

N° d'ordre : 12/2005-M/C.I

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université des Sciences et de la Technologie
Houari BOUMEDIENE



Faculté de Génie Mécanique et Génie des Procédés

MEMOIRE

Présenté pour l'obtention du diplôme de MAGISTER

En : Chimie industrielle

Spécialité : Energétiques des procédés

Par

Mlle Lynda LAMOUDI

Sujet

Optimisation d'un procédé de fabrication d'un médicament et contribution à la modélisation de sa diffusion

Soutenu le 08/11/2005, devant le jury composé de :

Mr S. BELAADI	Professeur (USTHB)	Président
Mr K. DAOUD	Maître de Conférences (USTHB)	Directeur de thèse
Mme A. BENSMAILI	Professeur (USTHB)	Examineur
Mr A.Y. BADJAH	Professeur (USTHB)	Examineur
Mr A. HADJSADOK	Chargé de Cours (U. Blida)	Examineur

Sommaire

Sommaire

Introduction générale	I
Chapitre I : Revue bibliographique	
Introduction	4
I. Etat de la recherche	4
I.1. Généralités	4
II. Nanotechnologies et nouveaux médicaments	5
II.1. Définition de la vectorisation	5
II.2. Vecteurs	5
II.2.1. Liposomes	6
II.2.2. Nanoparticules	6
II.3. Voie intraveineuse	7
II.3.1. Maîtrise de la distribution tissulaire des médicaments	7
II.3.1.1. Vecteurs de première génération	7
II.3.1.2. Vecteurs de deuxième génération	8
II.3.2. Maîtrise de la distribution cellulaire des médicaments	9
II.3.2.1. Principe	9
II.3.2.2. Vecteurs de troisième génération et applications	10
II.4. Voie orale	12
II.4.1. Bioadhésion et voie orale	12
II.4.2.1. Définitions	12
II.4.2.2. Approches	13
II.4.2. Voies de translocation des nanoparticules	13
II.4.3. Applications	14
II.5. Administration locale	14
II.5.1. Voie oculaire	14
II.5.2. Voie tumorale	14
III. Libération de principes actifs à partir des matrices polymériques	15
III.1. Introduction	15
III.2. Aspects mathématiques de la diffusion	16
III.3. Structure macromoléculaire	18
III.3.1. Densité de réticulation	19
III.3.2. Degré de cristallinité	19
III.3.3. Relaxation macromoléculaire	19
III.4. Conclusion	20
Chapitre II : Procédés de fabrication	
Introduction	21
1. Généralité	21
2. Evaporation du solvant (émulsification / évaporation)	21
2.1. Emulsion aqueuse huile dans eau (H/E)	22
2.2. Emulsion multiple eau dans huile eau (E/H/E)	23
2.3. Emulsion non aqueuse	24
3. Extraction du solvant (émulsification/extraction)	25
4. Séparation de phases (milieu non aqueux)	25
5. Nébulisation (dessiccation par nébulisation)	26
6. Fluidisation	26
7. Fusion	27
8. Conclusion	27
Chapitre III : Méthodologie de la recherche expérimentale	
Introduction	28

1. Historique	28
2. Limites des méthodes traditionnelles d'essais	29
3. Origine de l'efficacité des plans d'expériences	29
4. La méthode des plans d'expériences	30
5. Les limites de l'application des plans des plans d'expériences	31
6. Les domaines d'application des plans d'expériences	31
7. les plans d'expériences numériques	31
Conclusion	32
Chapitre VI : Travail expérimental	
Introduction	
	33
Partie I : Etude d'orientation	
Introduction	34
I. Définition des réponses	34
II. Méthodes d'analyses utilisées	35
1. granulométrie laser	35
2. Chromatographie liquide à haute performance	37
3. Potentiel Zêta	38
III. Mélange de polymères miscibles	40
III.1. Etude de la miscibilité du système binaire Eudragit -PEG	41
III.1.1. Caractérisation par Spectroscopie Infra Rouge du système binaire Eudragit – PEG	41
III.1.2. Etude de la miscibilité du système binaire Eudragit – PEG par analyse thermique différentielle (DSC)	45
IV. Stabilité du mélange miscible par tests rhéologiques	48
Conclusion	50
Partie II : Etude de preformulation	
Introduction	51
I. Caractérisation des facteurs liés à la formulation	51
I.1. Le principe actif	51
I.2. Les excipients	52
II. Caractérisation des facteurs liés au procédé de fabrication	53
II.1. Agitateur	53
II.2. Evaporateur rotatif	53
II.3. Lyophilisateur	53
III. Procédé de fabrication	54
1. Emulsification /évaporation (Emulsion multiple eau dans huile dans eau (E/H/E))	54
2. Etapes du procédé de fabrication	55
Conclusion	56
Partie III : Etude de formulation	
Introduction	57
I. Méthodologie expérimentale	57
II. Réalisation et caractérisation des essais	57
III. Analyse statistique des résultats	60
IV. Modélisation en surface de réponse	61
V. Etude de l'effet des facteurs sur les réponses	62
1. Sur le taux d'encapsulation	63
2. Sur le diamètre des particules	63
Conclusion	64
VI. Détermination et validation de l'optimum	65
VI.1. Caractérisation rhéologique de l'optimum	69
Conclusion	70

Chapitre V : Etude de la cinétique de diffusion	
Introduction	71
1. Modélisation	71
2. Test de dissolution in vitro	78
Conclusion	80
Conclusion générale	82
Références bibliographiques	84
Annexes	
Annexe 1 : Méthode d'analyse par HPLC des la Pénicilline nanoencapsulée	87
Annexe 2 : Chromatogramme de l'étude de spécificité	88
Annexe 3 : Matériau viscoélastique linéaire soumis à des contraintes et des déformations sinusoïdales.	89
Annexe 4 : Courbes isoréponses en surface	92
Annexe 5 : Caractérisation de l'optimum par HPLC et granulométrie laser	101

Introduction générale

Aucun médicament ne peut exercer une activité thérapeutique si la molécule biologiquement active qu'il renferme n'est pas capable de franchir les barrières biologiques qui séparent le site d'administration du site d'action. Les barrières à traverser sont des systèmes très complexes faisant intervenir plusieurs éléments (épithélium, endothélium, membrane cellulaire) et plusieurs composantes (barrières mécaniques ou physico-chimiques et barrières enzymatiques). Certaines molécules sont inefficaces car elles ne diffusent pas spontanément à l'intérieur de la cellule alors que leur cible thérapeutique est à localisation intracellulaire à cause de leurs caractéristiques physico-chimiques (poids moléculaire, solubilité...) peu favorables au passage des barrières biologiques. D'autres molécules se heurtent à des obstacles enzymatiques et chimiques entraînant leur dégradation rapide.

La vectorisation des médicaments correspond au transport des molécules biologiquement actives jusqu'à leur cible biologique. Les chercheurs s'appliquent à mettre au point des systèmes particuliers, submicroniques (nano particules, liposomes) pour le transport des médicaments. Après administration intravasculaire, les vecteurs particuliers sont opsonisés, c'est-à-dire recouverts de protéines et reconnus par les macrophages du foie, de la rate et de la moelle (SPM).

Cette distribution particulière permet d'envisager le ciblage et le traitement expérimental de pathologies telles que les métastases hépatiques mais aussi réduire les concentrations au niveau d'organes cibles de la toxicité de certains médicaments anticancéreux. Par exemple, lorsque la doxorubicine est transportée par des nano particules biodégradables (à base de chaînes moléculaires de polyalkylcyanoacrylate), la toxicité cardiaque de cet anticancéreux est fortement diminuée en raison d'une concentration hépatique accrue.

Les chercheurs ont également développé des systèmes nano particuliers "furtifs" qui, à l'inverse des précédents sont capables de séjourner plus longtemps dans la circulation en évitant la reconnaissance par le foie, la rate et la moelle. La stratégie consiste à empêcher l'adsorption des opsonines en modifiant les propriétés de surface des nano particules. Rendre la surface nano particulaire plus hydrophile est une piste susceptible de réduire les possibilités d'interaction hydrophobe avec les opsonines plasmatiques. Cet objectif peut être atteint en utilisant des polymères non ioniques et flexibles comme le polyéthylène glycol (PEG).

Dans ce cas, le PEG par un effet de répulsion stérique est aussi capable de repousser ces protéines impliquées dans la reconnaissance des nano particules par le SPM. L'étape la plus délicate pour le développement de nano particules à rémanence plasmatique prolongée (nano particules "furtifs") consiste donc à établir une couche stable de PEG par liaison covalente à la surface des particules.

Dans cette optique, nous proposons d'utiliser un mélange de polymères afin de formuler des nano particules "furtifs".

Une étude de miscibilité de deux polymères : l'Eudragit et le PEG, qui sont respectivement lipophile et hydrophile, sera réalisée dans le but de trouver la proportion (rapport) optimale d'un mélange stable (formation d'une liaison hydrogène stable entre les fonctions des deux polymères) qui sera utilisé par la suite dans l'optimisation du procédé de fabrication des nano particules "furtifs".

Dans l'étude de la miscibilité, nous utiliserons deux techniques d'analyses à savoir : l'analyse thermique et la spectroscopie Infrarouge pour mettre en évidence la miscibilité du système binaire du polymère étudié.

Une analyse rhéologique du mélange optimal est réalisée pour vérifier sa stabilité.

L'objectif de la seconde partie de ce travail est la mise au point d'une formule lyophilisée de nano particules d'un mélange de polymères chargé en Pénicilline.

Pour cela, nous proposons de mettre au point une technique d'encapsulation afin d'obtenir des particules submicroniques (vecteurs colloïdaux) et d'étudier le procédé de production de ces vecteurs colloïdaux dans un objectif de contrôle et d'extrapolation à l'échelle pilote et industrielle.

Nous développerons également les techniques de caractérisation de ces systèmes (taille, état de surface, stabilité, capacité d'incorporation de principes actifs, modèles et cinétiques de libération in vitro).

Une étude bio pharmaceutique nous permettra la détermination de la cinétique de libération du principe actif de la matrice polymérique (étude in vitro) d'une part et d'autre part mettre en évidence les différents phénomènes de diffusion qui gouvernent cette libération ; cette étude sera suivie d'une contribution à la modélisation afin de déterminer la loi qui régit cette diffusion.

L'encapsulation a pour objectifs la mise en forme d'un principe actif sous forme de particules de taille variable, la protection éventuelle de ce principe actif et le contrôle de la libération ultérieure.

Dans ce contexte, nous avons utilisé la méthodologie des plans d'expérience, afin de structurer notre démarche de réalisation des essais d'une part, et d'utiliser la matière première de façon rationnelle d'autre part.

En effet après étude des caractéristiques de tous les facteurs de contrôle, et à l'issue du choix des facteurs principaux, le nombre d'essais maximum à réaliser pour optimiser la formulation est de 27 (plan d'expériences Centrale Composite Face (CCF)). Ceci a permis un gain substantiel en matière de temps et de coût.

L'utilisation de l'outil statistique et mathématique du plan d'expérience a permis d'expliquer les différentes influences des facteurs sur les réponses d'une part et de faire ressortir la formule optimale d'autre part.

Sur le plan théorique, ce mémoire est scindé en trois chapitres. Le premier est une revue bibliographique qui traite de la nanotechnologie et des nouveaux médicaments, nous enchaînons ensuite par la cinétique de la libération contrôlée à partir des systèmes polymériques. Ce chapitre met l'accent sur les travaux de recherche réalisés dans ce domaine.

Dans le deuxième chapitre, nous avons décrit les différents procédés d'encapsulation utilisés ainsi que les travaux relatifs à ces derniers.

Le troisième chapitre est consacré à la méthodologie de la recherche expérimentale. Le lecteur trouvera les limites des méthodes traditionnelles, une présentation des plans d'expériences ainsi que l'origine de leur efficacité et leurs limites d'applications.

Enfin, nous concluons ce mémoire par une récapitulation des résultats importants et des recommandations pour les travaux à venir.

Chapitre I : Revue bibliographique

Introduction

Ce chapitre, consacré à la revue bibliographique, comporte trois parties. La première, répertorie les travaux académiques déjà réalisés et nous poserons au terme de cette revue, la problématique de la préparation des nanoparticules. Les deux autres parties focalisent sur la présentation de la nanotechnologie qui nous permet de comprendre l'intérêt de la vectorisation pour en acheminer le principe actif sur le site malade dans un but thérapeutique. Il va de soi que cette vectorisation doit s'opérer sans altérer les organes sains ou l'équilibre physiologique du patient. Les transporteurs étant des structures synthétiques nanométriques à base de polymères, il est possible de développer de nouvelles nanotechnologies pour la vectorisation des médicaments en mettant en œuvre les caractéristiques associatives de polymères. La dernière partie traitera également de la relation entre la structure des polymères et la libération contrôlée de principes actifs.

I. ETAT DE LA RECHERCHE

I.1. Généralités

Au cours de ces dernières années, de nombreux systèmes submicroniques capables de protéger la molécule active de la dégradation et d'en contrôler la libération dans le temps et dans l'espace ont été développés.

De par le monde, la vectorisation des médicaments fait l'objet de nombreuses recherches impliquant différentes approches. Cet intérêt accru peut être expliqué par le fait que cette méthode (vectorisation des médicaments) concerne pratiquement toutes les maladies et plus particulièrement, celles qui accablent l'humanité (cancer, sida, maladies dégénératives etc.).

Les vecteurs à tropisme hépato-splénique relèvent des nanotechnologies. Les plus connus sont les liposomes, les nanocapsules et les nanosphères mais il existe aussi, depuis peu, des systèmes bicompartimentaux qui ouvrent des perspectives nouvelles pour le transport simultané de molécules hydrophiles et lipophiles.

En raison de leur devenir, ces vecteurs dits de «première génération» sont principalement adaptés au traitement des infections intracellulaires. Ils présentent également un grand intérêt pour la réduction de la toxicité de certains médicaments (amphotéricine B, anticancéreux).

Les vecteurs de «deuxième génération» sont conçus sur le principe de la «répulsion stérique». Moins vite captés par le Système Phagocytaire Monocluéé (SPM), ils permettent d'obtenir une résidence vasculaire prolongée. Appelés vecteurs «furtifs», ils ont montré une efficacité remarquable dans le traitement de tumeurs expérimentales.

Les vecteurs de «troisième génération» sont des vecteurs de «deuxième génération» pourvus d'un système de reconnaissance membranaire (anticorps monoclonal, fragment d'anticorps,...). Ils ont aussi prouvé leur intérêt dans le traitement de cancers expérimentaux [1, 2, 3].

II. NANOTECHNOLOGIES ET NOUVEAUX MEDICAMENTS

La vectorisation permet d'obtenir une meilleure efficacité du principe actif mais aussi une diminution de la toxicité. Dans cette partie, nous passerons en revue les différents types de vecteurs de médicaments et leur distribution tissulaire et cellulaire

II.1. Définition de la vectorisation

La vectorisation des médicaments correspond au transport des molécules biologiquement actives jusqu'à leur cible biologique. Les chercheurs s'appliquent à mettre au point des systèmes particuliers, submicroniques (nanoparticules, liposomes) pour le transport des médicaments. Après administration intravasculaire, les vecteurs particuliers sont opsonisés, c'est-à-dire recouverts de protéines et reconnus par les macrophages du foie et de la rate. Cette distribution particulière permet d'envisager le ciblage et le traitement expérimental de pathologies telles que les métastases hépatiques mais aussi de réduire les concentrations au niveau d'organes cibles de la toxicité de certains médicaments anticancéreux. Les chercheurs ont également développé des systèmes nanoparticulaires "furtifs" qui, à l'inverse des précédents sont capables de séjourner plus longtemps dans la circulation en évitant la reconnaissance par le foie et la rate.

II.2. Vecteurs

Ils sont administrés le plus souvent par voie intraveineuse : ils doivent donc être très petits, de quelques centaines de nanomètres (d'où nanotechnologies). La figure (I.1) représente les différents vecteurs de médicaments.

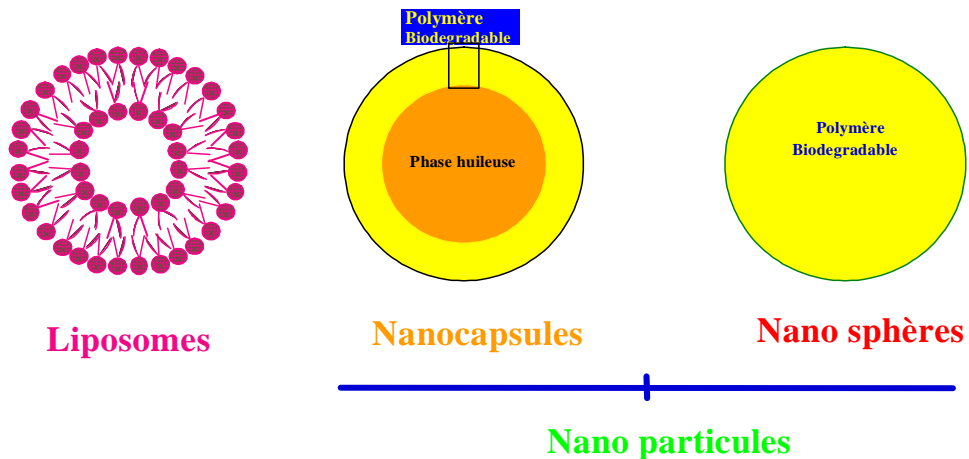


Figure (I.1) : Vecteurs de médicaments

II.2.1. Liposomes

Les liposomes sont des vecteurs formés de phospholipides qui s'organisent en bicouches (phase lamellaire). Ils présentent plusieurs avantages : ils sont composés de phospholipides naturels et sont donc biomimétiques ; en outre ils sont capables d'encapsuler des molécules lipophiles dans la bicouche de phospholipides, et des molécules hydrophiles dans la phase aqueuse.

Les liposomes peuvent avoir des formes diverses : petits ou grands, unilamellaires ou multilamellaires.

Les liposomes ont pour inconvénient d'être relativement instables. Ils sont en effet dépendants de leur température de transition de phase. En outre, in vivo les liposomes subissent des échanges lipidiques avec ceux de l'organisme, ce qui les déstabilisent [4].

II.2.2. Nanoparticules

Pour pallier à ces inconvénients, on a utilisé les progrès de la chimie des polymères pour fabriquer des nanoparticules avec des polymères biodégradables. Ils peuvent être de deux types :

- Nanocapsules (système réservoir) : un cœur huileux ou aqueux est encapsulé dans une fine membrane de polymère. Les molécules encapsulées peuvent être hydrophiles ou lipophiles en fonction de la nature du cœur de la nanocapsule.
- Nanosphères (système matriciel) : le polymère forme une matrice biodégradable dans laquelle le principe actif est dispersé de façon moléculaire.

On peut faire varier la cinétique de libération du principe actif en choisissant des polymères plus ou moins rapidement biodégradables :

- Nanocapsules :
 - Si le polymère se dégrade très lentement, la libération dépend du coefficient de partage de la molécule entre le cœur et le polymère, et du coefficient de diffusion du principe actif dans la membrane polymérique.
 - Si le polymère est rapidement biodégradable, la cinétique de libération dépend du coefficient de partage de la molécule entre le cœur et le milieu de l'organisme.
- Nanosphères : en fonction de la vitesse de dégradation du polymère, la cinétique de libération dépend de la bioérosion du polymère ou de la diffusion du principe actif dans le polymère.

On peut donc maîtriser totalement la cinétique de libération grâce à une bonne connaissance de la physicochimie.

Ces vecteurs sont le plus souvent administrés par voie intraveineuse, mais présentent également des intérêts par voie orale et par voie locale [2,3].

II.3. Voie intraveineuse

Dans ce chapitre, nous verrons comment l'administration par voie intraveineuse de formes vectorisées peut permettre d'obtenir une maîtrise de la distribution tissulaire, cellulaire ou subcellulaire des médicaments [1, 2, 5].

II.3.1. Maîtrise de la distribution tissulaire des médicaments

II.3.1.1. Vecteurs de première génération

L'étude de la biodistribution des vecteurs de première génération a été faite grâce à l'administration de principes actifs marqués au carbone 14 puis à l'application de coupes transversales des animaux traités sur des plaques autoradiographiques. On observe une concentration importante de ces principes actifs essentiellement dans le foie et la rate et dans une moindre mesure dans la moelle, des organes formant le système réticulo-endothélial, qui est riche en cellules phagocytaires.

Il y a donc un ciblage hépato-splénique par ces systèmes colloïdaux. Ceci est expliqué par la très grande surface spécifique développée par ces systèmes :

Pour 1 gramme de particules de 100 nm de diamètre, la surface développée est de 100 m^2 ! Or les protéines plasmatiques viennent s'adsorber à la surface de ces particules. Parmi ces protéines on trouve des opsonines (fragment Fc des IgG, fibronectine, éléments du complément) qui ont des récepteurs sur les macrophages (FcR1 et R2, CR-1, MAC-4, récepteur à la fibronectine). Cette opsonisation, considérée comme marquage du non-soi, se fait par interactions hydrophobes avec les parties hydrophobes des protéines, et conduit à la capture des particules opsonisées par les macrophages. La figure (I.2) représente l'action des vecteurs de première génération dans le foie.

On peut se demander pourquoi cette capture est ciblée au niveau hépato-splénique. En fait, dans la plupart des organes, l'endothélium vasculaire est continu. Mais dans la rate, le foie et la moelle, l'endothélium vasculaire est discontinu. Le sang entre en contact direct avec des macrophages (cellules de Kupffer dans le foie) : on retrouve donc une très grande concentration des systèmes colloïdaux dans ces cellules.

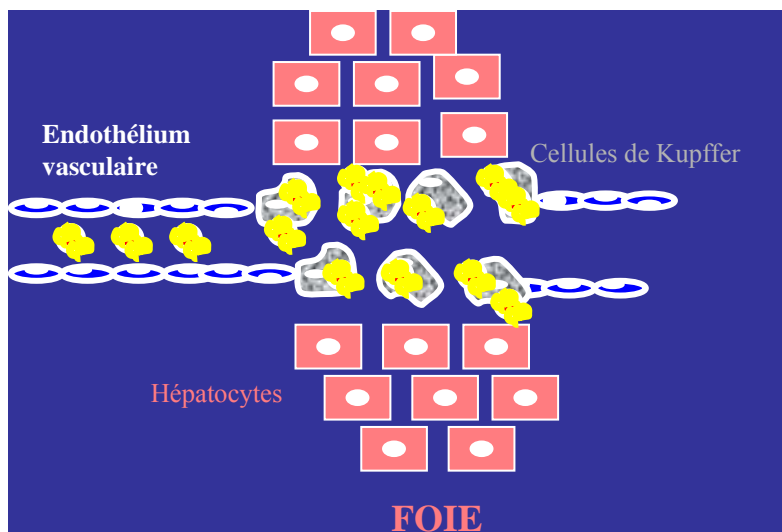


Figure (I.2) : L'action des vecteurs de première génération dans le foie.

Ces systèmes s'avèrent excellents pour traiter les pathologies hépatiques, par exemple les métastases hépatiques. Ces métastases peuvent être traitées par la doxorubicine, mais la dose où la toxicité cardiaque est effective n'est pas suffisante pour éradiquer les métastases. On a donc utilisé des nanoparticules de doxorubicine, qui se sont avérées plus efficaces et n'ont pas engendré de mortalité par toxicité cardiaque. En phase I, la dose maximale tolérée était le double pour les nanoparticules que pour la forme galénique traditionnelle.

Les vecteurs de première génération présentent donc un grand intérêt dans les pathologies hépatiques. Cependant, si le cancer n'est pas situé dans le système réticulo-endothélial, on est confronté à un problème de distribution. On a tenté de marquer les particules par des anticorps spécifiques des tumeurs visées, mais *in vivo* l'opsonisation reste toujours prédominante. Il faut donc empêcher l'opsonisation : c'est ce qu'on peut obtenir avec les vecteurs de deuxième génération [1, 2, 5].

II.3.1.2. Vecteurs de deuxième génération

Pour éviter l'opsonisation, le concept de répulsion stérique a été utilisé en greffant des chaînes très hydrophiles et flexibles sur la surface des particules. Les vecteurs de deuxième génération sont donc des vecteurs à surface modifiée. En fonction de la densité et de la longueur des chaînes de PEG, la dysopsinisation et la répulsion stérique sont variables. La figure (I.3) représente un exemple de vecteur de deuxième génération : le copolymère de cyanoacrylate-co-PEG).

Les PEG modifient les caractéristiques de distribution et de pharmacocinétique : ils permettent aux particules d'avoir une rémanence vasculaire beaucoup plus longue et de diminuer considérablement la clairance plasmatique. On parle de vecteurs furtifs car ils ne sont pas reconnus par les cellules de Kupffer.

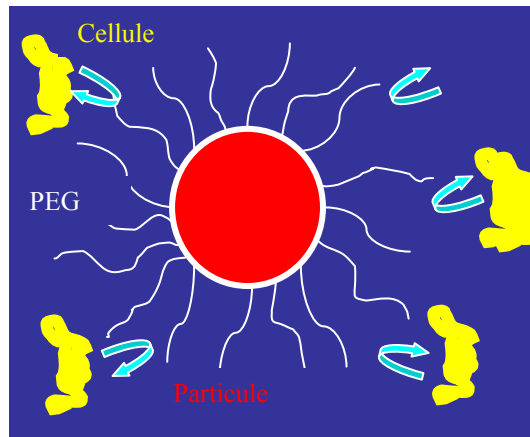


Figure (I.3) : Copolymère de cyanoacrylate-co-PEG.

Cette rémanence vasculaire présente un intérêt pour le ciblage des tumeurs. Dans la plupart des organes, l'endothélium vasculaire est continu. Cependant dans les tumeurs, la perméabilité vasculaire est accrue : les vecteurs pegylés diffusent plus dans les zones tumorales [1, 2, 5].

Les applications thérapeutiques sont nombreuses :

- traitement des tumeurs
- drogues anticancéreuses
- cytokines
- acides nucléiques
- traitement des pathologies vasculaires
- radiodiagnostic
- ciblage des tissus infectés ou inflammés

II.3.2 Maîtrise de la distribution cellulaire des médicaments

II.3.2.1. Principe

Afin d'améliorer l'affinité des vecteurs pour un type tissulaire ou cellulaire, la notion d'adressage moléculaire a orienté la recherche de marqueurs spécifiques. Pour le ciblage tumoral, la découverte de marqueurs tumoraux qui distinguent les cellules cancéreuses des cellules saines a permis de concevoir des vecteurs de troisième génération dotés d'éléments de reconnaissance moléculaire. Ces marqueurs spécifiques peuvent être constitués par des protéines cellulaires de surface exprimées sélectivement ou surexprimées par les cellules cancéreuses.

Le ciblage de ces antigènes spécifiques peut être réalisé par :

- des anticorps (le plus souvent monoclonaux car plus spécifiques)
- des sucres (lectines)
- des hormones ou facteurs de croissance
- des petites molécules (acide folique).

La connaissance des cibles à traiter est donc primordiale. De plus, il faut que le récepteur cible ait la capacité d'internaliser le complexe Récepteur-Ligand, afin de permettre l'entrée du vecteur dans la cellule et d'y délivrer le principe actif.

II.3.2.2. Vecteurs de troisième génération et applications

► Nano particules décorées d'acide folique

Un certain nombre de cellules cancéreuses surexpriment ce récepteur, en particulier les cancers ovariens. Il constitue ainsi un marqueur spécifique de ces tumeurs qui peut être ciblé par l'acide folique. De plus, le ciblage de ce récepteur particulier est d'autant plus intéressant qu'il est recyclé lors du processus de capture des particules. La figure (I.4) représente des nanoparticules décorées d'acide folique.

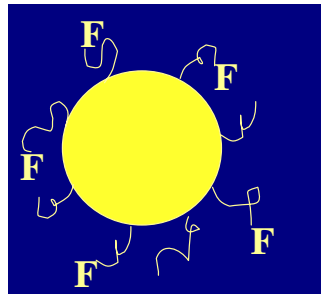


Figure (I.4) : Nanoparticules décorées d'acide folique.

En effet, le processus naturel de capture de l'acide folique fait intervenir les étapes suivantes :

- Liaison ligand-récepteur par reconnaissance biomoléculaire.
- Formation d'un endosome par invagination de la membrane cellulaire : capture de l'acide folique (ou des nanoparticules décorées d'acide folique).
- Libération de l'acide folique (ou des nanoparticules) dans le cytoplasme de la cellule, sans dégradation préalable.
- Recyclage des récepteurs de l'acide folique par fusion des membranes endosomale et cellulaire.

Des nanoparticules décorées d'acide folique sont obtenues en greffant l'acide folique, par son extrémité COOH, à l'extrémité CH₂OH des chaînes de PEG des copolymères. Mais il faut s'assurer que la fonction active du ligand est bien libre afin que l'efficacité soit conservée.

Il faut aussi vérifier que l'acide folique est bien à la surface du vecteur. La densité d'acide folique, c'est à dire la quantité retrouvée à la surface de la nanoparticule, doit être maîtrisée afin d'optimiser le ciblage tout en évitant la capture par le système réticulo-endothélial. En effet, une trop grande expression des ligands à la surface des particules pourrait masquer les effets du PEG contre la reconnaissance et l'opsonisation [1, 2, 5].

► Liposomes recouverts d'anticorps

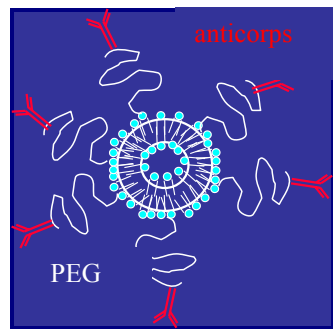


Figure (I.5) : Liposomes recouverts d'anticorps

La glycoprotéine gp 112 est exprimée spécifiquement par les cellules pulmonaires. Il existe une densité de surface de gp 112 optimale pour laquelle l'accumulation des liposomes est maximale. Une augmentation de la dose (quantité) de gp 112 à la surface des liposomes diminue les effets de répulsion stérique conférée par le PEG. La figure (I.5) représente des liposomes recouverts d'anticorps [1, 2, 5].

► Vecteurs issus de la chimie des sucres

L'intérêt de développer des nanotechnologies à partir de la chimie des sucres repose sur leur grande variété (oligo-poly saccharides) et flexibilité.

Les sucres s'avèrent tout particulièrement intéressants pour leur propriétés de surface :

- Élément de reconnaissance (ciblage cellulaire ou tissulaire)
- Masques biologiques (acide sialique)
- Muco et bioadhésion
- Chimie de couplage.

Différents types de nano systèmes peuvent être obtenus à partir de copolymères à base de polysaccharides. Selon le copolymère utilisé, bloc ou ramifié, il est possible de former des particules dont les propriétés de surface sont différentes et dont les interactions avec les milieux biologiques peuvent être modulées.

- **Système en brosse**

La figure (I.6) représente l'obtention d'un système de nanoparticules furtifs avec une configuration en brosse formé d'un copolymère dibloc : cyanoacrylate (hydrophobe) - polysaccharide (hydrophile)

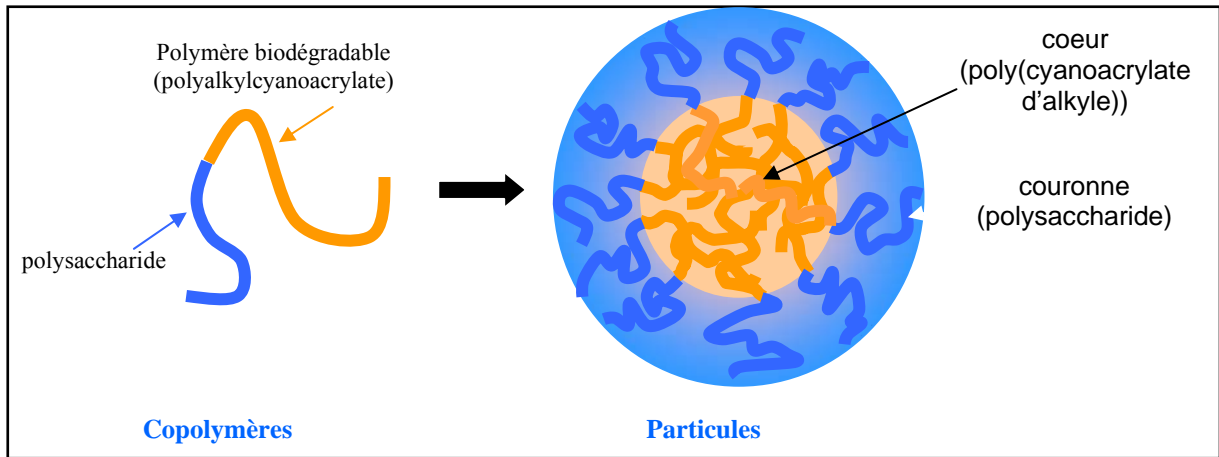


Figure (I.6) : Configuration en brosse du polysaccharide en surface des nanoparticules à base de poly (cyanoacrylate d'alkyle).

- **Système en boucle**

La figure (I.7) représente l'obtention d'un système de nanoparticules furtifs avec une configuration en boucle.

Dans ce cas, on a un copolymère de type « peigne » qui s'autoassocie en milieu aqueux en formant des boucles [1, 2, 5].

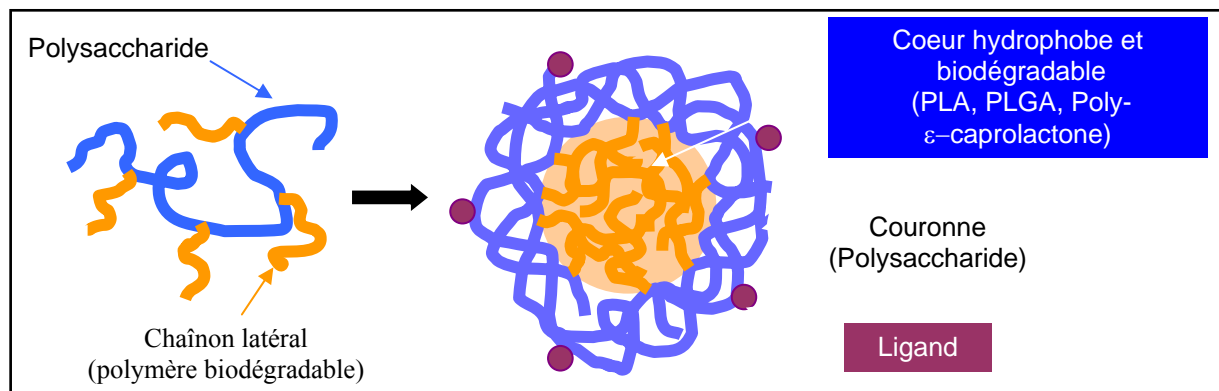


Figure (I.7) : Configuration en brosse du polysaccharide en surface des nanoparticules polymériques.

II.4. Voie orale

II.4.1. Bioadhésion et voie orale

II.4.1.1. Définitions

- **Biodisponibilité :**
Pourcentage du médicament absorbé par voie orale par rapport à la voie de référence intraveineuse.

- **Fenêtre d'absorption :**

Les PA possèdent souvent une fenêtre d'absorption. C'est à dire qu'il existe une partie du tube digestif où le PA est absorbé. Il en résulte que tout le PA ne peut pas être absorbé.

- Bioadhésion :

La bioadhésion est une approche qui permet de ralentir le transit du médicament (sans modifier le transit intestinal), au niveau de la fenêtre d'absorption.

- Mucoadhésion :

L'épithélium est recouvert d'une couche de mucus. Les particules s'enchevêtrent dans le mucus, et si elles sont suffisamment petites, elles diffusent dans le mucus.

II.4.1.2. Approches

Le mucus est un polysaccharide. Pour faciliter la bioadhésion, des vecteurs peuvent être recouverts de polysaccharide (polymère hydrophile). De plus, le mucus est chargé négativement. Des vecteurs décorés de chitosan sont ainsi chargés positivement, et interagissent avec le mucus.

Il a ainsi été montré que des liposomes non recouverts ont une faible bioadhésion. Des liposomes recouverts de chitosan présentent une meilleure bioadhésion au niveau de l'iléon. Des liposomes (de taille plus petite) recouverts de chitosan sont immobilisés en grande quantité le long de l'épithélium digestif. Il y a donc un effet de taille et de surface.

Une troisième approche consiste à décorer les vecteurs de lectines, en mettant à profit la capacité des lectines à reconnaître sélectivement des portions du tube digestif.

Enfin, le greffage de molécules de reconnaissance spécifiques de cellules cancéreuses ou des cellules M permet la reconnaissance de ces cellules au niveau du tube digestif par interaction ligand- récepteur [1, 2].

II.4.2. Voies de translocation des nanoparticules

Les nanoparticules peuvent être absorbées au travers de la muqueuse intestinale par plusieurs mécanismes :

- diffusion
- passage paracellulaire
- passage transcellulaire (transcytose)
- via la plaque de Peyer.

L'intestin est constitué de l'épithélium intestinal homogène et de plaques blanches, les plaques de Peyer (PP). Ces PP sont composées de 3 types de cellules dont les majeurs sont :

- les cellules M. Ce sont des cellules en U spécialisées dans la transcytose. Elles ne possèdent pas d'enzymes.
- les cellules du Dôme (D), dans lesquelles s'accumulent des lymphocytes B et T, immunocompétentes.

II.4.3. Applications

- Administration de peptides par voie orale. Des nanoparticules d'insuline ont été formulées. Efficaces chez le rat, elles ne marchent pas chez le chien
- L'immunisation par voie orale est une application tout aussi attractive mais beaucoup plus réaliste. L'ovalbumine (OVA) a été administrée par voie orale à des rats, et la concentration d'IgA (immunité muqueuse) a été déterminée. Formulée en solution, l'OVA n'induit pas de réaction immunologique. Sous forme de nanoparticules OVA-PLGA (50:50), elle est spectaculaire, traduisant l'efficacité de la forme vectorisée.
- La formulation d'un vaccin contre la phosphorylcholine (IP) permettrait d'avoir une immunisation universelle contre les bactéries. L'IP est en effet une protéine ubiquitaire de toutes les bactéries. Des microsphères d'IP ont ainsi permis de protéger des animaux infectés par S Typhi.
- La vectorisation par voie orale ouvre aussi les portes de la thérapie génique. L'utilisation de la β galactosidase comme gène rapporteur a montré la possibilité de transfection de l'épithélium intestinal.

II.5. Administration locale

Les nanotechnologies peuvent être élaborées pour permettre l'administration topique de médicaments [1, 2].

II.5.1. Voie oculaire

Libération cornéenne :

- après instillation : faible pénétration dans la cornée
Drainage lacrymal très important.

- forte rétention : charge positive (adhère sur les charges négatives des muqueuses)
Association à des gels adhésifs.

Libération intravitréenne :

- systèmes à libération contrôlée
- stabilité non connue

I.5.2. Voie tumorale

Administration intratumorale :

Après exérèse chirurgicale, des vecteurs peuvent être implantés afin d'y libérer lentement et localement l'anti-cancéreux.

Administration intracavitaire :

- cavité pleurale (cancer du poumon)
- cavité péritonéale (cancer de l'ovaire).

III. Libération de principes actifs à partir des matrices polymériques

III.1. Introduction

La recherche de formes galéniques originales prend une place de plus en plus importante dans l'industrie pharmaceutique. Cette recherche serait impensable sans l'utilisation de polymères. Actuellement, le développement de formes à action prolongée ou contrôlée fait appel à des polymères aux spécifications très précises ou alors à d'autres polymères déjà utilisés dans le domaine biomédical. Les polymères conventionnels, sont peu à peu remplacés, leur spécification étant trop large pour obtenir des formes médicamenteuses nouvelles.

Les systèmes à libération contrôlée sont soit préparés par dispersion ou dissolution de la molécule active dans une phase polymérique (type matriciel), soit par incorporation d'un liquide ou d'un solide dans une phase polymérique (type réservoir). Les différentes porosités des matrices permettent de distinguer des systèmes à macropores ($>500 \text{ \AA}$) ou micropores ($100\text{-}500 \text{ \AA}$) d'une part, des systèmes non poreux d'autre part ($<100 \text{ \AA}$)

Six principes fondamentaux se basant sur les modes d'activation et les mécanismes de contrôle de la libération peuvent être énoncés [6, 7] :

- Diffusion,
- Activation par solvant,
- Gonflement,
- Réaction chimique,
- Osmose sélective,
- Activation magnétique.

Dans le cas des systèmes contrôlés par diffusion, la substance active est libérée vers l'extérieur par diffusion le long des macro- ou micropores remplis de liquide ou directement à travers la structure moléculaire du système : Bien souvent, il s'agit d'une combinaison de ces phénomènes qui obéissent tous à la loi de Fick [2, 3].

Les systèmes activés par solvatation nécessitent une hydratation initiale de la phase polymérique par le milieu entourant la matrice, pour qu'il y ait libération du principe actif piégé. Après cette première phase, le mécanisme de libération est similaire à celui des matrices qui libèrent uniquement par diffusion.

Les systèmes qui sont contrôlés par le gonflement de la phase polymérique sont différents des cas précédents. C'est la relaxation des macromolécules au niveau du front du solvant qui contrôle la vitesse de libération. En général, on observe un mécanisme non fickien (transport anomal) qui peut être assimilé à une libération d'ordre zéro. Ce dernier est souvent appelé par les chercheurs « transport de type II ».

Dans les systèmes de libération qui font appel à des réactions chimiques, nous trouvons le plus souvent des polymères biodégradables ou bioérodables.

La libération du principe actif à partir de ces formes est contrôlée par une bioérosion ou biodégradation à laquelle peut s'ajouter une diffusion.

Les systèmes osmotiques sont basés sur un effet de surpression au niveau du noyau de la préparation. Cette surpression est créée par une phase contenant une concentration élevée en principes actifs et une phase de solvant pur (milieu extérieur). Les deux phases sont séparées par une membrane semi-perméable comportant un orifice, et ce n'est que par ce dernier que le soluté concentré peut quitter le système [2,8].

Finalement, les systèmes contrôlés magnétiquement en sont aujourd'hui encore au stade du développement. La substance active est libérée à partir d'un polymère contenant le principe actif dispersé et une multitude de microsphères magnétiques. Ces sphères peuvent entrer en résonance sous l'action d'un champ magnétique extérieur et par là former des micropores.

C'est le premier système qui permet une libération modulée de cas en cas, souhaitable par exemple pour les diabétiques traités avec de l'insuline [2, 6, 7, 8].

III.2. Aspects mathématiques de la diffusion

A l'exception de certains systèmes de libération contrôlée (réaction chimique, osmose sélective) et un certain nombre de systèmes poreux, les mécanismes de libération reposent sur le principe de diffusion dans les polymères. Il est donc important d'envisager quels types de modifications structurelles et morphologiques peuvent être effectués sur le polymère afin de contrôler les coefficients de diffusion.

La diffusion du soluté à travers une membrane ou une matrice polymérique est décrite par les lois de Fick (équations (I.1) et (I.2)).

$$J_i = D_{ip} \frac{dC_i}{dz} \quad (I.1)$$

$$\frac{\partial C_i}{\partial t} = D_{ip} \frac{\partial^2 C_i}{\partial z^2} \quad (I.2)$$

Dans ces équations, J_i est le flux de soluté (exprimé en moles/cm² s), C_i est la concentration du soluté (moles/cm³), t est la durée de libération et z la distance de diffusion. Les équations (I.1) et (I.2) permettent de décrire uniquement une diffusion unidimensionnelle.

Le coefficient de diffusion D_{ip} (cm²/s) est le paramètre structurel important qui peut être contrôlé par des modifications de la structure du polymère. Dans les équations (I.1) et (I.2), on prend comme hypothèse que D_{ip} est indépendant de la concentration du soluté C_i , ce qui est largement admis dans le cas de l'analyse des systèmes à libération contrôlée. La validité de cette hypothèse peut cependant être remise en question. Par exemple, Fujita [9] a proposé différentes équations décrivant la dépendance de D_{ip} par rapport à C_i . Dans ces conditions, une expression plus précise de la loi de Fick serait :

$$\frac{\partial C_i}{\partial t} = \frac{\partial}{\partial t} \left(D_{ip}(C_i) \frac{\partial C_i}{\partial z} \right) \quad (I.3)$$

En utilisant les équations (I.1) à (I.3), il a été possible de développer des modèles mathématiques adéquats.

L'analyse approfondie des mécanismes exige avant tout trois informations principales :

- Le profil de concentration du principe actif, c'est-à-dire (C_i/C_{i0}) en fonction de sa localisation normalisée dans la préparation (z/δ), où C_{i0} est la concentration initiale du principe actif au temps zéro et δ l'épaisseur de la préparation ;
- Le flux du principe actif (J_i), exprimé par rapport à la surface effective ;
- La quantité de principe actif (M_i) ayant été libérée au temps t .

Lorsque la différence de concentration de part et d'autre de la membrane polymérique d'un système de type réservoir peut être considérée constante pendant un temps de diffusion assez long, l'équation (I.1) peut être intégrée sur l'épaisseur δ . En admettant que J_i et D_{ip} soient constants, on obtient :

$$J_i = \frac{D_{ip} K_i}{\delta} \Delta C_i \quad (I.4)$$

Dans cette équation, ΔC_i correspond à la différence de concentration à travers la membrane et K_i est un coefficient caractérisant la solubilité du principe actif qui permet d'exprimer d'éventuelles modifications de sa solubilité selon son environnement. La valeur K_i n'a pas de dimension car c'est un coefficient de partage du soluté, équation (I.5) :

$$K_i = (C_i, \text{ dans la membrane} / C_i, \text{ dans la solution}) \quad (\text{I.5})$$

Le coefficient de perméabilité P_i , (cm/s) souvent utilisé, correspond à l'équation (I.6).

$$P_i = \frac{D_{ip} K_i}{\delta} \quad (\text{I.6})$$

On constate qu'en plus d'une valeur raisonnable pour le coefficient de diffusion D_{ip} , le coefficient de partage doit être élevé afin d'obtenir une perméation importante. Cette exigence implique un certain nombre de considérations thermodynamiques. Un principe actif diffusera à travers un système microporeux ou gélifié s'il est compatible, au point de vue thermodynamique, avec le polymère. En fait, les substances polaires seront facilement transportées dans les polymères hydrophiles, alors que dans les mêmes systèmes, les substances non polaires auront des vitesses de perméation extrêmement faibles, ce qui n'est pas toujours acceptable pour une utilisation pharmaceutique.

Dans l'équation (I.4), il faut tenir compte de l'hypothèse que J_i , a été considéré constant. Comme cette hypothèse se justifie, car C_i est élevé et presque constant, les systèmes de type réservoir sont caractérisés par une libération d'ordre zéro.

L'interprétation de problèmes de libération à partir de formes médicamenteuses matricielles nécessite la résolution des équations de diffusion transitoire, équation (I.2) ou (I.3) en utilisant des limites adéquates. Des solutions de ce type d'équation, pour certaines formes géométriques, peuvent être trouvées dans l'ouvrage de Crank [10].

Nous nous limiterons ici à décrire les points essentiels de ces développements mathématiques.

- L'équation de Fick est choisie sous la forme de l'équation (I.2) si l'on peut s'attendre à obtenir des solutions analytiques. L'équation (I.3) est utilisée si l'on pense pouvoir obtenir des solutions numériques ou également analytiques. Dans ce cas, on fait appel à la technique des différences finies et d'autres méthodes informatiques.
- Il est nécessaire d'établir les conditions initiales et les limites décrivant mathématiquement les conditions expérimentales. Par exemple, pour les expériences effectuées bien en dessous de l'équilibre de saturation (perfect sink conditions), on peut assumer que la concentration C_i , est égale à zéro à l'interface polymère /eau pendant toute la durée de l'expérience.
- L'équation (I.2) est résolue par les moyens habituels utilisés pour les équations différentielles partielles. On obtient C_i/C_0 en fonction de z/δ et de Dt/δ^2 . Pour les valeurs C_{i0} , on utilise la concentration initiale du soluté dans le polymère.
- Le flux J_i peut être calculé par dérivation de l'expression mathématique

$$\frac{C_i}{C_0} = f(z/\delta, Dt/\delta^2) :$$

$$J_i = \frac{dM_i}{A \cdot dt} = \partial \left(D_{ip} \frac{\partial C_i}{\partial z} \right)_{z=0} \quad (\text{I.7})$$

Il est bien connu que flux J_i obtenu par l'équation (I.7) est dépendant du temps, ce qui est valable pour la plupart des géométries et conditions expérimentales.

Une transformation de l'équation (I.7) souvent utilisée par les pharmacocinéticiens est donnée dans l'équation (I.8). Cette simplification est en fait valable uniquement pour des films, dans des conditions éloignées de la saturation et pour des temps très courts.

$$\frac{dM_i}{A \cdot dt} = \left(\frac{4D_{ip}}{\delta} \right) t^{1/2} \quad \frac{M_i}{M_\infty} < 0.4 \quad (I.8)$$

Cette expérience prédit que la vitesse de libération décroît avec le temps.

- La quantité totale de principes actifs libérés M_i en fonction du temps peut être obtenue par intégration simple de l'équation (I.7).

$$M_i = \int_0^t J_i dt \quad (I.9)$$

- Une autre forme dérivée également de l'équation (I.8), valable sous les mêmes conditions, est donnée ci-dessous.

$$M_i = \left(\frac{4D_{ip}}{\delta} \right) t^{1/2} \quad (I.10)$$

Cette forme est souvent utilisée pour la représentation graphique de la libération de principes actifs en fonction de la racine carrée du temps

I.3. Structure macromoléculaire

L'analyse développée précédemment montre que, dans la plupart des cas, la libération d'un principe actif dépend de la structure polymérique de la formulation. Différentes techniques de fabrication peuvent aboutir à des préparations à libération contrôlée.

Par exemple, il est possible de comprimer le principe actif à l'intérieur d'un système micro- ou macroporeux en comprimant le mélange polymère et principe actif à une température adéquate. Il est également possible d'incorporer le principe actif dans une solution, on obtiendra des systèmes non poreux ou microporeux.

Les mécanismes diffusionnels à travers des polymères non poreux (gels) dépendent de l'espace libre entre les chaînes macromoléculaires, appelé maille macromoléculaire.

Toutes modification qui augmente la barrière de diffusion, diminue la surface de diffusion effective qui va de pair avec une diminution de la mobilité macromoléculaire [9].

Le coefficient de diffusion d'un soluté dans un polymère peut être influencé par les paramètres structurels suivants :

- Densité de réticulation ;
- Degrés de ramification ;
- Degrés de cristallinité ;
- Grandeur des zones cristallines.

III.3.1. Densité de réticulation

Dans des réseaux macromoléculaires amorphes, une augmentation de la densité de réticulation produit une réduction progressive du coefficient de diffusion de soluté. Une réticulation excessive conduit à une exclusion totale du soluté.

Lorsque la densité de réticulation augmente, la surface disponible pour la diffusion (maille macromoléculaire) diminue. De plus, la mobilité des chaînes peut diminuer d'une manière dramatique et réduire la surface effective de diffusion. Les réticulations peuvent être induites chimiquement ou par irradiation. Les techniques chimiques nécessitent une mise en solution des polymères. Par exemple, on ajoutera aux polymères hydrophiles une petite quantité d'agents de réticulation bifonctionnels pour induire la réticulation [9].

Différents exemples tirés de développement récents de systèmes à libération contrôlée illustrent l'importance de la réticulation. Récemment, Lee et Colt [9] ont mis au point un nouveau système matriciel en laissant gonfler du poly (2-hydroxyéthyl méthacrylate) (PHEMA) dans une solution alcoolique diluée d'éthylène glycol diméthacrylate (EGDMA), un agent de réticulation pour le PHEMA. Ensuite, ce polymère a été traité par irradiation UV afin de créer une zone de réticulation importante au niveau des couches extérieures. Cette matrice a été chargée avec de la progestérone et d'autres principes actifs. Il a été démontré que la structure des couches extérieures détermine la vitesse de libération. Celle-ci peut être modulée par la quantité d'EGDMA ajoutée et le temps d'exposition aux rayons UV afin d'obtenir des libérations d'ordre zéro sur une longue durée. Des comportements analogues ont été observés pour des copolymères de HNEMA avec du méthoxyéthoxyéthyl méthacrylate (MEEMA) contenant des principes actifs similaires.

III.3.2. Degré de cristallinité

Les régions cristallines d'un polymère sont celles qui possèdent une zone structurée de chaînes macromoléculaires d'une plus haute densité par rapport aux autres régions. C'est la raison pour laquelle, ces zones sont généralement imperméables aux solutés. Cette cristallinité peut être obtenue par un traitement du polymère à la chaleur (la recuite, ou en anglais « annealing ») pendant ou après la fabrication. Le degré de cristallisation d'un polymère dépend de sa structure (par exemple liaisons hydrogènes). C'est pourquoi les polymères substitués par des groupements stériquement volumineux ne cristallisent que difficilement par rapport à des structures simples, telles que le polyéthylène ou le PVA. Les recherches pharmaceutiques décrites dans la littérature ne sont pas encore bien nombreuses. Il a été cependant clairement démontré [9] que la libération de la théophylline se trouve fortement ralentie par des zones cristallines. Puisque le traitement à la chaleur doit s'effectuer au-delà de la température vitreuse (T_g), il est souvent inapplicable pour des principes actifs thermolabiles. Actuellement, on se demande si le traitement à la chaleur peut encore influencer des structures déjà fortement réticulées ou des structures qui présentent une haute cristallinité.

III.3.3. Relaxation macromoléculaire

Les caractéristiques structurelles observées jusqu'ici ont une influence sur le coefficient de diffusion mais ne changent pas le type de diffusion (diffusion de fick). La vitesse de libération dépend toujours du temps [2, 9], même si les systèmes sont hautement réticulés ou présentent une cristallinité élevée. Dans les quelques cas où l'on a pu observer une libération d'ordre zéro, elle est généralement d'une faible durée.

Des effets extrêmement intéressants peuvent être obtenus si l'on utilise les caractéristiques de relaxation des chaînes polymériques. En effet, si un solvant (p. ex. milieu de dissolution ou fluide biologique) pénètre dans un polymère vitreux, on peut facilement observer une couche hydratée à l'interface liquide/polymère. Dans cette phase gélifiée, la diffusion d'un principe actif est influencée par la relaxation continue des chaînes macromoléculaires. En général, la libération de médicaments à partir de ces polymères est non fickienne, c'est-à-

dire anormale. Sous certaines conditions, il est possible d'obtenir une libération d'ordre zéro [2, 9].

Plusieurs systèmes thérapeutiques ont été développés ces dernières années [2]. L'effet de relaxation moléculaire a été utilisé pour la première fois par Good [2, 9] qui a étudié la libération du chlorhydrate de tripeleennamine à partir de matrices vitreuses de PHEMA. Les interprétations mathématiques ont été publiées un peu plus tard par Hopfenberg et Hsu [9] qui donnent comme unique exemple la libération dans le n-hexane du Soudan IV, à partir de polystyrène. Ce cas, non pharmaceutique, montre une libération d'ordre zéro parfaite. Dans d'autres recherches [2, 9], plusieurs copolymères d'éthylène/vinyl alcool(EVA) ont été employés pour libérer le KCl par diffusion non fickienne. Peppas et Franson [9] utilisent les copolymères HEMA et MMA comme matrice avec de la théophylline comme traceur.

Une intéressante combinaison des effets de la relaxation macromoléculaire, de la cristallinité et de la réticulation a été expérimentée par Korsmeyer et Peppas [2, 9] dans une publication. Ces chercheurs ont observé une libération ni fickienne ni d'ordre zéro. Les travaux dans ce domaine sont encore peu nombreux et la technologie est encore en plein développement.

III.4. Conclusion

Le propos de ce chapitre est de démontrer que des modifications structurelles d'un polymère permettent de changer le profil de libération des principes actifs incorporés. La densité de réticulation et le degré de cristallinité influencent avant tout le coefficient de diffusion. Cependant, un changement au niveau de la relaxation macromoléculaire influence la cinétique de libération, c'est-à-dire le mode mécanistique et l'ordre du transport.

Plusieurs travaux démontrent le grand intérêt de ces systèmes pour des préparations pharmaceutiques à libération contrôlée.

Chapitre II : Procédés de fabrication des nanoparticules

Introduction

Après avoir passé en revue les travaux des auteurs du domaine de la nanotechnologie et de la libération contrôlée de principes actifs à partir des structures des polymères, nous présenterons dans ce chapitre les procédures de fabrication des nanoparticules répertoriées. Notre choix se portera sur une technique assez maîtrisable au laboratoire et facilement transposable à l'échelle industrielle.

1. Généralité

Ce sont les propriétés physico-chimiques du couple principe actif/polymère qui dictent en premier lieu la sélection d'une technique particulière. Par ailleurs, les propriétés des micro ou nanoparticules obtenues (la granulométrie, la structure interne, le chargement, le profil de libération, l'écoulement, la mouillabilité, etc.) sont tributaires de la méthode de préparation adoptée. Parmi les procédés classiques de microencapsulation, plusieurs sont repris dans la fabrication des microparticules biodégradables. Ces techniques nombreuses et variées ont fait l'objet de plusieurs revues [11, 12, 13]. Chaque méthode présente ses avantages et ses limites, et ce n'est qu'en considérant les propriétés de la substance médicamenteuse et du polymère, ainsi que les caractéristiques souhaitées des microparticules, qu'une technique pourra être choisie (tableau II.1). Cependant, d'un point de vue purement technologique, la méthode adoptée, tout en étant reproductible, doit garantir l'obtention d'un rendement d'encapsulation élevé en principe actif, de même qu'un taux important en microparticules non agglomérées et d'une granulométrie propice.

2. Evaporation du solvant (émulsification / évaporation)

Cette technique, basée sur l'évaporation de la phase interne d'une émulsion, est d'une mise en œuvre aisée, dans un petit laboratoire comme à l'échelle industrielle. L'émulsion est obtenue en dispersant sous agitation une solution organique de polymère contenant le principe actif, dans un non-solvant additionné d'un agent surfactif. Le terme général « non-solvant » désigne un liquide inapte à dissoudre le polymère. Dans cette méthode, il doit posséder un point d'ébullition supérieur à celui du solvant organique et ne pas être miscible à ce dernier. Une fois l'émulsion stabilisée, l'agitation est maintenue et le solvant est évaporé après diffusion à travers la phase continue, pour donner naissance à des microparticules solides. La vitesse d'évaporation peut être modulée en variant la pression ou la température. D'autres procédés, tels que la lyophilisation ou la nébulisation, peuvent également être utilisés pour éliminer le solvant. Les microparticules sont récupérées par filtration ou centrifugation, lavées et séchées [11, 12, 15, 16].

Tableau (II.1) : Classification des procédés de fabrication.

Technique	Milieu de suspension	Exigences
1. Evaporation du solvant : Emulsion aqueuse	Eau	Médicament peu hydrosoluble
Emulsion aqueuse multiple	Eau	Médicament très hydrosoluble
Emulsion non aqueuse	Non solvant	Médicament insoluble dans le véhicule.
2. Extraction du solvant	Non solvant (s)	Médicament insoluble dans le (s) véhicules (s)
3. séparation de phases	Non solvant et solvant	Médicament insoluble (solide) ou non miscible (liquide) au milieu.
4. Nébulisation	Air	Polymère possédant une température de transition vitreuse ou de ramollissement supérieure à la température d'évaporation du solvant.
5. Fluidisation	Air	Polymère possédant une température de transition vitreuse ou de ramollissement supérieure à la température d'évaporation du solvant.
6. Fusion	Non solvant	Médicament et polymère thermostables et médicament insoluble dans le véhicule.

2.1. Emulsion aqueuse huile dans eau (H/E)

En général, les procédés faisant appel à l'eau comme non- solvant sont préférables ; ils sont économiques et ne nécessitent pas de recyclage. Les microparticules obtenues sont faciles à laver, rarement agglomérées et exemptes de résidus toxiques autres que le solvant nécessaire à la solubilisation du polymère. Le polymère est dissous dans un solvant organique tel que le chlorure de méthylène ou le chloroforme, le principe actif y est dispersé ou dissous à l'aide d'un co-solvant, puis le tout est émulsionné avec une solution aqueuse contenant un agent surfactif.

L'émulsification H/E est la méthode la plus fréquemment exploitée dans la microencapsulation des principes actifs liposolubles. Cependant, l'application potentielle de ce procédé dépend du pouvoir de rétention de la substance médicamenteuse par la phase interne de l'émulsion. Un partage important s'opère en présence de principes actifs hydrosolubles entre les phases aqueuse et organique et entraîne de faibles rendements d'encapsulation.

Les mesures permettant de diminuer la perte en principe actif sont citées dans le tableau (II.2). Elles font appel à des modifications de la formulation ou des conditions opératoires. Leur efficacité est cependant faible [11, 12, 15, 16,17].

Tableau (II.2) : Facteurs influençant le rendement de microencapsulation par émulsification (H/E)/évaporation du solvant.

Niveau d'intervention	Facteur	Effet ¹	Réf.
Principe actif	Augmentation de la liposolubilité	+	[6, 11, 18]
Phase aqueuse	Saturation par le médicament	+	[11, 18]
	Ajustement du pH		
	Augmentation de la température	+	[11, 19]
	Augmentation du volume	-	[11, 20]
		+	[11, 20]
Phase organique	Augmentation de la température	(-)	[11, 20]
Solvant organique	Augmentation de l'hydrosolubilité relative	+	[11, 20]
	Augmentation du volume	-	[11, 21]
Polymère	Augmentation du poids moléculaire	+	[11, 21]

¹ + : augmentation du rendement. – baisse du rendement.

2.2. Emulsion multiple eau dans huile eau (E/H/E)

Dans une double émulsification de ce type, le principe actif est incorporé en solution aqueuse dans la phase interne d'une émulsion H/E. Outre sa simplicité de mise en œuvre, cette technique permet l'obtention d'un rendement d'encapsulation élevé en principes actifs hydrosolubles. La phase organique agit comme une barrière entre les deux compartiments aqueux, évitant ainsi la diffusion du médicament vers la phase aqueuse externe. La technique est d'autant plus efficace que l'hydrosolubilité du médicament est importante « supérieure à 900 mg/ml selon OGAWA [11] » et le partage envers la phase organique défavorable « coefficient de partage octanol/eau inférieur à 0,1 ».

YAMAMOTO [11,12] note le rôle critique de la viscosité de l'émulsion primaire E/H dans la prévention de la diffusion du principe actif vers la phase aqueuse externe. A cet effet, il recommande l'incorporation d'un agent capable de retenir le principe actif dans la phase aqueuse interne en viscosité ou même en solidifiant cette dernière (valeurs de viscosité comprises entre 150 et 1000 mPa.s). L'efficacité d'une telle intervention, démontrée par OGAWA [11], se heurte toutefois à l'éventuelle incompatibilité des agents utilisés (gélatine, pectine, agar-agar, etc.) avec le médicament, limitant ainsi son champ d'application. Le tableau (II.3) regroupe les paramètres susceptibles d'influencer le taux d'encapsulation par ce procédé. Il faut noter que les références citées ne traitent pas uniquement de polymères biodégradables.

Tableau (II.3) : Facteurs influençant le rendement de microencapsulation par émulsion (E/H/E)/évaporation du solvant.

Niveau d'intervention	Facteur	Effet ¹	Ref.
Phase aqueuse externe	Ajustement du pH	-	[12, 22]
	Augmentation du volume	-	[12, 22]
Solvant organique	Augmentation de l'hydrosolubilité relative	+	[23]
Polymère	Augmentation de la concentration	+	[12, 22]
	Augmentation du poids moléculaire	+	[24]
Principe actif	Augmentation de la charge	-	[24]
Phase aqueuse interne	Augmentation de la viscosité	+	[24]
	Augmentation du volume	-	[22]
Divers	Augmentation de la durée de l'agitation	-	[22]
	Diminution du diamètre des particules	-	[24]

¹ + : augmentation du rendement. - : baisse du rendement.

2.3. Emulsion non aqueuse

Dans ce type de système, le remplacement de l'eau par un non- solvant apolaire comme phase externe de l'émulsion permet de prévenir la perte en principe actif hydrosoluble. Le non- solvant peut être une huile minérale ou végétale, un solvant organique, ou encore le mélange de ces derniers.

Ce procédé, tout en garantissant un rendement élevé d'encapsulation pour le principe actif hydrosoluble, prévient l'hydrolyse du médicament ou du polymère biodégradable. Cependant, par rapport aux émulsions aqueuses, cette méthode présente un certain nombre de désavantages liés à l'emploi d'un véhicule non aqueux. Il est plus simple et plus économique de travailler avec l'eau ; le non-solvant utilisé est souvent cher et implique un recyclage. Les résidus de ce dernier sont difficiles à éliminer, car souvent peu volatils, et nécessitent un lavage par un solvant organique volatil. Finalement, le nombre élevé de solvants organiques mis en jeu rend ces particules potentiellement plus toxiques pour une administration parentérale [11, 12].

3. Extraction du solvant (émulsification/extraction)

Dans les méthodes d'émulsification/évaporation, le solvant organique est éliminé en deux étapes :

- diffusion du solvant dans le non- solvant (extraction du solvant) ;
- disparition du solvant à partir de l'interface non- solvant/air (évaporation du solvant).

Grâce à l'affinité élevée du solvant pour le milieu continu, l'étape de l'évaporation peut ne pas être nécessaire à la formation de microparticules. La phase externe doit alors présenter une certaine miscibilité avec le solvant ou doit être susceptible de devenir miscible par addition d'un second non- solvant.

Il faut remarquer que, dans certains systèmes, les deux phénomènes d'extraction et d'évaporation peuvent contribuer de manière concomitante à l'élimination du solvant. Dans ce cas, la distinction entre les deux procédés cités dépend d'une multitude de facteurs, parmi lesquels on peut citer le rapport des volumes solvant/non- solvant, l'affinité du polymère pour le solvant, l'agitation, la géométrie et la dimension des récipients.

Dans les systèmes où l'affinité entre solvant et non- solvant est élevée, les auteurs[11, 12] proposent de remplacer l'étape d'émulsification par l'introduction goutte à goutte de la solution polymérique dans le véhicule. La gouttelette est transformée en microparticule solide après l'extraction du solvant. LEELARASAMEE [11] module la granulométrie de ses particules en modifiant le diamètre de l'aiguille utilisée lors de l'introduction de la solution organique de polymère ; de plus, il parvient à fabriquer des particules avec une structure interne de type réservoir ou matriciel en variant le solvant ou le mélange de solvants.

4. Séparation de phases (milieu non aqueux)

Le principe de cette technique repose sur le phénomène de coacervation. Il s'agit d'une désolvation ménagée d'une solution organique de polymère en deux liquides, le coacervat, riche en polymère, et le liquide d'équilibre, pauvre en polymère. Depuis longtemps, cette forme de séparation de phases liquide/ liquide a été exploitée dans la technologie pharmaceutique de microencapsulation. Les différentes étapes du procédé sont les suivantes :

1. la substance médicamenteuse est dispersée dans la solution organique du polymère ;
2. sous agitation continue, la séparation de phases est induite par l'action individuelle ou combinée de ces trois agents : addition d'un non- solvant, abaissement de la température du système ou évaporation du solvant organique ;
3. les gouttelettes de coacervat formées piègent ou enrobent le principe actif pour donner naissance à des microparticules immatures ou « protomicroparticules », trop molles à ce stade pour être récupérées ;
4. la paroi est durcie grâce à une désolvation plus prononcée, habituellement par addition d'un grand excès de non- solvant ; les particules sont récupérées par filtration, lavées et séchées.

Dans la littérature [8, 11, 12] relative aux polymères biodégradables, la coacervation est essentiellement induite par addition lente d'un non- solvant.

Une fois ajouté au système, le non- solvant se mélange au solvant, diminue son pouvoir de solvation et provoque la séparation du polymère sous forme de coacervat autour des particules solides ou liquides de principe actif.

La microencapsulation par séparation de phases est une technique complexe et nécessite un ajustement minutieux des conditions opératoires.

Malgré la complexité des processus et les problèmes concernant l'agglomération des particules ou la manipulation de milieux non aqueux (coût élevé et recyclage des non-solvants, lavage résiduels), la séparation de phases reste une technique de choix dans l'encapsulation de médicaments hydrosolubles. Ce procédé présente l'avantage d'être peu traumatisant pour les médicaments et polymères fragiles. En outre, de par la nature non polaire de ses constituants, il est en mesure d'offrir des rendements d'encapsulation importants en médicaments hydrosolubles.

5. Nébulisation (dessiccation par nébulisation)

Dans cette technique (spray drying), le principe actif est dispersé ou dissous dans une solution organique de polymère, puis le mélange est atomisé dans un courant d'air chaud au moyen d'un nébulisateur. Après évaporation du solvant, les microparticules sèches sont récupérées. La nébulisation convient aussi bien à l'encapsulation de médicaments hydrosolubles que liposolubles.

Cette technique simple et rapide est réalisable en laboratoire comme à l'échelle industrielle et permet l'obtention de la forme finale en une seule étape. Elle est en outre particulièrement adaptée à la production en continu et à grande échelle.

Le rendement et les propriétés de la forme finale sont grandement influencés par les propriétés viscoélastiques de la solution polymérique et le type de polymère utilisé. Seuls les polymères non plastifiés ou non ramollis lors du séchage des gouttelettes nébulisées peuvent garantir l'obtention d'un rendement élevé en particules sphériques non agglomérées.

Le recours au chauffage est en mesure non seulement d'influencer les propriétés du polymères, mais également celles des principes actifs lorsque ceux-ci se présentent sous différents polymorphes.

6. Fluidisation

Dans ce procédé, les procédés solides de principe actif sont mises en suspension dans l'air chauffé de l'enceinte d'un lit fluidisé. Les noyaux sont ensuite enrobés par atomisation d'une solution organique de polymère. Cette technique nécessite habituellement une charge importante de substance médicamenteuse (300-2000 g) [11, 12]. Pour les médicaments disponibles en faible quantité, NUWAYSER [12] a développé un modèle permettant de ne traiter que des charges de 5 à 40 g (mini-lit fluidisé de BIOTEK).

La fluidisation aboutit à des microcapsules hautement chargées (jusqu'à 90%). Un risque potentiel associé à ces formes réservoirs résulte de l'endommagement ou de la rupture de la membrane polymérique, entraînant une libération non contrôlée du médicament. Ce problème devient d'autant plus aigu que le médicament est puissant et son hydrosolubilité importante.

Cette méthode présente de nombreuses analogies avec la précédente. Tout comme cette dernière, elle est simple et de mise en œuvre rapide. De même, l'encapsulation est possible indépendamment de la solubilité du médicament, mais les propriétés thermiques du polymère sont critiques [11, 12].

7. Fusion

Cette méthode est fondée sur la transformation par refroidissement (congealing) des gouttelettes polymériques fondues en microparticules solides. MATHIOWITZ [11, 12] fait appel à ce procédé pour préparer des microparticules chargées en protéine (insuline ou myoglobine) à base de polyanhydride. Dans ce cas, le polymère étant hydrolysable et le médicament hydrosoluble, il propose une émulsification de la masse polymérique fondue contenant le médicament dans un mélange de non- solvants composé d'huile de silicone et d'huile d'olive.

L'intérêt de ce procédé est qu'il évite l'utilisation de solvants organiques, mais son application se limite aux polymères et médicaments thermostables.

8. Conclusion

Après avoir répertorié tous les procédés avec leurs avantages et inconvénients, notre choix s'est porté sur le procédé d'Evaporation de solvant avec une double émulsification. A la différence que dans notre cas, nous avons dans l'ultime étape procédé à la lyophilisation de la suspension afin d'obtenir des nanoparticules de dimension identique.

Chapitre III : Méthodologie de la recherche expérimentale

Introduction

Dans le cadre de cette étude, nous fixons pour objectif d'encapsuler un principe actif dans un mélange de polymères miscible. De ce fait, il est onéreux de procéder à une expérimentation aléatoire. Il par conséquent nécessaire de planifier les expériences de façon à réduire considérablement le nombre de mesure. Cette méthodologie appelée plan d'expérience sera développée dans ce chapitre afin de montrer aux lecteurs l'importance de cette méthode.

1. Historique

L'expérience a conservé auprès des expérimentateurs un prestige étonnant. Tout travail comportant un grand nombre d'expériences est par nature qualifié de « sérieux ». De plus, les méthodes d'étude et d'analyse des phénomènes physiques, chimiques, biologiques,...connaissant depuis les dernières années un développement impressionnant du, entres autres :

- A l'apparition de moyens techniques et d'appareillages de plus en plus raffinés (souvent couplés à des ordinateurs chargés d'une partie de l'analyse des résultats),
- A la mise au point de méthodes mathématiques et statistiques d'analyse et de traitement des données numériques qui connaissent un vif succès dans de très nombreux domaines (analyses factorielles, reconnaissance de formes, classification, etc...).

Il est d'ailleurs probable que les deux évolutions très différentes soient parfaitement liées. En effet, on peut disposer maintenant d'un nombre presque illimité d'informations concernant l'étude d'un phénomène, en multipliant les capteurs, enregistreurs, analyseurs, etc....et il est naturel que le chercheur veuille « engranger » le plus de « matériau » possible au cours de son expérimentation souvent très coûteuse, quitte à remettre à plus tard (ou à jamais) l'analyse et la réflexion sur ces données.

Cependant, depuis quelque temps, la tendance est à la diminution du nombre d'expériences ; tendance encouragée surtout du point de vue économique. On ne peut plus se permettre de réaliser une infinité d'expériences ; il faut en déduire le nombre. Mais peu de personnes mettent en cause l'inutilité de l'accumulation des résultats. En effet, si nous pouvions revenir à une période plus riche, la plupart des expérimentateurs reprendraient leurs veilles habitudes. L'accumulation de résultats expérimentaux n'est plus un gage d'informations de bonne qualité. Paradoxalement (en apparence du moins) la réflexion sur une amélioration de la stratégie de la recherche expérimentale est restée très en retrait.

Des travaux importants ont été faits dans ce domaine, mais n'ont trouvé à ce jour qu'un écho très limité chez les expérimentateurs.

On oublie très souvent, que quelque soit la puissance des ordinateurs et des logiciels :

- On ne peut extraire des résultats expérimentaux que les informations qu'ils contiennent,
- Il n'est pas rare que, malgré la multiplication des mesures, certaines informations indispensables manquent.

Peu de personnes mettent en cause l'inutilité de l'accumulation des résultats. Il est difficile de faire admettre qu'il n'y a aucune information dans le résultat d'une expérience et que toute l'information est contenue dans les conditions expérimentales ».

Ceci contredit tout ce qui est communément admis. L'accumulation de résultats n'est plus gage d'informations de bonne qualité. Par exemple, quel que soit le nombre d'expériences effectuées en deux points bien précis, nous ne pourrons jamais étudier un modèle autre que linéaire du premier degré. En effet, « La qualité de l'information ne dépend pas du nombre d'expériences »

2. Limites des méthodes traditionnelles d'essais

Traditionnellement, les essais sont effectués de manière séquentielle en faisant varier les facteurs d'entrée du système étudié l'un après l'autre sans planification préalable de l'ensemble des essais à réaliser. Il en résulte que la décision d'arrêter ou de continuer les essais repose essentiellement sur des résultats obtenus pas à pas. Dans ces conditions, les conclusions suivantes s'imposent naturellement.

D'abord les essais classiques ne permettent pas toujours d'optimiser le produit ou le processus. En effet, le principe même de ces essais conduit le plus souvent à emprunter un chemin labyrinthique et à s'arrêter dans le meilleur cas à la meilleure solution jugée satisfaisante. Il s'ensuit que la solution retenue n'est pas nécessairement optimale, dans la mesure où d'autres solutions non explorées, auraient peut être pu permettre d'atteindre de meilleures performances, ou, pour des résultats identiques, d'obtenir une solution plus économique.

Ensuite, les essais selon les méthodes classiques ne prennent pas en compte les interactions entre facteurs, lesquelles interactions sont omniprésentes. Les effets ainsi calculés en comparant deux à deux les résultats d'essais ne sont valables que pour des valeurs particulières des facteurs et ne peuvent se transposer à d'autres conditions d'essais ou d'utilisation.

Enfin, les essais selon les méthodes classiques ne permettent pas de tenir compte aisément de la variabilité des grandeurs observées, occasionnées par une multitude de sources de floculations. Celles-ci dispersent les résultats d'essais et rendent incertaines, voire fausses les conclusions.

En définitive, les démarches traditionnelles conduisent à :

- Une prolifération d'essais à cause des tâtonnements et des remises en cause fréquentes.
- Une connaissance très relative des influences des facteurs et par suite à des conclusions peu fiables et non généralisables. Elles ne permettent pas de prévoir le comportement du système étudié pour des valeurs non testées des facteurs.
- Un manque de méthode, de rigueur et de formalisme, notamment pour capitaliser et valoriser l'expérience technique [26, 27, 28].

3. Origine de l'efficacité des plans d'expériences

La méthode des plans d'expériences puise son efficacité dans l'utilisation de deux outils complémentaires.

D'abord l'outil algébrique. En effet, tous les facteurs dont les effets sont à analyser doivent être étudiés en même temps que prendre en compte leurs couplages en vue de mieux comprendre le comportement du système étudié, et d'être en mesure d'effectuer des prévisions. La construction de plans d'expériences selon des règles algébriques définies et la modélisation des réponses étudiées permettent de réaliser l'ensemble de ces analyses et de gagner en précision sur les résultats obtenus.

Ensuite l'outil statistique. En effet, les résultats d'essais ne sont jamais parfaitement reproductibles. Ils sont toujours affectés d'une variabilité naturelle plus ou moins importante. Les statistiques permettent de faire part de ce qui est dû à la variabilité naturelle et de ce qui est dû aux effets réels des facteurs [26, 27, 28].

4. La méthode des plans d'expériences

Le terme « plan d'expérience » vient de l'anglais Design of Experiments qui se traduit par « conception des expériences » ; en fait, la méthode englobe aussi bien la définition de la séquence d'essais à réaliser pour étudier un problème donné que l'analyse, algébrique et statistique, des résultats de ces essais.

Selon la définition donnée par Fisher [26], les plans d'expériences constituent «un essai technologique d'utilisation maximale de données». L'efficacité d'un plan d'expériences en termes d'informations acquises et de fiabilité de ces informations est supérieure à celle de toute autre séquence d'essais non structurée de même volume.

La différence majeure entre les méthodes classiques de réalisation d'essais et la méthode des plans d'expériences réside dans le fait que dans la première, la recherche de l'effet des différents facteurs se fait de manière séquentielle et souvent non planifiée – en changeant la valeur ou le niveau, d'un seul facteur à la fois, d'un essai à l'autre – alors que dans la seconde méthode, plusieurs facteurs à la fois changent de niveau. L'interprétation ne se fait plus résultat d'essai par résultat d'essai, mais à partir de l'ensemble des résultats.

Le système à étudier peut être un produit, un processus ou un dispositif quelconque. Les grandeurs à étudier/optimiser dans ce système sont caractérisées par les réponses y_1, y_2 . Elles peuvent correspondre, par exemple, à des performances à optimiser, ou à des défauts à minimiser. Soient A, B, C, les variables ayant a priori une influence sur l'une ou plusieurs de ces réponses. Elles seront dans la suite appelées facteurs. Le système étudié sera considéré comme une boîte noire. On cherchera simplement à définir de manière expérimentale la relation entre chacune des réponses et les différents facteurs étudiés, sans se préoccuper des phénomènes physiques, chimiques, mécaniques, qui régissent ces relations. Selon le système étudié, le nombre de facteurs peut être plus ou moins important. Pour un processus de production par exemple, le nombre de facteurs est en général supérieur à 10. A titre d'exemple, pour une presse d'injection plastique, le nombre de facteurs retenus pour réaliser un plan d'expériences est en général plus près de 20 que de 10 [26, 27, 28].

Les facteurs étudiés peuvent être quantitatifs (pression, température, intensité, etc.) ou qualitatifs (lots de matières, machines, modes opératoires, etc.).

Les valeurs d'un facteur sont appelées niveaux. Les niveaux d'un facteur qualitatif sont aussi appelés modalités. Dans certains cas, nous utiliserons également les termes réglage, valeur ou position pour désigner l'attribut ou le niveau d'un facteur.

Dans le cas où le facteur peut être fixé à un niveau prédéterminé au cours des essais, celui-ci sera qualifié de facteur maîtrisable. Les facteurs devront de préférence être maîtrisés. A défaut, il sera nécessaire de mesurer les niveaux qu'ils prennent pendant les essais, pour étudier leur influence.

5. Les limites de l'application des plans des plans d'expériences

Plusieurs contraintes peuvent restreindre l'application des plans d'expériences. Les situations suivantes sont celles que l'on rencontre le plus souvent.

- Les résultats d'essais doivent pouvoir être quantifiés
- Les facteurs doivent pouvoir être maîtrisés lors de l'expérimentation
- Le système étudié doit être stable.
- Les perturbations de la fabrication doivent être acceptables.

6. Les domaines d'application des plans d'expériences

Les plans d'expériences sont habituellement appliqués dans la recherche et le développement de nouveaux produits ou procédés. Les secteurs d'activités concernés peuvent être aussi différents que l'agronomie, la chimie, l'électronique, la mécanique ou le marketing. Ce qui est nouveau, c'est leur application à la qualité. Les japonais en ont fait un outil privilégié d'obtention de la qualité [26, 27, 28].

Pour le domaine industriel, les plans d'expériences peuvent s'appliquer à tous les stades de la vie d'un produit, que ce soit pour optimiser les performances du produit ou du procédé de fabrication, ou pour résoudre des problèmes de fabrication. Le tableau ci-contre résume les principales activités pour lesquelles les plans d'expérience peuvent être appliqués avec profit.

Tableau (III.2) : principales applications des plans d'expériences.

PRINCIPALES ACTIVITES CONCERNEES
Etude de marketing
Choix des principes technologiques et des matériaux
Définitions des produits ou des procédés (Détermination des performances nominales, tolérance).
Améliorations des produits ou des procédés
Essais de qualification (fiabilité, environnement)
Résolution des problèmes qualité en fabrication

7. les plans d'expériences numériques

Les plans d'expériences s'appliquent également dans le cas où les résultats obtenus par simulation à partir des codes de calcul. On parle alors de « plan d'expériences numériques ». L'ordinateur simule l'essai, à l'aide d'un modèle numérique suffisamment représentatif du phénomène étudié. Les niveaux des facteurs sont combinés en plan d'expériences. L'analyse des résultats des calculs permet de cerner leur influence et d'optimiser le système.

Dans ce cas, les résultats des calculs, à la différence de ceux des essais, n'ont rien d'aléatoire. Les tests statistiques n'ont guère de sens. Cependant, certains codes de simulation permettent de prendre en compte une incertitude de calcul. Dans tous les cas, la quantification des effets des facteurs et des interactions permet de mieux comprendre le comportement du système et d'identifier les configurations optimales.

Conclusion

Les plans d'expériences sont généralement utilisés pour l'optimisation de la formulation. Avec cette méthode quelques expériences permettent la sélection des conditions optimums de fabrication du produit dans un environnement multivariable.

Nous avons utilisé la méthodologie des plans d'expérience, afin de structurer notre démarche de réalisation des essais d'une part, et d'utiliser la matière première de façon rationnelle d'autre part.

Pour se faire, nous avons utilisé un logiciel de plan d'expériences (MODDE 6.0) qui nous a permis de choisir le plan d'expériences Centrale Composite Face (CCF) avec 27 essais à réaliser.

Introduction

L'objectif de cette partie du travail est d'appliquer les plans d'expériences non seulement pour l'optimisation mais aussi pour la compréhension des mécanismes de formation spontanée des nano particules.

Dans le cadre de cette étude expérimentale, la démarche empruntée pour aboutir à l'objectif fixé est constituée de quatre étapes principales :

- Une étude d'orientation dans le but de faire ressortir les réponses représentant les différentes caractéristiques physico-chimiques des nanoparticules.
- Une étude de préformulation qui permet d'inventorier l'ensemble des facteurs de formulation et du procédé de fabrication susceptibles d'influencer notre système.
- Une étude de formulation ayant pour but de planifier la réalisation des essais suivant la méthodologie des plans d'expérience en vue de faire ressortir l'optimum et de le valider.
- Une contribution à la modélisation de la cinétique de libération du principe actif.

Les variables les plus dominantes dans la recherche des conditions de formulations optimales sont le rapport de système binaire Eudragit – PEG, la concentration en Pénicilline, le Poloxamer 188, le cryoprotecteur et la vitesse d'agitation. Des interactions entre ces paramètres ont eu lieu. L'identification de ces interactions est réalisée par une planification expérimentale permettant une modélisation utilisant une régression multiple.

La planification expérimentale est l'application des principes statistiques pour le traitement des données.

Une planification expérimentale introduit les changements systématiques dans les variables d'un système dans un objectif de rechercher quelle variable est responsable des changements en sortie (résultats).

Les plans d'expériences sont généralement utilisés pour l'optimisation de la formulation. Avec cette méthode quelques expériences permettent la sélection des conditions optimums de fabrication du produit dans un environnement multivariable.

En théorie, tous les paramètres qui affectent les propriétés physico-chimiques d'un produit fini doivent être inclus dans un plan d'expérience. Cependant dans l'industrie pharmaceutique le nombre d'excipients et d'équipements utilisés sont source de variabilité. Si toutes les variables sont incluses dans le plan d'expérience, le nombre d'essai pourrait être fastidieux même pendant un criblage en utilisant la matrice de Hadamard [25].

Certaines variables sont initialement fixées pour des raisons technologiques, économiques et réglementaires. D'autres variables sont déterminées par des expériences préliminaires et ne sont soumises à aucune variation sans affecter fondamentalement le produit.

C'est le cas de l'étude de miscibilité système binaire Eudragit – PEG dans l'étude d'orientation, afin d'optimiser le rapport de mélange des deux polymères dans le but d'améliorer la biodistribution de la pénicilline.

Il est à signaler que si toutes les variables dominantes ne sont pas incluses dans le plan d'expérience, même le modèle le plus sophistiqué ne sera pas utile.

Partie I : Etude d'orientation

Introduction

Avant d'entreprendre la mise au point, il est nécessaire de rassembler un certain nombre de données préalables qui constitueront les bases de développement et qui guideront les choix ultérieurs.

L'objectif de ce travail consiste à encapsuler un antibiotique, la pénicilline, dans un mélange de polymères à savoir, l'Eudragit E100 et le polyéthylène glycol 1540 (PEG).

Une étude de la miscibilité de ces deux polymères a été réalisée afin de faire ressortir le rapport optimal de la miscibilité.

La mesure des propriétés rhéologiques du mélange miscible optimal, nous a permis de vérifier sa stabilité.

Dans cette optique, notre propos est de faire ressortir les réponses représentant les différentes caractéristiques physico-chimiques des nano particules en tenant compte des contraintes liées aux facteurs de formulation et du procédé.

I. Définition des réponses :

Les méthodes de caractérisation retenues selon les objectifs visés sont :

- L'analyse granulométrique : elle caractérise les dimensions géométriques des nanoparticules par la mesure du diamètre (d_p) des particules formulées ;
- L'analyse par zétamétrie : la mesure du potentiel Zêta (Z) caractérise la stabilité du colloïde, les valeurs optimales de cette analyse sont à maximiser ;
- L'analyse par Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC) : les propriétés dégagés à partir de cette dernière se résument au taux d'encapsulation (TE) qui représente la quantité du principe actif encapsulé dans les nano particules. Egalement, on retient cette valeur comme réponse, où sa valeur maximale est à cibler.

Pour la réalisation des essais de mesure du taux et de l'efficacité d'encapsulation par HPLC, les conditions opératoires utilisées se trouvent résumées en Annexe 1.

Et afin de vérifier la fiabilité de cette méthode pour la mesure du taux d'encapsulation, il suffit de tester la spécificité de cette dernière par rapport au produit à analyser.

► Etude de la spécificité de la méthode de dosage

Une méthode d'analyse est spécifique si dans un système à plusieurs constituants, elle ne fournit un signal que pour le seul constituant à mesurer. Les interférences des divers constituants dans les échantillons ou dans les réactifs, peuvent ainsi modifier le signal fourni par le constituant à mesurer [29].

A cet effet, une préparation placebo a été analysée dans les mêmes conditions opératoires. Le chromatogramme obtenu, donné en Annexe 2, ne présente aucun pic au temps de rétention du principe actif, ce qui confirme la bonne spécificité de la méthode utilisée.

II. Méthodes d'analyses utilisées

II.1. Granulométrie laser

La granulométrie a pour objet la détermination de la taille des particules élémentaires qui constituent les ensembles de grains de substances diverses, telles que farines, poudres, sables,... et la fréquence statistique des différentes tailles de grains dans l'ensemble étudié. La technique de la granulométrie laser utilise le principe de diffraction et de diffusion d'un faisceau laser.

Qu'est-ce que la taille d'une particule et comment la déterminer ?

Lorsque l'on souhaite définir la taille d'une particule, le problème de sa forme apparaît immédiatement. En effet, une particule non poreuse parfaitement sphérique peut être caractérisée par une seule grandeur : son rayon, r . De cette valeur, il sera possible de déterminer avec exactitude : son volume, sa surface... selon la grandeur qui sera la plus pertinente pour le système étudié. Par exemple, dans le cas des catalyseurs la surface développée par les particules sera primordiale alors que dans le cas de particules magnétiques, les propriétés sont essentiellement liées au volume des particules. Mais si les particules ne sont pas sphériques, le nombre de paramètres permettant de définir la particule augmente rapidement. En effet, supposons que la particule puisse être observée par microscopie. Cette technique nous donne une projection 2D de la particule. Si l'on souhaite toujours décrire cette particule avec un seul paramètre, il est possible de la décrire soit par la sphère de plus petit diamètre contenant la particule, soit par la sphère de plus grand diamètre inscrite dans la particule, soit dans une sphère dont la masse serait équivalente à celle de la particule....

Il est donc clair que la notion de taille devient ambiguë et il est important lors de toute détermination de bien le préciser. Une fois que la notion de taille est définie, différentes méthodes peuvent être envisagées selon la gamme de taille des particules à analyser. Ces méthodes vont de la loupe binoculaire, la microscopie optique, le tamisage,... à des méthodes plus onéreuses comme les compteurs de particules, les analyseurs automatiques d'images ou la diffraction laser. Chacune de ces méthodes a ses avantages et ses inconvénients et sera appropriée à certains types de matériau. Dans le cas de la granulométrie laser, les particules ont des tailles inférieures en général à $500 \mu\text{m}$ et supérieures à $0.15 \mu\text{m}$ pour les dispositifs les plus simples. Par conséquent, cette méthode est particulièrement adaptée à de nombreuses poudres minérales, à des émulsions de polymères...

Une émulsion est un système polydisperse, elle est constituée de particules de différentes tailles et différentes formes donc elle peut être caractérisée par plusieurs dimensions, n'en choisir qu'une seule peut conduire à de grosses erreurs.

Il existe une unique forme dans la nature qui possède une seule dimension : c'est la sphère. Dans le but de faciliter la caractérisation des particules, on les assimile à cette forme.

Un diamètre de particule n'est jamais cité isolément, il est toujours relié à des méthodes de mesure et il représente la valeur moyenne d'une distribution granulométrique de l'ensemble des particules comme l'indique la figure (IV.2) :

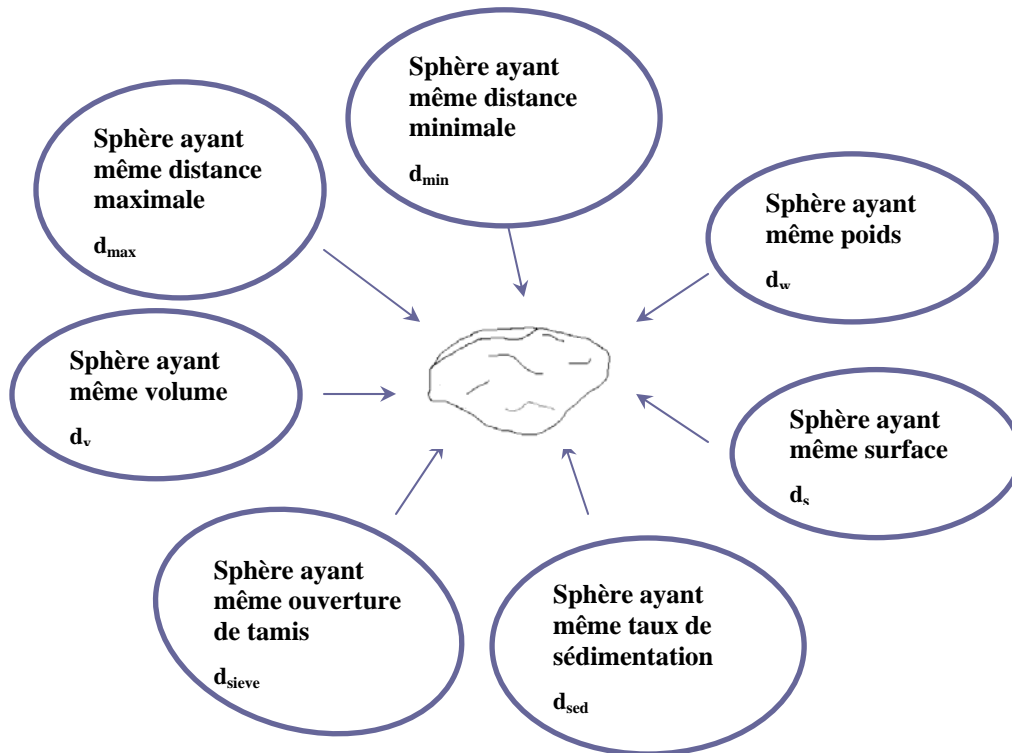


Figure IV.2 : Diamètres des sphères équivalentes.

- Chaque méthode de mesure est exacte, elle mesure simplement une propriété différente de la particule.
- Le tamis mesure la seconde dimension pouvant passer au travers d'une maille carrée ou ronde.
- Le microscope mesure la plus grande dimension qui correspond au plan de repos de la particule.
- La sédimentation mesure le diamètre de STOKES, diamètre de la sphère sédimentant à la même vitesse que la particule.
- La granulométrie laser mesure le diamètre de la sphère ayant soit le même volume ou la même surface que la particule.

Les diamètres en fonction du volume/masse et de la surface de particules sont :

- D[3,2] : Moment moyen de l'aire de la surface : diamètre moyen de Sauter $\frac{\sum d^3}{d^2}$
- D[4,3] : Moment moyen de volume ou de poids : diamètre moyen de Brouckere $\frac{\sum d^4}{d^3}$

La granulométrie nous permis d'accéder à plusieurs diamètres, notre choix s'est porté sur le diamètre en surface.

II.2. Chromatographie liquide à haute performance

- Définition

La chromatographie, méthode d'analyse physico-chimique, sépare les constituants d'un mélange (les solutés) par entraînement au moyen d'une **phase mobile** (liquide ou gaz) le long d'une **phase stationnaire** (solide ou liquide fixé), grâce à la (ré) partition sélective des solutés entre ces deux phases.

Chaque soluté est donc soumis à une **force de rétention** (exercée par la phase stationnaire) et une **force de mobilité** (due à la phase mobile).

- Principe de la chromatographie liquide

- Un liquide appelé **phase mobile** parcourt un tube appelé **colonne**. Cette colonne peut contenir un support solide poreux ou non appelé **phase stationnaire**.
- Si la **phase stationnaire** a été bien choisie, les constituants du mélange, appelés généralement les **solutés**, sont inégalement retenus lors de la traversée de la colonne
- De ce phénomène appelé **rétention** il résulte que les constituants du mélange injecté se déplacent tous moins vite que la phase mobile et que leurs vitesses de déplacement sont différentes. Ils sont ainsi **élués** de la colonne les uns après les autres et donc **séparés**
- Un détecteur placé à la sortie de la colonne couplé à un enregistreur permet d'obtenir un tracé appelé **chromatogramme**
- Dans des conditions chromatographiques données, le "**temps de rétention**" (temps au bout duquel un composé est élué de la colonne et détecté) caractérise qualitativement une substance
- L'**amplitude** de chaque pic, ou encore l'aire limitée par le pic et la ligne de base permet de mesurer la concentration de chaque soluté dans le mélange injecté

II.3. Potentiel Zêta

L'existence d'une charge globulaire donne naissance à un potentiel de surface Ψ_0 à la surface de la particule, qui est progressivement neutralisée par des ions de signe opposé.

Le potentiel zêta ou potentiel électrocinétique, est la différence de potentiel qui apparaît entre le plan d'écoulement et la phase dispersante qui les contient.

Dans un milieu aqueux, une particule chargée va attirer les ions de charge opposée, appelés contre-ions formant une couche ionique fortement liée à la surface de la particule. Ils constituent la couche fixe ou adhérente ou couche de Stern, qui se déplace avec la particule, abaisse sa charge réelle et forme autour d'elle une sorte d'écran protecteur, le potentiel dans cette région diminue rapidement et passe de Ψ_0 à Ψ_s (potentiel de Stern).

La particule et la première couche de contre-ions sont souvent entourés par une couche supplémentaire qui est constituée par des molécules de la phase dispersante. Le potentiel dans cette région varie relativement peu. Il passe de Ψ_s à Ψ_z (potentiel zêta) [30, 31].

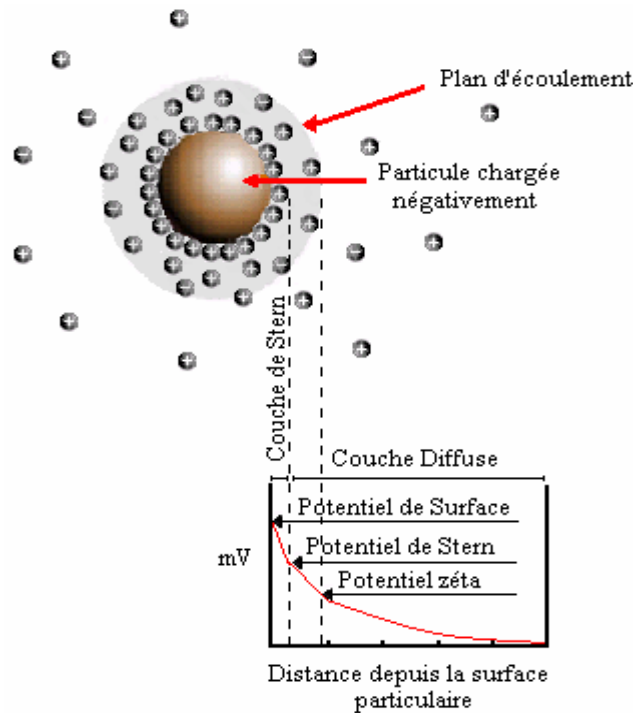


Figure IV.3 : Représentation schématique de l'environnement d'une particule chargée négativement.

La concentration de ces ions décroît quant on s'éloigne de la particule. Il existe donc une deuxième couche appelée couche diffuse, qui n'adhère pas à la particule, mais qui forme un nuage autour d'elle, s'estompe et devient nulle à une certaine distance de la particule, figure (IV.3) [30]. Le seul potentiel qui peut être aisément mesuré est le potentiel zêta.

L'épaisseur de la couche diffuse $1/K$ est donnée par la formule de DEBYE- HUCKEL [31] :

$$1/K = \left[\frac{\varepsilon k T}{4 \pi e^2 \sum n_i z_i^2} \right]^{1/2} \quad (IV.1)$$

ϵ : Permittivité du milieu ;
 k : Constante de BOLTZMANN ;
 T : Température absolue ;
 e : Charge de l'électron ;
 n_i : Concentration en contre-ions i ;
 z_i : Valence des contre-ions i .

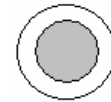
La mesure du potentiel zêta repose sur la mobilité électrophorétique de particules chargées en dispersion dans un réservoir électrolytique. Lorsque les particules dispersées sont soumises à l'influence d'un champ électrique E , elles migrent vers l'électrode de signe opposé à leur charge avec une vitesse V par rapport au liquide qui les contient.

La mobilité électrophorétique μ est donnée par :

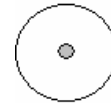
$$\mu = \frac{V}{E} \quad (IV.2)$$

La mobilité électrophorétique permet d'accéder à la valeur du potentiel zêta, selon les relations suivantes [12] :

Relation d'Henry : $Z = \frac{6\pi\eta\mu}{\epsilon[1 + f(Ka)]} \quad (IV.3)$



Relation d'Huckel : $Z = \frac{6\pi\eta\mu}{\epsilon} \quad (IV.4)$



$Ka \rightarrow 0$

Relation de Von Smoluchowski : $Z = \frac{4\pi\eta\mu}{\epsilon} \quad (IV.5)$



$Ka \rightarrow \infty$

Z : Potentiel zêta ;
 η : Viscosité du milieu ;
 μ : Mobilité électrophorétique des particules ;
 K : L'inverse de l'épaisseur de la double couche ;
 a : Le rayon des particules.

Avec :

$$f(Ka) = \frac{1}{2 \left[1 + \left(\frac{2.5}{Ka (1 + 2 \exp(-Ka))} \right) \right]^3} \quad (IV.6)$$

III. Mélange de polymères miscibles

Dans certaines études, le chercheur a besoin d'un matériau qui possède en même temps les propriétés de deux polymères différents. Pour obtenir ce polymère, nous essayons de mélanger deux polymères, dans l'espoir d'avoir les propriétés de chacun des deux.

Théoriquement, cette thèse est facile à considérer, mais pratiquement, elle est difficile à réaliser. Il est, en effet, très rare que deux types de polymères se mélangent.

Le responsable de ce phénomène est l'entropie ou le désordre.

Pour expliquer ce phénomène, nous utiliserons la règle de la seconde loi de la thermodynamique. Cette loi stipule que « quand les choses changent, elles passent d'un état d'ordre à un état de désordre ». Changer les choses dans le sens inverse est très difficile.

En clair, un changement a plus de chance de se produire s'il provoque une augmentation de l'entropie.

Quelle est la relation entre l'entropie et les mélanges de polymères?

Considérons un polymère amorphe. Quand il est seul, les chaînes sont emmêlées les unes dans les autres au hasard et de façon chaotique. L'entropie est élevée dans un polymère amorphe.

L'une des principales raisons qui font que deux polymères se mélangent, c'est qu'ils sont plus désordonnés une fois mélangés que lorsqu'ils sont séparés. Donc le mélange est favorisé par la seconde loi de la thermodynamique. Mais un polymère amorphe est déjà si désordonné qu'il ne peut pas gagner beaucoup d'entropie quand il est mélangé à un autre polymère. Résultat : le mélange n'est pas favorable.

Sans l'entropie comment faire pour mélanger deux polymères?

Dans ce cas, il faut retourner à la première loi de la thermodynamique.

La première loi de la thermodynamique nous indique que quand les choses changent, elles changent vers un état de plus faible énergie.

La première loi de la thermodynamique et les mélanges de polymères?

Pour que deux polymères se mélangent, il faut qu'ils aient moins d'énergie une fois mélangés que lorsqu'ils sont séparés.

Un exemple pour illustrer. Parmi les couples de polymères qui se mélangent effectivement, nous avons le polystyrène et le polyphénylène oxyde. La figure (IV.4) représente les formules développées de ces deux polymères.

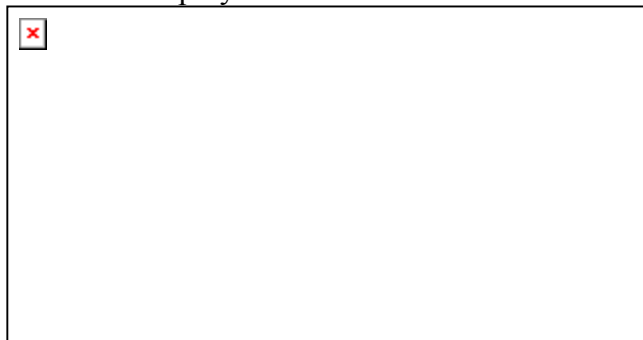


Figure (IV.4) : formules développées.

Ces deux polymères ont des cycles aromatiques, qui s'empilent facilement. Pour cette raison, ces deux polymères s'associent et se mélangent très bien. Il y a peu d'autres exemples de paires de polymères qui se mélangent.

III.1. Etude de la miscibilité du système binaire Eudragit -PEG :

Les deux polymères et leurs mélanges ont été caractérisés qualitativement par infrarouge à transformée de Fourier. Le comportement thermique de ces polymères, ainsi que celui du système binaire élaboré dans les proportions 1/1,1/2,2/1, a été suivi par analyse enthalpique différentielle à balayage.

III.1.1. Caractérisation par Spectroscopie Infra Rouge du système binaire Eudragit – PEG

Les deux polymères ont été caractérisés qualitativement par infrarouge à transformé de Fourier (FTIR) à l'aide d'un spectrophotomètre de marque Nicolet, équipé d'une station de données.

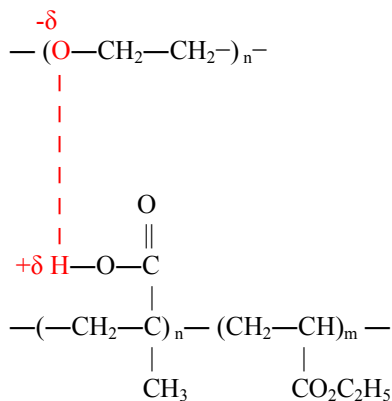
L'étude a été menée avec une résolution de 2 cm^{-1} et un nombre minimal de balayage de 64. Les échantillons sous forme de film, ont été préparés à partir des solutions polymériques dilués dans de l'acétone, le solvant est volatilisé par chauffage modéré, puis dans une étuve à vide pendant quelque heures.

Le dépouillement des spectres FTIR des films de polymères, Eudragit et PEG, sont représentés sur les figures (I.5 et I.6), et leurs mélanges par les figures (IV.7, IV.8 et IV.9). Il est à constater que les vibrations observées dans le cas des trois mélanges correspondent à la contribution de chacun des deux polymères étudiés [32].

Les interactions susceptibles de se former lors des mélanges du système binaire étudié sont de type acide - base.

Elles se présentent sous forme de liaison Hydrogène interchaîne et peuvent être schématisées selon le diagramme suivant :

Hypothèse 1:



Hypothèse 2:

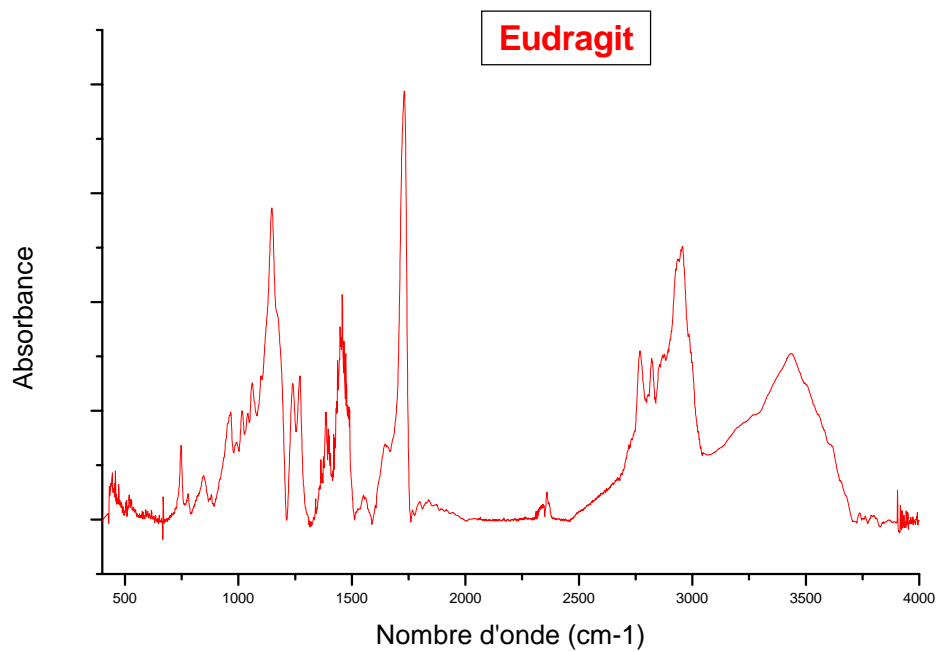
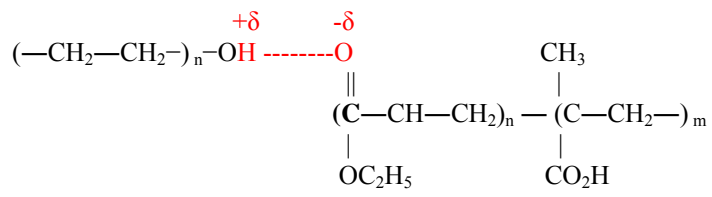


Figure (IV.5) : Spectre Infrarouge de l'Eudragit E100

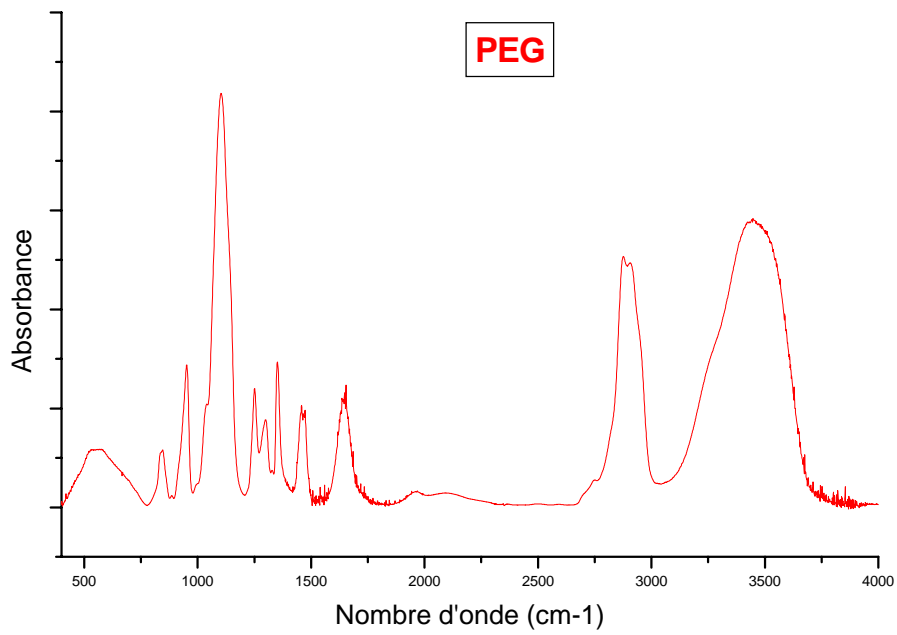


Figure (IV.6) : Spectre Infrarouge de l'PEG

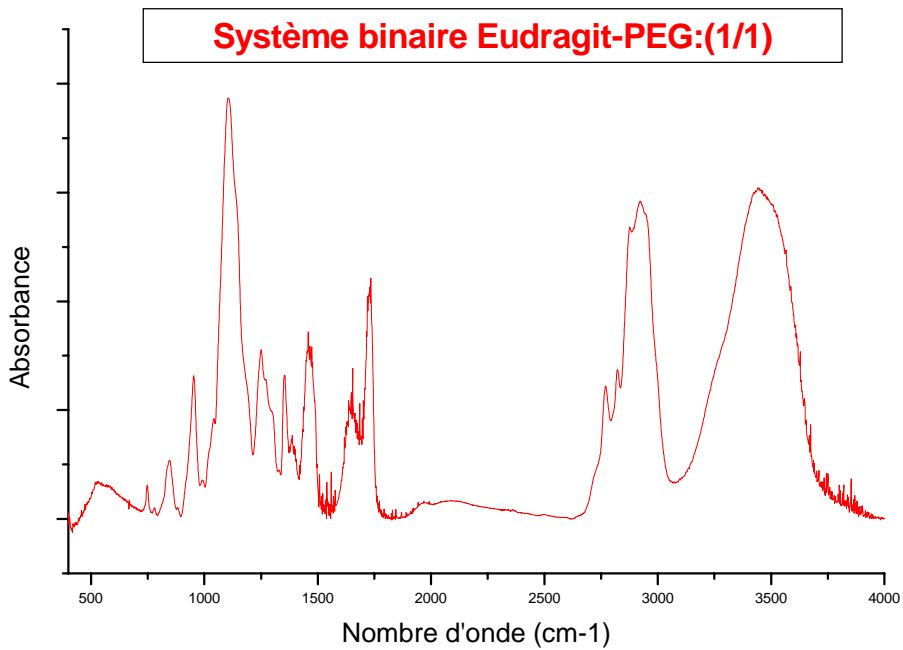


Figure (IV.7) : Spectre Infrarouge du système binaire Eudragit -PEG (1/1)

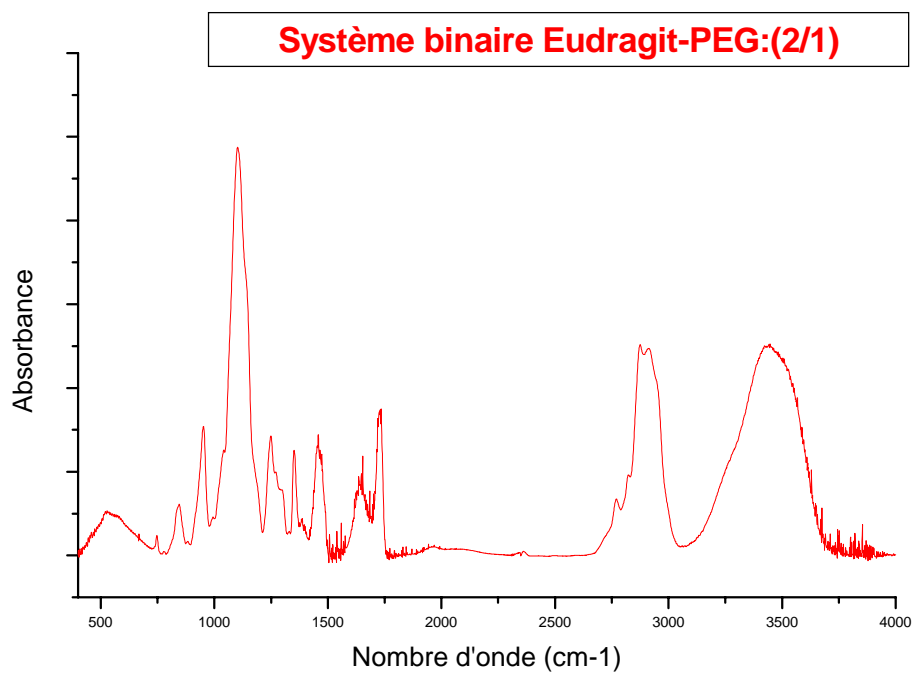


Figure (IV.8) : Spectre Infrarouge du système binaire Eudragit -PEG (2/1)

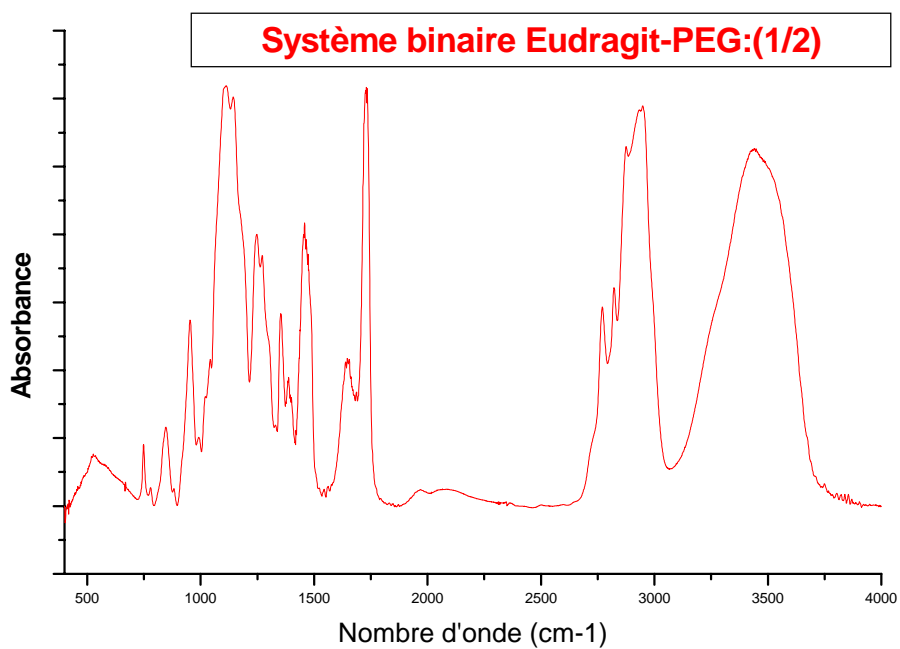


Figure (IV.9) : Spectre Infrarouge du système binaire Eudragit -PEG (1/2)

III.1.2. Etude de la miscibilité du système binaire Eudragit – PEG par analyse thermique différentielle (DSC) :

Des mélanges de deux copolymères à savoir, l'Eudragit E100 et le PEG 1540, ont été préparés par coprécipitation dans de l'acétone et séchés.

Les températures de fusion T_f de chaque polymère et des différents mélanges préparés ont été déterminées à l'aide d'un appareil d'analyse enthalpique différentielles DSC7 de type Perkin-Elmer avec une vitesse de chauffe de 20°C/mn.

Les thermogrammes obtenus sont représentés dans les figures (IV.10, IV.11, IV.12, IV.13, et IV.14). A partir de ces thermogrammes, nous pouvons déduire les valeurs des températures de fusion (T_f), pour chaque composition étudiée, et qui sont reportées dans le tableau (IV.1) ; les températures de fusion correspondent aux sommets des pics.

Les mélanges des deux polymères aux rapports (2/1) et (1/1) présentent deux températures de fusion avec un décalage de 0.2-1.1°C et de 4.3-14.2°C respectivement ce qui indique l'existence d'une miscibilité partielle [32].

Le système binaire Eudragit – PEG (1/2) présente une seule T_f dont la valeur se situe dans la zone intermédiaire entre celle des deux constituants purs.

Ce système est donc miscible pour la proportion Eudragit- PEG (1/2).

Tableau (IV.1) : Valeurs des T_f du système Eudragit- PEG.

PHASE	Rapport	T_f (1) (°C)	T_f (2) (°C)
PEG	/	47.8	/
Eudragit	/	/	56.8
Eudragit/PEG	2/1	48.0	61.1
Eudragit/PEG	1/1	48.9	71.0
Eudragit/PEG	1/2	48.9	/

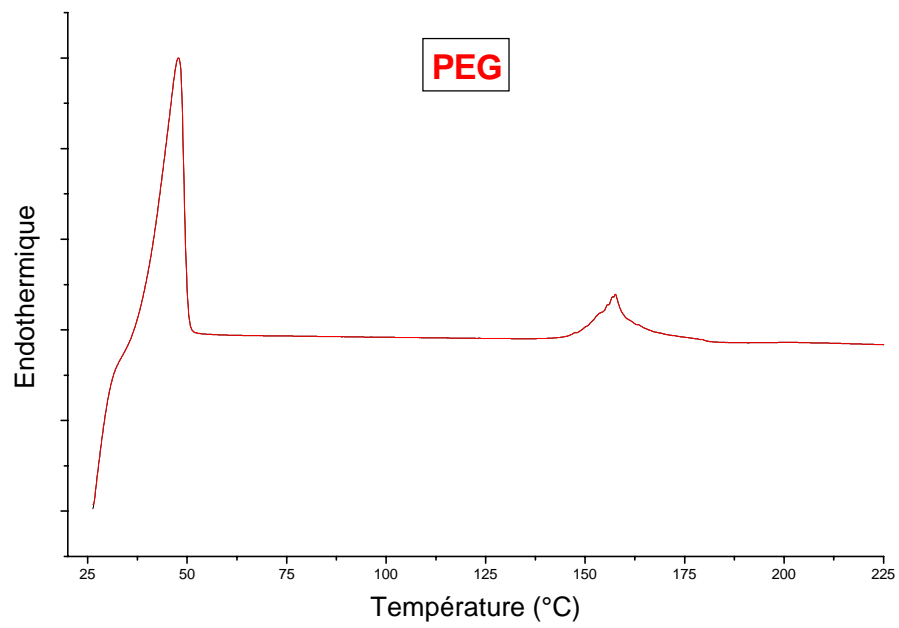


Figure (IV.10) : thermogramme de DSC du PEG

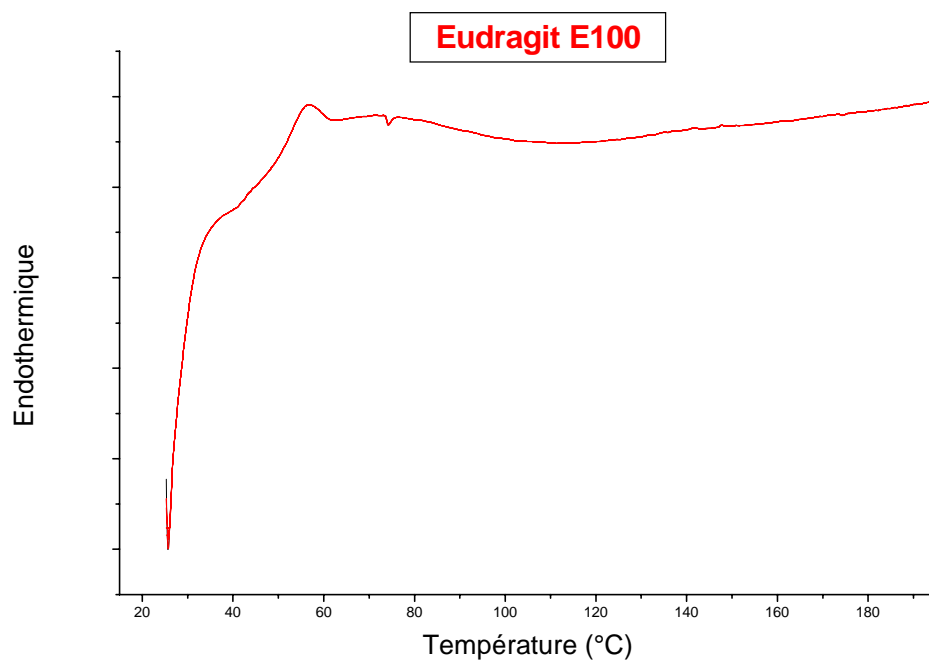


Figure (IV.11) : thermogramme de DSC de l'Eudragit

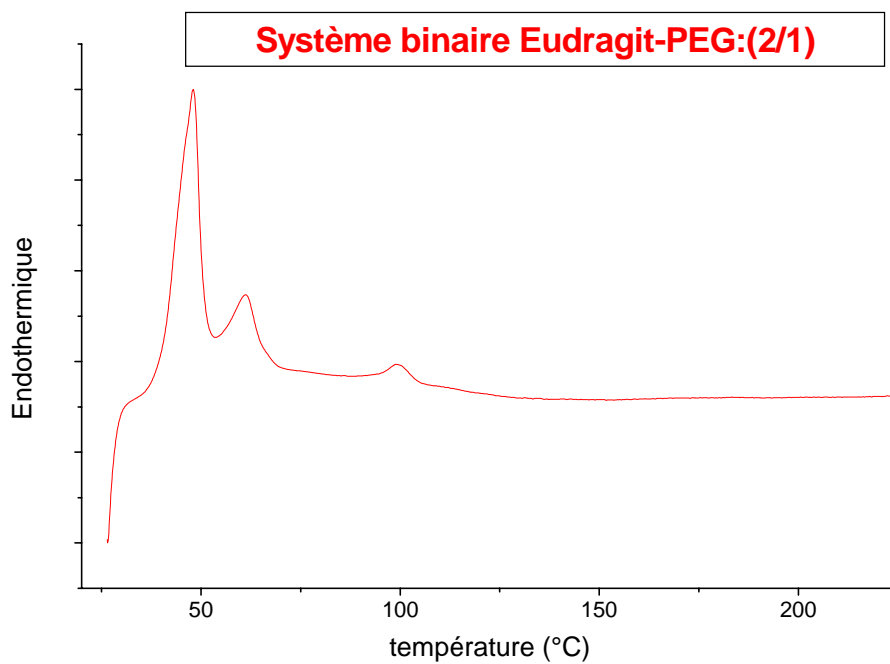


Figure (IV.12) : thermogramme de DSC du système binaire (Eudragit/PEG) rapport (2/1)

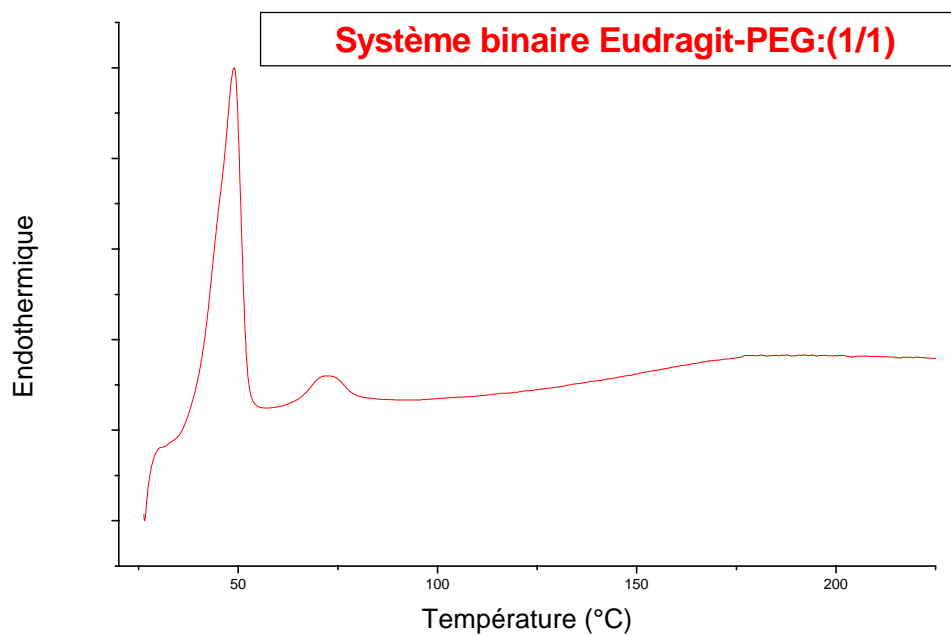


Figure (IV.13): thermogramme de DSC du système binaire (Eudragit/PEG) rapport (1/1)

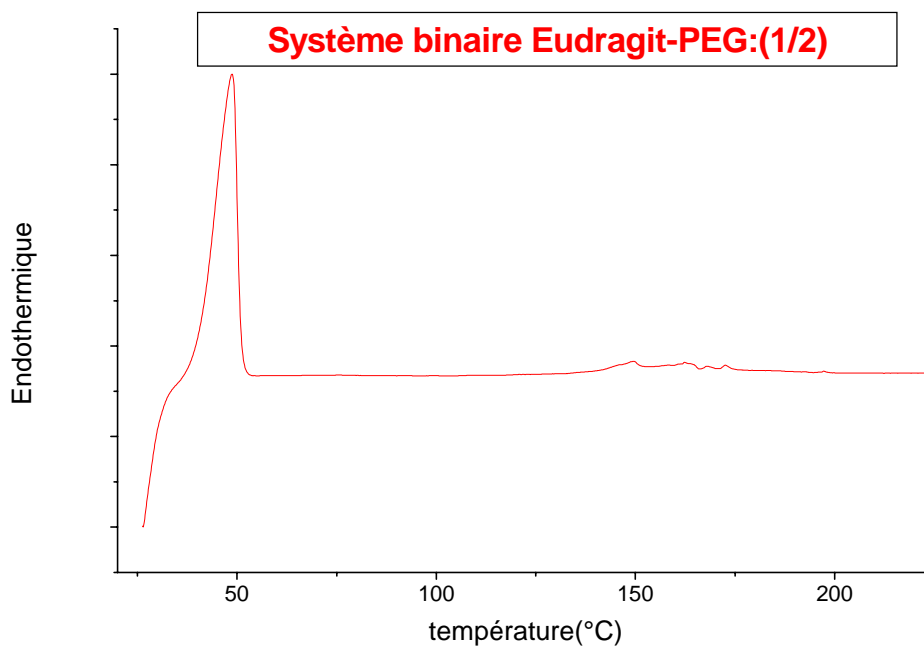


Figure (IV.14) : thermogramme de DSC du système binaire (Eudragit/PEG) rapport (1/2)

IV. Stabilité du mélange miscible par tests rhéologiques

La détermination des propriétés rhéologiques d'un fluide sert non seulement à identifier et à caractériser le fluide, mais aussi à deviner son emploi dans les formulations.

A cet effet, le mélange miscible étant trouvé, la vérification de sa stabilité par la réalisation du test de la viscoélasticité s'impose afin de prévoir son comportement mécanique au cours des différentes étapes de développement.

- Tests viscoélastiques [33]

En conception, essayer de comprendre le comportement rhéologique observé permet de déterminer l'influence du procédé et des conditions de fabrication sur la qualité du produit et sur la reproductibilité de la production.

Dans notre cas, la mesure de la viscoélasticité permet la vérification de la stabilité des solutions de polymères étudiées du système binaire Eudragit – PEG.

L'étude des propriétés viscoélastiques linéaires d'un corps permet de caractériser sa structure au repos puisque le comportement linéaire est relié à l'aptitude du matériau à supporter des déformations, sans modification de la structure à l'échelle microscopique.

Des essais oscillatoires sont utilisés pour examiner les différents types de matériaux viscoélastiques, des liquides de basse viscosité, pâtes, gels, polymères ou élastomères solides rigides.

On fait subir au mélange miscible du système binaire Eudragit- PEG des tests oscillatoires, en faisant varier la déformation γ de 1 à 100%, avec une fréquence constante ($f = 1\text{Hz}$), le nombre de points de mesure est de 30.

La figure (IV.15) montre l'évolution du module de conservation (G') et celui de perte en fonction de la déformation (G'').

La démonstration des équations qui décrivent ces deux modules est donnée en annexe 3.

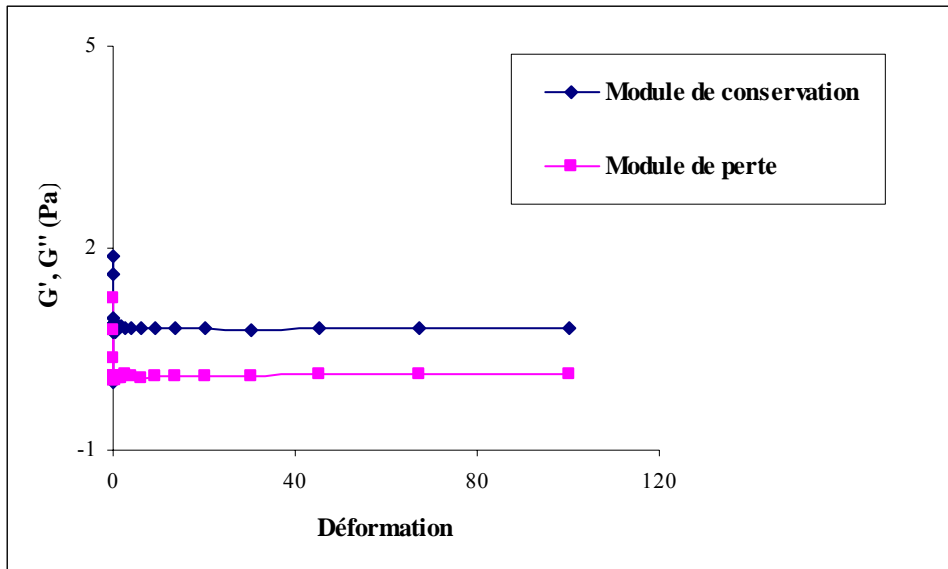


Figure (IV.15) : Courbe de viscoélasticité du rapport (2/1) du système binaire Eudragit-PEG.

La valeur du G' est une mesure de l'énergie de déformation stockée dans l'échantillon pendant le cisaillement. G' représente le comportement élastique d'un fluide.

Le module de conservation G' (dans le domaine linéaire) est un paramètre rhéologique important pour l'analyse de l'état structural de la solution polymérique au repos. Il caractérise le degré de cohésion des réseaux polymériques obtenus à l'issue d'enchevêtrement ou d'interpénétration des macromolécules par effet d'interactions attractives de type de Van Der Waals ou à l'issue de leur séparation par effet d'interactions répulsives entropique ou électrostatique.

La valeur du G'' est une mesure de l'énergie de déformation utilisée dans le matériau pendant le cisaillement, et perdue après. Cette énergie est employée pendant le processus de changement de la structure ou dissipée dans l'environnement entourant sous forme de chaleur. Ainsi, G'' représente le comportement visqueux d'un fluide.

La courbe de viscoélasticité de la solution de polymères au rapport optimal (figure IV.15) montre que G'' est supérieur à G' , ce qui traduit le comportement d'un solide viscoélastique. Dans ce cas, le comportement élastique est prédominant sur le comportement visqueux. La structure montre une certaine rigidité (structure d'un gel) et, donc une certaine forme de stabilité.

On peut donc conclure que le mélange miscible du système binaire Eudragit – PEG optimisé a un comportement rhéologique stable.

Conclusion

Dans ce chapitre, l'analyse enthalpique a permis de mettre en évidence la miscibilité du système binaire Eudragit - PEG.

L'utilisation de la spectroscopie infra Rouge à transformé de Fourier a permis de confirmer l'existence d'interaction de type hydrogène au sein du système miscible.

Par ailleurs, l'analyse rhéologique a permis de confirmer la stabilité du mélange binaire optimisé.

Au vu de ces résultats, le rapport (1/2) du système binaire étudié est considéré comme optimal et sera retenu pour la suite de ce travail.

Au terme de cette étude d'orientation, les réponses dégagées rentrant dans l'étape de formulation sont :

- Le diamètre moyen des nano particules (en μm) ;
- Le potentiel zêta (en mV) ;
- Le taux d'encapsulation qui représente la quantité du principe actif (pénicilline) encapsulé (en %).

Partie II : Etude de préformulation

Introduction :

Les études préalables d'orientation ont défini à priori le cadre dans lequel la formulation devra s'exercer ; elles ont permis d'établir les principes des études expérimentales ultérieures.

L'objectif de cette étude est de faire ressortir les principaux facteurs liés à la formulation et au procédé de fabrication, afin de les utiliser comme variables de contrôle dans l'étape de formulation.

En fait, le but de ce chapitre est de caractériser tous les facteurs de contrôle afin de ne retenir que ceux qui sont potentiellement importants, ce qui permet de réduire considérablement le nombre de variables et par la même de minimiser le nombre de réalisation des essais en vue d'optimiser la formulation des nanoparticules.

I. CARACTERISATION DES FACTEURS LIES A LA FORMULATION

Les facteurs liés à la formule sont :

- **Principe actif :**
 - Pénicilline.
- **Excipients :**
 - Poloxamer ;
 - Eudragit E100 ;
 - PEG 1540 ;
 - Saccharose.

I.1. Le principe actif

Le principe actif est une substance dont l'activité thérapeutique a été établie et qui a fait l'objet de nombreuses études de la part des chimistes, des toxicologues et des pharmacologues [34].

Les caractéristiques physico-chimiques de la pénicilline sont regroupées dans le tableau (IV.2)

Tableau (IV.2) : Caractéristiques physico-chimiques de la pénicilline [35, 36, 37]

Produit	Pénicillamine
Formule brute	$C_5H_{11}NO_2S$
Masse moléculaire	149.2
Caractère	Poudre cristalline blanche ou sensiblement blanche.
Solubilité	Facilement soluble dans l'eau, peu soluble dans l'alcool, pratiquement soluble dans l'éther
Classe thérapeutique	Antibiotique
Pouvoir rotatoire spécifique	$-61.0^\circ - 65.0^\circ$

I.2. Les excipients

Les excipients sont des matières premières destinées à entrer dans la composition des préparations pharmaceutiques à un titre différent de celui des principes actifs. Elles sont destinées à la mise en forme de ces préparations ou à y être incorporées [29, 33].

- **Eudragit E100 :**

Les caractéristiques physico-chimiques de l'Eudragit E100 sont représentées dans le tableau (IV.3)

Tableau (IV.3) : **Caractéristiques physico-chimiques de l'Eudragit E100 [38, 39]**

Produit	Eudragit E100
Synonyme	Polyméthacrylate
Nom chimique	Poly(butyl methacrylate,(2-dimethyl aminoethyl)méthacrylate,methyl methacrylate)1 :2 :1
Description	Polymère cationique
Poids moléculaire (Kda)	$\geq 100\ 000$
Densité (g/cm ³)	0.81-0.82
Indice de réfraction (n _D ²⁰)	1.38-1.385
Viscosité Dynamique (mPa)	3-12
Propriétés	Agent enrobant
Méthode de préparation	Par polymérisation des acides acrylique et méthacrylique ou de leurs esters : butyle ester ou diméthylaminoethyl ester

- **Polyéthylène Glycol 1540 :**

Les caractéristiques physico-chimiques du PEG 1540 sont représentées dans le tableau (IV.4)

Tableau (IV.4) : **Caractéristiques physico-chimiques du PEG 1540 [35, 38]**

Produit	Polyéthylène Glycol
Synonyme	Macrogol – Carbowax – Lutrol E
Nom chimique	
Description	Polymère hydrophile
Poids moléculaire (Kda)	1300 - 1600
Densité (g/cm ³) à 25 °C	1.15 – 1.21
Viscosité Dynamique (mm ² /s (cSt))	26 - 33
Propriétés	Agent enrobant

- **Pluronic:**

Les agents tensio-actifs sont des substances qui abaissent la valeur de la tension superficielle des liquides auxquels sont additionnées par suite d'une adsorption plus importante de leurs molécules à la surface du liquide.

Ces composés sont des substances amphiphiles. En effet, leur molécule est formée d'une partie apolaire, qui n'a pas d'affinité pour l'eau et d'une partie polaire hydrophile, ionisée ou non, qui a beaucoup d'affinité pour l'eau.

En pharmacie galénique, ils sont employés notamment comme émulsionnant (ou émulsifiant), agents de suspension, solubilisants, mouillants, moussants ou détergents [40].

Les caractéristiques physico-chimiques du Pluronic sont représentées dans le tableau (IV.5)

Tableau (IV.5) : **Caractéristiques physico-chimiques du Poloxamer 188 [35, 38,41]**

Produit	Poloxamer 188
Synonyme	Pluronic F68
Type	Non ionique
Formule brute	$\text{HO}(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_{80}(\text{C}_3\text{H}_6\text{O})_{27}(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_{80}\text{H}$
Solubilité	Facilement soluble dans l'éthanol et dans l'eau.
Catégorie de la fonction	Agent d'émulsification
HLB*	29
pH	De 6.0 à 7.4 pour une solution aqueuse à 2.5%(p/v).
Densité	1.06 g/cm ³ à 25°C
Viscosité	1000 cP
dL50	Par voie orale chez la souris = 15 g/ kg. Par voie orale chez le rat =9.4 g/kg.

* Balance Hydrophile- Lipophile.

II. Caractérisation des facteurs liés au procédé de fabrication

Le matériel ainsi que ses caractéristiques utilisés pour la formulation des nanoparticules sont les suivants :

II.1. Agitateur :

Il est de type IKA-Werk et sert à mélanger tous les composants utilisés dans la formulation avec une vitesse variant entre 100 à 2000 trs/mn.

II.2. Evaporateur rotatif :

Il est de type Buchi Rotavapor R-205 relié à un bain marie thermostaté Julabo EC, il est utilisé pour la concentration de la solution colloïdale de nanoparticules.

II.3. Lyophilisateur [42] :

Il est de type Freezemobile 12-Virtis.

Principe de la lyophilisation :

La lyophilisation est une cryodessiccation, c'est à dire une dessiccation d'un système aqueux ou organique préalablement congelé.

Etapas de la lyophilisation :

- **Phase 1 : congélation-** Elle doit être conduite à une température suffisamment basse et dans un temps assez court pour que les substances contenues dans la masse ne soient pas altérées.
- **Phase 2 : Dessiccation primaire-** L'élimination du solvant congelé se fait par sublimation sous vide avec piégeage de ses vapeurs au niveau d'un condensateur maintenu à très basse température. Cette sublimation se fait de façon progressive avec un apport de calories tel que la température de la masse soit impérativement maintenue en dessous de sa température de fusion commençante.
- **Phase 3 : Dessiccation secondaire-** A partir du moment où la plus grande partie (environ 90%) du solvant est éliminée, la température de la masse peut remonter sans crainte d'altération des constituants. C'est la phase terminale de séchage. Le produit obtenu est poreux, léger, stable.

III. Procédé de fabrication :

1. Emulsification /évaporation (Emulsion multiple eau dans huile dans eau (E/H/E)) :

Dans une double émulsification de ce type, le principe actif est incorporé en solution aqueuse dans la phase interne d'une émulsion H/E. Outre sa simplicité de mise en œuvre, cette technique permet l'obtention d'un rendement d'encapsulation élevé en principes actifs hydrosolubles. La phase organique agit comme une barrière entre les deux compartiments aqueux, évitant ainsi la diffusion du médicament vers la phase aqueuse externe.

Cette technique, basée sur l'évaporation de la phase interne d'une émulsion, et d'une mise en œuvre aisée, dans un petit laboratoire comme à l'échelle industrielle.

On dissout l'Eudragit et le PEG dans de l'acétone (solvant organique miscible à l'eau). On dissout le principe actif dans de l'eau et on verse la solution obtenue dans un non solvant du polymère (eau contenant le surfactant : poloxamer). Les nanoparticules se forment instantanément dans le milieu, sous forme d'une suspension laiteuse qui présente l'effet Tyndall caractéristique de l'état colloïdal. La phase dispersée formée par diffusion mutuelle et réciproque du solvant organique dans l'eau, est ensuite concentrée par évaporation sous pression réduite. La suspension colloïdale est ensuite filtrée avec du papier filtre. Le filtrat de la suspension des nanoparticules est lyophilisé.

Les conditions opératoires liées à la lyophilisation sont regroupées dans un seul facteur de contrôle « bloc » considéré comme bruit car il peut induire des variabilités sur les propriétés des nanoparticules étant donné qu'il est vraisemblablement non maîtrisable et non contrôlable. Remarquons que nous n'avons pas la maîtrise des paramètres opératoires du lyophilisateur à savoir la température de dessiccation (primaire et secondaire) ainsi que la pression, ce qui nous a amené à considérer ce dernier comme facteur non maîtrisable.

Les quantités à incorporer de Pénicilline, polymères, surfactant et la vitesse d'agitation sont considérées comme des facteurs principaux variables.

2. Etapes du procédé de fabrication

On effectue en premier lieu, les pesées nécessaires des deux phases qui sont constituées de :

- **Phase aqueuse 1 :**

Pénicilline ;
Eau.

- **Phase organique :**

Eudragit ;
PEG ;
Acétone.

- **Phase aqueuse 2:**

Poloxamer;
Eau.

Mode Opératoire :

- Etape 1 : **Préparation de la phase aqueuse 1 :**

Dissoudre une quantité de Pénicilline dans 10 ml d'eau.

Cette étape ne nécessite pas l'utilisation des moyens mécaniques car la Pénicilline est soluble dans l'eau.

- Etape 2 : **Préparation de la phase organique :**

Une quantité d'Eudragit et de PEG, a été préparés par coprécipitation dans de l'acétone et séchés sous agitation et chauffage modérés.

- Etape 3 : **Préparation de la phase aqueuse 2 :**

On dissout une quantité de Poloxamer dans de l'eau.

Cette étape ne nécessite pas l'utilisation d'agitation mécanique car le Poloxamer est soluble dans l'eau.

- Etape 4 : **Préparation de l'émulsion E/H :**

On additionne la phase aqueuse 1 à la phase organique sous agitation modérée. Obtention d'une émulsion E/H.

- Etape 5 : **Préparation de l'émulsion E/H/E**

On additionne l'émulsion E/H à la phase aqueuse 2. On obtient l'émulsion E/H/E.

La vitesse d'agitation du mélange est considérée comme un facteur principal variable. Par contre le temps de mélange des deux phases est fixé à 10mn.

- Etape 6 :

On évapore sous vide la solution de nanoparticules afin de la concentrer. Cette étape permet de faciliter la lyophilisation du système dispersé. La solution concentrée est filtrée.

Les facteurs liés à cette étape sont la température du bain marie (30°C) et la pression du vide de la pompe. Cette dernière n'est pas maîtrisable ni contrôlable du fait d'absence de moyen de mesure (manomètre).

- Etape 7 : **La lyophilisation**

Conclusion

Au terme de cette étude de caractérisation, les facteurs retenus pour la suite de l'étude de formulation sont :

- **Polymère** : Système binaire Eudragit -PEG à un rapport de (1/2) fixé à 600 mg ;
- **Principe actif** : la Pénicilline : [300 à 1200] mg
- **Tensioactif** : le Poloxamer : [600 à 1800] mg ;
- **Cryoprotecteur** : Saccharose : [1 à 10] % ;
- **Vitesse d'agitation** : [500 à 1500] trs/mn.

Partie III : Etude de formulation

Introduction

Cette étude a été menée afin de planifier la réalisation des essais suivant une méthodologie s'appuyant sur les techniques des plans d'expérience en vue de faire ressortir l'optimum, bien entendu, la validation de l'optimum sera réalisée au terme de cette étude.

I. Méthodologie expérimentale

La démarche adoptée dans ce travail est basée sur la planification des expériences. Le recours à cette méthode des plans d'expériences permet d'obtenir des modèles prévisionnels des réponses étudiées, ainsi que les conditions optimales, et ce avec un minimum d'essais et un maximum de crédibilité.

Compte tenu de l'objectif visé par cette étude, à savoir la détermination des effets des quatre facteurs, la stratégie de planification expérimentale la plus adéquate repose sur une modélisation en surface de réponse (RSM) [14, 43], par un modèle d'ordre 2 tenant compte de toutes les interactions doubles entre les facteurs :

$$y = a_0 + a_1x_1 + a_2x_2 + a_3x_3 + a_4x_4 + a_{11}x_1^2 + a_{22}x_2^2 + a_{33}x_3^2 + a_{44}x_4^2 + a_{12}x_1x_2 + a_{13}x_1x_3 + a_{14}x_1x_4 + a_{23}x_2x_3 + a_{24}x_2x_4 + a_{34}x_3x_4$$

y= représente la réponse ;

x_1, x_2, x_3 et x_4 représentent les facteurs ou variables aux coordonnées centrées et réduites.

a_i = représente les coefficients du modèle.

Les coefficients a_i sont déterminés par utilisation de la méthode des moindres carrés partiels (PLS (partial least square) [44], qui consiste à regrouper les facteurs en composantes principales.

Pour définir la matrice d'expérience à réaliser, on utilise un logiciel (MODDE 6).

Le plan d'expérience qui répond le mieux aux conditions d'expérimentation, en tenant compte, des contraintes liées aux temps et à la quantité de matière première, est celui de Centrale Composite Face (CCF) pour quatre facteurs. 27 expériences sont retenues pour la réalisation des essais.

II. Réalisation et caractérisation des essais

On effectue les essais selon l'ordre aléatoire proposé par le logiciel (Run Order). Le respect de cet ordre est important (Randomisation) car il permet de réduire considérablement la variabilité.

La matrice d'expériences choisie qui répond à cette stratégie est de type Central Composite Face désigné (CCF). La matrice contient 27 essais, avec 3 répétitions au centre des différents domaines de variation des facteurs, pour minimiser l'erreur au centre, et estimer l'écart type de la variabilité naturelle (l'erreur expérimentale).

La matrice d'expériences aux variables centrées réduites associée à ce plan est donnée comme suit (tableau IV.6)

Tableau (IV.6) : matrice au variables centrées et réduites du plan d'expériences

Exp No	Pénicilline (x_1)	Pluronic (x_2)	Cryoprotecteur (x_3)	Vitesse (x_4)
1	-1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1	-1
3	-1	1	-1	-1
4	1	1	-1	-1
5	-1	-1	1	-1
6	1	-1	1	-1
7	-1	1	1	-1
8	1	1	1	-1
9	-1	-1	-1	1
10	1	-1	-1	1
11	-1	1	-1	1
12	1	1	-1	1
13	-1	-1	1	1
14	1	-1	1	1
15	-1	1	1	1
16	1	1	1	1
17	-1	0	0	0
18	1	0	0	0
19	0	-1	0	0
20	0	1	0	0
21	0	0	-1	0
22	0	0	1	0
23	0	0	0	-1
24	0	0	0	1
25	0	0	0	0
26	0	0	0	0
27	0	0	0	0

Les résultats d'analyse obtenus à l'issue de la caractérisation granulométrique, de la mesure du taux d'encapsulation et du potentiel zêta sont consignés dans le tableau (IV.7) ci dessous :

Tableau (IV.7) : Valeurs des réponses expérimentales

Exp No	Taux d'encapsulation (%)	Diamètre (µm)	potentiel Zêta (mV)
1	61,92	53,72	21
2	70,83	58,36	3,2
3	62,9	65,3	3,1
4	68,9	68,59	3,1
5	61,76	52,1	3,6
6	71,55	51,55	3,7
7	59,15	80,04	8,7
8	69,5	71,46	4,9
9	59,19	13,29	5,9
10	67,85	11,93	4,4
11	53,51	5,22	3,8
12	69,23	2,3	3,6
13	63,07	3,0	3,7
14	68,67	10,64	4,1
15	59,37	12,93	5,2
16	69,58	13,36	3,7
17	59,28	22,39	3
18	69,97	33,44	4,8
19	63,9	19,73	3,6
20	64,07	17,31	3,8
21	63,44	52,1	6,1
22	66,58	51,55	4,1
23	65,26	75,46	3,9
24	64,88	7,43	2,8
25	65,03	21,93	3,9
26	65,95	37,98	4
27	65,56	28,12	3,5

III. Analyse statistique des résultats :

La qualité au sens statistique des résultats, obtenue à l'issue de l'étude des ajustement, est conditionnée par la mesure de :

- le coefficient expliquant la variance, R^2 ;
- le coefficient de prédiction, Q^2 ;
- validité du modèle ;
- la reproductibilité.

Le premier (R^2) indique à quel point le modèle explique les valeurs observées. Plus il est proche de 1, plus le modèle est bien ajusté (adéquat).

▪ Le second (Q^2) indique la puissance prédictive du modèle. Au-delà de 0.7, le modèle présente un bon pouvoir prédictif.

▪ Les expressions mathématiques de ces deux coefficients sont :

$$R^2 = \frac{\sum (y_i - \bar{y})^2 - \sum e_i^2}{\sum (y_i - \bar{y})^2} \quad 0 \leq R^2 \leq 1 \quad (\text{IV.7})$$

$$Q^2 = \frac{\sum (y_i - \bar{y})^2 - \sum \left(\frac{y_i - \bar{y}}{1 - h_i} \right)^2}{\sum (y_i - \bar{y})^2} \quad 0 \leq Q^2 \leq 1 \quad (\text{IV.8})$$

Avec :

\bar{y} : moyenne de l'ensemble des réponses y_i mesurés ;

e_i : résidu au point i ;

y_i : réponse prédite par le modèle au point i ;

h_i : la variance de prédiction au point i ; c'est le $i^{\text{ème}}$ élément diagonal de la matrice $X(X^T X)^{-1} X^T$, ou X est la matrice de calcul des coefficients du modèle.

▪ Mesure de la validité du modèle : le modèle n'est pas ajustable quand la valeur de la validité du modèle est inférieure à 0.25. Quand cette dernière est supérieure à 0.25, l'ajustement du modèle est significatif. Le modèle est considéré comme parfait si la valeur de la validité du modèle est égale à 1.

▪ La reproductibilité (reproducibility) : est la variation des réponses dans les mêmes conditions comparée à la variation totale des réponses.

IV. Modélisation en surface de réponse

Le calcul des paramètres des modèles polynomiaux de surface de réponse s'effectue par la méthode de régression multilinéaire (MLR), en utilisant les valeurs expérimentales des réponses en fonction des données des facteurs.

Il est à noter que ces modèles sont intéressants dans le sens où ils expliquent le comportement expérimental théoriquement et prédisent les résultats lorsqu'on est hors du domaine expérimental.

Toutefois, ces explications et prédictions ne sont pas assurés à 100% par les modèles et il est judicieux de représenter leurs coefficients, figure (IV.16), afin d'apprécier cette analyse.

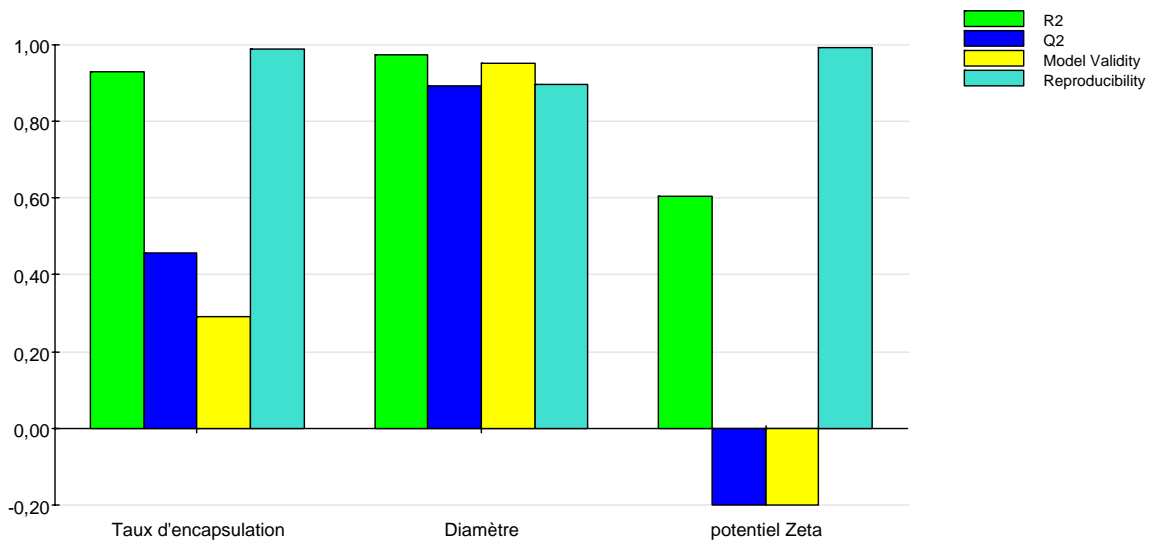


Figure (IV.16): **Histogramme des réponses étudiées.**

Au regard des valeurs de R^2 , Q^2 , validité du modèle et reproductibilité on peut dire que les modèles obtenues sont prédictifs pour les deux réponses : taux d'encapsulation et diamètre des particules, ce qui permet de déterminer, sans équivoque, les effets des facteurs sur ces deux réponses.

Concernant la réponse Potentiel Zêta, on constate qu'elle présente une très bonne reproductibilité des résultats de mesure qui est égale à 0.99 et une valeur acceptable pour le R^2 , égale à 0.60.

On note également des valeurs négatives concernant le coefficient de prédiction Q^2 et la validité du modèle qui sont égales respectivement à - 0.24 et - 0.20. On en déduit que l'étude des effets des facteurs sur cette réponse n'est pas significative.

En effet, le potentiel Zêta nous renseigne sur la stabilité des suspensions et toute suspension est un système instable qui tend à s'agréger par l'effet des forces de Van der Waals. Il est possible de stabiliser un tel système en introduisant des interactions à grande distance, telles que des interactions stériques, ou encore une répulsion électrostatique. Les nano particules formulées bénéficient d'une stabilisation stérique grâce aux molécules de PEG entrant dans leur composition. Afin de vérifier l'efficacité de cette stabilité stérique qui empêche

l'agrégation du système dispersé formulé, nous avons procédé à des mesures de potentiel Zêta.

Ces mesures ont été systématiquement associées à des mesures de la taille et du taux d'encapsulation des nano particules. Les particules ont un potentiel Zêta qui varie de 2.8 à 21 mV. Néanmoins, cette réponse ne sera pas retenue du fait de la faiblesse des coefficients de prédiction et de validité du modèle.

Les modèles polynomiaux exprimant les trois réponses en fonction des facteurs de formulation et de procédé, exprimés en coordonnées centrées réduites, s'écrivent alors:

⇒ **Pour le taux d'encapsulation, TE:**

$$TE = 64.99 + 4.8 x_1 \quad (IV.9)$$

⇒ **Pour le diamètre des particules, dp :**

$$dp = 32.47 + 3.45x_2 - 27.58x_4 - 6.11x_1^2 - 15.51x_2^2 + 17.8x_3^2 + 7.42x_4^2 - 1.13x_1x_2 + 3.52x_2x_3 - 4.7x_2x_4 \quad (IV.10)$$

⇒ **Pour le potentiel Zêta, Z :**

$$Z = 3.66 - 1.52x_1 - 0.74x_2 - 0.69x_3 - x_4 + 0.31x_1^2 + 1.5x_3^2 + 0.83x_1x_2 + 0.92x_1x_3 + 1.17x_1x_4 + 1.77x_2x_3 + 0.62x_2x_4 + 0.53x_3x_4 \quad (IV.11)$$

A noter qu'on peut trouver entre ces réponses de fortes corrélations, dues au fait qu'elles peuvent être régies par les mêmes phénomènes. En conséquence, ces réponses dépendantes se comporteront de la même façon (R positif), ou (R négatif). Ainsi, il est judicieux de ne tenir compte que celles qui sont indépendantes. Pour ce faire, on représente la matrice de corrélation réponse-réponse tableau (IV.8), déduite de la matrice d'expérience.

Tableau (IV.8) : **matrice de corrélation**

Réponse	TE	dp	Z
TE	1	0.165084	- 0.266577
dp	0.165084	1	0.240761
Z	- 0.266577	0.240761	1

A la lumière de ces valeurs de corrélation, on constate que toutes les réponses sont indépendantes du fait que les coefficients de corrélation sont très faibles (R < 0.3).

V. **Etude de l'effet des facteurs sur les réponses :**

Au terme de la modélisation en surface de réponse, on se propose de déterminer l'effet propre de chaque facteur sur les réponses.

1. Sur le taux d'encapsulation :

Le modèle (IV.9) du taux d'encapsulation, montre clairement que cette réponse ne dépend que de la Pénicilline. Donc ce dernier présente l'effet le plus caractéristique sur cette réponse, figure (IV.17). Ceci étant prévisible, du fait que le taux d'encapsulation correspond à la quantité du principe actif encapsulé dans les nanoparticules.

On peut noter par ailleurs, que la variation des trois autres facteurs ne porte aucune modification sur le sens de cette allure, et donc il n'y a pas d'interaction entre ces éléments et la Pénicilline.

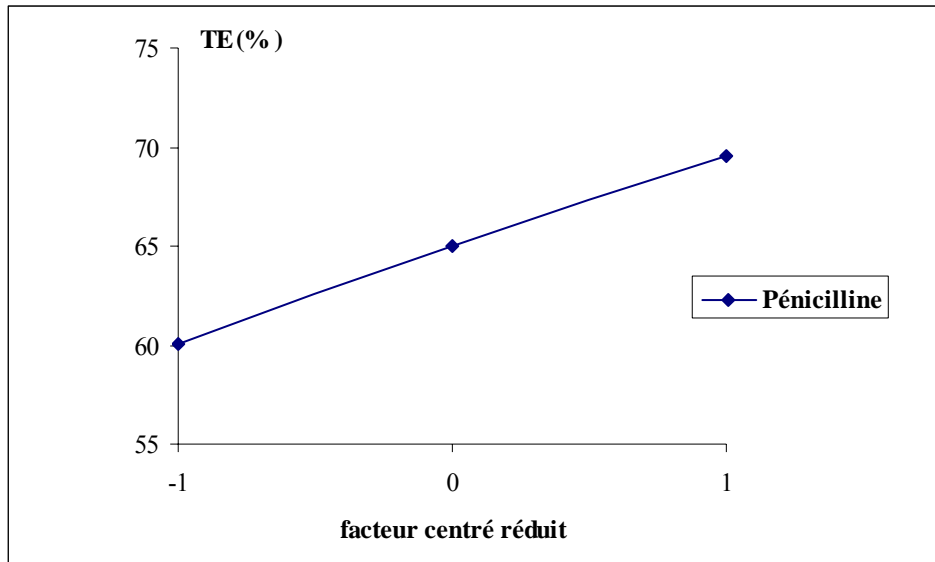


Figure (IV.17) : Courbe d'influence de la Pénicilline sur le taux d'encapsulation

2. Sur le diamètre des particules :

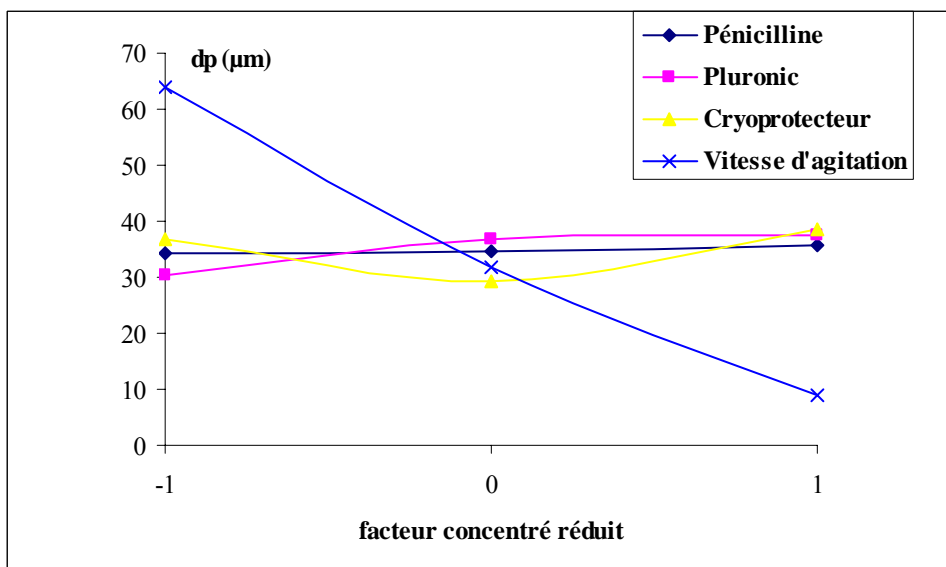


Figure (IV.18) : Courbe d'influence sur le diamètre des particules.

Le diamètre des nanoparticules est un paramètre qui traduit les dimensions géométriques des ces dernières.

Au vu des courbes d'effets, figure (IV.18), nous remarquons que la vitesse d'agitation semble avoir une influence très importante sur cette réponse, elle est inversement proportionnelle au diamètre des particules, les particules de faible diamètre sont obtenues avec les grandes vitesses d'agitation.

Ceci est du certainement aux forts taux de cisaillement qui engendrent des faibles diamètres. Quant aux trois autres facteurs, à savoir, la Pénicilline, le poloxamer et le cryoprotecteur, leur influence semble ne pas trop affecter cette réponse, au vu des écarts relativement faible enregistrés.

Conclusion :

Il ressort de cette étude d'effet sur les facteurs de formulation et du procédé les point importants suivants :

1. Pour le taux d'encapsulation, la Pénicilline est le facteur le plus important, susceptible de le faire augmenter de façon dominante. Les autres facteurs ont un effet négligeable. De plus, il n'existe pas d'interaction double entre les facteurs pouvant modifier cette réponse.
2. Pour le diamètre des nanoparticules, l'effet de la vitesse d'agitation est le plus dominant ; Cette influence induit des variations très importantes sur le diamètres des nanoparticules.

VI. Détermination et validation de l'optimum :

Les critères de choix d'un optimum d'un système colloïdal à l'échelle de nano, et présentant le meilleur taux d'encapsulation du principe actif sont :

- Diamètre des particules minimal;
- Taux d'encapsulation maximal ;
- Potentiel Zêta maximal.

Des présentations schématiques des réponses en fonction des facteurs, sous forme de courbe isoréponse, en surface, obtenues à partir des modèles (figures IV.19, IV.20, IV.21, IV.22, IV.23 et IV.24) permettent de localiser l'optimum.

Le domaine associé aux valeurs optimales de réponse est obtenu à partir du plus faible intervalle de variation du facteur. Par exemple, en ce qui concerne le domaine optimal de la Pénicilline, l'intervalle le plus faible est donné par la figure (IV.19), comparativement aux autres, figure (IV.20) et figure (IV.21).

En annexe 3, on trouvera les courbes isoréponses en surface des autres facteurs.

Ainsi, on peut déduire les domaines associés aux valeurs optimales de réponse qui sont regroupés dans le tableau (IV.9) :

Tableau (IV.9) : Domaines associés aux valeurs optimales de réponse

FACTEURS	DOMAINE OPTIMAL	
	Diamètres des nanoparticules	Taux de d'encapsulation
Pénicilline	(750 - 894.44) mg	(1177.8 - 1200) mg
Pluronic	(1229.03 - 1358.06) mg	(1309.7 - 1454.84) mg
Cryoprotecteur	(8.8 - 10) %	(3.5 - 7) %
Vitesse d'agitation	(1462.5 - 1500) trs/mn	(1262.5 - 1500) trs/mn

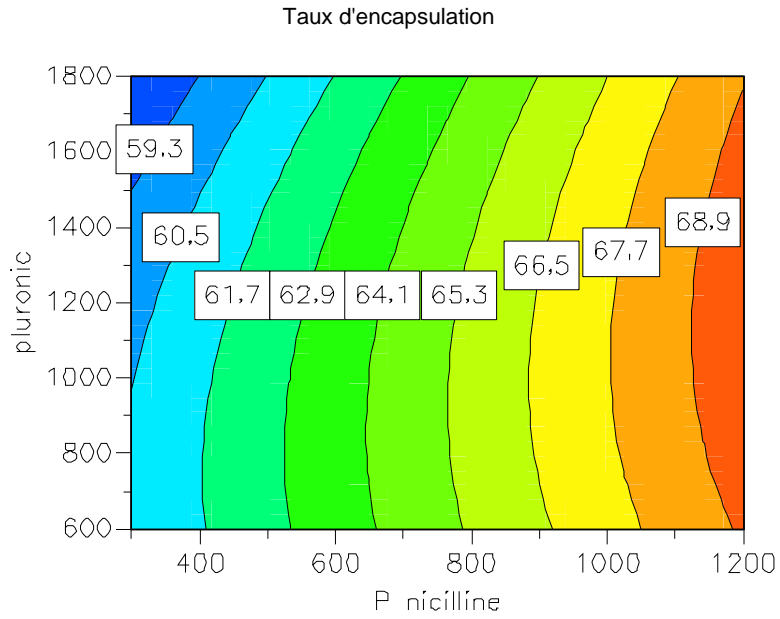


Figure (IV.19) : Courbe iso réponses en surface du taux d'encapsulation en fonction de la Pénicilline et le pluronic.

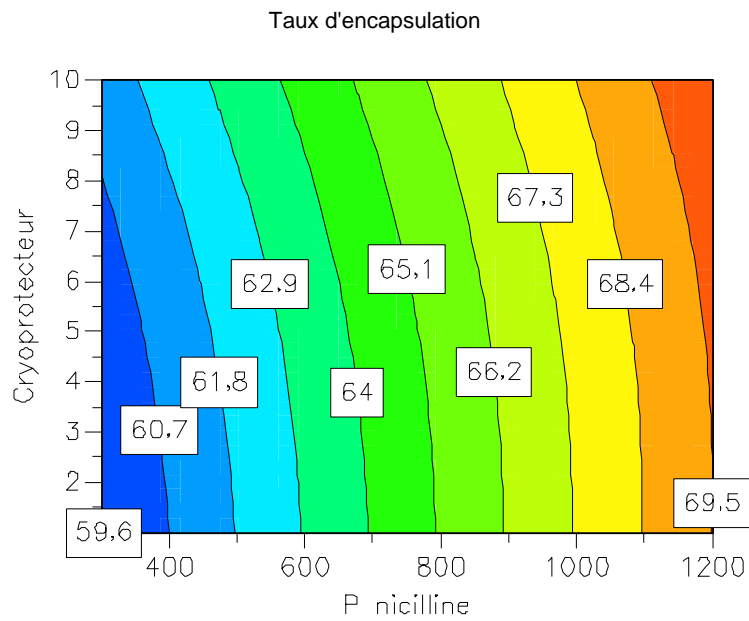


Figure (IV.20) : Courbe iso réponses en surface du taux d'encapsulation en fonction de la Pénicilline et du cryoprotecteur.

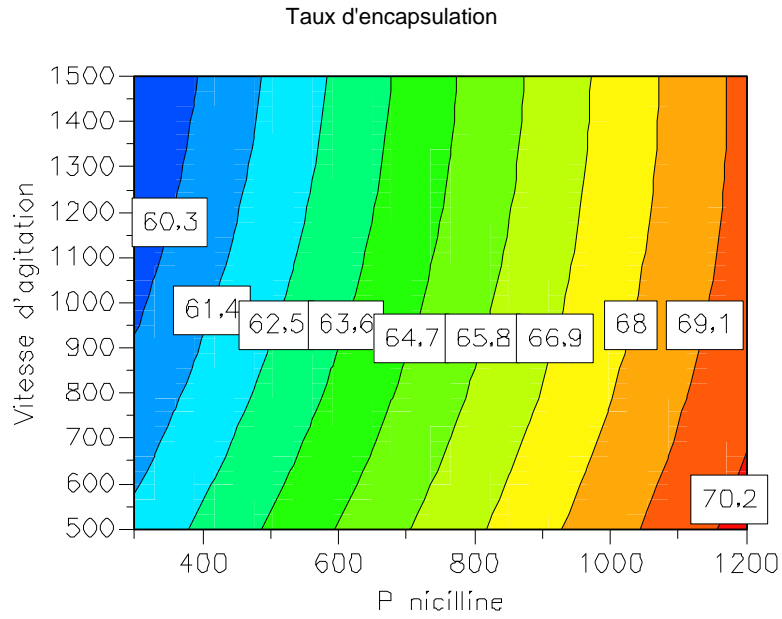


Figure (IV.21) : Courbe iso réponses en surface du taux d'encapsulation en fonction de la Pénicilline et de la vitesse d'agitation.

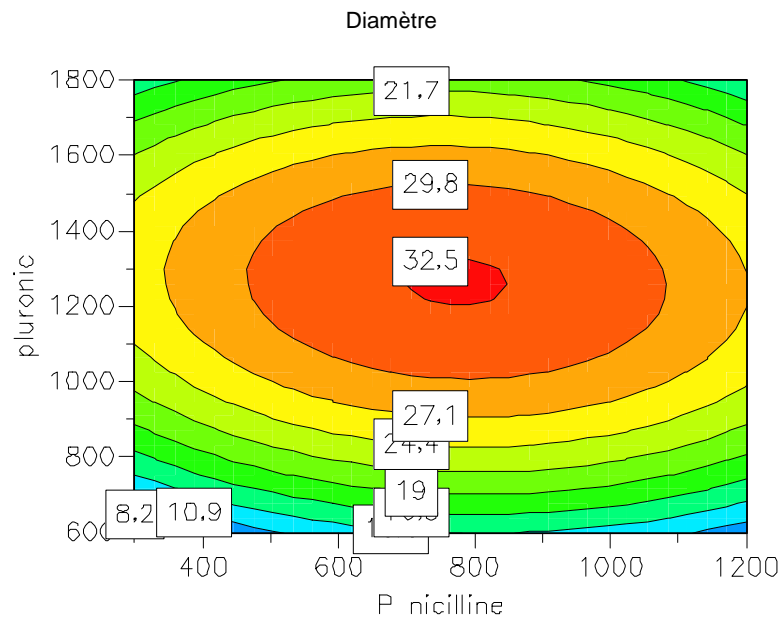


Figure (IV.22) : Courbe iso réponses en surface du diamètre en fonction de la Pénicilline et le pluronic.

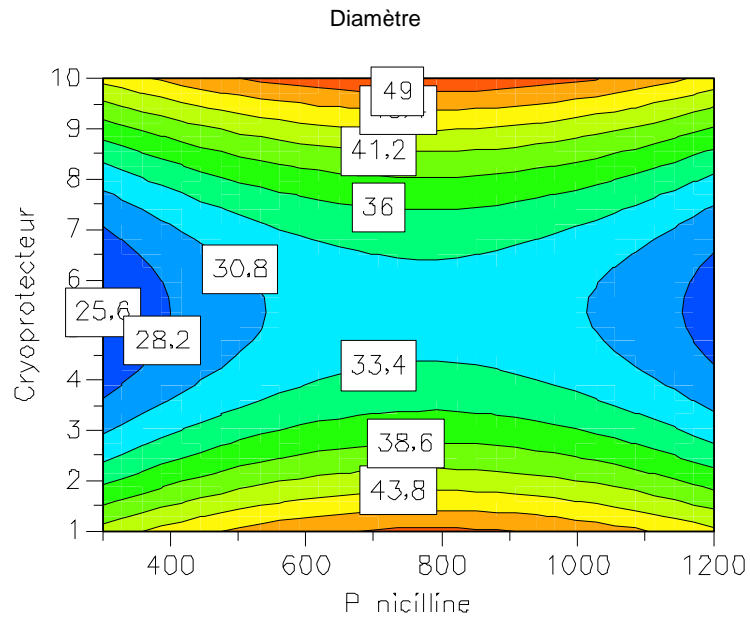


Figure (IV.23) : Courbe iso réponses en surface du diamètre en fonction de la Pénicilline et du cryoprotecteur.

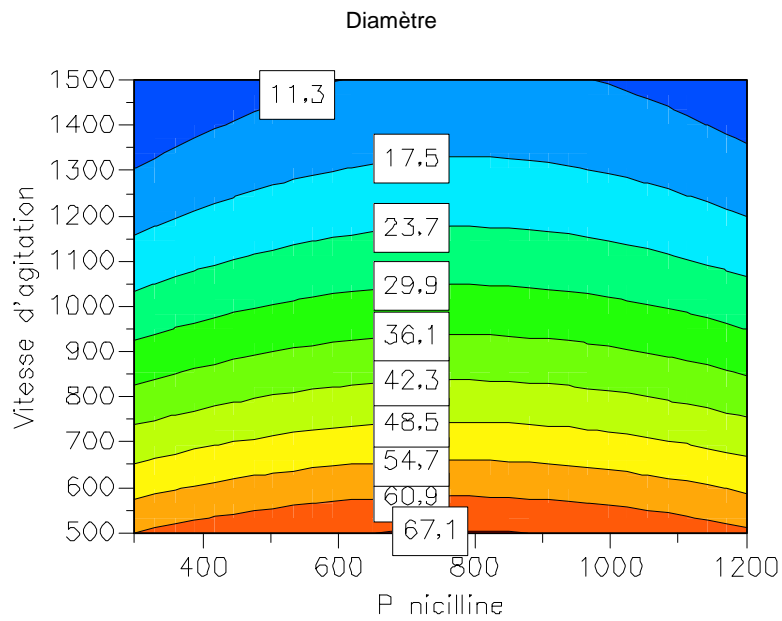


Figure (IV.24) : Courbe iso réponses en surface du diamètre en fonction de la Pénicilline et de la vitesse d'agitation.

Le logiciel Modde 6, propose un optimum proche de celui déterminé graphiquement et de plus cette solution est très proche de l'essai du niveau supérieur du plan CCF.

L'analyse du taux d'encapsulation est représentée par les chromatogrammes de la formule optimale (échantillon) et de l'étalon, donnés en annexe 4.

Le résultat de l'analyse granulométrique est également donné en annexe 4.

La formule optimale donnée par le logiciel ainsi que les résultats d'analyse de cet essai sont reportés dans le tableau (IV.10) :

Tableau (IV.10) : Formule et résultats de l'analyse de l'optimum

<i>Pénicilline (mg)</i>	<i>Pluronic (mg)</i>	<i>Cryoprotecteur (%)</i>	<i>Vitesse d'agitation (trs/mn)</i>	<i>TE (%)</i>	<i>Dp (µm)</i>
1189.34	1799.99	9.3104	1500	60.4	37.98

Si l'on fait une comparaison par rapport aux différentes formules réalisées, on constate que cet essai apparaît comme la formulation la plus concluante par rapport aux autres essais car il présente les propriétés de réponses les plus importantes et qui sont conformes aux critères que nous avons élaborés.

VI.1. Caractérisation rhéologique de l'optimum

La connaissance du comportement rhéologique des émulsions est très important, car ce paramètre peut exercer une influence déterminante au niveau de :

- la technologie (incorporation de substances médicamenteuses ou auxiliaires);
- l'utilisation (stabilité) ;
- l'activité thérapeutique (la biodisponibilité des principes actifs peut être influencé par la viscosité).

De ce fait, nous avons réalisé les tests viscoélastiques aux conditions de l'optimum.

- Tests viscoélastiques :

On fait subir à la formule optimale des tests oscillatoires, en faisant varier la déformation γ de 1 à 100%, avec une vitesse angulaire constante ($\omega = 10 \text{ s}^{-1}$), le nombre de point de mesure est de 30.

La figure (IV.25) montre l'évolution du module de conservation (G') et celui de perte en fonction de la déformation (G'').

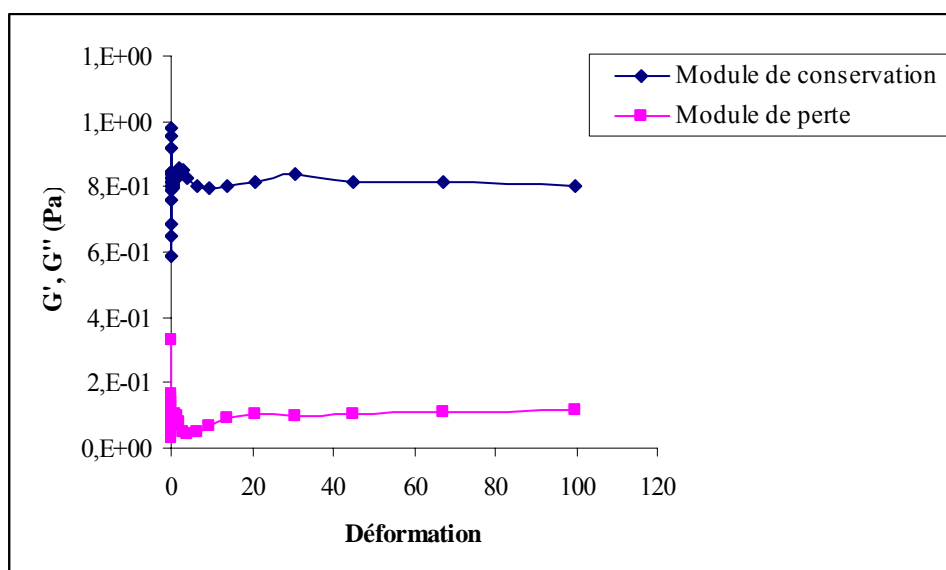


Figure (IV.25) : Courbe de viscoélasticité de l'optimum

La courbe de viscoélasticité de la formule optimale figure (IV.25) montre que G'' est supérieur à G' , ce qui est synonyme du comportement d'un solide viscoélastique. Dans ce cas, le comportement élastique domine sur le comportement visqueux.

La structure montre une certaine rigidité (structure d'un gel) et, donc une certaine forme de stabilité.

On peut donc conclure que la formule optimale a un comportement rhéologique identique à celui du système binaire Eudragit – PEG et elle est stable.

Conclusion

Dans cette partie de l'étude, l'utilisation des plans d'expériences a permis d'évaluer avec précision l'influence des différents facteurs de formulation et du procédé de fabrication sur le processus de formulation, et de réduire ainsi le nombre d'essais à réaliser.

La technique physico-chimique qui est basée sur l'évaporation et l'extraction de solvant est proposée dans ce travail comme option intéressante pour la préparation de nanoparticules biodégradables. Cette technique offre de nombreux avantages comparativement à d'autres méthodes disponibles.

Chapitre V : Etude de la cinétique de diffusion

Introduction

Les formes galéniques à libération contrôlée constituent une nouvelle conception du médicament de plus en plus utilisée. Grâce à ces formes galéniques, l'organisme est imprégné de façon plus durable et régulière par la substance médicamenteuse. La posologie est ainsi plus facile pour une protection thérapeutique meilleure.

De ce fait, cette partie de travail est consacrée à l'étude bio pharmaceutique par la détermination de la cinétique de libération du principe actif (la Pénicilline) à partir d'un système colloïdal à savoir des nanoparticules à base d'un mélange miscible de polymères (étude in vitro).

Dans le but d'obtenir un profil de libération de ce principe actif à partir de sa matrice polymérique et afin de caractériser la loi qui régit la diffusion de ce dernier, une forme galénique a été élaborée et étudiée. La substance active est incorporée dans une matrice de polymère biocompatible à partir de laquelle elle peut se libérer au contact des milieux de dissolution.

1. Modélisation

L'application de la loi de Fick au phénomène diffusionnel qui régit, dans la grande majorité des cas, la libération des médicaments, nous a permis de quantifier le coefficient de diffusion.

La diffusion des polymères est un phénomène compliqué car elle peut être influencée par beaucoup de facteurs. En conséquence, ces hypothèses sont considérées :

- La diffusion est Fickienne ;
- Le coefficient de diffusion est constant pendant l'expérience ;
- Aucune étape cinétique ne se produit dans le transfert de matière (par exemple évaporation à la surface ou réaction chimique).

L'équation de Fick s'écrit sous forme de :

$$\frac{\partial C}{\partial t} = \text{div}(D \text{grad} C) \quad (\text{V.1})$$

Si D est constant donc :

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \left[\frac{\partial^2 C}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 C}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 C}{\partial z^2} \right] \quad (\text{V.2})$$

Soit r la distance du centre de la sphère au point de coordonnées (x, y, z), nous allons établir l'équation de Fick lorsque la concentration est exprimé en fonction de x et de t.

$$\text{On a : } r^2 = x^2 + y^2 + z^2 \quad (\text{V.3})$$

Dérivons l'équation (IV.3) successivement par rapport à x, y, et z.

$$\frac{\partial r}{\partial x} = \frac{x}{r} \quad ; \quad \frac{\partial r}{\partial y} = \frac{y}{r} \quad ; \quad \frac{\partial r}{\partial z} = \frac{z}{r} \quad (\text{V.4})$$

$$\text{Comme : } \frac{\partial C}{\partial x} = \frac{\partial C}{\partial r} \frac{\partial r}{\partial x} \quad (\text{V.5})$$

On peut écrire donc :

$$\frac{\partial C}{\partial x} = \frac{\partial C}{\partial r} \frac{x}{r} \quad (\text{V.6})$$

Dérivons une seconde fois l'équation (IV.6) :

$$\frac{\partial^2 C}{\partial x^2} = \frac{\partial}{\partial x} \left[\frac{\partial C}{\partial r} \frac{x}{r} \right] = \left[\frac{\partial}{\partial x} \left(\frac{\partial C}{\partial r} \right) \frac{x}{r} \right] + \left[\frac{\partial C}{\partial r} \frac{\partial}{\partial x} \left(\frac{x}{r} \right) \right] \quad (\text{V.7})$$

En exploitant les équations (IV.4), on déduit que :

$$\frac{\partial}{\partial x} \left(\frac{\partial C}{\partial r} \right) \frac{x}{r} = \frac{\partial}{\partial r} \left(\frac{\partial C}{\partial r} \right) \frac{x^2}{r^2} = \frac{\partial^2 C}{\partial r^2} \frac{x^2}{r^2} \quad (\text{V.8})$$

De la même manière :

$$\frac{\partial}{\partial x} \left(\frac{x}{r} \right) = \frac{\frac{\partial x}{\partial x} r - x \frac{\partial r}{\partial x}}{r^2} = \frac{r - x \frac{x}{r}}{r^2} = \frac{1}{r} - \frac{x^2}{r^3} \quad (\text{V.9})$$

Par conséquent :

$$\frac{\partial C}{\partial r} \frac{\partial}{\partial x} \left(\frac{x}{r} \right) = \frac{\partial C}{\partial r} \left[\frac{1}{r} - \frac{x^2}{r^3} \right] \quad (\text{V.10})$$

En remplaçant les expressions (V.9) et (V.10) dans l'équation (V.7) nous obtenons :

$$\frac{\partial^2 C}{\partial x^2} = \frac{\partial^2 C}{\partial r^2} \frac{x^2}{r^2} + \frac{\partial C}{\partial r} \left[\frac{1}{r} - \frac{x^2}{r^3} \right] \quad (\text{V.11})$$

Et par analogie, nous obtenons :

$$\frac{\partial^2 C}{\partial y^2} = \frac{\partial^2 C}{\partial r^2} \frac{y^2}{r^2} + \frac{\partial C}{\partial r} \left[\frac{1}{r} - \frac{y^2}{r^3} \right] \quad (\text{V.12})$$

$$\frac{\partial^2 C}{\partial z^2} = \frac{\partial^2 C}{\partial r^2} \frac{z^2}{r^2} + \frac{\partial C}{\partial r} \left[\frac{1}{r} - \frac{z^2}{r^3} \right] \quad (\text{V.13})$$

Par conséquent, l'équation (IV.2) devient :

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \left[\left\{ \frac{\partial^2 C}{\partial r^2} \frac{x^2}{r^2} + \frac{\partial C}{\partial r} \left[\frac{1}{r} - \frac{x^2}{r^3} \right] \right\} + \left\{ \frac{\partial^2 C}{\partial r^2} \frac{y^2}{r^2} + \dots + \frac{\partial C}{\partial r} \left[\frac{1}{r} - \frac{y^2}{r^3} \right] \right\} + \left\{ \frac{\partial^2 C}{\partial r^2} \frac{z^2}{r^2} + \frac{\partial C}{\partial r} \left[\frac{1}{r} - \frac{z^2}{r^3} \right] \right\} \right] \quad (\text{V.14})$$

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \left\{ \frac{\partial^2 C}{\partial r^2} \frac{1}{r} (x^2 + y^2 + z^2) + \frac{\partial C}{\partial r} \left[\frac{3}{r} - \frac{1}{r^3} (x^2 + y^2 + z^2) \right] \right\} \quad (\text{V.15})$$

D'où, nous en déduisons :

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \left[\frac{\partial^2 C}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial C}{\partial r} \right] \quad (\text{V.16})$$

Pour résoudre cette équation, il convient d'effectuer le changement de variable :

$$u = C \cdot r$$

Les conditions initiales et aux limites sont :

$$t = 0 \quad C(r) = C_0$$

$$t > 0 \quad C = C_{\text{éq}} \text{ pour } r = R$$

Avec le changement de variable, nous aurons :

$$r = 0 \quad u = 0$$

$$r = R \quad u = C_{\text{éq}} R$$

Avec ce nouveau changement de variable, l'équation (V.16) s'écrira sous une autre forme :

$$\frac{\partial u}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C}{\partial r^2} \quad (\text{V.17})$$

La résolution de l'équation (V.17) est aisée si la fonction de concentration s'annule pour les valeurs extrêmes de r . dans ce but, posons :

$$u = C_{eq}r + v(r,t)$$

Nous aurons donc :

$$t > 0 \quad \left\{ \begin{array}{l} r = 0 \\ r = R \end{array} \right\} \quad \begin{array}{l} u = 0 \\ u = C_{eq}R \end{array} \quad \text{d'où} \quad \begin{array}{l} v = 0 \\ v = 0 \end{array} \quad (V.18)$$

Avec ce nouveau changement de variable, l'équation (V.17) peut s'écrire sous la forme :

$$\frac{\partial u}{\partial t} = \frac{\partial v}{\partial t} \quad \text{et} \quad \frac{\partial u}{\partial r} = C_{eq} + \frac{\partial v}{\partial r}$$

Donc :

$$\frac{\partial^2 u}{\partial r^2} = \frac{\partial^2 v}{\partial r^2}$$

Nous aurons donc :

$$\frac{\partial u}{\partial t} = D \frac{\partial^2 u}{\partial r^2} = \frac{\partial v}{\partial t} = D \frac{\partial^2 v}{\partial r^2}$$

D'où :

$$\frac{\partial v}{\partial t} = D \frac{\partial^2 v}{\partial r^2} \quad (V.19)$$

Nous résolvons cette équation par la méthode de séparation de variables.

La solution générale de l'équation (V.19) est :

$$v(r,t) = \sum_{n=0}^{\infty} (A_n \sin \lambda_n r + B_n \cos \lambda_n r) \exp(-\lambda_n^2 Dt) \quad (V.20)$$

- La première condition aux limites

$$\begin{aligned} r = 0, \quad v = 0 \\ 0 = \sum_{n=0}^{\infty} B_n \exp(-\lambda_n^2 Dt) \end{aligned}$$

D'où : $B_n = 0$

- La deuxième condition

$$r = R, \quad v = 0$$

$$0 = \sum_{n=0}^{\infty} A_n \sin \lambda_n \operatorname{Re} xp(-\lambda_n^2 Dt)$$

$$\text{D'où : } \sin \lambda_n R = 0 \Rightarrow \lambda_n R = n\pi \Rightarrow \lambda_n = \frac{n\pi}{R}$$

La solution générale devient :

$$v(r, t) = \sum_{n=1}^{\infty} A_n \sin\left(\frac{n\pi r}{R}\right) \exp\left(-\frac{n^2 \pi^2}{R^2} Dt\right) \quad (\text{V.21})$$

Exprimons maintenant les conditions initiales :

$$t = 0 \quad C = C_0 \quad u = rC_0$$

d'où :

$$v = u - C_{\acute{e}q} \cdot r \quad \text{donc } v = r(C_0 - C_{\acute{e}q})$$

En remplaçant dans l'équation (IV.21), nous aurons :

$$r(C_0 - C_{\acute{e}q}) = A_1 \sin\left(\frac{\pi r}{R}\right) + A_2 \sin\left(\frac{2\pi r}{R}\right) + \dots + A_n \sin\left(\frac{n\pi r}{R}\right) \quad (\text{V.22})$$

Multiplions les deux membres par $\sin\left(\frac{n\pi r}{R}\right) dr$ et intégrons de 0 à R.

$$\int_0^R r(C_0 - C_{\acute{e}q}) \sin\left(\frac{n\pi r}{R}\right) dr = A_1 \int_0^R \sin\left(\frac{\pi r}{R}\right) \sin\left(\frac{n\pi r}{R}\right) dr + \dots + A_n \int_0^R \sin^2\left(\frac{n\pi r}{R}\right) dr \quad (\text{V.23})$$

D'où :

$$(C_0 - C_{\acute{e}q}) \int_0^R r \sin\left(\frac{n\pi r}{R}\right) dr = A_n \frac{R}{2} \quad (\text{V.24})$$

L'intégrale de $\int_0^R r \sin\left(\frac{n\pi r}{R}\right) dr$ par partie donne :

$$\int_0^R r \sin\left(\frac{n\pi r}{R}\right) dr = \frac{rR}{n\pi} \cos n\pi - \frac{R^2}{(n\pi)^2} \sin n\pi \quad (\text{V.25})$$

d'où :

$$(C_0 - C_{\acute{e}q}) \int_0^R r \sin\left(\frac{n\pi r}{R}\right) dr = -(C_0 - C_{\acute{e}q}) \frac{R}{n\pi} (-1)^n = A_n \frac{R}{2} \quad (\text{V.26})$$

D'où :

$$A_n = -2(C_0 - C_{\acute{e}q}) \frac{R}{n\pi} (-1)^n$$

L'équation (V.21), devient en remplaçant A_n par sa valeur :

$$v(r, t) = \sum_{n=1}^{\infty} -2(C_0 - C_{\acute{e}q}) \frac{R}{n\pi} (-1)^n \sin\left(\frac{n\pi r}{R}\right) \exp\left(\frac{-n^2 \pi^2 Dt}{R^2}\right)$$

$$v(r, t) = -\frac{2R}{\pi} (C_0 - C_{\acute{e}q}) \sum_{n=1}^{\infty} \frac{(-1)^n}{n} \sin\left(\frac{n\pi r}{R}\right) \exp\left(\frac{-n^2 \pi^2 Dt}{R^2}\right) \quad (\text{V.27})$$

En faisant apparaître la concentration initiale :

$$v = r(C - C_0) + r(C_0 - C_{\acute{e}q})$$

D'où en remplaçant dans l'équation (IV.27), nous aurons :

$$r(C - C_0) + r(C_0 - C_{\acute{e}q}) = -\frac{2R}{\pi} (C_0 - C_{\acute{e}q}) \sum_{n=1}^{\infty} \frac{(-1)^n}{n} \sin\left(\frac{n\pi r}{R}\right) \exp\left(\frac{-n^2 \pi^2 Dt}{R^2}\right)$$

$$\frac{C - C_{\acute{e}q}}{C_0 - C_{\acute{e}q}} = \frac{-2R}{\pi r} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{(-1)^n}{n} \sin\left(\frac{n\pi r}{R}\right) \exp\left(\frac{-n^2 \pi^2 Dt}{R^2}\right) \quad (\text{V.28})$$

La quantité de principe actif qui s'est libérée de la sphère au temps t par unité de surface est égale à :

$$q_t = \int_0^t -D \left(\frac{\partial C}{\partial r} \right)_{r=R} dt$$

Dérivons l'équation (V.28), nous obtenons :

$$\frac{1}{C_0 - C_{\acute{e}q}} \frac{\partial C}{\partial r} = \frac{2R}{\pi r^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{(-1)^n}{n} \sin\left(\frac{n\pi r}{R}\right) \exp\left(\frac{-n^2 \pi^2 Dt}{R^2}\right) + \dots + \frac{2R}{\pi r} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{(-1)^n}{n} \left(\frac{-n\pi}{R}\right) \cos\left(\frac{n\pi r}{R}\right) \exp\left(\frac{-n^2 \pi^2 Dt}{R^2}\right)$$

(V.29)

Pour $r=R$, le premier terme du membre de droite s'annule car $\sin n\pi = 0$ de plus $\cos n\pi = (-1)^n$

On en déduit la valeur de q_t :

$$\frac{1}{(C_0 - C_{\acute{e}q})} \left(\frac{\partial C}{\partial r} \right)_{r=R} = \frac{2}{R} \sum_{n=1}^{\infty} \exp\left(-\frac{n^2 \pi^2 D t}{R^2} \right)$$

$$q_t = \int_0^t -D \left(\frac{\partial C}{\partial r} \right)_{r=R} dt = \int_0^t -D \frac{2(C_0 - C_{\acute{e}q})}{R} \sum_{n=1}^{\infty} \exp\left(-\frac{n^2 \pi^2 D t}{R^2} \right) dt$$

$$q_t = \frac{2(C_0 - C_{\acute{e}q})}{\pi^2} R \sum_{n=1}^{\infty} \left(\frac{1}{n^2} - \frac{1}{n^2} \exp\left(-\frac{n^2 \pi^2 D t}{R^2} \right) \right) \quad (\text{V.30})$$

Or :

$$\sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n^2} = \frac{\pi^2}{6}$$

Nous aurons donc :

$$q_t = \frac{2(C_0 - C_{\acute{e}q})}{\pi^2} R \left[\frac{\pi^2}{6} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n^2} \exp\left(-\frac{n^2 \pi^2 D t}{R^2} \right) \right] \quad (\text{V.31})$$

L'équation (V.31) donne la quantité de principe actif qui s'est libérée par unité de surface, pour la surface d'une sphère, elle doit être multipliée par $4\pi R^2$.

Donc :

$$Q(t) = 4\pi R^2 q_t$$

Après un temps infiniment long, $t \rightarrow \infty$ d'après l'équation (V.31), nous aurons :

$$q_{\infty} = \frac{2(C_0 - C_{\acute{e}q})}{\pi^2} \frac{\pi^2}{6} R \quad (\text{V.32})$$

$$q_{\infty} = \frac{1}{3} (C_0 - C_{\acute{e}q}) R \quad (\text{V.33})$$

Et donc la quantité qui s'est évaporée après un temps infini est égale à :

$$Q_{\infty} = \frac{3}{4} \pi R^3 (C_0 - C_{\acute{e}q}) \quad (\text{V.34})$$

Par conséquent, nous pouvons exprimer le rapport de la quantité de principe actif qui a diffusé sur la quantité de principe actif disponible initialement dans la sphère :

$$\frac{Q_t}{Q_{\infty}} = \frac{3}{R} \frac{q_t}{(C_0 - C_{\acute{e}q})} \quad (\text{V.35})$$

D'où :

$$\frac{Q_t}{Q_\infty} = \frac{6}{\pi^2} \left[\frac{\pi^2}{6} - \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n^2} \exp\left(\frac{-n^2 \pi^2 D t}{R^2}\right) \right] = 1 - \frac{6}{\pi^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n^2} \exp\left(\frac{n^2 \pi^2 D t}{R^2}\right) \quad (\text{V.36})$$

La quantité de principe actif qui reste dans la sphère est exprimée sous forme de concentration réduite $C^*(t)$ telle que :

C^* = (la quantité de principe actif restant dans la nanoparticule / la quantité de principe actif qui a diffusé après un temps infiniment long).

$$C^* = \frac{C - C_{\acute{e}q}}{C_0 - C_{\acute{e}q}}$$

$$C^*(t) = 1 - \frac{Q_t}{Q_\infty} = \frac{6}{\pi^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n^2} \exp\left(\frac{-n^2 \pi^2 D t}{R^2}\right) \quad (\text{V.37})$$

Lorsque la particule n'est pas sphérique, nous corrigeons cette équation en faisant introduire un coefficient de sphéricité.

$$C^* = \frac{6}{\pi^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n^2} \exp\left(-\frac{4n^2 \pi^2 D t}{\psi^2 d_p^2}\right) \quad (\text{V.38})$$

Généralement pour les temps longs, $n > 1$, tous les autres termes deviennent négligeables devant le premier et nous aurons :

$$C^* = \frac{6}{\pi^2} \exp\left(\frac{-4\pi^2 D}{\psi^2 d_p^2} t\right) \quad (\text{V.39})$$

2. Test de dissolution in vitro

Le processus de dissolution du principe actif à partir de dispositif médicament- polymère contrôlé par diffusion est étudié dans le cas des tests in vitro. Ainsi, la cinétique de libération est suivie en continu. La libération du principe actif s'effectue dans un milieu tampon de pH 7.4 à $37^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ et à une vitesse d'agitation modérée. Le dosage s'effectue sur des prélèvements à des temps d'intervalles successifs par Chromatographie Liquide à Haute performance.

L'application de la loi de Fick au phénomène diffusionnel qui régit, dans la grande majorité des cas, la libération des médicaments, nous a permis de quantifier le coefficient de diffusion.

La quantité de produit actif libérée (la Pénicilline nanoencapsulée) Q_t en fonction du temps à partir de sa matrice polymérique est représentée par la figure (V.1).

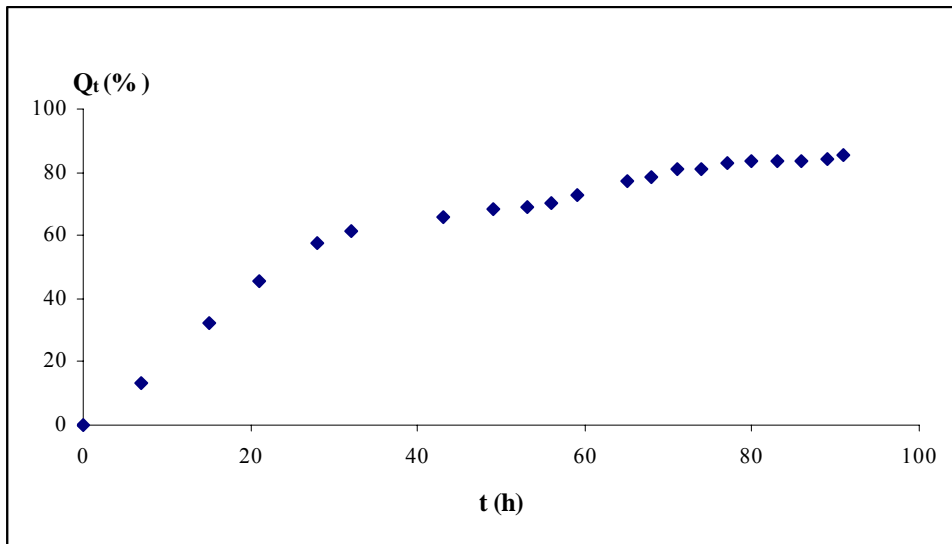


Figure (V.1) : Cinétique de libération de la Pénicilline à partir de sa matrice polymérique

La résolution de la seconde loi de Fick appliquée à une diffusion à partir d'une sphère est donnée par l'équation (V.37) et représentée par la figure (V.2). On remarque qu'au bout de 90 h, la quantité de principe actif libérée est supérieure à 80 %.

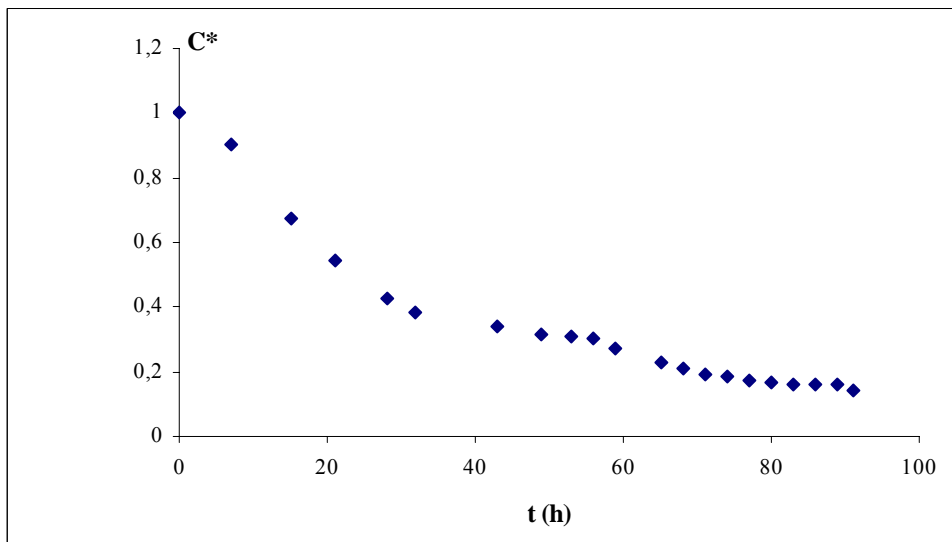


Figure (V.2) : diffusion de la Pénicilline à partir de sa matrice polymérique

Le coefficient de diffusion D est déterminé par régression linéaire en ayant supposé la particule sphérique ($\psi=1$) ; cette hypothèse est justifiée par le fait que dans la production des nanoparticules, celles-ci sont en général de forme proche de la sphéricité [32, 45, 46, 47] comme en témoigne la photographie représenté par la figure (V.3) correspondant à l'encapsulation du Piroxicam [48].

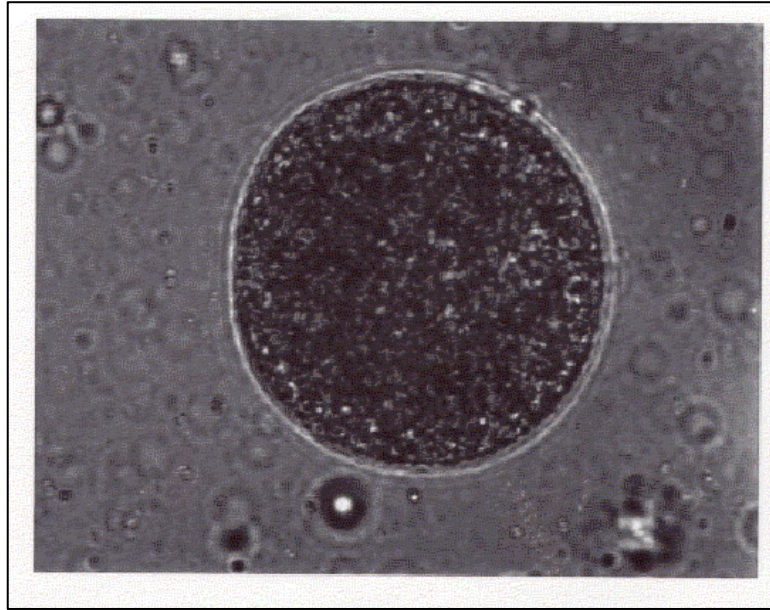


Figure (V.3) : Analyse par microscope optique des nanosphères chargées en Piroxicam.

L'application de la seconde loi de Fick montre une relation linéaire entre le logarithme népérien de la quantité du principe actif libéré et le temps de diffusion, figure (V.4).

La valeur du coefficient de diffusion trouvé est égale à $5.24 \cdot 10^{-13} \text{ cm}^2/\text{s}$.

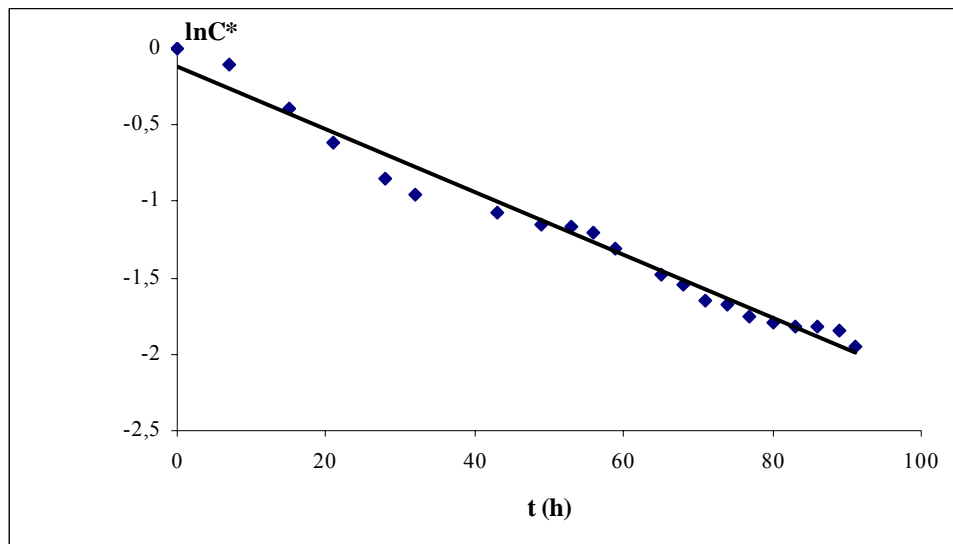


Figure (V.4) : Détermination du coefficient de diffusion

Conclusion :

Dans le cadre d'administration du principe actif, le «procédé de dissolution» peut être décrit comme le phénomène de disponibilité du principe actif à partir de la forme pharmaceutique après son administration.

Cependant, la libération contrôlée de la Pénicilline à partir de sa matrice polymérique a pour base le principe de la dissolution. Cette dernière a donné un taux de dissolution précis, lui conférant ainsi un profil de dissolution caractéristique.

Dans ce cas, l'application de la loi de Fick nous a permis de quantifier le coefficient de diffusion et de contrôler la dissolution du médicament formulé par la détermination de son profil de dissolution.

Ceci, permettra aux travaux à venir la réalisation de l'étude in vivo de la cinétique de la libération de ce médicament, en la rendant prévisible grâce à une disponibilité contrôlée, le contrôler de sa concentration dans le sang et le prolongement de son action pharmacologique dans le temps après une seule administration.

Conclusion générale

La formulation transforme un principe actif en médicament qui doit être fabricable de manière reproductible et industrielle et qui tout en étant administrable, doit présenter des propriétés de biodisponibilité et de stabilité. Une des voies de mise en forme des principes actifs est constituée par l'encapsulation (micro et nanoencapsulation). L'encapsulation a pour objectifs la mise en forme d'un principe actif sous forme de particules de taille variable, la protection éventuelle de ce principe actif et le contrôle de la libération ultérieure.

La technologie du transport des médicaments repose sur la nanotechnologie. Les transporteurs sont en effet des structures synthétiques nanométriques à base de polymères appelées vecteurs. Les vecteurs peuvent atteindre leur cible de façon passive, grâce à leur forme ou à leur dimension qui les conduit à se loger dans un tissu déterminé, ou de façon active lorsqu'on leur adjoint une molécule capable de reconnaître une cellule spécifique. Certains transporteurs sont suffisamment spécialisés pour pouvoir pénétrer à l'intérieur de la cellule et atteindre un compartiment particulier.

Le travail de ce mémoire a été structuré en trois étapes, dont la première a été consacrée à l'étude de la miscibilité d'un mélange de deux polymères qui sont lipophile et hydrophile. L'utilisation de deux techniques d'analyses à savoir : l'analyse thermique et l'Infrarouge, nous a permis de mettre en évidence la miscibilité du mélange de polymères étudié. Une analyse rhéologique de ce mélange est réalisée pour vérifier sa stabilité.

Dans la deuxième partie, nous avons utilisé la méthodologie des plans d'expérience afin d'optimiser une technique d'encapsulation d'une substance active, la Pénicilline, dans un mélange de polymères en utilisant un procédé physico-chimique qui est basé sur l'évaporation et l'extraction de solvant.

Cette technique offre certains avantages sur les autres méthodes disponibles, tels que:

- L'usage des solvants pharmaceutiques acceptables ;
- Une exécution facile ;
- Une bonne reproductibilité ;
- La possibilité de transposition d'échelle.

L'application des plans d'expériences nous a permis non seulement l'optimisation de la technique d'encapsulation, mais aussi la compréhension des mécanismes de formation spontanée des nano particules.

Dans la troisième partie de ce travail, une contribution à la modélisation de la cinétique de diffusion de vecteur de médicament formulé a été réalisée.

Dans ce cas, l'application de la loi de Fick nous a permis de quantifier le coefficient de diffusion et de contrôler la dissolution du médicament formulé par la détermination de son profil de dissolution.

Ceci, permettra aux travaux à venir la réalisation de l'étude in vivo de la cinétique de la libération de ce médicament, en la rendant prévisible grâce à une disponibilité contrôlée, le

contrôler de sa concentration dans le sang et le prolongement de son action pharmacologique dans le temps après une seule administration.

Références bibliographiques

- | | |
|------|---|
| [1] | <i>Patrick Couvreur. «Les nanoparticules de polyalkylcyanoacrylate : du vecteur à tropisme hépatique au vecteur « Furtifs » ». J. Pharm. Belg., 2000, 55, 3, 78-84.</i> |
| [2] | P. Buri, F. Puisieux, E. Doelker, JP. Benoit « Formes pharmaceutiques nouvelles : Aspects Technologiques, Biopharmaceutiques et médical », 1985, éditions Techniques et Documentations. |
| [3] | M.Seiller, MC. Martini «Formes pharmaceutiques pour application locale », 1996, éditions Techniques et Documentations. |
| [4] | J. Delattre, P. Couvreur, F. Puisieux, J.-R. Philippot, F. Schuber «Les liposomes : Aspect technologiques, Biologiques et Pharmacologiques ». Editions Médicales Internationales. |
| [5] | M.T. Peracchia. «Stealth nanoparticules for intravenous administration». S.T.P. PHARMA SCIENCES 13 (3) 155-161 2003. |
| [6] | R. Cavalli, C. Bocca, A. Miglietta, O. Caputo, M.R. Gasco. «Albumin adsorption on stealth and non stealth solid lipid nanoparticles». S.T.P. PHARMA SCIENCES 9 (2) 183-189 1999. |
| [7] | R.W. Korsweyer, N.A. Peppas «Control Delivery Systems». Edition Marcel Dekker, New York 1982. |
| [8] | Lisa Brannon-Peppas. «Polymers in controlled Drug Delivery». Medical Plastics and Biomaterials Magazine. Originally published Novembre 1997. |
| [9] | N.A. Peppas, R. Gurny. «Relation entre la structure des polymères et la libération contrôlée de principes actifs». Pharm.Acta. Helv. 58, Nr.1 (1983). |
| [10] | J. Crank. «The Mathematics of Diffusion». 2nd edition, Oxford University Press, New York, 1975. |
| [11] | C. Aftabrouhad, E. Doelker. «Méthodes de preparation des microparticules biodégradables chargées en principes actifs hydrosolubles». S.T.P. PHARMA SCIENCES 2 (5) 365-380 1992. |
| [12] | P. Wehrlé, K. Westesen, T.L. Whateley, N. Yerushalmi. «Microencapsulation : Methods and Industrial Applications». Edited by Simon Benita. |
| [13] | I. Montasser, S. Briançon, J. Lieto, H. Fessi. «Méthodes d'obtention et mécanismes de formation de nanoparticules polymériques», J. PHARM. BELG., 2000, 55, 6, PP 155-167. |
| [14] | H. Fessi, F. Puisieu, J.PH. Devissaguet, N. Ammoury, S. Benita. «Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement». International Journal of pharmaceutics, 55 (1989) R-R4. |
| [15] | B. Alban, J.P. Canselier, N. Le Sauze, M. Poux, C. Xuereb. «Les procédés d'émulsification : présentation et comparaison de différents systèmes». S.T.P. Pharma Pratiques 13 (1) 16-21 2003. |
| [16] | N.V. Majeti, Ravi Kumar. «Nano and Microparticles as Controlled Drug Delivery Devices». J. Pharmaceut Sci 3 (2): 234-258, 2000. |
| [17] | L. Peltonen, P. Koistinen, J. Hirvonen. «Preparation of nanoparticles by the nanoprecipitation of low molecular weight poly(l)lactide». S.T.P. PHARMA SCIENCE 13 (5) 299-304 2003. |
| [18] | R. Jalil J.R. Nixon. «Microencapsulation using poly(l-lactic acid) : Microcapsule properties affected by the preparative technique». J. Microencapsulation, 6, 473-484, 1989. |
| [19] | N. Wakiyama, K. Juni, M. Nakano. «Preparation and evaluation in vitro of polylactic acid microspheres containing local anaesthetics». Chem. Pharm. Bull., |

- 29, 3363-3368, 1981.
- [20] R. bodmeier, J.W. McGinity. «Polylactic acid microspheres containing quinidine base and sulphate by the solvent evaporation technique: Some process parameters influencing the preparation and proprieties of microspheres». *J.Microencapsulation*, 4, 289-297, 1987.
- [21] G. Spenlehauer, M. Vert, J.P. Benoit, F. Chabot, M. Veillard. «Biodegradable cisplatin microspheres prepared by the solvent evaporation method: morphology and release characteristics». *J. Contr. Rel.*, 7, 217-229, 1988.
- [22] P. Wehrle, B. Magenheim, S. Benita. «The influence of process parameters on the PLA nanoparticle size distribution, evaluated by means of factorial design». *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 41 (1) 19-26 (1995).
- [23] G.E. Hardee, G.W.R. Davidson, H. Chen, R. Bodmeier. Microencapsulation of antimicrobial agents for extended release after injection. *Proceed. Int. Symp. Cont. Rel. Bioact. Mater*, 18, 203-204, 1991.
- [24] Y. Ogawa, M. Yamamoto, H. Okada, T. yashika, T. Shimamoto. «A new technique to efficiently entrapleupreulide acetate into microcapsules of polylactic acid or copoly(lactic/glycolic)acid». *Chem. Pharm. Bull.*, 36, 1095-1103, 1988.
- [25] D. Mathieu, R. Phan-Tan-Luu, M. Sergent. «Methodologie de la recherche experimentale» édition LPRAI. 1998.
- [26] P. Schimmerling, JP. Sisson, A. Zaidi. «Pratique des plans d'expériences», 1998, éditions Techniques et Documentations.
- [27] JP. Benzecri et al ., «l'analyse des données». 1979. Editions Dunod, Paris.
- [28] Wg. Cochran, GM.Cox. .Expérimental designs, 1957, Wiley and Sons Ed., 2° ed., N.Y.
- [29] Y. Cohen, D. Pradeau «l'analyse pratique du médicament», 1992, éditions Médicales Internationales.
- [30] E. Dubois, G. Lambert. «Nouvelles formes médicamenteuses, émulsion parentéral». Édition Lavoisier, 2000. pp 237-255.
- [31] A. Doren, J. Lemaire. «Determination of the Zêta Potential of Macroscopic Specimens using Micro- electrophoresis». *Journal of colloid and Interface science* Vol 130, N°1 June 1989. pp 146,156.
- [32] W. Jiang, S.P. Schwendeman. «Stabilization and controlled release of bovine serum albumin encapsuled in poly(D,L-lactide) and poly(ethylene glycol) microsphere blends». *Pharmaceutical Research*, Vol 18, No. 6, 2001.
- [33] G. Couarraze, J.L. Grossiord «Initiation à la rhéologie». Editions Techniques et Documentations.1983.
- [34] A. Lahir, «Pharmacie Galénique: Bonnes pratiques de fabrication des médicaments», 1997, Masson.
- [35] Edition électronique de la pharmacopée Européenne 2002. 4ème edition version 4.05.
- [36] Clarke's isolation and identification of drugs and in Pharmaceuticals, body fluids, and post – mortem material. Second Edition.
- [37] The Merck index, 1989, eleventh edition. Centennial Edition.
- [38] A. Wade, PJ. Weller, «Handbook of Pharmaceutical Excipients», 1994, The Pharmaceutical Press.
- [39] United State Pharmacopoeia. 25eme édition 2002.
- [40] GALENICA 5: les systèmes dispersés, 1983, éditions Technique et documentation.
- [41] MARTINDALE «The extra Pharmacopoeia», 1982, The Pharmaceutical Press.
- [42] T. Jaccard, J. Leyder. «Une nouvelle forme galénique: le lyoc». *Ann. Pharmaceutiques françaises*. 1985,43, n°2, pp123-131.

[43]	C. Chavany, T. Le Boan, P. Couvreur, F. Puisieux, C. Hélène. « Polyalkylcyanoacrylate Nanoparticles Polymeric Carriers for Antisense Oligonucléotides ». <i>Pharmaceutical Research</i> . Vol 9, N°4, 1992, pp 441-449.
[44]	M. Tenenhaus. « La régression PLS : Théorie et pratique ». Edition Technip, 1998.
[45]	M. Tobio, R. Gref, A. Sanchez, R. Langer, M. J. Alonso. «Stealth PLA-PEG Nanoparticles as protein carriers for nasal administration ». <i>Pharmaceutical Research</i> . Vol 15, N°2, 1998. pp 270-275.
[46]	T. Painbeni, M.C. Veneir-Julienne, J.P. Benoit. «Internal morphology of poly (D,L-lactide-co-glycolide) BCNU-loaded microspheres. Influence on drug stability». <i>European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics</i> 45, 1998. pp 31-39.
[47]	Y. Kawashima, H. Yamamoto, H. Takeuchi, T. Hino, T. Niwa. «Properties of a peptide containing DL-lactide/glycolide copolymer nanospheres prepared by novel emulsion solvent diffusion methods». <i>European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics</i> 45, 1998. pp 41-48.
[48]	L. Lamoudi. «Formulation d'un système dispersé à base de nanoparticules». Mémoire d'ingénieur USTHB. Faculté de Génie mécanique et génie des procédés. Génie chimique (2001-2002).

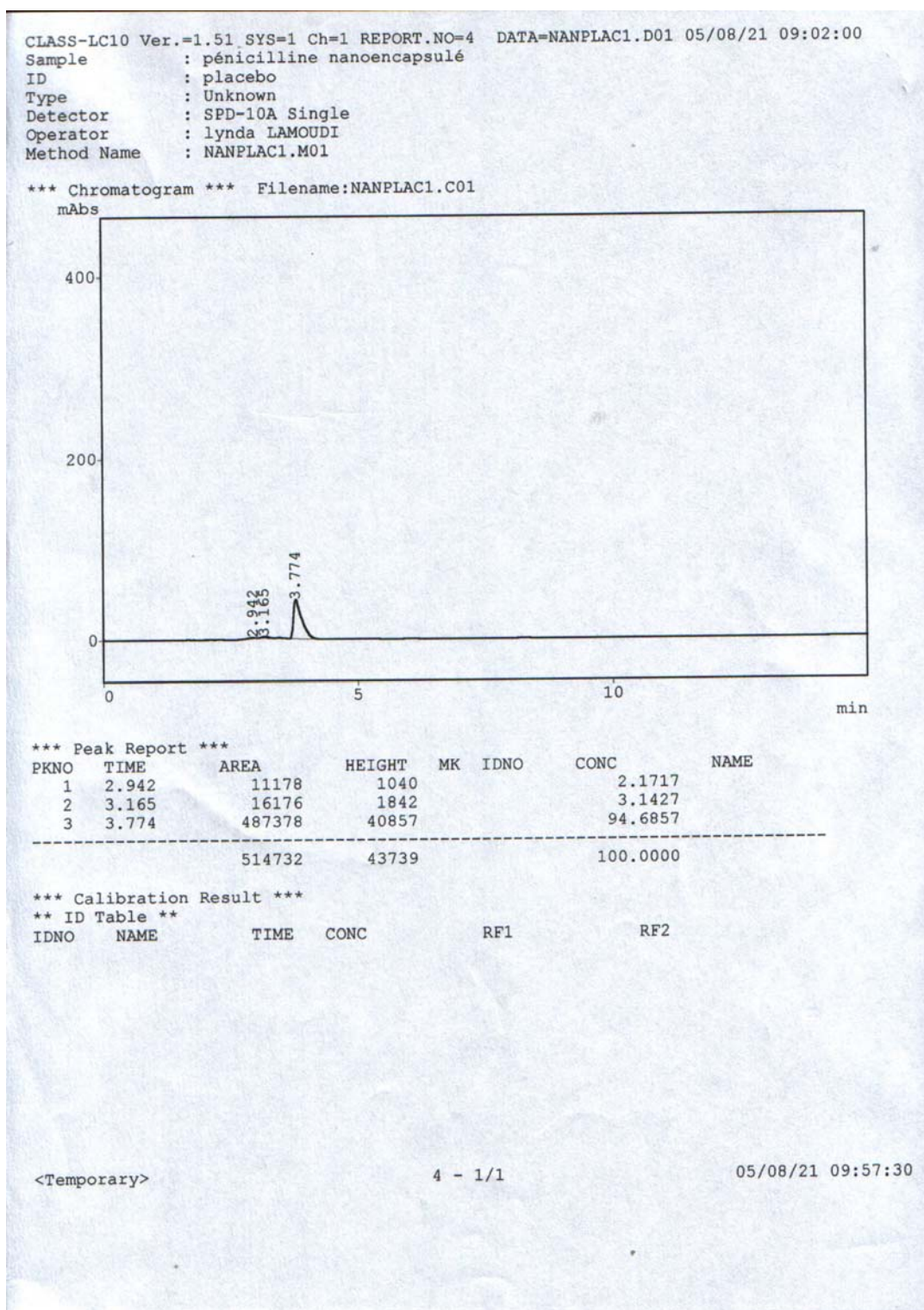
Annexe 1 : Méthode d'analyse par HPLC des nanoparticules chargées en Pénicilline

Conditions chromatographiques :

- Phase mobile : un mélange de 20 volumes d'Acétonitrile R et 80 volumes d'une solution tampon phosphate 0.05M, pH 6. Filtrer et dégazer.
- Colonne : phase stationnaire : gel de silice octadécylsilylé (C18) pour chromatographie R (5 µm). — dimensions : l = 0,250 m, Ø = 4,0 mm, —
- Débit : 2 ml/min.
- Détection : spectrophotomètre à une longueur d'onde de 225 nm.
- Injection : autoinjecteur à boucle de 20 µl.
- Préparation des solutions :
 - Solution standard : pénicilline G potassique : prendre une prise d'essai de 80 mg dans 100 ml de phase mobile
 - Solution échantillon : prendre une prise d'essai égale à environ 120 mg de nano particules dans 100 ml de phase mobile.
- Procédure :

Injecter séparément des volumes égaux de 20 µl de chaque solution standard et échantillon dans le chromatographe, puis enregistrer et mesurer les réponses des chromatogrammes obtenus.

Annexe 2 : Chromatogramme de l'étude de la spécificité



Annexe 3: Matériau viscoélastique linéaire soumis à des contraintes et des déformations sinusoïdales

En dehors des expériences de fluage et de relaxation, il existe, en viscoélasticité linéaire, un autre type d'expérience qui présente un intérêt fondamental et qui consiste à étudier le matériau de façon dynamique, en lui imposant une contrainte (déformation) qui varie sinusoïdalement au cours du temps avec la fréquence f . La linéarité des équations entraîne que la déformation (contrainte) est également sinusoïdale et de même fréquence.

On pose :

$$\tau(t) = \tau_0 \cos[\omega t + \delta]$$

(A3.1)

$$\gamma(t) = \gamma_0 \cos \omega t$$

(A3.2)

Avec :

τ_0, γ_0 , amplitude maximale de la contrainte, de la déformation ;

$\omega = 2\pi f$, pulsation ;

δ , déphasage de la contrainte par rapport à la déformation

Pour faciliter les calculs, on emploie le formalisme des nombres complexes, utilisables dès lors qu'on a affaire à des phénomènes sinusoïdaux linéaires ; on fait correspondre aux grandeurs réelles $\tau(t)$ et $\gamma(t)$ les grandeurs complexes :

$$\bar{\tau}(t) = \tau_0 e^{i[\omega t + \delta]}$$

(A3.3)

$$\bar{\gamma}(t) = \gamma_0 e^{i\omega t}$$

(A3.4)

Les équations différentielles linéaires de la viscoélasticité se transforment en équations algébriques complexes qui peuvent s'écrire sous la forme :

$$\bar{\tau}(t) = \bar{G}(\omega) \bar{\gamma}(t)$$

(A3.5)

$$\bar{\gamma}(t) = \bar{J}(\omega) \bar{\tau}(t)$$

(A3.6)

$\bar{G}(\omega)$ et $\bar{J}(\omega)$ sont des grandeurs complexes, fonctions algébriques de la pulsation ω , mais indépendantes du temps, appelées respectivement module de rigidité complexe (complex modulus) et complaisance complexe (complex compliance). Leurs expressions dépendent évidemment des propriétés du matériau, c'est-à-dire des valeurs des paramètres du modèle représentatif choisi (Maxwell ou Kelvin-Voigt).

La connaissance d'une seule de ces fonctions est suffisante pour caractériser complètement le matériau ; suivant en cela un usage bien établi, la fonction que nous retenons est le module de rigidité complexe, il peut se décomposer en parties réelle et imaginaire :

$$\bar{G}(\omega) = G'(\omega) + iG''(\omega)$$

(A3.7)

$G'(\omega)$ est appelé module de conservation (storage modulus), $G''(\omega)$, module de perte (loss modulus).

En utilisant les équations rhéologiques suivantes :

- **Equation rhéologique d'un solide élastique parfait :**

L'équation rhéologique d'un solide élastique parfait (loi de Hooke) s'écrit :

$$\gamma(t) = J\tau(t)$$

(A3.8)

Où J est un coefficient constant, dépendant de la nature du solide, appelé complaisance élastique et exprimé en Pa⁻¹.

- **Equation rhéologique d'un liquide visqueux newtonien :**

L'équation rhéologique d'un liquide visqueux newtonien est l'équation de newton :

$$\gamma = \frac{\tau}{\eta}$$

(A3.9)

γ : Vitesse de cisaillement

η : Viscosité absolue

τ : La pente de la droite représentant l'équation de newton

$$\frac{d\gamma(t)}{dt} = \frac{\tau(t)}{\eta}$$

(A3.10)

- **Equation rhéologique d'un liquide de Maxwell :**

L'équation rhéologique d'un liquide de Maxwell est:

$$\frac{d\gamma}{dt} = J \frac{d\tau}{dt} + \frac{1}{\eta} \tau$$

(A3.11)

Utilisant les équations rhéologiques (A3.8), (A3.10), (A3.11), il vient immédiatement :

- **Solide élastique parfait :**

$$\bar{G}(\omega) = \frac{\bar{\tau}(t)}{\gamma(t)} = \frac{1}{J} = G$$

Si bien que :

$$G'(\omega) = G$$

$$G''(\omega) = 0$$

(A3.12)

▪ **Liquide visqueux newtonien :**

$$\bar{G}(\omega) = \frac{\bar{\tau}(t)}{\gamma(t)} = \eta \frac{\bar{\dot{\gamma}}(t)}{\gamma(t)} = i\omega\eta$$

Si bien que :

$$G'(\omega) = 0$$

$$G''(\omega) = \eta\omega$$

(A3.13)

▪ **Liquide de Maxwell :**

$$\bar{G}(\omega) = \frac{\bar{\tau}(t)}{\gamma(t)} = \frac{i\omega}{\frac{1}{\eta} + i\frac{\omega}{G}} = \frac{i\omega\eta}{1 + i\omega\frac{\eta}{G}}$$

Soit encore, en introduisant le temps de relaxation $\theta = \frac{\eta}{G}$ du liquide de Maxwell :

$$\bar{G}(\omega) = \frac{\omega^2\eta\theta + i\omega\eta}{1 + \omega^2\theta^2}$$

Si bien que :

$$G'(\omega) = G \frac{\omega^2\theta^2}{1 + \omega^2\theta^2}$$

$$G''(\omega) = G \frac{\omega\theta}{1 + \omega^2\theta^2}$$

(A3.14)

Annexe 4 : Courbes isoréponses en surface

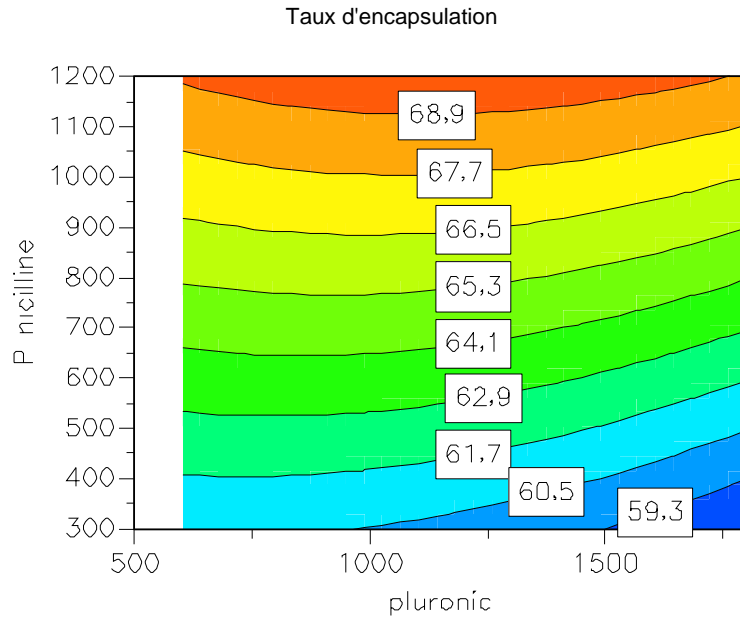


Figure (A4.1) : Courbe iso réponses en surface du taux d'encapsulation en fonction de la Pénicilline et du pluronic.

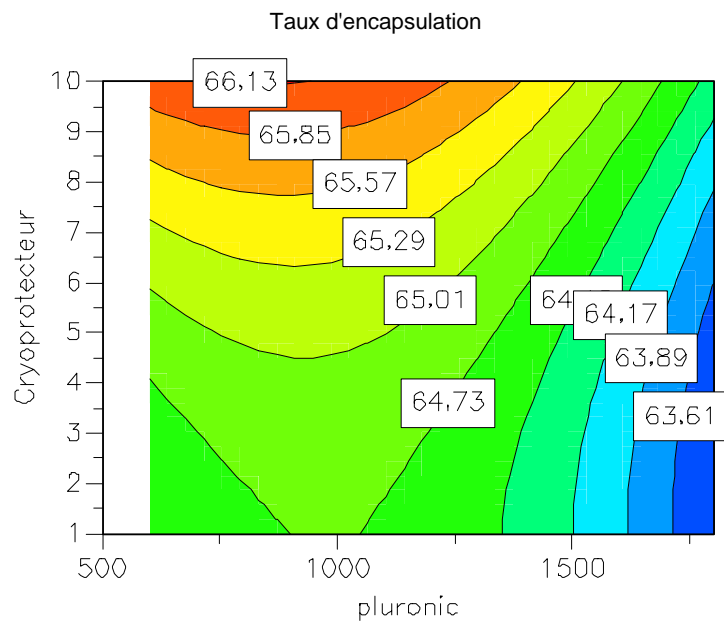


Figure (A4.2) : Courbe iso réponses en surface du taux d'encapsulation en fonction du pluronic et du cryoprotecteur.

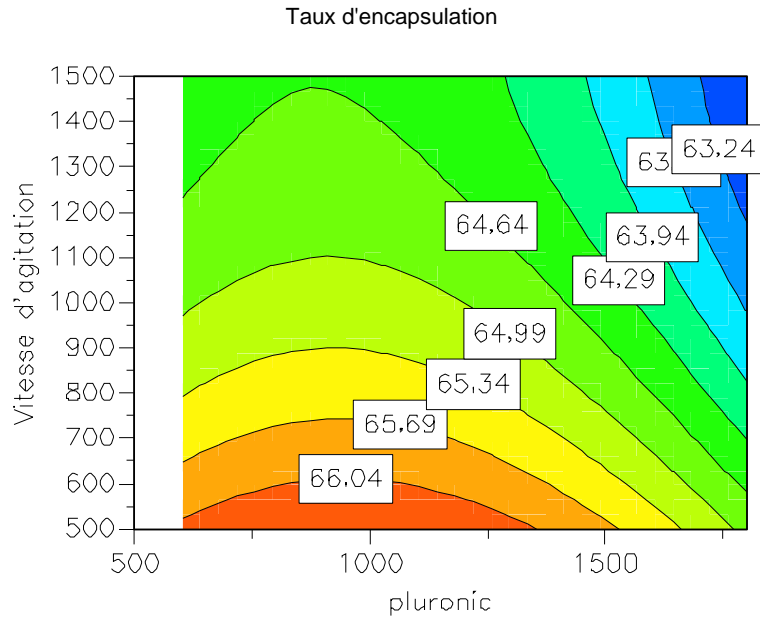


Figure (A4.3) : Courbe iso réponses en surface du taux d'encapsulation en fonction du pluronic et de la vitesse d'agitation.

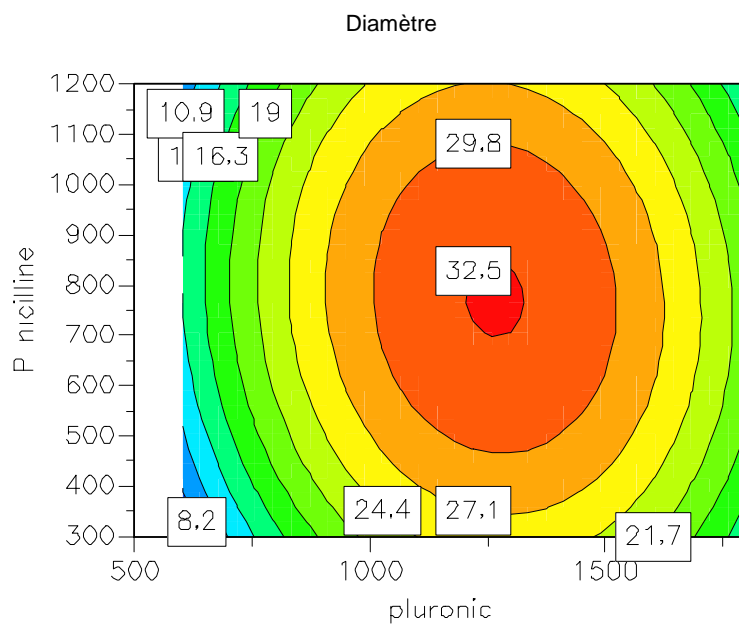


Figure (A4.4) : Courbe iso réponses en surface du diamètre en fonction du pluronic et de la Pénicilline.

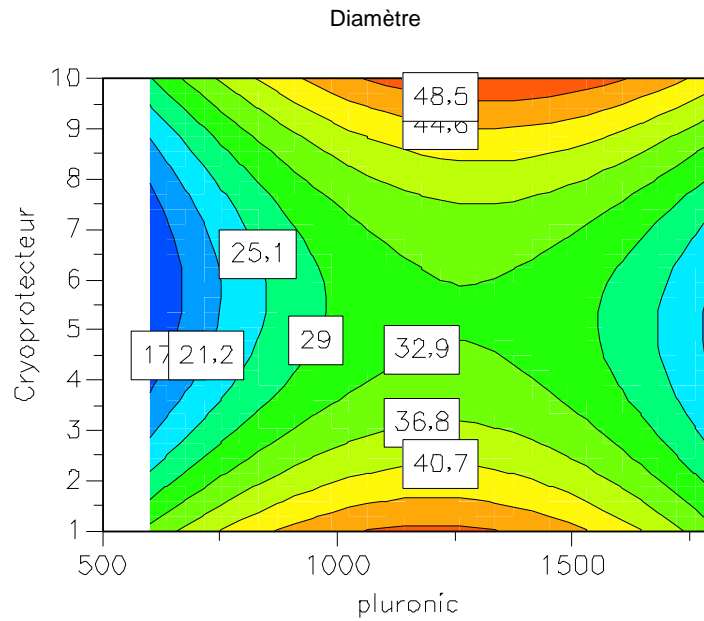


Figure (A4.5) : Courbe iso réponses en surface du diamètre en fonction du pluronic et du cryoprotecteur.

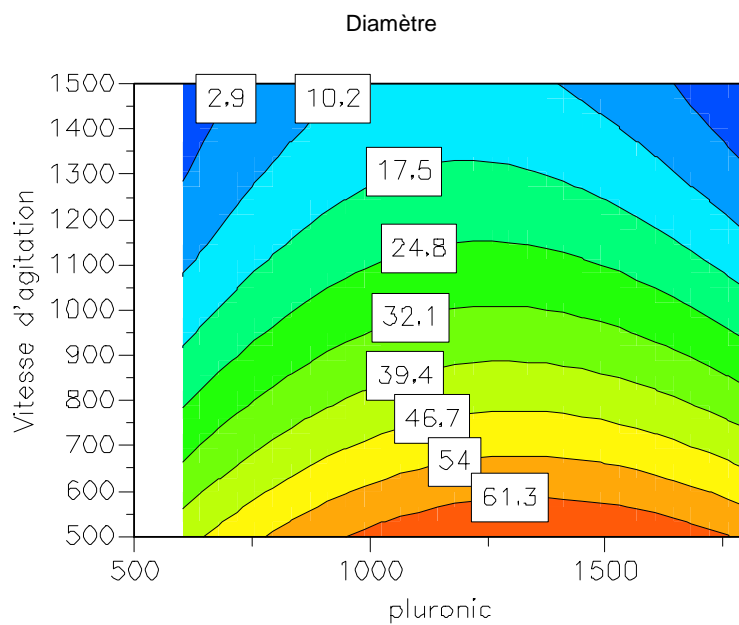


Figure (A4.6) : Courbe iso réponses en surface du diamètre en fonction du pluronic et de la vitesse d'agitation.

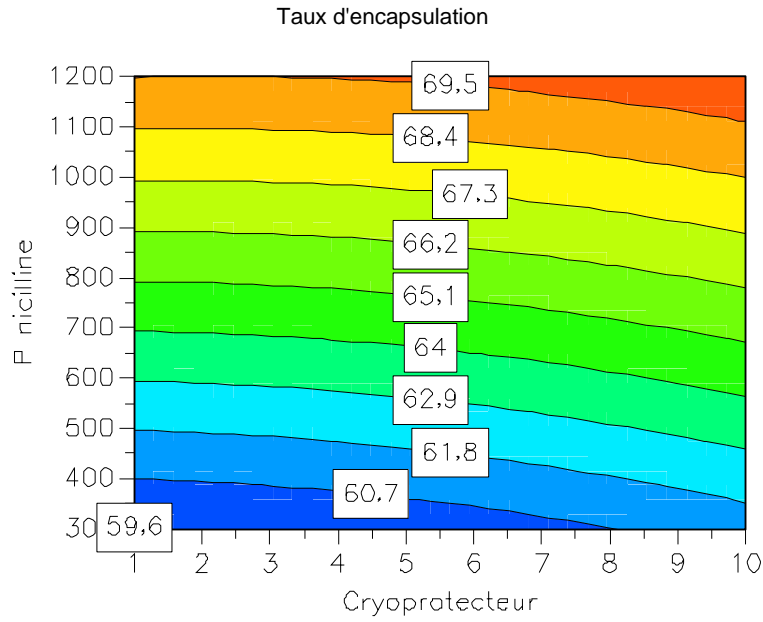


Figure (A4.7) : Courbe iso réponses en surface du taux d'encapsulation en fonction du cryoprotecteur et de la Pénicilline.

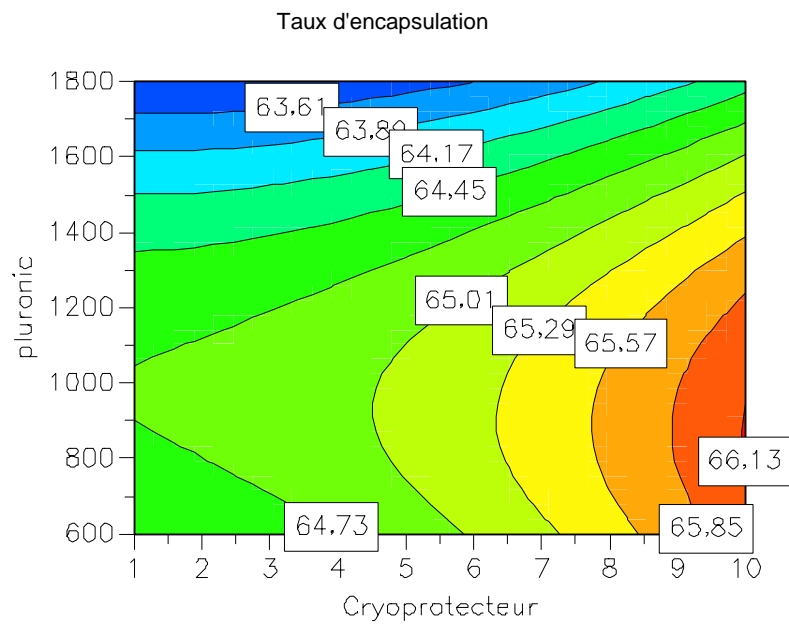


Figure (A4.8) : Courbe iso réponses en surface du taux d'encapsulation en fonction du cryoprotecteur et du pluronic.

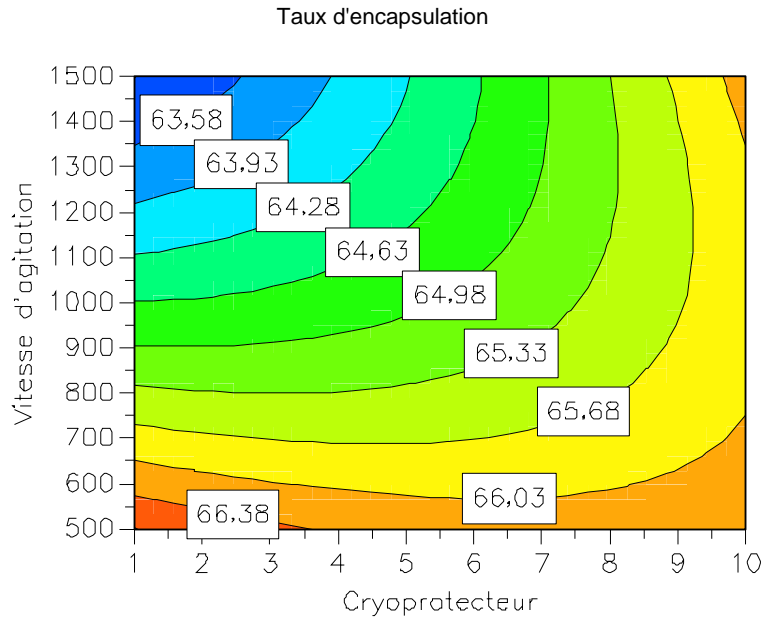


Figure (A4.9) : Courbe iso réponses en surface du taux d'encapsulation en fonction du cryoprotecteur et de la vitesse d'agitation.

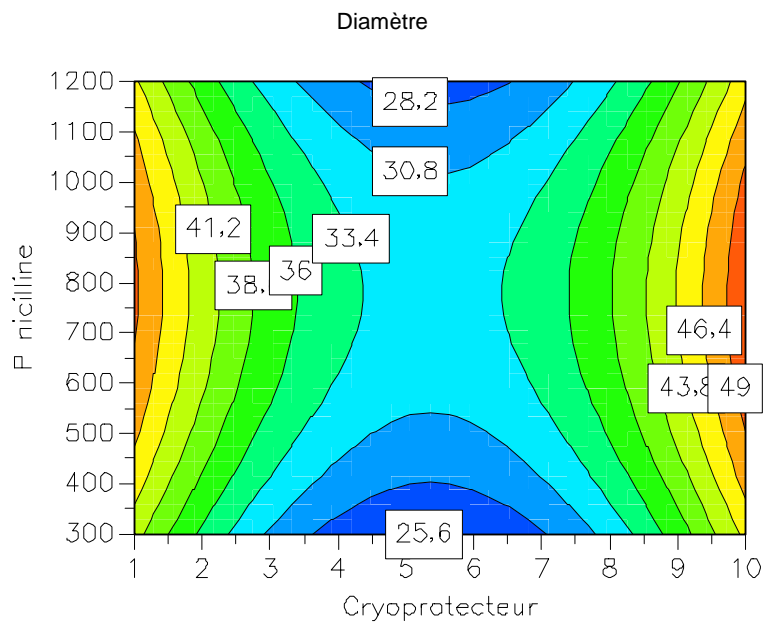


Figure (A4.10) : Courbe iso réponses en surface du diamètre en fonction du cryoprotecteur et de la Pénicilline.

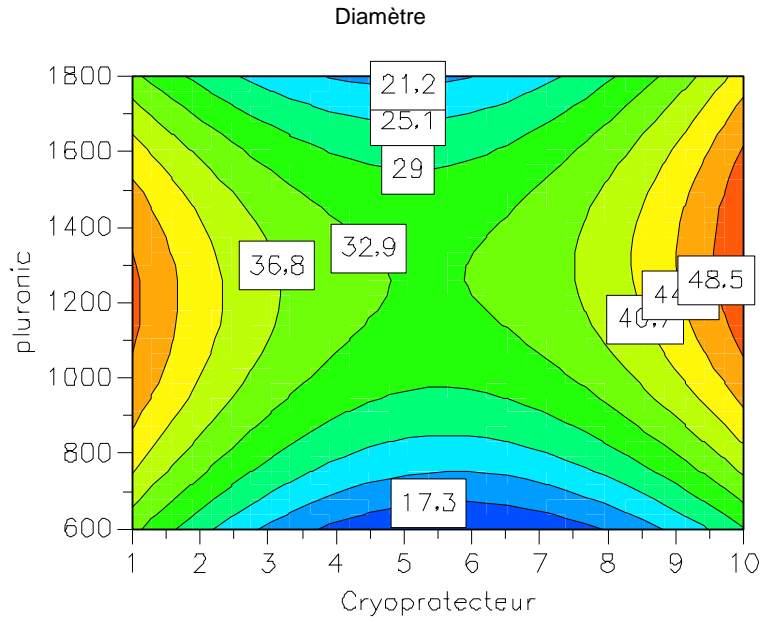


Figure (A4.11) : Courbe iso réponses en surface du diamètre en fonction du cryoprotecteur et du pluronic.

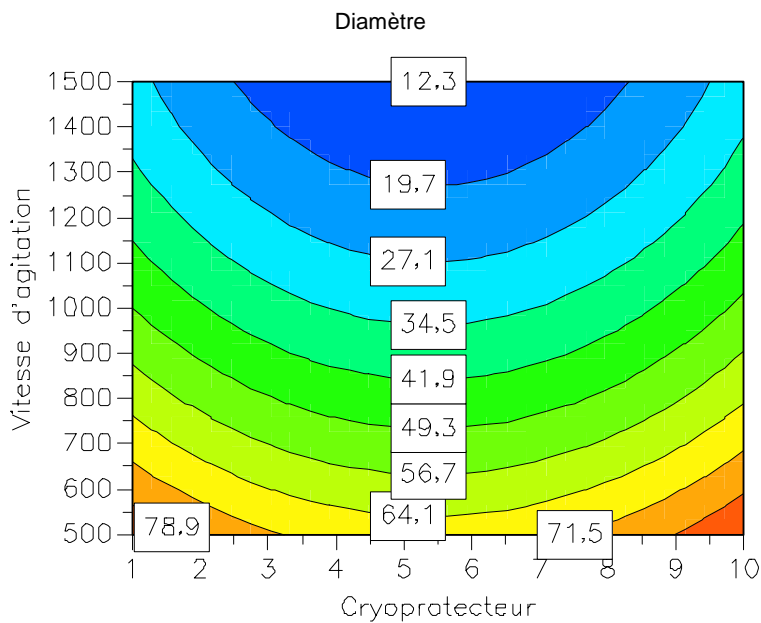


Figure (A4.12) : Courbe iso réponses en surface du diamètre en fonction du cryoprotecteur et de la vitesse d'agitation.

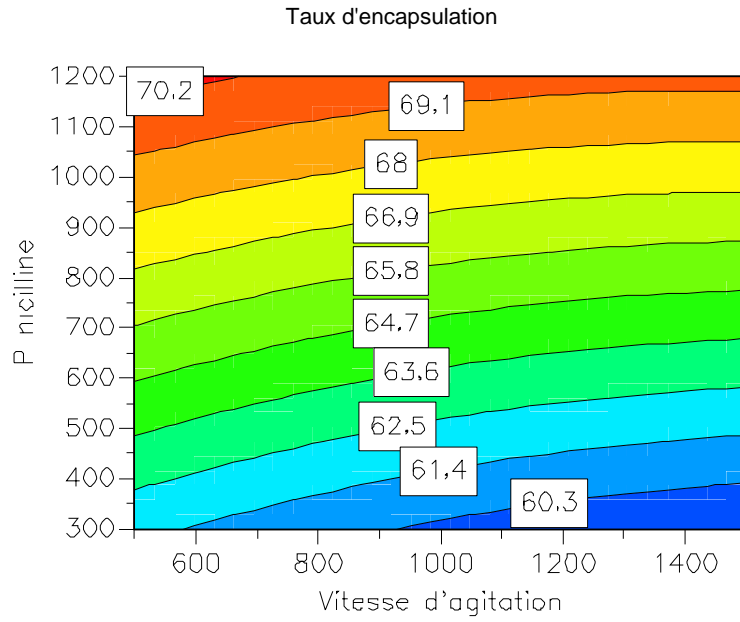


Figure (A4.13) : Courbe iso réponses en surface du taux d'encapsulation en fonction de la vitesse d'agitation et de la Pénicilline.

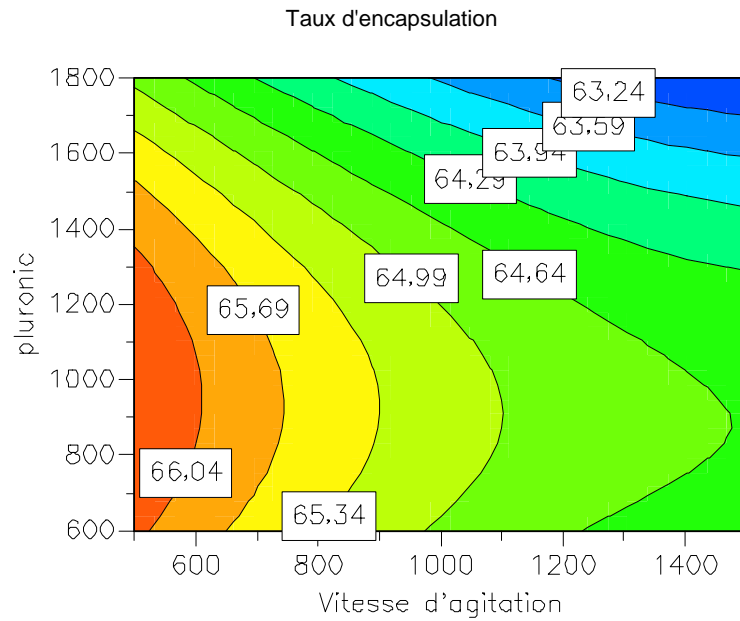
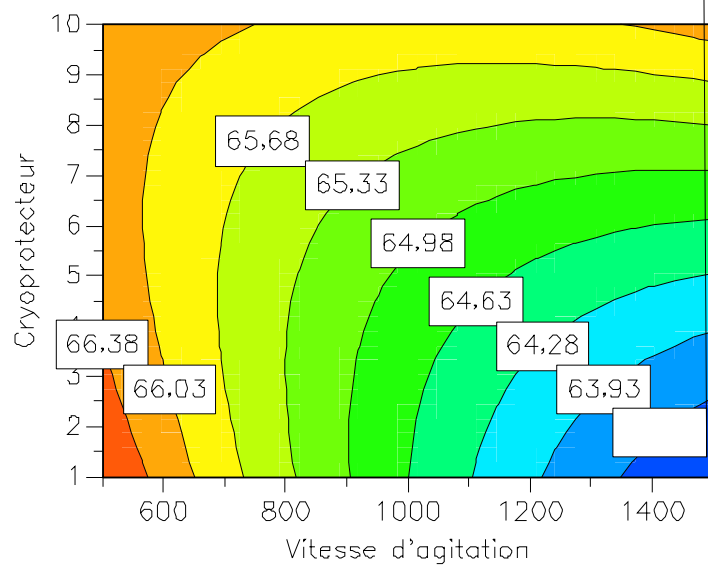


Figure (A4.14) : Courbe iso réponses en surface du taux d'encapsulation en fonction de la vitesse d'agitation et le pluronic.



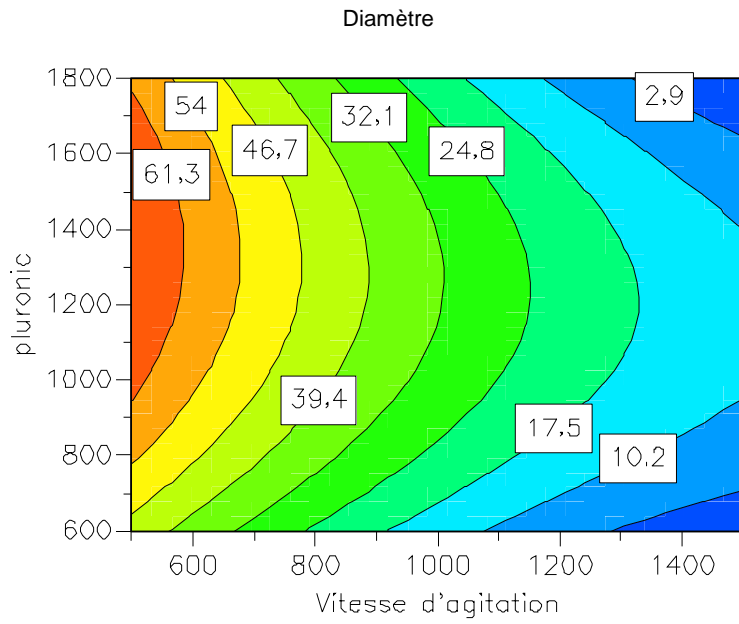


Figure (A4.17) : Courbe iso réponses en surface du diamètre en fonction de la vitesse d'agitation et le pluronic.

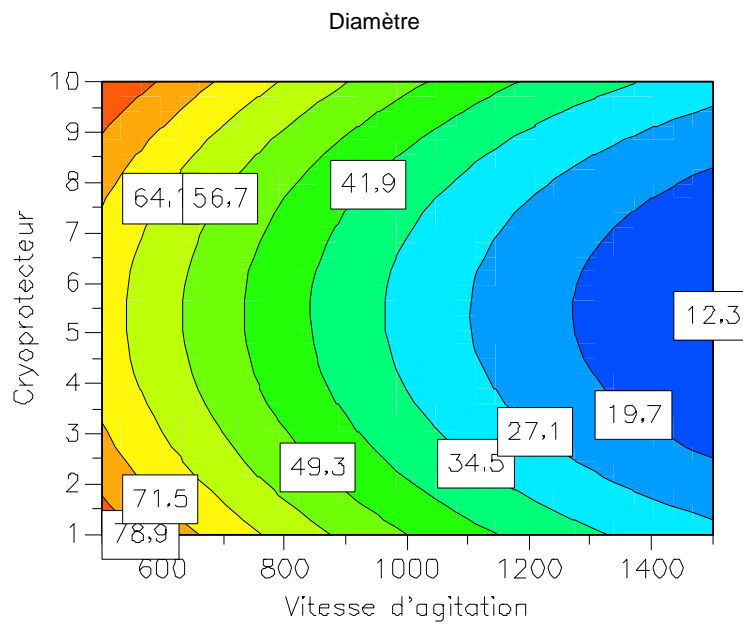


Figure (A4.18) : Courbe iso réponses en surface du diamètre en fonction de la vitesse d'agitation et du cryoprotecteur.

Annexe 5 : Caractérisation de l'optimum par HPLC et granulométrie laser

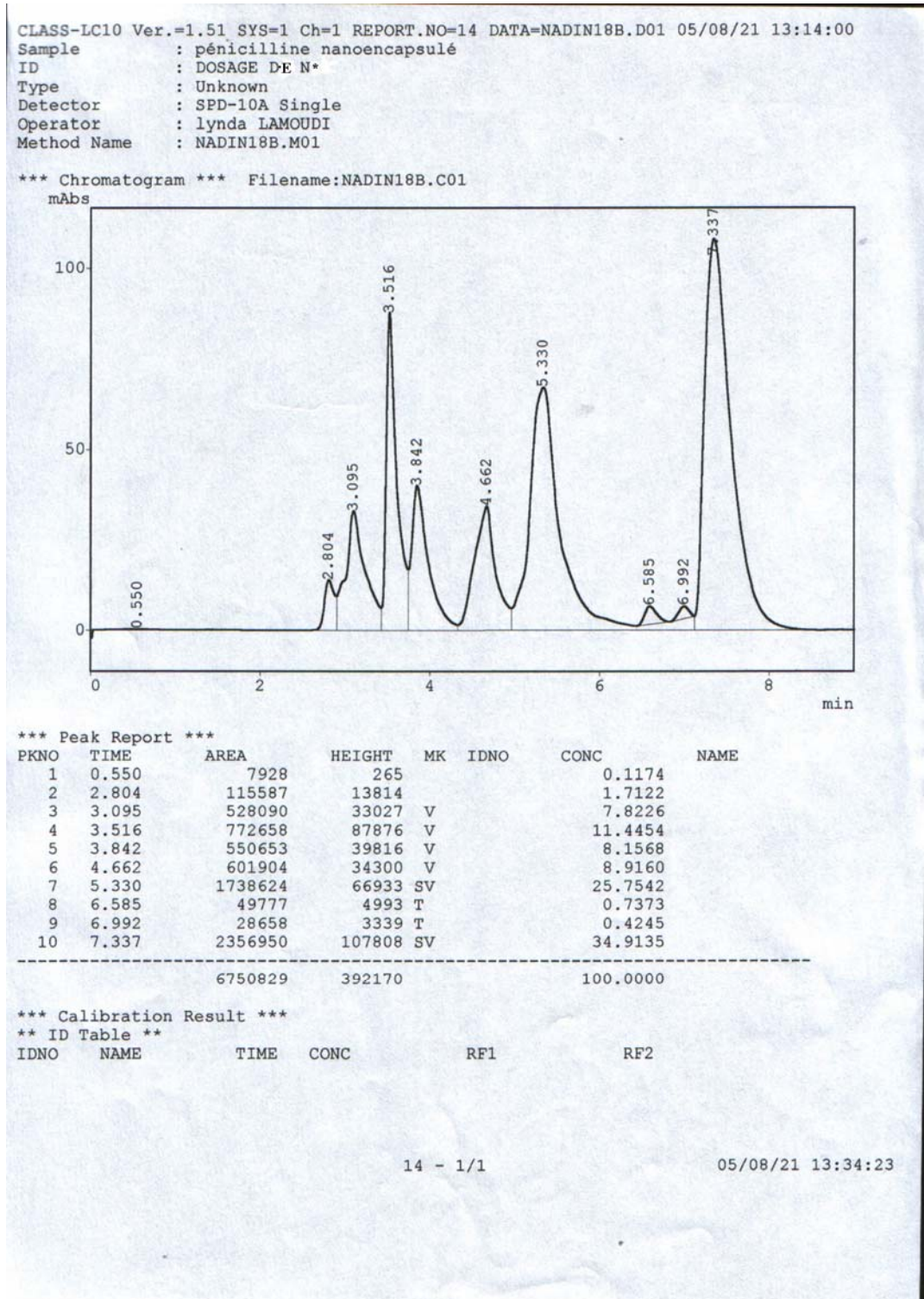
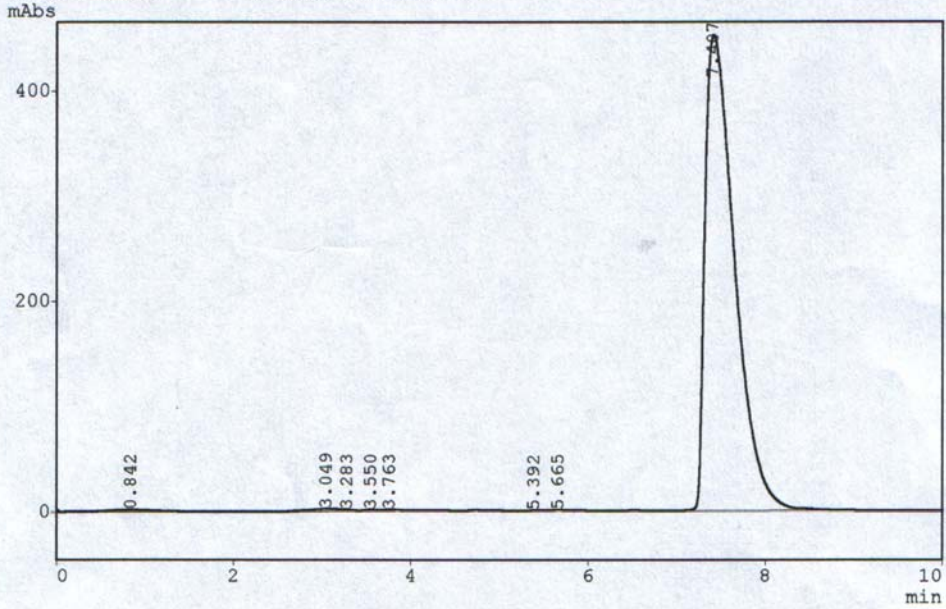


Figure (A5.1) : Chromatogramme de la formule optimale des nanoparticules (échantillon)

CLASS-LC10 Ver.=1.51 SYS=1 Ch=1 REPORT.NO=27 DATA=NANETAL2.D01 05/08/20 13:22:34
 Sample : pénicilline nanoencapsulé
 ID : étalon
 Type : Unknown
 Detector : SPD-10A Single
 Operator : lynda LAMOUDI
 Method Name : NANETAL2.M01

*** Chromatogram *** Filename:NANETAL2.C01



*** Peak Report ***

PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	0.842	42152	1345			0.3967	
2	3.049	47872	2159			0.4506	
3	3.283	8764	1224	V		0.0825	
4	3.550	9650	1107	V		0.0908	
5	3.763	9426	1039	V		0.0887	
6	5.392	2115	203			0.0199	
7	5.665	3486	424	V		0.0328	
8	7.407	10501369	451401	S		98.8380	
		10624833	458902			100.0000	

*** Calibration Result ***

** ID Table **

IDNO	NAME	TIME	CONC	RF1	RF2
------	------	------	------	-----	-----

Figure (A5.2) : Chromatogramme de la Pénicilline étalon.

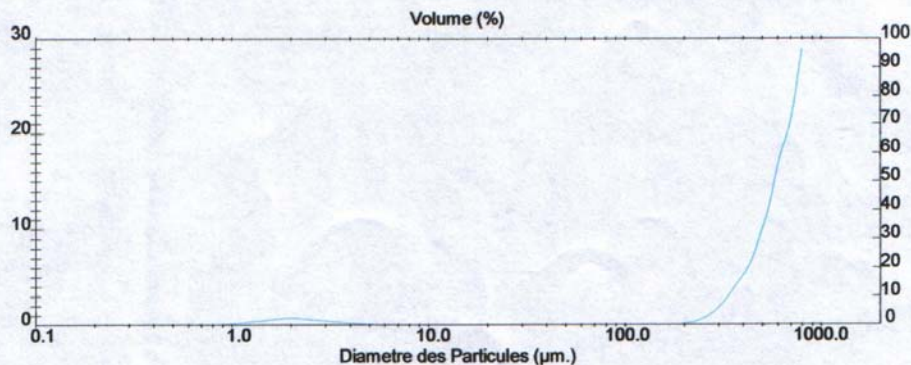
Résultat: Rapport Histogramme

INFORMATIONS SUR LE PRODUIT		
IDENTIFICATION: Solution N°	N° d'Execution: 12	Mesuré le: Lun 8 Aug 2005 15:30
Fichier: TESTS	N° Enregistrement: 360	Analysé le: Lun 8 Aug 2005 15:30
Répertoire: C:\SIZERS\DATA\		Type de Résultat: Analyse
Commentaires: N° lot : N°		
Provenance : Chimie analytique		

INFORMATIONS SUR L' INSTRUMENT			
Gamme: 300RF mm	Longueur Faisceau: 2.40 mm	Préparateur: MS1	Obscurcissement: 1.2 %
Présentation: 3OHD	[Particule R.I. = (1.5295, 0.1000);	Dispersant R.I. = 1.3300]	Résiduel: 1.748 %
Modèle d'Analyse: Polydispense			
Modifications: Aucune			

RÉSULTATS DE LA MESURE			
Type de Distribution: Volume	Concentration = 0.0055 %Vol	Densité = 1.000 g / cub. cm	Specific S.A. = 0.1580 sq. m / g
Diamètres:	D (v, 0.1) = 358.52 µm	D (v, 0.5) = 655.16 µm	D (v, 0.9) = 837.54 µm
D [4, 3] = 612.43 µm	D [3, 2] = 37.98 µm	Span = 7.311E-01	Uniformité = 2.394E-01

Taille (µm)	Volume Diff %	Taille (µm)	Volume Diff %	Taille (µm)	Volume Diff %	Taille (µm)	Volume Diff %
0.050	0.00	0.576	0.00	6.63	0.01	76.32	0.00
0.055	0.00	0.635	0.00	7.31	0.01	84.15	0.00
0.061	0.00	0.700	0.00	8.06	0.01	92.79	0.00
0.067	0.00	0.772	0.00	8.89	0.01	102.3	0.00
0.074	0.00	0.851	0.02	9.80	0.00	112.8	0.00
0.082	0.00	0.938	0.05	10.81	0.00	124.4	0.00
0.090	0.00	1.03	0.09	11.91	0.00	137.2	0.00
0.099	0.00	1.14	0.14	13.14	0.00	151.3	0.00
0.109	0.00	1.26	0.21	14.49	0.00	166.8	0.01
0.121	0.00	1.39	0.26	15.97	0.00	183.9	0.03
0.133	0.00	1.53	0.32	17.62	0.00	202.8	0.06
0.147	0.00	1.69	0.38	19.42	0.00	223.6	0.13
0.162	0.00	1.86	0.44	21.42	0.00	246.6	0.28
0.178	0.00	2.05	0.47	23.62	0.00	271.9	0.53
0.196	0.00	2.26	0.45	26.04	0.00	299.8	0.92
0.217	0.00	2.49	0.40	28.72	0.00	330.6	1.47
0.239	0.00	2.75	0.35	31.66	0.00	364.6	2.18
0.263	0.00	3.03	0.31	34.92	0.00	402.0	2.97
0.290	0.00	3.34	0.25	38.50	0.00	443.3	3.77
0.320	0.00	3.69	0.20	42.45	0.00	488.8	5.15
0.353	0.00	4.07	0.15	46.81	0.00	539.0	6.92
0.389	0.00	4.48	0.11	51.62	0.00	594.3	9.10
0.429	0.00	4.94	0.08	56.92	0.00	655.4	11.70
0.473	0.00	5.45	0.06	62.76	0.00	722.7	13.20
0.522	0.00	6.01	0.04	69.21	0.00	796.9	16.79
0.576	0.00	6.63	0.02	76.32	0.00	878.7	19.97



Malvern Instruments Ltd.
Malvern, UK
Tel: +[44] (0)1684-892456 Fax: +[44] (0)1684-892789

Mastersizer S Ver. 2.18 FR
Serial Number: 33544-801

p. 6
08 Aug 05 15:31

Figure (A5.3) : Analyse par granulométrie laser de la formule optimale des nanoparticules