Dermatology*. 2011, 50.
97. **Yuan, J. S., et al.** Effect of surfactant concentration on transdermal lidocaine delivery with linker microemulsions. *International Journal of Pharmaceutics*. 2010, 392.

98. **Hasanovic, A., et al.** Improvement in physicochemical parameters of DPPC liposomes and increase in skin permeation of aciclovir and minoxidil by the addition of cationic polymers. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2010, 75.
99. **Yariv, D., et al.** In vitro permeation of diclofenac salts from lyotropic liquid crystalline systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2010, 78.
100. **Zhang, J. et Michniak-Kohn, B.** Investigation of microemulsion microstructures and their relationship to transdermal permeation of model drugs: Ketoprofen, lidocaine, and caffeine. *International Journal of Pharmaceutics*. 2011, 421.

Nom – Prénoms : Lemoine Carmen Marie

Titre de la thèse : Evaluation de la peau de porc et de la peau de souris comme modèles pour les études *in vitro* de perméation cutanée dans un contexte de médicaments transdermiques

Résumé de la thèse

La voie transdermique est intéressante pour administrer de façon continue et prolongée des principes actifs, sans premier passage hépatique. Sur le marché, elle est représentée principalement par les dispositifs transdermiques. La structure de la peau en fait une barrière efficace à la plupart des substances chimiques. C'est la couche superficielle de la peau, le *Stratum corneum* qui en est le principal acteur. Le passage à travers la peau d'un principe actif contenu dans un dispositif transdermique dépend de facteurs liés au patient, des caractéristiques physico-chimiques du principe actif et de la formulation du médicament. Depuis la sélection de principes actifs candidats jusqu'aux études cliniques finales en passant par l'optimisation de la formulation, le développement d'un médicament transdermique s'appuie sur des études de perméation cutanée. A l'étape de formulation, le galéniste s'appuie sur des résultats obtenus *in vitro*. Ce travail a pour but de comparer deux modèles membranaires pour ce type d'études, la peau de souris et la peau de porc, selon deux critères principaux : la représentativité vis-à-vis de la peau humaine et la capacité discriminante vis-à-vis du choix de formules. D'après la synthèse de données bibliographique, la peau de porc est physiologiquement plus proche de la peau humaine que celle des autres mammifères, dont la souris. La peau de porc est également unanimement reconnue comme possédant une perméabilité très proche de celle de l'homme. Enfin, une étude expérimentale a permis de montrer que grâce à une faible variabilité, la peau de souris est un modèle plus discriminant que la peau de porc, permettant de faire des choix efficaces de formulation.

MOTS CLES

ABSORPTION TRANSDERMIQUE, ETUDE IN VITRO, PEAU DE SOURIS, PEAU DE PORC, PATCH, FORMULATION

JURY

PRESIDENT : Mme Christine Herrenknecht, Professeur de Chimie Analytique
Faculté de Pharmacie de Nantes

ASSESEURS : Mme Laurence Coiffard, Professeur de Cosmétologie
Faculté de Pharmacie de Nantes
Mme Francine Dozolme
Centre de Recherche et Développement Pierre Fabre, Toulouse
