



Faculté de Médecine
Laboratoire de Technologie Pharmaceutique et Biopharmacie (LTPB)
Laboratoire de Neurobiologie du Développement (GIGA-Neurosciences)

Développement, caractérisation et mise à l'échelle
d'un système liposomes - hydrogel thermosensible
pour une administration transtympanique afin de
traiter les surdités neurosensorielles induites par un
traumatisme sonore

Chloé Gauthy

Pharmacienne

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de
Doctorat en Sciences Biomédicales et Pharmaceutiques

Promotrices :
Prof. Géraldine Piel
Prof. Brigitte Malgrange

Année académique 2026-2027

Jury

Professeure Géraldine Piel	(<i>Promotrice</i> , Université de Liège, BE)
Professeure Brigitte Malgrange	(<i>Co-Promotrice</i> , Université de Liège, BE)
Professeure Cécile Oury	(<i>Présidente du jury</i> , Université de Liège, BE)
Professeure Laurence Delacroix	(<i>Secrétaire du jury</i> , Université de Liège, BE)
Professeure Marianne Fillet	(Université de Liège, BE)
Docteur Bruno Grignard	(Université de Liège, BE)
Professeure Maud Martin	(Université Libre de Bruxelles, BE)
Professeur Guillaume Bastiat	(Université d'Angers, FR)

REMERCIEMENTS

Cette thèse marque l'aboutissement de plusieurs années de travail, de doutes, d'apprentissages et de belles rencontres. Je tiens à remercier sincèrement toutes les personnes qui m'ont conseillée, soutenue et accompagnée au cours de cette aventure.

Tout d'abord, je tiens à remercier ma promotrice de thèse, Madame la Professeure Géraldine Piel, qui m'a accordé sa confiance en m'offrant l'opportunité de réaliser cette thèse. Je la remercie pour son encadrement tout au long de ces quatre années, ainsi que pour sa disponibilité, ses conseils avisés et son suivi scientifique rigoureux, qui ont grandement contribué à l'avancement de ces travaux. Je lui adresse également mes sincères remerciements pour son soutien dans la réalisation de ce manuscrit.

Je tiens également à remercier Madame la Professeure Brigitte Malgrange, co-promotrice de cette thèse, qui m'a permis de découvrir un nouvel aspect de la recherche biomédicale et d'élargir mes compétences. Sa confiance en moi, sa bienveillance et sa positivité m'ont marquée et portée à travers certaines périodes de doute. Je suis également très reconnaissante d'avoir pu bénéficier de son regard critique de « biologiste » plutôt que de « pharmacienne », ce qui a apporté un éclairage complémentaire et contribué à renforcer la qualité de ce travail.

Je souhaite remercier Madame la Professeure Brigitte Evrard de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire de Technologie Pharmaceutique et Biopharmacie. Je la remercie également pour sa bonne humeur et son accessibilité au quotidien.

Je tiens également à exprimer ma gratitude aux membres de mon comité de thèse et jury, Madame la Professeure Cécile Oury, Madame la Docteure Laurence Delacroix, Madame la Professeure Marianne Fillet, Monsieur le Docteur Bruno Grignard, ainsi que mes deux promotrices, pour leur accompagnement, leurs encouragements et la pertinence de leurs remarques lors de nos réunions. Je remercie également Madame la Professeure Maud Martin et Monsieur le Professeur Guillaume Bastiat, membres du jury, pour le temps et l'attention qu'ils consacreront à l'évaluation de ce manuscrit.

Ce projet de recherche n'aurait pu voir le jour sans le généreux soutien financier de la Région wallonne, que je tiens à remercier. Je tiens également à exprimer ma gratitude au partenaire industriel Dendrogenix et à l'ensemble de ses membres pour leur bienveillance et leurs conseils.

A special thank you to Dr. Valentin Tallandier, Dr. Nicholas Cole, and Enes Spahic, who carried out the in vivo part of this project and made teamwork feel surprisingly effortless. After all, when each of us understands only half of what the others are doing, mutual trust becomes our greatest asset! I will truly miss our many discussions, filled with misunderstandings, improvised explanations, and plenty of laughter. Wishing you all the very best as life takes us to four different corners of Europe.

I would also like to thank my colleagues at GIGA-Neurosciences (Brigitte Malgrange, Laurence Delacroix, Renaud Vandenbosch, Pierre-Bernard Van Lerberghe, Salimata Kane, Nicholas Cole, Erwan Doume, Hilde Smeenk, Camille Lejon, Timothé Krummenacker, Auriane Toupet, Valentin Tallandier, Enes Spahic and also Hannah Bruce, Célia Lemoine and Kim Mottard), who welcomed me so warmly from the very beginning and made me feel part of the team. Thank you as well for your guidance, advice, and patience as I navigated my rather clumsy first steps in cell culture!

J'aimerais remercier tous les membres du Laboratoire de Technologie Pharmaceutique et Biopharmacie, anciens et actuels, pour l'ambiance agréable et les moments partagés durant toutes ces années. Merci à Vanessa Strauven, Françoise Léonard et Laurence Collard, les « petites mains » indispensables qui permettent à ce laboratoire de tourner et accompagnent les doctorants en cas de problèmes administratifs, techniques ou scientifiques. Merci à Brigitte Evrard, Géraldine Piel, Anna Lechanteur, Robin Crunenbergh, Olivier Jennotte, Nathan Koch, Noémie Penoy, Chloé Parulski, Manon Berger, Eva

Gresse, Laure-Anne Bya, Tuan Nghia Dinh, Quentin Bourcy, Manon Degey, Alicia Curnel, Giacomo Baudino, Berfin Dédé, Lena Renauld et Sixtine de Harlez de Deulin pour tous les beaux moments partagés, au labo ou en-dehors, et les nombreux souvenirs que j'en garderai.

Un merci tout particulier à Laure-Anne Bya et Tuan Nghia Dinh, qui ont commencé cette aventure doctorale à mes côtés. Traverser les épreuves ensemble a rendu chaque étape plus facile. Merci.

Je remercie la Professeure Anne-Catherine Servais, du laboratoire d'analyse des médicaments, et le Docteur Patrice Chiap, du laboratoire de toxicologie du CHU de Liège, pour leur aide précieuse dans le développement des méthodes HPLC, ainsi que la réalisation de certaines analyses.

Merci à la Docteure Noémie Penoy et le Docteur Pierre-Yves Sacré, du RSU Chemometrics, pour leur encadrement scientifique et statistique dans le cadre du plan d'expériences de la méthode PGSS. Merci également à la Professeure Dominique Teye et au Docteur Sébastien Calvo, du laboratoire de génie chimique, pour leur aide dans la compréhension des résultats du plan d'expériences.

Merci à la Docteure Erika Hendrickx et à la Docteure Louise Conrard, du Centre de microscopie et d'imagerie moléculaire de l'ULB, pour la réalisation des analyses en cryo-TEM.

Merci à Raphaël Closset, du GREnMat, pour son implication dans la mise au point et la réalisation des analyses rhéologiques, ainsi que pour son aide précieuse dans l'interprétation des résultats.

Je souhaite également remercier mes plus proches amies, qui m'ont toujours soutenue dans mes aventures et présentent des caractères aux antipodes les unes des autres. Les retrouver le temps d'une après-midi me ressourcent comme peu de choses en sont capables. Merci à Lucie Corneau, Elodie Brévère, Charlotte Régibeau, Charline Faville et Héloïse Gohy. Merci également à Aurore Boclinville, une amie de longue date que j'ai rencontrée dans la cour du collège et que je retrouve aujourd'hui en doctorat. Merci d'avoir été à l'écoute toutes ces années, tu es la seule qui pouvait réellement me comprendre et ça, ça n'avait pas de prix !

Je tiens également à remercier sincèrement ma belle-famille. Malgré des personnalités bien différentes dans la fratrie, il vous tient tous particulièrement à cœur de soutenir les projets des autres, qu'ils soient personnels ou professionnels. Vous me l'avez démontré à de nombreuses reprises, et j'ai particulièrement ressenti ce soutien au cours de ces derniers mois. Merci à tous !

Merci à mes deux petits frères pour leur soutien, les nombreuses distractions et les moments de rire qu'ils m'ont offerts et qui m'ont aidée à « déconnecter », ainsi que pour avoir supporté, pendant toutes ces années, que mes études et mon travail occupent une si grande place à la maison.

J'aimerais adresser un immense merci à mes parents. Merci pour votre soutien indéfectible et la confiance que vous m'avez toujours accordée. Vous avez tout mis en œuvre pour me donner les meilleures opportunités possibles et m'avez transmis le goût du travail bien fait. C'est avant tout grâce à vous que j'en suis arrivée là aujourd'hui. Merci d'avoir toujours cru en moi, surtout quand je n'en étais pas capable moi-même.

Le meilleur pour la fin... Merci infiniment à mon petit mari, qui m'a écoutée, conseillée, soutenue, consolée, encouragée et nourrie (littéralement !) pendant ces quatre longues années, mais plus encore au cours de ces derniers mois particulièrement intenses. Cette folle aventure doctorale n'aurait tout simplement pas été la même sans cette force tranquille à mes côtés, toujours présente pour m'aider à relativiser, à avancer et à croire en moi. Tu m'as permis d'aller au bout de mes ambitions, sans jamais perdre de vue les tiennes. Je t'en suis infiniment reconnaissante.

Cette thèse marque la fin d'un chapitre, mais les rencontres et les souvenirs qu'elle m'a offerts l'accompagneront bien au-delà. Merci.

Chloé

RÉSUMÉ

L'utilisation de la voie transtympanique (TT) constitue une stratégie prometteuse pour la délivrance cochléaire de principes actifs visant à traiter les surdités neurosensorielles induites par un traumatisme sonore. Les formulations administrées par cette voie doivent néanmoins traverser la membrane de la fenêtre ronde (RWM) afin d'atteindre le compartiment périlymphatique. L'encapsulation des molécules actives dans des liposomes est susceptible de favoriser leur pénétration cochléaire. Toutefois, leur faible viscosité entraîne leur clairance rapide via la trompe d'Eustache. La dispersion de ces nanoparticules dans un hydrogel thermosensible permet dès lors de prolonger leur temps de contact avec la RWM et d'améliorer leur potentiel thérapeutique. L'objectif de cette thèse est donc de développer, caractériser et mettre à l'échelle un système à base de liposomes encapsulant des principes actifs à noyau stéroïdien, dispersés dans un hydrogel thermosensible, adapté à une administration TT, afin de traiter les surdités neurosensorielles induites par un traumatisme sonore.

Les études réalisées ont principalement confirmé l'influence de la composition lipidique sur l'efficacité d'encapsulation de la dexaméthasone, qui diminue en présence de cholestérol. Elles ont également montré que les propriétés des principes actifs conditionnent le développement de ces formulations, chaque molécule nécessitant une optimisation spécifique, comme l'illustrent les études réalisées avec la dexaméthasone, la dexaméthasone phosphate sodique et la DX243. L'association des liposomes à un hydrogel thermosensible de Poloxamer 407 a permis d'obtenir une formulation injectable à température ambiante et capable de gélifier rapidement ($8,0 \pm 3,8$ min) dans la cavité de l'oreille moyenne afin de prolonger son temps de résidence au niveau de la RWM et la libération des liposomes. Les travaux menés sur explants cochléaires murins ont par ailleurs confirmé l'effet otoprotecteur de cette formulation.

Le premier modèle *in vitro* de RWM a été développé. Un système compartimenté le positionnant en amont de cellules HEI-OC1 reproduisant les cellules ciliées cochléaires a ensuite été mis au point. Celui-ci a permis d'identifier les principaux paramètres favorisant la pénétration des liposomes à travers la membrane, notamment une taille particulière réduite et la présence de DOPE dans leur composition lipidique, puis de démontrer leur internalisation par les cellules cibles après franchissement de la RWM. Ce modèle constitue ainsi un outil préclinique innovant pour l'évaluation de nouvelles stratégies de délivrance cochléaire.

Les enjeux liés au transfert industriel de la production de liposomes ont été abordés par le développement du procédé PGSS. Une démarche « Quality by Design » a notamment permis d'identifier des conditions de fabrication prometteuses à l'échelle pilote (262 bar, 10% d'agitation, 100 mL, dépressurisation à 60 bar/min), conduisant à la production de liposomes de taille inférieure à 200 nm, tout en mettant en évidence les principaux axes d'amélioration du procédé, notamment la maîtrise de leur polydispersité ($PdI > 0,30$).

Dans l'ensemble, ce travail a permis de développer une formulation associant liposomes et hydrogel thermosensible pour l'encapsulation de principes actifs destinés à la cochlée. Bien qu'elle présente toujours certaines limites, notamment une stabilité limitée, son développement a permis d'apporter une meilleure compréhension des paramètres qui conditionnent ses performances. Ce travail a également permis de développer un modèle *in vitro* de RWM, un outil prometteur pour le développement et la caractérisation de nouvelles thérapies.

ABSTRACT

The use of the transtympanic (TT) route represents a promising strategy for the cochlear delivery of active pharmaceutical ingredients intended to treat noise-induced sensorineural hearing loss. However, formulations administered via this route must cross the round window membrane (RWM) to reach the perilymphatic compartment. Encapsulation of active compounds into liposomes may enhance their cochlear penetration. Nevertheless, their low viscosity results in rapid clearance through the Eustachian tube. Dispersing these nanoparticles within a thermosensitive hydrogel can therefore prolong their contact time with the RWM and improve their therapeutic potential. The aim of this thesis is therefore to develop, characterize, and scale up a system based on liposomes encapsulating steroid-based active compounds, dispersed within a thermosensitive hydrogel, suitable for TT administration, to treat noise-induced sensorineural hearing loss.

The studies conducted primarily confirmed the influence of lipid composition on the encapsulation efficiency of dexamethasone, which was found to decrease in the presence of cholesterol. They also demonstrated that the physicochemical properties of the active compounds are critical determinants in formulation development, with each molecule requiring specific optimization, as illustrated by the studies performed with dexamethasone, dexamethasone sodium phosphate, and DX243. The incorporation of liposomes into a Poloxamer 407 thermosensitive hydrogel yielded a formulation that is injectable at room temperature and capable of rapidly gelling (8.0 ± 3.8 min) within the middle ear cavity, thereby prolonging its residence time at the RWM and sustaining liposome release. Furthermore, studies conducted on murine cochlear explants confirmed the otoprotective effect of this formulation.

The first *in vitro* model of the RWM was developed. A compartmentalized system positioning the RWM upstream of HEI-OC1 cells, which mimic cochlear hair cells, was subsequently established. This model enabled the identification of the main parameters promoting liposome penetration across the membrane, particularly smaller particle size and the presence of DOPE in the lipid composition, and demonstrated the internalization of liposomes by target cells following passage through the RWM. This model therefore represents an innovative preclinical tool for the evaluation of novel cochlear drug delivery strategies.

The challenges associated with the industrial scale-up of liposome production were addressed through the development of the PGSS process. In particular, a "Quality by Design" approach identified promising manufacturing conditions at the pilot scale (262 bar, 10% stirring, 100 mL, depressurization at 60 bar/min), leading to the production of liposomes with diameters below 200 nm while highlighting the main areas requiring further optimization, particularly the control of particle polydispersity ($PdI > 0.30$).

Overall, this work led to the development of a formulation combining liposomes and a thermosensitive hydrogel for the encapsulation and cochlear delivery of active compounds. Although the formulation still presents certain limitations, particularly limited stability, its development has provided a deeper understanding of the key parameters governing its performance. This work also resulted in the development of an *in vitro* RWM model, representing a promising preclinical tool for the development and characterization of novel cochlear therapies.

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION	1
I. Le contexte otologique des surdités	1
I.1. L'anatomie et la physiologie de l'oreille	2
I.2. La classification et l'étiologie des surdités	5
I.3. Les surdités neurosensorielles induites par un traumatisme sonore et leur prise en charge	8
I.3.1. La prise en charge des surdités induites par un traumatisme sonore	10
I.3.2. Les voies d'administration permettant d'atteindre la cochlée	11
I.3.2.1. Les voies systémiques	11
I.3.2.2. La voie intracochléaire	12
I.3.2.3. La bullotomie	13
I.3.2.4. La voie transtympanique	14
II. Les liposomes	15
II.1. Les composants des liposomes	16
II.1.1. Les phospholipides	17
II.1.2. Les stérols	19
II.1.3. Les lipides PEGylés	20
II.2. Le devenir intracellulaire des liposomes	21
II.3. Les propriétés et applications des liposomes	23
II.4. Les liposomes administrés par voie transtympanique	25
II.4.1. Les premières évaluations précliniques	25
II.4.2. Les attributs critiques de qualité des liposomes pour une administration transtympanique	26
II.4.2.1. La taille et l'indice de polydispersité	26
II.4.2.2. La charge de surface	27
II.4.2.3. La lamellarité	29
II.4.2.4. L'efficacité d'encapsulation du principe actif	31
II.4.2.5. Les autres critères non spécifiques de la voie transtympanique	33
II.4.2.5.1. La stabilité chimique	33
II.4.2.5.2. La stabilité physique	35
II.5. Les méthodes de production des liposomes	36
II.5.1. Les propriétés du scCO ₂	40
II.5.2. L'utilisation du scCO ₂ en tant qu'agent dispersant : le procédé PGSS	41
II.5.3. Les paramètres critiques en « <i>scale-up</i> »	42
II.6. Les limites des liposomes pour une administration transtympanique	44
III. Les hydrogels	45

III.1. L'intérêt des systèmes gélifiés pour la voie transtympanique	45
III.2. Les hydrogels thermosensibles	47
III.2.1. Les hydrogels thermosensibles à base de poloxamères	48
III.2.1.1. La nature et la structure du réseau polymérique	48
III.2.1.2. Le Poloxamer 407	50
III.2.1.3. Les propriétés fonctionnelles	51
III.2.1.3.1. Le caractère biomimétique	51
III.2.1.3.2. Les propriétés rhéologiques et mécaniques	51
III.2.1.3.3. La perméabilité aux solutés	52
III.2.2. Les méthodes d'évaluation des hydrogels	54
III.2.2.1. La température de transition sol-gel	54
III.2.2.2. Le temps de gélification	56
IV. Les modèles expérimentaux de la membrane de la fenêtre ronde et le développement de systèmes <i>in vitro</i> alternatifs	58
IV.1. Résumé de l'article de revue	58
IV.2. Publication	61
IV.2.1. Introduction	62
IV.2.2. Round window membrane anatomy	64
IV.2.3. Required properties to cross the RWM	65
IV.2.4. Laboratory models used for RWM penetration studies	67
IV.2.4.1. <i>In vivo</i> studies	67
IV.2.4.1.1. Main delivery routes in animal studies	68
IV.2.4.1.2. Considerations for animal model selection	68
IV.2.4.1.3. <i>In vivo</i> RWM penetration studies	69
IV.2.4.2. <i>Ex vivo</i> models	79
IV.2.4.2.1. Evolution of RWM <i>ex vivo</i> models	80
IV.2.4.2.2. RWM permeability	80
IV.2.4.3. <i>In vitro</i> models	81
IV.2.5. Modulation of RWM permeability	84
IV.2.6. Assessment of drug transport across the round window membrane and intracochlear biodistribution	86
IV.2.6.1. Quantitative assessment of drug transport	87
IV.2.6.2. Assessment of intracochlear biodistribution	88
IV.2.6.3. Current challenges and limitations	89
IV.2.7. Conclusion	89
CONTEXTE, OBJECTIFS ET PLAN DE LA THÈSE	95
I. Contexte	95
II. Objectifs	96

III. Plan de la thèse.....	97
PARTIE EXPÉRIMENTALE.....	101
CHAPITRE 1 – DÉVELOPPEMENT D’UN HYDROGEL THERMOSENSIBLE DISPERSANT DES LIPOSOMES ET PERMETTANT LA LIBÉRATION PROLONGÉE DE PRINCIPES ACTIFS À NOYAU STÉROÏDIEN EN VUE DE TRAITER LES SURDITÉS NEUROSENSORIELLES INDUITES PAR UN TRAUMATISME SONORE.....	101
I. Introduction.....	101
II. Partie 1 – Étude de l’impact des différents constituants des liposomes sur leur taille, ainsi que leur capacité à encapsuler la dexaméthasone et à moduler sa vitesse de libération	103
II.1. Introduction.....	103
II.2. Matériel et méthodes.....	106
II.2.1. Matériel.....	106
II.2.2. Production des liposomes.....	106
II.2.3. Purification des liposomes	106
II.2.4. Caractérisation des liposomes.....	107
II.2.4.1. Taille et PdI	107
II.2.4.2. Efficacité d’encapsulation	107
II.2.4.3. Quantification des principes actifs par HPLC	107
II.2.4.3.1. Dexaméthasone.....	108
II.2.4.3.2. Dexaméthasone phosphate sodique	108
II.2.4.4. Etude de la cinétique de libération de la dexaméthasone encapsulée.....	109
II.2.4.5. Analyse statistique.....	109
II.3. Résultats et discussion.....	110
II.3.1. Évaluation de l’impact de la composition lipidique des liposomes sur leur taille, ainsi que l’encapsulation et la libération de la dexaméthasone	110
II.3.2. Evaluation de l’impact de la composition lipidique des liposomes sur l’encapsulation de la dexaméthasone phosphate sodique	114
II.4. Conclusion.....	115
III. Partie 2 – Développement d’une formulation injectable combinant hydrogel thermosensible, liposomes et dexaméthasone afin de traiter les surdités neurosensorielles liées à un traumatisme sonore.....	117
III.1. Introduction	117
III.2. Résultats publiés.....	118
III.2.1. Résumé des résultats	118
III.2.2. Publication.....	122
III.2.2.1. Introduction.....	123
III.2.2.2. Materials and methods.....	125

III.2.2.2.1. Chemicals and reagents	125
III.2.2.2.2. Liposomes	126
III.2.2.2.3. Hydrogel	128
III.2.2.2.4. <i>In vitro</i> toxicity evaluation	131
III.2.2.2.5. Cochlear explant studies	132
III.2.2.2.6. Statistical analysis	133
III.2.2.3. Results and discussion	134
III.2.2.3.1. Liposome production and characterization	134
III.2.2.3.2. Formulation of the hydrogel based on P407 and liposomes	135
III.2.2.3.3. Hydrogel stability	137
III.2.2.3.4. <i>In vitro</i> dexamethasone release from the P407 hydrogel	138
III.2.2.3.5. Liposomes morphology	139
III.2.2.3.6. Liposomes and hydrogel biocompatibility	141
III.2.2.4. Conclusion	147
III.3. Résultats complémentaires	150
III.3.1. Introduction	150
III.3.2. Matériel et méthodes supplémentaires	150
III.3.2.1. Évaluation de la température de transition sol-gel	150
III.3.2.2. Etude de stabilité	151
III.3.2.2.1. Stabilité des dispersions colloïdales de P407	151
III.3.2.2.2. Stabilité des liposomes	152
III.3.2.3. Etude de cytocompatibilité avec la lignée HEI-OC1	152
III.3.2.4. Analyse statistique	152
III.3.3. Résultats et discussion	153
III.3.3.1. Identification de la température de transition sol-gel	153
III.3.3.2. Etudes de stabilité	154
III.3.3.2.1. Stabilité des dispersions colloïdales de P407	154
III.3.3.2.2. Stabilité des liposomes	156
III.3.3.3. Biocompatibilité des formulations H_L5_Dexa à 16,25% et 18,75% de P407 avec la lignée cellulaire HEI-OC1	158
III.3.4. Conclusion	160
IV. Partie 3 – Transposition de la formulation combinée hydrogel-liposomes à la DX243	161
IV.1. Introduction	161
IV.2. Matériel et méthodes	162
IV.2.1. Matériel	162
IV.2.2. Liposomes	162
IV.2.2.1. Production	162
IV.2.2.2. Purification	162
IV.2.2.3. Caractérisation	162
IV.2.2.3.1. Taille et PdI	162

IV.2.2.3.2. Efficacité d'encapsulation.....	163
IV.2.2.3.3. Quantification de la DX2403 par HPLC	163
IV.2.2.4. Dispersions colloïdales de P407	163
IV.2.2.4.1. Production.....	163
IV.2.2.4.2. Viscosité dynamique apparente	164
IV.2.2.5. Etude de la cytocompatibilité avec la lignée HEI-OC1	164
IV.2.2.6. Analyse statistique	164
IV.3. Résultats et discussion	164
IV.3.1. Transfert du protocole de production des liposomes à la DX2403	164
IV.3.2. Impact de la DX243 sur la viscosité de la dispersion colloïdale de P407	165
IV.3.3. Etude de la cytocompatibilité avec la lignée HEI-OC1	167
IV.4. Conclusion	168

CHAPITRE 2 – DÉVELOPPEMENT D'UN MODÈLE *IN VITRO* DE MEMBRANE DE LA FENÊTRE RONDE PERMETTANT D'ÉVALUER LE PASSAGE DE MOLÉCULES ET DE NANOPARTICULES VERS L'OREILLE INTERNE

.....**173**

I. Introduction.....	173
II. Matériel et méthodes.....	175
II.1. Matériel.....	175
II.2. Maintien des lignées cellulaires	176
II.3. Développement des modèles de RWM.....	176
II.4. Caractérisation de l'épithélium à l'interface air-liquide	177
II.4.1. Mesure de la résistance électrique transépithéliale.....	177
II.4.2. Marquage des jonctions serrées.....	177
II.4.3. Étude des flux paracellulaires	178
II.5. Test de viabilité cellulaire	179
II.6. Cinétiques de pénétration à travers les modèles de RWM.....	179
II.6.1. Production des liposomes	179
II.6.2. Caractérisation des liposomes.....	180
II.6.3. Tests de pénétration.....	180
II.7. Modèle en co-culture compartimentée.....	181
II.7.1. Développement des co-cultures	181
II.7.2. Evaluation de l'internalisation des liposomes par la lignée HEI-OC1 après passage du modèle de RWM.....	181
II.8. Analyse statistique	182
III. Résultats et discussion	182
III.1. Développement et caractérisation d'un épithélium à l'interface air-liquide.....	182
III.1.1. Mesure de la résistance électrique transépithéliale	182
III.1.2. Visualisation des jonctions serrées.....	184

III.1.3. Evaluation du flux paracellulaire	187
III.1.4. Identification du stade optimal de développement à l'interface air-liquide.....	188
III.2. Evaluation de la biocompatibilité de la formulation H_L5_Dexa avec les cellules Calu-3 et 16HBE14o-	189
III.3. Évaluation de la cinétique de pénétration des liposomes à travers les modèles de RWM	190
III.3.1. Impact de la composition lipidique des liposomes sur la cinétique de pénétration	190
III.3.2. Cinétique de pénétration de la formulation optimale de liposomes encapsulant de la dexaméthasone.....	195
III.4. Internalisation des liposomes par les cellules cibles HEI-OC1 après traversée du modèle de RWM	196
IV. Conclusion.....	197
 CHAPITRE 3 – DE LA PRODUCTION EN LABORATOIRE AU PROCÉDÉ PILOTE EN CONDITIONS GMP : TRANSFERT DE MÉTHODE, OPTIMISATION DES PARAMÈTRES ET MISE À L'ÉCHELLE DE LA MÉTHODE DE PRODUCTION DES LIPOSOMES.....	203
 I. Partie 1 – Transfert du procédé de production des liposomes à l'échelle du laboratoire : de l'hydratation du film lipidique (TFH) à la méthode PGSS utilisant le scCO₂.....	203
I.1. Introduction.....	203
I.2. Matériel et méthodes.....	205
I.2.1. Matériel	205
I.2.2. Production des liposomes	205
I.2.3. Purification des liposomes	205
I.2.4. Caractérisation des liposomes	205
I.2.4.1. Taille, PdI, ZP	205
I.2.4.2. Efficacité d'encapsulation	205
I.2.4.3. Etude de stabilité.....	206
I.2.4.4. Morphologie	206
I.2.5. Analyse statistique.....	206
I.3. Résultats et discussion.....	206
I.3.1. Comparaison des caractéristiques physico-chimiques des liposomes produits par les méthodes TFH et PGSS à l'échelle du laboratoire.....	206
I.3.2. Stabilité des liposomes produits par les méthodes TFH et PGSS	211
I.3.3. Morphologie.....	213
I.4. Conclusion.....	215
II. Partie 2 – Mise à l'échelle pilote du procédé PGSS utilisant le scCO₂ par l'approche « Quality by Design »	216

II.1. Introduction.....	216
II.2. Essai préliminaire	216
II.3. Résultats publiés	218
II.3.1. Résumé des résultats.....	218
II.3.2. Publication	222
II.3.2.1. Introduction	223
II.3.2.2. Materials and methods	225
II.3.2.2.1. Materials.....	225
II.3.2.2.2. Liposome production.....	226
II.3.2.2.3. Characterization of physicochemical properties of liposomes	228
II.3.2.2.4. Drugs quantification.....	229
II.3.2.2.5. Evaluation of lysophospholipids (LPC) content (hydrolysis products of phospholipids)	230
II.3.2.2.6. Determination of percentage of peroxidized lipids	231
II.3.2.2.7. Evaluation of liposomes morphology by cryo-TEM imaging	231
II.3.2.2.8. Statistical Analysis	232
II.3.2.3. Results and discussion	232
II.3.2.3.1. Risk analysis	232
II.3.2.3.2. Study of the impact of PGSS production parameters on liposome characteristics using the design of experiments approach	233
II.3.2.3.3. Validation of the optimal condition	240
II.3.2.3.4. Transfer of the optimal conditions to the production of drug-containing formulations	241
II.3.2.4. Conclusion	247
DISCUSSION GÉNÉRALE	253
I. La formulation combinée hydrogel-liposomes-dexaméthasone répond-elle aux critères de qualité requis pour une administration transtympanique ?	254
I.1. Quelles stratégies envisager pour limiter le relargage prématuré d'un principe actif encapsulé dans les liposomes ?.....	256
I.2. Une concentration thérapeutique de dexaméthasone peut-elle être atteinte avec un volume injectable compatible avec la voie transtympanique ?	261
II. Quels sont les avantages et les limites des méthodes PGSS et TFH pour la production des liposomes ?.....	265
III. Le système hydrogel-liposomes est-il transposable à d'autres principes actifs ?	268
III.1. Quels sont les aspects sensibles de la transposition du point de vue de la formulation des liposomes ?.....	268
III.2. Quels sont les aspects sensibles de la transposition du point de vue de la formulation d'hydrogel ?	271

IV. Quelles sont les limites et les perspectives du modèle <i>in vitro</i> de membrane de la fenêtre ronde ?.....	275
---	-----

CONCLUSIONS GÉNÉRALES 281

PERSPECTIVES 283

I. Transposition de la formulation combinée hydrogel-liposomes à d'autres principes actifs et applications thérapeutiques	283
II. Développement d'une forme sèche de liposomes	284
III. Poursuite de l'optimisation de la méthode PGSS à l'échelle pilote.....	285
IV. Stratégies d'amélioration du modèle <i>in vitro</i> de RWM	285

ANNEXES 289

I. Annexe I : Validation d'une méthode HPLC-UV pour la quantification de la dexaméthasone	289
II. Annexe II : Validation d'une méthode HPLC-UV pour la quantification de la dexaméthasone phosphate sodique	304
III. Annexe III : Validation d'une méthode HPLC-visible pour la quantification de la DX2403	318
IV. Annexe IV : Méthode de dosage par LC-MS/MS (Synovo GmbH).....	332
V. Annexe V : Supplementary materials of the article "Pilot scale transfer and optimization of an innovative supercritical CO ₂ PGSS method for the production of drug-encapsulating liposomes"	333

RÉFÉRENCES 337

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AAV	Virus adénoassocié (<i>Adeno-associated virus</i>)
Abs	Absorbance
ALI	Interface air-liquide (<i>Air-Liquid Interface</i>)
AMPA	Acide α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionique
API	<i>Active Pharmaceutical Ingredient(s)</i>
ATP	Adénosine triphosphate
BDNF	<i>Brain-Derived Neurotrophic Factor</i>
BHE	Barrière hémato-encéphalique
BLB	Barrière hémato-labyrinthique (<i>Blood Labyrinth Barrier</i>)
BSA	Albumine sérique bovine
CCK-8	<i>Cell Counting Kit – 8</i>
Chol	Cholestérol
Cic	Ciclésonide
CMC	Concentration micellaire critique
CO₂	Dioxyde de carbone
CQA	Attributs critiques de qualité (<i>Critical Quality Attributes</i>)
Cryo-TEM	Cryo-microscopie électronique en transmission (<i>Cryogenic Transmission Electron Microscopy</i>)
DCI	Dénomination Commune Internationale
DLPC	1,2-dilinoyleyl-sn-glycero-3-phosphocholine
DLS	Diffusion dynamique de la lumière (<i>Dynamic Light Scattering</i>)
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (à haute teneur en glucose et supplémenté en Glutamax)
DMEM/F12	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12</i> (à haute teneur en glucose et supplémenté en Glutamax)
DMPC	1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
DMPG	Sel sodique de 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol)
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DoE	Plan d'expériences (<i>Design of Experiments</i>)
DOPC	1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
DOPE	1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine

DOTAP	Chlorure de 1,2-dioleoyl-3-triméthylammonium-propane
DPPC	1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
DPPS	Sel sodique de 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phospho-L-sérine
DSP	Dexaméthasone phosphate sodique (<i>Dexamethasone sodium phosphate</i>)
DSPC	1,2-distearoyl-sn-glycero-3 phosphocholine
DSPE-PEG₂₀₀₀	Sel d'ammonium de la 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[methoxy(polyethylene glycol)-2000]
EE	Efficacité d'encapsulation (<i>Encapsulation Efficiency</i>)
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
EPC	L-α-phosphatidylcholine d'œuf
FBS	<i>Foetal Bovine Serum</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GAS	<i>Gas Anti-Solvent</i>
GMP	<i>Good Manufacturing Practice</i>
GUV	Vésicule unilamellaire géante (<i>Giant Unilamellar Vesicle</i>)
HBSS	<i>Hank's buffered saline solution</i>
HEPES	L'acide 4-(2-hydroxyéthyl)-pipérazine-1-éthanesulfonique
HPLC	Chromatographie Liquide Haute Performance (<i>High-Performance Liquid Chromatography</i>)
HPTLC	Chromatographie sur Couche Mince Haute Performance
HSPC	L-α-phosphatidylcholine de soja hydrogénée
Ind	Maléate d'indacatérol (<i>Indacaterol maleate</i>)
LC	Chromatographie Liquide (<i>Liquid Chromatography</i>)
LLI	Interface liquide-liquide (<i>Liquid-Liquid Interface</i>)
LNP	Nanoparticule lipidique (<i>Lipid Nanoparticle</i>)
LPC	Lysophosphatidylcholine
LUV	Grande vésicule unilamellaire (<i>Large Unilamellar Vesicle</i>)
MLV	Vésicule multilamellaire (<i>Multilamellar Vesicle</i>)
MRI	<i>Magnetic Resonance Imaging</i>
MS	Spectrométrie de masse (<i>Mass Spectrometry</i>)
MS/MS	Spectrométrie de masse en tandem (<i>Tandem Mass Spectrometry</i>)
MVV	Vésicule multivésiculaire (<i>Multivesicular Vesicle</i>)

NaFl	Fluorescéine sodique
NMDA	N-méthyl-D-aspartate
NTA	Analyse du suivi des nanoparticules (<i>Nanoparticle Tracking Analysis</i>)
OLV	Vésicule oligolamellaire (<i>Oligolamellar Vesicle</i>)
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
OWM	Membrane de la fenêtre ovale (<i>Oval Window Membrane</i>)
P407	Poloxamer 407
-PA	Acide phosphatidique
PBS	<i>Dulbecco's phosphate-buffered saline (without magnesium or calcium)</i>
-PC	Phosphatidylcholine
PC	Polycarbonate
PCL	Poly(ϵ -caprolactone)
PdI	Indice de Polydispersité (<i>Polydispersity Index</i>)
-PE	Phosphatidyléthanolamine
PEG	Poly(éthylène glycol)
PEO	Poly(éthylène oxyde)
PET	Polyéthylène téréphtalate
PFA	Paraformaldéhyde
-PG	Phosphatidylglycérol
PGSS	<i>Particles from Gas-Saturated Solution</i>
-PI	Phosphatidylinositol
PLA	Poly(acide lactique)
PLGA	Poly(acide lactique-co-acide glycolique)
pNIPAAm	Poly(N-isopropylacrylamide)
PPO	Poly(propylène oxyde)
PS	<i>Penicillin-Streptomycin</i>
-PS	Phosphatidylsérine
QbD	<i>Quality by Design</i>
RESS	<i>Rapid Expansion of Supercritical Solutions</i>
R_f	Facteur de rétention
ROS	Espèces réactives de l'oxygène (<i>Reactive Oxygen Species</i>)

RT	<i>Room temperature</i>
RWM	Membrane de la fenêtre ronde (<i>Round Window Membrane</i>)
scCO₂, SC-CO₂	CO ₂ Supercritique (<i>Supercritical CO₂</i>)
SD	Ecart-type (<i>Standard Deviation</i>)
SLN	Nanoparticule lipidique solide (<i>Solid Lipid Nanoparticle</i>)
SNHL	<i>Sensorineural Hearing Loss</i>
SPC	L-α-phosphatidylcholine de soja
SPIONs	Nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques (<i>Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles</i>)
SUV	Petite vésicule unilamellaire (<i>Small Unilamellar Vesicle</i>)
TEER	Résistance électrique transépithéliale (<i>Transepithelial electrical resistance</i>)
TEM	Microscopie électronique en transmission (<i>Transmission Electron Microscopy</i>)
TFH	Hydratation du film lipidique (<i>Thin Film Hydration</i>)
THF	Tétrahydrofurane
T_m	Température de transition de phase
TMC	Température micellaire critique
TPMA	<i>Trimethylphenylammonium</i>
TT	Transtympanique (<i>Transtympanic</i>)
WHO	<i>World Health Organization</i>
ZO-1	<i>Zona Occludens – 1</i>
ZP	Potentiel Zêta (<i>Zeta Potential</i>)
ΔP	<i>Depressurization rate</i>

INTRODUCTION

Introduction

Une partie de cette introduction a fait l'objet d'un article de revue, intitulé « Experimental models for investigating drug transport across the round window membrane: implications for inner ear drug delivery and sensorineural hearing loss therapy », soumis en juillet 2026 dans *Drug Delivery and Translational Research* (Ed. Springer). Cet article est disponible à la section IV.2 (page 61) de l'introduction.

I. Le contexte otologique des surdités

D'après l'étude *Global Burden of Disease 2019*, environ 1,57 milliard de personnes souffrent d'une perte auditive [1]. Parmi celles-ci, l'Organisation mondiale de la Santé (OMS) estime que 430 millions de personnes présentent un déficit incapacitant, caractérisé par une déficience auditive supérieure à 35 dB [2]. Les projections pour 2050 prévoient que plus de 2,45 milliards de personnes pourraient être touchées par une déficience auditive, soulignant ainsi la progression préoccupante de ce trouble qui est un défi majeur de santé publique. En effet, la perte auditive s'accompagne de répercussions psychosociales importantes, affectant profondément la qualité de vie des individus. Chez l'adulte, la diminution des capacités de communication entraîne fréquemment un repli social, un sentiment d'isolement et d'abandon, ce qui favorise l'émergence de troubles anxieux et dépressifs. La difficulté à comprendre la parole, notamment dans un environnement bruyant, altère les interactions sociales et professionnelles, ce qui contribue à une perte progressive d'autonomie et à un sentiment d'insécurité au quotidien. Plusieurs études ont même établi un lien entre la perte auditive et un risque accru de déclin cognitif et de démence, probablement lié à la diminution de la stimulation sensorielle et à l'isolement social [3]. Chez l'enfant, une déficience auditive non prise en charge peut entraîner un retard de développement du langage et de la communication, avec des répercussions durables sur les apprentissages scolaires, l'intégration sociale et les opportunités professionnelles ultérieures [1].

Le développement de stratégies thérapeutiques innovantes vise dès lors à ralentir la progression des surdités et à en atténuer les conséquences. Pour atteindre cet objectif, une compréhension approfondie des mécanismes physiopathologiques de l'audition constitue une étape préalable indispensable.

I.1. L'anatomie et la physiologie de l'oreille

L'oreille est un organe sensoriel complexe qui assure à la fois la perception des sons et l'équilibre postural. Elle est anatomiquement divisée en trois compartiments fonctionnels, à savoir l'oreille externe, moyenne et interne, chacune de ces régions jouant un rôle spécifique dans la transmission et le traitement du signal auditif [4].

L'oreille externe comprend le pavillon auriculaire et le conduit auditif (Figure 1A). Le pavillon auriculaire capte les ondes sonores, qui se propagent sous la forme de successions de compressions et de raréfactions d'air, et agit comme un entonnoir pour les focaliser dans le conduit auditif [5]. Ce dernier, long d'environ 4 cm, possède une partie externe cartilagineuse tapissée de follicules pileux, de glandes sébacées et sudoripares, responsables de la production de cérumen, constituant une première barrière protectrice antimicrobienne et mécanique pour l'oreille [4]. En revanche, la partie interne du conduit auditif se veut glabre et rigide par sa fixation au tissu osseux sous-jacent. Elle permet ainsi aux sons les plus faibles d'être captés et redirigés vers la partie ventrale de la membrane tympanique, la *Pars Tensa*, une fine membrane fibro-élastique d'environ 0,1 mm d'épaisseur qui constitue la première barrière vibratoire essentielle à la transmission sonore [4]. La membrane tympanique représente également l'interface entre l'oreille externe et l'oreille moyenne [5].

L'oreille moyenne, cavité aérienne tapissée de muqueuse, en continuité avec celle du nasopharynx via la trompe d'Eustache, contient la chaîne ossiculaire : marteau, enclume et étrier [5]. Le marteau s'insère dans la membrane tympanique, tandis que la platine de l'étrier repose sur la membrane de la fenêtré ovale (OWM), une membrane conjonctive de grande résistance mécanique qui ferme la fenêtré ovale, une ouverture osseuse située entre l'oreille moyenne et la cochlée de l'oreille interne [4,6]. Située sous l'OWM, la membrane de la fenêtré ronde (RWM) est une fine membrane trilaminaire qui ferme la fenêtré ronde, une ouverture également située entre la rampe tympanique de la cochlée et l'oreille moyenne. La RWM est constituée d'une couche épithéliale externe, d'une couche intermédiaire de tissu conjonctif riche en fibres de collagène et en fibres élastiques, et d'une couche épithéliale interne [4,6]. Grâce à cette organisation, les vibrations de la membrane tympanique sont transmises à la chaîne ossiculaire, qui les amplifie grâce à leurs mouvements avant de les concentrer sur l'OWM. Cette amplification repose sur l'effet de levier des osselets ($\approx 1,3$) et sur la différence de surface entre la membrane tympanique et l'OWM (rapport $\approx 17:1$). La pression exercée sur l'OWM est ainsi augmentée d'un facteur 22 par rapport à celle appliquée par les ondes sonores sur la membrane tympanique [7]. Les

INTRODUCTION

mouvements « piston-like » de l'étrier sur l'OWM engendrent des variations de pression intracochléaire. La RWM agit alors comme structure de compliance et se déforme dans le sens opposé à l'OWM, afin de dissiper ces variations de pression [5].

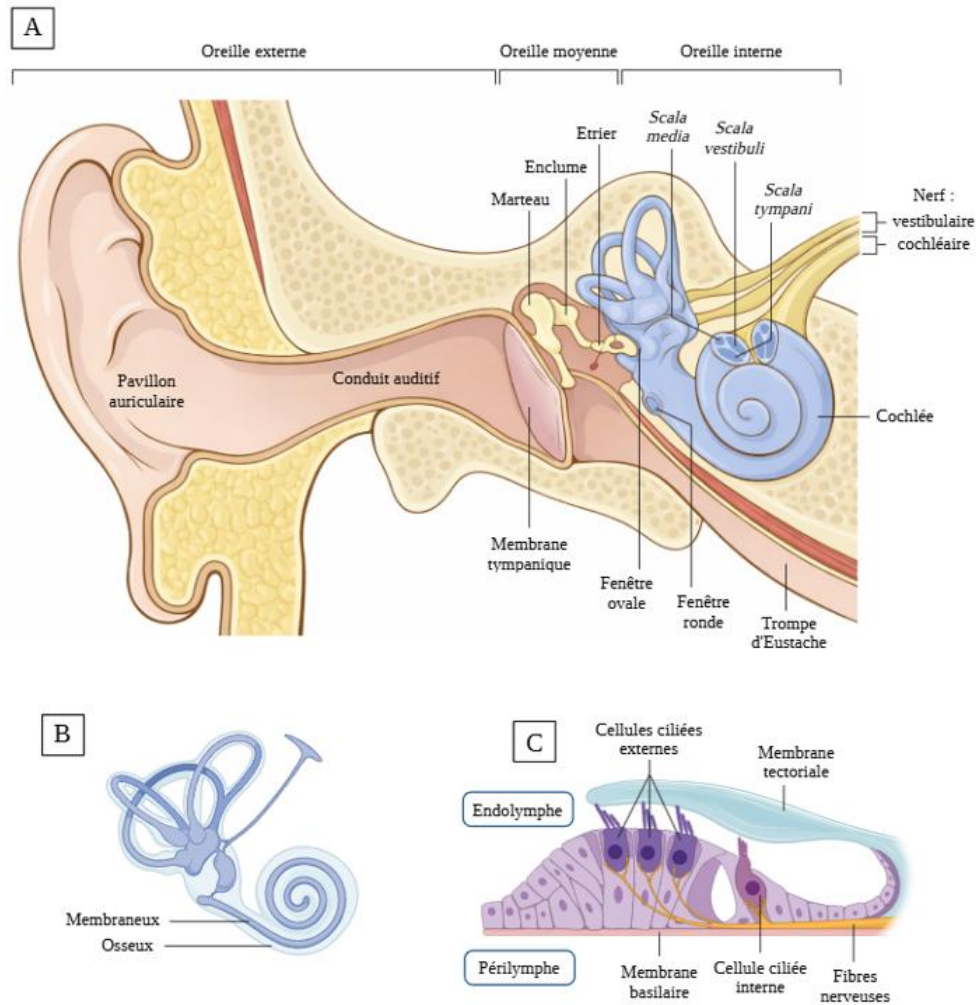


Figure 1 : Schéma anatomique de l'oreille humaine, inspiré de Hall et al. [7] et modifié avec Biorender. (A) Représentation des compartiments de l'oreille (externe, moyenne et interne) illustrant leurs principales structures anatomiques. (B) Représentation des parties osseuse et membraneuse du labyrinthe. (C) Schéma de l'organe de Corti, mettant en évidence les cellules ciliées impliquées dans la transduction mécano-électrique du signal sonore.

L'oreille interne comprend, d'une part, une structure rigide de forme complexe, le labyrinthe osseux (Figure 1B), au sein duquel se loge une structure souple de forme comparable, le labyrinthe membraneux, et d'autre part, les structures nerveuses périphériques qui y sont

INTRODUCTION

rattachées [4,7]. Le labyrinthe membraneux reprend notamment le canal cochléaire (*Scala media*) qui contient de l'endolymphe, un liquide extracellulaire riche en potassium (K^+ ; 150 mM), mais pauvre en sodium (Na^+ ; 1 mM) et en calcium (Ca^{2+} ; 0,002 mM), indispensable à la transduction des stimuli mécaniques par les cellules ciliées [4,8]. La périlymphe, riche en Na^+ (140 mM), mais pauvre en Ca^{2+} (1,2 mM) et en K^+ (5 mM), occupe quant à elle les rampes vestibulaire (*Scala vestibuli*) et tympanique (*Scala tympani*) de la cochlée, situées entre les labyrinthes osseux et membraneux [4,8]. Puisqu'elle se trouve également au contact direct de l'OWM, la périlymphe est mise en mouvement par les vibrations de cette dernière, générant des ondes de pression qui se propagent le long de la cochlée. Ces ondes induisent un déplacement de la membrane basilaire de l'organe de Corti selon un mouvement oscillatoire (Figure 1C), et l'amplitude maximale de ce déplacement dépend de la fréquence du son [4,9]. Les hautes fréquences induisent une déformation maximale de la membrane basilaire à la base de la cochlée, tandis que les basses fréquences stimulent préférentiellement sa région apicale. Cette organisation spatiale des fréquences sonores le long de la membrane basilaire constitue la base de la tonotopie cochléaire [4,9]. Elle permet ainsi une discrimination fréquentielle fine des sons (20 Hz à 20 kHz chez l'Homme) [10,11].

L'organe de Corti contient environ 3 500 cellules ciliées internes et 12 000 cellules ciliées externes, respectivement responsables de la transduction mécano-électrique du son et de l'amplification des signaux sonores [5,7]. La transduction du son (Figure 2) débute lorsque les ondes sonores font vibrer la membrane basilaire de la cochlée, ce qui entraîne la déflexion des stéréocils des cellules ciliées. Cette déformation ouvre des canaux mécano-sensibles, provoquant une entrée de K^+ qui dépolarise les cellules ciliées internes. Cette dépolarisation active les canaux calciques voltage-dépendants, permettant l'entrée de Ca^{2+} et déclenchant la libération de glutamate au niveau des synapses basolatérales entre les cellules ciliées internes et les neurones du ganglion spiral. Ces derniers possèdent des récepteurs aux glutamate et assurent ainsi la transmission des potentiels d'action vers les aires auditives corticales où le son est interprété [12,13]. Au niveau des cellules ciliées externes, la dépolarisation induite par l'entrée de K^+ active principalement la prestine, une protéine motrice située dans leur membrane latérale, induisant une contraction cellulaire. Cette électromotilité va amplifier les vibrations locales de l'organe de Corti et de la membrane basilaire, augmentant indirectement la stimulation des cellules ciliées internes [14]. Les cellules ciliées externes jouent ainsi un rôle essentiel dans l'amplification du signal, ainsi que dans l'amélioration de la sensibilité et de la sélectivité fréquentielle. Cependant, leur fonction ne se limite pas à cette amplification mécanique : elles sont également capables de libérer du

INTRODUCTION

glutamate et d'activer les fibres neuronales, bien que cette voie de signalisation demeure largement minoritaire.

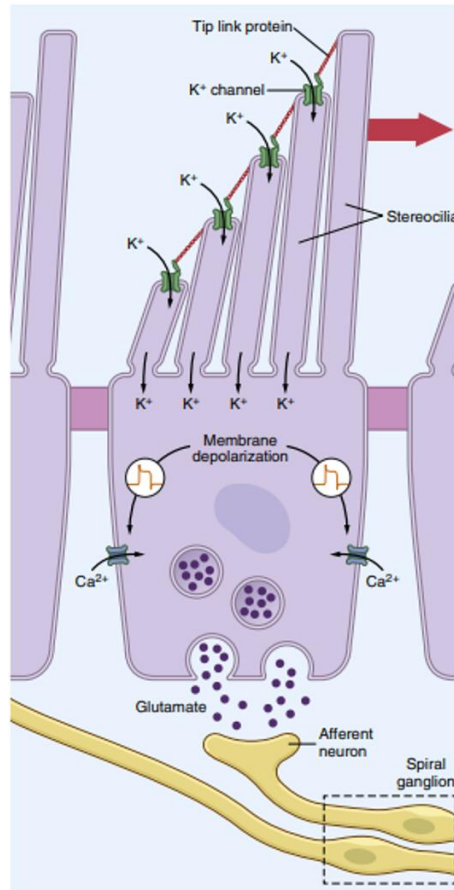


Figure 2 : Transduction de l'énergie mécanique en influx nerveux par les cellules ciliées internes. La déflexion des stéréocils ouvre les canaux ioniques mécano-sensibles, entraînant une entrée de K^+ et la dépolarisation de la cellule. Cette dépolarisation active ensuite les canaux calciques voltage-dépendants, permettant l'entrée de Ca^{2+} , qui déclenche la libération d'un neurotransmetteur excitateur, le glutamate, au niveau de la synapse, ainsi que l'activation de la fibre nerveuse afférente auditive [7].

I.2. La classification et l'étiologie des surdités

Chaque compartiment de l'oreille joue un rôle spécifique dans la transmission et le traitement du signal auditif, ce qui signifie que chacune de ces régions est sujette à des dommages susceptibles d'entraîner une perte auditive partielle ou totale, avec ou sans récupération possible.

INTRODUCTION

Les lésions des portions externe ou moyenne de l'oreille mènent à des surdités dites de transmission. Parmi les causes possibles, on peut notamment citer une obstruction du conduit auditif externe, une perforation ou une inflammation de la membrane tympanique, une infection chronique de l'oreille moyenne (otite) ou un traumatisme impliquant une fracture de la chaîne ossiculaire. Chez un patient souffrant d'une surdité de transmission due à une fracture de la chaîne ossiculaire et dont le compartiment interne de l'oreille est préservé, le traitement de référence repose sur une intervention chirurgicale afin de remplacer la chaîne ossiculaire à l'aide d'une prothèse adaptée [11]. Dans de plus rares cas, un stimulateur sonore appliqué sur le crâne peut transmettre les ondes sonores à la cochlée par conduction osseuse, contournant ainsi le tympan et les osselets [15].

Les lésions de l'oreille interne mènent à des surdités dites neurosensorielles. Elles impliquent principalement une dysfonction, voire une perte, des cellules ciliées cochléaires ou une atteinte des voies nerveuses auditives. Il existe quatre grandes causes à l'origine de ce type de surdité : les mutations génétiques, l'usage de molécules thérapeutiques ototoxiques, la presbycusie, ainsi que l'exposition au bruit, ces deux dernières étant les causes prédominantes chez l'adulte [1,16]. Les surdités neurosensorielles d'origine génétique résultent de mutations affectant des gènes impliqués dans le développement ou le fonctionnement de l'oreille interne. Ces surdités peuvent être présentes dès la naissance ou se manifester plus tardivement au cours de la vie. Les formes congénitales représentent la majorité des surdités sévères à profondes chez l'enfant [17]. L'ototoxicité médicamenteuse peut être causée par l'usage de certaines molécules thérapeutiques, notamment les antibiotiques de la famille des aminoglycosides (ex. gentamicine, streptomycine), les diurétiques de l'anse (ex. furosémide) ou certains agents anticancéreux (ex. cisplatine). Ces molécules induisent des lésions irréversibles des cellules ciliées cochléaires, pouvant conduire à une surdité neurosensorielle permanente [16]. La presbycusie est une diminution progressive de la sensibilité cochléaire liée au vieillissement. Elle est caractérisée par des altérations progressives des cellules ciliées, des neurones du ganglion spiral et de la strie vasculaire, un épithélium hautement vascularisé localisé dans la paroi latérale de la cochlée et responsable de la production de l'endolymphe. Ces altérations conduisent à une perte auditive prédominante sur les hautes fréquences [11]. Enfin, la surdité induite par le bruit résulte d'une exposition aiguë ou chronique à des niveaux sonores élevés, provoquant des lésions mécaniques et un stress métabolique des cellules ciliées, ainsi qu'une dégénérescence des synapses reliant les cellules ciliées internes aux neurones du ganglion spiral [2,11]. Bien que leurs mécanismes physiopathologiques diffèrent, ces quatre formes de surdité neurosensorielle impliquent

INTRODUCTION

généralement une altération de l'homéostasie cochléaire et un dysfonctionnement des cellules sensorielles, pouvant conduire à leur dégénérescence par apoptose [18]. Jusqu'à présent, il n'existe qu'un médicament commercialisé permettant de restaurer l'audition chez un patient atteint de surdité neurosensorielle. Il est destiné au traitement des surdités induites spécifiquement par des mutations du gène *OTOF*. L'Otarmeni™ (DCI : lunsotogene parvec-cwaha), autorisé par la *Food and Drug Administration* (FDA) et mis sur le marché américain en avril 2026, est une thérapie génique qui apporte une copie fonctionnelle du gène *OTOF* aux cellules sensorielles de l'oreille interne afin de restaurer la production d'otoferline, une protéine indispensable à la transmission des signaux auditifs. Il est administré au cours d'une intervention chirurgicale, par perfusion dans la cochlée [19]. Aucun traitement curatif n'est cependant disponible pour les autres formes de surdités neurosensorielles.

Ainsi, la perte d'une partie ou de la totalité des cellules ciliées cochléaires ou de leurs connexions avec le nerf auditif entraîne une surdité neurosensorielle irréversible. Lorsque cette atteinte est partielle, une fonction auditive résiduelle est conservée, mais la transmission de l'information sonore devient insuffisante pour assurer une perception et une compréhension satisfaisantes, en particulier pour les sons de faible intensité tels que la parole [5,11]. Afin de compenser ce déficit, différents dispositifs tels que les prothèses auditives ou les implants cochléaires peuvent être proposés en fonction du degré de la perte auditive et des structures encore fonctionnelles. Toutefois, ces dispositifs constituent des solutions supplétives, et non curatives, puisqu'ils visent à restaurer partiellement la fonction auditive, sans traiter la cause sous-jacente de la surdité. Les amplificateurs d'ondes sonores (appareils auditifs « classiques ») augmentent le volume des sons perçus, optimisant ainsi l'utilisation des cellules ciliées restantes [20]. Les implants cochléaires contournent les cellules ciliées déficientes et stimulent directement le nerf auditif via des électrodes. L'efficacité de ces prothèses varie selon les patients, et l'audition obtenue est souvent différente de l'audition naturelle, ce qui peut être perçu comme artificiel ou insatisfaisant [20]. Les implants cochléaires présentent également certains inconvénients. Leur implantation nécessite une intervention chirurgicale, exposant à un risque d'infection ou de lésion au site d'implantation pouvant entraîner une perte de l'audition résiduelle. Elle implique également une rééducation auditive longue et intensive, ainsi qu'un certain inconfort et des contraintes liés à l'utilisation et à l'entretien du dispositif [21].

INTRODUCTION

I.3. Les surdités neurosensorielles induites par un traumatisme sonore et leur prise en charge

Une exposition à un bruit de forte intensité, qu'elle soit ponctuelle, comme lors d'une explosion (~140 dB) ou d'un concert (~100 dB), ou répétée, tel que dans le cadre d'activités professionnelles (ex. ouvriers du bâtiment, personnel aéroportuaire, musiciens), peut provoquer un traumatisme sonore affectant les structures sensorielles de la cochlée (Figure 3).

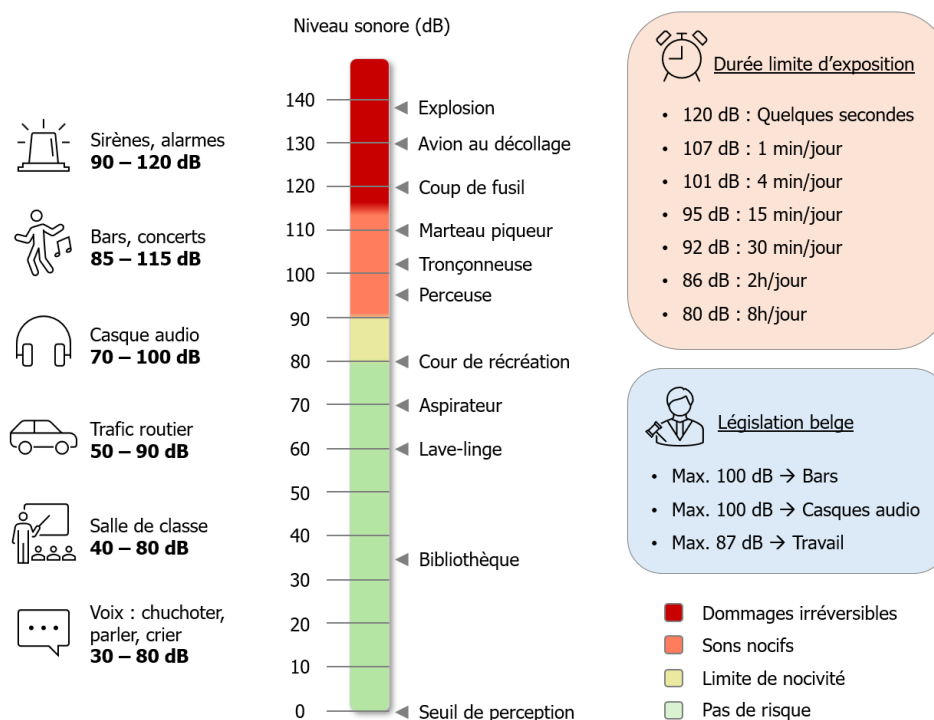


Figure 3 : Echelle des niveaux sonores (dB) et risques auditifs associés à différents environnements et activités, inspirée de Pujol et al. [22].

Reconnaissant le bruit comme un enjeu de santé publique, l'État belge a mis en place un cadre légal visant à limiter l'exposition aux intensités sonores. Par exemple, un niveau sonore maximal de 100 dB est autorisé dans les espaces publics tels que les discothèques ou les salles de concert, ainsi que pour les systèmes d'écoute individuelle de type casque audio [23]. Ceux-ci sont d'ailleurs à utiliser avec prudence, puisqu'une légère augmentation du niveau sonore (ex. 80 → 86 dB) réduit considérablement la durée d'écoute permise sans risque de lésions auditives (ex. 8h/jour → 2h/jour). D'autre part, la législation du travail impose à tout employeur une surveillance stricte

du niveau sonore auquel est soumis son personnel (max. 87 dB/journée de 8h), ainsi que la mise à disposition d'équipements de protection individuelle [24]. En parallèle, des recommandations européennes, souvent en accord avec l'OMS, encouragent la limitation des niveaux sonores, l'information du public et la mise à disposition de protections auditives dans les lieux diffusant de la musique amplifiée.

Compte tenu du mode de vie de nombreux citoyens, en particulier des adolescents et jeunes adultes régulièrement exposés à des niveaux sonores élevés (casque audio, concerts, etc.), le nombre de cas de surdité neurosensorielle induite par un traumatisme sonore devrait augmenter dans les prochaines années, affectant une population de plus en plus jeune [1].

Un son intense entraîne des déplacements excessifs de la membrane basilaire, provoquant une flexion excessive des stéréocils. Cela peut entraîner une rupture des *tip-links*, les liaisons mécano-sensibles liant les stéréocils entre eux, essentielles à la transduction du signal [25]. Cette déformation excessive maintient également l'ouverture prolongée des canaux mécano-sensibles, entraînant une entrée massive de K^+ , responsable d'une dépolarisation prolongée de la cellule. Cette dépolarisation persistante perturbe les gradients ioniques et oblige la cellule à activer en continu ses pompes ioniques pour tenter de repolariser sa membrane, ce qui épuise ses réserves d'ATP. Par ailleurs, cette dépolarisation prolongée favorise l'entrée excessive de Ca^{2+} intracellulaire qui active plusieurs enzymes, notamment des protéases et des phospholipases, qui dégradent respectivement les protéines cytosquelettiques et les membranes cellulaires [26]. Cette surcharge calcique, associée à un stress énergétique, conduit à une production accrue d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) par les mitochondries, générant un stress oxydatif important [16,25]. L'ensemble de ces processus altère progressivement l'intégrité cellulaire et peut aboutir à une apoptose ou à une nécrose dans les cas les plus sévères [25].

Les cellules ciliées externes sont les premières à être affectées par les effets d'un traumatisme sonore [27]. En effet, leur rôle dans l'amplification mécanique du signal auditif leur impose de maintenir une activité électromécanique constante et donc de gérer des flux ioniques importants. Cette forte activité les rend particulièrement dépendantes de l'ATP et donc plus vulnérables au stress oxydatif d'origine mitochondriale [14]. Dans un second temps, si le traumatisme sonore est intense ou prolongé, les cellules ciliées internes peuvent également être atteintes.

Au-delà d'une atteinte des cellules ciliées, les terminaisons nerveuses auditives peuvent également être endommagées. En effet, la surstimulation des cellules ciliées internes par l'excès de bruit induit une libération excessive de glutamate au niveau synaptique [26]. Celui-ci provoque

une suractivation des récepteurs de l'acide α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionique (AMPA) et du N-méthyl-D-aspartate (NMDA) post-synaptiques et déclenche une entrée excessive de Ca^{2+} dans la terminaison nerveuse [28]. Cette surcharge calcique est à l'origine de dysfonctionnements mitochondriaux et d'un stress oxydatif, conduisant *in fine* à la dégénérescence de ces terminaisons nerveuses auditives.

Les cellules ciliées cochléaires ne possédant pas de capacité de régénération, elles ne peuvent plus transmettre correctement l'information sonore au nerf auditif, ce qui provoque une surdité irréversible, partielle ou totale. À ce jour, aucun traitement pharmacologique permettant leur régénération n'est disponible.

I.3.1. La prise en charge des surdités induites par un traumatisme sonore

En pratique clinique, l'administration précoce de corticostéroïdes, permettant de limiter les processus inflammatoires et les lésions cochléaires secondaires, constitue l'approche thérapeutique la plus fréquemment utilisée dans la prise en charge du traumatisme sonore aigu, bien que les preuves de son efficacité demeurent limitées. Les posologies varient selon les protocoles, mais consistent principalement en une corticothérapie *per os*, soit de 60 mg/jour de prednisone ou de prednisolone, soit de 64 mg/jour de méthylprednisolone, pendant 7 à 14 jours avec diminution progressive de la dose [29–31]. Ce traitement d'urgence est généralement initié dans les 10 jours suivant l'apparition des symptômes, car plus la prise en charge est rapide, meilleures sont les chances de récupération [32,33]. Au-delà de cette période, son efficacité est compromise. Les résultats varient toutefois considérablement d'un patient à l'autre : certains constatent une amélioration en quelques jours, tandis que d'autres ne perçoivent qu'un effet modeste à long terme, voire aucun bénéfice [34]. L'injection transtympanique (TT) de méthylprednisolone ou de dexaméthasone est parfois réalisée en complément de la corticothérapie *per os* [35–37]. Elle constitue également une alternative pour les patients présentant des contre-indications à l'administration orale de corticostéroïdes (ex. patients immunodéprimés, diabétiques ou atteints de tuberculose) ou dont l'état n'a pas progressé après une première corticothérapie par voie générale [38]. Dans ce cas, la dexaméthasone (24 mg/mL) est administrée dans l'oreille moyenne sous la forme de 3 injections espacées de 10 à 14 jours [38]. La méthylprednisolone (40 mg/mL), injectée tous les deux jours pour un maximum de 4 injections, constitue également une option thérapeutique valable [36,39].

INTRODUCTION

Malgré leur utilisation fréquente, les corticostéroïdes ne permettent qu'une récupération partielle et variable de la fonction auditive, soulignant la nécessité de développer de nouvelles approches thérapeutiques capables de cibler directement les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans les lésions cochléaires. Certaines approches innovantes, telles que la thérapie génique ou les stratégies de régénération des cellules ciliées (thérapie cellulaire), font actuellement l'objet de nombreuses recherches. La thérapie génique vise notamment à restaurer la fonction auditive en introduisant ou en modulant l'expression de gènes impliqués dans l'audition. Par exemple, certaines études ont montré que le transfert dans l'oreille interne du gène codant pour le *Brain-Derived Neurotrophic Factor* (BDNF) permet d'augmenter la production locale de cette protéine et favorise la survie des neurones du ganglion spiral [40–42]. Ce gène peut être vectorisé par un virus adénoassocié (AAV) ou une cellule transfectée (*cell-gene therapy*), afin d'être acheminé dans la cochlée via les voies intracochléaires ou TT. À côté de la thérapie génique, la thérapie cellulaire constitue une approche visant à remplacer les structures sensorielles endommagées. Des travaux récents explorent ainsi l'injection de cellules progénitrices dans la cochlée, capables de se différencier et de participer aux processus de réparation et de régénération des cellules ciliées de l'oreille interne [43]. Toutefois, ces approches thérapeutiques demeurent limitées par la complexité de leur mise en œuvre, le contrôle encore imparfait de la distribution des cellules ou des gènes, la variabilité des réponses entre sujets, ainsi que par la nécessité d'évaluer leur efficacité et leur innocuité à long terme.

Par ailleurs, l'administration de molécules thérapeutiques antioxydantes, telles que la N-acétylcystéine, est également explorée afin de protéger les cellules ciliées. Différentes voies d'administration et systèmes de délivrance sont actuellement à l'étude pour leur permettre d'atteindre la cochlée et d'exercer leur effet thérapeutique [44,45].

I.3.2. Les voies d'administration permettant d'atteindre la cochlée

I.3.2.1. Les voies systémiques

La voie orale est la voie classiquement utilisée pour le traitement d'urgence des surdités neurosensorielles induites par un traumatisme sonore. La voie intraveineuse pourrait également être envisagée afin d'atteindre la cochlée. Ces voies générales impliquent toutefois le passage des principes actifs dans la circulation systémique, qui présente certains inconvénients. En effet, la barrière hémato-labyrinthique (BLB ; *Blood-Labyrinth Barrier*), formée de capillaires non fenestrés dont la paroi est constituée d'un endothélium continu présentant des jonctions serrées,

entoure les structures sensibles de l'oreille interne (Figure 4). Elle agit de manière similaire à la barrière hémato-encéphalique (BHE) et protège les structures auditives en restreignant fortement le passage des principes actifs depuis la circulation systémique vers l'endolymphe et la périlymphe [46]. Cette barrière explique notamment la nécessité d'administrer des doses élevées de corticostéroïdes par voie orale lors de la prise en charge du traumatisme sonore afin d'atteindre une concentration thérapeutique au niveau cochléaire (ex. 40 ng/mL de dexaméthasone) [47,48]. En conséquence, l'ensemble de l'organisme est exposé à des concentrations importantes de corticostéroïdes, ce qui peut entraîner divers effets indésirables tels que des modifications de l'appétit ou de l'humeur, des troubles du sommeil, une hyperglycémie, une hypertension artérielle ou encore une prise de poids [49]. Puisque le franchissement de la BLB constitue un obstacle majeur à l'acheminement des principes actifs vers la cochlée, les voies d'administration locales semblent constituer une stratégie plus adaptée pour cibler efficacement les cellules ciliées tout en limitant l'exposition systémique.

I.3.2.2. La voie intracochléaire

La voie intracochléaire apparaît comme une stratégie prometteuse pour contourner la BLB et assurer une délivrance rapide et contrôlée des agents thérapeutiques. En raison de la localisation profonde de la cochlée au sein de l'os temporal, le recours à cette voie implique une intervention chirurgicale invasive. Celle-ci offre un accès direct aux compartiments internes de la cochlée et permet un dépôt ciblé de la formulation au niveau des structures d'intérêt. Cette approche permet dès lors d'atteindre des concentrations locales élevées, de limiter les effets indésirables liés à l'exposition systémique, et d'améliorer significativement l'efficacité des traitements développés pour les surdités neurosensorielles induites par un traumatisme sonore. À ce jour, plusieurs stratégies thérapeutiques reposant sur la voie intracochléaire sont à l'étude. Elles comprennent notamment l'administration directe de corticostéroïdes, d'antioxydants ou de facteurs neurotrophiques, ainsi que des approches de thérapie génique et cellulaire [40,43,50]. La voie intracochléaire est également utilisée en pratique clinique pour l'administration de l'Otarmeni™ [19]. Toutefois, les risques d'infection ou de perte de l'audition résiduelle associés à cette intervention ne sont pas négligeables, ce qui a conduit les chercheurs à se tourner vers une autre voie d'administration locale : la bullotomie.

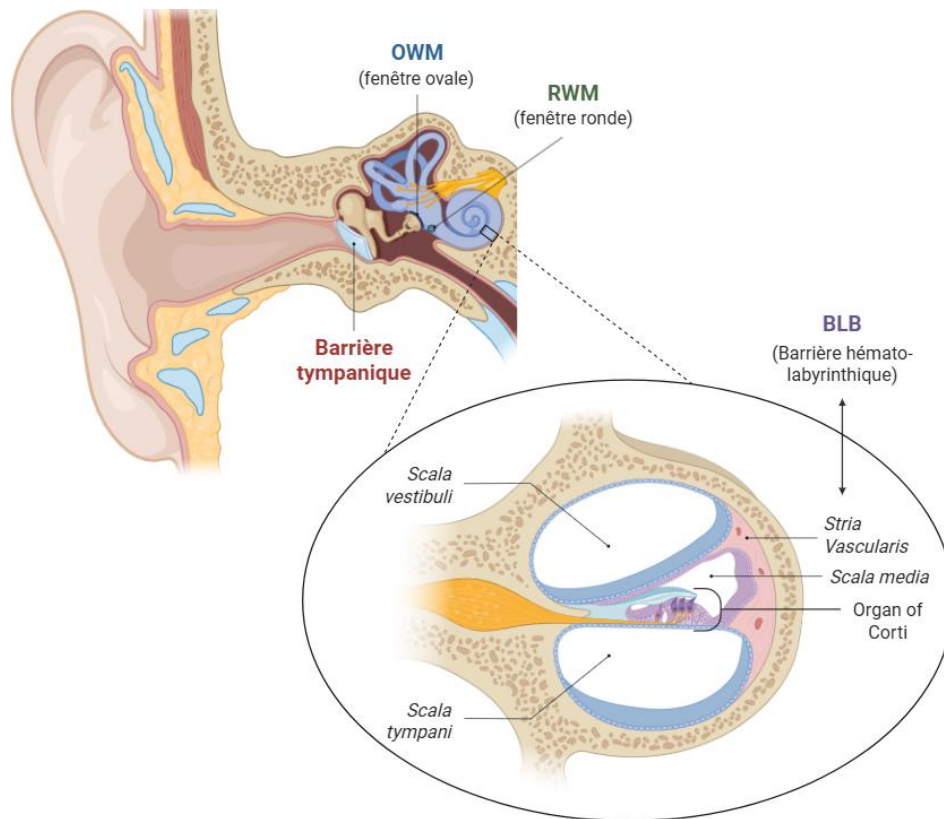


Figure 4 : Schéma des principales barrières limitant la diffusion de substances pharmacologiques vers la cochlée, à savoir la membrane tympanique, la RWM, l'OWM et la BLB. Cette dernière s'étend sur l'ensemble du labyrinthe membraneux contenant les liquides cochléaires (endolymphe, périlymphe). Figure réalisée avec BioRender.

I.3.2.3. La bullotomie

La bullotomie est une intervention chirurgicale qui consiste à perforer de manière ciblée la paroi osseuse de la bulle tympanique, c'est-à-dire la cavité de l'oreille moyenne, afin d'exposer la cochlée [51]. Cette cavité constitue dès lors un point de départ stratégique pour atteindre les cellules ciliées, car elle offre un accès au compartiment périlymphatique via les RWM et OWM. Toutefois, l'OWM est occupée par la platine de l'étrier de la chaîne ossiculaire, ce qui réduit considérablement la surface disponible pour la diffusion de la formulation et en fait une voie peu adaptée à la délivrance de principes actifs vers la cochlée [52]. Par conséquent, la RWM constitue la principale porte d'entrée vers le compartiment périlymphatique, en raison de sa surface d'échange entièrement accessible à la diffusion. La bullotomie permet dès lors d'accéder

directement à la niche de la RWM et d'y déposer une formulation thérapeutique destinée aux cellules ciliées [51]. Bien que cette approche locale évite la percée de la cochlée, elle reste tout de même invasive, nécessite une anesthésie et présente un risque infectieux accru au niveau de l'oreille moyenne. Une approche moins traumatique, ne nécessitant pas de chirurgie, a également été mise en évidence avec l'utilisation de la voie TT.

I.3.2.4. La voie transtympanique

L'administration d'une formulation par voie TT consiste à l'injecter directement dans la cavité de l'oreille moyenne, en traversant la membrane tympanique [53]. À l'instar de la bullotomie, cette voie permet d'approcher la cochlée sans altérer son intégrité. La formulation thérapeutique est ainsi déposée directement au contact de la RWM, sans recourir à la chirurgie, ce qui fait de la voie TT une approche particulièrement intéressante pour le ciblage cochléaire. Cette voie présente néanmoins deux principales limites. D'une part, les molécules administrées doivent obligatoirement traverser la RWM pour atteindre les cellules ciliées. D'autre part, leur temps de contact avec la RWM est limité par la clairance vers le nasopharynx via la trompe d'Eustache, ce qui limite leur diffusion vers la cochlée [52,54].

Afin de surmonter ces limitations, plusieurs stratégies sont proposées dans la littérature. L'application de certains agents chimiques, tels que l'histamine, l'alcool benzylique et le caprate sodique, sur la RWM permettrait notamment d'augmenter sa perméabilité aux principes actifs [52,55,56]. La RWM, qui se comporte comme une barrière semi-perméable, est organisée en trois couches : un épithélium externe, une couche centrale de tissu conjonctif et un épithélium interne. La couche externe, formée de cellules épithéliales cuboïdales avec des jonctions serrées, constitue la principale barrière contrôlant la perméabilité aux principes actifs [57]. L'application d'agents perméabilisants sur la couche externe de la RWM permettrait ainsi d'augmenter sa perméabilité, notamment en ouvrant transitoirement les jonctions serrées, et de favoriser la diffusion des principes actifs vers la cochlée. Toutefois, l'application clinique de cette approche reste délicate en raison d'une variabilité interindividuelle importante et du risque d'altération durable de l'intégrité membranaire [58,59]. Cette stratégie thérapeutique est décrite plus en détails dans l'article de revue présenté à la section IV.2 (page 61).

Une autre stratégie largement étudiée consiste à utiliser des nanomédicaments, c'est-à-dire des vecteurs nanoparticulaires qui encapsulent les principes actifs, afin de faciliter leur passage à travers la RWM.

II. Les liposomes

Les liposomes constituent l'une des classes de nanomédicaments les plus étudiées et les plus utilisées pour la délivrance de principes actifs. Les nanomédicaments sont des systèmes thérapeutiques particuliers dont la taille est le plus souvent comprise entre 1 et 100 nm. Selon certains auteurs, des particules de plusieurs centaines de nanomètres peuvent également être classées dans cette catégorie dès lors qu'elles conservent un comportement caractéristique de l'échelle nanométrique, notamment en termes d'interactions biologiques et de capacité de vectorisation de molécules actives [60,61]. En effet, les nanomédicaments sont conçus pour transporter, protéger et délivrer une ou plusieurs substances actives, qu'elles soient hydrophiles ou hydrophobes. Ils servent ainsi de vecteurs multifonctionnels capables d'améliorer l'efficacité thérapeutique ou la tolérance d'un principe actif par rapport à une formulation conventionnelle où il est administré sous forme libre [62,63].

Les nanomédicaments peuvent être administrés par différentes voies (ex. intraveineuse, intramusculaire, cutanée, TT), le choix de cette voie dépendant notamment de la cible thérapeutique, des barrières biologiques à franchir et de la vitesse d'action recherchée [61]. La prédominance actuelle de la voie intraveineuse en clinique s'explique principalement par l'évitement de la phase d'absorption, de la dégradation digestive et du premier passage hépatique des nanomédicaments, ainsi que par une pharmacocinétique plus prévisible [62].

Les nanomédicaments peuvent être constitués de matériaux organiques (lipides, polymères, protéines), inorganiques (silice, or, oxyde de fer) ou carbonés. Différentes structures sont classées parmi les nanoparticules polymériques, telles que les nanosphères, les nanocapsules, les dendrimères et les micelles polymériques (Figure 5). Les vecteurs de nature lipidique comprennent, par exemple, les nanoparticules lipidiques (LNP), les nanoparticules lipidiques solides (SLN) et les liposomes [46,54,64]. La diversité de ces nanomédicaments reflète la variété des applications visées, qu'elles soient thérapeutiques, diagnostiques ou théranostiques. Chaque famille a été conçue pour répondre à des besoins spécifiques et présente ainsi des avantages et des limites en termes d'efficacité, de biocompatibilité, de faisabilité industrielle et de coût de production. Les LNP et les liposomes sont aujourd'hui les nanoparticules les plus utilisées en clinique, en raison de l'équilibre qu'elles offrent entre ces différents critères [61,63].

INTRODUCTION

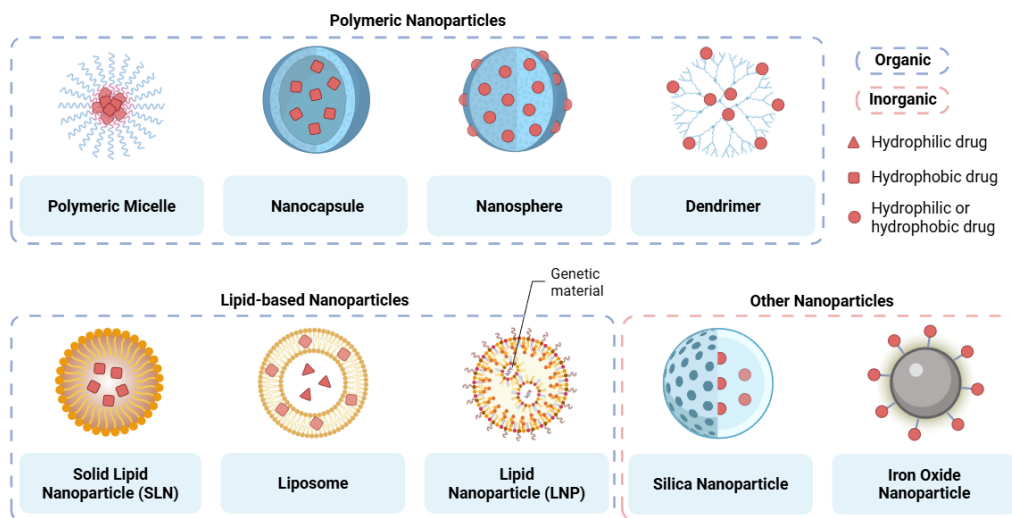


Figure 5 : Représentation schématique de différentes nanoparticules. Selon leur structure, ces nanovecteurs peuvent encapsuler ou adsorber des principes actifs hydrophiles, hydrophobes ou des acides nucléiques. Figure réalisée avec BioRender.

Les liposomes ont été décrits pour la première fois dans les années 1960 par le biophysicien britannique Alec D. Bangham, à la suite de l'observation de la formation spontanée de vésicules lipidiques lors de l'hydratation de films secs de phospholipides [65]. Ce phénomène s'explique par la nature amphiphile des phospholipides, qui s'autoassemblent spontanément en milieu aqueux afin de minimiser l'exposition de leurs chaînes hydrophobes à l'eau. Cette organisation conduit à la formation de bicouches lipidiques fermées entourant un compartiment aqueux, à l'origine de structures vésiculaires appelées liposomes [65]. Bien que la majorité des liposomes présente des dimensions nanométriques, leur taille peut varier de 20 nm à 10 µm. Ils sont constitués d'une ou de plusieurs bicouches lipidiques, généralement organisées de manière concentrique autour d'un compartiment aqueux central, et chacune de ces bicouches présente typiquement une épaisseur de 4 à 5 nm [66]. Ainsi, les liposomes constituent des modèles simplifiés de membranes biologiques et suscitent un intérêt majeur en raison de leur capacité à encapsuler simultanément des composés hydrophiles dans leur cœur aqueux et des composés hydrophobes au sein des bicouches lipidiques [61].

II.1. Les composants des liposomes

Les principaux constituants de la bicouche lipidique sont les phospholipides, majoritaires en raison de leur capacité à s'auto-assembler spontanément, les stérols et les lipides PEGylés.

II.1.1. Les phospholipides

Les phospholipides sont des molécules amphiphiles composées d'une tête polaire hydrophile et de deux chaînes hydrophobes constituées d'acides gras. Les phospholipides utilisés pour la formulation de liposomes appartiennent à deux grandes familles : les glycérophospholipides et les sphingophospholipides. Les glycérophospholipides (Figure 6A) possèdent un squelette glycérol estérifié à deux acides gras et à un groupement phosphate, lui-même lié à un alcool. La nature de cette tête hydrophile « alcool + phosphate + glycérol » détermine le type de glycérophospholipide, parmi lesquels figurent les phosphatidylcholines (-PC), phosphatidyléthanolamines (-PE), phosphatidylinositols (-PI), acides phosphatidiques (-PA), phosphatidylglycérols (-PG) et phosphatidylsérines (-PS). Les sphingophospholipides (Figure 6B), quant à eux, reposent sur un squelette sphingosine. Leur principal représentant est la sphingomyéline, caractérisée par une tête polaire de type phosphocholine [61,67,68].

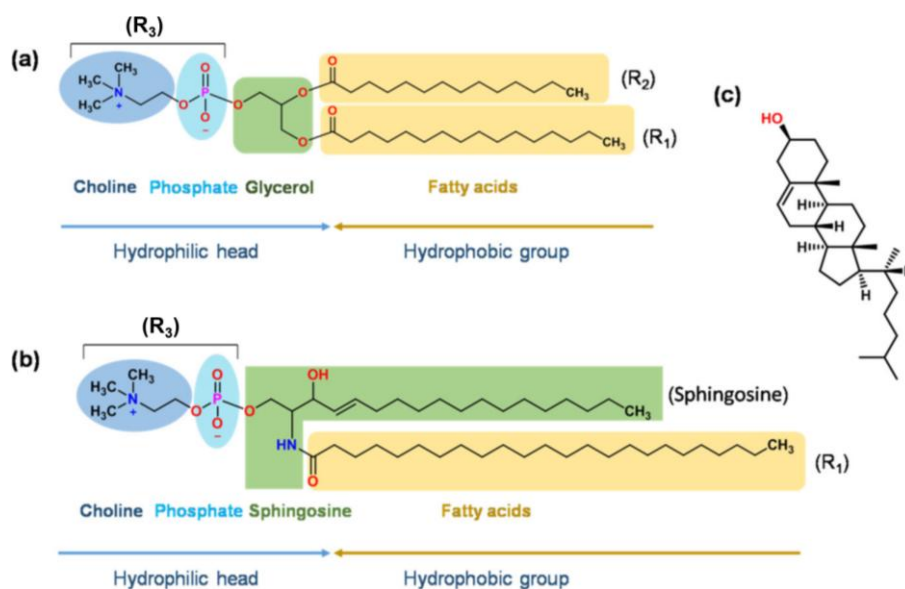


Figure 6 : Représentation schématique d'une phosphatidylcholine (A), d'une sphingomyéline (B) et du cholestérol (C), appartenant respectivement aux familles des glycérophospholipides, des sphingophospholipides et des stérols [61].

La longueur des chaînes d'acides gras influence fortement les propriétés des liposomes : plus les chaînes carbonées sont longues, plus les interactions hydrophobes entre phospholipides sont importantes. Cela augmente la cohésion de la bicouche, sa rigidité ainsi que sa température de transition de phase (T_m), correspondant à la température à laquelle la bicouche lipidique passe

INTRODUCTION

d'un état ordonné et rigide, appelé « phase gel », à un état plus fluide et moins ordonné, appelé « phase liquide ». Ainsi, des phospholipides tels que la 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DMPC (14:0)), la 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPPC (16:0)) et la 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DSPC (18:0)) constituent des membranes de rigidité croissante en raison de l'allongement progressif des chaînes acyles (Tableau 1) [61,67].

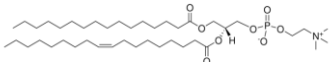
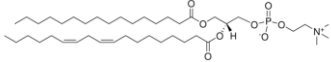
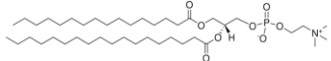
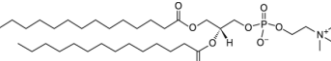
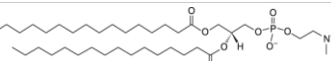
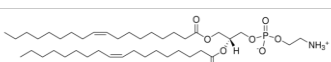
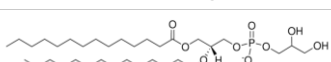
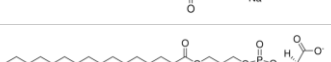
Le degré de saturation des chaînes d'acides gras influence également la fluidité membranaire. Les chaînes saturées, linéaires, s'organisent de manière compacte et confèrent des membranes rigides. À l'inverse, la présence de doubles liaisons *cis* introduit des déformations dans les chaînes hydrocarbonées, perturbant leur linéarité et leur organisation, ce qui augmente la fluidité de la bicouche lipidique. Ainsi, la 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC (18:1)) forme des membranes relativement fluides, alors que la DSPC (18:0) (Tableau 1) génère des membranes plus rigides [67,69].

La nature de la tête polaire conditionne la charge de surface des liposomes et, par conséquent, leurs interactions avec les constituants du milieu biologique. Les phospholipides zwitterioniques, tels que les -PC et les -PE, présentent une charge électrique globalement neutre à pH physiologique. Certains de leurs représentants, tels que la L- α -phosphatidylcholine d'œuf (EPC), la L- α -phosphatidylcholine de soja hydrogénée (HSPC) ou la DSPC, sont fréquemment employés dans la formulation de liposomes en raison de leur biocompatibilité et de leur absence de charge nette, qui limite les interactions électrostatiques avec les membranes biologiques et peut faciliter leur franchissement [70]. Les -PS et les -PG, tels que la 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phospho-L-sérine (DPPS) et le 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol) (DMPG), possèdent une charge nette négative qui favorise la répulsion électrostatique entre vésicules et améliore ainsi la stabilité colloïdale. Enfin, bien qu'ils ne possèdent pas de groupe phosphate et n'appartiennent donc pas à la catégorie des phospholipides, certains lipides synthétiques portant une charge positive, comme le 1,2-dioleoyl-3-triméthylammonium-propane (DOTAP), sont parfois utilisés dans la production de liposomes. Ces lipides cationiques sont généralement employés pour complexer des acides nucléiques ou faciliter l'internalisation cellulaire des liposomes, bien qu'ils puissent présenter une certaine cytotoxicité liée à leur charge positive. En effet, l'augmentation du nombre de charges positives est généralement corrélée à une toxicité accrue. Les lipides monocationiques sont à privilégier afin de limiter cet effet [68,71].

Les structures de ces lipides, ainsi que des phospholipides qui seront utilisés dans la partie expérimentale de cette thèse, sont présentées dans le Tableau 1.

INTRODUCTION

Tableau 1 : Exemples de structures lipidiques fréquemment employées dans la formulation de liposomes, ainsi que leur charge électrique à pH physiologique et leur origine [68,72].

Nom	Structure	Charge	Origine
L- α -phosphatidylcholine d'œuf (EPC)	Mélange de phospholipides (in)saturés Principal représentant : 	Neutre	Naturelle (œuf)
L- α -phosphatidylcholine de soja (SPC)	Mélange de phospholipides (in)saturés Principal représentant : 	Neutre	Naturelle (soja)
L- α -phosphatidylcholine de soja hydrogénée (HSPC)		Neutre	Semi- synthétique
1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3- phosphocholine (DMPC)		Neutre	Synthétique
1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3- phosphocholine (DPPC)		Neutre	Synthétique
1,2-distearoyl-sn-glycero-3- phosphocholine (DSPC)		Neutre	Synthétique
1,2-dioleoyl-sn-glycero-3- phosphocholine (DOPC)		Neutre	Synthétique
1,2-dioleoyl-sn-glycero-3- phosphoethanolamine (DOPE)		Neutre	Synthétique
Sel sodique de 1,2-dimyristoyl-sn- glycero-3-phospho-(1'-rac- glycerol) (DMPG)		Négative	Synthétique
Sel sodique de 1,2-dipalmitoyl-sn- glycero-3-phospho-L-sérine (DPPS)		Négative	Synthétique
Chlorure de 1,2-dioleoyl-3- triméthylammonium-propane (DOTAP)		Positive	Synthétique

II.1.2. Les stérols

Les stérols sont des constituants majeurs des liposomes. Leur représentant le plus utilisé est le cholestérol (Chol), une molécule amphiphile composée d'une tête polaire hydroxylée, d'un noyau stéroïde hydrophobe rigide et d'une courte chaîne hydrocarbonée apolaire (Figure 7A-B). Sa structure lui permet de s'insérer entre les phospholipides de la bicouche grâce à des interactions hydrophobes et de van der Waals de sa partie apolaire avec les chaînes acyles lipidiques, tandis

INTRODUCTION

que son groupement hydroxyle peut établir des liaisons hydrogène avec les têtes polaires des phospholipides. Son noyau stéroïde s'aligne ainsi avec les segments linéaires des chaînes phospholipidiques, restreint leurs mouvements et augmente dès lors la rigidité membranaire à ce niveau (Figure 7C) [67]. Par conséquent, la présence de Chol augmente la T_m du liposome, limite la fuite du composé encapsulé et améliore la résistance mécanique et la stabilité physique de la particule [68,73].

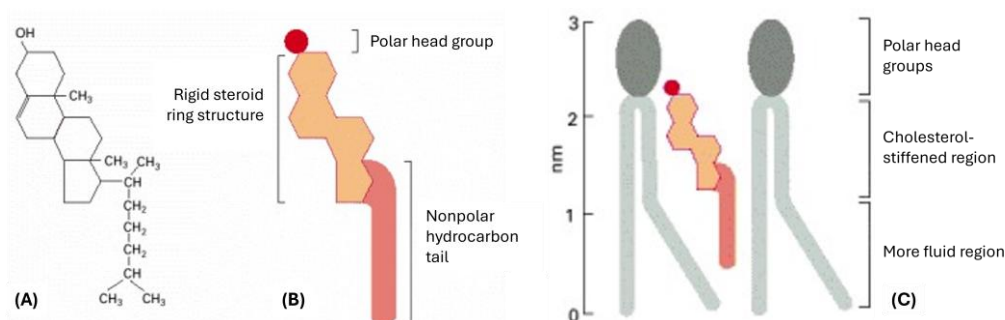


Figure 7 : Structure chimique (A), représentation simplifiée (B) et positionnement du Chol au sein d'une bicouche phospholipidique (C). Figure adaptée à partir de Alberts B. et al [67].

Dans les formulations de liposomes, le Chol représente typiquement 5 à 40 % des constituants membranaires. Sa présence augmente également l'hydrophobicité de la bicouche, ce qui favorise l'encapsulation et la rétention de principes actifs hydrophobes. Toutefois, lorsqu'il est incorporé en grande quantité, le Chol peut entrer en compétition avec ces composés pour l'espace disponible au sein de la membrane, ce qui réduit alors la capacité d'encapsulation des liposomes [61,73].

II.1.3. Les lipides PEGylés

Des lipides PEGylés sont parfois incorporés dans les formulations de liposomes, bien qu'en faible proportion (généralement 5 à 20%). Il s'agit de lipides auxquels sont greffées des chaînes hydrophiles de poly(éthylène glycol) (PEG), capables de former une couronne hydratée à la surface des liposomes. Leur ajout dans la formulation permet notamment de réduire la taille des liposomes. En cas d'administration par voie intraveineuse, cette couronne hydratée limite également l'adsorption des protéines plasmatiques à la surface des particules, ce qui réduit leur reconnaissance par le système immunitaire et prolonge leur temps de circulation [74]. Enfin, elle améliore la stabilité physique des formulations en induisant une répulsion stérique entre les particules, limitant ainsi leur agrégation au cours du temps [75]. Il existe différentes longueurs

de chaînes de PEG. Cette longueur détermine l'épaisseur et la conformation de la couche hydratée formée à la surface des liposomes. Ainsi, des chaînes plus longues forment une barrière plus étendue, ce qui augmente la répulsion stérique. À l'inverse, des chaînes plus courtes offrent une protection stérique moindre, mais favorisent certaines interactions cellulaires. Ces différences se traduisent en pratique par des chaînes de PEG de masse molaire variable. L'exemple le plus courant est le sel d'ammonium de la 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[methoxy(polyethylene glycol)-2000] (DSPE-PEG₂₀₀₀ ; Figure 8) [76,77].

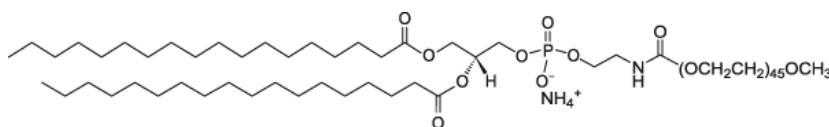


Figure 8 : Structure du DSPE-PEG₂₀₀₀, un phospholipide PEGylé couramment utilisé dans la formulation des liposomes comme agent de stabilisation pour limiter l'aggrégation des particules [72].

II.2. Le devenir intracellulaire des liposomes

Le franchissement d'un épithélium, tel que la RWM, par un liposome vecteur de principes actifs implique une succession d'étapes critiques, notamment l'internalisation cellulaire, la transcytose à travers la cellule épithéliale, l'échappement endosomal et l'exocytose, qui conditionnent l'efficacité thérapeutique finale.

L'internalisation des liposomes par les cellules épithéliales repose presque exclusivement sur des voies d'endocytose actives. Plusieurs voies coexistent, leur importance relative dépendant principalement de la taille et de la charge de surface du liposome [78]. Les plus fréquentes sont les suivantes :

- **L'endocytose dépendante de la clathrine** constitue la voie majoritaire pour les liposomes de petite taille (< 200 nm). Elle implique le recrutement de protéines adaptatrices (AP-2) qui initient la polymérisation de clathrines à la face cytoplasmique de la membrane cellulaire, formant une invagination qui se referme pour générer une vésicule recouverte de clathrines, et enfin, un endosome précoce [78–81].
- **L'endocytose dépendante des cavéolines** (liposomes < 80 nm) implique des invaginations membranaires riches en Chol et en sphingolipides, stabilisées par les protéines cavéoline-1. Cette voie est particulièrement pertinente car les vésicules cavéolaires échappent souvent à la fusion avec les lysosomes, empruntant un trafic

INTRODUCTION

distinct vers le réticulum endoplasmique ou l'appareil de Golgi, ce qui limite la dégradation du contenu encapsulé [78–80].

- **La macropinocytose**, non spécifique et dépendante du remodelage de l'actine, permet l'internalisation de volumes importants de liquide extracellulaire et de particules de plus grande taille (0,2 – 5 μm) [78,81].
- **La phagocytose et la fusion membranaire** sont également mentionnées dans la littérature, bien que peu décrites pour les liposomes [78,80].

Une fois internalisé à la membrane apicale, le liposome est pris en charge par l'endosome précoce, qui constitue une véritable plateforme de tri redirigeant la vésicule vers l'une des trois voies suivantes : la voie de **dégradation lysosomale**, la voie de **recyclage vers la membrane apicale** ou la voie de **transcytose** [80].

La transcytose repose sur un trafic vésiculaire orchestré par les endosomes de recyclage, et peut également impliquer un transit via le réticulum endoplasmique ou l'appareil de Golgi [78,80]. Ce processus permet au liposome d'éviter la voie de dégradation lysosomale classique et d'atteindre le pôle basolatéral, où il est relargué par exocytose.

Toutefois, le devenir le plus fréquent des vésicules d'endocytose est la maturation en endosomes précoces (pH $\sim 6,5$), puis en endosomes tardifs (pH $\sim 5,5$), avant fusion avec les lysosomes (pH $\sim 4,5-5$), riches en protéases, lipases et nucléases [82]. Cette acidification progressive et cet environnement enzymatique constituent le principal obstacle à l'efficacité des liposomes : la majorité du contenu encapsulé y est dégradée avant d'avoir pu atteindre sa cible. On estime que seule une fraction minoritaire du matériel endocyté échappe à cette voie dégradative, ce qui justifie les stratégies visant à favoriser leur libération précoce, avant la fusion lysosomale complète. Les liposomes qui échappent à cette dégradation peuvent à nouveau être orientés vers les voies de recyclage ou de transcytose.

Pour échapper à la dégradation lysosomale, les liposomes peuvent contenir des lipides fusogéniques, tels que la DOPE [80,83]. Ce phospholipide présente une particularité structurale essentielle : sa petite tête polaire associée à deux chaînes acyles insaturées volumineuses lui confèrent une géométrie moléculaire conique, défavorable à la formation d'une bicouche lamellaire stable, mais favorable à une transition vers une phase dite « hexagonale inverse » (non lamellaire). Ainsi, à pH neutre, la DOPE est stabilisée en configuration « bicouche » lorsqu'elle est

INTRODUCTION

associée à d'autres lipides. Cependant, dans l'environnement acide de l'endosome tardif, la protonation des groupements amines implique que la DOPE adopte spontanément sa conformation hexagonale inverse [78]. Cette transition déstabilise localement la bicouche endosomale et favorise sa fusion avec la membrane liposomale. Le résultat est une perméabilisation de la membrane endosomale, permettant le relargage du contenu encapsulé dans le cytoplasme avant que l'endosome n'atteigne le stade de lysosome. Ce **phénomène d'échappement endosomal** (*endosomal escape*) permet ainsi de préserver l'activité d'un principe actif sensible à la dégradation intracellulaire [78–80]. Il convient toutefois de distinguer ce mécanisme de la transcytose d'un liposome intact jusqu'au pôle basolatéral.

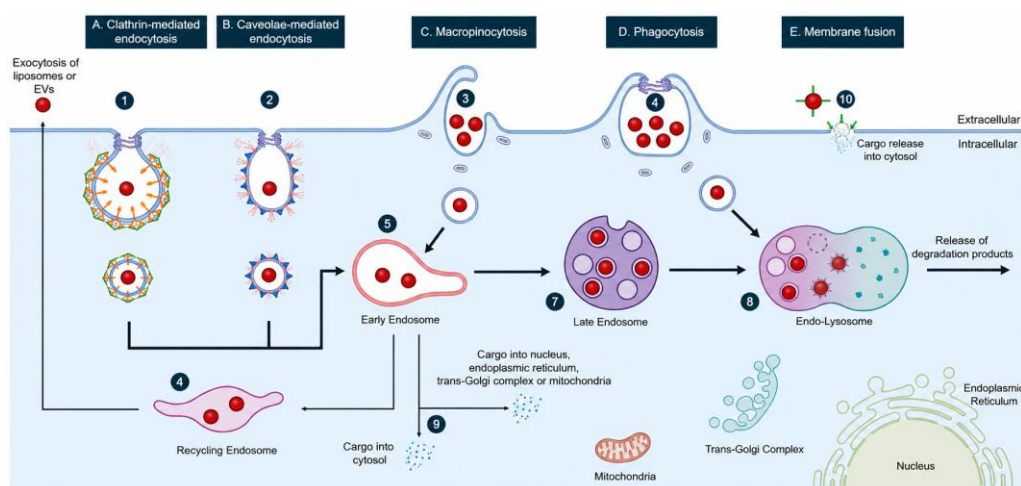


Figure 9 : Vue d'ensemble des mécanismes d'internalisation cellulaire des liposomes. Les voies prédominantes sont l'endocytose médiée par les clathrines (A) ou les cavéolines (B), la macropinocytose (C), la phagocytose (D) et la fusion membranaire (E) [80].

II.3. Les propriétés et applications des liposomes

Depuis leur développement, les liposomes ont connu de nombreuses évolutions visant à améliorer leurs performances comme systèmes de délivrance. Ces optimisations reposent principalement sur l'ajustement de la composition de leur bicouche lipidique et sur la fonctionnalisation de leur surface par l'ajout de molécules d'intérêt, telles que des ligands de ciblage. En modifiant leurs propriétés physico-chimiques et biologiques, ces approches permettent d'optimiser leur stabilité, leur biodistribution, leurs interactions avec les cellules cibles ainsi que la cinétique de libération des principes actifs, favorisant ainsi une délivrance plus efficace et plus spécifique [84,85]. Ces

INTRODUCTION

modifications peuvent également influencer leur capacité à franchir certaines barrières biologiques.

Parmi ces propriétés figurent notamment :

- L'augmentation de la solubilité de substances actives lipophiles via leur encapsulation, permettant ainsi d'accroître la dose administrable par rapport à la forme libre peu hydrosoluble et d'atteindre les concentrations thérapeutiques [63,68,86].
- L'effet barrière de la nanoparticule, protégeant le principe actif des dégradations causées par le système immunitaire ou les enzymes circulantes et améliorant ainsi sa stabilité, tout en réduisant les effets indésirables associés à sa libre circulation dans l'organisme [61,63,87].
- La traversée de barrières biologiques, obtenue par l'optimisation de la composition des liposomes afin de favoriser leur interaction avec les membranes cellulaires et la pénétration du principe actif encapsulé [63,86].
- Le ciblage, permettant d'amener le principe actif au plus près de son site d'action grâce à la capacité des nanoparticules à modifier sa distribution tissulaire. Le ciblage actif est généralement obtenu par fonctionnalisation de la surface du liposome, tandis que le ciblage passif repose sur son accumulation naturelle dans certaines régions de l'organisme (ex. au niveau des tumeurs, qui présentent une perméabilité vasculaire accrue). La concentration du principe actif au site d'action est ainsi augmentée et permet une amélioration de l'efficacité thérapeutique [61,63,86].
- La modulation de la cinétique de libération du principe actif encapsulé, permettant de générer des libérations prolongées ou dépendantes d'un stimulus, ce dernier pouvant être appliqué de manière externe (ex. ultrasons) ou provenir de l'environnement biologique (ex. variation de pH, présence d'enzymes) [61,63,74].

Grâce à ces propriétés, les liposomes sont devenus des vecteurs de principes actifs particulièrement polyvalents [84,85]. Initialement, ces systèmes ont été développés afin d'améliorer la distribution des principes actifs administrés par voie intraveineuse vers les tissus cibles et de réduire leur toxicité systémique. Ils ont ainsi trouvé de nombreuses applications en infectiologie, en oncologie et dans le traitement de maladies rares [62,88]. Bien que la voie intraveineuse demeure la principale voie d'administration des formulations de liposomes

actuellement autorisées sur le marché pharmaceutique, de nombreuses applications par voie topique sont en cours de développement, notamment en dermatologie, en ophtalmologie et en otologie [46,89].

II.4. Les liposomes administrés par voie transtympanique

II.4.1. Les premières évaluations précliniques

Au cours des dernières années, différentes formulations liposomales ont été développées et évaluées pour l'administration TT de composés thérapeutiques à destination de la cochlée. Ces travaux ont mis en évidence l'intérêt des liposomes comme vecteurs potentiels pour le traitement des surdités neurosensorielles.

Plusieurs travaux ont ainsi évalué leur sécurité et leur biodistribution après administration TT. Chez le rat, des liposomes encapsulant de l'acide gadotérique (Gd-DOTA), traçables par IRM, ont traversé efficacement la RWM pour atteindre la cochlée sans induire d'altération auditive, d'inflammation significative, ni d'apoptose cellulaire [90]. Le transport du Gd-DOTA à travers la RWM semble toutefois favorisé par l'utilisation de liposomes de petite taille, avec une efficacité de passage décroissante lorsque leur diamètre augmente (95 nm > 130 nm > 240 nm) [91].

Divers agents antioxydants (ex. N-acétyl-L-cystéine, ebsélène) et corticostéroïdes (ex. dexaméthasone phosphate sodique ; DSP) encapsulés dans des liposomes, eux-mêmes dispersés dans différents hydrogels, ont ensuite été administrés par voie TT afin d'étudier leur passage à travers la RWM et leur effet otoprotecteur. L'ebsélène, encapsulé dans des liposomes incorporés dans des microsphères de gélatine méthacrylatée recouvertes d'une couche de polydopamine adhésive, a ainsi été injecté dans l'oreille moyenne par bullotomie pour être acheminé dans la cochlée de souris. Ce traitement a permis une récupération complète de l'audition 14 jours après une exposition au bruit [92]. La N-acétyl-L-cystéine et la DSP, encapsulées dans des liposomes PEGylés dispersés dans un hydrogel d'acide hyaluronique, n'ont pas permis d'améliorer la récupération auditive chez le cobaye [44,93]. En revanche, des liposomes multivésiculaires encapsulant de la DSP à forte concentration (20 mg/mL), dispersés dans un hydrogel thermosensible constitué d'un mélange de Poloxamer 407 et 188, ont montré un effet otoprotecteur significatif chez le cobaye. Cette formulation a permis de maintenir des concentrations thérapeutiques de dexaméthasone dans la périlymphe pendant 3 à 7 jours après administration TT [94]. Cette même formulation, associant hydrogel thermosensible et liposomes

multivésiculaires, a également permis d'améliorer la biodistribution du principe actif encapsulé vers la région apicale de la cochlée [95].

Malgré ces résultats prometteurs, le développement clinique de ces approches reste limité. Les principaux défis concernent l'efficacité du franchissement de la RWM, le contrôle de la libération du principe actif, ainsi que la démonstration d'un bénéfice fonctionnel durable sur l'audition.

Les études réalisées à ce jour ont toutefois permis d'identifier plusieurs **attributs critiques de qualité (CQA)** des liposomes qui conditionnent leur administration par voie TT ainsi que leur passage à travers la RWM afin d'atteindre la cochlée.

II.4.2. Les attributs critiques de qualité des liposomes pour une administration transtympanique

II.4.2.1. La taille et l'indice de polydispersité

La taille des liposomes constitue l'un des principaux CQA à contrôler lors du développement d'une formulation, car elle influence directement leur comportement physico-chimique, leur stabilité, leur capacité d'encapsulation ainsi que leurs interactions avec les tissus biologiques. Selon leur mode de préparation et leur application thérapeutique, les liposomes peuvent présenter des diamètres allant de quelques dizaines de nanomètres à plusieurs micromètres [61,96].

D'un point de vue pharmaceutique, la taille des vésicules conditionne leur stabilité colloïdale et leur devenir biologique. Les liposomes de petite taille présentent généralement une meilleure dispersion au sein du milieu et une sédimentation limitée en raison de leur mouvement brownien plus important. À l'inverse, les vésicules de plus grande taille peuvent présenter une tendance accrue à la sédimentation et une distribution moins homogène. La taille influence également la surface spécifique disponible pour les échanges avec le milieu extérieur, les mécanismes d'interaction avec les membranes biologiques ainsi que la biodistribution des particules après administration [96,97].

Dans le cas des systèmes de délivrance destinés à l'oreille interne, la taille des liposomes constitue un paramètre particulièrement critique. En effet, la RWM représente la principale voie d'accès entre l'oreille moyenne et la cochlée et agit comme une barrière sélective vis-à-vis des particules administrées par voie TT. Plusieurs études ont montré que la pénétration des nanoparticules à travers cette membrane diminue lorsque leur taille augmente. Ainsi, des diamètres inférieurs à

INTRODUCTION

200 nm sont généralement recherchés afin de favoriser la diffusion transmembranaire tout en conservant une stabilité colloïdale satisfaisante [91,97,98].

La taille des liposomes est le plus souvent déterminée par diffusion dynamique de la lumière (DLS), une technique rapide permettant d'estimer le diamètre hydrodynamique moyen des particules en suspension à partir de l'analyse de leur mouvement brownien. Bien que cette méthode soit largement utilisée en routine, les résultats obtenus correspondent à une distribution pondérée en intensité et peuvent être influencés par la présence d'agrégats ou de populations minoritaires de grande taille. D'autres techniques, telles que la microscopie électronique en transmission (TEM), la cryo-microscopie électronique en transmission (cryo-TEM) ou l'analyse du suivi des nanoparticules (NTA), peuvent être utilisées en complément afin d'obtenir des informations plus détaillées sur la morphologie et la distribution granulométrique des liposomes [65,89,96,99].

À partir des mesures de DLS, l'indice de polydispersité (PdI) est calculé automatiquement selon la méthode des cumulants. Ce paramètre renseigne sur l'homogénéité de la distribution des tailles au sein de l'échantillon. Sa valeur varie entre 0 et 1, les valeurs les plus faibles traduisant une population plus homogène. Un PdI inférieur à 0,30 est généralement considéré comme acceptable pour la plupart des systèmes liposomaux, tandis que des valeurs plus élevées peuvent révéler la présence de plusieurs populations de particules ou de phénomènes d'agrégation. La maîtrise simultanée de la taille moyenne et de la polydispersité est essentielle afin de garantir la reproductibilité, la stabilité et les performances biologiques de la formulation [100,101].

Dans le cadre de cette thèse, une **taille moyenne inférieure à 200 nm** a été retenue comme critère de qualité cible afin de maximiser le potentiel de passage à travers la RWM après administration TT.

Un **PdI inférieur à 0,30** a été retenu comme critère de qualité cible afin d'assurer une population liposomale homogène, de limiter la présence d'agrégats ou de populations de tailles distinctes et de garantir une diffusion reproductible à travers la RWM après administration TT.

II.4.2.2. La charge de surface

La charge de surface constitue un attribut de qualité majeur des formulations liposomales, car elle influence directement leur stabilité colloïdale, leurs interactions avec les biomolécules et leur comportement après administration. Cette charge dépend principalement de la composition de la

INTRODUCTION

bicouche lipidique, de la présence éventuelle de lipides ionisables ou de polymères fonctionnalisés, ainsi que des caractéristiques physico-chimiques du milieu environnant, notamment son pH et sa force ionique [99,102].

La charge de surface joue un rôle essentiel dans la stabilité des suspensions liposomales. Lorsque les particules portent une charge électrique suffisante, les forces de répulsion électrostatique limitent les phénomènes d'aggrégation et de fusion entre vésicules. À l'inverse, une charge proche de la neutralité pourrait favoriser les interactions interparticulaires et conduire à une diminution de la stabilité colloïdale au cours du stockage. Ainsi, le contrôle de la charge de surface contribue directement à la robustesse et à la reproductibilité de la formulation [96,100].

Au-delà de son influence sur la stabilité, la charge de surface détermine également les interactions des liposomes avec les tissus biologiques. Les membranes cellulaires possèdent généralement une charge nette négative liée à la présence de glycoprotéines, de glycolipides et de protéoglycanes. Les liposomes cationiques présentent dès lors une forte affinité pour ces surfaces biologiques, ce qui favorise leur adhésion, leur internalisation cellulaire et la délivrance intracellulaire du principe actif encapsulé. Toutefois, ces interactions accrues peuvent également entraîner une augmentation de la cytotoxicité, une activation du système immunitaire et une diminution de la tolérance biologique. À l'inverse, les liposomes anioniques ou neutres présentent généralement une meilleure biocompatibilité, mais des interactions cellulaires plus limitées. Cet effet est davantage marqué pour les liposomes anioniques, qui pourraient subir une répulsion électrostatique au contact des membranes cellulaires [89,100].

La charge de surface est généralement caractérisée par la mesure du potentiel zêta (ZP), qui correspond au potentiel électrique au niveau du plan de glissement entourant la particule lorsqu'elle se déplace sous l'effet d'un champ électrique. Le ZP est déterminé expérimentalement à partir de la mobilité électrophorétique des particules et constitue un indicateur indirect de leur charge de surface. De manière générale, une valeur absolue élevée du ZP, qu'elle soit positive ou négative, traduit une meilleure stabilité colloïdale en raison des répulsions électrostatiques plus importantes entre particules [89,100].

Dans le contexte de l'administration TT, la charge de surface influence fortement les interactions des liposomes avec la RWM, principale interface entre l'oreille moyenne et l'oreille interne. Plusieurs travaux suggèrent que des liposomes présentant une charge neutre à légèrement positive favorisent l'adhésion à la RWM et leur transfert vers la cochlée tout en limitant les risques de toxicité associés aux formulations fortement cationiques [98].

Dans le cadre de cette thèse, un **ZP neutre** a d'abord été retenu comme critère de qualité cible afin de favoriser les interactions des liposomes avec la RWM tout en préservant une tolérance biologique compatible avec une administration TT. Dans l'éventualité où une stabilité de la taille des particules ne serait pas observée, un ZP légèrement positif serait envisagé.

II.4.2.3. La lamellarité

La lamellarité correspond au nombre de bicouches lipidiques constituant un liposome et représente un paramètre structural majeur susceptible d'influencer les propriétés pharmaceutiques de la formulation. Selon leur organisation, les liposomes peuvent être classés en plusieurs catégories.

On distingue classiquement les liposomes unilamellaires, qui regroupent les petites vésicules unilamellaires (SUV), dont le diamètre est souvent inférieur à 100 nm, les grandes vésicules unilamellaires (LUV), comprises approximativement entre 100 nm et 1 μ m, ainsi que les vésicules unilamellaires géantes (GUV), d'une taille supérieure à 1 μ m (Figure 10) [61,96]. La limite de taille entre les SUV et les LUV reste toutefois sujette à discussion, puisque certains auteurs classent des particules allant jusqu'à 200 nm parmi les SUV [103]. A côté des liposomes unilamellaires se trouvent les liposomes multilamellaires dits « en oignons », qui incluent les vésicules oligolamellaires (OLV), caractérisées par un nombre limité de bicouches lipidiques concentriques (généralement ≤ 5), ainsi que les vésicules multilamellaires (MLV), qui en possèdent un nombre plus élevé [61,96,102].

Dans la littérature, cette distinction est cependant rarement appliquée de manière stricte et le terme MLV est souvent utilisé pour désigner l'ensemble des structures multilamellaires. Enfin, les vésicules multivésiculaires (MVV) présentent une architecture particulière dans laquelle plusieurs petites vésicules sont encapsulées à l'intérieur d'un compartiment principal, formant une structure complexe parfois décrite comme un « nid d'abeilles » [61,96].

Les MLV, MVV et GUV présentent cependant des dimensions supérieures à celles recherchées pour les systèmes de délivrance contrôlée, qui se situent le plus souvent dans une gamme de tailles inférieures à 200 nm [97,98].

Par ailleurs, la lamellarité des liposomes influence fortement l'efficacité d'encapsulation (EE) des substances actives. En effet, à taille égale, les formes multilamellaires présentent une fraction lipidique plus importante, ce qui favorise l'incorporation de principes actifs lipophiles. À l'inverse,

INTRODUCTION

les formes unilamellaires disposent d'un volume aqueux proportionnellement plus accessible, ce qui est avantageux pour l'encapsulation de molécules hydrophiles [61,96].

La lamellarité exerce également une influence importante sur les cinétiques de libération. Dans les systèmes multilamellaires, les molécules encapsulées doivent diffuser à travers plusieurs bicouches lipidiques successives avant d'être libérées dans le milieu environnant. Cette organisation crée une barrière supplémentaire au transfert du principe actif et peut conduire à des profils de libération prolongée. À l'inverse, les liposomes unilamellaires présentent généralement des cinétiques de libération plus rapides en raison de leur structure plus simple et de la distance de diffusion réduite entre le compartiment interne et le milieu extérieur [104].

Au-delà de son impact sur l'encapsulation et la libération, la lamellarité influence également le comportement biologique des liposomes. Les structures multilamellaires et multivésiculaires présentent souvent des tailles plus importantes, une plus grande hétérogénéité et une mobilité réduite dans les tissus biologiques. À l'inverse, les liposomes unilamellaires peuvent être préparés avec des dimensions nanométriques et une distribution de taille plus homogène, ce qui favorise leur diffusion au sein des fluides biologiques ainsi que leur interaction avec les barrières physiologiques [61,96].

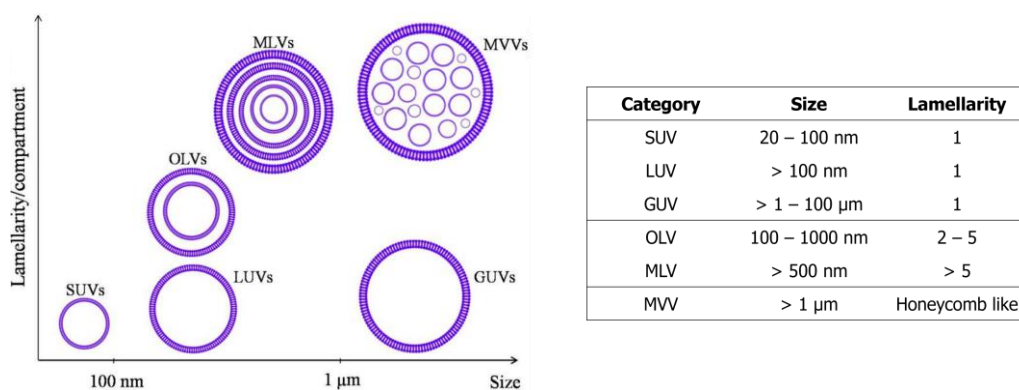


Figure 10 : Classification des liposomes selon leur taille et lamellarité en petites vésicules unilamellaires (SUV), grandes vésicules unilamellaires (LUV), vésicules unilamellaires géantes (GUV), vésicules oligolamellaires (OLV), vésicules multilamellaires (MLV) et vésicules multivésiculaires (MVV). Figure adaptée à partir de Liu P. et al [61].

Dans le contexte de l'administration TT, ces considérations revêtent une importance particulière. Le passage des liposomes vers l'oreille interne repose principalement sur leur capacité à traverser la RWM, dont la perméabilité est fortement influencée par les caractéristiques physiques des

particules administrées. Les structures multilamellaires, multivésiculaires ou géantes présentent généralement des dimensions incompatibles avec une diffusion efficace à travers cette membrane. À l'inverse, les liposomes unilamellaires de petite taille offrent un meilleur potentiel de pénétration et permettent d'obtenir des formulations plus homogènes et reproductibles [97,98].

Dans le cadre de cette thèse, une **population majoritairement constituée de liposomes unilamellaires** a été retenue comme critère de qualité cible afin de favoriser l'obtention de particules de taille nanométrique, homogènes et compatibles avec le passage à travers la RWM après administration TT.

II.4.2.4. L'efficacité d'encapsulation du principe actif

L'EE représente la proportion de principe actif effectivement incorporée au sein des liposomes par rapport à la quantité totale introduite lors de leur préparation (Équation 1). Cet attribut de qualité constitue un paramètre essentiel dans le développement de systèmes liposomaux, puisqu'il détermine directement la quantité de substance active pouvant être transportée et délivrée au site d'action. Une EE élevée permet d'augmenter la charge thérapeutique des particules tout en limitant la quantité totale de lipides administrée, ce qui contribue à améliorer les performances de la formulation et à réduire les risques liés à l'administration de doses excessives d'excipients [65,89].

L'EE dépend de nombreux facteurs liés à la fois au principe actif et à la formulation. Les propriétés physico-chimiques de la molécule encapsulée, notamment sa solubilité, sa charge et son caractère hydrophile ou lipophile, jouent un rôle déterminant dans sa répartition au sein du liposome. Les molécules hydrophiles sont principalement localisées dans le compartiment aqueux interne, tandis que les molécules lipophiles s'insèrent préférentiellement au sein des bicouches lipidiques. L'EE est également influencée par la composition de la membrane, notamment la nature des phospholipides utilisés, la présence de Chol, la longueur des chaînes acyles ou encore leur degré d'insaturation. Les paramètres de fabrication, tels que la méthode de préparation, le pH du milieu, la force ionique ou la composition du tampon, peuvent également modifier de manière significative la quantité de principe actif retenue dans les vésicules [65,89,96].

La morphologie des liposomes, et plus particulièrement leur lamellarité, influence fortement leur capacité d'encapsulation. À taille égale, les liposomes multilamellaires possèdent une quantité

INTRODUCTION

plus importante de matière lipidique et offrent une surface membranaire totale plus élevée, ce qui favorise l'incorporation de molécules lipophiles. À l'inverse, les liposomes unilamellaires disposent généralement d'un volume aqueux plus accessible, particulièrement adapté à l'encapsulation de composés hydrophiles. Le choix du type de liposome doit donc être réalisé en fonction des propriétés du principe actif et de la stratégie thérapeutique envisagée [61,96].

L'EE influence également les profils de libération du principe actif. Dans les systèmes présentant une forte capacité de rétention, la substance active demeure plus longtemps confinée au sein des vésicules, ce qui peut permettre de prolonger sa disponibilité et de contrôler sa libération. À l'inverse, une encapsulation insuffisante conduit à une proportion importante de molécule libre susceptible d'être éliminée rapidement ou de diffuser prématurément hors du système de délivrance. Ainsi, la maîtrise de l'EE contribue directement à la reproductibilité et à l'efficacité thérapeutique de la formulation [104].

L'évaluation expérimentale de l'EE (Équation 1) repose généralement sur la séparation préalable des fractions encapsulées et non encapsulées, réalisée par des techniques telles que la dialyse, l'ultrafiltration ou la chromatographie d'exclusion de taille. La quantité de principe actif présente dans chaque fraction est ensuite déterminée au moyen de méthodes analytiques adaptées, notamment la chromatographie liquide haute performance (HPLC), la spectrophotométrie UV-visible ou la spectrométrie de masse (MS) [65,89].

$$EE = \frac{C_e}{C_t} \times 100$$

Équation 1 : Détermination de l'efficacité d'encapsulation (EE ; %) sur base du rapport de la concentration en principe actif encapsulé (C_e ; $\mu\text{g/mL}$) et de la concentration totale en principe actif introduit au cours de la production (C_t ; $\mu\text{g/mL}$).

Dans le contexte de l'administration TT, l'EE revêt une importance particulière en raison des faibles volumes pouvant être administrés dans l'oreille moyenne et des quantités limitées de principe actif capables d'atteindre l'oreille interne après franchissement de la RWM. Une encapsulation élevée permet ainsi de maximiser la quantité de molécule transportée par chaque liposome et d'augmenter la dose effectivement délivrée à la cochlée tout en limitant le volume de formulation administré.

Dans le cadre de cette thèse, une **EE élevée** a été retenue comme critère de qualité cible afin de maximiser la quantité de principe actif transportée vers l'oreille interne et de limiter la quantité de liposomes nécessaire pour atteindre une concentration thérapeutique après administration TT.

II.4.2.5. Les autres critères non spécifiques de la voie transtympanique

La **stabilité colloïdale**, tant sur le plan physique (agrégation/fusion) que chimique (oxydation/hydrolyse), conditionne directement la durée de conservation et la performance des liposomes [63].

II.4.2.5.1. La stabilité chimique

La stabilité des liposomes constitue un paramètre clé conditionnant leur performance et leur utilisation en clinique. Ainsi, la stabilité chimique de ces nanoparticules, principalement liée au risque de dégradation des constituants lipidiques par oxydation ou hydrolyse, peut être évaluée à la fin du procédé de production ainsi qu'au cours du stockage.

Le risque d'hydrolyse

La réaction d'hydrolyse affectant les liposomes concerne principalement les liaisons ester reliant les chaînes acyles des phospholipides au squelette glycérol, et conduit dès lors à la formation de lysophospholipides et d'acides gras libres (Figure 11). Par exemple, le phospholipide DSPC (18:0) peut subir une hydrolyse partielle aboutissant à son principal produit de dégradation, la lysophosphatidylcholine (LPC ; 18:0), résultant de la perte d'une chaîne acyle. L'augmentation de la LPC (18:0) peut ainsi être suivie afin d'estimer le degré d'hydrolyse subi par l'échantillon au cours du procédé de production des liposomes ou au cours du stockage. Ce phénomène d'hydrolyse est favorisé par plusieurs facteurs, notamment le pH, la lumière, la température, ainsi que la présence d'impuretés ou de traces enzymatiques. L'environnement aqueux des suspensions de liposomes joue évidemment un rôle central dans ce processus [99,105].

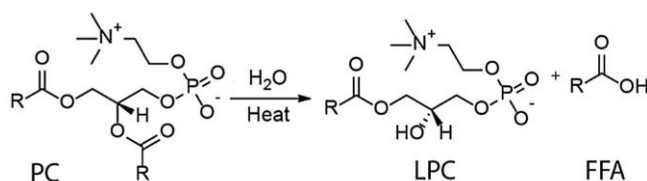


Figure 11 : Réaction de dégradation par hydrolyse d'une phosphatidylcholine (PC) générant un lysophospholipide, la lysophosphatidylcholine (LPC), et un acide gras libre (FFA) sous l'action de l'eau et de la chaleur [105].

INTRODUCTION

Certains phospholipides contiennent naturellement une faible proportion de lysophospholipides. C'est notamment le cas de la SPC, un phospholipide d'origine naturelle qui contient en moyenne 2,8% m/m de LPC [106]. Cette présence s'explique par son origine biologique (biosynthèse incomplète, phospholipases endogènes), ainsi que par les procédés d'extraction et de purification.

À faible concentration, les lysophospholipides ne sont pas nécessairement délétères et peuvent même contribuer à la modulation de la fluidité membranaire. En revanche, une accumulation excessive de LPC peut devenir problématique, bien qu'aucune limite ne soit actuellement définie par des organismes de réglementation tels que la FDA ou l'*European Medicines Agency* (EMA). Des proportions élevées de LPC sont en effet associées à une toxicité biologique ainsi qu'à une perturbation de l'organisation de la bicouche lipidique, entraînant une augmentation de la perméabilité membranaire, une fuite du contenu encapsulé et une diminution de la stabilité des liposomes. Sur le plan physico-chimique, cela peut également se traduire par des variations de taille et de polydispersité [105,107].

L'évaluation de ce phénomène repose sur des techniques analytiques permettant de séparer et de quantifier les phospholipides ainsi que leurs produits de dégradation. Parmi celles-ci, la chromatographie sur couche mince haute performance (HPTLC) constitue une méthode adaptée et largement utilisée. Son principe repose sur la séparation des composés en fonction de leur affinité différentielle pour une phase stationnaire, généralement constituée de silice, et une phase mobile, composée de divers solvants organiques. L'échantillon est déposé sur la plaque sous forme de bandes, puis la migration de la phase mobile par capillarité entraîne les différents constituants à des vitesses distinctes dépendantes de leurs interactions avec les deux phases. Les phospholipides et les lysophospholipides présentent ainsi des facteurs de rétention (R_f) différents, permettant leur discrimination. Après migration, les composés sont révélés à l'aide de réactifs spécifiques, puis quantifiés par densitométrie ou par analyse d'images numériques (ex. système CAMAG basé sur l'acquisition et le traitement photographique des plaques) [105,108]. Le pourcentage de LPC dans l'échantillon est ensuite calculé à l'aide de l'Équation 2 :

$$LPC = \frac{C_{LPC}}{C_{phospholipides}} \times 100$$

Équation 2 : Détermination du contenu en lysophosphatidylcholine (LPC ; %) dans l'échantillon de phospholipides sur base du rapport entre la concentration en LPC (C_{LPC} ; $\mu\text{g/mL}$) et la concentration initiale en phospholipides ($C_{phospholipides}$; $\mu\text{g/mL}$).

INTRODUCTION

Le risque d'oxydation

L'oxydation des liposomes résulte de la réactivité intrinsèque des phospholipides vis-à-vis des espèces oxydantes, en particulier lorsque leurs chaînes d'acides gras comportent des insaturations. Ces doubles liaisons constituent des sites privilégiés pour l'oxydation lipidique, un processus initié par des ROS. Ce phénomène est favorisé par plusieurs facteurs environnementaux, notamment la présence d'oxygène, la lumière, la chaleur ou encore des traces de métaux de transition agissant comme catalyseurs. L'oxydation se déroule généralement selon un mécanisme en chaîne, impliquant des étapes d'initiation, de propagation et de terminaison, conduisant à la formation de peroxydes lipidiques et de produits de dégradation secondaires. Ces transformations altèrent les propriétés physico-chimiques des liposomes, entraînant notamment une augmentation de la perméabilité membranaire, une perte d'intégrité structurale, voire une libération prématurée des composés encapsulés. Dans un contexte biologique, ces altérations peuvent diminuer l'efficacité thérapeutique et générer des effets indésirables liés aux produits d'oxydation, parfois cytotoxiques [109,110]. À ce jour, aucune limite spécifique d'oxydation des phospholipides n'a été explicitement établie par des autorités telles que l'EMA ou la FDA, bien que ces dernières imposent un suivi rigoureux des produits de dégradation et de la stabilité des formulations mises sur le marché.

L'état d'oxydation d'une formulation de liposomes peut être évalué par spectrophotométrie UV-visible, notamment par la mesure d'absorbance (Abs) des diènes conjugués à 234 nm. Le pourcentage de lipides peroxydés générés, par exemple par un procédé de production ou par des conditions de stockage définies, peut être déterminé à l'aide de l'Équation 3 :

$$\% \text{ Lipides Peroxydés} = \frac{Abs_{234} - Abs'_{234}}{\varepsilon \times D \times C_{lipides}} \times 100$$

Équation 3 : Détermination du pourcentage de lipides peroxydés générés au cours d'un processus défini, à partir des valeurs d'absorbance à 234 nm de l'échantillon avant (Abs'_{234}) et après (Abs_{234}) ce procédé, du coefficient d'extinction molaire des diènes conjugués (ε ; $27000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), du trajet optique (D ; cm) et de la concentration en lipides totaux dans l'échantillon ($C_{lipides}$; mol/L) [110,111].

La présence de phospholipides saturés évite l'oxydation de la formulation [71].

II.4.2.5.2. La stabilité physique

La stabilité physique des liposomes repose sur l'équilibre de leur organisation colloïdale, sensible à divers phénomènes d'instabilité comme l'aggrégation, la fusion, la sédimentation ou encore la

INTRODUCTION

fuite du contenu encapsulé. Ces altérations peuvent être induites par des variations de température, de pH, de force ionique ou par des contraintes mécaniques liées à l'agitation, à la manipulation ou au stockage. Elles se traduisent par des changements de taille, de polydispersité, de charge de surface ou par une perte d'intégrité membranaire. Ces modifications peuvent compromettre l'efficacité thérapeutique en modifiant la cinétique de libération du principe actif encapsulé, sa biodisponibilité, voire entraîner des effets indésirables liés à une libération prématurée ou non contrôlée dans l'organisme.

Le suivi de ces caractéristiques physico-chimiques au cours du temps est donc essentiel et repose sur diverses méthodes complémentaires. La DLS permet ainsi de suivre l'évolution de la taille et du PdI, tandis que la mesure du ZP renseigne sur la stabilité électrostatique des particules. Des analyses de turbidité ou de sédimentation peuvent détecter des phénomènes d'agrégation, et le dosage du contenu encapsulé permet d'évaluer les fuites dues à une perturbation de la bicouche lipidique. Les phénomènes de fusion et d'agrégation des particules peuvent aussi être observés via différentes techniques de microscopie comme la cryo-TEM. Ces paramètres sont généralement étudiés dans différentes conditions de stockage afin d'anticiper la mise sur le marché du système et d'assurer sa qualité, sa sécurité et son efficacité sur une période de validité prédéfinie [99].

Plusieurs composants permettent d'améliorer la stabilité physique des liposomes. L'incorporation de Chol est l'approche la plus classique : il rigidifie la bicouche lipidique, diminue sa perméabilité et limite la fuite du contenu ainsi que les phénomènes de fusion. Le choix de phospholipides à T_m élevée (chaînes longues et saturées) renforce également la cohésion membranaire et réduit la fluidité, améliorant ainsi la stabilité au cours du stockage. L'ajout de lipides chargés (cationiques ou anioniques) augmente la répulsion électrostatique entre particules, limitant ainsi l'agrégation. Dans la même logique, la PEGylation confère une stabilisation stérique en formant une barrière hydrophile qui empêche le rapprochement des liposomes. L'optimisation du ratio entre les constituants lipidiques contribue ainsi à maintenir l'intégrité membranaire et à prévenir les dégradations susceptibles d'altérer la stabilité physique au cours du temps [75].

II.5. Les méthodes de production des liposomes

Le choix de la méthode de production des liposomes dépend notamment de la taille, du PdI et de la lamellarité souhaités, de l'échelle de production requise en fonction de l'application visée (ex. tests expérimentaux, lots précliniques, production industrielle), ainsi que du recours éventuel à des solvants organiques.

INTRODUCTION

La méthode par hydratation du film lipidique (TFH) reste la technique la plus répandue pour la production des liposomes à l'échelle du laboratoire, au vu de sa simplicité et de son faible coût. Cette méthode permet d'obtenir des liposomes homogènes et reproductibles à petite échelle, ce qui est suffisant pour la réalisation d'études expérimentales [65]. Sa principale limite concerne sa transposition industrielle, entravée par certaines étapes de production qui imposent l'usage de petits volumes (ex. étape de formation du film lipidique par évaporation des solvants).

Cette méthode (Figure 12) repose sur la formation initiale d'un fin film lipidique déposé sur les parois d'un ballon, obtenu après évaporation de l'éthanol ayant solubilisé les lipides et les principes actifs hydrophobes destinés à constituer les liposomes. Une fois ce film homogène formé, une phase aqueuse, pouvant contenir des principes actifs hydrophiles, est ajoutée. L'application d'une agitation, par vortex ou sonication, favorise le détachement du film et l'hydratation des lipides, entraînant leur autoassemblage en structures vésiculaires. Pour cette étape, la température est généralement maintenue au-dessus de la T_m des lipides afin de favoriser leur fluidité et une organisation optimale. Cette méthode génère des vésicules de taille et de lamellarité hétérogènes, nécessitant une étape complémentaire d'extrusion pour réduire la taille et obtenir une distribution plus uniforme. L'extrusion des liposomes nécessite l'utilisation de membranes en polycarbonate avec des pores de taille définie. La taille de ces pores et le nombre de cycles d'extrusion dictent la taille finale des liposomes, qui se présentent alors sous la forme de SUV. Enfin, une étape de purification, au moyen de méthodes telles que la dialyse ou l'ultrafiltration, est indispensable pour éliminer les principes actifs non encapsulés dans les liposomes [68,112,113].

La méthode par injection de solvants (ex. éthanol, éther) repose sur un mélange de phases organique et aqueuse, induisant la nanoprécipitation des liposomes. Elle permet d'obtenir des vésicules relativement hétérogènes et nécessite donc un post-traitement pour réduire et homogénéiser leur taille. Cette méthode présente l'avantage d'être transférable à l'échelle industrielle via des systèmes de production continue, mais impose une élimination stricte des solvants organiques. Elle constitue aujourd'hui l'une des approches les plus utilisées pour la production de liposomes destinés à la voie parentérale [65,114].

Les approches microfluidiques, de plus en plus utilisées, reposent sur des principes similaires de mélange contrôlé et de nanoprécipitation. Elles permettent un contrôle précis de la taille des particules et une meilleure reproductibilité grâce à l'écoulement laminaire généré au sein du système, bien qu'elles nécessitent également une étape d'élimination des solvants. Ces approches

INTRODUCTION

microfluidiques sont transposables à l'échelle industrielle, mais restent limitées par des contraintes de débit et de coût des équipements. Ces technologies sont actuellement utilisées dans l'industrie pour la production de formulations de LNP encapsulant des acides nucléiques [114–116].

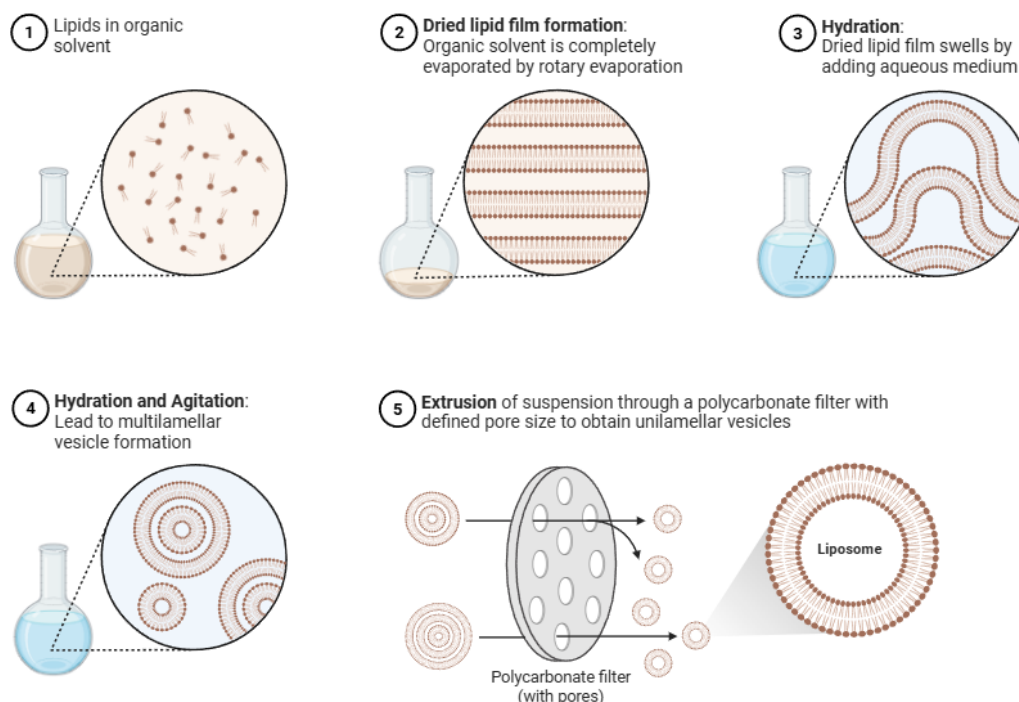


Figure 12 : Production de liposomes par la méthode d'hydratation du film lipidique (TFH), suivie d'une étape d'extrusion sur filtre en polycarbonate. Les principes actifs lipophiles sont ajoutés à l'étape 1, tandis que les principes actifs hydrophiles sont ajoutés à l'étape 3. Figure provenant de BioRender.

Les méthodes conventionnelles de production des liposomes, telles que la TFH, l'injection d'éthanol ou encore les procédés microfluidiques, présentent chacune des avantages mais également plusieurs limitations lorsqu'une application pharmaceutique à grande échelle est envisagée. La plupart de ces techniques reposent sur l'utilisation de solvants organiques afin de solubiliser les lipides et les principes actifs lipophiles avant la formation des vésicules [61]. Bien que des étapes de purification puissent être mises en œuvre afin d'éliminer ces solvants, leur retrait complet n'est pas toujours garanti et des traces résiduelles peuvent persister dans la formulation finale. Cette problématique est particulièrement importante dans le cadre d'une administration TT, où les formulations sont destinées à être déposées à proximité immédiate de

INTRODUCTION

l'oreille interne, un organe particulièrement sensible aux effets toxiques potentiels de certains solvants [63].

Au-delà de cette contrainte, les procédés conventionnels présentent également des défis en matière de reproductibilité et de transfert d'échelle. La méthode TFH, largement utilisée au laboratoire, implique de multiples étapes successives, telles que l'évaporation du solvant, l'hydratation du film lipidique puis les opérations de réduction de taille, susceptibles d'introduire une variabilité importante entre les lots. L'injection d'éthanol permet d'obtenir des liposomes de manière plus simple et plus rapide, mais nécessite également l'élimination du solvant et peut présenter des limitations en termes de concentration lipidique finale. Les technologies microfluidiques offrent quant à elles un contrôle très précis des CQA des liposomes, notamment leur taille et leur polydispersité, mais leur mise en œuvre industrielle reste complexe en raison des débits relativement faibles, des contraintes d'équipement et des coûts associés [61,63,115].

La production de liposomes destinés à l'administration TT impose par ailleurs des exigences supplémentaires. La formulation doit être obtenue dans des conditions compatibles avec la stérilité pharmaceutique, l'utilisation d'agents conservateurs étant généralement déconseillée en raison des risques d'ototoxicité [114,117]. De plus, les CQA des liposomes, tels que leur taille, leur PdI, leur charge de surface ou leur EE, doivent être maintenus de manière constante lors du changement d'échelle afin de garantir un comportement biologique reproductible. Or, de faibles variations des paramètres opératoires peuvent modifier significativement ces propriétés et altérer les performances thérapeutiques observées *in vivo* [63,115].

Dans ce contexte, le développement d'une méthode de production permettant de s'affranchir de l'utilisation de solvants organiques, tout en assurant la reproductibilité du procédé, sa compatibilité avec la stérilisation et son transfert à l'échelle industrielle, apparaît particulièrement pertinent. La technologie PGSS (*Particles from Gas Saturated Solutions*) constitue à cet égard une alternative prometteuse. Basée sur l'utilisation de dioxyde de carbone (CO₂) sous pression comme agent de mise en forme, elle permet de produire des particules dans des conditions douces, sans recours à des solvants organiques, tout en offrant des perspectives intéressantes en matière de changement d'échelle, de maîtrise des CQA et de développement industriel. Ces caractéristiques en font une approche particulièrement attractive pour la production de liposomes destinés à l'administration TT [68,89,112].

Les technologies utilisant des fluides supercritiques, et en particulier le CO₂ supercritique (scCO₂), pour la production de liposomes ont émergé comme des alternatives prometteuses. Depuis les

premières applications dans les années 1990, ces procédés ont été largement étudiés et diversifiés. Ils peuvent être classés selon le rôle du scCO_2 : solvant ou co-solvant des lipides, agent anti-solvant permettant la précipitation de proliposomes, ou encore agent de dispersion facilitant la formation de liposomes. Des techniques spécifiques comme le *Gas Anti-Solvent* (GAS), la *Rapid Expansion of Supercritical Solutions* (RESS) ou le PGSS illustrent cette diversité méthodologique [118]. Toutefois, certaines de ces techniques nécessitent encore l'utilisation d'un solvant organique en complément du fluide supercritique (ex. GAS, RESS).

Ces approches ont d'abord été développées à l'échelle du laboratoire, démontrant leur capacité à produire des liposomes de taille nanométrique, homogènes et présentant une EE équivalente ou supérieure à ceux obtenus par les méthodes traditionnelles [89]. Progressivement, elles ont évolué vers des procédés semi-continus, facilitant leur transposition vers une production à plus grande échelle. Cette évolution répond aujourd'hui aux exigences industrielles en matière de reproductibilité et de contrôle des caractéristiques physico-chimiques [65]. Bien que certaines limitations subsistent (optimisation des rendements d'encapsulation ou complexité des paramètres opératoires), les procédés utilisant le scCO_2 sont considérés comme des technologies innovantes et industrialisables pour la production de liposomes. Ils s'inscrivent dans une dynamique de modernisation des procédés, visant à simplifier les étapes de fabrication et à les rendre plus vertes, tout en améliorant la reproductibilité et la qualité des systèmes obtenus.

II.5.1. Les propriétés du scCO_2

Le fluide supercritique le plus utilisé est le scCO_2 , en raison de son point critique (31,1°C et 73,8 bar) facilement accessible et au-delà duquel il n'existe plus de distinction entre les phases liquide et gazeuse. Il présente alors des propriétés intermédiaires entre celles d'un liquide et d'un gaz, particulièrement intéressantes pour la formation de liposomes. Sa densité élevée, proche de celle du CO_2 liquide, lui confère un pouvoir solvant vis-à-vis de certains composés lipidiques. Par ailleurs, sa faible viscosité et sa diffusivité élevée, similaires à celles du CO_2 gazeux, favorisent des transferts de matière rapides ainsi qu'une pénétration efficace dans les matrices. Le point critique du CO_2 , relativement facile à atteindre, rend son utilisation compatible avec des molécules sensibles, notamment en limitant les contraintes thermiques [103,119]. De plus, le scCO_2 peut également être utilisé pour la stérilisation des liposomes, grâce à son pouvoir de pénétration et à sa capacité à inactiver certains micro-organismes, tout en évitant les dégradations liées aux hautes températures [120]. Enfin, en ajustant finement la pression et la température, il est possible de moduler ses propriétés (pouvoir solvant, viscosité, diffusivité), afin d'améliorer la

solubilité des lipides et la formation des structures liposomales. Cela contribue à obtenir des vésicules de taille plus contrôlée et une distribution plus homogène [118].

Du point de vue chimique, économique et environnemental, le CO₂ présente plusieurs avantages : il est abondant, peu coûteux, chimiquement inerte, non toxique et facilement éliminable par simple détente, ce qui réduit les étapes de purification et évite les résidus de solvants. Par ailleurs, dans un contexte industriel, des systèmes de récupération et de recyclage du CO₂ peuvent être mis en place, permettant de limiter les émissions et de réduire davantage l'impact environnemental du procédé. Toutefois, l'utilisation de technologies supercritiques nécessite des équipements spécifiques capables de supporter des pressions élevées, ce qui implique un investissement initial important et des coûts de maintenance non négligeables. De plus, l'optimisation des paramètres opératoires peut être complexe et dépend fortement des systèmes étudiés [89,121].

Ainsi, le scCO₂ combine des propriétés physico-chimiques uniques permettant un contrôle fin du procédé de formation des liposomes, tout en offrant des perspectives intéressantes en termes de durabilité. Néanmoins, son adoption à grande échelle reste conditionnée par des considérations économiques et techniques liées aux infrastructures requises.

II.5.2. L'utilisation du scCO₂ en tant qu'agent dispersant : le procédé PGSS

Le procédé PGSS repose sur un équipement (Figure 13A) comprenant une bouteille de CO₂ reliée à une pompe permettant son injection dans le système, un réacteur à haute pression (autoclave) équipé d'un système d'agitation et entouré d'un collier chauffant, ainsi qu'une buse débouchant dans un vase d'expansion [122].

Le protocole de production débute par l'introduction manuelle dans le réacteur des lipides, des principes actifs et de la phase aqueuse. L'ensemble est ensuite chauffé et agité, formant une suspension constituée d'agrégats de lipides (Figure 13B ; étape 1). Le CO₂ est ensuite pompé dans l'autoclave jusqu'à atteindre la pression souhaitée, ce qui lui permet notamment d'adopter des propriétés supercritiques. Le scCO₂ diffuse alors dans la phase lipidique et s'intercale au niveau des chaînes d'acides gras des phospholipides, favorisant leur désorganisation et la dispersion des agrégats pour conduire à la formation d'une émulsion (étape 2). Lors de la dépressurisation, le scCO₂ retourne à l'état gazeux et se dilate rapidement. Cette expansion entraîne la fragmentation des micelles (étape 3), suivie de leur réorganisation spontanée en

INTRODUCTION

bicouches phospholipidiques, conduisant *in fine* à la formation de liposomes (étape 4) [119]. Parallèlement, cette suspension est projetée à travers la buse vers les parois du vase d'expansion, où elle est récupérée dans un récipient collecteur. Cette méthode s'affranchit donc complètement de l'utilisation de solvants organiques et permet simultanément la production et la stérilisation des liposomes. Ce procédé étant réalisé en système fermé, il peut être adapté à des zones de production stériles en vue d'une application industrielle [120].

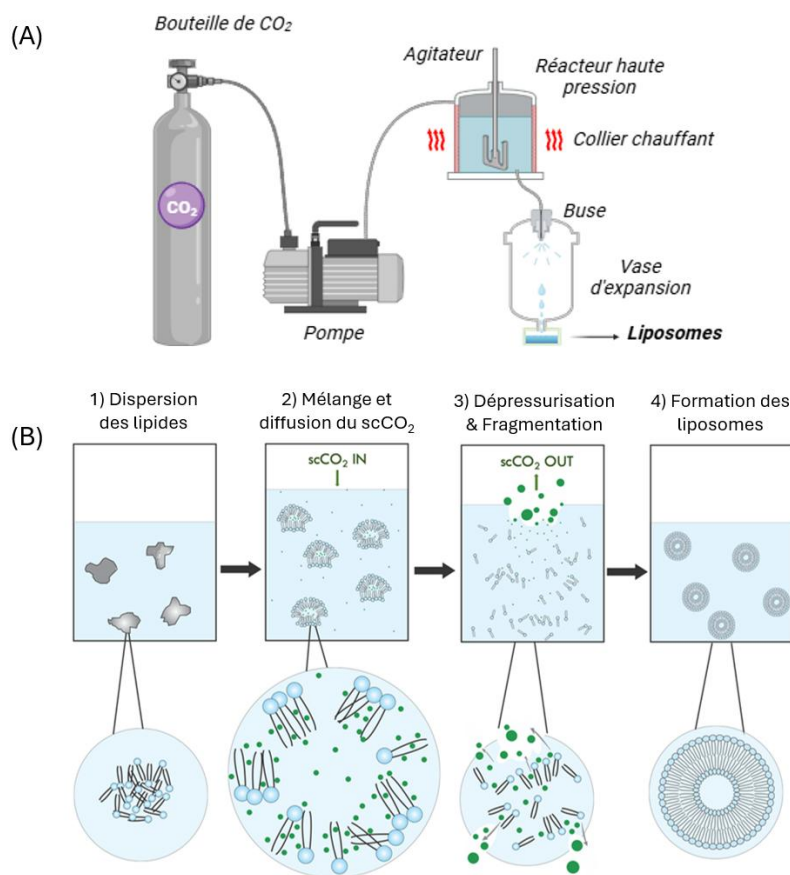


Figure 13 : Schéma simplifié de l'équipement PGSS (A) et mécanisme de formation des liposomes par la méthode PGSS en présence de scCO₂ (B). Figure réalisée avec BioRender, inspirée de Zhao et al. [119].

II.5.3. Les paramètres critiques en « scale-up »

La montée d'échelle, ou *scale-up*, du procédé PGSS permettant la production des liposomes constitue une étape délicate, dans la mesure où elle peut affecter les CQA des particules obtenues, notamment leur taille, leur PdI, leur EE, ainsi que leur stabilité chimique (dégradation

INTRODUCTION

hydrolytique et oxydative). Dans ce contexte, l'identification et la maîtrise des paramètres influents apparaissent essentielles afin de garantir la robustesse et la reproductibilité du procédé à plus grande échelle. Deux catégories de facteurs doivent être distinguées : d'une part, les paramètres intrinsèques au procédé, qui doivent être optimisés, et d'autre part, les paramètres liés au changement d'échelle de l'équipement.

Parmi les variables de procédé, la pression et la température jouent un rôle central en modulant les propriétés du scCO_2 , notamment sa densité et son pouvoir solvant. La vitesse d'agitation influence quant à elle l'efficacité du mélange des deux phases, tandis que le volume de dispersion introduit dans le réacteur, et donc le taux de remplissage, impacte également les conditions hydrodynamiques. D'autres paramètres, tels que la concentration en lipides, le temps de contact avec le scCO_2 et la vitesse de dépressurisation, sont également déterminants en raison de leur influence directe sur la formation des liposomes et leurs caractéristiques finales. Dans une perspective industrielle, certains de ces paramètres doivent être définis en tenant compte des contraintes de faisabilité et de productivité du procédé. Le temps de contact avec le scCO_2 doit ainsi être optimisé afin de concilier efficacité du procédé et débit de production. De même, la concentration en lipides doit être ajustée afin d'assurer une formation efficace de liposomes présentant des propriétés physico-chimiques optimales, tout en optimisant les coûts et en maintenant des performances satisfaisantes. À titre indicatif, des concentrations de l'ordre de 5 à 25 mM sont généralement envisagées à l'échelle industrielle pour des productions en microfluidique [115].

Par ailleurs, le changement d'échelle s'accompagne de modifications significatives des caractéristiques de l'équipement. L'augmentation du volume du réacteur est susceptible d'affecter les transferts de chaleur et de matière, l'efficacité du mélange et donc la dynamique interne des fluides. En outre, des différences de conception des systèmes d'agitation (type de mobile, géométrie), la capacité à contrôler précisément la vitesse de dépressurisation, ainsi que les caractéristiques du circuit (notamment la longueur, la géométrie et la température des conduites en acier inoxydable) introduisent des sources supplémentaires de variabilité. Enfin, le niveau d'automatisation, plus élevé à l'échelle industrielle, constitue un facteur clé pouvant influencer la robustesse et la reproductibilité du procédé.

Les paramètres critiques à prendre en considération pour la mise à l'échelle de la méthode PGSS seront investigués dans le 3^{ème} chapitre de la partie expérimentale de cette thèse, à la section II.3.2 (page 222).

II.6. Les limites des liposomes pour une administration transtympanique

Malgré leur intérêt comme vecteurs de délivrance pour l'administration TT, les formulations liposomales conventionnelles présentent certaines limites susceptibles de réduire leur efficacité thérapeutique. En effet, les suspensions liposomales présentent généralement une faible viscosité et, après leur injection dans la cavité de l'oreille moyenne, elles sont progressivement éliminées par les mécanismes physiologiques de drainage, notamment via la trompe d'Eustache. Cette clairance rapide diminue la durée de contact entre les liposomes et la RWM, qui constitue la principale voie d'accès vers l'oreille interne. Par conséquent, seule une fraction des particules administrées dispose d'un temps suffisant pour interagir avec cette membrane et diffuser vers la cochlée, limitant ainsi la quantité de principe actif effectivement délivrée au site d'action [54,123,124].

Dans ce contexte, l'amélioration du temps de résidence de la formulation au niveau de la RWM apparaît comme un enjeu majeur pour optimiser le transport cochléaire des principes actifs encapsulés. L'incorporation des liposomes au sein d'un hydrogel constitue à cet égard une stratégie particulièrement prometteuse.

III. Les hydrogels

La majorité des formulations thérapeutiques développées pour être injectées dans l'oreille moyenne contiennent une composante hydrogel qui leur confère une certaine viscosité. Le terme « hydrogel » illustre une dualité structurelle : « hydro- », du grec *hûdôr*, signifiant eau, et « gel », issu du latin *gélŭ* (froid, glace), désignant à l'origine une substance figée, puis par extension, un réseau polymérique capable d'immobiliser de l'eau [125]. Les hydrogels constituent ainsi une classe spécifique de matériaux caractérisés par leur capacité à absorber et retenir de grandes quantités d'eau tout en conservant une structure tridimensionnelle stable. Ils se présentent dès lors sous la forme de systèmes semi-solides démontrant une grande souplesse [126]. Ce comportement leur confère des propriétés proches de celles de la matrice extracellulaire et favorise dès lors leur intégration dans des environnements biologiques. Leur capacité à laisser diffuser des molécules actives au sein de leur réseau polymérique les rend particulièrement adaptés aux applications nécessitant des échanges contrôlés avec leur environnement [127].

Les hydrogels sont aujourd'hui utilisés dans de nombreux secteurs, notamment les industries biomédicale et pharmaceutique, où ils sont employés comme systèmes de délivrance de principes actifs, dispositifs de cicatrisation (pansements) ou matrices pour l'ingénierie tissulaire, mais également dans les industries cosmétique, agroalimentaire et agricole [126,127]. Leur polyvalence repose sur leur capacité à combiner des propriétés physiques modulables et une forte compatibilité avec les milieux aqueux, faisant d'eux des matériaux clés dans le développement de technologies innovantes.

III.1. L'intérêt des systèmes gélifiés pour la voie transtympanique

L'utilisation de systèmes gélifiés pour l'administration TT a émergé comme une stratégie particulièrement intéressante pour améliorer la rétention locale des formulations thérapeutiques dans l'oreille moyenne et favoriser leur transfert vers l'oreille interne [128,129].

En effet, la voie TT présente plusieurs contraintes physiologiques, parmi lesquelles la clairance rapide des formulations liquides administrées dans l'oreille moyenne. Après injection, les solutions et suspensions aqueuses sont progressivement drainées vers la trompe d'Eustache, ce qui réduit leur temps de résidence dans la cavité tympanique et limite leur durée de contact avec la RWM, principale voie d'accès vers la cochlée (Figure 14A) [124,128].

INTRODUCTION

Dans ce contexte, les hydrogels constituent une stratégie particulièrement intéressante pour améliorer la délivrance cochléaire des principes actifs. Grâce à leurs propriétés viscoélastiques et, dans certains cas, mucoadhésives, ils permettent de limiter l'écoulement de la formulation vers la trompe d'Eustache et de maintenir les molécules thérapeutiques ou les nanoparticules, telles que les liposomes, à proximité de la RWM pendant une durée prolongée. Cette augmentation du temps de résidence favorise les échanges au niveau de la membrane et peut améliorer le transfert des principes actifs vers la cochlée. De plus, la structure tridimensionnelle du réseau polymérique permet de contrôler la diffusion des molécules incorporées, contribuant ainsi à prolonger leur libération et à maintenir une exposition thérapeutique plus durable [92,124,128].

Cette rétention locale prolongée constitue un avantage majeur par rapport aux formulations liquides conventionnelles, rapidement éliminées après administration. En augmentant la durée de contact avec la RWM, les hydrogels sont susceptibles d'améliorer l'efficacité thérapeutique tout en réduisant potentiellement la fréquence des administrations nécessaires. Ils contribuent ainsi à limiter l'invasivité du traitement et à améliorer le confort du patient [124,128].

Par ailleurs, bien qu'un temps de résidence prolongé soit recherché, l'hydrogel doit rester biodégradable afin de ne pas perturber durablement la transmission sonore au sein de l'oreille moyenne. La plupart des hydrogels étudiés pour cette application ont démontré une bonne biocompatibilité, souvent liée à leur caractère hydrophile et à l'utilisation de polymères d'origine naturelle ou synthétique bien tolérés, tels que l'alginate, le chitosane, le PEG ou l'acide hyaluronique [117,128].

L'association d'un hydrogel avec des molécules thérapeutiques ou des systèmes nanoparticulaires doit néanmoins être soigneusement optimisée afin de garantir la sécurité de l'administration. En particulier, la formulation finale doit présenter un pH proche des conditions physiologiques ainsi qu'une osmolalité voisine de celle de la périlymphe (environ 286 mOsm/kg), afin d'éviter toute perturbation des équilibres hydriques de l'oreille interne susceptible d'entraîner une fuite de périlymphe ou d'altérer la fonction cochléaire [117].

Cependant, l'utilisation d'hydrogels préformés présente certaines limitations. Leur viscosité élevée avant administration peut compliquer leur injection à travers une aiguille fine et rendre leur manipulation plus délicate en pratique clinique [124,130]. De plus, leur capacité à épouser la géométrie complexe de la cavité de l'oreille moyenne demeure limitée, ce qui peut influencer leur répartition locale ainsi que leur contact effectif avec la RWM (Figure 14B).

INTRODUCTION

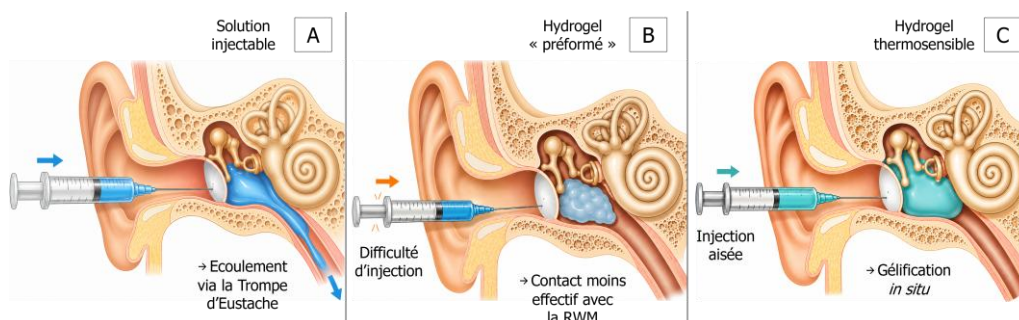


Figure 14 : Injection par voie TT d'une formulation thérapeutique dans la cavité de l'oreille moyenne afin d'atteindre la RWM. (A) Ecoulement d'une solution/suspension injectable par la Trompe d'Eustache. (B) Difficulté d'injection d'un hydrogel visqueux et contact sous-optimal avec la RWM. (C) Injection facilitée d'un hydrogel thermosensible, liquide à température ambiante, et gélification in situ à température physiologique (37°C). Figure partiellement réalisée à l'aide de ChatGPT.

Certains systèmes thermosensibles présentent l'avantage de passer d'un état liquide à température ambiante à un état gélifié à température physiologique (37°C). Cette propriété favorise ainsi une administration aisée à travers l'aiguille de la seringue d'injection à température ambiante et une rétention prolongée au site d'injection grâce à la gélification à la température physiologique (Figure 14C). Cette transition présente également un intérêt majeur : lors des premiers instants suivant l'administration dans l'oreille moyenne, la formulation demeure à l'état liquide, ce qui favorise sa diffusion au sein de la cavité et lui permet d'en épouser la morphologie. La gélification rapide améliore ensuite l'adhésion du système à la muqueuse de l'oreille moyenne et limite le drainage, augmentant ainsi le temps de résidence au niveau de la RWM afin de maximiser l'efficacité thérapeutique [45,124,128].

III.2. Les hydrogels thermosensibles

Les hydrogels thermosensibles constituent une classe particulière de biomatériaux intelligents capables de modifier leurs propriétés physico-chimiques en réponse à une variation de température. Leur caractéristique principale réside dans leur transition de phase réversible, qui se traduit généralement par un passage d'un état liquide à un état gélifié lorsque la température atteint une valeur critique : la température de transition sol-gel [131–134]. Cette propriété confère aux hydrogels thermosensibles un intérêt considérable dans le domaine biomédical, puisqu'ils permettent une administration aisée et une gélification en conditions physiologiques.

Diverses propriétés de ces hydrogels thermosensibles, telles que leurs propriétés mécaniques, leur vitesse de dégradation ainsi que leur cinétique de libération des molécules actives, sont

influencées par la composition du réseau polymérique, ce qui permet d'adapter leurs performances à différentes applications. Ils sont généralement constitués de poloxamères, d'associations de chitosane et de β -glycérophosphate, de poly(N-isopropylacrylamide) (pNIPAAm), ou de copolymères à blocs de PEG et de polyesters tels que le poly(acide lactique) (PLA), le poly(acide lactique-co-acide glycolique) (PLGA) ou le poly(ϵ -caprolactone) (PCL) [135,136]. Les hydrogels à base de chitosane et de β -glycérophosphate sont biodégradables et biocompatibles. Ils associent les propriétés bioadhésives et l'activité antimicrobienne du chitosane à la thermosensibilité conférée par le β -glycérophosphate. Grâce à ces caractéristiques, ils sont particulièrement étudiés pour des applications en ingénierie tissulaire et en délivrance contrôlée de principes actifs [137–139]. Le pNIPAAm est un polymère thermosensible étudié en raison de sa température sol-gel proche de la température corporelle ($\sim 32^\circ\text{C}$). Toutefois, son absence de biodégradabilité et les interrogations concernant sa biocompatibilité à long terme limitent son utilisation clinique [140,141]. Les copolymères à blocs PEG-polyester sont également largement utilisés en recherche. Leur caractère amphiphile, résultant de l'association d'un segment hydrophile (PEG) et d'un segment hydrophobe (PLA, PLGA ou PCL), permet une gélification par autoassemblage en structures micellaires. Ces matériaux présentent une excellente biocompatibilité, une biodégradabilité relativement contrôlée, ainsi que des propriétés mécaniques modulables. En ajustant la nature des polyesters, leur masse molaire ou le rapport PEG/polyester, il est possible de contrôler la température sol-gel, la vitesse de dégradation et la cinétique de libération des molécules thérapeutiques, ce qui explique leur intérêt croissant pour la délivrance contrôlée de principes actifs. En revanche, leur synthèse est complexe et coûteuse [42,141]. Enfin, les hydrogels à base de poloxamères constituent aujourd'hui l'une des familles les plus étudiées en raison de leur excellente biocompatibilité, de leur capacité à subir une transition sol-gel réversible à des températures proches des conditions physiologiques et de leur élimination aisée [128,142].

III.2.1. Les hydrogels thermosensibles à base de poloxamères

III.2.1.1. La nature et la structure du réseau polymérique

Sur le plan moléculaire, les hydrogels sont constitués de monomères polymérisés en de longues chaînes macromoléculaires, elles-mêmes organisées en un réseau tridimensionnel [143]. Les poloxamères, également connus sous le nom commercial de Pluronic[®], sont des macromolécules non ioniques synthétiques appartenant à la classe des copolymères triblocs. Ils sont composés

INTRODUCTION

d'une séquence centrale hydrophobe de poly(propylène oxyde) (PPO), encadrée par deux blocs hydrophiles de poly(éthylène oxyde) (PEO), selon la structure générale PEO-PPO-PEO (Figure 15) [126,144,145]. La variation de la longueur relative de ces blocs permet d'obtenir une large gamme de poloxamères présentant des propriétés physico-chimiques variées, notamment en termes de solubilité, de viscosité, de comportement micellaire et d'interactions avec les milieux biologiques [131,146].

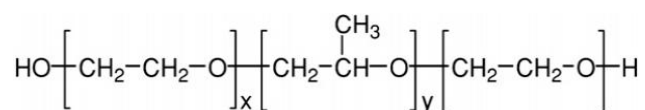


Figure 15 : Structure chimique du poly(oxyde d'éthylène-co-oxyde de propylène-co-oxyde d'éthylène) (PEO-PPO-PEO), également appelé poloxamère (Pluronic®) [136].

La nomenclature des Pluronic® repose sur une classification comprenant une lettre (L, P ou F), indiquant respectivement des formulations liquides, pâteuses ou solides, suivie de deux ou trois chiffres. Le ou les deux premiers chiffres, multipliés par 300, correspondent approximativement à la masse molaire du bloc PPO, tandis que le dernier chiffre multiplié par 10 indique le pourcentage massique de PEO dans le copolymère. La nomenclature des poloxamères diffère légèrement. Elle ne contient pas de lettre relative à l'état du composé, les deux premiers chiffres multipliés par 100 donnent la masse molaire approximative du bloc PPO, et le dernier chiffre multiplié par 10 indique le pourcentage massique de PEO [131,132,146].

Grâce à leur structure amphiphile, les poloxamères possèdent la capacité de s'autoassembler en solution aqueuse pour former des micelles, généralement de 10 à 100 nm, lorsque certaines conditions de concentration polymérique et de température sont atteintes, appelées respectivement la concentration micellaire critique (CMC) et la température micellaire critique (TMC). Dans ces structures thermosensibles, le cœur hydrophobe constitué de PPO peut véhiculer des molécules lipophiles, tandis que les chaînes hydrophiles de PEO assurent la stabilisation de l'ensemble dans le milieu aqueux. Cette propriété est particulièrement intéressante pour améliorer la solubilité aqueuse, la stabilité et la biodisponibilité de molécules actives hydrophobes [128,131,146]. Lorsque la température augmente au-delà de la température sol-gel, ces micelles s'organisent en un réseau tridimensionnel gélifié. Cette réticulation physique repose sur des interactions non covalentes réversibles, telles que les liaisons hydrogène, les interactions hydrophobes ou encore les forces de Van der Waals. Bien que la nature physique et réversible de ces interactions soit particulièrement avantageuse pour les formulations injectables en permettant une réticulation *in situ*, elle limite également les propriétés mécaniques et la stabilité

du gel [126,144,145]. Le développement de ces systèmes de délivrance contrôlée de principes actifs pour l'administration TT implique généralement l'usage de Poloxamer 188 ou de Poloxamer 407 [131,146].

III.2.1.2. Le Poloxamer 407

Le Poloxamer 407 (P407), ou Pluronic® F127, est l'un des représentants les plus étudiés de cette famille en raison de ses propriétés thermosensibles remarquables. D'après les règles de nomenclature exposées à la section III.2.1.1 (page 48), son appellation Pluronic® indique qu'il se présente sous forme de flocons solides (Pluronic® **F127**), que la masse molaire du bloc PPO est d'environ 3600 Da (Pluronic® **F127** : 12 x 300) et que le pourcentage massique de PEO est de 70% (Pluronic® **F127** : 7 x 10). En comparaison, la nomenclature des poloxamères indique une masse molaire du bloc PPO d'environ 4000 Da (Poloxamer **407** : 40 x 100) ainsi qu'un pourcentage massique de PEO de 70% (Poloxamer **407** : 7 x 10). Globalement, ce polymère présente donc un ratio PEO/PPO élevé (~70/30) pour une masse molaire totale d'environ 12 600 Da. Grâce à son caractère amphiphile, il permet la formation de micelles d'environ 25 nm de diamètre lorsque sa concentration est supérieure à la CMC. Celle-ci est estimée à 0,7% et 0,025% (m/v) à 25°C et 35°C respectivement [132,133].

Cette proportion élevée de PEO confère au P407 une bonne solubilité aqueuse et une capacité de gélification marquée dans une plage de températures compatibles avec la physiologie humaine (environ 25-37°C). La possibilité d'ajuster finement la température de gélification en fonction de la concentration en P407 en fait un excipient polyvalent. Cette propriété est d'ailleurs exploitée dans le cadre de l'administration TT, car elle permet de concevoir des formulations qui restent liquides à température ambiante et sont donc facilement injectables dans la cavité de l'oreille moyenne, avant de gélifier *in situ* à la température physiologique. Grâce à leurs propriétés physico-chimiques, les hydrogels de P407 favorisent l'adhésion à la muqueuse de l'oreille moyenne et prolongent le temps de contact de la molécule active avec la RWM, limitant ainsi sa clairance par la trompe d'Eustache et facilitant la vectorisation des molécules actives vers l'oreille interne [132,134].

Malgré ces nombreux avantages, le P407 présente également certaines limitations. Les poloxamères ne forment des hydrogels qu'à des concentrations polymériques relativement élevées (minimum 15% m/v), ce qui nécessite une évaluation rigoureuse de leur innocuité, bien qu'ils soient généralement reconnus biocompatibles [131,132,147]. De plus, les hydrogels

obtenus présentent une résistance mécanique limitée en raison de leur structure micellaire physiquement réticulée. Ils permettent généralement une diffusion relativement aisée des molécules incorporées, ce qui peut conduire à une cinétique de libération insuffisamment contrôlée [132,146]. Après administration sur les muqueuses, la dilution progressive du réseau gélifié par les fluides biologiques peut entraîner son érosion, voire sa liquéfaction, réduisant ainsi le temps de contact avec les tissus cibles. Cette sensibilité à l'érosion constitue une limitation importante pour les applications topiques sur des muqueuses, car elle peut compromettre le maintien d'une libération prolongée du principe actif. Cette propriété peut toutefois être mise à profit afin de favoriser l'élimination progressive de la formulation après administration et d'éviter une persistance excessive du polymère au site d'application [132,146,148].

III.2.1.3. Les propriétés fonctionnelles

Les hydrogels à base de P407 présentent un ensemble de propriétés directement liées à leur structure tridimensionnelle réticulée et à leur forte teneur en eau. Le caractère biomimétique, les propriétés rhéologiques et mécaniques, ainsi que la perméabilité aux solutés sont trois caractéristiques expliquant leur intérêt pour une administration TT de molécules actives.

III.2.1.3.1. Le caractère biomimétique

La forte teneur en eau et la souplesse des hydrogels de P407, leur confèrent des propriétés proches de celles des tissus mous. L'utilisation de ce type de formulation réduit donc les risques d'irritation ou de réponse inflammatoire au contact des muqueuses, ce qui explique leur meilleure tolérance par rapport à d'autres systèmes. Bien que la biodégradabilité de la formulation ne puisse être obtenue, une élimination naturelle par érosion puis écoulement par la trompe d'Eustache est progressivement observée *in vivo* [148]. Par ailleurs, la propriété de mucoadhésion de l'hydrogel de P407 favorise son ancrage sur des surfaces biologiques, telles que la RWM [134]. Elle améliore ainsi l'efficacité thérapeutique grâce à une plus grande proximité avec la cochlée et à un temps de résidence prolongé des principes actifs avec la membrane [149].

III.2.1.3.2. Les propriétés rhéologiques et mécaniques

La dispersion colloïdale de P407 présente un comportement rhéologique qui évolue d'un régime newtonien à un régime pseudoplastique en fonction de sa concentration polymérique et de la température. En-dessous de sa température de transition sol-gel et à faible concentration en

P407 (13-19% m/v), il se comporte comme un fluide newtonien, ce qui facilite son injection par voie TT [131,134]. En revanche, au-delà de sa température de transition sol-gel, il adopte un comportement viscoélastique pseudoplastique, aussi appelé rhéofluidifiant [131]. À l'état gélifié, le P407 combine ainsi des propriétés visqueuses et élastiques, respectivement associées à ses composantes liquides et solides. Un équilibre approprié entre celles-ci lui permet de supporter de faibles déformations induites par les mouvements tissulaires *in vivo* sans altération majeure de son intégrité structurale. Son profil pseudoplastique implique toutefois qu'une contrainte mécanique importante risque de diminuer sa viscosité et d'entraîner son écoulement. En effet, en tant que réseau physiquement réticulé, l'hydrogel de P407 est souple et légèrement déformable, mais aussi mécaniquement moins résistant. Par ailleurs, l'élasticité et la flexibilité de l'hydrogel de P407 jouent un rôle important dans sa capacité à épouser la morphologie de surfaces anatomiques irrégulières, telles que la cavité de l'oreille moyenne ou la RWM [149,150].

III.2.1.3.3. La perméabilité aux solutés

La libération de molécules actives à partir d'un hydrogel de P407 est gouvernée par deux mécanismes : la diffusion et l'érosion [148].

La diffusion des molécules actives (Figure 16) dépend principalement de leurs propriétés physico-chimiques ainsi que de la structure du réseau micellaire. Une densité et un diamètre micellaire élevés favorisent le chevauchement des couronnes hydrophiles de PEO et réduisent l'espace aqueux entre les micelles, limitant ainsi la diffusion des molécules actives à travers le réseau. À l'inverse, un réseau micellaire moins dense, présentant un espacement inter-micellaire plus important, offre des voies de diffusion aqueuses qui facilitent leur libération. Les interactions entre les molécules actives et les domaines hydrophiles ou hydrophobes des micelles, telles que les interactions électrostatiques, hydrophobes ou les liaisons hydrogène, influencent également leur mobilité au sein du gel. Ainsi, les petites molécules hydrophiles, qui diffusent principalement dans les couronnes de PEO et les espaces inter-micellaires, sont facilement libérées du réseau polymérique [148]. Leur diffusion est ainsi régie par la seconde loi de Fick (Équation 4), qui décrit l'évolution temporelle de la concentration du principe actif au sein de l'hydrogel en fonction de l'épaisseur de matrice à traverser, du gradient de concentration du principe actif entre l'hydrogel et le milieu extérieur, ainsi que de son coefficient de diffusion, lui-même déterminé par l'équation de Stokes–Einstein (Équation 5) [127,151,152].

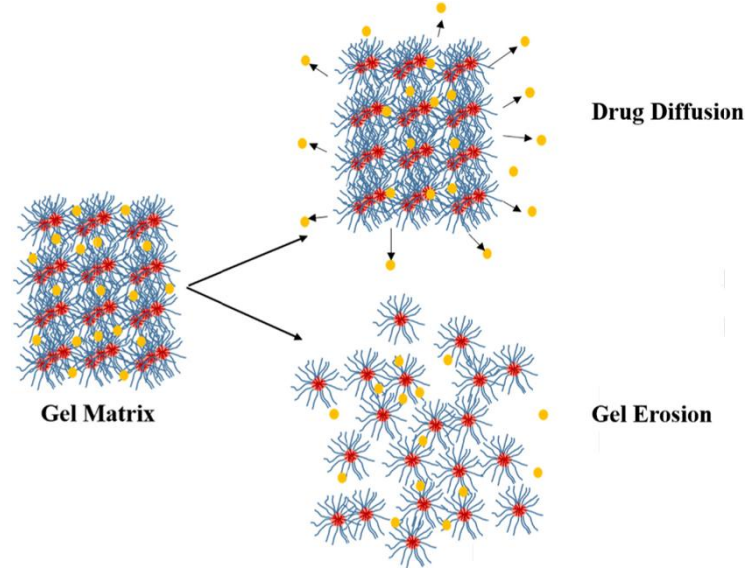


Figure 16 : Représentation des mécanismes de diffusion et d'érosion gouvernant la libération de molécules actives (sphères jaunes) à partir d'un hydrogel de P407 (monomères PEO en bleu et PPO en rouge) [148].

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \left(\frac{\partial^2 C}{\partial x^2} \right)$$

Équation 4 : Seconde loi de Fick régissant l'évolution temporelle de la concentration d'un principe actif au sein d'un hydrogel. $\partial C/\partial t$ est la variation de concentration au cours du temps ($\text{mol.m}^{-3}.\text{s}^{-1}$), D est le coefficient de diffusion ($\text{m}^2.\text{s}^{-1}$), $\partial^2 C/\partial x^2$ est la variation spatiale du gradient de concentration (mol.m^{-5}) [151].

$$D = \frac{R T}{6 \pi \eta r}$$

Équation 5 : Équation de Stokes-Einstein établissant le coefficient de diffusion d'un principe actif. D est le coefficient de diffusion ($\text{m}^2.\text{s}^{-1}$), R est la constante des gaz parfaits ($\text{kg.m}^2.\text{s}^{-2}.\text{mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$), T est la température absolue (K), η est la viscosité dynamique de la solution ($\text{kg.m}^{-1}.\text{s}^{-1}$), et r est le rayon de la molécule active (m) [152].

En revanche, les molécules hydrophiles dont la taille excède celle des espaces inter-micellaires présentent une diffusion plus limitée. De même, les molécules hydrophobes, qui s'associent préférentiellement aux cœurs micellaires de PPO, diffusent plus difficilement vers le milieu extérieur en raison de leur faible affinité pour la phase aqueuse et les couronnes hydrophiles de PEO [148]. Bien que certaines études rapportent des résultats divergents quant au mécanisme impliqué, leur libération semblerait principalement gouvernée par un mécanisme d'érosion [153–155]. En effet, lorsqu'un hydrogel est exposé à un milieu aqueux, la dilution progressive de sa

surface peut entraîner le désassemblage des micelles superficielles, conduisant à l'érosion du réseau et à la libération des principes actifs qui y sont retenus. Ce mécanisme prédomine notamment pour les molécules de haut poids moléculaire, les molécules fortement hydrophobes ou les réseaux polymériques présentant de faibles propriétés mécaniques. L'érosion est par ailleurs d'autant plus importante que le volume de milieu aqueux entourant le réseau polymérique est élevé [148,149,153].

La cinétique de libération des molécules actives à partir d'un hydrogel de P407 résulte ainsi de la combinaison de mécanismes de diffusion et d'érosion, qui permettent tous deux d'obtenir une libération prolongée. Toutefois, selon les propriétés physico-chimiques du principe actif et celles du réseau polymérique, l'un de ces mécanismes peut devenir prédominant [148]. Les propriétés de la matrice gélifiée doivent donc être soigneusement ajustées afin de concevoir un système performant de délivrance contrôlée des principes actifs [152].

III.2.2. Les méthodes d'évaluation des hydrogels

La dispersion colloïdale de P407 doit être capable de gélifier rapidement après son administration sous forme liquide par voie TT dans l'oreille moyenne. Cette capacité est évaluée à travers deux caractéristiques spécifiques des hydrogels thermosensibles, directement liées à leur structure amphiphile : la température de transition sol-gel et le temps de gélification.

III.2.2.1. La température de transition sol-gel

La température sol-gel correspond à la température à laquelle la dispersion colloïdale de P407 effectue la transition entre l'état de solution et celui de gel. À faible température, les chaînes polymériques sont majoritairement dispersées sous forme d'unimères hydratés (Figure 17). La solution polymérique présente alors le comportement d'un fluide newtonien. Lorsque la température augmente, la déshydratation progressive des segments PPO accentue les interactions hydrophobes, entraînant la formation de structures micellaires sphériques dans lesquelles le bloc PPO constitue le cœur hydrophobe tandis que le bloc PEO forme la couronne hydrophile. Ce processus de micellisation est gouverné par deux seuils caractéristiques : la CMC et la TMC. La formation des micelles induit une légère augmentation de la viscosité, mais la formulation conserve un comportement fluide. Lorsque la température augmente encore, la déshydratation favorise davantage les interactions hydrophobes entre micelles, conduisant à la réorganisation de celles-ci en un réseau tridimensionnel structuré. Ce phénomène aboutit à la

INTRODUCTION

transition sol-gel, à l'origine du comportement thermosensible des solutions de poloxamères. À ce stade, le système présente les propriétés d'un gel rhéofluidifiant. Lorsque la température augmente bien au-delà de la température sol-gel, la couronne hydrophile de PEO se contracte en raison d'une déshydratation excessive, entraînant l'effondrement de la structure gélifiée. Par ailleurs, lorsque la température d'un hydrogel gélifié diminue, les interactions hydrophobes s'atténuent et le système retrouve un état liquide, démontrant ainsi le caractère thermoréversible des hydrogels de P407 [131–134].

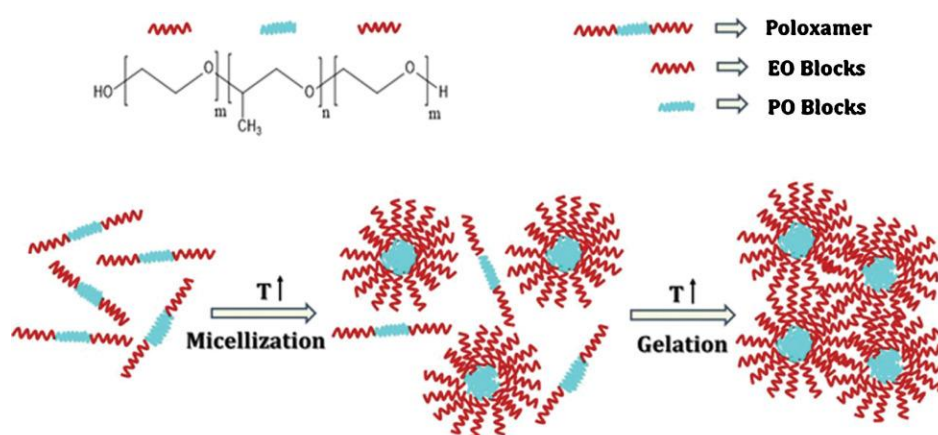


Figure 17 : Mécanisme de gélification des solutions de poloxamères en deux étapes : la formation initiale de micelles polymériques imposant une élévation modérée de la viscosité, puis l'organisation des micelles en un réseau structuré qui provoque la gélification [131].

Une augmentation de la concentration en polymère entraîne généralement une diminution de la TMC. La concentration en polymère doit ainsi être optimisée afin d'éviter une gélification précoce lors de la manipulation du traitement, ou une gélification insuffisante *in situ* qui entrainerait un écoulement et une diminution de l'efficacité thérapeutique.

La température sol-gel peut être déterminée à l'aide de différents protocoles non standardisés accessibles à tous les laboratoires, notamment les méthodes du « tube microcapillaire en verre » et du « barreau magnétique ». La première consiste à refroidir progressivement un capillaire contenant un échantillon préalablement gélifié jusqu'à observer sa liquéfaction, permettant ainsi d'identifier la température de transition gel-sol. La seconde repose sur l'exposition d'une solution polymérique à des températures croissantes et sur la détermination de la température sol-gel à partir du ralentissement, puis de l'arrêt, du barreau magnétique agitant la solution. Enfin, des mesures rhéologiques en oscillation permettent d'obtenir des résultats standardisés, bien que

cette technique soit plus coûteuse et moins accessible. Dans cette mesure, le module de stockage (G') et le module de perte (G'') reflètent respectivement les composantes élastique (solide) et visqueuse (liquide) des hydrogels. La température de transition sol-gel correspond donc à la température à laquelle les modules G' et G'' sont équivalents, reflétant des propriétés élastiques et visqueuses similaires [132,134].

III.2.2.2. Le temps de gélification

Le temps de gélification, ou temps de gel, correspond au temps nécessaire à la gélification complète de la solution polymérique à une température donnée, généralement de 37°C pour les applications biomédicales. Ce temps ne doit pas être trop court afin d'assurer une administration fluide sans gélification prématurée, favorisant ainsi une bonne adhésion aux tissus. À l'inverse, il ne doit pas être trop long afin d'éviter l'écoulement et l'élimination involontaire de la formulation via la trompe d'Eustache.

Plusieurs méthodes permettent de déterminer le temps de gel. La méthode « d'inversion du vial » consiste à plonger un vial contenant la solution polymérique dans un bain maintenu à température physiologique, puis à le retourner à intervalles réguliers afin de déterminer visuellement le temps à partir duquel l'absence d'écoulement pendant 60 secondes traduit la formation d'un réseau gélifié [156]. Cette méthode est toutefois peu standardisée et peut conduire à une variabilité inter-laboratoires importante, notamment en raison de l'influence du type de vial et du volume d'échantillon utilisés. À l'inverse, une analyse rhéologique permet d'obtenir des résultats plus standardisés. Le temps de gel est alors défini comme le temps nécessaire pour que le module de stockage G' devienne supérieur au module de perte G'' à une température définie. Il correspond ainsi au point d'intersection des courbes des modules G' et G'' (Figure 18) [132,134,157].

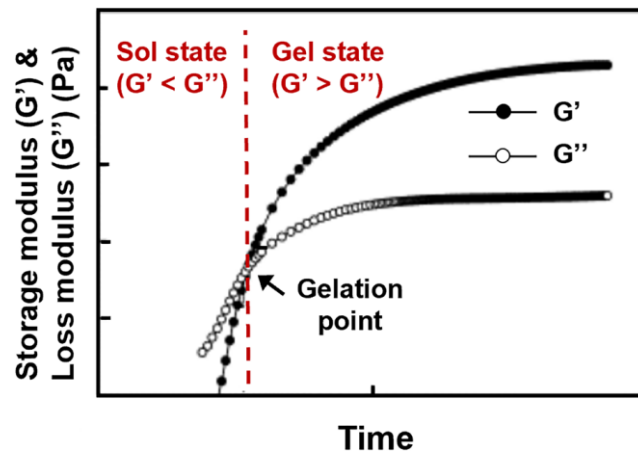


Figure 18 : Caractérisation rhéologique en oscillation du temps nécessaire à la transition entre les états de solution et de gel de solutions de poloxamères. Le module de stockage G' est associé au comportement élastique (solide) de l'hydrogel, tandis que le module de perte G'' est associé au comportement visqueux (liquide) de la formulation [157].

IV. Les modèles expérimentaux de la membrane de la fenêtre ronde et le développement de systèmes *in vitro* alternatifs

Les formulations thérapeutiques développées pour le traitement des surdités neurosensorielles reposent généralement sur l'association d'un hydrogel et d'un vecteur nanoparticulaire encapsulant un principe actif [92–94]. Il convient dès lors d'évaluer la capacité de ce système à traverser la RWM afin d'atteindre les cellules ciliées cochléaires. Ce type d'étude peut être réalisée au moyen de différents modèles expérimentaux.

À l'heure actuelle, la majorité des travaux s'appuie sur des modèles animaux, principalement le cobaye et la souris, car les études *in vivo* permettent d'évaluer directement l'efficacité de ces thérapies, notamment par la mesure des réponses auditives après stimulation sonore [158]. En parallèle, des modèles *ex vivo* ont été développés afin d'étudier plus spécifiquement la capacité des formulations thérapeutiques à franchir la RWM pour atteindre les compartiments de la cochlée [159]. Les modèles *in vitro* demeurent encore peu représentés dans ce domaine, alors même qu'ils pourraient constituer un outil rapide, standardisé et moins contraignant, car ne nécessitant pas le recours à l'expérimentation animale, pour le *screening* initial des traitements [160].

Aujourd'hui, la diversité des modèles (*in vivo*, *ex vivo* ou *in vitro*), des protocoles expérimentaux et des critères d'évaluation rapportés dans la littérature rend les comparaisons difficiles. Dans ce contexte, il apparaît donc essentiel de dresser un état des lieux des modèles actuellement employés dans les études impliquant la RWM, ainsi que de leurs avantages et limites respectifs.

Ce chapitre a fait l'objet d'un article de revue, intitulé « Experimental models for investigating drug transport across the round window membrane: implications for inner ear drug delivery and sensorineural hearing loss therapy », soumis en juillet 2026 dans *Drug Delivery and Translational Research* (Ed. Springer).

IV.1. Résumé de l'article de revue

De nombreuses études ont été menées sur des modèles *in vivo* et *ex vivo* afin d'évaluer la perméabilité de la RWM à différents principes actifs ou systèmes nanoparticulaires. Pour ces études, le choix du modèle animal est crucial, puisque l'espèce sélectionnée possède une RWM présentant des caractéristiques de surface et d'épaisseur qui lui sont propres, impactant ainsi les résultats de perméabilité, et donc la transférabilité à l'homme. Ainsi, des grands animaux, tels

INTRODUCTION

que le porc ou le mouton, ont été proposés en raison de la similarité structurelle de leurs cochlées avec celle de l'homme. L'anatomie de la RWM a d'ailleurs été largement détaillée afin d'en comprendre les limites.

Les modèles *in vivo* présentent plusieurs inconvénients. En effet, après administration d'un principe actif, les prélèvements de périlymphe réalisés ne reflètent pas uniquement la pénétration de la molécule dans la cochlée, mais également la diminution de sa concentration liée à sa métabolisation. De plus, le dépôt de la formulation dans la cavité de l'oreille moyenne n'entraîne pas un passage exclusif à travers la RWM, mais également via l'OWM, dissimulée derrière l'étrier ossiculaire. Enfin, la position de l'animal durant la période de récupération post-administration est déterminante pour prolonger le temps de contact entre la formulation et la RWM, et ainsi maximiser le passage vers la cochlée. Par ailleurs, le recours à des modèles animaux pour le *screening* préclinique de formulations thérapeutiques soulève d'importantes considérations éthiques.

Le développement de modèles *ex vivo* s'est largement répandu afin de s'affranchir des limites biologiques des modèles *in vivo*. L'extraction des RWM, compte tenu de leur petite taille, est cependant extrêmement fastidieuse et risquée pour l'intégrité du tissu. Contrairement aux RWM des rongeurs, les RWM porcines ou humaines présentent des surfaces membranaires plus grandes, ce qui facilite leur extraction et leur manipulation [161,162]. Lors de leur montage sur un support de type Transwell®, l'absence de fuites et l'intégrité membranaire doivent donc être rigoureusement contrôlées, par exemple grâce à des traceurs colorés ou à la mesure de la résistance électrique transépithéliale (TEER) [163]. Ce type de système permet ensuite le dépôt d'un principe actif sur la face externe de la RWM afin d'évaluer sa pénétration cochléaire, tout en évitant les facteurs biologiques confondants, tels que les variations de concentration périlymphatique liées au métabolisme *in vivo*, à la contamination du prélèvement par le liquide cérébrospinal, ou encore à la variabilité de distribution du principe actif au sein des différentes sections cochléaires. La perméabilité membranaire à diverses molécules actives, telles que la DSP, le chlorhydrate de ciprofloxacine ou la dexaméthasone [159,161], et nanoparticules, telles que des nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques (SPIONs) ou des AAVs [163–165], a ainsi été étudiée. Les perméabilités d'explants de RWM obtenus à différents stades de vie du modèle animal peuvent également être comparées grâce à ce type de dispositif. En revanche, la préservation des tissus après extraction reste délicate. Les données actuelles suggèrent que les cycles de congélation/décongélation des tissus modifient leur perméabilité [161]. Ils ne seraient

INTRODUCTION

donc plus fiables pour des études ultérieures. Seuls les tissus frais placés en culture semblent adaptés, bien que ces derniers ne présentent qu'une viabilité limitée à 3-5 jours [159].

Quelques modèles *in vitro* de RWM ont récemment été développés et présentent un fort potentiel pour le *screening* et les études mécanistiques, tout en réduisant le recours aux modèles animaux. Cependant, aucun consensus n'existe actuellement quant à la définition d'une structure *in vitro* standardisée utilisable par l'ensemble de la communauté scientifique. Certaines études décrivent un modèle à trois couches [166,167], tandis que d'autres ne reproduisent que la couche externe, considérée comme la principale barrière limitant le passage vers l'oreille interne [160,168]. Les lignées cellulaires utilisées comprennent notamment des cellules épithéliales pulmonaires (ex. lignée hSAEC), rénales (ex. lignée MDCK) ou cutanées (ex. lignée HaCaT), choisies pour leur capacité à former un épithélium doté de jonctions serrées, et sont parfois accompagnées de fibroblastes humains ou de collagène, représentant la couche moyenne de la RWM. Les membranes générées *in vitro* semblent toutefois différer en termes d'épaisseur par rapport aux membranes physiologiques, ce qui pourrait impacter leur perméabilité. Ainsi, un modèle basé sur la lignée hSAEC, ne modélisant que la couche externe de la RWM, présente une perméabilité à la DSP et au chlorhydrate de ciprofloxacine de 241×10^{-9} m/s et 212×10^{-9} m/s, respectivement, contre 40×10^{-9} m/s et $23,3 \times 10^{-9}$ m/s avec le modèle *ex vivo* de RWM humaine. Globalement, bien qu'ils ne soient pas directement corrélables, les résultats obtenus avec les modèles *in vitro* se rapprochent de ceux rapportés pour les modèles *in vivo* et *ex vivo*, représentant ainsi une avancée majeure pour la recherche sur l'oreille interne tout en limitant l'utilisation d'animaux, bien qu'une optimisation importante reste encore nécessaire.

De nouvelles stratégies visant à perméabiliser transitoirement la RWM ont également été explorées afin de faciliter la pénétration d'agents thérapeutiques dans la cochlée. Elles reposent sur l'utilisation concomitante d'un agent perméabilisant, tel que l'histamine, le caprate de sodium ou la saponine, et de la molécule thérapeutique d'intérêt. Ces études, tous modèles confondus, ont notamment été rendues possibles grâce à diverses méthodes analytiques et histologiques permettant à la fois la quantification des principes actifs dans les fluides et tissus de l'oreille interne, ainsi que la visualisation de leur biodistribution au sein des différentes coupes cochléaires.

IV.2. Publication

Experimental models for investigating drug transport across the round window membrane: implications for inner ear drug delivery and sensorineural hearing loss therapy

Chloé Gauthy^a, Valentin Tallandier^b, Nicholas Cole^b, Brigitte Evrard^a, Géraldine Piel^a, Brigitte Malgrange^{b, *}

^a Laboratory of Pharmaceutical Technology and Biopharmacy, CIRM, University of Liège, Liège, Belgium

^b Developmental Neurobiology Laboratory, GIGA-Stem cells, University of Liège, Liège, Belgium

* Corresponding author: Brigitte Malgrange (bmalgrange@uliege.be)

Article soumis en juillet 2026 dans *Drug Delivery and Translational Research* (Ed. Springer)

KEYWORDS

Round Window Membrane, Experimental model, Drug transport study, Sensorineural Hearing Loss

ABSTRACT

The development of effective therapies for inner ear disorders, particularly sensorineural hearing loss (SNHL), requires robust experimental models that accurately evaluate drug delivery systems and therapeutic agents. The round window membrane (RWM) represents the principal anatomical gateway for transtympanic (TT) drug administration to the inner ear and therefore plays a critical role in determining therapeutic efficacy. This review provides a comprehensive overview of the anatomical and physiological characteristics of the RWM and critically examines the experimental approaches used to investigate drug permeation across this barrier. *In vivo*, *ex vivo*, and *in vitro* models are compared with respect to their translational relevance, advantages, limitations, and applications. *In vivo* models, particularly those based on guinea pigs and other mammalian species, provide valuable information on pharmacokinetics, biodistribution, and therapeutic outcomes, although their use is limited by biological variability, ethical considerations, and cost. *Ex vivo* systems using animal or human tissues provide a controlled environment that preserves native tissue architecture while minimizing systemic confounding factors. Recent advances in *in vitro* RWM models have enabled mechanistic investigations and high-throughput screening,

thereby supporting the reduction of animal experimentation. In addition, this review summarizes the analytical and imaging methodologies currently employed to quantify drug transport, distribution, and retention within the inner ear. Collectively, these experimental platforms provide complementary insights into RWM permeability and constitute essential tools for the rational design of next-generation othotherapeutic strategies.

IV.2.1. Introduction

Hearing loss represents a major and growing global public health challenge. According to the World Health Organization (WHO), more than 1.5 billion individuals worldwide experience some degree of hearing impairment, and this number is projected to increase substantially over the coming decades [169]. Beyond its impact on auditory function, hearing loss is associated with reduced quality of life, social isolation, anxiety, depression, and accelerated cognitive decline, particularly in older adults [170,171]. Among the different forms of hearing impairment, sensorineural hearing loss (SNHL) is the most prevalent and arises from dysfunction of the auditory sensory pathway. SNHL is typically associated with irreversible damage to cochlear hair cells and/or spiral ganglion neurons and may result from genetic predisposition, aging, viral infections, acoustic trauma, excessive noise exposure, or treatment with ototoxic agents such as platinum-based chemotherapeutics and aminoglycoside antibiotics [172–174]. Consequently, there remains a substantial unmet clinical need for effective pharmacological strategies to prevent, attenuate, or reverse inner ear damage.

Recent progress in auditory biology has identified numerous molecular and cellular pathways involved in cochlear degeneration and hearing loss, opening new avenues for the development of targeted therapeutics [175]. These emerging approaches include anti-inflammatory agents, antioxidants, neuroprotective compounds, gene therapies, and regenerative strategies designed to preserve or restore cochlear function. However, successful clinical translation of these therapies remains strongly dependent on the development of efficient drug delivery approaches. Indeed, the inner ear is protected by highly specialized anatomical and physiological barriers that severely restrict drug access following systemic administration. In particular, the blood–labyrinth barrier (BLB) limits the penetration of therapeutic compounds into cochlear tissues, frequently resulting in subtherapeutic intracochlear concentrations while increasing the risk of systemic adverse effects [176,177].

INTRODUCTION

To overcome these limitations, local drug administration via transtympanic (TT) injection has emerged as one of the most promising strategies for inner ear therapy. This minimally invasive procedure involves delivering therapeutic formulations into the middle ear cavity, from which the compounds may diffuse into the cochlea through the round window membrane (RWM). Compared with systemic administration, TT delivery enables substantially higher local drug concentrations while minimizing systemic exposure [178]. The clinical relevance of this approach has been demonstrated in the management of sudden SNHL, where intratympanic corticosteroid administration has shown favorable therapeutic outcomes and has become an established component of treatment protocols [179–181].

Nevertheless, achieving effective intracochlear drug delivery following TT administration remains challenging. The therapeutic performance of locally administered formulations is largely determined by their ability to remain in contact with the RWM for sufficient periods, resist clearance through the Eustachian tube, and permeate the membrane to reach target tissues within the inner ear [182]. Consequently, considerable research efforts have focused on developing advanced delivery systems that prolong residence time in the middle ear cavity, provide sustained drug release, and enhance transport across the RWM [124,183]. A comprehensive understanding of the factors governing RWM permeability is therefore essential for optimizing local drug delivery strategies and improving therapeutic outcomes in hearing loss.

Over the past two decades, numerous studies have investigated the transport of small molecules, biologics, viral vectors, and nanocarrier-based systems across the RWM. However, interpreting and comparing these studies remains challenging due to substantial differences in experimental models, animal species, analytical methodologies, and formulation characteristics. Furthermore, the mechanisms regulating RWM permeability remain incompletely understood. Although *in vivo* studies have generated valuable insights into drug biodistribution and pharmacokinetics, they are associated with considerable costs, ethical concerns, biological variability, and limited experimental throughput. These limitations have stimulated growing interest in *ex vivo* and *in vitro* approaches that provide more controlled, reproducible, and mechanistically informative platforms for evaluating drug transport across the RWM.

In this context, the objective of the present review is to provide a comprehensive and critical overview of the experimental models currently available for investigating drug transport across the RWM. First, the anatomical and physiological features of the membrane and the physicochemical determinants governing compound permeation are discussed. Subsequently, *in*

vivo, *ex vivo*, and *in vitro* models used to evaluate RWM permeability are critically compared, with particular emphasis on their respective advantages, limitations, and translational relevance. We further review current strategies aimed at modulating membrane permeability and summarize the analytical and imaging techniques used to quantify drug transport, biodistribution, and retention within the inner ear. Finally, we discuss current challenges and future perspectives for the development of predictive, standardized, and clinically relevant models to accelerate the translation of novel therapies for hearing disorders.

IV.2.2. Round window membrane anatomy

The RWM is the principal anatomical interface between the middle and inner ear and the primary route for therapeutics delivered via the TT pathway [6,160]. Anatomically, the RWM occupies the round window niche and separates the middle ear cavity from the cochlear *scala tympani*. Functionally, it serves as a semi-permeable biological barrier that regulates the transport of endogenous molecules, xenobiotics, and therapeutic agents into the inner ear. Consequently, its structural and physiological characteristics are critical determinants of the efficacy of local drug delivery strategies.

The human RWM is a trilaminar structure with a total thickness of approximately 65–70 μm , although substantial interspecies variability has been reported [6,184]. In rodents, for example, the membrane is considerably thinner, with values of approximately 10 μm reported in mice [159]. In addition to species-dependent differences, the membrane exhibits regional heterogeneity, as its central portion is significantly thinner than its peripheral margins [159,185]. This non-uniform architecture likely influences local transport kinetics and may contribute to regional variations in permeability.

Histologically, the RWM is composed of three distinct layers (Figure 19). The outer layer consists of a low cuboidal epithelium interconnected by tight junctions and constitutes the principal barrier to drug transport [57,163,186]. Beneath this epithelial layer lies a connective tissue core composed primarily of collagen fibers, fibroblasts, and elastic fibers, together with blood and lymphatic vessels [6,57]. The innermost layer consists of a thin squamous epithelium facing the *scala tympani* and appears to contribute less to the overall barrier function of the membrane [160]. Beyond its role as a diffusion barrier, the RWM contributes to cochlear homeostasis and pressure regulation [6], highlighting the importance of understanding its structure when developing local drug delivery strategies.

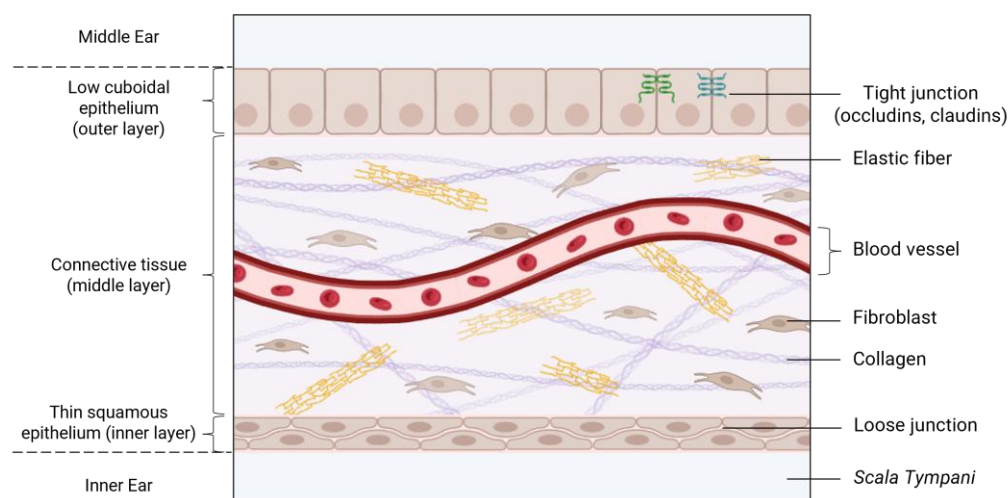


Figure 19: Representation of the three-layers RWM separating the middle from the inner ear. Its overall thickness ranges from 10 μm in mice to 70 μm in humans. This figure was generated using Biorender.com.

IV.2.3. Required properties to cross the RWM

The ability of a therapeutic compound or delivery system to cross the RWM is governed by a complex interplay between physicochemical properties of the administered formulation and the structural characteristics of the membrane itself. Key determinants include molecular size, electrical charge, lipophilicity, concentration gradient, and membrane integrity, all of which directly influence transport efficiency across this biological barrier [163,187]. Understanding these parameters is essential for the rational design of drug delivery systems intended for local administration to the inner ear.

Among these factors, molecular size is generally considered one of the most important determinants of RWM permeability. Small molecules readily diffuse across the membrane, whereas larger macromolecules exhibit markedly reduced transport. For example, dexamethasone (392.5 Da, Dexa) efficiently permeates the RWM, while albumin (67 kDa) displays negligible penetration [188,189]. This observation is consistent with the behavior of many biological barriers and suggests that passive diffusion represents a major transport mechanism for low-molecular-weight compounds. Similarly, several physicochemical descriptors associated with membrane permeability, including molecular weight, lipophilicity, and hydrogen-bonding capacity, broadly align with the principles of Lipinski's Rule of Five, which predicts a compound's ability to cross biological membranes [190]. This empirical framework states that compounds

INTRODUCTION

generally display favorable membrane permeability when they exhibit a molecular weight < 500 Da, a partition coefficient (logP) < 5, no more than five hydrogen-bond donors (such as -OH or -NH groups), and no more than 10 hydrogen-bond acceptors. Although originally established to predict oral bioavailability, these descriptors are also relevant to RWM transport because they influence passive diffusion through biological membranes.

Electrical charge also plays a significant role in determining transport across the RWM. The membrane surface contains negatively charged glycoproteins that can interact electrostatically with administered particles. Consequently, negatively charged nanoparticles generally exhibit reduced permeability due to electrostatic repulsion, whereas neutral or positively charged carriers often demonstrate enhanced membrane transport [191]. These findings have important implications for the engineering of nanoparticle-based delivery systems, where surface charge can be deliberately tailored to optimize cochlear uptake.

In addition to formulation-related parameters, anatomical features of the RWM itself influence permeability. The central region of the membrane is thinner than its peripheral margins and therefore represents a preferential site for molecular transport [185]. Variations in membrane thickness resulting from species differences, aging, inflammation, or pathological conditions may further alter permeability and contribute to the variability observed across experimental studies [192]. Consequently, both drug-related and tissue-related factors must be considered when interpreting transport data.

Although the RWM is generally regarded as the primary pathway for TT drug delivery, it is unlikely to be the only route through which compounds access the inner ear. Alternative pathways have been proposed, including transport across the oval window membrane, diffusion through vascular and lymphatic networks within the connective tissue layer of the RWM, and migration through bone suture pathways that connect the middle and inner ear compartments. Experimental studies in guinea pigs have provided evidence supporting the existence of these secondary routes [187,193–196].

The presence of multiple entry pathways represents an important challenge when evaluating RWM permeability *in vivo*, as drug concentrations measured within the cochlea may not exclusively reflect transport through the membrane itself. Consequently, *ex vivo* and *in vitro* models offer distinct advantages for mechanistic investigations by enabling direct assessment of RWM transport while minimizing confounding contributions from alternative diffusion routes. These models therefore play a critical role in improving our understanding of the determinants

governing drug entry into the inner ear and in facilitating the development of more predictive drug delivery strategies.

IV.2.4. Laboratory models used for RWM penetration studies

Clinical studies evaluating TT administration of corticosteroids have demonstrated therapeutic benefit in selected patient populations [197,198]. However, they provide limited mechanistic information regarding membrane permeability, cochlear biodistribution, and the factors governing intracochlear drug exposure. Consequently, most knowledge concerning RWM transport has been generated through preclinical investigations.

Experimental models play a central role in the development of othotherapeutic formulations. Beyond simply determining whether a compound reaches the inner ear, these systems provide critical information regarding transport kinetics, biodistribution, elimination pathways, residence time, and safety. Importantly, each model category—*in vivo*, *ex vivo*, and *in vitro*—captures different aspects of the drug delivery process. Rather than competing approaches, these platforms should be viewed as complementary tools that collectively contribute to a comprehensive understanding of RWM-mediated transport. The increasing complexity of modern othotherapeutic strategies, including nanoparticle-based formulations, gene therapies, biologics, and controlled-release systems, has further emphasized the need for predictive experimental platforms. In parallel, ethical and economic considerations have encouraged the development of alternative models that reduce animal use while maintaining translational relevance. The following sections critically review the strengths, limitations, and future perspectives of currently available models used to investigate drug transport across the RWM.

IV.2.4.1. *In vivo* studies

Preclinical *in vivo* models remain the gold standard for investigating inner ear drug delivery because they provide a physiologically relevant framework for evaluating therapeutic efficacy, safety, and transport across the RWM. Such information is essential for understanding the relationship between local drug exposure and therapeutic outcome, and for guiding the rational design of next-generation othotherapeutic formulations [199].

IV.2.4.1.1. Main delivery routes in animal studies

The most commonly used delivery strategy is TT administration, in which a formulation is injected into the middle ear cavity through the tympanic membrane [182,183]. The perforation created by the needle tends to heal spontaneously within 7 to 12 days, making this approach a promising strategy for future clinical applications [200]. Alternative approaches include retroauricular and ventrolateral surgical procedures that provide direct visualization of the RWM through bullostomy. Although more invasive, these techniques offer greater control over drug placement and exposure [201–203]. Intracochlear administration is occasionally used to bypass the RWM entirely, but its invasive nature and potential impact on hearing function limit its clinical applicability [186].

IV.2.4.1.2. Considerations for animal model selection

The selection of an appropriate animal model is critical in preclinical studies investigating drug transport across the RWM, as substantial interspecies differences in cochlear anatomy and membrane properties can significantly affect permeability measurements and intracochlear drug distribution. Among small animal models, guinea pigs remain the most widely used species in auditory research because their relatively large middle ear cavity facilitates surgical manipulation, RWM visualization, and perilymph sampling compared with smaller rodents such as mice [158]. Consequently, guinea pigs have become the reference model for evaluating TT drug delivery strategies and characterizing RWM transport kinetics.

However, important anatomical differences exist between rodents and humans. In particular, the RWM of rodents is considerably thinner than that of humans (see above). Such differences are likely to contribute to the higher permeability generally observed in rodent models and may therefore limit the direct extrapolation of permeability data to the clinical setting.

Larger mammalian species, including rabbits, cats, sheep, and pigs, have therefore gained increasing interest as translational models for inner ear drug delivery. Among these, cats exhibit several anatomical characteristics that closely resemble the human cochlea, including a larger RWM surface area, a membrane thickness comparable to that of humans, and a basal cochlear turn cross-sectional area of approximately 2.0 mm² [204]. The translational impact of these anatomical differences was illustrated in a study demonstrating that ¹²⁵I-Neurotrophin-3-loaded chitosan/alginate-coated silica supraparticles exhibited limited intracochlear penetration in cats, with less than 1% of the administered payload detected within the cochlea after 28 days, whereas

INTRODUCTION

greater diffusion into the basal turn was observed in guinea pigs [186]. These findings suggest that results from rodent models may overestimate drug penetration in species with thicker, more clinically relevant RWMs.

More recently, large-animal models such as sheep and pigs have emerged as particularly valuable platforms for translational research. Ovine and porcine cochleae exhibit several similarities to the human cochlea, including comparable numbers of cochlear turns, overlapping auditory frequency ranges, and RWM thicknesses approaching those observed in humans [162,205]. Studies performed in porcine models have further demonstrated that Dexamethasone (Dexa) and dexamethasone sodium phosphate (DSP) exhibit lower permeability across the porcine RWM than across the guinea pig membrane, supporting the hypothesis that membrane thickness constitutes an important determinant of drug transport [162,189]. Computational simulations based on porcine and human cochlear geometries have similarly shown comparable diffusion patterns and dephosphorylation kinetics within the perilymphatic compartment, further reinforcing the translational relevance of the porcine model [162]. Large-animal models have also proven valuable for evaluating emerging therapeutic strategies. For example, microbubble-assisted ultrasound significantly enhanced gadolinium transport across the ovine RWM, increasing both the amount of agent delivered and its distribution toward apical cochlear regions compared with passive transport diffusion [205].

Collectively, these findings demonstrate that species selection profoundly affects the interpretation of RWM permeability data. While rodent models remain indispensable for mechanistic investigations and early-stage screening, larger mammalian species provide anatomical and physiological characteristics that more closely reproduce the human inner ear and therefore offer improved translational relevance. The choice of model should consequently be guided by the specific objectives of the study, balancing experimental accessibility, cost, ethical considerations, and clinical predictability.

IV.2.4.1.3. *In vivo* RWM penetration studies

Seminal studies established the conceptual framework for understanding drug transport across the RWM and subsequent distribution within the cochlea. By quantifying the permeation kinetics of several model compounds (including Dexa, DSP, and gentamicin), these investigations demonstrated the critical roles of membrane permeability, intracochlear distribution, and physicochemical properties in determining local drug delivery to the inner ear (Table 2) [189,206–208].

INTRODUCTION

One of the most important observations from these studies is that successful permeation across the RWM does not necessarily lead to homogeneous drug distribution throughout the cochlea. Although compounds such as the ionic marker trimethylphenylammonium (TMPA) readily crossed the membrane following middle ear administration, their diffusion within the perilymph remained largely restricted to the basal turn, with only limited longitudinal transport toward apical regions [208]. This phenomenon reflects the influence of cochlear geometry on intracochlear transport, as drug diffusion is constrained by the length and spiral architecture of the cochlear duct [162]. Consequently, locally administered therapeutics tend to accumulate within basal regions and reduce exposure of apical structures [208]. This limitation represents a major translational challenge for TT therapies, particularly in humans, whose cochlea is substantially longer than that of commonly used rodent models.

In vivo studies have also provided valuable insights into the pathways through which compounds enter the inner ear. Although several routes contribute to cochlear uptake, including transport through the stapes and diffusion across thin bony regions near the cochlear apex, the RWM appears to constitute the predominant entry pathway for locally administered steroids. Quantitative modeling studies estimated that approximately 73% of total perilymphatic steroid uptake occurs through the RWM, compared with only 22% through the stapes pathway [189]. These findings further support the central role of the RWM as the primary target for local drug delivery strategies.

Another key finding is the strong dependence of RWM permeability on the physicochemical properties of the administered compound. Molecules that are uncharged and lipophilic generally exhibit higher permeability than hydrophilic or ionized compounds, consistent with passive diffusion across biological membranes. For example, Dexamethasone (Dexa) displays a substantially higher permeability coefficient across the RWM (150×10^{-9} m/s) than its charged prodrug DSP (28×10^{-9} m/s) [189]. However, enhanced membrane permeability does not necessarily result in prolonged cochlear exposure, as previously mentioned. Despite its superior transport across the RWM, Dexa is cleared more rapidly from perilymphatic compartments than DSP, resulting in shorter intracochlear residence times [162,189]. These observations demonstrate that therapeutic performance is determined not only by membrane permeation but also by intracochlear pharmacokinetics and elimination processes.

Taken together, these studies demonstrate that successful therapy depends on a complex interplay between membrane permeability, intracochlear distribution, and drug retention,

emphasizing the need to consider all three parameters when designing and evaluating novel ototherapeutic formulations.

Gentamicin as a model compound for studying uptake and retention

Gentamicin has been extensively investigated as a model compound for studying RWM transport because of its clinical relevance and well-documented ototoxicity [207,209,210]. Quantitative studies in guinea pigs demonstrated that approximately 57% of cochlear gentamicin uptake following bullostomy occurs through the RWM, with an estimated permeability coefficient of 50×10^{-9} m/s [206,207]. In contrast to corticosteroids such as Dexamethasone, gentamicin exhibits relatively slow elimination from perilymphatic compartments, with an estimated half-life of 4.7 h. This prolonged intracochlear retention is believed to contribute to the cumulative toxicity associated with aminoglycoside exposure and highlights the importance of considering both membrane permeability and elimination kinetics when evaluating local drug delivery strategies.

General determinants of RWM permeability

Beyond corticosteroids and aminoglycosides, numerous compounds have been evaluated for their ability to cross the RWM, including local anesthetics, proteins, metabolites, ions, glutamate receptor antagonists, antioxidants, antibiotics, and molecular tracers [57,187,211–213]. Collectively, these studies have established that RWM permeability is governed by a complex interplay of physicochemical and experimental factors, including molecular size, electrical charge, lipophilicity, concentration gradient, and duration of membrane exposure. These observations have provided the conceptual basis for the rational design of formulations intended to optimize intracochlear drug delivery.

Nanocarriers as emerging transport systems

More recently, significant attention has focused on the ability of nanoscale drug delivery systems to overcome the limitations associated with conventional small-molecule administration. *In vivo* studies have demonstrated that a variety of nanocarriers, including polymeric nanoparticles, liposomes, solid lipid nanoparticles, and metallic nanoparticles, can cross the RWM and reach the cochlear fluids [183]. For example, poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) nanoparticles were shown to penetrate all three histological layers of the membrane and subsequently enter the perilymphatic compartment, confirming that the RWM is permeable not only to small molecules but also to nanoscale delivery systems [79]. Similarly, MRI-traceable liposomes successfully

INTRODUCTION

crossed the membrane and reached the cochlea, although their distribution remained predominantly confined to the basal turn [214]. These findings further support the concept that intracochlear drug distribution following local administration is inherently heterogeneous and strongly influenced by cochlear anatomy.

Mechanistic studies have revealed that nanoparticle transport across the RWM differs substantially from that of small molecules. While passive diffusion appears to be the dominant transport mechanism for many low-molecular-weight compounds, nanoparticle translocation involves active cellular processes. Entry through the outer epithelial layer is mediated by multiple endocytic pathways, including clathrin- and caveolin-mediated uptake and macropinocytosis, followed by intracellular trafficking and basolateral exocytosis [79,215]. Once beyond the epithelial barrier, the structurally looser connective tissue and inner epithelial layers appear to permit predominantly passive migration toward cochlear fluids [79,161]. The transient accumulation of nanoparticles within the membrane before their progressive release into the inner ear further suggests a dynamic and concentration-dependent transport process.

Taken together, these studies demonstrate the considerable potential of nanocarriers for enhancing local drug delivery to the inner ear. Nevertheless, improved membrane transport does not necessarily translate into superior intracochlear drug exposure. In some cases, encapsulated formulations generate lower perilymphatic drug concentrations than the corresponding free compound, indicating that the therapeutic benefit of nanoparticle-based systems depends on the combined transport characteristics of both the carrier and its payload [214]. Consequently, successful nanocarrier design requires optimization not only of membrane permeation but also of drug release kinetics, cochlear distribution, and intracochlear retention.

Administration procedure

An important lesson emerging from *in vivo* studies is that successful intracochlear drug delivery also depends on the administration procedure itself. In particular, the duration of contact between the formulation and the RWM is a critical determinant of transport efficiency. Factors that influence middle ear clearance, formulation retention, and membrane exposure can therefore significantly affect cochlear drug uptake. For example, animal positioning following TT administration has been shown to influence nanoparticle delivery, with lateral positioning of the treated ear promoting greater cochlear uptake than the prone position, likely by prolonging formulation residence time at the RWM [214]. These observations highlight the importance of

INTRODUCTION

administration-related parameters, which may contribute substantially to variability between studies.

In vivo investigations have also revealed potential confounding factors related to middle ear anatomy. Because the two middle ear cavities communicate through the Eustachian tubes and the nasopharynx, locally administered formulations may spread to the contralateral ear, particularly in small animal models. This phenomenon was demonstrated following TT administration of fluorescent magnetic nanoparticles conjugated to gentamicin, resulting in bilateral localization within the cochlear outer hair cells despite unilateral treatment [216]. Such findings underscore the need for caution when using the contralateral ear as an untreated control, as inadvertent bilateral exposure may lead to underestimation of treatment effects.

Collectively, the available evidence indicates that therapeutic performance is governed by a complex interplay between drug physicochemical properties, nanoparticle composition, membrane permeability, intracochlear distribution, residence time at the RWM, and the mechanism of transport employed, whether passive diffusion or externally enhanced approaches such as microbubble-assisted ultrasound. Consequently, interpretation of *in vivo* data requires consideration of numerous formulation- and procedure-related variables that may influence drug exposure within the inner ear.

Despite their indispensable role in evaluating drug efficacy and pharmacokinetics under physiologically relevant conditions, *in vivo* models present several inherent limitations. The complexity of living organisms introduces multiple sources of variability that can complicate data interpretation, including systemic metabolism, biological clearance mechanisms, genetic heterogeneity, and environmental influences such as age, diet, and housing conditions. Furthermore, substantial anatomical and physiological differences between animal species and humans may limit the direct translation of preclinical findings to the clinical setting. In addition to these scientific challenges, animal experimentation is associated with important ethical considerations, specialized infrastructure requirements, and high financial costs.

INTRODUCTION

Table 2 : Synthesis of studies on RWM penetration across different models (in vivo, ex vivo, in vitro). Abbreviations: Trimethylphenylammonium (TMPA), Dexamethasone (Dexa), Dexamethasone sodium phosphate (DSP), Round window membrane (RWM), High-Performance Liquid Chromatography (HPLC), Mass Spectrometry (MS), 125I-Neurotrophin-3-loaded chitosan/alginate-coated silica supraparticles ((Chi/Alg)SPs loading 125I-NT3), Microbubble-assisted ultrasound (MB-US), Gadolinium (Gd), Transtympanic injection (TT), Magnetic Resonance Imaging (MRI), Poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles (PLGA NPs), Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM), Transmission Electron Microscopy (TEM), Fluorescence Detection (FLD), Liposomes encapsulating gadolinium-tetra-azacyclododecane-tetra-acetic acid (LPS+Gd-DOTA), Fluorescent magnetic nanoparticles conjugated to gentamicin (F-MNP@GM), Cinnarizine (CNZ), Ultra-Performance Liquid Chromatography (UPLC), Dexamethasone Fluorescein (DexF), Enzyme-Linked Immunoassay (ELISA), Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles (SPIONs), Green Fluorescent Protein (GFP), Polymerase Chain Reaction (PCR), Madin Darby Canine Kidney (MDCK), Small Intestinal Submucosa (SIS), Ibuprofen conjugated to Hyaluronic Acid (Ibu-HA), human Small Airway Epithelial (hSAE), Air-Liquid Interface (ALI), Size Exclusion Chromatography Multi-Angle Light Scattering (SEC-MALS), Claudin-1 (CLDN-1), Zonula Occludens-1 (ZO-1), Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS), Human Adult low Calcium high Temperature (HaCaT)

<i>Model</i>	<i>Animal, Explant or Cell type</i>	<i>Administration route / Device</i>	<i>API(s) or Nanoparticle(s)</i>	<i>RWM permeability</i>	<i>Biodistribution and pharmacokinetics</i>	<i>Detection or Quantification method</i>	<i>Reference</i>
<i>In vivo</i>	Guinea pig	Ventrolateral surgical approach	TMPA	0.194×10^{-9} m/s	After 90 min, 16.5% TMPA reached the basal turn of the cochlea. Only 0.8% TMPA were detected at the second turn, demonstrating a slow longitudinal perilymph flow rate.	TMPA-selective electrodes	[208]
	Guinea pig	Ventrolateral surgical approach	Gentamicin	50×10^{-9} m/s	Gentamicin concentration was low in the apical region, but substantially higher in the basal part of the Scala Tympani, demonstrating a basal-apical gradient along the cochlea.	Fluorescence-polarization-immunoassay	[206]
	Guinea pig	Retroauricular surgical approach	Gentamicin		After 1h, 54% of the gentamicin applied penetrated the inner ear. Only 57% of this penetration was attributed to crossing the RWM rather than the stapes (35%). Gentamicin estimated half-life is 4.7 hour in perilymph (= a decrease of 2.46 %/hour).	Particle enhanced turbidimetric inhibition immunoassay Kinetic interaction of microparticles in solution assay	[207]

INTRODUCTION

	Guinea pig	Retroauricular surgical approach	Dexa (suspension) DSP (solution)	Dexa: 150×10^{-9} m/s DSP: 28×10^{-9} m/s	The perilymph analysis conducted 1h post-deposition attributed passage as follows: RWM (73%), stapes (22%) and apex (5%), for both Dexa and DSP.	HPLC-MS	[189]
	Guinea pig Cat	Retroauricular surgical approach	(Chi/Alg)SPs loading ^{125}I -NT3		Guinea pig: Low NT3 diffusion through RWM was observed and did not extend beyond the basal turn. However, a clear ^{125}I signal was detected in the basilar membrane, below the hair cells. Cat: Intracochlear spread of the drug is limited. After 28 days, less than 1% of the loaded NT3 was detected.	Gamma count measurement Autoradiography	[186]
	Sheep	Retroauricular surgical approach + MB-US TT injection	Gd		10 min after MB-US, Gd was detected in the cochlea, with a progression of 10.84 mm. After TT injection, Gd was detected in the cochlea only at 30 min, with a mean progression of 1.30 mm. MB-US enhanced Gd delivery into the cochlea (3.56-fold), compared to TT injection.	MRI	[205]
	Pig	Surgery to access tympanic membrane + TT injection	Dexa (solution) DSP (solution)	Dexa: 123×10^{-9} m/s DSP: 12×10^{-9} m/s	At 30 min, Dexa was present in the inner ear ($0.38 \pm 0.28 \mu\text{g/mL}$), but not in the contralateral one. 30 min after DSP injection, Dexa and DSP concentrations in perilymph were $5.06 \mu\text{g/mL}$ and $1.21 \mu\text{g/mL}$ respectively, showing a high dephosphorylation rate in pigs.	MS	[162]

INTRODUCTION

	Guinea pig	TT injection	PLGA NPs encapsulating coumarin-6		PLGA NPs are distributed within the RWM 3 layers and successfully enter perilymph. The coumarin-6 concentration in the RWM increased until 30 min post-injection and decreased at 60 min. The passage is primarily regulated by endocytosis and exocytosis mechanisms.	CLSM TEM HPLC-FLD	[79]
	Rat	TT injection	LPS+Gd-DOTA		Nanoparticles were detected in the perilymph after 3h (21.1%). Their uptake in the inner ear was influenced by the rat posture (prone < lateral position) after TT injection.	MRI	[214]
	Rat	TT injection	F-MNP@GM		Contralateral spreading was observed (66.7%). F-MNP@GM were detected in the contralateral middle ear 1h after injection, as well as in the ipsilateral and contralateral cochlear OHCs, especially in the basal turn.	MRI Confocal microscopy	[216]
	Rabbit	TT injection	CNZ-loaded eutectic emulsion-like dispersion (C1) CNZ solution (C2)	Penetration after 2h: C1: 2.96% C2: 2.52%	After 30 min, CNZ concentration in perilymph was >18-times higher with C1 than C2. Then, a strong decline is observed for C1, whereas C2 increases progressively.	UPLC-MS/MS	[217]
<i>Ex vivo</i>	Human RWM	Figure 20B	DSP Ciprofloxacin HCl	DSP: 40×10^{-9} m/s Ciprofloxacin HCl: 23.3×10^{-9} m/s	DSP permeability was higher in membranes that underwent multiple freeze/thaw cycles for storage.	HPLC-UV	[161]

INTRODUCTION

	Porcine RWM	Figure 20D	Dexa DexF	Dexa: 123×10^{-9} m/s (P0-P40) DexF: 6.2×10^{-9} m/s (P0-P20) or 6.5×10^{-10} m/s (P40)	RWM explant viability is limited to 3-5 days, emphasizing the need to optimize tissue preservation procedures while maintaining native permeability. RWM permeability may decrease with increasing pig age.	ELISA	[159]
	Mouse RWM	Figure 20E	Toluidine blue GFP-Adenovirus		A hyaluronic acid ester-based sponge placed in the round window niche enabled time-dependent penetration of toluidine blue and adenoviral vector through the RWM.	Spectrophotometer GFP-PCR	[163]
	Guinea pig RWM	Figure 20A	SPIONs		The presence of a 0.4 Tesla magnetic field increased SPIONs delivery by ~50% in a nanoparticle size- and cellular layer-dependent manner.	TEM Confocal microscopy	[164,165]
	Guinea pig RWM	Figure 20C	Dexa in solution or hydrogel (chitin and/or alginate)	Penetration after 3h: Dexa solution: 0.16%	Alginate and chitin efficiently slowed Dexa diffusion through the RWM. The apparatus was cheap, reproducible, and reliable, with no false RWMs and no variability associated with drug application or sampling techniques.	HPLC-UV	[218]
<i>In vitro</i>	Inner & outer layers: MDCK cells Middle layer: Fibroblasts in a SIS membrane		SPIONs		The RWM model is 80-100 μ m thick and differs from the native membrane by lacking blood and lymph vessels. $\sim 10^7$ SPIONs crossed the model after 60 min of magnetic exposure.	TEM Fluorescence Spectrophotometry	[166]

INTRODUCTION

	Single hSAE cell layer (mimicking the RWM outer layer) 14 days of differentiation at the ALI	Fluorescein DSP Ciprofloxacin HCl Gentamicin sulfate	Fluorescein: 80.3×10^{-9} m/s DSP: 241×10^{-9} m/s Ciprofloxacin HCl: 212×10^{-9} m/s Gentamicin sulfate: 154×10^{-9} m/s	High expression of CLDN-1 and ZO-1 showed the presence of tight junctions in the epithelium. Modeling of the middle and inner layers demonstrated that these layers do not contribute to the barrier function and are therefore not essential for the final model representation.		[160]
		Ibu Ibu-HA conjugate	Penetration after 24h: Ibu-HA: 41% Ibu: 28%	The RWM model showed that conjugation of Ibu to HA increased its permeability. This <i>in vitro</i> model facilitated histological studies.	SEC/MALS	[168]
	3-layer model: HaCaT cells Human fibroblasts Collagen layer	Dexa	Penetration after 1h: 4.5%	Comparison of models composed of a collagen layer, HaCaT cells, and/or fibroblasts revealed differences in Dexa permeability. The final model exhibited a total thickness of $\sim 200 \mu\text{m}$, which is greater than that of the human RWM.	HPLC-UV	[167]
	Reconstructed human artificial mucosa: Human oral mucosal epithelial cells and stroma of fibroblasts in a collagen matrix	Neutral NPs Anionic NPs Cationic NPs Cat-PEG NPs		The purchased artificial mucosa is $\sim 100 \mu\text{m}$ thick. After 40h, Cat-PEG NPs and Neutral NPs showed the highest penetration. The <i>in vitro</i> results are consistent with the <i>in vivo</i> observations.	FACS Confocal microscopy	[191]

IV.2.4.2. *Ex vivo* models

Ex vivo models represent an attractive intermediate between *in vivo* studies and simplified cell culture systems. By isolating the RWM from surrounding cochlear structures, these models enable direct investigation of membrane permeability while minimizing systemic confounding factors. As a result, they provide a powerful tool for mechanistic studies and comparative evaluation of drug formulations. Consequently, *ex vivo* platforms have become valuable tools for mechanistic studies and comparative evaluation of drug formulations intended for inner ear delivery.

The establishment of *ex vivo* RWM models is technically demanding because membrane isolation must be performed without compromising tissue integrity [161]. This challenge is particularly pronounced in small rodents, whose delicate and limited RWM dimensions increase the risk of rupture during dissection. As a result, RWMs obtained from larger species, including pigs and sheep, are generally preferred owing to their larger size and improved handling characteristics. Following isolation, the membrane is typically mounted between donor and receiver compartments using custom-built diffusion chambers, 3D-printed devices, or modified Transwell® systems, thereby enabling quantitative assessment of molecular transport across the tissue (Figure 20, Table 2). Prior to experimentation, membrane integrity and viability are commonly evaluated using transepithelial electrical resistance (TEER) measurements, metabolic activity assays, and leakage tests to ensure the reliability of permeability measurements [159,161].

Validation of barrier function

One of the major advantages of *ex vivo* models is their ability to generate permeability data under tightly controlled conditions. Unlike *in vivo* studies, measured transport rates are not influenced by systemic pharmacokinetic processes, allowing a more direct assessment of the intrinsic barrier properties of the RWM. This feature has facilitated meaningful comparisons across species and formulations. For example, Veit et al. reported an apparent permeability coefficient of approximately 40×10^{-9} m/s for DSP across human cadaveric RWMs [161], compared with values of 12×10^{-9} m/s and 28×10^{-9} m/s previously reported in porcine and guinea pig tissues, respectively [162,189]. Although these findings suggest greater permeability in human tissues, interpreting such comparisons requires caution, as tissue preservation procedures, particularly repeated freeze–thaw cycles, may alter membrane integrity and artificially increase permeability [159,161]. Consequently, optimization and standardization of tissue storage protocols remain critical challenges for the field.

IV.2.4.2.1. Evolution of RWM *ex vivo* models

Ex vivo studies have also provided important insights into how experimental conditions influence permeability measurements. Dexta transport rates determined in *ex vivo* porcine RWMs were remarkably similar to those reported in guinea pig *in vivo* studies, despite substantial anatomical differences between species [159,189]. However, methodological factors may contribute significantly to these apparent similarities. Only the dissolved fraction of a drug is available for membrane transport, making formulation composition, solvent selection, and drug solubility critical determinants of permeability measurements. The use of organic solvents, such as methanol, may additionally affect epithelial integrity and thereby influence transport kinetics. These observations highlight the importance of carefully characterizing formulation properties when comparing permeability data across experimental models.

IV.2.4.2.2. RWM permeability

Beyond interspecies variability, membrane permeability also appears to be influenced by tissue maturation. In porcine RWMs, permeability to dexamethasone fluorescein (DexaF) was approximately twofold higher in neonatal animals than in older subjects, suggesting that age-related structural changes contribute to the progressive development of barrier function. Such findings underscore the importance of considering animal age when designing permeability studies and interpreting experimental outcomes [159].

Ex vivo platforms have proven particularly valuable for evaluating advanced drug delivery systems. Viral vectors, nanoparticles, and magnetically guided formulations have all been successfully investigated using isolated RWM preparations. For instance, adenoviral vectors delivered through a sponge-based reservoir exhibited sustained penetration across the membrane over several days, demonstrating the ability of controlled-release systems to prolong membrane exposure and enhance transport [163]. Similarly, superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) exposed to an external magnetic field showed significantly enhanced penetration compared with passive diffusion alone. These studies illustrate the versatility of *ex vivo* models for assessing emerging delivery technologies while reducing dependence on animal experimentation [164].

INTRODUCTION

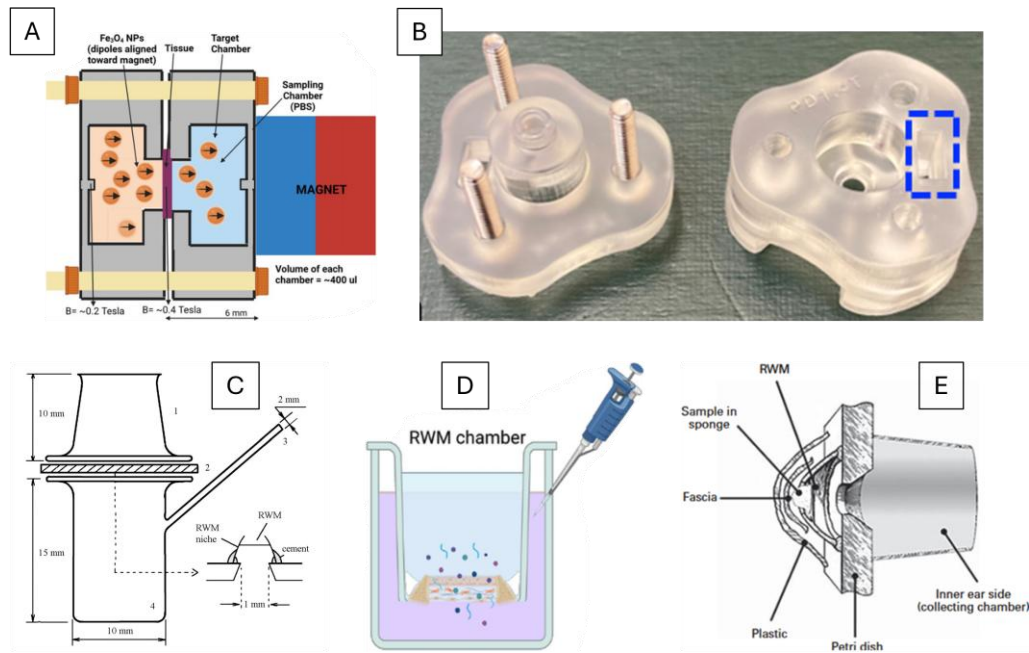


Figure 20: In-house devices for ex vivo RWM studies. (A, B) 3D-printed devices composed of two screw-fastened supports used to clamp the RWM between two chambers [161,164]. (C, D, E) Lab systems developed using supports such as inserts, plastic tubes, or glass chambers, onto which the RWM is fixed using dental cement or epoxy glue [159,163,218]. Figure reproduced with permission of the authors.

Overall, *ex vivo* models provide a robust and physiologically relevant platform for investigating RWM transport. By combining native tissue architecture with a controlled experimental environment, they offer significant advantages over conventional *in vivo* studies for mechanistic investigations. Nevertheless, limitations related to tissue availability, viability, preservation, and inter-donor variability continue to restrict their widespread application. Future efforts should therefore focus on standardizing experimental procedures and establishing stronger correlations with human tissues and emerging *in vitro* models to improve translational predictability.

IV.2.4.3. *In vitro* models

The development of physiologically relevant *in vitro* models represents a major objective in inner ear drug delivery research. Beyond addressing ethical concerns associated with animal experimentation, *in vitro* systems offer several advantages, including improved experimental reproducibility, reduced costs, higher throughput, and the ability to investigate molecular transport mechanisms under tightly controlled conditions. By eliminating many of the biological

INTRODUCTION

variables inherent to whole-animal studies, these models facilitate the evaluation of drug permeability, carrier interactions, and barrier properties while generating data that may be more readily translated to human physiology.

One of the earliest efforts to reproduce the RWM *in vitro* employed a hybrid *ex vivo/in vitro* approach in which Madin–Darby Canine Kidney (MDCK) epithelial cells were cultured on both sides of a fibroblast-populated collagen scaffold derived from porcine small intestinal submucosa. The resulting trilaminar construct exhibited histological features resembling those of the native RWM, thereby providing an important proof of concept for the development of tissue-engineered models of the membrane [166].

Subsequent efforts sought to improve the physiological relevance of these early constructs by reproducing the trilaminar architecture of the native RWM. Fully *in vitro* models incorporating epithelial cells, fibroblasts, and collagen-based scaffolds were therefore developed to better mimic the structural organization of the membrane. Permeability studies performed across the individual layers and the complete construct demonstrated a progressive reduction in Dexta transport with increasing structural complexity, highlighting the contribution of each layer to the overall barrier function of the membrane [167]. These findings provided important evidence that engineered tissue models can reproduce key transport characteristics of the native RWM and may therefore serve as valuable platforms for investigating drug permeation mechanisms.

Despite the physiological relevance of trilaminar models, accumulating evidence suggests that the outer epithelial layer constitutes the principal determinant of RWM permeability, whereas the connective tissue core and inner epithelial layer contribute comparatively little to overall transport resistance [57,160,219]. This observation has driven the development of simplified *in vitro* systems based on a single epithelial cell layer, which are easier to reproduce, more amenable to standardization, and better suited for routine permeability screening. Cell types are typically selected based on their structural and functional similarity to the native outer RWM epithelium, with human small airway epithelial (hSAE) cells emerging as particularly promising candidates because of their ability to form tight junctions and establish a robust epithelial barrier [160].

A prerequisite for using simplified epithelial models in permeability studies is establishing a functional barrier that adequately reproduces the transport properties of the native RWM. Barrier formation occurs progressively as cells reach confluence and develop intercellular tight junctions, which restrict paracellular diffusion and promote regulated transepithelial transport. The maturation of this epithelial barrier is commonly assessed by immunofluorescence staining for

tight junction proteins, including claudins, occludins, and *zonula occludens-1* (ZO-1), whose expression indicates epithelial integrity and differentiation [160]. In parallel, TEER measurements provide a quantitative assessment of barrier function and are widely used to monitor model maturation over time. Depending on the cellular model employed, tight-junction formation may occur rapidly following confluence or require an extended differentiation period, during which TEER values increase progressively until a stable, physiologically relevant barrier is established [160,166]. Together, these complementary approaches provide essential validation of the structural and functional integrity of *in vitro* RWM models prior to permeability assessment. Although these simplified systems lack physiological features such as vascularization and lymphatic drainage, they allow direct assessment of membrane permeability without the confounding effects of systemic metabolism or clearance.

The growing interest in epithelial barrier models has also stimulated the development of commercially available, pre-characterized cell culture systems that offer improved reproducibility and ease of implementation. These ready-to-use platforms provide standardized culture conditions and validated barrier properties, thereby reducing experimental variability between laboratories and facilitating the adoption of *in vitro* approaches for permeability screening [191,220]. Such advances are expected to contribute to the harmonization of experimental protocols and improve the comparability of data generated across different research groups.

Applications of *in vitro* RWM models for studying drug and nanoparticle transport

Despite their relatively recent development, *in vitro* RWM models have already been applied to investigate the transport of a broad range of therapeutic agents and delivery systems, including corticosteroids, aminoglycosides, non-steroidal anti-inflammatory drugs, superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs), and nanoparticles with varying physicochemical properties [160,166–168,191]. These studies have confirmed the influence of molecular size, lipophilicity, and surface charge on membrane permeability, while also providing mechanistic insights into nanoparticle transport across epithelial barriers.

Nevertheless, permeability values obtained *in vitro* do not always correspond to those reported in *ex vivo* or *in vivo* models. For example, DSP exhibited apparent permeability coefficients substantially higher in hSAE-based models than those measured in human cadaveric or guinea pig RWMs [160,161,189]. Such discrepancies highlight the importance of experimental variables specific to cell culture systems, including cell source, passage number, differentiation state, culture medium composition, and barrier maturation. Consequently, rigorous standardization of

experimental protocols remains essential for improving reproducibility and enabling meaningful comparisons between studies.

Overall, current *in vitro* RWM models represent a significant advance toward the development of predictive and animal-free platforms for evaluating drug transport to the inner ear. Nevertheless, further refinement and validation remain necessary before these systems can reliably serve as surrogates for human tissues. In particular, systematic comparisons between *in vitro* models and human cadaveric RWMs will be essential to establish their physiological relevance and predictive value. The integration of such validation studies with emerging tissue-engineering and microphysiological approaches may ultimately enable the development of robust, standardized platforms capable of accelerating the translation of novel “ototherapeutic” strategies while substantially reducing reliance on animal experimentation.

IV.2.5. Modulation of RWM permeability

Despite the therapeutic potential of TT administration, the barrier properties of the RWM may limit the amount of drug reaching cochlear tissues. Considerable efforts have therefore been directed toward the development of strategies capable of transiently modulating RWM permeability to enhance inner ear drug delivery. These approaches include chemical permeation enhancers, osmotic modulators, and mechanical interventions, which have been investigated primarily in preclinical models.

Among the different permeability-enhancing strategies investigated to date, chemical modulators have received the greatest attention. Most of these compounds act by transiently altering epithelial barrier function, either through disruption of tight junctions, modification of membrane lipid organization, or changes in local osmotic conditions. The resulting increase in paracellular and/or transcellular transport can significantly enhance the penetration of therapeutic agents across the RWM. However, the clinical utility of these approaches depends on achieving a reversible increase in permeability without compromising membrane integrity or cochlear function.

Histamine is among the most extensively studied permeability enhancers and has consistently been shown to increase cochlear drug uptake following TT administration [56,59,221]. As a key mediator of inflammation, histamine promotes vasodilation and modulates epithelial barrier function through receptor-mediated signaling pathways that affect tight-junction integrity. These

INTRODUCTION

effects are thought to increase paracellular transport across the RWM, resulting in enhanced penetration of corticosteroids and other therapeutic agents into the inner ear. Nevertheless, the magnitude of the permeability increase appears to depend on both the formulation and the experimental conditions employed.

Several other agents have been investigated for their ability to transiently disrupt epithelial barrier function. Sodium caprate, a well-established absorption enhancer, has attracted particular interest because of its reversible effect on tight-junction integrity. Experimental studies demonstrated that sodium caprate induces widening of intercellular spaces within the RWM, thereby promoting the transport of macromolecules up to 10 kDa in size [56,222,223]. Importantly, this effect is transient, with barrier function progressively recovering within a few hours after treatment. The temporary nature of this permeabilization is particularly attractive from a therapeutic perspective, as it minimizes the risk of permanent membrane damage while significantly increasing intracochlear drug exposure. Indeed, cochlear Dexamethasone concentrations were reported to increase approximately threefold following sodium caprate pretreatment [222].

Other chemical permeation enhancers, including saponin, benzyl alcohol, N-methyl-2-pyrrolidone (NMP), and dimethyl sulfoxide (DMSO), have also demonstrated the ability to increase RWM permeability [55,58]. These compounds are thought to act primarily through interactions with membrane lipids, resulting in transient alterations of epithelial integrity and enhanced drug diffusion. However, despite their efficacy, several of these agents present important limitations for clinical translation. For example, benzyl alcohol may cause significant discomfort following TT administration, while NMP raises safety concerns that currently restrict its therapeutic use [56].

In addition to direct modulation of epithelial barrier function, permeability may also be influenced by the physicochemical characteristics of the administered formulation. Hyperosmolar solutions containing agents such as sodium chloride or mannitol have been shown to increase RWM permeability by two- to threefold, emphasizing the role of osmotic gradients in regulating membrane transport [56,58]. Similarly, hyaluronic acid has been investigated as a permeability-enhancing strategy because of its mucoadhesive properties and ability to prolong formulation residence time within the round window niche. Although hyaluronic acid alone appears to exert only a modest effect on permeability, its combination with histamine resulted in substantially greater intracochlear steroid concentrations than either treatment alone, suggesting a synergistic effect mediated by prolonged membrane exposure [59].

Beyond chemical approaches, mechanical modulation of RWM permeability has emerged as an alternative strategy for enhancing inner ear drug delivery. Microperforation of the membrane has been shown to dramatically increase transport into cochlear fluids, with reported increases in rhodamine B penetration of up to 35-fold in guinea pig models [224]. The magnitude of this effect depends on both the number and size of the perforations generated. Importantly, multiple small perforations appear preferable to fewer large defects because they maximize permeability enhancement while minimizing perilymph leakage and preserving the membrane's regenerative capacity. Small perforations generally heal within 48 h, whereas larger injuries may require up to two weeks for complete recovery.

Collectively, these studies demonstrate that RWM permeability can be modulated through a variety of chemical, osmotic, and mechanical approaches. Although many of these strategies have shown considerable promise in preclinical models, their clinical translation will depend on achieving a careful balance between enhanced drug transport and preservation of membrane integrity. Future developments will likely focus on reversible and minimally invasive approaches capable of transiently increasing permeability while maintaining the safety and physiological functions of the RWM.

IV.2.6. Assessment of drug transport across the round window membrane and intracochlear biodistribution

A critical aspect of developing therapies for inner ear disorders is the ability to accurately assess drug transport across the RWM and characterize subsequent distribution within cochlear tissues. Beyond demonstrating that a therapeutic agent reaches the inner ear, evaluation methods must provide information on the extent of membrane permeation, intracochlear biodistribution, retention kinetics, and, when applicable, drug metabolism and clearance. Together, these parameters determine the local exposure of target tissues and ultimately influence therapeutic efficacy.

The assessment of inner ear drug delivery is commonly performed within the framework of the Liberation–Absorption–Distribution–Metabolism–Excretion (LADME) concept, which provides a structured approach for investigating the pharmacokinetic fate of compounds following TT administration [182,194]. To this end, a variety of complementary analytical and imaging techniques have been developed. While quantitative analytical methods provide direct measurements of drug concentrations and pharmacokinetic profiles, imaging approaches offer

spatial information regarding tissue localization and transport pathways. The integration of these methodologies is therefore essential for obtaining a comprehensive understanding of drug behavior within the inner ear.

IV.2.6.1. Quantitative assessment of drug transport

Quantitative determination of drug concentrations remains the reference approach for evaluating RWM permeability and intracochlear pharmacokinetics. Depending on the experimental model employed, analyses may be performed using perilymph, endolymph, cochlear tissues, or receiver media collected from *ex vivo* and *in vitro* systems. In animal studies, inner ear fluids are typically sampled following microsurgical fenestration of the bony cochlear wall, thereby enabling direct measurement of drug concentrations within cochlear compartments [225,226].

Among the available analytical techniques, high-performance liquid chromatography (HPLC) is one of the most widely employed methods for quantifying therapeutic agents following local administration. Coupled with ultraviolet, fluorescence, or mass spectrometric detection, HPLC has been extensively used to characterize the pharmacokinetics of corticosteroids, antibiotics, antioxidants, and model compounds delivered through a variety of carrier systems, including nanoparticles, liposomes, hydrogels, and microcrystalline formulations. These measurements provide valuable information regarding drug release, cochlear exposure, and retention kinetics.

Liquid chromatography coupled with mass spectrometry (LC–MS) offers superior sensitivity and molecular specificity and is increasingly considered the gold standard for pharmacokinetic investigations in the inner ear [227]. Its high analytical performance allows detection of compounds present at very low concentrations in cochlear fluids and enables simultaneous quantification of drugs, metabolites, and degradation products. Consequently, LC–MS has become particularly valuable for studying the pharmacokinetic behavior of complex formulations and assessing the impact of delivery systems on intracochlear drug exposure.

Although less sensitive than chromatographic approaches, immunoassays remain attractive because of their simplicity, rapid implementation, and relatively low cost [227]. When suitable antibodies are available, these methods provide a practical alternative for quantifying therapeutic proteins, growth factors, and corticosteroids [228,229], and are frequently used for formulation screening and comparative studies.

Collectively, quantitative analytical techniques provide the concentration–time profiles required to determine permeability coefficients, residence times, and pharmacokinetic parameters. However, these methods generally provide limited information regarding the precise localization of compounds within cochlear tissues.

IV.2.6.2. Assessment of intracochlear biodistribution

Because drug concentration alone does not fully describe therapeutic exposure, imaging approaches are frequently employed to complement quantitative analyses and evaluate the spatial distribution of therapeutic agents within the cochlea.

Histological and fluorescence-based techniques remain among the most widely used methods for investigating intracochlear biodistribution. Therapeutic compounds may be detected directly through immunohistochemical labelling or indirectly by incorporating fluorescent probes into delivery systems [147,203,230]. These approaches enable visualization of drug localization within specific cochlear structures, including the organ of Corti, spiral ganglion, and stria vascularis, thereby providing valuable information regarding tissue targeting and penetration depth.

At the ultrastructural level, electron microscopy can further elucidate the mechanisms governing RWM transport. Transmission electron microscopy (TEM) enables visualization of intracellular trafficking processes such as endocytosis and exocytosis, whereas scanning electron microscopy (SEM) provides detailed information regarding membrane surface morphology, formulation retention, and structural changes induced by permeability-enhancing strategies [219,222].

Non-invasive imaging modalities have become increasingly important for longitudinal evaluation of drug delivery systems. Magnetic resonance imaging (MRI) enables three-dimensional visualization of contrast agent-labeled formulations [41,231] and allows monitoring of their distribution, persistence, and degradation within the middle and inner ear over extended periods. Similarly, *in vivo* fluorescence imaging permits repeated assessment of fluorescently labeled compounds in the same animal [232,233], providing valuable information regarding retention kinetics and biodistribution while reducing the number of animals required for experimentation.

Together, these imaging techniques complement analytical measurements by providing spatial and mechanistic information that cannot be obtained from concentration data alone.

IV.2.6.3. Current challenges and limitations

Despite significant advances in analytical and imaging technologies, assessing drug transport across the RWM remains challenging. Quantitative methods often require invasive sampling procedures that may introduce contamination or alter cochlear physiology, while imaging techniques frequently provide semi-quantitative rather than absolute measurements. Furthermore, substantial methodological heterogeneity exists across studies in sampling procedures, analytical methods, imaging protocols, and experimental endpoints, complicating direct comparisons between investigations.

Another important limitation is that drug concentration within cochlear fluids does not necessarily reflect effective exposure at the cellular target site. Similarly, biodistribution studies may demonstrate tissue localization without providing information regarding pharmacological activity. Consequently, interpretation of transport data requires integration of quantitative, spatial, and functional endpoints.

Future efforts should therefore focus on the standardization of experimental methodologies and the development of multimodal approaches that simultaneously assess permeability, biodistribution, and therapeutic efficacy. Such advances will be essential for improving the predictive value of preclinical studies and accelerating the translation of novel drug delivery strategies for the treatment of sensorineural hearing loss.

IV.2.7. Conclusion

The development of effective therapies for SNHL remains critically dependent on overcoming the biological barriers that restrict drug access to the inner ear, with the RWM as the principal gateway for locally administered therapeutics. Over the past decades, substantial progress has been made in understanding the anatomical, physiological, and physicochemical factors governing drug transport across the RWM, leading to the development of a wide range of experimental models for investigating membrane permeability and intracochlear drug delivery.

In vivo models have played a pivotal role in establishing the fundamental principles of RWM transport and cochlear pharmacokinetics, while *ex vivo* systems have provided valuable mechanistic insights under controlled experimental conditions. More recently, advances in tissue engineering and epithelial barrier modelling have enabled the emergence of increasingly sophisticated *in vitro* platforms. Although these models have not yet achieved the physiological

INTRODUCTION

complexity required to fully reproduce the native human RWM, they represent a promising step toward more standardized, reproducible, and ethically sustainable approaches to evaluating drug transport and screening novel formulations.

Collectively, these experimental models have facilitated the investigation of a broad range of therapeutic agents and nanocarrier systems, significantly advancing our understanding of the factors influencing inner ear drug delivery. In parallel, numerous strategies to transiently enhance RWM permeability have demonstrated potential to improve intracochlear drug exposure, further expanding the therapeutic possibilities of local administration.

Despite these advances, important challenges remain. The absence of standardized experimental protocols, the limited availability of human tissues, and the anatomical and physiological differences between animal models and humans continue to complicate the translation of preclinical findings into clinical practice. Future efforts should therefore focus on the development and validation of predictive human-relevant *in vitro* models, the harmonization of permeability assessment methodologies, and the integration of advanced imaging, analytical, and computational approaches. Such developments will be essential to establishing robust translational frameworks that accelerate the development of next-generation ototherapeutics.

Ultimately, the combination of optimized delivery systems, transient permeability-enhancing strategies, and predictive experimental models is expected to substantially improve local drug delivery to the inner ear. These advances hold considerable promise for facilitating the clinical translation of emerging therapies and improving the treatment of sensorineural hearing loss and other debilitating inner ear disorders.

Statements & Declarations

Funding This work, as part of the NANOPDELEAR project, was supported by the Walloon Region funds (Win2Wal Convention No. 2210045); Dendrogenix (Liège, Belgium); and the 2025 CSR-SS funds (Conseil Sectoriel de la Recherche – Sciences de la Santé; University of Liège, Belgium).

Declaration of Competing Interest The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Author Contributions Gauthy Chloé: Investigation, Conceptualization, Writing – original draft, review & editing. Tallandier Valentin: Investigation, Writing – original draft. Cole Nicholas: Writing

INTRODUCTION

– review & editing. Evrard Brigitte: Writing – review & editing. Piel Géraldine: Funding acquisition, Supervision, Writing – review & editing. Malgrange Brigitte: Funding acquisition, Supervision, Writing – review & editing.

Data availability Not applicable.

Clinical trial number, ethics approval and consent to participate Not applicable.

Consent to publish All authors have approved the content of the manuscript prior to its submission for publication.

OBJECTIFS

Contexte, objectifs et plan de la thèse

I. Contexte

Ce travail s'inscrit dans le cadre du projet NANOPDELEAR, financé par la Région wallonne (programme Win2Wal, 2022 – 2026, convention n° 2210045).

Le projet NANOPDELEAR vise à développer une formulation innovante à base d'hydrogel et de liposomes permettant d'encapsuler des principes actifs synthétiques à noyau stéroïdien, la dexaméthasone et la DX243, pour le traitement par administration locale des surdités neurosensorielles induites par un traumatisme sonore.

Ce projet réunit trois partenaires scientifiques.

Le premier partenaire académique est le **laboratoire de Neurobiologie du Développement** (Prof. Brigitte Malgrange, Dr. Nicholas Cole, Dr. Valentin Tallandier, Enes Spahic), situé au sein du GIGA-Neurosciences. Ce laboratoire est responsable de l'évaluation *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo* des performances de la formulation thérapeutique développée. Cela comprend notamment l'évaluation de la biocompatibilité et de l'effet otoprotecteur de la formulation sur des explants cochléaires sains ou placés en conditions d'excitotoxicité, ainsi que l'étude de sa distribution dans les différentes régions cochléaires et de son efficacité *in vivo* après injection TT chez des souris préalablement exposées au bruit.

Le développement de la formulation de liposomes adaptés à une administration TT, le transfert de la méthode de production à l'échelle pilote GMP, ainsi que la mise au point et la caractérisation d'un hydrogel thermosensible capable de disperser ces nanoparticules relèvent de la responsabilité du deuxième partenaire académique, le **laboratoire de Technologie Pharmaceutique et Biopharmacie** (LTPB ; Prof. Géraldine Piel, Chloé Gauthy).

Ce projet est soutenu par un partenaire industriel. **Dendrogenix** (CEO – Stéphane Silvente, CDO – Nicolas Caron) est une société fondée en 2018, basée à Liège, spécialisée dans le développement de nouvelles molécules thérapeutiques, appelées dendrogénines, dont la DX243. Cette classe de molécules est reconnue pour stimuler la différenciation cellulaire dans les systèmes immunitaire et nerveux, ainsi que pour induire la croissance des dendrites sur les précurseurs des cellules dendritiques et neuronales. Elles sont ainsi développées afin de répondre à d'importants besoins médicaux dans les domaines de la perte auditive et de la neurologie.

II. Objectifs

L'objectif général de cette thèse est de développer, caractériser et mettre à l'échelle un système à base de liposomes encapsulant des principes actifs à noyau stéroïdien, dispersés dans un hydrogel thermosensible, adapté à une administration TT, afin de traiter les surdités neurosensorielles induites par un traumatisme sonore.

Dans le cadre du développement de cette thérapie innovante, le premier objectif consiste à produire des liposomes capables d'encapsuler la dexaméthasone, fréquemment utilisée dans le traitement des surdités neurosensorielles induites par un traumatisme sonore. La dexaméthasone est un corticostéroïde synthétique de structure stéroïdienne, apparenté aux hormones naturellement synthétisées à partir du Chol. Elle servira à étudier l'influence de la composition lipidique des liposomes sur son encapsulation et sa cinétique de libération. Dans un second temps, une formulation d'hydrogel thermosensible permettant la dispersion de ces liposomes sera ensuite développée. Elle devra notamment démontrer son injectabilité à température ambiante et sa capacité à gélifier rapidement à température physiologique afin d'augmenter le temps de résidence des liposomes au contact de la RWM et de prolonger la libération du principe actif encapsulé. Les liposomes devront démontrer leur capacité à diffuser hors de l'hydrogel, puis à travers les trois couches épithéliales de la RWM afin d'atteindre la périlymphe cochléaire, et enfin les cellules ciliées. Cette pénétration sera étudiée au moyen d'un modèle *in vitro* de RWM qui sera développé à partir de cellules épithéliales pulmonaires. La biocompatibilité, la biodistribution et l'efficacité de cette formulation thérapeutique encapsulant de la dexaméthasone seront ensuite évaluées *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo* sur un modèle murin. Une attention particulière sera portée à la méthode de production des liposomes, dans l'objectif de transférer ce procédé à l'échelle pilote GMP en vue d'une future production industrielle.

Ce système combiné hydrogel-liposomes sera ensuite transféré à une autre molécule de structure stéroïdienne, la DX243, principe actif récemment breveté par la société Dendrogenix.

Afin de répondre à cet objectif général, plusieurs sous-objectifs ont été fixés :

1. Étudier l'influence de la composition lipidique des liposomes sur l'EE et la cinétique de libération de la dexaméthasone.
2. Développer et caractériser une formulation d'hydrogel thermosensible, facilement injectable à température ambiante et gélifiant rapidement à température physiologique,

OBJECTIFS

afin de prolonger le temps de résidence et la libération de la dexaméthasone dans l'oreille moyenne.

3. Transférer le système combiné hydrogel-liposomes au principe actif « test », la DX243.
4. Évaluer la biocompatibilité et l'effet otoprotecteur du système « hydrogel-liposomes-dexaméthasone » *in vitro* et *ex vivo*, notamment sur explants cochléaires murins sains ou en conditions d'excitotoxicité.
5. Développer un modèle *in vitro* de RWM permettant d'évaluer la cinétique de passage de molécules et nanoparticules, telles que des liposomes, vers le compartiment représentant l'oreille interne.
6. Transférer le procédé de production des liposomes à l'échelle du laboratoire, de la méthode TFH à la méthode PGSS utilisant le scCO_2 , puis à l'échelle pilote GMP grâce à un nouvel équipement de capacité supérieure.

III. Plan de la thèse

Ce travail est composé de trois chapitres.

Le premier chapitre a pour objet le développement d'un hydrogel thermosensible dispersant des liposomes et permettant la libération prolongée des deux principes actifs, la dexaméthasone et la DX243, en vue de traiter les surdités neurosensorielles liées à un traumatisme sonore.

Celui-ci s'articule en trois parties. **La première partie** se consacre au développement d'une formulation de liposomes encapsulant de la dexaméthasone. Des variations de la composition lipidique seront étudiées afin d'évaluer leur impact sur la taille des liposomes, leur EE et leur cinétique de libération de la dexaméthasone. **La deuxième partie** aborde le développement et la caractérisation d'une formulation injectable par voie TT composée d'un hydrogel thermosensible et de liposomes encapsulant la dexaméthasone. Les propriétés rhéologiques et la cinétique de libération de la dexaméthasone à partir de ce système combiné seront étudiées. La biocompatibilité de la formulation sera évaluée *in vitro* à l'aide de cellules de la lignée *House Ear Institute – Organ of Corti 1* (HEI-OC1) modélisant les cellules ciliées cochléaires, et *ex vivo* à l'aide d'explants cochléaires murins. Enfin, l'effet otoprotecteur de la formulation sera mis en évidence grâce à des explants cochléaires placés en conditions d'excitotoxicité. **La troisième**

OBJECTIFS

partie reprend ensuite le transfert du protocole de production des liposomes étudiés en première partie à une nouvelle molécule thérapeutique amphiphile développée par Dendrogenix, la DX243 couplée à un fluorophore (DX2403).

Le deuxième chapitre se concentre sur le développement d'un modèle *in vitro* de RWM à l'interface air-liquide permettant d'évaluer la cinétique de pénétration de molécules et de nanoparticules, telles que des liposomes, vers un compartiment représentant l'oreille interne. La caractérisation du modèle sera d'abord réalisée au moyen de trois méthodes complémentaires, permettant de vérifier l'intégrité de l'épithélium à différents stades de différenciation cellulaire. La cinétique de pénétration de diverses formulations de liposomes dans le modèle de RWM permettra ensuite d'identifier une composition lipidique optimale *in vitro*. Enfin, un modèle de co-culture compartimentée, impliquant le modèle de RWM ainsi que les cellules cibles HEI-OC1, mettra en évidence la capacité des liposomes à traverser la RWM, puis à être intégrés par les cellules ciliées cochléaires.

Le troisième chapitre porte sur le transfert d'une méthode de production de liposomes développée à l'échelle du laboratoire vers une production à l'échelle pilote en conditions GMP.

Ce chapitre est divisé en deux parties. **La première partie** reprend le transfert de la méthode de production des liposomes, passant ainsi du procédé TFH à la méthode PGSS basée sur l'utilisation du scCO₂. Les caractéristiques physico-chimiques, la stabilité et la morphologie des nanoparticules produites par ces deux méthodes seront comparées afin de valider le transfert de méthode. **La deuxième partie** concerne la mise à l'échelle pilote du procédé PGSS utilisant le scCO₂ par l'approche *Quality by Design* (QbD). Un plan d'expériences permettra d'optimiser les conditions de production des liposomes sur un nouvel équipement PGSS GMP de capacité supérieure et partiellement automatisé. Enfin, la morphologie des nanoparticules produites, ainsi que l'impact du procédé PGSS sur la stabilité chimique des phospholipides seront étudiés.

CHAPITRE I

DÉVELOPPEMENT D'UN HYDROGEL
THERMOSENSIBLE DISPERSANT DES LIPOSOMES ET
PERMETTANT LA LIBÉRATION PROLONGÉE DE
PRINCIPES ACTIFS À NOYAU STÉROÏDIEN EN VUE
DE TRAITER LES SURDITÉS NEUROSENSORIELLES
INDUITES PAR UN TRAUMATISME SONORE

Partie expérimentale

Chapitre 1 – Développement d'un hydrogel thermosensible dispersant des liposomes et permettant la libération prolongée de principes actifs à noyau stéroïdien en vue de traiter les surdités neurosensorielles induites par un traumatisme sonore

I. Introduction

Les surdités neurosensorielles induites par un traumatisme sonore résultent de lésions irréversibles des cellules sensorielles et des neurones auditifs de la portion auditive de l'oreille interne [5,11]. Les corticostéroïdes, et en particulier la dexaméthasone, constituent actuellement l'un des seuls traitements envisagés en pratique clinique pour limiter ces dommages, notamment grâce à leurs propriétés anti-inflammatoires [29,32].

Toutefois, l'administration locale de ces molécules reste limitée par leur faible temps de résidence dans l'oreille moyenne et par la présence de barrières biologiques, telles que la RWM qui réduisent leur diffusion vers la cochlée [52].

Les liposomes constituent des vecteurs prometteurs pour améliorer le transport des corticostéroïdes à travers la RWM et contrôler leur libération au niveau cochléaire [91,94]. Leur biocompatibilité, leur capacité à encapsuler des molécules hydrophobes ou hydrophiles, ainsi que la possibilité de moduler leurs propriétés physico-chimiques en jouant sur leur composition lipidique en font des systèmes particulièrement polyvalents et adaptés à une administration TT [61].

Les formulations de liposomes présentent toutefois une faible viscosité, ce qui favorise leur écoulement vers la trompe d'Eustache après injection dans la cavité de l'oreille moyenne et réduit ainsi leur temps de contact avec la RWM. L'incorporation de ces liposomes dans un hydrogel permettra d'augmenter la viscosité de la formulation et, par conséquent, son temps de résidence dans la cavité de l'oreille moyenne ainsi qu'au contact de la RWM, favorisant ainsi le passage des liposomes vers la cochlée. La formulation devra gélifier rapidement, idéalement en moins de 15 minutes, afin d'éviter son écoulement et de limiter le temps pendant lequel le patient devra rester

en décubitus latéral après l'administration. Cet hydrogel doit néanmoins présenter une bonne injectabilité à température ambiante, tout en étant biocompatible [54,123,124].

Enfin, la polyvalence du système combiné hydrogel-liposomes, développé dans un premier temps avec la dexaméthasone, sera évaluée au travers de son adaptation à d'autres molécules thérapeutiques stéroïdiennes, telles que la DX243. Cette étude offrira également l'occasion de comparer les propriétés physico-chimiques de liposomes encapsulant des principes actifs aux profils de solubilité distincts (hydrophiles, lipophiles ou amphiphiles).

Ce chapitre se décline en trois parties :

- Une étude préliminaire ayant pour objectif d'étudier l'impact des différents constituants des liposomes sur leur capacité à encapsuler la dexaméthasone et former des liposomes aux caractéristiques compatibles avec une administration TT, ainsi que sur leur capacité à influencer la vitesse de relargage de cette molécule dans la perspective de développement d'une forme à libération prolongée.
- Le développement d'une formulation injectable biocompatible et efficace, combinant un hydrogel, des liposomes et de la dexaméthasone. L'objectif de ce travail est de développer une formulation injectable permettant une délivrance locale prolongée de dexaméthasone dans l'oreille interne, en réponse aux limites des approches actuelles par injection TT.
- La transposition du système combiné hydrogel-liposomes à la DX243, un principe actif amphiphile. Cette étape permettra d'évaluer la transférabilité du système à divers principes actifs synthétiques à noyau stéroïdien.

II. **Partie 1** – Étude de l'impact des différents constituants des liposomes sur leur taille, ainsi que leur capacité à encapsuler la dexaméthasone et à moduler sa vitesse de libération

II.1. Introduction

L'objectif de cette première partie est de développer des liposomes présentant des caractéristiques physico-chimiques, notamment en termes de taille et de charge de surface, susceptibles de favoriser leur passage à travers la RWM. L'EE de la dexaméthasone devra être la plus élevée possible afin, d'une part, de limiter les volumes injectés dans la cavité de l'oreille moyenne et, d'autre part, d'atteindre la concentration thérapeutique (40 ng/mL) lors de sa délivrance cochléaire [47]. Cette étude permettra également d'évaluer l'aptitude des liposomes à moduler la cinétique de libération de la dexaméthasone.

La composition lipidique variera à plusieurs niveaux :

- La nature du **phospholipide principal** sera modifiée afin d'évaluer l'impact de phospholipides saturés (semi-)synthétiques (DPPC, DSPC, HSPC ; Tableau 1, page 19) ainsi que de phospholipides d'origine naturelle (EPC, SPC ; Tableau 1, page 19), constitués de mélanges de phospholipides présentant des insaturations, sur l'aptitude des liposomes à encapsuler la dexaméthasone et à moduler sa vitesse de libération. Les phospholipides saturés présentent l'avantage de former des bicouches lipidiques dont la rigidité augmente avec la longueur des chaînes acyles (ex. DSPC > DPPC). Ils constitueraient ainsi une membrane plus stable, capable de ralentir la libération du principe actif encapsulé, mais aussi plus épaisse, ce qui favoriserait l'encapsulation de principes actifs lipophiles. À l'inverse, les phospholipides insaturés constituent des bicouches lipidiques plus souples, ce qui pourrait présenter un certain intérêt lors des futures études de pénétration des liposomes à travers la RWM. Ces phospholipides d'origine naturelle présentent généralement une bonne biocompatibilité [61,67,69].
- La présence de **Chol** (Figure 7, page 20) dans la bicouche lipidique pourrait aussi influencer l'encapsulation de la dexaméthasone et sa vitesse de libération. L'augmentation du pourcentage de Chol permettrait de rigidifier et stabiliser la membrane du liposome, limitant ainsi la fuite de la dexaméthasone encapsulée et générant une libération légèrement prolongée [68,73]. Sa présence dans la bicouche

lipidique pourrait toutefois réduire la capacité d'encapsulation des molécules actives lipophiles qui seraient susceptibles d'occuper le même espace [61,73].

- L'ajout d'un **phospholipide PEGylé**, le DSPE-PEG₂₀₀₀ (Figure 8, page 21), sera évalué pour son impact sur la structure des liposomes. En effet, l'ajout de DSPE-PEG₂₀₀₀ permet de réduire et d'homogénéiser la taille des liposomes [234], ce qui impacterait leur pénétration à travers la RWM. Les chaînes de PEG présentes à la surface de la particule sont responsables d'un effet de stabilisation stérique, limitant l'agrégation et la fusion des liposomes en cours de stockage [75]. Cet effet de stabilisation pourrait influencer la cinétique de libération de la dexaméthasone. Par ailleurs, le DSPE-PEG₂₀₀₀ serait responsable d'une pénétration facilitée à travers les membranes biologiques, telles que la RWM [235]. Cet aspect sera principalement investigué lors des études *in vitro* et *in vivo*.
- Enfin, l'incorporation d'un **lipide fusogénique**, le DOPE (Tableau 1, page 19), en faibles proportions dans la formulation des liposomes présente un intérêt qu'il conviendra également de démontrer au niveau des applications *in vitro* et *in vivo*. Le DOPE favoriserait l'échappement endosomal des liposomes après leur internalisation cellulaire, limitant ainsi la dégradation prématurée de leur structure ainsi que celle du principe actif encapsulé. Le DOPE améliorerait également le passage à travers la RWM en facilitant la fusion avec sa couche épithéliale externe [102,236]. Sa présence dans la formulation a toutefois tendance à rendre la bicouche lipidique plus souple et déformable, impactant ainsi son EE et la vitesse de libération de la dexaméthasone.

Par conséquent, les liposomes seront composés de :

- Phospholipide principal (EPC, DPPC, DSPC, SPC ou HSPC)
- DOPE (0 à 40 %mol)
- Chol (5 à 30 %mol)
- DSPE-PEG₂₀₀₀ (0 à 20 %mol)
- Lorsque la proportion de DOPE, Chol ou DSPE-PEG₂₀₀₀ augmente, le pourcentage molaire du phospholipide principal diminue proportionnellement.

Deux formes de dexaméthasone, la dexaméthasone et la DSP (Figure 21), ont été évaluées afin d'étudier l'influence des propriétés physico-chimiques du principe actif, notamment sa lipophilie et son hydrophilie, sur son EE dans les liposomes. La dexaméthasone est un corticostéroïde

PARTIE EXPÉRIMENTALE

lipophile, caractérisé par log P d'environ 1,83, traduisant une affinité supérieure pour les phases lipidiques [237]. Sa lipophilie et sa faible solubilité aqueuse (89 µg/mL) favorisent son incorporation au sein de la bicouche phospholipidique des liposomes et sa diffusion à travers les membranes biologiques [189]. En revanche, la dexaméthasone sous sa forme ionisée, la DSP, est très soluble dans l'eau (50 mg/mL) à pH physiologique, ce qui explique qu'elle soit régulièrement citée dans la littérature pour des applications thérapeutiques au niveau de l'oreille interne malgré son statut de prodrogue de la dexaméthasone. Elle présente ainsi un comportement hydrophile favorisant son encapsulation dans le compartiment aqueux des liposomes [162,189]. Cette différence de localisation de la DSP au sein des liposomes est ainsi susceptible d'influencer les valeurs d'EE. Cette hydrophilie pourrait également influencer l'aptitude de la molécule à diffuser efficacement à travers la RWM.

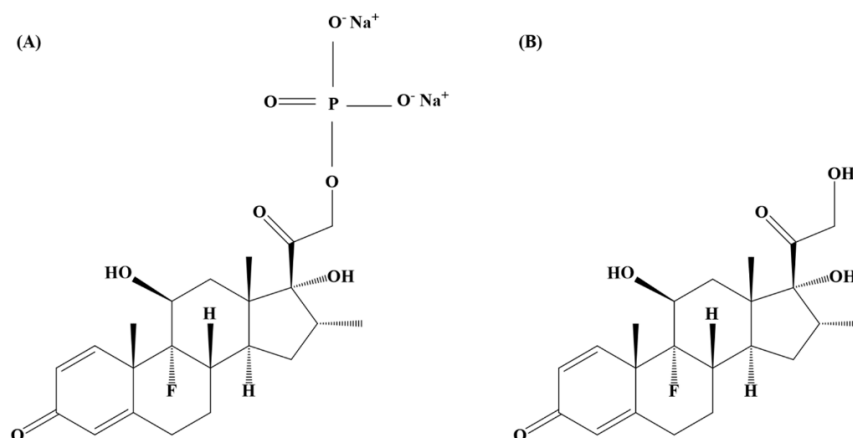


Figure 21 : Structures chimiques de la DSP (A) et de la dexaméthasone (B) [238].

Lors de cette étude, les caractéristiques physico-chimiques des liposomes seront évaluées. Une taille inférieure à 200 nm et un PdI inférieur à 0,30 sont notamment recherchés afin de favoriser la pénétration à travers la RWM et d'assurer la reproductibilité de l'effet thérapeutique [91,97,98]. Les constituants lipidiques sélectionnés ne présentant aucune charge de surface, la neutralité de la formulation est respectée. L'EE de la dexaméthasone sera également déterminée dans l'objectif d'obtenir les valeurs les plus élevées possibles. Enfin, le profil de libération de la dexaméthasone sera étudié afin d'identifier la composition lipidique la plus à même de prolonger sa libération.

Pour cette étude de *screening* de l'impact de la composition des liposomes sur l'EE et la vitesse de relargage de la dexaméthasone, les liposomes seront produits par TFH. Cette méthode comprend une étape d'extrusion des particules qui leur impose une taille inférieure à 200 nm et

un PdI relativement faible. La taille des liposomes ne sera donc pas systématiquement déterminée. Seules les formulations contenant différentes proportions de DSPE-PEG₂₀₀₀ feront l'objet de cette mesure, ce phospholipide étant susceptible de modifier la taille des liposomes malgré l'étape d'extrusion.

II.2. Matériel et méthodes

II.2.1. Matériel

L'acide 4-(2-hydroxyéthyl)-pipérazine-1-éthanesulfonique (HEPES), le glucose et le triton X-100 sont fournis par Sigma-Aldrich (Belgique). Le chlorure de sodium (NaCl), la dexaméthasone et la DSP proviennent de chez Fagron (Pays-Bas). Le Chol, l'EPC, la SPC, la HSPC, la DSPC, la DOPE, la DPPC, ainsi que la DSPE-PEG₂₀₀₀ sont fournis par Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, Etats-Unis). Le chlorure de potassium (KCl), chlorure de calcium (CaCl₂), chlorure de magnésium (MgCl₂), le bicarbonate de sodium (NaHCO₃), l'éthanol absolu, le tétrahydrofurane (THF) et l'acide phosphorique proviennent de chez VWR (Allemagne). L'eau ultrapure est produite à l'aide d'un système Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, Etats-Unis). L'acétonitrile et le méthanol, tous deux de grade HPLC, sont fournis par J.T. Baker (Etats-Unis).

II.2.2. Production des liposomes

Les liposomes ont été produits à une concentration en lipides totaux de 5 mM selon la méthode TFH, également appelée méthode de Bangham [65]. Pour ce procédé, des solutions stock de lipides ont été préparées dans de l'éthanol absolu. Un volume approprié de ces solutions a été introduit dans un ballon à fond rond, qui a ensuite été placé sur un évaporateur rotatif à 30°C sous vide pendant 1h (Büchi R200, BÜCHI Labortechnik GmbH, Pays-Bas). Le film lipidique obtenu a été réhydraté à l'aide de tampon HEPES (10 mM, pH 7,4, isotonique). Les liposomes ont ensuite été extrudés sous pression à trois reprises à travers des membranes en polycarbonate (Nucleopore®, Whatman, Royaume-Uni) présentant des pores de 0,4 µm, puis de 0,2 µm, afin d'obtenir des liposomes d'un diamètre inférieur à 200 nm.

II.2.3. Purification des liposomes

L'étape de purification des liposomes consiste à éliminer la fraction libre non encapsulée des molécules actives.

Les liposomes encapsulant de la dexaméthasone ont été purifiés par dialyse grâce à des membranes en cellulose de 20 kDa (Biotech CE Tubing, Spectra/Por®, Repligen, USA), plongées dans du tampon HEPES (10 mM, pH 7,4, isotonique) sous agitation (200 rpm) à 4°C. La purification de 1 mL de liposomes nécessite 20 mL de tampon HEPES. La durée totale de la dialyse est fixée à 5 heures et le tampon HEPES est renouvelé toutes les heures.

Les liposomes encapsulant de la DSP ont été purifiés par ultracentrifugation. Des tubes « Vivaspin® 2 PES – 10 kDa » (Sartorius, Allemagne) sont lavés avec 500 µL d'eau milli-Q, puis centrifugés 10 minutes à 6000g (angle fixe) et à 4°C (Centrifuge 5810 R, Eppendorf, Allemagne). Ensuite, 2 mL de liposomes non purifiés sont insérés et centrifugés pendant 2h aux mêmes conditions. Les liposomes sont repris dans 400 µL de tampon HEPES afin d'être lavés, puis sont centrifugés 1h supplémentaire. Le filtrat (DSP libre) est éliminé et les liposomes purifiés sont repris dans 2 mL de tampon HEPES.

II.2.4. Caractérisation des liposomes

II.2.4.1. Taille et PdI

La taille et le PdI des liposomes (5 mM) ont été mesurés par DLS. Ceux-ci ont été dilués 20 fois dans du tampon HEPES (10 mM, pH 7,4, isotonique) afin d'obtenir une concentration en particules adaptée à la mesure. Toutes les analyses ont été réalisées en triplicat à l'aide d'un Zetasizer® Nano ZS (Malvern Instruments, Royaume-Uni), à 25°C avec un angle fixe de 90°.

II.2.4.2. Efficacité d'encapsulation

La concentration en principe actif encapsulé a été quantifiée avant (C_t) et après (C_e) purification des liposomes. L'EE est ensuite calculée selon l'Équation 6 :

$$EE = \frac{C_e}{C_t} \times 100$$

Équation 6 : Formule de l'efficacité d'encapsulation. EE = efficacité d'encapsulation (%), C_e = concentration en principe actif encapsulé (µg/mL), C_t = concentration totale en principe actif (libre + encapsulé ; µg/mL).

II.2.4.3. Quantification des principes actifs par HPLC

La dexaméthasone et la DSP présentes dans les échantillons de liposomes ont été quantifiées à l'aide de méthodes HPLC validées. Les protocoles et résultats de validation sont respectivement

présentés dans les annexes I (section I, page 289) et II (section II, page 304). L'équipement utilisé était un système Agilent® 1100 (Santa Clara, États-Unis) doté du logiciel OpenLab CDS LC ChemStation (version C.01.05).

II.2.4.3.1. Dexaméthasone

Pour la dexaméthasone, la séparation chromatographique a été effectuée sur une colonne analytique LiChrospher® 100 RP-18 (250 × 4 mm, 5 µm ; Merck, Allemagne) munie d'une pré-colonne LiChroCART® RP-18 correspondante (4 × 4 mm, 5 µm ; Merck, Allemagne), en utilisant une phase mobile isocratique composée d'eau et d'acétonitrile (50:50, v/v), à un débit de 0,8 mL/min. La température de la colonne a été maintenue à 35°C. Les échantillons (10 µL) ont été injectés à température ambiante, avec un temps d'analyse de 8 minutes. La détection de la dexaméthasone a été réalisée à 242 nm, avec un temps de rétention de 4,9 minutes. Les droites de calibration ont été établies à partir de solutions standards préparées à des concentrations de 1, 10, 50 et 100 µg/mL dans de l'éthanol absolu. Les échantillons ont été dilués 10 fois dans de l'éthanol absolu avant analyse. Cette méthode a été validée avec succès à l'aide du logiciel Enoval® V3.0 (Arlenda, Liège, Belgique). Le risque α a été fixé à 5%, et les limites d'acceptation à 10%.

II.2.4.3.2. Dexaméthasone phosphate sodique

Pour la DSP, la séparation chromatographique a été effectuée sur une colonne analytique LiChrospher® 100 RP-18 (125 × 4 mm, 5 µm ; Merck, Allemagne) munie d'une pré-colonne LiChroCART® RP-18 correspondante (4 × 4 mm, 5 µm ; Merck, Allemagne), en utilisant une phase mobile isocratique composée d'eau milli-Q (520 mL), d'acide phosphorique (2 mL), de THF (36 mL) et de méthanol (364 mL) ajusté à pH 2,6 et à un débit de 1,0 mL/min. La température de la colonne a été maintenue à 30°C. Les échantillons (20 µL) ont été injectés à température ambiante, avec un temps d'analyse de 10 minutes. La détection de la dexaméthasone phosphate sodique a été réalisée à 242 nm, avec un temps de rétention de 6,8 minutes. Les droites de calibration ont été établies à partir de solutions standards préparées à des concentrations de 1, 10, 50 et 100 µg/mL dans la phase mobile. Les échantillons ont été dilués 2 fois dans du triton à 2,5%, puis 0 à 5 fois dans la phase mobile avant analyse. Cette méthode a été validée avec succès à l'aide du logiciel Enoval® V3.0 (Arlenda, Liège, Belgique). Le risque α a été fixé à 5%, et les limites d'acceptation à 5%.

II.2.4.4. Etude de la cinétique de libération de la dexaméthasone encapsulée

Les liposomes encapsulant de la dexaméthasone ou de la DSP sont insérés dans une membrane de dialyse en cellulose de 20 kDa (Biotech CE Tubing, Spectra/Por®, Repligen, USA), puis placés dans un flacon de 100 mL. La membrane est immergée dans de la périlymphe artificielle (pH 7,4) à raison de 20 mL de périlymphe pour 1 mL de liposomes (conditions sink). Le flacon, fermé pour prévenir l'évaporation, est placé dans un bain agitant (200 rpm) à 37°C. Des aliquotes de liposomes sont prélevés dans la membrane à des temps prédéterminés, puis analysés par HPLC pour établir le profil de libération de la formulation.

La périlymphe artificielle est composée de NaCl (137 mM), KCl (5 mM), CaCl₂ (2 mM), MgCl₂ (1 mM), NaHCO₃ (1 mM) et de glucose (11 mM), avec un pH ajusté à 7,4. Cette solution est ensuite stérilisée par filtration à travers une membrane dont la taille des pores est de 0,22 µm, sous un poste de sécurité microbiologique.

II.2.4.5. Analyse statistique

L'analyse des données a été réalisée à l'aide du logiciel GraphPad Prism (version 8.4.3, La Jolla, CA, États-Unis). Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± écart-type (SD). Les différences statistiques entre les groupes ont été évaluées à l'aide d'une ANOVA à un facteur, suivie d'un test de comparaisons multiples de Tukey (Tableau 3) ou de Dunnett (Figure 22). Pour la Figure 22A-B, à 2,5 h, lorsque seules deux conditions doivent être comparées, un t-test non apparié a été utilisé. Pour la Figure 23, une ANOVA à un facteur, suivie d'un test de comparaisons multiples de Dunnett, a permis la comparaison des formulations encapsulant la dexaméthasone, tandis qu'un t-test non apparié a été réalisé pour la comparaison des groupes « Dexa » et « DSP » pour chaque formulation. Une p-valeur < 0,05 est considérée statistiquement significative. Les différences non significatives sont indiquées par « ns ».

II.3. Résultats et discussion

II.3.1. Évaluation de l'impact de la composition lipidique des liposomes sur leur taille, ainsi que l'encapsulation et la libération de la dexaméthasone

Impact de la proportion de Chol

Le pourcentage de Chol dans les formulations a varié de 5 à 30% (Tableau 3A), ces proportions étant régulièrement rencontrées dans la littérature [61,73], tandis que le lipide principal (EPC), les pourcentages de DOPE (0%) et de DSPE-PEG₂₀₀₀ (5%) étaient fixes. Le Tableau 3 montre que l'EE tend à diminuer significativement ($****p < 0,0001$) lorsque le pourcentage de Chol augmente de 10 à 30%. Ceci peut s'expliquer par la similarité de structure entre le Chol et la dexaméthasone, possédant tous deux un noyau stérol, qui pourrait engendrer un effet de compétition entre les deux molécules souhaitant occuper le même espace dans la bicouche lipidique des liposomes [113]. Par conséquent, l'EE de la dexaméthasone serait plus élevée aux pourcentages en Chol les plus faibles. Les profils de libération de la dexaméthasone (Figure 22A) ont été obtenus dans des conditions *in vitro* se rapprochant des conditions *in vivo*, c'est-à-dire en utilisant de la périlymphe artificielle maintenue à 37°C comme milieu receveur. Ces profils montrent également que les formulations de liposomes contenant les proportions les plus faibles en Chol (5 et 10%) libèrent plus lentement la dexaméthasone. En effet, après une heure de contact avec la périlymphe, les liposomes contenant 20 ou 30% de Chol libèrent environ 85% de la dexaméthasone encapsulée, tandis que ceux contenant 5 ou 10% de Chol n'en libèrent qu'environ 68%. Une proportion de 5 ou 10% de Chol semble donc favorable à l'encapsulation de la dexaméthasone tout en réduisant légèrement sa cinétique de libération.

Impact de la nature du phospholipide principal

Le Tableau 3B montre que les lipides saturés (DSPC, DPPC et HSPC) présentent une EE significativement plus faible que celle des insaturés (SPC ou EPC ; EPC vs DPPC : $*p = 0,0170$; EPC vs DSPC : $**p = 0,0050$; EPC vs HSPC : $*p = 0,0299$; SPC vs DPPC : $**p = 0,0065$; SPC vs DSPC : $**p = 0,0021$; SPC vs HSPC : $*p = 0,0109$). Cette diminution pourrait s'expliquer par la formation d'une bicouche lipidique plus ordonnée et plus rigide en présence de ces lipides saturés, ce qui pourrait réduire l'affinité de la dexaméthasone pour la membrane lipidique, contribuant ainsi à la baisse de l'EE observée par rapport à l'EPC ou au SPC, dont les chaînes

insaturées confèrent aux liposomes une membrane plus fluide (Tableau 3B ; Figure 22B) [113]. L'EPC et la SPC présentent non seulement les EE les plus élevées, mais aussi une cinétique de libération légèrement plus lente. En effet, après une heure de contact avec la périlymphe, les liposomes contenant de l'EPC libèrent $64,4 \pm 0,3\%$ de dexaméthasone alors que ceux contenant du DSPC en libèrent $83,9 \pm 0,2\%$. La rigidité de la bicouche à base de lipides saturés pourrait être à l'origine d'une tension accélérant la fuite de dexaméthasone, par rapport à l'EPC qui génère une membrane plus souple. De plus, bien que les EE de l'EPC et du SPC soient proches (Tableau 3B ; ns, $p = 0,8567$), l'EPC semble donner un meilleur profil de libération (Figure 22B ; après 1h, EPC vs SPC : **** $p < 0,0001$).

Impact de la proportion de DSPE-PEG₂₀₀₀

Comme mentionné précédemment, tous les liposomes produits dans cette étude présentent une taille proche ou inférieure à 200 nm, imposée par l'étape d'extrusion réalisée au cours de leur production. La variation de la proportion de DSPE-PEG₂₀₀₀ (0, 5, 10 ou 20%) dans la formulation est la seule modification de la composition lipidique ayant eu un impact important sur la taille des liposomes, au-delà de l'effet imposé par l'étape d'extrusion. En effet, l'ajout de 5% de DSPE-PEG₂₀₀₀ tend à diminuer la taille des liposomes d'environ 44 nm par rapport à leur équivalent sans DSPE-PEG₂₀₀₀ (**** $p < 0,0001$; Tableau 3C). Ces liposomes de taille réduite pourraient donc présenter une pénétration facilitée à travers la RWM [235]. La formulation contenant 5% de DSPE-PEG₂₀₀₀ présente également le meilleur profil de libération de la dexaméthasone (Figure 22C). En effet, après une heure de contact avec la périlymphe, les liposomes contenant 5% de DSPE-PEG₂₀₀₀ libèrent $64,4 \pm 0,3\%$ de dexaméthasone, alors que ceux qui ne contiennent pas de DSPE-PEG₂₀₀₀ en libèrent $76,3 \pm 1,3\%$. Augmenter le pourcentage de DSPE-PEG₂₀₀₀ de 5 à 20% a permis de réduire davantage la taille des liposomes, mais a également entraîné une libération légèrement plus rapide (Figure 22C ; après 1h, DSPE-PEG₂₀₀₀ 5% vs 20% : *** $p = 0,0002$). Ceci pourrait s'expliquer par la géométrie amphiphile volumineuse du DSPE-PEG₂₀₀₀, pouvant être assimilé à une structure conique. Lorsqu'il est ajouté en faible proportion (5%) dans la formulation, les chaînes acyles saturées du DSPE-PEG₂₀₀₀ peuvent limiter localement la mobilité des lipides et ralentir la sortie de la dexaméthasone, par rapport à la formulation qui n'en contient pas. Toutefois, lorsque sa concentration augmente à 20%, l'encombrement stérique des chaînes de PEG et la forte courbure imposée à la bicouche peuvent localement générer des défauts dans son organisation lipidique, ce qui pourrait favoriser une augmentation de la perméabilité membranaire et accélérer la fuite de la dexaméthasone hors du liposome [239,240]. Par ailleurs, aucune différence significative entre les EE des formulations à 0, 5, 10 ou 20% de DSPE-PEG₂₀₀₀

PARTIE EXPÉRIMENTALE

n'a été observée. Lors des prochaines expérimentations, le DSPE-PEG₂₀₀₀ sera donc maintenu à la concentration de 5% afin de bénéficier de la réduction de la taille et d'un profil de libération légèrement amélioré.

Tableau 3 : Évaluation de l'impact de la composition lipidique sur l'EE (%) de la dexaméthasone (A – D), et sur la taille des liposomes (C). A chaque étape, trois paramètres sont fixés, tandis que le quatrième est modifié pour permettre l'évaluation de son impact (n = 3 ; moyenne ± SD). Les pourcentages représentent la proportion molaire du lipide par rapport aux lipides totaux. Les paramètres retenus à la fin de chaque étape sont mis en évidence par des caractères gras soulignés.

Paramètres fixes		Paramètre variable				
A	Lipide : EPC DOPE : 0% DSPE-PEG ₂₀₀₀ : 5%	5% Chol	<u>10% Chol</u>	20% Chol	30% Chol	
	EE (%)	27,1 ± 1,2	27,0 ± 1,3	15,0 ± 3,4	7,9 ± 0,8	
B	DOPE : 0% Chol : 10% DSPE-PEG ₂₀₀₀ : 5%	<u>EPC</u>	DPPC	DSPC	SPC	HSPC
	EE (%)	27,0 ± 1,3	20,2 ± 1,3	18,4 ± 0,3	28,3 ± 2,7	20,9 ± 0,1
C	Lipide : EPC DOPE : 0% Chol : 10%	0% DSPE-PEG ₂₀₀₀	<u>5% DSPE-PEG₂₀₀₀</u>	10% DSPE-PEG ₂₀₀₀	20% DSPE-PEG ₂₀₀₀	
	EE (%)	22,3 ± 1,9	27,0 ± 1,3	22,7 ± 3,1	25,1 ± 4,7	
	Taille (nm)	206,7 ± 4,5	163,1 ± 1,0	163,4 ± 3,5	137,4 ± 0,5	
D	Lipide : EPC Chol : 10% DSPE-PEG ₂₀₀₀ : 5%	<u>0% DOPE</u>	10% DOPE	20% DOPE	30% DOPE	40% DOPE
	EE (%)	27,0 ± 1,3	25,4 ± 0,3	22,7 ± 0,3	24,6 ± 0,8	21,4 ± 0,6

PARTIE EXPÉRIMENTALE

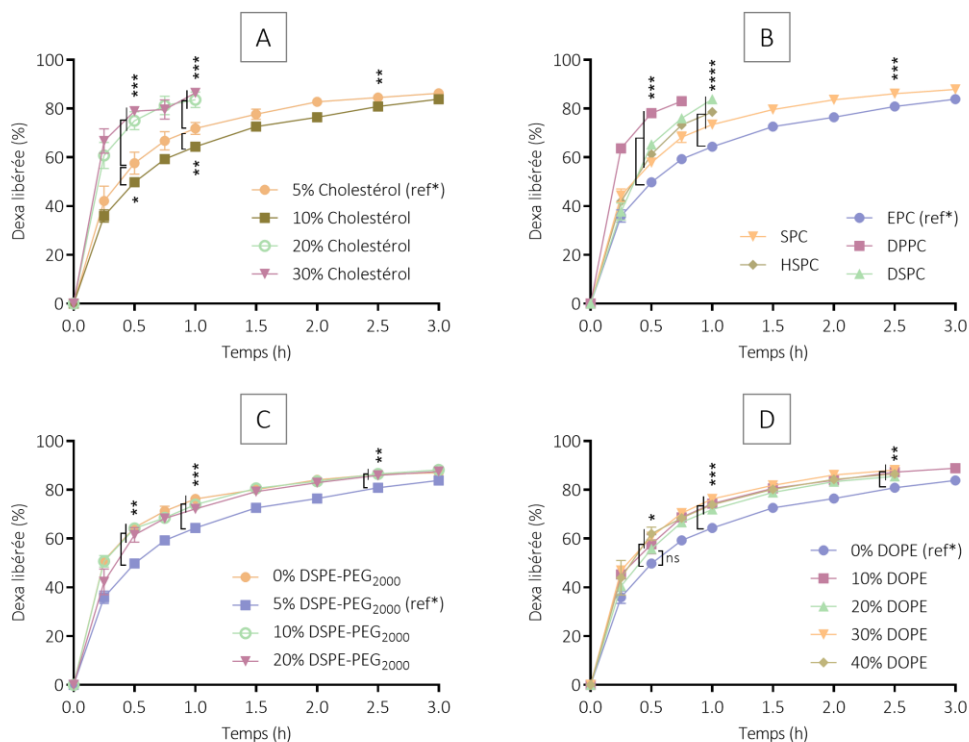


Figure 22 : Profils de libération de la dexaméthasone en fonction du temps et de la composition lipidique des liposomes. Le pourcentage en Chol (A), la nature du lipide principal (B), ainsi que les pourcentages en DSPE-PEG₂₀₀₀ (C) et en DOPE (D) ont été modifiés pour évaluer leur impact sur la cinétique de libération. Les significativités (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$), évaluées après 0,5, 1 et 2,5 heures de test, caractérisent la différence entre chaque condition et la référence (ref*) mentionnée sur chaque graphique ($n = 3$; moyenne $\pm$ SD). Les différences non significatives ($p > 0,05$) sont indiquées par « ns ».

Impact du lipide fusogénique

L'ajout de DOPE dans la formulation (10 à 40%) accélère légèrement la libération de la dexaméthasone par rapport au contrôle (0% DOPE), bien que l'effet global semble limité (Figure 22D). En effet, après une heure de contact avec la périlymphe, les liposomes contenant 10% de DOPE libèrent $74,4 \pm 1,3\%$ de dexaméthasone alors que ceux ne contenant pas de DOPE en libèrent $64,4 \pm 0,3\%$. Cette tendance est également observée en présence de 20, 30 et 40% de DOPE. L'EE, en revanche, tend à diminuer (** $p = 0,0029$) lorsque le pourcentage de DOPE passe de 0 à 40% (Tableau 3D).

À l'issue de cette étude, plusieurs variations de la composition lipidique se sont révélées favorables à l'amélioration de l'EE de la dexaméthasone. Les formulations les plus performantes

étaient caractérisées par une faible teneur en Chol (5 à 10 %mol), l'emploi d'EPC ou de SPC comme phospholipide principal, ainsi que l'absence de DOPE.

Certaines modifications de la composition lipidique, notamment l'utilisation d'une faible teneur en Chol (5 à 10 %mol), d'EPC comme phospholipide principal, de 5 %mol de DSPE-PEG₂₀₀₀ et l'absence de DOPE, ont permis de prolonger modestement la libération de la dexaméthasone. Néanmoins, aucune des formulations testées n'a induit un effet de libération prolongée marqué, puisque la majorité du principe actif a été relarguée dans les trois premières heures du test. Enfin, bien que les liposomes produits aient subi une étape d'extrusion, la présence de 5 à 20% de DSPE-PEG₂₀₀₀ permet de réduire la taille des liposomes d'environ 44 à 69 nm.

II.3.2. Evaluation de l'impact de la composition lipidique des liposomes sur l'encapsulation de la dexaméthasone phosphate sodique

La Figure 23 compare les EE de la dexaméthasone et de la DSP dans des liposomes de composition similaire. Lorsque les liposomes contiennent 10% de Chol, la dexaméthasone présente une EE largement supérieure à celle de la DSP ($27,0 \pm 1,3\%$ et $7,1 \pm 0,3\%$ respectivement : **** $p < 0,0001$). En revanche, lorsque le pourcentage de Chol augmente à 30%, cette différence disparaît.

Comme expliqué dans la section II.3.1 (page 110), l'effet de compétition entre la dexaméthasone et le Chol pour occuper l'espace au sein de la bicouche lipidique est à l'origine d'une diminution de l'EE. La DSP ne suit pas cette tendance et conserve une EE stable (ns, $p = 0,8253$) puisque, étant hydrophile, elle se localise probablement préférentiellement dans la cavité aqueuse du liposome et n'entrerait donc pas en compétition avec le Chol.

La modification de la nature du phospholipide principal de la formulation n'a pas permis d'identifier une composition favorable à l'encapsulation de la DSP (Figure 23), puisqu'aucune différence significative n'a été observée entre les formulations contenant de l'EPC, de la DSPC ou de la DPPC. La même observation peut être faite concernant l'influence du pourcentage de DSPE-PEG₂₀₀₀ sur l'EE de la formulation. En effet, les résultats montrent que la DSP est systématiquement moins bien encapsulée que la dexaméthasone, et que la valeur d'EE ne dépasse jamais 12%. Ceci pourrait s'expliquer à la fois par le faible volume de la cavité aqueuse des liposomes présentant des tailles inférieures à 200 nm, mais également par l'importance de la phase aqueuse externe,

PARTIE EXPÉRIMENTALE

limitant l'attrait de la DSP pour l'encapsulation. La quantité de DSP introduite lors de la production, ainsi que l'absence de chargement actif, pourraient également contribuer à limiter l'EE [241].

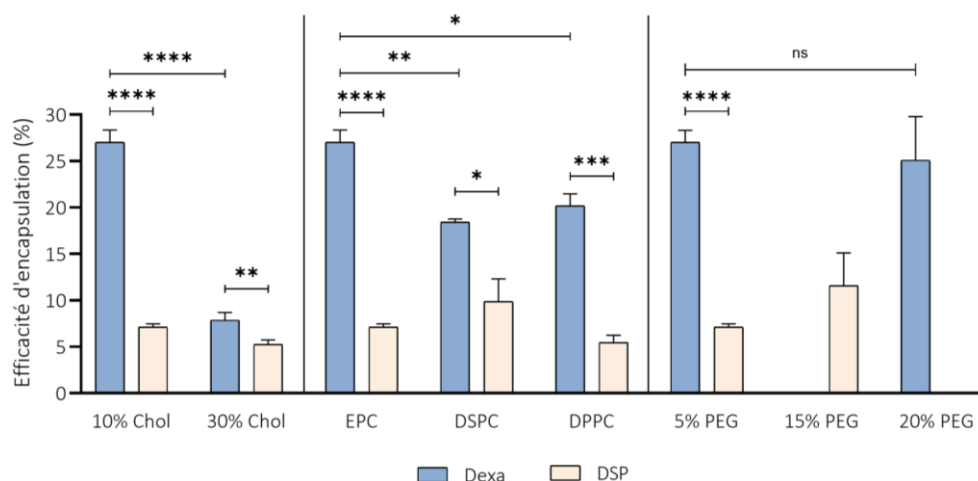


Figure 23 : Comparaison des EE (%) des liposomes encapsulant la dexaméthasone (Dexa) ou la DSP en fonction de leur pourcentage de Chol, de la nature du phospholipide principal et du pourcentage de DSPE-PEG₂₀₀₀ (n = 3 ; moyenne ± SD ; *p < 0,05 ; **p < 0,01 ; ***p < 0,001 ; ****p < 0,0001). Les différences non significatives (p > 0,05) sont indiquées par « ns ».

Globalement, l'EE de la DSP ne semble pas être influencée par la modification de la composition lipidique des liposomes. Elle ne dépasse jamais 12%, ce qui limite sa capacité à atteindre les concentrations thérapeutiques requises dans l'oreille interne, et imposerait dès lors l'injection de plus grands volumes de liposomes.

II.4. Conclusion

Au terme de cette étude évaluant l'impact de la composition des liposomes sur les propriétés d'encapsulation et de libération de la dexaméthasone, la forme non ionisée apparaît comme le candidat le plus pertinent pour obtenir des taux d'encapsulation permettant d'atteindre la concentration thérapeutique requise dans l'oreille interne en injectant un volume de liposomes le plus faible possible. En effet, l'EE de la DSP demeure inférieure à 12%, alors que celle de la dexaméthasone peut atteindre 27%.

Le choix de la dexaméthasone implique toutefois l'utilisation d'une faible proportion de Chol (5 à 10%) dans la formulation des liposomes afin de limiter l'effet de compétition pour l'espace au sein de la bicouche lipidique et de maximiser l'EE. En dehors de ce facteur déterminant, les autres

PARTIE EXPÉRIMENTALE

paramètres étudiés n'ont pas montré d'impact majeur sur la taille des liposomes, leur EE ou leur cinétique de libération de la dexaméthasone. Si cela n'a pas permis d'améliorer les caractéristiques physico-chimiques des liposomes, cela représente toutefois un avantage pour les futures expérimentations, puisque seul le pourcentage de Chol sera contraignant. Dans la seconde partie de ce chapitre, la biocompatibilité des autres constituants lipidiques sera évaluée afin de sélectionner une composition de liposomes prometteuse en vue d'une administration *in vivo*.

Par ailleurs, la modification de la composition lipidique ne permettant pas de prolonger suffisamment la libération de la dexaméthasone, d'autres stratégies devront être envisagées, notamment l'incorporation des liposomes dans un hydrogel afin de permettre un relargage plus progressif du principe actif.

III. **Partie 2** – Développement d’une formulation injectable combinant hydrogel thermosensible, liposomes et dexaméthasone afin de traiter les surdités neurosensorielles liées à un traumatisme sonore

III.1. Introduction

La voie d’administration TT, qui consiste à déposer une formulation thérapeutique dans la cavité de l’oreille moyenne, présente divers avantages dans le contexte des surdités neurosensorielles. Cette approche locale permet notamment de contourner la barrière hémato-labyrinthique et favorise l’accès des nanomédicaments ou des molécules actives libres à l’organe de Corti par diffusion à travers la RWM [53].

Les liposomes développés dans la première partie de ce chapitre n’ayant pas permis d’obtenir une véritable libération prolongée de la dexaméthasone, leur utilisation nécessiterait donc des administrations TT répétées. Or, ces injections peuvent être associées à des douleurs, à un inconfort, à des vertiges transitoires, ainsi qu’à un risque de perforation tympanique persistante lorsqu’elles sont réalisées de manière répétée [242].

Afin de limiter ces contraintes, il apparaît nécessaire d’adapter la stratégie thérapeutique en associant ces liposomes à un hydrogel capable de prolonger la libération de la dexaméthasone et, par conséquent, de réduire la fréquence des injections TT. Par ailleurs, l’utilisation d’un hydrogel devrait limiter l’écoulement de la formulation vers la trompe d’Eustache, augmentant ainsi son temps de résidence au niveau de la RWM [45,124,128]. Cette propriété est susceptible de favoriser la diffusion des composés dans les fluides cochléaires et d’améliorer leur accès aux structures sensorielles de l’oreille interne. Dans cette optique, il convient de développer et caractériser une formulation d’hydrogel afin de prolonger le temps de résidence et la libération de la dexaméthasone dans l’oreille moyenne.

Pour répondre à ce premier objectif, un hydrogel à base de P407 a été sélectionné en raison de ses propriétés thermosensibles. Liquide à température ambiante, il peut être facilement administré à l’aide d’une aiguille de calibre 30G, couramment utilisée pour les injections TT, avant de gélifier rapidement à température physiologique (37°C) dans la cavité de l’oreille moyenne [132,134]. Étant donné que le patient doit rester en position de décubitus latéral jusqu’à la gélification complète de la formulation, un temps de gélification inférieur à 15 minutes est recherché afin de réduire cette contrainte. Cette partie du travail vise donc à caractériser les

propriétés rhéologiques de la formulation d'hydrogel dispersant des liposomes encapsulant de la dexaméthasone, puis à évaluer la cinétique de libération du corticostéroïde à partir de l'hydrogel seul ou du système combiné hydrogel-liposomes.

Les liposomes utilisés dans cette deuxième partie de chapitre ont été produits par la méthode PGSS à la concentration de 45 mM en lipides totaux. Le transfert de la méthode TFH à la méthode PGSS sera abordé dans le 3^{ème} chapitre (page 203). Les principales différences de structure observées pour les liposomes produits par la méthode PGSS, par rapport à la méthode TFH utilisée en première partie de chapitre, sont une taille de particule et une lamellarité plus hétérogènes, bien que la taille moyenne se maintienne sous le seuil des 200 nm, ainsi qu'une EE supérieure, principalement due à l'augmentation de la concentration lipidique.

Le deuxième objectif de cette partie consiste à étudier la biocompatibilité de cette formulation combinée sur la lignée HEI-OC1 modélisant les cellules ciliées de l'oreille interne, puis *ex vivo* sur des explants cochléaires murins. Le troisième objectif consiste à tester l'efficacité otoprotectrice de la formulation sur des explants cochléaires placés en conditions excitotoxiques.

Cette étude a fait l'objet d'un article de recherche intitulé « Development of a thermosensitive hydrogel containing liposomes for sustained dexamethasone delivery in sensorineural hearing loss », publié en 2026 dans *International Journal of Pharmaceutics* (Ed. Elsevier). Cet article est disponible à la section III.2.2 du premier chapitre (page 122).

III.2. Résultats publiés

III.2.1. Résumé des résultats

Huit formulations de liposomes, L1 à L8, différant par la nature et la proportion des phospholipides, ont été produites afin d'étudier l'influence de la composition lipidique des liposomes sur leur biocompatibilité avec la lignée cellulaire HEI-OC1, modélisant les cellules ciliées cochléaires.

Les différentes compositions lipidiques étudiées comprennent notamment de l'EPC, du DPPC ou du DSPC, afin d'évaluer l'impact de l'origine du lipide (naturelle/synthétique) et de la fluidité membranaire sur la biocompatibilité des liposomes [243,244]. L'impact du DOPE a également été évalué, puisqu'il pourrait être intéressant, *ex vivo* et *in vivo*, pour faciliter la pénétration de la RWM [236]. Enfin, bien que le DSPE-PEG₂₀₀₀ ait été incorporé dans toutes les formulations pour

son rôle stabilisateur, l'impact de sa proportion sur la biocompatibilité des liposomes sera également étudié [235,245,246]. En effet, l'évaluation de cette biocompatibilité constitue une étape essentielle de cette étude, car elle permettra d'identifier les formulations de liposomes les mieux tolérées, condition indispensable pour une étude d'efficacité *ex vivo* puis *in vivo*.

Les liposomes possèdent tous une taille inférieure à 200 nm (moyenne L1 – L8 : $159,5 \pm 14,9$ nm) qui devrait être favorable à leur passage à travers la RWM. L'EE de la dexaméthasone se situait entre 65 et 80 %, indépendamment de la composition lipidique.

Bien que les phospholipides soient généralement considérés comme biocompatibles, plusieurs formulations ont présenté une cytotoxicité concentration-dépendante sur les cellules HEI-OC1. La présence d'insaturations au niveau des chaînes acyles des phospholipides serait ainsi susceptible de conduire à la formation de produits d'oxydation, capables d'altérer les membranes cellulaires. Ce phénomène expliquerait notamment la baisse de la viabilité cellulaire observée en présence d'EPC [108,247]. À l'inverse, la saturation des chaînes acyles limiterait la formation de produits d'oxydation ainsi que leur impact sur la viabilité cellulaire. Cette hypothèse est notamment étayée par la biocompatibilité observée avec la DSPC. Par ailleurs, l'hétérogénéité membranaire générée par l'insertion de DSPE-PEG₂₀₀₀, présentant une structure conique, dans la bicouche lipidique est susceptible de déclencher une réponse de stress cellulaire et donc une certaine cytotoxicité lorsqu'il est présent à concentration élevée (15%) [239].

En revanche, la présence de DOPE semble améliorer la biocompatibilité des formulations. Grâce à ses chaînes insaturées, le DOPE augmente la fluidité et la déformabilité de la bicouche lipidique, ce qui pourrait limiter les interactions délétères avec les membranes cellulaires. Par ailleurs, ses propriétés fusogéniques sont susceptibles de favoriser les interactions entre les liposomes et les cellules, ainsi que leur internalisation [236].

A l'issue de cette étude, les liposomes L5, composés de DSPC/Chol/DSPE-PEG₂₀₀₀ dans les proportions 85/10/5 %mol, ont été identifiés comme une composition prometteuse.

Une formulation d'hydrogel à 16,25% m/v de P407 a ensuite été développée. Celle-ci présente un pH physiologique ainsi qu'une osmolalité de $260 \pm 10,2$ mOsm/kg, qui n'est pas affectée par la présence de liposomes dans la formulation. Le comportement rhéologique de la formulation combinée hydrogel-liposomes-dexaméthasone (H_L5_Dexa) a été étudié dans des conditions simulant une injection à travers une aiguille de 30G à un débit de 0,1 mL/min. La formulation a présenté un comportement newtonien, démontrant que la contrainte mécanique induite par

L'injection n'altère pas durablement sa structure. Une seconde étude a permis d'étudier l'évolution de la viscosité du gel au cours du temps dans des conditions de température mimant son injection (20°C) puis sa résidence dans l'oreille moyenne (37°C). Quatre phases distinctes ont été observées. Lors de la première phase, H_L5_Dexa est maintenu à 20°C, température à laquelle il demeure à l'état liquide et présente une viscosité constante. Lors de l'augmentation de la température à 37°C afin de simuler les conditions d'injection, la viscosité augmente progressivement, traduisant la micellisation du polymère (phase 2). Cette augmentation s'accroît ensuite lorsque les micelles s'organisent en un réseau structuré (phase 3). Une fois ce réseau complètement établi, l'hydrogel atteint son état gélifié et la viscosité se stabilise sous la forme d'un plateau correspondant à son organisation structurale finale (phase 4). Enfin, une dernière étude rhéologique a permis de déterminer un temps de gélification de $8,0 \pm 3,8$ min à 37°C et de $11,5 \pm 3,5$ min à 36°C. Ces résultats indiquent qu'après l'injection, la formulation gélifie relativement rapidement, ce qui limite sa clairance via la trompe d'Eustache.

La cinétique de libération de la dexaméthasone à 37°C a ensuite été comparée à partir d'une solution, d'un hydrogel et du système combiné hydrogel-liposomes. Comme attendu, la solution a présenté un profil de libération rapide, avec $53,4 \pm 1,4$ % de la dexaméthasone libérés après seulement 6h. À l'inverse, l'hydrogel a montré une libération plus lente et plus soutenue, avec seulement $33,8 \pm 5,0$ % de dexaméthasone libérés après 24h. En effet, malgré sa faible masse molaire (392,5 g/mol), la dexaméthasone peut être transitoirement retenue dans le réseau micellaire avant de diffuser vers le milieu extérieur. Au contact du milieu de libération, l'hydrogel absorbe progressivement le fluide environnant, entraînant sa dilution, la déstabilisation progressive de la structure micellaire ainsi que son érosion graduelle, contribuant ainsi à une libération prolongée du principe actif [248]. Bien que l'hydrogel permette déjà de ralentir la libération de la dexaméthasone, le système H_L1_Dexa accentue davantage cet effet, avec seulement $17,4 \pm 0,8$ % de dexaméthasone libérés après 24h. L'incorporation des liposomes apporte donc un avantage significatif en combinant leurs propriétés intrinsèques de libération prolongée à une rétention accrue au sein du réseau polymérique de P407, qui stabiliserait les nanovecteurs et retarderait davantage la libération de la dexaméthasone. Par ailleurs, l'effet de libération prolongée démontré par les liposomes est probablement attribuable à leur structure multilamellaire ou multivésiculaire, qui impose à la dexaméthasone de traverser plusieurs bicouches lipidiques avant d'être libérée. Cette structure est due à la méthode de production des liposomes, puisque le procédé PGSS utilisant le scCO₂ ne comprend pas d'étape d'extrusion.

Enfin, la biocompatibilité de la formulation H_L5_Dexa a été évaluée sur des explants cochléaires. La comparaison des densités de cellules ciliées a révélé une perte significative des cellules ciliées internes et externes uniquement dans les régions médianes des explants exposés à la formulation H_L5_Dexa contenant 33 µg/mL de dexaméthasone. Ces résultats suggèrent une légère toxicité de la formulation à cette concentration élevée de dexaméthasone, bien que cet effet ne soit pas suffisamment marqué pour être observé de manière homogène dans l'ensemble de la cochlée. En revanche, l'absence de toxicité observée avec la formulation H_L5_Dexa contenant 40 ng/mL de dexaméthasone indique que celle-ci est biocompatible aux concentrations thérapeutiques attendues dans l'oreille interne.

L'effet otoprotecteur de ce traitement a ensuite été évalué sur des explants cochléaires placés dans des conditions excitotoxiques visant à reproduire la libération chronique de glutamate par les cellules ciliées internes observée lors d'une exposition au bruit *in vivo* [249,250]. Les résultats montrent que la formulation H_L5_Dexa exerce un effet protecteur lorsqu'elle est appliquée directement sur les explants, en préservant les synapses des cellules ciliées des dommages induits par l'excitotoxicité. Cet effet est particulièrement marqué au niveau du tour basal de la cochlée, mais est également observé au niveau des points présynaptiques des cellules ciliées externes apicales ainsi qu'au niveau des points postsynaptiques des cellules ciliées internes et externes. Ces résultats ont été obtenus en collaboration avec le Dr. Nicholas Cole, chercheur post-doctorant dans le laboratoire de neurobiologie du développement (GIGA-Neurosciences).

III.2.2. Publication

Development of a thermosensitive hydrogel containing liposomes for sustained dexamethasone delivery in sensorineural hearing loss

Chloé Gauthy^a, Nicholas Cole^b, Enes Spahic^b, Raphaël Closset^c, Erika Hendrickx^d, Louise Conrard^d, Yasmina Bodadi^a, Hugo Magdalena Segura^a, Valentin Tallandier^b, Pierre-Bernard Van Lerberghe^b, Laurence Collard^a, Noémie Penoy^a, Frédéric Boschini^c, Brigitte Evrard^a, Laurence Delacroix^b, Brigitte Malgrange^{b,1}, Géraldine Piel^{a,*,1}

^a Laboratory of Pharmaceutical Technology and Biopharmacy, CIRM, University of Liège. CHU Sart-Tilman, Liège, Belgium

^b Developmental Neurobiology Laboratory, GIGA-Stem cells, University of Liège. CHU Sart-Tilman, Liège, Belgium

^c GREENMat, Institute of Chemistry, University of Liège. Sart-Tilman, Liège, Belgium

^d Center for Microscopy and Molecular Imaging (CMMI), Université Libre de Bruxelles (ULB), Gosselies, Belgium

* Corresponding author: Geraldine.piel@uliege.be

¹ These authors contributed equally to this work.

International Journal of Pharmaceutics, 2026; 697: 126847

DOI: 10.1016/j.ijpharm.2026.126847

KEYWORDS

Liposomes, Thermosensitive hydrogel, Cochlear explants, Transtympanic injection, NIHL, Otoprotection

ABSTRACT

Dexamethasone-loaded liposomes composed of DSPC/Chol/PEG (85/10/5 mol%) and dispersed in a 16.25% Poloxamer 407 (P407) hydrogel were developed as a local therapeutic strategy for sound trauma-induced sensorineural hearing loss (SNHL). Physicochemical and rheological characterization demonstrated that the formulation remains injectable at room temperature and

undergoes rapid *in situ* gelation within 8.0 ± 3.8 minutes in the middle ear cavity at 37°C. Incorporation of liposomes into the 16.25% P407 hydrogel significantly prolonged the *in vitro* release of encapsulated dexamethasone compared to the free drug solution. Cryogenic transmission electron microscopy (cryo-TEM) revealed multilamellar and multivesicular liposomal vesicles, consistent with sustained release behavior. The formulation was well tolerated by HEI-OC1 cells and cochlear explants and conferred a significant otoprotective effect, as evidenced by preservation of synaptic surface area following kainic acid-induced excitotoxic injury.

III.2.2.1. Introduction

Sensorineural hearing loss (SNHL) arises from degeneration or dysfunction of cochlear hair cells and/or spiral ganglion neurons, leading to impaired transmission of sound to the brain [251]. This degeneration may result from aging, genetic mutations, prolonged noise exposure, head or ear trauma, or ototoxic drugs [252,253]. Currently, no curative treatment is available. Only prosthetic solutions such as hearing aids or cochlear implants, which require surgical intervention, can improve hearing [254,255]. For sudden SNHL, clinical guidelines generally recommend oral corticosteroid therapy at a daily dose of 10 mg dexamethasone to limit inflammation and cellular damage [256,257]. Innovative therapeutic approaches are therefore needed to target and protect cochlear cells and to restore auditory signal transmission [258]. However, drug delivery to these cells remains challenging because of their deep location within the temporal bone and the associated anatomical barriers [128,259]. Transtympanic (TT) injection constitutes an attractive alternative route of administration, as drugs, such as dexamethasone, need to cross only the round window membrane (RWM) – the sole barrier – to reach the inner ear.

However, TT injection also presents limitations, including rapid clearance of the drug from the middle ear cavity, variability in RWM permeability, and the risk of insufficient drug reaching the cochlea due to anatomical differences among patients. These constraints highlight the need for drug encapsulation strategies to sustain the drug release and improve RWM penetration [117,260]. Moreover, because effective therapy requires sustained and long-term delivery to cochlear tissues, the development of hydrogel-based formulations is essential to ensure prolonged residence time in the middle ear and controlled drug release.

Nanoparticle-based systems – including liposomes, polymeric nanoparticles, and lipid–polymer hybrids – offer improved drug stability, enhanced penetration across the RWM, and tunable release kinetics that depend on their composition [71,102,261]. The ability of nanoparticles to

cross the RWM largely relies on three fundamental physicochemical features: their size, morphology, and surface charge. Among these delivery systems, liposomes have been largely explored for inner ear drug delivery. TT administration of dexamethasone-loaded liposomes has demonstrated sustained drug release and therapeutic perilymph concentrations, although cochlear delivery efficiency remains low, highlighting the need for further optimization [262]. More recently, highly deformable liposomes (transfersomes) have shown effective middle- and inner-ear penetration without detectable ototoxicity [263]. Overall, liposomal formulations represent a promising strategy for SNHL treatment; optimized encapsulation of corticosteroids, such as dexamethasone, can enhance RWM passage, increase cochlear bioavailability, and provide sustained drug exposure, thereby reducing injection frequency [71,264]. Together, these advantages position liposomal delivery as a particularly attractive platform for enhancing the efficacy and practicality of corticosteroid-based therapies in the inner ear.

In addition to drug encapsulation within liposomes, we sought to further prolong therapeutic efficacy by incorporating the formulation into a hydrogel system, thereby enabling sustained drug release and extended residence time at the site of administration. The hydrogel component critically determines formulation retention, release kinetics, and overall delivery efficiency to the inner ear. Both natural hydrogels (e.g., hyaluronic acid (HA) and chitosan) and synthetic systems (e.g., polyethylene glycol (PEG)-based networks and thermosensitive poloxamers) have been explored for TT injections [135,156,265,266]. While HA and chitosan offer good biocompatibility and bioadhesion, their batch-to-batch variability and limited control over mechanical properties restrict their suitability for reproducible, sustained delivery [267–269]. PEG-based formulations provide tighter control over mechanical properties and release kinetics of the active compound dispersed within the network [270,271]. However, their complex manufacturing processes and the need for long-term cochlear biocompatibility assessment make them less appealing as candidates. Thermosensitive hydrogels based on poloxamer 407 (P407) – a triblock copolymer composed of poly(ethylene oxide)–poly(propylene oxide)–poly(ethylene oxide) (PEO-PPO-PEO) chains – represent a particularly attractive alternative, as they remain liquid at room temperature (RT) and rapidly gel at physiological temperature (37°C), enabling easy TT injection followed by prolonged middle-ear retention [272]. At appropriate concentrations – typically ranging from 15 to 22% w/v – P407 hydrogels provide controlled viscosity, sustained release of incorporated therapeutics, good pH and osmolality compatibility, and limited batch variability [134,147,229,273].

To obtain a P407 hydrogel suitable for TT injection and for dispersing dexamethasone-loaded liposomes, the formulation must minimize polymer–liposome interactions arising from the surfactant properties of P407, remain injectable at RT, rapidly gel at 37°C, and maintain physiological pH and osmolality to ensure cochlear biocompatibility [274,275]. These parameters are essential to prevent tissue irritation, reduce the risk of immune responses, and avoid cellular damage [276,277].

In this study, we developed an optimized liposome formulation encapsulating dexamethasone to prolong its release and enhance its penetration through the RWM in order to reach the cochlea and ultimately provide pharmacological treatment of SNHL. The dispersion of these liposomes within a compatible P407 thermosensitive hydrogel (16.25%) allows local administration via TT injection, facilitated by the low-viscosity liquid form of the formulation at RT, as well as prolonged retention after a fast gelation, of around 8.0 minutes, within the middle ear cavity (37°C). This prolonged *in vitro* release of dexamethasone is likely due to the multilamellar and multivesicular structure of dexamethasone-loaded liposomes, as revealed by cryo-TEM imaging. Following *in vitro* screening that identified DSPC as the most biocompatible lipid component, both empty liposomes and dexamethasone-loaded liposomes showed no toxicity on HEI-OC1 cells [278,279]. Moreover, quantitative analysis of synaptic puncta area in cochlear explants even revealed that H_L5_Dexa (16.25% P407) exerted a protective effect against excitotoxic-induced synaptic swelling, indicating a potential for preserving inner ear hair cells synapses after noise-induced trauma.

III.2.2.2. Materials and methods

III.2.2.2.1. Chemicals and reagents

Commercial Pluronic F127 (Poloxamer 407, P407) (MW 12600 g/mol) and 4-(2-hydroxyethyl)-piperazine-1-ethanesulfonic acid (HEPES) were provided by Sigma-Aldrich (Belgium). Dexamethasone was obtained from Fagron (Belgium). Cholesterol (Chol), Egg L- α -PhosphatidylCholine (Chicken) (EPC), 1,2-DiStearoyl-sn-glycero-3-PhosphoCholine (DSPC), 1,2-Di-(9Z-Octadecenoyl)-sn-glycero-3-PhosphoEthanolamine (DOPE), 1,2-DiPalmitoyl-sn-glycero-3-PhosphoCholine (DPPC), 1,2-DiStearoyl-sn-glycero-3-PhosphoEthanolamine-N-[methoxy (PolyEthylene Glycol-2000)] (DSPE-PEG₂₀₀₀, further called PEG) were purchased from Avanti Polar Lipids, INC (Alabaster, AL, USA). Liquid CO₂ with a purity of 99.7% was purchased from Air Liquide (Belgium). Ultrapure water was produced by a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA,

PARTIE EXPÉRIMENTALE

USA). The acetonitrile HPLC Far UV / Gradient Grade and methanol (Ultra) Gradient HPLC Grade were purchased from J.T. Baker. Biowest (Nuaillé, France) supplied Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), Dulbecco's phosphate-buffered saline (PBS) without magnesium or calcium, L-Glutamine, and Hank's buffered saline solution (HBSS). The 0.05% Trypsin-EDTA and Foetal Bovine Serum (FBS) were purchased from Gibco by Life Technologies (Carlsbad, CA, USA), and the Cell Counting Kit-8 (CCK-8) was obtained from MedChemExpress.

III.2.2.2.2. Liposomes

III.2.2.2.2.1. Production

Liposomes (compositions presented in Table 4) were produced at 45 mM using a Particles from Gas Saturated Solution (PGSS) method based on supercritical CO₂ (scCO₂), as previously described [120]. Briefly, lipids and dexamethasone (5% mol) were weighed and pre-dispersed (15 min, 60°C, 200 rpm) in 14 mL of non-isotonic HEPES buffer (10 mM, pH 7.4) to achieve a homogeneous dispersion. The dispersion was then poured into the high-pressure reactor (Autoclave® Engineering, France) of the equipment (Separex, France), and scCO₂ was pumped into the reactor (500 rpm, 80°C, 240 bar, 30 min). Following a depressurization step through a nozzle, liposomes were collected under the expansion vessel.

Table 4: Lipid composition (phospholipid type and %) of liposome formulations, named L1 to L8, produced at 45 mM (total lipid concentration) by the PGSS method using scCO₂.

Formulation	Main lipid(s) (mol%)	Cholesterol (mol%)	PEG (mol%)
L1	EPC (85)	Chol (10)	PEG (5)
L2	EPC (75)	Chol (10)	PEG (15)
L3	DSPC (90)	Chol (5)	PEG (5)
L4	EPC (65)/DOPE (20)	Chol (10)	PEG (5)
L5	DSPC (85)	Chol (10)	PEG (5)
L6	DSPC (65)/DOPE (20)	Chol (10)	PEG (5)
L7	DSPC (70)/DOPE (20)	Chol (5)	PEG (5)
L8	DPPC (85)	Chol (10)	PEG (5)

III.2.2.2.2. Purification

Dexamethasone-loaded liposomes were purified by dialysis using a 20 kDa molecular weight cut-off cellulose membrane (Spectra/Por®, 10mm diameter, VWR Chemical). This membrane was immersed in a non-isotonic HEPES buffer (10 mM, pH 7.4) in proportion to the volume of liposomes introduced (1 mL of liposomes per 20 mL of HEPES buffer). Dialysis was performed for 5 hours at 4°C under constant agitation (200 rpm), with medium changes every hour, to remove non-encapsulated dexamethasone.

III.2.2.2.3. Characterization

III.2.2.2.3.1. Size, PdI and surface charge

A dynamic light scattering (DLS) analysis was performed to assess the size, polydispersity index (PdI), and surface charge (zeta potential) of the dexamethasone-encapsulated liposomes (45 mM). Liposomes were diluted 200-fold in a non-isotonic HEPES buffer to achieve a particle concentration suitable for measurement. All measurements were performed in triplicate using a Zetasizer Ultra-Red (Malvern Instruments, UK) at 90° and RT (25°C). Results were processed using ZS Explorer software.

III.2.2.2.3.2. Dexamethasone quantification

Dexamethasone quantification was performed using a validated HPLC method. The equipment consisted of an Agilent® 1100 system (Santa Clara, USA) equipped with OpenLab CDS LC ChemStation (version C.01.05). Separation was achieved on an RP-18 analytical column (250 x 4 mm, 5 µm) fitted with a matching RP-18 guard column (4 x 4 mm, 5 µm), using an isocratic mobile phase of water/acetonitrile (50:50, v/v) at a flow rate of 0.8 mL/min. The column temperature was kept constant at 35°C. Samples (10 µL) were injected at RT, with a total run time of 8 min, and dexamethasone was detected at 242 nm with a retention time of 4.9 min. Calibration curves were generated using standard solutions at 1, 10, 50, and 100 µg/mL. Samples were diluted 20-fold in absolute ethanol. This method was successfully validated using the accuracy profile approach and Enoval® software V3.0 (Arlenda, Liège, Belgium). The risk α was set at 5% with acceptance limits at 10%.

III.2.2.2.3.3. Encapsulation efficiency (EE)

Dexamethasone concentration was quantified before (C_t) and after (C_e) purification. EE is then calculated (Equation 7):

$$EE = \frac{C_e}{C_t} \times 100$$

Equation 7: Encapsulation efficiency formula. EE = Encapsulation efficiency (%), C_e = Encapsulated dexamethasone concentration ($\mu\text{g/mL}$), C_t = Total dexamethasone concentration ($\mu\text{g/mL}$).

III.2.2.2.3. Hydrogel

III.2.2.2.3.1. Preparation

P407 was added to non-isotonic HEPES buffer (10 mM, pH 7.4) to reach final concentrations of 15, 16.25, 17.5, 18.75, and 20% (w/v) P407. Flasks were then stored at 4°C and stirred overnight at 200 rpm to achieve complete polymer solvation. For hydrogels containing L1 or L5 liposomes encapsulating dexamethasone (H_L1_Dexa or H_L5_Dexa), corresponding liposomes were diluted in non-isotonic HEPES buffer (10 mM, pH 7.4) to a final dexamethasone concentration of 33 $\mu\text{g/mL}$, this concentration being imposed by the sensitivity of the HPLC method to allow us to assess a minimum of 1% release. P407 was then added following the same protocol.

III.2.2.2.3.2. Osmolality and pH

Osmolality was measured using a Löser 16/16M osmometer. A 100 μL hydrogel sample was placed in an Eppendorf tube and introduced into the device, where freezing was triggered to obtain an osmolality reading. The sample pH was determined potentiometrically using a WTW pH 7110 (INOLAB) pH meter.

III.2.2.2.3.3. Rheological analysis

The rheological properties of the hydrogel sample were measured using a liquid rheometer, MCR 102 (Anton Paar, Austria), equipped with a double-gap DG 26.7 geometry. Samples were evaluated at RT (20°C).

PARTIE EXPÉRIMENTALE

The shear rate experienced by the micellar solution during TT injection was estimated to assess the preservation of micellar structural integrity under injection conditions. The shear rate within the 30G needle was calculated using an equation derived from the Hagen–Poiseuille law for capillary flow (Equation 8), based on the injected volume, flow time, and needle radius [280]. Therefore, viscosity was measured at 20°C over a shear rate range of 0.1–6200 s⁻¹.

$$\dot{\gamma} = \frac{4V}{\pi R^3 t}$$

Equation 8: Shear rate at the wall of the needle expressed in s⁻¹, where V is the volume of sample (cm³), t the flow time (s), and R the radius of the needle (cm).

Temperature-dependent viscosity was evaluated at a constant shear rate using a four-step protocol: a pre-shear step (10 s at 6200 s⁻¹, 20 °C), a stabilization step (300 s at 1 s⁻¹, 20 °C), a heating step (200 s from 20 to 37 °C at 1 s⁻¹), followed by stabilization at 37 °C and 1 s⁻¹.

Gelation kinetics were assessed under physiological conditions: samples were loaded at RT and heated to 37°C. Shear deformation (0.01–10 %) was then applied at a fixed angular frequency of 10 rad.s⁻¹. Storage (G') and loss (G'') moduli were recorded every 90 s, and gelation time was defined as the point at which G' exceeded G''.

III.2.2.2.3.4. Stability study

A stability study was conducted on the 18.75% P407 hydrogel (H 18.75%) by comparing its thermosensitive properties over time. Viscosities at 20°C and 37°C, as well as the gelation time, were evaluated after 1, 2, 3, 4, 8, 12, and 16 weeks of storage at +4°C.

III.2.2.2.3.5. Dexamethasone quantification in hydrogels

Quantification of dexamethasone was performed using an HPLC system, Series 1100 (Hewlett-Packard/Agilent, Santa Clara, USA), consisting of a binary pump, a thermostated compartment at 45°C for the analytical column (Waters XBridge, 150 × 4.6 mm, i.d., C18, 3.5 µm), an autosampler thermostated at 15°C, and a diode array UV detector (DAD). The OpenLab CDS ChemStation Edition software was used for system control, data acquisition, and processing. The mobile phase, composed of water (A) and acetonitrile (B), was injected using a linear gradient (Table 5) at a flow rate of 1.2 mL/min. The injected sample volume was 90 µL, and UV detection was performed at 242 nm.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Table 5: Linear gradient program of the mobile phase in HPLC, showing the evolution of the mobile phase composition (% water [solvent A] and % acetonitrile [solvent B]) as a function of analysis time.

Time (min)	Water (%A)	Acetonitrile (%B)
Initial	70.0	30.0
5.0	40.0	60.0
5.1	5.0	95.0
6.1	5.0	95.0
6.2	70.0	30.0
10.0	70.0	30.0

The calibration curve (10 to 20,000 ng/mL) was prepared from a stock solution containing 4 mg/mL of dexamethasone in methanol. Calibration standards were then prepared by diluting this solution in a water/methanol mixture (70:30; v/v). Quality control (QC) solutions were prepared at dexamethasone concentrations of 25, 250 and 1,000 ng/mL following the same protocol.

III.2.2.2.3.6. Dexamethasone release

In vitro release of dexamethasone from the hydrogel was evaluated using Corning Transwell® inserts (6.5 mm diameter, 0.4 µm pore size, PET, sterile, ref. 734-1581 – VWR) at 37°C in artificial perilymph to mimic the physiological conditions of the middle ear. 150 µL of formulation (see section III.2.2.2.3.1) were added to the apical compartment and allowed to gel for 15 min at 37°C, then 300 µL of artificial perilymph were added to the basal compartment. Samples were collected from the basal compartment at 2, 6, 24, and 48 h, replaced with clean preheated perilymph, and dexamethasone was quantified by HPLC. Results were expressed as cumulative dexamethasone release over time.

Artificial perilymph consists of 137 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 1 mM NaHCO₃, and 11 mM glucose, adjusted to pH 7.4. The solution is then sterilized by filtration.

A dexamethasone stock solution was prepared in methanol (3.3 mg/mL), then diluted 100-fold in HEPES buffer to obtain the Dexa_solution (33 µg/mL), which was used as a control.

III.2.2.2.3.7. Morphology

For cryo-TEM analysis, QUANTIFOIL® R1.2/1.3 200 mesh Cu grids were glow-discharged using an ELMO glow discharge system (Cordouan Technologies) at a vacuum of 2.1×10^{-1} mbar and

a voltage of 1.7 V for 35 s. Grids were then transferred to a Vitrobot Mark IV (Thermo Fisher Scientific) for plunge-freezing. A double application of the sample was used: 3 μL of the particle suspension was applied to the grid, followed by blotting (blot force = 2, blot time = 4 s, wait time = 5 s). Immediately after the first blot, a second 3 μL aliquot of the same suspension was applied, followed by a final blot (blot force = 2, blot time = 4 s, wait time = 0 s). Vitrified grids were transferred to a Talos F200C transmission electron microscope (Thermo Fisher Scientific) equipped with a Field Emission Gun and observed at 200 kV under cryogenic conditions. Images were acquired using EPU software (Thermo Fisher Scientific) and a Falcon III EC camera (Thermo Fisher Scientific) at a magnification of 73,000x, corresponding to a pixel size of 0.14 nm/pixel, with an electron dose of 21 $\text{e}^-/\text{\AA}^2$. Liposomes were analyzed for a final lipid concentration of 5 to 10 mM.

III.2.2.2.4. *In vitro* toxicity evaluation

III.2.2.2.4.1. HEI-OC1 cell culture

The HEI-OC1 (House Ear Institute – Organ of Corti 1) cell line, derived from the organ of Corti of the ImmortomouseTM — a transgenic mouse line expressing a temperature-sensitive SV40 large T antigen under the interferon- γ -inducible H-2K^b promoter — was used to assess the cytotoxicity of the liposome formulations [278,279]. HEI-OC1 cells were cultured in high-glucose Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with L-Glutamine and 10% fetal bovine serum (FBS), at 33°C in a humid atmosphere (95%) with 10% CO₂. Medium was renewed every two days. When cultures reached 80% confluence, cells were detached with 0.05% trypsin-EDTA and re-seeded into new flasks for expansion.

III.2.2.2.4.2. Cell viability assay

Cell viability was assessed using the CCK-8 assay. Cells were seeded in 96-well plates (64,000 cells/mL) and incubated for 24h before treatment. For liposome biocompatibility testing, the medium was replaced with 25% HEPES / 75% DMEM-FBS containing 0.05 to 5 mM liposomes. For evaluation of the H_L5_Dexa formulation, cells received 10% HEPES / 90% DMEM-FBS supplemented with P407 (16.25% or 18.75%), DSPC/Chol/PEG liposomes (L5; 2.79 mM), and dexamethasone ($33.0 \pm 4.1 \mu\text{g/mL}$). After 24h of incubation, the CCK-8 reagent (MedChemExpress) was added according to the manufacturer's instructions, and absorbance at 450 nm was measured to quantify cell viability.

III.2.2.2.5. Cochlear explant studies

III.2.2.2.5.1. Organotypic cochlea cultures

All mice used in this study were handled according to the ethical guidelines of the Belgian Ministry of Agriculture in agreement with European Community Laboratory Animal Care and Use Regulations (86/609/CEE, Journal Officiel des Communautés Européennes, L358, 18 December 1986), with the ethical approval number 23-2623. Cochlea from neonatal CBA/7Rj mice (Janvier labs, France, n=40; 80 cochleae) were dissected in cold HBSS with ampicillin (100 µg/ml – G-Biosciences, USA). The organs of Corti were isolated and placed on Millicell™ inserts (0.4 µm, Merck Millipore, USA). After adhesion, explants were maintained in DMEM/F-12 with Glutamax (Gibco Life Technologies, UK) supplemented with HEPES (25mM, Cytiva HyClone, USA), N2 (Gibco), B-27 (minus antioxidants, Gibco), and penicillin (100 U/L, Merck) at 37 °C in 5% CO₂. Medium was replaced every 24 h, and cultures were maintained for up to 50 h.

III.2.2.2.5.2. Excitotoxic injury

After 24h of culture, explants were exposed to 0.5 mM kainic acid (Thermo Fisher Scientific, USA) and 0.5 mM NMDA (Tocris Bioscience, UK) for 2h. Controls were transferred to standard fresh medium. All explants were then returned to standard medium for a further 24h. Experimental conditions contained 16.25% P407 hydrogel (kept at 30°C before use); H_L5_Dexa was applied at 33 µg/mL or 40 ng/mL dexamethasone, the former corresponding to the HPLC quantification limit of our method for *in vitro* assays and the latter to the reported therapeutic concentration in the inner ear.

III.2.2.2.5.3. Immunohistochemistry

Explants were washed twice in PBS to remove the hydrogel, before being fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) / PBS at RT for 1 hour. After washing with PBS containing 0.3% Triton X (PBST), the cultures were blocked for 2 hours in PBST containing 5% normal donkey serum (NDS – Jackson ImmunoResearch, USA). The cultures were incubated overnight at 4°C in a primary antibody mixture composed of: PBST with 1% NDS, rat anti-Neurofilament (1:1000, Millipore) to observe spiral ganglion neuron processes, rabbit anti-Myo7a (1:500, Enzo Life Sciences, USA) to label hair cells, mouse anti-CtBP2 (1:200, BD Biosciences, USA) to label pre-

synaptic ribbon terminals, and guinea-pig anti-Homer1 (1:200, Synaptic Systems, Germany) to label post-synaptic terminals.

Cultures were then washed in PBST and incubated at RT for 2h with secondary antibody mixture composed of: PBST with 1% NDS, anti-rat Alexa-405 (1:500, Invitrogen ThermoFisher, USA), anti-guinea-pig Alexa-594 (1:500, Invitrogen), anti-mouse Alexa-647 (1:1000, Invitrogen), and anti-rabbit Alexa-488 (1:1000, Invitrogen). After washing in PBST, explants were briefly re-fixed in 4% PFA for 15 minutes before mounting in FluorSave mounting medium (Merck).

III.2.2.2.5.4. Confocal imaging and analysis

Hair cell survival was assessed using a Zeiss 880 confocal microscope (20X objective, NA = 0.5, pixel size = 197.9nm x 197.9nm) with tiled z-stack acquisition (1 μ m steps). Hair cell counts were obtained in basal, medial, and apical regions. Synaptic analysis was performed on a Nikon A1R (60X objective with 2X digital zoom, NA = 1.4, pixel size = 102.9nm x 102.9nm) using high-resolution z-stacks (0.3 μ m steps, pinhole size = 17.88 a.u.). Puncta (Homer1 and CtBP2 labelling) were quantified in ImageJ using thresholding and particle analysis (circularity $\geq$ 0.8; area 0.2–4 μ m²), with correction for duplicate z-plane counts and pre/post-synaptic colocalization. Values were normalized per inner or outer hair cell.

III.2.2.2.6. Statistical analysis

All experiments were performed at least three times, and the data are expressed as mean $\pm$ standard deviation (SD). For hydrogel development and *in vitro* tests, all graphs and statistical analyses were generated using GraphPad Prism 8 (version 8.3.0). A one-way ANOVA analysis was performed with a Tukey post-test to compare at least three data groups according to a single independent variable, and a two-way ANOVA followed by a Tukey post-test was performed to compare at least two data groups according to two independent variables. For *ex vivo* studies, a mixed-model ANOVA with a Bonferroni correction for multiple comparisons was applied. Otherwise, statistical significance was set at $p < 0.05$.

III.2.2.3. Results and discussion

III.2.2.3.1. Liposome production and characterization

Eight liposome formulations, L1–L8, composed of different types and percentages of phospholipids, were produced at 45 mM (Table 4). Liposome composition was modulated to evaluate how lipid physicochemical properties influence stability, membrane rigidity, and RWM penetration for inner-ear drug delivery. EPC, a natural, unsaturated phospholipid, was selected for its high membrane fluidity and ease of formulation, serving as a reference composition. DSPC and DPPC, saturated phospholipids with higher phase transition temperatures, were included to generate more rigid bilayers, expected to enhance liposome stability and slow drug release [243,244]. DOPE, a cone-shaped phospholipid with fusogenic properties, was tested for its potential to promote membrane interaction and transport across biological barriers such as the RWM [236]. PEG was incorporated in all formulations to improve colloidal stability, reduce aggregation, and limit non-specific interactions with biological components, thereby increasing formulation robustness and reproducibility [235,245,246].

In this study, lipid composition was determined based on physicochemical properties such as size and PdI which are important properties to cross the RWM. All these formulations exhibited particle sizes consistently below the 200 nm threshold (L1–L8 size mean: 159.5 ± 14.9 nm), which is favorable for passage through the RWM, and a PdI indicating acceptable size homogeneity (0.30 ± 0.05) [91,281]. As expected, the measured surface charge was neutral (-1.75 ± 0.51 mV), and dexamethasone EE values ranged from 65 to 80%. Overall, the lipid composition did not significantly affect the liposomes physicochemical characteristics.

Given the comparable physicochemical properties of the formulations, the lower-cost L1 liposomes will be used preferentially in subsequent experiments. After biocompatibility testing on HEI-OC1 cells (see section III.2.2.3.6.1), selected experiments will also be performed with L5 liposomes. The influence of liposomes type on the physicochemical outcomes is considered negligible. In a subsequent study, the impact of lipid composition on RWM penetration will be assessed to determine the optimal formulation for *in vivo* TT injections.

III.2.2.3.2. Formulation of the hydrogel based on P407 and liposomes

III.2.2.3.2.1. Hydrogel formulation, pH, and osmolality

We prepared an injectable hydrogel formulation incorporating L1 liposomes, using the thermosensitive polymer Poloxamer P407 at concentrations of 16.25% to 18.75% in a buffered solution. These formulations were liquid at ambient temperature and rapidly transitioned into a gel at 37°C, fulfilling the requirements for injectable and *in situ* gelling delivery systems [147,229,273].

The pH and osmolality of the hydrogel formulations were evaluated in the presence and absence of L1 liposomes. All formulations exhibited stable pH values between 7.3 and 7.4. Osmolality increased progressively with rising P407 concentrations from 16.25% to 18.75%; however, no significant difference was observed between 16.25% P407 hydrogels containing liposomes (247 ± 1.5 mOsm/kg) and their liposome-free counterparts (260 ± 10.2 mOsm/kg). A similar trend was observed for hydrogels with 17.5% or 18.75% P407. However, a concentration of 18.75% P407 resulted in an osmolality (353 ± 21.6 mOsm/kg) exceeding the physiological value of 286 mOsm/kg.

III.2.2.3.2.2. Hydrogel rheological behavior

A rheological analysis of the hydrogel formulation dispersing liposomes (H_L5_Dexa) was then performed to evaluate its behavior under shear conditions relevant to TT injection. The lowest P407 concentration (16.25%) was selected to maximize biocompatibility, and rheological analysis will determine whether this concentration is sufficient to achieve the desired properties of an injectable thermosensitive hydrogel. Measurements were conducted up to a shear rate of 6200 s^{-1} , corresponding to injection through a 30G needle at a flow rate of 0.1 mL/min. Viscosity values were recorded while applying an increasing and a decreasing shear rate ramp successively (Figure 24A). The sample displayed a shear-thinning behavior when the applied shear rate was below 1 s^{-1} . Above 1 s^{-1} , this behavior tended to be Newtonian. This rheological profile thus demonstrates that applied stress does not have a lasting impact on the H_L5_Dexa (16.25% P407) formulation. It will therefore reach its target site in its original structural state, unaffected by the shear stresses experienced during injection. This characteristic can be observed in most diluted polymer solutions, as the shear stress acting on the sample forces the polymer chains to

PARTIE EXPÉRIMENTALE

align parallel to the flow direction, thereby reducing the viscosity until all the chains have aligned. Moreover, no significant viscosity hysteresis was observed at any shear rate. The large variability observed at low shear rate reflects the limited sensitivity of the rheometer when measuring low torque values.

A second rheological analysis was performed to evaluate temperature- and time-dependent viscosity of H_L5_Dexa (16.25% P407) at a shear rate of 1 s^{-1} , thereby mimicking the injection into the middle ear (Figure 24B). In the first phase, H_L5_Dexa is equilibrated at 20°C , where it remains in a liquid state with constant viscosity. Upon heating to 37°C to mimic injection conditions, viscosity increases, reflecting polymer micellization (phase 2), then rises more sharply as micelles organize into a structured network (phase 3). As the network becomes fully established, the hydrogel transitions to its gel state and reaches a viscosity plateau corresponding to its final structural organization (phase 4).

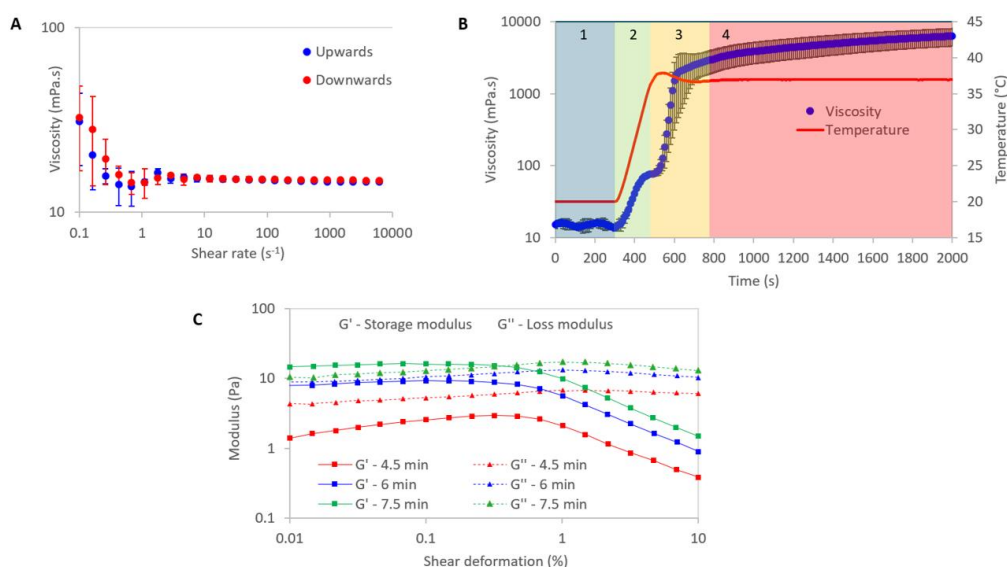


Figure 24: Rheological behavior of the liposome-loaded P407 hydrogel under conditions relevant to TT injection and in situ gelation. (A) Viscosity of H_L5_Dexa (16.25% P407) as a function of shear rate measured during upward (blue) and downward (red) ramps at 20°C (RT). (B) Time-dependent viscosity (blue dots) of H_L5_Dexa measured at a shear rate of 1 s^{-1} during a temperature ramp (red trace) from 20°C to 37°C (Phase 1 = Liquid state with constant viscosity; Phase 2 = Viscosity increase due to P407 micellization; Phase 3 = Viscosity increase due to P407 micelles organization into a network; Phase 4 = Gel state with constant viscosity due to the stabilization of the final structure). (C) Example of an amplitude sweep test of H_L5_Dexa (16.25% P407) at 37°C at different time points during gelation (4.5 min = red; 6 min = blue; and 7.5 min = green), showing the evolution of the storage (G' , $\blacksquare$) and loss (G'' , $\blacktriangle$) moduli as a function of shear deformation (%). At low shear deformation (up to 0.3%), G' modulus remains nearly constant, indicating the linear viscoelastic (LVE) region. At higher shear deformation, a decrease in G' is observed, reflecting the progressive breakdown of the hydrogel network.

An amplitude sweep test was performed to determine the gelation time of H_L5_Dexa under physiological conditions (Figure 24C). The temporal evolution of the storage modulus (G') and loss modulus (G'') reflects the transition from a liquid-like ($G'' > G'$) to a solid-like ($G' > G''$) state. At low shear deformation ($< 0.3\%$), which probes the material near rest, G'' exceeded G' after 4.5 min at 37 °C, indicating predominantly liquid-like behavior. After 6 min, G' and G'' converged, consistent with a transitional sol–gel state. After 7.5 min, G' surpassed G'' , indicating the establishment of a solid-like gel network for this replicate.

Based on three independent measurements, the mean gelation time was 8.0 ± 3.8 minutes at 37°C, in agreement with the end of the steep increase in viscosity observed in Figure 24B.

Given that inner ear temperature may vary between 36 and 37°C, the analysis was repeated at 36°C, yielding a gelation time of 11.5 ± 3.5 minutes (data not shown). No significant difference was observed between the two conditions. Overall, the gelation time of the 16.25% P407 hydrogel meets the predefined specification, as the formulation was designed to undergo gelation within 60 minutes post-injection. Rapid gelation is a critical attribute for this therapeutic application, as it promotes prompt adhesion to the RWM, limits formulation loss through the Eustachian tube, and supports prolonged local drug release. This property will ensure ease of administration and improved therapeutic efficacy. This concentration of 16.25% P407 can therefore be considered sufficient to achieve the expected thermoreversible effect and will be used in the subsequent experiments, with the exception of the stability study. The results of the latter, conducted at 18.75% P407, may be extrapolated to the 16.25% P407 formulation, as this slight difference in concentration is not expected to significantly affect stability.

III.2.2.3.3. Hydrogel stability

A stability study was conducted over 8 and 16 weeks, respectively, on hydrogels (without liposomes) containing 16.25% and 18.75% P407 to determine whether their thermoreversible properties remained consistent after storage at +4°C in a cold room. Because standard references do not specify official viscosity limits, the acceptable stability range was considered sufficient if the hydrogels remained liquid at 20°C, ensuring ease of injection. At 37°C, a lower specification limit was set ($0.75\text{--}1.25 \times \eta_0$), because the hydrogels must maintain a minimum viscosity to prevent undesirable flow of the formulation. Both hydrogels, containing 16.25% and 18.75% P407 and evaluated at 20°C and 37°C, remained within the predefined limits throughout their respective storage periods (data not shown). Furthermore, the maximum gelation time, set at 15

minutes, was consistently met throughout the study. Overall, the 16.25% and 18.75% P407 hydrogel formulations showed no evidence of instability over their respective 8-weeks and 16-weeks storage periods.

III.2.2.3.4. *In vitro* dexamethasone release from the P407 hydrogel

The *in vitro* release of dexamethasone from liposomes in a P407-based hydrogel formulation (H_L1_Dexa 16.25%) was evaluated at 37°C under conditions mimicking the middle ear environment. Release rate profiles were compared to a dexamethasone solution (Dexa_solution) and a 16.25% P407 hydrogel containing dexamethasone (H_Dexa 16.25%). All three formulations contained 33 µg/mL of dexamethasone.

As expected, Dexa_solution exhibited a rapid release profile for dexamethasone, with $53.4 \pm 1.4\%$ released within 6 hours (Figure 25). Given the low molecular weight of dexamethasone, a faster release would normally be expected after 6 hours, rather than the observed plateau. Indeed, the limited donor and receiver volumes imposed by the insert geometry prevented the establishment of sink conditions. Additionally, the small membrane surface area and the relatively small pore size (0.4 µm) of the insert may have slowed diffusion between the two compartments. This non-sink environment, combined with the specific geometry of the experimental setup, restricted the concentration gradient driving diffusion and thus limited the total dexamethasone transfer across the membrane.

In contrast, the H_Dexa showed slower and more sustained release, with only $33.8 \pm 5.0\%$ of dexamethasone released after 24 hours. Drug release from the P407 hydrogel is governed by a combination of diffusion and erosion mechanisms. Despite its low molecular weight (392.5 g/mol), dexamethasone can be transiently retained within the micellar network before diffusing out. Upon contact with release media, the hydrogel progressively absorbs fluid, leading to dilution, destabilization of the micellar structure, and gradual erosion, ultimately contributing to sustained drug release. This behavior has been widely reported for P407-based hydrogels [248].

While H_Dexa 16.25% already prolongs the release of dexamethasone, H_L1_Dexa 16.25% further extends this effect with only $17.4 \pm 0.8\%$ of dexamethasone released over 24 hours. The incorporation of liposomes therefore provides a clear advantage, combining their intrinsic

PARTIE EXPÉRIMENTALE

sustained-release properties with additional retention within the P407 polymeric network, which likely stabilizes the nanocarriers and further delays drug release.

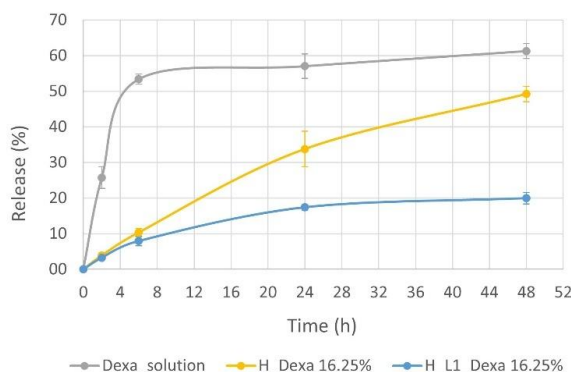


Figure 25: In vitro release profiles of dexamethasone from different formulations under conditions mimicking the middle ear environment following TT injection, with hydrogel gelation at 37°C. Cumulative dexamethasone release is shown for dexamethasone in HEPES buffer (DEXA_solution), dexamethasone in a 16.25% P407 hydrogel (H_DEXA 16.25%), and dexamethasone encapsulated in L1 liposomes dispersed within a 16.25% P407 hydrogel (H_L1_DEXA 16.25%). The P407 hydrogel significantly slows dexamethasone release compared to the solution, while incorporation of liposomes within the hydrogel further prolongs release. Data are expressed as mean $\pm$ SD ($n = 3$).

III.2.2.3.5. Liposomes morphology

We then examined the morphology of the L5 liposomes when suspended in HEPES buffer (Figure 26B) or dispersed within a 16.25% P407 hydrogel (H_L5_DEXA) before (Figure 26C) and after 12h of incubation at 37°C (Figure 26D), to assess the impact of physiological heating on particle structure. A P407 hydrogel sample was analyzed as a control (Figure 26A). Micellization of the polymer occurs only at elevated temperatures, depending on its concentration (e.g. gelation occurs around 32°C for a 16.25% P407 hydrogel). Since sample preparation for imaging involved immersion in liquid nitrogen at -196°C , no micellar structures were observed. Dexamethasone-loaded liposomes produced by scCO_2 , analyzed as a control, present an “onion-like” multilamellar vesicle (MLV) structure with several concentric lipid bilayers (Figure 26B). Multivesicular vesicles (MVV) can also be observed, with multiple liposomes nested within a larger one (Figure 26D). These images show that liposomes produced by the PGSS method using scCO_2 are mostly MLVs with heterogeneous size and structure, which is not surprising since no extrusion step is performed during their production. This multilayered particle structure may contribute to sustained release, given the number of bilayers the drug must diffuse through before being

PARTIE EXPÉRIMENTALE

released into the perilymph of the ear. A small proportion of unilamellar vesicles (ULV) was also present on several occasions in the L5_Dexa sample (data not shown), with sizes ranging from 50 to 120 nm, which may facilitate their passage through the RWM compared to larger particles.

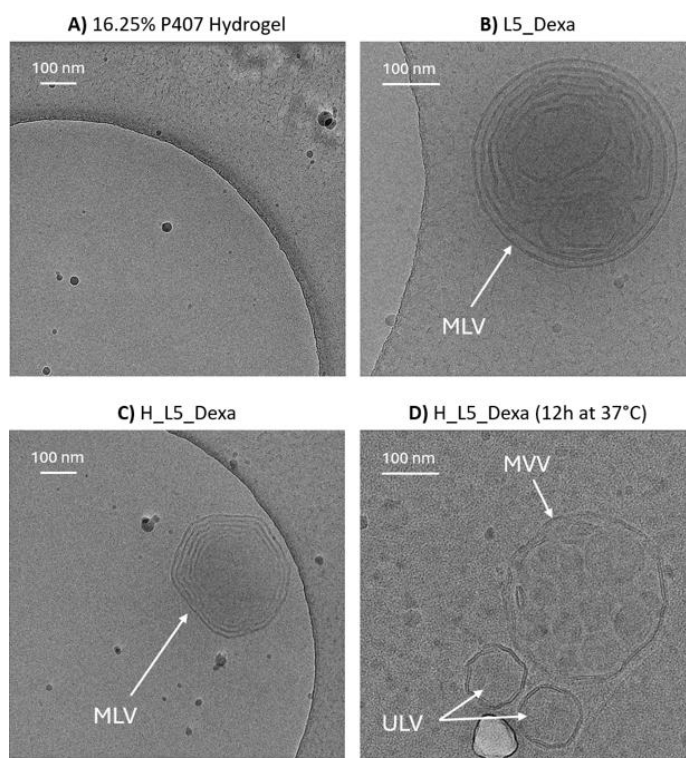


Figure 26: Cryo-TEM images showing the morphology of L5 liposomes. (A) The 16.25% P407 hydrogel, imaged after sample preparation at -196°C , does not show any P407 micellar structures. (B) L5 liposomes in HEPES buffer, imaged after sample preparation at -196°C , exhibit MLV with concentric bilayers. (C) L5 liposomes dispersed in a 16.25% P407 hydrogel (H_L5_Dexa), imaged after sample preparation at -196°C , retain MLV structures, and indicate no effect of the polymer on liposome morphology. (D) H_L5_Dexa, previously incubated for 12h at 37°C to mimic residence in the middle ear, and then immersed in liquid nitrogen at -196°C for imaging sample preparation, shows preserved MVV and ULV structures, confirming the stability and structural integrity of the vesicles within the hydrogel network.

While DLS characterization suggests that the liposomes are globally smaller than 200 nm, with an average size of 144 nm, cryo-TEM imaging reveals larger particles up to 350 nm, as well as smaller ones around 50 nm. Despite the presence of larger MLVs and MVVs, the liposomes maintained sizes and homogeneity suitable for RWM penetration. As with the L5 liposomes control sample (Figure 26B), liposomes incorporated into the P407 micellar network exhibit MLV, MVV or ULV structures of varying sizes (Figure 26C). They do not appear to be affected by the presence of the polymer. After 12 hours of incubation at 37°C (Figure 26D), no notable differences were

observed in the liposome structures. All three lamellarity types remained present in the sample, and no appreciable change in vesicle size distribution was observed. The particles could therefore reach the RWM without undergoing any structural alteration. Altogether, cryo-TEM imaging confirmed that liposomes incorporated into the P407 hydrogel retained structural integrity and stability over the short term (within 7 days post-production) and were not affected by the presence of the polymer.

III.2.2.3.6. Liposomes and hydrogel biocompatibility

III.2.2.3.6.1. Liposomes biocompatibility with HEI-OC1 cells

Liposomes dispersed in the hydrogel will be deposited in the middle ear cavity, in contact with the RWM. Dexamethasone and/or liposomes will then cross this membrane to reach the inner ear hair cells, their therapeutic target. Therefore, the biocompatibility of these liposomes must be evaluated in HEI-OC1 cells, which model inner ear hair cells [278,279].

Four liposomal formulations (L1–L4), differing in phospholipid composition or relative lipid content (Table 4) and lacking dexamethasone, were selected for an initial evaluation of biocompatibility on HEI-OC1 cells. Formulations were chosen to assess the impact of PEG, EPC, DSPC, and DOPE on liposomes biocompatibility. A minimum viability of 80% should be obtained to consider the formulations as biocompatible.

HEI-OC1 cells were exposed for 24h to increasing concentrations (0.1–5 mM) of the different liposomal formulations, and cell viability was quantified using the CCK-8 assay (Figure 27). For formulations L1–L4 (Figure 27A), cell viability remained close to 100% at low lipid concentrations (0.1 mM), indicating good cytocompatibility. At intermediate concentrations (0.5–1 mM), a formulation-dependent decrease in viability was observed, with L1 and L2 showing a more pronounced reduction. At higher concentrations (2.5–5 mM), significant cytotoxicity emerged for several formulations, particularly L1 and L2, whereas L3 and L4 retained comparatively higher viability, highlighting a strong influence of lipid composition on biocompatibility in a concentration-dependent manner. Although phospholipids are generally considered biocompatible, the observed cytotoxicity is consistent with the intrinsic biophysical properties of the lipid formulation. In particular, EPC, which contains a high proportion of unsaturated fatty acyl chains, forms relatively fluid bilayers that are prone to oxidation, potentially leading to the generation of oxidized products known to disrupt cellular membranes [247]. In contrast, DSPC, composed of saturated chains,

forms a more stable bilayer, resulting in improved cellular tolerance. The increased PEG content in L2 liposomes also enhances cytotoxicity, likely due to liposome membrane heterogeneity induced by incorporating a rigid PEGylated lipid into a highly fluid EPC bilayer which may promote cellular stress responses [239]. Interestingly, the presence of DOPE in L4 liposomes appears to increase HEI-OC1 viability at 0.5–5 mM concentrations compared to L1. This effect is likely to be due partly to the reduced EPC content in the L4 liposomes relative to L1, and partly to the ability of DOPE to reduce excessive bilayer fluidity and interact more gently with cells [236]. Overall, these observations indicate that liposome biocompatibility depends not only on the chemical nature of the lipids but also on the stability of the bilayer. Moreover, since the HEI-OC1 cell line is known to be particularly sensitive to oxidative stress [282], it is very likely that phospholipids such as EPC and DSPE-PEG₂₀₀₀ specifically impair the viability of this cell line, whereas such an effect may be much less pronounced in more robust cell lines.

Based on these preliminary findings, four new liposomal formulations (L5–L8) were selected, composed of DSPC or DPPC, with or without DOPE. For this second biocompatibility assessment, the tested lipid concentration range was reduced to 0.05–1 mM, as these concentrations are expected to deliver sufficient dexamethasone to achieve the therapeutic level in the inner ear (40 ng/mL) [47,283]. All formulations L5–L8 maintained high cell viability (>90–100%) across the entire concentration range tested (Figure 27B). Only minor, formulation-dependent differences were detected between specific formulations at selected concentrations, indicating overall favorable cytocompatibility profiles for this second series of liposomes. Altogether, DSPC-based formulations, such as L3 or L5, appeared the most robust, as they remained biocompatible even at higher lipid concentrations (Figure 27A). On this basis, the L5 liposome formulation, primarily composed of DSPC and cholesterol, was selected for subsequent experiments.

We next evaluated the cytocompatibility of the L5 formulation at the target lipid concentration (2.79 mM) in the presence and absence of dexamethasone (33.0 µg/mL) (Figure 27C). Dexamethasone alone, L5 liposomes alone, and the combined formulation (L5_Dexa) all preserved cell viability near or above 100%, with no statistically significant differences between conditions. These results demonstrate that the L5 formulation is well tolerated by HEI-OC1 cells at therapeutically relevant concentrations and that dexamethasone encapsulation does not compromise cellular viability.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

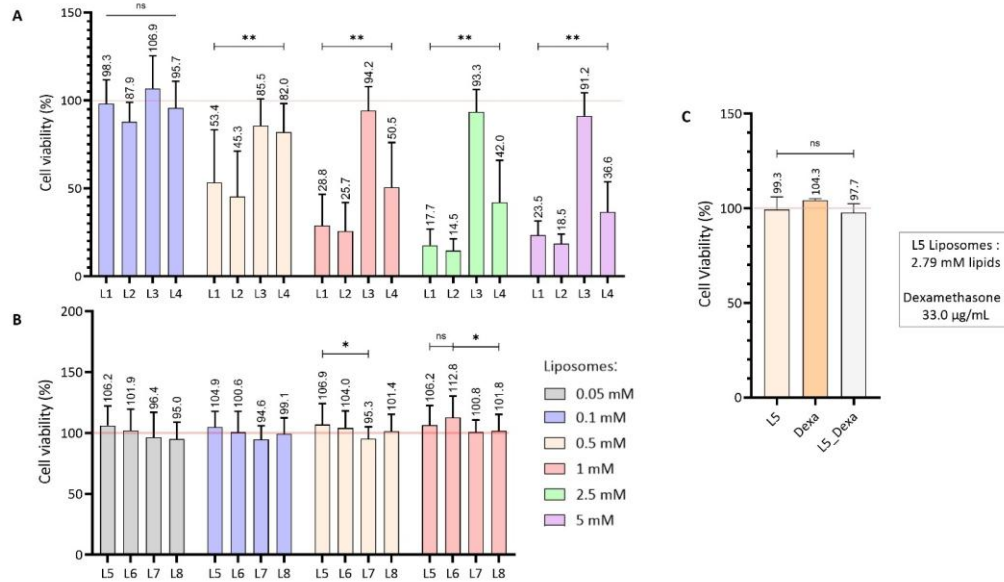


Figure 27: HEI-OC1 cell viability following exposure to dexamethasone and liposome formulations. (A) Evaluation of the biocompatibility of liposome formulations L1–4 on HEI-OC1 cells after 24h of exposure ($n = 3$). DSPC-based liposomes (L3) showed good biocompatibility at all tested concentrations. (B) Evaluation of the biocompatibility of liposome formulations L5–8 on HEI-OC1 cells after 24h of exposure ($n = 3$). All tested formulations exhibited excellent biocompatibility. (C) Comparison of the viability of HEI-OC1 cells exposed for 24h to L5 liposomes and dexamethasone ($n = 3$). All conditions exhibited excellent biocompatibility with HEI-OC1 cells, and no additional cytotoxic effects were observed from the combination of L5 and Dexa.

III.2.2.3.6.2. Hydrogels biocompatibility and otoprotective effect on cochlear explants

To test the effects of the H_L5_Dexa (16.25% P407) formulation when applied directly to hair cells of the inner ear, neonatal cochlea explants were prepared and exposed to the formulation for 24 hours. Toxicity was assessed by counting Myo7a-positive inner and outer hair cells per 100 μm from regions without obvious mechanical damage from dissection. Basal, medial, and apical turns were counted separately to account for differences in hair cell size throughout the organ of Corti (Figure 28A) [284].

PARTIE EXPÉRIMENTALE

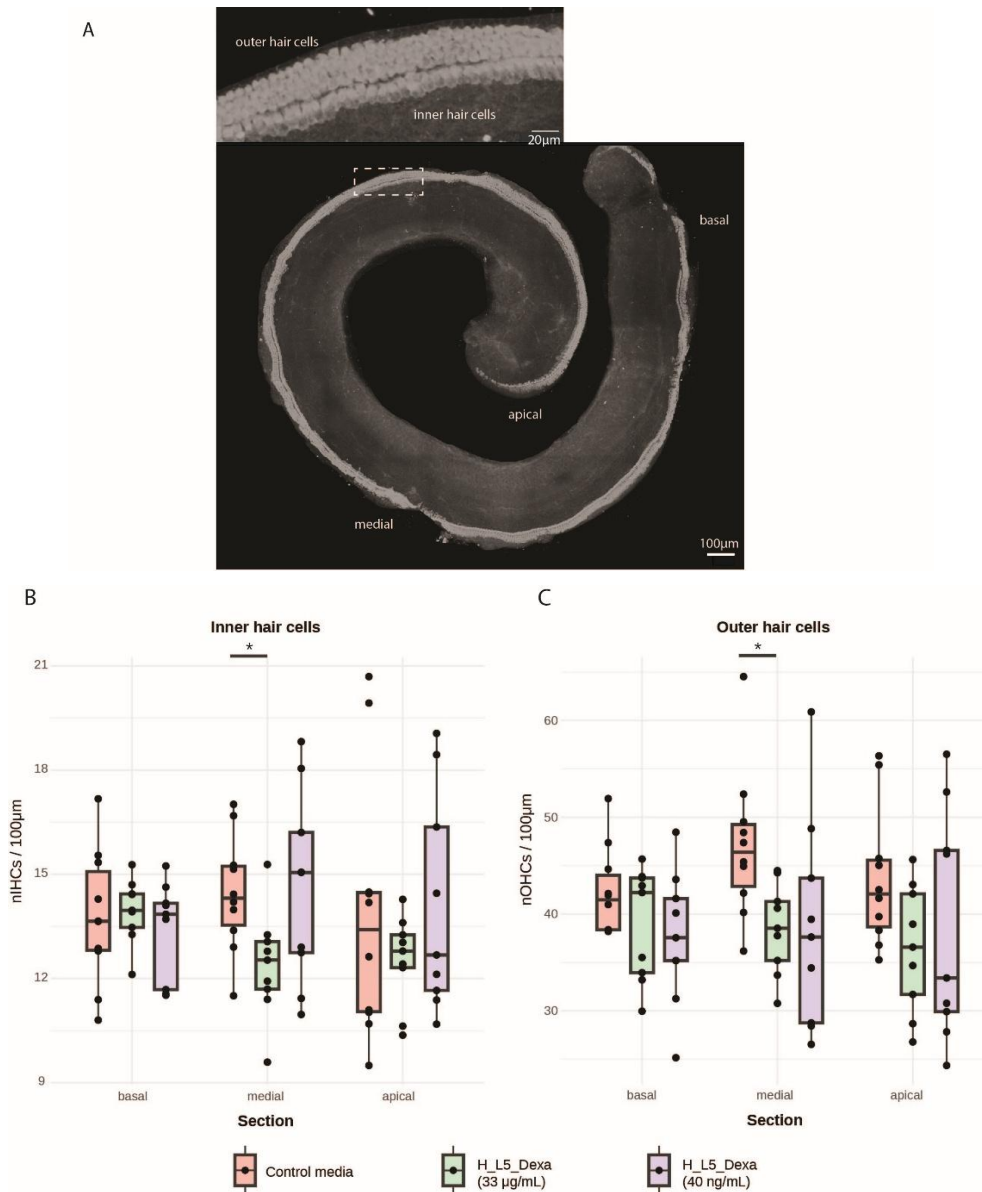


Figure 28: Effect of H_L5_Dexa formulation on hair cell survival in mouse neonatal organ of Corti explants. (A) Lower: Cochlear explant showing Myo7a-positive hair cells following immunostaining, composite of tiles acquired at 20x magnification. Upper: Representative stretch from the 20x image showing inner and outer cells, used to quantify hair cells. Both images correspond to maximum-intensity projections generated from z-stacks acquired with a 1 µm step size. (B-C) Inner hair cell counts (B) and Outer hair cell counts (C) per 100 µm from basal, medial, and apical turns of cochlear explants exposed to either standard cell culture medium or H_L5_Dexa (16.25% P407) formulations at 33 µg/mL and 40 ng/mL dexamethasone concentrations. Significance bars represent the outcome of a mixed-ANOVA comparing the hair cell counts per region between each condition, with adjusted p-values from a Bonferroni correction for multiple comparisons.

Comparing hair cell counts revealed a significant loss of inner and outer hair cells only at medial regions of explants exposed to the 33 µg/mL H_L5_Dexa formulation (Figure 28B-C). This suggests a mild toxicity of the H_L5_Dexa formulation at the higher dexamethasone concentration, although not consistent enough to be seen across each region of the cochlea. The lack of toxicity seen in the 40 ng/mL H_L5_Dexa condition suggests that the formulation is not toxic at the dexamethasone concentrations that would be expected in the inner ear after crossing the RWM.

Cochlear explants were subsequently cultured for 2 hours in 0.5 mM kainic acid (KA) and N-methyl-D-aspartate (NMDA) to induce excitotoxic activation of glutamate receptors [249,250], modelling the chronic release of glutamate from inner hair cells observed during noise exposure *in vivo*. As expected, this treatment did not result in hair cell loss, indicating that the excitotoxic paradigm primarily affects synaptic and neuronal components rather than hair cell survival.

We then investigated the effects of these same culture conditions on the health of inner and outer hair cell synapses. Explants were immunostained for presynaptic and postsynaptic markers (Figure 29A), as well as inner and outer hair cells, allowing the visualization of puncta associated with each hair cell group. Puncta area was used as a measure of the first sign of synaptic damage as previously described [285–287], particularly pronounced in the presynaptic ribbon synapses of inner hair cells.

Comparing puncta sizes between conditions revealed no effect of our H_L5_Dexa formulations compared to control, suggesting they are not harmful to the auditory synapses. In contrast, a significant increase in puncta size was evidenced in explants exposed to the KA/NMDA excitotoxic condition consistently across presynaptic puncta of the inner hair cells (Figure 29B). This swelling caused by the excitotoxic agents was significantly reduced at the basal turn of the cochlea upon addition of H_L5_Dexa formulations. A similar effect was seen at presynaptic puncta of the apical outer hair cells, and at postsynaptic puncta of inner and outer hair cells (Figure 29C). These results indicate that the H_L5_Dexa formulation is effective when applied directly to protect hair cell synapses from excitotoxicity-induced inflammation.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

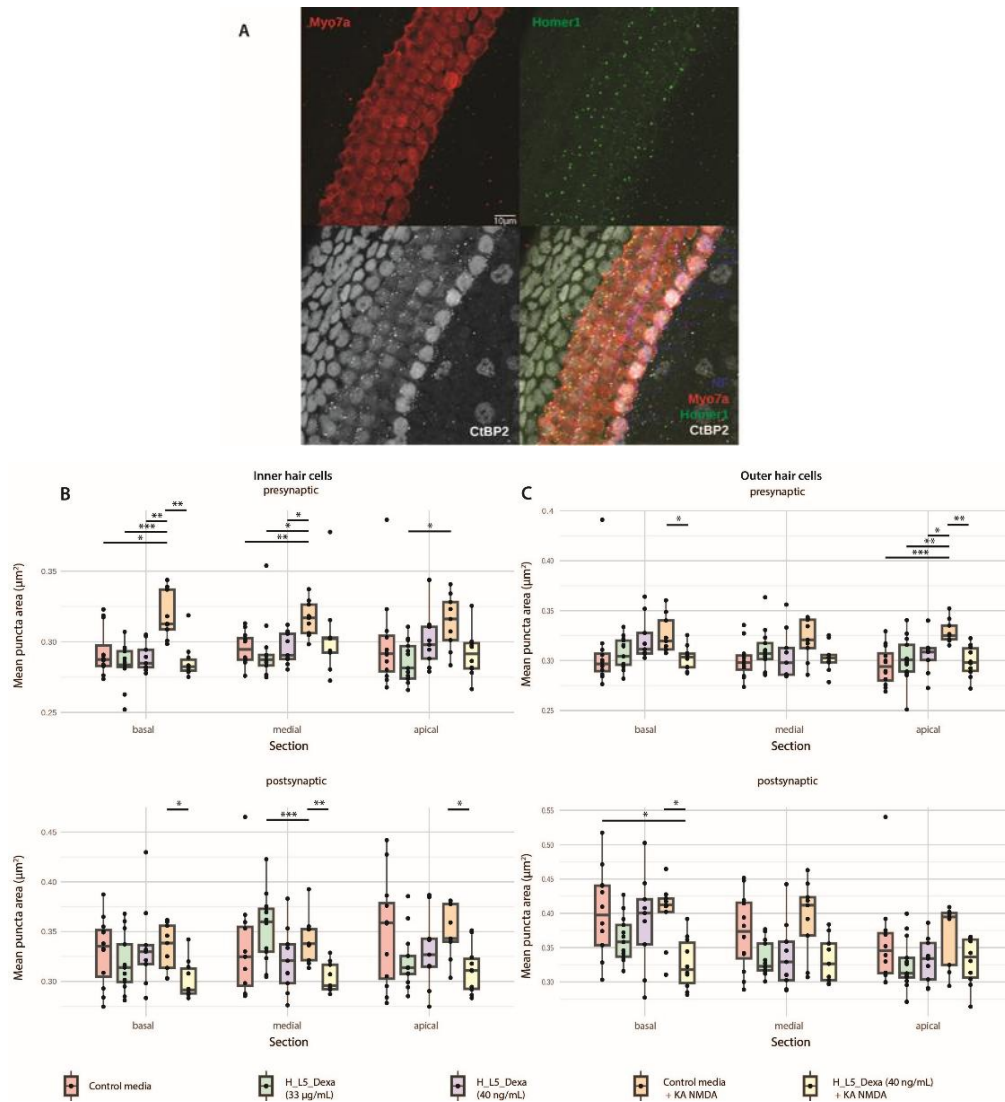


Figure 29: Otoprotective capacity of H_L5_Dexa (16.25% P407) in an in vitro model of synaptopathy following excitotoxicity. (A) Example image showing hair cells and puncta used for quantification. Explants were stained for Myo7a-positive hair cells, the presynaptic marker CtBP2, the postsynaptic marker Homer1, and the neural process marker NF. Images were acquired using 60x magnification objective with a 2x digital zoom, as z-stacks with 0.3 µm intervals. These images are presented as maximal projections but were analyzed as 3D stacks. (B) Mean area of presynaptic (upper) and postsynaptic (lower) puncta that co-localized with inner hair cells from z-stacks taken from representative basal, medial, and apical regions of cochlea explants. Explants were exposed to standard cell culture medium, H_L5_Dexa (16.25% P407) formulations at 33 µg/mL and 40 ng/mL dexamethasone concentrations, or to control medium or H_L5_Dexa (16.25% P407; 40 ng/mL Dexa) formulations following 2 hours of exposure to KA and NMDA to cause excitotoxicity. (C) Mean area of presynaptic (upper) and postsynaptic (lower) synaptic puncta that co-localized with outer hair cells, from the same z-stacks used in B. Significance bars represent the outcome of a mixed-ANOVA comparing the puncta areas for each region between each condition, with adjusted p-values from a Bonferroni correction for multiple comparisons.

While these results are promising for future studies of the use of H_L5_Dexa (16.25% P407) to protect against inner ear synapse loss, this *in vitro* assay cannot be considered a perfect model of what would be observed following injection *in vivo*. First, the dexamethasone concentrations chosen for this study were directly applied to the hair cells and therefore do not fully reflect the *in vivo* situation, where partial diffusion across the RWM would likely reduce the amount of active compound reaching the inner ear. A more accurate assessment of cochlear dexamethasone exposure would require direct measurement of perilymph concentrations following TT administration, for example using liquid chromatography – mass spectrometry. Second, the hydrogel would only be expected to remain in the middle ear following TT injection, so directly applying it to the inner ear cells may confound results compared to those seen *in vivo*. Further tests of cochlea hair cell health following TT injection *in vivo* are required to fully capture the viability of this formulation.

III.2.2.4. Conclusion

This study establishes a rationally designed liposome-hydrogel platform for local and sustained dexamethasone delivery to the inner ear. Systematic biocompatibility screening of liposomes with different phospholipid compositions (L1–L8) identified formulation L5 (DSPC/Chol/PEG – 85/10/5 mol%) as the optimal candidate, highlighting DSPC as a key determinant of cellular tolerance.

Incorporation of dexamethasone-loaded L5 liposomes into a 16.25% P407 hydrogel (H_L5_Dexa 16.25% P407) yielded a formulation that is readily injectable at ambient temperature and undergoes rapid *in situ* gelation (~8.0 min) at physiological temperature, a profile well suited for TT administration, prolonged middle-ear residence, and reduced formulation clearance.

The combined formulation (liposomes and 16.25% P407) exhibited a markedly prolonged *in vitro* release of dexamethasone compared with free drug, consistent with the presence of MLV and MVV liposomes generated by the PGSS process, as revealed by cryo-TEM. Importantly, the formulation demonstrated excellent cytocompatibility in HEI-OC1 cells and exerted a measurable otoprotective effect in cochlear explants, as evidenced by attenuation of excitotoxicity-induced synaptic puncta swelling. These findings provide functional validation that the formulation not only meets key physicochemical and rheological requirements for inner ear delivery but also preserves biological activity in relevant *in vitro* and *ex vivo* models.

Collectively, this work positions the H_L5_Dexa (16.25% P407) system as a promising translational candidate for local corticosteroid therapy in noise-induced hearing loss (NIHL). Ongoing efforts will focus on *in vivo* efficacy studies using TT administration and auditory brainstem response (ABR) readouts, as well as on the development of advanced *in vitro* RWM models to directly quantify dexamethasone and liposome transport into cochlear target tissues.

CRediT authorship contribution statement

Gauthy Chloé: Investigation, Conceptualization, Methodology, Data curation, Writing – original draft, review & editing. Cole Nicholas: Investigation, Conceptualization, Methodology, Data curation, Writing – original draft, review & editing. Spahic Enes: Investigation, Methodology, Data curation. Closset Raphaël: Investigation, Methodology, Data curation, Writing – original draft. Hendrickx Erika: Methodology, Data curation, Writing – original draft. Conrard Louise: Methodology. Bodadi Yasmina: Investigation, Methodology, Data curation. Magdalena Segura Hugo: Data curation. Tallandier Valentin: Methodology. Van Lerberghe Pierre-Bernard: Methodology. Collard Laurence: Methodology. Penoy Noémie: Methodology, Supervision, Writing – review & editing. Boschini Frédéric: Supervision. Evrard Brigitte: Supervision. Delacroix Laurence: Supervision. Malgrange Brigitte: Funding acquisition, Supervision, Validation, Writing – review & editing. Piel Géraldine: Funding acquisition, Supervision, Validation, Writing – review & editing.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

This work, as part of the NANOPDELEAR project, was supported by the Walloon Region funds (Win2Wal Convention No. 2210045); Dendrogenix (Liège, Belgium); and the CSR-SS funds (Conseil Sectoriel de la Recherche – Sciences de la Santé; University of Liège, Belgium). The authors thank Dr. Patrice Chiap from the Toxicology laboratory (Prof. Corine Charlier - University of Liege, Belgium) for his help with dexamethasone assays (see section III.2.2.2.3.5).

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Declaration of generative AI and AI-assisted technologies in the manuscript preparation process

During the preparation of this work, the authors used ChatGPT in order to improve language and readability. After using this tool, the authors reviewed and edited the content as needed and take full responsibility for the content of the published article.

III.3. Résultats complémentaires

III.3.1. Introduction

En complément des analyses rhéologiques présentées dans cette publication, la température de transition sol-gel de la dispersion colloïdale de P407 a pu être déterminée grâce à la méthode d'inversion de tube [156,288]. Celle-ci permet l'identification macroscopique de la transition sol-gel, sans caractérisation précise de la viscoélasticité du système. Cette approche permet ainsi de comparer rapidement plusieurs formulations entre elles sur base de leur comportement thermosensible [132].

La stabilité des dispersions colloïdales de P407 a également été évaluée, parallèlement à celle des formulations de liposomes destinés à y être intégrés.

Ainsi, la viscosité dynamique apparente, le temps de gélification et la température de transition sol-gel des dispersions colloïdales de P407 ont été suivis sur une période de stockage de 16 semaines afin de vérifier le maintien de leurs propriétés thermosensibles. La stabilité des liposomes a également été suivie sur base de leurs caractéristiques de taille, de PdI et d'EE de la dexaméthasone sur une période de stockage de 28 jours.

Enfin, l'impact des différents constituants de la formulation H_L5_Dexa, contenant 16,25% ou 18,75% de P407, sur la biocompatibilité avec les cellules HEI-OC1, modélisant les cellules ciliées cochléaires, a été évalué. Cette étude constitue une étape préliminaire indispensable avant la réalisation d'études *ex vivo* et *in vivo*, qui permettront d'évaluer plus en détail le potentiel de cette formulation.

III.3.2. Matériel et méthodes supplémentaires

Cette rubrique mentionne uniquement les méthodes supplémentaires à la section III.2.2.2 (page 125) de la publication. Le matériel est commun au matériel de la publication.

III.3.2.1. Évaluation de la température de transition sol-gel

Pour déterminer la température de transition sol-gel, des flacons en verre contenant 5 mL de dispersion colloïdale de P407, dispersant ou non des liposomes, ont été placés dans un bain-marie thermostaté à 20°C et agité à 75 rpm. Après 5 minutes à cette température, chaque

flacon a été retourné pendant 1 minute afin de vérifier si un gel s'était formé et adhéraux parois, ou si la solution s'écoulait. Si la solution s'écoulait, la température du bain était augmentée de 0,5°C et la procédure était répétée jusqu'à obtention de la gélification [288]. La température du bain était contrôlée en plusieurs points tout au long de l'expérience.

III.3.2.2. Etude de stabilité

III.3.2.2.1. Stabilité des dispersions colloïdales de P407

Une étude de stabilité a été réalisée sur les dispersions colloïdales de P407 à 16,25% (H 16,25%) et 18,75% (H 18,75%) en comparant l'évolution de leurs propriétés thermosensibles au cours du temps. Les viscosités à 4°C, 20°C et à 37°C, ainsi que le temps de gélification et la température de transition sol-gel, ont été évalués après 1, 2, 3, 4, 8, 12 et 16 semaines de stockage à +4°C.

III.3.2.2.1.1. Viscosité dynamique apparente

La viscosité dynamique apparente des dispersions colloïdales de P407 à 4°C et 20°C, ainsi que des hydrogels de P407 à 37°C a été mesurée à l'aide d'un viscosimètre Brookfield DV2T (AMETEK Brookfield, Etats-Unis).

À 4°C et 20°C, les mesures ont été réalisées à l'aide du mobile 21 (SC4-21) à 50 rpm, en utilisant une chambre *Small Sample Adapter* préalablement thermostatée. Les relevés ont été effectués toutes les 30 secondes pendant 1,5 minutes.

À 37°C, les mesures ont été réalisées avec le mobile Helipath F (T-F 96) à 0,5 rpm. Les échantillons, placés dans des tubes Falcon de 50 mL, ont été incubés dans un bain-marie à 37°C pendant 1h afin d'assurer leur gélification. Les mesures ont ensuite été effectuées dans les 5 minutes suivant leur retrait du bain, avec des relevés enregistrés toutes les 30 secondes pendant 1,5 minutes.

III.3.2.2.1.2. Temps de gélification

Le temps de gélification des dispersions colloïdales de P407 a été évalué à 37°C afin de simuler les conditions de gélification *in vivo* [289]. Des vials contenant 5 mL de dispersion colloïdale de P407 ont été placés dans un bain-marie thermostaté à 37°C et agités à 75 rpm. Après 1 minute, chaque flacon a été retourné pendant 1 minute afin de déterminer si un gel s'était formé et

adhérait aux parois, ou si la solution s'écoulait. Si la solution s'écoulait, le flacon était immédiatement remplacé dans le bain pendant une minute supplémentaire [156]. Cette procédure a été répétée jusqu'à l'obtention d'une gélification complète.

III.3.2.2.1.3. Température de transition sol-gel

L'évaluation de la température de transition sol-gel a été réalisée conformément au protocole décrit précédemment (section III.3.2.1, page 150).

III.3.2.2.2. Stabilité des liposomes

Les formulations de liposomes à 45 mM encapsulant de la dexaméthasone, produits par la méthode PGSS utilisant le scCO_2 , ont été stockées en chambre froide (+4°C) pendant 28 jours. Après 7, 14, 21 et 28 jours de stockage, les liposomes ont été dialysés, puis analysés par HPLC afin de suivre l'évolution de l'EE et ainsi évaluer la perte en dexaméthasone encapsulée au cours du temps. La stabilité de la taille et du PdI des particules a été évaluée au moyen d'une analyse par DLS.

III.3.2.3. Etude de cytocompatibilité avec la lignée HEI-OC1

La viabilité cellulaire a été évaluée à l'aide du test CCK-8. Les cellules ont étéensemencées dans des plaques 96-puits à une densité de 64 000 cellules/mL, puis incubées pendant 24h avant traitement. Les cellules ont ensuite été exposées à un milieu composé de 10% de tampon HEPES et de 90% de DMEM-FBS, supplémenté en P407 (16,25% ou 18,75%), en liposomes L5 (DSPC/Chol/DSPE-PEG₂₀₀₀ ; 2,79 mM) et/ou en dexaméthasone ($33,0 \pm 4,1 \mu\text{g/mL}$). Après 24h d'incubation, le réactif CCK-8 (MedChemExpress) a été ajouté conformément aux instructions du fabricant, puis l'absorbance à 450 nm a été mesurée afin de quantifier la viabilité cellulaire.

III.3.2.4. Analyse statistique

L'analyse des données a été réalisée à l'aide du logiciel GraphPad Prism (version 8.4.3, La Jolla, CA, États-Unis). Les résultats sont présentés sous forme de moyenne $\pm$ SD. Les différences statistiques entre les groupes ont été évaluées à l'aide d'une ANOVA à un facteur, suivie d'un test de comparaisons multiples de Tukey (Figures 32A et 33). Pour la Figure 30, la comparaison des concentrations de P407 a été réalisée à l'aide d'une ANOVA à un facteur, suivie d'un test de

comparaisons multiples de Tukey, tandis que la comparaison « H – H_L1_Dexa » a été réalisée à l'aide d'un t-test non apparié. Pour la Figure 32B-C, les comparaisons « Jour 1 – Jour 28 » et « L1 – L5 » ont respectivement été réalisées à l'aide de t-tests appariés et non appariés. Une p-valeur < 0,05 est considérée comme statistiquement significative. Les différences non significatives ($p > 0,05$) sont indiquées par « ns ».

III.3.3. Résultats et discussion

III.3.3.1. Identification de la température de transition sol-gel

Comme attendu, la dispersion colloïdale de P407 contenant des liposomes (H_L1_Dexa) a montré une diminution significative de sa température de transition sol-gel (Figure 30) lorsque la concentration en P407 augmente de 16,25% ($32,3 \pm 0,4$ °C) à 17,5% ($27,8 \pm 0,0$ °C ; **** $p < 0,0001$) et à 18,75% ($26,2 \pm 0,6$ °C ; ** $p = 0,0083$). Aucune différence significative n'a été observée entre les formulations dispersant (H_L1_Dexa) ou non (H) des liposomes ($p = 0,1161$ à 16,25% et 17,5% de P407 ; $p = 0,1237$ à 18,75% de P407). La présence des nanoparticules n'altère donc pas la température de transition entre les états de solution et de gel. Afin d'éviter une gélification prématurée et une mauvaise injectabilité, par exemple lors de fortes chaleurs, il semble plus judicieux de privilégier une formulation contenant 16,25% de P407. Non seulement sa température de transition sol-gel est suffisamment élevée pour éviter une gélification prématurée à température ambiante, mais elle est également suffisamment inférieure à la température physiologique pour assurer une gélification complète de la formulation.

Les expérimentations réalisées ont également permis de vérifier visuellement la thermoréversibilité de ces formulations. En effet, dans un hydrogel à base de P407, la structure du gel est maintenue par des interactions physiques, telles que les forces de Van der Waals ou les interactions hydrophobes, entre les chaînes PEO–PPO–PEO. Ce type de structure implique un certain degré de réversibilité, ce qui a permis aux gels formés à 37°C de retrouver leur état liquide par désorganisation des micelles lors du refroidissement de la formulation en dessous de sa température de transition sol-gel [132,134].

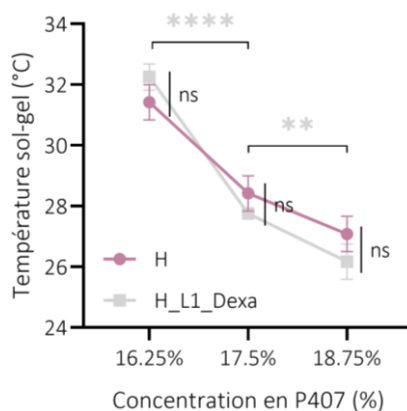


Figure 30 : Comparaison des températures de transition sol-gel (°C) des formulations contenant 16,25%, 17,5% et 18,75% de P407, avec (H_L1_Dexa) ou sans (H) liposomes encapsulant de la dexaméthasone ($n = 3$; moyenne $\pm$ SD ; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; les différences non significatives ($p > 0,05$) sont indiquées par « ns »).

III.3.3.2. Etudes de stabilité

III.3.3.2.1. Stabilité des dispersions colloïdales de P407

Les résultats présentés ci-dessous complètent les informations publiées précédemment (section III.2.2.3.3, page 137).

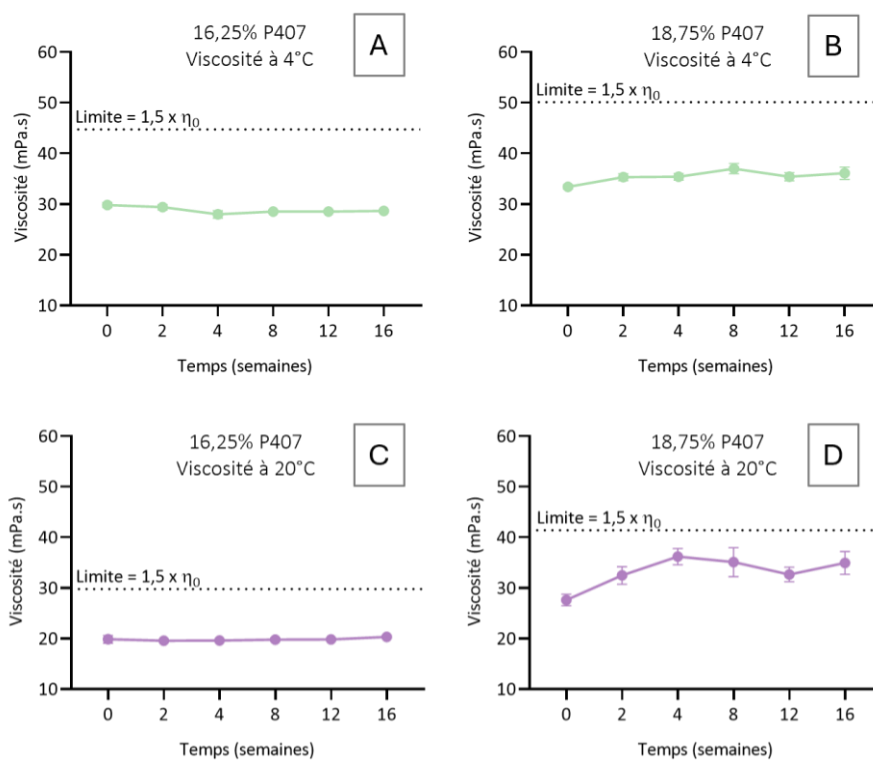
Une étude de stabilité a été menée sur des formulations contenant 16,25% et 18,75% de P407 afin de déterminer si leurs propriétés thermosensibles étaient maintenues après 16 semaines de stockage en chambre froide (4°C). À ce jour, aucune limite de viscosité n'est officiellement définie dans des références telles que la Pharmacopée Européenne pour attester de l'injectabilité ou de la stabilité des formulations thermosensibles. Les limites de viscosité aux différentes températures ont dès lors été fixées arbitrairement.

Ainsi, aux températures de 4°C et 20°C, la viscosité des formulations ne devait pas excéder 1,5 fois la valeur initiale de viscosité (η_0) (Figure 31A-D). D'un point de vue pratique, il suffit que la dispersion colloïdale de P407 conserve un comportement de liquide faiblement visqueux, garantissant une administration aisée par injection. Pour les mesures réalisées à 37°C (Figure 31E-F), une plage d'acceptation comprise entre 0,75 et $1,25 \times \eta_0$ a été définie. En effet, l'hydrogel doit maintenir une viscosité minimale afin de prévenir un écoulement indésirable de la formulation après l'administration. Par ailleurs, le temps de gélification maximal a été fixé à 5 minutes (Figure

PARTIE EXPÉRIMENTALE

31G-H) et la température de transition sol-gel ne pouvait pas varier de plus de 10% par rapport à sa valeur initiale (Figure 31I-J).

Les viscosités des formulations contenant 16,25% et 18,75% de P407, évaluées à 4, 20 et 37°C, sont restées dans les limites prédéfinies pendant les 16 semaines de stockage. Le temps de gélification ainsi que la température de transition sol-gel ont également montré une bonne stabilité au cours de l'étude. Dans l'ensemble, les formulations à base de P407 n'ont présenté aucun signe d'instabilité, ont conservé leur état liquide à 4 et 20°C, facilitant l'injection, et leur état gélifié à 37°C, capable de prolonger le temps de contact avec la RWM.



PARTIE EXPÉRIMENTALE

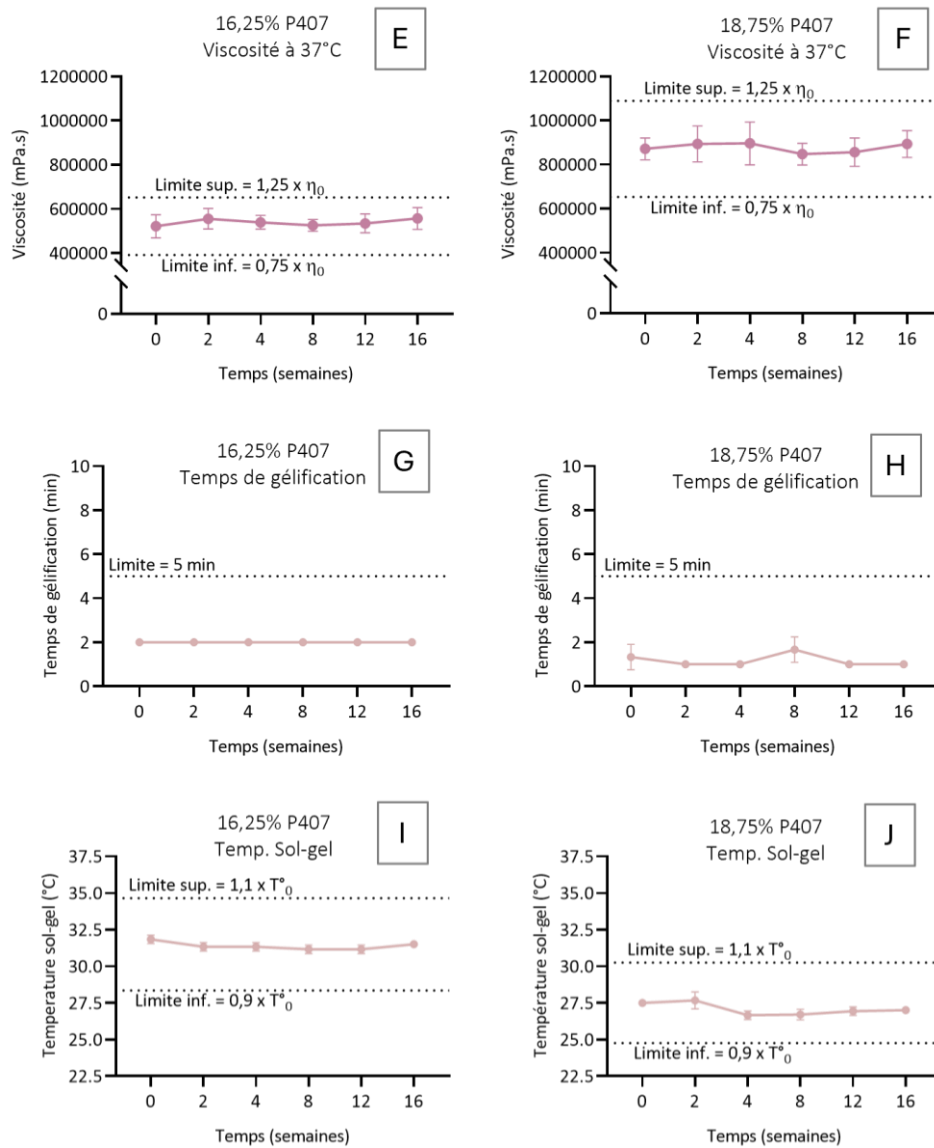


Figure 31 : Etude de stabilité des propriétés thermosensibles des formulations constituées de 16,25% (A, C, E, G, I) et 18,75% (B, D, F, H, J) de P407 sur 16 semaines. Les viscosités à 4°C (A, B), 20°C (C, D) et 37°C (E, F), ainsi que le temps de gélification (G, H) et la température de transition sol-gel (I, J) ont été analysés ($n = 3$; moyenne $\pm$ SD).

III.3.3.2. Stabilité des liposomes

La stabilité des liposomes L1 et L5 encapsulant de la dexaméthasone, conservés à 4°C pendant 7, 14, 21 et 28 jours, a été évaluée sur la base de l'évolution de leur EE, de leur taille et de leur

PARTIE EXPÉRIMENTALE

PdI. Une libération rapide de la dexaméthasone encapsulée a ainsi été observée après seulement 7 jours de stockage (Figure 32A), correspondant à une diminution de l'EE de $10,7 \pm 1,2$ % pour les liposomes L1 (**** $p < 0,0001$) et de $28,8 \pm 1,9$ % pour les liposomes L5 (**** $p < 0,0001$), ce qui témoigne d'une instabilité à court terme de ces formulations. En revanche, la taille des particules ainsi que leur PdI sont restés stables tout au long des 28 jours de stockage pour les deux formulations de liposomes (Figure 32B-C).

L'imagerie par cryo-TEM (section III.2.2.3.5, page 139) a confirmé que les liposomes incorporés dans la dispersion colloïdale de P407 conservaient leur intégrité structurale à court terme (imagerie réalisée dans les 7 jours suivant leur production) et ne semblaient pas être affectés par la présence du P407. Toutefois, la faible stabilité de l'EE observée pour les liposomes souligne la nécessité de développer une stratégie permettant de stabiliser l'ensemble du système hydrogel-liposomes-dexaméthasone. La mise en œuvre de stratégies de stabilisation, telles que la lyophilisation, devrait dès lors être envisagée afin d'améliorer la stabilité à long terme de la formulation.

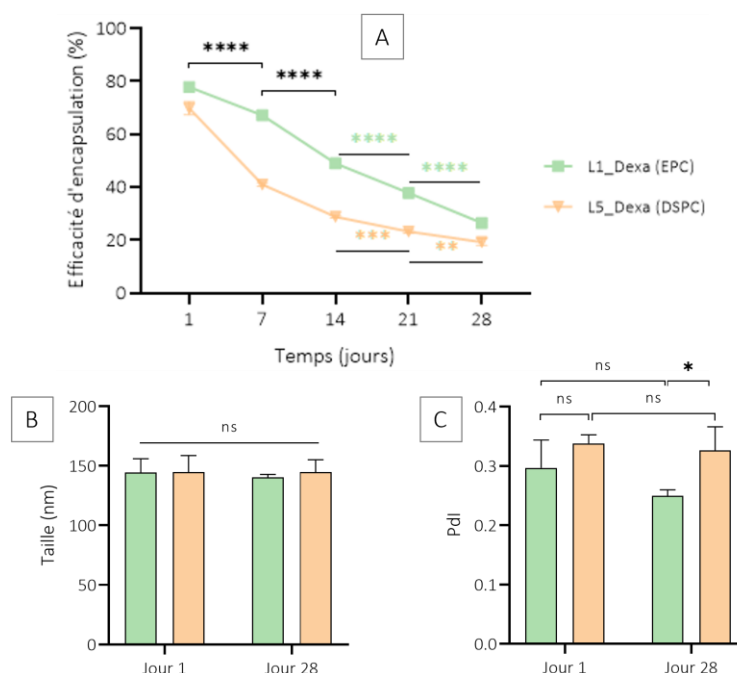


Figure 32 : Evaluation de la stabilité des liposomes L1 (EPC) et L5 (DSPC) encapsulant de la dexaméthasone (Dexa) sur base de l'évolution de leur (A) EE, (B) taille et (C) PdI ($n = 3$; moyenne $\pm$ SD ; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; les différences non significatives ($p > 0,05$) sont indiquées par « ns »).

III.3.3.3. Biocompatibilité des formulations H_L5_Dexa à 16,25% et 18,75% de P407 avec la lignée cellulaire HEI-OC1

Dans les premiers instants suivant l'injection d'une formulation de P407 dans l'oreille moyenne, la formulation, encore à l'état liquide, se répartira dans l'ensemble de la cavité tympanique. Elle devrait ensuite gélifier rapidement et adhérer aux muqueuses, ce qui permettra d'augmenter le temps de résidence des liposomes encapsulant la dexaméthasone au niveau de la RWM. En théorie, l'hydrogel de P407 ne devrait donc ni traverser la RWM ni entrer en contact avec les cellules ciliées cochléaires. Toutefois, par mesure de précaution, la biocompatibilité des différents constituants de la formulation thérapeutique finale (P407, liposomes L5 et dexaméthasone), ainsi que celle des formulations combinées, a été évaluée sur la lignée cellulaire HEI-OC1, modèle *in vitro* des cellules ciliées de l'oreille interne.

Ainsi, la dexaméthasone (33 µg/mL) a démontré une excellente biocompatibilité avec les cellules HEI-OC1 (Figure 33). La biocompatibilité des liposomes L5 a également été confirmée, ce qui était attendu puisque ceux-ci sont principalement constitués de DSPC et de Chol, deux lipides naturellement présents dans les membranes cellulaires [243]. L'association des liposomes et de la dexaméthasone (L5_Dexa) a présenté une biocompatibilité similaire à celle observée pour chacun des constituants évalués séparément.

En revanche, le P407 aux concentrations de 16,25% et 18,75% a induit une diminution marquée de la viabilité cellulaire (****p < 0,0001). Les formulations associant hydrogel et liposomes, encapsulant (H_L5_Dexa) ou non (H_L5) de la dexaméthasone, ont également présenté une faible biocompatibilité aux deux concentrations évaluées. Trois mécanismes susceptibles d'expliquer cet effet ont été identifiés : une contrainte mécanique exercée par l'hydrogel sur les cellules, une diminution de l'apport en oxygène et une hyperosmolarité de la formulation. Tout d'abord, après son dépôt à 20°C, la dispersion colloïdale de P407 se répartit autour des cellules avant de gélifier rapidement lors de son transfert dans l'incubateur (37°C). Cette transition exerce une pression mécanique sur les cellules, pouvant altérer leur intégrité. Ensuite, en conditions *in vitro*, l'apport en oxygène constitue également un paramètre déterminant de la survie cellulaire. La gélification de la formulation augmente fortement la viscosité du milieu et peut ainsi limiter la diffusion de l'oxygène vers les cellules. *In vivo*, cet effet devrait être limité puisque les tissus bénéficient de multiples sources d'oxygénation, notamment via la vascularisation. Enfin, l'osmolarité de la formulation pourrait également contribuer à la diminution de la viabilité cellulaire. En effet, les hydrogels étudiés dans les sections précédentes ont été préparés dans

PARTIE EXPÉRIMENTALE

une solution de tampon HEPES hypotonique. À titre d'exemple, l'ajout de 18,75% de P407 à cette solution conduisait à une osmolarité de 353 ± 22 mOsm/kg. En revanche, lorsque cette même concentration de P407 est incorporée dans une solution tampon isotonique, comparable au milieu de culture utilisé dans cette étude de viabilité, l'osmolarité atteint 760 ± 5 mOsm/kg. Une telle hyperosmolarité pourrait expliquer la diminution de la biocompatibilité observée *in vitro*. Néanmoins, cet effet devrait être atténué *in vivo* en présence d'un tampon hypotonique.

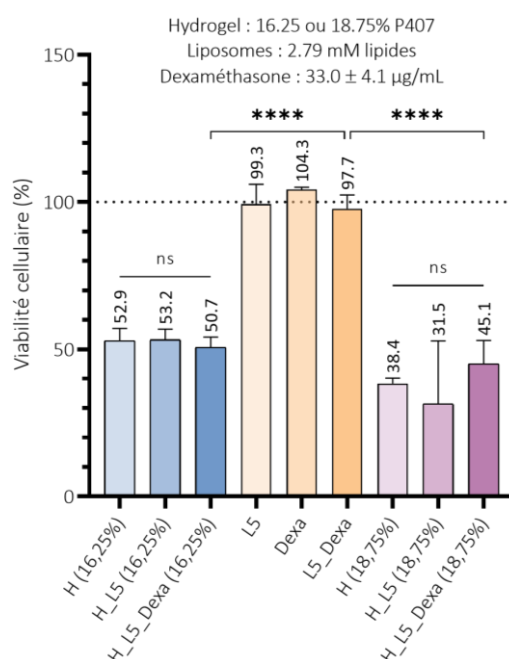


Figure 33 : Evaluation de la viabilité des cellules HEI-OC1 après 24h d'exposition aux différents constituants de la formulation H_L5_Dexa, à savoir des liposomes L5 (DSPC/Chol/DSPE-PEG₂₀₀₀ ; 85/10/5 %mol ; 2,79 mM en lipides), un hydrogel contenant 16,25 ou 18,75% de P407, et de la dexaméthasone (Dexa ; $33 \pm 4,1$ µg/mL). L'ensemble des résultats a été normalisé par rapport à un contrôle de viabilité ($n = 3$; moyenne $\pm$ SD ; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; les différences non significatives ($p > 0,05$) sont indiquées par « ns »).

Dans l'ensemble, il convient donc d'éviter l'usage des hydrogels de P407 lors des études *in vitro*. En revanche, la formulation contenant 16,25% de P407 ayant déjà satisfait aux contraintes pratiques de l'application envisagée, notamment en termes de gélification et d'injectabilité, cette concentration a été retenue pour la suite du développement *ex vivo* (section III.2.2.3.6.2, page 143) et *in vivo*. En outre, son utilisation devrait améliorer la tolérance *in vivo* par rapport à une formulation contenant 18,75% de P407.

III.3.4. Conclusion

La « méthode d'inversion du flacon » a mis en évidence une diminution de la température de transition sol-gel de la formulation lorsque la concentration en P407 augmente. Cette méthode a montré qu'une formulation contenant 16,25% de P407 présente un comportement macroscopique de gel à partir de $32,3 \pm 0,4$ °C, ce qui limite le risque de gélification prématurée si la température ambiante dépassait les 26-28°C, tout en garantissant une gélification complète dans des conditions physiologiques (37°C). En effet, les formulations contenant 17,5% et 18,75% de P407 sont susceptibles de gélifier dès 28°C et 26°C, respectivement.

Les études de stabilité des dispersions colloïdales de P407 et des liposomes, réalisées respectivement sur 16 et 4 semaines, ont souligné l'importance de développer une stratégie de stabilisation des nanoparticules, telle que la lyophilisation. Bien que leur taille et leur PdI soient maintenus après 28 jours, les liposomes conservés en milieu aqueux ont perdu une partie du principe actif encapsulé après seulement 7 jours. Le développement d'une forme sèche de liposomes pourrait améliorer cette stabilité. Par ailleurs, la dispersion colloïdale de P407 a présenté une excellente stabilité de ses propriétés thermosensibles tout au long de l'étude.

La biocompatibilité de la formulation H_L5_Dexa a ensuite été évaluée sur les cellules HEI-OC1 et a révélé une toxicité liée à la composante hydrogel. Trois mécanismes susceptibles d'expliquer cet effet ont été identifiés : une contrainte mécanique exercée par l'hydrogel sur les cellules, une diminution de l'apport en oxygène et une hyperosmolarité de la formulation. Bien que l'usage des hydrogels soit à proscrire pour les futures expérimentations *in vitro*, ces limitations devraient toutefois être négligeables en conditions *in vivo*.

La transposition de ce système combiné hydrogel-liposomes, développé avec la dexaméthasone, à la DX243, peut maintenant être envisagée.

IV. **Partie 3** – Transposition de la formulation combinée hydrogel-liposomes à la DX243

IV.1. Introduction

La DX243, récemment développée par la société Dendrogenix, est une nouvelle molécule thérapeutique amphiphile, synthétique, à noyau stéroïdien, appartenant à la classe des dendrogénines. Ces composés sont reconnus pour leur capacité à stimuler la différenciation cellulaire au sein du système nerveux, ainsi qu'à induire la croissance dendritique des cellules précurseurs neuronales. Grâce à ces propriétés, la DX243 présente un fort potentiel thérapeutique pour favoriser la régénération synaptique dans le traitement des surdités neurosensorielles induites par un traumatisme sonore [290].

La transposition du système combiné hydrogel-liposomes à la DX243 permettrait ainsi de favoriser sa rétention dans la cavité de l'oreille moyenne et sa pénétration cochléaire après administration par voie TT. Au regard des résultats de biocompatibilité et d'effet otoprotecteur obtenus en section III.2.2.3.6 (page 141), la composition lipidique L5 (DSPC/Chol/DSPE-PEG₂₀₀₀ ; 85/10/5 %mol) sera utilisée pour ce transfert. Cette transposition se déroulera en trois étapes. Dans un premier temps, le transfert du protocole de production des liposomes, développé avec la dexaméthasone, vers la DX243 sera évalué par l'analyse des caractéristiques de taille, de PdI et d'EE des liposomes. Ensuite, l'impact de la solubilisation de la DX243 sur la viscosité d'une dispersion colloïdale contenant 16,25% de P407 sera étudié à 4°C, 20°C et 37°C. Enfin, la biocompatibilité de la DX243 avec les cellules HEI-OC1, modélisant les cellules ciliées cochléaires, sera vérifiée *in vitro*.

Les liposomes utilisés dans cette troisième partie de chapitre ont été produits par la méthode TFH à la concentration de 5 mM en lipides totaux. Les caractéristiques structurales observées sont donc comparables à celles rapportées en première partie de chapitre, c'est-à-dire une taille de particule inférieure à 200 nm, une homogénéité de taille acceptable (PdI < 0,30) et une EE du principe actif qui est moindre à la concentration de 5 mM qu'à celle de 45 mM en lipides totaux.

Outre la DX243, une forme « fluorescente » (DX2403) correspondant à la DX243 couplée à un fluorophore a été utilisée pour les applications nécessitant une encapsulation dans des liposomes ainsi qu'une quantification du principe actif, tandis que la DX243 sera employée pour la production des formulations de P407.

Pour des raisons de confidentialité, les structures de ces molécules ne seront pas présentées dans cette thèse. En ce qui concerne leurs caractéristiques physico-chimiques, seules certaines ont été déterminées, tandis que d'autres restent inconnues. Les informations disponibles ne seront toutefois pas communiquées.

IV.2. Matériel et méthodes

IV.2.1. Matériel

La triéthylamine est fournie par Sigma-Aldrich (Belgique). La DX243 et la DX2403 sont fournies par Dendrogenix (Belgique). L'acide formique provient de chez VWR (Allemagne).

IV.2.2. Liposomes

IV.2.2.1. Production

Les liposomes encapsulant de la DX2403 (5 %mol) ont été produits par la méthode TFH à la concentration de 5 mM en lipides totaux, conformément au protocole décrit en section II.2.2 (page 106). La composition lipidique L5 (DSPC/Chol/DSPE-PEG₂₀₀₀ ; 85/10/5 %mol) a été sélectionnée pour ce transfert.

IV.2.2.2. Purification

L'étape de purification des liposomes consiste à éliminer la fraction libre non encapsulée des molécules actives. Les liposomes encapsulant de la DX2403 ont été purifiés par dialyse grâce à des membranes en cellulose régénérée de 12-14 kDa (Pur-A-Lyzer™ Maxi Dialysis Kit, Sigma-Aldrich, USA), plongées dans du tampon HEPES (10 mM, pH 7,4, isotonique) sous agitation (200 rpm) à 4°C. La purification de 1 mL de liposomes demande 100 mL de tampon HEPES. La durée totale de la dialyse est fixée à 4 heures et le tampon HEPES est renouvelé toutes les heures.

IV.2.2.3. Caractérisation

IV.2.2.3.1. Taille et PdI

La taille et le PdI des liposomes ont été mesurés par DLS, conformément au protocole décrit en section II.2.4.1 (page 107).

IV.2.2.3.2. Efficacité d'encapsulation

L'EE de la DX2403 par les liposomes a été évaluée conformément au protocole décrit en section II.2.4.2 (page 107).

IV.2.2.3.3. Quantification de la DX2403 par HPLC

La DX2403 présente dans les échantillons de liposomes a été quantifiée à l'aide d'une méthode HPLC validée. Les protocoles et résultats de validation sont présentés dans l'annexe III (section III, page 318). L'équipement utilisé était un système Agilent® 1100 (Santa Clara, États-Unis) équipé du logiciel OpenLab CDS LC ChemStation (version C.01.05).

La séparation chromatographique a été effectuée sur une colonne analytique Purospher® RP-18 endcappée (125 × 4 mm, 5 µm ; Merck, Allemagne), en utilisant une phase mobile isocratique composée d'eau et d'acétonitrile (65:35, v/v), contenant tous deux 0,1% d'acide formique et 0,1% de triéthylamine, à un débit de 1,0 mL/min. La température de la colonne a été maintenue à 60°C. Les échantillons (5 µL) ont été injectés à température ambiante, avec un temps d'analyse de 6 minutes. La détection de la DX2403 a été réalisée dans le visible à 564 nm, avec un temps de rétention de 2,8 minutes. Les droites de calibration ont été établies à partir de solutions standards préparées à des concentrations de 1, 10, 25 et 50 µg/mL dans un mélange d'eau et d'éthanol absolu (10:90, v/v). Les échantillons ont été dilués 10 fois dans de l'éthanol absolu avant analyse. Cette méthode a été validée avec succès à l'aide du logiciel Enoval® V3.0 (Arlenda, Liège, Belgique). Le risque α a été fixé à 5%, et les limites d'acceptation à 10%.

IV.2.2.4. Dispersions colloïdales de P407

IV.2.2.4.1. Production

Le P407 a été introduit dans du tampon HEPES (10 mM, pH 7,4) afin d'obtenir une dispersion colloïdale « contrôle » (H) à la concentration finale de 16,25% (m/v). Les flacons ont ensuite été conservés à 4°C sous agitation à 200 rpm pendant une nuit afin d'assurer la solubilisation complète du polymère.

Pour les dispersions colloïdales de P407 contenant de la DX243 (H_DX243), le principe actif a été dilué dans un tampon HEPES afin d'obtenir des concentrations comprises entre 0,01 et 10 mg/mL.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Cette gamme de concentrations a été définie arbitrairement en l'absence de concentration thérapeutique connue pour la DX243. Le P407 a ensuite été ajouté selon le même protocole.

IV.2.2.4.2. Viscosité dynamique apparente

La viscosité dynamique apparente des dispersions colloïdales de P407 a été mesurée à 4°C, 20°C et 37°C conformément au protocole décrit en section III.3.2.2.1.1 (page 151).

IV.2.2.5. Etude de la cytocompatibilité avec la lignée HEI-OC1

La viabilité cellulaire a été évaluée conformément au protocole décrit en section III.3.2.3 (page 152). Les cellules ont été exposées 24h à un milieu composé de 10% de tampon HEPES et de 90% de DMEM-FBS, supplémenté en DX243 à des concentrations de 1, 5 ou 10 nM.

IV.2.2.6. Analyse statistique

L'analyse des données a été réalisée à l'aide du logiciel GraphPad Prism (version 8.4.3, La Jolla, CA, États-Unis). Les résultats sont présentés sous forme de moyenne $\pm$ SD. Les différences statistiques entre les groupes ont été évaluées à l'aide d'une ANOVA à un facteur, suivie d'un test de comparaisons multiples de Tukey (Figures 35 et 36). Une p-valeur $< 0,05$ est considérée statistiquement significative. Les différences non significatives ($p > 0,05$) sont indiquées par « ns ».

IV.3. Résultats et discussion

IV.3.1. Transfert du protocole de production des liposomes à la DX2403

La composition lipidique L5, initialement développée pour l'encapsulation de la dexaméthasone, une molécule lipophile, a été transférée à la DX2403.

Puisque la méthode de production implique une étape d'extrusion, les liposomes encapsulant la DX2403 présentent une taille contrôlée de $158,8 \pm 2,4$ nm et un PdI de $0,10 \pm 0,02$. Ces paramètres reflètent respectivement une taille acceptable, puisqu'elle est inférieure à 200 nm et devrait donc permettre le passage à travers la RWM, ainsi qu'une faible polydispersité des particules au sein de l'échantillon. L'EE de la DX2403 atteint les $72,2 \pm 3,6$ %, surpassant ainsi les valeurs précédemment obtenues (section II.3.2, page 114) pour la DSP ($9,9 \pm 2,5$ %) et la

dexaméthasone ($18,4 \pm 0,3 \%$) avec la même composition lipidique. Ceci pourrait s'expliquer par les propriétés amphiphiles de la DX2403 et sa capacité à se placer potentiellement à l'interface entre la bicouche lipidique et la phase aqueuse, qu'il s'agisse de la cavité aqueuse interne au liposome ou de la phase aqueuse extérieure à la particule (Figure 34) [69]. En présentant la possibilité de s'insérer à la fois au niveau du feuillet interne et du feuillet externe de la membrane, la DX2403 pourrait ainsi rentabiliser l'espace à occuper et favoriser son EE.

La cinétique de libération de ce système n'a pas pu être étudiée dans le cadre de cette thèse. Il serait néanmoins intéressant de déterminer si la cinétique de libération de la DX2403 présente elle aussi un profil plus avantageux que celui observé pour la dexaméthasone.

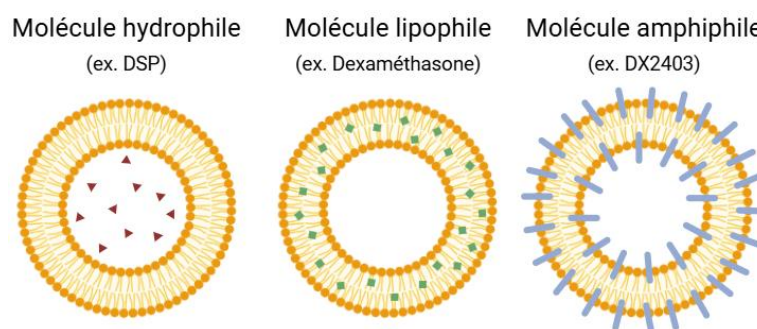


Figure 34 : Lieux d'encapsulation supposés des molécules hydrophiles (ex. DSP), lipophiles (ex. dexaméthasone) et amphiphiles (ex. DX2403), justifiant les différences d'EE observées pour divers principes actifs dans une même formulation de liposomes.

IV.3.2. Impact de la DX243 sur la viscosité de la dispersion colloïdale de P407

L'impact de la libération de la DX243 à partir des liposomes dispersés dans une dispersion colloïdale contenant 16,25% de P407 sur la viscosité de cette dernière a été étudié. Afin de simuler une libération complète du principe actif, la DX243 a été directement solubilisée dans la dispersion colloïdale de P407, sans être préalablement encapsulée dans les liposomes. Puisque la concentration thérapeutique en DX243 au sein de l'oreille interne est inconnue à ce jour, des formulations contenant diverses concentrations en principe actif, variant entre 0,01 et 10 mg/mL, ont été comparées (Figure 35).

PARTIE EXPÉRIMENTALE

L'impact de la présence de la DX243 sur la viscosité apparente d'une dispersion colloïdale de P407 est évalué par le pourcentage de la viscosité de la dispersion contenant la DX243 par rapport à celle de la dispersion contrôle sans DX243 ($[\text{sol_DX243}/\text{sol_ctrl}] \times 100$) (Figure 35).

Lorsque la concentration en DX243 est comprise entre 0,01 et 0,1 mg/mL, la viscosité de la dispersion colloïdale de P407 contenant la DX243 représente entre 94 et 98% de celle de la dispersion colloïdale de P407 contrôle à 4°C, et entre 86 et 93% à 20°C. À ces concentrations, la formulation contenant la DX243 présente une viscosité proche de celle de la formulation contrôle. En revanche, à 37°C, la viscosité de l'hydrogel contenant la DX243 ne représente plus que 24 à 40% de celle de l'hydrogel contrôle, ce qui traduit une baisse importante de la viscosité apparente en présence de DX243. Ces valeurs sont également cohérentes avec la fluidité observée visuellement pour ces échantillons, alors qu'une gélification était attendue. Cet effet pourrait s'expliquer par la capacité de la DX243, en tant que structure amphiphile, à former ses propres micelles ou à s'intégrer au sein des micelles de P407. Elle pourrait ainsi perturber l'organisation du réseau polymérique de P407 et limiter sa gélification.

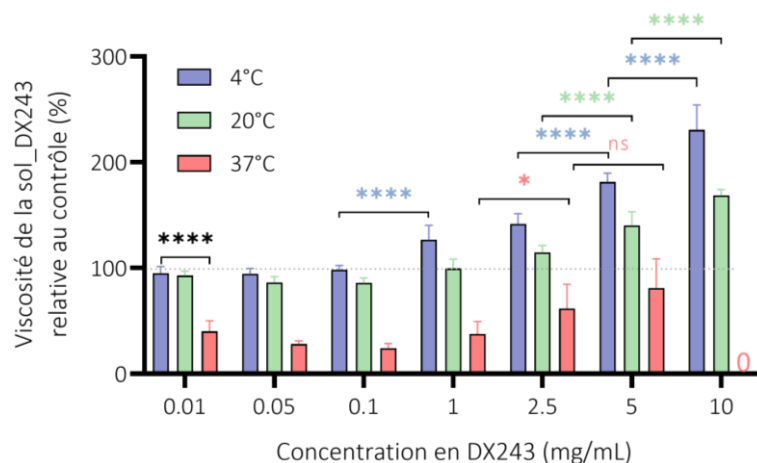


Figure 35 : Représentation de la viscosité dynamique apparente d'une dispersion colloïdale de P407 (16,25%) contenant de la DX243 (sol_DX243), exprimée en pourcentage (%) de celle de la dispersion contrôle (sol_ctrl), en fonction de la concentration en principe actif et de la température ($n = 3$; moyenne $\pm$ SD ; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; les différences non significatives ($p > 0,05$) sont indiquées par « ns »). La viscosité de la sol_DX243 à 10 mg/mL n'a pas pu être mesurée (0).

Lorsque la concentration en DX243 varie entre 0,1 et 10 mg/mL, la viscosité de la dispersion colloïdale de DX243 relative au contrôle augmente significativement, quelle que soit la température.

À 4°C, bien que cette valeur atteigne 231 ± 23 % pour une concentration en DX243 de 10 mg/mL, la dispersion colloïdale conserve un état liquide, mais d'aspect légèrement visqueux. À nouveau, cet effet pourrait s'expliquer par la capacité de la DX243 à former ses propres micelles. En effet, au-delà de sa CMC, qui est inconnue à ce jour, une augmentation de la concentration en DX243 impliquerait une augmentation de la quantité de micelles en solution, ce qui pourrait également favoriser une augmentation de la viscosité de la formulation.

À 20°C, le même phénomène est observé, bien que légèrement atténué, puisque la viscosité de la dispersion colloïdale contenant 10 mg/mL de DX243 n'atteint que 169 ± 6 % de celle de la dispersion colloïdale contrôle. Cette atténuation pourrait être liée à l'élévation de température qui augmenterait l'énergie thermique des micelles formées et diminuerait ainsi la viscosité dynamique apparente de la formulation. À nouveau, puisque celle-ci conserve un état liquide, bien que légèrement visqueux, son injectabilité ne devrait pas être trop impactée.

En revanche, à 37°C, une augmentation de la viscosité de l'hydrogel contenant la DX243, exprimée en pourcentage de celle de l'hydrogel contrôle, n'est observée que pour des concentrations en DX243 comprises entre 1 et 5 mg/mL (1 vs 2,5 mg/mL : * $p = 0,0255$; 1 vs 5 mg/mL : **** $p < 0,0001$). De plus, seules les formulations contenant 2,5 et 5 mg/mL de DX243 ont présenté un aspect visuel gélifié. La mesure de la viscosité de la dispersion colloïdale contenant 10 mg/mL en DX243 n'a pas généré de résultat utilisable car l'échantillon présentait une structure liquide incompatible avec les conditions de mesure, préalablement optimisées pour un échantillon gélifié. Cet état liquide pourrait résulter d'une transition vers une phase auto-assemblée de structure différente, qui présenterait une viscosité inférieure à celle observée aux faibles concentrations en DX243. Plusieurs études ont montré que ce type de phénomène génère un pic de viscosité, tel qu'observé à 5 mg/mL en DX243, avant de revenir à une viscosité proche de sa valeur initiale [291,292]. Une caractérisation plus approfondie, combinant des analyses rhéologiques et de la microscopie, permettrait d'élucider le phénomène observé.

IV.3.3. Etude de la cytocompatibilité avec la lignée HEI-OC1

Dans la perspective du transfert du système thérapeutique hydrogel-liposomes à la DX243, la biocompatibilité de ce principe actif sur les cellules HEI-OC1, modélisant les cellules ciliées cochléaires, a été évaluée (Figure 36).

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Selon la norme ISO 10993-5 relative aux essais de cytotoxicité *in vitro* des dispositifs médicaux, un matériau est considéré comme non cytotoxique lorsque la viabilité cellulaire est supérieure ou égale à 70% du témoin négatif. Dans la littérature consacrée aux biomatériaux, un seuil plus conservateur de 80% est toutefois fréquemment utilisé pour conclure à une bonne cytocompatibilité [293,294].

La DX243 a ainsi démontré une bonne biocompatibilité avec les cellules HEI-OC1 aux concentrations de 1 et 5 nM. Bien qu'aucune différence significative n'ait été observée à 10 nM (5 vs 10 nM : ns, $p = 0,1164$), la viabilité moyenne apparaît toutefois plus faible et passe sous le seuil de 80% considéré comme acceptable.

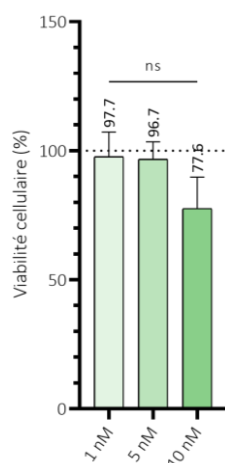


Figure 36 : Evaluation de la viabilité des cellules HEI-OC1 après 24h d'exposition à la DX243 (1, 5 ou 10 nM). L'ensemble des résultats a été normalisé par rapport à un contrôle de viabilité ($n = 3$; moyenne $\pm$ SD ; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; les différences non significatives ($p > 0,05$) sont indiquées par « ns »).

IV.4. Conclusion

Le transfert de la formulation des liposomes à la DX243 s'est révélé concluant, avec une EE atteignant $72,2 \pm 3,6$ %, soit des valeurs nettement supérieures à celles obtenues avec la DSP ($9,9 \pm 2,5$ %) et la dexaméthasone ($18,4 \pm 0,3$ %) pour une même composition lipidique. L'étude de sa cinétique de libération semble dès lors particulièrement prometteuse. En revanche, la présence de DX243 au sein de la dispersion colloïdale de P407 a montré une perturbation des profils de viscosité de la formulation ainsi que de son processus de gélification. En tant que molécule amphiphile, la DX243 pourrait potentiellement s'autoassembler sous forme de micelles,

qui s'intercaleraient entre les micelles de P407 et perturberaient la gélification du réseau polymérique. Enfin, la variation de l'aspect de la formulation, liquide ou gélifiée, semble dépendante de la concentration en DX243. Ce comportement pourrait résulter d'une transition vers une phase auto-assemblée de structure différente [291,292]. L'utilisation de DX243 ne semble donc pas compatible avec le développement d'un hydrogel thermosensible. Une matrice gélifiée à toutes les températures, telle que celles à base d'acide hyaluronique ou de chitosane, semblerait plus appropriée.

L'ensemble des résultats obtenus dans ce premier chapitre semble donc assez prometteur en vue d'une application thérapeutique pour le traitement des surdités neurosensorielles induites par un traumatisme sonore. Toutefois, il reste à démontrer que les liposomes sont capables de traverser la RWM afin de rejoindre la cochlée. Bien que la composition lipidique L5 ait montré une bonne biocompatibilité, les autres constituants lipidiques envisagés dans ce chapitre pourraient également influencer cette pénétration. Il est toutefois difficilement envisageable de réaliser le *screening* d'un grand nombre de formulations *in vivo*. Le développement d'un modèle *in vitro* de RWM permettrait ainsi de limiter autant que possible le recours à l'expérimentation animale.

CHAPITRE II

DÉVELOPPEMENT D'UN MODÈLE *IN VITRO* DE
MEMBRANE DE LA FENÊTRE RONDE PERMETTANT
D'ÉVALUER LE PASSAGE DE MOLÉCULES ET DE
NANOPARTICULES VERS L'OREILLE INTERNE

Chapitre 2 – Développement d'un modèle *in vitro* de membrane de la fenêtre ronde permettant d'évaluer le passage de molécules et de nanoparticules vers l'oreille interne

I. Introduction

L'administration TT de thérapies innovantes constitue aujourd'hui une stratégie prometteuse pour le traitement de nombreuses pathologies de l'oreille interne. En permettant une délivrance locale des principes actifs au plus près de leur site d'action, cette approche vise à contourner les limites de l'administration systémique, notamment la faible biodisponibilité cochléaire et les effets indésirables résultant d'une distribution aspécifique [242]. Dans ce contexte, la RWM représente la principale voie d'accès entre l'oreille moyenne et l'oreille interne. La capacité des molécules thérapeutiques et des nanoparticules à traverser cette barrière biologique constitue donc un paramètre déterminant de leur efficacité.

À ce jour, l'évaluation du passage des thérapies à travers la RWM repose principalement sur des modèles *in vivo* ou *ex vivo* [159,189]. Bien que ces approches aient permis d'améliorer la compréhension des mécanismes de transport à travers la membrane, la grande diversité des modèles utilisés, des protocoles expérimentaux et des critères d'évaluation rapportés dans la littérature rend difficile la comparaison des résultats et la standardisation des méthodes. Par ailleurs, ces modèles présentent des contraintes importantes en termes de coût, de disponibilité des tissus et d'utilisation d'animaux à des fins expérimentales. Le développement d'un modèle *in vitro* représentatif de la RWM apparaît ainsi comme une alternative particulièrement pertinente. Un tel modèle permettrait non seulement de réduire le recours à l'expérimentation animale, conformément aux principes des 3R (Remplacement, Réduction et Raffinement) [295], mais également d'améliorer certaines phases de développement préclinique en offrant un outil reproductible et compatible avec le *screening* de nombreuses formulations thérapeutiques. Quelques modèles *in vitro* ont déjà été proposés dans la littérature, notamment à partir de lignées épithéliales pulmonaires, cutanées ou rénales [160,166,167]. Toutefois, leur pertinence vis-à-vis des caractéristiques physiologiques de la RWM reste variable.

La RWM est constituée de trois couches distinctes, mais sa couche épithéliale externe constitue la principale barrière au passage des molécules et des nanoparticules [160]. La reproduction *in vitro* de cette couche représente donc une stratégie pertinente pour modéliser les propriétés de

perméabilité de la membrane tout en simplifiant le système expérimental. Afin de se rapprocher au mieux de la physiologie humaine, le modèle devrait reposer sur des cellules capables de former un épithélium doté de jonctions serrées et cultivé à l'interface air-liquide (*Air-Liquid Interface*, ALI), à l'image de la RWM située entre le compartiment aérien de l'oreille moyenne et le compartiment périlymphatique cochléaire [6]. Plusieurs lignées épithéliales sont capables de former une barrière polarisée en conditions ALI, notamment des lignées d'origine respiratoire telles que Calu-3 (bronchique), 16HBE14o- (bronchique), RPMI 2650 (cavité nasale) ou NCI-H441 (poumon distal), ainsi que certaines lignées cornéennes comme HCE-T [296–298]. Parmi ces modèles, les lignées Calu-3 et 16HBE14o- apparaissent comme des candidates particulièrement pertinentes pour la modélisation de la RWM en ALI, en raison de leur capacité à établir une barrière épithéliale monostratifiée, continue et fonctionnelle, bien que leurs performances diffèrent en termes de robustesse et de TEER. Les cellules Calu-3, issues d'un adénocarcinome pulmonaire humain, sont notamment reconnues pour former de manière robuste et reproductible une barrière épithéliale présentant une TEER élevée [299,300]. Les cellules 16HBE14o-, issues d'un épithélium bronchique humain sain puis immortalisées, développent également des jonctions serrées, mais leur fonction barrière en ALI apparaît généralement plus modérée et davantage dépendante des conditions de culture [300–302]. Ces deux lignées constituent ainsi des modèles complémentaires pour évaluer les paramètres nécessaires à la reproduction *in vitro* des propriétés de barrière de la RWM. Le phénotype mucosécrétoire des Calu-3 constitue toutefois un élément à prendre en compte, la RWM ne présentant pas physiologiquement de fonction de sécrétion de mucus.

Les études précédentes ont permis d'identifier des formulations de liposomes aux compositions lipidiques prometteuses et présentant des caractéristiques physico-chimiques susceptibles de favoriser la pénétration de la RWM. Il est désormais nécessaire d'évaluer cette aptitude à traverser la membrane.

L'objectif de ce chapitre est donc de développer et de caractériser un modèle de RWM fondé sur les lignées épithéliales Calu-3 et 16HBE14o-. Ce modèle devra permettre de discriminer les cinétiques de passage de molécules thérapeutiques et de nanoparticules, telles que la dexaméthasone et les liposomes, vers un compartiment représentant la périlymphe cochléaire. La biocompatibilité de ces formulations avec les lignées cellulaires Calu-3 et 16HBE14o- sera vérifiée préalablement à l'évaluation de leur cinétique afin d'éviter toute toxicité pouvant dégrader le modèle de RWM.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Toutefois, la vérification de la pénétration des liposomes à travers la RWM ne suffit pas à garantir leur internalisation par les cellules ciliées cochléaires. Afin d'évaluer le potentiel des liposomes à rejoindre leur cible, un modèle en co-culture compartimentée sera établi. Il s'agira de mettre les lignées Calu-3 ou 16HBE14o- comme modèle de RWM dans le compartiment supérieur et des cellules HEI-OC1, représentatives des cellules ciliées, dans le compartiment inférieur (Figure 37). Ce modèle à deux compartiments constitue une approche particulièrement novatrice, combinant pour la première fois la barrière membranaire et les cellules cibles dans un même dispositif *in vitro*. Malgré sa complexité de mise en œuvre, il permettra de reproduire de manière plus fidèle le trajet des vecteurs thérapeutiques, depuis le franchissement de la RWM jusqu'à leur intégration au sein des cellules ciliées.

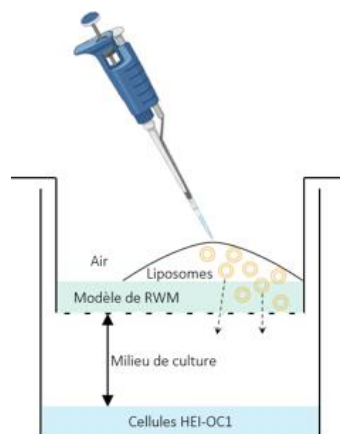


Figure 37 : Dispositif permettant l'étude de l'internalisation des liposomes dans les cellules HEI-OC1 (bleu), modélisant les cellules ciliées cochléaires, après passage d'un modèle *in vitro* de RWM (vert), constitué de cellules Calu-3 ou de cellules 16HBE14o-, dans un système en co-culture compartimentée.

II. Matériel et méthodes

II.1. Matériel

Le Triton X-100 (réf. T8787), l'albumine sérique bovine (BSA ; réf. A9418), la paraformaldéhyde (PFA ; réf. 252549) et la fluorescéine sodique (NaFl ; réf. 46960) ont été fournis par Sigma-Aldrich (Allemagne). Le 25-NBD-Chol a été acheté chez Avanti Polar Lipids, Inc. (États-Unis). Biowest (Nuaillé, France) a fourni les milieux de culture *Dulbecco's Modified Eagle Medium* à haute teneur en glucose et supplémenté en Glutamax (DMEM ; référence L0104), et *Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12* à haute teneur en glucose et supplémenté en Glutamax

(DMEM/F12 ; référence L0093), ainsi que le *Hank's buffered saline solution* (HBSS). La Penicillin-Streptomycin (10,000 U/mL ; référence 15140122) a été achetée chez Gibco by Life Technologies (Carlsbad, Californie, États-Unis).

II.2. Maintien des lignées cellulaires

La lignée cellulaire HEI-OC1 a été utilisée pour évaluer l'internalisation des liposomes [278,279]. Les cellules ont été cultivées dans un milieu DMEM supplémenté avec 10% (v/v) de FBS (DMEM-FBS), à 33°C dans une atmosphère humide (95%) contenant 10% de CO₂.

Les lignées cellulaires Calu-3 et 16HBE14o-, respectivement dérivées d'un adénocarcinome bronchique humain et de cellules épithéliales bronchiques humaines normales immortalisées par l'expression de l'antigène T du SV40, ont été utilisées pour développer le modèle *in vitro* de RWM, ainsi que pour évaluer la cytotoxicité de la formulation H_L5_Dexa. Ces cellules ont été cultivées dans un milieu DMEM/F12 supplémenté avec 1% (v/v) de Penicillin-Streptomycin (10,000 U/mL) et 5% (v/v) de FBS (DMEM/F12-FBS/PS), à 37°C dans une atmosphère humide (99%) contenant 5% de CO₂.

Le milieu de culture a été renouvelé tous les deux jours. Lorsque les cultures atteignaient 80% de confluence, les cellules étaient détachées à l'aide d'une solution de trypsine-EDTA à 0,05%, puis réensemencées dans de nouvelles flasques de culture pour permettre leur croissance.

II.3. Développement des modèles de RWM

Les cellules des lignées Calu-3 et 16HBE14o- ont été respectivement ensemencées à raison de 1.5×10^6 et 2.5×10^5 cellules/mL sur deux types d'inserts Transwell non coatés, l'un présentant une membrane en polyéthylène téréphtalate (PET ; pores de 0,4 µm, réf. Corning™ 3470) et l'autre en polycarbonate (PC ; pores de 0,4 µm, réf. Corning™ 3413), adaptés à des plaques 24-puits. Les compartiments apical et basolatéral contenaient respectivement 200 µL et 500 µL de milieu DMEM/F12-FBS/PS. Les cellules ont été menées à confluence sur l'insert, puis une différenciation en ALI a été réalisée pendant 7 à 21 jours par simple retrait du milieu de culture du compartiment apical. Le milieu de culture dans le compartiment basal a été renouvelé tous les 2 jours.

II.4. Caractérisation de l'épithélium à l'interface air-liquide

II.4.1. Mesure de la résistance électrique transépithéliale

La résistance électrique transépithéliale (TEER) des modèles *in vitro* a été mesurée à l'aide d'une électrode « chopstick » STX-2 reliée à un volt-ohmmètre épithélial (EVOM, World Precision Instruments, USA). Avant les mesures de la TEER, les cellules ont été lavées une fois avec du PBS afin de retirer le mucus et les débris cellulaires. Du milieu DMEM/F12-FBS/PS a été ajouté dans les compartiments basolatéral (500 μ L) et apical (200 μ L), puis les cellules ont été incubées pendant 20 minutes afin de permettre l'équilibration du milieu. La TEER a été mesurée, puis le milieu du compartiment apical a été retiré et les cellules en ALI ont été remplacées dans l'incubateur.

Les données brutes ont été corrigées en soustrayant la résistance électrique mesurée à travers un insert Transwell dépourvu de cellules. Les valeurs finales de TEER ont ensuite été obtenues en multipliant la résistance corrigée par la surface de la membrane Transwell.

II.4.2. Marquage des jonctions serrées

Les protéines constitutives des jonctions serrées ont été visualisées par immunomarquage et microscopie confocale. Après 0, 7, 14 ou 21 jours de différenciation en ALI, les cellules cultivées sur inserts ont été lavées une fois avec du PBS, puis fixées à l'aide d'une solution de PFA à 4% (v/v) pendant 15 min à température ambiante. Les inserts ont ensuite été lavés trois fois avec du PBS, puis les cellules ont été perméabilisées pendant 60 min à température ambiante dans une solution contenant 0,3% (v/v) de Triton X-100 et 5% (m/v) de BSA dans du PBS. Les cellules ont ensuite été incubées toute la nuit à 4 °C avec un anticorps primaire monoclonal de souris anti-ZO-1 (1:100) (réf. 33-9100, Thermo Fisher Scientific), dilué dans une solution de 0,3% (v/v) de Triton X-100 et 0,5% (m/v) de BSA dans du PBS. Le lendemain, les inserts ont été lavés trois fois avec du PBS puis incubés, à l'abri de la lumière, avec un anticorps secondaire anti-souris couplé à de l'Alexa Fluor 488 (1:1000 ; réf. A-21202, Invitrogen), de la phalloïdine-TRITC (1:500 ; réf. P1951, Sigma-Aldrich) et du DAPI (1:5000 ; réf. D9542, Sigma-Aldrich), dilués dans une solution de 0,3% de Triton X-100 et 0,5% (m/v) de BSA dans du PBS, pendant 1h à température ambiante. Enfin, les inserts ont été lavés trois fois au PBS, puis découpés de leur support plastique avant d'être montés sur une lame de microscope (face apicale vers le coverslip) à l'aide du milieu de montage *Dako Fluorescence Mounting Medium* (réf. S302380-2, Agilent Technologies).

L'acquisition des images a été réalisée à l'aide d'un microscope confocal Zeiss LSM 880, équipé de la technologie *Airyscan* en mode *Fast Airyscan* (Carl Zeiss Microscopy, Allemagne), avec les paramètres suivants : objectif à immersion dans l'huile Plan Apochromat 40×/1.3, taille de pixel = 76 nm × 76 nm, acquisition en *z-stack* par pas de 1 µm. Pour l'acquisition du DAPI, une diode laser 405 nm à 2.3 %, un gain à 706 V et un *bandpass* 420-480 ont été utilisés. Pour l'acquisition du ZO-1, un laser Argon 488 nm à 1.4 %, un gain à 650 V, et un *bandpass* 495-550 ont été utilisés. Pour l'acquisition de la phalloïdine, un laser DPSS 561 nm à 2.9 %, un gain à 620 V, et un *bandpass* 570-620 ont été utilisés. Les images ont été traitées avec la méthode *Airyscan processing 3D*.

À la suite des études de pénétration des liposomes, l'intégrité des épithéliums a été vérifiée avec l'adaptation suivante : le deuxième jour du protocole d'immunomarquage, les inserts ont été lavés trois fois avec du PBS puis incubés, à l'abri de la lumière, avec les anticorps secondaires *anti-mouse Alexa Fluor 555* (1:1000 ; réf. A-31570, Invitrogen), phalloïdine 647 (1:1000 ; réf. 65906, Sigma-Aldrich) et DAPI (1:5000 ; réf. D9542, Sigma-Aldrich), dilués dans une solution de 0,3% de Triton X-100 et 0,5% (m/v) de BSA dans du PBS, pendant 1h à température ambiante. Cette adaptation a permis la visualisation du 25-NBD-Chol intégré aux épithéliums.

II.4.3. Étude des flux paracellulaires

L'étude des flux paracellulaires a été réalisée afin d'évaluer l'intégrité de la barrière épithéliale et la formation adéquate des jonctions serrées. À cette fin, un test de perméabilité à la NaFl a été effectué sur les épithéliums après 0, 7, 14 et 21 jours de différenciation cellulaire en ALI sur des inserts en PET. Les membranes ont d'abord été lavées trois fois avec de l'HBSS. Ensuite, 200 µL d'une solution de NaFl (25 µg/mL) et 500 µL d'HBSS ont respectivement été placés dans les compartiments apical et basal, marquant le départ de la cinétique. Les plaques ont ensuite été incubées à 37°C sous 5% de CO₂. Aux temps de prélèvement définis (5, 10, 15, 30, 60, 120, 180 et 240 min), des échantillons de 100 µL ont été prélevés dans le compartiment basolatéral, puis transférés dans une plaque 96-puits. Chaque prélèvement a été compensé par l'ajout d'un volume d'HBSS équivalent. La fluorescence a ensuite été mesurée à l'aide d'un lecteur de microplaques multimode FlexStation 3 (Molecular Devices, Etats-Unis), avec des longueurs d'onde d'excitation de 495 nm et d'émission de 521 nm.

II.5. Test de viabilité cellulaire

La viabilité cellulaire a été évaluée à l'aide du test CCK-8. Les cellules Calu-3 et 16HBE14o- ont été respectivement ensemencées dans des plaques 96-puits à raison de 80 000 et 125 000 cellules/mL, puis incubées pendant 24h avant traitement. Elles ont ensuite été exposées aux différents constituants de la formulation H_L5_Dexa (développée dans le chapitre 1 de cette thèse : section III.2.2.3.1, page 128) grâce à un milieu composé de 10% de tampon HEPES et de 90% de DMEM/F12-FBS/PS supplémenté en P407 (16,25%), en liposomes L5 (DSPC/Chol/DSPE-PEG₂₀₀₀ ; 2,79 mM) et/ou en dexaméthasone (33,0 ± 4,1 µg/mL). Après 24h d'incubation, le réactif CCK-8 a été ajouté conformément aux instructions du fabricant, puis l'absorbance à 450 nm a été mesurée afin de quantifier la viabilité cellulaire.

II.6. Cinétiques de pénétration à travers les modèles de RWM

II.6.1. Production des liposomes

Des liposomes fluorescents ont été produits par ajout de 25-NBD-Chol (formulations présentées dans le Tableau 6) à une concentration en lipides totaux de 45 mM par la méthode TFH, conformément au protocole décrit en section II.2.2 (page 106). Les liposomes ont ensuite été extrudés sous pression à trois reprises à travers des membranes en polycarbonate (Nucleopore®, Whatman, Royaume-Uni) présentant des tailles de pores de 0,4 µm, puis de 0,2 µm, voire de 0,1 µm, afin d'obtenir des liposomes d'un diamètre proche ou inférieur à 200 nm et 100 nm, respectivement.

Tableau 6 : Composition lipidique, taille (nm) et PdI des formulations de liposomes L1, L5, L6 et L9, produites à la concentration lipidique totale de 45 mM par la méthode TFH (n = 3 ; moyenne ± SD). Les liposomes extrudés sur des filtres de 100 nm sont suivis de la lettre « s » (small liposomes), tandis que ceux extrudés sur des filtres de 200 nm sont suivis de la lettre « l » (large liposomes).

Formulation	Phospholipide(s) (%mol)	Chol (%mol)	25-NBD-Chol (%mol)	DSPE-PEG ₂₀₀₀ (%mol)	Taille mesurée (nm)	PdI mesuré
L1l	EPC (85)	(9,5)	(0,5)	(5)	169 ± 3	0.12 ± 0.02
L5s	DSPC (85)			(5)	122 ± 2	0.04 ± 0.02
L5l	DSPC (85)			(5)	156 ± 1	0.09 ± 0.03
L6s	DSPC (65)/DOPE (20)			(5)	122 ± 2	0.04 ± 0.01
L6l	DSPC (65)/DOPE (20)			(5)	157 ± 1	0.09 ± 0.01
L9l	DSPC (75)			(15)	97 ± 1	0.28 ± 0.01

Des liposomes non fluorescents (formulation L6s : DSPC/DOPE/Chol/DSPE-PEG₂₀₀₀ - 65/20/10/5 %mol) encapsulant de la dexaméthasone (L6s_Dexa) ont ensuite été produits suivant le même protocole, avant d'être purifiés par dialyse conformément au mode opératoire décrit en section II.2.3 (page 106).

II.6.2. Caractérisation des liposomes

La taille et le PdI des liposomes (45 mM) ont été mesurés par DLS, conformément au protocole décrit en section III.2.2.2.3.1 (page 127).

II.6.3. Tests de pénétration

Pour le test de pénétration des liposomes fluorescents à travers les modèles de RWM, ceux-ci ont d'abord été dilués dix fois dans du milieu DMEM/F12-FBS/PS afin d'obtenir une concentration en lipides de 4,5 mM. Les membranes Calu-3 et 16HBE14o-, développées sur inserts en PC, ont été lavées avec un milieu contenant 10% de tampon HEPES et 90% de DMEM/F12-FBS/PS. Ensuite, 200 µL de la solution de liposomes (4,5 mM) et 500 µL du milieu HEPES / DMEM/F12-FBS/PS ont respectivement été placés dans les compartiments apical et basal, marquant le départ de la cinétique. Les plaques ont ensuite été incubées sous agitation légère (60 rpm) à 37°C avec 5% de CO₂. Aux temps de prélèvement définis (4, 8, 24, 48 et 72h), l'ensemble du milieu basal (500 µL) a été prélevé, puis 100 µL de celui-ci ont été transférés dans une plaque 96-puits. Le milieu basal a ensuite été remplacé pour permettre la poursuite de l'étude. La fluorescence a ensuite été mesurée à l'aide d'un lecteur de microplaques multimode FlexStation 3 (Molecular Devices, Etats-Unis), avec des longueurs d'onde d'excitation et d'émission de 467 et 538 nm.

Afin d'étudier la cinétique de pénétration de la dexaméthasone, encapsulée ou non dans des liposomes, les liposomes L6s_Dexa ont d'abord été dilués dix fois dans du milieu DMEM/F12-FBS/PS, afin d'obtenir une concentration en dexaméthasone de 50 µg/mL. Une solution contrôle à 50 µg/mL de dexaméthasone a également été préparée en ajoutant 1 µL d'une solution mère de dexaméthasone dans du DMSO (50 mg/mL) à 999 µL de milieu HEPES / DMEM/F12-FBS/PS (10/90 %v/v). Le protocole décrit ci-dessus a ensuite été appliqué. La dexaméthasone présente dans le milieu basolatéral a été quantifiée par LC-MS/MS (Synovo GmbH, Allemagne), selon la méthode décrite en annexe IV (section IV, page 332).

II.7. Modèle en co-culture compartimentée

II.7.1. Développement des co-cultures

Deux types de co-cultures ont été réalisées en parallèle : Calu-3/HEI-OC1 et 16HBE14o-/HEI-OC1. Le 1^{er} jour, des inserts en PC ont étéensemencés avec la lignée Calu-3 afin de développer un épithélium en ALI pendant 14 jours, conformément au protocole décrit précédemment (section II.3, page 176). Le 12^e jour, les cellules HEI-OC1 ont étéensemencées dans des plaques 24-puits à raison de 10 000 cellules/mL, puis incubées à 33°C dans une atmosphère humide (95%) contenant 10% de CO₂. Le milieu de culture a été changé après 48h. Le 13^e jour, des inserts en PC ont étéensemencés avec la lignée 16HBE14o- afin de développer un épithélium, comme décrit précédemment (section II.3, page 176). Le 16^e jour, les modèles de RWM (Calu-3 et 16HBE14o-) ont été lavés trois fois au PBS, puis ces inserts ont été placés dans les puits contenant les cellules HEI-OC1. La co-culture a ensuite été utilisée dans les 6h qui ont suivi.

II.7.2. Evaluation de l'internalisation des liposomes par la lignée HEI-OC1 après passage du modèle de RWM

Afin d'évaluer l'internalisation des liposomes fluorescents par les cellules HEI-OC1 après traversée d'un modèle de RWM, les formulations L5s et L6s développées précédemment (section II.6.1, page 179) ont été diluées dix fois dans du milieu DMEM-FBS pour donner les solutions S1-L5s et S1-L6s (4,5 mM en lipides). Celles-ci ont été diluées 2,5 fois dans un milieu HEPES / DMEM-FBS (10/90 %v/v) afin de préparer les solutions S2-L5s et S2-L6s (1,8 mM en lipides).

L'étude d'internalisation a repris 7 conditions différentes. Pour les modèles Calu-3/HEI-OC1, 200 µL de solution S1-L5s ou S1-L6s (4,5 mM en lipides) ont été déposées dans le compartiment apical, alors que 500 µL de milieu HEPES / DMEM-FBS (10/90 %v/v) ont été placés en basal. Les modèles 16HBE14o-/HEI-OC1 ont également été soumis à ces deux conditions. Le contrôle négatif (Ctrl -) consiste en un puit de cellules HEI-OC1 contenant 500 µL de milieu HEPES / DMEM-FBS (10/90 %v/v). Les contrôles positifs (Ctrl +) consistent en un puit de cellules HEI-OC1 contenant 500 µL de solution S2-L5s ou S2-L6s (1,8 mM en lipides). Les co-cultures ont ensuite été incubées pendant 6h à 33°C dans une atmosphère humide (95%) contenant 10% de CO₂. Ensuite, les cellules HEI-OC1 ont été traitées à la trypsine-EDTA (0,05%), collectées puis reprises dans 250 µL de PBS pour être analysées à l'aide du logiciel CytExpert sur un cytomètre

en flux CytoFLEX (Beckman Coulter, Inc., États-Unis). Un minimum de 10 000 événements était requis pour mesurer la fluorescence des cellules HEI-OC1.

II.8. Analyse statistique

L'analyse des données a été réalisée à l'aide du logiciel GraphPad Prism (version 8.4.3, La Jolla, CA, États-Unis). Les résultats sont présentés sous forme de moyenne $\pm$ SD. Les différences statistiques entre les groupes ont été évaluées à l'aide d'un t-test non apparié (Figure 45) ou d'une ANOVA à un facteur, suivie d'un test de comparaisons multiples de Tukey (Figures 38, 41, 42, 43 et 46) ou de Dunnett (Tableau 7). Une p-valeur $< 0,05$ est considérée statistiquement significative. Les différences non significatives sont indiquées par « ns ».

III. Résultats et discussion

III.1. Développement et caractérisation d'un épithélium à l'interface air-liquide

Conformément à certains protocoles décrits dans la littérature [303,304], les cellules Calu-3 et 16HBE14o- ont d'abord étéensemencées sur des inserts en PET. Au cours des essais menés, la dexaméthasone a démontré sa capacité à franchir la membrane en PET. En revanche, ce n'était pas le cas des liposomes, bien qu'ils aient une taille (max. 200 nm) inférieure à celle des pores de la membrane (0,4 μ m). De nouveaux essais ont alors permis de démontrer qu'une membrane en PC de même taille de pore que la membrane en PET permettait le passage des liposomes. Le modèle de RWM en ALI a donc été développé à partir de deux lignées cellulaires, chacune ensemencée sur les deux types d'inserts. Les modèles ont ensuite été caractérisés par trois méthodes complémentaires : la mesure des TEER, la visualisation des jonctions serrées par immunomarquage et l'évaluation des flux paracellulaires.

III.1.1. Mesure de la résistance électrique transépithéliale

Les valeurs de TEER obtenues dans cette étude sont difficilement comparables à celles rapportées dans la littérature. En effet, cette résistance est fortement dépendante du type cellulaire utilisé, ainsi que des conditions expérimentales, notamment du type d'électrodes, de la température de mesure, de la nature de l'insert et du milieu employé (HBSS, PBS ou milieu de culture) qui peut présenter une composition ionique et une conductivité électrique variable [305]. Par conséquent, aucune valeur précise de TEER n'est attendue. L'interprétation des résultats repose davantage

PARTIE EXPÉRIMENTALE

sur l'évolution de la TEER au cours du temps, dont la tendance permet d'apprécier le développement de l'effet barrière et d'identifier les périodes où celui-ci est le plus marqué. Les résultats obtenus avec les inserts en PET et en PC ne sont donc pas directement comparables, mais apportent des informations complémentaires.

Les résultats de TEER obtenus avec les modèles de RWM développés sur des inserts en PET (Figure 38A) montrent que la lignée 16HBE14o- présente une résistance élevée et donc un effet barrière dès sa confluence (J0) à l'interface liquide-liquide (LLI), c'est-à-dire sans nécessiter de différenciation en ALI. Cependant, après quelques jours de différenciation, la TEER chute et témoigne ainsi d'une dégradation de l'épithélium (J0 – J7 : * $p = 0,0249$). Les résultats obtenus sur les inserts en PC (Figure 38B) sont particulièrement surprenants, puisque dans ce cas, l'effet barrière observé avec les cellules 16HBE14o- semble maintenu tout au long de la période de différenciation en ALI.

A l'inverse, le modèle Calu-3 sur insert en PET (Figure 38A) ne présente aucune différence significative entre les résistances mesurées aux différents stades de développement en ALI, tandis que sur insert en PC (Figure 38B), l'effet barrière semble se développer lors des 7 premiers jours de différenciation en ALI (** $p = 0,0017$). Cette résistance est ensuite maintenue entre J7 et J21.

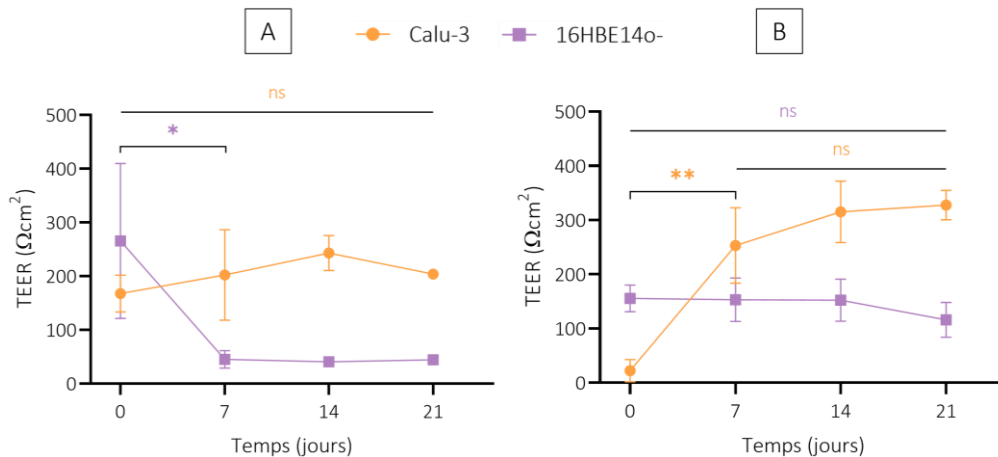


Figure 38 : Mesure de la TEER en fonction du temps des modèles de RWM développés à partir des cellules Calu-3 et 16HBE14o-, sur inserts en PET (A) ou en PC (B), démontrant un effet barrière qui se construit lors de la différenciation en ALI pour Calu-3, et qui chute dès l'exposition en ALI pour 16HBE14o- ($n = 3$; moyenne $\pm$ SD ; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; les différences non significatives ($p > 0,05$) sont indiquées par « ns »).

III.1.2. Visualisation des jonctions serrées

L'immunofluorescence a mis en évidence les jonctions serrées (ZO-1) qui se sont formées entre les cellules au cours du temps et qui démontrent la qualité de l'effet barrière.

Les modèles de RWM constitués de cellules Calu-3 (Figure 39), sur des inserts en PET comme en PC, présentent des micro-espaces entre les cellules à J0, malgré leur confluence apparente au microscope optique à contraste de phases. Après 7 jours de différenciation en ALI, un tapis cellulaire confluent s'est formé et des jonctions serrées sont apparues sur les deux types d'inserts, parfois autour de cellules individuelles, parfois autour de petits regroupements cellulaires. Cette apparition de jonctions serrées peut être corrélée à l'élévation de la TEER observée précédemment avec le modèle Calu-3 (Figure 38B) après 7 jours de différenciation en ALI sur un insert en PC. L'immunomarquage appuie donc l'hypothèse de la mise en place d'un effet barrière dès ce stade de développement.

D'après ces images, un minimum de 7 à 14 jours de différenciation semble nécessaire pour développer des jonctions serrées régulières et fournir un effet barrière correct. Celui-ci semble néanmoins stable jusqu'à 21 jours en conditions ALI, ce qui permet d'envisager des expérimentations de longue durée sans altération majeure de l'intégrité du modèle, notamment entre J14 et J21.

Avec le modèle 16HBE14o- (Figure 40), c'est l'inverse qui est observé. Un tapis cellulaire parfaitement confluent avec des jonctions serrées très régulières est présent dès J0, témoignant d'un bon effet barrière sans nécessité de différenciation en ALI. Au cours du temps (J7-J21), l'épithélium semble se dégrader légèrement puisque des débris apoptotiques sont visibles. En parallèle, certaines cellules semblent en phase de prolifération et amorcent la formation d'une seconde couche cellulaire. L'épithélium 16HBE14o- semble donc être un tissu plus dynamique, qu'il conviendrait d'utiliser dès son arrivée à confluence (J0). Ces observations sont également cohérentes avec les conclusions tirées à l'étape précédente à partir des résultats de TEER obtenus sur les inserts en PET (Figure 38A).

Par ailleurs, aucune différence de structure n'est visible entre les épithéliums développés sur les inserts en PET ou en PC, quelle que soit la lignée cellulaire. Ces supports semblent donc générer des modèles de RWM équivalents, ce qui suggère que les deux inserts sont interchangeables. Seule une différence d'intensité de la fluorescence est observée, et celle-ci pourrait s'expliquer par l'opacité plus élevée de la membrane en PC par rapport à la membrane en PET.

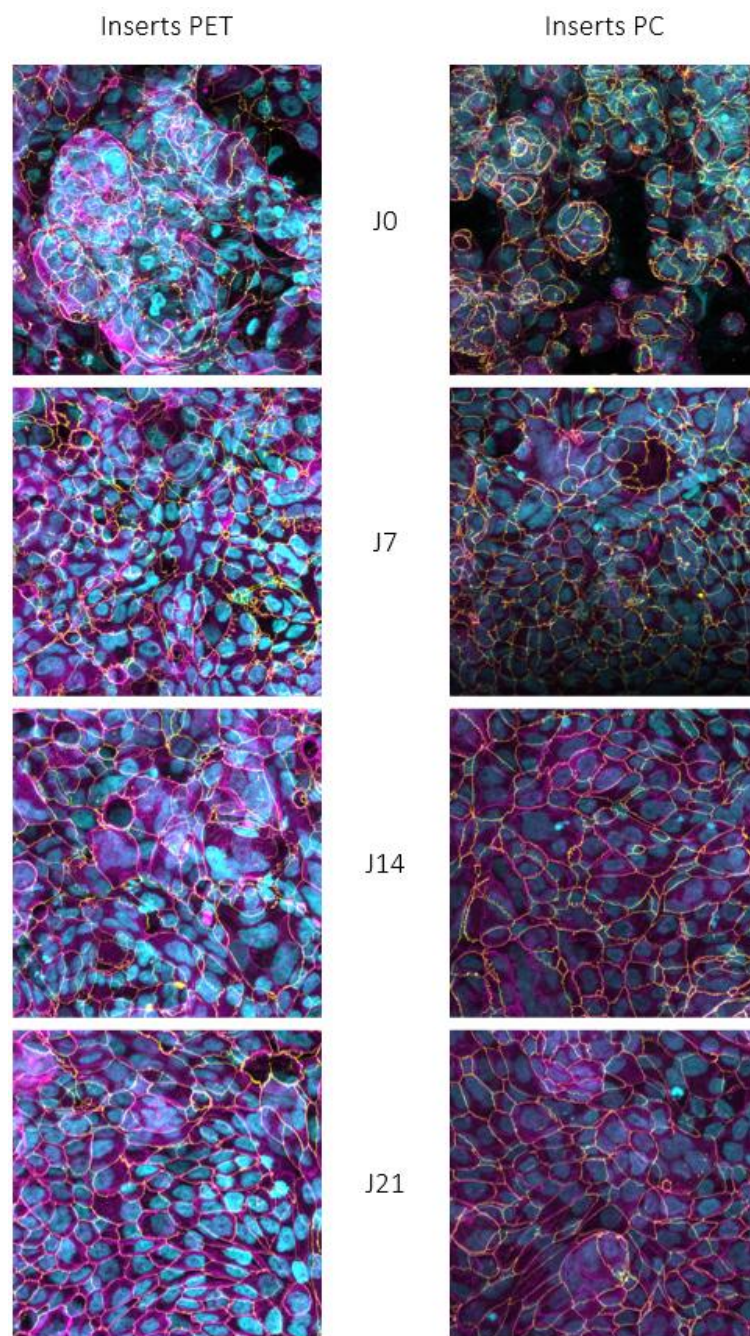


Figure 39 : Immunofluorescence d'un épithélium Calu-3, développé sur inserts en PET ou en PC, à différents stades de différenciation en ALI (J0, J7, J14, J21). Les noyaux cellulaires (DAPI ; cyan), l'actine cellulaire (phalloïdine ; magenta), et les jonctions serrées (ZO-1 ; jaune) qui se sont formées entre les cellules Calu-3 ont été marquées pour démontrer la qualité de l'effet barrière.

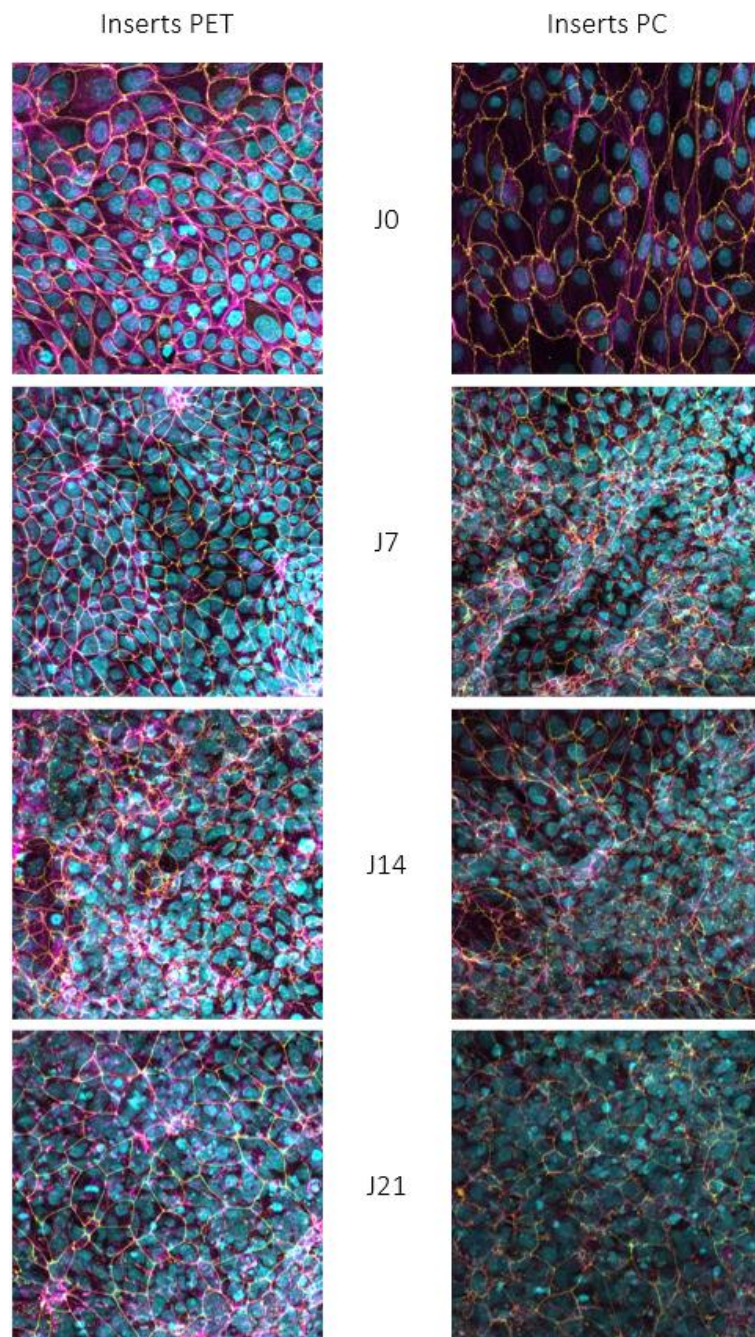


Figure 40 : Immunofluorescence d'un épithélium 16HBE14o-, développé sur inserts en PET ou en PC, à différents stades de différenciation en ALI (J0, J7, J14, J21). Les noyaux cellulaires (DAPI ; cyan), l'actine cellulaire (phalloïdine ; magenta), et les jonctions serrées (ZO-1 ; jaune) qui se sont formées entre les cellules 16HBE14o- ont été marquées pour démontrer la qualité de l'effet barrière.

III.1.3. Evaluation du flux paracellulaire

La dernière étape de la caractérisation des modèles de RWM consiste à évaluer le passage paracellulaire d'une petite molécule fluorescente, la NaFl, utilisée comme traceur. Un modèle épithélial présentant des jonctions serrées fonctionnelles et donc un effet barrière efficace devrait limiter, voire empêcher, le passage de ce traceur. Comme énoncé précédemment, les résultats de TEER et d'immunofluorescence témoignent d'une équivalence de structure entre les épithéliums formés sur inserts en PET et en PC, et ce en respectant les mêmes délais de développement. L'étude des flux paracellulaires a uniquement été réalisée sur les modèles de RWM développés sur des inserts en PET.

Avant sa différenciation en ALI (J0), le modèle Calu-3 permet un passage paracellulaire conséquent, suggérant ainsi que son effet barrière n'est pas complètement développé (Figure 41). Après 7 jours de différenciation, le passage est fortement réduit (**** $p < 0,0001$), ce qui témoigne du développement de l'effet barrière de l'épithélium en ALI au cours du temps. Cet effet barrière à J21 est légèrement diminué (** $p = 0,0040$), permettant davantage le passage de la NaFl, mais demeure globalement bien préservé. Globalement, un épithélium Calu-3 présentant 7 à 21 jours de différenciation en ALI est capable de limiter le passage paracellulaire et constitue dès lors un modèle de RWM intègre.

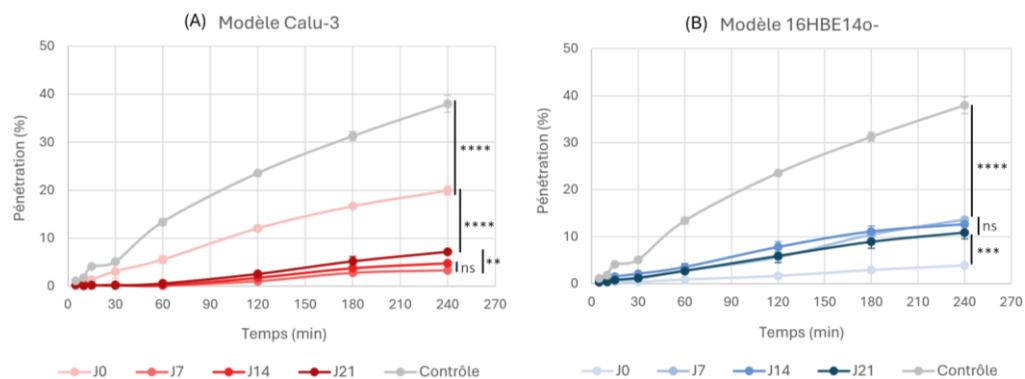


Figure 41 : Evaluation du passage paracellulaire de la NaFl à travers les modèles (A) Calu-3 et (B) 16HBE14o-, développés sur des inserts en PET, après 0, 7, 14 ou 21 jours de différenciation en ALI. Le contrôle consiste en un insert sans cellules, laissant passer librement la NaFl ($n = 3$; moyenne $\pm$ SD ; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; les différences non significatives ($p > 0,05$) sont indiquées par « ns »).

A l'inverse, le modèle 16HBE14o- limite fortement le passage paracellulaire de la NaFl (**** $p < 0,0001$) dès sa confluence (J0). À la suite de sa différenciation en ALI (J7-J21), l'épithélium

permet toujours de limiter le flux de NaFl par rapport à l'insert contrôle, mais moins efficacement qu'à J0, avant sa différenciation (**p = 0,0003).

À nouveau, ces résultats confirment les tendances observées précédemment avec les TEER et l'imagerie des jonctions serrées.

III.1.4. Identification du stade optimal de développement à l'interface air-liquide

Le modèle Calu-3 présente une TEER élevée entre le 7^e et le 21^e jour de différenciation en ALI, des jonctions serrées visibles en immunofluorescence qui sont très régulières à J14, bien qu'elles apparaissent déjà à J7, ainsi qu'un passage paracellulaire fortement limité après 7 à 14 jours en ALI. Les TEER, l'immunofluorescence et l'évaluation des flux paracellulaires s'accordent également sur une intégrité membranaire maintenue jusqu'à J21. Sur la base de ces observations, les prochaines expérimentations seront réalisées à l'aide d'un modèle Calu-3 à J14, qui semble représenter le stade de différenciation en ALI le plus approprié pour cette lignée cellulaire. L'épithélium sera utilisable pendant 7 jours avec la certitude d'une intégrité maintenue jusqu'à J21 en ALI.

En revanche, le modèle 16HBE14o- présente une TEER élevée dès sa confluence sans passer par une différenciation en ALI (J0), des jonctions serrées parfaitement régulières autour de chaque cellule à J0, ainsi qu'un passage paracellulaire majoritairement limité à J0 également. Les prochaines expérimentations seront donc réalisées à l'aide d'un modèle 16HBE14o- à J0. En revanche, l'épithélium présente déjà des signes de dégradation à J7. Il conviendra dès lors d'utiliser ce modèle dès son arrivée à confluence (J0), sans garantie du maintien de son intégrité entre J1 et J7 en ALI.

Il est important de noter que, *in vitro* comme *in vivo*, les expérimentations visant à étudier la pénétration de molécules ou de nanoparticules à travers ces modèles seront réalisées au niveau d'une membrane située en LLI (formulation thérapeutique *vs* milieu receveur), et non en conditions ALI, lesquelles ne concernent que l'épithélium au repos. L'exposition prolongée à ces conditions pourrait ainsi induire de légères modifications du comportement épithélial. L'intégrité du modèle devra donc être vérifiée en fin de test.

Puisque les expérimentations de ce travail impliquent des liposomes, les inserts en PC, permettant leur passage, seront privilégiés. Cependant, dans une optique plus générale, les deux types

d'inserts (PET et PC) conviennent pour le développement d'un épithélium Calu-3 ou 16HBE14o-intègre.

III.2. Evaluation de la biocompatibilité de la formulation H_L5_Dexa avec les cellules Calu-3 et 16HBE14o-

Avant qu'elles n'atteignent les cellules ciliées cochléaires, les formulations injectées par voie TT entrent en contact avec la RWM, dont la couche externe est modélisée *in vitro* à l'aide de cellules Calu-3 ou 16HBE14o-. La biocompatibilité des différents composants de la formulation thérapeutique finale H_L5_Dexa doit donc être évaluée sur ces lignées cellulaires.

Comme énoncé précédemment (section IV.3.3, page 167), un matériau est considéré non cytotoxique lorsque la viabilité cellulaire est supérieure ou égale à 70% du témoin négatif (norme ISO 10993-5). Néanmoins, un seuil plus conservateur de 80% est généralement utilisé dans la littérature consacrée aux biomatériaux [293,294].

Les cellules exposées à la dexaméthasone et aux liposomes L5 présentent des viabilités supérieures au seuil de 80% considéré comme acceptable. Ces constituants sont donc considérés biocompatibles avec les deux lignées cellulaires, qu'ils soient étudiés individuellement ou de manière combinée dans la formulation L5_Dexa (Figure 42). La présence de liposomes (L5) semble même exercer un léger effet nutritif sur les cellules Calu-3 [306], dont la viabilité tend à augmenter au-delà de 100%. Cette observation est cohérente avec plusieurs études rapportant une faible cytotoxicité des liposomes, ainsi qu'une viabilité élevée des cellules Calu-3 après exposition à différentes formulations de ces liposomes [76]. La dexaméthasone pourrait également contribuer à une légère augmentation de la viabilité en inhibant certaines voies de stress cellulaire et d'apoptose [307]. En revanche, les traitements à base de P407 (H, H_L5, H_L5_Dexa) ont montré une viabilité significativement diminuée sur les cellules 16HBE14o- (entre 55 et 76% ; Dexa vs H_L5_Dexa : *p = 0,0161), tandis qu'ils semblent bien tolérés par les cellules Calu-3 (viabilité entre 94 et 103%). Comme expliqué précédemment (section III.3.3.3, page 158), trois facteurs pourraient expliquer cette baisse de viabilité : la pression mécanique exercée par la gélification de l'hydrogel sur les cellules, la réduction de l'apport en oxygène, et l'hyperosmolarité de la formulation en conditions *in vitro*. *In vivo*, ces inconvénients devraient être atténués, et leur impact sur la viabilité cellulaire devrait être réduit. Toutefois, l'étude du passage de cette formulation à travers un modèle *in vitro* de RWM devra être réalisée en l'absence de la composante hydrogel. En effet, toute altération de l'intégrité de la membrane induite par

PARTIE EXPÉRIMENTALE

l'hydrogel pourrait conduire à une surestimation artificielle de la perméabilité des composés testés. Par ailleurs, la biocompatibilité de l'hydrogel a pu être vérifiée *ex vivo* à l'aide d'explants cochléaires (section III.2.2.3.6.2, page 143).

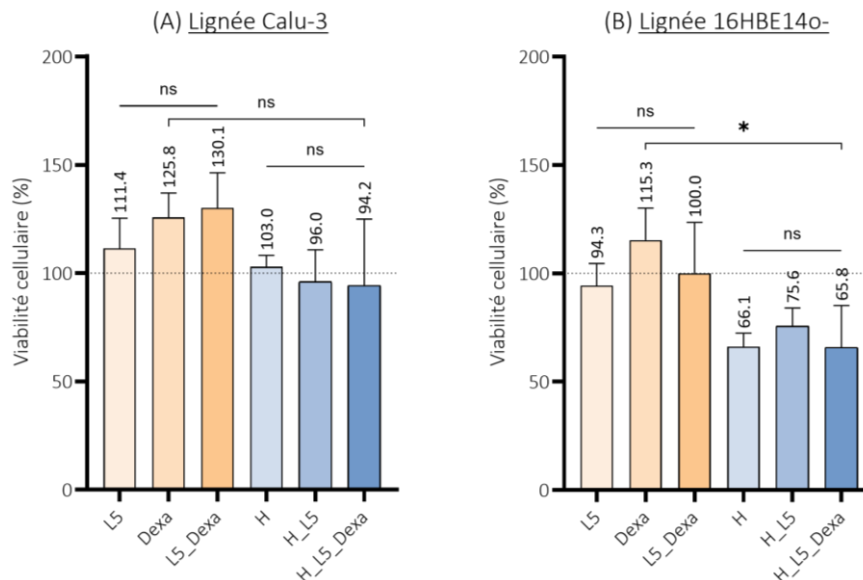


Figure 42 : Evaluation de la viabilité des cellules (A) Calu-3 et (B) 16HBE14o- après 24h d'exposition aux différents constituants de la formulation H_L5_Dexa, à savoir des liposomes L5 (DSPC/Chol/DSPE-PEG₂₀₀₀ ; 85/10/5 %mol ; 2,79 mM en lipides), un hydrogel contenant 16,25% de P407, et de la dexaméthasone (Dexa ; $33 \pm 4,1$ µg/mL). L'ensemble des résultats a été normalisé par rapport à un contrôle de viabilité ($n = 3$; moyenne $\pm$ SD ; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; les différences non significatives ($p > 0,05$) sont indiquées par « ns »).

III.3. Évaluation de la cinétique de pénétration des liposomes à travers les modèles de RWM

III.3.1. Impact de la composition lipidique des liposomes sur la cinétique de pénétration

Des liposomes comprenant un lipide fluorescent (25-NBD-Chol), de diverses compositions lipidiques (L1, L5, L6 et L9 ; Tableau 6, page 179), ont été déposés sur les modèles de RWM. Leur cinétique de pénétration à travers ces membranes a ensuite été évaluée pendant 72h (Figure 43).

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Les liposomes L5 ont été sélectionnés en raison de leur excellente biocompatibilité avec les cellules HEI-OC1 (section III.2.2.3.6.1, page 141), Calu-3 et 16HBE14o-. L'impact de la **taille** de ces liposomes sur la pénétration du modèle de RWM sera évalué au moyen de formulations extrudées sur des filtres dont le diamètre des pores est de 200 nm (L5I) ou de 100 nm (L5s).

Les liposomes L9 et L6 ont été inclus dans l'étude afin d'évaluer l'impact d'une teneur élevée en **DSPE-PEG₂₀₀₀** ou en **DOPE**, respectivement, sur le passage à travers les modèles de RWM. Ces deux composés sont en effet respectivement connus pour favoriser la stabilité de nanoparticules et leur pénétration à travers différentes barrières biologiques [71,102,236].

La formulation L1, contenant de l'**EPC**, pourrait quant à elle générer des liposomes plus souples et ainsi favoriser leur pénétration à travers la membrane.

Les résultats de cette étude montrent que le modèle Calu-3 limite fortement le passage des liposomes, quelle que soit leur composition. Cette observation pourrait s'expliquer par l'importante production de mucus caractéristique de cette lignée cellulaire d'origine pulmonaire, les liposomes utilisés n'ayant pas été conçus pour présenter des propriétés de muco-pénétration. Ces résultats suggèrent donc que le modèle Calu-3 n'est probablement pas le plus adapté pour reproduire les propriétés de la RWM.

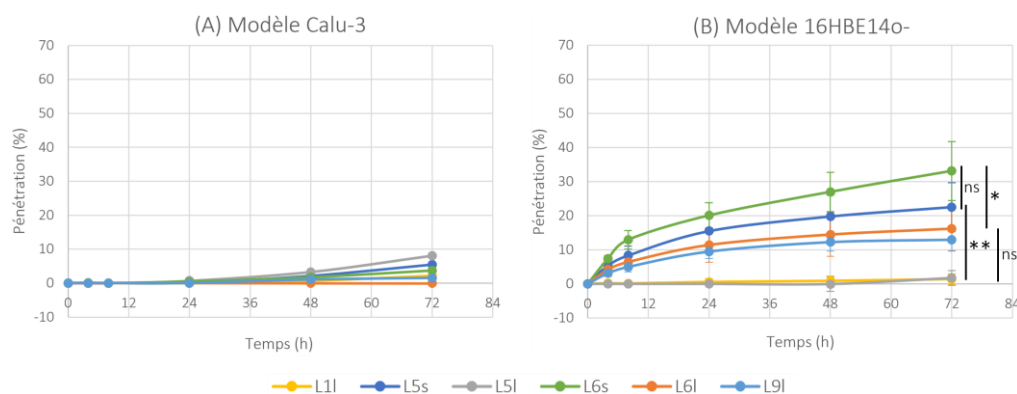


Figure 43 : Évaluation de la cinétique de pénétration de liposomes (L1I, L5s, L5I, L6s, L6I et L9I) sur une période de 72h à travers les modèles de RWM développés avec les lignées cellulaires (A) Calu-3 et (B) 16HBE14o- ($n = 3$; moyenne $\pm$ SD; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; les différences non significatives ($p > 0,05$) sont indiquées par « ns »).

En revanche, le modèle 16HBE14o- permet le passage des liposomes vers le compartiment basal. Les liposomes L5I (156 ± 1 nm), extrudés sur des filtres de 200 nm, ne traversent pas la membrane, alors qu'une formulation de composition lipidique identique mais de taille plus faible

(L5s ; 122 ± 2 nm) en est capable (**p = 0,0064). Ces résultats mettent ainsi en évidence un effet de la taille des liposomes sur leur capacité à traverser le modèle de RWM, paramètre qui doit être pris en compte lors de l'optimisation des formulations. L'incorporation de DOPE (L6I ; 157 ± 1 nm) semble également faciliter la pénétration de la membrane par rapport à la formulation L5I (156 ± 1 nm), qui n'en contient pas, bien que cette différence ne soit pas statistiquement significative (p = 0,0666). De même, l'incorporation de DSPE-PEG₂₀₀₀ dans les liposomes semble légèrement favoriser leur pénétration (ns, p = 0,2046). Cette amélioration du passage membranaire peut également s'expliquer par la diminution de la taille observée pour ces liposomes. En effet, le DSPE-PEG₂₀₀₀ tend à réduire fortement la taille des particules et bien que les liposomes L9I aient été extrudés sur des filtres dont la taille des pores est de 200 nm, la taille mesurée n'est que de 97 ± 1 nm. Ceci suggère donc que l'amélioration observée de la pénétration est au moins en partie attribuable à la diminution de la taille des liposomes plutôt qu'à la seule présence de DSPE-PEG₂₀₀₀. En revanche, le remplacement du DSPC, principal constituant lipidique de la formulation L5I, par de l'EPC (L1I) n'apporte aucune amélioration du profil de pénétration à travers le modèle 16HBE14o- (ns, p > 0,9999). Une formulation (L6s ; Tableau 6, page 179), combinant les avantages conférés par la présence de DOPE et ceux liés à la réduction de taille obtenue par extrusion sur des filtres de 100 nm, a donc été produite et évaluée.

Comme attendu, le modèle Calu-3 ne permet pas le passage des liposomes L6s, pour les raisons évoquées précédemment. En revanche, sur le modèle 16HBE14o-, ces liposomes (122 ± 2 nm) améliorent le passage transmembranaire avec un pourcentage de pénétration significativement plus élevé à 72h que toutes les autres formulations testées (L5I vs L6s : ***p = 0,0002 ; L9I vs L6s : **p = 0,0083 ; L6I vs L6s : *p = 0,0272 ; L1I vs L6s : ***p = 0,0002), à l'exception de la formulation L5s (ns, p = 0,2568).

Les formulations les plus performantes sont donc les liposomes présentant les plus petites tailles (L5s et L6s), tous deux extrudés sur des filtres de 100 nm. Ceci met en évidence l'importance cruciale de la taille des liposomes sur leur capacité à franchir le modèle de RWM.

Afin de vérifier que la pénétration des liposomes à travers le modèle 16HBE14o- n'est pas due à une toxicité entraînant une dégradation de l'épithélium, les jonctions serrées ont été mises en évidence par immunofluorescence (Figure 44). Le marquage confirme la présence de jonctions serrées (ZO-1) régulières autour de chaque cellule 16HBE14o-. La présence de 25-NBD-Chol est également observée, témoignant de son incorporation dans les membranes cellulaires. Enfin, le dynamisme de l'épithélium est visible par la présence de nombreux débris cellulaires et de cellules

PARTIE EXPÉRIMENTALE

en mitose, identifiables grâce à une forte coloration au DAPI. Aucune discontinuité n'est observée dans la couche cellulaire, suggérant que le passage des liposomes vers le compartiment basolatéral résulte d'une traversée de l'épithélium et non d'une perte d'intégrité de la membrane conduisant à des fuites.

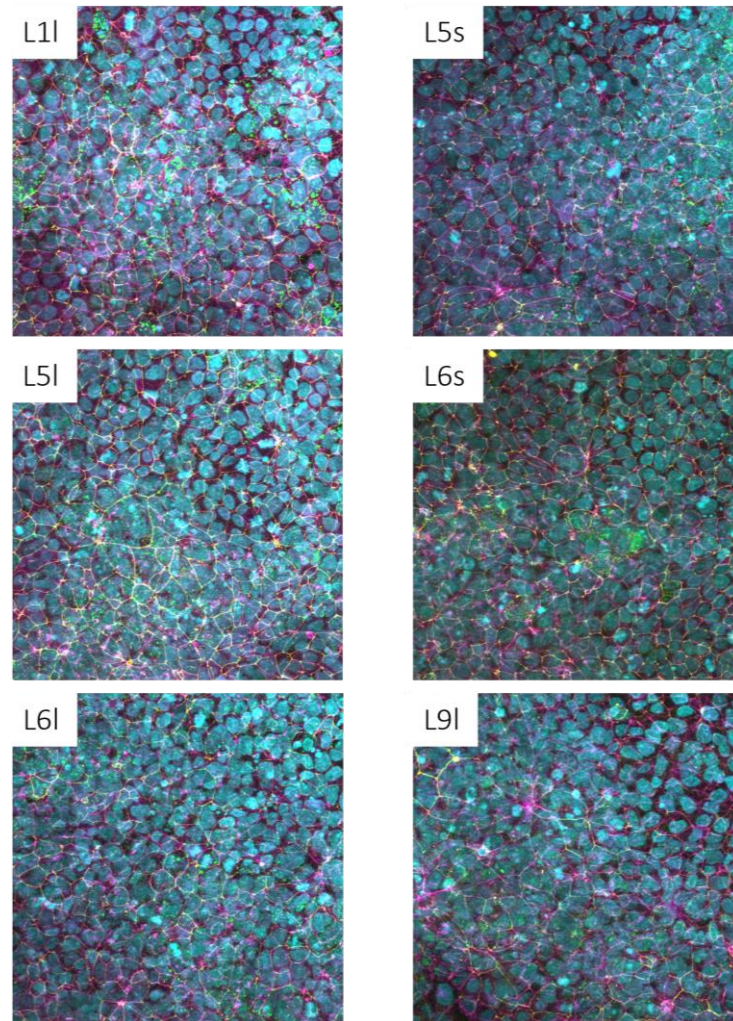


Figure 44 : Immunofluorescence des membranes 16HBE14o- après 72h d'exposition aux formulations de liposomes (L1I, L5s, L5I, L6s, L6I et L9I). Les noyaux cellulaires (DAPI ; cyan), l'actine cellulaire (phalloidine ; magenta), et les jonctions serrées (ZO-1 ; jaune) qui se sont formées entre les cellules 16HBE14o- ont été marquées pour démontrer la qualité de l'effet barrière. Le 25-NBD-Chol, constituant des liposomes fluorescents, s'est partiellement intégré aux membranes cellulaires (vert).

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Afin de corroborer cette observation, la TEER a été mesurée en fin d'expérience (Tableau 7). En l'absence de liposomes, la TEER augmente fortement après 72h de culture en LLI (Contrôle J0 vs Contrôle 72h : **** $p < 0,0001$). En présence des formulations de liposomes, une tendance similaire est observée, avec des valeurs fluctuant autour de celle du contrôle à 72h. Aucune différence significative n'est toutefois observée par rapport à ce contrôle (Contrôle 72h vs L1I : ns, $p = 0,9217$; Contrôle 72h vs L5s : ns, $p = 0,9997$; Contrôle 72h vs L5I : ns, $p = 0,7696$; Contrôle 72h vs L6s : ns, $p = 0,5092$; Contrôle 72h vs L6I : ns, $p = 0,3169$; Contrôle 72h vs L9I : ns, $p = 0,0809$). Ces résultats suggèrent que la fonction barrière de l'épithélium tend à se renforcer au cours de l'expérience, alors qu'une diminution de la TEER aurait été attendue en cas de toxicité et d'altération de l'intégrité épithéliale. Les mesures de TEER corroborent ainsi les observations réalisées par immunofluorescence et confirment que la présence des liposomes dans le compartiment basolatéral résulte de leur traversée de l'épithélium et non d'une fuite liée à une perte d'intégrité de la couche cellulaire.

Tableau 7 : Evaluation de la TEER ($\Omega.cm^2$) des épithéliums 16HBE14o- dès confluence (J0), ou après application d'une solution contrôle ainsi que de solutions de liposomes (L1I, L5s, L5I, L6s, L6I, and L9I) pendant 72h ($n = 3$; moyenne $\pm$ SD).

Contrôle J0	Contrôle 72h	L1I	L5s	L5I	L6s	L6I	L9I
155 $\pm$ 25 $\Omega.cm^2$	967 $\pm$ 31 $\Omega.cm^2$	999 $\pm$ 78 $\Omega.cm^2$	960 $\pm$ 34 $\Omega.cm^2$	1010 $\pm$ 26 $\Omega.cm^2$	909 $\pm$ 63 $\Omega.cm^2$	896 $\pm$ 61 $\Omega.cm^2$	865 $\pm$ 21 $\Omega.cm^2$

Cette étude démontre que le modèle 16HBE14o- développé en ALI est capable de discriminer différentes formulations de liposomes en fonction de leur cinétique de pénétration à travers le modèle de RWM. Par ailleurs, ce modèle présente plusieurs avantages pratiques. Il conserve son intégrité pendant au moins 72h sans dégradation de l'épithélium, ne produit pas de mucus susceptible d'interférer avec les essais de pénétration et est relativement simple à mettre en œuvre. En effet, son développement ne nécessite ni *coating* préalable des inserts ni période de différenciation cellulaire avant utilisation, ce qui réduit considérablement le temps de préparation expérimental.

Ce modèle a donc permis de mettre en évidence l'importance de la taille et de la composition lipidique des liposomes sur leur aptitude à franchir la RWM. Bien que le critère initial ait été fixé à 200 nm, une taille de particule proche de 100 nm favorise davantage la pénétration cochléaire, tout comme l'ajout d'un lipide fusogénique (DOPE).

III.3.2. Cinétique de pénétration de la formulation optimale de liposomes encapsulant de la dexaméthasone

Après avoir évalué les cinétiques de pénétration de liposomes vides à travers le modèle de membrane 16HBE14o-, la cinétique de pénétration de liposomes contenant de la dexaméthasone a été étudiée et comparée à celle d'une solution de dexaméthasone non encapsulée dans des liposomes.

L'étude montre qu'après 4h, l'encapsulation de la dexaméthasone dans les liposomes L6s entraîne une diminution de sa pénétration à travers le modèle de RWM de 23% (**p = 0,0004) par rapport à la molécule sous forme libre (Figure 45). Après 8h, cette différence atteint 34% (**p = 0,0006). Un écart persiste jusqu'à 48h (*p = 0,0335) après l'application des formulations sur le modèle. Les deux courbes convergent ensuite progressivement pour atteindre des niveaux de pénétration similaires après 72h (ns, p = 0,8561).

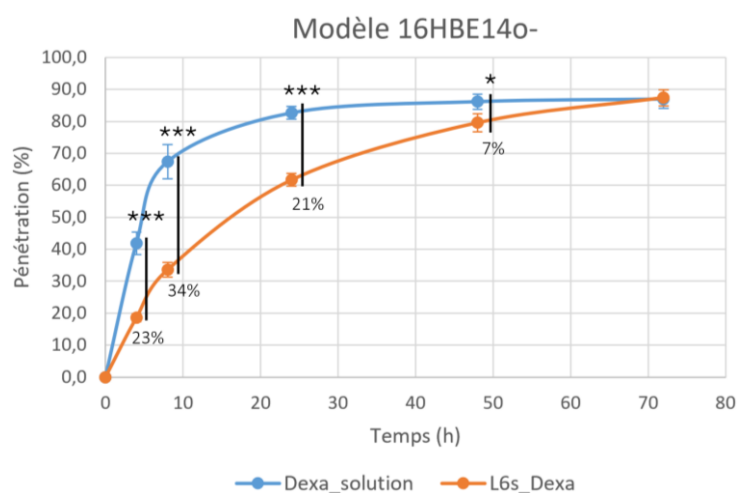


Figure 45 : Profil de pénétration de la dexaméthasone, en solution (Dexa_solution) ou encapsulée dans les liposomes L6s (L6s_Dexa), à travers un modèle de RWM constitué de cellules 16HBE14o- (n = 3 ; moyenne $\pm$ SD ; *p < 0,05 ; **p < 0,01 ; ***p < 0,001 ; ****p < 0,0001 ; les différences non significatives (p > 0,05) sont indiquées par « ns »).

Ces résultats confirment tout d'abord que la dexaméthasone est capable de traverser la membrane sous forme libre, ce qui est cohérent avec les données de la littérature et son caractère lipophile [162,189]. Ils indiquent également qu'après 72h, la quantité totale de dexaméthasone ayant traversé la membrane est comparable, qu'elle soit administrée sous forme libre ou encapsulée dans les liposomes. Le système nanoparticulaire développé serait donc efficace pour

acheminer un principe actif au niveau cochléaire. Enfin, le retard observé en début d'étude suggère un léger effet de libération prolongée de la dexaméthasone lorsqu'elle est encapsulée dans les liposomes L6s.

Cette observation est en accord avec les résultats obtenus lors de l'étude de la cinétique de libération de la dexaméthasone réalisée sur des inserts Transwell dépourvus de modèle de RWM (Figure 25, page 139). Dans cette étude, 50% de la dexaméthasone en solution ont atteint le compartiment receveur après 4h, contre environ 40% après traversée du modèle de RWM 16HBE14o- dans la présente étude. Pour une molécule lipophile telle que la dexaméthasone, la présence de ce modèle membranaire ne semble donc induire qu'un léger retard de passage. Ces résultats mettent en évidence que la combinaison de l'hydrogel et des liposomes contribue à prolonger la libération de la dexaméthasone et à retarder son arrivée dans le compartiment périlymphatique, notamment en raison du franchissement préalable de la RWM par les liposomes.

III.4. Internalisation des liposomes par les cellules cibles HEI-OC1 après traversée du modèle de RWM

La dernière étape du développement de ce modèle *in vitro*, conçu pour représenter de manière plus exhaustive le devenir d'une thérapie administrée par voie TT, consiste à intégrer des cellules HEI-OC1 en aval du modèle de RWM. Cette approche vise à reproduire les cellules sensorielles cochléaires ciblées par la thérapie. L'utilisation d'un système de co-culture compartimentée permet ainsi de simuler l'ensemble du parcours thérapeutique, depuis le dépôt d'une formulation, telle que des liposomes, dans la cavité de l'oreille moyenne, jusqu'à sa traversée de la RWM et son internalisation par les cellules ciliées de la cochlée (Figure 37, page 175).

Pour cette étude, les liposomes les plus prometteurs ont été déposés pendant 6h soit sur le modèle de RWM, soit directement sur les cellules HEI-OC1 (Ctrl +). Après incubation, la fluorescence des cellules cibles (HEI-OC1) a été mesurée afin de quantifier l'internalisation des liposomes après leur passage à travers le modèle de RWM (Figure 46).

Les résultats confirment les observations rapportées dans les sections précédentes : le modèle 16HBE14o- permet le passage des liposomes (Ctrl - vs RWM 16HBE14o- : ****p < 0,0001 pour L5s et L6s), tandis que celui basé sur les cellules Calu-3 l'entrave fortement (Ctrl - vs RWM Calu-3 : ns, p = 0,9698 pour L5s et p = 0,9878 pour L6s). Par ailleurs, le rapport entre l'intensité de fluorescence mesurée après passage à travers le modèle 16HBE14o- et celle mesurée en

PARTIE EXPÉRIMENTALE

l'absence de cellules mimant la RWM (ratio RWM 16HBE14o- / Ctrl +) est similaire pour les deux formulations (39,6% pour L5s et 38,5% pour L6s).

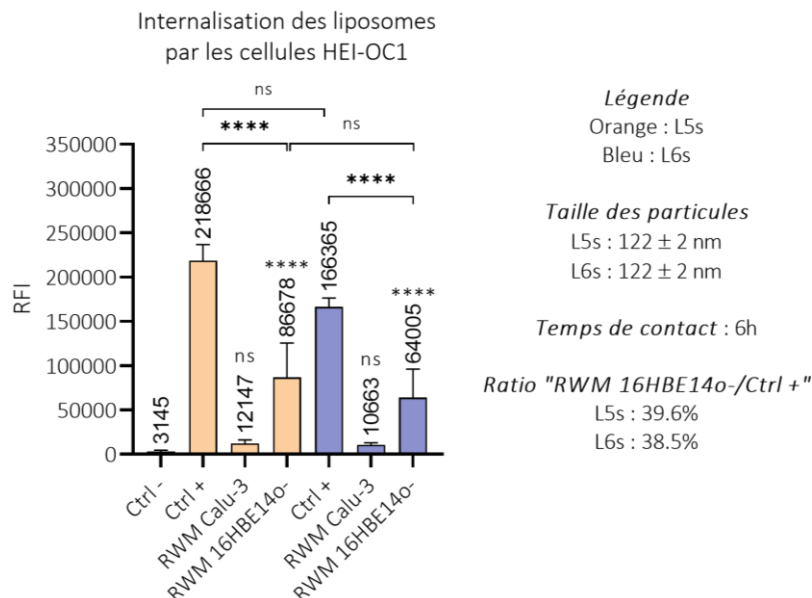


Figure 46 : Intensité de fluorescence relative (RFI) des cellules HEI-OC1 après internalisation des liposomes L5s ou L6s ayant traversé un modèle de RWM (RWM Calu-3 ou RWM 16HBE14o-), ou après exposition directe des cellules HEI-OC1 aux liposomes (Ctrl +). Les cellules HEI-OC1 exposées au mélange HEPES/DMEM-FBS (10/90 %v/v) constituent le contrôle négatif (Ctrl -). Les significativités (*) par rapport au Ctrl - sont indiquées au-dessus de chaque condition (n = 3 ; moyenne ± SD ; *p < 0,05 ; **p < 0,01 ; ***p < 0,001 ; ****p < 0,0001 ; les différences non significatives (p > 0,05) sont indiquées par « ns »).

IV. Conclusion

La mise au point du modèle *in vitro* de la RWM a montré que les inserts Transwell munis de membranes en PET ou en PC constituent deux supports capables de soutenir la formation d'un épithélium intègre. Toutefois, seule la membrane en PC permet la pénétration des liposomes, contrairement à la membrane en PET. La caractérisation du modèle de RWM en trois étapes a permis d'identifier le stade de différenciation des épithéliums Calu-3 et 16HBE14o- le plus pertinent. Les différences observées entre les inserts en PET et en PC soulignent également l'importance d'une évaluation multidimensionnelle de l'effet barrière (ex. TEER, immunofluorescence des jonctions serrées, mesure du flux paracellulaire). Le modèle Calu-3 présente de meilleures performances après 14 jours de différenciation en ALI, avec des valeurs de TEER élevées, des images de jonctions serrées régulières et une forte limitation du flux

paracellulaire de la NaFl. À l'inverse, le modèle 16HBE14o- démontre son meilleur effet barrière dès l'atteinte de la confluence (J0), sans nécessiter de phase de différenciation en ALI.

L'étude de la cinétique de pénétration de différentes formulations de liposomes à travers les deux modèles de RWM a montré que le modèle Calu-3 ne permet pas le passage des liposomes. Cette observation est probablement liée à l'importante production de mucus de cette lignée cellulaire d'origine pulmonaire, les liposomes évalués n'ayant pas été développés pour présenter des propriétés de muco-pénétration. Ces résultats suggèrent que le modèle Calu-3 n'est pas le plus approprié pour reproduire les propriétés de la RWM. En revanche, le modèle 16HBE14o- s'est révélé capable de discriminer différentes formulations de liposomes en fonction de leur cinétique de pénétration et de mettre en évidence l'intérêt de certains composants lipidiques ainsi que l'effet de la taille des particules. Ce modèle offre une plateforme pertinente pour l'évaluation préclinique *in vitro* de nouvelles formulations thérapeutiques avant leur validation *in vivo*. À ce titre, il pourrait participer à la réduction du recours aux modèles animaux en favorisant une sélection plus rationnelle des formulations candidates [295]. Ce modèle présente également plusieurs avantages pratiques. Il conserve son intégrité pendant au moins 72h sans dégradation de l'épithélium, ne produit pas de mucus susceptible d'interférer avec les essais de pénétration et est relativement simple et rapide à mettre en œuvre puisqu'aucune étape de différenciation cellulaire n'est requise. L'évaluation de formulations contenant un hydrogel de P407 n'a cependant pas été possible sur ce modèle, cet hydrogel ayant montré une certaine cytotoxicité vis-à-vis de la lignée 16HBE14o-.

Les résultats ont également montré qu'une même quantité de dexaméthasone, administrée sous forme libre ou encapsulée dans les liposomes L6s, atteint le compartiment basolatéral après 72h de contact avec le modèle 16HBE14o-. Un léger effet de libération prolongée est néanmoins observé. Ce phénomène est probablement lié au temps nécessaire au passage des liposomes à travers la membrane comparativement à la molécule libre.

Enfin, le modèle en co-culture compartimentée intégrant des cellules HEI-OC1 en aval du modèle de RWM 16HBE14o- a permis d'évaluer l'internalisation des liposomes par leurs cellules cibles après leur traversée de la membrane. Aucune différence entre les formulations L5s et L6s n'a été observée ; celles-ci sont toutes deux internalisées par les cellules HEI-OC1, démontrant ainsi leur capacité à atteindre leur cible.

Dans son ensemble, ce travail a conduit au développement du premier modèle compartimenté *in vitro*, reproduisant le franchissement de la RWM et permettant le suivi de nanoparticules jusqu'à

leur internalisation par des cellules ciliées cochléaires. Contrairement aux modèles décrits jusqu'à présent, qui se limitent généralement à l'étude du passage transmembranaire, cette plateforme innovante intègre les deux étapes clés du processus de délivrance cochléaire. Elle constitue ainsi un nouvel outil préclinique pertinent pour l'évaluation de formulations destinées à l'administration TT, en reproduisant plus fidèlement le devenir des nanoparticules après leur administration, tout en contribuant à réduire le recours aux expérimentations animales. Ce modèle original ouvre également de nouvelles perspectives pour l'étude des mécanismes de transport à travers la RWM et pour le développement de systèmes d'administration ciblés destinés au traitement des pathologies de l'oreille interne.

Dans le futur, il serait intéressant de comparer les cinétiques de pénétration de différents principes actifs observées *in vitro* à celles obtenues sur un modèle *ex vivo* utilisant des RWM humaines, afin de valider les performances du modèle *in vitro* de RWM [161]. Ce dispositif servira ensuite de modèle prédictif du passage de la RWM humaine et permettra de *screener* différents principes actifs.

CHAPITRE III

DE LA PRODUCTION EN LABORATOIRE AU PROCÉDÉ
PILOTE EN CONDITIONS GMP : TRANSFERT DE
MÉTHODE, OPTIMISATION DES PARAMÈTRES ET
MISE À L'ÉCHELLE DE LA MÉTHODE DE
PRODUCTION DES LIPOSOMES

Chapitre 3 – De la production en laboratoire au procédé pilote en conditions GMP : transfert de méthode, optimisation des paramètres et mise à l'échelle de la méthode de production des liposomes

I. Partie 1 – Transfert du procédé de production des liposomes à l'échelle du laboratoire : de l'hydratation du film lipidique (TFH) à la méthode PGSS utilisant le scCO_2

I.1. Introduction

Afin de traverser la RWM, les liposomes doivent présenter les CQA de taille, de PdI, de ZP et d'EE énoncés précédemment. En outre, pour être injectés par voie TT, ils doivent également satisfaire aux critères de qualité des formes injectables [97,98]. La maîtrise de l'ensemble de ces paramètres fait de l'industrialisation des procédés de production des liposomes un défi majeur. À cela s'ajoute la nécessité de garantir leur stérilité, ainsi que la reproductibilité des procédés lors de leur transfert à grande échelle [308].

À l'échelle du laboratoire, la méthode TFH permet de produire avec succès des liposomes répondant à la plupart de ces critères. Toutefois, cette technique présente plusieurs limites : elle ne permet la production que de faibles volumes de liposomes (maximum 4 à 5 mL par lot), nécessite l'utilisation de solvants organiques, ainsi que des étapes subséquentes de réduction de la taille des particules et de stérilisation, ce qui s'avère chronophage. En effet, suite à la production par TFH, qui comprend déjà plusieurs étapes dont l'évaporation du solvant suivie de l'hydratation du film, une étape supplémentaire d'extrusion ou de sonication est réalisée afin de réduire et d'homogénéiser la taille des particules. Cette étape permet généralement de passer d'une population majoritairement constituée de MLV à un mélange de SUV ou LUV [68].

À l'heure actuelle, l'injection d'éthanol est la méthode la plus largement utilisée pour la production industrielle de liposomes [114]. Cette technique repose sur le mélange rapide de phases aqueuse et éthanolique, conduisant à l'autoassemblage des liposomes par nanoprécipitation des lipides et des principes actifs dissous. Son principal inconvénient réside dans l'utilisation de quantités importantes d'éthanol, qui doit être éliminé au cours d'une étape de purification. Une étape de stérilisation est ensuite nécessaire lorsque la stérilité est requise. En plus de répondre aux exigences de sécurité microbiologique pour la voie injectable, la stérilisation favorise la

conservation des liposomes en limitant les phénomènes de contamination et de dégradation d'origine microbienne [114,308]. La multiplicité de ces étapes, combinée aux contraintes associées à la maîtrise des CQA des liposomes, à la reproductibilité du procédé à grande échelle et à l'utilisation de solvants organiques, met en évidence la nécessité de développer des procédés alternatifs permettant de simplifier la production tout en assurant la qualité et la stérilité des particules.

Dans ce contexte, la méthode PGSS utilisant le scCO_2 constitue une approche innovante permettant de produire et de stériliser en une étape les liposomes, sans recourir à des solvants organiques, souvent toxiques et coûteux [120]. Cette technologie de production respectueuse de l'environnement, fondée sur l'utilisation d'un gaz recyclable, présente également un fort potentiel pour une future transposition à l'échelle industrielle [118].

Toutefois, avant d'envisager cette étape, le développement du procédé peut être réalisé avec un équipement PGSS à l'échelle du laboratoire. Lors de travaux antérieurs menés au laboratoire, un procédé de production de liposomes par PGSS a été développé, optimisé et validé au moyen d'un équipement qui comprend un autoclave d'une capacité totale de 50 mL et permet ainsi la production de volumes supérieurs à ceux obtenus par TFH [122].

Suite à la réalisation d'un plan d'expériences, deux conditions de production permettant d'obtenir des liposomes répondant aux CQA définis précédemment ont été obtenues. La première condition permet la production de lots de liposomes de 14 mL à une concentration en lipides de 45 mM (autoclave maintenu à 80°C et 240 bar), tandis que la seconde conduit à la production de 10 mL de liposomes à 5 mM en lipides (autoclave maintenu à 80°C et 156 bar). Ces deux conditions de production ont été validées pour la production de liposomes de composition variable et co-encapsulant des principes actifs hydrophile (salbutamol) et hydrophobe (budésonide) [122].

L'objectif de cette première partie du chapitre est d'assurer le transfert, à l'échelle du laboratoire, des formulations liposomales optimisées dans les chapitres précédents de la méthode TFH vers le procédé PGSS, tout en évaluant l'impact de ce changement de procédé sur les caractéristiques des liposomes obtenus. Les caractéristiques physico-chimiques, la stabilité et la morphologie des nanoparticules obtenues par ces deux procédés seront comparées afin d'évaluer la pertinence de ce transfert technologique.

I.2. Matériel et méthodes

I.2.1. Matériel

Le CO₂ liquide, d'une pureté de 99,7%, a été fourni par Air Liquide (Belgique).

I.2.2. Production des liposomes

Les liposomes L1 (EPC/Chol/DSPE-PEG₂₀₀₀ ; 85/10/5 %mol) et L5 (DSPC/Chol/DSPE-PEG₂₀₀₀ ; 85/10/5 %mol) ont été produits à des concentrations en lipides totaux de 5 ou 45 mM par la méthode TFH décrite en section II.2.2 (page 106) ou par la méthode PGSS décrite en section III.2.2.2.1 (page 126). Les liposomes L1 ont également été produits à la concentration de 5 mM, suivant une légère adaptation du protocole PGSS : la dispersion de lipides et de dexaméthasone a été réalisée dans un volume de 10 mL de tampon HEPES (10 mM, pH 7,4, isotonique), et la pression imposée dans le réacteur était limitée à 156 bar [120].

I.2.3. Purification des liposomes

Les liposomes encapsulant de la dexaméthasone ont été purifiés par dialyse conformément au protocole décrit en section II.2.3 (page 106).

I.2.4. Caractérisation des liposomes

I.2.4.1. Taille, PdI, ZP

La taille, le PdI et le ZP des liposomes ont été analysés par DLS, selon le protocole décrit en section II.2.4.1 (page 107). Les liposomes à 5 et 45 mM ont été respectivement dilués 20 et 200 fois dans du tampon HEPES (10 mM, pH 7,4, isotonique), afin d'obtenir une concentration en particules adaptée à la mesure.

I.2.4.2. Efficacité d'encapsulation

L'EE de la dexaméthasone a été évaluée selon l'équation décrite en section II.2.4.2 (page 107), après détermination de la concentration en dexaméthasone par une méthode HPLC validée, décrite en section II.2.4.3.1 (page 108).

I.2.4.3. Etude de stabilité

La stabilité des liposomes a été évaluée conformément au protocole décrit en section III.3.2.2.2 (page 152).

I.2.4.4. Morphologie

La morphologie des liposomes a été évaluée selon le protocole décrit en section III.2.2.3.7 (page 130).

I.2.5. Analyse statistique

L'analyse des données a été réalisée à l'aide du logiciel GraphPad Prism (version 8.4.3, La Jolla, CA, États-Unis). Les résultats sont présentés sous forme de moyenne $\pm$ SD. Les différences statistiques entre les groupes ont été évaluées à l'aide d'un t-test apparié (Figure 50B-C), d'un t-test non apparié (Figures 47 et 49) ou d'une ANOVA à un facteur, suivie d'un test de comparaisons multiples de Tukey (Figure 50A). Une p-valeur $< 0,05$ est considérée statistiquement significative. Les différences non significatives sont indiquées par « ns ».

I.3. Résultats et discussion

I.3.1. Comparaison des caractéristiques physico-chimiques des liposomes produits par les méthodes TFH et PGSS à l'échelle du laboratoire

Les tailles des liposomes obtenus par la méthode PGSS à 5 mM (171 ± 37 nm) et 45 mM (144 ± 12 nm) en lipides totaux sont similaires à celles obtenues par TFH aux mêmes concentrations (163 ± 1 nm et 151 ± 1 nm respectivement) (Figure 47A). Le procédé PGSS permet donc de produire des liposomes avec des tailles comparables à celles observées lors de la production par TFH (TFH vs PGSS à 5 mM : ns, $p = 0,7159$; TFH vs PGSS à 45 mM : ns, $p = 0,3920$).

PARTIE EXPÉRIMENTALE

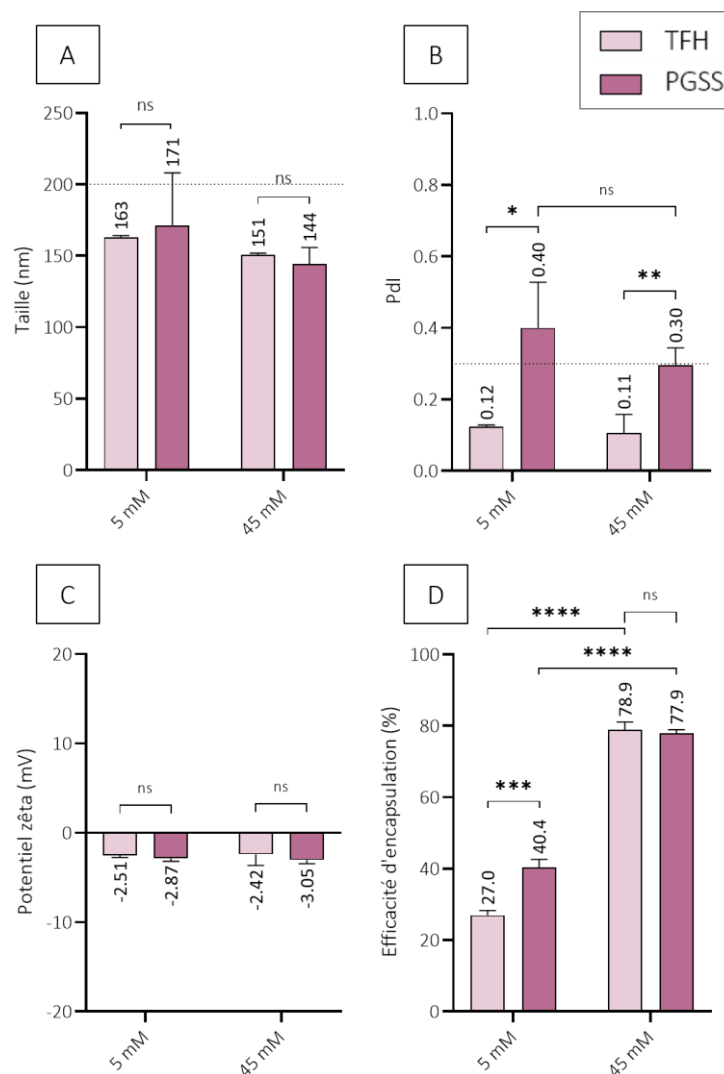


Figure 47 : Comparaison des caractéristiques physico-chimiques (taille, PdI, ZP et EE) des liposomes L1 encapsulant la dexaméthasone lorsqu'ils sont produits à 5 et 45 mM en lipides totaux par les méthodes TFH et PGSS ($n = 3$; moyenne $\pm$ SD ; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; les différences non significatives ($p > 0,05$) sont indiquées par « ns »).

En ce qui concerne le PdI, les liposomes produits à 45 mM par le procédé PGSS présentent un PdI ($0,30 \pm 0,05$; Figure 47B) plus élevé (** $p = 0,0092$) que celui observé avec les liposomes produits par TFH ($0,11 \pm 0,05$). La comparaison des distributions de taille de ces liposomes (Figure 48) montre que le procédé PGSS génère une population de particules légèrement plus hétérogène que celle obtenue par la méthode TFH, bien que toujours monodisperse. Ceci

s'explique par le fait que la méthode TFH comprend une étape d'extrusion supplémentaire visant à homogénéiser la taille des liposomes. La même tendance est observée à la plus faible concentration en lipides (5 mM ; * $p = 0,0199$). Par ailleurs, les liposomes produits par la méthode PGSS présentent un PdI qui semble plus élevé à 5 mM qu'à 45 mM, bien que la différence ne soit pas significative (ns, $p = 0,2589$). Cette légère variation peut s'expliquer par la différence de pression appliquée lors du procédé de production (156 bar à 5 mM vs 240 bar à 45 mM) [309]. La valeur de PdI étant généralement considérée comme acceptable lorsqu'elle est inférieure ou égale à 0,30, les valeurs obtenues par PGSS, bien que plus élevées que celles obtenues par TFH, témoignent de la capacité de cette méthode à produire des liposomes présentant une distribution de taille relativement homogène en une étape, sans recours à l'extrusion et aux solvants organiques.

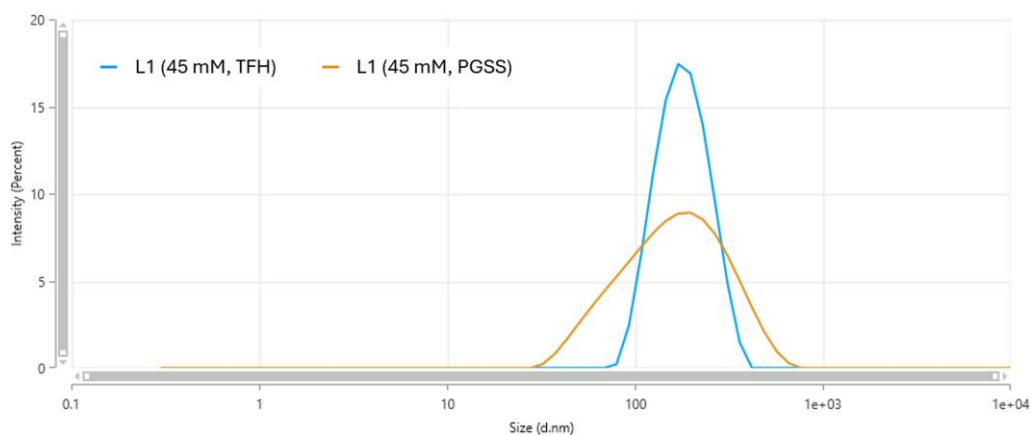


Figure 48 : Distribution moyenne ($n = 3$) de la taille des liposomes L1 produits à la concentration de 45 mM en lipides totaux par les méthodes TFH (bleu) ou PGSS (brun).

Le ZP, représentant la charge de surface des liposomes, ne varie ni avec la méthode de production ni avec la concentration en lipides et reste proche de la neutralité dans toutes les conditions étudiées (Figure 47C).

Enfin, à une concentration lipidique de 5 mM, l'EE de la dexaméthasone (Figure 47D) est significativement plus élevée (** $p = 0,0009$) avec la méthode PGSS ($40,4 \pm 2,3$ %) qu'avec la méthode TFH ($27,0 \pm 1,3$ %). En revanche, aucune différence significative d'EE n'est observée entre les deux méthodes lorsque les liposomes sont produits à 45 mM ($p = 0,5401$), l'EE augmentant dans les deux cas jusqu'à atteindre près de 80%. Ces résultats indiquent que la méthode PGSS permet d'obtenir des liposomes présentant une EE au moins équivalente, voire

supérieure, à celle obtenue par la méthode TFH, quelle que soit la concentration en lipides étudiée.

Le protocole de production par PGSS, précédemment appliqué à la formulation L1, a ensuite été transféré à la composition lipidique L5 à 45 mM. L'objectif était de vérifier que la modification de la composition lipidique n'altérerait pas de manière significative les caractéristiques physico-chimiques des liposomes et que ceux-ci préservent les CQA requis.

Comme le montre la Figure 49, les caractéristiques de taille, de PdI et de ZP des liposomes n'ont pas été significativement modifiées par le changement de composition lipidique (Figure 49A-C). Les formulations L1 et L5 demeurent toutes deux sous le seuil de 200 nm fixé, conservent une homogénéité de taille satisfaisante (PdI proche de 0,30) et présentent une charge globalement neutre. En revanche, l'EE de la dexaméthasone diffère légèrement entre les liposomes L1 et L5, indépendamment de la méthode de production utilisée (Figure 49D). Comme observé précédemment pour des liposomes produits à 5 mM par TFH (Tableau 3, page 112), le remplacement de l'EPC (L1) par du DSPC (L5) tend à réduire significativement l'encapsulation de la dexaméthasone. Cette tendance se confirme à 45 mM, puisque lors d'une production par TFH (Figure 49D), l'EE atteint $78,9 \pm 2,3$ % pour les liposomes L1 contre seulement $63,5 \pm 0,9$ % pour les liposomes L5 ($***p = 0,0004$). Avec la méthode PGSS, l'écart d'EE entre les formulations L1 et L5 est légèrement réduit, mais demeure bien présent ($**p = 0,0069$). Par ailleurs, la formulation L5 produite par PGSS présente une EE légèrement supérieure à celle obtenue par TFH ($*p = 0,0145$), contrairement à la formulation L1 pour laquelle aucune différence significative (ns , $p = 0,5401$) n'est observée entre les deux procédés de production.

Dans l'ensemble, les liposomes L5 répondent aux CQA relatifs à la taille, au PdI et au ZP, des paramètres déterminants pour la pénétration à travers la RWM, et présentent une bonne reproductibilité de ces caractéristiques. De plus, bien que l'EE soit inférieure à celle obtenue avec la formulation L1, elle devrait être suffisamment élevée pour permettre d'atteindre des concentrations thérapeutiques en dexaméthasone dans la cochlée. Il est toutefois difficile de définir une valeur seuil minimale d'EE permettant de répondre à cet objectif. En effet, la quantité de dexaméthasone devant être administrée *in vivo* dépendra notamment de la proportion de liposomes capables de franchir efficacement la RWM humaine, ainsi que de la cinétique de libération de la dexaméthasone.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Le transfert de la méthode de production des liposomes du procédé TFH vers la méthode PGSS à l'échelle du laboratoire a donc été validé et semble applicable à différentes compositions lipidiques.

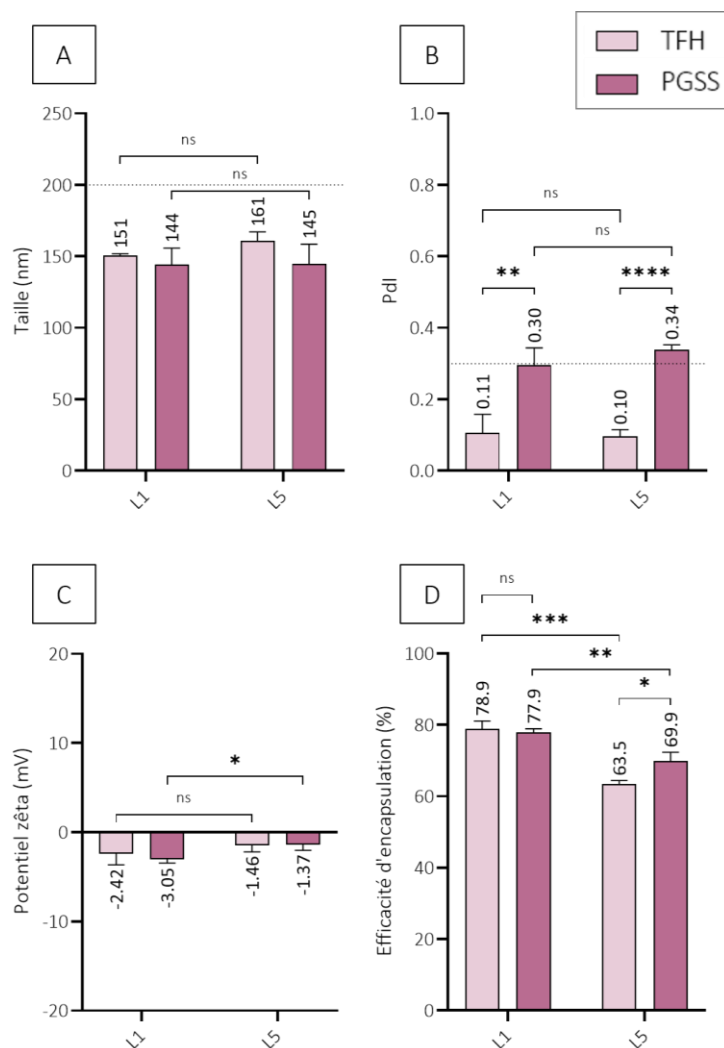


Figure 49 : Comparaison des caractéristiques physico-chimiques (taille, PdI, ZP et EE) des liposomes L1 et L5 encapsulant de la dexaméthasone lorsqu'ils sont produits à 45 mM par les méthodes TFH et PGSS (n = 3 ; moyenne ± SD ; *p < 0,05 ; **p < 0,01 ; ***p < 0,001 ; ****p < 0,0001 ; les différences non significatives (p > 0,05) sont indiquées par « ns »).

I.3.2. Stabilité des liposomes produits par les méthodes TFH et PGSS

La stabilité à court terme des formulations L1 et L5, stockées à 4°C pendant 28 jours, a été étudiée afin de déterminer l'impact de la méthode de production (PGSS ou TFH) sur l'évolution de l'EE de la dexaméthasone, mais également sur la taille et le PdI des liposomes à 45 mM (Figure 50).

Dans l'ensemble, les liposomes L1 et L5 suivent une tendance similaire, caractérisée par une diminution importante de leur EE au cours des 28 jours de stockage (Figure 50A) et donc par une fuite du principe actif. Pour la formulation L5, cette diminution est plus marquée durant les premiers jours de conservation (J1 – J7 : ****p < 0,0001), puis tend à ralentir entre J14 et J28. Les formulations produites par TFH et PGSS présentent globalement des profils comparables, bien qu'une différence notable d'EE soit observée entre les courbes L1-TFH et L1-PGSS. En effet, les liposomes L1 produits par PGSS ne présentent qu'une perte de 10,7% d'EE après les 7 premiers jours de stockage, alors que ceux produits par TFH présentent une perte de 24,4% d'EE sur la même période. Cette différence d'encapsulation est maintenue tout au long de l'étude. La méthode PGSS semble donc limiter la fuite du contenu des liposomes. Toutefois, cette tendance n'est pas observée avec la formulation L5. En effet, les liposomes L5 produits par PGSS affichent une perte d'EE de 28,8% après 7 jours, contre 22,3% pour ceux produits par TFH. Ces résultats suggèrent que l'influence de la méthode de production sur la stabilité de l'EE reste limitée par rapport à celle de la composition lipidique. Cette hypothèse est notamment soutenue par le comportement des liposomes L5, dont le phospholipide principal est le DSPC, qui présentent une diminution de l'EE plus prononcée que les liposomes L1 formulés à partir d'EPC, quelle que soit la méthode de production utilisée. Ceci pourrait s'expliquer par une bicouche lipidique de rigidité supérieure pour L5 que pour L1, une rigidité excessive étant susceptible d'altérer l'affinité de la dexaméthasone pour la membrane lipidique, contribuant ainsi à la fuite de principe actif. La méthode PGSS ne semble donc pas améliorer la stabilité de l'encapsulation au cours du stockage.

Après 21 jours de conservation à 4°C, l'EE des liposomes L1 produits par PGSS atteint $37,9 \pm 0,7$ %, soit une valeur proche de celle obtenue pour les liposomes L1 produits à 5 mM ($40,4 \pm 2,2$ % ; Figure 47D, page 207). Bien que la production à 45 mM permette d'obtenir initialement une EE plus élevée, cet avantage tend à s'estomper au cours du stockage en raison de la diminution progressive de cette EE. Néanmoins, dans le cadre d'une utilisation en laboratoire, cette approche permet de produire des liposomes présentant une concentration initiale élevée en dexaméthasone

PARTIE EXPÉRIMENTALE

encapsulée et offre la possibilité de les conserver quelques jours avant leur utilisation. Il reste toutefois nécessaire de réévaluer la concentration en principe actif encapsulé avant emploi.

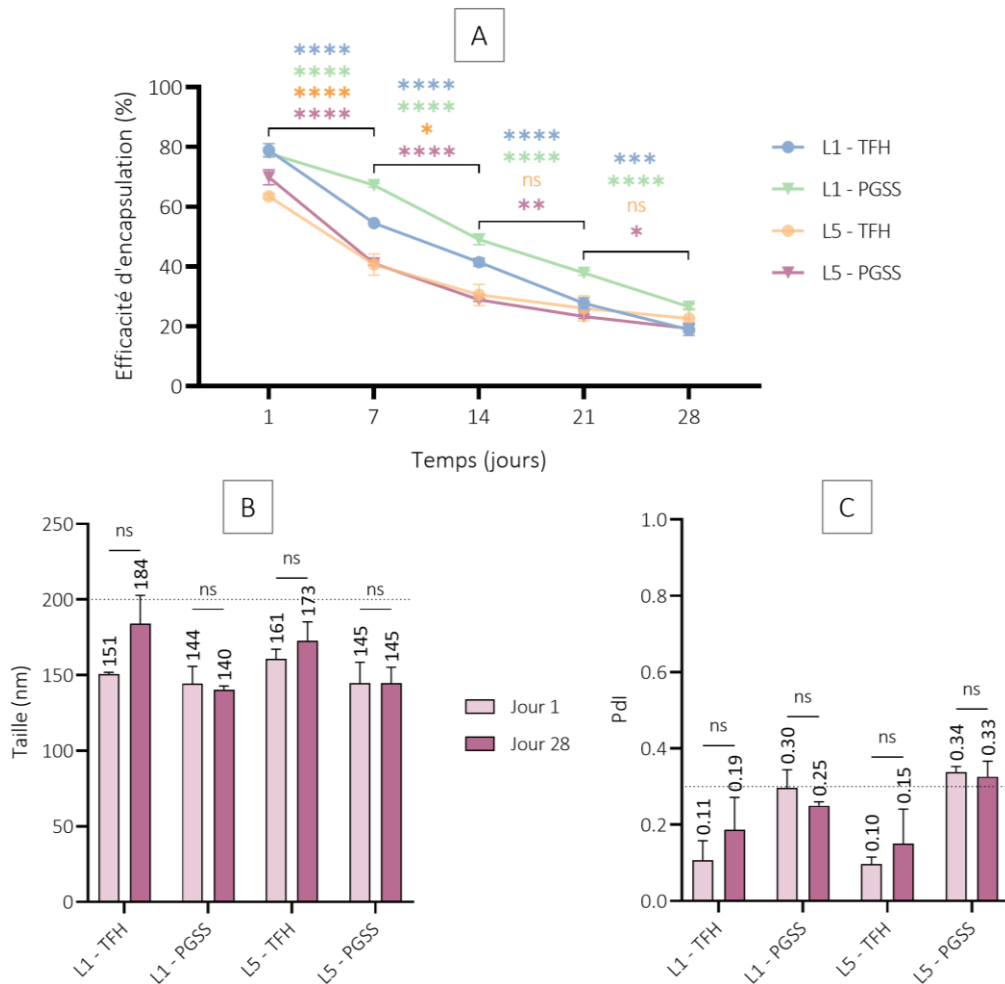


Figure 50 : Profils de stabilité de l'EE (A), de la taille (B) et du PdI (C) des liposomes L1 et L5, encapsulant de la dexaméthasone et produits à 45 mM en lipides totaux par les méthodes TFH et PGSS ($scCO_2$), lors d'un stockage à 4°C pendant 28 jours ($n = 3$; moyenne $\pm$ SD ; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; les différences non significatives ($p > 0,05$) sont indiquées par « ns »).

Par ailleurs, la taille et le PdI des particules sont restés stables tout au long des 28 jours de conservation pour les deux formulations, indépendamment de la méthode de production utilisée (Figure 50B-C). Les variations observées demeurent faibles et non significatives, et ne semblent donc pas traduire une déstabilisation physique des liposomes susceptible d'expliquer la fuite du principe actif.

Dans l'ensemble, la faible stabilité de l'EE observée pour les différentes formulations souligne l'importance d'identifier des stratégies de stabilisation adaptées aux liposomes destinés à une conservation prolongée. À cet égard, le stockage des formulations sous forme aqueuse ne semble pas optimal, en raison des risques de relargage progressif du principe actif et d'altération de la structure des vésicules au cours du temps. La conservation des liposomes sous forme sèche, notamment après lyophilisation, constitue dès lors une piste particulièrement pertinente pour améliorer leur stabilité à long terme tout en facilitant leur stockage et leur transport.

Par ailleurs, cette étude démontre que le procédé PGSS utilisant le scCO_2 préserve la stabilité des particules de manière comparable à la méthode TFH. Les diminutions d'EE observées paraissent ainsi davantage liées à la nature du principe actif et à la composition lipidique qu'au procédé de fabrication lui-même, confortant le potentiel du procédé PGSS comme alternative aux méthodes conventionnelles de production des liposomes.

I.3.3. Morphologie

L'imagerie par cryo-TEM a permis d'étudier la morphologie des liposomes L5 produits par les méthodes TFH et PGSS (Figure 51). Ainsi, la méthode TFH, qui comprend une étape d'extrusion à travers un filtre de taille de pores de 0,2 μm , génère principalement des SUV et des LUV de tailles comprises entre 65 et 230 nm (Figure 51A-B). Les liposomes observés sont majoritairement unilamellaires, à l'exception de quelques vésicules à bicouches concentriques (OLV).

À l'inverse, la méthode PGSS produit majoritairement des liposomes aux lamellarités, tailles et structures plus hétérogènes. Différentes morphologies ont ainsi été observées, notamment des MLV comportant plusieurs bicouches lipidiques concentriques (Figure 51C) et des MVV renfermant plusieurs liposomes imbriqués dans une vésicule de plus grande taille. Ces particules présentent des tailles comprises entre 150 et 350 nm et pourraient expliquer l'augmentation de l'EE observée avec les liposomes L5 produits par la méthode PGSS par rapport à la méthode TFH (Figure 49D, page 210), les nombreuses bicouches lipidiques offrant davantage de domaines favorables à l'encapsulation d'un composé lipophile. De même, ces structures pourraient être à l'origine du profil de libération légèrement prolongée de la dexaméthasone, celle-ci devant diffuser à travers plusieurs bicouches avant d'être libérée dans le milieu extérieur. Une faible proportion de SUV, de tailles comprises entre 50 et 120 nm, a également été observée dans l'échantillon (Figure 51D), ce qui pourrait favoriser leur passage à travers la RWM par rapport aux particules de plus

PARTIE EXPÉRIMENTALE

grande taille. La pénétration des liposomes produits par PGSS à travers le modèle de RWM n'a cependant pas été évaluée dans ce travail.

Les différences de PdI observées précédemment entre les deux méthodes (Figure 49B, page 210) s'expliquent ainsi par les distributions morphologiques distinctes mises en évidence par la cryo-TEM. Alors que la méthode TFH produit principalement des SUV et des LUV relativement homogènes, ce qui se traduit par un faible PdI ($\leq 0,15$), la méthode PGSS conduit à une population plus hétérogène, constituée d'un mélange de SUV, de MLV et de MVV de tailles variées, en accord avec des valeurs de PdI plus élevées ($\sim 0,30$).

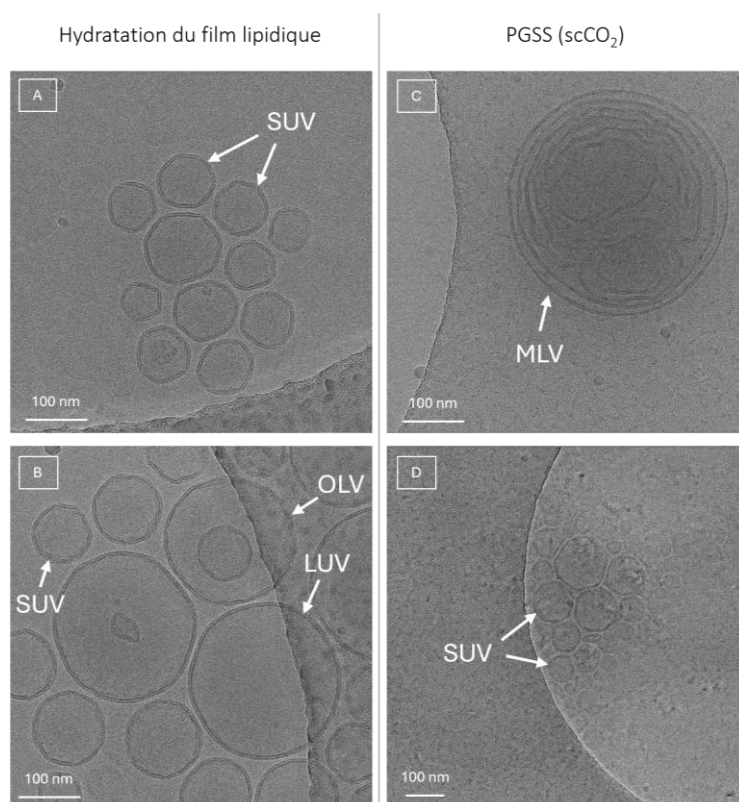


Figure 51 : Comparaison de la morphologie des liposomes L5 encapsulant de la dexaméthasone produits par les méthodes TFH (A-B) et PGSS utilisant le scCO₂ (C-D) grâce à l'imagerie par cryo-TEM.

I.4. Conclusion

Le transfert de la méthode de production des liposomes L1 et L5 de la méthode TFH vers la méthode PGSS à l'échelle du laboratoire a été réalisé avec succès. Cette méthode innovante permet en effet d'obtenir des liposomes dont la taille et le ZP sont comparables à ceux observés avec la méthode de référence. L'EE est également équivalente, voire supérieure, avec la méthode PGSS, mais dépend principalement de la concentration et de la composition lipidiques des particules. Le PdI reste quant à lui acceptable, bien qu'il soit légèrement plus élevé que celui observé avec la méthode TFH. Dans l'ensemble, l'étude a montré une bonne reproductibilité des résultats obtenus avec les diverses productions de liposomes.

Les différences d'EE et de PdI observées entre les méthodes s'expliquent probablement par la morphologie des liposomes. En effet, les liposomes produits par TFH se présentent majoritairement sous forme de vésicules unilamellaires de petite et grande taille (SUV et LUV), grâce à l'étape d'extrusion qui homogénéise leur taille et leur structure, réduisant ainsi leur PdI. À l'inverse, les liposomes obtenus par la méthode PGSS sont constitués d'un mélange de SUV, MLV et MVV. Grâce à leurs multiples bicouches lipidiques, ces dernières pourraient encapsuler davantage de principe actif lipophile, tel que la dexaméthasone, et en ralentir la libération, celle-ci devant diffuser à travers un plus grand nombre de barrières lipidiques avant d'être libérée de la particule.

Par ailleurs, il serait nécessaire de développer une stratégie de stabilisation des particules, telle que leur mise sous forme sèche afin d'améliorer leur conservation par rapport à la forme aqueuse. Diverses méthodes peuvent être envisagées, notamment la lyophilisation. En effet, bien que les liposomes demeurent stables pendant 28 jours en termes de taille et de PdI, leur EE diminue fortement dès 7 jours de stockage à 4°C, avec des pertes de 10% et 28% pour les formulations L1 et L5, respectivement.

Le procédé PGSS, respectueux de l'environnement, permet donc la production reproductible et rapide, en une seule étape, de grands volumes de liposomes sans recourir à des solvants organiques, souvent toxiques et coûteux. Cette méthode permet également la stérilisation simultanée des particules produites. Cet aspect ayant déjà été développé au sein du laboratoire, il n'a pas été investigué davantage dans le cadre de cette thèse [108,120]. Les CQA des liposomes sont donc respectés et devraient permettre la traversée de la RWM en vue d'atteindre l'oreille interne.

II. **Partie 2** – Mise à l'échelle pilote du procédé PGSS utilisant le scCO₂ par l'approche « Quality by Design »

II.1. Introduction

Après avoir validé le transfert de la méthode de production des liposomes du procédé TFH vers le procédé PGSS à l'échelle du laboratoire, il convient désormais d'adapter cette méthode innovante à une production à plus grande échelle.

Cette deuxième partie de chapitre est ainsi consacrée à la mise à l'échelle pilote, étape intermédiaire entre l'échelle du laboratoire et l'échelle industrielle, du procédé PGSS selon une approche QbD. L'utilisation de l'échelle pilote permet de valider la robustesse du procédé sur des volumes plus importants que ceux utilisés au laboratoire et d'identifier les contraintes liées à l'industrialisation. Un plan d'expériences a été mis en œuvre afin d'optimiser les conditions de production des liposomes sur un nouvel équipement conforme aux normes GMP, de plus grande capacité et partiellement automatisé. Le passage à ce nouvel équipement s'accompagne toutefois de différences mécaniques et mécanistiques par rapport au système utilisé à l'échelle du laboratoire. Il sera donc nécessaire d'investiguer de nouveaux paramètres de procédé, tels que la vitesse de dépressurisation de l'autoclave, ainsi que de réévaluer et d'optimiser certains paramètres déjà étudiés à plus petite échelle, notamment la vitesse d'agitation, le volume de dispersion et la pression de fonctionnement. Afin de limiter les coûts expérimentaux, ce plan d'expériences sera réalisé à l'aide d'une formulation de liposomes présentant une composition lipidique intermédiaire entre celle optimisée dans le cadre de cette thèse, pour une application dans les surdités, et celle développée pour une application pulmonaire dans le cadre d'une autre thèse menée au laboratoire, celle de Tuan Nghia Dinh [310]. Les conditions opératoires identifiées seront ensuite transférées à la formulation de liposomes développés pour l'administration TT. Enfin, la morphologie des nanoparticules produites ainsi que l'impact du procédé PGSS sur la stabilité chimique des phospholipides seront évalués afin de confirmer la pertinence de cette technologie pour une production industrielle de liposomes.

II.2. Essai préliminaire

La mise à l'échelle pilote de la méthode PGSS permettant la production de liposomes nécessite le passage à un équipement de capacité supérieure (Figure 52). Par rapport à l'équipement PGSS à l'échelle du laboratoire, celui à l'échelle pilote présente trois différences majeures :

PARTIE EXPÉRIMENTALE

1. La capacité de l'autoclave est dix fois supérieure, avec un volume maximal de remplissage passant de 50 à 500 mL.
2. Le système d'agitation dispose d'une pale de forme différente, susceptible d'influencer la dynamique du mélange, et sa vitesse est exprimée en pourcentage plutôt qu'en rpm.
3. La vitesse de dépressurisation est modulable, ce qui n'était pas le cas à l'échelle du laboratoire.

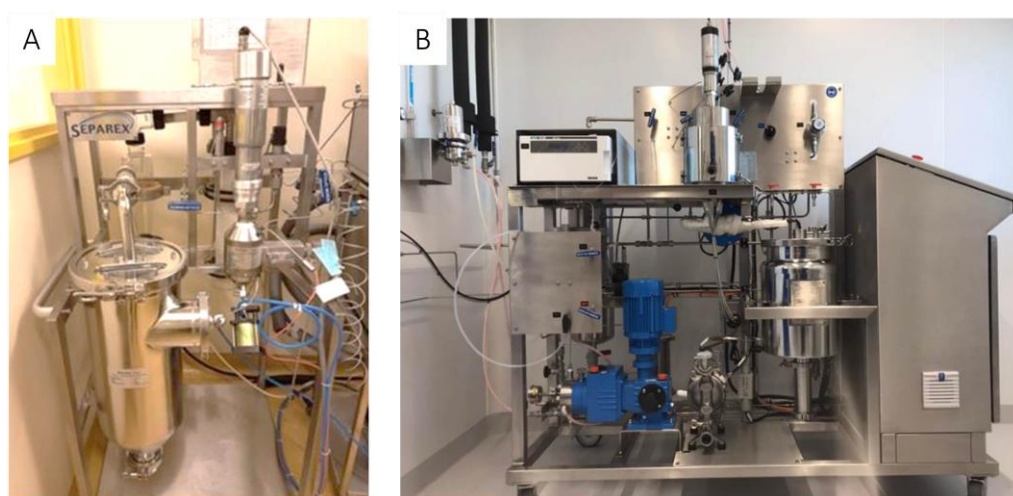


Figure 52 : Représentations des équipements PGSS à l'échelle du laboratoire (A) et à l'échelle pilote (B).

Puisque l'autoclave est dix fois plus volumineux, un essai préliminaire a été réalisé en multipliant par dix le volume de dispersion lipidique introduit dans l'autoclave. Cet essai a été mené conformément au protocole décrit à la section I.2.2 (page 205) afin de produire des liposomes de composition L5 contenant 5 mM de lipides. L'agitation a été fixée arbitrairement à 10% afin d'approcher au mieux la vitesse d'agitation de 500 rpm utilisée à l'échelle du laboratoire. Les autres paramètres, tels que le temps de contact, la température, la pression et la vitesse de dépressurisation, ont été maintenus identiques à ceux utilisés à l'échelle du laboratoire pour la condition à 5 mM en lipides.

Les liposomes L5 produits en triplicats lors de cet essai préliminaire à l'échelle pilote présentent une taille (242 ± 34 nm) et un PdI ($0,43 \pm 0,04$) nettement supérieurs aux CQA visés pour une administration TT, à savoir une taille inférieure à 200 nm et un PdI inférieur ou égal à 0,30. Cette augmentation de la taille des liposomes pourrait résulter d'un mélange insuffisant de la dispersion

lipidique dû à une vitesse d'agitation trop faible pouvant échouer à casser les agrégats de poudre et à produire une émulsion lipidique homogène [311]. Toutefois, ce phénomène semble principalement attribuable à la vitesse de dépressurisation élevée caractéristique du mode « tout ou rien ». Dans cette configuration, la pression de l'autoclave est relâchée sans régulation du débit de sortie. Durant les premiers instants de la dépressurisation, la pression interne demeure suffisamment importante pour provoquer l'expulsion rapide des liposomes en cours de formation, ce qui est susceptible d'affecter leurs caractéristiques finales. Ceux-ci s'autoassemblent probablement trop rapidement, ce qui générerait des liposomes de grande taille [312,313]. En revanche, à la fin de la phase de dépressurisation, la pression résiduelle dans l'autoclave permettrait une sortie plus lente des liposomes. Leur autoassemblage générerait alors des structures de plus petite taille. Cette variabilité de la taille des liposomes produits en début et fin de cycle se traduirait notamment par une valeur de PdI élevée, telle qu'observée dans cet essai.

Comme attendu, la charge de surface des particules est neutre ($-1,91 \pm 0,23$ mV). L'EE de la dexaméthasone atteint $32,9 \pm 7,7$ % pour cet essai à l'échelle pilote, tandis que la même formulation produite par PGSS à l'échelle du laboratoire présente une EE de $23,9 \pm 1,0$ %. Cette légère élévation de l'EE à l'échelle pilote pourrait toutefois résulter de la plus grande taille observée pour ces liposomes, qui seraient susceptibles d'encapsuler davantage de principe actif dans leur bicouche.

Ces premiers résultats sont encourageants pour une première production à grande échelle. Toutefois, puisque les liposomes produits ne répondent pas aux CQA requis, une optimisation du procédé sur ce nouvel équipement PGSS à l'échelle pilote sera nécessaire.

II.3. Résultats publiés

II.3.1. Résumé des résultats

Un plan d'expériences comprenant 22 essais a permis d'optimiser le protocole de production des liposomes par la méthode PGSS à l'échelle pilote en faisant varier les paramètres suivants : le volume (100-200 mL), la pression (120-250 bar), la vitesse d'agitation (10-70 %) et la vitesse de dépressurisation (60-120 bar/min). Afin de limiter les coûts expérimentaux, ce plan d'expériences a été réalisé à l'aide d'une formulation SPC/Chol/DSPE-PEG₂₀₀₀ (65/30/5 %mol) à une concentration lipidique de 5 mM. Les objectifs de taille (≤ 200 nm) et de PdI ($\sim 0,3$) ont été définis

dans le logiciel JMP afin d'identifier les conditions de production permettant d'obtenir des liposomes répondant au mieux à ces CQA.

Le premier paramètre étudié est la vitesse de dépressurisation. En effet, lors du procédé PGSS, les lipides sont introduits dans l'autoclave avec la phase aqueuse, ce qui conduit à la formation d'une dispersion lipidique. Le scCO_2 introduit dans l'autoclave s'intercale progressivement entre les chaînes d'acides gras des phospholipides, favorisant leur dispersion au cours de la phase de mélange et conduisant progressivement à la formation d'une émulsion. Lors de l'étape de dépressurisation, le scCO_2 se dilate puis retrouve son état gazeux. Cette expansion provoque la fragmentation des micelles, qui se réorganisent ensuite spontanément en bicouches pour former des liposomes [119]. Une dépressurisation trop rapide pourrait donc compromettre la formation des liposomes et affecter leur taille ainsi que leur PdI, les lipides ne disposant alors pas d'un temps suffisant pour se réorganiser correctement en bicouches homogènes et reproductibles. Ainsi, à pression fixe, une augmentation de la vitesse de dépressurisation entraîne une hausse significative du PdI, passant d'environ 0,30 à plus de 0,40. Une tendance similaire est observée pour la taille des particules. Ceci pourrait s'expliquer par l'effet Joule-Thomson [312,313]. Lors d'une dépressurisation rapide, les molécules de CO_2 doivent vaincre les forces intermoléculaires pour se dilater [314]. Lorsque cette expansion se produit trop rapidement, les molécules de CO_2 consomment leur propre énergie interne plutôt que celle de leur environnement, ce qui entraîne une chute importante de la température du mélange. À petite échelle, les transferts thermiques sont favorisés et compensent partiellement ce refroidissement. En revanche, à plus grande échelle, les transferts de chaleur sont moins efficaces. Le refroidissement pourrait alors induire une précipitation des lipides dans la phase aqueuse, augmentant le PdI et la taille des liposomes [315,316]. La vitesse de dépressurisation a dès lors été fixée à 60 bar/min pour la suite du développement.

L'effet de la pression a ensuite été analysé. Une augmentation de celle-ci a conduit à la production de liposomes de taille et PdI réduits. Cette observation est en accord avec plusieurs études montrant que des pressions élevées favorisent l'obtention de petites vésicules homogènes [312,317]. Cet effet peut être attribué à la plus grande quantité de CO_2 introduite dans l'autoclave, qui s'intercale entre les agrégats lipidiques et renforce ainsi l'effet dispersant. La pression a donc été fixée à 262 bar.

L'étude de la vitesse d'agitation a révélé une interaction complexe avec la pression appliquée dans l'autoclave. En effet, à basse pression, une augmentation de l'agitation entraîne une

diminution de la taille des liposomes, tandis qu'à haute pression, l'effet inverse est observé. Cette interaction pourrait s'expliquer par des différences dans le comportement du mélange entre la phase aqueuse et le scCO₂. À basse pression (80°C, 120 bar), le scCO₂, de densité relativement faible (296 kg/m³), forme une couche distincte au-dessus de la phase aqueuse plus dense (977 kg/m³) [318]. L'agitation induit la formation d'un vortex central qui favorise la dispersion de la phase scCO₂ au sein de la phase aqueuse [319]. L'augmentation de la vitesse d'agitation accentue ce phénomène en approfondissant le vortex et en favorisant la fragmentation des bulles de scCO₂ au sein de l'émulsion [311]. Ceci améliorerait l'incorporation du CO₂ dans la dispersion lipidique et renforcerait son effet dispersant. À haute pression (ex. 262 bar), la densité de l'eau reste pratiquement inchangée (982 kg/m³), tandis que celle du scCO₂ augmente fortement (686 kg/m³) [318]. La différence de densité entre les phases diminue, facilitant l'entrée du scCO₂ dans la phase aqueuse même à faible vitesse d'agitation (10%) [319]. Toutefois, lorsque celle-ci augmente, le flux axial généré par l'agitateur entraînerait le scCO₂ vers le bas de manière excessive. Dans cette situation, les pales de l'agitateur tourneraient principalement dans une cavité riche en scCO₂ plutôt qu'à l'interface des deux phases, réduisant ainsi l'efficacité du transfert du scCO₂ vers la dispersion lipidique et limitant son action dispersante. La vitesse d'agitation a donc été fixée à 10%.

Par ailleurs, lorsque le volume de dispersion lipidique introduit dans l'autoclave augmente, une légère diminution de la taille des liposomes est observée. Deux hypothèses pourraient expliquer cet effet : la première est que l'énergie mécanique dissipée par l'agitateur serait répartie de manière plus homogène dans un grand volume, générant des gouttelettes plus stables, tandis que, dans un faible volume, elle perturberait l'environnement. La deuxième hypothèse repose sur la diminution du volume disponible dans l'autoclave pour la phase scCO₂ lorsque le volume de dispersion lipidique augmente. Lors de la dépressurisation, la quantité de cette phase scCO₂ susceptible de subir une détente rapide est alors plus faible, ce qui limiterait le refroidissement du milieu (effet Joule-Thomson) et réduirait le risque de précipitation lipidique associé à la formation de particules hétérogènes et de grande taille. Néanmoins, un volume de 100 mL a été retenu pour la suite du développement puisqu'il permet d'atteindre les CQA visés tout en minimisant les coûts de production.

La validation de ce protocole de production a permis de générer des liposomes dont la taille (180 ± 4 nm), le PdI ($0,34 \pm 0,02$) et le ZP ($-3,1 \pm 1,0$ mV) étaient en accord avec les CQA définis. Cette condition optimale a ensuite été appliquée à deux formulations développées au LTPB : une formulation à base de 1,2-dilinoéyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DLPC) co-encapsulant le

maléate d'indacatérol (Ind) et le ciclésonide (Cic), destinée à l'administration pulmonaire [310], et une formulation à base de DSPC encapsulant la dexaméthasone, développée pour une administration par voie TT dans le cadre de cette thèse. Lors du passage de l'échelle du laboratoire à l'échelle pilote, la taille des liposomes de DLPC est passée de 113 ± 3 nm à 152 ± 8 nm, tandis que celle des liposomes de DSPC a augmenté de 152 ± 10 nm à 186 ± 8 nm. Le PdI de la formulation DLPC est passé de $0,26 \pm 0,02$ à $0,36 \pm 0,02$, tandis que celui de la formulation DSPC est passé de $0,31 \pm 0,01$ à $0,39 \pm 0,01$. Malgré ces augmentations, les tailles des deux formulations restent inférieures au seuil de 200 nm et leurs PdI demeurent proches de la valeur cible de 0,30. La formulation DLPC a conservé des EE élevées ($> 90\%$) pour le Cic et l'Ind aux deux échelles de production, tandis que la formulation DSPC produite à l'échelle pilote a présenté une amélioration significative de l'EE de la dexaméthasone, atteignant $30,7 \pm 1,4$ % contre $23,9 \pm 1,0$ % à l'échelle du laboratoire. Ces résultats démontrent la robustesse du procédé PGSS dans les conditions optimisées à l'échelle pilote, qui ont permis d'obtenir des liposomes présentant les CQA attendus, malgré les différences de composition lipidique entre les formulations. Une réduction supplémentaire du PdI des liposomes produits à l'échelle pilote demeure néanmoins souhaitable.

Enfin, l'impact du procédé PGSS sur la stabilité des phospholipides a été évalué. Lors de l'analyse par HPTLC, la formulation DSPC n'a présenté aucun pic détectable de LPC 18:0, principal produit d'hydrolyse du DSPC, avant ou après la production, indiquant que le degré d'hydrolyse est inférieur à 1,86%. Pour la formulation DLPC, bien que la densité du pic de LPC 18:2, principal produit d'hydrolyse du DLPC, ait augmenté significativement après production, sa proportion est restée inférieure à 2,9%. Dans l'ensemble, ces résultats sont rassurants, bien qu'ils ne permettent pas d'exclure totalement le risque d'hydrolyse. De plus, en raison de son degré élevé d'insaturation, le DLPC est particulièrement sensible à l'oxydation, un phénomène susceptible d'être favorisé par les températures élevées mises en œuvre lors du procédé PGSS. Toutefois, le pourcentage de lipides oxydés dans la formulation DLPC n'a augmenté que de $0,004 \pm 0,002$ % après la production à l'échelle pilote. Aucune oxydation n'a été détectée pour la formulation DSPC, ce qui est cohérent avec le caractère saturé de ce phospholipide. Ces résultats confirment que le procédé PGSS est un procédé adapté à la production de formulations de liposomes contenant des composés sensibles à l'oxydation, tels que le DLPC.

II.3.2. Publication

Pilot scale transfer and optimization of an innovative supercritical CO₂ PGSS method for the production of drug-encapsulating liposomes

Tuan Nghia Dinh^{a,1}, Chloé Gauthy^{a,1}, Hugo Magdalena Segura^a, Pierre-Yves Sacré^b, Erika Hendrickx^c, Louise Conrard^c, Brigitte Evrard^a, Brigitte Malgrange^d, Géraldine Piel^{a,*}, Noémie Penoy^a

^a Laboratory of Pharmaceutical Technology and Biopharmacy, Center for Interdisciplinary Research on Medicines, University of Liège, 4000 Liège, Belgium

^b Research Support Unit in Chemometrics, Center for Interdisciplinary Research on Medicines, University of Liège, 4000 Liège, Belgium

^c Center for Microscopy and Molecular Imaging (CMMI), Université Libre de Bruxelles, 6041 Gosselies, Belgium

^d Developmental Neurobiology Laboratory, GIGA-Stem cells, University of Liège, 4000 Liège, Belgium

* Corresponding author: geraldine.piel@uliege.be

¹ These authors contributed equally to this work.

International Journal of Pharmaceutics, 2026; 702: 127281

DOI: 10.1016/j.ijpharm.2026.127281

KEYWORDS

Liposomes, supercritical carbon dioxide, pilot scale, drug encapsulation, liposome production method

ABSTRACT

The industrial translation of liposome production processes remains challenging, particularly in achieving scalability while maintaining critical quality attributes and formulation stability. In this study, a supercritical CO₂-based PGSS process was successfully transferred from the laboratory to the pilot scale (50 to 500 mL reactor). Using a Quality by Design approach and a design of experiments on a simplified soy phosphatidylcholine formulation, we identified optimal production

process parameters. These parameters were then validated and transferred to other drug-encapsulating liposome formulations, demonstrating process robustness. Under these conditions, liposomes measuring less than 200 nm and polydispersity indices close to 0.30 were reproducibly obtained at pilot scale. The process was successfully applied to drug-loaded formulations, achieving high encapsulation efficiencies while maintaining suitable physicochemical properties. Cryo-TEM confirmed the formation of consistent vesicular structures. Importantly, lipid chemical stability was preserved, with minimal hydrolysis and no significant increase in oxidation, even for unsaturated lipids. Overall, this study demonstrates the robustness, scalability, and relevance of the PGSS process as a solvent-free, single-step technology for liposome production.

II.3.2.1. Introduction

Liposomes are spherical vesicles composed of one or more phospholipid bilayers surrounding an aqueous core [320,321]. This unique architecture allows them to encapsulate, or co-encapsulate, both hydrophilic and hydrophobic active ingredients, making them a versatile delivery system for small molecules as well as biomolecules. While numerous methods have been developed for liposomes preparation at the laboratory scale (lab scale), few satisfy the rigorous demands of industrial-scale pharmaceutical manufacturing, where high reproducibility, sterility and precise control over critical quality attributes (CQAs) such as particle size, polydispersity index (PdI), and encapsulation efficiency (EE) are of paramount importance [322]. Ethanol injection method is currently the most common technique for the industrial manufacture of parenteral liposomes containing small molecules, whereas microfluidics has become the dominant technology for manufacturing lipid nanoparticles (LNPs) used in gene therapies and mRNA vaccines [322,323]. Both methods rely on the same fundamental principle of solvent exchange: lipids and hydrophobic drugs are dissolved in a water-miscible organic solvent (typically ethanol) and mixed with an aqueous phase containing hydrophilic drugs. This mixing increases the polarity of the solvent environment, triggering lipid precipitation and self-assembly into vesicles. However, ethanol injection typically yields heterogeneous vesicles that require subsequent size reduction and homogenization steps, such as extrusion, to achieve a uniform particle size distribution. Furthermore, these production methods must be followed by organic solvent removal (e.g., via tangential flow filtration) and, if needed, a final sterilization step. One of the most challenging problems with these methods is the use of ethanol which necessitates complex removal steps and rigorous monitoring of residue levels in the final product [324]. These processes are both costly and time-consuming for industrial applications [325,326].

With the aim of developing a solvent free method for liposome production, our laboratory has focused for years on the Particles from Gas-Saturated Solution (PGSS) process using supercritical carbon dioxide (SC-CO₂). The primary role of SC-CO₂ in this process is to disperse the lipid molecules within the aqueous phase during pressurization, which then reassemble into lipid vesicles during the depressurization step [327]. The low critical parameters of SC-CO₂ (31.1 °C, 73.8 bar), combined with its non-flammable, non-toxic, chemically inert, and environmentally friendly nature, make it an ideal and cost-effective candidate for industrial scale applications [328,329].

In a previous study, Penoy et al. employed a Quality by Design (QbD) approach to optimize process parameters (temperature, pressure, agitation rate, dispersion volume, and contact time with SC-CO₂) as well as formulation parameters (lipid concentration) [309]. The goal was to produce liposomes at the lab scale exhibiting targeted CQAs, specifically a size below 200 nm and a PdI close to 0.30. This strategy enabled one-step liposome production without organic solvents, and led to the identification of specific operating conditions that were reproducible and robust across multiple liposomal formulations, enabling efficient encapsulation of both hydrophilic and hydrophobic compounds without causing a considerable increase in hydrolysis and oxidation products of lipid components [330]. The PGSS method has also gained attention from other research groups, as evidenced by studies investigating the impact of process parameters [312,313,316,317,327,331] and lipid composition [332,333] on liposomes formation and drugs loading.

In addition, SC-CO₂ exhibits notable microbicidal properties, offering a promising alternative for the sterilization of thermosensitive products such as liposomes [334]. More recently, the PGSS conditions optimized by Penoy et al. were shown to achieve a sterility assurance level compliant with pharmaceutical requirements, as a result of the combined effects of elevated temperature and pressure during processing [120].

Throughout these studies, PGSS has emerged as an innovative technology for the simultaneous production and sterilization of drug-encapsulated liposomes without the need for organic solvents. To move closer to industrial application, investigating its ability to produce liposomes at a pilot-scale is now of great interest. However, to the best of our knowledge, this subject has not yet been explored. To bridge this gap, our laboratory has worked on scaling up the PGSS process, transitioning from the lab scale to a pilot scale (50 to 500 mL reactor). This development was

made possible by the use of a GMP-compliant PGSS system (IMPact Cleanroom, University of Liège).

However, the transition from the lab- to pilot-scale equipments involves significant mechanical and mechanistic differences, such as changes in reactor volume (from 50 to 500 mL), impeller design (from square to pitched blade impeller), and the ability to control the depressurization process of the pilot-scale device, making simple scaling up based solely on lab-scale conditions impossible. Therefore, the objective of this study is to conduct the first investigation on parameters for PGSS production at the pilot scale using a QbD approach. Based on our understanding from previous lab scale investigations, parameters such as lipid concentration, temperature, and contact time were fixed to facilitate the investigation of others, including pressure, dispersion volume, agitation speed, and depressurization rate. Following a Design of Experiment (DoE) study, an optimal condition was applied to the production of two liposomal formulations containing drugs previously developed: a co-encapsulated indacaterol maleate (Ind) and ciclesonide (Cic) formulation for pulmonary administration [335] and a dexamethasone (Dexa) formulation designed for intratympanic administration [336]. Then, the obtained liposomes were thoroughly analyzed in terms of size, PdI, zeta potential, morphology, drugs encapsulation, as well as lipid hydrolysis and oxidation. These results confirmed the capability of the PGSS process to produce large quantities of liposomes with expected properties, further establishing it as a future industrial technology for solvent-free liposome manufacturing.

II.3.2.2. Materials and methods

II.3.2.2.1. Materials

Dexamethasone (Dexa) was purchased from Fagron (Belgium). Ciclesonide (Cic) was purchased from LEAPChem (China). Indacaterol maleate (Ind) was purchased from NEWCHEM Spa (Italy). Cholesterol, chloroform, triethylamine and 4-(2-hydroxyethyl)-piperazine-1-ethanesulfonic acid (HEPES) $\geq 99.5\%$ were purchased from Sigma-Aldrich (Belgium). Soy phosphatidylcholine with 95% L- α -phosphatidylcholine (SPC) and 1-stearoyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phosphocholine (18:0 LPC) were purchased from Avanti Polar Lipids, inc. (Alabaster, USA). 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DSPC), 1,2-dilinoleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DLPC) and 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[methoxy(polyethylene glycol-2000)] (DSPE-PEG₂₀₀₀) were purchased from SINOPEG (China). 1-linoleoyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phosphatidylcholine (18:2 LPC) was purchased from ABITEC (Sweden). HPTLC Silica gel 60 F₂₅₄, orthophosphoric acid and

PARTIE EXPÉRIMENTALE

copper sulfate (CuSO_4) were purchased from Supelco® (Germany), Merck (Germany) and Carl ROTH® (Germany), respectively. Liquid CO_2 with a purity of 99.7% was purchased from Air Liquide (Belgium). Ultrapure water was produced by a Milli-Q system ($18.2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$ resistivity; Millipore, Bedford, MA, USA). Methanol and acetonitrile of (Ultra) Gradient HPLC Grade were purchased from J.T. Baker (Poland). Absolute ethanol from analytical reagent grade was purchased from VWR chemicals BDH® (France).

II.3.2.2.2. Liposome production

Table 8 shows the composition of the liposome formulations used in this study. To investigate the PGSS process parameters using a design of experiments (DoE) approach, a formulation based on SPC, without any active pharmaceutical ingredient (API), was used. Two formulations loaded with an active ingredient were then used to evaluate the robustness and transferability of the production method during scaling up.

Table 8 : Composition of liposomes.

Formulation	Lipid composition (mol%)	Drugs (5 mol% of total lipids)
SPC Formulation	SPC/Chol/DSPE-PEG (65/30/5)	/
DSPC Formulation	DSPC/Chol/DSPE-PEG (85/10/5)	Dexa
DLPC Formulation	DLPC/Chol/DSPE-PEG (55/30/15)	Cic and Ind

II.3.2.2.2.1. PGSS method by the lab scale equipment

First, lipids and APIs were weighed and dispersed in HEPES buffer (10 mM, pH 7.4) at 60 °C for 15 min under stirring (200 rpm). Then, the dispersion was poured into the high-pressure reactor of the lab scale equipment (Separex, France) and liquid CO_2 was pumped into the reactor, where it reached the supercritical state under a previously optimized condition for the production of liposomes at 5 mM: 10 mL of lipid dispersion, 80 °C, 156 bar, 500 rpm of agitation, 30 min of contact [309]. SC- CO_2 was mixed with the lipid dispersion for 30 min at 500 rpm (Figure 53). Finally, the reactor was depressurized through a nozzle, and the resulting liposome suspension was collected in the expansion vessel.

II.3.2.2.2. PGSS method by the GMP pilot scale equipment

The liposome production was scaled up to fit the pilot scale GMP PGSS equipment, which features a high-pressure reactor with a tenfold larger volume. The procedure is more or less identical to that used at the lab scale. Briefly, lipids, APIs and HEPES buffer (10 mM, pH 7.4) were first added to the reactor without preheating at 60 °C. This dispersion was mixed with SC-CO₂ under experimental conditions defined by a DoE as detailed below. Finally, the mixture was depressurized through a nozzle at a constant rate, also specified by the DoE, and the liposome suspension was collected from the expansion vessel.

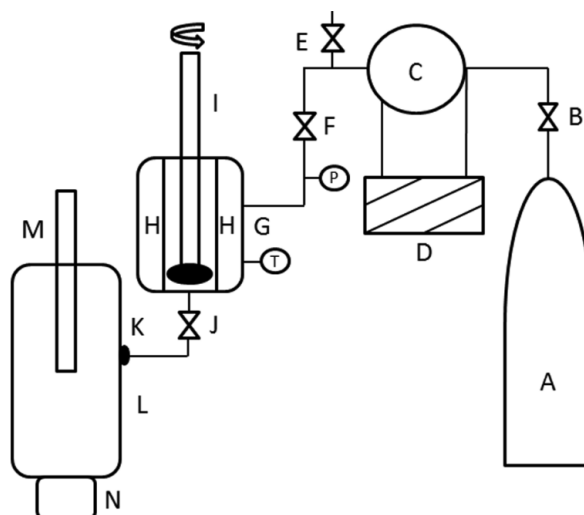


Figure 53 : Schematic representation of PGSS equipments: (A) CO₂ bottle, (B, E, and F) on/off valves, (C) pump, (D) refrigerant, (G) high pressure reactor, (H) heating jacket, (I) Stirrer, (J) pneumatic valve, (K) nozzle, (L) expansion vessel, (M) CO₂ outlet, (N) sample recovery vial, (P) pressure gauge, (T) thermostat. Reprinted with permission from [309].

II.3.2.2.2.3. Design of Experiment (DoE): production parameters optimization

Building on previous optimization of the PGSS process at the lab scale, the temperature, contact time, and lipid concentration were fixed at 80 °C, 30 min, and 5 mM, respectively [309,337]. The investigated parameters included dispersion volume, pressure, agitation speed, and depressurization rate (Table 9). Their influence on the size and PdI of the SPC formulation produced by the pilot scale equipment was evaluated using an A-optimal DoE generated by JMP 19 Software (SAS Institute, Cary, NC, USA). Main effects, interactions, and quadratic terms of

PARTIE EXPÉRIMENTALE

these factors were evaluated, resulting in 22 experimental runs grouped into blocs of 2 (Table 39, page 334). The ranges for volume (100 to 200 mL) and pressure (120 to 250 bar) were based on previous studies [309,337], while the agitation speed was capped at 70% (10 to 70%) due to mechanical constraints of the pilot equipment. The depressurization rate (ΔP) was limited to 120 bar/min (60 to 120 bar/min) to mitigate the Joule-Thomson effect [312,313]. The objective of the DoE was to achieve a size below 200 nm and a PdI close to 0.30.

Statistical analysis of the experimental data, including model fitting and evaluation of factor effects on the CQAs, was performed using JMP Pro 19. After analyzing the results using the Profiler in JMP, a Monte Carlo simulation was performed to account for factor variability and model uncertainty. This approach made it possible to assess the robustness of the previously identified optimal conditions by estimating the distribution of responses and the probability of meeting specifications (CQAs) under real-world conditions.

Table 9 : Variables in the A-Optimal design for parameters investigation of PGSS at pilot scale.

Coded level			
Factors	Low level (-1)	Medium level (0)	High level (+1)
Dispersion volume (mL)	100	150	200
Pressure (bar)	120	185	250
Agitation speed (%)	10	40	70
Depressurization rate (bar/min)	60	90	120
Responses	Constraints		
Size (nm)	< 200		
PdI	≤ 0.30		

II.3.2.2.3. Characterization of physicochemical properties of liposomes

II.3.2.2.3.1. Size, PdI, and zeta potential

The Z-average size (nm) and PdI of the liposomes were determined by dynamic light scattering (DLS), while the zeta potential (ZP, mV) was measured by electrophoretic light scattering (ELS), using a Zetasizer Ultra Red (Malvern Panalytical, UK) at a scattering angle of 90° and at room temperature (25°C). Liposomes were diluted in HEPES buffer (10 mM, pH 7.4) to achieve a total lipid concentration of 0.5 mM, corresponding to a particle concentration suitable for

measurement. Prior to data acquisition, an equilibration time of 120 seconds was applied to each sample. The dispersant (HEPES buffer) properties were defined using the standard parameters of water at 25°C: a refractive index of 1.332 and a viscosity of 0.8872 cP. The liposomal material was modeled with a refractive index of 1.450 and an absorption of 0.001. Data processing was performed using ZS Explorer software. For DLS analysis, the General Purpose model was utilized, with the number of runs per measurement automatically optimized by the software (typically ranging between 10 and 15 runs). For zeta potential measurements, the Auto mode analysis model was employed. All samples were measured in triplicate.

II.3.2.2.3.2. Encapsulation efficiency

Non-encapsulated drugs in DSPC and DLPC formulations were purified by dialysis at 4°C in HEPES buffer (10 mM, pH 7.4) (1:20, volume ratio) using a 20 kDa molecular weight cut-off cellulose membrane (Spectra/Por®, VWR Chemical) for 5h [336] and 4h [335], respectively, under constant agitation (200 rpm), with medium changes every hour. EE of Dexa in DSPC formulation and Cic and Ind in DLPC formulation were determined by quantifying drugs concentrations (µg/mL) before and after dialysis for the calculation by the Equation 9.

$$EE (\%) = \frac{\text{Drug concentration after dialysis}}{\text{Drug concentration before dialysis}} \times 100$$

Equation 9 : Encapsulation efficiency (EE).

II.3.2.2.4. Drugs quantification

II.3.2.2.4.1. Quantification of Dexa

Dexa quantification was performed using a validated HPLC method [336]. The equipment consisted of an Agilent® 1100 system (Santa Clara, USA) equipped with OpenLab CDS LC ChemStation (version C.01.05). Separation was achieved on an RP-18 analytical column (250 x 4 mm, 5 µm) fitted with a matching RP-18 guard column (4 x 4 mm, 5 µm), using an isocratic mobile phase of water/acetonitrile (50:50, v/v) at a flow rate of 0.8 mL/min. The column temperature was kept constant at 35°C. Samples (10 µL) were injected at room temperature, with a total run time of 8 min, and Dexa was detected at 242 nm with a retention time of 4.9 min. Calibration curves were generated using standard solutions at 1, 10, 50, and 100 µg/mL. Samples were diluted 20-fold in absolute ethanol. This method was successfully validated using

the accuracy profile approach and Enoval® software V3.0 (Arlenda, Liège, Belgium). The limit of quantification of Dexa is 1.868 µg/mL. The risk α was set at 5% with acceptance limits at 10%.

II.3.2.2.4.2. Quantification of Cic and Ind

Cic and Ind concentrations were quantified using a HPLC method [338]. The equipment consisted of an Agilent® 1100 system (Santa Clara, USA) equipped with OpenLab CDS LC ChemStation (version C.01.05). Separation was achieved on an Xbridge BEH C18 column (50 x 3 mm, 3.5 µm) maintained at 30°C. The mobile phase consisted of an ammonium acetate buffer at pH 10 (A) and methanol (B) with the following gradient elution at a flow rate of 0.7 mL/min: 0-1 min 80% A; 10-13 min 5% A; 13.5-20 min 80% A. The injection volume was 10 µL. The UV detector was set at 243 nm wavelength. The limits of quantification of Cic and Ind are 3.205 and 2.031 µg/mL, respectively. Liposomes were diluted 10-fold in methanol prior to analysis.

II.3.2.2.5. Evaluation of lysophospholipids (LPC) content (hydrolysis products of phospholipids)

The evaluation of 18:0 LPC and 18:2 LPC, main hydrolysis products of DSPC and DLPC respectively, was performed by high-performance thin-layer chromatography (HPTLC) as previously reported [330,339]. Liposomes were diluted 2.5-fold in methanol. A lipid solution in methanol with the same composition and concentration was prepared as pre-PGSS control. Calibration curves of 18:0 LPC and 18:2 LPC were prepared in methanol at 25, 50, 100, and 150 µg/mL. Samples were applied onto silica gel HPTLC plates (Merck, 60 F₂₅₄, 10 × 20 cm) using a semi-automatic LINOMAT 5 applicator (CAMAG, Switzerland) under the following conditions: 10 µL injection volume, 150 nL/s application rate, 5 mm band length, and a 15 mm distance from the lower edge of the plate. Dried plates were then developed in a development chamber (CAMAG ADC2, Switzerland) using a double-trough chamber (10 × 20 cm, CAMAG, Switzerland) containing 10 mL of mobile phase composed of chloroform, methanol, triethylamine, and water (30:35:34:8, v/v). Development was stopped when the solvent front had migrated 70 mm. Plates were immersed three times for 5 s in a 10% CuSO₄ solution acidified with 8% phosphoric acid for post-chromatographic derivatization, dried at room temperature for 20 min, and heated at 170°C for 30 min. Evaluation of 18:0 LPC and 18:2 LPC amounts was performed by measuring the intensity of the derivatized bands using CAMAG TLC 2 visualizer using visionCATS software, and LPC

PARTIE EXPÉRIMENTALE

content was subsequently calculated using the Equation 10, where LPC is LPC content (%), C_{LPC} is LPC concentration ($\mu\text{g/mL}$), and $C_{\text{phospholipid}}$ is the initial phospholipid concentration ($\mu\text{g/mL}$).

$$LPC = \frac{C_{LPC}}{C_{\text{phospholipid}}} \times 100$$

Equation 10 : Lysophospholipids content (LPC).

II.3.2.2.6. Determination of percentage of peroxidized lipids

The amount of oxidation was determined by measuring the absorbance of conjugated dienes, which appear in the oxidized form of phospholipids, by UV–visible spectrophotometry at 234 nm [340]. For the spectrophotometric measurements, liposomes were diluted in ethanol to a final phospholipid concentration of 0.5 mg/mL for DPLC formulation and 1 mg/mL for DSPC formulation. A lipid solution of identical composition and concentration was prepared to serve as a pre-PGSS control. The increase in the percentage of peroxidized lipids relative to the initial phospholipid content (% Δ Peroxidized lipids) was calculated using the Equation 11, where Abs_{234} and Abs'_{234} are the measured absorbances at 234 nm after and before the PGSS production, ϵ is the molar extinction coefficient of the conjugated dienes ($27000 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$), D is the light path length of the quartz cell (1 cm), and C_{lipids} is the molar concentration of total lipids [340].

$$\% \Delta \text{ Peroxidized lipids} = \frac{Abs_{234} - Abs'_{234}}{\epsilon \cdot D \cdot C_{\text{lipids}}} \times 100$$

Equation 11 : Increase in peroxidized lipids (%).

II.3.2.2.7. Evaluation of liposomes morphology by cryo-TEM imaging

For cryo-TEM analysis, QUANTIFOIL® R1.2/1.3 200 mesh Cu grids were glow-discharged using an ELMO glow discharge system (Cordouan Technologies) at a vacuum of 2.1×10^{-1} mbar and a voltage of 1.7 V for 35s. Grids were then transferred to a Vitrobot Mark IV (ThermoFisher Scientific) for a plunge-freezing procedure. A double application of the sample was used: 3 μL of the particle suspension was applied to the grid, followed by blotting (blot force = 2, blot time = 4 s, wait time = 5 s). Immediately after the first blot, a second 3 μL aliquot of the same suspension

was applied, followed by a final blot (blot force = 2, blot time = 4 s, wait time = 0 s). Vitrified grids were transferred into a Talos transmission electron microscope (ThermoFisher Scientific) and observed under cryogenic conditions at an accelerating voltage of 200 kV. Images were acquired using EPU software (ThermoFisher Scientific) and a Falcon III EC camera (ThermoFisher Scientific) at a magnification of 73,000x corresponding to a pixel size of 0.14 nm/pixel for an electron dose of 21 e⁻/Å². Liposomes were analyzed for a final lipid concentration of 5 mM.

II.3.2.2.8. Statistical Analysis

Data analysis was performed using GraphPad Prism software (version 8.4.3, La Jolla, CA, USA). Results are presented as mean values ± standard deviation (SD). Statistical differences between groups were assessed using unpaired t-tests. A p-value <0.05 was considered statistically significant: **p < 0.01, ****p < 0.0001. Non-significant differences are denoted as ns.

II.3.2.3. Results and discussion

II.3.2.3.1. Risk analysis

Before considering the scale-up of the liposome production process using PGSS, a comprehensive risk assessment was carried out to identify the parameters most likely to influence the key CQAs of the liposomes. Key process variables considered included pressure, temperature, agitation speed, dispersion volume introduced into the reactor, lipid concentration, contact time with the SC-CO₂, and ΔP, as these parameters may significantly impact particle size, PdI and EE.

In addition to the process parameters, the differences between the laboratory and pilot scale equipment were carefully evaluated. Scaling up from a 50 mL to a 500 mL reactor may affect heat and mass transfer, mixing efficiency, and internal fluid dynamics. Furthermore, potential sources of variability affecting process robustness and reproducibility were considered, including differences in impeller design and agitation geometry, the possibility of precisely controlling the ΔP, and the higher level of automation available at pilot scale.

Based on this risk analysis and previous lab scale findings, several parameters were fixed for the pilot scale study. The temperature was fixed at 80 °C, as it was identified as a decisive factor for both liposome formation and sterilization [309,337]. The contact time was maintained at 30 min, as it showed no significant impact on particle properties while ensuring acceptable industrial feasibility and process throughput. The total lipid concentration was set at 5 mM to limit raw

material consumption and reduce production costs in view of large-scale manufacturing. The remaining parameters were selected as experimental variables for optimization, namely pressure (120–250 bar), agitation speed (10–70%), dispersion volume introduced into the autoclave (100–200 mL), and ΔP (60–120 bar/min). This systematic evaluation of variables via a DoE strategy was implemented in alignment with the QbD principles outlined in the ICH Q8 (R2) guideline. This guideline states that quality cannot be tested into products but must be built in by design [341]. Utilizing this DoE framework to screen variables, identify Critical Process Parameters, and discover their interactions with the liposomes CQAs directly addresses this expectation. In turn, this process understanding serves as the basis for the construction of design space in the future and facilitates technology transfer to commercial manufacturing [342].

II.3.2.3.2. Study of the impact of PGSS production parameters on liposome characteristics using the design of experiments approach

To facilitate the results analysis from the DoE, it is crucial to have a quick overview of previous hypotheses regarding the effect of SC-CO₂ on lipid components when using the PGSS process. Liposome production via this method involves two fundamental stages: first, SC-CO₂ is mixed with an aqueous lipid dispersion; then, the mixture is depressurized under controlled conditions [312,327] (Figure 54). Although SC-CO₂ and water are only partially miscible, some CO₂ is solubilized in the aqueous phase during the mixing stage. Simultaneously, the undissolved SC-CO₂ can partition into the crude lipid aggregates, intercalating between the fatty acyl chains of the phospholipids. This process disrupts the intermolecular van der Waals interactions, effectively dispersing the poorly soluble phospholipids and cholesterol. Furthermore, evidence suggests that dispersed lipids could migrate to the interface between the SC-CO₂ and the aqueous phase, leading to the formation of emulsion systems [343]. During the subsequent depressurization, the expansion of the CO₂ acts as a powerful mechanical dispersing agent. As the CO₂ transitions from a supercritical state to a gas, it fragments the plasticized lipid phase into small, disordered assemblies or even discrete molecules. Then, they spontaneously self-assemble into bilayers and finally liposomes, driven by hydrophobic interactions to minimize the hydrophobic surface area in contact with the aqueous buffer.

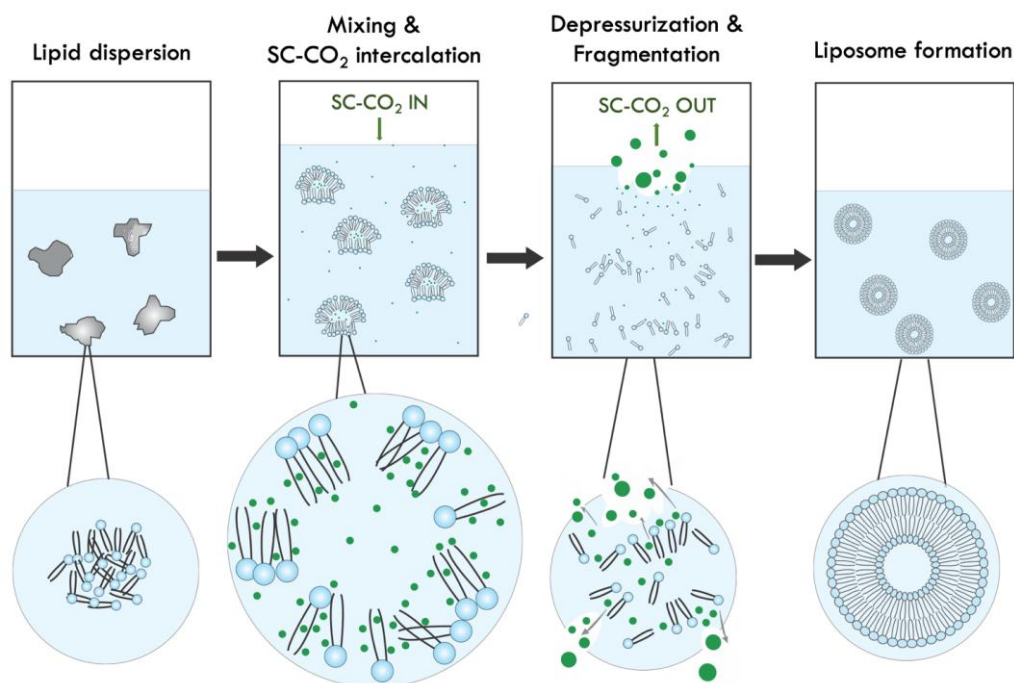


Figure 54 : Schematic mechanism of liposomes formation by the PGSS method, inspired by the reference [327] with modifications: (A) Lipid aggregation in aqueous dispersion. (B) Intercalation of SC-CO₂ between hydrophobic regions of lipids during pressurization. (C) Lipid reassembly during depressurization. (D) Formation of liposome vesicles after depressurization.

As the final characteristics of the vesicles are dictated by the kinetics of this expansion, the ΔP is a decisive factor. An inadequate pressure drop can compromise liposome size and PdI, even if the lipids were well dispersed during the mixing stage because phospholipids do not have sufficient time to reorganize into bilayers and subsequently into liposomes in a reproducible manner. Consequently, the influence of the ΔP is analyzed first, followed by the remaining parameters governing the SC-CO₂-lipid mixing stage. This order of results interpretation was further supported by the significant influence of ΔP on the dependent variables, including its main effect, quadratic term, and interactions with other parameters (Figure 78, page 333). The profilers which showed the variation of size and PdI of liposomes in function of the different investigated parameters at low (120 bar) and high (~ 250 bar) pressure conditions were used for the results interpretation (Figure 55).

II.3.2.3.2.1. Effect of depressurization rate

Under high-pressure conditions (262 bar), increasing the ΔP from 60 to 120 bar/min resulted in a significant increase in the PdI, rising from approximately 0.30 to over 0.40 (Figure 55B). Similarly, at low pressure condition (120 bar), although the PdI was already elevated (> 0.30) at 60 bar/min, increasing the ΔP to 90 bar/min exacerbated this further (Figure 55A). The same trend was observed for particle size, particularly when the ΔP was increased from 60 to 90 bar/min.

These findings contrast with those of previous optimization studies on the PGSS process for the production of small volumes of liposomes (6 mL) which suggested that rapid CO_2 release facilitated the disruption of phospholipid aggregates into discrete molecules, thereby promoting homogeneous reassembly into vesicles and lowering PdI [312,313,327,344]. However, those studies also cautioned that applying high ΔP (e.g., 200 bar/min) to larger volumes would present significant challenges due to the Joule-Thomson effect [312,313]. During rapid depressurization, CO_2 molecules must overcome attractive intermolecular forces to expand [314]. When the expansion occurs too rapidly for heat to be absorbed from the surroundings, the CO_2 molecules are forced to consume their own internal heat energy, resulting in a severe temperature drop. In small-scale production, the high surface-to-volume ratio facilitates rapid heat transfer, which can potentially compensate for this cooling. However, at larger scales (100–200 mL), heat transfer would be more difficult and the uncompensated internal cooling could withdraw heat from the aqueous phase inducing lipid precipitation and increasing the PdI. This would create bigger vesicles [315,345]. Furthermore, even when the depressurisation pipe is kept at 80°C , intense local cooling can pose a risk of blockage to the pipe or nozzle due to the formation of CO_2 ice [346,347]. Therefore, we set ΔP to 60 bar/min for subsequent analysis of the other results in the DoE.

II.3.2.3.2.2. Effect of pressure and interaction with agitation

When the influence of pressure was analyzed independently, a clear trend emerged: an increase in pressure reduced the size and PdI of the liposomes (Figure 55). This observation aligns with previous studies indicating that higher pressures favor narrower size distributions and smaller vesicles [312,344]. This can be attributed to the greater amount of CO_2 introduced into the reactor, which increases the concentration of unhydrated CO_2 molecules intercalated between lipid aggregates, thereby enhancing the dispersing effect of SC- CO_2 on the lipids. Furthermore,

at a constant depressurization rate, depressurizing from a higher initial pressure generated a stronger disruptive force on the lipid dispersion, effectively breaking aggregates into discrete molecules and promoting a more homogeneous reassembly into liposomes.

However, the interaction between agitation speed and pressure revealed a more complex behavior. Under the low-pressure condition, increasing the agitation speed reduced liposome size, but had a negligible impact on the PdI, which remained consistently high (~ 0.40) (Figure 55A). In contrast, under the high-pressure condition, a size smaller than 200 nm and a PdI around 0.30 were achieved only at the lowest agitation speed. Increasing agitation under this condition detrimentally increased both size and PdI (Figure 55B).

For all volumes investigated, the 45° pitched impeller blades were fully submerged in the lipid dispersion. At low pressure (80°C, 120 bar), the lighter SC-CO₂ (296 kg/m³) formed a distinct layer above the denser aqueous phase (977 kg/m³) (Figure 56A) [348]. In this unbaffled reactor, agitation induces a central vortex that can facilitate the mass transfer of the lighter phase as small bubbles into the denser phase [349]. This process becomes significantly more efficient when the vortex is deep enough to reach the impeller (vortex ingestion), ensuring that the energy dissipated by the blades is mostly used to disperse the lighter phase [350]. Consequently, in this study, increasing the agitation speed at low pressure deepened the vortex, which likely promoted the formation of SC-CO₂ bubbles in the aqueous phase and enhanced the turbulent dissipation rate responsible for bubble breakage, thereby improving CO₂ intercalation into the lipids [351].

PARTIE EXPÉRIMENTALE

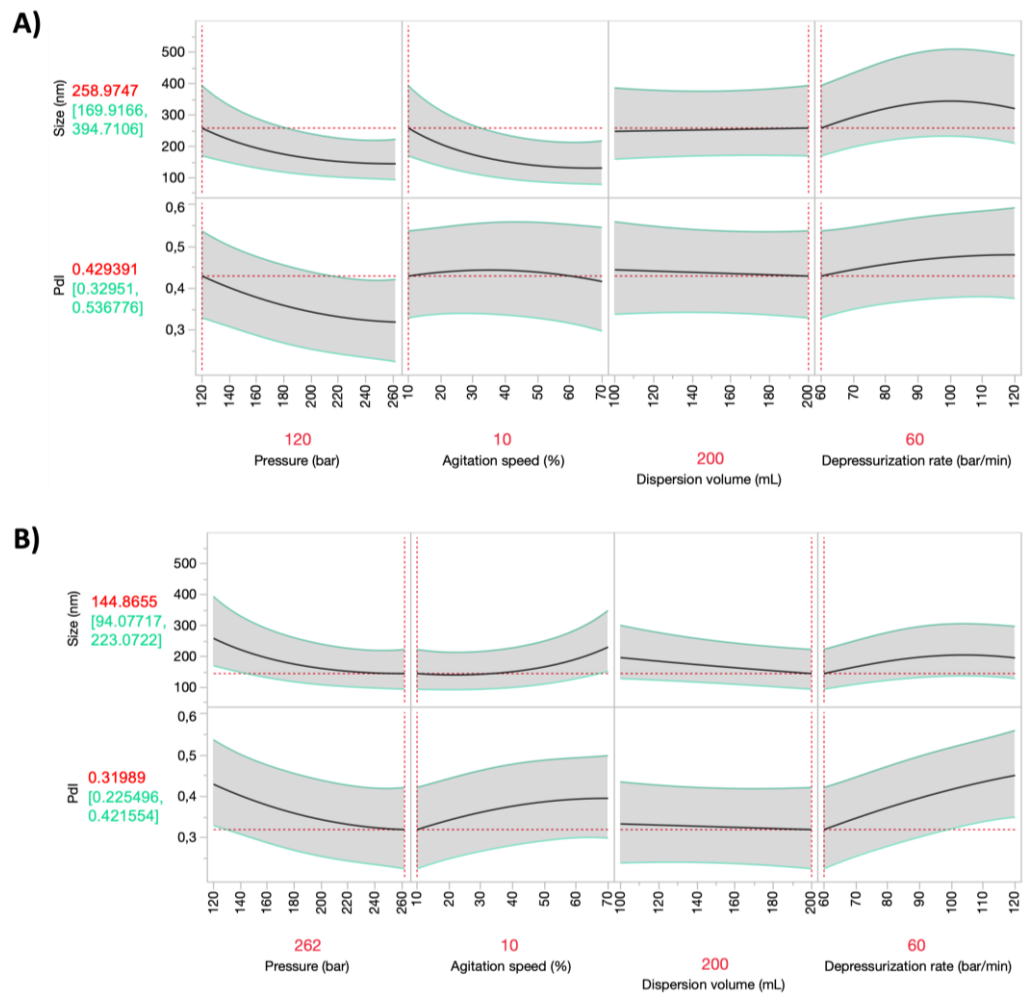


Figure 55 : DoE prediction profilers at (A) low (120 bar) and (B) high (262 bar) pressure conditions: Illustration of the effects of process parameters on the size and PdI of liposomes produced by the PGSS method at pilot scale. Fixed parameters include the lipid concentration at 5 mM, the temperature at 80 °C, and the contact time of 30 min. The grey shaded areas represent the prediction intervals of the model. Predicted values for each response and the corresponding prediction intervals are displayed on the left of each panel.

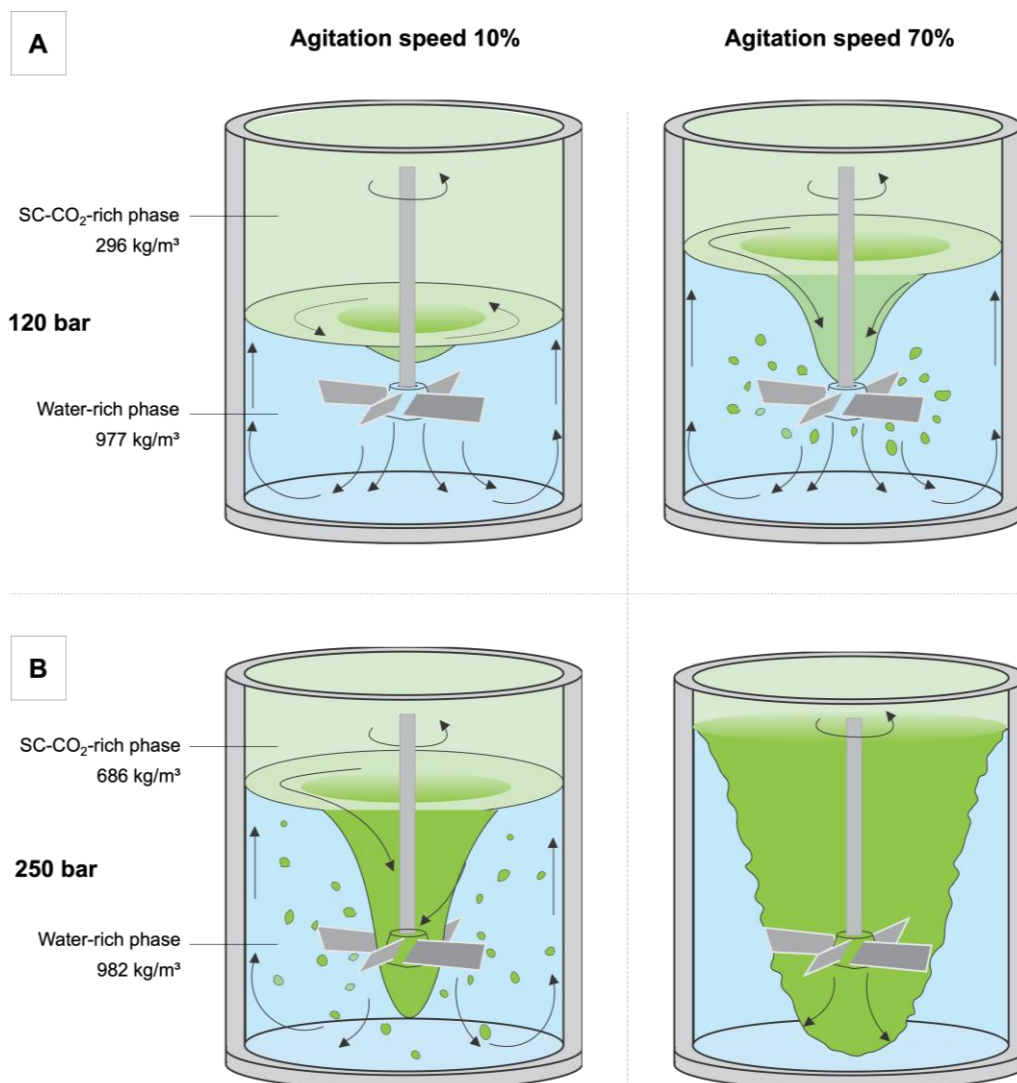


Figure 56 : Schematic illustration of hypothetical effects of different agitation speeds, focused on the reactor bottom, under (A) low pressure and (B) high pressure conditions.

However, under high-pressure conditions, the density of the water remained stable at 982 kg/m³ while the density of the SC-CO₂ density increased considerably to 686 kg/m³ [348]. It has been established that increasing the density of the lighter fluid in a two immiscible fluids system enhanced the vortex effect due to a reduced density difference [349]. Therefore, we speculate that under high-pressure, vortex ingestion was more easily achieved even at a low agitation speed of 10%, resulting in a high concentration of SC-CO₂ bubbles in the aqueous phase (Figure 56B).

However, when the agitation speed was increased further, the SC-CO₂ was likely swept down so aggressively by the axial flow that the impeller became 'flooded', meaning the blades rotated primarily within a cavity of SC-CO₂ rather than interacting with the bulk aqueous phase. This phenomenon reduced the efficacy of transporting SC-CO₂ to the lipid dispersion, possibly explaining why increasing the agitation speed at high pressure markedly increased the size and PdI of the liposomes. This hydrodynamic hypothesis should be clarified via further experiments.

II.3.2.3.2.3. Effect of the lipid dispersion volume

In the high-pressure condition, the volume of the lipid dispersion only had a minor influence on the size of the liposomes. Increasing the volume from 100 to 200 mL reduced the predicted size from ~200 nm to ~150 nm (Figure 55B). We propose 2 approaches to explain this result.

As mentioned above, the lipids dispersed by the SC-CO₂ can act as surfactants, stabilizing the interface to form emulsions between the water and the SC-CO₂ [343]. When the volume of the lipid dispersion is increased, the mechanical dissipation energy becomes more evenly distributed throughout the volume. This uniform distribution may facilitate the formation of smaller, more stable emulsion droplets than in the highly disturbed, chaotic environment of a lower volume. These stabilized droplets likely serve as templates for smaller vesicles during the depressurization phase.

In a fixed volume reactor at the same pressure, increasing the volume of the aqueous phase reduces the available headspace volume occupied by the SC-CO₂ phase not dispersed in the aqueous phase. The reduction in that SC-CO₂ fraction likely diminished the severity of the cooling effect exerted on the aqueous phase during depressurization. By attenuating the intensity of this thermal shock, the rapid, uncontrolled lipid precipitation that typically leads to the formation of large vesicles was minimized.

Altogether, this volume-dependent variation should be considered a potential tool for size tuning rather than a detrimental effect, particularly since the PdI remained consistently close to 0.30 in the high pressure condition.

II.3.2.3.3. Validation of the optimal condition

The results obtained from the DoE enabled us to determine the optimal conditions for producing liposomes at a pilot scale using the PGSS method (Table 10). High pressure and low agitation speed were chosen to efficiently mix the lipid dispersion with SC-CO₂. The dispersion is then depressurized at a low rate to ensure the size homogeneity. As the dispersion volume did not greatly affect the liposome properties, we decided to continue in this initial investigation with the volume of 100 mL to minimize costs. Additionally, since the results indicated that decreasing ΔP reduces the PdI, we were interested in testing another condition with a ΔP of 30 bar/min while fixing the other parameters (additional condition).

Table 10 : Optimal condition for the PGSS method at pilot scale, derived from the DoE, and additional condition for a more complete investigation of ΔP (* are fixed parameters).

	Optimal condition	Additional condition
Lipid concentration (mM)*	5	5
Dispersion volume (mL)	100	100
Pressure (bar)	262	262
Temperature (°C)*	80	80
Agitation speed (%)	10%	10%
Contact time (min)*	30	30
Depressurization rate (bar/min)	60	30

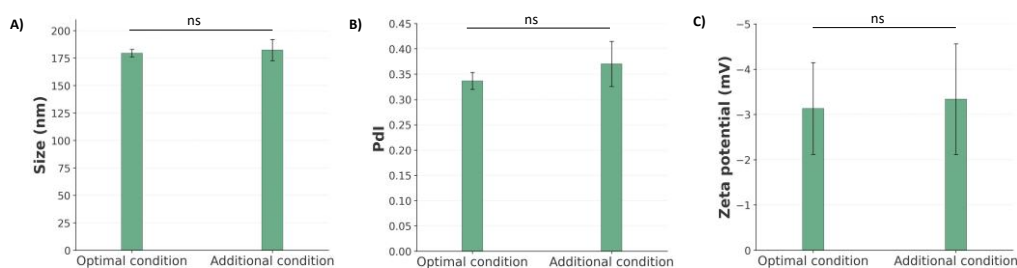


Figure 57 : (A) Size, (B) PdI and (C) ZP of the SPC formulation produced under optimal and additional conditions ($n = 3$).

The SPC formulation produced under the optimal condition has an average size of 180 ± 4 nm (less than 200 nm), a PdI of 0.34 ± 0.02 , which is close to 0.30, and ZP of -3.1 ± 1.0 mV (Figure 57). Reducing the ΔP to 30 bar/min under the additional condition yielded similar results for all

three characteristics. Therefore, we selected the optimal conditions for evaluating the two drug-containing formulations.

II.3.2.3.4. Transfer of the optimal conditions to the production of drug-containing formulations

The optimal conditions were then applied to produce liposomes containing phospholipids other than SPC and encapsulating an active ingredient. Two formulations developed in the laboratory were used: one co-encapsulating both Ind and Cic, based on DLPC and suitable for pulmonary administration [335]; and the other encapsulating Dexa, based on DSPC and designed for transtympanic administration [336]. The physicochemical properties were compared with those of liposomes produced by the PGSS method at laboratory scale under the condition described in the section II.3.2.2.2.1 (page 226).

II.3.2.3.4.1. Evaluation of physicochemical properties

When transitioning from the lab to the pilot scale, the mean particle sizes of the DLPC and DSPC formulations increased from 113 ± 3 nm to 152 ± 8 nm and from 152 ± 10 nm to 186 ± 8 nm, respectively (Figure 58A). The PdI of the DLPC formulation rose from 0.26 ± 0.02 to 0.36 ± 0.02 , while that of the DSPC formulation increased from 0.31 ± 0.01 to 0.39 ± 0.01 (Figure 58B). Despite this upward trend, the sizes of both formulations remained below the 200 nm threshold with their PdI remaining close to the target value of 0.30. A size less than 200 nm was important so that the liposomes could penetrate the pores of the mucus meshwork upon pulmonary administration (DLPC formulation) and cross the round window membrane after the transtympanic injection (DSPC formulation) [352,353]. A PdI below 0.30 is generally considered as an indicator of a uniform size distribution [354].

Notably, the DLPC formulation exhibited high EE of Cic and Ind across both scales (>90%) (Figure 58D). Meanwhile, the DSPC formulation produced at the pilot scale showed a significant improvement in Dexa EE, reaching $30.7 \pm 1.4\%$ compared to $23.9 \pm 1.0\%$ at the lab scale. These results demonstrate that the process is robust under these conditions, as the optimised pilot-scale conditions successfully produced liposomes of the expected size and PdI with efficient drug encapsulation, despite the different lipid compositions.

However, a reduction in the PdI of the pilot scale liposomes is still desirable. While both the FDA and the EMA classify particle size distribution as a CQA in their guidelines for liposomal medicines, they do not specify an acceptance criterion for the PdI. This is because a complex assessment is required to evaluate the toxicity risks associated with the size distribution of particles in healthy tissues. This assessment depends on factors such as the route of administration, the drug properties, and the liposome composition [355]. Generally, a PdI below 0.30 indicates a uniform size distribution, while values greater than 0.50 suggest a broader distribution [354,356]. In this study, the PdI values for the pilot scale DLPC and DSPC formulations fell between 0.30 and 0.40, indicating a moderately uniform distribution that could be improved upon to reach the target value of 0.30. One potential approach to reduce PdI is to increase the lipid concentration, as Zhao *et al.* previously reported that high phospholipid concentrations favor better particle uniformity at high temperatures [333]. This strategy is well aligned with the development of the PGSS method for the industrial scale, given that the total lipid concentration in commercially available liposomal products typically ranges from 5 to 25 mM [357]. Furthermore, another approach to improve size uniformity is modifying the depressurization protocol itself. As previously demonstrated by Zhao and Temelli, maintaining a constant pressure inside the vessel by continuously pumping supercritical CO₂ while the liposome suspension is being discharged can significantly reduce the PdI [327]. This constant-pressure protocol ensures that the concentration of unhydrated CO₂ inserted within the phospholipid bilayers remains stable throughout the entire depressurization stage. Consequently, every portion of the liquid phase experiences the same consistent dispersion force, preventing the formation of heterogeneous vesicles that commonly occurs when the pressure is allowed to drop gradually inside the vessel.

As such, another optimization process combines results obtained from the DoE of this study and the aforementioned strategies would be of great interest. In this fine-tuning step, an elevated pressure, a low agitation speed, and a low ΔP could be selected as the cornerstones to achieve a PdI close to 0.30, while the addition of new parameters, such as lipid and the pumping rate of CO₂ during depressurization, could be introduced to reduce the PdI to less than 0.30. Similar sequential DoE approaches were successfully applied to finely tune the parameters of microfluidic technology to produce liposomes with a PdI of less than 0.30, therefore constituting a promising approach for the PGSS method [358,359]. Finally, if necessary, a downstream size homogenization step (e.g., extrusion or high-pressure homogenization) could be implemented after PGSS production to achieve the desired polydispersity.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

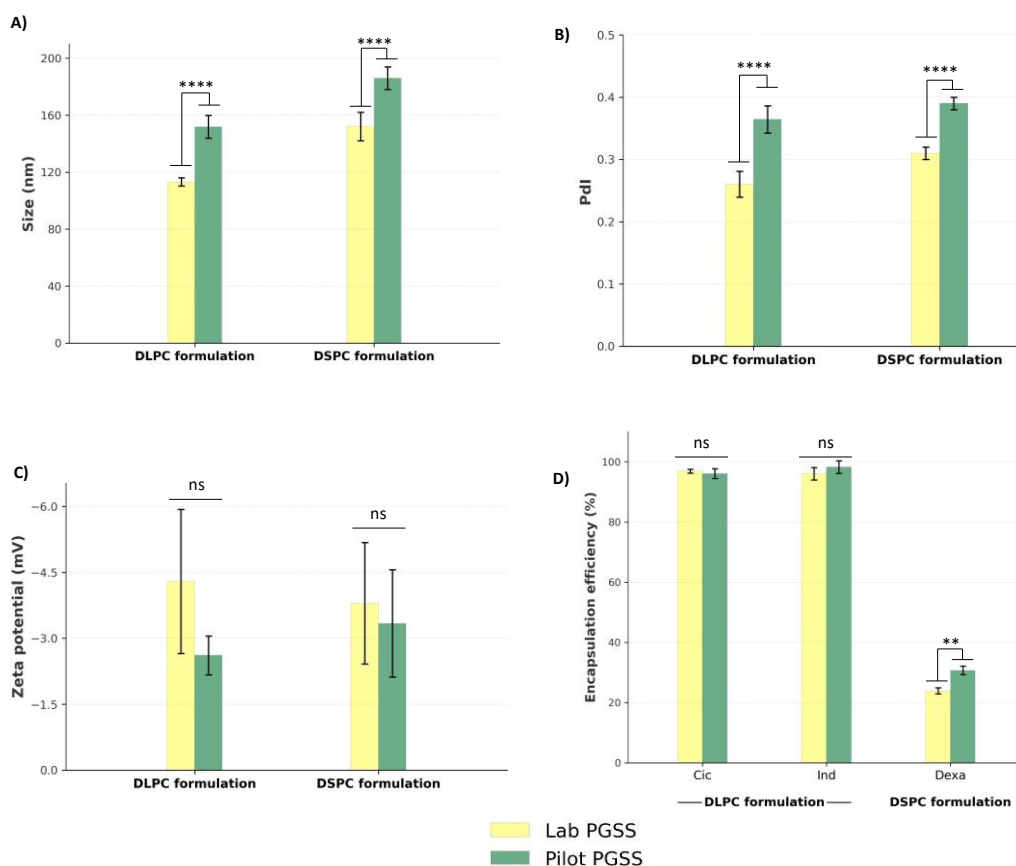
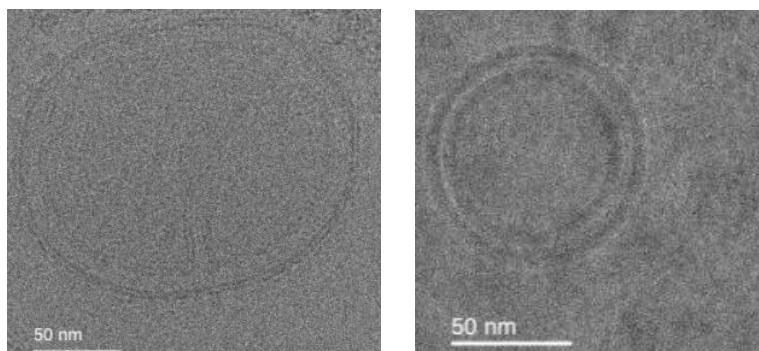


Figure 58: (A) Size, (B) PDI, (C) ZP, and (D) EE of drugs for DLPC and DSPC formulations produced by the PGSS process at the lab and pilot scales ($n=3$).

II.3.2.3.4.2. Morphology of drug-containing liposomes produced by the PGSS method at pilot scale

The DLPC formulation yielded spherical to oval-shaped vesicles with double bilayers (Figure 59A). This morphology increases the volume of the hydrophobic bilayer domain, providing greater capacity for the encapsulation of hydrophobic drugs such as Cic ($\log P = 4.08$) and Ind ($\log P = 2.33$) [360,361]. Therefore, this structural advantage likely accounts for the high EE observed in this formulation.

A)



B)

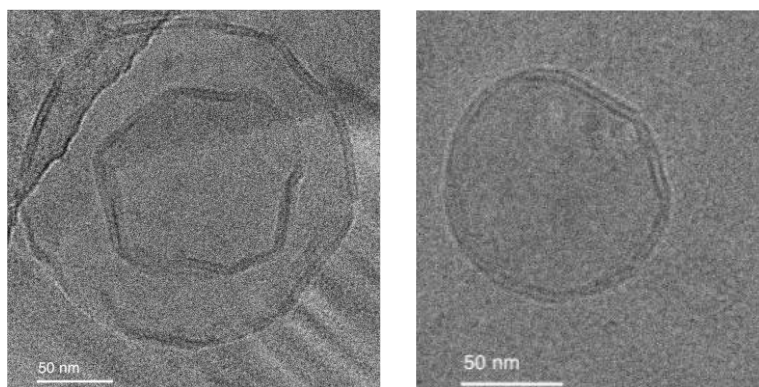


Figure 59: Cryo-TEM images of (A) DLPC and (B) DSPC formulations produced by the PGSS process at the pilot scale.

In contrast, the DSPC liposomes displayed a quasi-spherical but distinctly angular morphology and occasionally exhibited oligolamellar structures (vesicle-in-vesicle) (Figure 59B). This angularity can be attributed to the saturated nature of the main lipid, DSPC (18:0), which leads to the formation of a rigid bilayer that resists smooth curvature. Drabik *et al.* explained that, in the solid phase of the lipid bilayer, shear elasticity drives the formation of rigid, flat patches that meet at sharp angles, resulting in 'oddly rectangular' or faceted vesicles rather than smooth spheres [362]. Conversely, the smooth, spherical morphology of the DLPC liposomes is consistent with the high fluidity of lipid bilayers composed of unsaturated DLPC (18:2). Taken together, these results demonstrate that the pilot scale PGSS process successfully produces liposomes of varying compositions, yielding morphologies that are consistent with previous observations in the literature.

II.3.2.3.4.3. Impact of the PGSS process on the phospholipid stability

Evaluation of phospholipid hydrolysis

Phospholipids are inherently susceptible to hydrolysis when exposed to moisture, heat, or light, which cleaves the ester bonds to produce LPC, glycerophosphocholine, and free fatty acids. As the PGSS process involves high temperatures and pressures, combined with SC-CO₂ dissolution, which lowers the pH of the aqueous phase, it is crucial to evaluate the potential for phospholipids hydrolysis. Consequently, monitoring intermediate products like LPC serves as a critical control to quantify this degradation.

The main phospholipid, cholesterol, and DSPE-PEG were shown not to interfere with the peak of the LPC hydrolysis product during the HPTLC analysis (data not shown). The DSPC formulation showed no detectable peaks for 18:0 LPC before or after production, indicating that the degree of hydrolysis was less than 1.86% (corresponding to the minimum concentration of the calibration curve) (Figure 60B). In the DLPC formulation, although the peak density of 18:2 LPC increased significantly post-production compared to pre-production (t-test, $p < 0.05$), however, its level remained significantly below the lowest point of the calibration curve (t-test, $p < 0.05$), corresponding to only 2.9% (w/w) relative to DLPC (Figure 60A, C). Overall, the results are reassuring regarding the risk of hydrolysis but do not guarantee its complete absence. As such, it remains important to characterize other possible hydrolysis products such as fatty acids and glycerophosphocholine, as well as all lipid components in these liposomes, using an HPLC-based method to fully assess their chemical stability.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

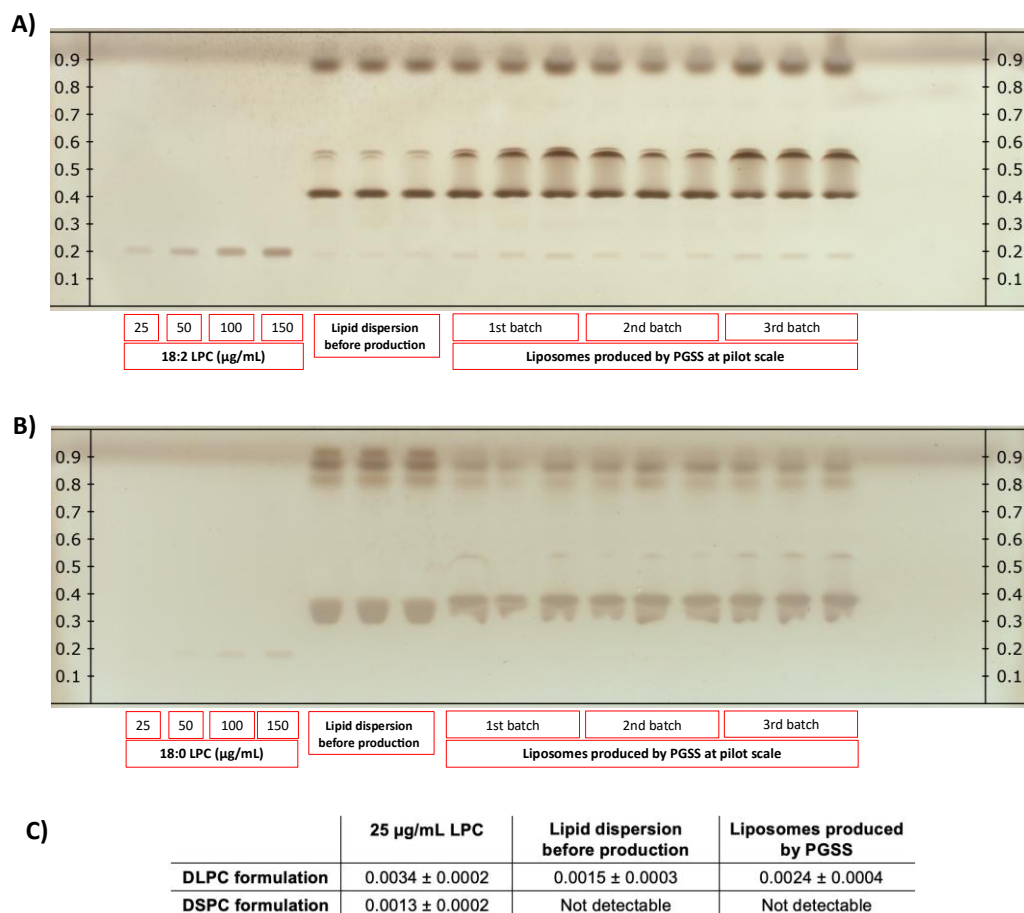


Figure 60: Images of the HPTLC plates for the hydrolysis evaluation of (A) DLPC and (B) DSPC formulations. (C) Optical intensity (AU) of LPC peak at 25 µg/mL and in DLPC and DSPC formulations before and after the production by the PGSS process at the pilot scale.

Evaluation of phospholipid oxidation

Because of its high degree of unsaturation, DLPC is particularly susceptible to oxidative degradation, which may be promoted under high-temperature processing conditions such as those used in PGSS. However, the percentage of peroxidized lipids in the DLPC formulation increased by only 0.004 ± 0.002 % after the production by the PGSS method at pilot scale. In addition, the DSPC formulation showed no oxidation results, which is consistent with the saturated state of DSPC. These results confirm that the PGSS method acts as a suitable platform for producing formulations containing oxidation-sensitive ingredients such as DLPC.

Overall, the DoE-derived conditions for the pilot-scale PGSS process allowed us to produce two drug-loaded liposomal formulations with sizes below 200 nm, PdI approaching 0.30, and EE comparable to that of lab-scale liposomes. Notably, despite the elevated pressure and temperature conditions, the process had a negligible impact on lipid hydrolysis and oxidation. Beyond the physicochemical quality of the produced liposomes, the successful pilot-scale implementation of the PGSS method presents significant advantages for industrial translation. From an economic and practical perspective, although supercritical fluid technologies are traditionally thought to require specialized high-pressure equipment with higher initial capital expenditures compared to conventional low-pressure batch reactors, this initial investment is effectively offset by significantly lower operating expenses [363,364]. A major factor driving this cost-efficiency is that the production of liposomes by the PGSS process can be conducted without the use of any organic solvent. In widely adopted industrial-scale liposome production techniques, such as ethanol injection and microfluidics, the fundamental reliance on organic solvents introduces several severe drawbacks. These include high material costs for solvent consumption, flammability and explosion hazards, acute and chronic health risks to personnel, and prolonged downstream purification steps [365,366]. Furthermore, operating with solvents necessitates costly and rigorous analytical quality control to monitor residual solvent limits in the final product, and poses a significant negative environmental impact due to the carbon-intensive incineration of complex aqueous-organic waste streams [367,368]. In contrast, the PGSS method utilizes SC-CO₂ as a dispersing agent which is inexpensive, non-toxic, non-flammable, and simply reverts to a gaseous state upon depressurization. In light of this, demonstrating the feasibility of the PGSS method for large-scale liposome production paves the way to effectively resolve the economic, environmental, and safety hurdles related to organic solvent-based methods. To advance this technology closer toward full-scale industrial application, future priorities will include further fine-tuning the process parameters to reduce the PdI, increasing the final lipid concentration of the suspensions, and integrating a closed-loop CO₂ recycling unit to maximize cost-efficiency and environmental sustainability.

II.3.2.4. Conclusion

In conclusion, the PGSS process was successfully transferred to a larger, pilot scale production, demonstrating its scalability and strong potential for industrial implementation. By applying a QbD approach supported by a structured DoE on a simplified liposome formulation, critical process parameters were systematically investigated and optimal operating conditions were defined.

These conditions ensured good reproducibility and enabled the consistent production of liposomes exhibiting CQAs within the targeted specifications.

The robustness of the process was further confirmed by successfully translating these operating conditions to more complex formulations containing APIs, while maintaining high EE. This highlights the versatility of the PGSS process and its suitability to produce functional liposomal systems. In addition, chemical stability studies demonstrated that the process does not significantly impact lipid integrity, with both hydrolysis and oxidation levels remaining minimal after processing, even under high-temperature conditions typically associated with this process.

Despite these promising results, further optimization is still required to improve size distribution, particularly to reduce the PdI, which remains a key parameter for pharmaceutical applications. Moreover, the evaluation of higher lipid concentrations will be essential to better reflect industrial constraints and to assess the process performance under more concentrated and scalable conditions. These improvements are expected to enable this technology to produce liposome batches that comply with GMP standards, with a view to their application in Phase I or I/IIa clinical trials. Overall, these findings support the relevance of the PGSS process as a solvent-free, single-step, robust and scalable technology for liposomes and lipid-based system manufacturing.

CRediT authorship contribution statement

Tuan Nghia Dinh: Investigation, Methodology, Data curation, Conceptualization, Writing – original draft, Writing – review & editing. Chloé Gauthy: Investigation, Methodology, Data curation, Conceptualization, Writing – original draft, Writing – review & editing. Hugo Magdalena Segura: Investigation, Methodology, Data curation. Pierre-Yves Sacré: Methodology, Software, Writing – review & editing. Erika Hendrickx: Data curation. Louise Conrard: Data curation. Brigitte Evrard: Funding acquisition, Supervision. Brigitte Malgrange: Funding acquisition, Supervision. Géraldine Piel: Funding acquisition, Conceptualization, Supervision, Writing – review & editing. Noémie Penoy: Investigation, Methodology, Data curation, Conceptualization, Supervision, Writing – original draft, Writing – review & editing.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

This research was funded by the Walloon Region, SPW-EER, DGO6 – Win2Wal – LNPulmo convention n°2210043 and NANOPDELEAR convention n°2210045, and supported by the 2025 Sectoral Research Credits in Health Sciences (University of Liège). Center for Microscopy and Molecular Imaging (CMMI) is supported by ERDF funding and the Walloon Region. Authors want to thank Aquilon Pharma and Dendrogenix (Liège, Belgium). Authors want to thank Professor Michel Frédérich and Delphine Etienne for their help in the high-performance thin-layer chromatography analysis. Authors also want to thank Professor Dominique Toye and Doctor Sebastien Calvo (Product Environment and Processes, Department of Chemical Engineering, University of Liège) for their help in interpreting the data.

DISCUSSION

Discussion générale

Les traitements actuellement disponibles en pratique clinique pour les surdités neurosensorielles induites par un traumatisme sonore se limitent à une prise en charge précoce par l'administration de corticostéroïdes. Leur efficacité demeure toutefois variable. Dans ce contexte, de nombreuses études se sont intéressées au développement de nouvelles formulations thérapeutiques pour le traitement de cette surdité. Parmi les stratégies explorées, l'administration par voie TT vise à acheminer directement les principes actifs, tels que la dexaméthasone, vers la cochlée tout en limitant les effets indésirables associés à une administration systémique. Cette voie présente néanmoins plusieurs limites, notamment la clairance rapide de la formulation injectée via la trompe d'Eustache et la nécessité de franchir la RWM avant d'atteindre les cellules ciliées cochléaires.

Les liposomes constituent une stratégie prometteuse pour faciliter le passage des principes actifs à travers la RWM. Leur utilisation nécessite toutefois de satisfaire à un ensemble de CQA afin de répondre aux contraintes spécifiques de l'administration TT. Par ailleurs, leur dispersion dans un hydrogel thermosensible permettrait de prolonger le temps de résidence de la formulation dans l'oreille moyenne, de limiter sa clairance et d'assurer une libération prolongée du principe actif, réduisant ainsi la fréquence des administrations. Enfin, la transposition de la production de cette formulation à l'échelle industrielle constitue également un enjeu majeur.

L'objectif général de cette thèse est donc de développer, caractériser et mettre à l'échelle un système associant des liposomes encapsulant des principes actifs à noyau stéroïdien à un hydrogel thermosensible destiné à une administration TT pour le traitement des surdités neurosensorielles induites par un traumatisme sonore. Pour atteindre cet objectif, les caractéristiques physico-chimiques des liposomes, les propriétés thermosensibles de l'hydrogel de P407, ainsi que le potentiel de cette formulation à permettre le passage du principe actif à travers un modèle *in vitro* de RWM jusqu'aux cellules ciliées cochléaires ont été étudiés. Le potentiel otoprotecteur de la formulation a également été évalué sur des explants cochléaires murins placés en conditions excitotoxiques. Ce dernier volet du projet ne sera toutefois pas abordé dans la présente discussion générale, dans la mesure où il a été conduit par un chercheur d'un laboratoire partenaire (GIGA-Neurosciences).

Les résultats obtenus apportent des éléments de réponse aux objectifs fixés, tout en soulevant plusieurs questions transversales qui dépassent le cadre de chaque étude individuelle. Ces

questions, progressivement discutées dans ce chapitre, visent à mettre les différents travaux en perspective, à en identifier les limites et à envisager les pistes de développement futures.

I. La formulation combinée hydrogel-liposomes-dexaméthasone répond-elle aux critères de qualité requis pour une administration transtympanique ?

Le développement d'une formulation destinée à une administration TT nécessite de satisfaire à un ensemble de CQA garantissant son efficacité, sa sécurité et sa compatibilité avec les contraintes de l'administration TT.

Du point de vue des liposomes, une taille inférieure à 200 nm, un PdI inférieur à 0,30 et une charge de surface neutre à légèrement positive étaient recherchés afin de favoriser la pénétration de la RWM et la reproductibilité des résultats [91,97,98]. Lorsque les liposomes sont produits par la méthode TFH suivie d'une extrusion, les critères de taille et de PdI sont systématiquement atteints. La méthode PGSS, qui ne nécessite pas d'étape d'extrusion, permet également d'obtenir, tant à petite qu'à grande échelle, des liposomes présentant une taille compatible avec cette application, malgré un PdI légèrement plus élevé mais restant acceptable. Par ailleurs, la composition lipidique retenue confère aux particules une charge de surface neutre, confirmée par les mesures de ZP.

L'EE constitue un autre paramètre déterminant, puisqu'elle conditionne la quantité de principe actif pouvant être administrée afin d'atteindre la concentration thérapeutique, tout en limitant l'exposition aux excipients et le volume injecté dans l'oreille moyenne, dont les dimensions sont restreintes [65,89]. Les résultats obtenus montrent que l'encapsulation est plus élevée pour une molécule sous sa forme hydrophobe que sous sa forme hydrophile, et que cette EE dépend également de la méthode de production. La méthode PGSS permet d'obtenir des liposomes présentant une EE de la dexaméthasone plus élevée que celle des liposomes produits par TFH, probablement en raison de la structure multilamellaire des liposomes obtenus, qui offre une surface de bicouche lipidique plus grande pour l'incorporation du principe actif [61,96]. En revanche, la méthode TFH qui génère des liposomes unilamellaires voit l'encapsulation de la dexaméthasone limitée par la surface membranaire réduite.

L'hydrogel thermosensible devait, quant à lui, répondre à plusieurs exigences fonctionnelles, notamment être facilement injectable à température ambiante et gélifier rapidement à température physiologique afin de limiter la clairance par la trompe d'Eustache, de réduire le

DISCUSSION

temps pendant lequel le patient doit rester en décubitus latéral et d'assurer une libération prolongée du principe actif [45,124,128]. Ces différents objectifs ont été atteints. La formulation reste liquide et facilement injectable à température ambiante, présente une température de transition sol-gel de 31,4°C pour une concentration de 16,25% de P407 et gélifie en moins de 8 minutes à 37°C. Cette température sol-gel apparaît particulièrement pertinente puisqu'elle est suffisamment élevée pour éviter une gélification prématurée lors de la manipulation ou en période estivale, tout en restant suffisamment basse pour assurer une gélification rapide après administration. De plus, la combinaison de l'hydrogel et des liposomes permet de prolonger la libération de la dexaméthasone pendant au moins 48h, ce qui pourrait contribuer à réduire la fréquence des injections.

Au-delà des caractéristiques physico-chimiques de la formulation, son potentiel biologique a également été démontré. Le modèle *in vitro* de RWM développé à partir des lignées cellulaires 16HBE14o- et HEI-OC1 a mis en évidence la capacité des liposomes à franchir cette barrière puis à être internalisés par les cellules ciliées cochléaires. Par ailleurs, l'effet otoprotecteur de la formulation hydrogel-liposomes contenant 40 ng/mL de dexaméthasone, correspondant à la concentration thérapeutique visée, a été démontré sur des explants cochléaires murins.

Enfin, la méthode de production constitue un élément essentiel dans le développement d'une future formulation pharmaceutique. À cet égard, la méthode PGSS sélectionnée présente plusieurs avantages majeurs. L'absence de solvants organiques réduit les coûts de production, simplifie les contraintes de stockage liées à leur caractère inflammable et diminue le risque de résidus potentiellement toxiques dans le produit fini. Cette approche s'inscrit également dans une démarche de chimie verte, plus durable, puisqu'elle utilise le CO₂, un gaz recyclable, comme fluide principal. En outre, le procédé permet de produire et de stériliser les liposomes en une étape, ce qui représente un avantage important pour le développement d'une forme injectable [68,89,112,121]. Enfin, la méthode PGSS offre également des perspectives d'industrialisation prometteuses, qui ont été démontrées dans ce travail via un transfert à l'échelle pilote, tout en conservant des caractéristiques physico-chimiques reproductibles.

Dans son ensemble, cette étude montre donc que la formulation développée satisfait la majorité des CQA définis pour une administration TT. Certaines limites persistent néanmoins, notamment en ce qui concerne la stabilité de l'EE de la dexaméthasone.

I.1. Quelles stratégies envisager pour limiter le relargage prématuré d'un principe actif encapsulé dans les liposomes ?

Malgré une EE satisfaisante, une partie de la dexaméthasone est rapidement relarguée des liposomes au cours du stockage à 4°C. Cette diminution de l'EE est observée aussi bien pour des liposomes constitués majoritairement de phospholipides saturés, tels que le DSPC, que pour des formulations contenant principalement des phospholipides insaturés, tels que ceux présents dans l'EPC. Elle survient également indépendamment de la méthode de production employée : TFH ou PGSS. Ce relargage prématuré constitue une limite importante, puisqu'il réduit la quantité de principe actif effectivement délivrée sous forme encapsulée et compromet ainsi l'intérêt des liposomes en tant que réservoirs de principes actifs.

La rétention de ces principes actifs dépend notamment de l'organisation, de la fluidité et de l'intégrité de la bicouche lipidique. Une membrane excessivement fluide peut favoriser la diffusion progressive de la molécule vers la phase aqueuse externe, tandis qu'une membrane trop rigide et présentant des défauts structuraux peut également générer des voies de fuite. Les variations de température ainsi que les contraintes mécaniques subies par les liposomes au cours de leur production, de leur manipulation ou de leur stockage sont susceptibles d'accentuer ces phénomènes [71,369]. La fuite des principes actifs pourrait être plus rapide s'ils sont localisés à proximité immédiate de la phase aqueuse externe. Ce serait notamment le cas des principes actifs lipophiles, tels que la dexaméthasone, ou amphiphiles, tels que la DX243, qui se répartissent vraisemblablement, au moins en partie, au sein de la bicouche lipidique, contrairement aux molécules hydrophiles, telles que la DSP, qui seraient encapsulées dans la cavité centrale du liposome [68].

Choix des phospholipides

La modification de la composition en phospholipides constitue un premier levier d'optimisation pour améliorer la stabilité de la formulation. De manière générale, une formulation composée majoritairement de phospholipides insaturés présente une bicouche relativement fluide, dont la perméabilité peut favoriser le relargage des molécules encapsulées [61,67,69]. Dans le cadre de cette thèse, une diminution de l'EE de la dexaméthasone a toutefois également été observée avec une formulation contenant 85% de DSPC, un phospholipide saturé caractérisé par une T_m élevée et formant des membranes relativement rigides [113]. Les images obtenues par cryo-TEM ont révélé la présence de bicouches lipidiques à l'aspect anguleux (Figure 59, page 244). Cette

DISCUSSION

morphologie traduit une résistance importante de la bicouche à la courbure, potentiellement due à une rigidité excessive, susceptible d'engendrer des défauts locaux d'organisation lipidique et de faciliter la fuite de la molécule encapsulée [370].

L'instabilité de l'EE a également été observée avec une formulation contenant 85% d'EPC, bien qu'il soit constitué d'un mélange de phospholipides majoritairement insaturés. La morphologie de ces liposomes n'a pas été étudiée par cryo-TEM. Elle devrait néanmoins ressembler à celle des liposomes constitués de DLPC, également porteurs de chaînes insaturées, pour lesquels une morphologie plus régulière et circulaire a été observée (Figure 59, page 244). Dans ce cas, le relargage du principe actif ne résulterait pas nécessairement de défauts membranaires visibles, mais pourrait être associé à une fluidité excessive de la bicouche, facilitant sa diffusion vers la phase externe [61,67,69]. Ces résultats suggèrent que ni une rigidité ni une fluidité élevées ne sont nécessairement favorables à la rétention du principe actif. Une composition de fluidité intermédiaire pourrait dès lors être recherchée. À titre d'exemple, une formulation associant 45% de DSPC et 40% d'EPC, au lieu de 85% d'un seul de ces constituants, permettrait d'évaluer si l'équilibre entre phospholipides saturés et insaturés améliore simultanément la courbure et la perméabilité de la bicouche.

Modulation de la teneur en Chol

Une seconde approche consiste à moduler la teneur en Chol dans la formulation des liposomes. Le lien entre la présence de ce lipide et la stabilité des particules pourrait s'expliquer par une éventuelle compétition entre le Chol et les principes actifs contenant un noyau stéroïdien qui sont localisés au sein de la bicouche lipidique, tels que la dexaméthasone. Ces molécules de structures semblables pourraient occuper des régions similaires de la membrane. Un effet de compétition entre le Chol et certains corticostéroïdes a d'ailleurs été rapporté dans la littérature [113,371–373]. L'augmentation de la proportion de Chol pourrait ainsi réduire l'espace disponible pour l'insertion du principe actif et entraîner une diminution de son EE. De plus, la fraction de ce principe actif qui est effectivement encapsulée en présence de Chol serait susceptible d'être évincée progressivement de la particule. En effet, le Chol et les corticostéroïdes présentent des comportements différents vis-à-vis de la phase aqueuse. La solubilité aqueuse du Chol est de l'ordre de 0,025 µg/mL, ce qui traduit son hydrophobicité ($\log P = 7,17$) très élevée et sa forte affinité pour la bicouche lipidique [113,374]. Parmi les corticostéroïdes, la dexaméthasone présente, quant à elle, une solubilité aqueuse de l'ordre de 89 µg/mL [189]. Bien qu'elle soit qualifiée de lipophile, elle possède donc une affinité relative plus importante pour la phase

DISCUSSION

aqueuse ($\log P = 1,83$) que le Chol [237]. En situation de compétition, elle serait par conséquent plus susceptible de quitter la bicouche et de se redistribuer dans le milieu extérieur.

Si le principe actif adopte un mode d'insertion comparable à celui du Chol dans la bicouche lipidique, il pourrait peut-être, au moins en partie, se substituer à ce dernier dans son rôle structural. Suivant cette hypothèse, il pourrait être intéressant d'évaluer des formulations dépourvues de Chol, afin de déterminer si un principe actif à noyau stéroïdien, tel que la dexaméthasone, est capable d'assurer lui-même une partie de la rigidification et donc de la stabilisation de la bicouche, tout en supprimant l'éventuel phénomène de compétition entre les deux molécules [375]. L'effet attendu pourrait toutefois être limité, puisque la formulation développée dans cette thèse ne contient déjà qu'une faible proportion de Chol, fixée à 10% afin de préserver l'encapsulation de la dexaméthasone.

Développement d'une forme sèche

Le développement d'une forme sèche des liposomes constitue une stratégie pertinente pour améliorer leur stabilité au cours du stockage à 4°C. Le passage d'une dispersion aqueuse à une poudre sèche réduirait la mobilité moléculaire et limiterait la diffusion progressive du principe actif hors de la particule. Il pourrait également ralentir certaines réactions de dégradation des phospholipides, notamment leur hydrolyse et leur oxydation. Une forme sèche pourrait ainsi favoriser le maintien de l'EE et des caractéristiques physico-chimiques des liposomes pendant une période prolongée, tout en facilitant leur conservation et leur transport [376–378]. Cette stratégie n'a pas pu être explorée dans le cadre de ce travail, mais elle constitue une perspective d'optimisation pertinente pour de futurs développements.

Diverses méthodes permettent de développer une forme sèche des liposomes, notamment la lyophilisation (*freeze drying*), le *spray drying* et le *spray-freeze drying*. La lyophilisation consiste à congeler la dispersion liposomale, puis à éliminer l'eau par sublimation sous vide, tandis que le *spray drying* repose sur l'atomisation de la dispersion en fines gouttelettes dans un flux d'air chaud, ce qui entraîne une évaporation rapide du solvant et la formation d'une poudre. Le *spray-freeze drying* combine ces deux approches : la dispersion est d'abord atomisée dans un milieu cryogénique afin de congeler instantanément les gouttelettes, puis l'eau est éliminée par lyophilisation. Parmi ces trois procédés, la lyophilisation est la méthode la plus largement utilisée pour la mise sous forme sèche des liposomes, en raison de sa capacité à préserver leur intégrité structurale et leurs propriétés physico-chimiques, à condition d'être associée à des agents protecteurs appropriés [376–378].

DISCUSSION

Lors du procédé de lyophilisation, les étapes de congélation, de sublimation et de déshydratation peuvent altérer l'organisation des bicouches, provoquer la fusion des vésicules et entraîner une fuite du principe actif, soit en cours de procédé, soit plus tard, lors de la reconstitution de la formulation [376]. L'ajout de cryo- et lyoprotecteurs dans cette formulation, tels que le saccharose ou le tréhalose, est donc généralement nécessaire afin de préserver l'intégrité des liposomes lors des phases de congélation et de séchage, respectivement (Figure 61) [377,379]. Ces sucres peuvent, après séchage, former une matrice vitreuse qui limite les mouvements, les collisions et la fusion des particules. Ils peuvent également établir des liaisons hydrogène avec les têtes polaires des phospholipides lorsque l'eau est éliminée, contribuant ainsi au maintien de l'organisation de la bicouche au cours de la déshydratation [378].

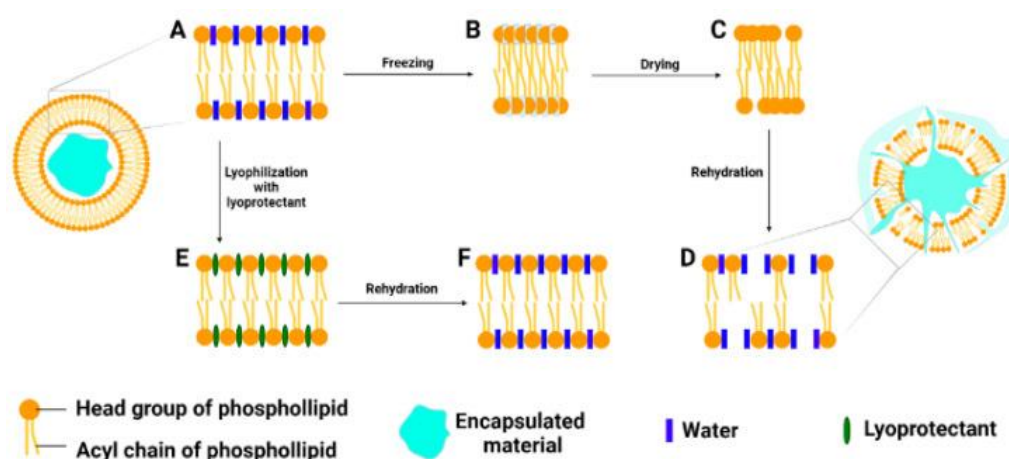


Figure 61 : Mécanisme de remplacement de l'eau par un agent lyoprotecteur lors de la lyophilisation et de la réhydratation des liposomes [377].

Plusieurs paramètres devront être étudiés, notamment la nature et la concentration du cryoprotecteur, la vitesse de congélation, ainsi que les températures et les durées des phases de séchage primaire et secondaire. Ces paramètres devront être corrélés avec la teneur résiduelle en eau et la stabilité de la forme sèche. Après reconstitution, la taille des liposomes, leur PdI, leur ZP, leur EE et leur profil de libération devront également être comparés à ceux de la formulation avant lyophilisation [376]. Suivant les résultats obtenus, la méthode devra être spécifiquement optimisée pour la composition lipidique et le principe actif choisis [379]. Cette étude représente donc un travail expérimental conséquent, nécessitant un certain temps de développement avant d'obtenir une formulation robuste et stable.

DISCUSSION

Ce procédé est applicable à de nombreux principes actifs, y compris ceux sensibles à la chaleur, à condition qu'ils présentent une bonne stabilité à l'état congelé, seuls ou en présence d'un cryoprotecteur, et qu'ils soient peu volatils afin d'être compatibles avec une mise sous vide pour les phases de séchage [379]. Cette méthode est donc envisageable pour les principes actifs étudiés dans ce travail, à savoir la dexaméthasone, la DSP et la DX2403, qui répondent à ces critères. Bien que la lyophilisation de liposomes encapsulant ces principes actifs soit peu documentée, plusieurs études ont montré des résultats prometteurs pour des nanoparticules d'origine lipidique contenant des corticostéroïdes [380,381].

Dans le système développé au cours de cette thèse, la lyophilisation pourrait être envisagée à deux niveaux. Une première approche consisterait à lyophiliser uniquement les liposomes, puis à les reconstituer et à les disperser dans la dispersion colloïdale de P407 peu avant l'administration. Cette stratégie permettrait d'optimiser séparément la stabilité des liposomes et les propriétés thermosensibles de l'hydrogel. Une seconde approche consisterait à lyophiliser directement la formulation combinée hydrogel-liposomes. Elle serait cependant plus complexe en raison de l'influence potentielle du P407 et des cryoprotecteurs sur la structure de la forme sèche, sa redispersibilité et ses propriétés après reconstitution. La présence de ces excipients pourrait notamment modifier la température de transition sol-gel, le temps de gélification, la viscosité et l'injectabilité de la formulation. La lyophilisation séparée des liposomes paraît donc, à ce stade, plus facile à maîtriser.

La lyophilisation apparaît ainsi comme une stratégie prometteuse pour limiter la fuite du principe actif lors du stockage. Elle ne résoudrait toutefois pas nécessairement le relargage prématuré pouvant survenir après la reconstitution ou l'administration. Elle devrait donc être envisagée comme une approche complémentaire à l'optimisation de la composition lipidique.

Utilisation d'une forme hydrophile du principe actif

Une stratégie supplémentaire peut être envisagée pour stabiliser les liposomes encapsulant des principes actifs lipophiles. En effet, si la rétention de ces molécules dans la bicouche lipidique demeure insuffisante malgré l'application des stratégies proposées précédemment, l'utilisation d'une autre forme du principe actif, plus hydrophile, peut être envisagée. Par exemple, la DSP, forme ionisée et prodrogue de la dexaméthasone, se répartit préférentiellement dans la cavité aqueuse des liposomes plutôt que dans leur bicouche lipidique [68]. Ce principe actif n'est donc pas soumis au même mécanisme de compétition avec le Chol que la dexaméthasone, ce qui stabilise son encapsulation et évite sa fuite vers la phase aqueuse externe. En revanche, si

DISCUSSION

certaines défauts membranaires, potentiellement associés à une forte proportion de phospholipides saturés, sont présents, ceux-ci peuvent toujours favoriser le relargage prématuré du principe actif contenu dans la cavité centrale [370]. Le remplacement de la dexaméthasone par sa forme DSP ne dispense donc pas d'optimiser la composition de la bicouche lipidique.

Dans l'ensemble, la limitation du relargage prématuré d'un principe actif nécessite vraisemblablement la combinaison de plusieurs stratégies. L'ajustement du rapport entre phospholipides saturés et insaturés, l'optimisation de la teneur en Chol, la stabilisation sous forme sèche et, éventuellement, la sélection d'une autre forme du principe actif constituent des pistes complémentaires. Leur pertinence devra être évaluée non seulement au regard des caractéristiques physico-chimiques des liposomes, mais également de la stabilité au stockage, de la libération après administration et de la capacité à franchir la RWM.

I.2. Une concentration thérapeutique de dexaméthasone peut-elle être atteinte avec un volume injectable compatible avec la voie transtympanique ?

Après administration par la voie TT, la formulation doit franchir plusieurs obstacles avant que la dexaméthasone n'atteigne les cellules ciliées cochléaires. Dans un premier temps, la formulation hydrogel-liposomes est injectée dans la cavité de l'oreille moyenne. Chez l'Homme, le volume de cette cavité est estimé à environ 1,4 mL [382,383]. Cette capacité justifie notamment les volumes de corticostéroïdes (0,3 – 1,0 mL) généralement injectés par voie TT, lesquels permettent de remplir une grande partie de la cavité [36,49,242]. Dans le cas de la formulation combinée développée au cours de cette thèse, le maintien du patient en décubitus latéral, associé à la gélification de la formulation, devrait favoriser son maintien au voisinage de la RWM et limiter temporairement son élimination par la trompe d'Eustache [45,124,128].

Après leur libération progressive hors de la matrice gélifiée, les liposomes chargés en dexaméthasone doivent atteindre la RWM, puis la franchir pour rejoindre le compartiment périlymphatique. L'estimation de la quantité de dexaméthasone susceptible d'atteindre ce compartiment repose sur deux études complémentaires : l'étude de libération à partir des formulations gélifiées, présentée dans la section III.2.2.3.4 (page 138), et l'étude de pénétration à travers le modèle *in vitro* de RWM, présentée dans la section III.3.2 (page 195).

La première étude a permis d'évaluer l'influence de l'hydrogel sur la libération de la dexaméthasone à partir des formulations H_Dexa et H_L1_Dexa contenant 16,25% de P407. La

DISCUSSION

formulation liposomale non gélifiée (L1_Dexa) n'a pas pu être étudiée dans ce dispositif, car la taille des liposomes était inférieure au diamètre des pores de l'insert. Leur passage direct aurait principalement entraîné un équilibrage entre les compartiments et n'aurait donc pas permis de caractériser de manière pertinente la libération du principe actif. À l'inverse, l'étude menée sur le modèle *in vitro* de RWM 16HBE14o- n'a pas permis d'évaluer directement les formulations gélifiées, puisqu'elles sont susceptibles d'altérer l'intégrité du modèle. Cette étude a donc principalement porté sur la formulation de liposomes encapsulant la dexaméthasone (L6s_Dexa). L'estimation du passage de la dexaméthasone depuis l'oreille moyenne jusqu'au compartiment périlymphatique doit, par conséquent, être réalisée en mettant en perspective les résultats de ces deux études distinctes.

L'étude de **libération** a montré qu'environ 35% de la dexaméthasone étaient libérés à partir de la formulation H_Dexa après 24h, contre environ **20% à partir de la formulation combinée H_L1_Dexa**. Le ralentissement observé pour cette dernière pourrait résulter de la diffusion progressive des liposomes hors de la matrice polymérique. Leur diffusion devrait en effet être plus lente que celle de la dexaméthasone libre en raison de leur taille plus importante et de leurs interactions potentielles avec les micelles de P407. Sur la base de ces résultats, environ 20% de la quantité de dexaméthasone initialement présente dans la formulation combinée serait disponible au voisinage de la RWM après 24h pour tenter de diffuser vers le compartiment périlymphatique, soit sous forme encore encapsulée dans les liposomes, soit sous forme déjà libérée. L'étude de **pénétration à travers le modèle *in vitro* de RWM** a, quant à elle, montré qu'après 24h, **60 à 80%** de la dexaméthasone déposée dans le compartiment donneur étaient retrouvés dans le compartiment mimant la périlymphe, selon qu'elle était administrée sous forme **encapsulée (L6s_Dexa) ou libre**, respectivement.

Ces résultats peuvent être utilisés pour établir une première estimation théorique de la quantité de principe actif susceptible d'atteindre le compartiment périlymphatique à partir d'un hydrogel dispersant des liposomes L6s_Dexa. Ces liposomes ont été produits par TFH à une concentration totale en lipides de 45 mM, puis extrudés successivement à travers des membranes de 400, 200 et 100 nm, pour présenter une taille finale de 122 ± 2 nm et une EE de $27,5 \pm 1,0$ %, équivalant à une concentration en dexaméthasone de 225 µg/mL. Comparativement aux EE obtenues pour les formulations L1 et L5 présentées dans le chapitre 3, cette valeur plus faible pourrait notamment résulter de l'extrusion finale à travers une membrane de 100 nm et de la présence de DOPE dans la formulation [236,384]. La formulation combinée hydrogel-liposomes contenant 225 µg/mL de dexaméthasone, dont on administrerait 0,5 mL par voie TT chez l'Homme

DISCUSSION

[36,49,242], contiendrait ainsi une dose totale de 112,5 µg. Si **20%** de cette dose (22,5 µg) diffusaient hors de l'hydrogel et devenaient disponibles au contact de la RWM après 24h, et qu'un **passage minimal de 60%** à travers la RWM après 24h se produisait, environ 13,5 µg atteindraient le compartiment périlymphatique. En considérant que le volume de la périlymphe humaine est d'environ 70 µL [385], cette quantité correspondrait théoriquement à une concentration moyenne de l'ordre de 193 µg/mL de dexaméthasone dans la périlymphe. Cette valeur est presque 5000 fois supérieure à la concentration thérapeutique attendue (40 ng/mL) [47,48]. Cette estimation indique qu'une diminution de la concentration initiale ou du volume administré pourrait être envisagée. Cette réduction permettrait de limiter l'exposition aux phospholipides et au P407, tout en conservant une quantité suffisante de principe actif.

Le raisonnement inverse impose l'injection par voie TT d'une solution à la concentration minimale de 47 ng/mL en dexaméthasone afin d'atteindre sa concentration thérapeutique de 40 ng/mL au niveau périlymphatique. Il reste toutefois difficile de définir une valeur d'EE minimale garantissant l'atteinte de cette concentration thérapeutique, puisque l'EE dépend de nombreux facteurs tels que la concentration en principe actif, les concentration et composition lipidiques, ainsi que la méthode de production (TFH ou PGSS) des liposomes [65,89,96]. Par conséquent, l'EE ne devrait pas être interprétée seule, mais conjointement avec la concentration en principe actif encapsulé, afin d'évaluer la quantité réellement administrée.

La principale limite de ce travail réside dans l'impossibilité d'évaluer correctement la cinétique globale du processus, celle-ci étant répartie entre deux dispositifs expérimentaux. En effet, la libération des liposomes hors de l'hydrogel, leur passage à travers la RWM, leur distribution cochléaire et leur élimination se produisent simultanément et de manière progressive. Cette double étude de libération et de pénétration ne permet donc pas de déterminer à quel moment la concentration biologiquement active serait atteinte, ni pendant combien de temps elle serait maintenue. Des essais complémentaires devraient être menées afin de caractériser l'ensemble de cette cinétique en une étape.

Comme énoncé précédemment, un système à deux compartiments (RWM 16HBE14o- / cellules HEI-OC1 ; Figure 37, page 175) a déjà été développé dans ce travail. Celui-ci ne permet toutefois pas d'évaluer la cinétique de libération de la dexaméthasone à partir d'une formulation gélifiée à cause de l'impact de l'hydrogel sur l'intégrité de l'épithélium lorsqu'ils sont en contact direct. Pour dépasser cette limite, le développement d'un nouveau dispositif *in vitro* à trois compartiments constituerait une approche pertinente et novatrice. En l'absence de tels systèmes sur le marché,

DISCUSSION

ceux-ci pourraient être fabriqués par impression 3D, une technique déjà fréquemment utilisée dans la littérature pour concevoir des dispositifs à deux ou trois compartiments [386,387]. Dans cette optique, un premier compartiment supérieur, sans cellules, contiendrait la formulation gélifiée, qui libérerait progressivement des liposomes encapsulant la dexaméthasone dans un deuxième compartiment central (Figure 62). Le modèle *in vitro* de RWM serait cultivé dans celui-ci afin de reproduire la cavité de l'oreille moyenne. Les liposomes capables de pénétrer cette membrane arriveront dans le troisième compartiment, qui mimerait la périlymphe entourant les cellules ciliées cochléaires. Un tel système permettrait d'éviter la contrainte mécanique exercée par l'hydrogel sur l'épithélium et de mesurer simultanément la libération de la formulation hors de l'hydrogel, son passage à travers la membrane et son accumulation dans le compartiment receveur final. Il serait ainsi possible de mieux estimer les concentrations périlymphatiques au fil du temps. À terme, ces résultats devraient être complétés par des études pharmacocinétiques *in vivo* mesurant directement les concentrations périlymphatiques.

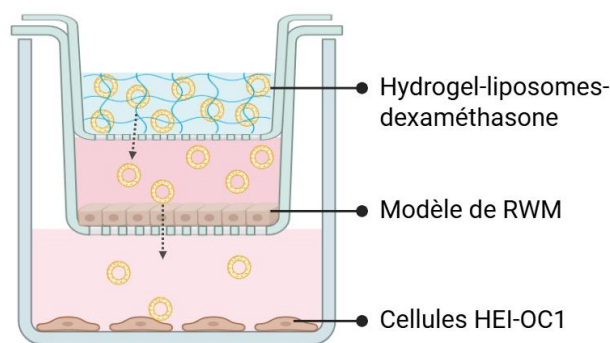


Figure 62 : Dispositif à trois compartiments permettant (de haut en bas) d'étudier la libération des liposomes à partir de l'hydrogel, leur pénétration à travers le modèle de RWM (cellules 16HBE14o-), et leur internalisation dans les cellules HEI-OC1, modélisant les cellules ciliées cochléaires. Ce dispositif peut être produit, en totalité ou en partie, par impression 3D. Figure réalisée avec BioRender.

Dans l'ensemble, les résultats indiquent que l'administration d'un volume de 0,5 mL, compatible avec la cavité de l'oreille moyenne, de la formulation combinée contenant 225 µg/mL de dexaméthasone devrait fournir une quantité de principe actif suffisante pour atteindre une concentration biologiquement active. Néanmoins, la concentration effectivement obtenue dans la périlymphe ne peut pas être déduite avec précision à partir des études menées dans cette thèse. De futurs développements pourraient donc être consacrés à la caractérisation intégrée de la cinétique de libération à partir de l'hydrogel et du passage ultérieur des liposomes encapsulant la dexaméthasone à travers la RWM, grâce à un dispositif en trois compartiments (Figure 62).

II. Quels sont les avantages et les limites des méthodes PGSS et TFH pour la production des liposomes ?

Les méthodes TFH et PGSS poursuivent un objectif commun, à savoir la production de liposomes présentant des caractéristiques compatibles avec une administration TT, la plus importante étant une taille de particule inférieure à 200 nm permettant de faciliter leur pénétration à travers la RWM [98]. Ce critère est également recherché dans de nombreuses autres applications nécessitant une délivrance contrôlée de principes actifs, telles que l'administration intraveineuse, afin de prolonger la circulation des liposomes et d'optimiser leur biodistribution, ou l'administration oculaire, pour favoriser la pénétration et la diffusion des particules au sein des tissus [97,388]. Les développements réalisés dans ce travail présentent donc un intérêt qui dépasse le seul cadre de l'administration TT et sont susceptibles de bénéficier à un large éventail d'applications.

Malgré leur objectif commun, les méthodes TFH et PGSS reposent toutefois sur des philosophies de fabrication très différentes. La méthode TFH est une méthode de référence, idéale pour la préparation de liposomes à l'échelle du laboratoire, puisqu'elle offre un contrôle précis de leurs caractéristiques physico-chimiques grâce à l'étape d'extrusion [65]. La méthode PGSS a été développée plus récemment dans une optique de simplification du procédé et de transposition industrielle, en limitant le nombre d'étapes de fabrication et le recours aux solvants organiques. Elle constitue ainsi une approche innovante répondant aux exigences croissantes de développement de procédés plus robustes, facilement industrialisables et plus respectueux de l'environnement. En revanche, les conditions de pression, de température et de détente rapide propres au PGSS peuvent modifier le processus d'autoassemblage des lipides et conduire à des caractéristiques physico-chimiques différentes de celles obtenues par TFH [68,89,112]. Les résultats obtenus dans cette thèse montrent que ces deux approches présentent chacune des avantages et des limites concernant les propriétés des liposomes produits, ainsi que leur facilité de mise en œuvre (Tableau 11).

DISCUSSION

Tableau 11 : Comparaison des avantages et limites des méthodes TFH et PGSS en termes de facilité de mise en œuvre et des propriétés des liposomes L5, produits à une concentration lipidique de 45 mM.

Liposomes L5 (45 mM lipides)	TFH	PGSS
Taille	161 ± 6 nm	145 ± 14 nm
PdI	0,10 ± 0,02	0,34 ± 0,01
EE	63,5 ± 0,9 %	69,9 ± 2,5 %
Lamellarité	SUV, LUV, OLV	MLV, MVV, SUV
Utilisation de solvants organiques	Oui	Non
Nombre d'opérations	Plusieurs étapes	Une étape
Stérilisation	Non	Oui
Industrialisable	Non	Oui

La méthode TFH, suivie d'une extrusion, permet d'obtenir des liposomes unilamellaires (SUV, LUV), de taille contrôlée et inférieure à 200 nm, ainsi que présentant une excellente homogénéité [65,384]. Cette maîtrise des caractéristiques physico-chimiques constitue un avantage majeur, en particulier pour ce travail, qui nécessite le passage à travers la RWM et donc la production de liposomes de petite taille. Cette qualité de particules s'obtient toutefois au prix d'un procédé relativement complexe. La production comprend plusieurs étapes successives qui allongent la durée de fabrication, avec notamment l'évaporation des solvants, l'hydratation du film lipidique, l'extrusion, la purification et la stérilisation. L'utilisation de solvants organiques impose par ailleurs des contraintes supplémentaires liées à leur coût, leur entreposage en tant que produits dangereux, leur manipulation, leur élimination, ainsi qu'au contrôle des résidus, potentiellement toxiques, dans le produit fini [68,112,113]. Bien que les liposomes produits par TFH présentent des caractéristiques physico-chimiques idéales, ce sont principalement ses limitations techniques qui ont mené au développement de la méthode PGSS, plus adaptée à la production de particules répondant aux exigences des applications dépassant le cadre du laboratoire et des études physico-chimiques.

DISCUSSION

Bien qu'ils répondent au critère de taille défini (< 200 nm), les liposomes produits par PGSS présentent toutefois une polydispersité plus importante que celle obtenue par TFH, en raison de l'absence d'étape de réduction de taille [122]. Ceci explique également qu'une population plus hétérogène, constituée majoritairement de MLV et MVV, et minoritairement de SUV, soit observée par cryo-TEM. Cette multilamellarité semble présenter plusieurs avantages, notamment une EE de la dexaméthasone légèrement supérieure à celle obtenue par la méthode TFH. Cette différence pourrait s'expliquer par l'absence d'étape d'extrusion dans le procédé PGSS, qui soumet les liposomes à d'importantes contraintes mécaniques susceptibles de favoriser une redistribution ou une perte partielle du principe actif au cours de la réduction de la taille [113,384]. La structure majoritairement multilamellaire de ces liposomes pourrait également contribuer à mieux retenir la dexaméthasone, celle-ci devant probablement traverser plusieurs bicouches lipidiques successives avant d'être libérée dans le milieu extérieur [113]. Cette multilamellarité est donc susceptible à la fois de générer un léger effet de libération prolongée à 37°C et de limiter modérément le relargage prématuré au cours du stockage des liposomes à 4°C.

Les principaux inconvénients de la méthode PGSS résident toutefois dans le contrôle limité de la taille des particules et dans leur polydispersité élevée. Ces caractéristiques sont susceptibles de limiter leur passage à travers la RWM. Le modèle *in vitro* développé dans cette thèse a démontré que des liposomes de taille supérieure à 150 nm (Tableau 6, page 179) présentaient un passage limité, voire nul, vers le compartiment correspondant à la périlymphe cochléaire (Figure 43, page 191). Contrairement à la méthode TFH qui comprend une étape d'extrusion sur des filtres de taille de pores choisie (ex. 100 ou 200 nm), cette étape n'est initialement pas prévue dans le procédé PGSS. Ajouter une extrusion sur un filtre de 100 nm en fin de protocole pourrait réduire la taille et la polydispersité des liposomes, ce qui améliorerait leur pénétration et la reproductibilité. Une telle stratégie supprimerait cependant une partie des bénéfices associés à la structure multilamellaire, notamment le léger effet de libération prolongée à 37°C et la rétention modérée de la dexaméthasone en conditions de stockage. Elle complexifierait également le procédé de fabrication en y ajoutant une étape supplémentaire, ce qui en allongerait la durée globale. Par ailleurs, l'un des principaux avantages du procédé PGSS réside dans la production directe de liposomes stériles. L'ajout d'une étape d'extrusion imposerait dès lors, soit de réaliser cette opération dans des conditions aseptiques validées, soit d'intégrer une filtration stérilisante en fin de procédé. Cette contrainte réduirait ainsi une partie de l'intérêt du PGSS en tant que procédé intégré de production et de stérilisation.

Aucune des deux méthodes ne permet donc de maximiser simultanément l'ensemble des caractéristiques recherchées. D'autres procédés de production pourraient être envisagés, tels que la méthode d'injection d'éthanol ou l'évaporation de solvant, déjà utilisées dans l'industrie pharmaceutique pour produire des liposomes destinés à diverses applications, notamment en oncologie (doxorubicine liposomale, Caelyx®) ou en infectiologie (amphotéricine B liposomale, AmBisome®) [61,63,115]. Ces méthodes présentent toutefois elles aussi certaines limites et ne permettent pas de répondre à l'ensemble des critères prédéfinis. Bien qu'elles permettent d'obtenir des liposomes présentant des caractéristiques acceptables, elles restent limitées en termes de facilité de mise en œuvre, en raison de l'utilisation de solvants organiques et de la nécessité de réaliser plusieurs étapes de production distinctes, notamment l'extrusion et la stérilisation. Le procédé PGSS apparaît donc toujours comme l'approche la plus prometteuse, mais nécessiterait davantage d'optimisations afin de satisfaire à l'ensemble des CQA requis pour des liposomes administrés par voie TT. Les premières optimisations réalisées sur les paramètres du procédé pourraient être approfondies par la réalisation d'expériences complémentaires. Par ailleurs, des adaptations de l'équipement pourraient également être envisagées, notamment une modification du diamètre de la buse d'expansion, un paramètre déterminant pour la taille des particules et, potentiellement, leur homogénéité [389].

III. Le système hydrogel-liposomes est-il transposable à d'autres principes actifs ?

III.1. Quels sont les aspects sensibles de la transposition du point de vue de la formulation des liposomes ?

Les liposomes développés dans cette thèse ont principalement été conçus pour encapsuler la dexaméthasone, un corticostéroïde lipophile fréquemment utilisé dans le traitement des surdités neurosensorielles induites par un traumatisme sonore. Les résultats obtenus soulèvent toutefois une question plus générale : dans quelle mesure cette formulation peut-elle être transposée à d'autres principes actifs aux propriétés physico-chimiques différentes ? La réponse dépend principalement du comportement de ce principe actif à l'égard de la bicouche lipidique et du compartiment aqueux des liposomes. Les stratégies de formulation optimales diffèrent selon que le principe actif est lipophile, hydrophile ou amphiphile, comme l'illustrent les trois molécules étudiées dans ce travail : la dexaméthasone, la DSP et la DX243, respectivement.

DISCUSSION

Dans le cas des molécules lipophiles, telles que la dexaméthasone, plusieurs points d'attention doivent être considérés. Comme expliqué précédemment (section II, page 265), les résultats obtenus au cours de cette thèse suggèrent que les liposomes produits par PGSS constituent une approche particulièrement intéressante pour ces molécules en raison de leur multilamellarité [113]. Cette structure ne suffit toutefois pas, à elle seule, à conférer aux liposomes un véritable effet de libération prolongée. Contrairement à ce que pourraient laisser supposer certaines études [390,391], les liposomes développés dans cette thèse n'ont pas permis de maintenir durablement la dexaméthasone au sein de la bicouche lipidique. L'association à un hydrogel thermosensible s'est révélée indispensable pour ralentir significativement la cinétique de libération de la formulation.

Cette limite pourrait être liée à la structure de la dexaméthasone et, plus largement, à celle des corticostéroïdes, tels que la prednisolone et la méthylprednisolone, également administrés par voie TT [29–31,38]. En effet, ces molécules lipophiles présentent un noyau stéroïdien, similaire à celui du Chol, entraînant une possible compétition au niveau de l'insertion au sein de la bicouche lipidique [113]. Un tel phénomène pourrait diminuer l'EE initiale et favoriser ensuite la redistribution du principe actif vers la phase aqueuse, contribuant ainsi à la diminution progressive de son EE au cours du stockage (4°C), ainsi qu'à l'accélération de sa libération en conditions physiologiques (37°C). Cette hypothèse pourrait également s'appliquer à toute autre molécule lipophile possédant un noyau stéroïdien et une forte affinité pour la bicouche lipidique. Les performances du système dépendent donc fortement de ses interactions avec les constituants de la membrane, en particulier le Chol.

À l'inverse, un principe actif hydrophile présente une plus forte affinité pour la phase aqueuse que pour la bicouche lipidique. Il devrait donc être principalement encapsulé dans le compartiment aqueux interne des liposomes [392]. Une telle localisation permettrait notamment d'éviter les interactions de compétition susceptibles d'exister entre la molécule et le Chol au sein de la membrane lipidique. En revanche, le principal facteur limitant pour l'encapsulation de molécules hydrophiles, réside dans le faible volume occupé par la phase aqueuse interne par rapport au volume total de la dispersion. Lors d'une encapsulation passive, seule une faible fraction du principe actif est ainsi encapsulée, la majeure partie demeurant dissoute dans la phase aqueuse externe avant purification [392]. Ce phénomène a été observé avec la DSP, dont l'EE n'a pas dépassé 12% dans les conditions développées au cours de cette thèse. Cette faible encapsulation ne résulte donc pas d'une faible affinité du principe actif pour les liposomes, mais principalement des limites intrinsèques du chargement passif des molécules hydrophiles.

DISCUSSION

Dès lors, la transposition de la formulation à ce type de molécules nécessitera une stratégie d'optimisation différente de celle développée pour la dexaméthasone. L'augmentation de la concentration lipidique, équilibrant le rapport entre les phases aqueuses interne et externe, ainsi que l'optimisation de la taille et de la structure des liposomes pourraient permettre d'améliorer l'EE. Le développement d'une méthode de chargement actif, fondée par exemple sur un gradient de pH ou de concentration ionique, constituerait également une piste particulièrement intéressante pour augmenter la quantité de principe actif encapsulée [61,392]. Par ailleurs, les structures fortement multilamellaires obtenues par PGSS ne constitueraient pas nécessairement la stratégie la plus adaptée. Si elles permettent probablement de mieux retenir les molécules insérées dans les bicouches lipidiques, leur intérêt semble moins évident pour des molécules préférentiellement localisées dans le compartiment aqueux, dont la taille est réduite par la présence de ces nombreuses bicouches. La méthode TFH suivie d'une étape d'extrusion permettrait de générer des liposomes unilamellaires, présentant donc un volume de phase aqueuse interne plus important par particule, ce qui permettrait probablement de mieux encapsuler la molécule hydrophile. Le choix de la méthode de production (TFH ou PGSS) devra donc être guidé non seulement par les propriétés (taille, lamellarité) recherchées pour les liposomes visant une administration TT, mais également par le mode d'encapsulation (bicouche lipidique ou cavité aqueuse) du principe actif.

Outre la DSP, d'autres molécules hydrophiles envisagées dans le traitement des surdités neurosensorielles induites par un traumatisme sonore pourraient bénéficier d'une telle stratégie, notamment la N-acétylcystéine ou l'ebssélène [44,92].

Les molécules amphiphiles constituent une catégorie intermédiaire particulièrement intéressante. En raison de leur double affinité pour les phases aqueuse et lipidique, elles sont susceptibles de s'insérer préférentiellement à l'interface entre la bicouche lipidique et le compartiment aqueux, qu'il soit interne ou externe à la particule. Cette double localisation au niveau des feuillettes interne et externe de la bicouche pourrait potentiellement augmenter le nombre de sites d'encapsulation disponibles par rapport à une molécule strictement hydrophile ou lipophile [393]. Les performances d'encapsulation dépendraient toutefois fortement de la structure des liposomes.

Contrairement aux molécules lipophiles, pour lesquelles la multilamellarité semble présenter un intérêt, son influence sur les molécules amphiphiles s'avère plus difficile à prédire. Une augmentation du nombre de bicouches pourrait accroître le nombre de sites d'insertion disponibles, mais réduirait simultanément le volume des compartiments aqueux séparant ces

DISCUSSION

bicouches. Un compromis pourrait ainsi être recherché en développant des liposomes oligolamellaires (OLV), susceptibles d'offrir à la fois plusieurs interfaces lipide-eau et un volume aqueux suffisant pour accueillir la partie hydrophile de la molécule. En suivant ce raisonnement, une extrusion modérée de liposomes produits par PGSS, réalisée avec un nombre limité de passages à travers des membranes de 200 à 400 nm, pourrait potentiellement permettre de réduire leur lamellarité tout en conservant plusieurs bicouches.

Dans le cas d'une molécule amphiphile telle que la DX243, cette stratégie devra toutefois être interprétée avec prudence. La présence d'un noyau stéroïdien laisse supposer que des phénomènes de compétition avec le Chol pourraient également intervenir, comme cela a été discuté pour la dexaméthasone. Une telle compétition pourrait limiter la stabilité de l'encapsulation malgré le caractère amphiphile de la molécule. À l'inverse, des molécules amphiphiles ne présentant pas de noyau stéroïdien pourraient constituer des candidats particulièrement intéressants, la structure du liposome offrant simultanément un environnement favorable à leur domaine hydrophile et à leur domaine lipophile.

Globalement, les résultats démontrent que les propriétés physico-chimiques du principe actif conditionnent directement la stratégie de formulation à adopter. Une molécule lipophile nécessitera d'optimiser ses interactions avec la bicouche lipidique pour améliorer sa rétention, tandis qu'une molécule hydrophile imposera d'augmenter la capacité d'encapsulation du compartiment aqueux. Dans le cas d'un principe actif amphiphile, il sera nécessaire de trouver un équilibre entre ces deux approches. Dès lors, aucune formulation liposomale universelle ne peut convenir à l'ensemble des principes actifs. Il est toutefois possible d'adapter le principe actif en le modifiant chimiquement pour qu'il adopte de nouvelles propriétés, susceptibles de déplacer son site d'encapsulation et de modifier l'ensemble des caractéristiques de la formulation liposomale. Le développement des liposomes demeure donc un travail de formulation spécifique, dans lequel la composition lipidique, la structure des particules et la méthode de production doivent être adaptées aux propriétés du principe actif.

III.2. Quels sont les aspects sensibles de la transposition du point de vue de la formulation d'hydrogel ?

La transposition du système combiné hydrogel-liposomes à un nouveau principe actif nécessite également de s'assurer de la compatibilité de celui-ci avec l'hydrogel utilisé comme véhicule d'administration. En effet, la libération du principe actif à partir des liposomes peut soit se

DISCUSSION

produire après leur diffusion hors du gel pour pénétrer dans la cochlée, soit avant, lorsque les liposomes sont toujours dispersés dans l'hydrogel. Dans ce cas, le principe actif est susceptible d'interagir directement avec le réseau polymérique qui l'entoure et de perturber les propriétés thermosensibles de la formulation.

Contrairement à un simple véhicule inerte, les propriétés du P407 reposent sur sa structure de tribloc amphiphile PEO-PPO-PEO [126,144,145]. Celle-ci est à l'origine de son mécanisme de gélification réversible, dépendant de son autoassemblage en micelles, elles-mêmes organisées en un réseau structuré. La présence d'un principe actif dans la solution peut ainsi influencer l'organisation micellaire du P407 et, par conséquent, les propriétés de gélification de la formulation.

La localisation du principe actif dans ce réseau gélifié dépend directement de ses propriétés physico-chimiques. Une molécule lipophile, telle que la dexaméthasone, devrait présenter une affinité préférentielle pour le cœur hydrophobe (blocs PPO) des micelles, tandis qu'une molécule hydrophile, telle que la DSP, devrait se répartir principalement dans la phase aqueuse et au voisinage des chaînes PEO [133]. Dans ces deux cas, les interactions avec le polymère resteraient limitées et ne devraient pas perturber l'organisation micellaire du P407. Cet hydrogel thermosensible représente donc un véhicule idéal pour l'administration TT de principes actifs lipophiles ou hydrophiles.

La situation s'avère plus complexe dans le cas d'une molécule amphiphile, telle que la DX243. En raison de la présence simultanée de domaines hydrophobes et hydrophiles dans cette molécule, plusieurs modes d'interaction avec le polymère peuvent être envisagés. La molécule pourrait d'une part, établir des interactions avec les segments hydrophobes (PPO) et hydrophiles (PEO) du P407, modifiant ainsi l'équilibre des interactions responsables de la formation des micelles polymériques, et d'autre part, s'autoassembler en structures micellaires indépendantes, susceptibles de perturber l'organisation en réseau des micelles polymériques. Les résultats obtenus dans cette thèse montrent que la présence de la DX243 perturbe effectivement la gélification de la formulation à base de P407, sans toutefois permettre de déterminer lequel de ces mécanismes est prédominant [132,133,394].

Ces observations soulignent que l'hydrogel de P407 ne constitue pas un véhicule universel. Sa transposition à un nouveau principe actif ne peut être envisagée sans vérifier au préalable qu'il n'interfère pas avec le mécanisme de gélification. Cette compatibilité dépend vraisemblablement des propriétés physico-chimiques de la molécule, notamment de son caractère amphiphile, mais

DISCUSSION

aussi de sa concentration et des interactions qu'elle est susceptible d'établir avec les blocs PEO et PPO.

Dans le cas particulier de la DX243, l'utilisation d'un hydrogel thermosensible dont les propriétés ne reposent pas sur un mécanisme de micellisation pourrait constituer une alternative intéressante. Des systèmes thermosensibles à base de méthylcellulose ou de chitosane/ β -glycérophosphate ont notamment été décrits dans la littérature pour la délivrance de principes actifs, bien qu'ils aient rarement été étudiés dans le cadre d'une administration TT [137,138,395]. Néanmoins, leur mécanisme de gélification, bien qu'il n'implique pas de micellisation, repose également sur des interactions intermoléculaires, notamment hydrophobes, susceptibles d'être perturbées par la présence d'un principe actif amphiphile. Dans le cas de la DX243, il est donc probable que ces interactions soient modifiées, ce qui pourrait affecter leur température ou leur cinétique de gélification. En l'absence de données démontrant la compatibilité de la DX243 avec ces systèmes thermosensibles, la pertinence de leur association demeure incertaine.

L'utilisation d'un hydrogel préformé apparaît dès lors comme l'alternative la plus pertinente pour ce type de principe actif. Plusieurs hydrogels préformés ont été proposés pour l'administration TT, principalement à base d'acide hyaluronique ou de chitosane [128,262]. Ces matrices viscoélastiques permettent d'augmenter le temps de résidence du principe actif dans l'oreille moyenne sans reposer sur un mécanisme de gélification thermo-dépendant. Ces formulations, initialement visqueuses, permettent ainsi de s'affranchir du risque de perturbation du gel par l'incorporation d'un principe actif amphiphile, tel que la DX243.

Leur utilisation nécessite néanmoins de vérifier leur injectabilité. La force maximale généralement admise comme compatible avec une injection manuelle est d'environ 30 N [396]. À titre d'exemple, une formulation à base d'acide hyaluronique à 2,28 % (m/v), injectée à travers une aiguille de calibre 30G comparable à celle utilisée dans cette thèse (section III.2.2.2.3.3, page 128), ne nécessite qu'une force d'environ 4 N. Cette faible force d'injection s'explique par le comportement rhéofluidifiant de ce type d'hydrogel, dont la viscosité diminue sous l'effet du cisaillement appliqué lors de l'injection [397]. Des formulations à base de chitosane présentent également un comportement rhéofluidifiant, suggérant que leur administration TT reste compatible avec une injection manuelle malgré leur caractère gélifié à température ambiante [398].

Au-delà de leur injectabilité, les interactions entre le principe actif amphiphile et le réseau polymérique doivent également être prises en considération. L'acide hyaluronique présente une

DISCUSSION

charge négative à pH physiologique [397], tandis que la chaîne hydrophile de la DX243 porte une charge positive. Des interactions électrostatiques entre le principe actif et le polymère pourraient dès lors ralentir la diffusion de la DX243 au sein du réseau hydrogel et modifier sa cinétique de libération, l'ampleur de cet effet dépendant de la force de ces interactions. À l'inverse, les interactions avec un hydrogel à base de chitosane pourraient être limitées à pH physiologique, celui-ci étant majoritairement déprotoné dans ces conditions [398]. Ces hypothèses devront toutefois être vérifiées expérimentalement, les interactions dépendant notamment du pH, de la force ionique du milieu, de l'état d'ionisation des différents constituants et de l'affinité propre de la DX243 pour chacun de ces polymères.

Chaque type de principe actif devrait ainsi être administré à l'aide de l'hydrogel le plus adapté à ses propriétés physico-chimiques. Les hydrogels thermosensibles demeurent l'option privilégiée pour l'administration TT de molécules lipophiles ou hydrophiles, telles que la dexaméthasone et la DSP. En revanche, pour des molécules amphiphiles telles que la DX243, des hydrogels préformés tels que ceux à base d'acide hyaluronique apparaissent plus appropriés. Il conviendra toutefois de vérifier que les interactions entre la DX243 et le polymère ne conduisent pas à une rétention excessive du principe actif au sein du réseau, susceptible de limiter sa libération.

Dans l'ensemble, les résultats montrent que la transposition d'une formulation hydrogel-liposomes à un nouveau principe actif ne consiste pas simplement à remplacer une molécule par une autre au sein d'un véhicule existant. Les propriétés physico-chimiques du principe actif influencent directement les interactions au sein de la formulation et peuvent modifier aussi bien le comportement des liposomes que les propriétés de gélification de la dispersion colloïdale de P407. Le développement d'un système combiné pour la voie TT doit donc être considéré comme le sujet d'une optimisation globale, dans laquelle la compatibilité du principe actif avec les liposomes et l'hydrogel devra être systématiquement évaluée avant toute transposition de la formulation. Si cette adaptation nécessite généralement une optimisation importante de la formulation des liposomes, celle de l'hydrogel apparaît plus simple et consiste principalement à sélectionner un polymère dont le mécanisme de gélification n'interfère pas avec les propriétés du principe actif, tout en conservant des caractéristiques compatibles avec l'administration envisagée, notamment une bonne injectabilité et une cinétique de libération adaptée.

IV. Quelles sont les limites et les perspectives du modèle *in vitro* de membrane de la fenêtre ronde ?

L'évaluation de la pénétration de particules et de molécules actives dans le compartiment périlymphatique de la cochlée nécessite généralement le *screening* d'un grand nombre de formulations, ce qui implique le recours à un grand nombre d'animaux d'expérimentation [295]. Afin de réduire les contraintes éthiques, logistiques et financières associées aux études *in vivo*, deux modèles *in vitro* de la RWM ont été développés à partir des lignées cellulaires Calu-3 et 16HBE14o-. Ces lignées épithéliales pulmonaires sont capables de former, en culture ALI, un épithélium présentant des jonctions serrées et un effet barrière prononcé. Il se comporte dès lors comme une membrane semi-perméable limitant le passage de certains agents thérapeutiques [301,302]. Un modèle innovant de co-culture compartimenté, constitué d'un modèle de RWM en amont de cellules HEI-OC1 [279], représentatives des cellules ciliées cochléaires, a ensuite été développé afin de permettre l'évaluation, en une seule étape, de la pénétration de principes actifs ou de nanoparticules à travers la RWM, ainsi que de leur internalisation par les cellules cibles. À notre connaissance, il s'agit du premier modèle entièrement *in vitro* visant à reproduire le dépôt d'une formulation dans la cavité de l'oreille moyenne et à en évaluer le potentiel thérapeutique au moyen de l'analyse des cellules ciliées.

Les études réalisées à l'aide de ces modèles de RWM ont toutefois permis d'identifier certaines limites. Selon le type d'insert utilisé, le suivi visuel du développement de l'épithélium peut s'avérer difficile en raison de l'opacité de certaines membranes, notamment celles en PC, incompatibles avec la microscopie optique à contraste de phase [399]. La surveillance de l'intégrité des cultures repose alors principalement sur des méthodes indirectes. Si la mesure de la TEER permet un suivi non destructif de l'évolution de la fonction barrière, son interprétation reste limitée par sa variabilité. Les méthodes les plus informatives, telles que les essais de perméabilité à l'aide de marqueurs paracellulaires ou l'immunomarquage des protéines de jonctions serrées, sont quant à elles destructrices et ne permettent donc pas de suivre l'évolution d'un même modèle au cours de son développement. Dans l'ensemble, les modèles de RWM présentent une bonne reproductibilité de leurs caractéristiques et sont relativement simples et rapides à mettre en œuvre. Ils ne peuvent toutefois pas être utilisés avec des hydrogels thermosensibles, ceux-ci exerçant une pression mécanique lors de leur gélification susceptible d'altérer l'intégrité de l'épithélium. La compatibilité d'autres types d'hydrogels n'a cependant pas été évaluée.

DISCUSSION

Les épithéliums formés à partir des lignées Calu-3 et 16HBE14o- voient progressivement leurs caractéristiques structurales évoluer au cours du temps, ce qui modifie leur fonction barrière et limite leur durée d'utilisation. Le modèle Calu-3 semble ainsi conserver une intégrité satisfaisante pendant au moins 7 jours, tandis que le modèle 16HBE14o- présente une stabilité plus limitée, son maintien en culture ALI pendant 24h suffisant à altérer légèrement son intégrité. Il est donc préférable d'utiliser ce dernier dès l'obtention de la confluence et pour une durée maximale de 72h.

Le modèle de RWM développé à partir de la lignée Calu-3 se caractérise par une importante production de mucus, susceptible de ralentir, voire d'empêcher, la pénétration des principes actifs et des nanoparticules étudiés [303]. Cette caractéristique a notamment interféré avec la pénétration des liposomes dans le compartiment représentant la périlymphe cochléaire. Par ailleurs, l'utilisation d'inserts Transwell impose de faibles volumes de part et d'autre de l'épithélium. L'obtention de conditions *sink* lors des études de pénétration nécessite donc l'emploi de faibles concentrations en principes actifs, associées à des méthodes analytiques particulièrement sensibles, telles que la LC-MS/MS.

À l'inverse, le modèle développé à partir des cellules 16HBE14o- s'est distingué par sa pertinence pour l'évaluation de la pénétration de certaines molécules et nanoparticules à travers la RWM. Il a notamment permis de discriminer diverses formulations liposomales de tailles et de compositions lipidiques différentes, ainsi que de comparer les cinétiques de pénétration d'un principe actif selon qu'il soit encapsulé ou non dans ces liposomes. L'étude d'autres principes actifs permettrait toutefois de confirmer l'applicabilité de ce modèle à un plus large éventail de molécules.

La principale contrainte liée au développement du modèle de co-culture compartimentée réside dans la nécessité de disposer d'un milieu de culture compatible avec les deux lignées cellulaires (16HBE14o- et HEI-OC1). En effet, la lignée pulmonaire 16HBE14o- est habituellement cultivée dans un milieu supplémenté en pénicilline et streptomycine. La présence de streptomycine, antibiotique aminoside connu pour ses propriétés ototoxiques, est toutefois incompatible avec la culture des cellules HEI-OC1 [279]. Après leur développement individuel, les deux compartiments doivent donc être rincés au PBS avant d'être assemblés dans un milieu de culture compatible avec les deux types cellulaires.

Bien que développé dans une perspective d'administration TT, le modèle de RWM basé sur les cellules 16HBE14o- présente également un potentiel de transposition vers d'autres applications

DISCUSSION

thérapeutiques nécessitant une barrière épithéliale dotée de jonctions serrées et dépourvue de production de mucus. Son caractère compartimenté permet son utilisation aussi bien en monoculture qu'en co-culture avec différents types cellulaires, offrant ainsi une grande flexibilité expérimentale. Il pourrait notamment être utilisé pour étudier la pénétration de nanoparticules à travers des barrières épithéliales impliquées dans des applications intestinales ou ophtalmiques [400]. Les cellules HEI-OC1 cultivées en aval de ce modèle pourraient alors être remplacées par d'autres lignées cellulaires représentatives du tissu cible, conférant au système une grande modularité et élargissant son champ d'application.

Dans le cadre de ce travail, ce modèle présente un intérêt particulier pour l'évaluation de nombreux principes actifs et vecteurs nanoparticulaires destinés au traitement des pathologies de l'oreille interne. À cet égard, la règle de Lipinski constitue un outil prédictif intéressant pour estimer la capacité d'un principe actif à diffuser passivement à travers les membranes biologiques [190]. Elle se base sur quatre caractéristiques attribuables ou non à ce principe actif : une masse moléculaire inférieure à 500 Da, un log P inférieur à 5, moins de cinq groupements donneurs et moins de dix groupements accepteurs de liaisons hydrogène. Selon cette règle, une molécule possédant au moins trois de ces quatre caractéristiques présente un potentiel favorable de diffusion à travers les membranes biologiques, telles que la RWM. Elle ne tient toutefois pas compte de l'état d'ionisation de la molécule à pH physiologique, paramètre susceptible d'influencer fortement sa perméabilité membranaire [190].

La dexaméthasone, largement utilisée dans ce travail, satisfait à l'ensemble des critères de Lipinski, ce qui est cohérent avec les résultats de pénétration obtenus sur le modèle 16HBE14o- [238]. Il serait dès lors intéressant d'utiliser systématiquement cette approche prédictive en parallèle des études expérimentales afin d'établir des corrélations entre les propriétés physico-chimiques des molécules et leur perméabilité observée.

Une analyse similaire peut être réalisée pour la DSP et la DX243. La DSP présente une masse moléculaire supérieure à 500 Da mais satisfait aux trois autres critères de Lipinski. En revanche, sa charge négative à pH physiologique lui confère une forte hydrosolubilité susceptible de limiter sa diffusion passive à travers la RWM [238]. Dans ce contexte, son encapsulation dans des liposomes apparaît comme une stratégie pertinente pour améliorer sa pénétration cochléaire. La DX243 possède également une masse moléculaire supérieure à la limite recommandée par Lipinski, mais respecte les critères relatifs aux groupements donneurs et accepteurs de liaisons hydrogène. Bien que son log P ne soit pas connu, cette molécule est amphiphile et présente une

DISCUSSION

charge globalement positive à pH physiologique. Comme pour la DSP, ses propriétés physico-chimiques ne permettent donc pas de garantir une diffusion passive efficace à travers la RWM. Le recours à un vecteur d'administration adapté permettant son encapsulation apparaît dès lors pertinent afin de favoriser sa délivrance cochléaire.

Ce modèle compartimenté pourrait également constituer un outil précieux pour les entreprises développant de nouvelles molécules ou formulations thérapeutiques destinées au traitement des surdités. Il permettrait de réaliser un *screening* précoce des candidats thérapeutiques en évaluant leur capacité à franchir la RWM et à atteindre leurs cellules cibles dans la cochlée. En identifiant rapidement les formulations les plus prometteuses, il pourrait contribuer à réduire les coûts et les délais de développement préclinique, tout en limitant le recours à l'expérimentation animale. Il ne se substituerait toutefois pas aux études *in vivo*, indispensables pour prendre en compte la complexité anatomique et physiologique de l'oreille interne. Il constituerait plutôt une étape intermédiaire de sélection et d'optimisation des formulations, permettant de réserver les expérimentations animales aux candidats thérapeutiques les plus prometteurs.

Enfin, plusieurs perspectives d'amélioration peuvent être envisagées afin d'accroître le biomimétisme du modèle. L'intégration d'autres types cellulaires permettrait notamment de mieux reproduire la structure trilaminaire de la RWM [6,163,186]. L'ajout d'une couche conjonctive intermédiaire, par exemple constituée de fibroblastes dermiques humains primaires (HDF), permettrait de reproduire plus fidèlement son architecture native [160,187]. De même, l'intégration de cellules représentatives de la couche épithéliale interne permettrait de se rapprocher davantage de la structure physiologique. Ces cellules devraient présenter des jonctions intercellulaires peu développées et une faible TEER, caractéristiques qui pourraient être obtenues à partir de cellules humaines de tubule proximal rénal (HK-2) ou de cellules rénales canines (MDCK II) [160,166,401]. Ces évolutions contribueraient à renforcer la pertinence biologique du modèle et à améliorer sa valeur prédictive pour les études précliniques consacrées au transport de molécules et de nanoparticules vers l'oreille interne [6,163,186].

CONCLUSIONS GÉNÉRALES ET PERSPECTIVES

Conclusions générales

Les limites des formulations thérapeutiques actuellement utilisées en pratique clinique pour le traitement des surdités neurosensorielles induites par un traumatisme sonore soulignent la nécessité de développer de nouvelles stratégies de délivrance afin d'améliorer l'efficacité des traitements administrés par voie TT. L'objectif général de cette thèse était donc de **développer, caractériser et mettre à l'échelle un système associant des liposomes encapsulant des principes actifs à noyau stéroïdien à un hydrogel thermosensible destiné à une administration TT** pour le traitement des surdités neurosensorielles induites par un traumatisme sonore.

Les travaux réalisés ont permis de démontrer la pertinence de cette approche combinée et de mettre en évidence le potentiel des liposomes comme vecteurs de principes actifs destinés à franchir la RWM. L'importance de la composition lipidique (ex. DSPC, DOPE, Chol, DSPE-PEG₂₀₀₀) dans les performances de ces nanoparticules, tant en matière d'encapsulation que de stabilité et de comportement vis-à-vis des barrières biologiques, a été confirmée. Les propriétés physico-chimiques des principes actifs constituent également un élément déterminant dans le développement de formulations liposomales, puisque chaque nouveau candidat nécessite une optimisation spécifique, comme illustré par les trois principes actifs employés dans cette thèse : la dexaméthasone, la DSP et la DX243.

L'intégration des liposomes dans une dispersion thermosensible de P407 a ensuite permis d'obtenir une formulation adaptée aux contraintes d'une administration TT. Tout en conservant une forme liquide, et donc une bonne injectabilité, à température ambiante, la formulation développée est capable de gélifier rapidement dans la cavité de l'oreille moyenne, permettant ainsi d'augmenter son temps de résidence au niveau de la RWM et de prolonger la libération des liposomes et de la dexaméthasone. Les études réalisées sur explants cochléaires murins ont par ailleurs confirmé l'effet otoprotecteur de cette formulation, soutenant ainsi l'intérêt de cette approche combinée. La transposition de ce système à la DX243 a cependant révélé une incompatibilité de la molécule avec le processus de gélification du P407. Une formulation d'hydrogel préformé devra être envisagée dans ce cas précis.

Cette thèse a également permis de développer un modèle *in vitro* original, destiné à reproduire la RWM en amont des cellules ciliées cochléaires. Dans un premier temps, plusieurs caractéristiques favorisant la pénétration des liposomes à travers la membrane ont été identifiées,

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

notamment une taille particulière réduite et une composition lipidique comprenant du DOPE. Le développement d'un modèle compartimenté a ensuite permis de démontrer l'internalisation de ces liposomes par les cellules cibles après leur passage au travers de la RWM. Ce modèle constitue ainsi un outil préclinique novateur permettant d'évaluer la pénétration des nanoparticules, leur internalisation par les cellules cibles et leur potentiel thérapeutique global, tout en contribuant à réduire le recours à l'expérimentation animale. Leur développement constitue dès lors une contribution méthodologique importante pour l'évaluation préclinique de nouvelles stratégies de délivrance destinées à la cochlée.

Enfin, ce travail ne s'est pas limité au développement d'une formulation à l'échelle du laboratoire. Il a aussi considéré les enjeux liés à son industrialisation. Le procédé PGSS s'est révélé être une alternative prometteuse aux méthodes conventionnelles de fabrication à l'échelle du laboratoire, en permettant la production de liposomes présentant des caractéristiques proches de celles obtenues par TFH, tout en offrant des avantages liés à l'absence de solvants organiques et à la réduction du nombre d'étapes de production. Pour sa mise à l'échelle pilote, une démarche QbD a permis d'investiguer certains paramètres critiques du procédé (pression, agitation, volume, vitesse de dépressurisation) et de définir des conditions de production prometteuses (262 bar, 10% d'agitation, 100 mL, dépressurisation à 60 bar/min). Une formulation de liposomes encapsulant la dexaméthasone produite à 5 mM en lipides a ainsi présenté une taille inférieure à 200 nm, un PdI de 0,39, une EE de 30,7% ainsi que des taux d'oxydation et d'hydrolyse négligeables, soulignant ainsi certains axes d'amélioration, notamment concernant la maîtrise de la polydispersité.

Dans l'ensemble, cette thèse met en évidence la pertinence d'une approche intégrée combinant le développement galénique, l'évaluation biologique, la modélisation préclinique et les considérations liées à la production pharmaceutique. Bien que la formulation développée dans ce travail présente encore certaines limites, notamment concernant la stabilité des liposomes, son développement a permis d'apporter une meilleure compréhension des facteurs qui conditionnent l'efficacité d'un système de délivrance pour la voie TT, mais aussi de proposer des outils méthodologiques susceptibles d'accélérer le développement de futures thérapies pour les pathologies de l'oreille interne.

Perspectives

Les travaux réalisés au cours de cette thèse ont permis d'établir des bases solides pour le développement d'un système de délivrance transtympanique innovant destiné au traitement des surdités neurosensorielles. Bien que les résultats obtenus soient prometteurs, plusieurs axes d'amélioration et de recherche peuvent encore être envisagés afin d'optimiser la formulation développée, de poursuivre sa validation préclinique et de favoriser sa transposition en application clinique.

I. Transposition de la formulation combinée hydrogel-liposomes à d'autres principes actifs et applications thérapeutiques

L'intérêt du système hydrogel-liposomes réside également dans son potentiel de transposition à d'autres principes actifs et à diverses applications thérapeutiques nécessitant le franchissement d'une barrière biologique. Toujours dans le domaine de l'otologie, cette stratégie pourrait notamment être adaptée à l'encapsulation d'autres corticostéroïdes ou de composés antioxydants, tels que la N-acétylcystéine [44,46].

Cette approche pourrait également être appliquée à d'autres voies d'administration. En ophtalmologie, des liposomes encapsulant des corticostéroïdes ou des antibiotiques pourraient favoriser la pénétration des principes actifs à travers la cornée, tandis qu'une dispersion thermosensible, administrée sous forme de collyre, gélifierait au contact de la surface oculaire afin de prolonger le temps de résidence de la formulation et de limiter son élimination par le film lacrymal [402,403]. Une attention particulière devrait toutefois être portée aux propriétés de gélification de la formulation, celle-ci étant directement exposée à l'air ambiant lors de l'administration.

Le même concept pourrait également être envisagé par voie nasale afin de favoriser l'administration de principes actifs destinés au système nerveux central, tels que le succinate de sumatriptan. Dans ce contexte, les liposomes favoriseraient le transport du principe actif à travers l'épithélium nasal, tandis que l'hydrogel thermosensible prolongerait le temps de résidence de la formulation sur la muqueuse et limiterait la clairance mucociliaire [404,405]. De manière similaire, une administration par voie vaginale pourrait être développée pour la délivrance locale d'antifongiques, tels que le clotrimazole, ou d'antiviraux. Les liposomes faciliteraient alors la diffusion du principe actif dans le mucus et son interaction avec l'épithélium vaginal, tandis que

l'hydrogel assurerait une meilleure rétention locale de la formulation et limiterait son élimination [406,407].

Quelle que soit l'application envisagée, la transposition de cette stratégie nécessitera d'adapter la formulation aux propriétés du principe actif ainsi qu'aux spécificités de la barrière biologique ciblée. Dans cette perspective, les modèles de membrane développés au cours de cette thèse pourraient constituer des outils précliniques particulièrement utiles. Les modèles épithéliaux reposant sur les lignées Calu-3 ou 16HBE14o-, selon que la présence d'un mucus soit souhaitée ou non, permettraient d'évaluer la pénétration des liposomes à travers les barrières biologiques qu'ils ciblent. La principale adaptation concernerait alors le compartiment sous-jacent, dans lequel différentes cellules cibles pourraient être cultivées en fonction de l'application étudiée, telles que des cellules ciliées cochléaires, des neurones ou cellules gliales du système nerveux central, des cellules cornéennes ou encore des cellules épithéliales vaginales.

II. Développement d'une forme sèche de liposomes

Afin d'améliorer la stabilité d'encapsulation des liposomes, qui relarguent prématurément la dexaméthasone, une perspective intéressante consisterait à développer une forme sèche de ces particules. Ceci pourrait notamment être réalisé par lyophilisation, la technique la plus couramment utilisée pour la mise sous forme sèche des liposomes. Cette stratégie permettrait de limiter les phénomènes de diffusion du principe actif à travers la bicouche lipidique pendant le stockage, tout en améliorant la stabilité physique (agrégation/fusion) et chimique (oxydation/hydrolyse) de la formulation et en facilitant son transport ainsi que sa conservation [376–378]. Avant administration, les liposomes pourraient être reconstitués dans une solution contenant le P407, nécessaire à la gélification *in situ*.

Le développement d'une telle formulation nécessiterait toutefois une optimisation du procédé de lyophilisation afin de préserver l'intégrité des liposomes. L'identification d'un cryo- ou lyoprotecteur adapté, tel que le tréhalose ou le saccharose, ainsi que l'optimisation de sa concentration et de son site d'insertion (interne ou externe à la particule) seraient essentielles pour limiter la fusion ou l'agrégation des liposomes au cours des étapes de congélation et de séchage [377,379]. Par ailleurs, les vitesses de congélation et de séchage, ainsi que la durée totale du cycle de lyophilisation devront être optimisées [376]. Après reconstitution, les propriétés des liposomes devraient être réévaluées, notamment leur taille, leur PdI, leur EE ainsi que leur profil de libération.

III. Poursuite de l'optimisation de la méthode PGSS à l'échelle pilote

Le plan d'expériences ayant permis d'optimiser la méthode PGSS à l'échelle pilote n'a pas permis d'atteindre l'ensemble des CQA définis pour la formulation. En particulier, le PdI des liposomes produits demeure légèrement supérieur à la valeur cible, traduisant une hétérogénéité encore trop importante de la population de particules. La poursuite de l'optimisation du procédé apparaît donc nécessaire afin d'améliorer la reproductibilité de la formulation et, à terme, de garantir une plus grande constance des effets thérapeutiques.

Les futurs travaux devront s'intéresser à la fois aux paramètres du procédé et aux caractéristiques de l'équipement, ces dernières n'ayant, à ce jour, jamais été évaluées. Le premier plan d'expériences comportant un nombre limité d'essais (22), un second plan pourrait être mis en œuvre afin d'explorer plus finement l'influence de certains paramètres clés, notamment la pression dans l'autoclave et la vitesse de dépressurisation, sur les caractéristiques des liposomes obtenus. En parallèle, des modifications de l'équipement pourraient être envisagées afin d'évaluer l'impact de différents systèmes d'agitation ou de buses de dépressurisation de diamètres variables [389,408]. Ces éléments sont en effet susceptibles d'améliorer respectivement la qualité du mélange et les transferts thermiques au sein du réacteur, ainsi que de moduler la taille et le PdI des liposomes formés lors de la détente du mélange.

Enfin, dans une perspective de transfert industriel, l'évolution du procédé vers une production en continu constituera une étape déterminante [409]. Une telle transition nécessitera le développement d'un système permettant l'alimentation continue de l'autoclave en dispersion lipidique et en scCO_2 , tout en y maintenant les conditions de pression requises. En parallèle, la dépressurisation devra également être réalisée de manière continue afin d'assurer la formation ininterrompue des liposomes et leur récupération, tout en garantissant la stabilité des conditions opératoires tout au long du procédé. Une telle évolution permettrait d'améliorer la reproductibilité des productions et de répondre plus efficacement aux exigences d'une fabrication industrielle conforme aux GMP.

IV. Stratégies d'amélioration du modèle *in vitro* de RWM

Deux principales pistes d'amélioration du modèle *in vitro* de RWM peuvent être envisagées.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

La première consisterait à reproduire l'architecture trilaminaire de la RWM, plutôt que sa seule couche externe, afin de mieux refléter sa structure physiologique. Pour cela, des cellules présentant des jonctions intercellulaires peu développées et une faible TEER, telles que les cellules humaines de tubule proximal rénal (HK-2), pourraient être cultivées sur un insert Transwell afin de représenter la couche interne de la membrane [160,166,401]. Après leur adhésion, des fibroblastes dermiques humains primaires (HDF) [160,187], principaux constituants de la couche conjonctive intermédiaire, seraient ensemencés, avant l'ajout des cellules épithéliales pulmonaires 16HBE14o-, qui constitueraient la couche externe du modèle. Une fois l'intégrité de cette dernière validée, les cinétiques de pénétration de la dexaméthasone et des liposomes pourraient être évaluées et comparées à celles obtenues avec le modèle actuellement développé, ne reproduisant que la couche externe de la RWM. L'intégration des trois couches constitutives de la membrane permettrait ainsi de renforcer la pertinence physiologique du modèle et d'améliorer sa valeur prédictive pour les études précliniques portant sur le transport de molécules et de nanoparticules vers la cochlée [6,163,186].

Une seconde stratégie consisterait à développer un modèle en trois compartiments (Figure 62, page 264) afin de reproduire plus fidèlement les différentes étapes du transport des liposomes depuis leur libération par l'hydrogel jusqu'à leur interaction avec les cellules cibles, et d'en évaluer la cinétique globale. Les travaux réalisés au cours de cette thèse ont en effet montré que le dépôt direct de la dispersion thermosensible de P407 sur le modèle épithélial 16HBE14o- altérait son intégrité, imposant de dissocier l'étude de la libération des liposomes à partir du gel de celle de leur pénétration à travers la RWM. Le développement d'un modèle en trois compartiments permettrait de lever cette limitation et d'évaluer plus fidèlement la cinétique de l'ensemble du processus. La formulation hydrogel-liposomes serait ainsi déposée dans un compartiment supérieur, à partir duquel les liposomes seraient progressivement libérés vers un compartiment intermédiaire contenant le modèle de RWM. Après avoir franchi cette barrière, les particules atteindraient un compartiment inférieur renfermant les cellules ciliées, permettant ainsi d'évaluer de manière séquentielle leur libération, leur pénétration et leur interaction avec leurs cellules cibles au sein d'un même dispositif expérimental. La mise au point d'un tel système pourrait reposer sur le développement d'un dispositif expérimental développé au laboratoire, ou fabriqué par impression 3D, venant s'adapter aux inserts Transwell [386,387]. Un tel modèle constituerait une plateforme préclinique originale permettant d'étudier, dans des conditions plus proches de la physiologie, le devenir de formulations liposomales gélifiées destinées à l'administration TT.

ANNEXES

Annexes

I. Annexe I : Validation d'une méthode HPLC-UV pour la quantification de la dexaméthasone

L'objectif de la validation est de démontrer que la méthode analytique est adaptée à l'usage auquel elle est destinée et, par conséquent, de prouver la fiabilité des résultats obtenus, dans des limites clairement définies. Plusieurs critères de validation reconnus doivent être évalués afin de garantir la fiabilité de la méthode développée.

Les critères de validation présentés dans ce rapport sont les suivants :

- fonction de réponse (courbe d'étalonnage) ;
- justesse ;
- précision (répétabilité et précision intermédiaire) ;
- exactitude ;
- incertitude de mesure ;
- linéarité ;
- limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ) ;
- domaine de mesure.

La quantification de la dexaméthasone a été réalisée à l'aide d'une méthode HPLC validée. L'équipement utilisé était un système Agilent® 1100 (Santa Clara, États-Unis) doté du logiciel OpenLab CDS LC ChemStation (version C.01.05). La séparation chromatographique a été effectuée sur une colonne analytique LiChrospher® 100 RP-18 (250 × 4 mm, 5 µm ; Merck, Allemagne) munie d'une pré-colonne LiChroCART® RP-18 correspondante (4 × 4 mm, 5 µm ; Merck, Allemagne), en utilisant une phase mobile isocratique composée d'eau et d'acétonitrile (50:50, v/v), à un débit de 0,8 mL/min. La température de la colonne a été maintenue à 35°C. Les échantillons (10 µL) ont été injectés à température ambiante, avec un temps d'analyse de 8 minutes. La détection de la dexaméthasone a été réalisée à 242 nm, avec un temps de rétention de 4,9 minutes. Les échantillons ont été dilués au minimum 10 fois dans de l'éthanol absolu avant analyse. Cette méthode a été validée avec succès à l'aide du logiciel Enoval® V3.0 (Arlenda, Liège, Belgique). Le risque α a été fixé à 5%, et les limites d'acceptation à 10%.

STANDARDS D'ÉTALONNAGE

Une solution mère de dexaméthasone (SM) a été préparée à une concentration de 1 mg/mL. Une masse précisément pesée de 10,0 mg a été quantitativement transférée dans une fiole jaugée de 10,0 mL, puis environ 9 mL d'éthanol absolu y ont été ajoutés. Les solutions ont été soniquées pendant 2 minutes afin d'assurer une dissolution complète, laissées à température ambiante jusqu'à refroidissement, puis complétées au trait de jauge avec le même solvant.

Quatre standards d'étalonnage (D1, D10, D50 et D100) ont ensuite été préparés par dilution dans l'éthanol absolu :

- D100 (100 µg/mL) : 1 mL de SM (jaugé : 10,0 mL)
- D50 (50 µg/mL) : 0,5 mL de SM (jaugé : 10,0 mL)
- D10 (10 µg/mL) : 1 mL de D100 (jaugé : 10,0 mL)
- D1 (1 µg/mL) : 1 mL de D10 (jaugé : 10,0 mL)

Toutes les solutions ont été préparées à température ambiante, puis transférées dans des vials pour HPLC en vue de leur analyse. Chaque solution a été injectée trois fois.

STANDARDS DE VALIDATION

Trois solutions mères de dexaméthasone (SMA, SMB, SMC) ont été préparées de manière indépendante selon le protocole décrit ci-dessus.

Pour chacune d'elles, six standards de validation (D1, D5, D10, D25, D50 et D100) ont ensuite été préparés par dilution dans l'éthanol absolu :

- D100 (100 µg/mL) : 1 mL de SM (jaugé : 10,0 mL)
- D50 (50 µg/mL) : 0,5 mL de SM (jaugé : 10,0 mL)
- D25 (25 µg/mL) : 2,5 mL de D100 (jaugé : 10,0 mL)
- D10 (10 µg/mL) : 1 mL de D100 (jaugé : 10,0 mL)
- D5 (5 µg/mL) : 1 mL de D50 (jaugé : 10,0 mL)
- D1 (1 µg/mL) : 1 mL de D10 (jaugé : 10,0 mL)

Toutes les solutions ont été préparées à température ambiante, puis transférées dans des vials pour HPLC en vue de leur analyse. Chaque solution a été injectée une seule fois.

ANNEXES

RAPPORT DE VALIDATION

Plan d'expériences :

Dans le but de valider une méthode analytique, deux types d'échantillons ont été préparés de façon indépendante : les standards d'étalonnage et les standards de validation.

Les standards d'étalonnage sont des échantillons, de concentrations connues, préparés hors de la matrice et qui permettent d'établir la courbe d'étalonnage. Les étalons de calibration consistent en quatre séries indépendantes, chacune comprenant quatre niveaux de concentration (1,0 ; 10,0 ; 50,0 ; 100,0 µg/mL), avec trois répliques par niveau (n total = 48).

Les standards de validation sont les échantillons reconstitués dans la matrice contenant une concentration connue et dont la valeur est considérée comme vraie par consensus. Les étalons de validation consistent en quatre séries indépendantes, chacune comprenant six niveaux de concentration (1,0 ; 5,0 ; 10,0 ; 25,0 ; 50,0 ; 100,0 µg/mL), avec trois répliques indépendants par niveau de concentration (n total = 72).

Fonction de réponse :

La fonction de réponse d'une méthode analytique est, à l'intérieur de l'intervalle de dosage, la relation existante entre la réponse (signal) et la concentration de la substance à examiner dans l'échantillon. La fonction de réponse monotone la plus simple qui exprime cette relation est appelée « courbe d'étalonnage ». Le Tableau 12 reprend les modèles de régression sélectionnés. Ces modèles ont été triés en fonction de leur « indice d'exactitude ».

Tableau 12 : Modèles d'étalonnage triés par 'Indice d'Exactitude'.

Modèle	Indice d'Exactitude	Limites inférieure et supérieure de quantification (µg/mL)	Indice d'Intervalle de Dosage	Indice de Fidélité	Indice de Justesse
Régression quadratique pondérée (1/X)	0.6605	[1.868 , 7.500] [7.768 , 103.4]	0.9892	0.2989	0.9745

Le modèle d'étalonnage sélectionné est : **Régression quadratique pondérée (1/X)**. Les courbes d'étalonnage obtenues pour ce modèle de régression (Tableau 13 et Figure 63) sont

ANNEXES

représentées par l'équation suivante : $Y = a + bX + cX^2$; où Y = réponse analytique (en mAU*s) et X = concentration introduite (en µg/mL).

Tableau 13 : Paramètres de régression.

Série	Terme constant	Terme linéaire	Terme quadratique	r ²	d.d.l résiduels	SCR
Series_1	1.394	23.44	0.006173	0.9999	9	976.2
Series_2	-1.074	23.82	0.0009707	0.9999	9	91.65
Series_3	0.4568	24.16	0.003837	0.9999	9	93.62
Series_4	-0.6168	23.32	0.006302	0.9999	9	869.7

r² = coefficient de détermination ; d.d.l. = degrés de liberté ; SCR = somme des carrés des résidus

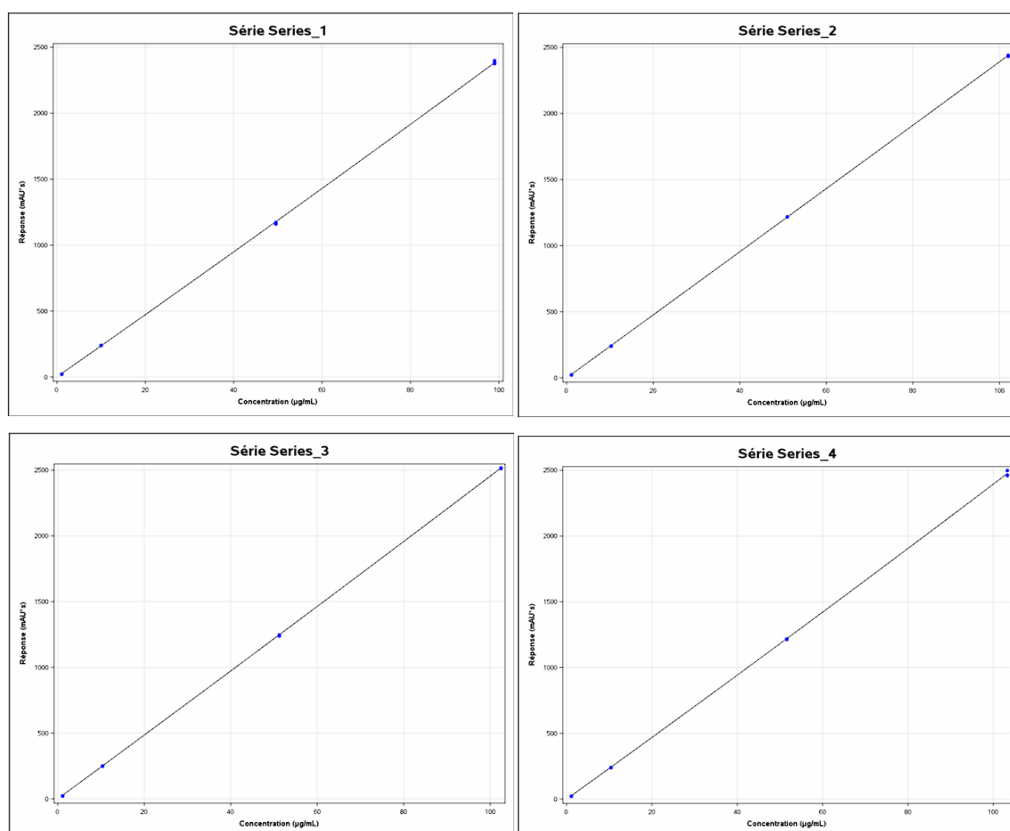


Figure 63 : Courbes d'étalonnage - Séries 1 à 4. Les réponses (mAU) sont représentées en ordonnée et les concentrations (µg/mL) en abscisse.

ANNEXES

Justesse :

La justesse exprime l'étroitesse de l'accord entre la valeur moyenne obtenue à partir d'une large série de résultats d'essais et une valeur de référence acceptée comme telle. La justesse donne une indication sur les erreurs systématiques. Comme indiqué dans le Tableau 14, la justesse est exprimée en termes de biais absolu (µg/mL), de biais relatif (%) ou de taux de recouvrement (%) pour chaque niveau de concentration des standards de validation. Si pour un niveau de concentration, $\mu^{\wedge}$ est la moyenne des concentrations introduites et que $\bar{x}$ est l'estimation de la concentration moyenne obtenue à partir des concentrations calculées alors nous avons :

$$\text{Biais absolu} = \bar{x} - \hat{\mu}$$

$$\text{Biais relatif (\%)} = 100 \times \frac{\bar{x} - \hat{\mu}}{\hat{\mu}}$$

$$\text{Taux de recouvrement (\%)} = 100 \times \frac{\bar{x}}{\hat{\mu}}$$

L'intervalle de confiance à 95% des recouvrements est calculé de la façon suivante :

$$L_{\text{taux de recouvrement}} = \left[\frac{\text{inferieure} \cdot 100}{\hat{\mu}}, \frac{\text{superieure} \cdot 100}{\hat{\mu}} \right]$$

où *inferieure* et *superieure* sont les limites normales inférieures et supérieures de confiance pour la moyenne des concentrations calculées de la façon suivante :

$$\bar{x} \pm t_{np-1; 1-\frac{\alpha}{2}} \cdot \frac{\hat{\sigma}}{\sqrt{np}}$$

où t est le quantile de la distribution de Student t à np-1 degrés de liberté, $\alpha = 0.05$, $\sigma^{\wedge}$ est la déviation standard empirique des concentrations, n est le nombre de répétitions par série et p est le nombre de séries.

Tableau 14 : Justesse.

Niveau de concentration (µg/mL)	Moyenne des concentrations introduites (µg/mL)	Moyenne des concentrations calculées (µg/mL)	Biais absolu (µg/mL)	Biais relatif (%)	Taux de recouvrement (%)	Intervalle de confiance à 95% des recouvrements (%)
1.0	1.034	1.011	-0.02306	-2.230	97.77	[96.02 , 99.52]

ANNEXES

5.0	5.172	5.102	-0.06995	-1.353	98.65	[97.50 , 99.80]
10.0	10.34	10.32	-0.02667	-0.2578	99.74	[98.90 , 100.6]
25.0	25.86	26.04	0.1791	0.6925	100.7	[99.95 , 101.4]
50.0	51.72	51.69	-0.03072	- 0.05939	99.94	[98.98 , 100.9]
100.0	103.4	102.9	-0.5668	-0.5480	99.45	[98.74 , 100.2]

Fidélité :

La fidélité exprime l'étroitesse de l'accord entre une série de mesures provenant de multiples prises d'un même échantillon homogène dans des conditions prescrites. Elle donne des informations sur l'erreur aléatoire et est évaluée à deux niveaux : la répétabilité et la fidélité intermédiaire. Comme présenté dans le Tableau 15 et le Tableau 16, la fidélité (répétabilité et fidélité intermédiaire) peut être exprimée en écart type (SD) et en termes de coefficient de variation (CV). Les estimations des composantes de la variance sont obtenues par l'approche itérative du maximum de vraisemblance restreint (REML).

L'écart type (SD) de la fidélité intermédiaire est égal à :

$$\hat{\sigma}_{IP}^2 = \sqrt{\hat{\sigma}_B^2 + \hat{\sigma}_W^2}$$

L'équation permettant de calculer la limite supérieure de confiance à 95% de la fidélité intermédiaire est définie par l'équation suivante :

$$L_{U,\hat{\sigma}_{IP}} = \sqrt{\hat{\sigma}_{IP}^2 + \sqrt{\left(\frac{n-1}{\chi_{\alpha,n-1}^2} - 1\right)^2 \cdot \left(\frac{MSM}{p}\right)^2 + \left(\frac{JK-J}{\chi_{\alpha,np-n}^2} - 1\right)^2 \cdot \left(1 - \frac{1}{p}\right)^2 \cdot MSE^2}}$$

L'équation permettant de calculer la limite supérieure de confiance à 95% de la répétabilité est définie par l'équation suivante :

$$L_{U,\hat{\sigma}_W} = \sqrt{\nu \cdot \frac{\hat{\sigma}_W^2}{\chi_{\nu,1-\alpha}^2}}$$

où MSE est l'erreur quadratique moyenne pour estimer la variance de répétabilité, MSM est le carré moyen du modèle utilisé pour estimer la variance entre les séries, n est le nombre de

ANNEXES

répétitions par série, p est le nombre de séries, $\chi^2_{\nu, 1-\alpha}$ est le quantile de distribution du Chi-carré à $1-\alpha = 0.95$ avec ν degrés de liberté, $\hat{\sigma}_B^2$ est l'estimation de la variance inter – série, $\hat{\sigma}_W^2$ est l'estimation de la variance intra – série, ν est le nombre de degrés de liberté calculés à l'aide de la méthode Satterthwaite.

Tableau 15 : Répétabilité et Fidélité intermédiaire relatives.

Niveau de concentration (µg/mL)	Moyenne des concentrations introduites (µg/mL)	Répétabilité (CV%) ¹	Fidélité Intermédiaire (CV%) ¹
1.0	1.034	1.536	2.910
5.0	5.172	1.168	1.921
10.0	10.34	1.326	1.326
25.0	25.86	0.9371	1.206
50.0	51.72	1.079	1.585
100.0	103.4	0.8288	1.181

¹ Les CV en % de Répétabilité et de Fidélité Intermédiaire ont été obtenus en divisant l'écart-type (SD) obtenu par la moyenne des concentrations introduites correspondante.

Tableau 16 : Répétabilité et Fidélité intermédiaire absolues.

Niveau de concentration (µg/mL)	Moyenne des concentrations introduites (µg/mL)	Répétabilité (SD-µg/mL)	Inter-Séries (SD-µg/mL)	Ratio des composants de la variance (Inter / Intra)	Fidélité intermédiaire (SD-µg/mL)
1.0	1.034	0.01588	0.02557	2.591	0.03010
5.0	5.172	0.06042	0.07889	1.705	0.09937
10.0	10.34	0.1372	0	0	0.1372
25.0	25.86	0.2423	0.1964	0.6569	0.3119
50.0	51.72	0.5581	0.6005	1.158	0.8198
100.0	103.4	0.8573	0.8708	1.032	1.222

Tableau 17 : Limite supérieure de confiance à 95%.

Niveau de concentration (µg/mL)	Moyenne des concentrations introduites (µg/mL)	Limite supérieure de confiance à 95% de la répétabilité (SD - µg/mL)	Limite supérieure de confiance à 95% de la fidélité intermédiaire (SD - µg/mL)
1.0	1.034	0.02873	0.08080
5.0	5.172	0.1034	0.2570

ANNEXES

10.0	10.34	0.2127	0.2127
25.0	25.86	0.4146	0.7358
50.0	51.72	0.9550	2.047
100.0	103.4	1.467	3.017

De plus, le taux de recouvrement de chaque série ainsi que de toutes les séries est rapporté dans le Tableau 18.

Tableau 18 : Taux de recouvrement par série.

Niveau de concentration (µg/mL)	Série	Moyenne des concentrations introduites (µg/mL)	Concentration calculée (µg/mL)	Taux de recouvrement (%)
1.0	Series_1	1.056	0.9710	93.87
1.0	Series_2	1.029	1.038	100.4
1.0	Series_3	1.013	1.015	98.12
1.0	Series_4	1.039	1.008	97.42
1.0	Moyenne des séries	1.034	1.011	97.77
5.0	Series_1	5.282	5.149	99.55
5.0	Series_2	5.144	5.178	100.1
5.0	Series_3	5.067	5.099	98.60
5.0	Series_4	5.196	4.982	96.33
5.0	Moyenne des séries	5.172	5.102	98.65
10.0	Series_1	10.56	10.39	100.5
10.0	Series_2	10.29	10.33	99.82
10.0	Series_3	10.13	10.34	99.99
10.0	Series_4	10.39	10.21	98.68
10.0	Moyenne des séries	10.34	10.32	99.74
25.0	Series_1	26.41	26.28	101.6
25.0	Series_2	25.72	26.21	101.4
25.0	Series_3	25.33	25.89	100.1
25.0	Series_4	25.98	25.78	99.70
25.0	Moyenne des séries	25.86	26.04	100.7
50.0	Series_1	52.82	52.28	101.1
50.0	Series_2	51.44	52.22	101.0
50.0	Series_3	50.67	51.39	99.36
50.0	Series_4	51.96	50.87	98.35
50.0	Moyenne des séries	51.72	51.69	99.94
100.0	Series_1	105.6	103.5	100.0

ANNEXES

100.0	Series_2	102.9	104.0	100.5
100.0	Series_3	101.3	101.8	98.42
100.0	Series_4	103.9	102.3	98.88
100.0	Moyenne des séries	103.4	102.9	99.45

Incertitude de mesure :

L'incertitude est un paramètre associé au résultat de la mesure, qui caractérise la dispersion des valeurs qui pourrait raisonnablement être attribuée au mesurande (Tableau 19).

$$\text{Incertitude} = \sqrt{\hat{\sigma}_{IP}^2 \cdot \left(1 + \frac{1}{p \cdot n \cdot b^2}\right)}$$

$$\text{Incertitude Etendue} = 2 \cdot \text{Incertitude}$$

$$\text{Incertitude Relative} = 100 \cdot \frac{\text{Incertitude}}{\hat{\mu}}$$

$$\text{Incertitude Etendue Relative} = 100 \cdot \frac{\text{Incertitude Etendue}}{\hat{\mu}}$$

$$\text{Incertitude du Biais} = \sqrt{\hat{\sigma}_{IP}^2 \cdot \frac{1}{p \cdot n \cdot b^2}}$$

où $\hat{\mu}$ est la moyenne des concentrations introduites, n est le nombre (moyen) de répétitions par série, p est le nombre de séries.

$$b = \sqrt{\frac{r + 1}{n \cdot r + 1}}$$

$$r = \frac{\hat{\sigma}_B^2}{\hat{\sigma}_W^2}$$

Tableau 19 : Incertitude.

Niveau de concentration (µg/mL)	Moyenne des concentrations introduites (µg/mL)	Incertitude du biais (µg/mL)	Incertitude (µg/mL)	Incertitude étendue (µg/mL)	Incertitude étendue relative (%)
1.0	1.034	0.01365	0.03305	0.06611	6.391
5.0	5.172	0.04313	0.1083	0.2166	4.189
10.0	10.34	0.03960	0.1428	0.2856	2.761

ANNEXES

25.0	25.86	0.1206	0.3344	0.6689	2.586
50.0	51.72	0.3408	0.8878	1.776	3.433
100.0	103.4	0.5008	1.321	2.641	2.553

Exactitude :

L'exactitude exprime l'étroitesse de l'accord entre le résultat d'essai et la valeur de référence acceptée comme telle, appelée également « valeur conventionnellement vraie ». L'exactitude prend en compte l'erreur totale, c'est à dire l'erreur systématique et l'erreur aléatoire liées au résultat. Par conséquent, l'exactitude est l'expression de la somme de la justesse et de la fidélité. Elle est estimée à partir du profil d'exactitude présenté en Figure 64.

Les limites d'acceptation ont été fixées à $\pm 10\%$ pour les concentrations inférieures à 7.5 µg/mL et à $\pm 5\%$ pour les concentrations supérieures ou égales à cette valeur, et ceci en accord avec l'objectif de la procédure analytique.

Le profil d'exactitude est obtenu en reliant entre elles d'une part les bornes inférieures et d'autre part les bornes supérieures de l'intervalle de tolérance, bornes calculées pour chaque niveau de concentration. La formule utilisée pour le calcul de cet intervalle de tolérance est :

$$biais (\%) \pm kCV_{FI} (\%)$$

La méthode est considérée comme valide pour l'intervalle de dosage où le profil d'exactitude est compris dans les limites d'acceptation fixées a priori. Cette approche garantit que seules 5.0 % des futures mesures d'échantillons inconnus seront en dehors de ces limites.

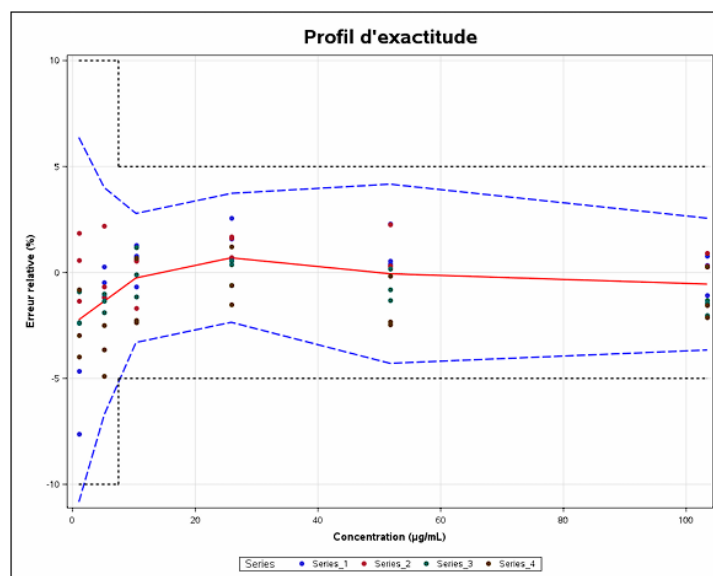


Figure 64 : Profil d'exactitude obtenu en considérant le modèle : Régression quadratique pondérée ($1/X$).

La ligne rouge continue représente le biais relatif, les lignes bleues discontinues définissent les limites de l'intervalle de tolérance attendues au niveau β et les lignes noires discontinues sont les limites d'acceptation. Les points sont quant à eux l'erreur relative des concentrations calculées et sont représentés en fonction de leurs concentrations cibles.

Les limites inférieures et supérieures de l'intervalle de tolérance exprimées en erreur relative sont également présentées dans le Tableau 20 pour chaque niveau de concentration introduit. Le risque d'avoir des mesures en dehors des limites d'acceptation à chaque niveau est calculé uniquement s'il y a au moins deux répétitions par série pour au moins une des séries (Figure 65).

ANNEXES

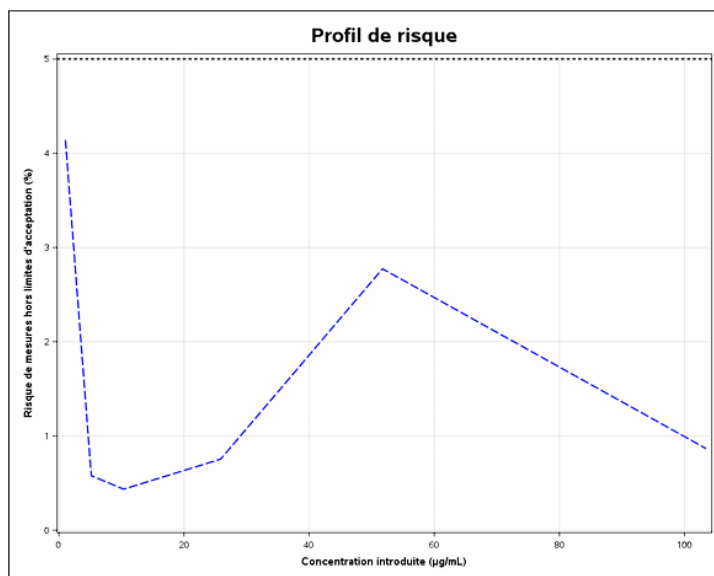


Figure 65 : Profil de risque obtenu en considérant le modèle : Régression quadratique pondérée ($1/X$).

La ligne pointillée noire représente le niveau de risque maximum choisi, à savoir : 5.0 %.

Tableau 20 : Exactitude de la méthode obtenue en considérant le modèle Régression quadratique pondérée ($1/X$).

Niveau de concentration (µg/mL)	Moyennes des concentrations introduites ¹ (µg/mL)	Limites de tolérance "θ-expectation" (µg/mL)	Limites de tolérance "θ-expectation" relatives (%)	Risque ² (%)
1.0	1.034	[0.9224 , 1.100]	[-10.83 , 6.371]	4.140
5.0	5.172	[4.825 , 5.379]	[-6.711 , 4.006]	0.5776
10.0	10.34	[10.00 , 10.63]	[-3.303 , 2.787]	0.4353
25.0	25.86	[25.25 , 26.83]	[-2.350 , 3.735]	0.7544
50.0	51.72	[49.50 , 53.88]	[-4.287 , 4.168]	2.774
100.0	103.4	[99.65 , 106.1]	[-3.660 , 2.564]	0.8674

¹ Les concentrations introduites et réponses associées peuvent avoir fait l'objet de transformations pour aligner les données sur une valeur moyenne de la concentration et ce par niveau.

² Le risque d'avoir des mesures en-dehors des limites d'acceptation.

ANNEXES

Linéarité des résultats :

La linéarité d'une méthode analytique est sa capacité à l'intérieur d'un certain intervalle de dosage d'obtenir des résultats directement proportionnels à la concentration en analyte dans l'échantillon.

Un modèle de régression linéaire (Figure 66) a été ajusté sur les concentrations calculées en fonction des concentrations introduites dans le but d'obtenir l'équation suivante : $Y = 0.07334 + 0.9950 X$.

où Y = concentrations calculées (µg/mL) et X = concentrations introduites (µg/mL). Le coefficient de détermination (r^2) est égal à 0.9997. Le coefficient de corrélation (r) est égal à 0.9999. La somme des carrés des résidus (SCR) est égale à 22.96.

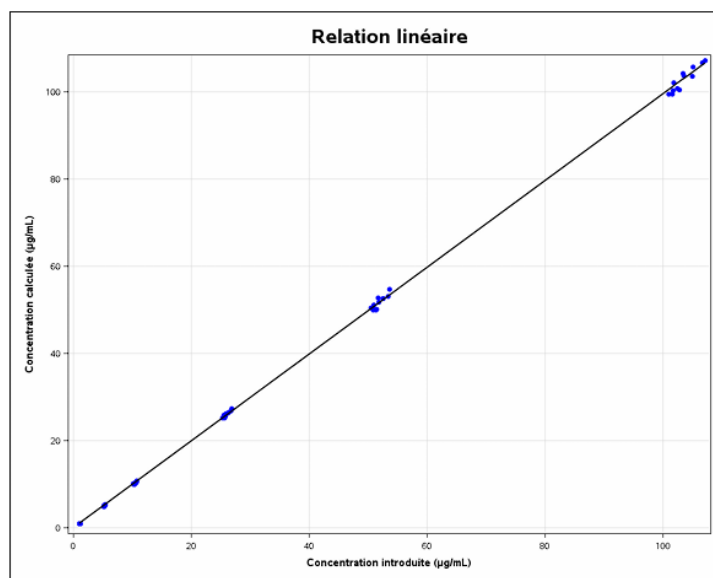


Figure 66 : Relation entre les concentrations introduites et calculées.

Dans le but de démontrer la linéarité de la méthode, l'approche basée sur l'intervalle de tolérance attendu au niveau β , exprimé en valeur absolue, peut être utilisé et est illustré dans la Figure 67.

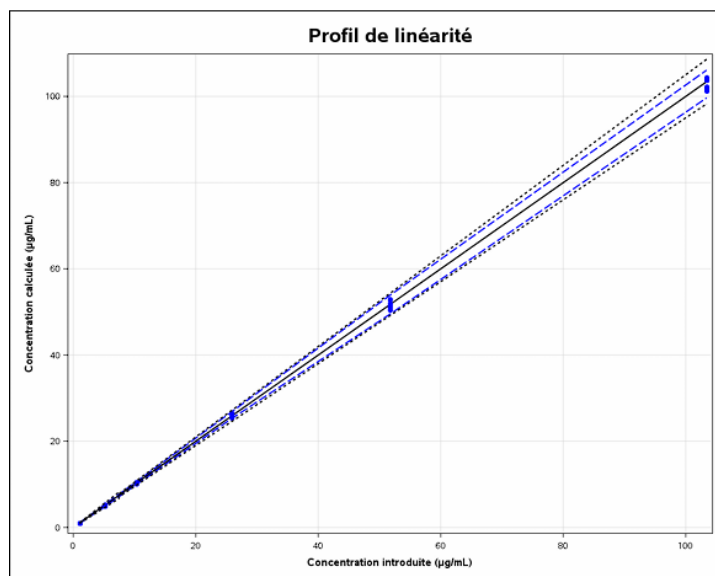


Figure 67 : Graphique de linéarité.

La ligne noire continue est la droite d'identité ($Y=X$). Les limites représentées par les lignes bleues discontinues sur le graphique correspondent au profil d'exactitude, c'est à dire les limites de tolérance "β-expectation" exprimées en valeur absolue. Ces limites sont calculées de la façon suivante :

$$\bar{x} \pm kS_{FI}$$

Les lignes noires discontinues représentent les limites d'acceptation exprimées dans l'unité de la concentration. La méthode est considérée comme valide là où l'intervalle de tolérance représenté par les lignes discontinues bleues est à l'intérieur des limites d'acceptation définies par les lignes pointillées noires.

La linéarité du modèle est démontrée quand les limites de l'intervalle de tolérance exprimées en absolu sont incluses dans les limites d'acceptation.

Limite de détection (LD), limites de quantification (LQ) et intervalle de dosage :

La limite de détection d'une procédure d'analyse est la plus petite quantité de l'analyte dans un échantillon pouvant être détectée, mais non quantifiée comme une valeur exacte dans les conditions expérimentales décrites de la procédure.

Il existe deux façons de calculer la LD :

- $LD = LQ/3.3$
- En utilisant Miller & Miller (non applicable si un seul niveau et pas de répétition) :
 - Détermination par série de Y_{LD} = Ordonnée à l'origine (0 si négative) + 3 * Déviation standard résiduelle obtenue par ANOVA. A l'aide du modèle de régression choisi, la concentration calculée, X_{LD} sera déterminée pour chaque série.
 - La moyenne des X_{LD} sur toutes les séries définira la LD de la procédure analytique.

L'application choisit la plus petite valeur.

$$LD (\mu\text{g/mL}) = 0.1437$$

La limite inférieure de quantification est la plus petite quantité de l'analyte dans un échantillon pouvant être dosée dans les conditions expérimentales décrites, avec une exactitude définie. La définition peut également être appliquée pour la limite supérieure de quantification, qui est la plus grande quantité de l'analyte dans l'échantillon pouvant être dosée dans les conditions expérimentales décrites, avec une exactitude définie. Les limites de quantification sont obtenues en calculant la plus petite et la plus grande concentration pour lesquelles les limites d'exactitude, c'est à dire les limites de l'intervalle de tolérance attendu au niveau β , sortent des limites d'acceptation.

L'intervalle de dosage est l'intervalle compris entre les limites inférieure et supérieure de quantification où la procédure analytique atteint l'exactitude souhaitée.

Comme deux limites d'acceptation différentes ont été fixées, les limites de quantification suivantes ont été calculées :

Pour la limite 1 (10%) :

Limite inférieure de quantification (LQInf) ($\mu\text{g/mL}$) = 1.868

Limite supérieure de quantification (LQSup) ($\mu\text{g/mL}$) = 7.500

Pour la limite 2 (5%) :

Limite inférieure de quantification (LQInf) ($\mu\text{g/mL}$) = 7.768

Limite supérieure de quantification (LQSup) ($\mu\text{g/mL}$) = 103.4

II. Annexe II : Validation d'une méthode HPLC-UV pour la quantification de la dexaméthasone phosphate sodique

L'objectif de la validation est de démontrer que la méthode analytique est adaptée à l'usage auquel elle est destinée et, par conséquent, de prouver la fiabilité des résultats obtenus, dans des limites clairement définies. Plusieurs critères de validation reconnus doivent être évalués afin de garantir la fiabilité de la méthode développée.

Les critères de validation présentés dans ce rapport sont les suivants :

- fonction de réponse (courbe d'étalonnage) ;
- justesse ;
- précision (répétabilité et précision intermédiaire) ;
- exactitude ;
- incertitude de mesure ;
- linéarité ;
- limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ) ;
- domaine de mesure.

La quantification de la DSP a été réalisée à l'aide d'une méthode HPLC validée. L'équipement utilisé était un système Agilent® 1100 (Santa Clara, États-Unis) doté du logiciel OpenLab CDS LC ChemStation (version C.01.05). La séparation chromatographique a été effectuée sur une colonne analytique LiChrospher® 100 RP-18 (125 × 4 mm, 5 µm ; Merck, Allemagne) munie d'une pré-colonne LiChroCART® RP-18 correspondante (4 × 4 mm, 5 µm ; Merck, Allemagne), en utilisant une phase mobile isocratique composée d'eau milli-Q (520 mL), d'acide phosphorique (2 mL), de THF (36 mL) et de méthanol (364 mL) ajusté à pH 2,6 et à un débit de 1,0 mL/min. La température de la colonne a été maintenue à 30°C. Les échantillons (20 µL) ont été injectés à température ambiante, avec un temps d'analyse de 10 minutes. La détection de la dexaméthasone a été réalisée à 242 nm, avec un temps de rétention de 6,8 minutes. Les échantillons ont été dilués 2 fois dans du triton à 2,5%, puis 0 à 5 fois dans la phase mobile avant analyse. Cette méthode a été validée avec succès à l'aide du logiciel Enoval® V3.0 (Arlenda, Liège, Belgique). Le risque α a été fixé à 5%, et les limites d'acceptation à 5%.

STANDARDS D'ÉTALONNAGE

Une solution mère de DSP (SM) a été préparée à une concentration de 1 mg/mL. Une masse précisément pesée de 10,0 mg a été quantitativement transférée dans une fiole jaugée de 10,0 mL, puis environ 9 mL de phase mobile y ont été ajoutés. Les solutions ont été soniquées pendant 2 minutes afin d'assurer une dissolution complète, laissées à température ambiante jusqu'à refroidissement, puis complétées au trait de jauge avec le même solvant.

Quatre standards d'étalonnage (D1, D10, D50 et D100) ont ensuite été préparés par dilution dans la phase mobile :

- D100 (100 µg/mL) : 1 mL de SM (jaugé : 10,0 mL)
- D50 (50 µg/mL) : 0,5 mL de SM (jaugé : 10,0 mL)
- D10 (10 µg/mL) : 1 mL de D100 (jaugé : 10,0 mL)
- D1 (1 µg/mL) : 1 mL de D10 (jaugé : 10,0 mL)

Toutes les solutions ont été préparées à température ambiante, puis transférées dans des vials pour HPLC en vue de leur analyse. Chaque solution a été injectée trois fois.

STANDARDS DE VALIDATION

Trois solutions mères de DSP (SMA, SMB, SMC) ont été préparées de manière indépendante selon le protocole décrit ci-dessus.

Pour chacune d'elles, quatre standards de validation (D1, D10, D50 et D100) ont ensuite été préparés par dilution dans la phase mobile :

- D100 (100 µg/mL) : 1 mL de SM (jaugé : 10,0 mL)
- D50 (50 µg/mL) : 0,5 mL de SM (jaugé : 10,0 mL)
- D10 (10 µg/mL) : 1 mL de D100 (jaugé : 10,0 mL)
- D1 (1 µg/mL) : 1 mL de D10 (jaugé : 10,0 mL)

Toutes les solutions ont été préparées à température ambiante, puis transférées dans des vials pour HPLC en vue de leur analyse. Chaque solution a été injectée une seule fois.

RAPPORT DE VALIDATIONPlan d'expériences :

Dans le but de valider une méthode analytique, deux types d'échantillons ont été préparés de façon indépendante : les standards d'étalonnage et les standards de validation.

Les standards d'étalonnage sont des échantillons, de concentrations connues, préparés hors de la matrice et qui permettent d'établir la courbe d'étalonnage. Les étalons de calibration consistent en quatre séries indépendantes, chacune comprenant quatre niveaux de concentration (1,0 ; 10,0 ; 50,0 ; 100,0 µg/mL), avec trois réplicas par niveau (n total = 48).

Les standards de validation sont les échantillons reconstitués dans la matrice contenant une concentration connue et dont la valeur est considérée comme vraie par consensus. Les étalons de validation consistent en quatre séries indépendantes, chacune comprenant quatre niveaux de concentration (1,0 ; 10,0 ; 50,0 ; 100,0 µg/mL), avec trois réplicas indépendants par niveau de concentration (n total = 48).

Fonction de réponse :

La fonction de réponse d'une méthode analytique est, à l'intérieur de l'intervalle de dosage, la relation existante entre la réponse (signal) et la concentration de la substance à examiner dans l'échantillon. La fonction de réponse monotone la plus simple qui exprime cette relation est appelée « courbe d'étalonnage ». Le Tableau 21 reprend les modèles de régression sélectionnés. Ces modèles ont été triés en fonction de leur « indice d'exactitude ».

Tableau 21 : Modèles d'étalonnage triés par 'Indice d'Exactitude'.

Modèle	Indice d'Exactitude	Limites inférieure et supérieure de quantification (µg/mL)	Indice d'Intervalle de Dosage	Indice de Fidélité	Indice de justesse
Régression quadratique pondérée ($1/X^2$)	0.8006	[1.008 , 100.8]	1.000	0.5144	0.9974

Le modèle d'étalonnage sélectionné est : **Régression quadratique pondérée ($1/X^2$)**. Les courbes d'étalonnage obtenues pour ce modèle de régression (Tableau 22 et Figure 68) sont

ANNEXES

représentées par l'équation suivante : $Y = a + bX + cX^2$; où Y = réponse analytique (en mAU*s) et X = concentration introduite (en µg/mL).

Tableau 22 : Paramètres de régression.

Série	Terme constant	Terme linéaire	Terme quadratique	r^2	d.d.l. résiduels	SCR
Series_1	-1.053	31.05	0.0001615	0.9999	9	376.3
Series_2	0.2200	29.03	0.008631	0.9998	9	3985
Series_3	-0.6240	30.12	0.003653	0.9999	9	82.84
Series_4	-0.02948	29.72	0.008153	0.9999	9	155.4

r^2 = coefficient de détermination ; d.d.l. = degrés de liberté ; SCR = somme des carrés des résidus

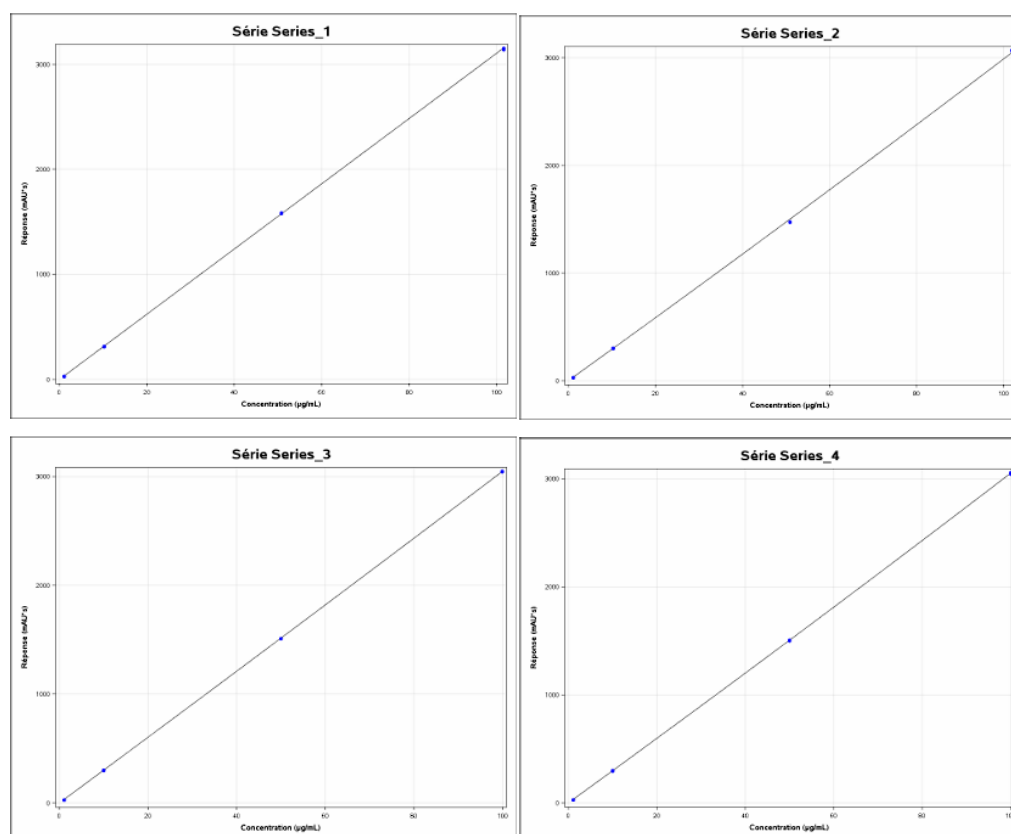


Figure 68 : Courbes d'étalonnage - Séries 1 à 4. Les réponses (mAU) sont représentées en ordonnée et les concentrations (µg/mL) en abscisse.

ANNEXES

Justesse :

La justesse exprime l'étroitesse de l'accord entre la valeur moyenne obtenue à partir d'une large série de résultats d'essais et une valeur de référence acceptée comme telle. La justesse donne une indication sur les erreurs systématiques. Comme indiqué dans le Tableau 23, la justesse est exprimée en termes de biais absolu (µg/mL), de biais relatif (%) ou de taux de recouvrement (%) pour chaque niveau de concentration des standards de validation. Si pour un niveau de concentration, $\mu^{\wedge}$ est la moyenne des concentrations introduites et que $\bar{x}$ est l'estimation de la concentration moyenne obtenue à partir des concentrations calculées alors nous avons :

$$\text{Biais absolu} = \bar{x} - \hat{\mu}$$

$$\text{Biais relatif (\%)} = 100 \times \frac{\bar{x} - \hat{\mu}}{\hat{\mu}}$$

$$\text{Taux de recouvrement (\%)} = 100 \times \frac{\bar{x}}{\hat{\mu}}$$

L'intervalle de confiance à 95% des recouvrements est calculé de la façon suivante :

$$L_{\text{taux de recouvrement}} = \left[\frac{\text{inferieure} \cdot 100}{\hat{\mu}}, \frac{\text{superieure} \cdot 100}{\hat{\mu}} \right]$$

où *inferieure* et *superieure* sont les limites normales inférieures et supérieures de confiance pour la moyenne des concentrations calculées de la façon suivante :

$$\bar{x} \pm t_{np-1; 1-\frac{\alpha}{2}} \cdot \frac{\hat{\sigma}}{\sqrt{np}}$$

où t est le quantile de la distribution de Student t à np-1 degrés de liberté, $\alpha = 0.05$, $\hat{\sigma}$ est la déviation standard empirique des concentrations, n est le nombre de répétitions par série et p est le nombre de séries.

Tableau 23 : Justesse.

Niveau de concentration (µg/mL)	Moyenne des concentrations introduites (µg/mL)	Moyenne des concentrations calculées (µg/mL)	Biais absolu (µg/mL)	Biais relatif (%)	Taux de recouvrement (%)	Intervalle de confiance 95% des recouvrements (%)
1.0	1.008	1.008	-0.0001891	-0.01875	99.98	[99.79 , 100.2]

ANNEXES

10.0	10.08	10.11	0.2506	0.2506	100.3	[99.87 , 100.6]
50.0	50.41	50.21	-0.4047	-0.4047	99.60	[99.04 , 100.1]
100.0	100.8	101.0	0.1696	0.1696	100.2	[99.89 , 100.4]

Fidélité :

La fidélité exprime l'étroitesse de l'accord entre une série de mesures provenant de multiples prises d'un même échantillon homogène dans des conditions prescrites. Elle donne des informations sur l'erreur aléatoire et est évaluée à deux niveaux : la répétabilité et la fidélité intermédiaire. Comme présenté dans le Tableau 24 et le Tableau 25, la fidélité (répétabilité et fidélité intermédiaire) peut être exprimée en écart type (SD) et en termes de coefficient de variation (CV). Les estimations des composantes de la variance sont obtenues par l'approche itérative du maximum de vraisemblance restreint (REML).

L'écart type (SD) de la fidélité intermédiaire est égal à :

$$\hat{\sigma}_{IP}^2 = \sqrt{\hat{\sigma}_B^2 + \hat{\sigma}_W^2}$$

L'équation permettant de calculer la limite supérieure de confiance à 95% de la fidélité intermédiaire est définie par l'équation suivante :

$$L_{U,\hat{\sigma}_{IP}} = \sqrt{\hat{\sigma}_{IP}^2 + \sqrt{\left(\frac{n-1}{\chi_{\alpha,n-1}^2} - 1\right) \cdot \left(\frac{MSM}{p}\right)^2 + \left(\frac{JK-J}{\chi_{\alpha,np-n}^2} - 1\right) \cdot \left(1 - \frac{1}{p}\right)^2 \cdot MSE^2}}$$

L'équation permettant de calculer la limite supérieure de confiance à 95% de la répétabilité est définie par l'équation suivante :

$$L_{U,\hat{\sigma}_W} = \sqrt{\nu \cdot \frac{\hat{\sigma}_W^2}{\chi_{\nu,1-\alpha}^2}}$$

où MSE est l'erreur quadratique moyenne pour estimer la variance de répétabilité, MSM est le carré moyen du modèle utilisé pour estimer la variance entre les séries, n est le nombre de répétitions par série, p est le nombre de séries, $\chi_{\nu,1-\alpha}^2$ est le quantile de distribution du Chi-carré à $1-\alpha = 0.95$ avec ν degrés de liberté, $\hat{\sigma}_B^2$ est l'estimation de la variance inter – série, $\hat{\sigma}_W^2$

ANNEXES

est l'estimation de la variance intra – série, v est le nombre de degrés de liberté calculés à l'aide de la méthode Satterthwaite.

Tableau 24 : Répétabilité et Fidélité intermédiaire relatives.

Niveau de concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Moyenne des concentrations introduites ($\mu\text{g/mL}$)	Répétabilité (CV%) ¹	Fidélité Intermédiaire (CV%) ¹
1.0	1.008	0.3036	0.3036
10.0	10.08	0.2906	0.6477
50.0	50.41	0.1392	0.9592
100.0	100.8	0.1958	0.4777

¹ Les CV en % de Répétabilité et de Fidélité Intermédiaire ont été obtenus en divisant l'écart-type (SD) obtenu par la moyenne des concentrations introduites correspondante.

Tableau 25 : Répétabilité et Fidélité intermédiaire absolues.

Niveau de concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Moyenne des concentrations introduites ($\mu\text{g/mL}$)	Répétabilité (SD- $\mu\text{g/mL}$)	Inter-Séries (SD- $\mu\text{g/mL}$)	Ratio des composants de la variance (Inter / Intra)	Fidélité intermédiaire (SD- $\mu\text{g/mL}$)
1.0	1.008	0.003061	0	0	0.003061
10.0	10.08	0.02930	0.05836	3.966	0.06531
50.0	50.41	0.07020	0.4784	46.45	0.4836
100.0	100.8	0.1974	0.4394	4.952	0.4817

Tableau 26 : Limite supérieure de confiance à 95%.

Niveau de concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Moyenne des concentrations introduites ($\mu\text{g/mL}$)	Limite supérieure de confiance à 95% de la répétabilité (SD - $\mu\text{g/mL}$)	Limite supérieure de confiance à 95% de la fidélité intermédiaire (SD - $\mu\text{g/mL}$)
1.0	1.008	0.004747	0.004747
10.0	10.08	0.05014	0.1791
50.0	50.41	0.1201	1.403
100.0	100.8	0.3378	1.335

De plus, le taux de recouvrement de chaque série ainsi que de toutes les séries est rapporté dans le Tableau 27.

ANNEXES

Tableau 27 : Taux de recouvrement par série.

Niveau de concentration (µg/mL)	Série	Moyenne des concentrations introduites (µg/mL)	Concentration calculée (µg/mL)	Taux de recouvrement (%)
1.0	Series_1	1.016	1.008	100.0
1.0	Series_2	1.018	1.007	99.92
1.0	Series_3	0.9990	1.008	99.99
1.0	Series_4	1.000	1.008	100.0
1.0	Moyenne des séries	1.008	1.008	99.98
10.0	Series_1	10.16	10.06	99.76
10.0	Series_2	10.18	10.20	101.1
10.0	Series_3	9.990	10.10	100.1
10.0	Series_4	10.00	10.08	99.98
10.0	Moyenne des séries	10.08	10.11	100.3
50.0	Series_1	50.80	50.61	100.4
50.0	Series_2	50.90	49.52	98.22
50.0	Series_3	49.95	50.29	99.76
50.0	Series_4	50.00	50.41	100.0
50.0	Moyenne des séries	50.41	50.21	99.60
100.0	Series_1	101.6	100.7	99.83
100.0	Series_2	101.8	101.7	100.8
100.0	Series_3	99.90	100.9	100.1
100.0	Series_4	100.0	100.8	99.95
100.0	Moyenne des séries	100.8	101.0	100.2

Incertitude de mesure :

L'incertitude est un paramètre associé au résultat de la mesure, qui caractérise la dispersion des valeurs qui pourrait raisonnablement être attribuée au mesurande (Tableau 28).

ANNEXES

$$\text{Incertitude} = \sqrt{\hat{\sigma}_{IP}^2 \cdot \left(1 + \frac{1}{p \cdot n \cdot b^2}\right)}$$

$$\text{Incertitude Etendue} = 2 \cdot \text{Incertitude}$$

$$\text{Incertitude Relative} = 100 \cdot \frac{\text{Incertitude}}{\hat{\mu}}$$

$$\text{Incertitude Etendue Relative} = 100 \cdot \frac{\text{Incertitude Etendue}}{\hat{\mu}}$$

$$\text{Incertitude du Biais} = \sqrt{\hat{\sigma}_{IP}^2 \cdot \frac{1}{p \cdot n \cdot b^2}}$$

où $\hat{\mu}$ est la moyenne des concentrations introduites, n est le nombre (moyen) de répétitions par série, p est le nombre de séries.

$$b = \sqrt{\frac{r + 1}{n \cdot r + 1}}$$

$$r = \frac{\hat{\sigma}_B^2}{\hat{\sigma}_W^2}$$

Tableau 28 : Incertitude.

Niveau de concentration (µg/mL)	Moyenne des concentrations introduites (µg/mL)	Incertitude du biais (µg/mL)	Incertitude (µg/mL)	Incertitude étendue (µg/mL)	Incertitude étendue relative (%)
1.0	1.008	0.0008837	0.003186	0.006372	0.6320
10.0	10.08	0.03038	0.07203	0.1441	1.429
50.0	50.41	0.2401	0.5399	1.080	2.142
100.0	100.8	0.2270	0.5325	1.065	1.056

Exactitude :

L'exactitude exprime l'étroitesse de l'accord entre le résultat d'essai et la valeur de référence acceptée comme telle, appelée également « valeur conventionnellement vraie ». L'exactitude prend en compte l'erreur totale, c'est à dire l'erreur systématique et l'erreur aléatoire liées au résultat. Par conséquent, l'exactitude est l'expression de la somme de la justesse et de la fidélité. Elle est estimée à partir du profil d'exactitude présenté en Figure 69.

ANNEXES

Les limites d'acceptation ont été fixées à $\pm 5\%$, et ceci en accord avec l'objectif de la procédure analytique.

Le profil d'exactitude est obtenu en reliant entre elles d'une part les bornes inférieures et d'autre part les bornes supérieures de l'intervalle de tolérance, bornes calculées pour chaque niveau de concentration. La formule utilisée pour le calcul de cet intervalle de tolérance est :

$$\text{biais } (\%) \pm kCV_{FI} (\%)$$

La méthode est considérée comme valide pour l'intervalle de dosage où le profil d'exactitude est compris dans les limites d'acceptation fixées a priori. Cette approche garantit que seules 5.0 % des futures mesures d'échantillons inconnus seront en dehors de ces limites.

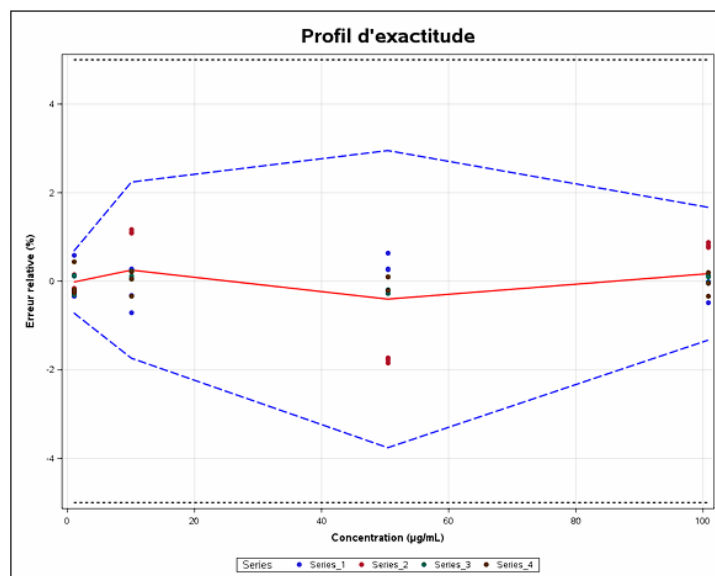


Figure 69 : Profil d'exactitude obtenu en considérant le modèle : Régression quadratique pondérée ($1/X^2$).

La ligne rouge continue représente le biais relatif, les lignes bleues discontinues définissent les limites de l'intervalle de tolérance attendues au niveau β et les lignes noires discontinues sont les limites d'acceptation. Les points sont quant à eux l'erreur relative des concentrations calculées et sont représentés en fonction de leurs concentrations cibles.

Les limites inférieures et supérieures de l'intervalle de tolérance exprimées en erreur relative sont également présentées dans le Tableau 29 pour chaque niveau de concentration introduit. Le

ANNEXES

risque d'avoir des mesures en dehors des limites d'acceptation à chaque niveau est calculé uniquement s'il y a au moins deux répétitions par série pour au moins une des séries (Figure 70).

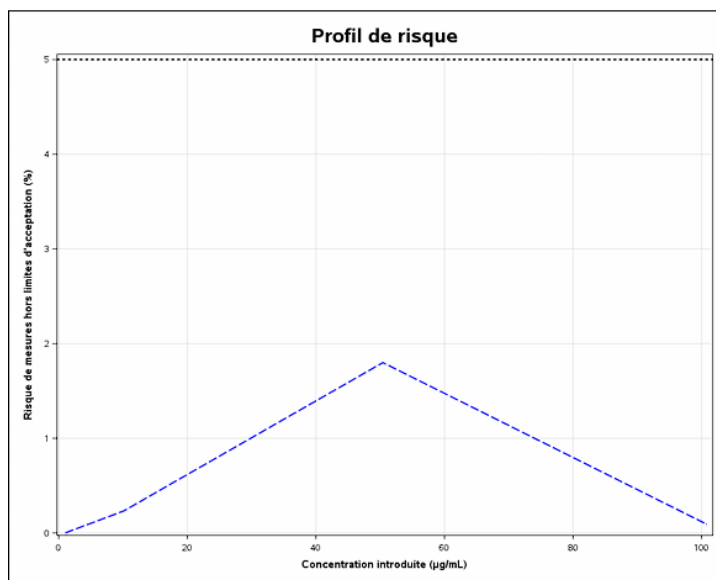


Figure 70 : Profil de risque obtenu en considérant le modèle : Régression quadratique pondérée ($1/X^2$).

La ligne pointillée noire représente le niveau de risque maximum choisi, à savoir : 5.0 %.

Tableau 29 : Exactitude de la méthode obtenue en considérant le modèle Régression quadratique pondérée ($1/X^2$).

Niveau de concentration (µg/mL)	Moyennes des concentrations introduites ¹ (µg/mL)	Limites de tolérance "B-expectation" (µg/mL)	Limites de tolérance "B-expectation" relatives (%)	Risque ² (%)
1.0	1.008	[1.001 , 1.015]	[-0.7159 , 0.6784]	0.00000082
10.0	10.08	[9.907 , 10.31]	[-1.739 , 2.241]	0.2311
50.0	50.41	[48.52 , 51.90]	[-3.760 , 2.950]	1.799
100.0	100.8	[99.48 , 102.5]	[-1.331 , 1.670]	0.09143

¹ Les concentrations introduites et réponses associées peuvent avoir fait l'objet de transformations pour aligner les données sur une valeur moyenne de la concentration et ce par niveau.

² Le risque d'avoir des mesures en-dehors des limites d'acceptation.

ANNEXES

Linéarité des résultats :

La linéarité d'une méthode analytique est sa capacité à l'intérieur d'un certain intervalle de dosage d'obtenir des résultats directement proportionnels à la concentration en analyte dans l'échantillon.

Un modèle de régression linéaire (Figure 71) a été ajusté sur les concentrations calculées en fonction des concentrations introduites dans le but d'obtenir l'équation suivante : $Y = -0.05164 + 1.001 X$.

où Y = concentrations calculées (µg/mL) et X = concentrations introduites (µg/mL). Le coefficient de détermination (r^2) est égal à 0.9999. Le coefficient de corrélation (r) est égal à 1.000. La somme des carrés des résidus (SCR) est égale à 4.869.

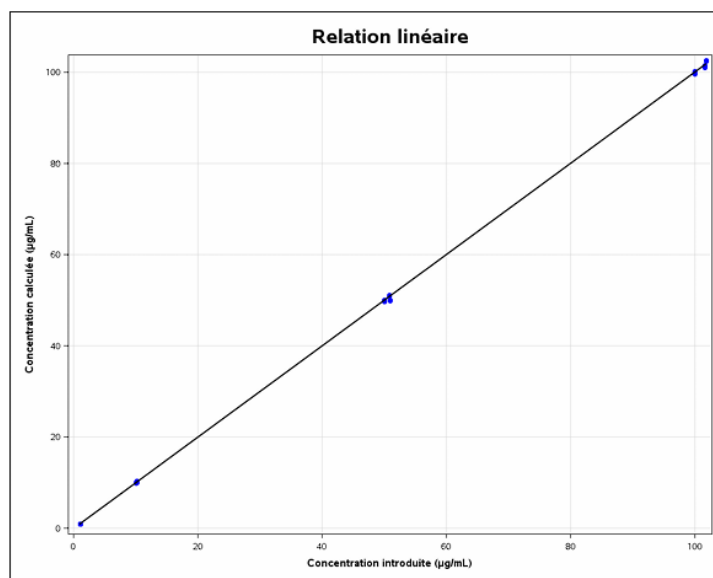


Figure 71 : Relation entre les concentrations introduites et calculées.

Dans le but de démontrer la linéarité de la méthode, l'approche basée sur l'intervalle de tolérance attendu au niveau β , exprimé en valeur absolue, peut être utilisé et est illustré dans la Figure 72.

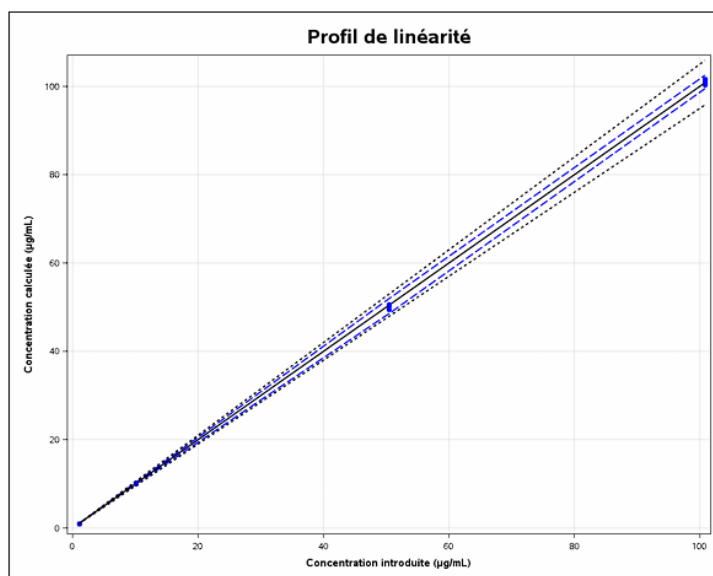


Figure 72 : Graphique de linéarité.

La ligne noire continue est la droite d'identité ($Y=X$). Les limites représentées par les lignes bleues discontinues sur le graphique correspondent au profil d'exactitude, c'est à dire les limites de tolérance "β-expectation" exprimées en valeur absolue. Ces limites sont calculées de la façon suivante :

$$\bar{x} \pm kS_{FI}$$

Les lignes noires discontinues représentent les limites d'acceptation exprimées dans l'unité de la concentration. La méthode est considérée comme valide là où l'intervalle de tolérance représenté par les lignes discontinues bleues est à l'intérieur des limites d'acceptation définies par les lignes pointillées noires.

La linéarité du modèle est démontrée quand les limites de l'intervalle de tolérance exprimées en absolu sont incluses dans les limites d'acceptation.

Limite de détection (LD), limites de quantification (LQ) et intervalle de dosage :

La limite de détection d'une procédure d'analyse est la plus petite quantité de l'analyte dans un échantillon pouvant être détectée, mais non quantifiée comme une valeur exacte dans les conditions expérimentales décrites de la procédure.

ANNEXES

Il existe deux façons de calculer la LD :

- $LD = LQ/3.3$
- En utilisant Miller & Miller (non applicable si un seul niveau et pas de répétition) :
 - Détermination par série de Y_{LD} = Ordonnée à l'origine (0 si négative) + 3 * Déviation standard résiduelle obtenue par ANOVA. A l'aide du modèle de régression choisi, la concentration calculée, X_{LD} sera déterminée pour chaque série.
 - La moyenne des X_{LD} sur toutes les séries définira la LD de la procédure analytique.

L'application choisit la plus petite valeur.

$$LD (\mu\text{g/mL}) = 0.03330$$

La limite inférieure de quantification est la plus petite quantité de l'analyte dans un échantillon pouvant être dosée dans les conditions expérimentales décrites, avec une exactitude définie. La définition peut également être appliquée pour la limite supérieure de quantification, qui est la plus grande quantité de l'analyte dans l'échantillon pouvant être dosée dans les conditions expérimentales décrites, avec une exactitude définie. Les limites de quantification sont obtenues en calculant la plus petite et la plus grande concentration pour lesquelles les limites d'exactitude, c'est à dire les limites de l'intervalle de tolérance attendu au niveau β , sortent des limites d'acceptation.

L'intervalle de dosage est l'intervalle compris entre les limites inférieure et supérieure de quantification où la procédure analytique atteint l'exactitude souhaitée.

$$\text{Limite inférieure de quantification (LQInf)} (\mu\text{g/mL}) = 1.008$$

$$\text{Limite supérieure de quantification (LQSup)} (\mu\text{g/mL}) = 100.8$$

III. Annexe III : Validation d'une méthode HPLC-visible pour la quantification de la DX2403

L'objectif de la validation est de démontrer que la méthode analytique est adaptée à l'usage auquel elle est destinée et, par conséquent, de prouver la fiabilité des résultats obtenus, dans des limites clairement définies. Plusieurs critères de validation reconnus doivent être évalués afin de garantir la fiabilité de la méthode développée.

Les critères de validation présentés dans ce rapport sont les suivants :

- fonction de réponse (courbe d'étalonnage) ;
- justesse ;
- précision (répétabilité et précision intermédiaire) ;
- exactitude ;
- incertitude de mesure ;
- linéarité ;
- limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ) ;
- domaine de mesure.

La quantification de la DX2403 a été réalisée à l'aide d'une méthode HPLC validée. L'équipement utilisé était un système Agilent® 1100 (Santa Clara, États-Unis) doté du logiciel OpenLab CDS LC ChemStation (version C.01.05). La séparation chromatographique a été effectuée sur une colonne analytique Purospher® RP-18 endcappée (125 × 4 mm, 5 µm ; Merck, Allemagne), en utilisant une phase mobile isocratique composée d'eau et d'acétonitrile (65:35, v/v), contenant tous deux 0,1% d'acide formique et 0,1% de triéthylamine, à un débit de 1,0 mL/min. La température de la colonne a été maintenue à 60°C. Les échantillons (5 µL) ont été injectés à température ambiante, avec un temps d'analyse de 6 minutes. La détection de la DX2403 a été réalisée dans le visible à 564 nm, avec un temps de rétention de 2,8 minutes. Les échantillons ont été dilués 10 fois dans de l'éthanol absolu avant analyse. Cette méthode a été validée avec succès à l'aide du logiciel Enova® V3.0 (Arlenda, Liège, Belgique). Le risque α a été fixé à 5%, et les limites d'acceptation à 10%.

STANDARDS D'ÉTALONNAGE

Une solution mère de DX2403 (SM) a été préparée à une concentration de 1 mg/mL. Une masse précisément pesée de 10,0 mg a été quantitativement transférée dans une fiole jaugée de 10,0 mL, puis environ 9 mL d'un solvant composé d'eau et d'éthanol (10/90 %v/v) y ont été ajoutés. Les solutions ont été soniquées pendant 2 minutes afin d'assurer une dissolution complète, laissées à température ambiante jusqu'à refroidissement, puis complétées au trait de jauge avec le même solvant.

Quatre standards d'étalonnage (D1, D10, D25 et D50) ont ensuite été préparés par dilution dans le solvant :

- D50 (50 µg/mL) : 80 µL de SM + 1520 µL de solvant
- D25 (25 µg/mL) : 40 µL de SM + 1560 µL de solvant
- D10 (10 µg/mL) : 16 µL de SM + 1584 µL de solvant
- D1 (1 µg/mL) : 1.6 µL de SM + 1598.4 µL de solvant

Toutes les solutions ont été préparées à température ambiante, puis transférées dans des vials pour HPLC en vue de leur analyse. Chaque solution a été injectée cinq fois.

STANDARDS DE VALIDATION

Trois solutions mères de DX2403 (SMA, SMB, SMC) ont été préparées de manière indépendante selon le protocole décrit ci-dessus.

Pour chacune d'elles, cinq standards de validation (D1, D5, D10, D25 et D50) ont ensuite été préparés par dilution dans le solvant :

- D50 (50 µg/mL) : 80 µL de SM + 1520 µL de solvant
- D25 (25 µg/mL) : 40 µL de SM + 1560 µL de solvant
- D10 (10 µg/mL) : 16 µL de SM + 1584 µL de solvant
- D5 (5 µg/mL) : 8 µL de SM + 1592 µL de solvant
- D1 (1 µg/mL) : 1.6 µL de SM + 1598.4 µL de solvant

Toutes les solutions ont été préparées à température ambiante, puis transférées dans des vials pour HPLC en vue de leur analyse. Chaque solution a été injectée une seule fois.

RAPPORT DE VALIDATION

Plan d'expériences :

Dans le but de valider une méthode analytique, deux types d'échantillons ont été préparés de façon indépendante : les standards d'étalonnage et les standards de validation.

Les standards d'étalonnage sont des échantillons, de concentrations connues, préparés hors de la matrice et qui permettent d'établir la courbe d'étalonnage. Les étalons de calibration consistent en deux séries indépendantes, chacune comprenant quatre niveaux de concentration (1,0 ; 10,0 ; 25,0 ; 50,0 µg/mL), avec cinq répliques par niveau (n total = 40).

Les standards de validation sont les échantillons reconstitués dans la matrice contenant une concentration connue et dont la valeur est considérée comme vraie par consensus. Les étalons de validation consistent en deux séries indépendantes, chacune comprenant cinq niveaux de concentration (1,0 ; 5,0 ; 10,0 ; 25,0 et 50,0 µg/mL), avec trois répliques indépendants par niveau de concentration (n total = 30).

Fonction de réponse :

La fonction de réponse d'une méthode analytique est, à l'intérieur de l'intervalle de dosage, la relation existante entre la réponse (signal) et la concentration de la substance à examiner dans l'échantillon. La fonction de réponse monotone la plus simple qui exprime cette relation est appelée « courbe d'étalonnage ». Le Tableau 30 reprend les modèles de régression sélectionnés. Ces modèles ont été triés en fonction de leur « indice d'exactitude ».

Tableau 30 : Modèles d'étalonnage triés par 'Indice d'Exactitude'.

Modèle	Indice d'Exactitude	Limites inférieure et supérieure de quantification (µg/mL)	Indice d'Intervalle de Dosage	Indice de Fidélité	Indice de justesse
Régression linéaire pondérée (1/X)	0.7955	[2.996 , 50.07]	0.9593	0.6154	0.8528

Le modèle d'étalonnage sélectionné est : **Régression linéaire pondérée (1/X)**. Les courbes d'étalonnage obtenues pour ce modèle de régression (Tableau 31 et Figure 73) sont représentées

ANNEXES

par l'équation suivante : $Y = a + bX$; où Y = réponse analytique (en mAU*s) et X = concentration introduite (en $\mu\text{g/mL}$).

Tableau 31 : Paramètres de régression.

Série	Ordonnée à l'origine	Pente	r^2	d.d.l résiduels	SCR
Series_1	1.912	22.43	0.9959	18	1.5001E+04
Series_3	3.451	22.75	0.9967	18	1.2107E+04

r^2 = coefficient de détermination ; d.d.l. = degrés de liberté ; SCR = somme des carrés des résidus

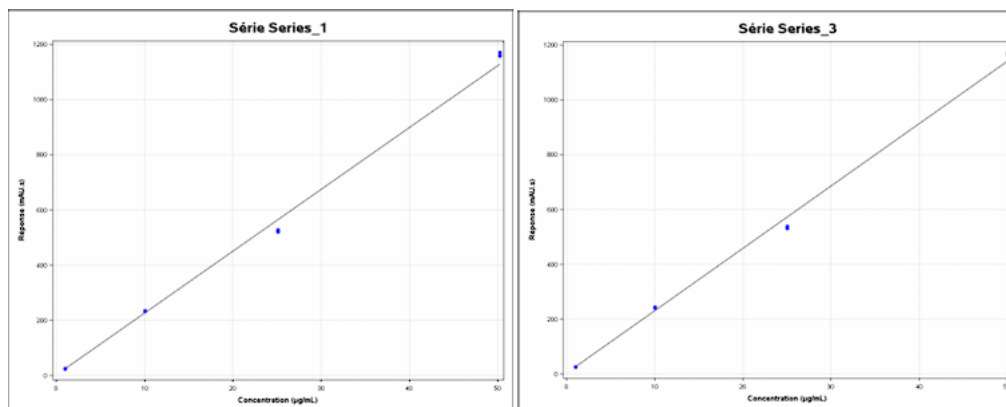


Figure 73 : Courbes d'étalonnage - Séries 1 et 3. Les réponses (mAU) sont représentées en ordonnée et les concentrations ($\mu\text{g/mL}$) en abscisse.

Justesse :

La justesse exprime l'étroitesse de l'accord entre la valeur moyenne obtenue à partir d'une large série de résultats d'essais et une valeur de référence acceptée comme telle. La justesse donne une indication sur les erreurs systématiques. Comme indiqué dans le Tableau 32, la justesse est exprimée en termes de biais absolu ($\mu\text{g/mL}$), de biais relatif (%) ou de taux de recouvrement (%) pour chaque niveau de concentration des standards de validation. Si pour un niveau de concentration, $\mu^{\wedge}$ est la moyenne des concentrations introduites et que $\bar{x}$ est l'estimation de la concentration moyenne obtenue à partir des concentrations calculées alors nous avons :

ANNEXES

$$\text{Biais absolu} = \bar{x} - \hat{\mu}$$

$$\text{Biais relatif (\%)} = 100 \times \frac{\bar{x} - \hat{\mu}}{\hat{\mu}}$$

$$\text{Taux de recouvrement (\%)} = 100 \times \frac{\bar{x}}{\hat{\mu}}$$

L'intervalle de confiance à 95% des recouvrements est calculé de la façon suivante :

$$L_{\text{taux de recouvrement}} = \left[\frac{\text{inferieure} \cdot 100}{\hat{\mu}}, \frac{\text{superieure} \cdot 100}{\hat{\mu}} \right]$$

où *inferieure* et *superieure* sont les limites normales inférieures et supérieures de confiance pour la moyenne des concentrations calculées de la façon suivante :

$$\bar{x} \pm t_{np-1; 1-\frac{\alpha}{2}} \cdot \frac{\hat{\sigma}}{\sqrt{np}}$$

où t est le quantile de la distribution de Student t à np-1 degrés de liberté, $\alpha = 0.05$, $\hat{\sigma}$ est la déviation standard empirique des concentrations, n est le nombre de répétitions par série et p est le nombre de séries.

Tableau 32 : Justesse.

Niveau de concentration (µg/mL)	Moyenne des concentrations introduites (µg/mL)	Moyenne des concentrations calculées (µg/mL)	Biais absolu (µg/mL)	Biais relatif (%)	Taux de recouvrement (%)	Intervalle de confiance 95% des recouvrements (%)
1.0	1.001	0.9656	-0.03567	-3.563	96.44	[91.15 , 101.7]
5.0	5.007	5.114	0.1073	2.143	102.1	[100.7 , 103.6]
10.0	10.01	10.52	0.5024	5.018	105.0	[103.5 , 106.5]
25.0	25.03	23.82	-1.213	-4.845	95.15	[94.47 , 95.84]
50.0	50.07	51.45	1.386	2.768	102.8	[101.9 , 103.7]

Fidélité :

La fidélité exprime l'étroitesse de l'accord entre une série de mesures provenant de multiples prises d'un même échantillon homogène dans des conditions prescrites. Elle donne des informations sur l'erreur aléatoire et est évaluée à deux niveaux : la répétabilité et la fidélité intermédiaire. Comme présenté dans le Tableau 33 et le Tableau 34, la fidélité (répétabilité et fidélité intermédiaire) peut être exprimée en écart type (SD) et en termes de coefficient de variation (CV). Les estimations des composantes de la variance sont obtenues par l'approche itérative du maximum de vraisemblance restreint (REML).

L'écart type (SD) de la fidélité intermédiaire est égal à :

$$\hat{\sigma}_{IP}^2 = \sqrt{\hat{\sigma}_B^2 + \hat{\sigma}_W^2}$$

L'équation permettant de calculer la limite supérieure de confiance à 95% de la fidélité intermédiaire est définie par l'équation suivante :

$$L_{U,\hat{\sigma}_{IP}} = \sqrt{\hat{\sigma}_{IP}^2 + \sqrt{\left(\frac{n-1}{\chi_{\alpha,n-1}^2} - 1\right)^2 \cdot \left(\frac{MSM}{p}\right)^2 + \left(\frac{JK-J}{\chi_{\alpha,np-n}^2} - 1\right)^2 \cdot \left(1 - \frac{1}{p}\right)^2 \cdot MSE^2}}$$

L'équation permettant de calculer la limite supérieure de confiance à 95% de la répétabilité est définie par l'équation suivante :

$$L_{U,\hat{\sigma}_W} = \sqrt{\nu \cdot \frac{\hat{\sigma}_W^2}{\chi_{\nu,1-\alpha}^2}}$$

où MSE est l'erreur quadratique moyenne pour estimer la variance de répétabilité, MSM est le carré moyen du modèle utilisé pour estimer la variance entre les séries, n est le nombre de répétitions par série, p est le nombre de séries, $\chi_{\nu,1-\alpha}^2$ est le quantile de distribution du Chi-carré à $1-\alpha = 0.95$ avec ν degrés de liberté, $\hat{\sigma}_B^2$ est l'estimation de la variance inter – série, $\hat{\sigma}_W^2$ est l'estimation de la variance intra – série, ν est le nombre de degrés de liberté calculés à l'aide de la méthode Satterthwaite.

ANNEXES

Tableau 33 : Répétabilité et Fidélité intermédiaire relatives.

Niveau de concentration (µg/mL)	Moyenne des concentrations introduites (µg/mL)	Répétabilité (CV%) ¹	Fidélité Intermédiaire (CV%) ¹
1.0	1.001	5.041	5.041
5.0	5.007	1.407	1.407
10.0	10.01	1.457	1.457
25.0	25.03	0.5771	0.6939
50.0	50.07	0.7293	0.9479

¹ Les CV en % de Répétabilité et de Fidélité Intermédiaire ont été obtenus en divisant l'écart-type (SD) obtenu par la moyenne des concentrations introduites correspondante.

Tableau 34 : Répétabilité et Fidélité intermédiaire absolues.

Niveau de concentration (µg/mL)	Moyenne des concentrations introduites (µg/mL)	Répétabilité (SD-µg/mL)	Inter-Séries (SD-µg/mL)	Ratio des composants de la variance (Inter / Intra)	Fidélité intermédiaire (SD-µg/mL)
1.0	1.001	0.05048	0	0	0.05048
5.0	5.007	0.07042	0	0	0.07042
10.0	10.01	0.1459	0	0	0.1459
25.0	25.03	0.1445	0.09646	0.4458	0.1737
50.0	50.07	0.3651	0.3032	0.6894	0.4746

Tableau 35 : Limite supérieure de confiance à 95%.

Niveau de concentration (µg/mL)	Moyenne des concentrations introduites (µg/mL)	Limite supérieure de confiance à 95% de la répétabilité (SD - µg/mL)	Limite supérieure de confiance à 95% de la fidélité intermédiaire (SD - µg/mL)
1.0	1.001	0.1055	0.1055
5.0	5.007	0.1471	0.1471
10.0	10.01	0.3049	0.3049
25.0	25.03	0.3427	2.037
50.0	50.07	0.8662	5.896

De plus, le taux de recouvrement de chaque série ainsi que de toutes les séries est rapporté dans le Tableau 36.

ANNEXES

Tableau 36 : Taux de recouvrement par série.

Niveau de concentration (µg/mL)	Série	Moyenne des concentrations introduites (µg/mL)	Concentration calculée (µg/mL)	Taux de recouvrement (%)
1.0	Series_1	1.002	0.9811	97.98
1.0	Series_3	1.001	0.9502	94.89
1.0	Moyenne de séries	1.001	0.9656	96.44
5.0	Series_1	5.008	5.098	101.8
5.0	Series_3	5.006	5.130	102.5
5.0	Moyenne de séries	5.007	5.114	102.1
10.0	Series_1	10.02	10.56	105.4
10.0	Series_3	10.01	10.48	104.6
10.0	Moyenne de séries	10.01	10.52	105.0
25.0	Series_1	25.04	23.91	95.52
25.0	Series_3	25.03	23.73	94.79
25.0	Moyenne de séries	25.03	23.82	95.15
50.0	Series_1	50.08	51.71	103.3
50.0	Series_3	50.06	51.19	102.2
50.0	Moyenne de séries	50.07	51.45	102.8

Incertitude de mesure :

L'incertitude est un paramètre associé au résultat de la mesure, qui caractérise la dispersion des valeurs qui pourrait raisonnablement être attribuée au mesurande (Tableau 37).

$$\text{Incertitude} = \sqrt{\hat{\sigma}_{IP}^2 \cdot \left(1 + \frac{1}{p \cdot n \cdot b^2}\right)}$$

$$\text{Incertitude Etendue} = 2 \cdot \text{Incertitude}$$

$$\text{Incertitude Relative} = 100 \cdot \frac{\text{Incertitude}}{\hat{\mu}}$$

$$\text{Incertitude Etendue Relative} = 100 \cdot \frac{\text{Incertitude Etendue}}{\hat{\mu}}$$

$$\text{Incertitude du Biais} = \sqrt{\hat{\sigma}_{IP}^2 \cdot \frac{1}{p \cdot n \cdot b^2}}$$

ANNEXES

où $\mu^{\wedge}$ est la moyenne des concentrations introduites, n est le nombre (moyen) de répétitions par série, p est le nombre de séries.

$$b = \sqrt{\frac{r + 1}{n \cdot r + 1}}$$

$$r = \frac{\hat{\sigma}_B^2}{\hat{\sigma}_W^2}$$

Tableau 37 : Incertitude.

Niveau de concentration (µg/mL)	Moyenne des concentrations introduites (µg/mL)	Incertitude du biais (µg/mL)	Incertitude (µg/mL)	Incertitude étendue (µg/mL)	Incertitude étendue relative (%)
1.0	1.001	0.02061	0.05453	0.1091	10.89
5.0	5.007	0.02875	0.07607	0.1527	3.039
10.0	10.01	0.05957	0.1576	0.3152	3.148
25.0	25.03	0.09017	0.1957	0.3914	1.564
50.0	50.07	0.2611	0.5416	1.083	2.164

Exactitude :

L'exactitude exprime l'étroitesse de l'accord entre le résultat d'essai et la valeur de référence acceptée comme telle, appelée également « valeur conventionnellement vraie ». L'exactitude prend en compte l'erreur totale, c'est à dire l'erreur systématique et l'erreur aléatoire liées au résultat. Par conséquent, l'exactitude est l'expression de la somme de la justesse et de la fidélité. Elle est estimée à partir du profil d'exactitude présenté en Figure 74.

Les limites d'acceptation ont été fixées à $\pm 10 \%$, et ceci en accord avec l'objectif de la procédure analytique.

Le profil d'exactitude est obtenu en reliant entre elles d'une part les bornes inférieures et d'autre part les bornes supérieures de l'intervalle de tolérance, bornes calculées pour chaque niveau de concentration. La formule utilisée pour le calcul de cet intervalle de tolérance est :

$$biais (\%) \pm kCV_{FI} (\%)$$

ANNEXES

La méthode est considérée comme valide pour l'intervalle de dosage où le profil d'exactitude est compris dans les limites d'acceptation fixées a priori. Cette approche garantit que seules 5.0 % des futures mesures d'échantillons inconnus seront en dehors de ces limites.

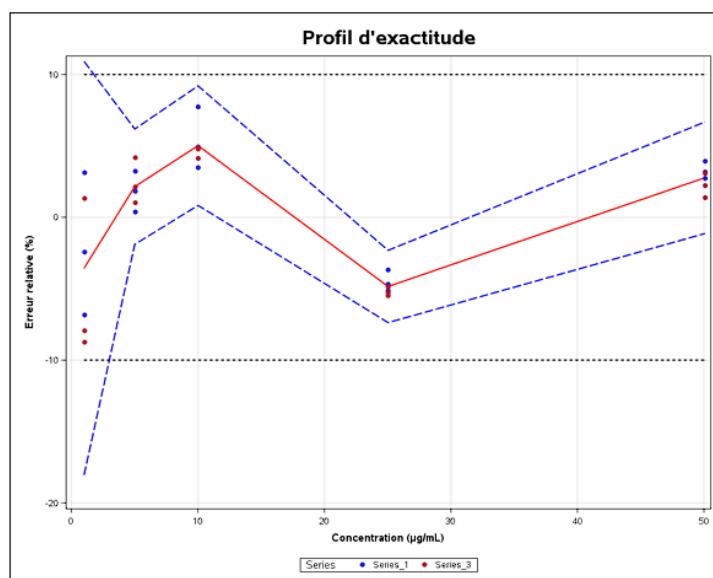


Figure 74 : Profil d'exactitude obtenu en considérant le modèle : Régression linéaire pondérée ($1/X$).

La ligne rouge continue représente le biais relatif, les lignes bleues discontinues définissent les limites de l'intervalle de tolérance attendues au niveau β et les lignes noires discontinues sont les limites d'acceptation. Les points sont quant à eux l'erreur relative des concentrations calculées et sont représentés en fonction de leurs concentrations cibles.

Les limites inférieures et supérieures de l'intervalle de tolérance exprimées en erreur relative sont également présentées dans le Tableau 38 pour chaque niveau de concentration introduit. Le risque d'avoir des mesures en dehors des limites d'acceptation à chaque niveau est calculé uniquement s'il y a au moins deux répétitions par série pour au moins une des séries (Figure 75).

ANNEXES

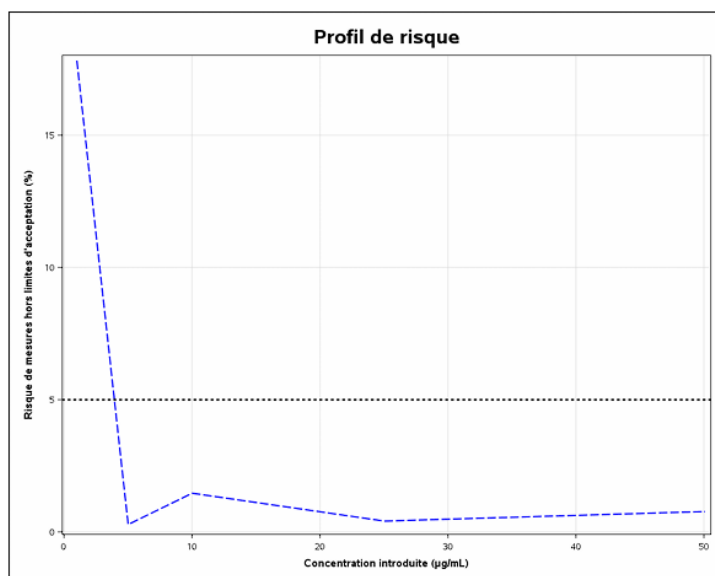


Figure 75 : Profil de risque obtenu en considérant le modèle : Régression linéaire pondérée ($1/X$).

La ligne pointillée noire représente le niveau de risque maximum choisi, à savoir : 5.0 %.

Tableau 38 : Exactitude de la méthode obtenue en considérant le modèle Régression linéaire pondérée ($1/X$).

Niveau de concentration (µg/mL)	Moyennes des concentrations introduites ¹ (µg/mL)	Limites de tolérance "B-expectation" (µg/mL)	Limites de tolérance "B-expectation" relatives (%)	Risque ² (%)
1.0	1.001	[0.8207 , 1.111]	[-18.04 , 10.92]	17.82
5.0	5.007	[4.912 , 5.316]	[-1.897 , 6.183]	0.2798
10.0	10.01	[10.10 , 10.93]	[0.8324 , 9.203]	1.463
25.0	25.03	[23.19 , 24.45]	[-7.377 , -2.313]	0.4089
50.0	50.07	[49.50 , 53.41]	[-1.137 , 6.673]	0.7700

¹ Les concentrations introduites et réponses associées peuvent avoir fait l'objet de transformations pour aligner les données sur une valeur moyenne de la concentration et ce par niveau.

² Le risque d'avoir des mesures en-dehors des limites d'acceptation.

ANNEXES

Linéarité des résultats :

La linéarité d'une méthode analytique est sa capacité à l'intérieur d'un certain intervalle de dosage d'obtenir des résultats directement proportionnels à la concentration en analyte dans l'échantillon.

Un modèle de régression linéaire (Figure 76) a été ajusté sur les concentrations calculées en fonction des concentrations introduites dans le but d'obtenir l'équation suivante : $Y = -0.2033 + 1.019 X$.

où Y = concentrations calculées (µg/mL) et X = concentrations introduites (µg/mL). Le coefficient de détermination (r^2) est égal à 0.9981. Le coefficient de corrélation (r) est égal à 0.9991. La somme des carrés des résidus (SCR) est égale à 18.90.

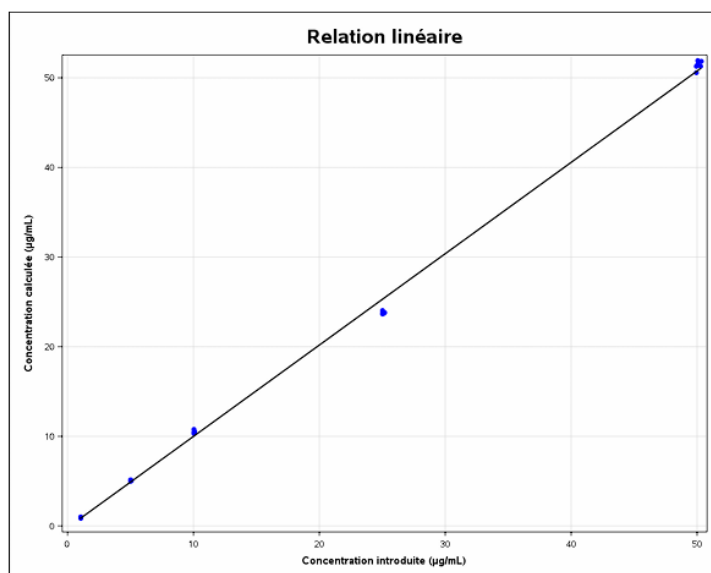


Figure 76 : Relation entre les concentrations introduites et calculées.

Dans le but de démontrer la linéarité de la méthode, l'approche basée sur l'intervalle de tolérance attendu au niveau β , exprimé en valeur absolue, peut être utilisé et est illustré dans la Figure 77.

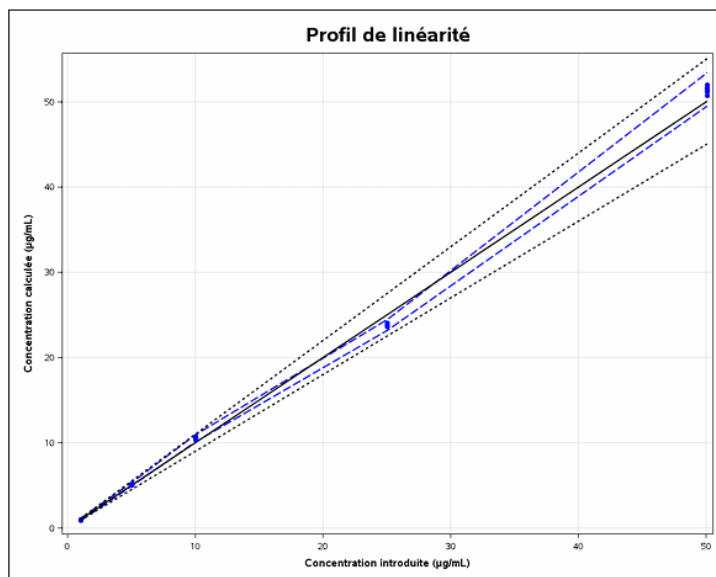


Figure 77 : Graphique de linéarité.

La ligne noire continue est la droite d'identité ($Y=X$). Les limites représentées par les lignes bleues discontinues sur le graphique correspondent au profil d'exactitude, c'est à dire les limites de tolérance "β-expectation" exprimées en valeur absolue. Ces limites sont calculées de la façon suivante :

$$\bar{x} \pm kS_{FI}$$

Les lignes noires discontinues représentent les limites d'acceptation exprimées dans l'unité de la concentration. La méthode est considérée comme valide là où l'intervalle de tolérance représenté par les lignes discontinues bleues est à l'intérieur des limites d'acceptation définies par les lignes pointillées noires.

La linéarité du modèle est démontrée quand les limites de l'intervalle de tolérance exprimées en absolu sont incluses dans les limites d'acceptation.

Limite de détection (LD), limites de quantification (LQ) et intervalle de dosage :

La limite de détection d'une procédure d'analyse est la plus petite quantité de l'analyte dans un échantillon pouvant être détectée, mais non quantifiée comme une valeur exacte dans les conditions expérimentales décrites de la procédure.

ANNEXES

Il existe deux façons de calculer la LD :

- $LD = LQ/3.3$
- En utilisant Miller & Miller (non applicable si un seul niveau et pas de répétition) :
 - Détermination par série de Y_{LD} = Ordonnée à l'origine (0 si négative) + 3 * Déviation standard résiduelle obtenue par ANOVA. A l'aide du modèle de régression choisi, la concentration calculée, X_{LD} sera déterminée pour chaque série.
 - La moyenne des X_{LD} sur toutes les séries définira la LD de la procédure analytique.

L'application choisit la plus petite valeur.

$$LD (\mu\text{g/mL}) = 0.6812$$

La limite inférieure de quantification est la plus petite quantité de l'analyte dans un échantillon pouvant être dosée dans les conditions expérimentales décrites, avec une exactitude définie. La définition peut également être appliquée pour la limite supérieure de quantification, qui est la plus grande quantité de l'analyte dans l'échantillon pouvant être dosée dans les conditions expérimentales décrites, avec une exactitude définie. Les limites de quantification sont obtenues en calculant la plus petite et la plus grande concentration pour lesquelles les limites d'exactitude, c'est à dire les limites de l'intervalle de tolérance attendu au niveau β , sortent des limites d'acceptation.

L'intervalle de dosage est l'intervalle compris entre les limites inférieure et supérieure de quantification où la procédure analytique atteint l'exactitude souhaitée.

$$\text{Limite inférieure de quantification (LQInf)} (\mu\text{g/mL}) = 2.996$$

$$\text{Limite supérieure de quantification (LQSup)} (\mu\text{g/mL}) = 50.07$$

IV. Annexe IV : Méthode de dosage par LC-MS/MS (Synovo GmbH)

La dexaméthasone a été dosée dans les échantillons à l'aide d'un système Agilent 1260 Infinity couplé à un détecteur LC-MS/MS triple quadripôle Sciex API 4500, en suivant la transition spécifique de l'ion précurseur vers l'ion produit 393,0/373,2.

La séparation chromatographique a été réalisée à l'aide d'une colonne Dr. Maisch Reprosil-pur Phenyl (50 × 2 mm, 3 µm). La phase mobile était composée d'eau contenant 0,1% d'acide formique (éluant A) et d'acétonitrile contenant 0,1% d'acide formique (éluant B).

Le gradient utilisé était le suivant : 95% A / 5% B pendant 1 min, puis passage à 100% B en 2 min, maintien à 100% B pendant 3 min, retour à 95% A / 5% B en 1 min, puis maintien à 95% A pendant 3 min.

La courbe d'étalonnage, couvrant une gamme de concentrations de 0,5 à 10 000 nmol/L, ainsi que les contrôles qualité à 10, 100 et 1 000 nmol/L, ont été préparés par dilutions successives dans l'éthanol.

Les limites inférieure et supérieure de quantification (LLOQ, *Lower Limit of Quantification*, et ULOQ, *Upper Limit of Quantification*) des analytes ont été déterminées sur la base de l'évaluation de la linéarité de la courbe de réponse.

V. Annexe V : Supplementary materials of the article "Pilot scale transfer and optimization of an innovative supercritical CO₂ PGSS method for the production of drug-encapsulating liposomes"

Supplementary Figure

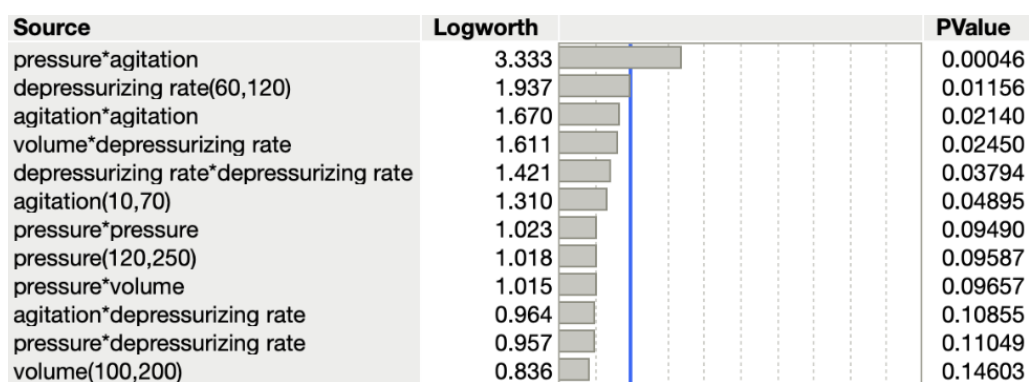


Figure 78 : Evaluation of influences of different terms on the depend variables via p-value (for section "II.3.2.3.2 Study of the impact of PGSS production parameters on liposome characteristics using the design of experiments approach", page 233).

Supplementary Table

Table 39 : Experimental conditions with results of 22 experiments from the A-optimal design (for section "II.3.2.2.2.3 Design of Experiment (DoE): production parameters optimization", page 227).

No.	Bloc	Pressure (bar)	Agitation (%)	Volume (mL)	Depressurisation rate (bar/min)	Size (nm)	PdI
1	1	245	10	100	120	161.2	0.38
2		120	70	100	120	141.2	0.42
3	2	193	40	150	90	138.8	0.41
4		262	70	200	60	218.3	0.40
5	3	250	10	200	90	186.0	0.38
6		250	70	150	120	565.0	0.73
7	4	190	70	150	90	259.6	0.40
8		250	40	100	60	194.8	0.35
9	5	191	40	150	60	147.0	0.41
10		120	70	200	120	217.2	0.50
11	6	120	40	150	90	198.2	0.50
12		185	10	100	60	183.0	0.38
13	7	259	40	200	120	248.3	0.52
14		250	70	100	90	352.7	0.49
15	8	250	10	150	60	180.7	0.35
16		120	10	200	60	253.1	0.41
17	9	127	70	100	60	125.6	0.43
18		187	40	100	120	141.2	0.43
19	10	185	10	200	120	222.9	0.45
20		120	10	100	90	265.8	0.44
21	11	185	40	200	90	219.0	0.48
22		120	10	150	120	252.7	0.44

RÉFÉRENCES

Références

- [1] L.M. Haile, K. Kamenov, P.S. Briant, A.U. Orji, J.D. Steinmetz, A. Abdoli, M. Abdollahi, E. Abu-Gharbieh, A. Afshin, H. Ahmed, T.A. Rashid, Y. Akalu, F. Alahdab, F.M. Alanezi, T.M. Alanzi, H.A. Hamad, L. Ali, V. Alipour, R.M. Al-Raddadi, H. Amu, J. Arabloo, M. Arab-Zozani, J. Arulappan, C. Ashbaugh, D.D. Atnafu, Z.-U.-D. Babar, A.A. Baig, P.C. Banik, T.W. Bärnighausen, A. Barrow, R.G. Bender, A.S. Bhagavathula, N. Bhardwaj, P. Bhardwaj, S. Bibi, A. Bijani, K. Burkart, C.R. Cederroth, J. Charan, S.G. Choudhari, D.-T. Chu, R.A.S. Couto, A.B. Dagneu, B. Dagneu, S.M.A. Dahlawi, X. Dai, L. Dandona, R. Dandona, A. Desalew, D. Dhamnetiya, M.L. Dhimal, M. Dhimal, K.E. Doyle, B.B. Duncan, M. Ekholuenetale, I. Filip, F. Fischer, R.C. Franklin, A.M. Gaidhane, S. Gaidhane, S. Gallus, F. Ghamari, A. Ghashghaee, G. Ghozali, S.A. Gilani, I.-R. Glavan, M. Golechha, B.N.G. Goulart, V.B. Gupta, V.K. Gupta, S. Hamidi, B.R. Hammond, S.I. Hay, K. Hayat, G. Heidari, H.J. Hoffman, K.P. Hopf, M. Hosseinzadeh, M. Househ, R. Hussain, B.-F. Hwang, I. Iavicoli, S.E. Ibitoye, O.S. Ilesanmi, S.S.N. Irvani, S.M.S. Islam, M. Iwagami, L. Jacob, S.K. Jayapal, R.P. Jha, J.B. Jonas, R. Kalhor, N.K. Al-Salihi, H. Kandel, A.S. Kasa, G.A. Kayode, R. Khalilov, E.A. Khan, M.N. Khatib, S. Kosen, A. Koyanagi, G.A. Kumar, I. Landires, S. Lasrado, S.S. Lim, X. Liu, S.W. Lobo, A. Lugo, A. Makki, W. Mendoza, A.G. Mersha, K.M. Mihretie, T.R. Miller, S. Misra, T.A. Mohamed, M. Mohammadi, A. Mohammadian-Hafshejani, A. Mohammed, A.H. Mokdad, M.A. Moni, S.N. Kandel, H.L.T. Nguyen, M.R. Nixon, J.J. Noubiap, V. Nuñez-Samudio, B. Oancea, V.M. Oguoma, A.T. Olagunju, B.O. Olusanya, J.O. Olusanya, H. Orru, M.O. Owolabi, J.R. Padubidri, K. Pakshir, S. Pardhan, F.P. Kan, M. Pasovic, S. Pawar, H.Q. Pham, M. Pinheiro, A. Pourshams, N. Rabiee, M. Rabiee, A. Radfar, F. Rahim, V. Rahimi-Movaghar, M.H.U. Rahman, M. Rahman, A.M. Rahmani, J. Rana, C.R. Rao, S.J. Rao, V. Rashedi, D.L. Rawaf, S. Rawaf, A.M.N. Renzaho, A. Rezapour, R.K. Ripon, V. Rodrigues, N. Rustagi, U. Saeed, A. Sahebkar, A.M. Samy, M.M. Santric-Milicevic, B. Sathian, M. Satpathy, M. Sawhney, W. Schlee, M.I. Schmidt, A. Seylani, M.A. Shaikh, M. Shannawaz, W.S. Shiferaw, S. Siabani, A. Singal, J.A. Singh, J.K. Singh, D. Singhal, V.Y. Skryabin, A.A. Skryabina, H. Sotoudeh, E.E. Spurlock, B.W. Taddele, A.T. Tamiru, M.I. Tareque, R. Thapar, M.R. Tovani-Palone, B.X. Tran, S. Ullah, S.V. Tahbaz, F.S. Violante, V. Vlassov, B. Vo, A. Vongpradith, G.T. Vu, J. Wei, A. Yadollahpour, S.H.Y. Jabbari, Y. Yeshaw, V. Yigit, B.W. Yirdaw, N. Yonemoto, C. Yu, I. Yunusa, M. Zamani, M.S. Zastrozhin, A. Zastrozhina, Z.-J. Zhang, J.T. Zhao, C.J.L. Murray, A.C. Davis, T. Vos, S. Chadha, Hearing loss prevalence and years lived with disability, 1990–2019: findings from the Global Burden of Disease Study 2019, *The Lancet* 397 (2021) 996–1009. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00516-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00516-X).
- [2] Organisation mondiale de la santé (OMS), Surdité et déficit auditif, (n.d.). <https://www.who.int/fr/health-topics/hearing-loss> (accessed March 29, 2023).
- [3] G. Livingston, J. Huntley, A. Sommerlad, D. Ames, C. Ballard, S. Banerjee, C. Brayne, A. Burns, J. Cohen-Mansfield, C. Cooper, S.G. Costafreda, A. Dias, N. Fox, L.N. Gitlin, R. Howard, H.C. Kales, M. Kivim ki, E.B. Larson, A. Ogunniyi, V. Orgeta, K. Ritchie, K. Rockwood, E.L. Sampson, Q. Samus, L.S. Schneider, G. Selb ek, L. Teri, N. Mukadam, Dementia prevention, intervention, and care: 2020 report of the Lancet Commission, *Lancet* 396 (2020) 413–446. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30367-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30367-6).
- [4] A. Sheikh, Bint-e-Zainab, K. Shabbir, A. Imtiaz, Structure and Physiology of Human Ear Involved in Hearing, in: *Auditory System - Function and Disorders*, IntechOpen, 2022. <https://doi.org/10.5772/intechopen.105466>.
- [5] Z. Qing, D. Mao-li, Anatomy and physiology of peripheral auditory system and common causes of hearing loss, *Journal of Otology* (2009). [https://doi.org/10.1016/s1672-2930\(09\)50002-5](https://doi.org/10.1016/s1672-2930(09)50002-5).

RÉFÉRENCES

- [6] M.V. Goycoolea, L. Lundman, Round window membrane. Structure function and permeability: A review, *Microscopy Research and Technique* 36 (1997) 201–211. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0029\(19970201\)36:3%3C201::AID-JEMT8%3E3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0029(19970201)36:3%3C201::AID-JEMT8%3E3.0.CO;2-R).
- [7] J.E. Hall, M.E. Hall, The Sense of Hearing, in: *Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology*, 14th Edition, Saunders Elsevier, Jackson, Mississippi, USA, 2021: pp. 663–673. <https://library.uniq.edu.iq/storage/books/file/Medical%20physiology/1669720301Guyton%20and%20Hall%202021%20Textbook%20of%20Medical%20Physiology%2014th%20Ed.pdf> (accessed April 3, 2026).
- [8] E. Ferrary, V. Couloigner, O. Sterkers, *Physiologie des liquides labyrinthiques*, EMC - Oto-rhino-laryngologie (2007). [https://doi.org/10.1016/S0246-0351\(07\)41887-6](https://doi.org/10.1016/S0246-0351(07)41887-6).
- [9] A. Recio-Spinoso, W. Dong, J.S. Oghalai, On the Tonotopy of the Low-Frequency Region of the Cochlea, *J Neurosci* 43 (2023) 5172–5179. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0249-23.2023>.
- [10] D. Purves, G.J. Augustine, D. Fitzpatrick, L.C. Katz, A.-S. LaMantia, J.O. McNamara, S.M. Williams, The Audible Spectrum, in: *Neuroscience*, 2nd edition, Sinauer Associates, 2001. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK10924/> (accessed April 4, 2026).
- [11] National Research Council (US) Committee on Disability Determination for Individuals with Hearing Impairments, Basics of Sound, the Ear, and Hearing, in: R.A. Dobie, S.V. Hemel (Eds.), *Hearing Loss: Determining Eligibility for Social Security Benefits*, National Academies Press (US), 2004. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK207834/> (accessed June 27, 2026).
- [12] R. Pujol, Neurobiologie de la cochlée, *Med Sci (Paris)* 6 (1990) 456–463. <https://doi.org/10.4267/10608/4168>.
- [13] R. Fettiplace, C.M. Hackney, The sensory and motor roles of auditory hair cells, *Nat Rev Neurosci* 7 (2006) 19–29. <https://doi.org/10.1038/nrn1828>.
- [14] J. Ashmore, Cochlear Outer Hair Cell Motility, *Physiological Reviews* 88 (2008) 173–210. <https://doi.org/10.1152/physrev.00044.2006>.
- [15] S.E. Ellsperman, E.M. Nairn, E.Z. Stucken, Review of Bone Conduction Hearing Devices, *Audiology Research* 11 (2021) 207–219. <https://doi.org/10.3390/audiolres11020019>.
- [16] A.C.Y. Wong, A.F. Ryan, Mechanisms of sensorineural cell damage, death and survival in the cochlea, *Front. Aging Neurosci.* 7 (2015). <https://doi.org/10.3389/fnagi.2015.00058>.
- [17] N. Uehara, T. Fujita, D. Yamashita, J. Yokoi, S. Katsunuma, A. Kakigi, S. Nishio, K. Nibu, S. Usami, Genetic background in late-onset sensorineural hearing loss patients, *J Hum Genet* 67 (2022) 223–230. <https://doi.org/10.1038/s10038-021-00990-2>.
- [18] S. Morrill, D.Z.Z. He, Apoptosis in inner ear sensory hair cells, *J Otol* 12 (2017) 151–164. <https://doi.org/10.1016/j.joto.2017.08.001>.
- [19] Regeneron Pharmaceuticals Inc., Otarmeni™ (lunsotogene parvec-cwha) Approved by FDA as First and Only Gene Therapy for Genetic Hearing Loss; Regeneron to Provide Otarmeni for Free in the U.S., Regeneron / Press Releases (2026). <https://investor.regeneron.com/news-releases/news-release-details/otarmenitm-lunsotogene-parvec-cwha-approved-fda-first-and-only/> (accessed June 19, 2026).
- [20] S.R. Atcherson, C. Moreland, P. Zazove, M.M. McKee, Hearing Loss: Hearing Augmentation, *FP Essent* 434 (2015) 18–23.
- [21] C.W. Turner, B.J. Gantz, S. Karsten, J. Fowler, L.A. Reiss, Impact of Hair Cell Preservation in Cochlear Implantation: Combined Electric and Acoustic Hearing, *Otology & Neurotology* 31 (2010) 1227. <https://doi.org/10.1097/MAO.0b013e3181f24005>.
- [22] R. Pujol, J.-L. Puel, S. Blatrix, S. Le Merre, T. Pujol, M. Camillieri, J. Ducourneau, Traumatisme acoustique: Facteurs de risque, *Voyage au centre de l'audition* (n.d.).

RÉFÉRENCES

- <https://www.cochlea.eu/pathologie/surdites-neuro-sensorielles/traumatisme-acoustiqu/> (accessed April 5, 2026).
- [23] Diffuser du son amplifié: les règles et autorisations requises, (2026). <https://environnement.brussels/pro/reglementation-et-inspection/obligations-et-autorisations/diffuser-du-son-amplifie-les-regles-et-autorisations-requises> (accessed April 6, 2026).
- [24] Directive 2003/10/EC of the European Parliament and of the Council of 6 February 2003 on the minimum health and safety requirements regarding the exposure of workers to the risks arising from physical agents (noise) (Seventeenth individual Directive within the meaning of Article 16(1) of Directive 89/391/EEC), 2003. <http://data.europa.eu/eli/dir/2003/10/oj> (accessed April 6, 2026).
- [25] D. Henderson, E.C. Bielefeld, K.C. Harris, B.H. Hu, The Role of Oxidative Stress in Noise-Induced Hearing Loss, *Ear and Hearing* 27 (2006) 1. <https://doi.org/10.1097/01.aud.0000191942.36672.f3>.
- [26] A. Kurabi, E.M. Keithley, G.D. Housley, A.F. Ryan, A.C.-Y. Wong, Cellular mechanisms of noise-induced hearing loss, *Hearing Research* 349 (2017) 129–137. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2016.11.013>.
- [27] R. Fettiplace, J.-H. Nam, Tonotopy in calcium homeostasis and vulnerability of cochlear hair cells, *Hear Res* 376 (2019) 11–21. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2018.11.002>.
- [28] A.R. Saidia, F. François, F. Casas, I. Mechaly, S. Venteo, J.T. Veechi, J. Ruel, J.-L. Puel, J. Wang, Oxidative Stress Plays an Important Role in Glutamatergic Excitotoxicity-Induced Cochlear Synaptopathy: Implication for Therapeutic Molecules Screening, *Antioxidants (Basel)* 13 (2024) 149. <https://doi.org/10.3390/antiox13020149>.
- [29] N. Choi, J.S. Kim, Y.-S. Chang, Comparison of oral steroid regimens for acute acoustic trauma caused by gunshot noise exposure, *The Journal of Laryngology & Otology* 133 (2019) 566–570. <https://doi.org/10.1017/S002221511900121X>.
- [30] E. Zloczower, N. Tsur, S. Hershkovich, N. Fink, T. Marom, Efficacy of Oral Steroids for Acute Acoustic Trauma, *Audiol Neurotol* 27 (2022) 312–320. <https://doi.org/10.1159/000522051>.
- [31] G. Van Haesendonck, V. Van Rompaey, A. Gilles, V. Topsakal, A. Et., Otologic Outcomes After Blast Injury: The Brussels Bombing Experience, *Otology & Neurotology* (2018). <https://doi.org/10.1097/mao.0000000000002012>.
- [32] M.M. Ahmed, R.J. Allard, C.R. Esquivel, Noise-Induced Hearing Loss Treatment: Systematic Review and Meta-analysis, *Mil Med* 187 (2022) e661–e666. <https://doi.org/10.1093/milmed/usaa579>.
- [33] A.B. Bayoumy, J.A. de Ru, Acute acoustic trauma requires urgent treatment within 72 h for optimal outcomes: results from the Dutch armed forces, *Eur Arch Otorhinolaryngol* 282 (2025) 3813–3814. <https://doi.org/10.1007/s00405-025-09284-1>.
- [34] S. Welber, Y. Oron, O. Handzel, R. Abu-Eta, N. Muhanna, S. Shilo, O.J. Ungar, Recovery rate after acute acoustic trauma: a case series and meta-analysis, *Eur Arch Otorhinolaryngol* 281 (2024) 6303–6316. <https://doi.org/10.1007/s00405-024-08847-y>.
- [35] Y.-S. Chang, K. Bang, N. Choi, J.S. Kim, G.-G. Lee, Factors Associated With the Benefits of Concurrent Administration of Intratympanic Steroid Injection With Oral Steroids in Patients With Acute Acoustic Trauma, *Otol Neurotol* 39 (2018) 565–570. <https://doi.org/10.1097/MAO.0000000000001784>.
- [36] Y. Zhou, G. Zheng, H. Zheng, R. Zhou, X. Zhu, Q. Zhang, Primary Observation of Early Transtympanic Steroid Injection in Patients with Delayed Treatment of Noise-Induced Hearing Loss, *Audiol Neurotol* 18 (2013) 89–94. <https://doi.org/10.1159/000345208>.
- [37] Y.-S. Chang, K.H. Bang, B. Jeong, G.-G. Lee, Effects of early intratympanic steroid injection in patients with acoustic trauma caused by gunshot noise, *Acta Otolaryngol* 137 (2017) 716–719. <https://doi.org/10.1080/00016489.2017.1280850>.

RÉFÉRENCES

- [38] C.R. Esquivel, M. Parker, K. Curtis, A. Merkley, P. Littlefield, G. Conley, S. Wise, B. Feldt, L. Henselman, Z. Stockinger, Clinical Practice Guideline: Aural Blast Injury/Acoustic Trauma and Hearing Loss, Joint Trauma System, USA, 2018. <https://doi.org/10.1093/milmed/usy167>.
- [39] S. Muzaffar, L. Orr, R. Rickard, C. Coulson, R. Irving, Mitigating noise-induced hearing loss after blast injury, *Trauma* 21 (2019) 121–127. <https://doi.org/10.1177/1460408618755191>.
- [40] T. Okano, T. Nakagawa, T. Kita, T. Endo, J. Ito, Cell–Gene Delivery of Brain-Derived Neurotrophic Factor to the Mouse Inner Ear, *Molecular Therapy* 14 (2006) 866–871. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2006.06.012>.
- [41] S. Mukherjee, M. Kuroiwa, W. Oakden, B.T. Paul, A. Noman, J. Chen, V. Lin, A. Dimitrijevic, G. Stanis, T.N. Le, Local magnetic delivery of adeno-associated virus AAV2(quad Y-F)-mediated BDNF gene therapy restores hearing after noise injury, *Mol Ther* 30 (2022) 519–533. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2021.07.013>.
- [42] Q. Yu, S. Liu, R. Guo, K. Chen, Y. Li, D. Jiang, S. Gong, L. Yin, K. Liu, Complete Restoration of Hearing Loss and Cochlear Synaptopathy via Minimally Invasive, Single-Dose, and Controllable Middle Ear Delivery of Brain-Derived Neurotrophic Factor–Poly(dl-lactic acid-co-glycolic acid)-Loaded Hydrogel, *ACS Nano* 18 (2024) 6298–6313. <https://doi.org/10.1021/acsnano.3c11049>.
- [43] S. Liu, R. Li, F. Wang, Y. Wang, K. Liu, Inner ear transplantation of cochlear progenitor cells restores acute sensorineural hearing loss, *Neuroscience* 601 (2026) 37–44. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2026.02.046>.
- [44] C. Jaudoin, F. Carré, M. Gehrke, A. Sogaldi, V. Steinmetz, N. Hue, C. Cailleau, G. Tourrel, Y. Nguyen, E. Ferrary, F. Agnely, A. Bochot, Transtympanic injection of a liposomal gel loaded with N-acetyl-L-cysteine: A relevant strategy to prevent damage induced by cochlear implantation in guinea pigs?, *International Journal of Pharmaceutics* 604 (2021) 120757. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120757>.
- [45] J.C. Gausterer, N. Saidov, N. Ahmadi, C. Zhu, M. Wirth, G. Reznicek, C. Arnoldner, F. Gabor, C. Honeder, Intratympanic application of poloxamer 407 hydrogels results in sustained N-acetylcysteine delivery to the inner ear, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 150 (2020) 143–155. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2020.03.005>.
- [46] Q. Lin, Q. Guo, M. Zhu, J. Zhang, B. Chen, T. Wu, W. Jiang, W. Tang, Application of Nanomedicine in Inner Ear Diseases, *Front Bioeng Biotechnol* 9 (2022) 809443. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.809443>.
- [47] B.T. Jung, J. Kuthubutheen, J.D. Sharon, A.C. Foster, S. Erickson, H. Peris, E. De Juan, C.J. Limb, K.C. Farinas, J. Turner, A. Henton, A. Salt, Plasma Concentration as a Proxy for Perilymph Drug Levels: Preclinical and Clinical Dexamethasone Measures with a Long-Acting Formulation for Precise Delivery to the Round Window Membrane, *Otology & Neurotology* 46 (2025) 80. <https://doi.org/10.1097/MAO.0000000000004336>.
- [48] A. Liebau, S. Schilp, K. Mugridge, I. Schön, M. Kather, B. Kammerer, J. Tillein, S. Braun, S.K. Plontke, Long-Term in vivo Release Profile of Dexamethasone-Loaded Silicone Rods Implanted Into the Cochlea of Guinea Pigs, *Front. Neurol.* 10 (2020). <https://doi.org/10.3389/fneur.2019.01377>.
- [49] S.D. Rauch, C.F. Halpin, P.J. Antonelli, S. Babu, J.P. Carey, B.J. Gantz, J.A. Goebel, P.E. Hammerschlag, J.P. Harris, B. Isaacson, D. Lee, C.J. Linstrom, L.S. Parnes, H. Shi, W.H. Slattery, S.A. Telian, J.T. Vrabec, D.J. Reda, Oral vs Intratympanic Corticosteroid Therapy for Idiopathic Sudden Sensorineural Hearing Loss: A Randomized Trial, *JAMA* 305 (2011) 2071–2079. <https://doi.org/10.1001/jama.2011.679>.
- [50] D.-K. Kim, Nanomedicine for Inner Ear Diseases: A Review of Recent In Vivo Studies, *Biomed Res Int* 2017 (2017) 3098230. <https://doi.org/10.1155/2017/3098230>.

RÉFÉRENCES

- [51] S. Murillo-Cuesta, Né S. Vallecillo, R. Cediel, A.M. Celaya, L. Lassaletta, I. Varela-Nieto, J. Contreras, A Comparative Study of Drug Delivery Methods Targeted to the Mouse Inner Ear: Bullostomy Versus Transtympanic Injection, *JoVE (Journal of Visualized Experiments)* (2017) e54951. <https://doi.org/10.3791/54951>.
- [52] B. Szeto, H. Chiang, C. Valentini, M. Yu, J.W. Kysar, A.K. Lalwani, Inner ear delivery: Challenges and opportunities, *Laryngoscope Investig Otolaryngol* 5 (2019) 122–131. <https://doi.org/10.1002/lio2.336>.
- [53] R. Yang, T. Wei, H. Goldberg, W. Wang, K. Cullion, D.S. Kohane, Getting Drugs across Biological Barriers, *Adv Mater* 29 (2017) 10.1002/adma.201606596. <https://doi.org/10.1002/adma.201606596>.
- [54] J. Patel, M. Szczupak, S. Rajguru, C. Balaban, M.E. Hoffer, Inner Ear Therapeutics: An Overview of Middle Ear Delivery, *Front. Cell. Neurosci.* 13 (2019). <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00261>.
- [55] W. Li, J.J. Hartsock, C. Dai, A.N. Salt, Permeation Enhancers for Intratympanically-applied Drugs Studied Using Fluorescent Dexamethasone as a Marker, *Otol Neurotol* 39 (2018) 639–647. <https://doi.org/10.1097/MAO.0000000000001786>.
- [56] J.S. Han, Y.L. Kim, K. Park, J.H. Lim, H.-L. Kim, S.Y. Park, S.N. Park, Comparing round window membrane permeability enhancers: An animal study, *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 216 (2026) 107256. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2025.107256>.
- [57] M.V. Goycoolea, Clinical Aspects of Round Window Membrane Permeability Under Normal and Pathological Conditions, *Acta Oto-Laryngologica* 121 (2001) 437–447. <https://doi.org/10.1080/000164801300366552>.
- [58] A.A. Mikulec, J.J. Hartsock, A.N. Salt, Permeability of the Round Window Membrane Is Influenced by the Composition of Applied Drug Solutions and by Common Surgical Procedures, *Otology & Neurotology* 29 (2008) 1020. <https://doi.org/10.1097/MAO.0b013e31818658ea>.
- [59] N.J. Creber, H.T. Eastwood, A.J. Hampson, J. Tan, S.J. O'Leary, Adjuvant agents enhance round window membrane permeability to dexamethasone and modulate basal to apical cochlear gradients, *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 126 (2019) 69–81. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2018.08.013>.
- [60] S. Soares, J. Sousa, A. Pais, C. Vitorino, Nanomedicine: Principles, Properties, and Regulatory Issues, *Front Chem* 6 (2018) 360. <https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00360>.
- [61] P. Liu, G. Chen, J. Zhang, A Review of Liposomes as a Drug Delivery System: Current Status of Approved Products, Regulatory Environments, and Future Perspectives, *Molecules* 27 (2022). <https://doi.org/10.3390/molecules27041372>.
- [62] X. Ma, Y. Tian, R. Yang, H. Wang, L.W. Allahou, J. Chang, G. Williams, J.C. Knowles, A. Poma, Nanotechnology in healthcare, and its safety and environmental risks, *J Nanobiotechnol* 22 (2024) 715. <https://doi.org/10.1186/s12951-024-02901-x>.
- [63] A.A. Halwani, Development of Pharmaceutical Nanomedicines: From the Bench to the Market, *Pharmaceutics* 14 (2022) 106. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14010106>.
- [64] H. Meyer, T. Stöver, F. Fouchet, G. Bastiat, P. Saulnier, W. Bäumer, T. Lenarz, V. Scheper, Lipidic nanocapsule drug delivery: neuronal protection for cochlear implant optimization, *Int J Nanomedicine* 7 (2012) 2449–2464. <https://doi.org/10.2147/IJN.S29712>.
- [65] P. Trucillo, R. Campardelli, E. Reverchon, Liposomes: From Bangham to Supercritical Fluids, *Processes* 8 (2020). <https://doi.org/10.3390/pr8091022>.
- [66] F. Mazur, M. Bally, B. Städler, R. Chandrawati, Liposomes and lipid bilayers in biosensors, *Advances in Colloid and Interface Science* 249 (2017) 88–99. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2017.05.020>.

RÉFÉRENCES

- [67] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, The Lipid Bilayer, in: *Molecular Biology of the Cell*, 4th edition, Garland Science, 2002. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26871/> (accessed April 28, 2026).
- [68] H. Nsairat, D. Khater, U. Sayed, F. Odeh, A. Al Bawab, W. Alshaer, Liposomes: structure, composition, types, and clinical applications, *Heliyon* 8 (2022) e09394. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09394>.
- [69] A. Lorin, C. Flore, A. Thomas, R. Brasseur, Les liposomes : description, fabrication et applications, *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement* 8 (2004) 163–176.
- [70] J. Li, X. Wang, T. Zhang, C. Wang, Z. Huang, X. Luo, Y. Deng, A review on phospholipids and their main applications in drug delivery systems, *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* 10 (2015) 81–98. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2014.09.004>.
- [71] S. Maritim, P. Boulas, Y. Lin, Comprehensive analysis of liposome formulation parameters and their influence on encapsulation, stability and drug release in glibenclamide liposomes, *International Journal of Pharmaceutics* 592 (2021) 120051. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.120051>.
- [72] Avanti Polar Lipids, Product Finder | Avanti Research, (n.d.). <https://www.avantiresearch.com/en-gb/products> (accessed April 28, 2026).
- [73] M.-L. Briuglia, C. Rotella, A. McFarlane, D.A. Lamprou, Influence of cholesterol on liposome stability and on in vitro drug release, *Drug Deliv. and Transl. Res.* 5 (2015) 231–242. <https://doi.org/10.1007/s13346-015-0220-8>.
- [74] S. Pande, Liposomes for drug delivery: review of vesicular composition, factors affecting drug release and drug loading in liposomes, *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology* 51 (2023) 428–440. <https://doi.org/10.1080/21691401.2023.2247036>.
- [75] V.G.S. Sainaga Jyothi, R. Bulusu, B. Venkata Krishna Rao, M. Pranothi, S. Banda, P. Kumar Bolla, N. Kommineni, Stability characterization for pharmaceutical liposome product development with focus on regulatory considerations: An update, *International Journal of Pharmaceutics* 624 (2022) 122022. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2022.122022>.
- [76] J. Carrillo-Romero, L. Fernández-Méndez, E. de la Iglesia, A. Katsumiti, L. Germán, D.D. Silvio, J. Ruiz-Cabello, S. Carregal-Romero, F. Goñi-de-Cerio, In Vitro Evaluation of the Effect of Size and PEGylation on Inhalable Liposomes for Pulmonary Drug Delivery, *Nanomaterials* 16 (2026). <https://doi.org/10.3390/nano16030200>.
- [77] T.J. Evjen, E.A. Nilssen, R.A. Fowler, S. Røgnvaldsson, M. Brandl, S.L. Fossheim, Lipid membrane composition influences drug release from dioleoylphosphatidylethanolamine-based liposomes on exposure to ultrasound, *International Journal of Pharmaceutics* 406 (2011) 114–116. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.12.026>.
- [78] G. Chahal, K. Helbig, R. Parton, E. Monson, The Biology of Endosomal Escape: Strategies for Enhanced Delivery of Therapeutics, *ACS Nano* 20 (n.d.) 1789–1813. <https://doi.org/10.1021/acsnano.5c18112>.
- [79] L. Zhang, Y. Xu, W. Cao, S. Xie, L. Wen, G. Chen, Understanding the translocation mechanism of PLGA nanoparticles across round window membrane into the inner ear: a guideline for inner ear drug delivery based on nanomedicine, *IJN* 13 (2018) 479–492. <https://doi.org/10.2147/IJN.S154968>.
- [80] T.B. Gandek, L. van der Koog, A. Nagelkerke, A Comparison of Cellular Uptake Mechanisms, Delivery Efficacy, and Intracellular Fate between Liposomes and Extracellular Vesicles, *Adv Healthc Mater* 12 (2023) 2300319. <https://doi.org/10.1002/adhm.202300319>.
- [81] J.H. Kang, W.Y. Jang, Y.T. Ko, The Effect of Surface Charges on the Cellular Uptake of Liposomes Investigated by Live Cell Imaging, *Pharm Res* 34 (2017) 704–717. <https://doi.org/10.1007/s11095-017-2097-3>.
- [82] J. Huotari, A. Helenius, Endosome maturation, *EMBO J* 30 (2011) 3481–3500. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.286>.

RÉFÉRENCES

- [83] U.S. Huth, R. Schubert, R. Peschka-Süss, Investigating the uptake and intracellular fate of pH-sensitive liposomes by flow cytometry and spectral bio-imaging, *Journal of Controlled Release* 110 (2006) 490–504. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2005.10.018>.
- [84] M.K. Riaz, M.A. Riaz, X. Zhang, C. Lin, K.H. Wong, X. Chen, G. Zhang, A. Lu, Z. Yang, Surface Functionalization and Targeting Strategies of Liposomes in Solid Tumor Therapy: A Review, *Int J Mol Sci* 19 (2018) 195. <https://doi.org/10.3390/ijms19010195>.
- [85] N.T.T. Le, V.D. Cao, T.N.Q. Nguyen, T.T.H. Le, T.T. Tran, T.T. Hoang Thi, Soy Lecithin-Derived Liposomal Delivery Systems: Surface Modification and Current Applications, *Int J Mol Sci* 20 (2019) 4706. <https://doi.org/10.3390/ijms20194706>.
- [86] Ż. Sobol, R. Chiczewski, D. Wątróbska-Swietlikowska, Advances in Liposomal Drug Delivery: Multidirectional Perspectives on Overcoming Biological Barriers, *Pharmaceutics* 17 (2025). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics17070885>.
- [87] L. Sercombe, T. Veerati, F. Moheimani, S.Y. Wu, A.K. Sood, S. Hua, Advances and Challenges of Liposome Assisted Drug Delivery, *Front Pharmacol* 6 (2015) 286. <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00286>.
- [88] European Medicines Agency (EMA), Medicines, (2023). <https://www.ema.europa.eu/en/medicines> (accessed April 23, 2026).
- [89] R. M. Senjab, N. AlSawaftah, W. H. Abuwatfa, G. A. Hussein, Advances in liposomal nanotechnology: from concept to clinics, *RSC Pharmaceutics* 1 (2024) 928–948. <https://doi.org/10.1039/D4PM00176A>.
- [90] J. Zou, H. Feng, R. Sood, P.K.J. Kinnunen, I. Pyykko, Biocompatibility of Liposome Nanocarriers in the Rat Inner Ear After Intratympanic Administration, *Nanoscale Res Lett* 12 (2017) 372. <https://doi.org/10.1186/s11671-017-2142-5>.
- [91] J. Zou, R. Sood, S. Ranjan, D. Poe, U.A. Ramadan, I. Pyykkö, P.K.J. Kinnunen, Size-Dependent Passage of Liposome Nanocarriers With Preserved Posttransport Integrity Across the Middle-Inner Ear Barriers in Rats, *Otology & Neurotology* 33 (2012) 666. <https://doi.org/10.1097/MAO.0b013e318254590e>.
- [92] K. Chen, F. Wang, R. Ding, Z. Cai, T. Zou, A. Zhang, D. Guo, B. Ye, W. Cui, M. Xiang, Adhesive and Injectable Hydrogel Microspheres for Inner Ear Treatment, *Small* 18 (2022) 2106591. <https://doi.org/10.1002/smll.202106591>.
- [93] E. Mamelie, N. El Kechai, V. Adenis, Y. Nguyen, O. Sterkers, F. Agnely, A. Bochot, J.M. Edeline, E. Ferrary, Assessment of the efficacy of a local steroid rescue treatment administered 2 days after a moderate noise-induced trauma in guinea pig, *Acta Oto-Laryngologica* 138 (2018) 610–616. <https://doi.org/10.1080/00016489.2018.1438659>.
- [94] Y. Li, R. Zhang, X. Li, W. Li, Y. Lu, C. Dai, The preparation of dexamethasone sodium phosphate multivesicular liposomes thermosensitive hydrogel and its impact on noise-induced hearing loss in the Guinea pigs, *Experimental Cell Research* 387 (2020) 111755. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2019.111755>.
- [95] W. Li, W. Sun, G. Zhang, Y. Lu, C. Dai, Thermosensitive hydrogel containing ethosuximide-loaded multivesicular liposomes attenuates age-related hearing loss in C57BL/6J mice, *Neuroscience Letters* 826 (2024) 137693. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2024.137693>.
- [96] S.K. Sahoo, Chapter 3 - Formulation and characterization of liposomes, in: C. Anandharamakrishnan, S. Dutta (Eds.), *Liposomal Encapsulation in Food Science and Technology*, Academic Press, 2023: pp. 39–63. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823935-3.00010-2>.
- [97] D. Liu, A. Mori, L. Huang, Role of liposome size and RES blockade in controlling biodistribution and tumor uptake of GM1-containing liposomes, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1104 (1992) 95–101. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(92\)90136-A](https://doi.org/10.1016/0005-2736(92)90136-A).

RÉFÉRENCES

- [98] R. Mittal, S.A. Pena, A. Zhu, N. Eshraghi, A. Fesharaki, E.J. Horesh, J. Mittal, A.A. Eshraghi, Nanoparticle-based drug delivery in the inner ear: current challenges, limitations and opportunities, *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology* 47 (2019) 1312–1320. <https://doi.org/10.1080/21691401.2019.1573182>.
- [99] Y. Fan, M. Marioli, K. Zhang, Analytical characterization of liposomes and other lipid nanoparticles for drug delivery, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 192 (2021) 113642. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113642>.
- [100] S. Mahmood, U.K. Mandal, B. Chatterjee, M. Taher, Advanced characterizations of nanoparticles for drug delivery: investigating their properties through the techniques used in their evaluations, *Nanotechnology Reviews* 6 (2017) 355–372. <https://doi.org/10.1515/ntrev-2016-0050>.
- [101] M. Danaei, M. Dehghankhold, S. Ataei, F. Hasanzadeh Davarani, R. Javanmard, A. Dokhani, S. Khorasani, M.R. Mozafari, Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems, *Pharmaceutics* 10 (2018) 57. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10020057>.
- [102] D.E. Large, R.G. Abdelmessih, E.A. Fink, D.T. Auguste, Liposome composition in drug delivery design, synthesis, characterization, and clinical application, *Advanced Drug Delivery Reviews* 176 (2021) 113851. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.113851>.
- [103] M.A. Chaves, L.S. Ferreira, L. Baldino, S.C. Pinho, E. Reverchon, Current Applications of Liposomes for the Delivery of Vitamins: A Systematic Review, *Nanomaterials* 13 (2023). <https://doi.org/10.3390/nano13091557>.
- [104] S.A. Agnihotri, K.S. Soppimath, G.V. Betageri, Controlled release application of multilamellar vesicles: a novel drug delivery approach, *Drug Delivery* 17 (2010) 92–101. <https://doi.org/10.3109/10717540903509027>.
- [105] D.A. Siriwardane, C. Wang, W. Jiang, T. Mudalige, Quantification of phospholipid degradation products in liposomal pharmaceutical formulations by ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry (UPLC-MS), *International Journal of Pharmaceutics* 578 (2020) 119077. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119077>.
- [106] Avanti Polar Lipids, Soy PC (95%) | 97281-47-5 | Avanti Research, (n.d.). <https://www.avantiresearch.com/en-gb/products/product/441601-soy-pc-95> (accessed April 30, 2026).
- [107] N.J. Zuidam, H.K.M.E. Gouw, Y. Barenholz, D.J.A. Crommelin, Physical (in) stability of liposomes upon chemical hydrolysis: the role of lysophospholipids and fatty acids, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1240 (1995) 101–110. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(95\)00180-5](https://doi.org/10.1016/0005-2736(95)00180-5).
- [108] K.L. Delma, N. Penoy, A.K. Sakira, S. Egrek, R. Sacheli, B. Grignard, M.-P. Hayette, T. Issa Somé, B. Evrard, R. Semdé, G. Piel, Use of supercritical CO₂ for the sterilization of liposomes: Study of the influence of sterilization conditions on the chemical and physical stability of phospholipids and liposomes, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 183 (2023) 112–118. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2023.01.002>.
- [109] K. Asayama, Y. Aramaki, T. Yoshida, S. Tsuchiya, Permeability Changes by Peroxidation of Unsaturated Liposomes with Ascorbic Acid/Fe²⁺, *Journal of Liposome Research* 2 (1992) 275–287. <https://doi.org/10.3109/08982109209018640>.
- [110] R.S. Kim, F.S. LaBella, Comparison of analytical methods for monitoring autoxidation profiles of authentic lipids, *Journal of Lipid Research* 28 (1987) 1110–1117. [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)38624-7](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)38624-7).
- [111] Avanti Polar Lipids, Determination of Phospholipid Oxidation by UV/VIS Spectroscopy | Avanti Research, (n.d.). <https://www.avantiresearch.com/en-gb/support-hub/analytical-procedures/oxidation-analysis> (accessed April 30, 2026).
- [112] Y.P. Patil, S. Jadhav, Novel methods for liposome preparation, *Chemistry and Physics of Lipids* 177 (2014) 8–18. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2013.10.011>.

RÉFÉRENCES

- [113] U. Bhardwaj, D.J. Burgess, Physicochemical properties of extruded and non-extruded liposomes containing the hydrophobic drug dexamethasone, *International Journal of Pharmaceutics* 388 (2010) 181–189. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.01.003>.
- [114] M. Biscaia-Caleiras, N.A. Fonseca, A.S. Lourenço, J.N. Moreira, S. Simões, Rational formulation and industrial manufacturing of lipid-based complex injectables: Landmarks and trends, *Journal of Controlled Release* 373 (2024) 617–639. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2024.07.021>.
- [115] D. Carugo, E. Bottaro, J. Owen, E. Stride, C. Nastruzzi, Liposome production by microfluidics: potential and limiting factors, *Sci Rep* 6 (2016) 25876. <https://doi.org/10.1038/srep25876>.
- [116] V.M. Shah, D.X. Nguyen, P. Patel, B. Cote, A. Al-Fatease, Y. Pham, M.G. Huynh, Y. Woo, A.W. Alani, Liposomes produced by microfluidics and extrusion: A comparison for scale-up purposes, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 18 (2019) 146–156. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2019.02.019>.
- [117] C. Jaudoin, F. Agnely, Y. Nguyen, E. Ferrary, A. Bochot, Nanocarriers for drug delivery to the inner ear: Physicochemical key parameters, biodistribution, safety and efficacy, *International Journal of Pharmaceutics* 592 (2021) 120038. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.120038>.
- [118] W. Bigazzi, N. Penoy, B. Evrard, G. Piel, Supercritical fluid methods: An alternative to conventional methods to prepare liposomes, *Chemical Engineering Journal* 383 (2020) 123106. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.123106>.
- [119] L. Zhao, F. Temelli, Preparation of liposomes using a modified supercritical process via depressurization of liquid phase, *The Journal of Supercritical Fluids* 100 (2015) 110–120. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2015.02.022>.
- [120] N. Penoy, K.L. Delma, N. Homkar, A. Karim Sakira, S. Egrek, R. Sacheli, P.-Y. Sacré, B. Grignard, M.-P. Hayette, T.I. Somé, R. Semdé, B. Evrard, G. Piel, Development and optimization of a one step process for the production and sterilization of liposomes using supercritical CO₂, *International Journal of Pharmaceutics* 651 (2024) 123769. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2024.123769>.
- [121] Supercritical fluid methods for liposome production and sterilization, in: *Liposomes in Drug Delivery*, Academic Press, 2024: pp. 559–582. <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-15491-1.00003-1>.
- [122] N. Penoy, K.L. Delma, H.A. Tonakpon, B. Grignard, B. Evrard, G. Piel, An innovative one step green supercritical CO₂ process for the production of liposomes co-encapsulating both a hydrophobic and a hydrophilic compound for pulmonary administration, *International Journal of Pharmaceutics* 627 (2022) 122212. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2022.122212>.
- [123] M. Magdy, E. Elmowafy, M. Elassal, R.A.H. Ishak, Localized drug delivery to the middle ear: Recent advances and perspectives for the treatment of middle and inner ear diseases, *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 69 (2022) 103149. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2022.103149>.
- [124] D.S. Delaney, L.J. Liew, J. Lye, M.D. Atlas, E.Y.M. Wong, Overcoming barriers: a review on innovations in drug delivery to the middle and inner ear, *Front Pharmacol* 14 (2023) 1207141. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1207141>.
- [125] Académie Nationale de Pharmacie, Le dictionnaire - Hydrogel, (n.d.). <https://dictionnaire.acadpharm.org/w/Hydrogel> (accessed May 7, 2026).
- [126] E.M. Ahmed, Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review, *Journal of Advanced Research* 6 (2015) 105–121. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2013.07.006>.
- [127] E. Caló, V.V. Khutoryanskiy, Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products, *European Polymer Journal* 65 (2015) 252–267. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2014.11.024>.

RÉFÉRENCES

- [128] K. Mfoafo, R. Mittal, A. Eshraghi, Y. Omid, H. Omidian, Improved inner ear drug delivery using hydrogel carriers, *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 79 (2023) 104086. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2022.104086>.
- [129] X. Pang, X. Zhang, D. Xu, C. Bu, Y. Qiu, P. Feng, B. Zhang, H. Cheng, Q. Zhu, L. Tian, Y. Hu, R. Chai, Bioactive hydrogels for the reconstruction of sensorineural hearing loss, *Bioactive Materials* 56 (2026) 160–180. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2025.09.014>.
- [130] F. Cilurzo, F. Selmin, P. Minghetti, M. Adami, E. Bertoni, S. Lauria, L. Montanari, Injectability Evaluation: An Open Issue, *AAPS PharmSciTech* 12 (2011) 604–609. <https://doi.org/10.1208/s12249-011-9625-y>.
- [131] P. Zarrintaj, J.D. Ramsey, A. Samadi, Z. Atoufi, M.K. Yazdi, M.R. Ganjali, L.M. Amirabad, E. Zangene, M. Farokhi, K. Formela, M.R. Saeb, M. Mozafari, S. Thomas, Poloxamer: A versatile tri-block copolymer for biomedical applications, *Acta Biomaterialia* 110 (2020) 37–67. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.04.028>.
- [132] E. Giuliano, D. Paolino, M. Fresta, D. Cosco, Mucosal Applications of Poloxamer 407-Based Hydrogels: An Overview, *Pharmaceutics* 10 (2018) 159. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10030159>.
- [133] A.M. Bodratti, P. Alexandridis, Formulation of Poloxamers for Drug Delivery, *J Funct Biomater* 9 (2018) 11. <https://doi.org/10.3390/jfb9010011>.
- [134] G. Dumortier, J.L. Grossiord, F. Agnely, J.C. Chaumeil, A Review of Poloxamer 407 Pharmaceutical and Pharmacological Characteristics, *Pharm Res* 23 (2006) 2709–2728. <https://doi.org/10.1007/s11095-006-9104-4>.
- [135] R. Fan, Y. Cheng, R. Wang, T. Zhang, H. Zhang, J. Li, S. Song, A. Zheng, Thermosensitive Hydrogels and Advances in Their Application in Disease Therapy, *Polymers (Basel)* 14 (2022) 2379. <https://doi.org/10.3390/polym14122379>.
- [136] B. Jeong, S.W. Kim, Y.H. Bae, Thermosensitive sol–gel reversible hydrogels, *Advanced Drug Delivery Reviews* 64 (2012) 154–162. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.012>.
- [137] M.N. Kayyali, J.R.A. Woollorton, A.J. Ramsey, M. Lin, T.N. Chao, A. Tsourkas, B.W. O'Malley, D. Li, A novel nanoparticle delivery system for targeted therapy of noise-induced hearing loss, *J Control Release* 279 (2018) 243–250. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.04.028>.
- [138] J. Dai, W. Long, Z. Liang, L. Wen, F. Yang, G. Chen, A novel vehicle for local protein delivery to the inner ear: injectable and biodegradable thermosensitive hydrogel loaded with PLGA nanoparticles, *Drug Development and Industrial Pharmacy* 44 (2018) 89–98. <https://doi.org/10.1080/03639045.2017.1373803>.
- [139] P. Rahmanian-Devin, V. Baradaran Rahimi, V.R. Askari, Thermosensitive Chitosan- β -Glycerophosphate Hydrogels as Targeted Drug Delivery Systems: An Overview on Preparation and Their Applications, *Adv Pharmacol Pharm Sci* 2021 (2021) 6640893. <https://doi.org/10.1155/2021/6640893>.
- [140] X.-Z. Zhang, D.-Q. Wu, C.-C. Chu, Synthesis, characterization and controlled drug release of thermosensitive IPN–PNIPAAm hydrogels, *Biomaterials* 25 (2004) 3793–3805. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2003.10.065>.
- [141] S.J. Buwalda, K.W.M. Boere, P.J. Dijkstra, J. Feijen, T. Vermonden, W.E. Hennink, Hydrogels in a historical perspective: From simple networks to smart materials, *Journal of Controlled Release* 190 (2014) 254–273. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.03.052>.
- [142] M. Thaler, S. Roy, A. Fornara, M. Bitsche, J. Qin, M. Muhammed, W. Salvenmoser, G. Rieger, A.S. Fischer, R. Glueckert, Visualization and analysis of superparamagnetic iron oxide nanoparticles in the inner ear by light microscopy and energy filtered TEM, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 7 (2011) 360–369. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2010.11.005>.

RÉFÉRENCES

- [143] A.S. Priya, R. Premanand, I. Ragupathi, V.R. Bhaviripudi, R. Aepuru, K. Kannan, K. Shanmugaraj, Comprehensive Review of Hydrogel Synthesis, Characterization, and Emerging Applications, *Journal of Composites Science* 8 (2024). <https://doi.org/10.3390/jcs8110457>.
- [144] T.-C. Ho, C.-C. Chang, H.-P. Chan, T.-W. Chung, C.-W. Shu, K.-P. Chuang, T.-H. Duh, M.-H. Yang, Y.-C. Tyan, Hydrogels: Properties and Applications in Biomedicine, *Molecules* 27 (2022) 2902. <https://doi.org/10.3390/molecules27092902>.
- [145] B. Maleki, P.G. Kargar, S.S. Ashrafi, M. Ghani, Perspective Chapter: Introduction to Hydrogels – Definition, Classifications, Applications and Methods of Preparation, in: *Ionic Liquids – Recent Advances*, IntechOpen, 2024. <https://doi.org/10.5772/intechopen.1005061>.
- [146] A. Rey-Rico, M. Cucchiari, PEO-PPO-PEO Tri-Block Copolymers for Gene Delivery Applications in Human Regenerative Medicine—An Overview, *International Journal of Molecular Sciences* 19 (2018). <https://doi.org/10.3390/ijms19030775>.
- [147] T.P. Le, Y. Yu, I.S. Cho, E.Y. Suh, H.C. Kwon, S.-A. Shin, Y.-H. Park, K.M. Huh, Injectable Poloxamer Hydrogel Formulations for Intratympanic Delivery of Dexamethasone, *J Korean Med Sci* 38 (2023) e135. <https://doi.org/10.3346/jkms.2023.38.e135>.
- [148] H. Abdeltawab, D. Svirskis, M. Sharma, Formulation strategies to modulate drug release from poloxamer based in situ gelling systems, *Expert Opinion on Drug Delivery* 17 (2020) 495–509. <https://doi.org/10.1080/17425247.2020.1731469>.
- [149] N.H. Thang, T.B. Chien, D.X. Cuong, Polymer-Based Hydrogels Applied in Drug Delivery: An Overview, *Gels* 9 (2023) 523. <https://doi.org/10.3390/gels9070523>.
- [150] A. Akbar, A. Shakeel, Chapter 1 - An introduction to hydrogels, in: *Polysaccharides-Based Hydrogels*, Elsevier, 2024: pp. 1–20. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-99341-8.00001-6>.
- [151] John C. Mauro, Chapter 3 - Fick's laws of diffusion, in: *Materials Kinetics, Transport and Rate Phenomena*, 2nd Edition, 2026: pp. 45–68. <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-30174-2.00023-X>.
- [152] J. Li, D.J. Mooney, Designing hydrogels for controlled drug delivery, *Nat Rev Mater* 1 (2016) 16071. <https://doi.org/10.1038/natrevmats.2016.71>.
- [153] T. Moore, S. Croy, S. Mallapragada, N. Pandit, Experimental investigation and mathematical modeling of Pluronic F127 gel dissolution: drug release in stirred systems, *J Control Release* 67 (2000) 191–202. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(00\)00215-7](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(00)00215-7).
- [154] O. Inal, E.A. Yapar, Effect of Mechanical Properties on the Release of Meloxicam from Poloxamer Gel Bases, *Indian J Pharm Sci* 75 (2013) 700–706.
- [155] L. Yang, P. Alexandridis, Controlled Release from Ordered Microstructures Formed by Poloxamer Block Copolymers, in: *Controlled Drug Delivery*, American Chemical Society, 2000: pp. 364–374. <https://doi.org/10.1021/bk-2000-0752.ch034>.
- [156] Jomarién García-Couce, M. Tomás, G. Fuentes, I. Que, A. Almirall, L.J. Cruz, Chitosan/Pluronic F127 Thermosensitive Hydrogel as an Injectable Dexamethasone Delivery Carrier, *Gels* 8 (2022) 44. <https://doi.org/10.3390/gels8010044>.
- [157] H. Cao, L. Duan, Y. Zhang, J. Cao, K. Zhang, Current hydrogel advances in physicochemical and biological response-driven biomedical application diversity, *Sig Transduct Target Ther* 6 (2021) 426. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00830-x>.
- [158] G. Naert, M.-P. Pasdelou, C.G. Le Prell, Use of the guinea pig in studies on the development and prevention of acquired sensorineural hearing loss, with an emphasis on noise, *J Acoust Soc Am* 146 (2019) 3743. <https://doi.org/10.1121/1.5132711>.
- [159] A. Moatti, D. Silkstone, T. Martin, K. Abbey, K.A. Hutson, D.C. Fitzpatrick, C.J. Zdanski, A.G. Cheng, F.S. Ligler, A. Greenbaum, Assessment of drug permeability through an ex vivo porcine round window membrane model, *iScience* 26 (2023) 106789. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2023.106789>.

RÉFÉRENCES

- [160] R. Singh, B. Birru, J.G.S. Veit, E.M. Arrigali, M.A. Serban, Development and Characterization of an In Vitro Round Window Membrane Model for Drug Permeability Evaluations, *Pharmaceutics* 15 (2022) 1105. <https://doi.org/10.3390/ph15091105>.
- [161] J.G.S. Veit, B. Birru, Y. Wang, R. Singh, E.M. Arrigali, R. Park, B. Miller, M.A. Firpo, A.H. Park, M.A. Serban, An Evaluation of the Drug Permeability Properties of Human Cadaveric In Situ Tympanic and Round Window Membranes, *Pharmaceutics* 15 (2022) 1037. <https://doi.org/10.3390/ph15091037>.
- [162] A. Moatti, S. Connard, N. De Britto, W.A. Dunn, S. Rastogi, M. Rai, L.V. Schnabel, F.S. Ligler, K.A. Hutson, D.C. Fitzpatrick, A. Salt, C.J. Zdanski, A. Greenbaum, Surgical procedure of intratympanic injection and inner ear pharmacokinetics simulation in domestic pigs, *Front Pharmacol* 15 (2024) 1348172. <https://doi.org/10.3389/fphar.2024.1348172>.
- [163] A.A. Aarnisalo, P. Aarnisalo, L. Pietola, J. Wahlfors, J. Jero, Efficacy of gene transfer through the round window membrane: an in vitro model, *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 68 (2006) 220–227. <https://doi.org/10.1159/000092123>.
- [164] M.M. Goyal, S.A. Shen, M. Lehar, A. Martinez, H. Hiel, C. Wang, Y. Liu, C. Wang, D.Q. Sun, A Benchtop Round Window Model for Studying Magnetic Nanoparticle Transport to the Inner Ear, *Laryngoscope* 134 (2024) 3355–3362. <https://doi.org/10.1002/lary.31345>.
- [165] S.A. Shen, M. Goyal, K. Lane, D.Q. Sun, Guinea pig round window membrane explantation for ex-vivo studies, *Journal of Visualized Experiments: JoVE* (2024) 10.3791/65816. <https://doi.org/10.3791/65816>.
- [166] F.G. Mondalek, Y.Y. Zhang, B. Kropp, R.D. Kopke, X. Ge, R.L. Jackson, K.J. Dormer, The permeability of SPION over an artificial three-layer membrane is enhanced by external magnetic field, *Journal of Nanobiotechnology* 4 (2006) 4. <https://doi.org/10.1186/1477-3155-4-4>.
- [167] A.A. Riabinin, O.S. Rogovaya, A.I. Kryukov, N.L. Kunelskaya, E.S. Yanyushkina, V.V. Mischenko, M.M. Ilyin, E.A. Shershunova, V.V. Voyevodin, S.V. Nebogatkin, K.I. Pomanov, E.A. Vorotelyak, The Development of Inner Ear Membrane Analog for Experimental Otorhinolaryngology, *Sovrem Tekhnologii Med* 17 (2025) 5–14. <https://doi.org/10.17691/stm2025.17.3.01>.
- [168] B. Birru, J.G.S. Veit, E.M. Arrigali, J. Van Tine, E. Barrett-Catton, Z. Tonnerre, P. Diaz, M.A. Serban, Hyaluronic acid-ibuprofen conjugation: a novel othotherapeutic approach protecting inner ear cells from inflammation-mediated damage, *Front. Pharmacol.* 15 (2024). <https://doi.org/10.3389/fphar.2024.1355283>.
- [169] S. Chadha, K. Kamenov, A. Cieza, The world report on hearing, 2021, *Bull World Health Organ* 99 (2021) 242–242A. <https://doi.org/10.2471/BLT.21.285643>.
- [170] M. Idstad, K. Tambs, L. Aarhus, B.L. Engdahl, Childhood sensorineural hearing loss and adult mental health up to 43 years later: results from the HUNT study, *BMC Public Health* 19 (2019) 168. <https://doi.org/10.1186/s12889-019-6449-2>.
- [171] A. Ciorba, C. Bianchini, S. Pelucchi, A. Pastore, The impact of hearing loss on the quality of life of elderly adults, *Clin Interv Aging* 7 (2012) 159–163. <https://doi.org/10.2147/CIA.S26059>.
- [172] J.S. Kempfle, D.H. Jung, Experimental drugs for the prevention or treatment of sensorineural hearing loss, *Expert Opin Investig Drugs* 32 (2023) 643–654. <https://doi.org/10.1080/13543784.2023.2242253>.
- [173] S.M. Vlajkovic, P.R. Thorne, Molecular Mechanisms of Sensorineural Hearing Loss and Development of Inner Ear Therapeutics, *Int J Mol Sci* 22 (2021) 5647. <https://doi.org/10.3390/ijms22115647>.
- [174] P.S. Steyger, Mechanisms of Aminoglycoside- and Cisplatin-Induced Ototoxicity, *Am J Audiol* 30 (2021) 887–900. https://doi.org/10.1044/2021_AJA-21-00006.

RÉFÉRENCES

- [175] C.R. Cederroth, J. Dyhrfeld-Johnsen, B. Canlon, Pharmacological Approaches to Hearing Loss, *Pharmacological Reviews* 76 (2024) 1063–1088. <https://doi.org/10.1124/pharmrev.124.001195>.
- [176] S. Nyberg, N.J. Abbott, X. Shi, P.S. Steyger, A. Dabdoub, Delivery of therapeutics to the inner ear: The challenge of the blood-labyrinth barrier, *Sci Transl Med* 11 (2019) eaao0935. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aao0935>.
- [177] S.S. Liu, R. Yang, Inner Ear Drug Delivery for Sensorineural Hearing Loss: Current Challenges and Opportunities, *Front Neurosci* 16 (2022) 867453. <https://doi.org/10.3389/fnins.2022.867453>.
- [178] E.E.L. Swan, M.J. Mescher, W.F. Sewell, S.L. Tao, J.T. Borenstein, Inner ear drug delivery for auditory applications, *Adv Drug Deliv Rev* 60 (2008) 1583–1599. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2008.08.001>.
- [179] Q. Qiang, X. Wu, T. Yang, C. Yang, H. Sun, A comparison between systemic and intratympanic steroid therapies as initial therapy for idiopathic sudden sensorineural hearing loss: a meta-analysis, *Acta Otolaryngol* 137 (2017) 598–605. <https://doi.org/10.1080/00016489.2016.1260157>.
- [180] H.G.-M. Ho, H.-C. Lin, M.-T. Shu, C.-C. Yang, H.-T. Tsai, Effectiveness of intratympanic dexamethasone injection in sudden-deafness patients as salvage treatment, *Laryngoscope* 114 (2004) 1184–1189. <https://doi.org/10.1097/00005537-200407000-00010>.
- [181] P. Lavigne, F. Lavigne, I. Saliba, Intratympanic corticosteroids injections: a systematic review of literature, *Eur Arch Otorhinolaryngol* 273 (2016) 2271–2278. <https://doi.org/10.1007/s00405-015-3689-3>.
- [182] A.N. Salt, S.K. Plontke, Pharmacokinetic principles in the inner ear: Influence of drug properties on intratympanic applications, *Hearing Research* 368 (2018) 28–40. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2018.03.002>.
- [183] S. Dash, J. Zuo, P.S. Steyger, Local Delivery of Therapeutics to the Cochlea Using Nanoparticles and Other Biomaterials, *Pharmaceutics (Basel)* 15 (2022) 1115. <https://doi.org/10.3390/ph15091115>.
- [184] M.M. Paparella, M. Oda, F. Hiraide, D. Brady, Pathology of Sensorineural Hearing Loss in Otitis Media, *Ann Otol Rhinol Laryngol* 81 (1972) 632–647. <https://doi.org/10.1177/000348947208100503>.
- [185] A.M. Carpenter, D. Muchow, M.V. Goycoolea, Ultrastructural studies of the human round window membrane, *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 115 (1989) 585–590. <https://doi.org/10.1001/archotol.1989.01860290043012>.
- [186] N. Gunewardene, Y. Ma, P. Lam, S. Wagstaff, C. Cortez-Jugo, Y. Hu, F. Caruso, R.T. Richardson, A.K. Wise, Developing the supraparticle technology for round window-mediated drug administration into the cochlea, *Journal of Controlled Release* 361 (2023) 621–635. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2023.08.016>.
- [187] M. Duan, C. Zhi-qiang, Permeability of round window membrane and its role for drug delivery: our own findings and literature review, *Journal of Otology* 4 (2009) 34–43. [https://doi.org/10.1016/S1672-2930\(09\)50006-2](https://doi.org/10.1016/S1672-2930(09)50006-2).
- [188] Y. Hamaguchi, T. Morizono, S.K. Juhn, Round window membrane permeability to human serum albumin in antigen-induced otitis media, *American Journal of Otolaryngology* 9 (1988) 34–40. [https://doi.org/10.1016/s0196-0709\(88\)80006-1](https://doi.org/10.1016/s0196-0709(88)80006-1).
- [189] A.N. Salt, J.J. Hartsock, F. Piu, J. Hou, Dexamethasone Phosphate Entry into Perilymph Compared for Middle Ear Applications in Guinea Pigs, *Audiol Neurotol* 23 (2018) 245–257. <https://doi.org/10.1159/000493846>.
- [190] M.P. Pollastri, Overview on the Rule of Five, *Current Protocols in Pharmacology* 49 (2010) 9.12.1-9.12.8. <https://doi.org/10.1002/0471141755.ph0912s49>.

RÉFÉRENCES

- [191] K.-J. Yang, J. Son, S.Y. Jung, G. Yi, J. Yoo, D.-K. Kim, H. Koo, Optimized phospholipid-based nanoparticles for inner ear drug delivery and therapy, *Biomaterials* 171 (2018) 133–143. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.04.038>.
- [192] Y. Kitamura, M. Teranishi, M. Sone, T. Nakashima, Round window membrane in young and aged C57BL/6 mice, *Hearing Research* 174 (2002) 142–148. [https://doi.org/10.1016/S0378-5955\(02\)00651-2](https://doi.org/10.1016/S0378-5955(02)00651-2).
- [193] L.P. Rybak, A. Dhukhwa, D. Mukherjea, V. Ramkumar, Local Drug Delivery for Prevention of Hearing Loss, *Front. Cell. Neurosci.* 13 (2019). <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00300>.
- [194] A.N. Salt, S.K. Plontke, Principles of Local Drug Delivery to the Inner Ear, *Audiology and Neurotology* 14 (2009) 350–360. <https://doi.org/10.1159/000241892>.
- [195] A.N. Salt, K. Hirose, Communication pathways to and from the inner ear and their contributions to drug delivery, *Hearing Research* 362 (2018) 25–37. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2017.12.010>.
- [196] M.V. Goycoolea, D. Muchow, G.C. Martinez, P.B. Aguila, H.G. Goycoolea, C.V. Goycoolea, P. Schachern, W. Knight, Permeability of the Human Round-Window Membrane to Cationic Ferritin, *Archives of Otolaryngology–Head & Neck Surgery* 114 (1988) 1247–1251. <https://doi.org/10.1001/archotol.1988.01860230041019>.
- [197] Y.-J. Tsai, J.-G. Liang, W.-B. Wu, Y.-F. Ding, R.P.-Y. Chiang, S.-M. Wu, Intratympanic injection with dexamethasone for sudden sensorineural hearing loss, *The Journal of Laryngology & Otology* 125 (2011) 133–137. <https://doi.org/10.1017/S0022215110002124>.
- [198] X. Li, W.-J. Chen, J. Xu, H.-J. Yi, J.-Y. Ye, Clinical Analysis of Intratympanic Injection of Dexamethasone for Treating Sudden Deafness, *IJGM* 14 (2021) 2575–2579. <https://doi.org/10.2147/IJGM.S304123>.
- [199] C. Zylberberg, S. Matosevic, Pharmaceutical liposomal drug delivery: a review of new delivery systems and a look at the regulatory landscape, *Drug Deliv* 23 (2016) 3319–3329. <https://doi.org/10.1080/10717544.2016.1177136>.
- [200] Y. Shen, Y. Guo, M. Wilczynska, J. Li, S. Hellström, T. Ny, Plasminogen initiates and potentiates the healing of acute and chronic tympanic membrane perforations in mice, *J Transl Med* 12 (2014) 5. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-12-5>.
- [201] S. Kanzaki, M. Fujioka, A. Yasuda, S. Shibata, M. Nakamura, H.J. Okano, K. Ogawa, H. Okano, Novel in vivo imaging analysis of an inner ear drug delivery system in mice: comparison of inner ear drug concentrations over time after transtympanic and systemic injections, *PLoS One* 7 (2012) e48480. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048480>.
- [202] S. Mülazimoğlu, E. Ocak, G. Kaygusuz, M.K. Gökcen, Retroauricular Approach for Targeted Cochlear Therapy Experiments in Wistar Albino Rats, *Balkan Med J* 34 (2017) 200–205. <https://doi.org/10.4274/balkanmedj.2016.0226>.
- [203] T. Phuc Le, Y. Yu, H. Chan Kwon, S.-A. Shin, Y.-H. Park, K. Moo Huh, Novel self-degradable prodrug blend thermogel for intratympanic drug delivery to treat inner ear diseases, *Chemical Engineering Journal* 476 (2023) 146726. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2023.146726>.
- [204] S.-I. Hatsushika, R.K. Shepherd, Y.C. Tong, G.M. Clark, S. Funasaka, Dimensions of the Scala Tympani in the Human and Cat with Reference to Cochlear Implants, *Ann Otol Rhinol Laryngol* 99 (1990) 871–876. <https://doi.org/10.1177/000348949009901104>.
- [205] F. Micaletti, E. Oujagir, D. Fouan, V. Schubnel, J.-Y. Tartu, J.-P. Cottier, L. Barantin, H. Blasco, C. Dupuy, J.J. Galvin, J.-M. Escoffre, D. Bakhos, Targeted inner ear delivery of gadolinium using microbubble-assisted ultrasound in an ovine model, *International Journal of Pharmaceutics* 693 (2026) 126676. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2026.126676>.

RÉFÉRENCES

- [206] S.K. Plontke, R. Mynatt, R.M. Gill, S. Borgmann, A.N. Salt, Concentration Gradient Along the Scala Tympani After Local Application of Gentamicin to the Round Window Membrane, *The Laryngoscope* 117 (2007) 1191–1198. <https://doi.org/10.1097/MLG.0b013e318058a06b>.
- [207] A.N. Salt, J.J. Hartsock, R.M. Gill, E. King, F.B. Kraus, S.K. Plontke, Perilymph pharmacokinetics of locally-applied gentamicin in the guinea pig, *Hearing Research* 342 (2016) 101–111. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2016.10.003>.
- [208] A.N. Salt, Y. Ma, Quantification of solute entry into cochlear perilymph through the round window membrane, *Hearing Research* 154 (2001) 88–97. [https://doi.org/10.1016/S0378-5955\(01\)00223-4](https://doi.org/10.1016/S0378-5955(01)00223-4).
- [209] K.R. Husmann, A.S. Morgan, D.A. Girod, D. Durham, Round window administration of gentamicin: a new method for the study of ototoxicity of cochlear hair cells, *Hearing Research* 125 (1998) 109–119. [https://doi.org/10.1016/S0378-5955\(98\)00137-3](https://doi.org/10.1016/S0378-5955(98)00137-3).
- [210] E.B. King, A.N. Salt, G.E. Kel, H.T. Eastwood, S.J. O’Leary, Gentamicin administration on the stapes footplate causes greater hearing loss and vestibulotoxicity than round window administration in guinea pigs, *Hearing Research* 304 (2013) 159–166. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2013.07.013>.
- [211] M. Yagi, E. Magal, Z. Sheng, K.A. Ang, Y. Raphael, Hair Cell Protection from Aminoglycoside Ototoxicity by Adenovirus-Mediated Overexpression of Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor, *Human Gene Therapy* 10 (1999) 813–823. <https://doi.org/10.1089/10430349950018562>.
- [212] L. Nordang, B. Linder, M. Anniko, Morphologic Changes in Round Window Membrane After Topical Hydrocortisone and Dexamethasone Treatment, *Otology & Neurotology* 24 (2003) 339.
- [213] X. Du, K. Chen, S. Kuriyavar, R.D. Kopke, B.P. Grady, D.H. Bourne, W. Li, K.J. Dormer, Magnetic Targeted Delivery of Dexamethasone Acetate across the Round Window Membrane in Guinea Pigs, *Otol Neurotol* 34 (2013) 41–47. <https://doi.org/10.1097/MAO.0b013e318277a40e>.
- [214] J. Zou, R. Sood, S. Ranjan, D. Poe, U.A. Ramadan, P.K. Kinnunen, I. Pyykkö, Manufacturing and in vivo inner ear visualization of MRI traceable liposome nanoparticles encapsulating gadolinium, *Journal of Nanobiotechnology* 8 (2010) 32. <https://doi.org/10.1186/1477-3155-8-32>.
- [215] D. Wen, L. Zhang, P. Deng, H. Li, X. Feng, L. Wen, G. Chen, Tracking the spatiotemporal journey of chitosan nanoparticles across ear physiological barriers: Mechanisms and pathways, *Drug Metabolism and Disposition* 54 (2026) 100233. <https://doi.org/10.1016/j.dmd.2026.100233>.
- [216] S.-Y. Lee, J. Kim, S. Oh, G. Jung, K.-J. Jeong, V. Tan Tran, D. Hwang, S. Kim, J.-J. Song, M.-W. Suh, J. Lee, J.-W. Koo, Contralateral spreading of substances following intratympanic nanoparticle-conjugated gentamicin injection in a rat model, *Sci Rep* 10 (2020) 18636. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-75725-y>.
- [217] A. Goswami, S.N. Ruhina Rahman, S. Ponneganti, V. Gangipangi, H. Vavialala, P. Radhakrishnanand, S. Selvaraju, S.R. Mutheneni, S. Bharti, T. Shunmugaperumal, Intratympanic injections of emulsion-like dispersions to augment cinnarizine amount in a healthy rabbit inner ear model, *Nanomedicine (Lond)* 19 (2024) 1717–1741. <https://doi.org/10.1080/17435889.2024.2373042>.
- [218] J. Sun, Y. Liu, W. Kong, P. Jiang, W. Jiang, In vitro permeability of round window membrane to transforming dexamethasone with delivery vehicles — a dosage estimation, *Chinese Medical Journal* 120 (2007) 2284.
- [219] Y.-C. Lin, C.-P. Shih, H.-C. Chen, Y.-L. Chou, H.-K. Sytwu, M.-C. Fang, Y.-Y. Lin, C.-Y. Kuo, H.-H. Su, C.-L. Hung, H.-K. Chen, C.-H. Wang, Ultrasound Microbubble-Facilitated Inner Ear Delivery of Gold Nanoparticles Involves Transient Disruption of the Tight

RÉFÉRENCES

- Junction Barrier in the Round Window Membrane, *Front Pharmacol* 12 (2021) 689032. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.689032>.
- [220] E.M. Arrigali, M.A. Serban, Development and Characterization of a Topically Deliverable Prophylactic Against Oxidative Damage in Cochlear Cells, *Front. Pharmacol.* 13 (2022). <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.907516>.
- [221] S.S. Chandrasekhar, R.Y. Rubinstein, J.A. Kwartler, M. Gatz, P.E. Connelly, E. Huang, S. Baredes, Dexamethasone pharmacokinetics in the inner ear: Comparison of route of administration and use of facilitating agents, *Otolaryngology–Head and Neck Surgery* 122 (2000) 521–528. <https://doi.org/10.1067/mhn.2000.102578>.
- [222] S.-H. Jeong, Y. Kim, A.-R. Lyu, S.-A. Shin, T.H. Kim, Y.H. Huh, A.R. Je, A. Gajibihiye, Y. Yu, Y. Jin, M.J. Park, Y.-H. Park, Junctional Modulation of Round Window Membrane Enhances Dexamethasone Uptake into the Inner Ear and Recovery after NIHL, *Int J Mol Sci* 22 (2021) 10061. <https://doi.org/10.3390/ijms221810061>.
- [223] S.M. Krug, M. Amasheh, I. Dittmann, I. Christoffel, M. Fromm, S. Amasheh, Sodium caprate as an enhancer of macromolecule permeation across tricellular tight junctions of intestinal cells, *Biomaterials* 34 (2013) 275–282. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.09.051>.
- [224] C.M. Kelso, H. Watanabe, J.M. Wazen, T. Bucher, Z.J. Qian, E.S. Olson, J.W. Kysar, A.K. Lalwani, Microperforations Significantly Enhance Diffusion Across Round Window Membrane, *Otol Neurotol* 36 (2015) 694–700. <https://doi.org/10.1097/MAO.0000000000000629>.
- [225] A.N. Salt, S.A. Hale, S.K.R. Plonkete, Perilymph sampling from the cochlear apex: a reliable method to obtain higher purity perilymph samples from scala tympani, *J Neurosci Methods* 153 (2006) 121–129. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2005.10.008>.
- [226] A.N. Salt, J.J. Hartsock, R.M. Gill, F. Piu, S.K. Plontke, Perilymph pharmacokinetics of markers and dexamethasone applied and sampled at the lateral semi-circular canal, *J Assoc Res Otolaryngol* 13 (2012) 771–783. <https://doi.org/10.1007/s10162-012-0347-y>.
- [227] S. Sawamura, G. Ogata, K. Asai, O. Razvina, T. Ota, Q. Zhang, S. Madhurantakam, K. Akiyama, D. Ino, S. Kanzaki, T. Saiki, Y. Matsumoto, M. Moriyama, Y. Saijo, A. Horii, Y. Einaga, H. Hibino, Analysis of Pharmacokinetics in the Cochlea of the Inner Ear, *Front Pharmacol* 12 (2021) 633505. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.633505>.
- [228] C.-P. Shih, H.-C. Chen, Y.-C. Lin, H.-K. Chen, H. Wang, C.-Y. Kuo, Y.-Y. Lin, C.-H. Wang, Middle-ear dexamethasone delivery via ultrasound microbubbles attenuates noise-induced hearing loss, *Laryngoscope* 129 (2019) 1907–1914. <https://doi.org/10.1002/lary.27713>.
- [229] A.-H. Liao, C.-P. Shih, M.-W. Li, Y.-C. Lin, H.-C. Chuang, C.-H. Wang, Development of thermosensitive poloxamer 407-based microbubble gel with ultrasound mediation for inner ear drug delivery, *Drug Deliv* 28 (2021) 1256–1271. <https://doi.org/10.1080/10717544.2021.1938758>.
- [230] X. An, R. Wang, E. Chen, Y. Yang, B. Fan, Y. Li, B. Han, Q. Li, Z. Liu, Y. Han, J. Chen, D. Zha, A forskolin-loaded nanodelivery system prevents noise-induced hearing loss, *J Control Release* 348 (2022) 148–157. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2022.05.052>.
- [231] X. Shi, Z. Wang, W. Ren, L. Chen, C. Xu, M. Li, S. Fan, Y. Xu, M. Chen, F. Zheng, W. Zhang, X. Zhou, Y. Zhang, S. Qiu, L. Wu, P. Zhou, X. Lv, T. Cui, Y. Qiao, H. Zhao, W. Guo, W. Chen, S. Li, W. Zhong, J. Lin, S. Yang, LDL receptor-related protein 1 (LRP1), a novel target for opening the blood-labyrinth barrier (BLB), *Signal Transduct Target Ther* 7 (2022) 175. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-00995-z>.
- [232] T.N. Nguyen, S.-Y. Yoo, W. Tangchang, J.-Y. Lee, H.-Y. Son, J.-S. Park, Sustained delivery of triamcinolone acetate from a thermosensitive microemulsion gel system for the treatment of sensorineural hearing loss, *Drug Deliv* 30 (2023) 2242003. <https://doi.org/10.1080/10717544.2023.2242003>.

RÉFÉRENCES

- [233] H. Zhang, H. Chen, L. Lu, H. Wang, Y. Zhao, R. Chai, Natural Multifunctional Silk Microcarriers for Noise-Induced Hearing Loss Therapy, *Adv Sci (Weinh)* 11 (2024) e2305215. <https://doi.org/10.1002/advs.202305215>.
- [234] J.K. Koehler, J. Schnur, H. Heerklotz, U. Massing, Screening for Optimal Liposome Preparation Conditions by Using Dual Centrifugation and Time-Resolved Fluorescence Measurements, *Pharmaceutics* 13 (2021) 2046. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13122046>.
- [235] B.R. Lentz, PEG as a tool to gain insight into membrane fusion, *Eur Biophys J* 36 (2007) 315–326. <https://doi.org/10.1007/s00249-006-0097-z>.
- [236] A. Mateos-Maroto, M. Gai, M. Brückner, R. da Costa Marques, I. Harley, J. Simon, V. Mailänder, S. Morsbach, K. Landfester, Systematic modulation of the lipid composition enables the tuning of liposome cellular uptake, *Acta Biomaterialia* (2023). <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2022.12.058>.
- [237] K. Ita, Chapter 9 - Iontophoresis, magnetophoresis, and electroporation, in: *Transdermal Drug Delivery*, Academic Press, 2020: pp. 183–229. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822550-9.00009-0>.
- [238] S. Duarah, M. Sharma, J. Wen, Rapid and simultaneous determination of dexamethasone and dexamethasone sodium phosphate using HPLC-UV: Application in microneedle-assisted skin permeation and deposition studies, *Journal of Chromatography B* 1170 (2021) 122609. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2021.122609>.
- [239] M. Silvander, M. Johnsson, K. Edwards, Effects of PEG-lipids on permeability of phosphatidylcholine/cholesterol liposomes in buffer and in human serum, *Chemistry and Physics of Lipids* 97 (1998) 15–26. [https://doi.org/10.1016/S0009-3084\(98\)00088-7](https://doi.org/10.1016/S0009-3084(98)00088-7).
- [240] W. Zhang, Z. Wang, C. Wu, Y. Jin, X. Liu, Z. Wu, J. Liu, The effect of DSPE-PEG2000, cholesterol and drug incorporated in bilayer on the formation of discoidal micelles, *Eur J Pharm Sci* 125 (2018) 74–85. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2018.09.013>.
- [241] Q. Li, X. Li, C. Zhao, Strategies to Obtain Encapsulation and Controlled Release of Small Hydrophilic Molecules, *Front Bioeng Biotechnol* 8 (2020) 437. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00437>.
- [242] F. Dispenza, E. Amodio, A. De Stefano, S. Gallina, D. Marchese, N. Mathur, F. Riggio, Treatment of sudden sensorineural hearing loss with transtympanic injection of steroids as single therapy: a randomized clinical study, *Eur Arch Otorhinolaryngol* 268 (2011) 1273–1278. <https://doi.org/10.1007/s00405-011-1523-0>.
- [243] C. Hald Albertsen, J.A. Kulkarni, D. Witzigmann, M. Lind, K. Petersson, J.B. Simonsen, The role of lipid components in lipid nanoparticles for vaccines and gene therapy, *Advanced Drug Delivery Reviews* 188 (2022) 114416. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2022.114416>.
- [244] M. Anderson, A. Omri, The Effect of Different Lipid Components on the In Vitro Stability and Release Kinetics of Liposome Formulations, *Drug Delivery* 11 (2004) 33–39. <https://doi.org/10.1080/10717540490265243>.
- [245] B.R. Lentz, J.K. Lee, Poly(ethylene glycol) (PEG)-mediated fusion between pure lipid bilayers: a mechanism in common with viral fusion and secretory vesicle release?, *Mol Membr Biol* 16 (1999) 279–296. <https://doi.org/10.1080/096876899294508>.
- [246] M.E. Haque, T.J. McIntosh, B.R. Lentz, Influence of lipid composition on physical properties and peg-mediated fusion of curved and uncurved model membrane vesicles: "nature's own" fusogenic lipid bilayer, *Biochemistry* 40 (2001) 4340–4348. <https://doi.org/10.1021/bi002030k>.
- [247] J. Van Der Paal, E.C. Neyts, C.C.W. Verlaack, A. Bogaerts, Effect of lipid peroxidation on membrane permeability of cancer and normal cells subjected to oxidative stress, *Chem. Sci.* 7 (2016) 489–498. <https://doi.org/10.1039/C5SC02311D>.

RÉFÉRENCES

- [248] X. Ruan, J. Hu, L. Lu, Y. Wang, C. Tang, F. Liu, X. Gao, L. Zhang, H. Wu, X. Huang, Q. Wei, Poloxamer 407/188 Binary Thermosensitive Gel as a Moxidectin Delivery System: In Vitro Release and In Vivo Evaluation, *Molecules* 27 (2022) 3063. <https://doi.org/10.3390/molecules27103063>.
- [249] P. Wu, L.D. Liberman, M.C. Liberman, Noise-induced synaptic loss and its post-exposure recovery in CBA/CaJ vs. C57BL/6J mice, *Hearing Research* 445 (2024) 108996. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2024.108996>.
- [250] Y. Koizumi, T. Ito, K. Mizutani, S. Kakehata, Regenerative Effect of a ROCK Inhibitor, Y-27632, on Excitotoxic Trauma in an Organotypic Culture of the Cochlea, *Front. Cell. Neurosci.* 14 (2020). <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.572434>.
- [251] L.L. Cunningham, D.L. Tucci, Hearing Loss in Adults, *New England Journal of Medicine* 377 (2017) 2465–2473. <https://doi.org/10.1056/NEJMr1616601>.
- [252] M. Hütten, A. Dhanasingh, R. Hessler, T. Stöver, K.-H. Esser, M. Möller, T. Lenarz, C. Jolly, J. Groll, V. Scheper, In Vitro and In Vivo Evaluation of a Hydrogel Reservoir as a Continuous Drug Delivery System for Inner Ear Treatment, *PLOS ONE* 9 (2014) e104564. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104564>.
- [253] World Health Organization, Deafness and hearing loss, (2025). <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/deafness-and-hearing-loss> (accessed March 5, 2025).
- [254] C. Calvet, G. Lahlou, S. Safieddine, Progrès de la thérapie génique - Espoirs pour le syndrome d'Usher, *Med Sci (Paris)* 34 (2018) 842–848. <https://doi.org/10.1051/medsci/2018210>.
- [255] L. Li, T. Chao, J. Brant, B. O'Malley, A. Tsourkas, D. Li, Advances in nano-based inner ear delivery systems for the treatment of sensorineural hearing loss, *Advanced Drug Delivery Reviews* 108 (2017) 2–12. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.01.004>.
- [256] X. Wang, L. Dellamary, R. Fernandez, A. Harrop, E.M. Keithley, J.P. Harris, Q. Ye, J. Lichter, C. LeBel, F. Piu, Dose-Dependent Sustained Release of Dexamethasone in Inner Ear Cochlear Fluids Using a Novel Local Delivery Approach, *Audiology and Neurotology* 14 (2009) 393–401. <https://doi.org/10.1159/000241896>.
- [257] R. Kitoh, S. Nishio, H. Sato, T. Ikezono, S. Morita, T. Wada, S. Usami, Clinical practice guidelines for the diagnosis and management of acute sensorineural hearing loss, *Auris Nasus Larynx* 51 (2024) 811–821. <https://doi.org/10.1016/j.anl.2024.06.004>.
- [258] S. Wang, W. Fu, M. Yu, A. Sun, J. Sun, G. Li, Efficacy analysis of intratympanic injection of dexamethasone at different concentrations for the treatment of unilateral idiopathic sudden sensorineural hearing loss, *American Journal of Otolaryngology* 46 (2025) 104603. <https://doi.org/10.1016/j.amjoto.2025.104603>.
- [259] X. Xu, S. Wang, Y. Shu, H. Zhang, Nanoparticle-based inner ear delivery systems for the treatment of hearing loss, *Smart Materials in Medicine* 2 (2021) 350–353. <https://doi.org/10.1016/j.smaim.2021.10.002>.
- [260] B.Y.S. Kim, J.T. Rutka, W.C.W. Chan, Nanomedicine, *New England Journal of Medicine* 363 (2010) 2434–2443. <https://doi.org/10.1056/NEJMr0912273>.
- [261] M.G. Calvagno, C. Celia, D. Paolino, D. Cosco, M. Iannone, F. Castelli, P. Doldo, M. Fresta, Effects of Lipid Composition and Preparation Conditions on Physical-Chemical Properties, Technological Parameters and In Vitro Biological Activity of Gemcitabine-Loaded Liposomes, *Current Drug Delivery* 4 (n.d.) 89–101. <https://doi.org/10.2174/156720107779314749>.
- [262] N. El Kechai, E. Mamelie, Y. Nguyen, N. Huang, V. Nicolas, P. Chaminade, S. Yen-Nicolaÿ, C. Gueutin, B. Granger, E. Ferrary, F. Agnely, A. Bochot, Hyaluronic acid liposomal gel sustains delivery of a corticoid to the inner ear, *Journal of Controlled Release* 226 (2016) 248–257. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.02.013>.

RÉFÉRENCES

- [263] R. Kashfi Sadabad, A. Xia, N. Benkafadar, C. Faniku, D. Preciado, S. Yang, T.A. Valdez, Topical Delivery of Elastic Liposomal Vesicles for Treatment of Middle and Inner Ear Diseases, *ACS Appl Bio Mater* 5 (2022) 4849–4859. <https://doi.org/10.1021/acsabm.2c00569>.
- [264] Q. Du, Y. Liu, M. Fan, S. Wei, M. Ismail, M. Zheng, PEG length effect of peptide-functional liposome for blood brain barrier (BBB) penetration and brain targeting, *Journal of Controlled Release* 372 (2024) 85–94. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2024.06.005>.
- [265] C. Jaudoin, I. Grillo, F. Cousin, M. Gehrke, M. Ouldali, A.-A. Arteni, L. Picton, C. Rihouey, F. Simelière, A. Bochot, F. Agnely, Hybrid systems combining liposomes and entangled hyaluronic acid chains: Influence of liposome surface and drug encapsulation on the microstructure, *Journal of Colloid and Interface Science* 628 (2022) 995–1007. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2022.07.146>.
- [266] E. Kianfar, W.R. Kadhumi, Z.H. Mahmoud, Hydrogel Nanoparticles in Drug Delivery: A Review, *Intelligent Pharmacy* (2025). <https://doi.org/10.1016/j.ipha.2025.11.002>.
- [267] S.A. Lajud, D.A. Nagda, P. Qiao, N. Tanaka, A. Civantos, R. Gu, Z. Cheng, A. Tsourkas, B.W. O'Malley, D. Li, A Novel Chitosan-Hydrogel-Based Nanoparticle Delivery System for Local Inner Ear Application, *Otol Neurotol* 36 (2015) 341–347. <https://doi.org/10.1097/MAO.0000000000000445>.
- [268] M. Rogha, A. Kalkoo, Therapeutic effect of Intra-Tympanic Dexamethasone–Hyaluronic Acid Combination in Sudden Sensorineural Hearing Loss, *Iranian Journal of Otorhinolaryngology* 29 (2017) 255–260. <https://doi.org/10.22038/ijorl.2017.20894.1697>.
- [269] Y.-J. Hwang, S.H. Oh, J.H. Lee, M.K. Park, M.-W. Suh, Biosafety and potency of high-molecular-weight hyaluronic acid with intratympanic dexamethasone delivery for acute hearing loss, *Front. Pharmacol.* 15 (2024). <https://doi.org/10.3389/fphar.2024.1294657>.
- [270] D. Yu, C. Sun, Z. Zheng, X. Wang, D. Chen, H. Wu, X. Wang, F. Shi, Inner ear delivery of dexamethasone using injectable silk-polyethylene glycol (PEG) hydrogel, *International Journal of Pharmaceutics* 503 (2016) 229–237. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.02.048>.
- [271] H.J. Ju, M. Park, J.H. Park, G.R. Shin, H.S. Choi, M.-W. Suh, M.S. Kim, In Vivo Imaging of Click-Crosslinked Hydrogel Depots Following Intratympanic Injection, *Materials* 13 (2020) 3070. <https://doi.org/10.3390/ma13143070>.
- [272] J. Andrade Del Olmo, V. Sáez Martínez, R. Pérez González, J. María Alonso, Sustained Drug Release from Biopolymer-Based Hydrogels and Hydrogel Coatings, in: L. Popa, M. Violeta Ghica, C.-E. Dinu-Pîrvu (Eds.), *Hydrogels - From Tradition to Innovative Platforms with Multiple Applications*, IntechOpen, 2023. <https://doi.org/10.5772/intechopen.103946>.
- [273] E. Brambilla, S. Locarno, S. Gallo, F. Orsini, C. Pini, M. Farronato, D.V. Thomaz, C. Lenardi, M. Piazzoni, G. Tartaglia, Poloxamer-Based Hydrogel as Drug Delivery System: How Polymeric Excipients Influence the Chemical-Physical Properties, *Polymers* 14 (2022) 3624. <https://doi.org/10.3390/polym14173624>.
- [274] S.M. Moghimi, C.J.H. Porter, L. Illum, S.S. Davis, The effect of poloxamer-407 on liposome stability and targeting to bone marrow: comparison with polystyrene microspheres, *International Journal of Pharmaceutics* 68 (1991) 121–126. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(91\)90134-A](https://doi.org/10.1016/0378-5173(91)90134-A).
- [275] I.I. Geneva, B. Cuzzo, T. Fazili, W. Javaid, Normal Body Temperature: A Systematic Review, *Open Forum Infectious Diseases* 6 (2019) ofz032. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofz032>.
- [276] N. El Kechai, F. Agnely, E. Mamelle, Y. Nguyen, E. Ferrary, A. Bochot, Recent advances in local drug delivery to the inner ear, *International Journal of Pharmaceutics* 494 (2015) 83–101. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.08.015>.

RÉFÉRENCES

-
- [277] M. Stranz, E.S. Kastango, A Review of pH and Osmolarity, *Int J Pharm Compd* 6 (2002) 216–220.
 - [278] G. Kalinec, P. Thein, C. Park, F. Kalinec, HEI-OC1 cells as a model for investigating drug cytotoxicity, *Hearing Research* 335 (2016) 105–117. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2016.02.019>.
 - [279] G.M. Kalinec, P. Webster, D.J. Lim, F. Kalinec, A cochlear cell line as an in vitro system for drug ototoxicity screening, *Audiol Neurotol* 8 (2003) 177–189. <https://doi.org/10.1159/000071059>.
 - [280] B. Wahlberg, H. Ghuman, J.R. Liu, M. Modo, Ex vivo biomechanical characterization of syringe-needle ejections for intracerebral cell delivery, *Sci Rep* 8 (2018) 9194. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27568-x>.
 - [281] Z.H. Mok, The effect of particle size on drug bioavailability in various parts of the body, *Pharmaceutical Science Advances* 2 (2024) 100031. <https://doi.org/10.1016/j.pscia.2023.100031>.
 - [282] Y. Ding, Y. Liu, D. Li, R. Hu, Z. Tian, L. Yang, Y. Li, Y. Lin, Y. Qu, Melatonin Ameliorates Senescence of Mouse Auditory Cell Line HEI-OC1 Cells by Suppressing NLRP3 Inflammasome-Mediated Pyroptosis, *Mol Neurobiol* 62 (2025) 9902–9915. <https://doi.org/10.1007/s12035-025-04880-y>.
 - [283] S.H. Kim, K.X. Kim, N.N. Raveendran, T. Wu, S.R. Pondugula, D.C. Marcus, Regulation of ENaC-mediated sodium transport by glucocorticoids in Reissner's membrane epithelium, *Am J Physiol Cell Physiol* 296 (2009) C544–C557. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00338.2008>.
 - [284] A. Maruyama, Y. Kawashima, Y. Fukunaga, A. Makabe, A. Nishio, T. Tsutsumi, Susceptibility of mouse cochlear hair cells to cisplatin ototoxicity largely depends on sensory mechanoelectrical transduction channels both *Ex Vivo* and *In Vivo*, *Hearing Research* 447 (2024) 109013. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2024.109013>.
 - [285] K. Blum, P. Schepsky, P. Derleder, P. Schätzle, F. Nasri, P. Fischer, J. Engel, S. Kurt, Noise-induced cochlear synaptopathy in C57BL/6 N mice as a function of trauma strength: ribbons are more vulnerable than postsynapses, *Front. Cell. Neurosci.* 18 (2024). <https://doi.org/10.3389/fncel.2024.1465216>.
 - [286] T.T. Hickman, K. Hashimoto, L.D. Liberman, M.C. Liberman, Synaptic migration and reorganization after noise exposure suggests regeneration in a mature mammalian cochlea, *Sci Rep* 10 (2020) 19945. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-76553-w>.
 - [287] N. Ismail Mohamad, P. Santra, Y. Park, I.R. Matthews, E. Taketa, D.K. Chan, Synaptic ribbon dynamics after noise exposure in the hearing cochlea, *Commun Biol* 7 (2024) 421. <https://doi.org/10.1038/s42003-024-06067-y>.
 - [288] W. Boonlai, V. Tantishaiyakul, N. Hirun, T. Sangfai, K. Suknuntha, Thermosensitive Poloxamer 407/Poly(Acrylic Acid) Hydrogels with Potential Application as Injectable Drug Delivery System, *AAPS PharmSciTech* 19 (2018) 2103–2117. <https://doi.org/10.1208/s12249-018-1010-7>.
 - [289] J.B. da Silva, M.T. Cook, M.L. Bruschi, Thermoresponsive systems composed of poloxamer 407 and HPMC or NaCMC: mechanical, rheological and sol-gel transition analysis, *Carbohydrate Polymers* 240 (2020) 116268. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116268>.
 - [290] S. Fink, C. Harasztosi, L. Xie, S. Silvente, P. Attali, N. Caron, W. Singer, L. Rüttiger, M. Knipper, DX243 counteracts both acoustic trauma-induced reduction in cortical brain oscillations and cochlear synaptopathy, *Front Pharmacol* 16 (2026) 1673189. <https://doi.org/10.3389/fphar.2025.1673189>.
 - [291] E.J. Nodoushan, T. Yi, Y.J. Lee, N. Kim, Wormlike Micellar Solutions, Beyond the Chemical Enhanced Oil Recovery Restrictions, *Fluids* 4 (2019). <https://doi.org/10.3390/fluids4030173>.

RÉFÉRENCES

- [292] S.E. Anachkov, G.S. Georgieva, L. Abezgauz, D. Danino, P.A. Kralchevsky, Viscosity Peak due to Shape Transition from Wormlike to Disklike Micelles: Effect of Dodecanoic Acid, *Langmuir* 34 (2018) 4897–4907. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b00421>.
- [293] H. Räägel, A. Turley, T. Fish, J. Franson, T. Rollins, S. Campbell, M.R. Jorgensen, Medical Device Industry Approaches for Addressing Sources of Failing Cytotoxicity Scores, *Biomed Instrum Technol* 55 (2021) 69–84. <https://doi.org/10.2345/0890-8205-55.2.69>.
- [294] L. Klouda, M.C. Hacker, J.D. Kretlow, A.G. Mikos, Cytocompatibility evaluation of amphiphilic, thermally responsive and chemically crosslinkable macromers for in situ forming hydrogels, *Biomaterials* 30 (2009) 4558–4566. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.05.029>.
- [295] R.C. Hubrecht, E. Carter, The 3Rs and Humane Experimental Technique: Implementing Change, *Animals (Basel)* 9 (2019) 754. <https://doi.org/10.3390/ani9100754>.
- [296] S.L. Ward, T.L. Walker, S.D. Dimitrijevič, Evaluation of chemically induced toxicity using an *in vitro* model of human corneal epithelium, *Toxicology in Vitro* 11 (1997) 121–139. [https://doi.org/10.1016/S0887-2333\(96\)00068-9](https://doi.org/10.1016/S0887-2333(96)00068-9).
- [297] S. Silva, J. Bicker, A. Falcão, A. Fortuna, Air-liquid interface (ALI) impact on different respiratory cell cultures, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 184 (2023) 62–82. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2023.01.013>.
- [298] M.E. Kreft, U.D. Jerman, E. Lasič, T. Lanišnik Rižner, N. Hevir-Kene, L. Peternel, K. Kristan, The Characterization of the Human Nasal Epithelial Cell Line RPMI 2650 Under Different Culture Conditions and Their Optimization for an Appropriate *in vitro* Nasal Model, *Pharm Res* 32 (2015) 665–679. <https://doi.org/10.1007/s11095-014-1494-0>.
- [299] A. Lechanteur, B. Evrard, G. Piel, Assessment of the feasibility to develop a fast and easy reproducible 3D bronchial model growing at the air-liquid interface: Which critical culture parameters must be controlled?, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 144 (2019) 2–10. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2019.09.001>.
- [300] D. Baldassi, B. Gabold, O. Merkel, Air-liquid interface cultures of the healthy and diseased human respiratory tract: promises, challenges and future directions, *Adv Nanobiomed Res* 1 (2021) 2000111. <https://doi.org/10.1002/anbr.202000111>.
- [301] H. Wan, H.L. Winton, C. Soeller, G. a Stewart, P. j Thompson, D. c Gruenert, M.B. Cannell, D. r Garrod, C. Robinson, Tight junction properties of the immortalized human bronchial epithelial cell lines Calu-3 and 16HBE14o-, *Eur Respir J* 15 (2000) 1058. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3003.2000.01514.x>.
- [302] P.J. Callaghan, B. Ferrick, E. Rybakovsky, S. Thomas, J.M. Mullin, Epithelial barrier function properties of the 16HBE14o- human bronchial epithelial cell culture model, *Bioscience Reports* 40 (2020) BSR20201532. <https://doi.org/10.1042/BSR20201532>.
- [303] M.E. Kreft, U.D. Jerman, E. Lasič, N. Hevir-Kene, T.L. Rižner, L. Peternel, K. Kristan, The characterization of the human cell line Calu-3 under different culture conditions and its use as an optimized *in vitro* model to investigate bronchial epithelial function, *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 69 (2015) 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2014.12.017>.
- [304] O. Schmid, C. Jud, Y. Umehara, D. Mueller, A. Bucholski, F. Gruber, O. Denk, R. Egle, A. Petri-Fink, B. Rothen-Rutishauser, Biokinetics of Aerosolized Liposomal Ciclosporin A in Human Lung Cells *In Vitro* Using an Air-Liquid Cell Interface Exposure System, *Journal of Aerosol Medicine and Pulmonary Drug Delivery* 30 (2017) 411–424. <https://doi.org/10.1089/jamp.2016.1361>.
- [305] M. Sharma, E. Huber, E. Arnesdotter, H.P. Behrsing, A. Bettmann, D. Brandwein, S. Constant, R. Date, A. Deshpande, E. Fabian, A. Gupta, R. Gutierrez, A.C. Gutleb, M.M. Hargrove, M. Hollings, V. Hutter, A.M. Jarabek, Y. Kaluzhny, R. Landsiedel, L. Milchak, R.A. Moyer, J.R. Murray, K. Page, M. Patel, S.N. Pearson, E.J. Petersen, E. Reinke, N. Roldan, C. Roper, J.B. Scaglione, R.S. Settivari, A.O. Stucki, S. Verstraelen, J.L. Wallace,

RÉFÉRENCES

- S. McCullough, A.J. Clippinger, Minimum information for reporting on the TEER (trans-epithelial/endothelial electrical resistance) assay (MIRTA), *Arch Toxicol* 99 (2025) 57–66. <https://doi.org/10.1007/s00204-024-03879-z>.
- [306] U. Puapermpoonsiri, V. Lipipun, N. Vardhanabhuti, Synergistic Effect of Phospholipid-Based Liposomes and Propylthiouracil on U-937 Cell Growth, *Journal of Liposome Research* 15 (2005) 215–227. <https://doi.org/10.1080/00032710500364316>.
- [307] B. Bailly-Maitre, G. de Sousa, K. Boulukos, J. Gugenheim, R. Rahmani, Dexamethasone inhibits spontaneous apoptosis in primary cultures of human and rat hepatocytes via Bcl-2 and Bcl-xL induction, *Cell Death Differ* 8 (2001) 279–288. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400815>.
- [308] S. Shah, V. Dhawan, R. Holm, M.S. Nagarsenker, Y. Perrie, Liposomes: Advancements and innovation in the manufacturing process, *Advanced Drug Delivery Reviews* 154–155 (2020) 102–122. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2020.07.002>.
- [309] N. Penoy, B. Grignard, B. Evrard, G. Piel, A supercritical fluid technology for liposome production and comparison with the film hydration method, *International Journal of Pharmaceutics* 592 (2021) 120093. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.120093>.
- [310] T.N. Dinh, B. Bottero, F. Perin, L.-A. Bya, A. Lechanteur, B. Evrard, G. Piel, D. Cataldo, Ciclesonide/indacaterol-encapsulated liposomes: optimizing corticosteroid-bronchodilator therapy for a more effective approach to asthma management, (2026). <https://doi.org/10.2139/ssrn.6765699>.
- [311] C.A. Coulaloglou, L.L. Tavlarides, Description of interaction processes in agitated liquid-liquid dispersions, *Chemical Engineering Science* 32 (1977) 1289–1297. [https://doi.org/10.1016/0009-2509\(77\)85023-9](https://doi.org/10.1016/0009-2509(77)85023-9).
- [312] L. Zhao, F. Temelli, Preparation of anthocyanin-loaded liposomes using an improved supercritical carbon dioxide method, *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 39 (2017) 119–128. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2016.11.013>.
- [313] L. Zhao, F. Temelli, J.M. Curtis, L. Chen, Encapsulation of lutein in liposomes using supercritical carbon dioxide, *Food Research International* 100 (2017) 168–179. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.06.055>.
- [314] B.-Z. Maytal, J.M. Pfotenhauer, The Joule-Thomson Effect, Its Inversion and Other Expansions, in: B.-Z. Maytal, J.M. Pfotenhauer (Eds.), *Miniature Joule-Thomson Cryocooling: Principles and Practice*, Springer, New York, NY, 2013: pp. 39–72. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-8285-8_2.
- [315] M. Schneider, Y. Masmoudi, C. Girard, F. Matonti, C. Olmière, E. Badens, Sequential-Dispersion PGSS process applied to lutein encapsulation at moderate temperatures: A solvent-free method for thermosensitive compound encapsulation, *The Journal of Supercritical Fluids* 207 (2024) 106186. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2024.106186>.
- [316] S. Varona, S. Kareth, Á. Martín, M.J. Cocero, Formulation of lavandin essential oil with biopolymers by PGSS for application as biocide in ecological agriculture, *The Journal of Supercritical Fluids* 54 (2010) 369–377. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2010.05.019>.
- [317] L. Zhao, F. Temelli, Preparation of liposomes using supercritical carbon dioxide via depressurization of the supercritical phase, *Journal of Food Engineering* 158 (2015) 104–112. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.03.004>.
- [318] P.J. Linstrom, W.G. (Eds.) Mallard, Thermophysical Properties of Fluid Systems, in: *NIST Chemistry WebBook*, NIST Standard Reference Database Number 69 (2025). <https://doi.org/https://doi.org/10.18434/T4D303>.
- [319] M. Nolasco Araujo, T. Boucherès, N. Sheibat-Othman, T.F.L. McKenna, Gas–Liquid Mass Transfer in Unbaffled Multi-Impeller Stirred Tank Reactors for Vinylidene Fluoride Emulsion Polymerization under Supercritical Conditions: Experimental Pressure-Based Approach and CFD Simulations of Hydrodynamics, *Ind. Eng. Chem. Res.* 64 (2025) 24538–24550. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.5c04184>.

RÉFÉRENCES

- [320] H. Daraee, A. Etemadi, M. Kouhi, S. Alimirzalu, A. Akbarzadeh, Application of liposomes in medicine and drug delivery, *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology* 44 (2016) 381–391. <https://doi.org/10.3109/21691401.2014.953633>.
- [321] S. Giordani, V. Marassi, A. Zattoni, B. Roda, P. Reschiglian, Liposomes characterization for market approval as pharmaceutical products: Analytical methods, guidelines and standardized protocols, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 236 (2023) 115751. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2023.115751>.
- [322] S. Shah, V. Dhawan, R. Holm, M.S. Nagarsenker, Y. Perrie, Liposomes: Advancements and innovation in the manufacturing process, *Advanced Drug Delivery Reviews* 154–155 (2020) 102–122. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2020.07.002>.
- [323] M. Biscaia-Caleiras, N.A. Fonseca, A.S. Lourenço, J.N. Moreira, S. Simões, Rational formulation and industrial manufacturing of lipid-based complex injectables: Landmarks and trends, *Journal of Controlled Release* 373 (2024) 617–639. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2024.07.021>.
- [324] S. Khadke, C.B. Roces, R. Donaghey, V. Giacobbo, Y. Su, Y. Perrie, Scalable solvent-free production of liposomes, *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 72 (2020) 1328–1340. <https://doi.org/10.1111/jphp.13329>.
- [325] S. Deshpande, C. Dekker, On-chip microfluidic production of cell-sized liposomes, *Nat Protoc* 13 (2018) 856–874. <https://doi.org/10.1038/nprot.2017.160>.
- [326] S.M. Mortazavi, M.R. Mohammadabadi, K. Khosravi-Darani, M.R. Mozafari, Preparation of liposomal gene therapy vectors by a scalable method without using volatile solvents or detergents, *Journal of Biotechnology* 129 (2007) 604–613. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2007.02.005>.
- [327] L. Zhao, F. Temelli, Preparation of liposomes using a modified supercritical process via depressurization of liquid phase, *The Journal of Supercritical Fluids* 100 (2015) 110–120. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2015.02.022>.
- [328] E. Badens, Y. Masmoudi, A. Mouahid, C. Crampon, Current situation and perspectives in drug formulation by using supercritical fluid technology, *The Journal of Supercritical Fluids* 134 (2018) 274–283. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2017.12.038>.
- [329] W. Bigazzi, N. Penoy, B. Evrard, G. Piel, Supercritical fluid methods: An alternative to conventional methods to prepare liposomes, *Chemical Engineering Journal* 383 (2020) 123106. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.123106>.
- [330] N. Penoy, K.L. Delma, H.A. Tonakpon, B. Grignard, B. Evrard, G. Piel, An innovative one step green supercritical CO₂ process for the production of liposomes co-encapsulating both a hydrophobic and a hydrophilic compound for pulmonary administration, *International Journal of Pharmaceutics* 627 (2022) 122212. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2022.122212>.
- [331] E. de Paz, Á. Martín, M.J. Cocero, Formulation of β -carotene with soybean lecithin by PGSS (Particles from Gas Saturated Solutions)-drying, *The Journal of Supercritical Fluids* 72 (2012) 125–133. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2012.08.007>.
- [332] L. Zhao, F. Temelli, L. Chen, Encapsulation of anthocyanin in liposomes using supercritical carbon dioxide: Effects of anthocyanin and sterol concentrations, *Journal of Functional Foods* 34 (2017) 159–167. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.04.021>.
- [333] L. Zhao, F. Temelli, J.M. Curtis, L. Chen, Preparation of liposomes using supercritical carbon dioxide technology: Effects of phospholipids and sterols, *Food Research International* 77 (2015) 63–72. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.07.006>.
- [334] K.L. Delma, A. Lechanteur, B. Evrard, R. Semdé, G. Piel, Sterilization methods of liposomes: Drawbacks of conventional methods and perspectives, *International Journal of Pharmaceutics* 597 (2021) 120271. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120271>.
- [335] T.N. Dinh, B. Bottero, F. Perin, L.-A. Bya, A. Lechanteur, B. Evrard, G. Piel, D. Cataldo, Ciclesonide/indacaterol-encapsulated liposomes: optimizing corticosteroid-bronchodilator

RÉFÉRENCES

- therapy for a more effective approach to asthma management, (2026). <https://doi.org/10.2139/ssrn.6765699>.
- [336] C. Gauthy, N. Cole, E. Spahic, R. Closset, E. Hendrickx, L. Conrard, Y. Bodadi, H. Magdalena Segura, V. Tallandier, P.-B. Van Lerberghe, L. Collard, N. Penoy, F. Boschini, B. Evrard, L. Delacroix, B. Malgrange, G. Piel, Development of a thermosensitive hydrogel containing liposomes for sustained dexamethasone delivery in sensorineural hearing loss, *International Journal of Pharmaceutics* 697 (2026) 126847. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2026.126847>.
- [337] N. Penoy, K.L. Delma, N. Homkar, A. Karim Sakira, S. Egrek, R. Sacheli, P.-Y. Sacré, B. Grignard, M.-P. Hayette, T.I. Somé, R. Semdé, B. Evrard, G. Piel, Development and optimization of a one step process for the production and sterilization of liposomes using supercritical CO₂, *International Journal of Pharmaceutics* 651 (2024) 123769. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2024.123769>.
- [338] L.-A. Bya, T.N. Dinh, N. Penoy, P.-Y. Sacré, B. Bottero, D. Cataldo, E. Hendrickx, L. Conrard, B. Evrard, G. Piel, Optimizing spray-dried liposomes for pulmonary delivery: impact of lipids composition and of drying parameters using experimental design, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* (2026) 115035.
- [339] K.L. Delma, N. Penoy, A.K. Sakira, S. Egrek, R. Sacheli, B. Grignard, M.-P. Hayette, T. Issa Somé, B. Evrard, R. Semdé, G. Piel, Use of supercritical CO₂ for the sterilization of liposomes: Study of the influence of sterilization conditions on the chemical and physical stability of phospholipids and liposomes, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 183 (2023) 112–118. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2023.01.002>.
- [340] R.S. Kim, F.S. LaBella, Comparison of analytical methods for monitoring autoxidation profiles of authentic lipids, *Journal of Lipid Research* 28 (1987) 1110–1117. [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)38624-7](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)38624-7).
- [341] International Council for Harmonisation (ICH), ICH guideline Q8 (R2) on pharmaceutical development - Step 5, ICH, Geneva, Switzerland, 2009. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/international-conference-harmonisation-technical-requirements-registration-pharmaceuticals-human-use-considerations-ich-guideline-q8-r2-pharmaceutical-development-step-5_en.pdf (accessed July 7, 2026).
- [342] N. Pippa, P.P. Dallas, D.M. Rekkas, Chapter 23 - Design of experiment approaches for liposome property optimization, in: S.G. Antimisariis (Ed.), *Liposomes in Drug Delivery*, Academic Press, 2024: pp. 583–611. <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-15491-1.00013-4>.
- [343] L. Lesoin, O. Boutin, C. Crampon, E. Badens, CO₂/water/surfactant ternary systems and liposome formation using supercritical CO₂: A review, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 377 (2011) 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2011.01.027>.
- [344] L. Zhao, F. Temelli, Preparation of liposomes using supercritical carbon dioxide via depressurization of the supercritical phase, *Journal of Food Engineering* 158 (2015) 104–112. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.03.004>.
- [345] S. Varona, S. Kareth, Á. Martín, M.J. Cocero, Formulation of lavandin essential oil with biopolymers by PGSS for application as biocide in ecological agriculture, *The Journal of Supercritical Fluids* 54 (2010) 369–377. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2010.05.019>.
- [346] J. Yang, O.N. Ciftci, Formation of hollow solid lipid micro- and nanoparticles using supercritical carbon dioxide, *Food and Bioproducts Processing* 98 (2016) 151–160. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2016.01.004>.
- [347] D.R. do Nascimento Junior, A. Tabernerio, E.C. de M. Cabral Albuquerque, S.A.B. Vieira de Melo, Biopesticide Encapsulation Using Supercritical CO₂: A Comprehensive Review

RÉFÉRENCES

- and Potential Applications, *Molecules* 26 (2021) 4003. <https://doi.org/10.3390/molecules26134003>.
- [348] P.J. Linstrom, W.G. Mallard, eds., Thermophysical Properties of Fluid Systems, in: NIST Chemistry WebBook, NIST Standard Reference Database Number 69, National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg MD, 2025: p. 20899. <https://doi.org/https://doi.org/10.18434/T4D303>.
- [349] M. Nolasco Araujo, T. Boucherès, N. Sheibat-Othman, T.F.L. McKenna, Gas–Liquid Mass Transfer in Unbaffled Multi-Impeller Stirred Tank Reactors for Vinylidene Fluoride Emulsion Polymerization under Supercritical Conditions: Experimental Pressure-Based Approach and CFD Simulations of Hydrodynamics, *Ind. Eng. Chem. Res.* 64 (2025) 24538–24550. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.5c04184>.
- [350] B. Prakash, T. Bhatelia, D. Wadnerkar, M.T. Shah, V.K. Pareek, R.P. Utikar, Vortex shape and gas-liquid hydrodynamics in unbaffled stirred tank, *The Canadian Journal of Chemical Engineering* 97 (2019) 1913–1920. <https://doi.org/10.1002/cjce.23433>.
- [351] C.A. Coulaloglou, L.L. Tavlarides, Description of interaction processes in agitated liquid-liquid dispersions, *Chemical Engineering Science* 32 (1977) 1289–1297. [https://doi.org/10.1016/0009-2509\(77\)85023-9](https://doi.org/10.1016/0009-2509(77)85023-9).
- [352] Z.H. Mok, The effect of particle size on drug bioavailability in various parts of the body, *Pharmaceutical Science Advances* 2 (2024) 100031. <https://doi.org/10.1016/j.pscia.2023.100031>.
- [353] W. Wang, Z. Huang, Y. Huang, X. Zhang, J. Huang, Y. Cui, X. Yue, C. Ma, F. Fu, W. Wang, C. Wu, X. Pan, Pulmonary delivery nanomedicines towards circumventing physiological barriers: Strategies and characterization approaches, *Advanced Drug Delivery Reviews* 185 (2022) 114309. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2022.114309>.
- [354] S. Salave, D. Rana, P. Patel, R. Gupta, D. Benival, N. Kommineni, Chapter 24 - Development of generic liposome products for drug delivery, in: S.G. Antimisialis (Ed.), *Liposomes in Drug Delivery*, Academic Press, 2024: pp. 613–634. <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-15491-1.00010-9>.
- [355] Yu.A. Tereshkina, T.I. Torkhovskaya, E.G. Tikhonova, L.V. Kostryukova, M.A. Sanzhakov, E.I. Korotkevich, Yu.Yu. Khudoklinova, N.A. Orlova, E.F. Kolesanova, Nanoliposomes as drug delivery systems: safety concerns, *Journal of Drug Targeting* 30 (2022) 313–325. <https://doi.org/10.1080/1061186X.2021.1992630>.
- [356] L. Wu, J. Zhang, W. Watanabe, Physical and chemical stability of drug nanoparticles, *Advanced Drug Delivery Reviews* 63 (2011) 456–469. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2011.02.001>.
- [357] D. Carugo, E. Bottaro, J. Owen, E. Stride, C. Nastruzzi, Liposome production by microfluidics: potential and limiting factors, *Sci Rep* 6 (2016) 25876. <https://doi.org/10.1038/srep25876>.
- [358] G. Buttitta, S. Bonacorsi, C. Barbarito, M. Moliterno, S. Pompei, G. Saito, I. Oddone, G. Verdone, D. Secci, S. Raimondi, Scalable microfluidic method for tunable liposomal production by a design of experiment approach, *International Journal of Pharmaceutics* 662 (2024) 124460. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2024.124460>.
- [359] R. Rebollo, F. Oyouun, Y. Corvis, M.M. El-Hammadi, B. Saubamea, K. Andrieux, N. Mignet, K. Alhareth, Microfluidic Manufacturing of Liposomes: Development and Optimization by Design of Experiment and Machine Learning, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 14 (2022) 39736–39745. <https://doi.org/10.1021/acsami.2c06627>.
- [360] M. Rohrschneider, S. Bhagwat, R. Krampe, V. Michler, J. Breitzkreutz, G. Hochhaus, Evaluation of the Transwell System for Characterization of Dissolution Behavior of Inhalation Drugs: Effects of Membrane and Surfactant, *Mol. Pharmaceutics* 12 (2015) 2618–2624. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.5b00221>.

RÉFÉRENCES

- [361] C. Tang, C. Ou-yang, W. Chen, C. Zou, J. Huang, C. Cui, S. Yang, C. Guo, X. Yang, Y. Lin, Q. Pei, G. Yang, Prediction of pharmacokinetic parameters of inhaled indacaterol formulation in healthy volunteers using physiologically-based pharmacokinetic (PBPK) model, *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 168 (2022) 106055. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2021.106055>.
- [362] D. Drabik, G. Chodaczek, S. Kraszewski, M. Langner, Mechanical Properties Determination of DMPC, DPPC, DSPC, and HSPC Solid-Ordered Bilayers, *Langmuir* 36 (2020) 3826–3835. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.0c00475>.
- [363] L. Padrela, M.A. Rodrigues, A. Duarte, A.M.A. Dias, M.E.M. Braga, H.C. de Sousa, Supercritical carbon dioxide-based technologies for the production of drug nanoparticles/nanocrystals – A comprehensive review, *Advanced Drug Delivery Reviews* 131 (2018) 22–78. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.07.010>.
- [364] P. Trucillo, R. Campardelli, S. Iuorio, P. De Stefanis, E. Reverchon, Economic Analysis of a New Business for Liposome Manufacturing Using a High-Pressure System, *Processes* 8 (2020) 1604. <https://doi.org/10.3390/pr8121604>.
- [365] L. Cseri, M. Razali, P. Pogany, G. Szekely, Chapter 3.15-organic solvents in sustainable synthesis and engineering, *Green Chemistry* (2018) 513–553. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809270-5.00020-0>.
- [366] R.D. Worsham, V. Thomas, S.S. Farid, Impact of ethanol on continuous inline diafiltration of liposomal drug products, *Biotechnology Journal* 18 (2023) 2300194. <https://doi.org/10.1002/biot.202300194>.
- [367] J.D. Chea, A. Christon, V. Pierce, J.H. Reilly, M. Russ, M. Savelski, C.S. Slater, K.M. Yenkie, Framework for solvent recovery, reuse, and recycling in industries, in: *Computer Aided Chemical Engineering*, Elsevier, 2019: pp. 199–204. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128185971500321> (accessed May 4, 2026).
- [368] L. Guerassimoff, J. Nicolas, Towards safer medicines: management of residual solvents and green alternatives, *Journal of Controlled Release* 391 (2026) 114643. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2026.114643>.
- [369] M.A. Rauf, Chapter 10 - Stability and release of bioactives from liposomes, in: C. Anandharamakrishnan, S. Dutta (Eds.), *Liposomal Encapsulation in Food Science and Technology*, Academic Press, 2023: pp. 189–222. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823935-3.00005-9>.
- [370] D. Drabik, G. Chodaczek, S. Kraszewski, M. Langner, Mechanical Properties Determination of DMPC, DPPC, DSPC, and HSPC Solid-Ordered Bilayers, *Langmuir* 36 (2020) 3826–3835. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.0c00475>.
- [371] G.W. Cleary, J.L. Zatz, Interaction of Hydrocortisone with Model Membranes Containing Phospholipid and Cholesterol, *Journal of Pharmaceutical Sciences* 66 (1977) 975–980. <https://doi.org/10.1002/jps.2600660718>.
- [372] A. Khondker, J.S. Hub, M.C. Rheinstädter, Steroid–steroid interactions in biological membranes: Cholesterol and cortisone, *Chemistry and Physics of Lipids* 221 (2019) 193–197. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2019.04.003>.
- [373] S. Kaddah, N. Khreich, F. Kaddah, L. Khrouz, C. Charcosset, H. Greige-Gerges, Corticoids modulate liposome membrane fluidity and permeability depending on membrane composition and experimental protocol design, *Biochimie* 153 (2018) 33–45. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2018.06.011>.
- [374] H.Y. Saad, W.I. Higuchi, Water Solubility of Cholesterol, *JPharmSci* 54 (1965) 1205–1206. <https://doi.org/10.1002/jps.2600540826>.
- [375] V.-A. Tsotas, S. Mourtas, S.G. Antimisiaris, Dexamethasone Incorporating Liposomes: Effect of Lipid Composition on Drug Trapping Efficiency and Vesicle Stability, *Drug Delivery* 14 (2007) 441–445. <https://doi.org/10.1080/10717540701603530>.

RÉFÉRENCES

- [376] S. Franzé, F. Selmin, E. Samaritani, P. Minghetti, F. Cilurzo, Lyophilization of Liposomal Formulations: Still Necessary, Still Challenging, *Pharmaceutics* 10 (2018) 139. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10030139>.
- [377] J.Y. Yu, P. Chuesiang, G.H. Shin, H.J. Park, Post-Processing Techniques for the Improvement of Liposome Stability, *Pharmaceutics* 13 (2021) 1023. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13071023>.
- [378] C. Chen, D. Han, C. Cai, X. Tang, An overview of liposome lyophilization and its future potential, *Journal of Controlled Release* 142 (2010) 299–311. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2009.10.024>.
- [379] M.M. Mehanna, K.K. Abba, Recent advances in freeze-drying: variables, cycle optimization, and innovative techniques, *Pharmaceutical Development and Technology* 27 (2022) 904–923. <https://doi.org/10.1080/10837450.2022.2129385>.
- [380] M.D. Howard, X. Lu, M. Jay, T.D. Dziubla, Optimization of the lyophilization process for long-term stability of solid-lipid nanoparticles, *Drug Dev Ind Pharm* 38 (2012) 1270–1279. <https://doi.org/10.3109/03639045.2011.645835>.
- [381] B. Sylvester, A. Porfire, P.-J. Van Bockstal, S. Porav, M. Achim, T.D. Beer, I. Tomuță, Formulation Optimization of Freeze-Dried Long-Circulating Liposomes and In-Line Monitoring of the Freeze-Drying Process Using an NIR Spectroscopy Tool, *Journal of Pharmaceutical Sciences* 107 (2018) 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2017.05.024>.
- [382] D.P. Rowe, S.J. O'Leary, Auditory System, Peripheral, in: M.J. Aminoff, R.B. Daroff (Eds.), *Encyclopedia of the Neurological Sciences* (Second Edition), Academic Press, Oxford, 2014: pp. 329–334. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385157-4.00121-4>.
- [383] J.-Y. Ahn, H.J. Park, G.-H. Park, Y.-S. Jeong, H.-B. Kwak, Y.-J. Lee, J.-E. Shin, W.-J. Moon, Tympanometry and CT Measurement of Middle Ear Volumes in Patients with Unilateral Chronic Otitis Media, *Clin Exp Otorhinolaryngol* 1 (2008) 139–142. <https://doi.org/10.3342/ceo.2008.1.3.139>.
- [384] B. Mui, L. Chow, M.J. Hope, Extrusion Technique to Generate Liposomes of Defined Size, in: *Liposomes, Part A*, Academic Press, 2003: pp. 3–14. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(03\)67001-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(03)67001-1).
- [385] E.E. Leary Pararas, D.A. Borkholder, J.T. Borenstein, Microsystems Technologies for Drug Delivery to the Inner Ear, *Adv Drug Deliv Rev* 64 (2012) 1650–1660. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.02.004>.
- [386] P. Supjaroen, W. Niamsi, P. Thirabowonkitphithan, P. Thummarati, W. Laiwattanapaisa, A customizable and low-cost 3D-printed transwell device coupled with 3D cell culture for permeability assay, *HardwareX* 20 (2024) e00603. <https://doi.org/10.1016/j.ohx.2024.e00603>.
- [387] A.A. Dogan, M. Dufva, Customized 3D-printed stackable cell culture inserts tailored with bioactive membranes, *Sci Rep* 12 (2022) 3694. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-07739-7>.
- [388] M.S. Razavi, P. Ebrahimnejad, Y. Fatahi, A. D'Emanuele, R. Dinarvand, Recent Developments of Nanostructures for the Ocular Delivery of Natural Compounds, *Front. Chem.* 10 (2022). <https://doi.org/10.3389/fchem.2022.850757>.
- [389] C. López-Iglesias, E.R. López, J. Fernández, M. Landin, C.A. García-González, Modeling of the Production of Lipid Microparticles Using PGSS® Technique, *Molecules* 25 (2020) 4927. <https://doi.org/10.3390/molecules25214927>.
- [390] Q. Yao, Y. Yang, M. Hu, Y. Qiu, Y. Shi, L. Kou, Liposomal dexamethasone for intra-articular therapy: Functional strategies and clinical progress, *Journal of Controlled Release* 385 (2025) 114040. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2025.114040>.
- [391] P. Kallinteri, S.G. Antimisiaris, D. Karnabatidis, C. Kalogeropoulou, I. Tsota, D. Siablis, Dexamethasone incorporating liposomes: an in vitro study of their applicability as a slow

RÉFÉRENCES

- releasing delivery system of dexamethasone from covered metallic stents, *Biomaterials* 23 (2002) 4819–4826. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(02\)00233-8](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(02)00233-8).
- [392] X. Xu, M.A. Khan, D.J. Burgess, Predicting hydrophilic drug encapsulation inside unilamellar liposomes, *International Journal of Pharmaceutics* 423 (2012) 410–418. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.12.019>.
- [393] M. Gulati, M. Grover, S. Singh, M. Singh, Lipophilic drug derivatives in liposomes, *International Journal of Pharmaceutics* 165 (1998) 129–168. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(98\)00006-4](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(98)00006-4).
- [394] J.M. White, M.A. Calabrese, Impact of small molecule and reverse poloxamer addition on the micellization and gelation mechanisms of poloxamer hydrogels, *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp* 638 (2022) 128246. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2021.128246>.
- [395] F. Persano, L. Lamanna, M. Friuli, A.C. Stetco, A. Barca, T. Verri, C. Malitesta, C. Demitri, E. Mazzotta, Smart Temperature-Sensitive Injectable Methylcellulose-Based Hydrogels: Design and Optimization for Sustained Drug Release, *VIEW* 6 (2025) 20250029. <https://doi.org/10.1002/VIW.20250029>.
- [396] V. Burckbuchler, G. Mekhloufi, A.P. Giteau, J.L. Grossiord, S. Huille, F. Agnely, Rheological and syringeability properties of highly concentrated human polyclonal immunoglobulin solutions, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 76 (2010) 351–356. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2010.08.002>.
- [397] N. El Kechai, A. Bochot, N. Huang, Y. Nguyen, E. Ferrary, F. Agnely, Effect of liposomes on rheological and syringeability properties of hyaluronic acid hydrogels intended for local injection of drugs, *International Journal of Pharmaceutics* 487 (2015) 187–196. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.04.019>.
- [398] P.J. do Amaral Sobral, G. Gebremariam, F. Drudi, A.C. De Aguiar Saldanha Pinheiro, S. Romani, P. Rocculi, M. Dalla Rosa, Rheological and Viscoelastic Properties of Chitosan Solutions Prepared with Different Chitosan or Acetic Acid Concentrations, *Foods* 11 (2022) 2692. <https://doi.org/10.3390/foods11172692>.
- [399] Corning, Transwell Guidelines for Use, Corning.Com (2025). <https://www.corning.com/worldwide/en/products/life-sciences/products/permeable-supports/transwell-guidelines.html> (accessed July 17, 2026).
- [400] H.M. Braakhuis, S.K. Kloet, S. Kezic, F. Kuper, M.V.D.Z. Park, S. Bellmann, M. van der Zande, S. Le Gac, P. Krystek, R.J.B. Peters, I.M.C.M. Rietjens, H. Bouwmeester, Progress and future of in vitro models to study translocation of nanoparticles, *Arch Toxicol* 89 (2015) 1469–1495. <https://doi.org/10.1007/s00204-015-1518-5>.
- [401] R.S. Álvarez, F. Sacerdoti, C. Jancic, A.W. Paton, J.C. Paton, C. Ibarra, M.M. Amaral, Comparative Characterization of Shiga Toxin Type 2 and Subtilase Cytotoxin Effects on Human Renal Epithelial and Endothelial Cells Grown in Monolayer and Bilayer Conditions, *PLoS One* 11 (2016) e0158180. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158180>.
- [402] B. Alshahrouri, B.E. Blass, T. Dürig, R. Fassihi, Applications of Thermoresponsive Hydrogels for Sustained Drug Release in Ocular and Intravitreal Formulations Treating Visual Impairments, *AAPS J* 28 (2026) 104. <https://doi.org/10.1208/s12248-026-01253-8>.
- [403] K.M. Hosny, Preparation and Evaluation of Thermosensitive Liposomal Hydrogel for Enhanced Transcorneal Permeation of Ofloxacin, *AAPS PharmSciTech* 10 (2009) 1336. <https://doi.org/10.1208/s12249-009-9335-x>.
- [404] D. Mathure, A.D. Sutar, H. Ranpise, A. Pawar, R. Awasthi, Preparation and Optimization of Liposome Containing Thermosensitive In Situ Nasal Hydrogel System for Brain Delivery of Sumatriptan Succinate, *Assay Drug Dev Technol* 21 (2023) 3–16. <https://doi.org/10.1089/adt.2022.088>.

RÉFÉRENCES

- [405] Q. Wang, Z. Zuo, C.K.C. Cheung, S.S.Y. Leung, Updates on thermosensitive hydrogel for nasal, ocular and cutaneous delivery, *Int J Pharm* 559 (2019) 86–101. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.01.030>.
- [406] L.M. Ensign, R. Cone, J. Hanes, Nanoparticle-based drug delivery to the vagina: a review, *J Control Release* 0 (2014) 500–514. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.04.033>.
- [407] M. Ning, Z. Gu, H. Pan, H. Yu, K. Xiao, Preparation and in vitro evaluation of liposomal/niosomal delivery systems for antifungal drug clotrimazole, *Indian J Exp Biol* 43 (2005) 150–157.
- [408] G.H. Sedahmed, Y.A. El-Taweel, M.H. Abdel-Aziz, H.M. El-Naqeara, Mass and heat transfer enhancement at the wall of cylindrical agitated vessel by turbulence promoters, *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification* 80 (2014) 43–50. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2014.04.004>.
- [409] L. Maja, K. Željko, P. Mateja, Sustainable technologies for liposome preparation, *The Journal of Supercritical Fluids* 165 (2020) 104984. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2020.104984>.

L'utilisation de la voie transtympanique (TT) constitue une stratégie prometteuse pour la délivrance cochléaire de principes actifs visant à traiter les surdités neurosensorielles induites par un traumatisme sonore. Les formulations administrées par cette voie doivent néanmoins traverser la membrane de la fenêtre ronde (RWM) afin d'atteindre le compartiment périlymphatique. L'encapsulation des molécules actives dans des liposomes est susceptible de favoriser leur pénétration cochléaire. Toutefois, leur faible viscosité entraîne leur clairance rapide via la trompe d'Eustache. La dispersion de ces nanoparticules dans un hydrogel thermosensible permet dès lors de prolonger leur temps de contact avec la RWM et d'améliorer leur potentiel thérapeutique. L'objectif de cette thèse est donc de développer, caractériser et mettre à l'échelle un système à base de liposomes encapsulant des principes actifs à noyau stéroïdien, dispersés dans un hydrogel thermosensible, adapté à une administration TT, afin de traiter les surdités neurosensorielles induites par un traumatisme sonore.

Les études réalisées ont principalement confirmé l'influence de la composition lipidique sur l'efficacité d'encapsulation de la dexaméthasone, qui diminue en présence de cholestérol. Elles ont également montré que les propriétés des principes actifs conditionnent le développement de ces formulations, chaque molécule nécessitant une optimisation spécifique, comme l'illustrent les études réalisées avec la dexaméthasone, la dexaméthasone phosphate sodique et la DX243. L'association des liposomes à un hydrogel thermosensible de Poloxamer 407 a permis d'obtenir une formulation injectable à température ambiante et capable de gélifier rapidement ($8,0 \pm 3,8$ min) dans la cavité de l'oreille moyenne afin de prolonger son temps de résidence au niveau de la RWM et la libération des liposomes. Les travaux menés sur explants cochléaires murins ont par ailleurs confirmé l'effet otoprotecteur de cette formulation.

Le premier modèle in vitro de RWM a été développé. Un système compartimenté le positionnant en amont de cellules HEI-OC1 reproduisant les cellules ciliées cochléaires a ensuite été mis au point. Celui-ci a permis d'identifier les principaux paramètres favorisant la pénétration des liposomes à travers la membrane, notamment une taille particulière réduite et la présence de DOPE dans leur composition lipidique, puis de démontrer leur internalisation par les cellules cibles après franchissement de la RWM. Ce modèle constitue ainsi un outil préclinique innovant pour l'évaluation de nouvelles stratégies de délivrance cochléaire.

Les enjeux liés au transfert industriel de la production de liposomes ont été abordés par le développement du procédé PGSS. Une démarche « Quality by Design » a notamment permis d'identifier des conditions de fabrication prometteuses à l'échelle pilote (262 bar, 10% d'agitation, 100 mL, dépressurisation à 60 bar/min), conduisant à la production de liposomes de taille inférieure à 200 nm, tout en mettant en évidence les principaux axes d'amélioration du procédé, notamment la maîtrise de leur polydispersité ($PdI > 0,30$).

Dans l'ensemble, ce travail a permis de développer une formulation associant liposomes et hydrogel thermosensible pour l'encapsulation de principes actifs destinés à la cochlée. Bien qu'elle présente toujours certaines limites, notamment une stabilité limitée, son développement a permis d'apporter une meilleure compréhension des paramètres qui conditionnent ses performances. Ce travail a également permis de développer un modèle in vitro de RWM, un outil prometteur pour le développement et la caractérisation de nouvelles thérapies.

