

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITÉ de BLIDA 1

Faculté de Technologie

Département de Génie des Procédés



Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de

MASTER EN GENIE DES PROCEDES

Spécialité : Pharmacie Industrielle

Intitulé du mémoire

Formulation de liposomes phospholipidiques à base de Diclofénac de diéthylamine

Présenté par :

DJILALI Khadidja

GHERRAK Fouzia

Encadré par :

Dr. A. HADJ SADOK

Année universitaire 2015/2016

DEDICACE

Je dédie ce modeste travail à toutes les personnes les plus chers à mon cœur.

A ma mère qui a toujours été là pour moi et fait preuve de compréhension,
d'amour et d'affection ;

A mon père qui m'a toujours soutenu et m'as permis de continuer mes études
dans les meilleures conditions ;

A mon époux, qui plus est, dans toute circonstance, un ami et un confident, son
amour et son soutien m'a été indispensable tout au long de mon parcours dans ce
master.

A ma sœur, ma collègue et ma meilleure amie Fouzia, merci pour tous.

A mes trois frères Mohamed Amine, Nasr eddine et chouaib.

A mes deux grands-mères magnifiques, qui m'ont toujours aimé et comblé de
bénédiction.

A mon oncle Ahmed, que je remercie pour ses encouragements, sa disponibilité
et son amour.

A tata Amel qui a toujours été présente, m'a soutenu et écouté durant mes pires
moments.

Je dédie aussi cette modeste réalisation à :

- Toute ma famille.
- Toutes mes meilleures amies : Lydia, Soumia, Nawel, Ikram, Meriem,
Mouniya, Nesrine, Djazia, Sihem, Zahra, Souad.
- Tous mes amis et collègues de la Pharmacie industrielle.
- A toute l'équipe de la fac.

Khadija

DEDICACE

A mes parents

Pour tout ce que vous m'avez inculqué et appris.

A mon père, qui a fait preuve de sacrifice pour que je puisse continuer mes études dans les meilleures conditions, pour ses précieux conseils, sa présence et son exemple.

A ma mère, pour ses prières, ses encouragements et son soutien dans les différentes étapes de ma vie estudiantine et future vie professionnelle.

Merci pour votre confiance et votre présence.

Recevez ce mémoire en guise de remerciement et témoignage de mon amour.

A ma sœur, mon frère, ma fidèle amie et confidente

Karima, pour m'avoir toujours écouté, supporté lors de mes moments de stress et pour son amour.

Wassim, mon petit frère, le plus beau et le plus intelligent à mes yeux.

Khadidja a qui j'exprime ma profonde amitié, avec qui j'ai partagé toutes les étapes de ce travail et qui a subi mes périodes de découragement avec beaucoup de compréhension.

Lamia, pour son amitié exemplaire, qui a su toujours être là pour moi, à la fois discrète et effacée, et pour tous les bons moments passés ensemble.

A toute ma famille

A mes amis et toute l'équipe de la fac spécialement Djamila, Lydia, Youcef, Fares.

A tous ceux qui m'ont fait profiter de leurs connaissances et expériences.

Fouzia

RESUME

Les liposomes sont connus pour avoir un potentiel considérable comme vecteurs de médicaments en vue de diminuer la toxicité et améliorer la biodisponibilité. L'objectif de l'étude consiste à encapsuler, optimiser et caractériser de préparations liposomales à base de diclofénac diéthylamine. Les liposomes à base de lécithine de soja et du cholestérol ont été préparés par la méthode d'évaporation en phase inverse à l'aide un rotavapeur. Les préparations ont été analysées en vue de déterminer leur taille, leur potentiel zêta, et leur pourcentage de médicament encapsulé. Il en était dégagé un optimum contenant une quantité maximale d'éthanol par rapport à l'eau et des taux maximum de cholestérol et de lécithine. Vraisemblablement, cette association favorise l'obtention de liposomes de petites tailles contenant une charge de surface (potentiel zêta) assez élevée et ne présentant qu'une étroite polydispersité.

MOTS-CLÉS : Liposomes, diclofenac diéthylamine, lécithine de soja, cholestérol, rotavapeur.

ABSTRACT

Liposomes are known to have considerable potential as drug carriers in reduction of the toxicity and improve bioavailability. The aim of this study is to encapsulate, optimize and characterize liposomal formulations of diclofenac diethylamine. Liposomes containing soy bean lecithin and cholesterol were prepared by the reverse phase evaporation method by a rotary evaporator. Preparations have been analyzed to determine size, zeta potential, and the percentage of encapsulated drug. Optimum obtained by RSM simulation contains a ratio maximal of ethanol/water with maximum levels of cholesterol and lecithin. this association promotes the production of liposomes of small sizes containing a zeta potential rather high and having relatively narrow dispersity.

KEYWORDS: Liposomes, diclofenac diethylamine, soylecithin, cholesterol, rotary evaporator.

ملخص

ومن المعروف أن الجسيمات الشحمية لديها إمكانات كبيرة كحاملات المخدرات للحد من سميّتها وتحسين تواجدها الحيوي. الهدف من هذه الدراسة هو لتغليّف، وتحسين وتوصيف تركيبات الجسيمات الشحمية المتكونة من عقار الديكلوفيناك دي إيثيلامين ، مضاد للالتهابات و المعروفة بآثارها الجانبية. وتمت طريقة إعداد الجسيمات الشحمية بواسطة طريقة التبخر العكسي باستخدام: ليسثين الصويا، الكوليسترول، الإيثانول وباستخدام المبخر الدوار. بعد أن تم تحليل الجسيمات الشحمية لتحديد حجمها، وشحنات زيتا، وتحديد نسبة المخدرات المغلفة داخلها. فكان واضحا أن مع أكبر قدر ممكن من الإيثانول نسبة إلى كمية الماء و البروبييلان غليكول المستعملة واستعمال أقصى مستويات الكوليسترول في الدم والليسيثين يعزز إنتاج الجسيمات الشحمية من الأحجام الصغيرة التي تحتوي على الشحنة السطحية (شحنات زيتا) ومرتفعة بما يكفي مع وجود التشتت المتعدد الضيق.

الكلمات الرئيسية: الجسيمات الشحمية، ثنائي إيثيلامين ديكلوفيناك، ليسثين الصويا، الكوليسترول، المبخر الدوار.

REMERCIEMENTS

Avant toute chose, nous remercions Dieu le tout puissant, pour nous avoir donné le courage et la patience.

Nous tenons à exprimer notre gratitude et notre respect à monsieur A. HADJ SADOK, Maitre de Conférences A, à l'université de Blida 1, pour nous avoir guidés dans ce travail. Sa disponibilité, sa compétence et sa gentillesse ont contribué au bon déroulement de ce travail. et ses conseils qui nous serviront, sans doute, tout au long de notre carrière professionnelle.

Nous remercions tous les membres de jury spécialement *M^{me}* A.HADJ ZIANE professeur à l'université de Blida 1 et responsable du Master Pharmacie Industrielle pour ses encouragements et M. KHELIFA professeur à l'université de Blida 1 de nous avoir donné l'honneur de présider le Jury et *M^{me}* ZERMANE Maitre de Conférences A, à l'université de Blida 1.

Nous remercions *M^{me}* AÏT MESBAH, Maitre assistante A, à l'université de Blida 1, pour ses nombreux conseils, pour sa gentillesse et sa disponibilité.

Nos remerciements vont respectueusement à *M^{me}* L. BRADAI, pour la gentillesse de nous avoir fournis les matières dont on a eu besoin, et pour ses encouragements.

Nous remercions *M^{me}* MEKAOUI responsable du département de la chimie analytique au C.R.D SAÏDAL pour nous avoir donné accès au laboratoire.

Nous exprimons nos respectueux remerciement a Monsieur A. REKAB responsable du laboratoire contrôle qualité de l'entreprise PRODIPHAL pour sa disponibilité malgré ses occupations.

Nous profitons de l'occasion pour remercier *M^{me}* EL HATAB, *M^{me}* DEGHBOUCHE et M. NOUAS.

Nous adressons aussi nos remerciements à M. BENAMAR responsable du laboratoire de physique.

Nous voulons aussi remercier tous ceux qui nous ont aidé à réaliser ce travail de près ou de loin, et nos sincères remerciements vont également à tous les membres de département de Génie des Procédés spécialement au chef de département et nous profitons aussi de l'occasion pour donner une marque d'estime enseignements dispensés, et pour nous avoir fait profiter de leurs expériences.

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 : formation des eicosanoïdes.....	5
Figure 1.2 : Structure chimique du diclofénac.....	9
Figure 2.1 : Structure d'un liposome unilamellaire.....	11
Figure 2.2 : Localisation d'un principe actif dans un liposome en fonction de sa nature chimique.....	12
Figure 2.3 : Structure chimique de différents phospholipides et représentation du caractère amphiphile.....	14
Figure 2.4 : Les différents états d'une bicouche phospholipidique en fonction de la température.....	15
Figure 2.5 : préparation des liposomes par la méthode d'hydratation du film lipidique.....	18
Figure 2.6 : Préparation des liposomes par injection de solvant organique.....	18
Figure 2.7 : Préparation de liposomes larges unilamellaires (LUV) par la méthode d'évaporation en phase inverse.....	19
Figure 2.8 : Préparation des liposomes par la méthode d'élimination du détergent.....	20
Figure 2.9 : Mécanismes de pénétration des liposomes au niveau cutané.....	24
Figure 3.1 : Protocole opératoire de la suspension liposomale.....	34
Figure 4.1 : Photo microscopique d'une vésicule liposomale.....	43
Figure 4.2 : Distribution granulométrique de la suspension liposomale « préformulation ».....	44
Figure 4. 3 : Distribution granulométrique monomodale de l'essai N° 1.....	46
Figure 4.4 : Distribution granulométrique bimodale de l'essai N° 7.....	47
Figure 4.5 : Distribution granulométrique de l'essai N° 5.....	48
Figure 4. 6 : Courbes de potentiel zêta.	49
Figure 4. 7 : Chromatogramme du HPLC (A) : STD, (B) : ECH.....	51
Figure 4. 8 : Chromatogramme du HPLC (A) : STD, (B) : ECH culot de l'essai N° 1, (C) : Surnageant de l'essai N° 2.....	52
Figure 4. 9 : Histogrammes représentant R^2 , Q^2 et la reproductibilité des modèles en surface de réponses.....	54

Figure 4.10 : Courbes d'interactions de cholestérol avec la lécithine et l'éthanol sur la taille.....	56
Figure 4.11 : Courbes d'interactions de la lécithine avec cholestérol et l'éthanol sur la taille.....	57
Figure 4.12 : Courbes d'interactions de l'éthanol avec la lécithine et le cholestérol sur la taille.....	58
Figure 4.13 : Courbes d'interactions de cholestérol avec la lécithine et l'éthanol sur le potentiel zêta.....	59
Figure 4.14 : Courbes d'interactions de la lécithine avec le cholestérol et l'éthanol sur le potentiel zêta.....	59
Figure 4.15 : Courbes d'interactions de l'éthanol avec la lécithine et le cholestérol sur le potentiel zêta.....	60
Figure 4.16 : Courbes d'interactions de cholestérol avec la lécithine et l'éthanol sur la polydispersité.....	61
Figure 4.17 : Courbes d'interactions de la lécithine avec le cholestérol et l'éthanol sur la polydispersité.....	62
Figure 4.18 : Courbes d'interactions de l'éthanol avec la lécithine et le cholestérol sur la polydispersité.....	62
Figure 4.19 : Les contours iso-réponses pour la taille.....	64
Figure 4.20 : Les contours iso-réponses pour le potentiel zêta.....	65
Figure 4.21 : Les contours iso-réponses pour l'indice de polydispersité.....	66
Figure 2.1 : Distribution granulométrique de l'essai N° 2.....	Annexe 2
Figure 2.2 : Distribution granulométrique de l'essai N° 3.....	Annexe 2
Figure 2.3 : Distribution granulométrique de l'essai N° 4.....	Annexe 2
Figure 2.4 : Distribution granulométrique de l'essai N° 6.....	Annexe 2
Figure 2.5 : Distribution granulométrique de l'essai N° 8.....	Annexe 2
Figure 2.6 : Distribution granulométrique de l'essai N° 9.....	Annexe 2
Figure 2.7 : Distribution granulométrique de l'essai N° 10.....	Annexe 2
Figure 2.8 : Distribution granulométrique de l'essai N° 11.....	Annexe 2
Figure 2.9 : Distribution granulométrique de l'essai N° 12.....	Annexe 2
Figure 2.10 : Distribution granulométrique de l'essai N° 13.....	Annexe 2
Figure 2.11 : Distribution granulométrique de l'essai N° 14.....	Annexe 2
Figure 2.12 : Distribution granulométrique de l'essai N° 15.....	Annexe 2

Figure 2.13 : Courbes de potentiel zêta des essais : 01, 02, 03, 04, 05, 06, 13.....	Annexe 2
Figure 2.14 : Courbes de potentiel zêta pour les essais : 09, 10, 11, 12, 07, 08, 14,15...	Annexe 2
Figure 2.15 : Chromatogramme du HPLC de standard de diclofénac diéthylamine.....	Annexe 2
Figure 2.16 : Chromatogramme du HPLC pour quelques échantillons de diclofénac diéthylamine.....	Annexe 2
Figure 2.17 : Chromatogramme du HPLC de culot de l'essai N° 1.....	Annexe 2
Figure 2.18 : Chromatogramme du HPLC de surnageant de l'essai N° 1.....	Annexe 2
Figure 2.19 : Chromatogramme du HPLC de culot de l'essai N° 2.....	Annexe 2
Figure 2.20 : Chromatogramme du HPLC de surnageant de l'essai N° 2.....	Annexe 2
Figure 2.21 : Chromatogramme du HPLC de culot de l'essai N° 3.....	Annexe 2
Figure 2.22 : Chromatogramme du HPLC de surnageant de l'essai N° 3.....	Annexe 2
Figure 2.23 : Chromatogramme du HPLC de culot de l'essai N° 4.....	Annexe 2
Figure 2.24 : Chromatogramme du HPLC de surnageant de l'essai N° 4.....	Annexe 2
Figure 2.25 : Chromatogramme du HPLC de culot de l'essai N° 5.....	Annexe 2
Figure 2.26 : Chromatogramme du HPLC de surnageant de l'essai N° 5.....	Annexe 2
Figure 2.27 : Chromatogramme du HPLC de culot de l'essai N° 6.....	Annexe 2
Figure 2.28 : Chromatogramme du HPLC de surnageant de l'essai N° 6.....	Annexe 2
Figure 2.29 : Chromatogramme du HPLC de culot de l'essai N° 7.....	Annexe 2
Figure 2.30 : Chromatogramme du HPLC de surnageant de l'essai N° 7.....	Annexe 2
Figure 2.31 : Chromatogramme du HPLC de culot de l'essai N° 8.....	Annexe 2
Figure 2.32 : Chromatogramme du HPLC de surnageant de l'essai N° 8.....	Annexe 2
Figure 2.33 : Chromatogramme du HPLC de culot de l'essai N° 9.....	Annexe 2
Figure 2.34 : Chromatogramme du HPLC de surnageant de l'essai N° 9.....	Annexe 2
Figure 2.35 : Chromatogramme du HPLC de culot de l'essai N° 10.....	Annexe 2
Figure 2.36 : Chromatogramme du HPLC de surnageant de l'essai N° 10.....	Annexe 2
Figure 2.37 : Chromatogramme du HPLC de culot de l'essai N° 11.....	Annexe 2
Figure 2.38 : Chromatogramme du HPLC de surnageant de l'essai N° 11.....	Annexe 2
Figure 2.39 : Chromatogramme du HPLC de culot de l'essai N° 12.....	Annexe 2
Figure 2.40 : Chromatogramme du HPLC de surnageant de l'essai N° 12.....	Annexe 2
Figure 2.41 : Chromatogramme du HPLC de culot de l'essai N° 13.....	Annexe 2
Figure 2.42 : Chromatogramme du HPLC de surnageant de l'essai N° 13.....	Annexe 2
Figure 2.43 : Chromatogramme du HPLC de culot de l'essai N° 14.....	Annexe 2

Figure 2.44 : Chromatogramme du HPLC de surnageant de l'essai N° 14.....	Annexe 2
Figure 2.45 : Chromatogramme du HPLC de culot de l'essai N° 15.....	Annexe 2
Figure 2.46 : Chromatogramme du HPLC de surnageant de l'essai N° 15.....	Annexe 2
Figure 2.47 : Composants du système rotavapeur.....	Annexe 2
Figure 2.48 : Photo représentant le microscope électronique à balayage (a) et schéma représentant les composants essentiels du MEB (b).....	Annexe 2
Figure 2.49 : Granulomètre laser de type HORIBA SZ 100.....	Annexe 2
Figure 2.50 : Photo représentant une ultracentrifugeuse.....	Annexe 2
Figure 2.51 : photo de l'appareil HPLC.....	Annexe 2

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2.1 : Classification des liposomes	14
Tableau 3.1 : Caractéristiques de la lécithine de soja.....	28
Tableau 3.2 : Caractéristiques physico-chimiques de l'éthanol 96%.....	29
Tableau 3.3 : Caractéristiques de cholestérol	30
Tableau 3.4 : Caractéristiques physicochimiques de Diclofénac diéthylamine.....	31
Tableau 3.5 : Propriétés de propylène glycol.....	32
Tableau 3.6 : Matrice d'expériences.....	36
Tableau 4.1 : Résultats de pré formulation.....	44
Tableau 4.2 : Résultats de distribution de taille.....	44
Tableau 4.3 : La taille et la distribution de taille des particules des préparations liposomales.....	48
Tableau 4.4 : Potentiel zêta des particules des préparations liposomales.....	50
Tableau 4.5 : Résultats de la teneur en principe actif et rendement d'encapsulation...	51
Tableau 4.6 : Matrices des réponses.....	53

LISTE DES ABREVIATIONS

AINS : Anti-inflammatoires Non Stéroïdiens.

AIS : Anti-Inflammatoires Stéroïdiens.

COX : Cyclo-oxygénase.

D_h : Diamètre hydrodynamique.

DLS : Diffusion dynamique de la Lumière.

ECH: Echantillon.

GUV: Geantes Unilamellar Vesicles.

HLB : Balance Hydrophile Lipophile.

HPLC: High Performance Liquid Chromatography.

IR : InfraRouge.

IUPAC : Union International de la Chimie pure et Appliquée.

L.U.V: Large Unilamellar Vesicles.

MEB : Microscopie Electronique à Balayage.

MET : Microscopie Electronique à Transmissions.

M.L.V: Multilamellar Vesicles.

MP : Matière Première.

mV : milli Volt.

M.V.V: Multivesicular Vesicles.

nm: nanomètre.

O.L.V: Oligolamellar Vesicles.

PA : Principe Actif.

PC: PhosphatidylCholine.

PEG: Polyéthylène Glycol.

PE: PhosphatidylEthanolamine.

PG : PhosphatidylGlycérol.

P.G : Propylène Glycol.

pH : potentiel Hydrogène.

PI: PhosphatidylInositol.

PIE : Perte Insensible en Eau.

PL: Phospholipides.

PLS : Partial Least Squares ou les moindres carrés partiels (français).

PS: PhosphatiDylSérine.

Psi : Tours par minute.

IP : Indice de Polydispersité.

Qte : Quantité.

QSP : Quantité Suffisante Pour.

RSM : Modélisation en Surface de Réponse.

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire.

R.E.V: Reverse phase Evaporation Vesicles.

SC: Stratum Corneum (couche cornée).

SPM: Système Phagocytaire Mononuclée.

S.U.V: Small Unilamellar Vesicles.

STD: Standard.

Tm: melting temperature (température de transition).

µm: micro-mètre.

TABLES DES MATIERES

RESUME

REMERCIEMENTS

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

LISTE DES ABREVIATIONS

INTRODUCTION 1

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUES

CHAPITRE 1 : LES ANTI-INFLAMMATOIRES

1.1 LES ANTI-INFLAMMATOIRES.....	3
1.2. CLASSIFICATION DES ANTI-INFLAMMATOIRES.....	3
1.2.1. Anti-inflammatoires stéroïdiens AIS.....	4
1.2.1.1. Généralités.....	4
1.2.2. Anti-inflammatoires non stéroïdiens AINS.....	4
1.2.2.1. Historique.....	4
1.2.2.2. Généralités.....	4
1.2.2.3. Mécanisme d'action des anti-inflammatoires non stéroïdiens.....	5
1.2.2.4. Effets pharmacodynamiques.....	6
1.2.2.5. Indications générales et traitements médicaux	7
1.2.2.5.1. Indications générales.....	7
1.2.2.5.2. Traitements médicaux.....	7
1.2.2.6. Effets indésirables des anti-inflammatoires.....	7
1.2.2.7. Les principaux anti-inflammatoires non stéroïdiens AINS.....	8
1.3. DICLOFENAC	8
1.3.1. Définition.....	8
1.4. CONCLUSION	9

CHAPITRE 2 : LES LIPOSOMES

2.1. LES SYSTEMES D'ENCAPSULATION ET DE VECTORISATION.....	10
2.1.1. Définition de l'encapsulation.....	10
2.1.2. Classification des systèmes d'encapsulation.....	11
2.2. LES LIPOSOMES.....	11
2.2.1. Définition.....	11
2.2.2. Classification des liposomes.....	13
2.2.3. Développement des liposomes	14
2.2.4. Composition des liposomes	15
2.2.4.1. Les phospholipides	15
2.2.4.2. Les stéroïdes.....	16
2.2.5. Stabilité.....	16
2.2.5.1. Stabilité chimique.....	17
2.2.5.2. Stabilité colloïdale.....	17
2.2.5.3. Paramètres influençant la stabilité de la membrane lipidique.....	18
2.2.6. Préparation des liposomes.....	18
2.2.6.1. Modes de préparation des liposomes.....	18
2.2.6.1.1. Méthodes de préparation par réhydratation de film suite à l'évaporation du solvant organique (méthode classique).....	18
2.2.6.1.2. Méthodes fondées sur la dispersion d'une solution organique	19
2.2.6.1.3. Méthodes basées sur l'utilisation de détergents : dispersion de micelles mixtes	20
2.2.6.2. Méthodes de réduction de taille des liposomes	21
2.2.6.2.1. Sonication.....	21
2.2.6.2.2. Extrusion	21
2.2.6.2.3. Microfluidisation	22
2.2.7. Caractérisation des liposomes.....	22
2.2.7.1. Taille, distribution de taille et morphologie des liposomes.....	22
2.2.7.2. Mobilité électrophorétique des liposomes.....	23
2.2.7.3. Mesure de l'efficacité d'encapsulation.....	23
2.2.8. Mécanisme de pénétration cutanée des liposomes.....	25
2.2.8.1. Facteurs influençant la pénétration percutanée.....	25
2.2.8.2. Absorption cutanée des liposomes.....	25

2.3. CONCLUSION.....	26
----------------------	----

PARTIE EXPERIMENTALE

CHAPITRE 3 : MATERIELS ET METHODES

3.1. OBJECTIF.....	27
3.2. STRATEGIE EXPERIMENTALE DE LA PRE FORMULATION.....	27
3.2.1. Choix des matières premières de la suspension liposomale.....	27
3.2.1.1. Phase organique.....	27
3.2.1.2. Phase aqueuse.....	30
3.2.2. Choix du procédé de fabrication.....	32
3.2.4. Essais de pré formulation.....	33
3.2.4.1. Mode opératoire de la suspension liposomale.....	34
3.2.5. Caractérisation des liposomes	36
3.2.5.1. Microscopie électronique à balayage (MEB).....	36
3.2.5.2. Taille des liposomes.....	37
3.3. DEMARCHE METHODOLOGIQUE DE LA FORMULATION.....	38
3.3.1. Matrice d'expériences.....	39
3.3.2. Méthodes de caractérisation et d'évaluation des liposomes.....	40
3.3.2.1. Détermination de la taille, de la polydispersité et du potentiel zêta.....	40
3.3.2.2. Détermination du taux d'incorporation de diclofénac dans les liposomes par HPLC.....	41

CHAPITRE 4 : RESULTATS ET DISCUSSION

4.1. RESULTATS DE PRE FORMULATION DE LA SUSPENSION LIPOSOMALE.....	43
4.1.1. Résultat de la préparation.....	43
4.1.2. Résultats de caractérisation	43
❖ Microscopie électronique à balayage.....	43
❖ Caractérisation par DLS	44
4.2. RESULTATS DE LA FORMULATION.....	45
4.2.1. Taille et distribution de taille.....	45
4.2.2. Charge de surface.....	49
4.2.3. Efficacité d'encapsulation	50

4.2.4. Matrice des réponses.....	53
4.2.4.1. Evaluation de la qualité au sens statistique du modèle en surface de réponses.....	53
4.2.4.2. Etude des effets et des interactions des facteurs sur les réponses	55
4.2.4.2.1. Effets des facteurs sur la taille	55
4.2.4.2.2. Effet des facteurs sur le potentiel zêta	58
4.2.4.2. 3. Effet des facteurs sur l'indice de polydispersité.....	60
4.2.5. Détermination des zones optimales	62
CONCLUSION	67
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	
ANNEXES	

INTRODUCTION

INTRODUCTION

La peau agit comme une barrière physiologique dont les principales fonctions sont de limiter la perte en eau (perte insensible en eau : PIE), en électrolytes et autres constituants de l'organisme par diffusion passive, dans le but de conserver une homéostasie indispensable à la survie de l'organisme. Elle joue également un rôle de protection en empêchant la pénétration dans l'organisme de substances nuisibles ou indésirables provenant de l'environnement extérieur ou encore en constituant un système de défense vis-à-vis des agressions mécaniques. Cette membrane ne permet donc à aucune molécule de passer facilement.

Pour être réellement efficace, une substance active doit être délivrée au niveau du bon site d'action et cela à une concentration efficace pendant une durée suffisante. Ces objectifs constituent les réels enjeux d'un mode de formulation visant à modifier la perméabilité cutanée.

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

Nous nous attacherons dans ce travail à décrire notre stratégie employée pour favoriser la pénétration cutanée et accroître l'efficacité et la biodisponibilité du Diclofénac de diéthylamine, un anti-inflammatoire non stéroïdien largement prescrit pour traiter les douleurs légères et modérée, inflammations et arthrose en inhibant l'enzyme cyclooxygénase. Il est déjà commercialisé sous différentes formes (gel, émulsion, solution ophtalmique, comprimé à libération immédiate et prolongée, suppositoires et injection intramusculaire).

En outre 40% du Diclofénac administré par voie orale subit un métabolisme de premier passage et n'atteint pas la circulation systémique. [1]

A cause de sa faible solubilité dans l'eau et dans le milieu acide de l'estomac, le Diclofénac présente une faible disponibilité et courte demi-vie d'environ deux heures. [1]

On suggère donc une application topique pour le traitement des maladies rhumatismales afin d'augmenter la biodisponibilité et diminuer la toxicité [2]

Le Diclofénac de diéthylamine n'est pas aisément absorbé lors d'une application transdermique ; on propose donc l'utilisation des liposomes, des particules sphériques composées de bicouches lipidiques refermées sur elles-mêmes, comme système d'encapsulation.

Le présent document est organisé en deux grandes parties. La première est consacrée à la synthèse bibliographique nécessaire à la bonne compréhension de ce travail. Elle comporte deux chapitres :

Le premier est dédié aux anti-inflammatoires. Nous parlerons de leurs effets, mécanisme d'action, différentes formes commercialisées et effets indésirables observés.

Le deuxième chapitre sera consacré aux systèmes d'encapsulation à travers lequel nous allons, d'une part, faire une synthèse sur l'ensemble des systèmes d'encapsulation avant de se focaliser, d'autre part, sur les liposomes et décrire les différentes techniques d'élaboration des liposomes, de leurs propriétés physicochimiques.

La partie expérimentale de ce travail est présentée dans le chapitre trois. Ce chapitre comporte trois grandes parties :

La première sera dédiée aux études de pré-formulation, nous décrirons les critères suivis qui nous ont permis d'aboutir à notre formule qualitative et quantitative, la réalisation des essais de pré-formulation ainsi que les différentes analyses effectuées sur cette formule seront mises en évidence.

La deuxième partie sera consacrée à la formulation proprement dite, nous présenterons la démarche expérimentale qui consistera à étudier l'influence des excipients utilisés dans notre formule de base, sur certaines propriétés physicochimiques (distribution granulométrique et potentiel zêta) du système. La méthodologie à suivre sera celle des plans d'expériences. Une modélisation en surface de réponses sera effectuée à l'aide du logiciel MODDE 6.0

La troisième partie sera consacrée à la discussion des résultats obtenus pour chaque formule du plan d'expérience, grâce à laquelle sera sélectionnée la meilleure (optimum).

Enfin, une conclusion et des perspectives seront apportées dans la dernière partie de ce mémoire. Nous rappellerons les principaux résultats obtenus, ainsi que les voies envisagées pour une suite d'études plus approfondies.

SYNTHESE
BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE 1

LES ANTI- INFLAMMATOIRES

CHAPITRE 1 : LES ANTI-INFLAMMATOIRES

Les médicaments sont souvent regroupés en fonction de l'effet biologique qu'ils exercent et c'est ainsi qu'on parle, par exemple, d'analgésiques, d'antipsychotiques, d'antihypertenseurs, d'antiasthmatiques, d'antibiotiques, d'anti-inflammatoires, etc.

A une agression par un agent pathogène, l'organisme répond par une réaction défensive qui prend deux aspects :

- L'inflammation, non spécifique, qui s'accompagne de la libération et de l'intervention de multiples autacoïdes et comporte des phénomènes vasculaires et cellulaires.
- L'immunité, spécifique, soit humorale ou tissulaire.

Dans cette mise au point bibliographique, nous présentons les anti-inflammatoires qui font par la suite l'objet de notre travail, et surtout les anti-inflammatoires non stéroïdiens.

1.1. LES ANTI-INFLAMMATOIRES

Les anti-inflammatoires sont des médicaments qui antagonisent les processus inflammatoires [3], c'est à dire les substances chimiques luttant contre les phénomènes inflammatoires généraux ou secondaires [ce sont des réactions systématiques qui se développent à distance « chroniques »] et locaux ou primaires (aigües) d'origine diverses (infections, brûlures, irritations, troubles métaboliques, etc.) par inhibition de la Cyclo-oxygénase (COX), en particulier la COX-2. [4,5].

Les anti-inflammatoires traitent les symptômes (et soulagent les malades), mais ils ne suppriment pas les causes. Si celles-ci persistent, l'arrêt du traitement expose à un phénomène de rebond. [6]

Les anti-inflammatoires sont responsables de multiples effets secondaires qui entraînent de nombreux effets indésirables souvent graves. Ce sont des médicaments fréquemment utilisés et aussi dangereux qu'utiles. [6]

1.2. CLASSIFICATION DES ANTI-INFLAMMATOIRES

On distingue généralement deux catégories d'anti-inflammatoires : les anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS) et les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS).

1.2.1. Anti-inflammatoires stéroïdiens AIS

1.2.1.1. Généralités

Les anti-inflammatoires hormonaux, couramment appelés « corticoïdes », sont des dérivés semi synthétiques des hormones corticosurréaliennes et, plus exactement, des glucocorticoïdes [6].

Les anti-inflammatoires stéroïdiens sont des dérivés des hormones stéroïdiens de la corticosurréale, principalement les glucocorticoïdes [cortisol (hydrocortisone) et la cortisone] qui sont biosynthétisés à partir du cholestérol et employés dans le domaine médical pour leurs propriétés : antiallergiques (asthme, œdème, choc anaphylactique), hématologiques (leucémie), dermatologiques (dermatose non virale, prurit), ophtalmologiques (uvéites, kératites), immunosuppressives (greffes d'organes), anti-inflammatoires (rhumatismes, polyarthrites rhumatoïdes, rhumatisme articulaire aigu). [6]

1.2.2. Anti-inflammatoires non stéroïdiens AINS

1.2.2.1. Historique

L'origine de l'appellation « anti-inflammatoires non hormonaux » ou encore « anti-inflammatoires non stéroïdiens », couramment « AINS », est historique. En effet, à l'époque de leur découverte, on ne connaissait comme anti-inflammatoires que les dérivés des hormones surréaliennes qui sont chimiquement des stéroïdes. Leur mécanisme d'action n'a de même été connu qu'après la découverte des prostaglandines. Le terme d'AINS devenu classique a été conservé alors que ceux d'« inhibiteurs de la synthèse des prostaglandines » ou d'« anti-prostaglandines » seraient plus appropriés.

Les AINS sont sans doute la classe pharmacothérapeutique la plus utilisée aussi bien en automédication qu'en prescription dans des syndromes aigus ou des affections chroniques, notamment rhumatismales. Ils figurent aussi parmi les principaux fournisseurs d'effets indésirables souvent graves. [6]

1.2.2.2. Généralités

Les anti-inflammatoires non hormonaux ou non stéroïdiens (AINS) regroupent les substances qui diminuent les réactions inflammatoires de l'organisme et ne sont pas apparentées à des hormones (stéroïdes). [6]

La famille des AINS comporte de nombreuses substances appartenant à plusieurs familles chimiques, dont le point commun est d'être des acides faibles. [6]

1.2.2.3. Mécanisme d'action des anti-inflammatoires non stéroïdiens

L'unité de la famille repose sur son mécanisme d'action responsable de quatre effets pharmacodynamiques majeurs.

Les eicosanoïdes se forment à partir des phospholipides de la membrane cellulaire (figure 1.1). Une enzyme, la phospholipase A₂, provoque la formation d'acide arachidonique, suivie de réactions « en cascade ». Dans ce processus complexe, interviennent deux enzymes clés, la cyclo-oxygénase et la lipo-oxygénase. La première est à l'origine de la formation des prostaglandines et du thromboxane A₂, la seconde des leucotriènes et de la prostacycline.

Les AINS sont des inhibiteurs de la cyclo-oxygénase (COX) et par là de la formation des prostaglandines et du thromboxane A₂. [6]

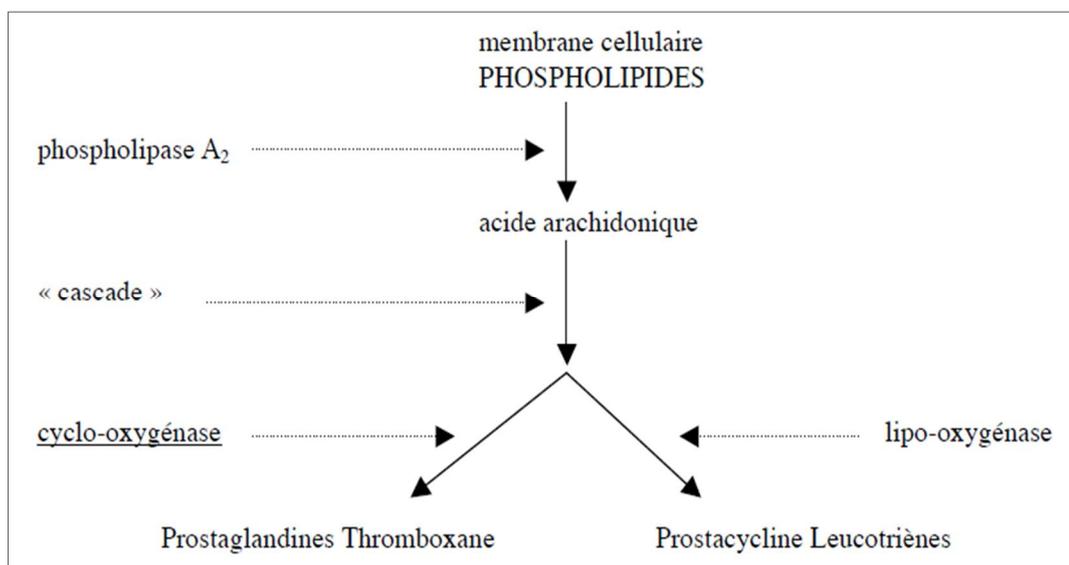


Figure 1.1 : formation des eicosanoïdes.

L'inhibition de la COX est réversible, sauf dans le cas de l'aspirine, d'où l'effet rémanent de l'aspirine.

Il existe deux isoformes de la COX :

- ✓ La COX1 constitutive (reins, estomac, vaisseaux, etc.) a un rôle physiologique. Son inhibition est responsable des effets indésirables des AINS, elle est immédiate.
- ✓ La COX2 inductible par des autacoïdes (IL1, TNF α) en cas d'inflammation. Son inhibition est responsable des effets pharmacodynamiques des AINS ; elle augmente avec la durée de l'administration.

La sélectivité des AINS par rapport aux isoformes de la COX est toujours relative et très variable. On peut schématiquement les répartir en trois classes en fonction de leur pouvoir inhibiteur in vitro :

- Inhibiteurs préférentiels de la COX1 : flubiprofène, kétoprofène, indométacine, aspirine, naproxen, ibuprofen, fénoprofen.
- Inhibiteurs préférentiels de la COX2 : acide niflurique, salicylate de sodium, diflunisal, piroxicam, méclofénamate, sulindac, diclofénac, nimésulide, célécoxib, méloxicam.
- Inhibiteurs prépondérants de la COX2 : coxibs. [6]

1.2.2.4. Effets pharmacodynamiques

- ❖ **Effet anti-inflammatoire** : atténuation des phénomènes inflammatoires impliquant aux phases précoces, les prostaglandines (vasodilatation, œdème, douleur), sans effet sur les autres phases, en particulier les processus entraînant des lésions tissulaires chroniques
- ❖ **Effet antalgique** : atténuation de la douleur d'origine périphérique, au départ des influx nociceptifs (les prostaglandines sensibilisent les terminaisons nerveuses centripètes aux hormones locales algogènes, notamment la bradykinine, libérées lors de l'inflammation). Un effet direct sur la moelle épinière est possible
- ❖ **Effet antipyrétique** : diminution de la fièvre et retour à la normale de la température corporelle par abaissement du seuil du thermostat hypothalamique (la fièvre est due à l'action sur l'hypothalamus des prostaglandines ; les pyrogènes provoquent la sécrétion par les macrophages d'interleukine 1 qui provoquent leur formation).
- ❖ **Effet anti-agrégant plaquettaire** : il résulte de l'inhibition de la formation de thromboxane. Il est surtout marqué avec l'aspirine en raison de l'irréversibilité de son action. [6]

1.2.2.5. Indications générales et traitements médicaux

1.2.2.5.1. Indications générales

- Les syndromes douloureux aigus : céphalées, migraines, syndrome prémenstruel, douleurs dentaires, mais aussi douleurs post-opératoires, etc. L'efficacité est variable, surtout marquée pour les douleurs d'origine périphérique et s'accompagnant d'inflammation.

- Les syndromes fébriles.
- En rhumatologie, les anti-inflammatoires sont le plus souvent prescrits pour résorber les douleurs articulaires, les tendinites et les maux de dos.

Les traitements pharmaceutiques, notamment antalgiques, sont parfois insuffisants.

En clinique, la réponse à un AINS donné est très individuelle et il faut souvent tâtonner avant de trouver le produit satisfaisant et convenablement toléré. [6]

1.2.2.5.2. Traitements médicaux

En matière de lutter contre la douleur osseuse et articulaire, il existe une multitude de traitements efficaces, qu'ils soient médicaux, fonctionnels ou bien chirurgicaux.

La stratégie thérapeutique sera définie par le spécialiste, après examen clinique du patient, en consultation et analyse des examens complémentaires pour être adaptée à chaque cas.

1.2.2.6. Effets indésirables des anti-inflammatoires

Les effets indésirables des AINS sont nombreux, extrêmement fréquents, parfois graves, quelquefois mortels. Etant donné leur très grande utilisation, ce sont en valeur absolue les plus dangereux des médicaments.

- ✓ **Troubles digestifs** : dyspepsies, diarrhées, nausées, vomissements ; hémorragies digestives, perforations gastriques et intestinales.
- ✓ **Troubles cutanés** : rashes, urticaires, photosensibilisation ; syndromes de LYELL et de STEVENS-JOHNSON.
- ✓ **Troubles respiratoires** : crises d'asthme.
- ✓ **Troubles rénaux** : insuffisance rénale aigüe en cas de bas débit ; insuffisance rénale chronique en cas de traitement très prolongé (surtout soupçonnée pour le paracétamol).
- ✓ **Troubles hématologiques** : (série des butazones) et troubles hépatiques, éventuels.
- ✓ **Intoxications aigües** : souvent graves, en particulier avec l'aspirine (coma avec acidose métabolique) et le paracétamol (nécrose hépatique). [6]

1.2.2.7. Les principaux anti-inflammatoires non stéroïdiens AINS

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens AINS comprennent :

❖ Les dérivés salicylés

Les dérivés salicylés sont généralement des analgésiques et des antipyrétiques utilisés pour traiter les maladies rhumatismales, exemple: Aspirine (acide acétylsalicylique) : est l'un des médicaments les plus fréquemment employé dans les douleurs d'origines diverses, Aspégic (l'acétylsalicylique de lysine): est utilisé comme antipyrétique et antalgique. [7]

❖ Les dérivés de l'acide propénoïque et de l'acide butyrique

Cette classe d'anti-inflammatoire a une efficacité probablement moindre que les autres médicaments anti-inflammatoires, mais sa tolérance est meilleure, dans ce type on trouve : Ibuprofène (BRUFEN, FENALGIC), Naproxen (APRANAX, NAPROXYNE), Kétoprofène (PROFENID) et Fénopropène (NALGESIC). [8]

❖ Les dérivés de l'acide anthranilique ou fénamates

Classe d'AINS peu différente des précédentes, donnant plutôt davantage d'incidents et d'accidents digestifs, le diclofénac (VOLTARENE) étant l'un des AINS les plus vendus en France, l'acide méfénamique (PONSTYL) et l'acide niflumique (NIFLURIL). [8]

❖ Les autres AINS

Dérivés acéto-indoliques et apparentés (indométacine): utilisés pour le traitement chronique des affections rhumatismales, ses effets toxiques sont nombreux : Oxicams: piroxicam, tonoxicam, méloxicam. [8]

1.3. DICLOFENAC

1.3.1. Définition

Le diclofénac est un dérivé de l'acide anilino-phénylacétique $C_{14}H_{11}NO_2$. [3]. C'est un puissant inhibiteur de cyclo-oxygénase ayant des propriétés anti inflammatoires, analgésiques et antipyrétiques. La puissance inhibitrice du diclofénac vis à vis de la cyclo-oxygénase est supérieure à celle du naproxène. Il est recommandé dans les pathologies inflammatoires chroniques telles que la polyarthrite chronique et l'arthrose, ainsi que dans le traitement des douleurs aiguës musculo-squelettiques [7], il est souvent prescrit dans le traitement des maladies rhumatismales et utilisé comme analgésique. [9] [10]

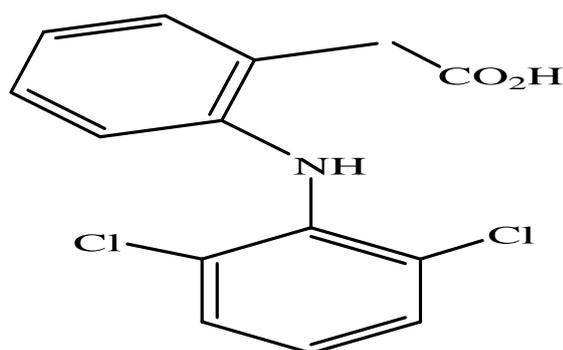


Figure 1.2 : Structure chimique du diclofénac.

Le diclofénac est contre indiqué dans l'ulcère gastrique et chez les sujets allergiques sensibilisés par l'aspirine ou d'autres inhibiteurs de la prostaglandine synthase [3]. Il est alors intéressant d'utiliser les liposomes comme une nouvelle approche de cette pathologie, en améliorant la biodisponibilité des PA et en réduisant la toxicité de diclofénac.

1.4. CONCLUSION

La thérapie par les anti-inflammatoires nécessite habituellement l'administration de doses fréquentes et, comme indésirables effets, des glucocorticoïdes et des anti-inflammatoires non-stéroïdiens sont bien connus ; cela souvent implique un risque élevé d'une augmentation de la non-conformité du **produit ou du traitement**. Les dernières années ont été témoins de développement de diverses approches visant à surmonter ces problématiques. Au moment de l'écriture, bien que de nombreuses sociétés pharmaceutiques travaillent à la commercialisation de certains systèmes avancés, le développement est nécessaire pour atteindre plus de résultats satisfaisants, en particulier ceux impliquant des études *in vivo* et des essais cliniques humains. Comme il existe un peu d'études cliniques sur l'approche des systèmes de délivrance de médicaments intra-articulaires, dans la littérature et ceux qui ont été publiés, sont, principalement, sur des liposomes. Ces approches sont, à ce jour, toujours au stade expérimental. Par conséquent, nous souhaitons davantage de recherches sur les qualités *in vivo* de ces systèmes de sorte que ces études peuvent atteindre le stade clinique et être bénéfiques.

CHAPITRE 2

LES LIPOSOMES

CHAPITRE 2 : LES LIPOSOMES

Dans un premier temps, nous décrirons les systèmes d'encapsulation. Puis, nous allons revenir plus particulièrement sur les liposomes, nous donnerons leur définition, composition, développement et propriétés physicochimiques des lipides qui constituent la membrane, propriétés qui vont régir la stabilité de cette membrane et donc du liposome. Nous nous attacherons ensuite aux différents paramètres qui permettent de contrôler la stabilité de ces matériaux. Enfin, les nombreuses applications de ces systèmes seront évoquées ainsi que leurs principales limites.

2.1. LES SYSTEMES D'ENCAPSULATION ET DE VECTORISATION

2.1.1. Définition de l'encapsulation

L'encapsulation regroupe l'ensemble des technologies qui permettent la préparation de microparticules individualisées, constituées d'un matériau enrobant, contenant un principe actif. Elle consiste à créer une membrane qui isole le principe actif du milieu environnant.

L'encapsulation de substances actives permet d'atteindre éventuellement les objectifs suivants :

- ✓ Une protection de l'ingrédient encapsulé contre une dégradation due à l'environnement (oxygène, lumière, humidité).
- ✓ Une amélioration de sa biodisponibilité.
- ✓ Un pouvoir de pénétration accru.
- ✓ Une amélioration de la substantivité vis-à-vis de la peau.
- ✓ Une diminution de la toxicité des actifs.
- ✓ Une amélioration de la présentation du produit pour faciliter le dosage, le transport, l'utilisation.
- ✓ Masquer un goût, une odeur.

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

- De maîtriser le profil de libération d'une matière active pour obtenir un effet prolongé.

- D'augmenter l'efficacité du traitement en diminuant les doses nécessaires et par conséquent les risques d'effets secondaires [11].

2.1.2. Classification des systèmes d'encapsulation

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

- ✓ Les systèmes particulaires (les microparticules et les nanoparticules).
- ✓ Les émulsions et nano émulsions (les émulsions multiples, les émulsions de Pickering et les nano émulsions).
- ✓ Les complexes moléculaires (les cyclodextrines et les complexes phospholipidiques).
- ✓ Les systèmes vésiculaires : (les liposomes par exemple), sont des systèmes colloïdaux caractérisés par une cavité hydrophile ou hydrophobe, délimitée par une membrane d'assemblages de lipides, de polymères ou de tensio-actifs assemblés en bicouche [12].

2.2. LES LIPOSOMES

2.2.1. Définition

Les liposomes sont des vésicules de quelques dizaines à quelques milliers de nm de diamètre. Ces vésicules sont composées d'une ou plusieurs bicouches de lipides, le plus souvent de nature phospholipidique, permettant d'isoler un ou plusieurs compartiments internes aqueux du milieu aqueux extérieur. Les liposomes ont longtemps été considérés comme des analogues synthétiques de cellules vivantes. Bangham et al [13], Johnson et al [14] sont les premières équipes à avoir fabriqué des liposomes.

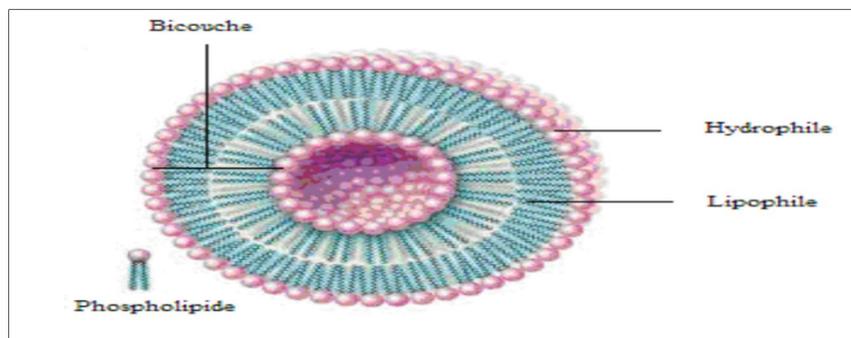


Figure 2.1 : Structure d'un liposome unilamellaire.

Leur intérêt dans le domaine pharmaceutique réside principalement dans la possibilité de vectoriser des substances, soit par inclusion dans la membrane lipidique, soit par encapsulation dans l'espace interne. Il est donc possible d'y encapsuler des principes actifs de solubilité très différente (hydrophile, amphiphile, lipophile). La connaissance de leur comportement in vivo a permis ensuite leur utilisation dans le traitement de certaines pathologies. [15]

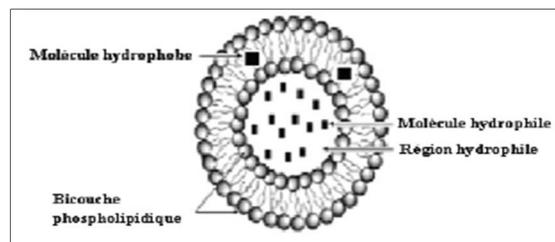


Figure 2.2 : Localisation d'un principe actif dans un liposome en fonction de sa nature chimique.

D'autre part, plusieurs avantages sont liés à l'encapsulation d'un principe actif (PA) dans des liposomes [15] :

- **Libération programmée dans le temps**

En fonction de la fluidité de la paroi liposomale. Si une réponse pharmacologique rapide est souhaitée, on peut utiliser des liposomes « fragiles » ayant une bicouche lipidique fluide.

- **Maintien de l'intégrité du PA**

Grâce au confinement dans les liposomes évitant les dégradations possibles dans la circulation sanguine.

- **Diminution de la toxicité du PA**

C'est l'un des avantages essentiels des liposomes du fait de leur faible capture dans des tissus comme le rein, le cœur ou le tractus gastro-intestinal. Le liposome peut être un moyen de protéger le patient contre les effets toxiques des principes actifs encapsulés. Par exemple, l'encapsulation de doxorubicine dans les liposomes permet de diminuer fortement la toxicité cardiaque observée avec les anthracyclines. Il en est de même pour la néphrotoxicité de l'amphotéricine B. Ils permettent également d'éviter l'apparition d'effets secondaires au moment de l'administration sous-cutanée, intradermique ou intramusculaire, que l'on observe avec certains principes actifs irritants.

- **Ciblage du PA**

L'élimination des liposomes s'effectue par capture par les cellules du système phagocytaire mononucléé (SPM). Leur endocytose augmente la concentration du PA au niveau cellulaire (lysosomes) ce qui confère un intérêt dans le traitement d'infections parasitaires ou microbiennes. Par contre, le ciblage de tissus différents du SPM relève de la mise au point de nouvelles formulations de liposomes permettant la libération du PA sur le site d'action.

- **Solubilisation de PA peu solubles dans l'eau**

Le liposome peut s'avérer intéressant pour pouvoir injecter par voie intraveineuse des composés lipophiles ou très peu solubles dans l'eau. C'est le cas de l'amphotéricine B qui est un PA lipophile dont il existe différentes formulations lipidiques sous forme de micelles (Fungizone ®), de complexe lipidique (Amphotec ®) ou de liposomes (AmBisome ®).

2.2.2. Classification des liposomes [15]

Il existe différentes classes de liposomes. Leur classification et leur dénomination se fait le plus souvent selon des critères structuraux (taille, lamellarité), mais on peut aussi les classer selon des critères plus fonctionnels (composition et leur application in vivo) ou même, selon leur méthode de préparation.

Les différents liposomes se distinguent selon leur taille mais aussi selon leur nombre de bicouches lipidiques ou lamellarité (voir tableau 2.1). Plusieurs abréviations sont utilisées pour les désigner d'après ces deux critères :

❖ **Liposomes multilamellaires**

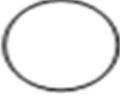
Les liposomes multilamellaires sont des liposomes comportant soit plusieurs bicouches concentriques (**O.L.V.** pour « oligolamellar vesicles » qui ont environ 5 bicouches, **M.L.V.** pour « multilamellar vesicles » qui ont entre 5 et 20 bicouches), soit plusieurs bicouches non concentriques délimitant plusieurs compartiments aqueux (**M.V.V.** pour « multivesicular vesicles »). Leur diamètre total, suivant le nombre de lamelles, est compris entre 400 à 3500 nm.

❖ **Liposomes unilamellaires**

Les liposomes unilamellaires ne comportent qu'une seule paroi et une seule cavité aqueuse. Ils peuvent être de grande taille (**L.U.V.** ou « large unilamellar vesicles ») avec

un diamètre moyen allant de 100 nm à 1 μm , ou de petite taille (S.U.V. pour « small unilamellar vesicles ») avec un diamètre moyen variant de 20 à 100 nm.

Tableau 2.1 : Classification des liposomes. [16]

Structure	SUV	LUV	MLV et OLV	MVV
Représentation				
Taille	20-100 nm	100-1000 nm	Taille très hétérogène	> 1 μm
Capacité	Contient peu de PA	Contient beaucoup de PA	Capacité intermédiaire à celle de SUV et LUV	Peu utilisés
% d'encapsulation	0.5-	35-60	5-15	
Stabilité	Plus le rayon de courbure est grand, plus faible est la tension de surface : MLV > LUV > SUV. La stabilité maximale entre 80 et 200 nm.			

2.2.3. Développement des liposomes

Dans les années 1970, plusieurs études ont établi le concept que les liposomes peuvent encapsuler des substances et être utilisés comme systèmes de transport [17,18, 19]. D'autres études, ont montré que les liposomes peuvent changer la distribution in vivo des médicaments encapsulés [20,21]. En parallèle, des méthodes ont été développées pour permettre la préparation de larges liposomes unilamellaires (LUV) avec des améliorations de l'efficacité d'encapsulation et de l'homogénéité [22]. La production des LUV par extrusion des vésicules multilamellaires (MLV) à travers des membranes de polycarbonate avec des pores de dimensions de 100 nm ou moins a été un progrès très important. [23]

Dans les années 1980 et 1990, des progrès dans la formulation des liposomes ont été obtenus afin de prolonger leur durée de vie dans la circulation sanguine. On distingue ainsi les liposomes furtifs ayant une barrière stérique créée tout autour de la bicouche lipidique le plus souvent par des polymères hydrophiles comme le polyéthylène glycol (PEG) couplés par des liaisons covalentes aux phospholipides membranaires [24, 25]. Les immunoliposomes qui portent à leur surface des anticorps spécifiques de cibles antigéniques et pouvant être furtifs aussi [26, 27], se fixent spécifiquement à la surface des cellules cibles (cellules tumorales par exemple) [28].

Parallèlement, les LUV ont été utilisés comme modèle membranaire pour étudier l'effet de certaines molécules ayant un intérêt biologique, pharmacologique ou thérapeutique [29, 30, 31] ou de certains facteurs comme la taille et la composition des liposomes [32, 33] sur la perméabilité de la membrane biologique. Ils sont utilisés aussi pour étudier l'effet de certaines molécules bioactives sur la morphologie et les propriétés surfaciques des membranes lipidiques [34].

Une approche robotique pour la construction d'un modèle cellulaire artificiel au niveau moléculaire a été récemment proposée [35]. Ce modèle est basé sur les liposomes géants dont la membrane est connue comme le modèle le plus simple de membrane de cellules vivantes [36]. Le système ainsi nommé « robotique moléculaire », est constitué d'un liposome géant (GUV) encapsulant un gène pour permettre la synthèse des protéines membranaires, d'une formule moléculaire artificielle à base d'ADN utilisée pour attacher les liposomes à la membrane des cellules vivantes et de molécules peptidiques membranaires et artificielles qui entrent dans les processus de reconnaissance de surface et de signalisation cellulaire [35].

2.2.4. Composition des liposomes

2.2.4.1. Les phospholipides

Les phospholipides (PL) sont formés d'un glycérol lié à deux acides gras (R1 et R2) et à un groupement phosphorylé. C'est ce groupement qui donne le nom aux différents PL : phosphatidylcholine (PC), phosphatidyléthanolamine (PE), phosphatidylsérine (PS) phosphatidylinositol (PI), phosphatidylglycérol (PG)... [37]

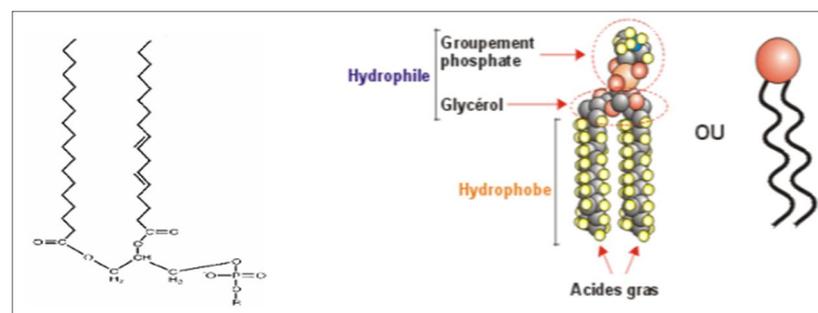


Figure 2.3 : Structure chimique de différents phospholipides et représentation du caractère amphiphile [38].

Les phospholipides diffèrent entre eux par la longueur de la chaîne hydrocarbonée des acides gras, par la charge de leur tête polaire et par le degré de saturation des chaînes lipidiques, la position d'un acide gras sur le C-1 [39].

Un phospholipide est caractérisé par la température de transition de phase (T_m : melting temperature). Elle correspond au passage des phospholipides d'un état solide ordonné à un état fluide désordonné [40, 41].

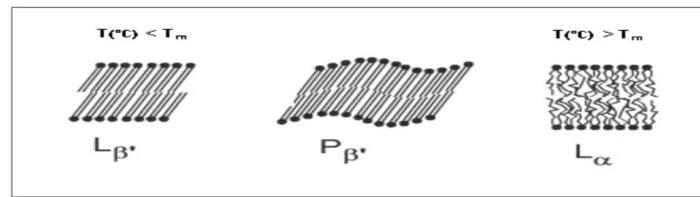


Figure 2.4 : Les différents états d'une bicouche phospholipidique en fonction de la température [42].

2.2.4.2. Les stéroïdes

Le stérol le plus employé est le cholestérol (ajouté généralement à raison de 30 % dans la composition lipidique). Il a une grande influence sur la fluidité de la paroi et sur la stabilité des liposomes dans le sang après leur administration. Le cholestérol diminue la fluidité de la bicouche lipidique car la structure rigide du stéroïde limite les mouvements des chaînes des acides gras. Il diminue ainsi la perméabilité membranaire pour les molécules hydrosolubles et enfin, il augmente la rigidité de la bicouche favorisant ainsi sa stabilité en milieu sérique [43]. Les liposomes sans cholestérol ont tendance à interagir avec les protéines du sang comme l'albumine, la transferrine ou les macroglobulines [15].

2.2.5. Stabilité [44]

Une attention particulière doit être portée à la stabilité des liposomes après leur préparation en raison de leur instabilité d'origine chimique ou physique qui peuvent modifier d'une manière importante l'activité biologique des principes actifs encapsulés. En effet, des phénomènes d'oxydation et d'hydrolyse des phospholipides sont susceptibles de se produire une fois les liposomes mis au point. Toutefois, les risques sont relativement minces lorsque les précautions de conservation et d'utilisation des phospholipides décrites sont prises.

Les liposomes doivent être conservés à +4°C sous argon, dans des tubes scellés de manière hermétique. La lyophilisation en présence de cryoprotecteurs permet d'améliorer la conservation des liposomes, même si l'intégrité des liposomes en termes de taille et de rétention des molécules encapsulées- après reconstitution du lyophilisat- est difficile à retrouver.

❖ Fuite passive

La bicouche lipidique isole un réservoir aqueux du milieu continu, lui-même aqueux. Toute espèce initialement encapsulée dans le compartiment interne aura tendance à diffuser à travers la bicouche et à être libérée dans le milieu continu sur des échelles de temps variables, fonctions de la nature de la bicouche.

Les cinétiques de ce processus de diffusion sont fonction de la taille de l'espèce encapsulée, de son coefficient de partition entre l'huile et l'eau mais dépend aussi fortement de la fluidité de la membrane, c'est-à-dire de la dynamique des lipides au sein de la membrane : une réduction de la mobilité des lipides au sein de la membrane réduit la vitesse à laquelle les espèces diffusent à travers cette bicouche [15].

2.2.5.1. Stabilité chimique

Les phospholipides assurent la stabilité de la membrane du liposome. Ces molécules sont le siège de deux types de dégradation chimique : l'hydrolyse de leurs fonctions esters et la peroxydation de leurs chaînes insaturées d'acyles. Des paramètres tels que la température, le pH et la conformation des phospholipides dans la membrane influencent la cinétique de la réaction d'hydrolyse. Un pH optimal de 6,5 et une faible température permettent de limiter la dégradation des phospholipides par hydrolyse [45].

La peroxydation des chaînes d'acyles peut être limitée grâce à certaines précautions comme une température faible, l'absence de métal lourd en contact direct avec le liposome, une atmosphère inerte ou encore l'addition d'antioxydant (vitamine C) [15].

2.2.5.2. Stabilité colloïdale

Les deux grands types d'instabilités auxquels sont soumis les liposomes sont l'agrégation et la fusion.

Les forces électrostatiques, stériques ou d'hydratation (c'est-à-dire les forces liées aux propriétés particulières des molécules d'eau près de la surface) qui existent entre deux liposomes, sont en fonction de la nature des phospholipides constituant la membrane. Le bilan de ces forces (attractives et répulsives) détermine la stabilité des suspensions de liposomes. Si les forces répulsives prédominent et si l'énergie répulsive qui en résulte est suffisamment efficace pour compenser les forces attractives, les membranes ne viennent pas au contact l'une de l'autre et la suspension de liposomes reste cinétiquement stable. Par contre, si la densité de charges à la surface du liposome est faible ou s'il n'y a pas de

répulsion stérique entre les objets, la barrière répulsive n'est alors pas suffisante pour compenser les forces attractives de Van Der Waal et les liposomes s'agrègent [46].

2.2.5.3. Paramètres influençant la stabilité de la membrane lipidique

Plusieurs paramètres peuvent influencer le comportement des lipides dans une membrane lipidique et donc influencer la membrane lipidique elle-même, sa stabilité et donc les propriétés d'encapsulation du liposome (voir annexe 1).

2.2.6. Préparation des liposomes [44]

La méthode de préparation ne doit pas être agressive vis-à-vis des substances à encapsuler. Enfin, la simplicité, la rapidité ainsi que la possibilité de mise en œuvre à l'échelle industrielle sont aussi des paramètres importants. La plupart des méthodes de préparation des liposomes font appel aux étapes suivantes :

- ✓ Dissolution des lipides dans un solvant organique.
- ✓ Elimination du solvant organique (évaporation sous vide, filtration dialysante).
- ✓ Dissolution de la substance à encapsuler dans la solution organique ou dans la solution aqueuse en fonction de sa balance hydrophile/lipophile
- ✓ Elimination des substances non encapsulées par des techniques de séparation telles que filtration sur gel, dialyse, centrifugation. Les méthodes de préparation des liposomes décrites diffèrent généralement par le mode de dispersion des phospholipides dans la phase aqueuse.

2.2.6.1. Modes de préparation des liposomes

2.2.6.1.1. Méthodes de préparation par réhydratation de film suite à l'évaporation du solvant organique (méthode classique)

Cette technique initiée dès les années 1960 par Bangham et al [13], consiste à évaporer une solution organique (généralement du chloroforme) de phospholipides sur les parois du récipient avant de le réhydrater à une température supérieure à la température de transition de phase gel-cristal liquide des phospholipides utilisés dans la préparation. Au cours de la préparation, le film phospholipidique, au contact de la solution aqueuse, gonfle, puis se décolle des parois du ballon pour former spontanément des vésicules de type MLV. Le diamètre des vésicules obtenues par cette méthode est très élevé, de l'ordre de quelques micromètres et la distribution de taille des vésicules est très hétérogène. Le faible volume aqueux encapsulé peut être augmenté par addition de lipides chargés [47].

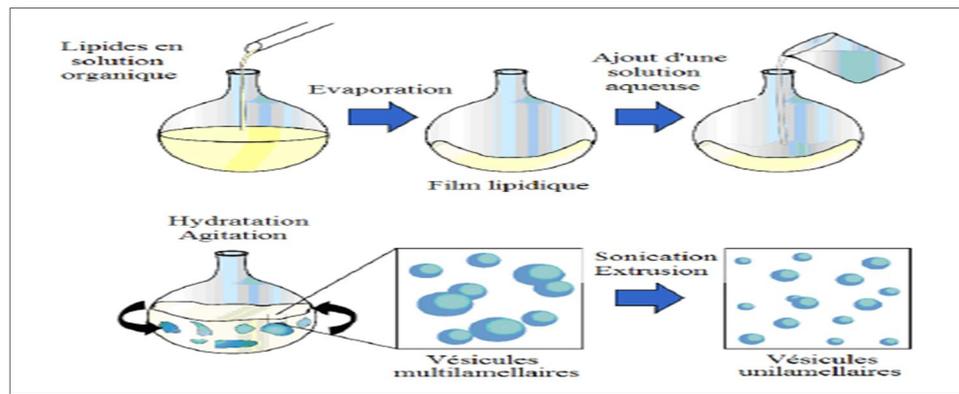


Figure 2.5 : préparation des liposomes par la méthode d'hydratation du film lipidique.

2.2.6.1.2. Méthodes fondées sur la dispersion d'une solution organique

❖ Injection d'une solution organique de phospholipides

Cette technique consiste à former spontanément des liposomes unilamellaires de petite taille à la suite d'une injection d'une solution organique de lipides dans une solution aqueuse et de l'élimination du solvant organique par évaporation sous pression réduite ou par dialyse. Les faibles diamètres et polydispersités des liposomes sont obtenus à des vitesses d'injection et d'agitation rapides ainsi qu'à des concentrations en phospholipides réduites. Cette méthode facilement transposable à l'échelle industrielle a une utilisation limitée par la solubilité des phospholipides dans les solvants organiques tels que l'éthanol, le mélange éther éthylique/ méthanol ou le diméthylsulfoxyde[48].

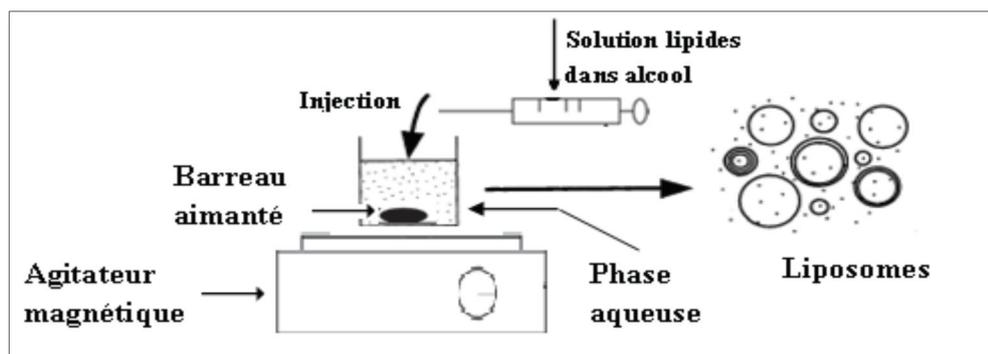


Figure 2.6 : Préparation des liposomes par injection de solvant organique [49].

❖ Evaporation en phase inverse

Les liposomes obtenus par cette méthode sont des LUV (également appelés R.E.V. pour « reverse phase evaporation vesicles »). Le principe de cette méthode est de dissoudre les phospholipides dans un solvant ou un mélange de solvants organiques (éther propylique/chloroforme 1/1 par exemple) et d'y ajouter la phase aqueuse dans un rapport

phase aqueuse/phase organique allant de 1/3 à 1/6. A ce stade, les phospholipides se placent à l'interface entre les deux phases non miscibles.

L'élimination du solvant organique par évaporation sous pression réduite entraîne un rapprochement des micelles inverses puis la formation d'un gel. Au cours de l'étape suivante, la pression est réduite davantage pour favoriser l'évaporation totale de l'éther et entraîner la rupture de la phase gel. A ce moment, les monocouches de phospholipides se rapprochent pour former les bicouches des liposomes. Les vésicules ainsi obtenues ont un volume d'encapsulation 4 fois supérieur à celui des MLV obtenues par hydratation d'un film lipidique. On peut obtenir une encapsulation maximale de 65% de la phase aqueuse permettant d'encapsuler un grand choix de macromolécules hydrosolubles avec une grande efficacité. Cette méthode reste cependant complexe et est inadaptée à la production [50].

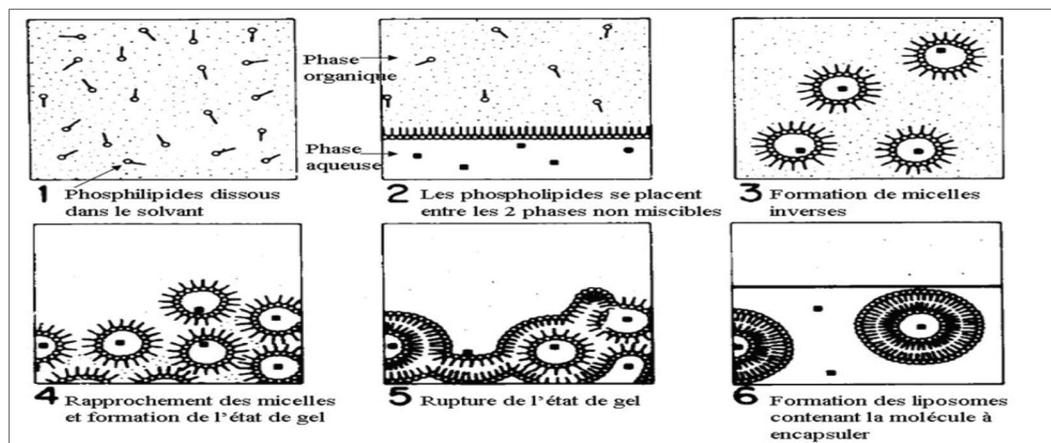


Figure 2.7 : Préparation de liposomes larges unilamellaires (LUV) par la méthode d'évaporation en phase inverse [51].

2.2.6.1.3. Méthodes basées sur l'utilisation des tensioactifs : dispersion de micelles mixtes

Dans cette méthode, les phospholipides sont d'abord solubilisés, en milieu aqueux, à l'aide d'un tensioactif (Tween 20®, Triton® x100). Il se forme alors des micelles mixtes. Le tensioactif est ensuite éliminé et les micelles s'enrichissent peu à peu en phospholipides pour former des vésicules unilamellaires de type SUV ou LUV. L'élimination du tensioactif peut se faire par dialyse, par chromatographie d'exclusion-diffusion ou par adsorption sur des résines hydrophobes. Ce sont des méthodes souvent longues et offrant un taux d'encapsulation généralement bas [47].

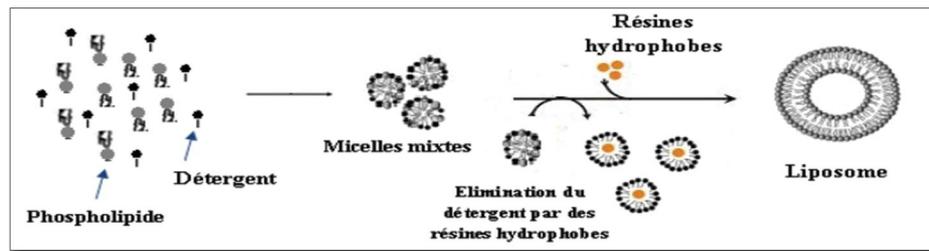


Figure 2.8 : Préparation des liposomes par la méthode d'élimination du tensioactif.

(Figure modifiée de Schmidt et al. 2010) [52].

2.2.6.2. Méthodes de réduction de taille des liposomes

2.2.6.2.1. Sonication

Saunders en 1962 propose l'utilisation des ultrasons afin de réduire le diamètre des liposomes MLV dont nous venons de voir la préparation. Les vésicules formées sont des SUV unilamellaires de petite taille ayant un diamètre compris entre 15 à 50 nm selon la composition en lipides. Généralement, on utilise un bain à ultrasons ou une sonde. Les sondes à ultrasons sont plus efficaces pour réduire la taille des liposomes car elles délivrent une forte énergie à la suspension liposomale. L'inconvénient de cette technique est qu'elle peut conduire à une destruction des liposomes ainsi qu'une libération, par la sonde, de particules métalliques. Pour ces raisons, l'utilisation d'un bain à ultrasons est conseillée pendant 5 à 10 minutes à une température supérieure au T_m des lipides [53].

2.2.6.2.2. Extrusion

❖ Membranes de polycarbonate

Cette technique consiste à forcer une suspension de liposomes à travers un filtre de polycarbonate ayant des taille de pores bien définies afin d'obtenir des liposomes d'un diamètre proche de la taille des pores du filtre utilisé [54,55, 56].

L'extrusion doit également être effectuée à une température supérieure à la température de transition des lipides T_m pour éviter, là encore, la destruction du filtre par des liposomes trop rigides qui ne passeraient pas les pores.

❖ Presse de French

L'extrusion des liposomes peut également s'effectuer sur une presse de French décrite par Hamilton en 1980. Cette méthode utilise des pressions beaucoup plus élevées que celles utilisées sur les membranes de polycarbonate. Une suspension aqueuse de lipides est placée dans une cellule de French et est rapidement extrudée à l'aide d'un piston

sous une pression de 20 000 psi à travers un petit orifice. On observe alors une fragmentation des liposomes due à des forces de cisaillement, contrairement à l'extrusion à travers les membranes où il n'y a pas de rupture vésiculaire mais simplement une diminution du nombre des lamelles des vésicules [57]. Au bout de 4 à 5 passages, on obtient 95 % de SUV avec un diamètre qui varie de 30 à 50 nm.

2.2.6.2.3. Microfluidisation

La microfluidisation permet également d'homogénéiser les suspensions de liposomes MLV. Elle consiste à forcer à haute pression (10000 psi) une suspension de liposomes à travers un filtre de 5 m. Ensuite la suspension est séparée en deux canaux qui se rejoignent dans une chambre d'interaction où les vésicules vont s'entrechoquer avec une grande vitesse pour former de petites vésicules de taille homogène. Plus on augmente le nombre de passages, plus le diamètre des liposomes diminue et plus leur bicouche tend à devenir unilamellaire. Après dix passages, on obtient des SUV avec un diamètre allant de 60 à 80 nm. Cette technique permet d'encapsuler des molécules hydrophiles avec des taux pouvant atteindre 70 %. [58, 59].

2.2.7. Caractérisation des liposomes

2.2.7.1. Taille, distribution de taille et morphologie des liposomes

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

La taille moyenne d'une dispersion aqueuse de liposomes peut être mesurée en utilisant la diffusion dynamique de la lumière (DLS) fonctionnant avec la détection hétérodyne [60, 61]. Elle permet d'indiquer la taille mais ne donne pas de précision sur la forme et la structure liposomales.

En revanche, les techniques de microscopie électronique permettent des observations possibles de la forme et la taille des liposomes, et la présence de toute fusion ou agrégation [62]. Elles fournissent également des informations sur l'épaisseur de la bicouche lipidique et la distance inter-lamellaire. Ces techniques sont faites à base de transmission d'électrons, l'exemple du microscope électronique à balayage et le microscope à transmission.

De manière complémentaire la diffraction des rayons X aux petits angles et la RMN permettent d'obtenir des renseignements sur la lamellarité des structures vésiculaires. Des techniques de fluorescence au moyen de sondes et la résonance paramagnétique électronique rendent accessible le volume de la cavité aqueuse interne [37].

2.2.7.2. Mobilité électrophorétique des liposomes

La charge liposomale est une caractéristique importante qui détermine la stabilité et l'efficacité d'encapsulation des liposomes. L'attraction électrostatique entre les bioactifs chargés et les liposomes est un moyen d'accroître l'efficacité d'encapsulation [63, 64].

La densité de charge des surfaces liposomales et l'affinité de liaison des différents ions à des vésicules lipidiques peuvent être déterminées par mesure d'un paramètre appelé, potentiel zêta. La mobilité électrophorétique est une fonction de la charge de surface de la vésicule lipidique. Elle n'est pas mesurable directement, mais peut être calculée à l'aide des modèles théoriques et une électrophorèse détermine de manière expérimentale la mobilité ou la dynamique électrophorétique [65]. La plus grande mobilité électrophorétique entraîne une suspension liposomale stable car les vésicules chargées se repoussent les unes les autres et surmontent la tendance naturelle à s'agréger. En général, les vésicules lipidiques précipitent pendant le stockage. Accroître la répulsion inter-particulaire, soit de façon électrostatique ou stérique, peut améliorer leur stabilité [66]. La charge de surface des liposomes peut influencer le temps de leur circulation dans le système sanguin et les valeurs de la mobilité électrophorétique sont influencées par la composition lipidique des liposomes [67]. La diffusion de lumière par effet doppler peut être utilisée pour mesurer la mobilité électrophorétique des liposomes [68].

2.2.7.3. Mesure de l'efficacité d'encapsulation

L'efficacité d'encapsulation va dépendre des propriétés liées à la bicouche du liposome d'un côté et celles des molécules à encapsuler de l'autre côté. Les biomolécules actives peuvent interagir avec les liposomes sous différentes formes en fonction de leurs propriétés, telles que la solubilité et la polarité [66].

➤ Pourcentage d'encapsulation (ou taux d'encapsulation)

Le pourcentage d'encapsulation est défini par la proportion de molécule associée aux vésicules par rapport à la quantité initialement présente. Cette mesure n'est effectuée qu'après élimination des molécules non encapsulées. Elle peut s'appliquer pour les substances liposolubles comme pour les substances hydrosolubles. Dans la mesure du

possible, il est préférable de rapporter le pourcentage d'encapsulation à la quantité de lipides (mg/g ou mol/g) [15].

Une réalisation majeure dans l'application médicale des liposomes est la possibilité de vectoriser une quantité suffisante de principe actif nécessaire à l'efficacité thérapeutique. Cette efficacité d'encapsulation est évaluée par l'équation suivante : [68]

$$\% \text{ d'encapsulation} = (\text{Qte encapsulée} \div \text{Qte totale}) \times 100 \dots\dots\dots (1.1)$$

La connaissance des caractéristiques des liposomes est nécessaire pour développer des formulations de liposomes qui ont des rendements optimaux de piégeage et permettent une libération contrôlée des substances bioactives. La composition lipidique et la méthode de préparation peuvent influencer l'efficacité d'encapsulation [69].

➤ **Séparation des substances non encapsulées**

Dans tous les cas, pour utiliser les liposomes comme vecteurs de substances pharmaceutiques, dosées et à libération contrôlée, il est important d'éliminer toute trace de principe actif qui ne serait pas encapsulé. Avec certaines techniques d' « active loading », cette étape n'est pas nécessaire ainsi qu'avec certains PA hydrophobes qui sont souvent totalement associés aux lipides. Dans le cas contraire, plusieurs approches ont été suggérées dans différents laboratoires. Certains ont proposé la chromatographie échangeuse d'ions pour des médicaments ayant une charge nettement différente des liposomes. Mais généralement, les liposomes ont une taille beaucoup plus grande que les molécules que l'on veut encapsuler.

La séparation des substances non encapsulées peut donc utiliser des techniques fondées sur la différence de taille des composés à séparer comme la centrifugation, la chromatographie d'exclusion-diffusion, la dialyse. Vemuri et Rhodes (1995) proposent une technique d'ultrafiltration pour les drogues hydrosolubles dont la plupart des systèmes sont commerciaux [15].

2.2.8. Mécanisme de pénétration cutanée des liposomes

La peau n'est pas imperméable. Sa fonction barrière n'est pas absolue puisqu'elle est perméable à pratiquement toutes les substances. C'est le SC qui est responsable de la perméabilité de la peau.

2.2.8.1. Facteurs influençant la pénétration percutanée

En fait, le mécanisme de la pénétration des principes actifs aux différents niveaux de la peau est très complexe. Ce qu'on peut affirmer, c'est qu'elle est sous la dépendance de nombreux facteurs (voir annexe 1).

2.2.8.2. Absorption cutanée des liposomes

Dans deux revues récentes, El Maghraby et al, ont décrit cinq mécanismes possibles de pénétration cutanée des liposomes [70, 71]. Ces mécanismes sont décrits ci-dessous et correspondent aux points A à E dans la Figure suivante :

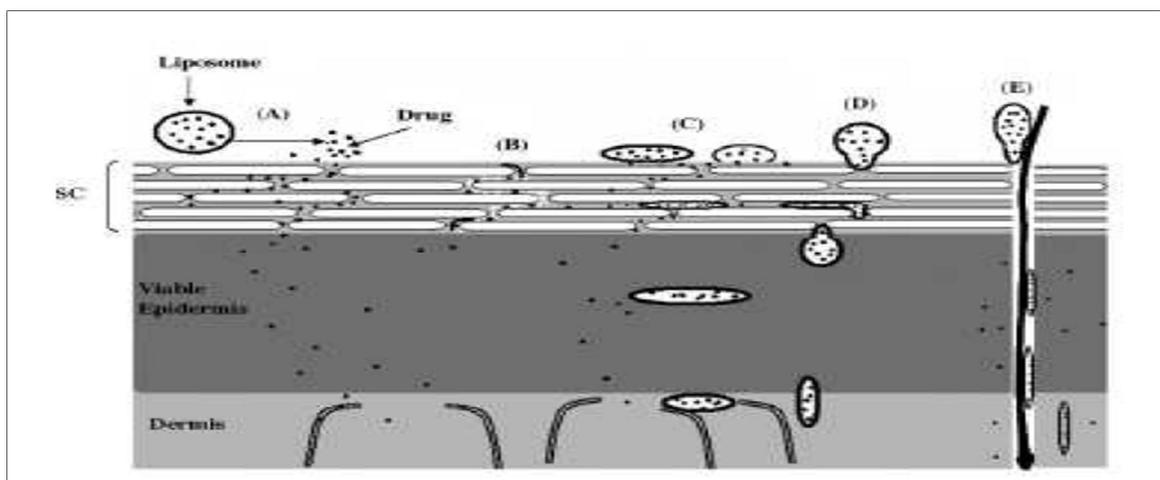


Figure 2.9 : Mécanismes de pénétration des liposomes au niveau cutané [70].

- Le mécanisme A, correspond à la libération de la substance active seule, qui sort des liposomes pour pénétrer, indépendamment, des vésicules dans la peau.
- Pour le mécanisme B, les composants des vésicules engendrent une modification de l'ultra structure de la matrice lipidique du stratum corneum. Les composants des liposomes jouent un rôle de promoteur d'absorption en diminuant l'imperméabilité du stratum corneum, favorisant ainsi la pénétration de la molécule encapsulée. Ce mécanisme a été confirmé par certains auteurs [72, 73] mais infirmé par d'autres [74, 75].
- Pour le mécanisme C, les liposomes pourraient s'adsorber sur la surface du stratum corneum avec pour conséquence un transfert direct de la molécule encapsulée du liposome vers la peau. Les vésicules pourraient également fusionner et se mélanger à la matrice lipidique du stratum corneum, augmentant ainsi la répartition de la molécule dans la peau [76].

- Le mécanisme D correspond à la pénétration des liposomes sous forme intacte. Bien qu'il soit maintenant également accepté que les liposomes conventionnels ne pénètrent pas sous forme intacte dans la peau, ce mécanisme de pénétration a été décrit par Cevc et al. pour les liposomes déformables ou Transfersomes [77, 78, 79].
- Enfin, le mécanisme E correspond à une pénétration des liposomes via les annexes cutanés. La pénétration des liposomes au niveau des follicules pileux a été montrée et mise à profit pour cibler ces annexes cutanées [80]. Malheureusement, il n'y a pas d'évidence d'une pénétration à travers ces follicules [71].

2.3. CONCLUSION

Les formulations à base de liposomes ont fait l'objet de nombreuses études qui ont montré tout leur intérêt pour améliorer la biodisponibilité des molécules après application topique. Elles offrent donc beaucoup de possibilités de développement pour des produits toujours plus performants. Leur mise au point nécessite la mise en œuvre de techniques de fabrication et de contrôle plus sophistiquées que pour les émulsions, lotions ou gels classiques.

Quoique d'un coût élevé, les liposomes sont indéniablement très efficaces parce qu'ils parviennent à faire quelque chose de très difficile : traverser la barrière quasi imperméable de notre peau et la membrane des cellules et libérer ensuite les principes actifs pharmacologiques qu'ils transportent.

PARTIE
EXPERIMENTALE

CHAPITRE 3

MATERIELS ET METHODES

CHAPITRE 3 : MATERIELS ET METHODES

3.1. OBJECTIF

Nous décrirons dans ce qui suit les différentes méthodes empruntées et matériels utilisés en vue de la formulation des liposomes encapsulant le diclofénac. L'objectif visé est d'arriver à un assemblage de bicouches membranaires afin d'obtenir des vésicules ayant la taille, la structure et l'élasticité désirée avec une répartition homogène, ainsi qu'une polydispersité et une efficacité d'encapsulation considérable [81].

Ce chapitre est divisé en deux parties, la première sera consacrée aux études de pré-formulation où sont sélectionnés les matières premières et le procédé de fabrication suite à une recherche bibliographique. Dans la deuxième partie, nous suivrons une approche plus méthodologique, nous tenterons d'optimiser la formule afin qu'elle puisse présenter des caractéristiques physicochimiques satisfaisantes.

3.2. METHODE EXPERIMENTALE DE LA PRE FORMULATION

La pré formulation est une étape clé dans le développement de nouvelles formules médicamenteuses, c'est l'ensemble des études qui permettent d'aboutir à une forme galénique stable et efficace. Dans cette partie, nous allons décrire les matières premières choisies ainsi que leurs principales caractéristiques. Puis, les différentes techniques expérimentales utilisées au cours de cette étude seront présentées.

3.2.1. Choix des matières premières de la suspension liposomale

L'ensemble des MP utilisés dans les essais de pré-formulation sont les suivants :

- Lécithine de soja.
- Cholestérol.
- Ethanol 96%.
- Diclofénac diéthylamine.
- Eau purifiée.
- Propylène glycol.

3.2.1.1. Phase organique

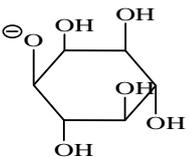
La phase organique contient la lécithine de soja et le cholestérol qui sont dissout dans l'éthanol.

✓ Lécithine de soja

Les lécithines sont des lipides contenant du glycérol et de l'acide phosphorique Elles sont présentes dans tous les tissus animaux et végétaux (très abondantes dans le

cerveau, le jaune d'œuf et de soja) [82]. Le tableau suivant représente l'ensemble des caractéristiques de la lécithine de soja utilisée dans notre étude.

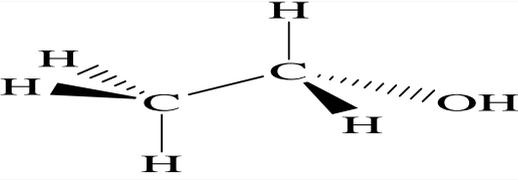
Tableau 3.1 : Caractéristiques de la lécithine de soja [83].

Propriétés	Spécifications
Composition chimique	la lécithine de soja contient 21% de phosphatidylcholine, 22% de phosphatidyléthanolamine et 19% de phosphatidylinositol, ainsi que d'autres composants.
Description	Elles font parties des lipides conjugués, qui se distinguent par la présence dans la molécule d'une substance autre que les acides gras et alcools. Et plus précisément des lipides phosphorés appelés phospholipides ou phosphatides. Ce groupe comprend en plus des lécithines dont la base est la choline, les céphalines (ayant pour base la colamine), les sphingomyélines et les acides phosphatidiques (ne contenant pas d'azote). Comme nous l'avons précisé dans la définition, la lécithine est composée du glycérol et de l'acide phosphorique donc il s'agit d'un phosphoglycéride. Les phosphoglycérides contenant la choline (alcool azoté) sont appelés phosphatidylcholines ou lécithines.
Aspect et solubilité	Aspect : Lécithines varient considérablement dans leur forme physique, de visqueux semi-liquides en poudres, en fonction de la teneur en acides gras libres. Ils peuvent également varier en couleur du brun au jaune clair, selon à savoir si elles sont blanchies ou écruées ou sur le degré de pureté. Quand ils sont exposés à l'air, l'oxydation rapide se produit, aussi résultant en une couleur jaune ou brun foncé. Solubilité : soluble dans l'éthanol, mélange méthanol chloroforme...
Propriétés physiques - T° de transition - Densité (liquide) - HLB	41- 55 ° C 0,97 g / cm ³ 4
Structure chimique	$ \begin{array}{l} \text{CH}_2 - \text{O} - \text{CO} - \text{R} \\ \\ \text{CH} - \text{O} - \text{CO} - \text{R}' \\ \\ \text{CH}_2 - \text{O} - \text{P}(\text{OH})(\text{O} - \text{X}) \end{array} $ <p>X= choline $\text{---CH}_2\text{---CH}_2\text{---N}^+(\text{CH}_3)_3$ ou éthanolamine $\text{---CH}_2\text{---CH}_2\text{---NH}_3^+$ ou inositol</p> 
Stabilité et stockage	Lécithines se décomposent à pH extrême. Ils sont également hygroscopiques et sujettes à une dégradation microbienne. Lorsqu'il est chauffé, lécithines oxydent, foncer, et se décomposent. Les températures de 160-180 °C provoqueront la dégradation dans les 24 heures. grades de lécithine fluide ou cireux doivent être conservés à la chambre la température ou au-dessus ; des températures inférieures à 108C peuvent causer séparation. Toutes les qualités de lécithine doivent être conservées dans des récipients bien fermés abri de la lumière et de l'oxydation.
Rôle	Lécithines sont principalement utilisés dans les produits pharmaceutiques comme dispersants, émulsifiants et agents stabilisants. Dans la préparation de liposomes (Lécithine de liposomes dans lesquels est incluse en tant que composante des bicouches ont été utilisés pour encapsuler des substances médicamenteuses ; leur potentiel en tant que nouveaux systèmes d'administration a été étudié)

✓ Ethanol 96%

Le solvant est de préférence un alcool miscible à l'eau en toutes proportions, notamment l'éthanol, les caractéristiques de celui-ci sont représentées dans le tableau suivant.

Tableau 3.2 : Caractéristiques physico-chimiques de l'éthanol 96 % [87] [83]

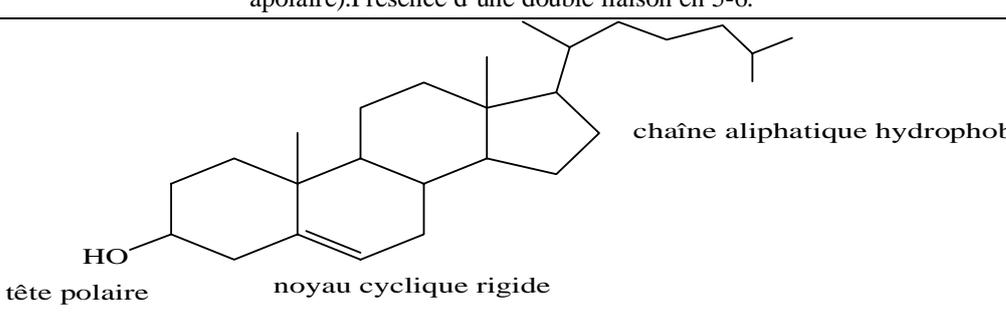
Propriétés	Spécifications
Nom chimique	Ethanol
Aspect et solubilité	Aspect : liquide incolore, limpide, volatile et inflammable, hygroscopique. Solubilité : miscible à l'eau et au chlorure de méthylène
Propriétés chimiques -Formule brute -Masse molaire	C ₂ H ₆ O 46,07 g/mol
Propriétés physiques -T° d'ébullition - Densité	78 ° C 0,805 à 0,812
Structure chimique	
Rôle	Solvant utilisé dans la solubilisation de la phase organique

✓ Cholestérol

Le cholestérol est une substance cireuse molle (qui est de nature de cire), trouvée parmi les lipides ou de graisses dans le sang et dans toutes les membranes cellulaires, concentré essentiellement dans le cerveau et la moelle épinière, il est le stérol majeur dans le corps humain et appartient à une classe de molécules appelées stéroïdes, utilisé pour former des membranes cellulaires, plusieurs hormones, la vitamine D, et les acides biliaires nécessaires pour digérer les graisses présentes dans nos aliments [84] [85].

Le cholestérol utilisé est fourni par laboratoire Merck, le tableau suivant représente ses spécifications [86] [83].

Tableau 3.3 : Caractéristiques de cholestérol.

Propriétés	Spécifications
Nom systémique	Cholest-5-en-3-β-ol
Composition chimique	Présence de quatre cycles carbonés, 3 cycles pyraniques (à 6 carbones) A, B et C et un cycle furanique D (à 5 carbones). Présence d'une fonction alcool sur le carbone 3, cette dernière constitue la tête polaire, donc la partie hydrophile du cholestérol. La fonction OH du cholestérol peut être estérifiée par un acide gras qui rend la molécule totalement insoluble dans l'eau. Présence d'une chaîne hydrocarbonée hydrophobe sur le carbone 17 (la queue aliphatique apolaire). Présence d'une double liaison en 5-6.
Structure chimique	 <p>HO tête polaire noyau cyclique rigide chaîne aliphatique hydrophobe</p>
Aspect et solubilité	Aspect : poudre cristalline presque blanche avec au plus un ton jaune brunâtre Solubilité : pratiquement insoluble dans l'eau, assez soluble dans l'acétone et dans l'éthanol à 96 %
Propriétés chimiques	
-Formule brute	$C_{27}H_{46}O$
-Masse molaire	386,65 g / mol
- HLB	2,7
Propriétés physiques	
-T° de fusion	147 – 150 °C
-Point d'ébullition	200 °C Décomposition
- Densité	1,07 g/cm ³ (20 °C)
Stabilité et stockage	Le cholestérol est sensible à l'action de la lumière. Le cholestérol est stable et doit être stocké dans un récipient bien fermé, abri de la lumière.
Rôle	Il a un rôle de « tampon thermique » : à 37°, il limite le mouvement des phospholipides, donc la fluidité membranaire diminue ; à des températures plus basses, il empêche l'entassement des phospholipides. Dans les liposomes l'incorporation de cholestérol confère une stabilité accrue par augmentation de la rigidité des parois phospholipidiques.

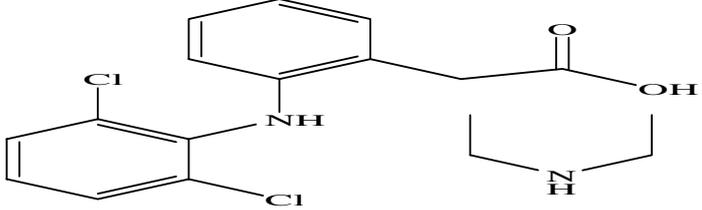
3.2.1.2. Phase aqueuse

La phase aqueuse contient le principe actif dissout dans l'eau purifiée et le propylène glycol.

✓ Principe Actif : Diclofénac de diéthylamine

Le Diclofénac est un anti-inflammatoire non stéroïdien (AINS) dérivé de l'acide phénylacétique du groupe des acides arylcarboxyliques. Il possède les propriétés suivantes : activité antalgique, antipyrétique, anti-inflammatoire et inhibition de courte durée des fonctions plaquettaires. L'ensemble de ces propriétés est lié à une inhibition de la synthèse des prostaglandines. [88]. Le tableau suivant représente l'ensemble des caractéristiques de Diclofénac de diéthylamine utilisé dans notre préparation.

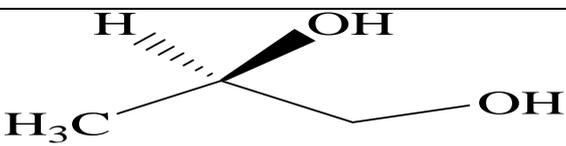
Tableau 3.4 : Caractéristiques physicochimiques de Diclofénac de diéthylamine [89].

Propriétés	Spécifications
Nom selon l'IUPAC	{ 2 - [(2,6-dichlorophényl) amino] phényl } acétate d'éthyle
Aspect et solubilité	Aspect : poudre cristalline, blanche ou faiblement jaunâtre, faiblement hygroscopique. Solubilité : assez soluble dans l'eau, facilement soluble dans le méthanol, soluble dans l'éthanol à 96 pour cent, peu soluble dans l'acétone.
Propriétés chimiques -Formule brute -Masse molaire	$C_{18}H_{22}Cl_2N_2O_2$ 369,28548 g/mol
Propriétés physiques -T° de décomposition	280 ° C
Structure chimique	
Classe thérapeutique	Anti inflammatoire non stéroïdien (AINS)

✓ Propylène glycol

Appartenant à la grande famille des alcools, le propylène glycol est un élément chimique très utilisé par l'industrie pharmaceutique grâce à ses propriétés émulsifiantes reconnues. Ce diol intervient dans la solubilisation de PA et la composition de nombreux polymères tels que le polyester [83].

Tableau 3.5 : Propriétés de propylène glycol [83, 87, 90].

Propriétés	Spécifications
Nom selon l'IUPAC	propane-1,2-diol
Aspect et solubilité	Aspect : Liquide, visqueux, limpide, incolore, inodore, hygroscopique Solubilité : Miscible à l'eau, l'acétone, le chloroforme, l'alcool comme l'éthanol à 96%, soluble dans l'éther et insoluble dans des huiles.
Propriétés chimiques -Formule brute -Masse molaire	$C_3H_8O_2$ 76,0944 ± 0,0036 g/mol
Propriétés physiques -T° de fusion - T° d'ébullition - Masse volumique - pKa	- 59 °C 188,2 °C 1,036 g /cm ³ (25 °C) 14,8 (25 °C)
Structure chimique	
Applications	- Humectant à 15% - Conservateur à 15–30% - Solvant ou co solvant (pour les formes topiques) à 5–80 %
Rôle	co-solvant et agnet conservateur

✓ **Eau purifiée**

C'est le solvant utilisé pour dissoudre le Diclofénac de diéthylamine.

3.2.2. Choix du procédé de fabrication

Le bon choix de la méthode de préparation dépend des propriétés physicochimiques, des caractéristiques du matériau à piéger et celles des ingrédients du liposome ainsi que la nature du milieu dans lequel les vésicules sont dispersées, la concentration efficace de la substance à piéger et son potentiel de toxicité, les processus supplémentaires impliqués lors de l'application et le transfert des vésicules, la taille optimale et la polydispersité sont des paramètres importants à prendre en compte pour choisir une méthode de préparation adéquate.

Pour toute formulation de liposomes, le choix de la méthode de préparation dépend non seulement de la composition lipidique, de la structure des liposomes (uni ou multilamellaires) et de leur taille mais aussi en fonction de critères de stabilité et de devenir in vivo. Les volumes et les taux d'encapsulation doivent être élevés si l'on veut

encapsuler des quantités importantes de macromolécules tout en limitant les volumes à administrer.

Dans notre étude, nous souhaitons obtenir des liposomes dont la taille permet une pénétration (taille minimale) cutanée avec un volume aqueux (cavité aqueuse) maximal.

Pour la préparation des liposomes nous avons opté pour la méthode d'évaporation en phase inverse. D'après les travaux des auteurs dans le domaine des liposomes, cette méthode constitue un progrès dans la préparation des liposomes puisqu'elle a permis l'obtention de liposomes unilamellaires avec une grande cavité aqueuse (LUV ou REV pour Reverse phase Evaporation Vesicles).

Les liposomes ainsi préparés sont caractérisés par une efficacité d'encapsulation relativement élevée pour les molécules hydrophiles comme le sucrose (65%), la carboxyfluorescéine (57%) et la ferritine (54%), de la ciprofloxacine (>73%) [15].

De plus, le volume aqueux encapsulé par les LUV préparés par cette méthode est 4 fois supérieur à celui des MLV préparés par la méthode d'hydratation du film lipidique et 30 fois supérieur à celui des SUV obtenus par sonication [22].

3.2.4. Essais de pré formulation

L'objectif de ces essais est la confirmation que le procédé ainsi que les matières premières choisis précédemment conduisent à la formation de liposomes. La microscopie électronique à balayage ainsi que la granulométrie laser nous permettront de mettre en évidence la morphologie et la taille de ces liposomes. Cet ajustement se fera aussi pour l'ensemble des conditions opératoires (ordre d'ajout des phases, T° du process, vitesse et temps d'agitation).

❖ Protocole expérimentale

Le schéma suivant illustre les étapes de préparation de la suspension liposomale.

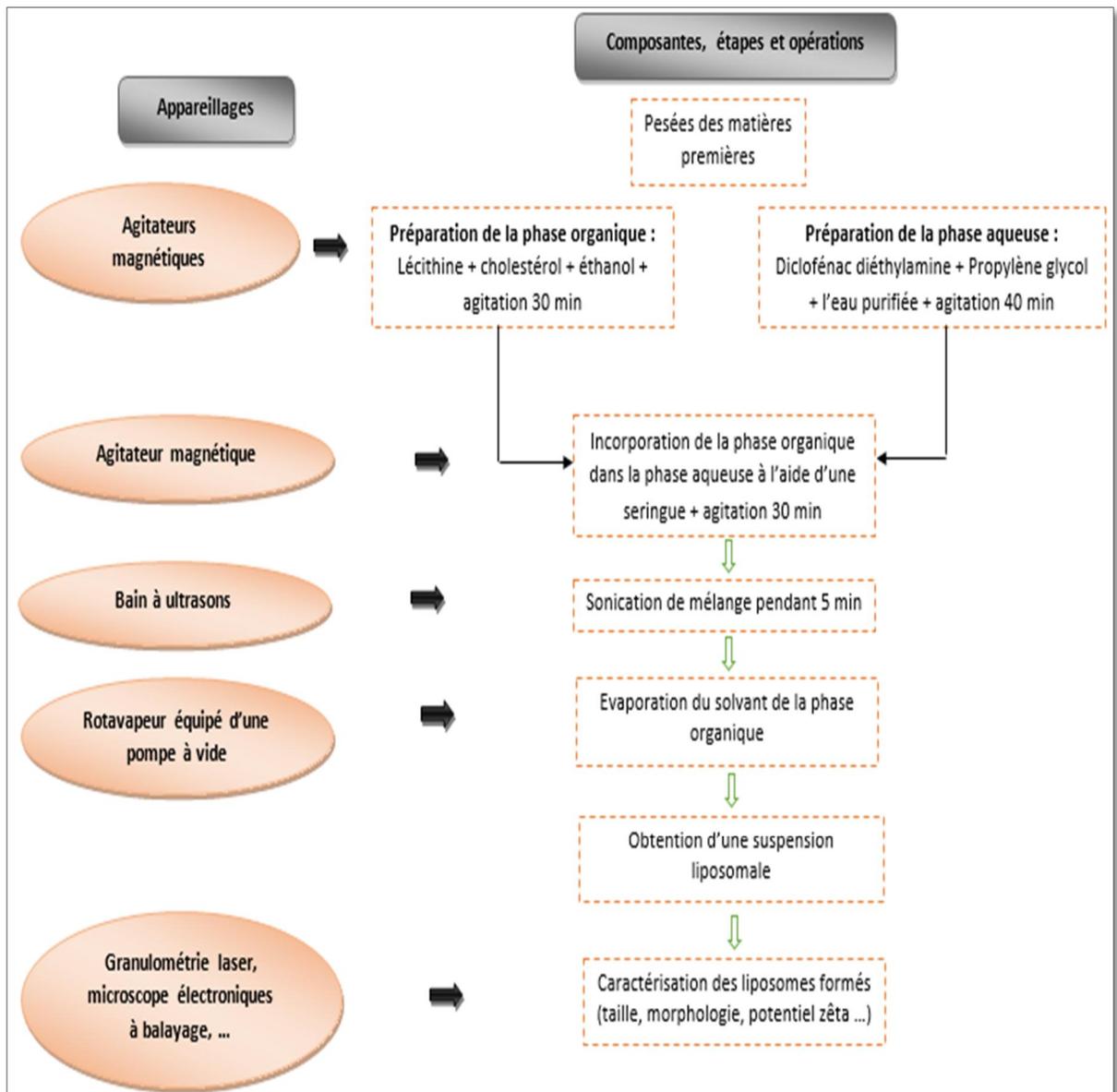


Figure 3.1 : Protocole opératoire de suspension liposomale.

3.2.4.1. Mode opératoire de la préparation de la suspension liposomale

Les pesées sont réalisées à l'aide d'une balance analytique de marque électronique KERN EG et les agitations sont réalisées à l'aide des agitateurs magnétiques chauffants avec régulateurs de température.

On prépare une phase liquide constituée essentiellement d'une solution de lipides amphiphiles et de cholestérol de nature lipophile dans un solvant organique et plus particulièrement l'éthanol. Cette phase est alors ajoutée sous agitation modérée, dans une solution aqueuse d'eau purifiée contenant éventuellement un principe actif associé de nature hydrophile qui est le diclofénac diéthylamine. Après une sonication et évaporation sous pression réduite, on obtient une suspension de concentration voulue en liposomes.

Les temps d'agitation sont fixés à partir des essais de pré formulation.

✓ **Préparation de la phase organique**

Dans l'éthanol, on introduit sous forte agitation à température ambiante, la lécithine et le cholestérol. On poursuit l'agitation 30 min jusqu'à dissolution et obtention d'une phase homogène, jaune pâle.

✓ **Préparation de la phase aqueuse**

Dans le propylène glycol, on introduit sous agitation, le Diclofénac diéthylamine. On poursuit l'agitation pendant 20 min puis on ajoute la quantité suffisante de l'eau purifiée et on continue l'agitation pendant 20 min jusqu'à l'obtention d'une phase homogène et transparente.

✓ **Préparation des liposomes**

On incorpore la phase organique dans la phase aqueuse par le biais d'une seringue. L'addition se fait sous forte agitation pendant 30 min. Il se forme une phase laiteuse des micelles inverses. Cette préparation a été suivie par une sonication dans un bain à ultrasons par effet mécanique d'ondes ultrasonores pendant 5 min.

✓ **Evaporation du solvant organique**

L'évaporation se fait dans un évaporateur rotatif qui possède les caractéristiques techniques suivantes [91, 92] :

- **Zone d'évaporation (Bain Marie)** : elle couvre une grande plage de température, entre 20 et 180 °C, à l'aide d'un bain chauffant. Le mélange turbulent à l'intérieur du ballon d'évaporation rotatif augmente le taux d'évaporation. La rotation prévient aussi une surchauffe locale du mélange ainsi que des chocs.
- **Entraînement par rotation avec conduit de vapeur** : l'unité d'entraînement garantit une rotation régulière du ballon d'évaporation. Le conduit de vapeur intégré transporte la vapeur de la zone d'évaporation jusqu'à la zone de refroidissement. Le système de vapeur empêche entre autres une contamination croisée.
- **Zone de refroidissement** : la vapeur de solvant pénètre très rapidement dans le réfrigérant. Ici, l'énergie contenue dans la vapeur du solvant est transférée au produit réfrigérant (en général de l'eau) de façon entraîner une condensation du solvant. Il existe plusieurs type d'assemblage celui utilisé pour la préparation est : assemblage en verre A (réfrigérant diagonal, pour un équipement à hauteur réduite,

pour distillations standard, alimentation en continu du ballon d'évaporation via un robinet en verre)

- **Ballon récepteur** : le ballon récepteur recueille le solvant condensé.
- **Vide (Pompe à vide)** : grâce au système d'étanchéité élaboré, on obtient un haut degré de vide stable en combinaison avec un régulateur de vide et une pompe à vide. Le vide élimine aussi les émissions de vapeur pendant le processus et constitue un élément de sécurité important. La basse pression diminue le point d'ébullition du fluide à l'intérieur du rotavapeur. Cette caractéristique permet de traiter le produit en douceur même à des performances d'évaporation plus élevées que celles réalisées à pression ambiante.

La performance d'évaporation est influencée par la pression de distillation (vide), la température du bain chauffant, la vitesse de rotation et la taille du ballon d'évaporation.

On évapore sous pression réduite (éthanol + eau). La température du bain-marie est de 55 °C est au-dessus de la T° de transition de la lécithine avec une vitesse de rotation 90 rpm pendant 45 min. On obtient une solution laiteuse à 2 % de Diclofénac diéthylamine.

La formulation liposomale a été stockée dans un réfrigérateur à 4 °C pour de plus amples études.

3.2.5. Caractérisation des liposomes

Le but de cette caractérisation est l'identification des liposomes et la détermination de leurs tailles.

3.2.5.1. Microscopie électronique à balayage (MEB)

Pour confirmer la formation des liposomes, il est nécessaire d'utiliser une technique qui permet d'observer morphologiquement les vésicules. Nous avons choisi, la microscopie électronique à balayage. Cette technique est communément utilisée pour l'imagerie des suspensions liposomales puisqu'elle permet d'observer la forme des vésicules. L'imagerie permet de visualiser des objets en deux dimensions, et l'analyse des images permet d'apprécier non seulement la taille mais aussi la forme des particules [93].

Le MEB utilisé dans ce cas est de type FEI QUANTA 650 qui comporte les composants suivants : le canon à électrons (1), l'anode est à la masse (2), le système de condenseurs (3), le système de balayage (4), une lentille objectif (5), L'échantillon qui peut être massif (6) est porté par une platine eucentrique permettant des mouvements en x, y, z,

f et q. Différents types de détecteurs servent à compter les particules émises : détecteurs d'électrons secondaires (7), d'électrons rétrodiffusés (9) ou de rayons X (8) [94] (voir annexe 3).

Contrairement au MET et au microscope optique, l'image n'est pas formée par une lentille objectif. L'image est formée de manière séquentielle en balayant la surface de l'échantillon par un faisceau d'électrons. Le MEB fournit des images de la surface en relation avec le mode de diffusion des électrons par l'échantillon. Le nombre d'électrons secondaires et rétrodiffusés émis varie en fonction du point d'impact du faisceau d'électrons sur la surface. Ces électrons sont détectés dans des détecteurs. Une image est obtenue en relation avec l'intensité du courant électrique produit en chaque point de la surface. La topographie de l'échantillon est ainsi obtenue [95].

Une goutte de la suspension a été montée sur une lame de verre clair. Elle a ensuite été séchée à l'air libre pour visualisation sous balayage électronique microscope à des grossissements adéquats.

3.2.5.2. Taille des liposomes

La granulométrie laser permet de déterminer la taille des liposomes et l'indice de polydispersité (PI). Ce deuxième paramètre reflète la distribution de taille des liposomes et leur homogénéité [98].

Le granulomètre laser utilisé dans ce cas est de type HORIBA scientific nano partica SZ 100, équipé d'un logiciel constitué de cinq sous-ensembles : un système de dispersion du liquide, un système de mise en circulation du liquide, un ensemble électronique d'amplification des signaux de mesure, un banc optique et un micro-ordinateur [99].

En voie liquide, le liquide porteur doit être transparent à la longueur d'onde utilisée, neutre chimiquement, et d'indice de réfraction différent de celui de la particule.

La distribution granulométrique est déduite de l'interaction entre un ensemble de particules et le faisceau laser incident par l'analyse de la tache de diffraction du faisceau.

Les particules ne sont pas analysées individuellement, mais dans leur ensemble. Il est nécessaire de faire appel à des algorithmes de traitement d'image pour convertir le signal en informations granulométriques, distribution en taille et nombre de particules

correspondant à chaque taille. La grandeur mesurée est un **diamètre équivalent de diffraction**.

Le dépouillement des résultats est réalisé par traitement informatique. Les résultats (diamètre, médian) sont exprimés en nanomètres avec trois chiffres significatifs.

1 mL de la formulation liposomale a été dilué avec 10 mL de l'eau distillée qui doit être transparent et neutre chimiquement et son indice de réfraction 1,33. Les mesures ont été prises.

3.3. DEMARCHE METHODOLOGIQUE DE LA FORMULATION

Dans cette partie, la mise au point des expériences est décrite afin d'expliquer le cheminement qui a conduit au choix de la formulation.

Nous allons suivre une approche plus méthodologique. Cette approche mettra en œuvre la méthode des plans d'expériences. Cette méthode nous permettra d'aborder plus efficacement certains problèmes rencontrés en pré-formulation. Elle repose sur la planification expérimentale : C'est-à-dire l'optimisation du choix des essais et de celui de leur enchaînement au cours de l'expérimentation.

Les réponses obtenues seront soumises à une modélisation mathématiquement, ce qui permettra de déterminer l'effet de chaque facteur choisi sur les réponses sélectionnées et d'en déduire la zone optimale. Les calculs nécessaires à cette démarche seront effectués par le logiciel MODDE 6.0.

L'objectif du travail étant de connaître avec précision les effets supposés éventuellement non linéaire des trois facteurs sur les propriétés physico-chimiques notamment la granulométrie (la taille et l'indice de polydispersité) et le comportement électro cinétique (potentiel zêta).

On se propose d'approcher cet objectif par la méthode des plans d'expérience avec objectif modélisation en surface de réponse. Nos facteurs étant indépendants, on opte pour un plan factoriel fractionnaire de type box Benhken, sachant qu'il satisfait aux critères sur le plan statistique. Ce plan propose 15 essais dont trois de répétabilité qui se situent au centre de gravité. Le modèle polynomiale correspondant est de type quadratique avec interaction d'ordre 1, il s'écrit comme suit :

$$Y_i = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{33}x_3^2 \dots\dots\dots (3.1)$$

Où :

Y_i : représente la réponse.

X_i : représente les facteurs compris entre -1 et +1

a_i : représente les coefficients du modèle.

3.3.1. Matrice d'expériences

Le plan d'expériences est construit en remplaçant les différents niveaux des facteurs par des variables centrées réduites, qui sont comprises entre « 0 », « -1 » et « 1 », La matrice d'expérience obtenue est illustrée dans le tableau ci-dessous.

Tableau 3.6 : Matrice d'expériences.

N° Exp	Ordre aléatoire	X1	X2	X3
1	3	-1	-1	0
2	12	1	-1	0
3	10	-1	1	0
4	11	1	1	0
5	8	-1	0	-1
6	5	1	0	-1
7	15	-1	0	1
8	13	1	0	1
9	4	0	-1	-1
10	14	0	1	-1
11	6	0	-1	1
12	2	0	1	1
13	1	0	0	0
14	9	0	0	0
15	7	0	0	0

X1 X2 X3 sont des variables centrées réduites des facteurs associé respectivement aux rapports : éthanol/ eau, lécithine/éthanol, cholestérol/lécithine.

Le domaine d'intérêt des facteurs de contrôle est [96, 97] :

- **Cholestérol** : 10 % - 50 %.
- **Lécithine de soja** : 1 % - 5 %.
- **Ethanol** : 5 % - 100 %.

Dans notre cas, nous avons choisi d'étudier l'influence de trois paramètres seulement. Tous les autres facteurs seront figés (procédé de fabrication, quantité de la phase aqueuse, quantité de Diclofénac de diéthylamine et la de P.G).

En appliquant le mode opératoire décrit précédemment, nous avons réalisé les 15 essais de cette matrice.

3.3.2. Méthodes de caractérisation et d'évaluation des liposomes

Après la production, la caractérisation des liposomes est nécessaire pour qualifier, quantifier et approuver la capacité des liposomes pour une application bien précise. Cette connaissance permet de développer des formulations ayant des rendements optimaux de piégeage et de libération contrôlée. Les méthodes de caractérisation doivent être exactes et rapides.

3.3.2.1. Détermination de la taille, de la polydispersité et du potentiel zêta

Les tests sont réalisés par l'équipement HORIBA SZ-100, instrument de la série nanopartica présentant un outil analytique flexible pour caractériser les propriétés physiques des petites particules. En fonction de la configuration et de l'application, le système peut être utilisé comme un analyseur de taille de particules, de polydispersité ou également utilisé pour mesurer le potentiel zêta. Les applications typiques pour le SZ-100 comprennent des nanoparticules, les colloïdes, émulsions, suspensions et submicroniques [99] (voir annexe 3).

L'analyse de la taille des particules est effectuée par diffusion de lumière dynamique (DLS) avec une large gamme de tailles et de concentrations de particules mesure des particules de taille à la fois 90 ° et 173 °. En fonction des propriétés physiques de l'échantillon, la plage dynamique est de 0,3 nm - 8 µm. La limite inférieure est influencée par la concentration, la force avec l'échantillon diffuse la lumière, et la présence de grosses particules non désirées. La limite supérieure est influencée par la densité de l'échantillon depuis DLS est calqué sur tout mouvement venant de mouvement brownien, pas décantation gravitationnelle.

Des dilutions de 10 fois dans de l'eau distillée sont faites sur des échantillons prélevés à partir des suspensions liposomales obtenues. Des mesures du diamètre moyen (nm) de ces échantillons sont déterminées à 25°C et à un angle de diffraction de 90 °. L'indice de polydispersité (PI) est également déterminé. Les résultats sont exprimés pour chaque échantillon par la moyenne ou par la moyenne Z.

La charge sur la surface des particules est caractérisée par le SZ-100, en mesurant le potentiel zêta d'une suspension. L'échantillon est injecté dans une cellule à usage unique, les résultats de la mobilité électrophorétique permettent d'aboutir au potentiel zêta. Le

potentiel zêta de l'échantillon est le plus souvent utilisé comme indicateur de stabilité de la dispersion. Grande amplitude des valeurs de potentiel zêta indiquent qu'une suspension électrostatiquement stabilisé restera stable.

Les mesures sont faites 3 fois, sur des échantillons prélevés à partir des suspensions liposomales obtenues après dilution 10 fois avec de l'eau distillée. Les résultats sont représentés comme étant la moyenne des 3 mesures \pm écart-type.

3.3.2.2. Détermination du taux d'incorporation de diclofénac dans les liposomes par HPLC

L'efficacité de piégeage du diclofénac diéthylamine dans les vésicules liposomales a été déterminée par la méthode de dosage en utilisant le HPLC.

Tout d'abord, les suspensions liposomales sont soumises à une centrifugation. Les conditions optimales de la centrifugation dépendent essentiellement de la taille des liposomes. Si les liposomes sont multilamellaires et très gros, une centrifugation à $700 \times g$ pendant 10 min est suffisante [100]. Il est possible de sédimenter de très petites vésicules par centrifugation à $150\,000 \times g$ pendant 4 heures [101].

Les vésicules étaient séparées dans une ultracentrifugeuse de type SIGMA 3-30 K à haute vitesse à 15500 tours pendant 6 heures à une température maintenue à 4°C [102].

Les sédiments et les liquides surnageants ont été séparés afin d'être analysés par HPLC.

❖ Dosage par HPLC

Le taux d'incorporation de Diclofénac dans les liposomes est déterminé par analyse HPLC. Il n'existe pas de monographie spécifique pour le dosage du Diclofénac dans les liposomes. On a procédé en se basant sur une méthode d'analyse déjà appliquée pour la forme émulsion au laboratoire PRODIPHAL (voltarène émulsion).

Ce test est destiné, d'une part, à analyser qualitativement l'échantillon par identification et comparaison des temps de rétention de la solution standard et celle de l'échantillon et, d'autre part, à analyser quantitativement par détermination du titre en PA en utilisant les aires de chaque pic.

Les solutions standard de Diclofénac diéthylamine sont préparées avec une concentration de 30 mg dans 100 mL de méthanol.

La quantité du PA dans les sédiments a été déterminée après solubilisation des vésicules dans 10 mL méthanol qui sont ensuite filtrés et injectés. Les surnageants sont filtrés puis injectés directement.

Dans un premier temps, la phase mobile est laissée circuler dans la colonne de l'appareil pendant au moins 30 min. Par la suite un volume de 20 microlitre (20 µL) est injecté séparément comme solution standard et 5 microlitre (5 µL) solution contenant l'échantillon, on commence par le culot puis le surnageant, en utilisant une micro seringue appropriée et on refait la même chose pour les autres échantillons.

❖ Procédure de Calcul

On mesure les surfaces des pics des surnageant des échantillons et de la solution de standard. La quantité du diclofénac non piégée dans les surnageants est calculée par la formule suivante :

$$S_{std} = 20 \times [C]_{std} \times k \dots \dots \dots (1) \quad \text{et} \quad S_{ech} = 5 \times [C]_{ech} \times k \dots \dots \dots (2)$$

$$\frac{(1)}{(2)} \Rightarrow S_{std} \div S_{ech} = 4 \times ([C]_{std} \div [C]_{ech})$$

$$[\text{Diclofénac}]_{\text{échantillon}} = \frac{4 \times S_{ech} \times [C]_{std}}{S_{std}} \times 50 \dots \dots \dots (3.2)$$

Avec :

- S_{std} : Surface du pic de standard.
- S_{ech} : Surface du pic de l'échantillon.
- $[C]_{std}$: Concentration de standard en mg / mL.
- $[C]_{ech}$: Concentration de l'échantillon en mg / 50 mL.
- k : Coefficient de rétention de Diclofénac de diéthylamine.
- 4: Coefficient de multiplication du volume.
- 50 : Volume totale de la suspension liposomale.

❖ Détermination de pourcentage d'encapsulation

L'efficacité de piégeage a été déterminée par l'équation suivante :

$$\% \text{ d'encapsulation} = \left(\frac{\text{Qte totale} - \text{Qte non encapsulée}}{\text{Qte totale}} \right) \times 100 \dots \dots \dots (3.3)$$

Où :

Qte totale : quantité théorique de médicament utilisé pour préparer la formulation (2 g).

Qte non encapsulée : quantité de médicament dans le surnageant.

CHAPITRE 4

RESULTATS ET DISCUSSION

CHAPITRE 4 : RESULTATS ET DISCUSSION

Dans ce chapitre, est exposé et discuté l'essentiel des résultats expérimentaux et numériques issus des essais de pré-formulation et de la formulation. Le détail de tous les résultats quantifiés est classé en annexe.

4.1. ETUDE DE PRE FORMULATION DE LA SUSPENSION LIPOSOMALE

4.1.1. Caractérisation sensorielle

L'analyse organoleptique de la formulation liposomale, obtenue suivant la méthode d'évaporation en phase inverse, a l'aspect d'une suspension laiteuse, de couleur jaune pâle d'aspect homogène et lisse.

4.1.2. Caractérisation par Microscopie Electronique à Balayage

La nature tridimensionnelle de la formulation liposomale a été confirmée par Microscopie Electronique à Balayage, représentée sur la figure (4.1). L'examen de ces particules séchées sur une lame et observées par le MEB permet de tirer les conclusions suivantes :

Elles sont sous forme sphérique déformables et de tailles nanométriques. La déformation est due à l'affaissement des liposomes, déposés sur la lame, soumis à la force de tension interfaciale solide (verre)- liquide (liposome) et à l'action de la gravitation, à l'image d'une goutte d'eau déposée sur un support propre de tension interfaciale relativement basse.

Les types des liposomes identifiés sont des larges unilamellaires vésicules (LUV) selon leur mode de préparation. Ici, on peut remarquer que la taille du liposome est d'environ 600 nm.

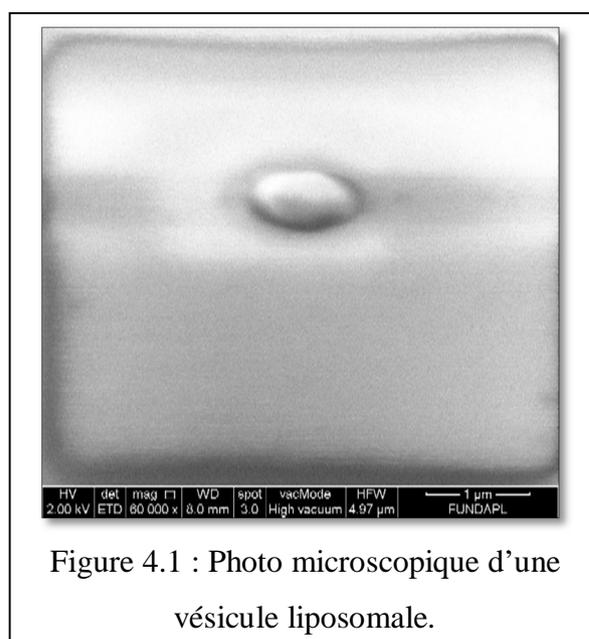


Figure 4.1 : Photo microscopique d'une vésicule liposomale.

4.1.3. Caractérisation par DLS

Les vésicules de formulation ont été évaluées par DLS et les résultats énumérés en termes de moyenne Z, du diamètre hydrodynamique et de polydispersité sont consignés dans le tableau (4.1).

Tableau 4.1 : Résultats de pré formulation.

Moyenne (nm)	Ecart type (nm)	Moyenne modale (nm)	Moyenne Z (nm)	Polydispersité (PI)
137,7	14,4	138,8	177,9	3,110

La distribution granulométrique en surface projetée est représentée par la fréquence en volume des vésicules (f_i) dans chaque catégorie de taille en fonction de la taille des gouttelettes (d_i) en nm. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau suivant.

Tableau 4.2 : Résultats de distribution granulométrique.

Diamètre (nm)	Fréquence (%)
118,74	7,944
134,16	35,026
151,57	39,070
171,25	17,960

La distribution granulométrique est illustrée par la figure suivante

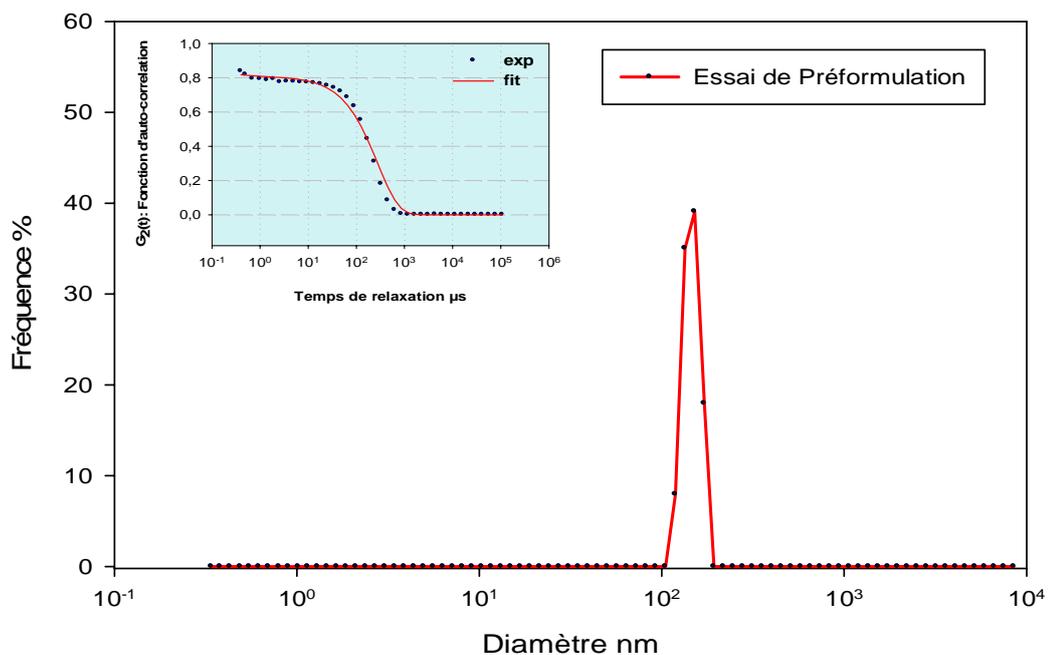


Figure 4.2 : Distribution granulométrique de la suspension liposomale « préformulation ».

4.2. RESULTATS DE LA FORMULATION

4.2.1. Distribution granulométrique

Les vésicules formulés ont été évalués par rapport à la taille, selon le diamètre hydrodynamique (D_h), l'indice de polydispersité (PI), la moyenne Z et la qualité du fit ou de l'ajustement de la fonction d'autocorrélation (complète ou mauvaise).

Le diamètre hydrodynamique , D_h , est déterminé à partir de l'ajustement de la courbe de distribution granulométrique et est calculé automatiquement par logiciel de l'appareillage selon l'équation suivante ci-dessous qui montre que la vitesse du mouvement brownien est définie par le coefficient de diffusion de translation (D) qui peut être converti en une taille de particule en utilisant l'équation de Stokes-Einstein : [104]

$$D_h = \frac{kT}{3\pi\eta D} \dots\dots\dots(4.1)$$

Où :

D_h = diamètre hydrodynamique.

k = constante.

T = température absolue.

η = viscosité de Boltzmann.

D = coefficient de diffusion.

La moyenne Z (Z-average) est déterminé à partir de l'ajustement du fit de la fonction d'autocorrélation $g_2(t)$. La moyenne Z est analysé par utilisation de la technique cumulant [105]. Etant donné que le calcul de la moyenne Z est mathématiquement stable, le résultat de cette moyenne est insensible au bruit, ce qui en fait un paramètre de taille DLS préféré.

La moyenne Z (D_z) peut être exprimée par l'intensité moyenne harmonique sur la base [106, 107] et est représenté par l'équation ci-dessous :

$$D_z = \frac{\sum_{i=1} S_i}{\sum \left(\frac{S_i}{D_i}\right)} \dots\dots\dots(4.2)$$

Ici, S_i est l'intensité diffusée à partir de particules i et D_i est le diamètre de la particule i .

A noter que le résultat obtenu se présente sous la forme d'une moyenne harmonique. Cette moyenne z est déterminée selon une méthode ISO [ISO13321 : 1996 ou plus récemment ISO22412 : 2008].

Trois cas se présentent à nous [103]:

- ✓ Le système est mono dispersé ($PI \sim 1$) avec une qualité certaine de l'ajustement de la fonction d'autocorrélation $g_2(t)$: $\boxed{\text{Moyenne } Z = D_h}$.
- ✓ Le système est polydisperse ($PI > 2$): $\boxed{\text{Moyenne } Z > D_h}$.
- ✓ Le fit ne tient pas compte de la partie initiale de la fonction d'autocorrélation ou sa qualité de détermination est médiocre: $\boxed{\text{Moyenne } Z < D_h}$.

Au vu de ces trois cas qui figurent, tous, dans nos résultats expérimentaux, et vue l'absence de valeurs du diamètre hydrodynamique pour les essais 05, 06, 09, 11, 12, 14 et 15, nous avons entrepris une démarche sélective qui consiste à choisir entre la valeur de la moyenne Z ou de D_h , sachant qu'elles indiquent la même grandeur, en tenant compte des trois critères cités précédemment et cela pour chaque essai.

Pour le calcul du diamètre hydrodynamique, à partir de la distribution granulométrique, nous tenons compte de la polydispersité du système :

Dans le cas d'une distribution monomodale (figure 4.3), à l'image de l'essai 01, la valeur de D_h correspond au diamètre le plus fréquent qui est le mode et qui correspond au pic.

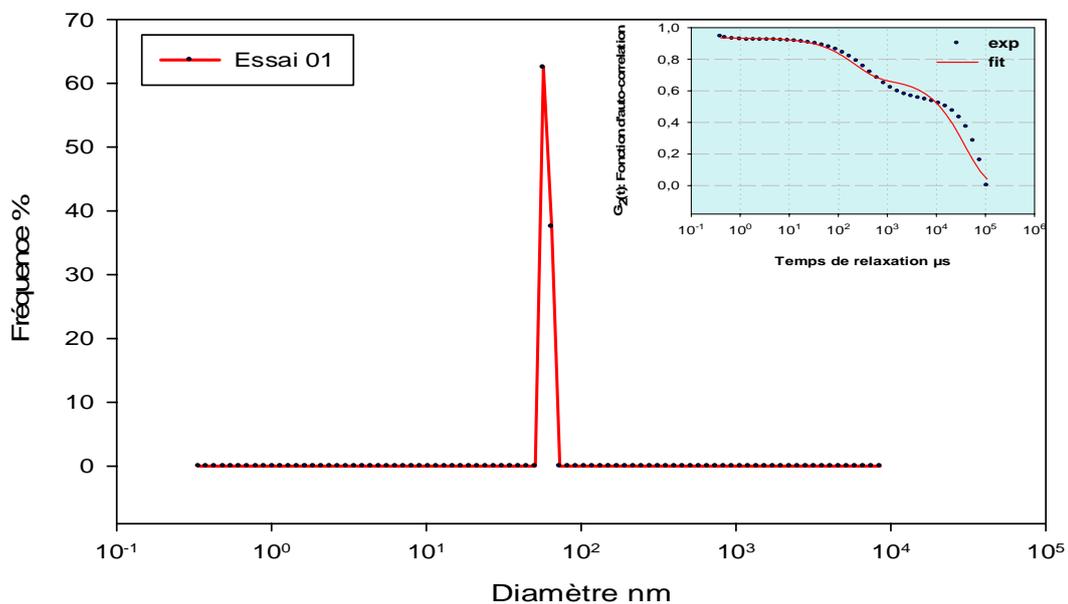


Figure 4.3 : Distribution granulométrique monomodale de l'essai N° 1.

Dans le cas d'un système bimodal (présence de deux modes), par exemple celui de l'essai 07, figure 4.4, le mode le plus fréquent doit être calculé manuellement qui représente le nombre de la population majoritaire, à la taille D_h .

Pour ce faire, on remarque que les liposomes de taille D_{h1} , diffusent une intensité I_1 de la lumière et ceux de taille D_{h2} , diffusent une intensité I_2 de la lumière. L'intensité de la lumière diffusée est proportionnelle au volume total des liposomes qui est égal à $n \frac{4}{3} \pi R_h^3$, où n est le nombre des liposomes de rayon hydrodynamique R_h et le terme « $\frac{4}{3} \pi R_h^3$ » représente le volume élémentaire d'un liposome supposé sphérique.

$$\text{Pour le mode rapide on a : } I_1 \sim n_1 \frac{4}{3} \pi R_1^3$$

$$\text{Et pour le mode lent on a : } I_2 \sim n_2 \frac{4}{3} \pi R_2^3$$

Le rapport des deux intensités I_1/I_2 permet d'évaluer le rapport des nombres des deux populations et de déduire celle qui est la plus importante.

$$\frac{I_1}{I_2} = \frac{n_1}{n_2} \times \left(\frac{R_1^3}{R_2^3} \right) \quad \Rightarrow \quad \frac{n_2}{n_1} = \frac{I_2}{I_1} \times \left(\frac{D_1^3}{D_2^3} \right) \quad \dots\dots\dots(4.3)$$

En appliquant cette formule, par exemple pour l'essai 07, on trouve que $\frac{n_2}{n_1} = 0,01$ soit, n_1 de petite taille est 100 fois plus grand que n_2 de grande taille ! Ainsi, le mode pour cet essai est associé au pic N° 1 (12,4 nm).

A noter que le logiciel du dispositif HORIBA propose systématiquement le mode auquel correspond à l'intensité la plus grande, ce qui n'est pas toujours vrai.

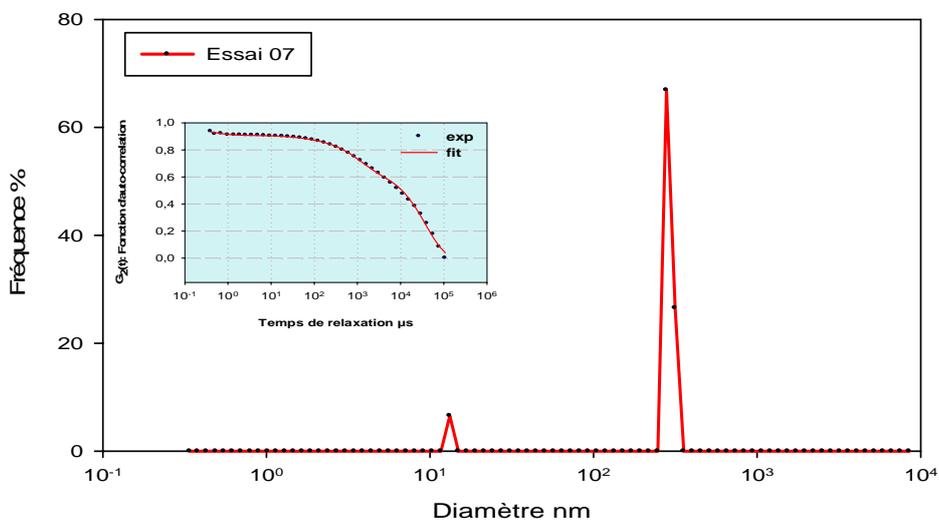


Figure 4.4 : Distribution granulométrique bimodale de l'essai N° 7.

Un mauvais ajustement de la fonction d'autocorrélation, à l'image de la figure 4.5 de l'essai 05, montre clairement l'absence d'une distribution granulométrique. Dans cette situation, s'offre à nous que la valeur de la moyenne Z.

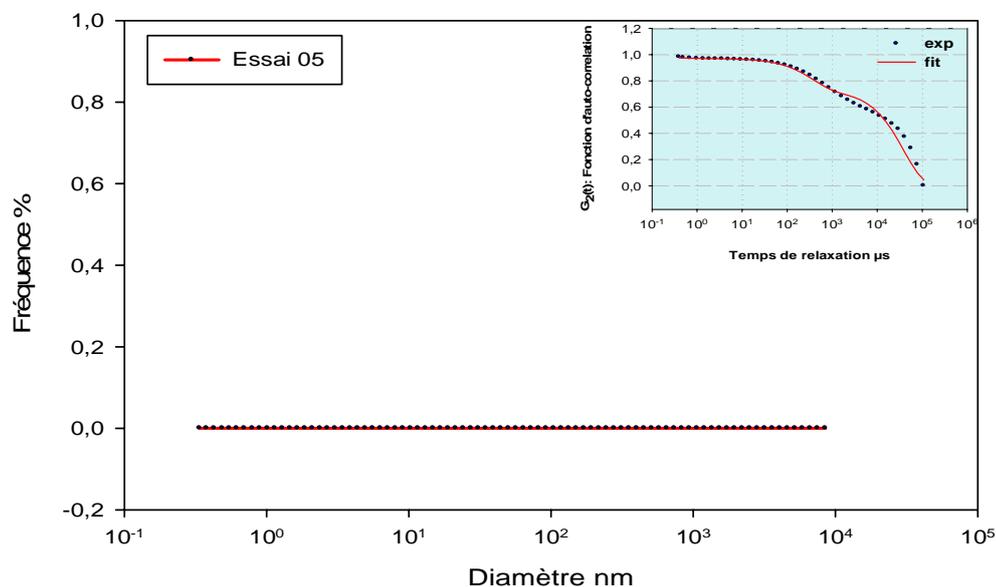


Figure 4.5 : Distribution granulométrique de l'essai N° 5.

Les autres courbes expérimentales de distribution granulométriques sont regroupées dans l'annexe 2.

Au terme de la démarche empruntée en vue de sélectionner la taille et son calcul pour tous les essais, on se propose de consigner les valeurs dans le tableau 4.3 ci-dessous.

Tableau 4.3 : La taille et la distribution de taille des particules des préparations liposomales.

N° d'expérience	Moyenne Z (nm)	D _h (nm)	PI	Fit	Choix de taille (nm)
N1	58,64	57,7	1,518	complet	57,7
N2	89,44	22,9	2,009	complet	22,9
N3	56,55	95	1,439	complet	95
N4	16,36	621,7	0,298	complet	621,7
N5	103,79	---	3,108	mauvais	103,79
N6	102,42	---	3,508	mauvais	102,42
N7	57,04	12,4	1,261	complet	12,4
N8	31,42	31,2	0,654	complet	31,2
N9	94,17	---	3,022	mauvais	94,17
N10	826,8	1380	0,151	complet	1380
N11	80,80	---	2,187	mauvais	80,80
N12	81,48	---	2,368	mauvais	81,48
N13	73,75	7,6	1,781	complet	7,6
N14	99,02	---	3,298	mauvais	99,02
N15	94,07	---	3,122	mauvais	94,07

4.2.2. Mesure du potentiel zêta

Les courbes suivantes représentent les résultats du potentiel zêta pour les essais N° 1 et 2, les courbes représentant les autres essais sont stockées dans l'annexe 2.

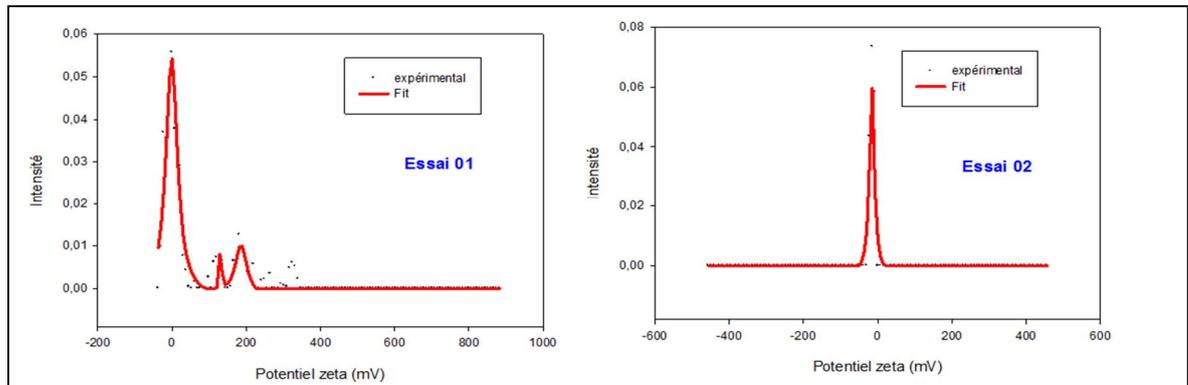


Figure 4. 6 : Courbes de l'intensité du champ électrique imposée en fonction du potentiel zêta.

Ces courbes représentent les valeurs du potentiel zêta donnant une intensité du champ électrique maximale qui doit être adaptée, loin du bruit, pour assurer une qualité de la mesure. Les résultats obtenus révèlent deux cas deux figures :

- ✓ Une courbe avec un seul pic qui démontre une qualité certaine de la mesure. C'est le cas des essais 02, 03, 04, 07, 08, 12, 13 et 14.
- ✓ Une courbe d'intensité présentant plus d'un pic, à l'image des figures (annexe 03) des essais 01, 05, 06, 09, 10, 11 et 15. Pour ces essais, nous avons déterminé une moyenne de la valeur du potentiel zêta pondérée aux valeurs des intensités aux pics. Sur ce, nous avons recalculé les valeurs du potentiel zêta et pas tenu compte des valeurs proposées par le logiciel HORIBA qui propose systématiquement la valeur du potentiel zêta au pic le plus grand.

Les différents résultats obtenus pour les valeurs moyennes pondérées du potentiel zêta sont regroupées dans le tableau ci-dessous.

Tableau 4.4 : Potentiel zêta des particules des préparations liposomales

	Pic 01		Pic 02		Pic 03		Valeur moyenne pondérée du potentiel zêta mV
	valeur	poids	valeur	poids	valeur	poids	
1	0,6	0,053	128,7	0,0079	181	0,0091	38,509
2	-14,4	0,057					-14,4
3	-46,8	0,093					-46,8
4	-25,6	0,16					-25,6
5	-113,2	0,03	-3,2	0,038			-51,72
6	-267,6	0,039	-154,4	0,012	-91,2	0,044	-171,6
7	-38,4	0,12					-38,4
8	-28	0,1					-28
9	-233,2	0,02	-150	0,002	50	0,001	-213,65
10	-113,2	0,013	6,8	0,0067	76,8	0,003	-52,67
11	-93,2	0,018	-40	0,033	13,9	0,02	-38,30
12	-6,8	0,13					-6,8
13	-23,2	0,054					-23,2
14	-16,4	0,133					-16,4
15	7,2	0,076	217	0,01	384	0,0006	34,03

La détermination du potentiel zêta permet d'appréhender la contribution électrostatique et électrocinétique à la stabilisation des dispersions colloïdales. La répulsion électrostatique interparticulaire peut empêcher l'agrégation des particules dispersées et s'opposer à des phénomènes tels que la coagulation et la floculation.

Les phénomènes électrocinétiques ralentissent la vitesse de sédimentation des particules et sont responsables de l'effet électrovisqueux [108].

Dans la littérature un potentiel zêta inférieur à 30 mV en valeur absolue signifie que le produit est instable mais ce n'est pas toujours le cas pour les produits visqueux. Dans notre cas, il est plus intéressant de privilégier des valeurs élevées que d'opter pour des valeurs inférieures à 30 mV, en valeur absolue.

D'après la matrice de corrélation réponse-réponse on voit que la taille et le potentiel zêta ne sont pas corrélés, $R < 10\%$. Cela veut dire que la taille n'est pas influée par ce dernier.

4.2.3. Efficacité d'encapsulation

On commence par l'identification du produit à analyser, le temps de rétention du PA STD est identique à celui de l'ECH, $t(\text{STD}) = 7,797 \text{ min}$, $t(\text{ECH}) = 7,797$. Ces derniers ont été déterminés à partir des chromatogrammes des figures suivantes :

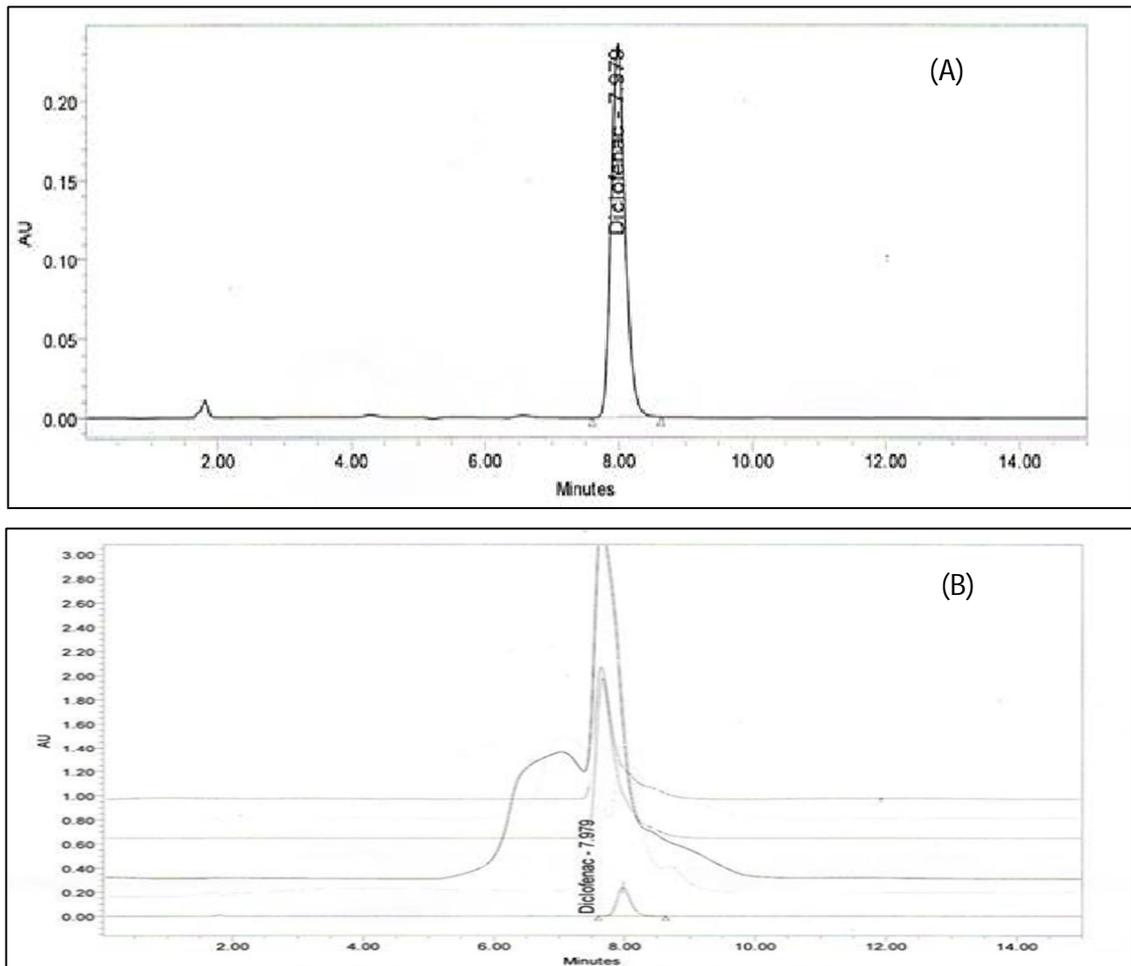


Figure 4. 7 : Chromatogramme du HPLC(A) : STD, (B) : ECH.

Les résultats de la teneur en PA et du rendement d'encapsulation pour les différents rapports sont regroupés dans le tableau (4.5).

Tableau 4.5 : Résultats de la teneur en principe actif et rendement d'encapsulation.

N° Essai	R. Ch / Lé	R. Lé / Eth	R. Eth / phase aqueuse	Teneur en PA dans le surnageant (mg/ 50 mL)	Taux d'encapsulation (%)
1	0,1	0,01	0,525	888,52	55,58
2	0,5	0,01	0,525	519,73	74,01
3	0,1	0,05	0,525	444,72	77,76
4	0,5	0,05	0,525	819,99	59
5	0,1	0,03	0,05	241,03	87,95
6	0,5	0,03	0,05	296,61	85,16
7	0,1	0,03	1	885,16	85,01
8	0,5	0,03	1	782,10	55,74
9	0,3	0,01	0,05	156,40	60,90
10	0,3	0,05	0,05	326,11	83,69
11	0,3	0,01	1	336,34	83,18
12	0,3	0,05	1	944,12	52,79
13	0,3	0,03	0,525	200,63	89,97
14	0,3	0,03	0,525	635,62	68,22
15	0,3	0,03	0,525	507,36	74,63

D'après les résultats du tableau précédent, on remarque que les résultats ne sont pas représentatifs. Ceci peut être justifié comme suit ;

Globalement, sur le plan bibliographique, il n'existe aucune monographie pour quantifier le diclofénac dans les liposomes, On a donc utilisé une méthode déjà appliquée pour la forme émulsion, une crème huile dans eau. L'analyse donne les profils suivants :

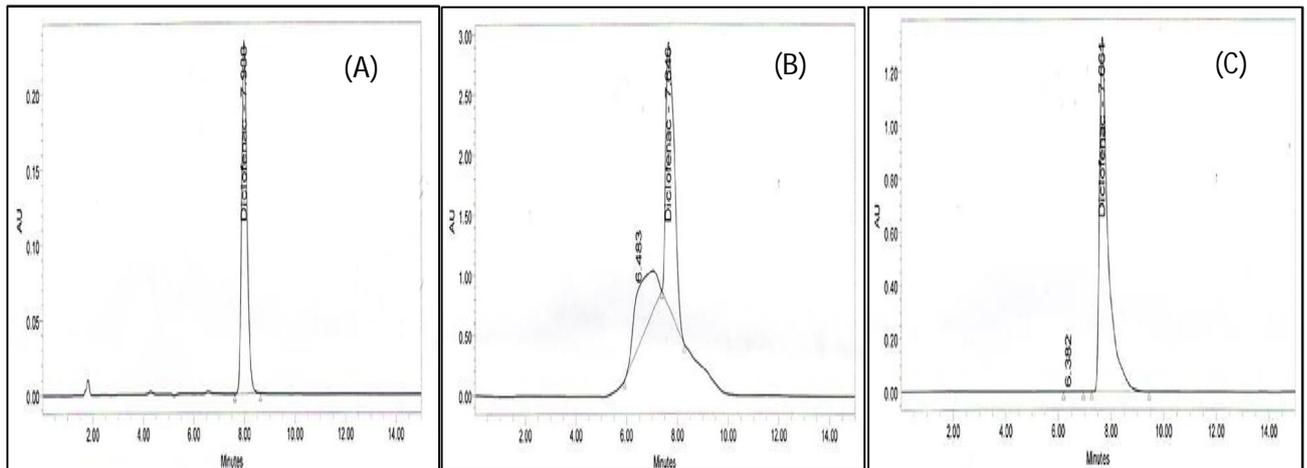


Figure 4. 8 : Chromatogramme du HPLC(A): STD, (B) : ECH culot de l'essai N°1, (C) : Surnageant de l'essai N° 2.

On remarque que les pics ne sont pas réellement gaussiens (C) par rapport au pic de STD (A), ce qui ne permet pas une analyse quantitative.

Dans le cas de (B), il n'y a pas de séparation totale de pic, cette gêne est liée aux excipients qui sont toujours présents dans les deux phases et donc une mauvaise séparation.

Le comportement chimique ou physique non idéal des réactifs et des réactions sur lesquels repose une analyse, peut être à l'origine des erreurs systématiques dues à la méthode. Ces causes de non idéalité comprennent la lenteur de certaines réactions, le fait que d'autres ne soient pas complètes, l'instabilité de certaines espèces, la non spécificité de la plupart des réactifs et l'existence éventuelle de réactions secondaires qui interfèrent avec la mesure.

On considère donc que cette méthode est comme une initiation à une méthode de dosage et on retiendra qu'elle n'est pas spécifique à la forme liposomale ce qui nécessite son amélioration dans le cadre d'une méthode d'analyse afin d'optimiser ses conditions opératoires.

4.2.4. Matrice d'expériences assortie aux réponses

Toutes les réponses obtenues à l'issue des différents contrôles effectués sur les suspensions liposomales sont rassemblées dans la matrice suivante. A noter qu'on n'a pas pris en considération le taux d'encapsulation à cause des résultats qui ne sont pas vraiment fiables, donc, on a les exclu de cette matrice.

Tableau 4.6 : matrice d'expériences assortie aux trois réponses.

N° Essai	Ordre aléatoire	Taille (nm)	Valeur moyenne pondérée du potentiel zêta (mV)	Indice de polydispersité (PI)
1	3	57,7	38,509	1,518
2	12	22,9	-14,4	2,009
3	10	95	-46,8	1,439
4	11	621,7	-25,6	0,298
5	8	103,79	-51,72	3,108
6	5	102,42	-171,6	3,508
7	15	12,4	-38,4	1,261
8	13	31,2	-28	0,654
9	4	94,17	-213,65	3,022
10	14	1380	-52,67	0,151
11	6	80,80	-38,30	2,187
12	2	81,48	-6,8	2,368
13	1	7,6	-23,2	1,781
14	9	99,02	-16,4	3,298
15	7	94,07	34,03	3,122

4.2.4.1. Evaluation de la qualité au sens statistique du modèle en surface de réponses

Dans le présent travail, l'analyse de régression a été basée sur l'évaluation de deux paramètres : R^2 et Q^2 [109].

R^2 : Permet d'évaluer le degré, en pourcentage, d'explication du modèle mathématique établi (réponse prédite) par rapport aux réponses mesurées. Un bon modèle doit avoir un R^2 proche de l'unité.

Q^2 : le coefficient Q^2 est très similaire au coefficient R^2 ; il est parfois appelé R^2 prédictif, il peut être négatif pour les très mauvais modèles et donc nul, du fait que sa valeur est strictement positive ou nulle. Des valeurs proches de l'unité désignent de la même façon des modèles prédictifs et bien ajustés aux données expérimentales.

Reproductibilité : est la variation de la réponse dans les mêmes conditions (erreur pure), souvent aux points centraux, comparés à toute la variation de la réponse. Une valeur de reproductibilité de 1 représente la reproductibilité parfaite.

Les expressions mathématiques, de ces deux coefficients sont [110] :

$$R^2 = \frac{\sum(y_i - \bar{y})^2 - \sum e_i^2}{\sum(y_i - \bar{y})^2} \quad 0 \leq R^2 \leq 1 \dots\dots\dots(4.4)$$

$$Q^2 = \frac{\sum(y_i - \bar{y})^2 - \frac{\sum(y_i - \bar{y})^2}{(1 - h_i)}}{\sum(y_i - \bar{y})^2} \quad 0 \leq Q^2 \leq 1 \dots\dots\dots(4.5)$$

Où :

y_i : La réponse mesurée au point i.

\bar{y} : La moyenne de l'ensemble des réponses mesurées.

e_i : Le résidu au point i.

\hat{y} : La réponse prédite par le modèle au point i.

h_i : La variance de prédiction au point i.

La qualité du modèle mathématique obtenue peut être évaluée par des tests statistiques qui sont donnés directement par le programme MODDE 6.0. Ces tests statistiques sont représentés dans la Figure (4.9).

A noter que la taille a été introduite en échelle logarithmique décimale pour l'augmentation de Q^2 , les valeurs sont trop dispersés dans la matrice (matrice non conditionnée), on passe en l'échelle logarithmique pour rapprocher les valeurs (la matrice devient conditionnée).

L'essai 05 est exclu de la matrice d'expériences pour la taille, l'essai 09 exclu pour le potentiel zêta et l'essai 10 exclu pour l'indice de polydispersité.

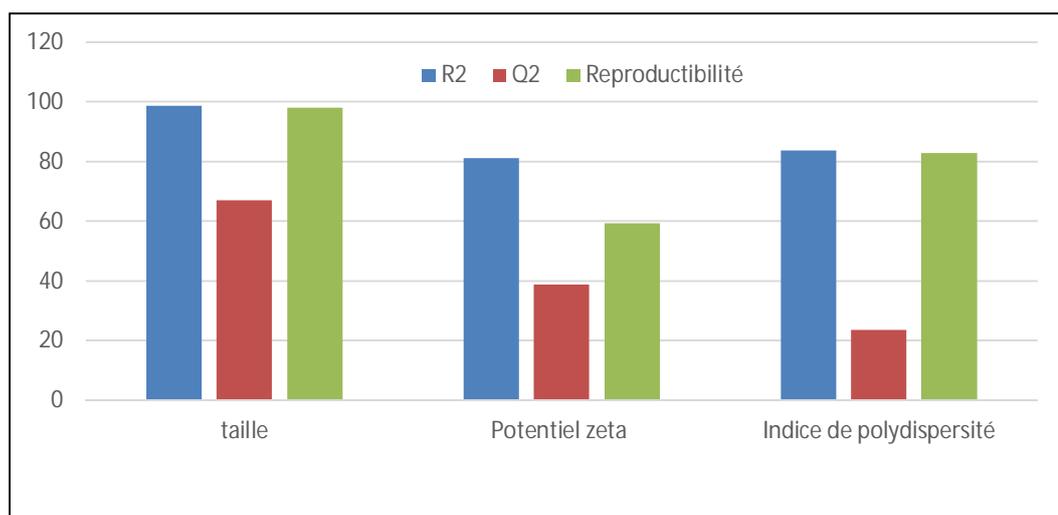


Figure 4. 9 : Histogrammes représentant R^2 , Q^2 et la reproductibilité des modèles en surface de réponses.

A la lumière de ces résultats statistiques, on peut dire que les modèles en surface de réponses présentent une très bonne qualité sur le plan de l'ajustement, en effet, les valeurs du coefficient de détermination R^2 sont très proches de 1.

Avec une prédiction entre 40% et 80%, ceci permettra de présenter des appréciations physicochimiques des effets des facteurs sur les réponses avec une assez bonne prédiction. Par ailleurs, les résultats de la reproductibilité sont remarquables (> 90 %).

Au terme de cette évaluation de la qualité des modèles, les réponses retenues pour la suite de l'étude sont : la taille, le potentiel zêta et l'indice de polydispersité.

Le modèle polynomial exprimant chaque réponse en fonction des facteurs de formulation, exprimés en coordonnées centrées réduites, s'écrivent alors :

$$\begin{aligned} \text{Taille} = & 1,96125 + 0,045622 x_1 + 0,277736 x_2 - 0,247417 x_3 + 0,168689 x_1 x_2 + \\ & 0,0516333 x_1 x_3 - 0,174827 x_2 x_3 - 0,155928 x_1^2 + 0,178997 x_2^2 - \\ & 0,0214212 x_3^2 \dots \dots \dots (4.6) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Potentiel zeta} = & -1,71028 - 11,5243 x_1 - 5,04967 x_2 + 14,4174 x_3 + \\ & 10,665 x_1 x_2 + 18,59 x_1 x_3 + 6,79866 x_2 x_3 - 15,1441 x_1^2 + 7,96691 x_2^2 - \\ & 23,8803 x_3^2 \dots \dots \dots (4.7) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{PI} = & 0,469869 - 0,0735486 x_1 - 0,0713987 x_2 - 0,103894 x_3 - 0,119439 x_1 x_2 - \\ & 0,0485427 x_1 x_3 + 0,0224069 x_2 x_3 - 0,182096 x_1^2 - 0,0763027 x_2^2 + \\ & 0,0316533 x_3^2 \dots \dots \dots (4.8) \end{aligned}$$

4.2.4.2. Etude des effets et des interactions des facteurs sur les réponses

Au terme de la modélisation en surface de réponses, on propose de déterminer l'effet de chaque facteur (cholestérol, lécithine de soja et l'éthanol) sur caractéristiques retenues des suspensions liposomales formulés.

4.2.4.2.1. Effets des facteurs sur la taille des liposomes

Les courbes ci-dessous, représentent l'étude des effets propre du cholestérol et de ses interactions avec la lécithine et l'éthanol sur la taille des liposomes :

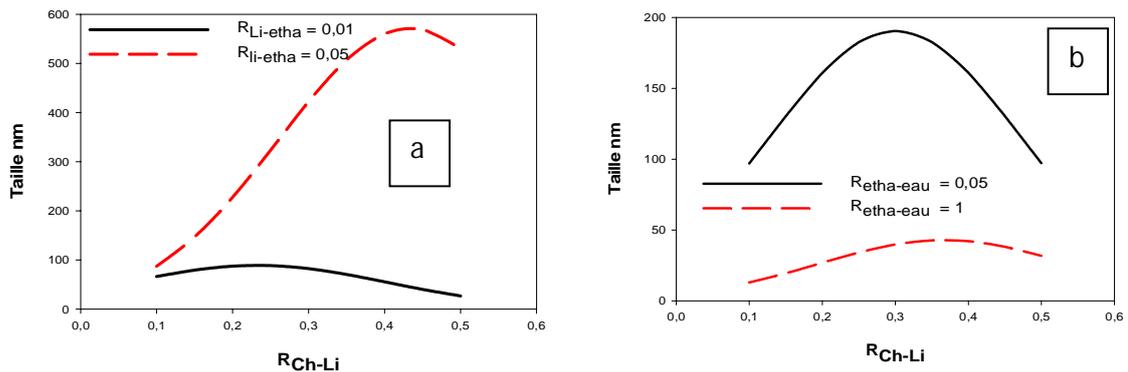


Figure 4.10 : Courbes d'interactions du cholestérol avec la lécithine et l'éthanol sur la taille.

❖ **Interaction cholestérol/lécithine, figure (4.10 a)**

- ✓ A bas niveau de lécithine, le cholestérol fait diminuer la taille des liposomes, son effet est donc positif.
- ✓ A haut niveau de la lécithine, on remarque un effet contraire, dans le sens où le cholestérol fait augmenter la taille jusqu'à un rapport de 0,45 puis quasiment se stabilise. Donc l'accroissement de la lécithine agit négativement sur l'effet du cholestérol et une interaction négative entre ces deux facteurs.

❖ **Interaction cholestérol/éthanol figure (4.10 b)**

- ✓ A bas niveau d'éthanol, le cholestérol à un effet non monotone : il fait augmenter la taille puis la courbe s'inverse et devient décroissante.
- ✓ Lorsque le niveau de l'éthanol atteint son maximum, l'effet du cholestérol garde cette même non monotonie mais avec une amplitude assez faible. Dans ce cas, l'interaction des deux facteurs n'est bien lisible vu le maintien du même effet du cholestérol, mais plus faible aux deux niveaux extrêmes de l'éthanol.

❖ **Interaction lécithine/cholestérol, figure (4.11 a)**

- ✓ A bas niveau du cholestérol, la lécithine n'a pratiquement aucun effet sur la taille, vue l'allure quasi-horizontale.
- ✓ A haut niveau du cholestérol, la taille augmente, la lécithine a donc un effet négatif sur cette dernière.
- ✓ Aussi, comme ça a été observé précédemment, l'interaction entre ces deux facteurs est négative.

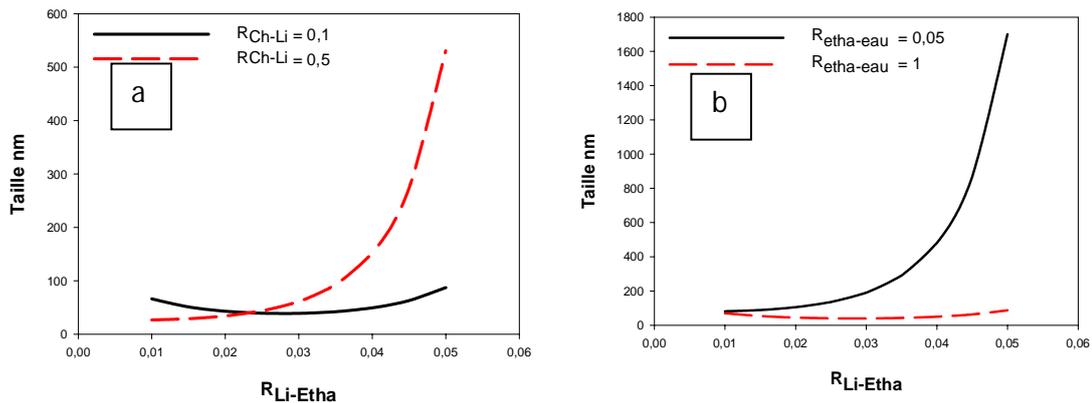


Figure 4.11 : Courbes d'interactions de la lécithine avec cholestérol et l'éthanol sur la taille.

❖ **Interaction lécithine/éthanol, figure (4.11 b)**

- ✓ au niveau bas de l'éthanol, on remarque que la taille augmente considérablement par la lécithine est l'effet n'est pas intéressant.
- ✓ Pour un niveau plus haut d'éthanol, l'effet de la lécithine est nul, vue l'allure horizontale de la courbe, mais reste meilleur que dans l'autre cas. Aussi, l'interaction des deux facteurs est positive.

❖ **Interaction éthanol/cholestérol, figure (4.12 a)**

- ✓ A bas niveau du cholestérol, le rapport éthanol fait diminuer la taille et son effet est positif.
- ✓ Lorsque le niveau du cholestérol passe à sa valeur maximale, on retrouve le même effet mais avec une pente moins prononcée, l'interaction cholestérol – éthanol est alors négative.

❖ **Interaction éthanol/lécithine, figure (4.12 b)**

- ✓ Au niveau bas de lécithine, le rapport éthanol/eau n'a aucun effet sur la taille car celle-ci reste constante.
- ✓ Lorsque le niveau de lécithine passe à sa valeur maximale, il y a une diminution très remarquable de la taille des liposomes et donc l'interaction entre l'éthanol et la lécithine est bienfaisante.

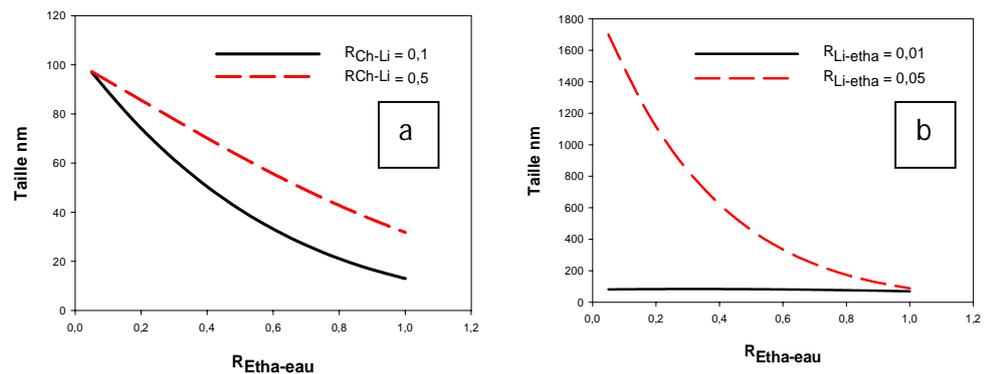


Figure 4.12 : Courbes d'interactions de l'éthanol avec la lécithine et le cholestérol sur la taille.

4.2.4.2.2. Effet des facteurs sur le potentiel zêta

❖ Interaction cholestérol/lécithine, figure (4.13 a)

- ✓ Au niveau bas de la lécithine, le potentiel zêta paraît insensible au cholestérol puis, au-delà d'un certain rapport, de 0,2, sa valeur diminue sensiblement pour passer par la zone critique, en dessous de 30 mV, en absolu, puis devient très négative, avec des valeurs $< -30\text{mV}$.
- ✓ Au niveau haut, l'effet du cholestérol génère un effet non monotone constitué d'une partie croissante et une autre décroissante. Toutefois, toutes les valeurs sont dans la zone critique entre 0 mV et 30 mV, en absolu. Dans ce cas l'effet de l'interaction entre ces deux rapports est sinistre.

❖ Interaction cholestérol/éthanol, figure (4.13 b)

- ✓ Au niveau bas d'éthanol, le cholestérol fait diminuer les valeurs du potentiel zêta, jusqu'à atteindre des valeurs maximales, en négatif, ce qui reflète un effet positif.
- ✓ Au niveau haut d'éthanol, la courbe s'inverse et les valeurs générées sont quasiment dans la zone critique, et l'effet de l'interaction est carrément négatif.

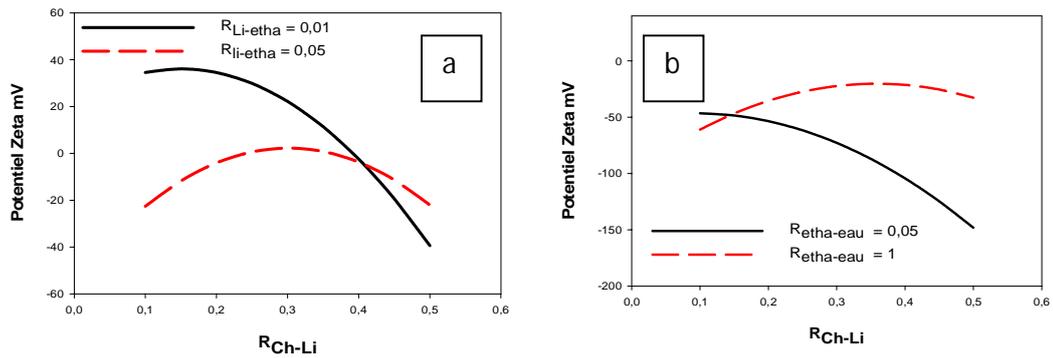


Figure 4.13 : Courbes d'interaction du cholestérol avec la lécithine et l'éthanol sur le potentiel zêta.

❖ Interaction lécithine /cholestérol (4.14 b)

- ✓ Au niveau bas du cholestérol, l'effet de la lécithine sur le potentiel zêta est négatif puisqu'elle réduit sa valeur en absolu. Quand on passe à un niveau maximum de cholestérol, l'effet est toujours négatif car l'augmentation de la lécithine réduit les valeurs du potentiel zêta.

❖ Interaction lécithine /éthanol, figure (4.14 a)

- ✓ A bas niveau d'éthanol, le rapport lécithine fait diminuer les valeurs du potentiel zêta, se stabilisant quasiment dans la zone critique ce qui rend l'effet néfaste dans ce domaine.
- ✓ Au niveau maximum, l'effet est nul du rapport lécithine/éthanol, la valeur affichée du potentiel zêta est constante et est d'emblée dans la zone critique. Aussi, l'interaction est négative.

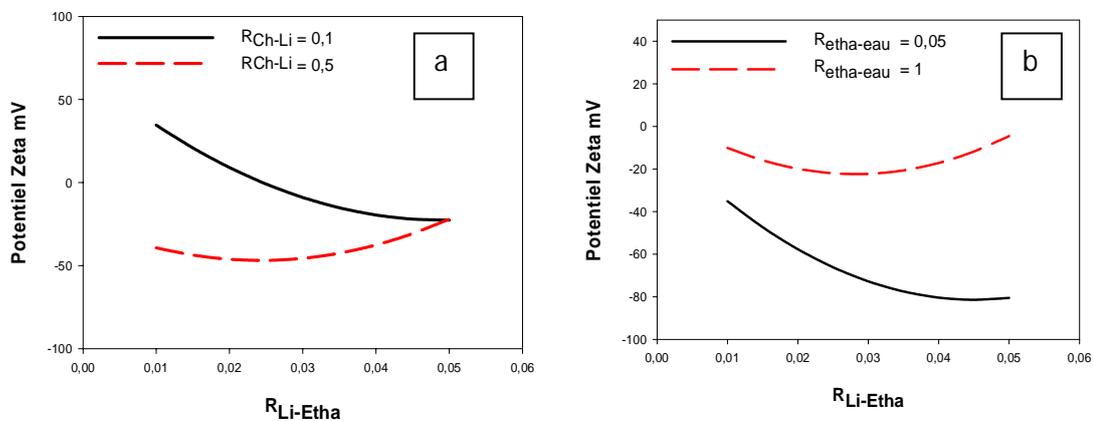


Figure 4.14 : Courbes d'interaction de la lécithine avec le cholestérol et l'éthanol sur le potentiel zêta.

❖ **Interaction éthanol /cholestérol, figure (4.15 a)**

- ✓ Au niveau bas de cholestérol, le rapport éthanol/eau enregistre une influence non monotone (croissante puis décroissante) sur les valeurs du potentiel zêta avec une faible amplitude. A noter que la majorité des valeurs sont dans la zone critique.
- ✓ Quand on passe à un niveau maximum de cholestérol, le rapport éthanol/eau fait augmenter les valeurs négatives du potentiel zêta jusqu'à atteindre des valeurs se rapprochant de la zone critique, donc son effet est négatif. L'interaction entre ces deux facteurs n'est pas très claire.

❖ **Interaction éthanol /lécithine, figure (4.15 b)**

- ✓ A bas niveau de lécithine, le rapport éthanol/eau enregistre une influence non monotone (croissante puis décroissante) sur les valeurs du potentiel zêta avec un éloignement marqué au fort rapport d'éthanol.
- ✓ Au niveau max de lécithine, le rapport éthanol/eau enregistre le même effet non monotone (absence d'interaction) avec des valeurs du potentiel zêta loin du domaine critique, ce qui est avantageux.

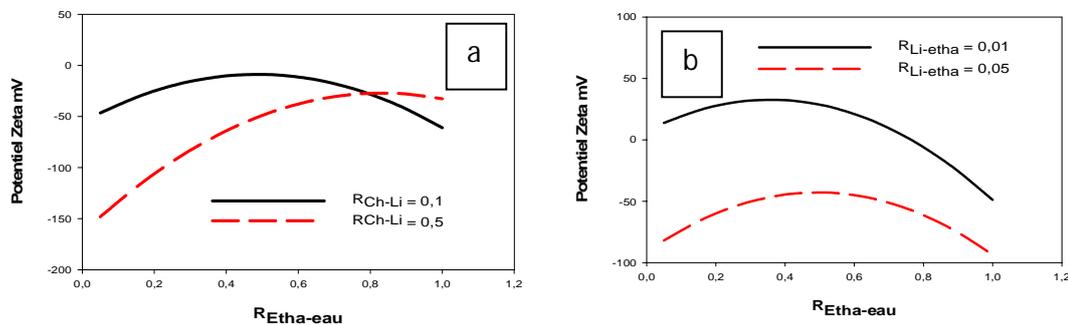


Figure 4.15 : Courbes d'interactions de l'éthanol avec la lécithine et le cholestérol sur le potentiel zêta.

4.2.4.2. 3. Effet des facteurs sur l'indice de polydispersité

❖ **Interaction cholestérol /lécithine, figure (4.16 a)**

- ✓ Pour un niveau bas de lécithine, l'effet du cholestérol non monotone (croissant puis décroissant). Les faibles valeurs de cet ingrédient génèrent des valeurs de polydispersité faibles et donc intéressantes.
- ✓ Pour un niveau haut de lécithine, l'effet reste le même non monotone, mais dans ce cas, ce sont les valeurs élevées du cholestérol qui génèrent une polydispersité

petite et donc meilleure. L'interaction entre les deux facteurs, au vu du même effet non monotone, est alors nulle.

❖ **Interaction cholestérol /éthanol, figure (4.16 b)**

- ✓ Au bas et haut niveau d'éthanol, le cholestérol enregistre un effet non monotone (croissant puis décroissant) sur l'indice de polydispersité, donc l'interaction entre les deux facteurs est nulle. A noter les valeurs plus basses affichées de PI au niveau max d'éthanol.

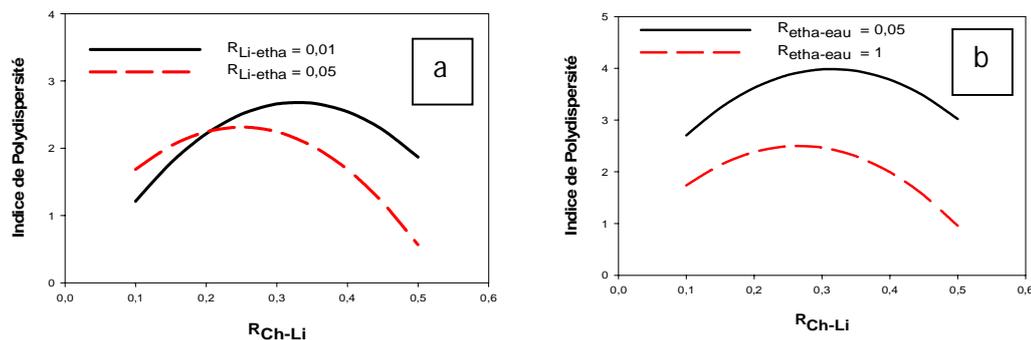


Figure 4.16 : Courbes d'interaction du cholestérol avec la lécithine et l'éthanol sur la polydispersité.

❖ **Interaction lécithine/cholestérol, figure (4.17 a)**

- ✓ A un niveau bas de cholestérol, l'indice de polydispersité semble augmenter avec l'augmentation du rapport lécithine/éthanol jusqu'à atteindre une valeur quasiment stable aux alentours de PI = 2.
- ✓ A haut niveau de cholestérol, l'effet semble s'inverser : initialement la polydispersité est insensible à la lécithine, puis au-delà d'un certain rapport, PI diminue. On peut globalement considérer l'interaction comme étant positive vue l'amélioration de PI par rehaussement au niveau haut du cholestérol.

❖ **Interaction lécithine/éthanol, figure (4.17 b)**

- ✓ A un niveau bas d'éthanol, la lécithine présente une influence quasi-nulle, vue l'allure de la courbe à la limite de l'horizontalité.
- ✓ A un niveau haut, la courbe est presque constante et l'effet est quasiment nul. L'interaction entre les deux rapports est nulle.

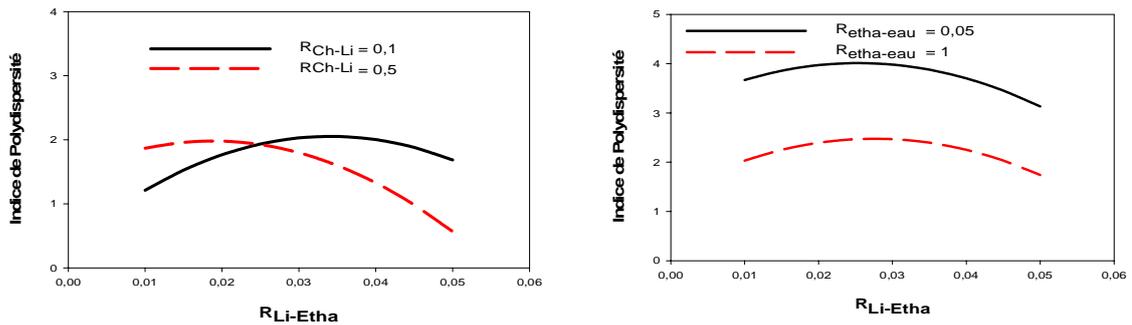


Figure 4.17 : Courbes d'interaction de la lécithine avec le cholestérol et l'éthanol sur la polydispersité.

❖ **Interaction éthanol/cholestérol, figure (4.18 a)**

- ✓ L'effet de l'éthanol paraît être positif en réduisant les valeurs de la polydispersité. Lorsque le niveau du cholestérol passe de sa valeur mini à max, cet effet positif semble devenir plus prononcé, d'où une interaction positive entre les deux facteurs.

❖ **Interaction éthanol/lécithine, figure (4.18 b)**

- ✓ De même que précédemment, l'effet de l'éthanol est positif et cet effet ne semble pas être modifié avec le changement du niveau de la lécithine. Donc l'interaction est nulle.

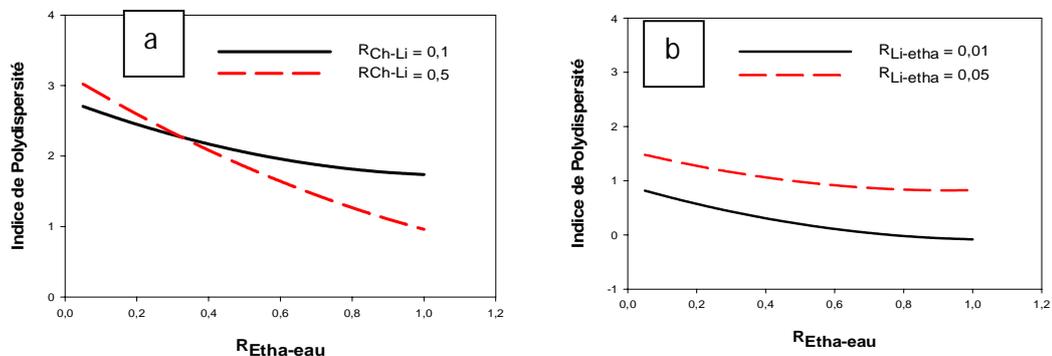


Figure 4.18 : Courbes d'interactions de l'éthanol avec la lécithine et le cholestérol sur la polydispersité.

4.2.5. Détermination des zones optimales

Suite à la phase de la modélisation en surface réponses, un balayage des trois facteurs de contrôle a été effectué, dans le but de faire ressortir les zones optimales qui correspondent à :

- ✓ Des tailles minimales permettent la pénétration à travers la peau.

- ✓ Des valeurs du potentiel zêta supérieur à 30 mV en valeur absolue qui confirment une stabilité satisfaisante pour les liposomes, les interactions répulsives électrostatiques dominant celles d'attractives de Van Der Waals.
- ✓ Des zones où les indices de polydispersité sont satisfaisantes présentant des valeurs les plus faibles possibles.

Les zones optimales étant identifiées, par le logiciel MODDE6.0 se présentent sous forme de cartographies sur lesquelles sont tracées des courbes iso-réponses. On se propose alors de représenter ces contours aux trois niveaux d'éthanol : bas, médian et haut, ce qui donne en valeurs numériques :

Ethanol/ eau niveau bas = 0,05

Ethanol/ eau niveau médian = 0,525

Ethanol/ eau niveau haut = 1

4.2.5.1. Détermination de la zone optimale dans le cas d'un rapport éthanol/eau bas :

Les contours iso-réponses associées aux trois réponses sont illustrés sur la figure (4.19). La région dans laquelle la taille doit présenter des valeurs relativement petites, pour pouvoir faciliter la pénétration des liposomes à travers la peau, est très étroite. Elle correspond aux domaines des deux facteurs :

Un rapport Cholestérol/lécithine $> 0,40$

Et un rapport Lécithine/éthanol $< 0,022$

Pour ce qui du potentiel zêta et pour éviter le domaine dans lequel cette grandeur est inférieure à 30mV, en valeur absolue, on remarque que la seule possibilité qui s'offre à nous, au vu de la cartographie du potentiel zêta, est délimitée dans la zone :

Un rapport Cholestérol/lécithine $< 0,40$

Et un rapport Lécithine/éthanol $> 0,020$

Enfin, à la lumière de la cartographie en matière d'iso-indice de polydispersité, aucune solution ne s'offre à nous, vu que toutes les valeurs de $IP > 2$

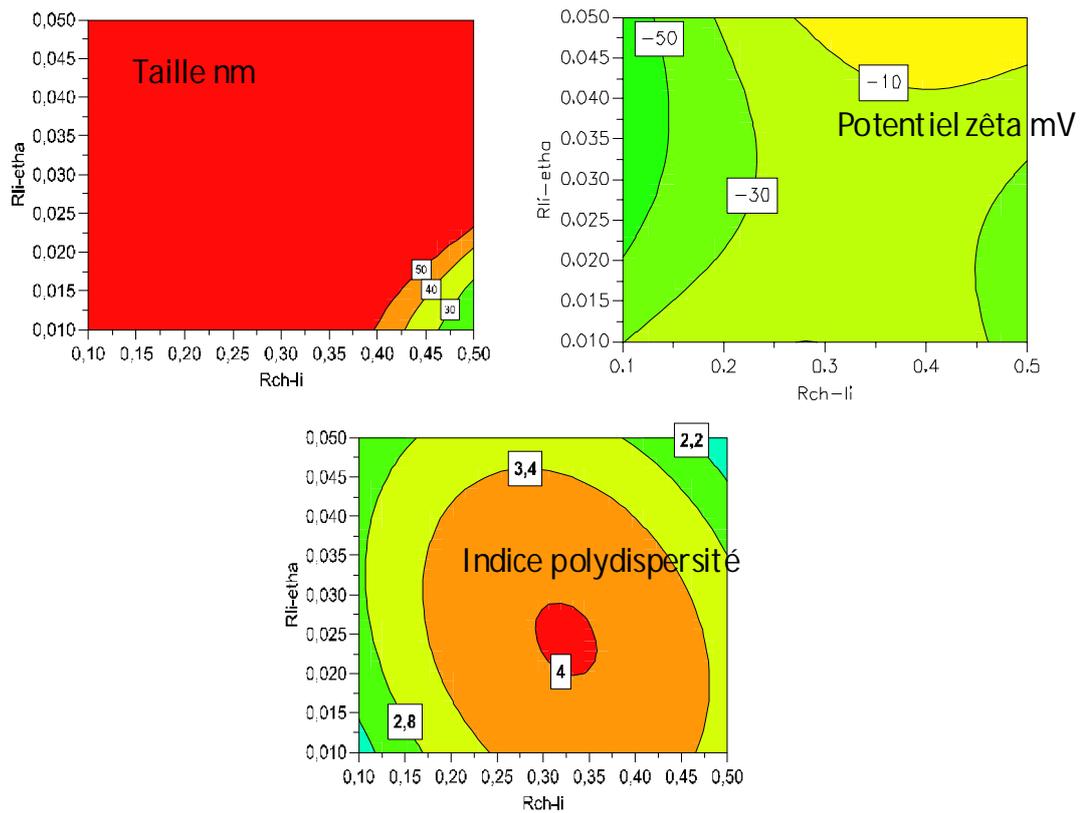


Figure 4.19 : Cartographie en termes de Contours iso-réponses au niveau bas d'éthanol.

Aussi, au terme de cette étude de détermination des conditions optimales, un constat se dégage qui se traduit par l'absence d'aucune solution optimale, dans le cas de l'emploi d'un rapport d'éthanol-eau bas.

4.2.5.2. Détermination de la zone optimale dans le cas d'un rapport éthanol/eau médian

Les contours iso-réponses associées aux trois réponses, niveau haut d'éthanol, sont illustrés sur la figure (4.20). La région dans laquelle la taille doit présenter des valeurs relativement petites, < 50nm, correspond à l'union des deux domaines :

$$[R_{\text{Chol/léci}} > 0,42, R_{\text{Léci/étha}} < 0,025] \cup [R_{\text{Chol/léci}} < 0,15, 0,015 < R_{\text{Léci/étha}} < 0,040]$$

Pour ce qui du potentiel zêta, le domaine auquel les valeurs de cette grandeur est supérieure à 30mV, en valeur absolue, est délimité dans la zone :

$$[R_{\text{Chol/léci}} > 0,40, R_{\text{Léci/étha}} < 0,045] \cup [R_{\text{Chol/léci}} < 0,25 ; R_{\text{Lécithine/éthanol}} < 0,0125]$$

Enfin, à la lumière de la cartographie en matière d'iso-indice de polydispersité, une zone très étroite qui correspond à $IP \leq 1$, c'est le domaine : $[R_{\text{Chol/léci}} > 0,45, R_{\text{Léci/étha}} > 0,045]$

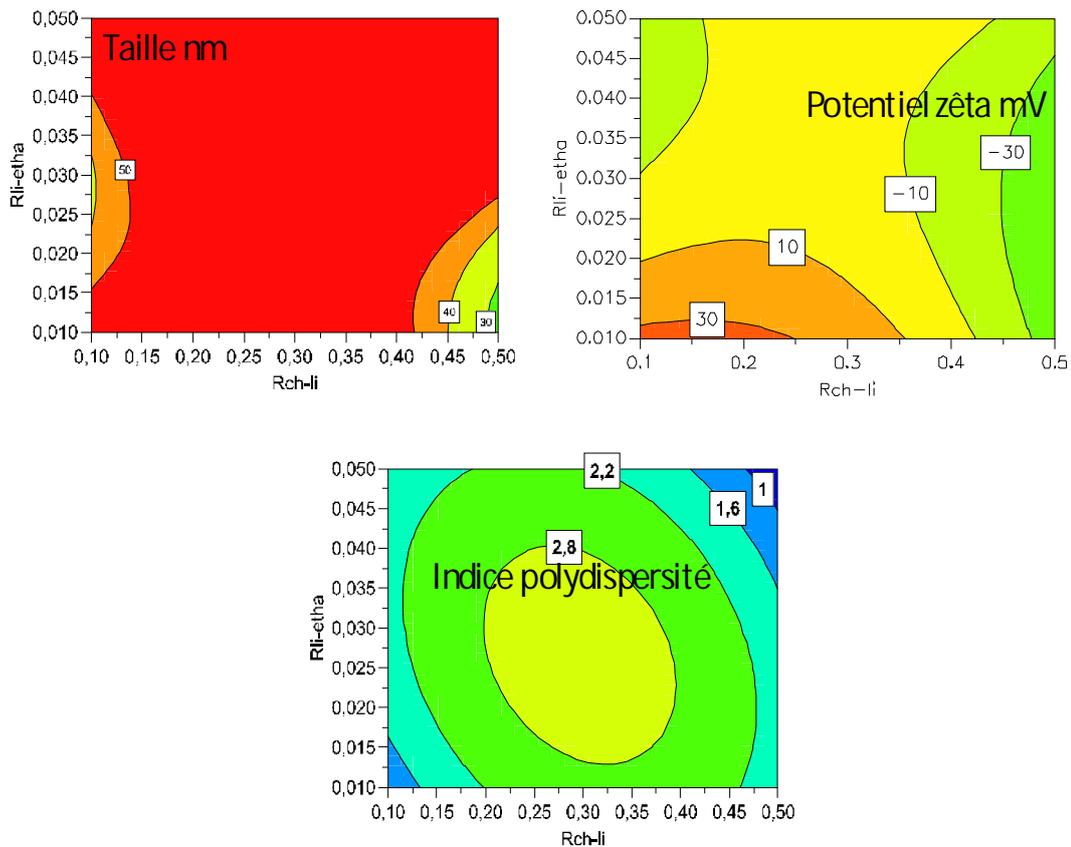


Figure 4.20: Cartographie en termes de Contours iso-réponses au niveau médian d'éthanol.

Pour satisfaire les trois domaines optimaux, au rapport d'éthanol médian, on procède à l'intersection de ces zones optimales qui n'offrent malheureusement aucune solution.

4.2.5.3. Détermination de la zone optimale dans le cas d'un rapport éthanol/eau haut :

Les contours iso-réponses associées aux trois réponses, à haut niveau d'éthanol, sont illustrés sur la figure (4.21). La région dans laquelle la taille doit présenter des valeurs relativement petites $< 50\text{nm}$, correspond à l'union de plusieurs domaines qu'on ne peut expliciter mais qui correspondent, sur la surface de réponse, à la somme de toutes les iso-régions exceptées celles qui sont de couleur rouge.

Pour ce qui du potentiel zêta, le domaine auquel les valeurs de cette grandeur est supérieure à 30 mV , en valeur absolue, est très large, c'est toute la région de la surface de réponse du potentiel zêta hormis la zone : $[R_{\text{Chol/léci}} < 0,30, R_{\text{Léci/étha}} < 0,024]$

Au vu de la cartographie en matière d'iso-indice de polydispersité, une zone assez étroite correspondant à $IP \leq 1$, c'est le domaine :

$$[R_{\text{Cholestérol/lécithine}} > 0,40, R_{\text{Lécithine/éthanol}} > 0,035]$$

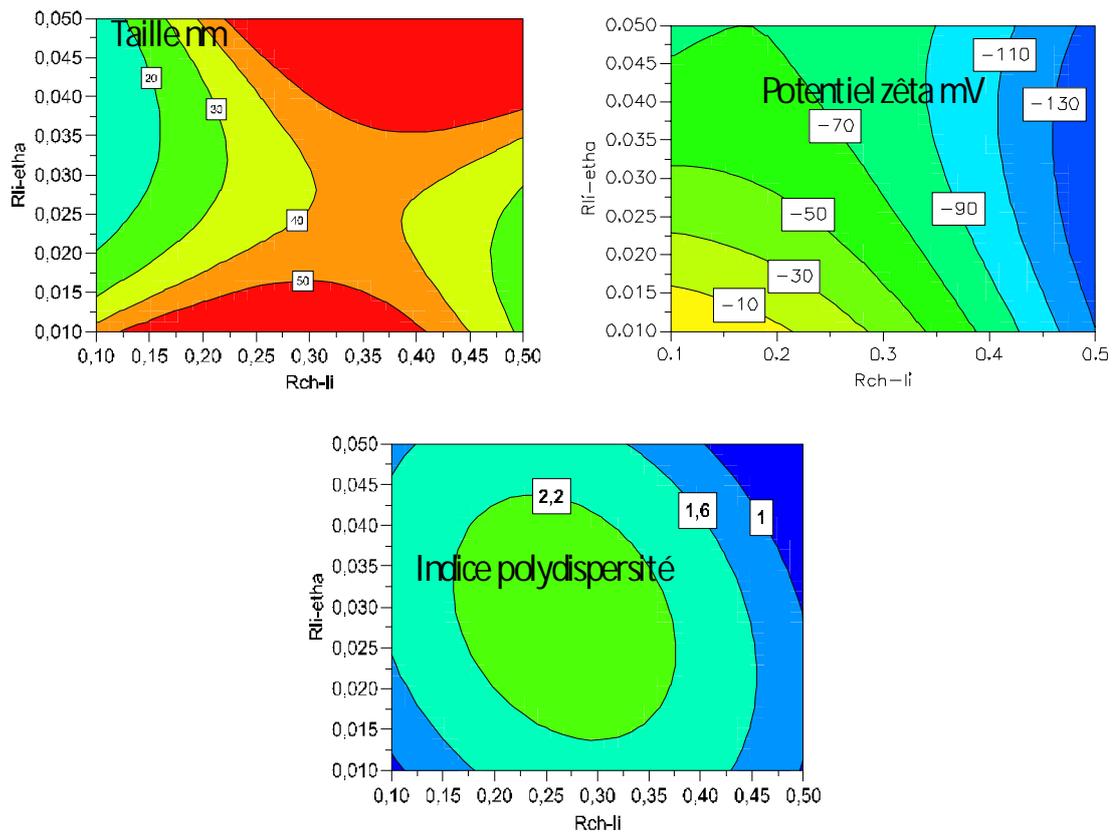


Figure 4.21 : Cartographie en termes de Contours iso-réponses au niveau haut d'éthanol.

Pour satisfaire les trois domaines optimaux, au rapport d'éthanol niveau haut, on procède à l'intersection de ces zones optimales qui offre une zone optimale définie dans le domaine :

$$[R_{\text{Cholestérol/lécithine}} > 0,40, R_{\text{Lécithine/éthanol}} > 0,035]$$

CONCLUSION

CONCLUSION

Les liposomes ont été considérés comme un éventuel transporteur vésiculaire pour administration transdermique de Diclofénac de diéthylamine un agent anti-inflammatoire analgésique.

L'objectif de ce travail s'est inscrit dans la réalisation de système d'encapsulation capable d'encapsuler un actif hydrophile avec des promoteurs de pénétration cutanée en vue de leur utilisation en rhumatologie. Il était donc question de concevoir, modéliser et optimiser la formulation liposomale à base de Diclofénac de diéthylamine.

De prime abord, des essais de pré-formulation ont été réalisés en vue de s'assurer que les excipients sélectionnés et le procédé de fabrication adopté permettent d'obtenir des liposomes, résultat confirmé et validé par les techniques de caractérisation de diffusion de la lumière en dynamique, DLS, et de la microscopie électronique à balayage, MEB.

En seconde phase, des essais de formulation ont été menés, suivant la méthodologie de la planification expérimentale. Cette technique a permis de rationaliser le nombre d'essai tout gardant une qualité certaine des résultats au sens statistique. D'ailleurs, tous les indicateurs statistiques étaient satisfaisants, tant sur les plans explicatif, reproductif que prédictif.

A l'issue de la modélisation en surface de réponses, par la méthode PLS (Partial Least Square), des modèles prédictifs en surface de réponses ont été dégagés, en l'occurrence, la taille hydrodynamique des liposomes, leur potentiel zêta et l'indice de polydispersité. Ces trois réponses sont toutes importantes et conditionnent fortement la biodisponibilité, la stabilité et l'homogénéité du système dispersé respectivement. A noter que dans ce travail, la réponse taux d'encapsulation n'a pas été retenue, vu les résultats affichés qui n'étaient pas en adéquation avec le ratio : sédiment de liposome et surnageant, séparés par ultracentrifugation. La technique de dosage empruntée sur celle monographiée d'une émulsion commercialisée, EMULGEL®, s'est avérée infructueuse.

L'exploitation des trois modèles RSM, par simulation numérique, a permis de faire ressortir d'une part les effets de chaque facteur et de ses interactions sur les trois réponses et les cartographies en termes de contours iso-réponses, d'autre part. il semblerait qu'une quantité maximale d'éthanol par rapport à l'eau associée à des taux maximum de

cholestérol et de lécithine favorise l'obtention de liposomes de petites tailles contenant une charge de surface (potentiel zêta) assez élevée et ne présentant qu'une étroite polydispersité.

Cette étude est loin d'être achevée, il serait intéressant de prime à bord de revoir et de maîtriser les techniques de diffusion de lumière qui reste assez difficile à contrôler.

Vérifier expérimentalement que la zone optimale obtenue par simulation génère bien des résultats intéressants.

Réaliser des études d'interactions entre la membrane lipidique et le médicament encapsulé par IR.

L'amélioration de la méthode d'analyse est nécessaire afin d'optimiser ses conditions opératoires pour la forme liposomale.

Et proposer une forme galénique à usage dermique de type semi solide à la formulation optimale, en se référant sur les caractéristiques physicochimique et rhéologique.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] Todd PA, Sorkin EM, Dicleofénac ; A reappraisal of tis pharmacodynamic and pharmacokinetic propreties and therapeutic efficacy. *Drugs*, 1988 ; p. 244-285.
- [2] Vaibhav Dubey, Dinesh Mishra, Jain N,K, Tathagata Dutta, Manoj Nahar, D.K. Saraf, Dermal and transdermal delivery of an anti-psiriasic agent via ethanolic liposomes. 2007 ; 123 ; p.148-154.
- [3] Y. Cohen, C. Jacquot; abrégés pharmacologie; 5eme édition (2001) 326-327.
- [4] J. P. Grunfeld; Dictionnaire médecine Flammarion; 7eme édition (2002) 66.
- [5] S. Gobec, P. Brozica and T. L. Riznerb; Nonsteroidal anti- inflammatory drugs and their analoguesas inhibitors of aldo-keto reductase AKR1C3: New lead compounds for the development of anticancer agents; *Bioorganic Medicinal Chemistry Letters* 15 (2005) 5170-5175.
- [6] Jacques Dangoumau. Nicholas Moore, Mathieu Molimard, Annie Fourrier-Reglat. Karin Latry, Françoise Haramburu. Ghada Miremont-Salame, Karine Titier. « Pharmacologie générale ». Edition 2006.
- [7] B. G. Katzung; pharmacologie fondamentale clinique; 7eme édition (1998) 599-619. drugs (NSAID); *Solid State Chemistry* 177 (2004) 3954-3962.
- [8] M. Moulin, A. Coquerel; pharmacologie connaissances et pratique; 2eme édition (2002) 393-406.
- [9] M. G. Lechon, X. Ponsoda, E. Connor, T. Donato, R. Jover, J. Castell; Diclofenac induces apoptosis in hepatocytes; *Toxicology in Vitro* 17 (2003) 675-680
- [10] D. J. Naisbitt, L. S. Sanderson, X. Meng, A.V. Stachulski, S. E. Clarke, B. K. Park; Investigation of the immunogenicity of diclofenac and diclofenac metabolites; *Toxicology Letters* 168 (2007) 45-50.
- [11] VINCENT, M., Vectorisation, clé de l'efficacité des actifs. *Parfums et cosmétiques actualités*, 2009. 208 : p. 115-126.
- [12] SOUSSAN, E., et al., Drug delivery by soft matter : matrix and vesicular carriers. *Angewandte Chemie International*, 2009. **48(2)** : p. 274-288.
- [13] Bangham A.D., Standish M.M., Watkins J.C., 1965. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids, *Journal molecular. Biology*, 13, 238-252.

- [14] Johnson S.M., Bangham A.D., Hill M.W., Korn E.D., 1971. Single bilayer liposomes, *Biochim. Biophys. Acta*, 233, 820-826.
- [15] Marie Mougín - Deraef. «Les liposomes: aspect technologique et pharmaceutique » . Thèse Docteur en pharmacie. 30 Avril 2004.
- [16] Rongen H.A, Bult A, van Bennekom W.P. Liposomes and immunoassays. *Journal of immunological methods* 204 (1997) 105-133.
- [17] Gregoriadis G, Leathwood PD, Ryman BE, 1971. Enzyme entrapment in liposomes. *FEBS Letters* 14, 95-99.
- [18] Gregoriadis G, 1973. Drug entrapment in liposomes. *FEBS Letters* 36, 292-296.
- [19] Rahman YE, Rosenthal MW, Cerny EA, Moretti ES, 1974. Preparation and prolonged tissue retention of liposome encapsulated chelating agents. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 83, 640-647.
- [20] Kimelberg HK, Tracy TF, Biddlecome SM, Bourke RS, 1976. The effect of entrapment in liposomes on the in vivo distribution of 3H-methotrexate in a primate. *Cancer Research* 36, 2949-2957.
- [21] Juliano RL, and Stamp D, 1978. Pharmacokinetics of liposome-entrapped anti tumor drugs, *Biochemical Pharmacology* 27, 21-27.
- [22] Szoka, F, and Papahadjopoulos D, 1978. Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 75, 4194-4198.
- [23] Olson F, Hunt CA, Szoka FC, Vail WJ, Papahadjopoulos D, 1979. Preparation of liposomes of defined size distribution by extrusion through polycarbonate membranes. *Biochimica et Biophysica Acta* 557, 9-23.
- [24] Lasic DD, Martin JF, Gabizon A, Huang SK, Papahadjopoulos D, 1991. Sterically stabilized liposomes: a hypothesis on the molecular origin of the extended circulation times. *Biochimica et Biophysica Acta* 1070, 187-192.
- [25] Torchilin VP, Omelyanenko VG, Papisov MI, Bogdanov Jr AA, Trubetskoy VS, Herron JN, Gentry CA, 1994. Poly(ethylene glycol) on the liposome surface: on the mechanism of polymer-coated liposome longevity. *Biochimica et Biophysica Acta* 1195, 11-20.
- [26] Sullivan S, Connor J, Huang L, 1986. Immunoliposomes: Preparation, properties and applications. *Medicinal Research Reviews* 6, 171-195.

- [27] Huwyler J, Wu D, Pardridge W, 1996. Brain drug delivery of small molecules using immunoliposomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 14164-14169.
- [28] Park JW, Hong K, Kirpotin DB, Papahadjopoulos D, Benz CC, 1997. Immunoliposomes for cancer treatment. *Advances in Pharmacology* 40, 399-435.
- [29] Ding W-x, Qi X-r, Li P, Maitani Y, Nagai T, 2005. Cholesteryl hemisuccinate as a membrane stabilizer in dipalmitoylphosphatidylcholine liposomes containing saikosaponin-d. *International Journal of Pharmaceutics* 300, 38-47.
- [30] Domenech O, Francius G, Tulkens P, Van Bambeke F, Dufrière Y, Mingeot-Leclercq MP, 2009. Interactions of oritavancin, a new lipoglycopeptide derived from vancomycin, with phospholipid bilayers: Effect on membrane permeability and nanoscale lipid membrane organization. *Biochimica et Biophysica Acta* 1788, 1832-1840.
- [31] Trombetta D, Arena S, Tomaino A, Tita B, Bisignano G, De Pasquale A, Saija A, 2001. Effect of the exposure to gentamicin and diltiazem on the permeability of model membranes. *Farmaco* 56, 447-449.
- [32] Lu T, Wang Z, Ma Y, Zhang Y, Chen T, 2012. Influence of polymer size, liposomal composition, surface charge, and temperature on the permeability of pH-sensitive liposomes containing lipid-anchored poly (2-ethylacrylic acid). *International Journal of Nanomedicine* 7, 4917-4926.
- [33] Shimanouchi T, Ishii H, Yoshimoto N, Umakoshi H, Kuboi R, 2009. Calcein permeation across phosphatidylcholine bilayer membrane: Effects of membrane fluidity, liposome size, and immobilization. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 73, 156-160.
- [34] Anabousi S, Laue M, Lehr CM, Bakowsky U, Ehrhardt C, 2005. Assessing transferrin modification of liposomes by atomic force microscopy and transmission electron microscopy, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 60, 295-303.
- [35] Nomura AI, Sato Y, Fujiwara K, 2013. Molecular robotics approach for constructing an artificial cell model. *ECAL*, 488-491.
- [36] Walde P, Cosentino K, Engel H, Stano P, 2010. Giant Vesicles: preparations and applications. *ChemBioChem* 848-865.
- [37] Honda Thong Deng. « Extraction et mise en forme en liposomes de phospholipides issus d'un co-produit par voie supercritique ». Thèse Docteur en génie des procédés. 15 novembre 2011.

- [38] Delattre J. Liposomes et barrières endothéliales. In : Delattre J, Couvreur P, Puisieux F, Philippot J.R, Schuber F. Les liposomes : aspects technologiques, biologiques et pharmaceutiques. Paris : Les éditions INSERM (1993) 167-178.
- [39] Lorin A, Flore C, Thomas A, Brasseur R, 2004. Les liposomes: description, fabrication et applications. *Biotechnology Agronomy Society and Environment* 8, 163-176.
- [40] Lipowsky R, and Sackmann E, 1995. Structure and Dynamics of Membranes. *Handbook of Biological Physics* (Elsevier) 1A.
- [41] Weinstein J, and Leserman L, 1984. Liposomes as drug carriers in cancer chemotherapy. *Pharmacology and Therapeutics* 24, 207-233.
- [42] Potamitis C, Chatzigeorgiou P, Siapi E, Viras K, Mavromoustakos T, Hodzic A, Pabst G, Cacho-Nerin F, Laggner P, Rappolt M, 2011. Interactions of the AT1 antagonist valsartan with dipalmitoyl-phosphatidylcholine bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta* 1808, 1753-1763.
- [43] Verumi S, Rhodes C.T. Preparation and characterisation of liposomes as therapeutic delivery systems : a review. *Pharmaceutica acta Helvetiae* 70 (1995) 95-111.
- [44] Clara Chaouat. « Conception de nouveaux systèmes de formulation actifs dépigmentants en vue de leur utilisation par voie cutanée ». Thèse de doctorat en chimie, biologie, santé. Février 2013
- [45] Grit M, de Smidt JH, Struijke A, Crommelin DJA, 1989. Hydrolysis of phosphatidylcholine in aqueous liposome dispersions. *International Journal of Pharmaceutics* 50, 1-6.
- [46] Cevc G., Richardsen H., 1999. Lipid vesicles and membrane fusion, *Adv. Drug Del. Rev.*, 38, 207-232
- [47] Wherle, P., *Pharmacie galénique : formulation et technologie pharmaceutique*. 2007, Paris: Maloine.
- [48] Deamer, D. and A. Bangham, Large volume liposomes by an ether vaporization method. *Biochimica and Biophysica Acta* 1976.
- [49] Gentine P, Bubel A, Crucifix C, Bourel-Bonnet L, Frisch B, 2012. Manufacture of liposomes by isopropanol injection: characterization of the method. *Journal of Liposome Research* 22, 18-30.
- [50] Szoka, F., et al, Preparation of unilamellar liposomes of intermediate size (0,1-0,2 μm) by a combination of reverse phase evaporation and extrusion through polycarbonate membranes. *Biochimica and Biophysica Acta*, 1980

- [51] Szoka F, and Papahadjopoulos D, 1978. Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 75, 4194-4198.
- [52] Schmidt P, Berger C, Scheidt HA, Berndt S, Bunge A, Beck-Sickinger AG, Huster D, 2010. A reconstitution protocol for the in vitro folded human G protein coupled Y2 receptor into lipid environment. *Biophysical Chemistry* 150, 29-36.
- [53] Saunders L, Perrin J, Gammack D.B. Aqueous dispersion of phospholipids by ultrasonic radiations. *Journal of pharmaceuticals and pharmacology* 14 (1962) 567-572.
- [54] Mayer L.D, Hope M.J, Cullis P.R. Vesicles of variable produced by a rapid extrusion procedure. *Biochimica and biophysica Acta* 858 (1986 a) 161-168.
- [55] Mac Donald R.C, MacDonald R.I, Menco B.P, Takeshita K, Subbarao N.K, Hu L.H. small-volume extrusion apparatus for preparation of large, unilamellar vesicles. *Biochimica and biophysica Acta* 1061 (1991) 297-303.
- [56] Olson F, Hunt C.A, Szoka F.C, Vail W.J, Papahadjopoulos D. Preparation of liposomes of defined size distribution by extrusion through polycarbonate membranes. *Biochimica and Biophysica Acta* 557 (1979) 9-23.
- [57] Jousma H, Talsma H, Spoes F, Joosten J.G, Junginger H.E, Crommelin D.J. Characterisation of liposomes. Then influence of extrusion of multilamellar vesicles through polycarbonate membranes on particle size, particule size distribution and number of bilayers. *International Journal of Pharmaceutic* 34 (1987) 263-274
- [58] Vemuri S, Yu CD, Wangsatorntanakun V, Roosdorp N, 1990. Large-scale production of liposomes by a microfluidizer. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 16, 2243-2256.
- [59] Hope, M.J.; Bally, M.B.; Webb, G.; Cullis, P.R. Production of large unilamellar vesicles by a rapid extrusion procedure. Characterization of size distribution, trapped volume and ability to maintain a membrane potential. *Biochim. Biophys. Acta – Biomembr.*, 1985, 812(1), 55-65.
- [60] Otake K, Imura T, Sakai H, Abe M, 2001. Development of a new preparation method of liposomes using supercritical carbon dioxide. *Langmuir* 17, 3898-3901.
- [61] Castor, T. P., Chu, L. Methods and apparatus for making liposomes containing hydrophobic drugs. US5776486 . 1998.
- [62] Reimer, L. *Scanning Electron Microscopy: Physics of Image Formation and Microanalysis*; 2nd ed. Springer Series in Optical Sciences, **1998**.

- [63] Nagahiro, I.; Mora, B.N.; Boasquevisque, C.H.R.; Scheule, R.K.; Patterson, G.A. Toxicity of cationic liposome-DNA complex in lung isografts. *Transplantation*, **2000**, 69(9), 1802-1805.
- [64] Fillion, M.C.; Phillips, N.C. Toxicity and immunomodulatory activity of liposomal vectors formulated with cationic lipids toward immune effector cells. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, 1997, 1329(2), 345-356.
- [65] Gregoriadis, G. *Liposome Technology, Liposome Preparation and Related Techniques*. 3rd ed., Vol. I; Informa Healthcare Inc: USA, 2007.
- [66] Grabielle-Madumont, C.; Lesieur, S.; Ollivon, M. Characterization of loaded liposomes by size exclusion chromatography. *J. Biochem. Biophys. Meth.*, 2003, 56(1-3), 189-217.
- [67] Keller, B.C. Liposomes in nutrition. *Trend. Food Sci. Tech.*, 2001, 12(1), 25-31.
- [68] Laridi R.; Kheadr E.E.; Benech R.O.; Vuillermard J.C.; Lacroix C.; Fliss I. Liposome encapsulated nisin Z: optimization, stability and release during milk fermentation. *Inter. Dairy J.*, 2003, 13(4), 325-336.
- [69] Lasic, D.D. *Liposomes, From Physics to Applications*; Elsevier Science Publishers: Amsterdam, 1993.
- [70] El Maghraby, G.M., B.W. Barry, and A.C. Williams, Liposomes and skin: From drug delivery to model membranes. *Eur. J. Pharm.l Sci.*, 2008. 34(4-5): p. 203-222.
- [71] El Maghraby, G.M. and A.C. Williams, Vesicular systems for delivering conventional small organic molecules and larger macromolecules to and through human skin. *Expert Opin. Drug Deliv.*, 2009. 6(2): p. 149 63.
- [72] Zellmer, S., W. Pfeil, and J. Lasch, Interaction of phosphatidylcholine liposomes with the human stratum corneum. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1995. 1237(2): p. 176-82.
- [73] El Maghraby, G.M., A.C. Williams, and B.W. Barry, Skin delivery of oestradiol from deformable and traditional liposomes: mechanistic studies. *J. Pharm. Pharmacol.*, 1999. 51(10): p. 1123-34.
- [74] Plessis, J., et al., The influence of particle size of liposomes on the deposition of drug into skin. *Int. J. Pharm.*, 1994. 103(3): p. 277-282.
- [75] Weiner, N., et al., Topical delivery of liposomally encapsulated interferon evaluated in a cutaneous herpes guinea pig model. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1989. 33(8): p. 1217-1221.
- [76] Kirjavainen, M., et al., Interaction of liposomes with human skin in vitro-the influence of lipid composition and structure. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1996. 1304(3): p. 179-89.

- [77] Cevc, G. and G. Blume, Hydrocortisone and dexamethasone in very deformable drug carriers have increased biological potency, prolonged effect, and reduced therapeutic dosage. *Biochim. Biophys. Acta.*, 2004. 1663(1 2): p. 61-73.
- [78] Cevc, G. and G. Blume, Lipid vesicles penetrate into intact skin owing to the transdermal osmotic gradients and hydration force. *Biochim/ Biophys. Acta.*, 1992. 1104(1): p. 226-32.
- [79] Cevc, G. and G. Blume, New highly efficient formulation of diclofenac for the topical, transdermal administration in ultradeformable drug carriers, *Transfersomes*. *Biochim. Biophys. Acta.*, 2001. 1514(2): p. 191-205.
- [80] Knorr, F., et al., Follicular transport route - Research progress and future perspectives. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2009. 71(2): p. 173-180.
- [81] Mozafari, M. R.; Mortazavi, M. S. *Nanoliposomes: From Fundamentals to Recent Developments*; Trafford Publishing Ltd: UK, 2005.
- [82] Robert Paul, 1984. *Le petit Robert 1*. Dictionnaire, p.1080.
- [83] *Hand book of pharmaceuticals excipients sixth edition*. Edited by Raymond C Rowe, Paul J. Sheskey and Marian E Quinn.
- [84] 2007“Learn and Live.” American Heart Association, Inc. 2006
- [85] *Reversed-Phase HPLC Determination of Cholesterol in Food Items*.
- [86] http://www.merckmillipore.com/INTL/fr/product/Cholesterol%2C-Highly-Purified---CAS-57-88-5---Calbiochem,EMD_BIO-228111#anchor_PDS
- [87] *Pharmacopée européenne*. 6^{ème} édition. 2008.
- [88] <http://www.vidal.fr/substances/1844/diclofenac/>
- [89] https://www.google.dz/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwj4KQzKDNAhULnRQKHe72BNwQFggcMAA&url=https%3A%2F%2Fpubchem.ncbi.nlm.nih.gov%2Fcompound%2FDiclofenac_diethylamine&usg=AFQjCNG6txZLZrSechOD8QJt38T2Khks6g
- [90] J. W. LAWRIE, «Glycerol and the Glycols», *Monograph Series*, American Chemical Society; (1928,) New York, p. 388.
- [91] http://www.blanc-labo.com/sites/default/files/produit_pdf/rotavapor210-215fr.pdf
- [92] https://www.google.dz/search?q=Rotavapor_Buchi+R_IIFR_IMALAB&oq=Rotavapor_Buchi+R_IIFR_IMALAB&aqs=chrome..69i57.1723j0j8&sourceid=chrome&ie=UTF-8#
- [93] http://www.ipcms.unistra.fr/wp-content/uploads/2014/06/memento_meb_eds.pdf
- [94] <https://www.fei.com/products/sem/quantum-sem/>

- [95] <http://chemphys.u-strasbg.fr/mpb/teach/Vie-Instrumentation2/MEB-MET-Bortoluzzi-Malatrait-Ribstein-Bassez-091012.pdf>
- [96] Fabre, P. H. Cousse, G. Mouzin and M.T. Trebosc. « Liposomes d'eaux thermales stabilisés dans un gel d'ADN ». Brevet EP 0554 343 B1, 1992.
- [97] Stainmesse, S. Fessi, H. Devissaguet, J-P. Puisieux, F. « Procédé de préparation de systèmes colloïdaux dispersibles de lipides amphiphiles sous forme de liposomes submicroniques ». Brevet EP 0349 429 A2, 1990.
- [98] www.ccm.usherbrooke.ca/fr/services/ccm/LCG/pdf/granulométrie%20laser.pdf
- [99] www.horiba.com/scientific/products/particle...size.../sz-100-7245/
- [100] JONHSON S.M. Inability of macrophages to digest liposomes containing a high proportion of cholesterol. *Biochim. Soc. Trans.* 3, 1975, 160-161.
- [101] Roseman M. , Litman B.J. , Thompson T.E. Transbilayer exchange of vesicle of phasphatidilethanolamine for phosphatidylcholine and N acetimidoylphosphatidyl ethanolamine in single – walled bilayer vesicles. *Biochimistry*, 14, 1975, 2809-2816.
- [102] http://www.sciquip.co.uk/wp-content/uploads/2011/09/Sigma_3-30KS.pdf
- [103] <http://www.materials-talks.com/blog/2014/07/10/faq-peak-size-or-z-average-size-which-one-to-pick-in-dls/>
- [104] 149.171.168.221/partcat/wp-content/.../Malvern-Zetasizer-LS.pdf
- [105] Koppel, DE "Analyse des macromoléculaire polydispersité en intensité Correlation Spectroscopy: La méthode des cumulants" *J. Chem. Phys* **57** (11), pp 4814-4820, 1972.
- [106] ISO 22412: 2008 Analyse granulométrique - Dynamic Light Scattering
- [107] Thomas, JC "La détermination du journal des distributions normales de taille de particules par diffusion dynamique de la lumière" *J. Interface Colloid Sci.* **117** (1) pp 187-192 (1987).
- [108] Hadj sadok, A., "Etude rhéologique et physicochimique des systèmes à structure complexe à base de caséinate de sodium". Thèse de doctorat, (2009), Université de Blida.
- [109] M. Rebiha, N. Moulai-Mostafa, A. Hadj Sadok, « Propriétés physicochimiques et rhéologiques d'un mélange aqueux de biopolymères et d'un tensioactif non ionique », *Revue Synthèse* N°23, (Octobre 2011).
- [110] Vivier.S, « Stratégies d'optimisation par la méthode des plans d'expériences et application aux dispositifs électro-techniques modélisés par éléments finis », Thèse de doctorat soutenue à l'université de Lille (France), (Juillet2002).

- [111] Gaber M.H., Wu N.Z., Hong K., Huang S.K., Dewhirst M.W., Papahadjopoulos D., 1996. Thermosensitive liposomes: Extravasation and release of contents in tumor microvascular networks, *Int. J. Radiation Onc. Biol. Phys.*, 36 (5), 1177-1187
- [112] Houslay M.D., 1982. *Dynamics of biological membranes*, Wiley: New York
- [113] Lesieur S., Grabielle-Madelmont C., Ménager C., Cabuil V., Dahdi D., Pierrot P., Edwards K., 2003. Evidence of surfactant-induced formation of transient pores in lipid bilayers by using magnetic-fluid loaded liposomes, *J. Am. Chem. Soc.*, 125, 5266-5267
- [114] Baeckmark et al. 1995) Baeckmark T., Elender G., Lasic D., Sackmann E., 1995. Conformational transitions of mixed monolayers of phospholipids and poly (ethylene oxide) lipopolymers and interaction forces with surfaces, *Langmuir*, 11, 3975-3987.
- [115] Ge L.Q., Möhwald H., Li J.B., 2003. Phospholipid liposomes stabilized by the coverage of polyelectrolyte, *Colloids Surf. A*, 221, 49-53.
- [116] Lee C.H., Petrov P., Döbereiner H.G., 1999. Curvature of zwitterionic membranes in transverse pH gradients, *Langmuir*, 15, 8543-8546
- [117] Schaefer H. and T.E. Redelmeier, *Skin Barrier: principles of percutaneous absorption*, 1996, Karger, Basel.
- [118] Elias, P.M., *Epidermal lipids, barrier function, and desquamation*. *J. Invest. Dermatol.*, 1983. 80(1) : p. 44-49.
- [119] A. Le Hir, J.-C. Chaumeil D. Brossard. *Pharmacie galénique « bonnes pratiques de fabrication des médicaments*. 9^{ème} édition. 2007

ANNEXES

ANNEXE 1

2.2.5.3. Paramètres influençant la stabilité de la membrane lipidique

2.2.5.2.1. La température

Comme nous l'avons décrit précédemment, la température est un facteur influençant fortement l'état d'organisation de la membrane : son augmentation permet le passage d'un état organisé (en dessous de la température de transition de phase) à un état désordonné (au-dessus de cette T_m). La transition de phase des lipides permet donc d'utiliser la température comme un paramètre externe contrôlant la perméabilité de la membrane et les propriétés d'encapsulation du liposome [111].

2.2.5.2.2. Composition de la bicouche

Un choix judicieux de la structure de la bicouche permet d'envisager un contrôle précis du relargage de l'espèce encapsulée dans le temps. L'insertion de molécules telles que le cholestérol peut ainsi mener à des modifications des propriétés physiques des membranes lipidiques [112].

2.2.5.2.3. L'ajout de tensioactif dans le milieu continu

Lesieur et al. (2003) ont démontré que l'ajout d'une concentration donnée de tensioactif (octyl- β -D-glucopyranoside) provoque la libération d'une espèce encapsulée et plus précisément induit la formation transitoire de pores dans la membrane par lesquels l'espèce peut diffuser [113].

2.2.5.2.4. Présence de polymère sur la membrane

Pour les liposomes, la présence d'une couche de polymère greffée à la surface (du polyéthylène glycol par exemple) modifie la rigidité de courbure de façon importante [114]. De plus, les groupements PEG à la surface assurent une répulsion stérique entre les liposomes et limitent leur agrégation. Le groupe de Möhwald a montré que l'adsorption de polyélectrolytes augmente de façon importante la rigidité de la membrane lipidique, sans pour autant affecter la perméabilité de la membrane [115].

2.2.5.2.5. Le pH

Un changement de la valeur du pH externe peut modifier la charge de la tête polaire ou son hydratation. Cela a pour effet de modifier les forces entre têtes polaires voisines et donc modifier la stabilité de la membrane du liposome [116]. Ainsi, plus récemment, une nouvelle approche consiste à fixer des copolymères eux-mêmes sensibles au pH à la

ANNEXE 1

surface des vésicules liposomales. Le polymère déstabilise la double couche lipidique uniquement lors d'un abaissement du pH et il en résulte une libération rapide du contenu liposomal à pH acide [15].

2.2.8. Mécanisme de pénétration cutanée des liposomes

2.2.8.2. Facteurs influençant la pénétration percutanée

C'est le SC qui est responsable de la perméabilité de la peau [117]. Un composé chimique est habituellement appliqué sur la peau dans un véhicule. Il peut s'agir d'un simple solvant (eau, solvant hydrophile ou lipophile). La première étape de la perméation cutanée est la distribution entre le véhicule et le film hydrolipidique de surface. Elle dépend de l'affinité du composé chimique pour l'un ou l'autre des milieux mais aussi de la diffusion du composé dans le véhicule. En effet, seules les molécules présentes à l'interface entre les deux milieux peuvent passer dans les tissus. La nature de la formulation joue donc ici un rôle important. Puis, la molécule diffuse dans les différentes couches de l'épiderme totalement hydratées pour ensuite continuer à diffuser dans le derme, également hydrophile [117]. La diffusion d'une couche à l'autre est appelée « perméation ». Au niveau du derme, les molécules entrent en contact avec le système vasculaire capillaire qui se charge d'en résorber une partie, qui passe alors dans la circulation générale pour fournir une action systémique. C'est la « résorption ». La diffusion peut se poursuivre dans le derme et même dans les tissus sous-cutanés [117]. Chaque étape se caractérise par une vitesse propre et la vitesse du processus global dépendra surtout de l'étape la plus lente [118].

Les deux étapes de l'absorption cutanée, pénétration à travers la couche cornée et absorption par les tissus de la peau (épiderme, derme, hypoderme) dépendent de la fonction barrière de la couche cornée ;

- **L'épaisseur de la couche cornée** est donc un facteur important d'absorption. Cependant l'efficacité de la fonction barrière dépend du nombre de couches cellulaires mais aussi du taux et du type des lipides intercellulaire. Par exemple, bien que l'âge ne modifie pas le nombre de couches cellulaires.
- **L'hydratation de la couche cornée** augmente sa perméabilité ; l'état d'hydratation de la peau possède une influence sur la perméabilité du Stratum corneum et de ce fait, celle-ci peut être simplement modifiée en augmentant la teneur en eau du stratum corneum.

ANNEXE 1

En fait, le mécanisme de la pénétration des principes actifs aux différents niveaux de la peau est très complexe. Ce qu'on peut affirmer, c'est qu'elle est sous la dépendance de nombreux facteurs qui peuvent être énumérés de la façon suivante : [119]

✓ **La nature du principe actif**

La peau se comporte comme un filtre vivant très sélectif qui ne laisse passer que certains principes actifs, les uns à travers l'épiderme, les autres dans une moindre mesure par l'appareil pilo-sébacé.

✓ **Les excipients constituant la base de la préparation**

Ils interviennent par leur nature chimique, leurs propriétés physiques et mécaniques, leur lipophilie ou leur hydrophilie, la présence ou non d'agents tensioactifs, etc. Ils doivent se mélanger au film hydrolipidique cutané pour céder leur principe actif qui doit être capable de passer dans les tissus au contact desquels ils se trouvent. Le coefficient de partage du principe actif doit être en faveur des tissus.

✓ **Région d'application**

Selon les régions du corps, la couche kératinisée est plus ou moins importante et les follicules pileux plus ou moins nombreux.

✓ **Le degré d'hydratation de la peau**

Le degré d'hydratation peut être influencé par la nature des excipients. Un excipient hydrophobe peut constituer un revêtement occlusif qui maintient la peau sous-jacente très humide. Au contraire, un excipient hygroscopique peut présenter l'inconvénient de dessécher la peau.

✓ **Le pH de la préparation**

Le pH peut intervenir sur le degré d'ionisation des principes ionisables donc sur leur pénétration.

✓ **Les modes d'application** peuvent être très divers :

- Simple étalement ou étalement accompagné de frictions et massages.
 - Application en couches plus ou moins épaisses.
 - Temps de contact plus ou moins long et répétition plus ou moins fréquente.
 - Application suivie ou non de la pose d'un bandage ou pansement, etc.
- ✓ Enfin le dernier facteur est très important : **l'état de la peau** ; la pénétration des médicaments varie beaucoup selon l'état et l'âge de la peau et selon le type de maladie.

ANNEXE 2

2.1. Résultats de la DLS : Distribution granulométrique et Fonction d'autocorrélation

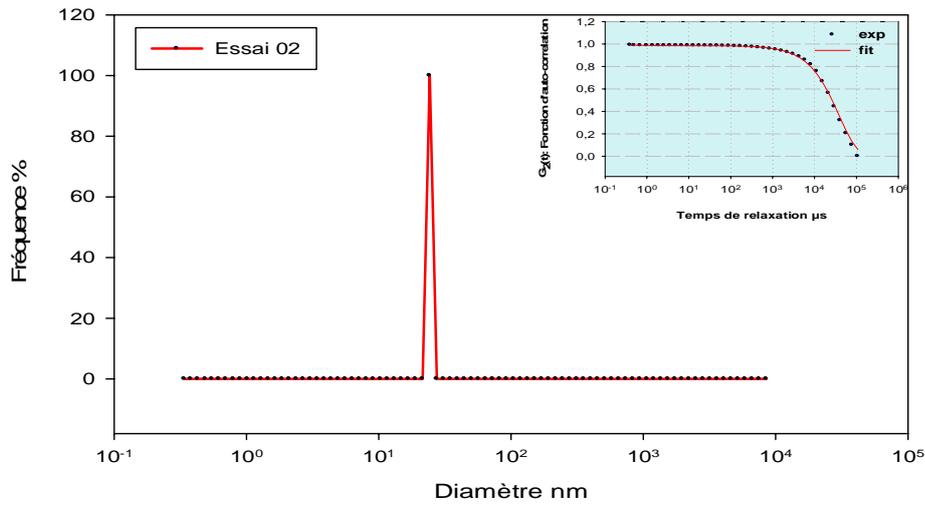


Figure 2.1 : Distribution granulométrique de l'essai N° 2.

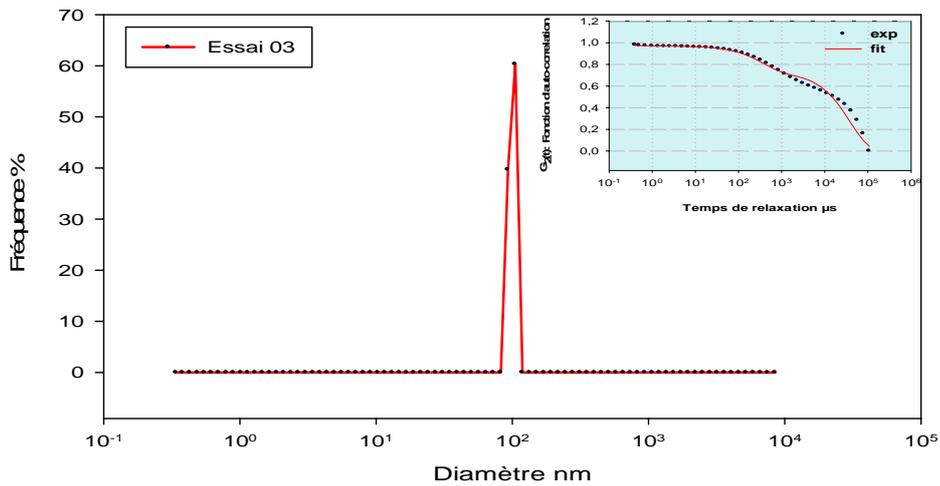


Figure 2.2 : Distribution granulométrique de l'essai N° 3.

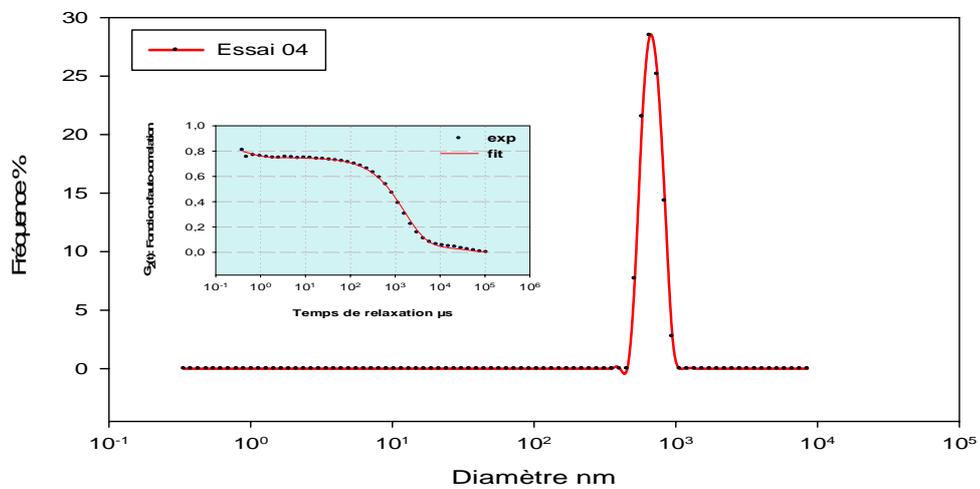


Figure 2.3 : Distribution granulométrique de l'essai N° 4.

ANNEXE 2

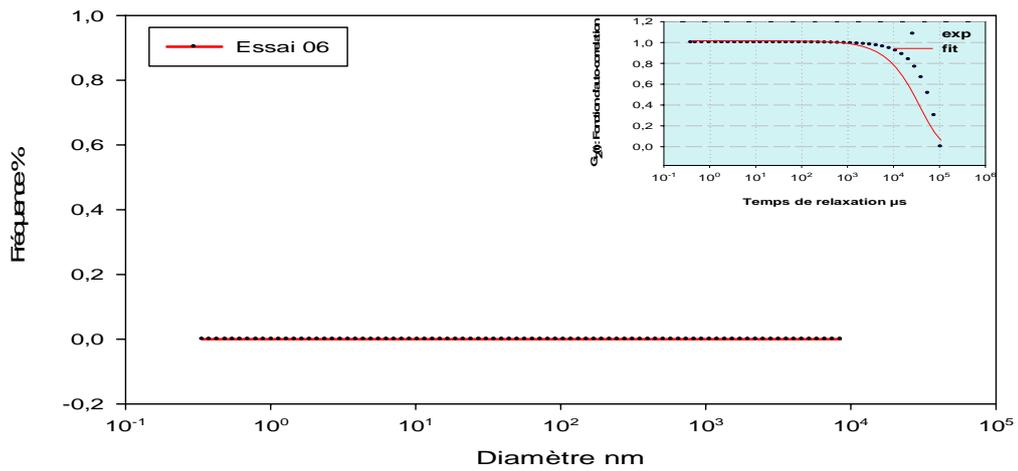


Figure 2.4 : Distribution granulométrique de l'essai N° 6.

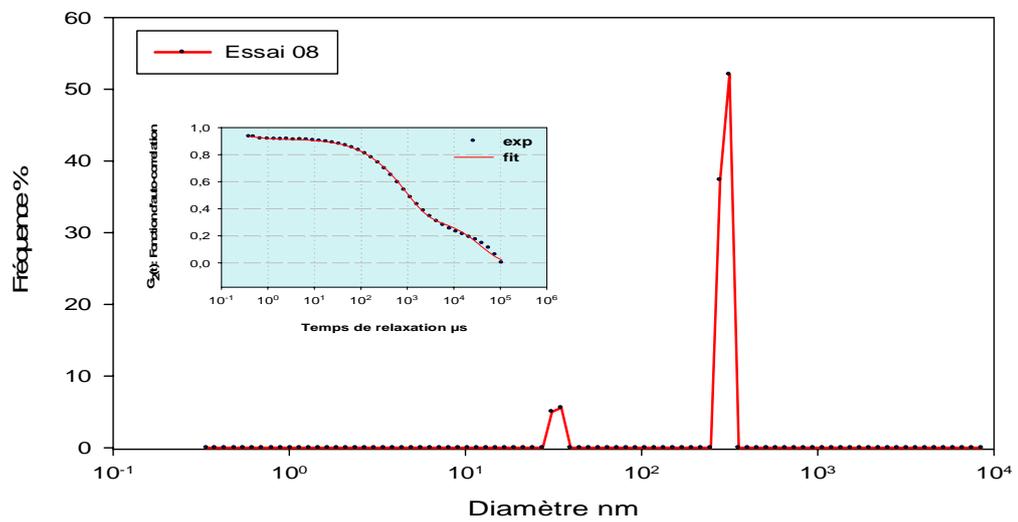


Figure 2.5 : Distribution granulométrique de l'essai N° 8.

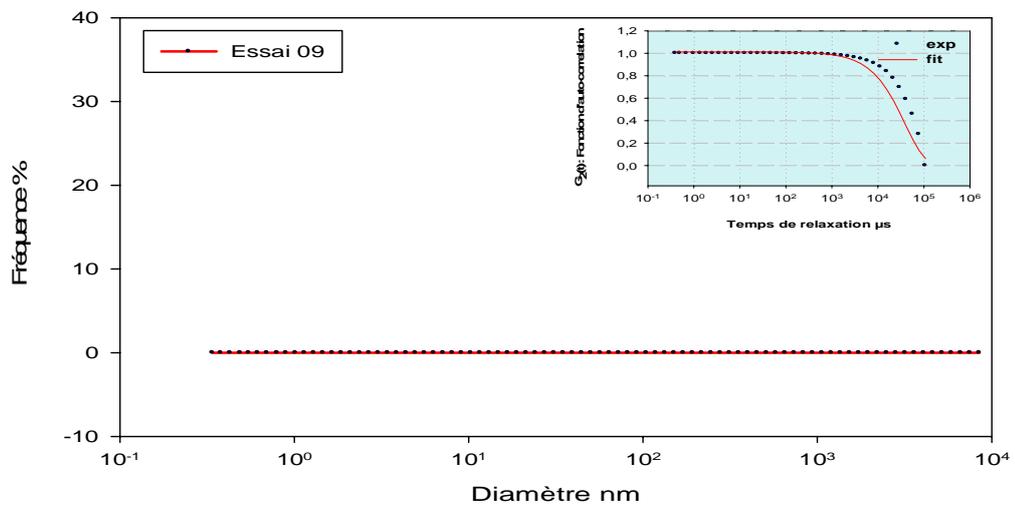


Figure 2.6 : Distribution granulométrique de l'essai N° 09.

ANNEXE 2

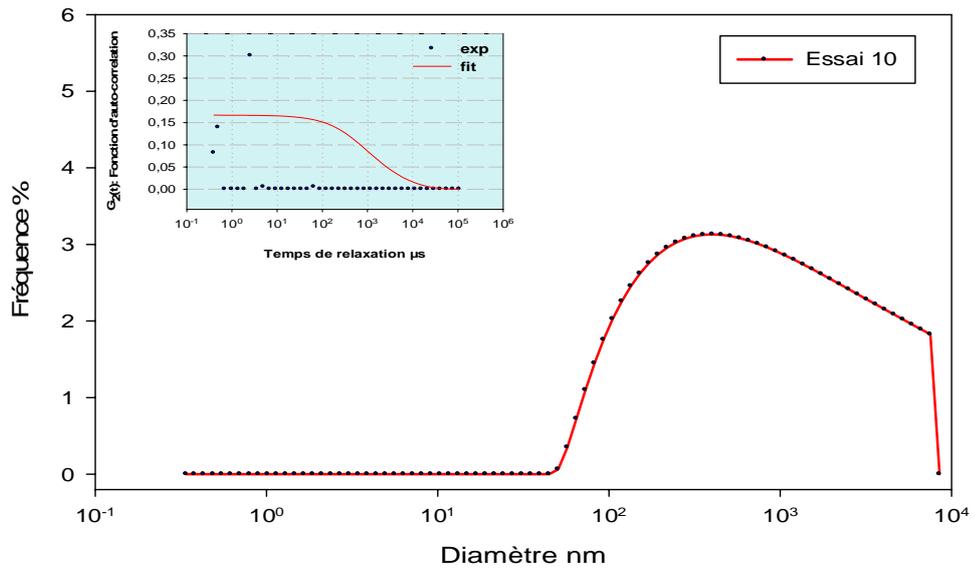


Figure 2.7 : Distribution granulométrique de l'essai N° 10.

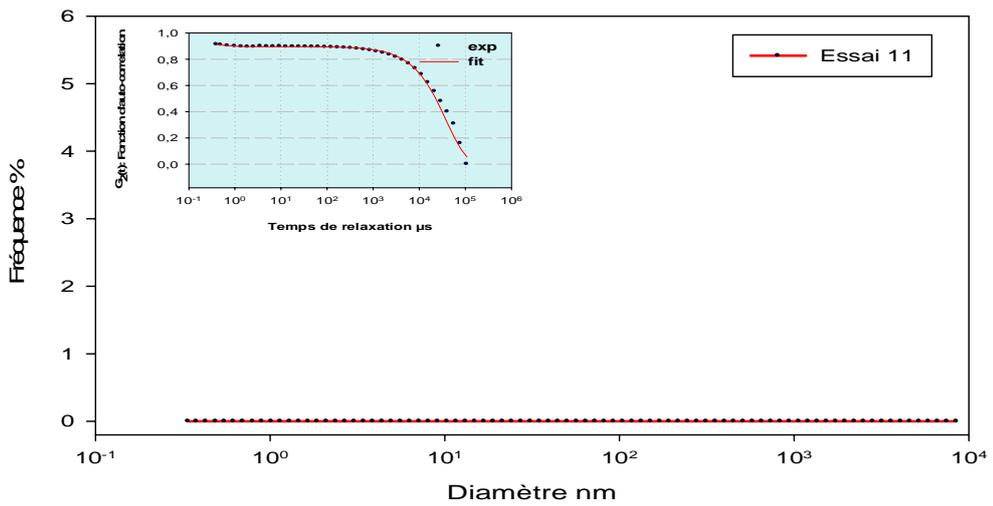


Figure 2.8 : Distribution granulométrique de l'essai N° 11.

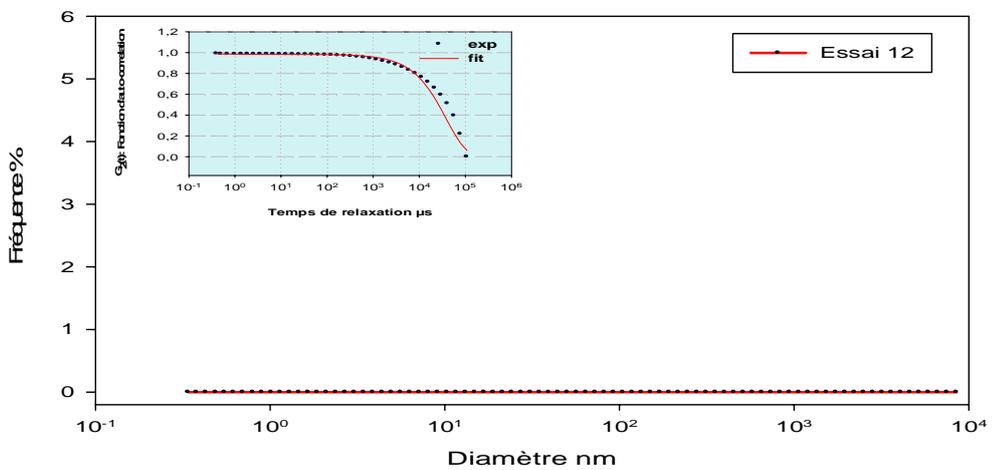


Figure 2.9 : Distribution granulométrique de l'essai N° 12.

ANNEXE 2

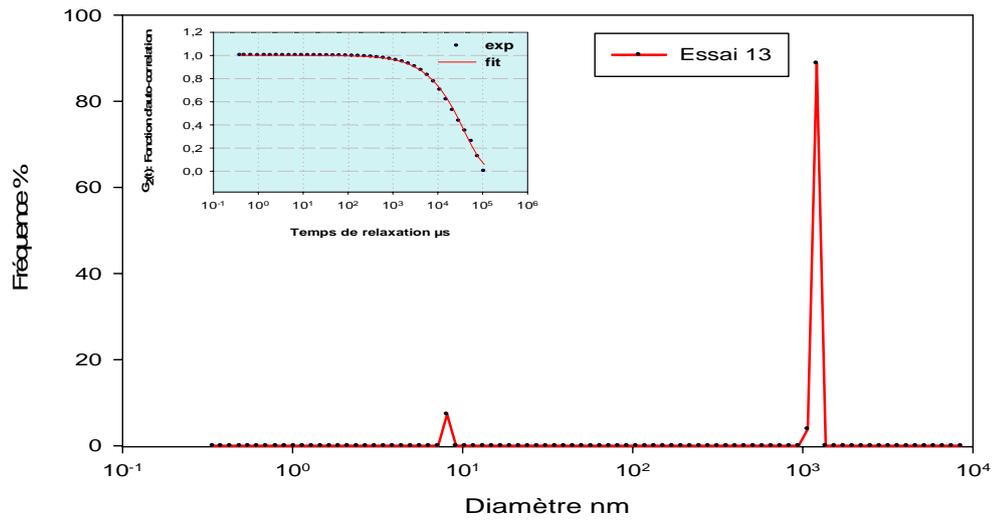


Figure 2.10 : Distribution granulométrique de l'essai N° 13.

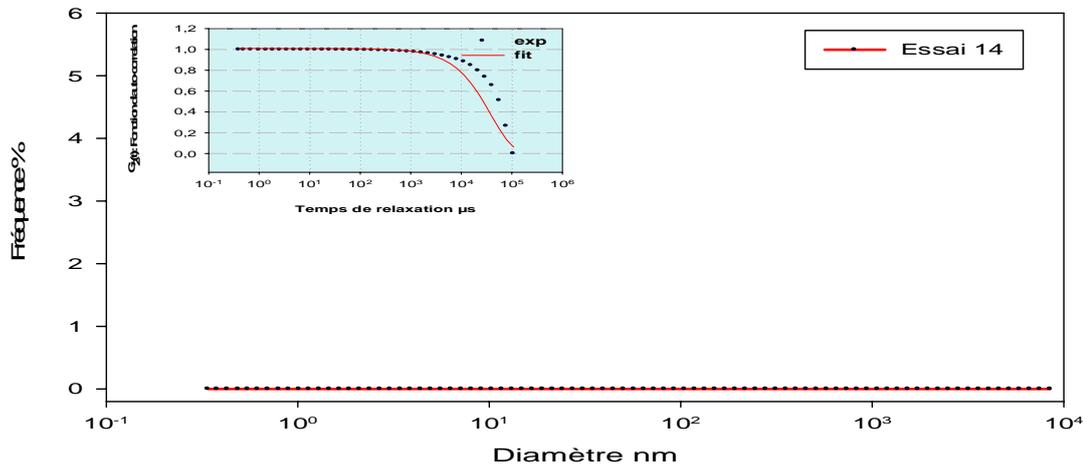


Figure 2.11 : Distribution granulométrique de l'essai N° 14.

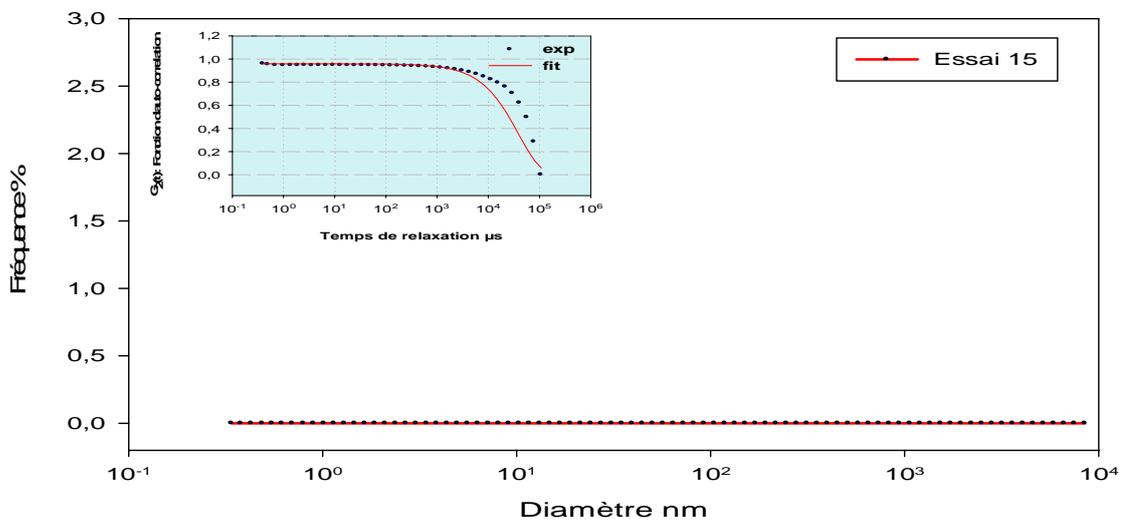


Figure 2.12 : Distribution granulométrique de l'essai N° 15.

ANNEXE 2

2.2. Résultats des pics d'intensité versus potentiel zêta

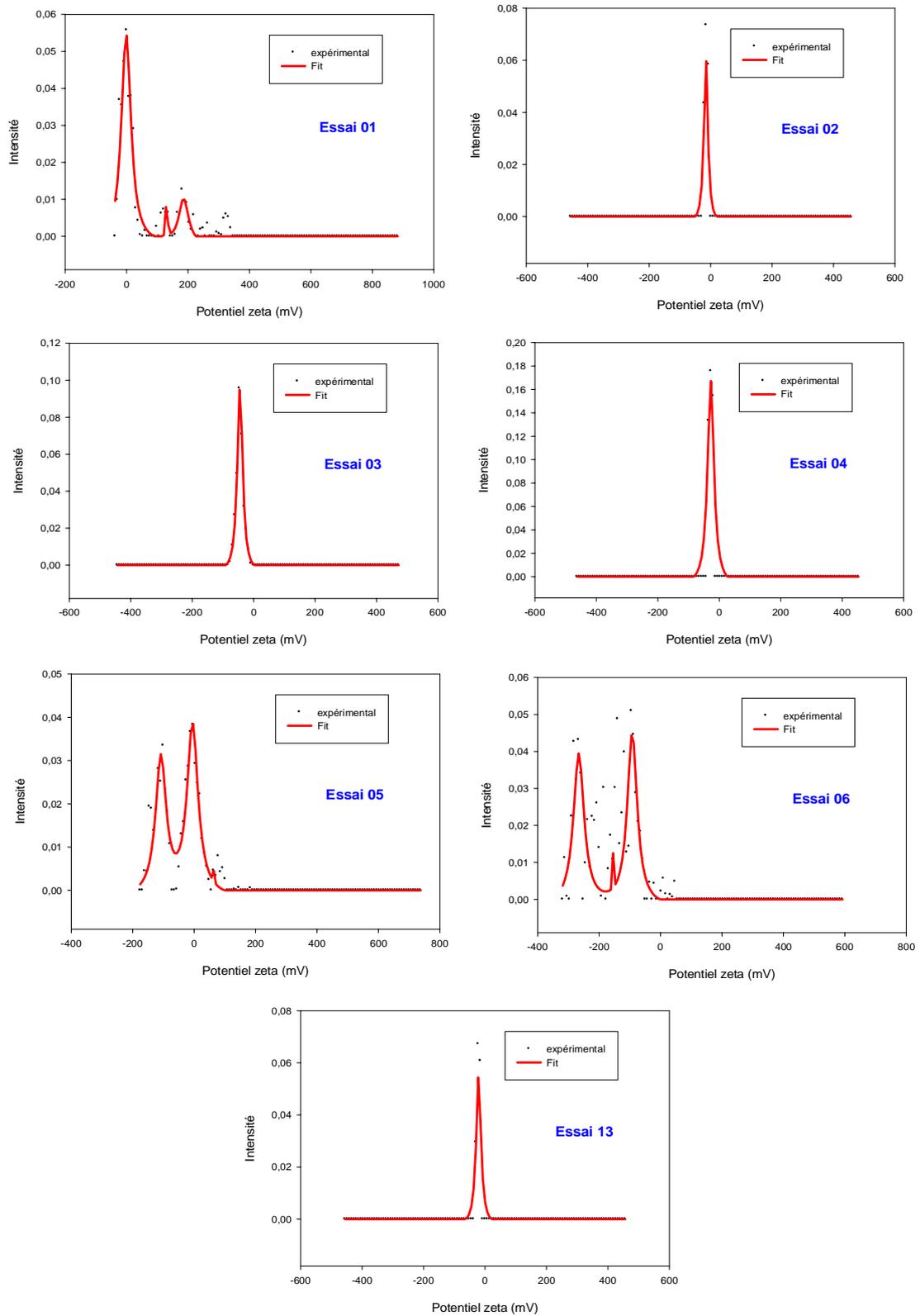


Figure 2.13 : Courbes du potentiel zêta des essais : 01, 02, 03, 04, 05, 06, 13.

ANNEXE 2

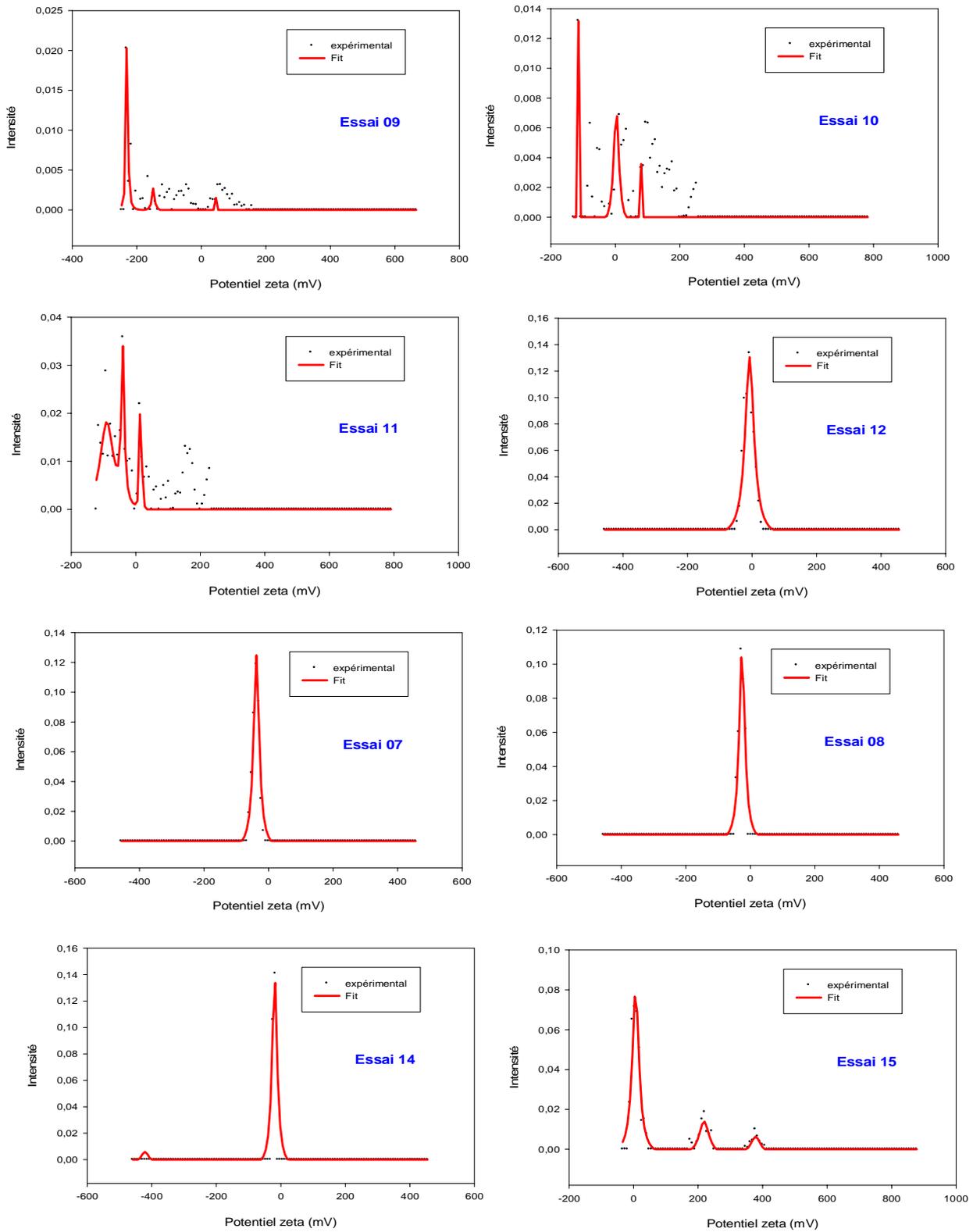


Figure 2.14 : Courbes du potentiel zêta pour les essais : 09, 10, 11, 12, 07, 08, 14,15.

ANNEXE 2

2.3. Résultats de dosage par HPLC

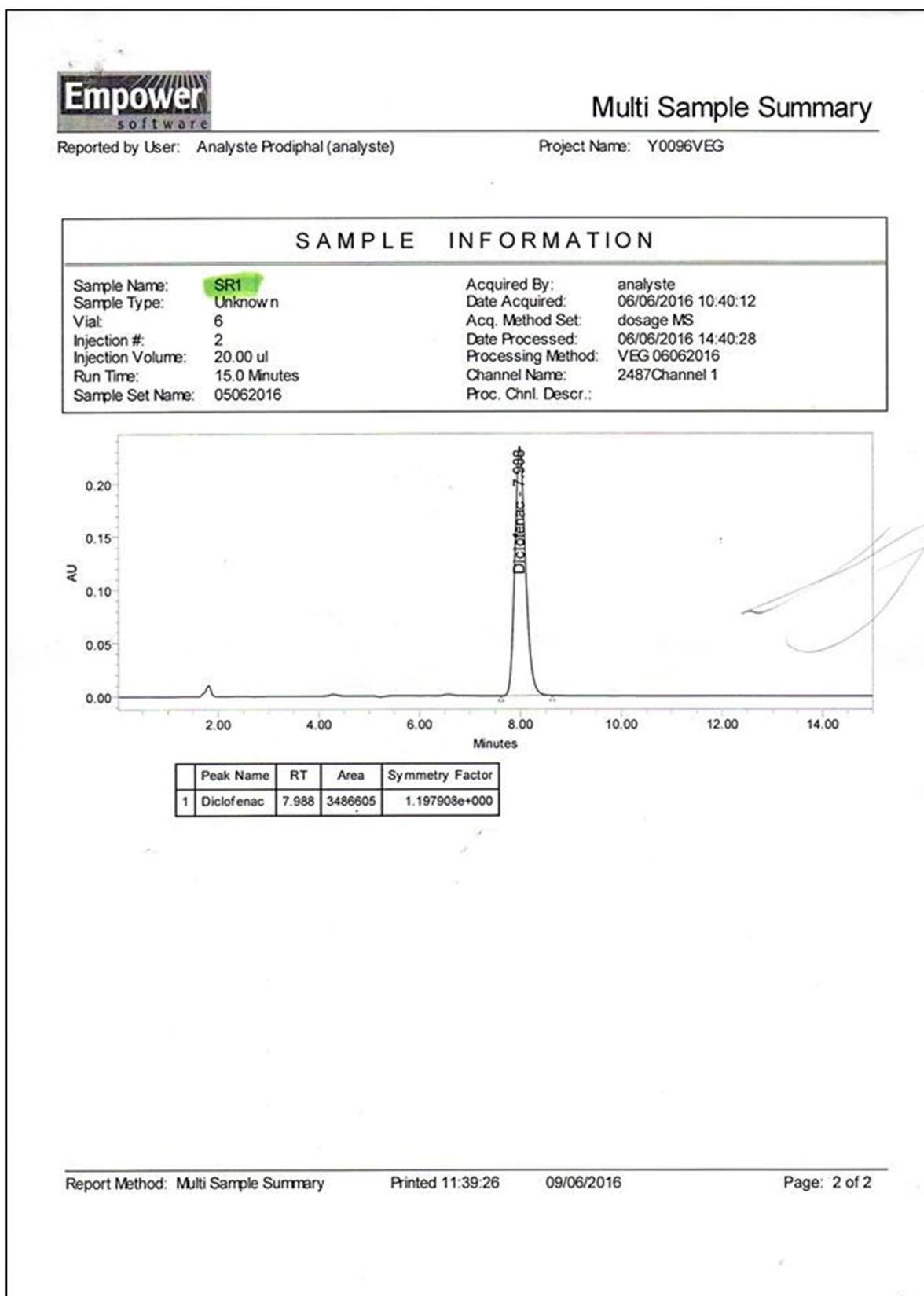


Figure 2.15: Chromatogramme du HPLC de standard de diclofénac diéthylamine

ANNEXE 2

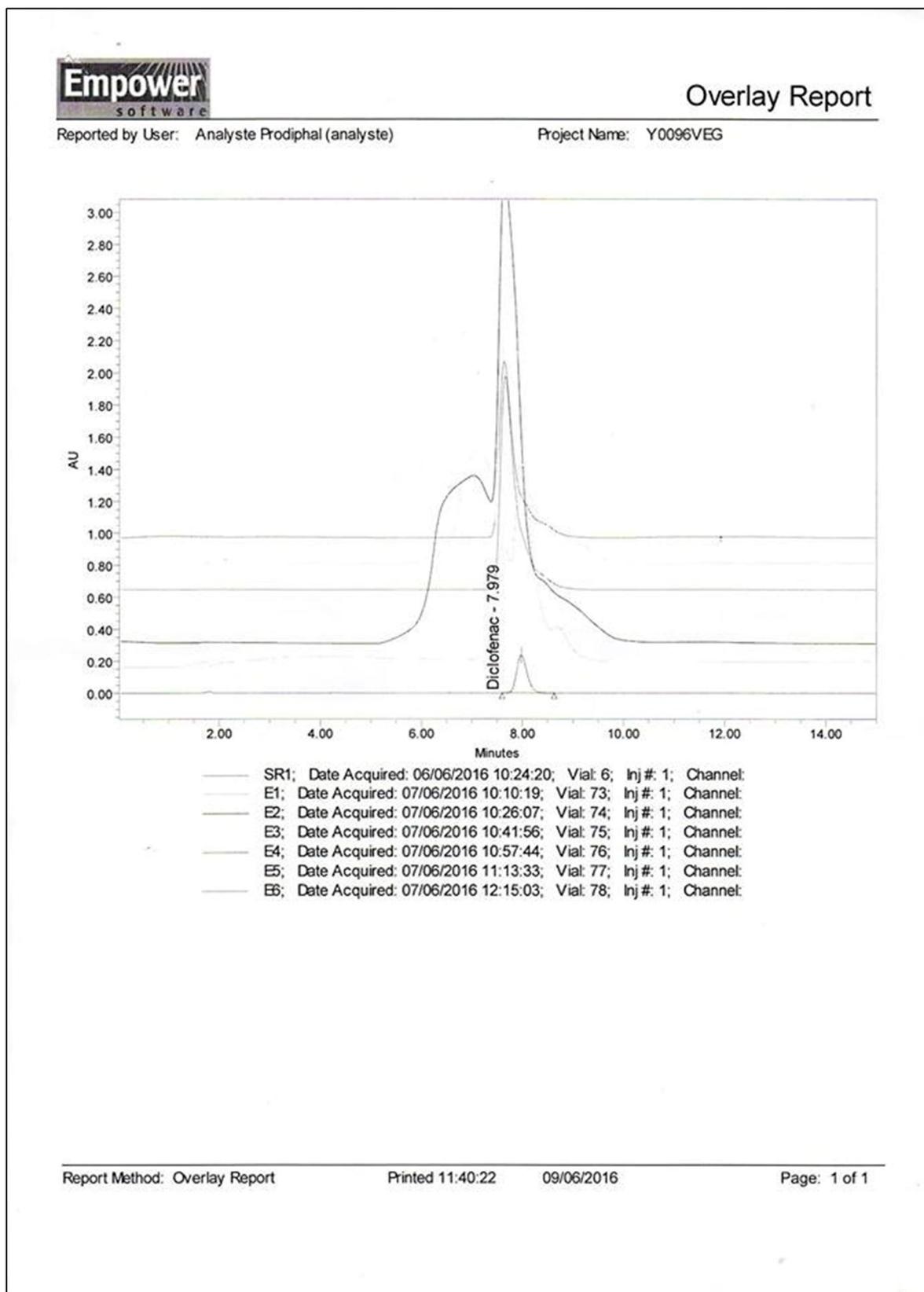


Figure 2.16 : Chromatogramme du HPLC pour quelques échantillons de diclofénac diéthylamine.

ANNEXE 2

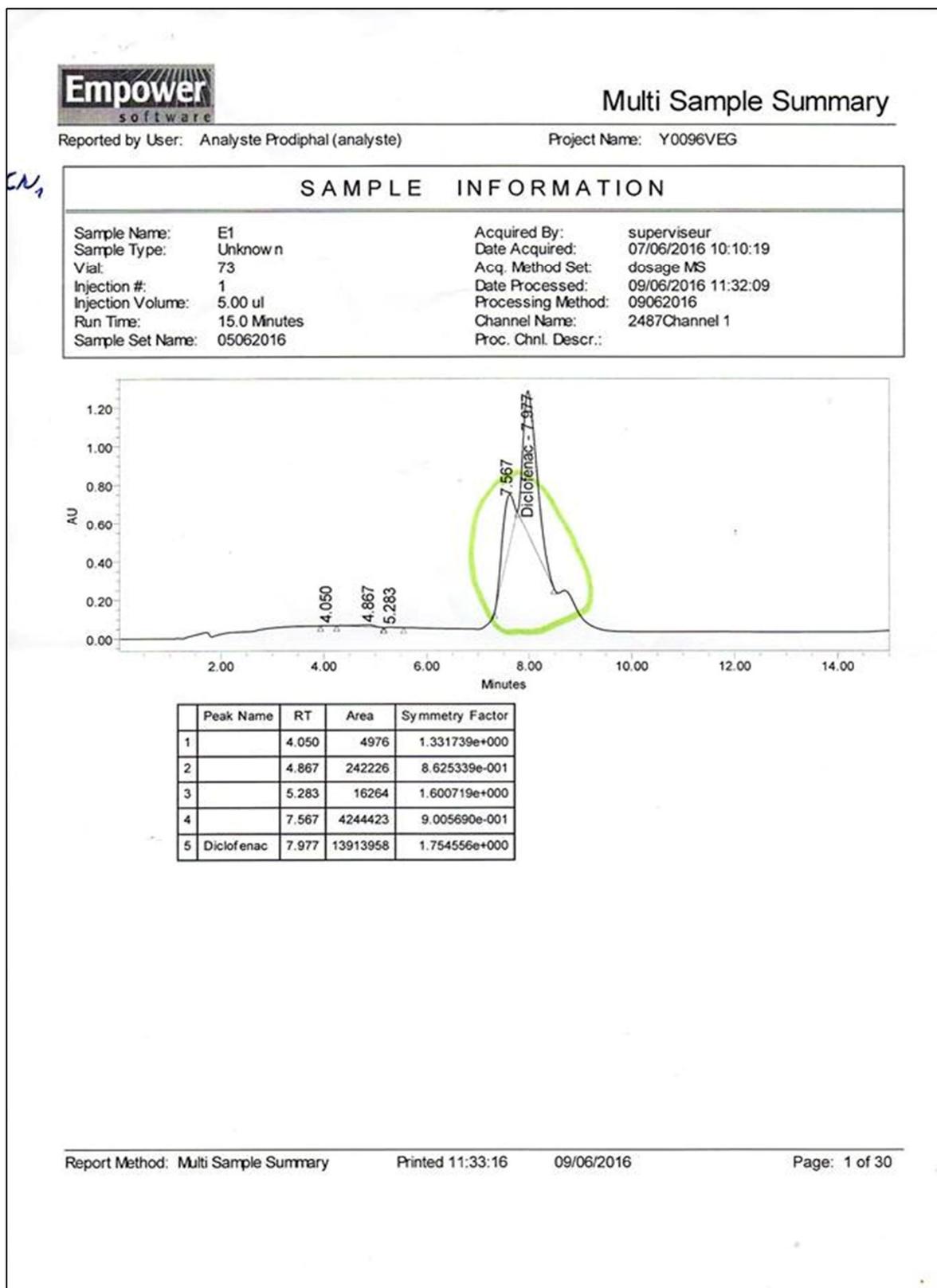


Figure 2.17: Chromatogramme du HPLC de culot de l'essai N° 1.

ANNEXE 2

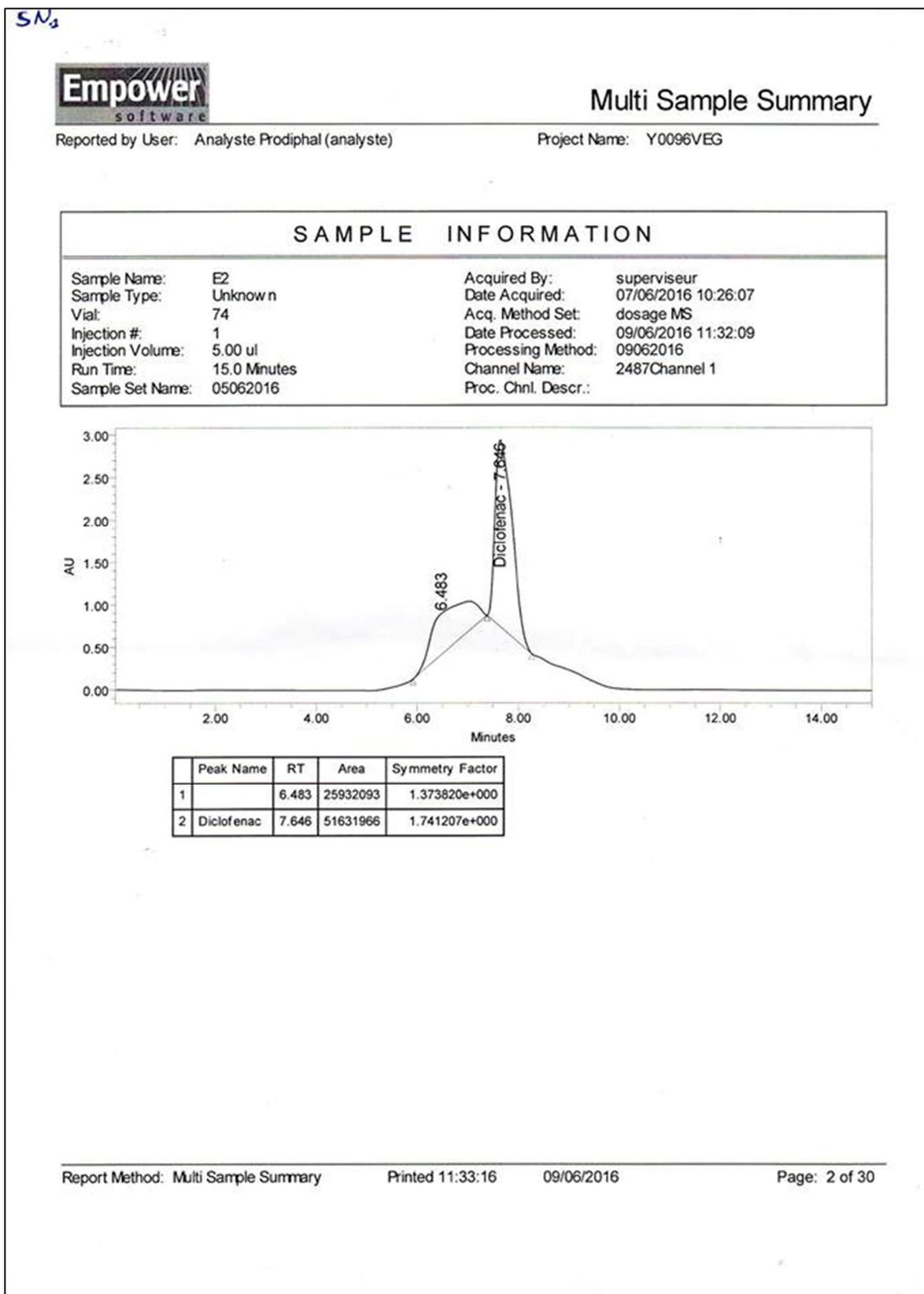


Figure 2.18: Chromatogramme du HPLC de surnageant de l'essai N° 1.

ANNEXE 2

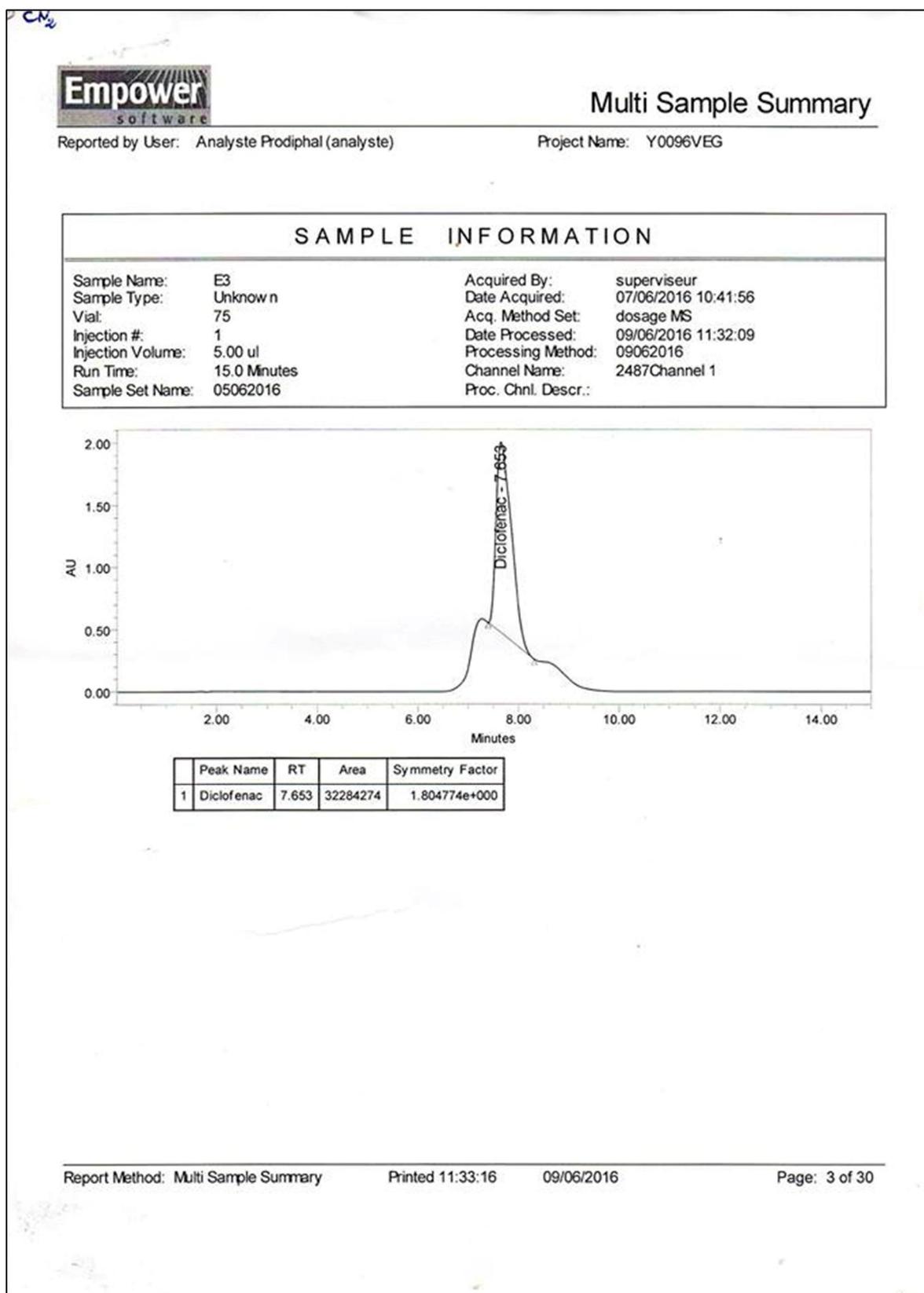


Figure 2.19: Chromatogramme du HPLC de culot de l'essai N° 2.

ANNEXE 2

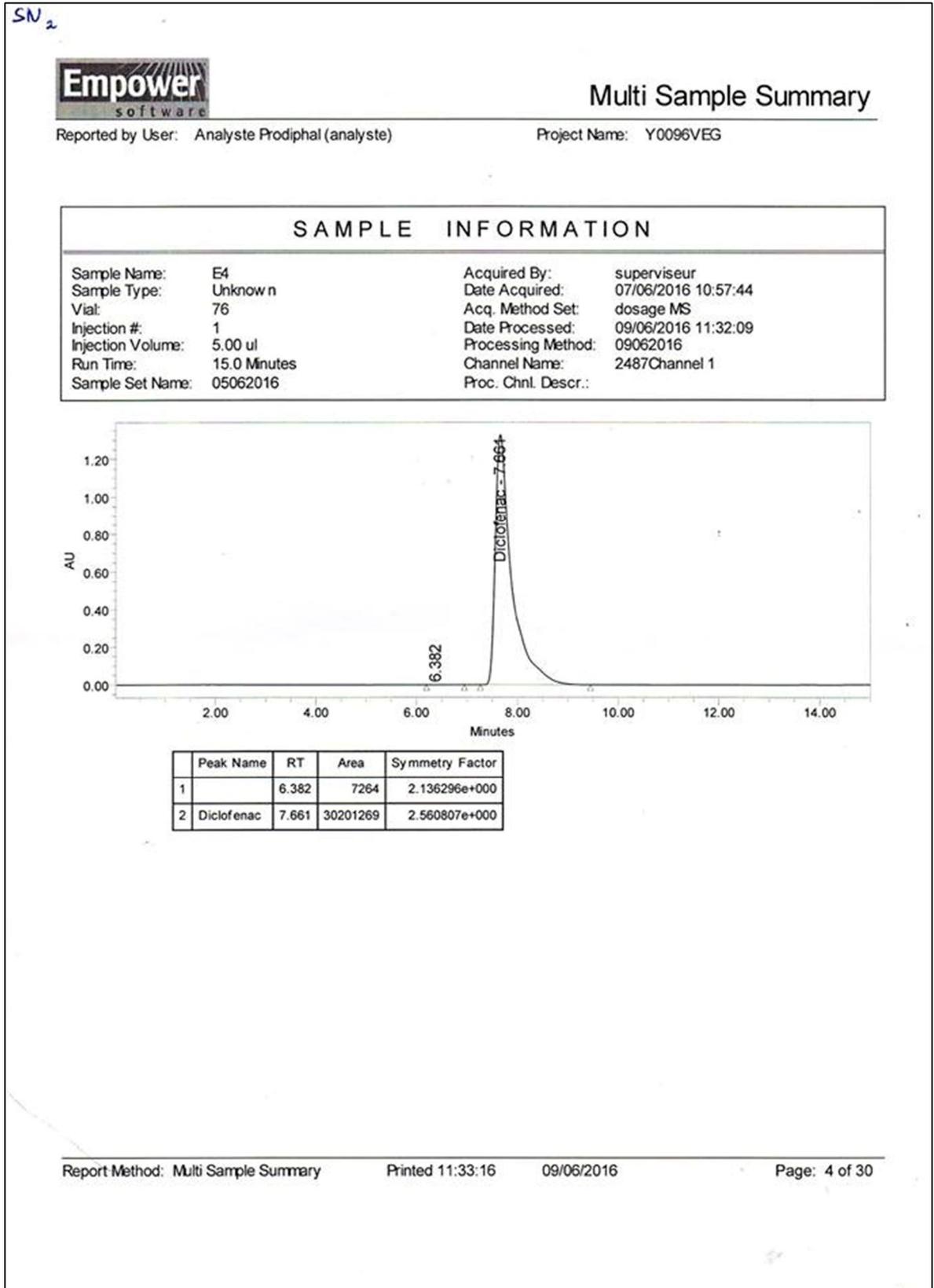


Figure 2.20: Chromatogramme du HPLC de surnageant de l'essai N° 2.

ANNEXE 2

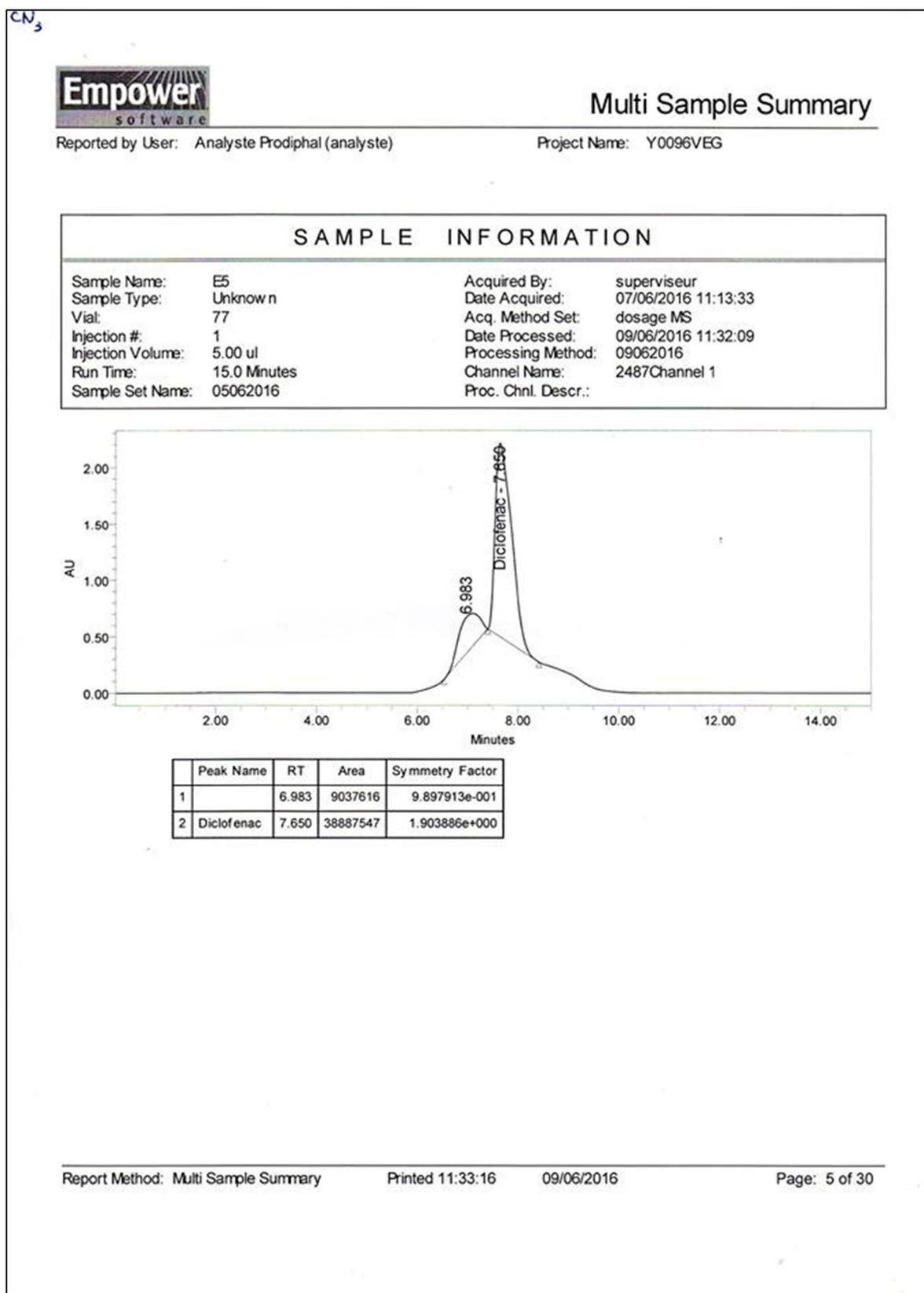


Figure 2.21: Chromatogramme du HPLC de culot de l'essai N° 3.

ANNEXE 2

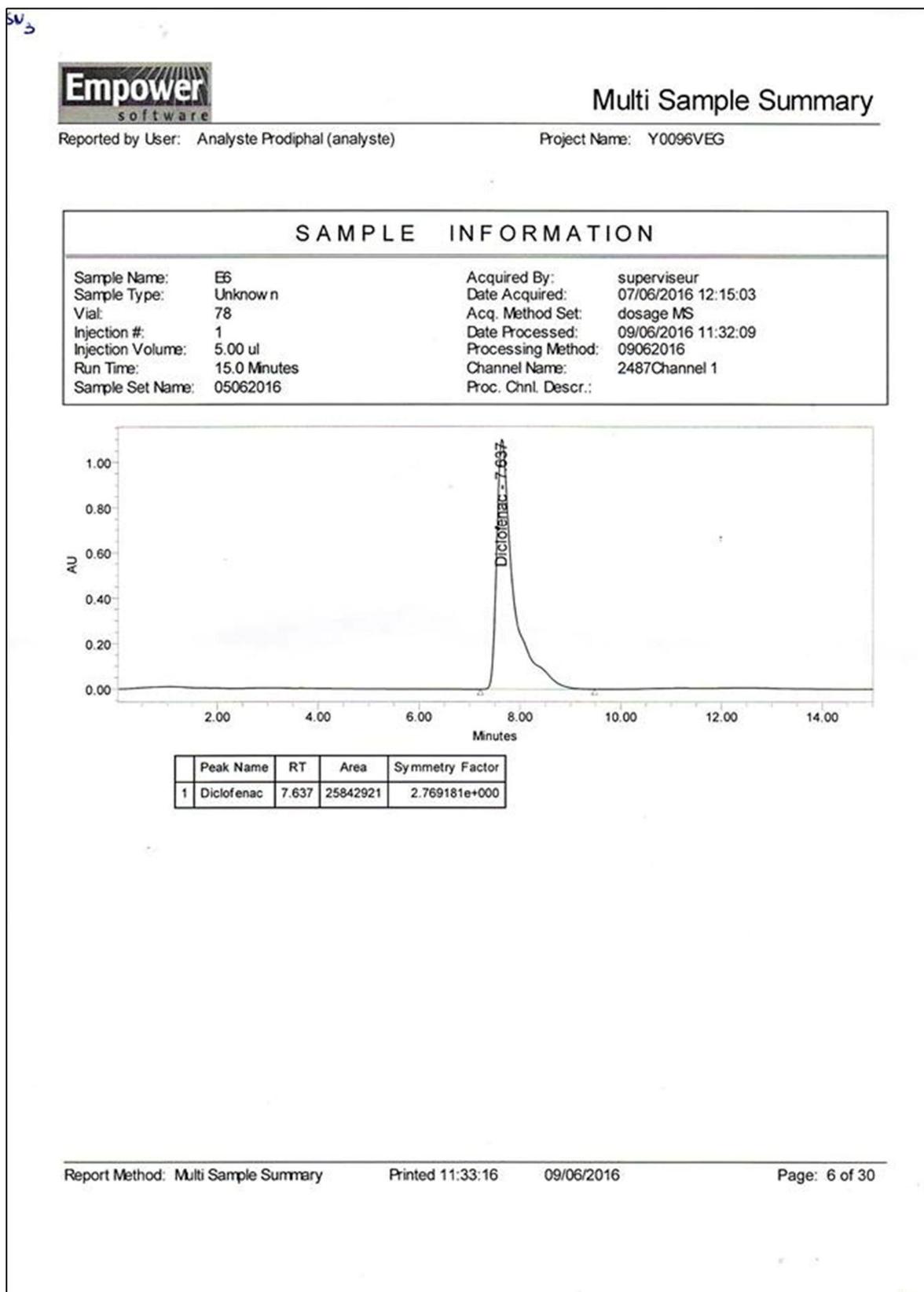


Figure 2.22: Chromatogramme du HPLC de surnageant de l'essai N° 3.

ANNEXE 2

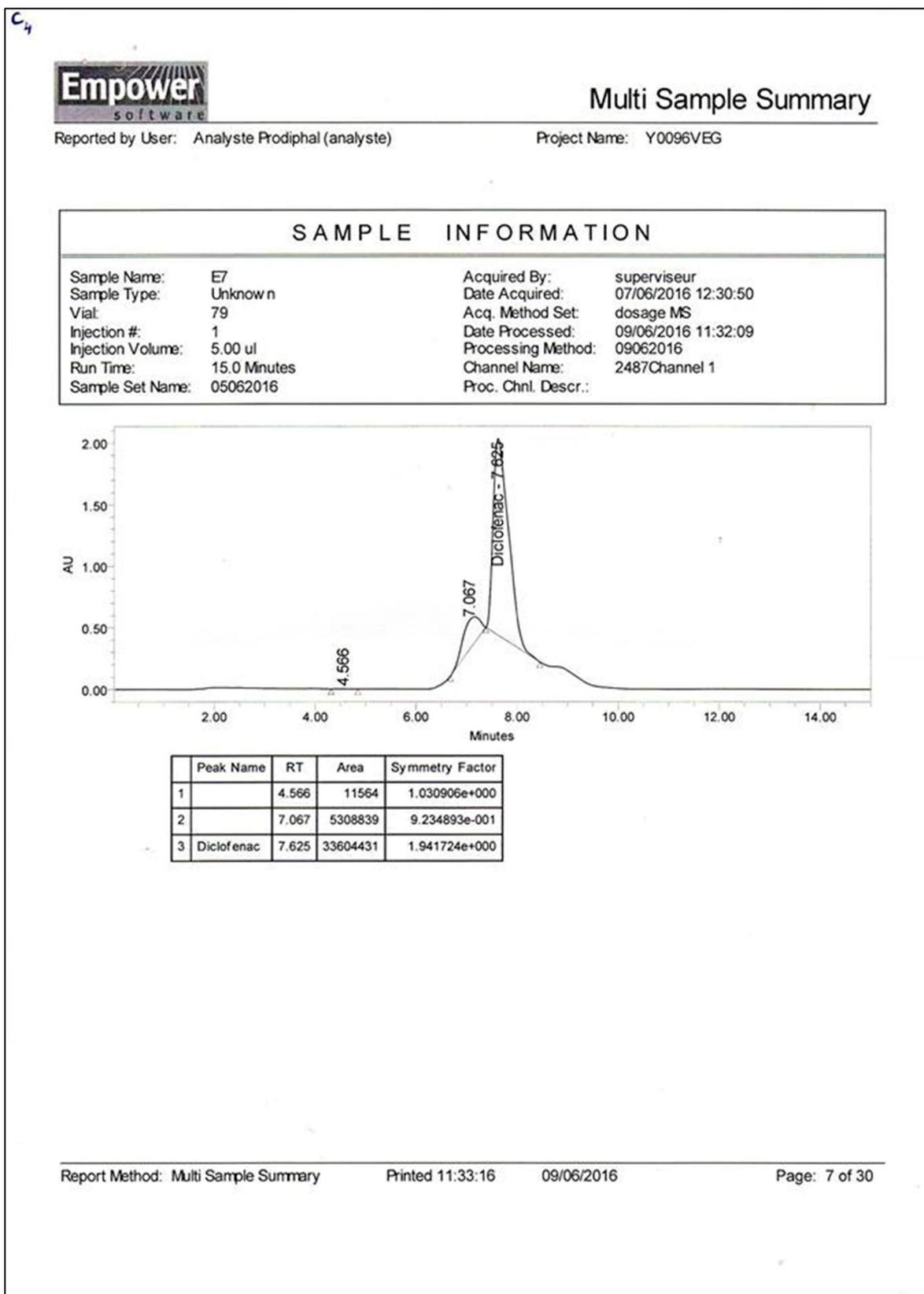


Figure 2.23: Chromatogramme du HPLC de culot de l'essai N° 4.

ANNEXE 2

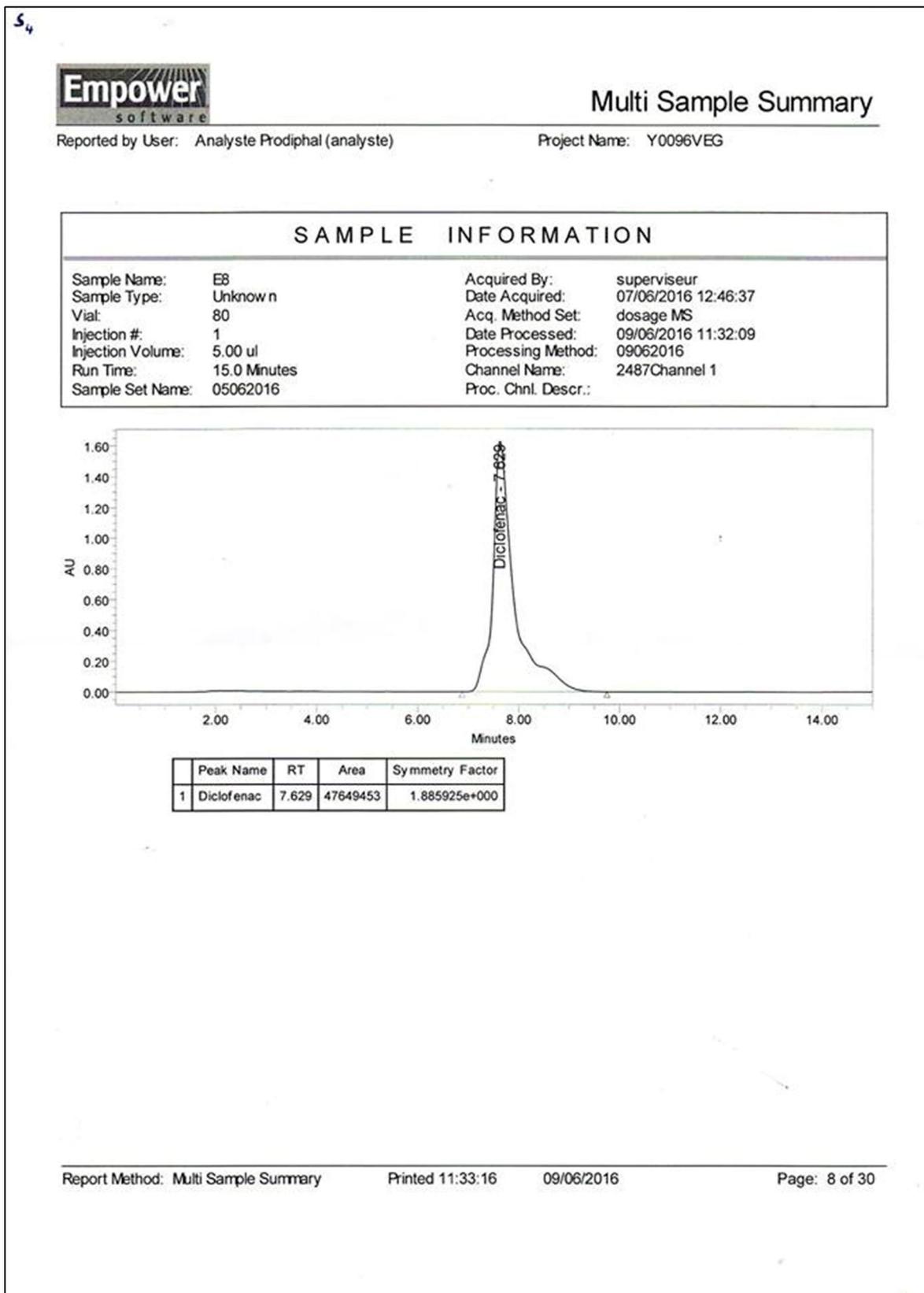


Figure 2.24: Chromatogramme du HPLC de surnageant de l'essai N° 4.

ANNEXE 2

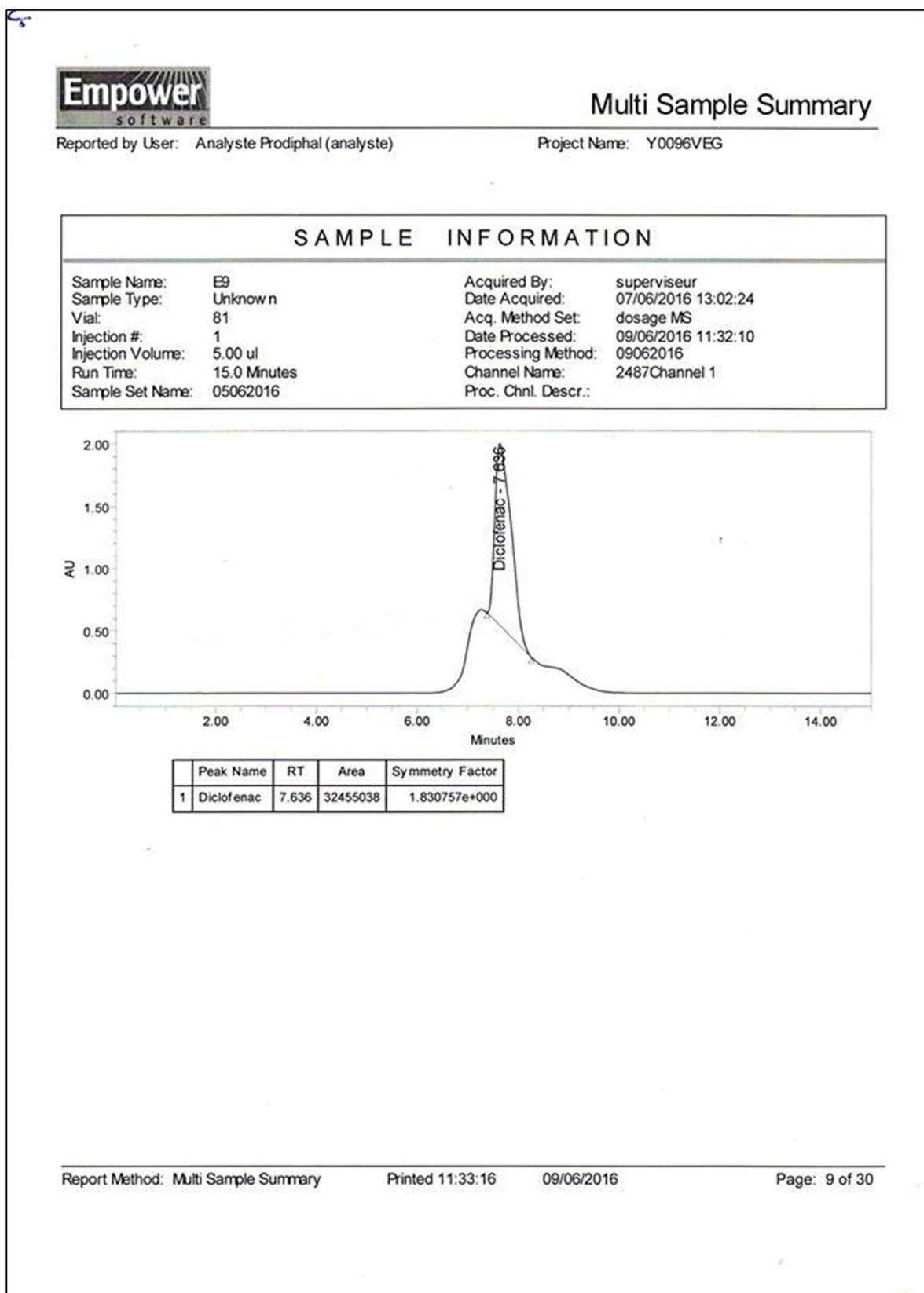


Figure 2.25: Chromatogramme du HPLC de culot de l'essai N° 5.

ANNEXE 2

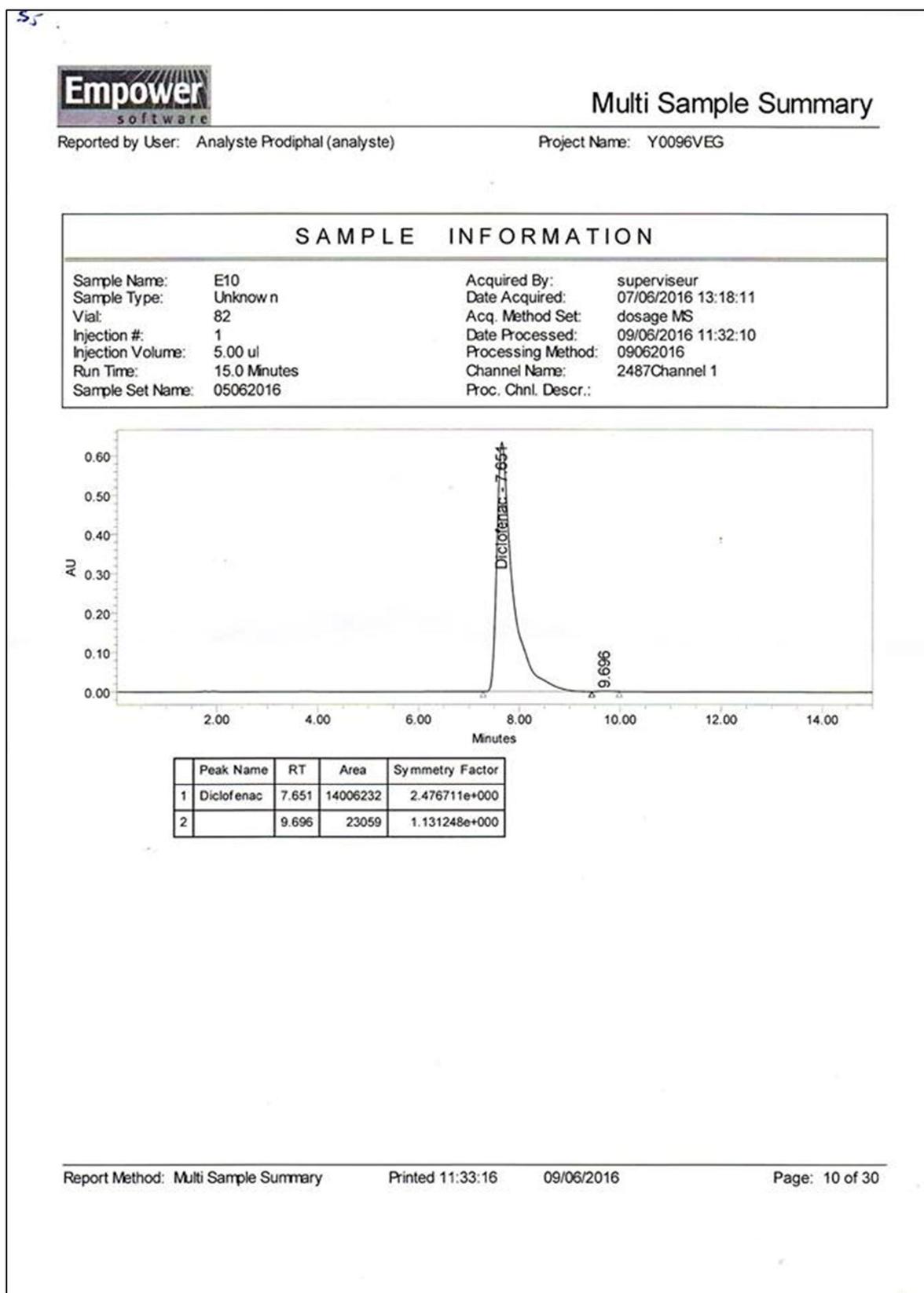


Figure 2.26: Chromatogramme du HPLC de surnageant de l'essai N° 5.

ANNEXE 2

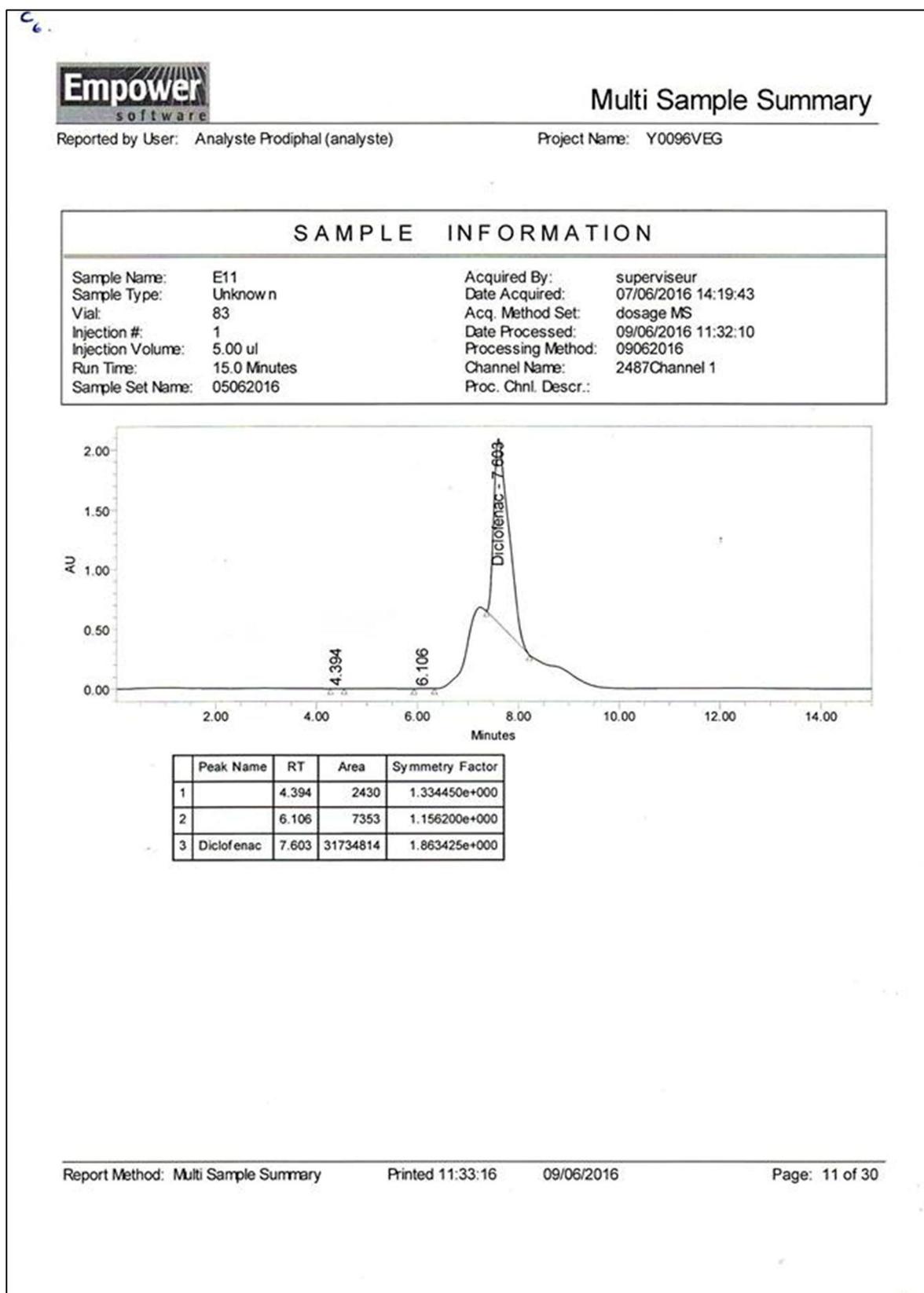


Figure 2.27: Chromatogramme du HPLC de culot de l'essai N° 6.

ANNEXE 2

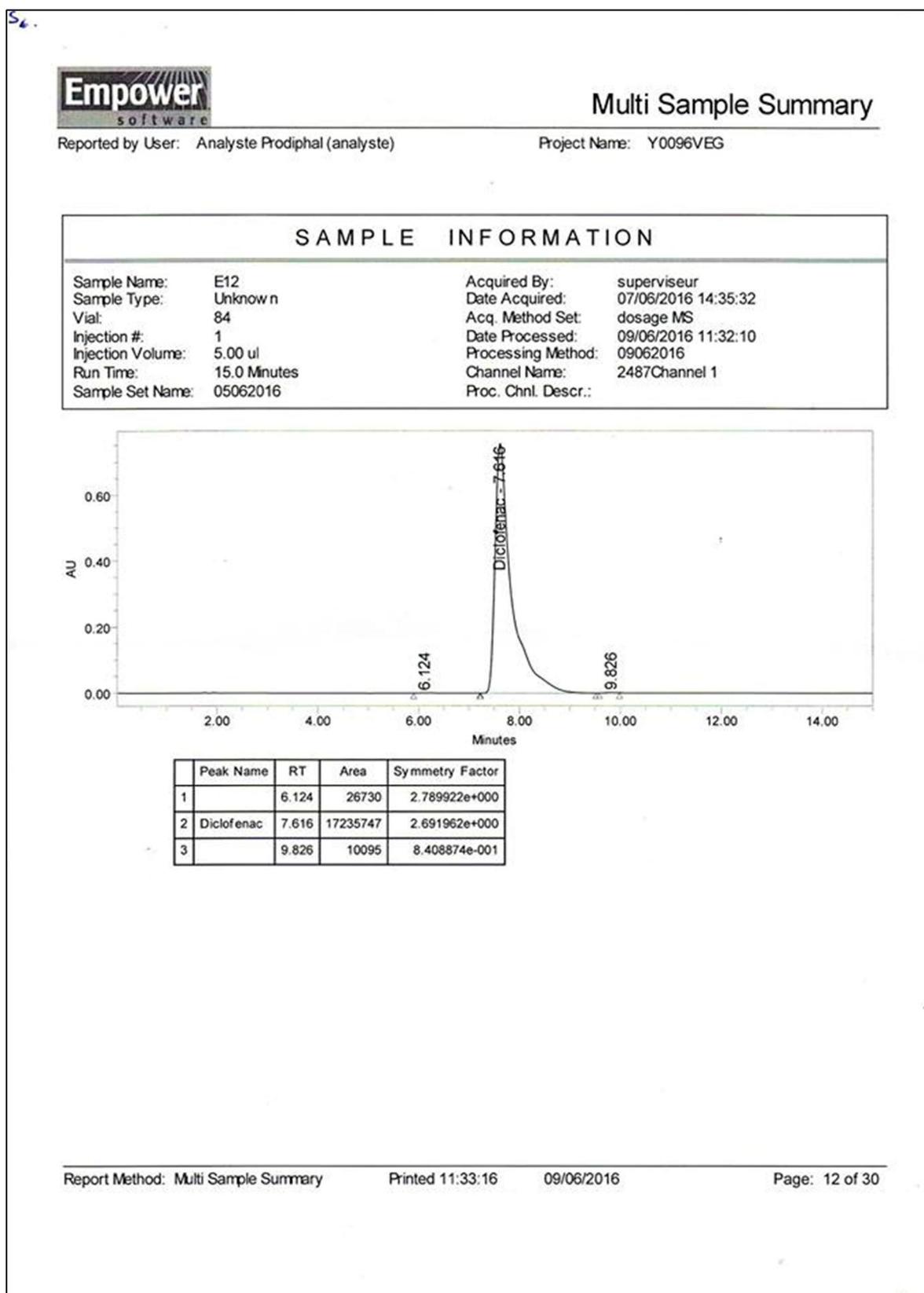


Figure 2.28: Chromatogramme du HPLC de surnageant de l'essai N° 6.

ANNEXE 2

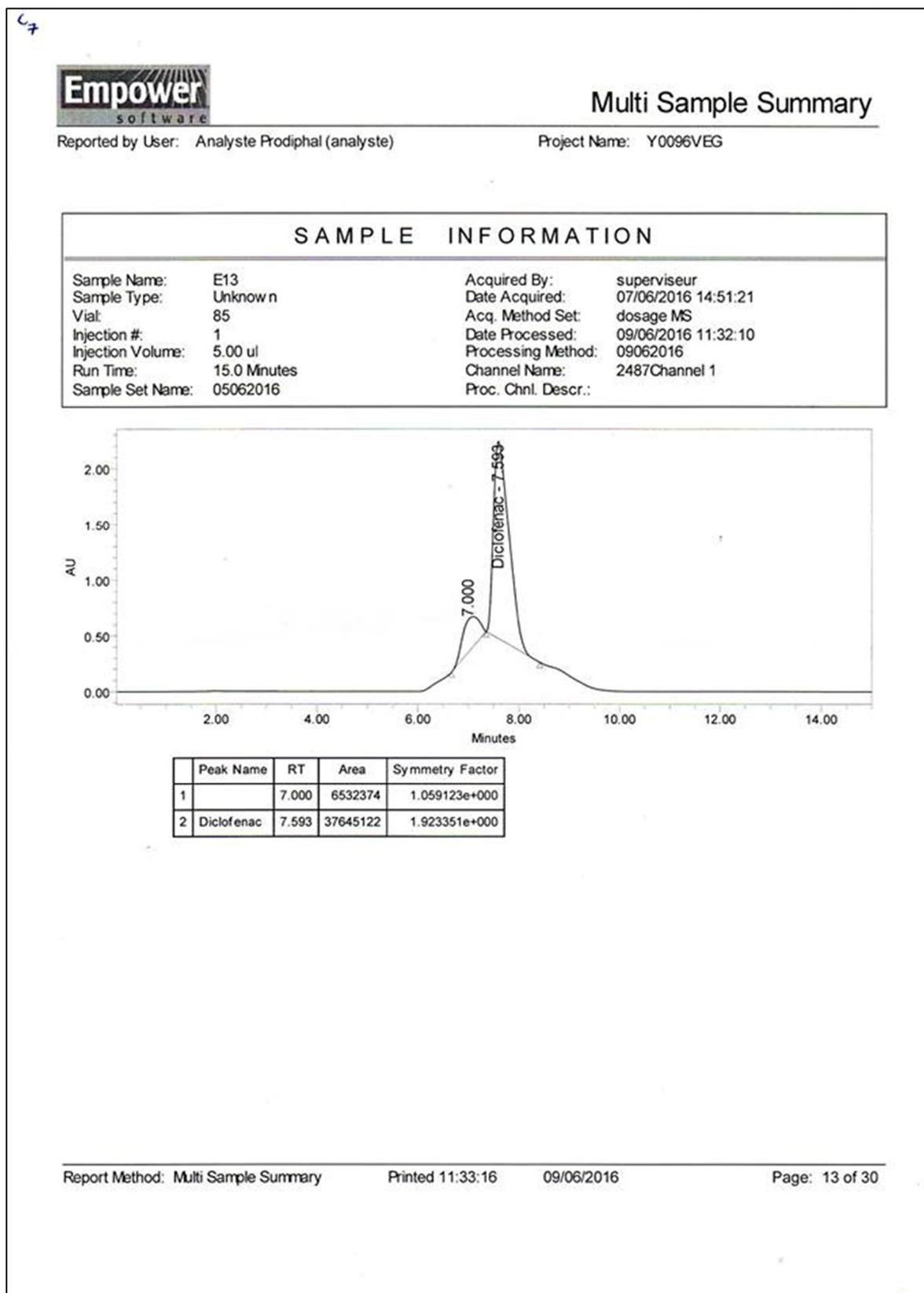


Figure 2.29: Chromatogramme du HPLC de culot de l'essai N° 7.

ANNEXE 2

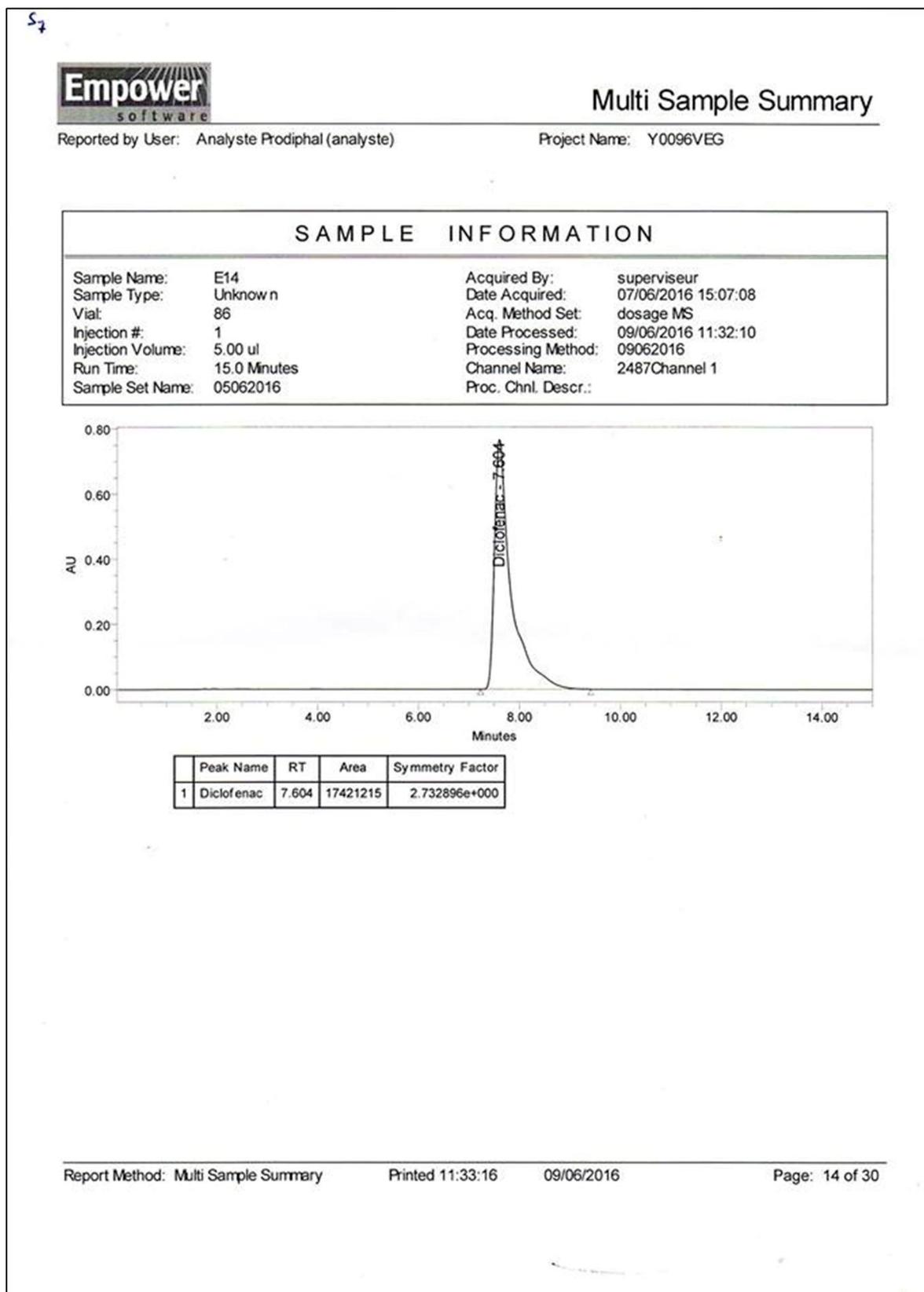


Figure 2.30: Chromatogramme du HPLC de surnageant de l'essai N° 7.

ANNEXE 2

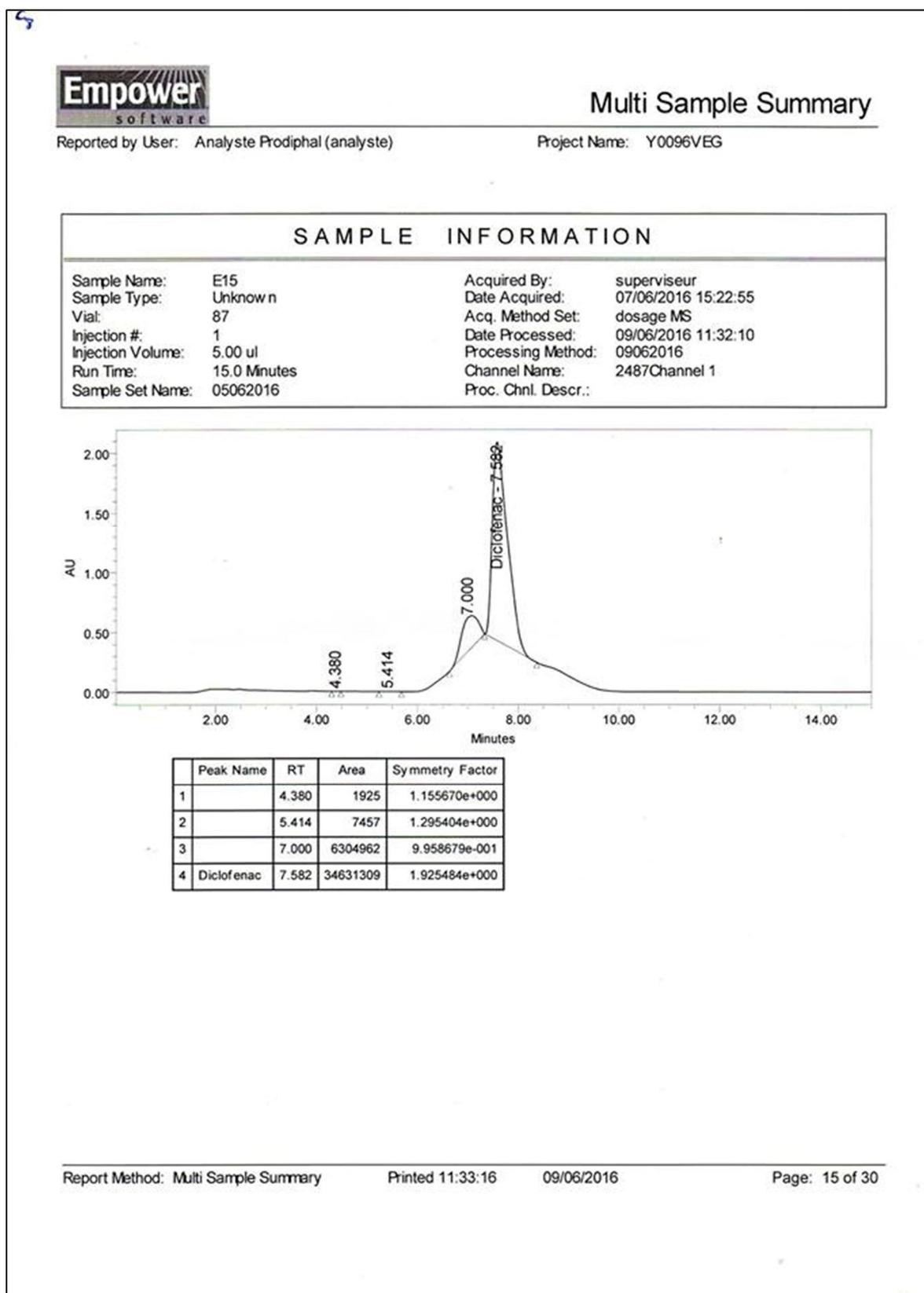


Figure 2.31: Chromatogramme du HPLC de culot de l'essai N° 8.

ANNEXE 2

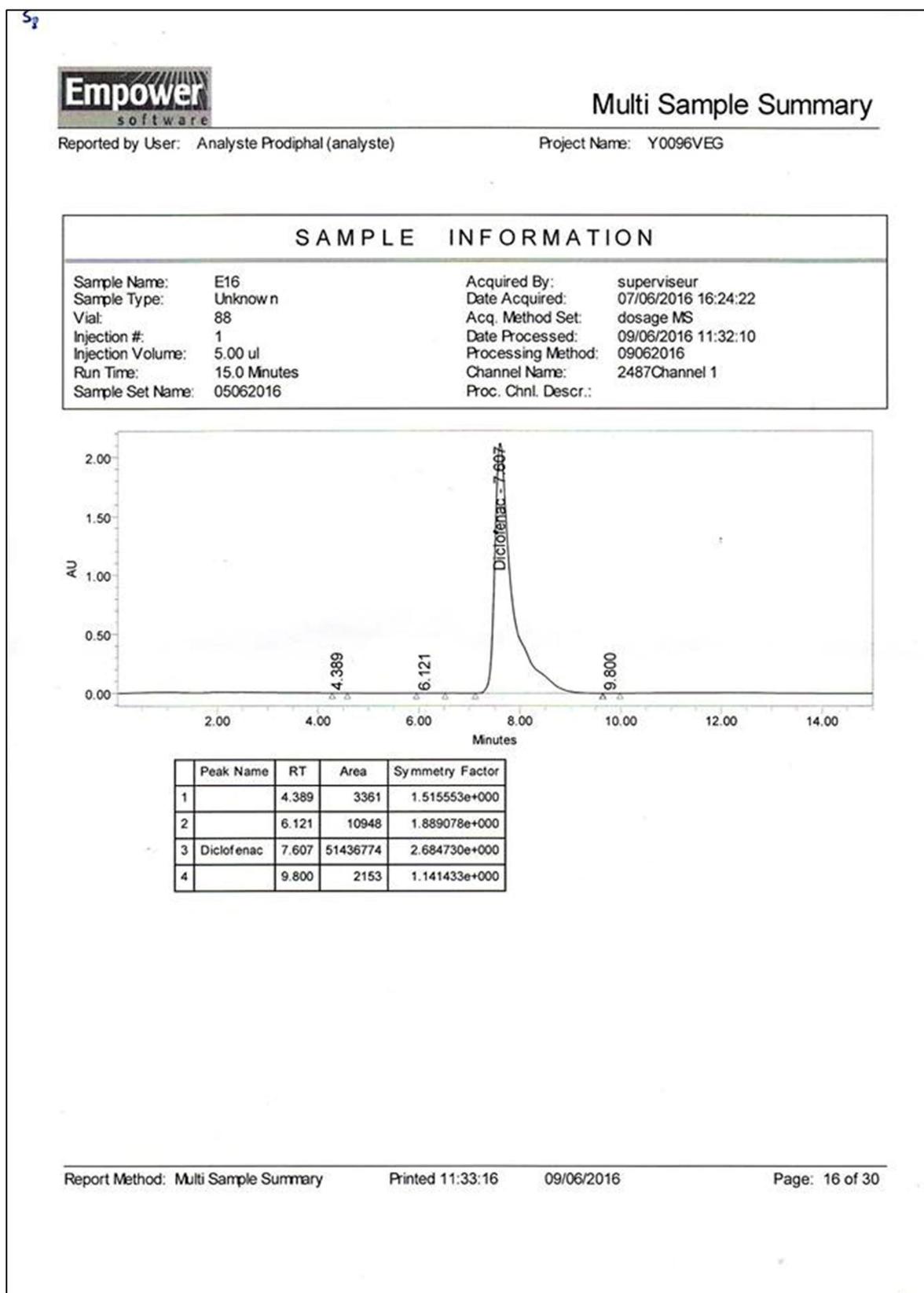


Figure 2.32: Chromatogramme du HPLC de surnageant de l'essai N° 8.

ANNEXE 2

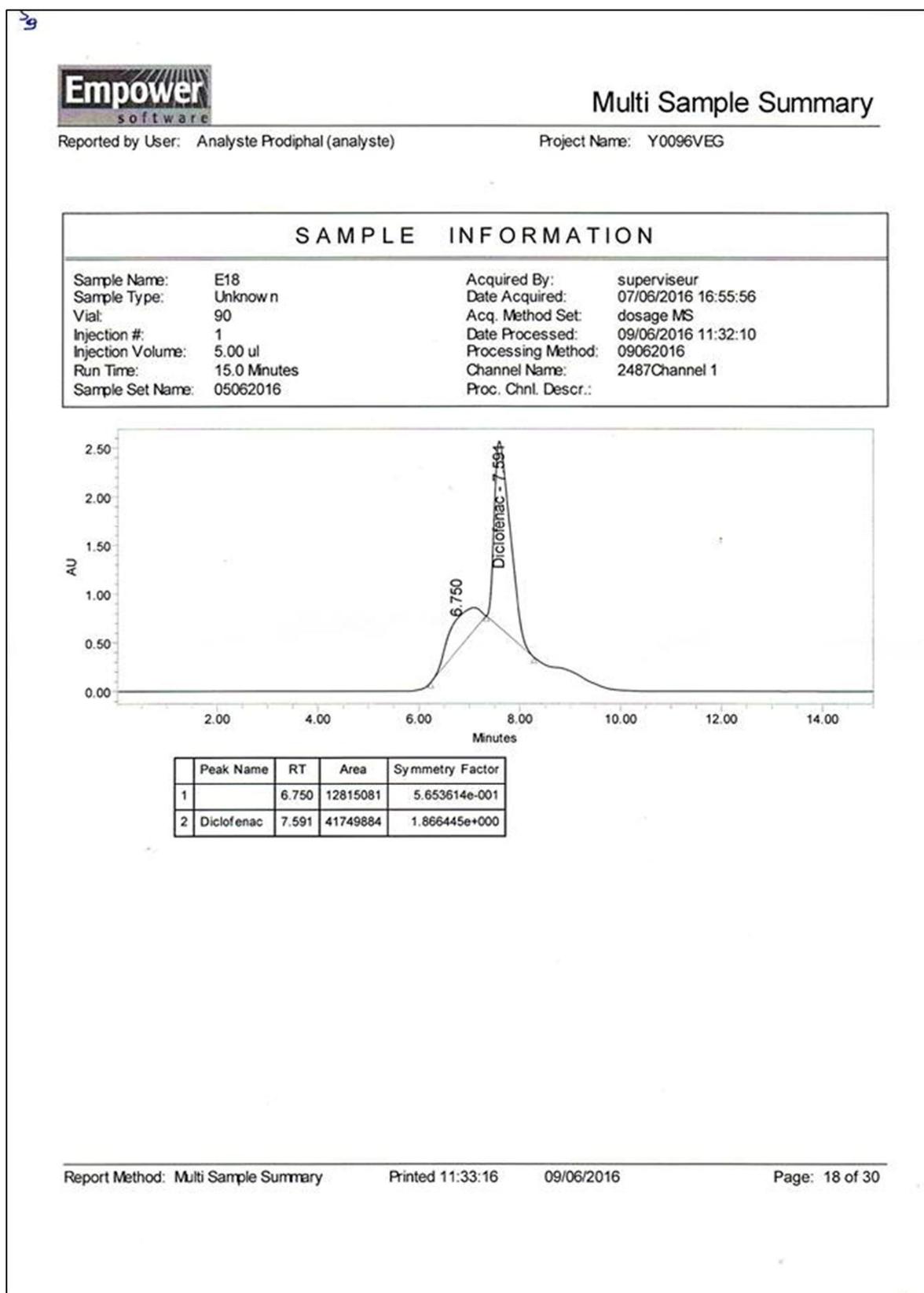


Figure 2.33: Chromatogramme du HPLC de culot de l'essai N° 9.

ANNEXE 2

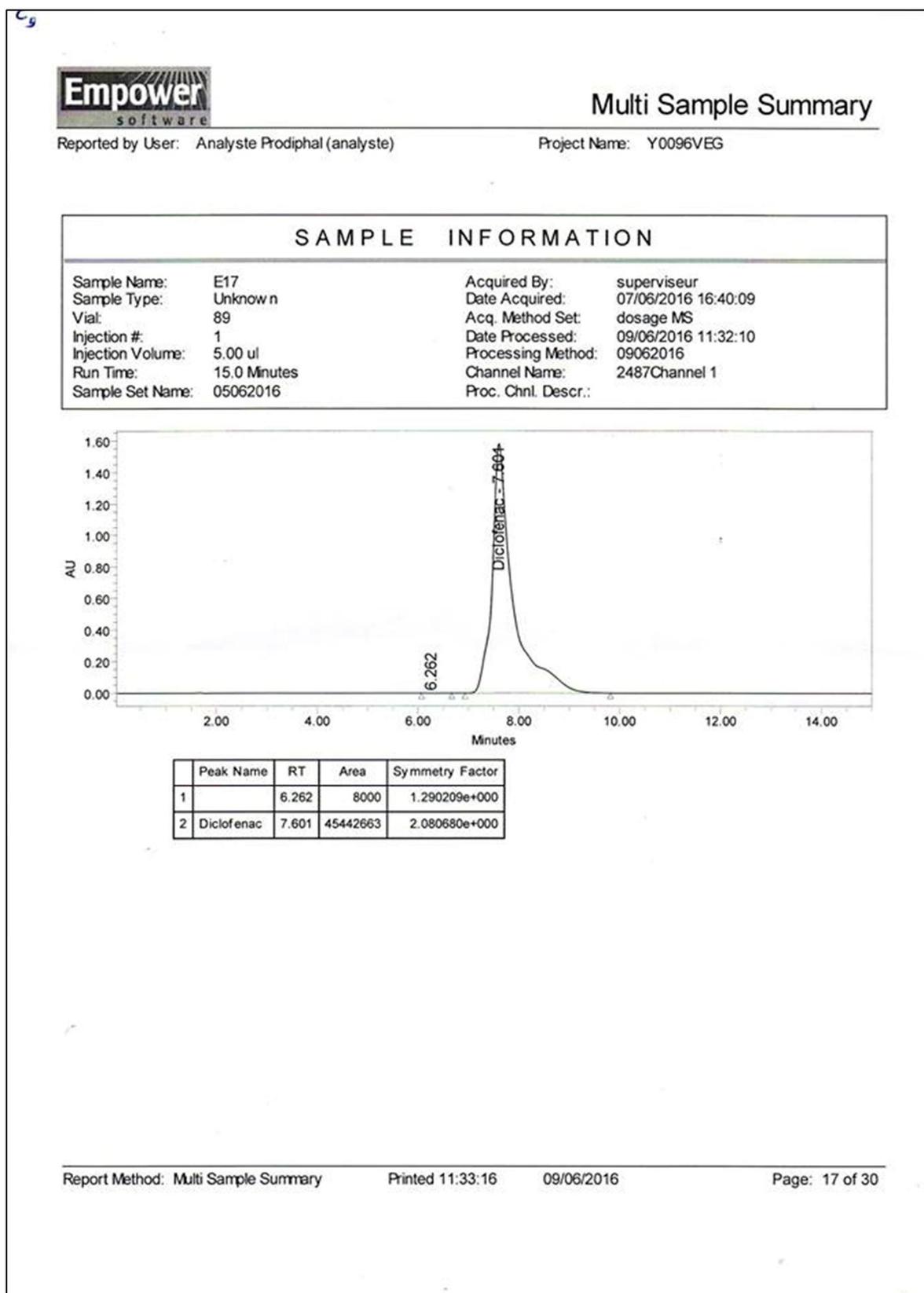


Figure 2.34: Chromatogramme du HPLC de surnageant de l'essai N° 9.

ANNEXE 2

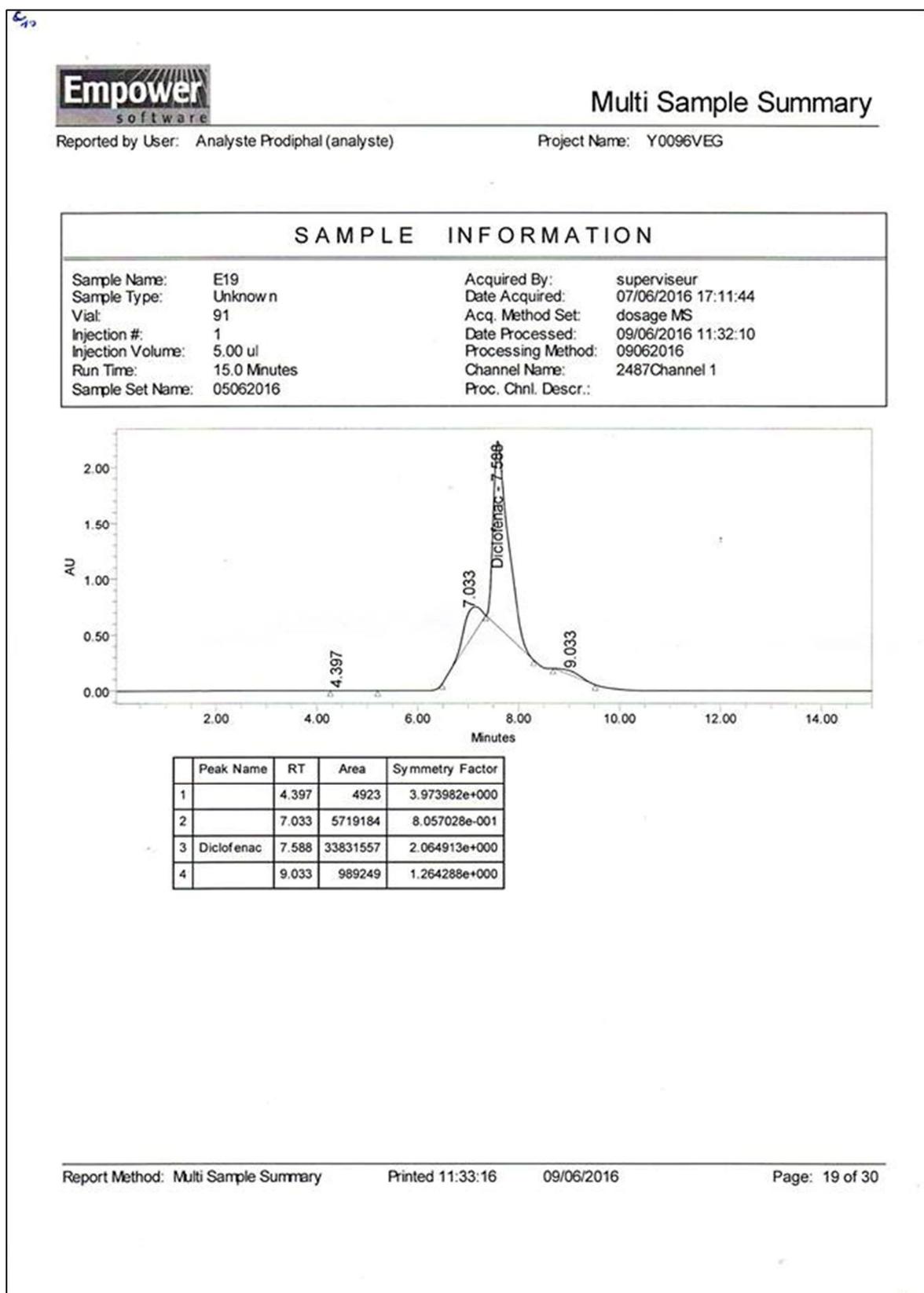


Figure 2.35: Chromatogramme du HPLC de culot de l'essai N° 10.

ANNEXE 2

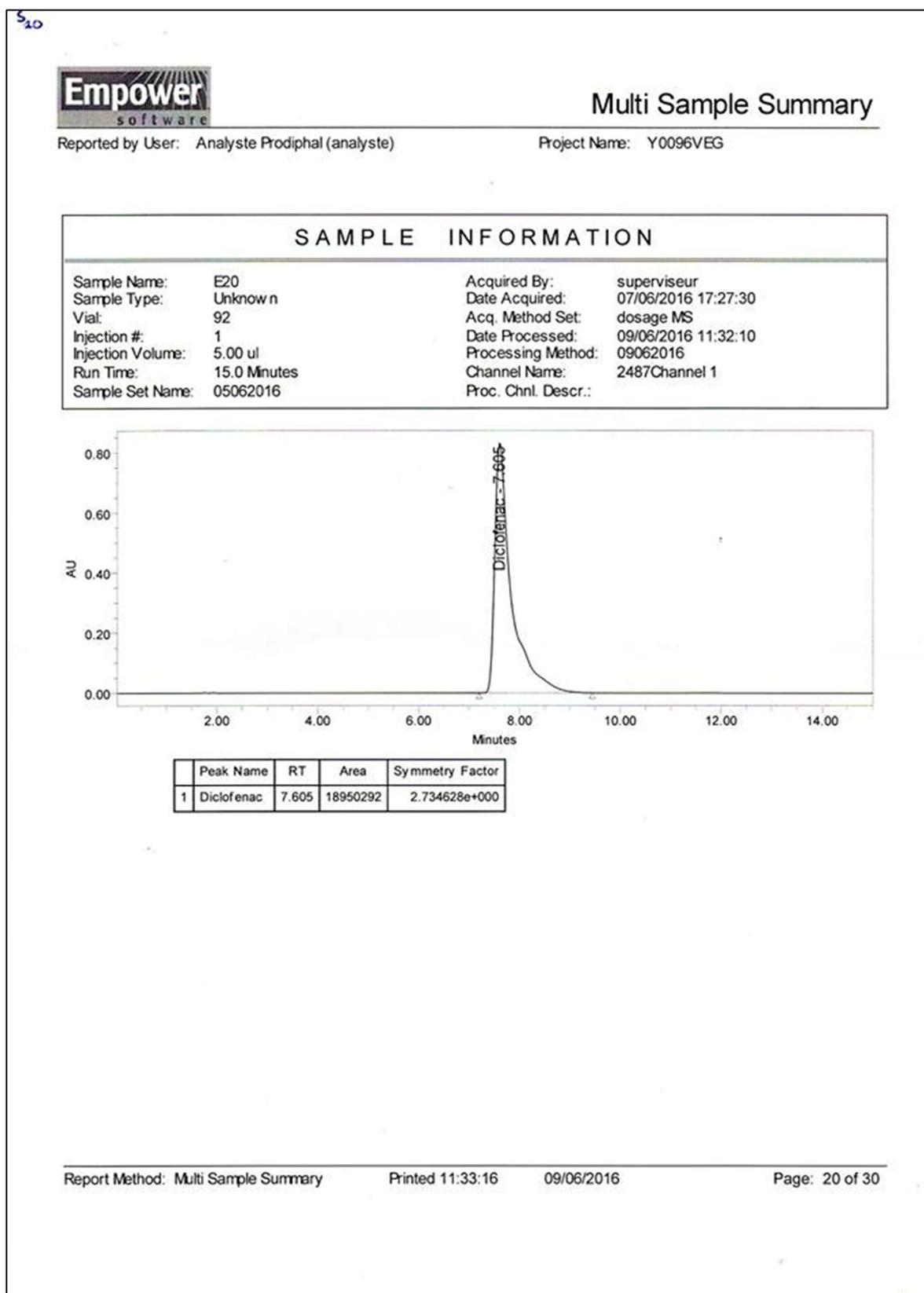


Figure 2.36: Chromatogramme du HPLC de surnageant de l'essai N° 10.

ANNEXE 2

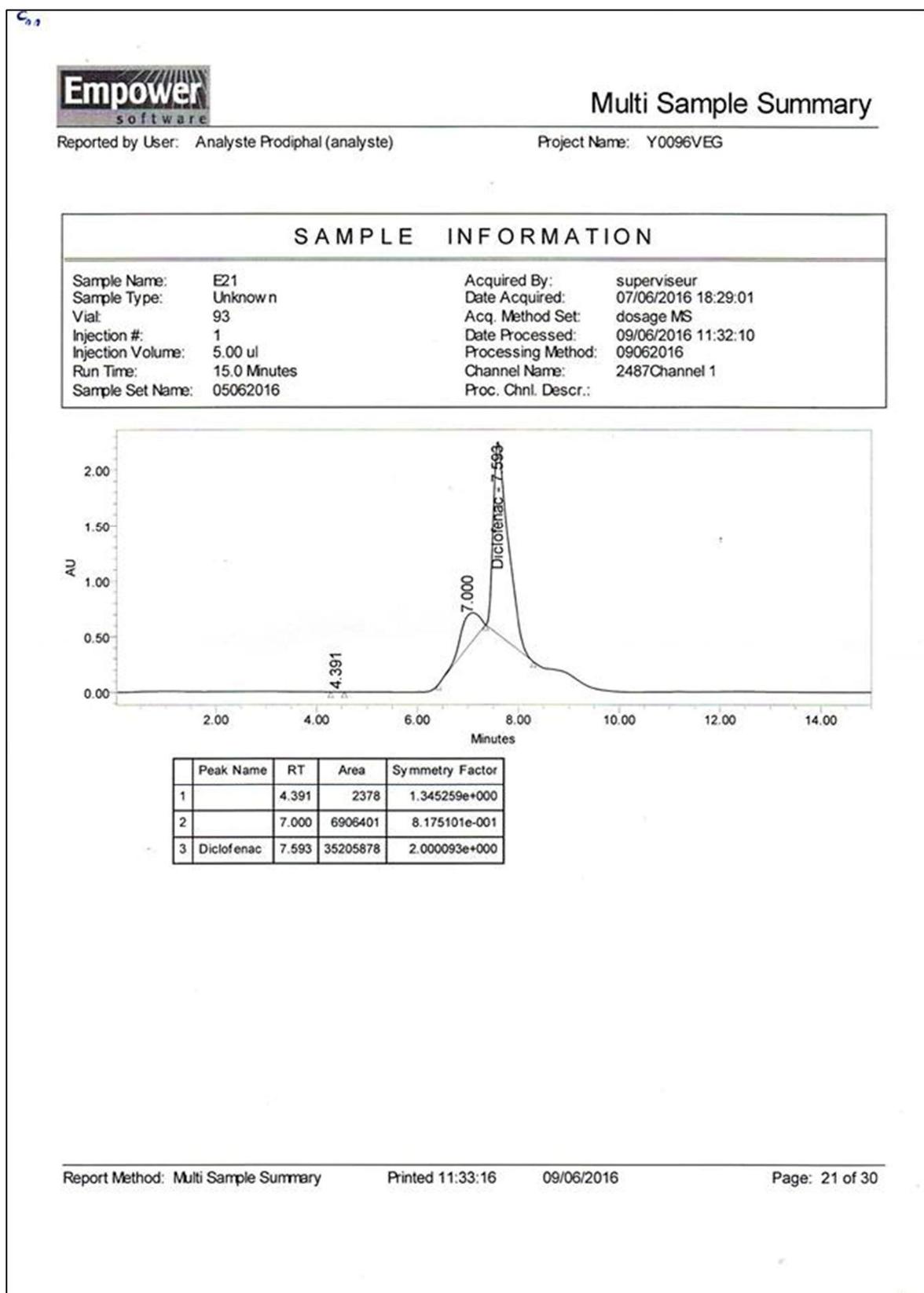


Figure 2.37: Chromatogramme du HPLC de culot de l'essai N° 11.

ANNEXE 2

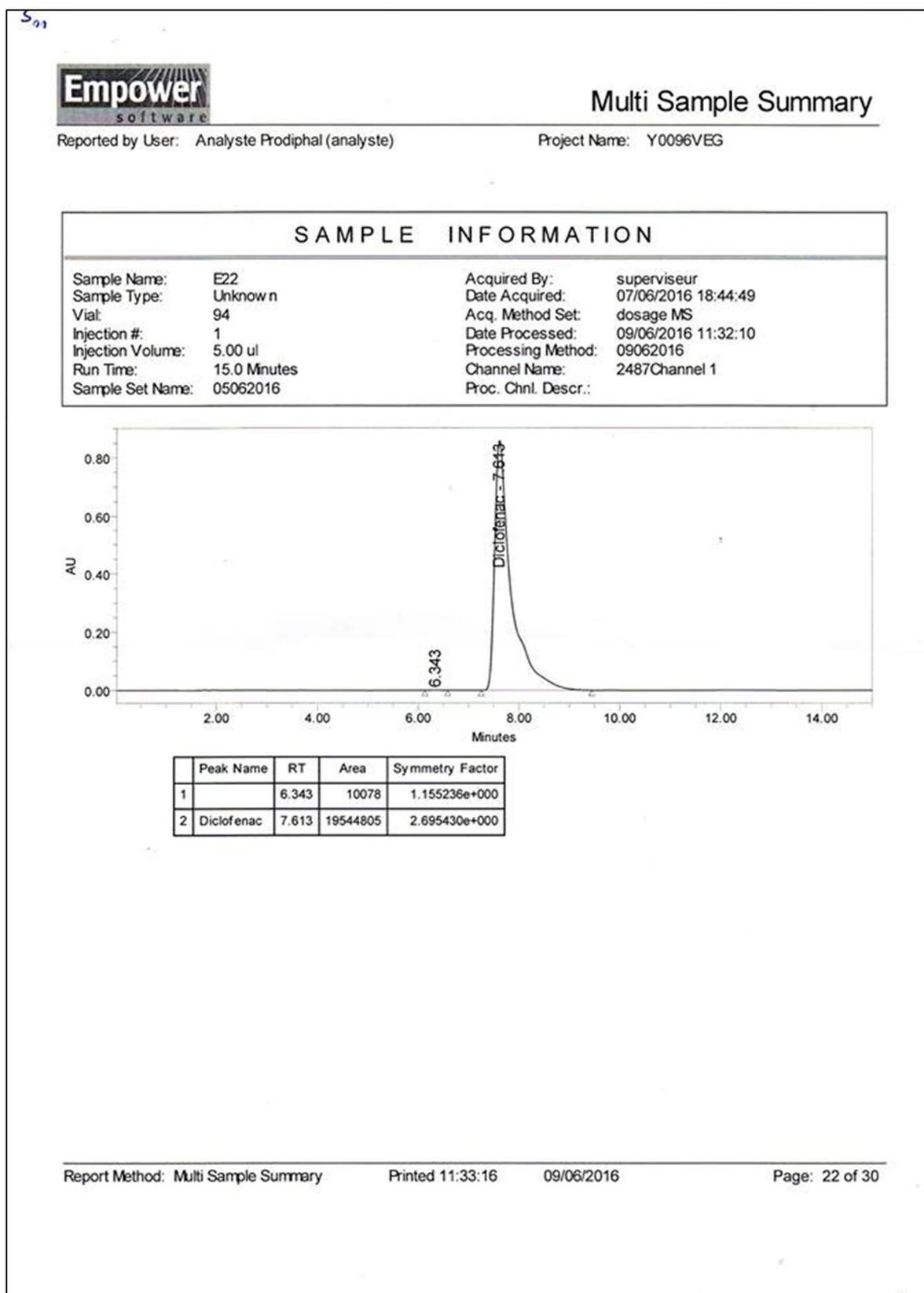


Figure 2.38: Chromatogramme du HPLC de surnageant de l'essai N° 11.

ANNEXE 2

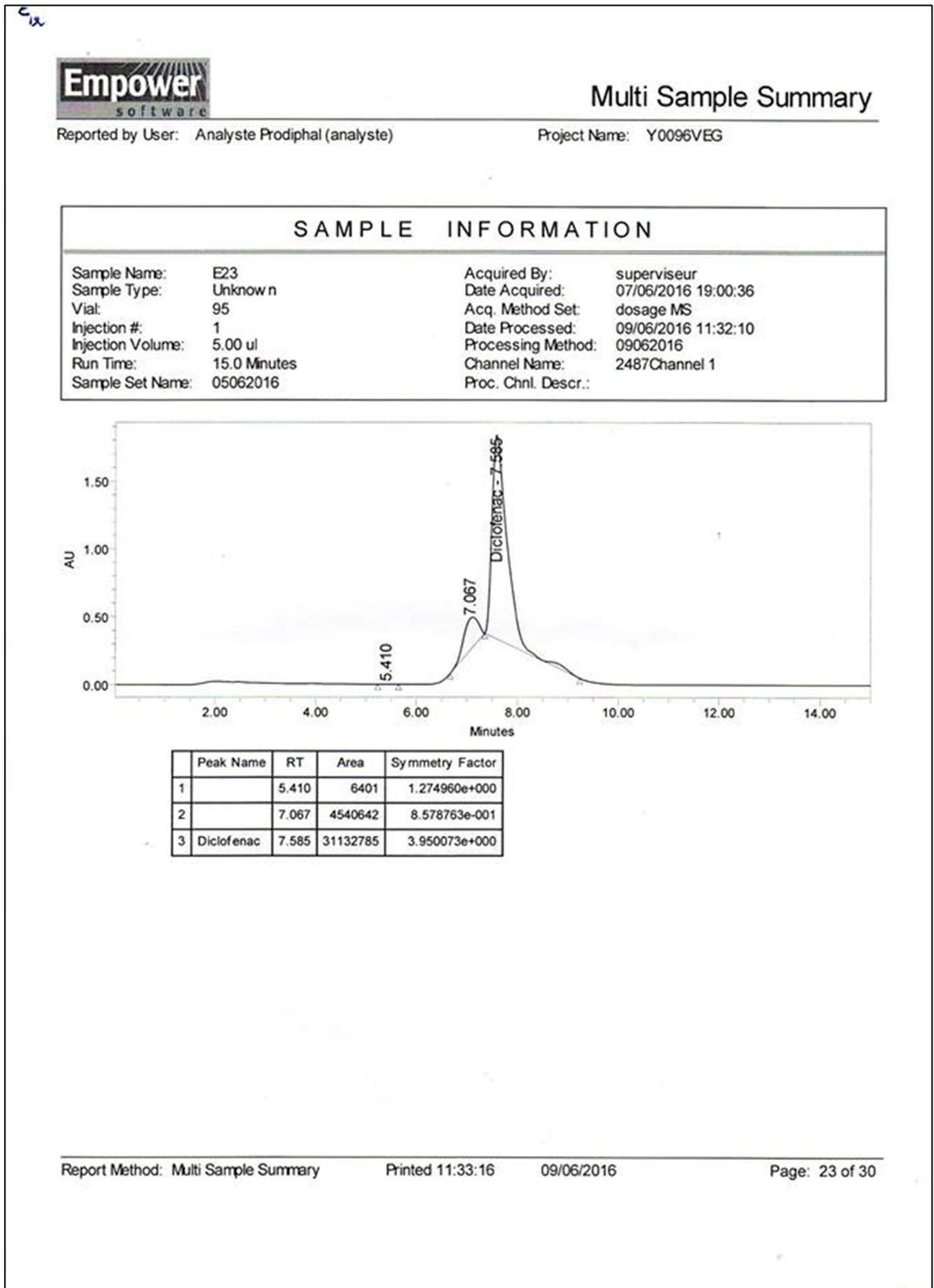


Figure 2.39: Chromatogramme du HPLC de culot de l'essai N° 12.

ANNEXE 2

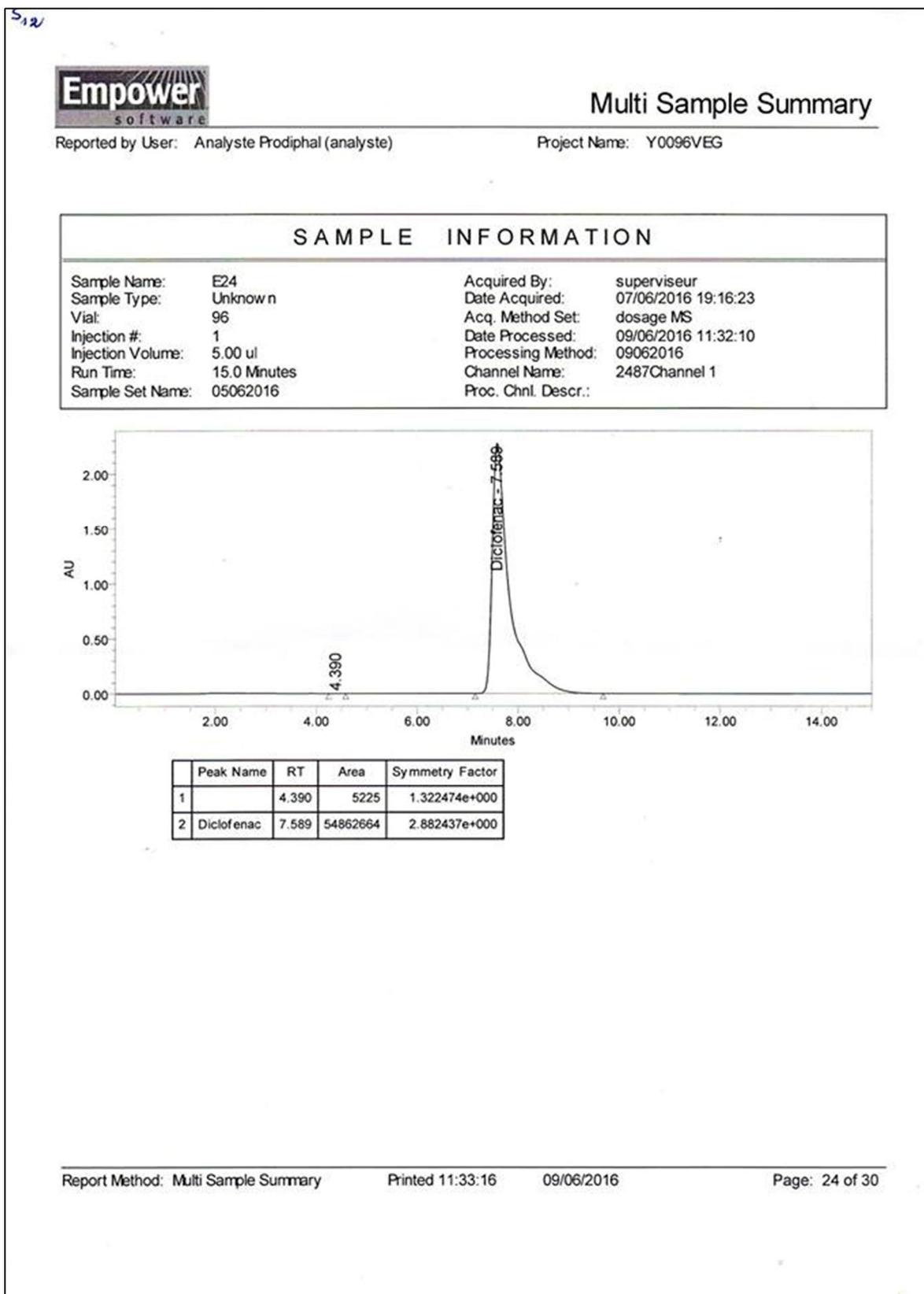


Figure 2.40: Chromatogramme du HPLC de surnageant de l'essai N° 12.

ANNEXE 2

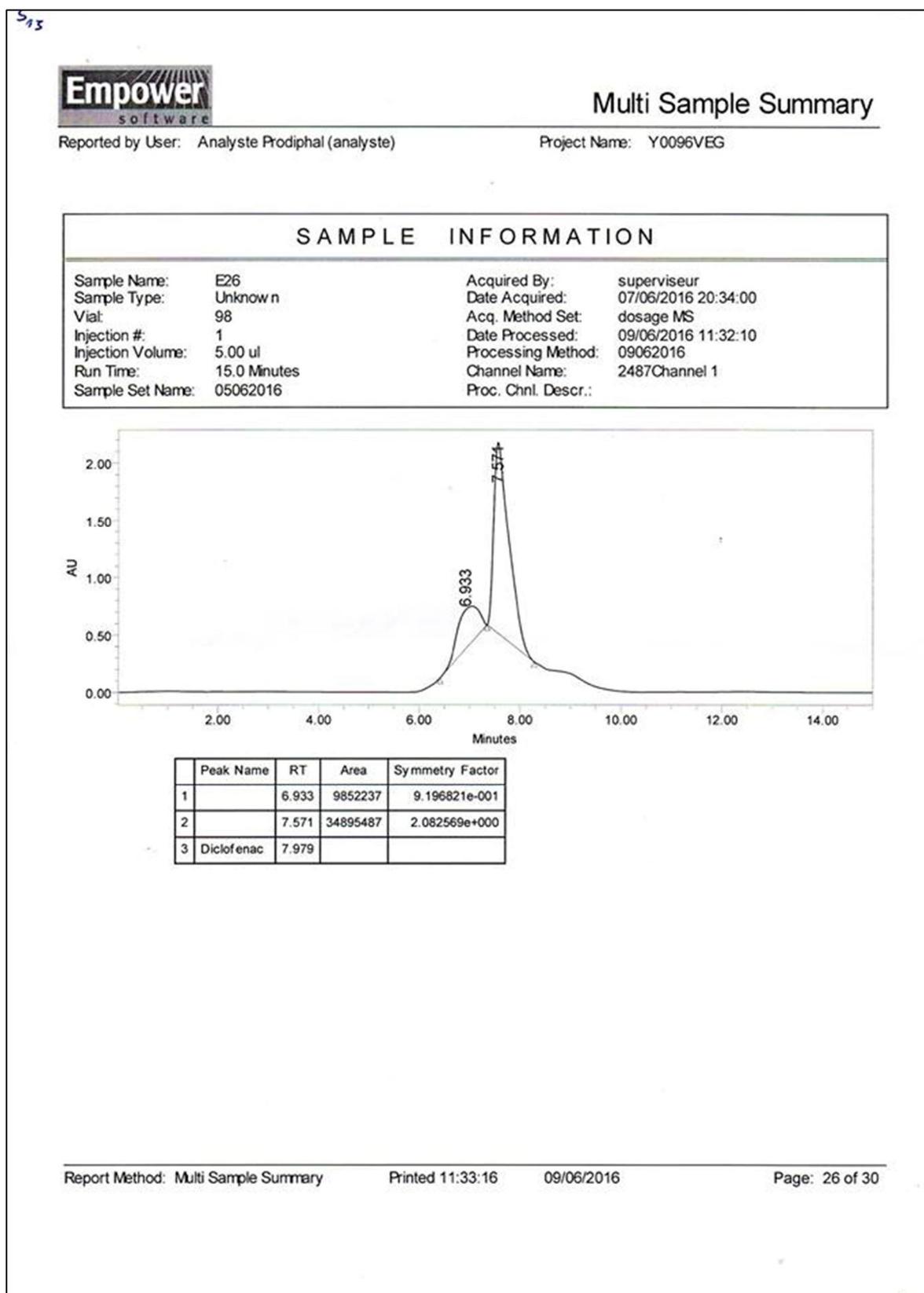


Figure 2.41: Chromatogramme du HPLC de culot de l'essai N° 13.

ANNEXE 2

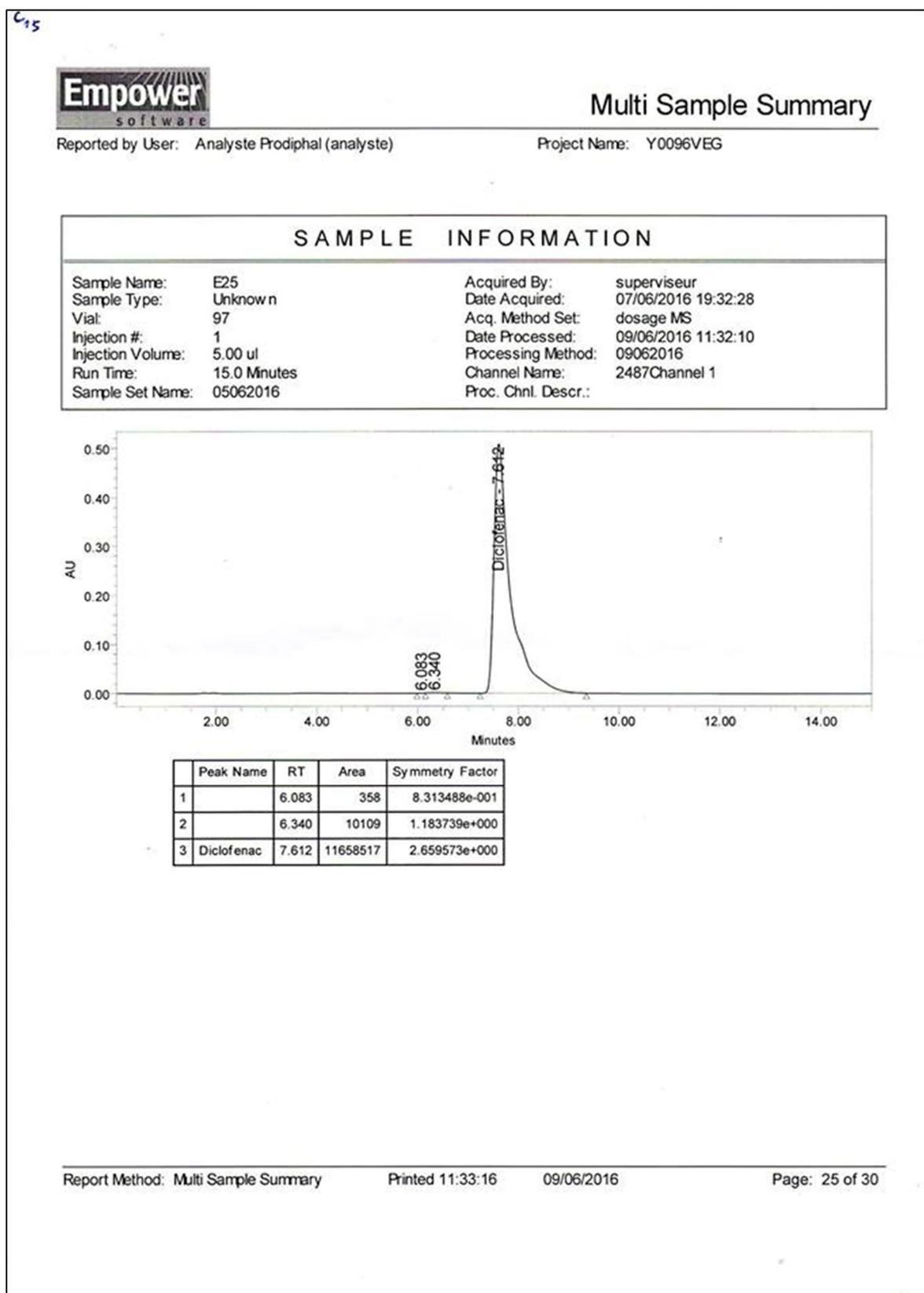


Figure 2.42: Chromatogramme du HPLC de surnageant de l'essai N° 13.

ANNEXE 2

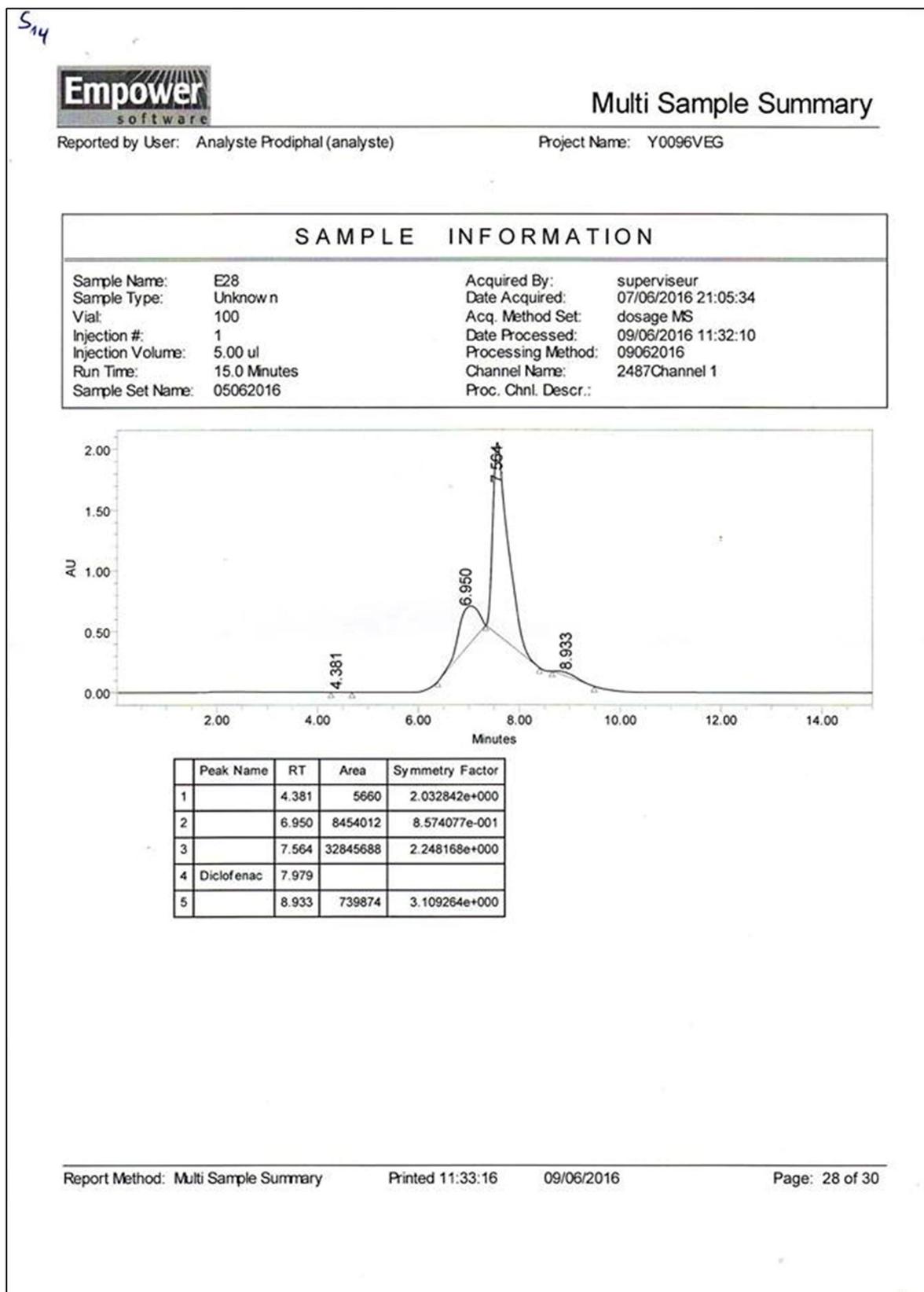


Figure 2.43: Chromatogramme du HPLC de culot de l'essai N° 14.

ANNEXE 2

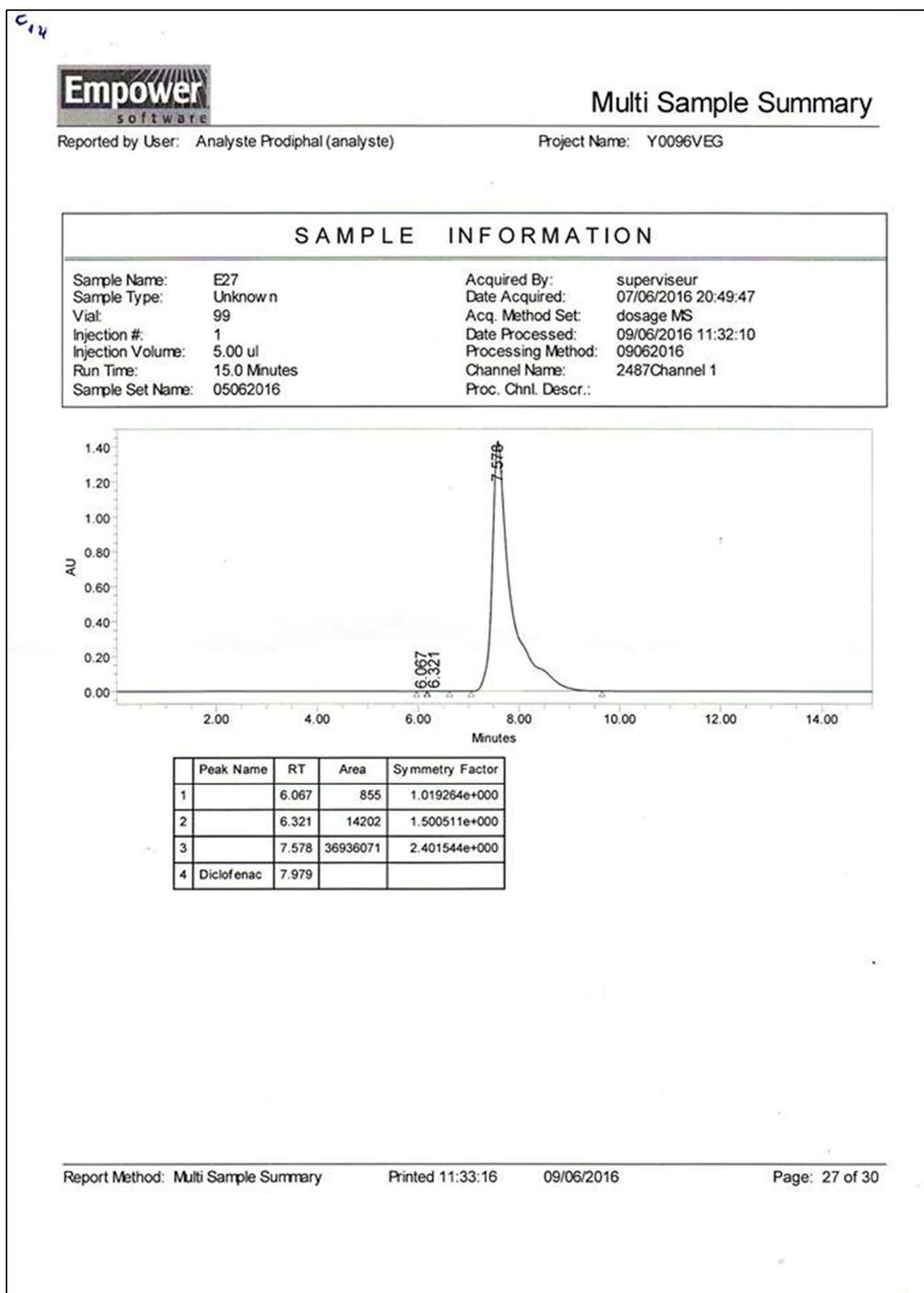


Figure 2.44: Chromatogramme du HPLC de surnageant de l'essai N° 14.

ANNEXE 2

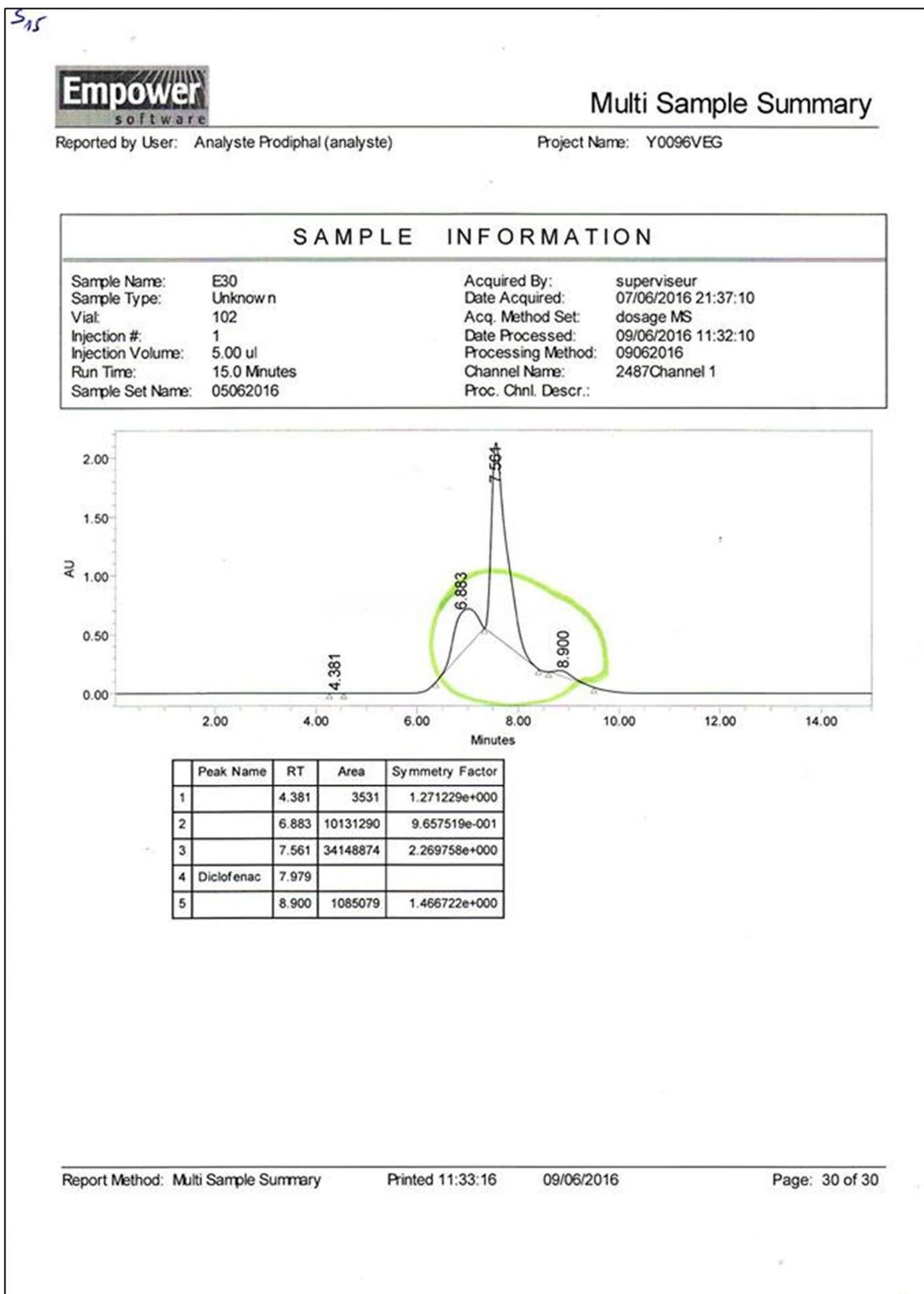


Figure 2.45: Chromatogramme du HPLC de culot de l'essai N° 15.

ANNEXE 2

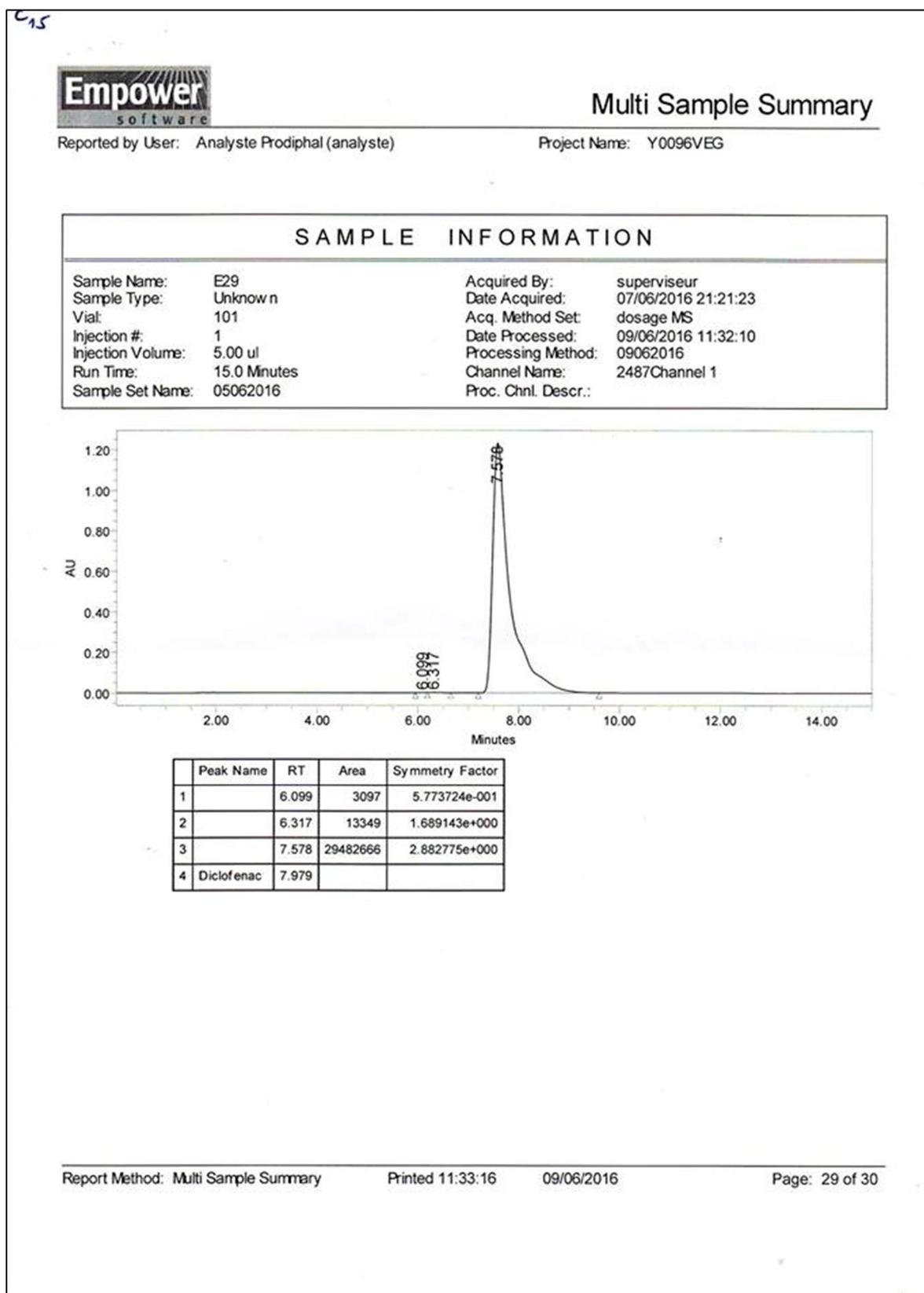


Figure 2.46 : Chromatogramme du HPLC de surnageant de l'essai N° 15.

ANNEXE 2

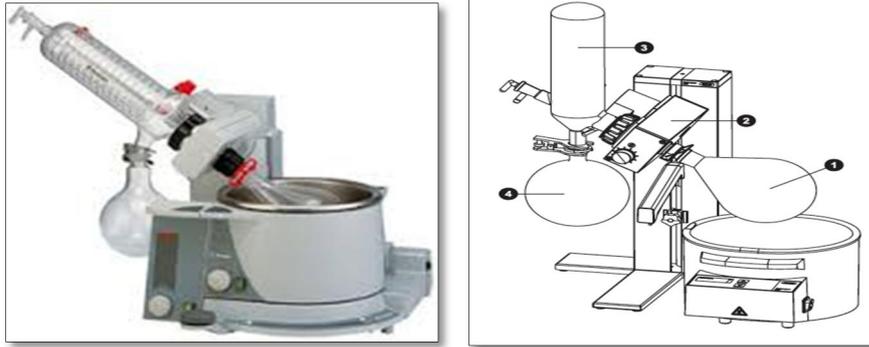


Figure 2.47 : Composants du système rotavapeur.

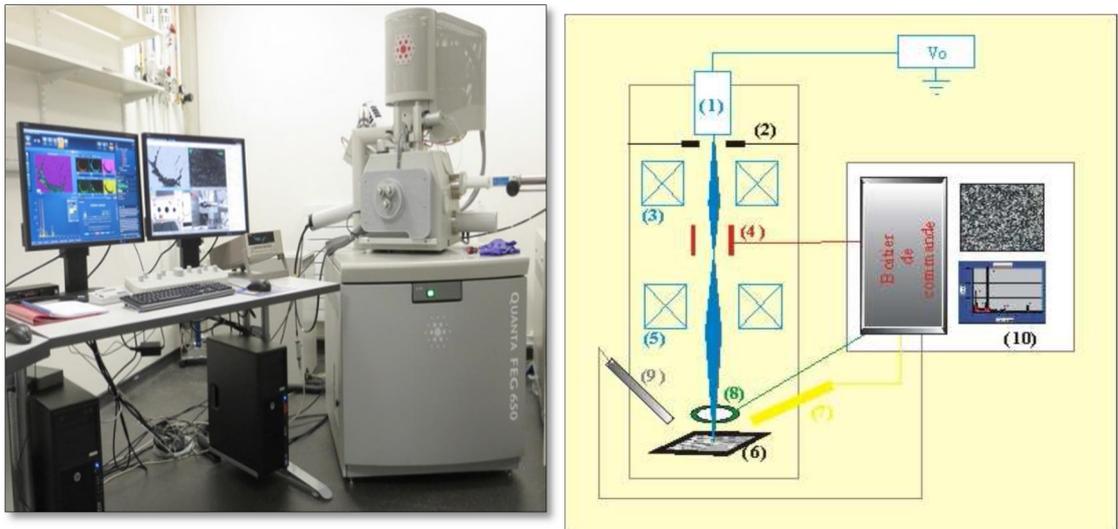


Figure 2.48 : Photo représentant le microscope électronique à balayage (a) et schéma représentant les composants essentiels du MEB (b).



Figure 2.49 : Granulomètre laser de type HORIBA SZ 100.

ANNEXE 2



Figure 2.50 : Photo représentant une ultracentrifugeuse.



Figure 2.51 : photo de l'appareil HPLC.