

MEMOIRE  
POUR LE DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES  
D'INNOVATION PHARMACEUTIQUE ET RECHERCHE

Soutenu publiquement le : 12 juin 2015

Par M<sup>elle</sup> : Hanane GASMI

Conformément aux dispositions du Décret du 10 septembre 1990  
tient lieu de

THESE EN VUE DU DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

---

**Microparticules à base d'acide poly(lactique-co-glycolique) : Elucidation des mécanismes de libération.**

---

**Membres du jury :**

**Président :** **M. le Professeur Bertrand DECAUDIN**  
Professeur des Universités – Praticien Hospitalier  
Université Lille 2 – CHRU de Lille

**Directeur de thèse :** **Mme le Docteur Florence SIEPMANN**  
Maître de Conférences Universitaire  
Université Lille 2

**Assesseurs :** **Mme le Docteur Sophie LIABEUF**  
Maître de Conférences - Praticien Hospitalier  
Université de Picardie Jules Verne – CHU Amiens  
**Mme le Docteur Michèle VASSEUR**  
Pharmacien Praticien Hospitalier  
Centre Hospitalier Régional de Lille



## Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille



3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE  
CEDEX

☎ 03.20.96.40.40 - 📠 : 03.20.96.43.64

### Université Lille 2 – Droit et Santé

Président : Professeur Xavier VANDENDRIESSCHE  
Vice- présidents : Professeur Alain DUROCHER  
Professeur Régis BORDET  
Professeur Eric KERCKHOVE  
Professeur Eric BOULANGER  
Professeur Frédéric LOBEZ  
Professeur Damien CUNY  
Professeur Benoit DEPREZ  
Professeur Murielle GARCIN  
Monsieur Pierre RAVAUX  
Monsieur Larbi AIT-HENNANI  
Monsieur Antoine HENRY

Directeur Général des Services : Monsieur Pierre-Marie ROBERT

### Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Doyen : Professeur Damien CUNY  
Vice-Doyen, 1<sup>er</sup> assesseur : Professeur Bertrand DECAUDIN  
Assesseur en charge de la pédagogie Dr. Annie Standaert  
Assesseur en charge de la recherche Pr. Patricia Melnyk  
Assesseur délégué à la scolarité Dr. Christophe Bochu  
Assesseur délégué en charge des relations internationales Pr. Philippe Chavatte  
Assesseur délégué en charge de la vie étudiante M. Thomas Morgenroth

Chef des services administratifs : Monsieur Cyrille PORTA

### Liste des Professeurs des Universités - Praticiens Hospitaliers

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	ALLORGE	Delphine	Toxicologie
M.	BROUSSEAU	Thierry	Biochimie
Mme	CAPRON	Monique	Immunologie
M.	DECAUDIN	Bertrand	Pharmacie Galénique
M.	DINE	Thierry	Pharmacie clinique
M.	DUBREUIL	Luc	Bactériologie

Mme	DUPONT-PRADO	Annabelle	Hématologie
M.	DUTHILLEUL	Patrick	Hématologie
M.	GRESSIER	Bernard	Pharmacologie
M.	LUYCKX	Michel	Pharmacie clinique
M.	ODOU	Pascal	Pharmacie Galénique
M.	DEPREUX	Patrick	Chimie Organique (ICPAL)

### Liste des Professeurs des Universités

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	ALIOUAT	El Moukhtar	Parasitologie
Mme	AZAROUAL	Nathalie	Physique
M.	BERTHELOT	Pascal	Chimie Thérapeutique 1
M.	CAZIN	Jean-Louis	Pharmacologie – Pharmacie clinique
M.	CHAVATTE	Philippe	Chimie Thérapeutique 2
M.	COURTECUISSÉ	Régis	Sciences végétales et fongiques
M.	CUNY	Damien	Sciences végétales et fongiques
Mme	DELBAERE	Stéphanie	Physique
M.	DEPREZ	Benoît	Chimie Générale
Mme	DEPREZ	Rebecca	Chimie Générale
M.	DUPONT	Frédéric	Sciences végétales et fongiques
M.	DURIEZ	Patrick	Physiologie
M.	GARÇON	Guillaume	Toxicologie
Mme	GAYOT	Anne	Pharmacotechnie Industrielle
M.	GESQUIERE	Jean-Claude	Chimie Organique
M.	GOOSSENS	Jean François	Chimie Analytique
Mme	GRAS	Hélène	Chimie Thérapeutique 3
M.	HENNEBELLE	Thierry	Pharmacognosie
M.	LEMDANI	Mohamed	Biomathématiques
Mme	LESTAVEL	Sophie	Biologie Cellulaire
M.	LUC	Gerald	Physiologie
Mme	MELNYK	Patricia	Chimie thérapeutique 2
Mme	MUHR – TAILLEUX	Anne	Biochimie
Mme	PAUMELLE-LESTRELIN	Réjane	Biologie Cellulaire
Mme	PERROY – MAILLOLS	Anne Catherine	Droit et déontologie pharmaceutique
Mme	ROMOND	Marie Bénédicte	Bactériologie
Mme	SAHPAZ	Sevser	Pharmacognosie
M.	SERGHÉRAERT	Eric	Droit et déontologie pharmaceutique
M.	SIEPMANN	Juergen	Pharmacotechnie Industrielle
M.	STAELS	Bart	Biologie Cellulaire
M	TARTAR	André	Chimie Organique
M.	VACCHER	Claude	Chimie Analytique
M.	WILLAND	Nicolas	Chimie organique
M.	MILLET	Régis	Chimie Thérapeutique (ICPAL)

## Liste des Maitres de Conférences - Praticiens Hospitaliers

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	BALDUYCK	Malika	Biochimie
Mme	GARAT	Anne	Toxicologie
Mme	GOFFARD	Anne	Bactériologie
M.	LANNOY	Damien	Pharmacie Galénique
Mme	ODOU	Marie Françoise	Bactériologie
M.	SIMON	Nicolas	Pharmacie Galénique

## Liste des Maitres de Conférences

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	AGOURIDAS	Laurence	Chimie thérapeutique 2
Mme	ALIOUAT	Cécile Marie	Parasitologie (90%)
M.	ANTHERIEU	Sébastien	Toxicologie
Mme	AUMERCIER	Pierrette	Biochimie
Mme	BANTUBUNGI	Kadiombo	Biologie cellulaire
Mme	BARTHELEMY	Christine	Pharmacie Galénique
Mme	BEHRA	Josette	Bactériologie
M	BELARBI	Karim	Pharmacologie
M.	BERTHET	Jérôme	Physique
M.	BERTIN	Benjamin	Immunologie
M.	BLANCHEMAIN	Nicolas	Pharmacotechnie industrielle
M.	BOCHU	Christophe	Physique
M.	BRIAND	Olivier	Biochimie
Mme	CACHERA	Claude	Biochimie
M.	CARNOY	Christophe	Immunologie
Mme	CARON	Sandrine	Biologie cellulaire (80%)
Mme	CHABÉ	Magali	Parasitologie (80%)
Mme	CHARTON	Julie	Chimie Organique (80%)
M	CHEVALIER	Dany	Toxicologie
M.	COCHELARD	Dominique	Biomathématiques
Mme	DANEL	Cécile	Chimie Analytique
Mme	DEMANCHE	Christine	Parasitologie (80%)
Mme	DEMARQUILLY	Catherine	Biomathématiques
Mme	DUMONT	Julie	Biologie cellulaire
M.	FARCE	Amaury	Chimie Thérapeutique 2
Mme	FLIPO	Marion	Chimie Organique
Mme	FOULON	Catherine	Chimie Analytique
M.	GELEZ	Philippe	Biomathématiques
M.	GERVOIS	Philippe	Biochimie
Mme	GRAVE	Béatrice	Toxicologie
Mme	GROSS	Barbara	Biochimie
Mme	HAMOUDI	Chérifa Mounira	Pharmacotechnie industrielle
Mme	HANNOTHIAUX	Marie-Hélène	Toxicologie
Mme	HELLEBOID	Audrey	Physiologie
M.	HERMANN	Emmanuel	Immunologie
Mme	HOUSSIN-THUILLIER	Pascale	Hématologie

M.	KAMBIA	Kpakpaga Nicolas	Pharmacologie
M.	KARROUT	Youness	Pharmacotechnie Industrielle
Mme	LALLOYER	Fanny	Biochimie
M.	LEBEGUE	Nicolas	Chimie thérapeutique 1
Mme	LECOEUR	Marie	Chimie Analytique
Mme	LIPKA	Emmanuelle	Chimie Analytique
Mme	MARTIN	Françoise	Physiologie
M.	MOREAU	Pierre Arthur	Sciences végétales et fongiques
Mme	MUSCHERT	Susanne	Pharmacotechnie industrielle
Mme	NEUT	Christel	Bactériologie
Mme	NIKASINOVIC	Lydia	Toxicologie
Mme	PINÇON	Claire	Biomathématiques
M.	PIVA	Frank	Biochimie
Mme	PLATEL	Anne	Toxicologie
M.	RAVAUX	Pierre	Biomathématiques
Mme	RIVIERE	Céline	Pharmacognosie
Mme	ROGER	Nadine	Immunologie
M.	ROUMY	Vincent	Pharmacognosie
Mme	SEBTI	Yasmine	Biochimie
Mme	SIEPMANN	Florence	Pharmacotechnie Industrielle
Mme	SINGER	Elisabeth	Bactériologie
Mme	STANDAERT	Annie	Parasitologie
M.	TAGZIRT	Madjid	Hématologie
M.	WELTI	Stéphane	Sciences végétales et fongiques
M.	YOUS	Saïd	Chimie Thérapeutique 1
M.	ZITOUNI	Djamel	Biomathématiques
M.	FURMAN	Christophe	Pharmacobiochimie (ICPAL)
Mme	GOOSSENS	Laurence	Chimie Organique (ICPAL)

### Professeurs Agrégés

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	MAYES	Martine	Anglais
M.	MORGENROTH	Thomas	Droit et déontologie pharmaceutique

### Professeurs Certifiés

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	HUGES	Dominique	Anglais
Mlle	FAUQUANT	Soline	Anglais
M.	OSTYN	Gaël	Anglais

### Professeur Associé - mi-temps

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	DHANANI	Alban	Droit et déontologie pharmaceutique

### Maîtres de Conférences ASSOCIES - mi-temps

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	BERTOUX	Elisabeth	Pharmacie Clinique - Biomathématiques
M.	BRICOTEAU	Didier	Biomathématiques
M.	FIEVET	Pierre	Information Médicale
M.	FRIMAT	Bruno	Pharmacie Clinique
M.	MASCAUT	Daniel	Pharmacie Clinique
M.	WATRELOS	Michel	Droit et déontologie pharmaceutique
M.	ZANETTI	Sébastien	Biomathématiques

### AHU

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	DROUET	Maryline	Pharmacie Galénique
Mme	GENAY	Stéphanie	Pharmacie Galénique

***Faculté des Sciences Pharmaceutiques  
et Biologiques de Lille***

3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE CEDEX  
Tel. : 03.20.96.40.40 - Télécopie : 03.20.96.43.64  
<http://pharmacie.univ-lille2.fr>

**L'Université n'entend donner aucune approbation aux opinions émises dans les thèses ; celles-ci sont propres à leurs auteurs.**

## REMERCIEMENTS

### **A Monsieur le Professeur Bertrand DECAUDIN,**

Vous me faites l'honneur de présider le jury de ma thèse. Veuillez trouver ici l'expression de mes remerciements et de ma gratitude les plus sincères

### **A Madame le Docteur Sophie LIABEUF,**

Je vous remercie d'avoir accepté de juger mon travail. Veuillez trouver ici l'expression de ma considération et de mes remerciements.

### **A Madame le Docteur Michèle VASSEUR,**

Vous me faites l'honneur de juger mon travail. Soyez assurée de ma reconnaissance sincère.

### **A Madame le Docteur Florence SIEPMANN,**

Je vous remercie d'avoir accepté de diriger ce travail, aussi pour votre patience et disponibilité face à mes demandes d'un point de vue scientifique et administratif.

Je souhaite également remercier le Pr. SIEPMANN, directeur de l'unité INSERM U1008, pour m'avoir accueilli au sein de son équipe ainsi que pour sa disponibilité et ses précieux conseils.

Je désire à adresser mes remerciements à Florence DANÈDE et Ahmed ADDAD pour la réalisation des observations au microscope électronique à balayage et des analyses de diffraction des rayons X.

Un grand merci à Mounira HAMOUDI pour sa précieuse amitié, sa disponibilité pour réaliser des observations au microscope électronique à balayage et ses conseils toujours d'une grande utilité.

Je tiens à remercier aussi Youness KARROUT et Susanne MUSCHERT pour leurs conseils et leur bonne humeur.

Je tiens aussi à remercier le Professeur Anne GAYOT pour son accueil dans le laboratoire.

J'adresse également mes remerciements à toute l'équipe du laboratoire de Pharmacotechnie Industrielle pour leur accueil et avec lesquels j'ai eu le plaisir de travailler

Enfin, Je tiens à remercier mes parents, mon frère et ma sœur pour leur éternel soutien qui m'a été utile durant ces années.

# SOMMAIRE

<b>LISTE DES ABREVIATIONS.....</b>	<b>12</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>13</b>
<b>I. GENERALITES .....</b>	<b>13</b>
<b>II. TRAVAUX ANTERIEURS .....</b>	<b>15</b>
II.1 Propriétés physico-chimiques de l'acide poly(lactique-co-glycolique) .....	15
II.2 Biodégradabilité et biocompatibilité de l'acide poly(lactique-co-glycolique). 17	
II.3 Les techniques de préparation des microparticules.....	19
II.3.1 Extraction et évaporation du solvant .....	19
<i>II.3.1.1. Procédé par simple émulsion .....</i>	<i>19</i>
<i>II.3.1.2. Procédé par double émulsion.....</i>	<i>21</i>
II.3.2 Technique de coacervation .....	22
II.3.3 Technique par atomisation-séchage (spray-drying) .....	23
II.4 Les facteurs influençant la préparation de microparticules à base d'acide poly(lactique-co-glycolique) .....	23
II.4.1 Les facteurs influençant la taille des microparticules .....	23
II.4.2 Les facteurs influençant le taux d'encapsulation de la substance active .....	25
II.5 Mécanismes et profils de libération de la substance active .....	27
II.5.1 : Les mécanismes de libération.....	27
<i>II.5.1.1 : Diffusion à travers les pores remplis d'eau .....</i>	<i>27</i>
<i>II.5.1.2: Diffusion à travers le polymère .....</i>	<i>28</i>
<i>II.5.1.3: Erosion .....</i>	<i>28</i>
II.5.2 Les profils de libération obtenus à partir de microparticules à base d'acide poly(lactique-co-glycolique) .....	29
II.6 Les facteurs influençant la libération de substances actives et la dégradation du polymère.....	31
II.6.1 la composition du copolymère.....	31
II.6.2. Le poids moléculaire du polymère .....	31
II.6.3. La cristallinité et la température de transition vitreuse .....	32
II.6.4. La nature de la substance active .....	32
II.6.5 La taille et la porosité des microparticules .....	32
II.6.6 L'effet du pH.....	33

II.6.7. L'effet des enzymes .....	33
II.6.8. L'effet des conditions de libération (ex gel versus tubes).....	33
II.7 Les mécanismes de dégradation de l'acide poly(lactique-co-glycolique) ....	35
<b>OBJECTIF DU TRAVAIL .....</b>	<b>37</b>
<b>PARTIE EXPERIMENTALE.....</b>	<b>38</b>
<b>I. MATERIELS ET METHODES .....</b>	<b>38</b>
I.1. MATERIELS .....	38
I.2. METHODES .....	38
I.2.1. Préparation des microparticules.....	38
I.2.2. Mesure de la stabilité de la prilocaïne .....	39
I.2.3 Mesure de la taille des microparticules .....	39
I.2.4. Détermination de la teneur réelle en substance active .....	39
I.2.5. Étude de la libération de substance active in vitro .....	39
I.2.6. Chromatographie par perméation de gel .....	40
I.2.7. Calorimétrie différentielle à balayage.....	40
I.2.8. Diffraction des rayons-X.....	40
I.2.9. Microscopie électronique à balayage.....	40
I.2.10. Test de gonflement .....	41
<b>II. RESULTATS ET DISCUSSION.....</b>	<b>42</b>
II.1. Stabilité de la prilocaïne .....	42
II.2. Taille, morphologie des microparticules et efficacité d'encapsulation.....	42
II.3. Microscopie électronique à balayage .....	44
II.4. Diffraction des rayons-X .....	45
II.5. Calorimétrie différentielle à balayage .....	46
II.6. Étude de la libération de la substance active encapsulée .....	49
II.7. Chromatographie par perméation de gel .....	53
II.8. Test de gonflement.....	56
<b>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>60</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES: .....</b>	<b>61</b>
<b>LISTE DES FIGURES .....</b>	<b>70</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX .....</b>	<b>71</b>

## LISTE DES ABREVIATIONS

**ADN** : Acide désoxyribonucléique  
**APV** : Alcool polyvinylique  
**ARN** : Acide ribonucléique  
**CLHP** : Chromatographie liquide à haute performance  
**CPG** : Chromatographie par perméation de gel  
**D** : Dextrogyre  
**DSC** : Differential scanning calorimetry  
**E<sub>1</sub>/H/E<sub>2</sub>**: Eau<sub>1</sub>-dans-huile-dans-eau<sub>2</sub>  
**FDA**: Food and Drug Administration  
**H/E**: Huile-dans-eau  
**H/H**: Huile-dans-huile  
**kDa**: kilodalton  
**L** : Lévoxyre  
**LP** : Libération prolongée  
**MP** : Microparticule  
**MEB**: Microscopie électronique à balayage  
**m/v**: Masse/volume  
**PGA**: Poly glycolic acid  
**PLA**: Poly lactic acid  
**PLGA**: Poly (lactic-co-glycolic) acid  
**PTFE**: Polytétrafluoroéthylène  
**SA**: Substance active  
**T**: Température  
**THF** : Tétrahydrofurane  
**Tg**: Glass transition temperature  
**USP** : United States Pharmacopeia  
**v/v** : volume/volume

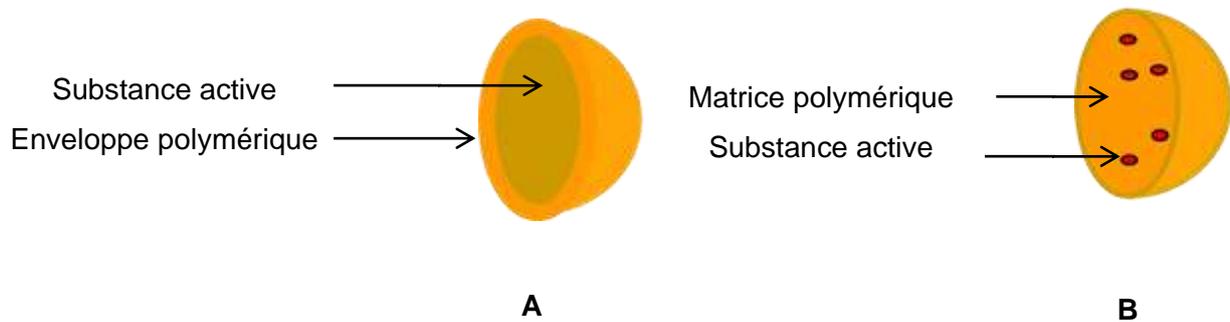
# INTRODUCTION

## I. GENERALITES

Les études de libération de substance active à partir de systèmes polymériques tels que des microparticules à base d'acide poly (lactique-co-glycolique) (PLGA) ont été largement explorées au cours de ces dernières décennies. Les systèmes à libération contrôlée de SA sont extrêmement utiles pour optimiser les effets thérapeutiques d'un traitement médical. Cela consiste à maintenir la concentration dans la zone thérapeutique sur des périodes prolongées qui varient de quelques jours à plusieurs mois. Ils sont également utilisés afin de réduire la fréquence d'administration et par conséquent l'amélioration de l'observance des patients ainsi que leur qualité de vie comparativement aux formes galéniques conventionnelles. Il est bien connu que la mauvaise observance est l'une des raisons de l'échec d'un traitement médical. L'acide poly(lactique-co-glycolique) est un copolymère biodégradable qui a été approuvé par l'agence réglementaire américaine (FDA) pour la libération de médicaments, en raison de son excellente biocompatibilité et biodégradabilité en acide lactique et acide glycolique, deux monomères qui sont naturellement produits sous conditions physiologiques par plusieurs voies métaboliques <sup>[1,2]</sup>.

Les MP sont définies comme étant des petites particules solides dont le diamètre est compris entre 1-1000  $\mu\text{m}$ . Elles sont classées en deux grandes catégories (**Figure 1**) :

- Le système réservoir (microcapsule): est constitué d'un noyau de SA entouré d'une enveloppe polymérique.
- Le système matriciel (microsphère): est constitué d'une matrice polymérique dans laquelle la SA est dispersée ou dissoute.



**Figure 1: Représentations schématiques des deux catégories de MP :**

**A : microcapsule, B : microsphère.**

Les MP de PLGA sont utilisées comme systèmes de libération de plusieurs molécules thérapeutiques telles que : les antibiotiques, les anticancéreux, les anesthésiques, les hormones, les protéines <sup>[3,4]</sup>, ainsi que les ADN et les ARN <sup>[5,6]</sup>. Ces MP sont destinées à une administration par différentes voies telles que la voie intra-articulaire, parentérale, oculaire, parodontale, orale ou pulmonaire <sup>[7,8,9,10]</sup>. Ce système galénique offre plusieurs avantages comparativement aux autres formes incluant :

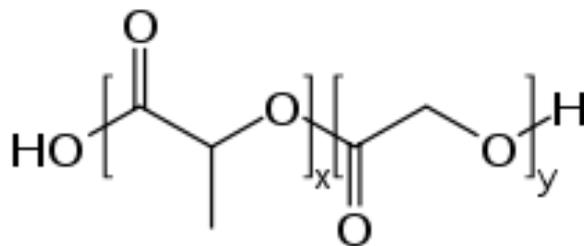
- La possibilité d'éviter l'effet du premier passage hépatique et le tractus gastro-intestinal (certains médicaments perdent leur activité après administration par voie orale) par injection par voie intramusculaire ou sous-cutanée.
- La facilité d'administration en utilisant des aiguilles (comme alternative aux autres formes galéniques comme les implants).
- La possibilité d'administrer le traitement de façon ciblée directement au niveau du site d'action. Cela permet de réduire la concentration en SA dans le reste du corps et donc le risque de développer des effets secondaires liés au traitement.
- La possibilité d'atteindre certains tissus cibles qui sont normalement inaccessibles à certaines SA (par exemple, le système nerveux central).
- L'absence du besoin de retirer ces formes galéniques après libération de la SA en raison de la biocompatibilité et biodégradabilité du polymère constitutif. Ces caractéristiques ont permis son utilisation comme matériau de base pour développer des systèmes destinés à la voie parentérale.

Aujourd'hui, le PLGA est largement utilisé dans les systèmes à libération contrôlée de SA destinés à la voie parentérale, y compris sous forme de MP [11]. Plusieurs produits à libération prolongée à base de MP de PLGA sont disponibles sur le marché, tels que Zoladex<sup>®</sup>, Risperdal Consta<sup>®</sup>, Gonapeptyl<sup>®</sup> LP, Decapeptyl<sup>®</sup> LP, Sandostatine<sup>®</sup> LP. Ces derniers ont été approuvés pour une utilisation clinique comme la thérapie anticancéreuse, l'hormonothérapie, ainsi que le traitement des troubles du système nerveux central [12].

## II. TRAVAUX ANTERIEURS

### II.1 Propriétés physico-chimiques de l'acide poly(lactique-co-glycolique)

Le PLGA est un hétéro copolymère d'acide lactique et d'acide glycolique obtenu par réaction de co-polymérisation. Les monomères sont liés par des liaisons ester et il en résulte un polyester aliphatique linéaire (**Figure 2**) [13].



**Figure 2: Structure de l'acide poly(lactique-co-glycolique) avec x et y le ratio de monomères d'acide lactique et d'acide glycolique, respectivement.**

L'acide lactique contient un carbone asymétrique rendant la molécule chirale avec deux énantiomères : D- et L- acide lactique. Le PLGA contient généralement la forme L et D en proportion égale ; il s'agit donc d'acide poly D,L-lactique-co-glycolique. En fonction du rapport de lactide / glycolide utilisé pour la polymérisation, différentes formes de PLGA peuvent être obtenues (ex : PLGA (75 / 25), PLGA (50 / 50)...). Les propriétés physiques du polymère tel que son poids moléculaire ont une influence sur la résistance mécanique du polymère et son aptitude à être destiné pour la formulation de systèmes à libération contrôlée. La présence du groupement méthyl

dans l'acide lactique (**Figure 2**) le rend moins hydrophile que l'acide glycolique, et par conséquent un PLGA riche en acide lactique sera plus hydrophobe, absorbera moins d'eau et par la suite se dégradera plus lentement<sup>[2]</sup>. Le PLGA se dégrade par hydrolyse des liaisons ester, en présence d'eau. Le temps nécessaire à la dégradation est lié à la proportion des monomères utilisés lors de la production du polymère: plus la teneur en acide glycolique est élevée, plus la dégradation est rapide. Une exception à cette règle, le PLGA avec un ratio (50 / 50) d'acide lactique et d'acide glycolique s'hydrolyse plus rapidement que ceux qui contiennent une proportion plus élevée de l'un des deux monomères et se dégrade en environ 50 à 60 jours<sup>[14]</sup>. Le PLGA peut être solubilisé dans une large gamme de solvants organiques, y compris les solvants chlorés, tétrahydrofurane, acétone ou l'acétate d'éthyle<sup>[15]</sup>. Sa solubilité dans les solvants organiques est un facteur important en ce qui concerne sa formulation en tant que système de libération de SA. Tous les PLGA sont amorphes et caractérisés par une température de transition vitreuse (Tg) qui correspond au passage du polymère d'un état vitreux à un état caoutchouteux<sup>[16]</sup>. Cette dernière est généralement supérieure à la température physiologique de 37 °C. Le polymère a des propriétés viscoélastiques dépendantes de la température extérieure (T) :

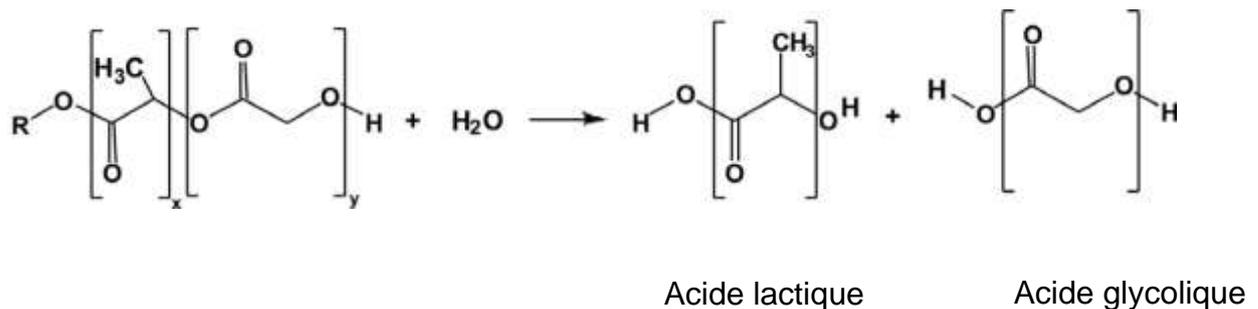
- Si  $T < T_g$  : le polymère est sous forme vitreuse
- Si  $T > T_g$  : le polymère est sous forme caoutchouteuse

L'état caoutchouteux est caractérisé par une mobilité moléculaire élevée et par conséquent, il est plus susceptible de subir des changements physiques et chimiques que l'état vitreux. La Tg d'un polymère sous forme vitreuse peut être diminuée lorsqu'il est mélangé à d'autres substances dites plastifiantes. Cela conduit à une augmentation de la mobilité des chaînes polymériques et influençant ainsi les cinétiques de libération de SA encapsulée à partir des systèmes à base de PLGA<sup>[16]</sup>. L'eau est connue pour jouer le rôle de plastifiant pour le PLGA<sup>[17]</sup>. En revanche, lorsque la Tg peut être augmentée par l'addition d'une SA, le phénomène est considéré comme anti-plastifiant<sup>[18]</sup>. Il a été rapporté dans la littérature que la Tg du PLGA diminue avec la diminution de la teneur en acide lactique dans la composition du copolymère ainsi que la diminution du poids moléculaire<sup>[17]</sup>. La capacité de gonflement et d'hydrolyse, et par la suite la vitesse de dégradation du PLGA sont directement influencées par la cristallinité du polymère<sup>[4]</sup>. La résistance mécanique

du PLGA est affectée par les propriétés physiques telles que son poids moléculaire et son indice de polydispersité.

## II.2 Biodégradabilité et biocompatibilité de l'acide poly(lactique-co-glycolique)

La conception et la formulation des systèmes biodégradables d'administration de SA exigent une bonne compréhension des phénomènes de biodégradation ainsi que les réponses cellulaires et tissulaires qui déterminent leur biocompatibilité <sup>[1]</sup>. Le PLGA est l'un des polymères biodégradables les plus utilisés. Il subit, dans le corps, une hydrolyse en milieu aqueux pour produire de l'acide lactique et de l'acide glycolique, deux métabolites solubles dans l'eau <sup>[19]</sup> (**Figure 3**):



**Figure 3: Hydrolyse de l'acide Poly(lactique-co-glycolique).**

L'acide lactique est un produit du métabolisme anaérobie du corps humain qui est incorporé par la suite dans le cycle de l'acide tricarboxylique, métabolisé et éliminé sous forme de dioxyde de carbone et d'eau <sup>[20]</sup>. L'acide glycolique est, soit excrété sous forme inchangée par voie rénale, soit il pénètre dans le cycle de l'acide tricarboxylique et est éventuellement éliminé sous forme de dioxyde de carbone et d'eau <sup>[21]</sup>. Les produits de dégradation sont formés à un rythme très lent et par conséquent ils n'affectent pas la fonction cellulaire puisque le corps traite efficacement ces deux monomères. Ainsi, ils représentent une toxicité systémique minimale associée à l'utilisation de MP de PLGA comme système de libération de SA

[22]. Les substances thérapeutiques encapsulées dans des systèmes matriciels à base de PLGA sont libérées à une vitesse contrôlée grâce à la diffusion de ces dernières et à la dégradation de la matrice polymérique [23]. Le rôle des enzymes dans la biodégradation du PLGA est controversé. Il a été rapporté dans la littérature que l'hydrolyse spontanée était le seul mécanisme de dégradation de ce type de système [24,25]. D'autres travaux ont indiqué que la biodégradation du PLGA n'implique aucune activité enzymatique et se fait purement par hydrolyse. Il a été conclu que seule une faible implication des enzymes est attendue dans les premiers stades de dégradation avec des polymères à l'état vitreux, tandis que les enzymes peuvent jouer un rôle important dans la dégradation des polymères à l'état caoutchouteux. Cela était basé sur les différences observées entre les taux de dégradation *in vivo* et *in vitro* [26,27,28].

L'évaluation de la biocompatibilité de systèmes de libération de SA à base de PLGA nécessite une compréhension des réactions inflammatoires qui suivent l'implantation de la forme galénique. La taille, la forme et les propriétés physico-chimiques du biomatériau utilisé peuvent influencer l'intensité et la durée de l'inflammation, ainsi que le processus de guérison de la plaie. La réponse tissulaire à des MP biodégradables injectées est caractérisée par trois phases :

- Phase I : se produit au cours des deux premières semaines suivant l'injection du système et comprend la mise en place des réponses inflammatoires aiguës et chroniques. Compte tenu de la biocompatibilité et de la biodégradabilité des MP, cette réponse est similaire quelle que soit la vitesse de dégradation du polymère utilisé.
- Phase II : est initiée par la prédominance des monocytes et des macrophages. La durée de leur persistance dans le site d'injection est déterminée par la vitesse de dégradation de MP. Elle s'accompagne de la formation de tissu de granulation fibreux et de nouveaux capillaires sanguins. Il a été montré que les MP à base de PLGA (50 :50) induisent une réponse de phase II de 50 à 60 jours [29].
- Phase III : la masse moléculaire du polymère diminue au point que l'intégrité des MP ne peut être maintenue. Ces dernières se décomposent en petites

particules qui subissent une phagocytose par les macrophages et conduisent ainsi à une dégradation complète. La capsule fibreuse formée au cours de la deuxième phase est accentuée au cours de la phase III avec des fibroblastes et une néovascularisation engendrée par la perte de volume des MP <sup>[1]</sup>.

Dans l'analyse de la réponse tissulaire suite à l'injection de MP biodégradables, il est important de prendre en considération l'activité biologique de la SA incorporée, en particulier si celle-ci a une activité cytotoxique ou anti-inflammatoire qui pourrait modifier ou moduler la réponse tissulaire <sup>[30]</sup>.

### **II.3 Les techniques de préparation des microparticules**

Bien qu'un certain nombre de techniques de micro-encapsulation ait été développé et rapporté à ce jour, le choix de la technique dépend de la nature du polymère, de la SA, de l'utilisation prévue et de la durée du traitement. La méthode de micro-encapsulation utilisée doit remplir les exigences suivantes <sup>[4]</sup>:

- La stabilité et l'activité biologique de la SA ne doivent pas être affectées au cours du procédé d'encapsulation ou dans les MP (produit final).
- Le rendement de fabrication des MP dans la gamme de taille souhaitée (jusqu'à 250  $\mu\text{m}$ , idéalement 125  $\mu\text{m}$ ) et l'efficacité d'encapsulation doivent être élevés.
- La qualité des MP et les profils de libération de la SA doivent être reproductibles.
- Une fois séchées, la poudre de MP doit présenter de bonnes propriétés d'écoulement sans agrégation ni d'adhésion.

#### **II.3.1 Extraction et évaporation du solvant**

##### **II.3.1.1. Procédé par simple émulsion**

Ce procédé est basé sur l'évaporation de la phase interne d'une émulsion type H/E entraînant ainsi la précipitation du polymère préalablement dissous dans cette phase organique, sous forme de MP. Le polymère est d'abord dissout dans un

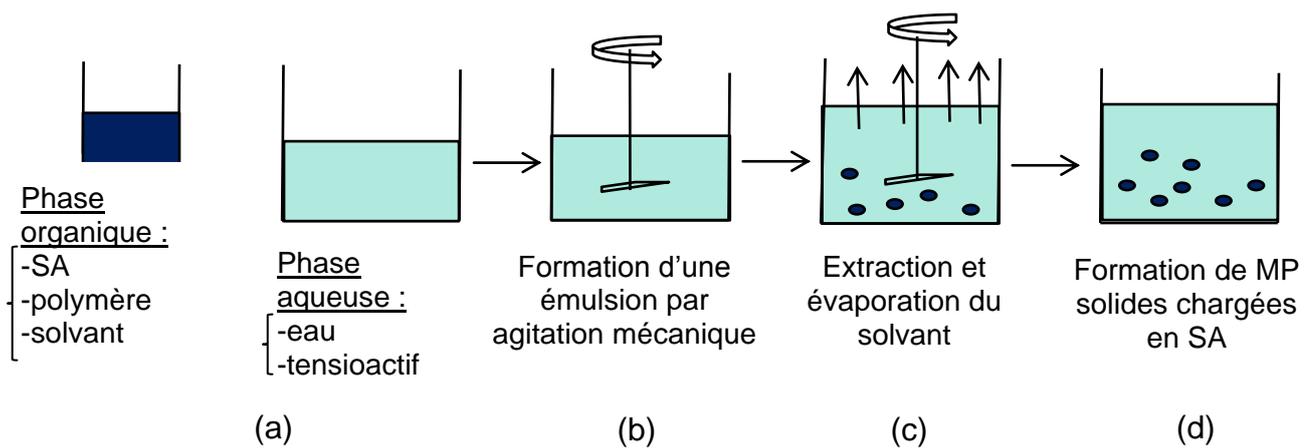
solvant organique volatil, peu miscible à l'eau comme le dichlorométhane (le plus couramment utilisé), puis la SA est dissoute ou dispersée dans cette solution de polymère. Le mélange (avec des conditions d'agitation et de chauffage appropriées) est ensuite émulsionné dans un grand volume d'eau contenant un tensioactif tel que l'alcool polyvinylique (APV), afin d'obtenir une émulsion de type huile-dans-eau (H/E). L'évaporation du solvant après diffusion progressive dans la phase continue peut se faire soit sous pression atmosphérique, soit sous pression réduite, ou bien sous agitation lente. L'extraction est obtenue par le transfert de l'émulsion dans un grand volume d'eau contenant ou pas un tensioactif. Cela permet une extraction accélérée du solvant organique par diffusion rapide de ce dernier dans l'eau et permet, ainsi, le durcissement des gouttelettes organiques sous forme de microsphères. Ces dernières sont par la suite lavées et collectées par filtration et/ou centrifugation puis lyophilisées pour éliminer le solvant résiduel (**Figure 4**)<sup>[4]</sup>.

La principale limite de cette méthode est sa faible capacité à encapsuler les SA solubles dans l'eau<sup>[31,32]</sup>. Celles-ci pourraient diffuser à partir de la phase organique vers la phase continue aqueuse et une partie pourrait se déposer à la surface des MP sous forme de cristaux. Ces derniers seraient, par la suite, responsables de la libération initiale rapide de la SA appelée « effet burst ». En revanche, cette méthode décrite ci-dessus est appropriée pour l'encapsulation de SA lipophiles<sup>[31,33]</sup>.

Afin d'augmenter l'efficacité d'encapsulation des SA hydrophiles, une émulsion de type huile-dans-huile (H/H) a été développée<sup>[34]</sup>. Un solvant organique volatil, miscible à l'eau est utilisé pour solubiliser le polymère et la SA (acétonitrile, acétone...). Celui-ci est, par la suite, dispersé dans une huile non-volatile et non-miscible (huile minérale ou végétale contenant un tensioactif). Les MP subissent souvent un lavage à l'hexane pour éliminer l'huile résiduelle<sup>[31]</sup>.

Le procédé de micro-encapsulation et la qualité du produit final sont influencés par plusieurs paramètres<sup>[35,36,37,38, 39, 40, 41]</sup> :

- La nature et la solubilité de la SA encapsulée,
- Le solvant organique utilisé,
- La concentration et la nature du tensioactif,
- La température et la vitesse d'agitation du procédé d'émulsification,
- La concentration, la composition et le poids moléculaire du polymère.



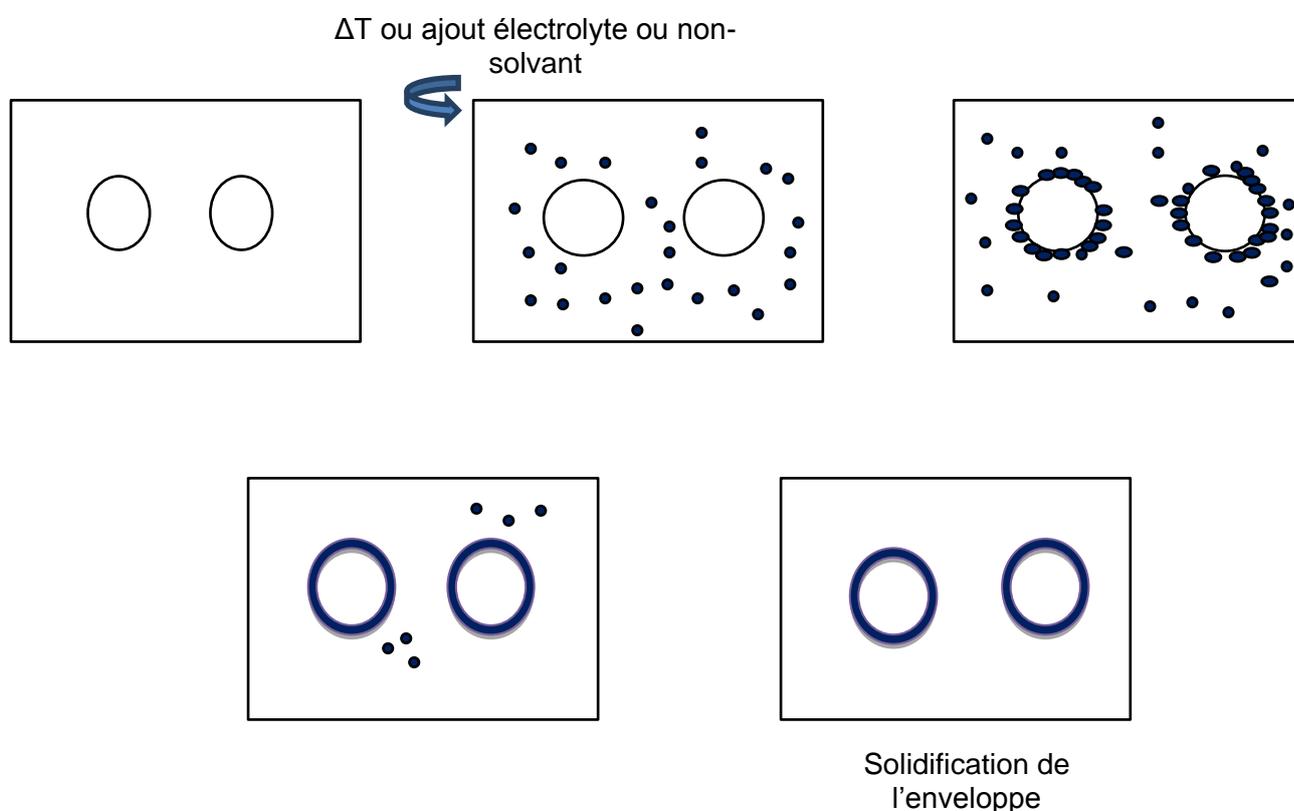
**Figure 4: Préparation de MP par procédé d'émulsion simple (H/E).**

### II.3.1.2. Procédé par double émulsion

Une émulsion eau-dans-huile-dans-eau ( $E_1/H/E_2$ ) est la plus adaptée à l'encapsulation de SA hydrophiles telles que les vaccins <sup>[42,43,44]</sup>, peptide/protéine <sup>[45,46,47]</sup> et des molécules classiques (anti-inflammatoires, anticancéreux, antibiotiques, antiviraux) <sup>[48,49,50]</sup>. Cette technique consiste à émulsionner une solution aqueuse ( $E_1$ ) de la SA (appelée phase interne) dans une solution organique (H) contenant le polymère dissout afin d'obtenir une émulsion primaire ( $E_1/H$ ). Cette émulsion  $E_1/H$  est ensuite émulsionnée dans une seconde phase aqueuse ( $E_2$ ) contenant un tensioactif afin de former une double émulsion ( $E_1/H/E_2$ ). Les MP obtenues par cette méthode peuvent être de type matriciel (microsphères) ou de type réservoir (microcapsule) <sup>[41,51]</sup>. Comme il a été observé dans des études antérieures, le volume de la phase aqueuse interne a une influence sur la microstructure des MP. Plus le volume de la phase aqueuse interne est augmenté, plus la structure de la matrice observée sera poreuse <sup>[52]</sup>. La stabilité de la SA encapsulée doit être maintenue. C'est le cas par exemple des protéines, si celles-ci sont dénaturées au cours de l'encapsulation, elles seront thérapeutiquement inactives et pourraient provoquer des effets secondaires imprévisibles comme une immunogénicité ou une toxicité <sup>[53]</sup>.

### II.3.2 Technique de coacervation :

Le procédé de coacervation consiste à abaisser la solubilité d'un polymère initialement solubilisé dans un solvant organique en variant la température ou par l'addition d'un électrolyte ou d'un non-solvant. La SA est dispersée dans la solution du polymère. Ces changements de conditions induisent une séparation de phases en une phase de coacervat qui est riche en polymère et une phase continue, pauvre en polymère. Le solvant du polymère est ensuite progressivement extrait du coacervat et conduit à la formation de gouttelettes de coacervat qui viennent se déposer à la surface des particules de SA. Le système à deux phases est transféré dans un grand volume d'un agent de durcissement organique (ex : les alcanes) miscible avec le solvant et le non-solvant du polymère. Les microparticules solides formées par extraction rapide et efficace du solvant restant dans les gouttelettes du coacervat sont de type réservoir (microcapsule) (**Figure 5**). Elles sont lavées, filtrées ou centrifugées puis séchées. Ce procédé permet l'encapsulation de substances hydrophiles et lipophiles <sup>[4,54,55]</sup>.



**Figure 5: Principe de la coacervation simple.**

### **II.3.3 Technique par atomisation-séchage (spray-drying)**

Le principe de séchage par nébulisation est basé sur la nébulisation d'une formulation liquide contenant le polymère et la SA pour la transformer en microparticules sèches. Contrairement aux autres précédés, cette technique est très rapide, pratique, implique des conditions douces et moins dépendantes du paramètre de solubilité du polymère et de la SA. Le procédé consiste à atomiser à travers une buse d'atomisation une solution, une suspension, ou une émulsion de polymère et de la SA. Cela permet la formation d'un aérosol qui est mis en contact avec un flux d'air chaud ou d'azote comprimé dans une chambre de séchage par évaporation du solvant initial et la formation de MP solides. Cette technique permet la production de microsphères ou microcapsules <sup>[4,56,57]</sup>. La taille des particules obtenues se situe généralement autour de 15µm avec une distribution de type gaussien assez large <sup>[58]</sup>. Parfois, la taille obtenue est beaucoup plus petite et elle varie de 1 à 5µm. Cette technique permet l'obtention des MP avec un rendement de fabrication et une efficacité d'encapsulation assez élevés <sup>[59]</sup>. Les paramètres les plus influents sont la géométrie de la buse et la viscosité de la solution de départ. Une perte significative de produit peut se produire suite à l'adhésion des particules aux parois de l'appareil. L'utilisation d'un anti-adhérent (mannitol) peut être envisagée <sup>[59]</sup>, ou bien le traitement du verre pour diminuer les caractéristiques d'adhérence.

### **II.4 Les facteurs influençant la préparation de microparticules à base d'acide poly(lactique-co-glycolique)**

Les propriétés du polymère et du produit fini (MP) sont fortement influencées par la méthode de préparation et dans certains cas par des interactions entre la SA et le polymère.

#### **II.4.1 Les facteurs influençant la taille des microparticules**

Il existe de nombreux paramètres qui peuvent influencer la taille des MP au moment du procédé de préparation, notamment:

- **La vitesse d'agitation au cours de l'étape d'émulsification** : Song *et al.* ont montré que l'augmentation de la vitesse d'agitation fournit une force de cisaillement plus puissante. Cela permet de séparer l'émulsion en petites gouttelettes ainsi après solidification, des MP d'une petite taille sont obtenues [60].
- **La concentration en agent tensioactif** : une diminution significative de la taille des MP est obtenue en augmentant la concentration en agent tensioactif. Maia *et al.* ont montré qu'une augmentation de la concentration en APV de 0,5 % à 2 % (m/v) permet la stabilisation des gouttelettes de l'émulsion pour éviter une coalescence, ce qui entraîne la formation de MP de plus petites tailles. En revanche, aucune diminution significative de la taille n'est observée en augmentant la concentration de l'APV au-delà de 2% (m/v). Dans ce cas, étant donné que le APV est un polymère de haut poids moléculaire, l'augmentation de sa concentration entraîne une augmentation de la viscosité de l'émulsion huile-dans-eau, ce qui entraîne une difficulté croissante à disperser l'émulsion en gouttelettes de plus petite taille [61].
- **La concentration du polymère dans la phase organique** : la taille des particules augmente constamment avec l'augmentation de la concentration du polymère dans la phase organique. Ce phénomène peut être attribué à une augmentation de la viscosité de la phase huileuse. Cela se traduit par une réduction de l'efficacité d'agitation et conduit à la formation de grosses gouttelettes dans l'émulsion. Par conséquent, des MP de plus grande taille sont obtenues [62]. En outre, Rosca *et al.* ont montré que le facteur de retrait (rapport entre le diamètre des gouttelettes de l'émulsion et le diamètre des MP après évaporation complète du solvant) est plus grand pour des concentrations en polymère plus faible, ce qui contribue à une diminution de la taille des MP [41].
- **Le type de solvant utilisé ainsi que l'utilisation de co-solvant** : l'utilisation d'un solvant organique à faible tension inter-faciale dans la phase aqueuse conduit à une réduction progressive de la taille des MP car cela favorise la formation de petites gouttelettes au cours de l'émulsification [63]. Cette

observation est étayée par les travaux d'Ito *et al.* qui ont formulé des MP à l'aide de différents solvants (chlorure de méthylène, chloroforme et acétate d'éthyle) : ils ont montré que des MP de plus petites tailles sont obtenues en utilisant des solvants à faible tension interfaciale.

- **La température de la solution** : Yan *et al.* ont montré que la taille des MP augmente avec la température de la préparation. Ce qui peut s'expliquer par une vitesse d'évaporation du solvant qui est beaucoup plus rapide à haute température <sup>[64]</sup>.
- **Le volume de la phase organique** : La taille des MP diminue en augmentant le volume de la phase organique selon Choi *et al.*. Cela est expliqué par la diminution de la viscosité de la phase organique et par conséquent la formation de particules de petites tailles. Le phénomène inverse est observé en diminuant le volume (tout en gardant la masse du polymère constante) <sup>[65]</sup>.

#### **II.4.2 Les facteurs influençant le taux d'encapsulation de la substance active**

L'amélioration de l'efficacité d'encapsulation de SA peut être obtenue grâce à l'optimisation des paramètres de la formulation et dépend de plusieurs facteurs :

- **La composition du polymère** : l'efficacité d'encapsulation des SA hydrophiles est très dépendante du rapport de l'acide lactique et l'acide glycolique du PLGA. Elle diminue en augmentant le taux d'acide glycolique, et cela par augmentation du caractère hydrophile du polymère. Par conséquent, ce dernier améliore à son tour la diffusion des SA dans la phase aqueuse externe <sup>[52]</sup>.
- **La présence de sel dans la phase aqueuse externe** : une efficacité d'encapsulation élevée est obtenue avec une concentration plus élevée d'électrolyte dans la phase aqueuse externe. Cela est attribué à la différence de pression osmotique entre la phase aqueuse interne et externe. Freytag *et*

*al.* ont montré qu'une concentration en sel au-dessus de 8 % ne donne pas lieu à une augmentation supplémentaire de l'efficacité d'encapsulation et reste relativement constante. En revanche, elle diminue lorsque la concentration en sel est en-dessous de 8 % <sup>[66]</sup>.

- **La viscosité de la phase organique:** l'augmentation de la viscosité de la phase organique, en augmentant la concentration en polymère ou son poids moléculaire, améliore et augmente l'efficacité d'encapsulation <sup>[67]</sup>. Une solution plus visqueuse retarde la diffusion de la SA dans les gouttelettes de polymère <sup>[68]</sup>.
- **La solubilité du solvant organique dans l'eau :** un solvant organique avec une solubilité élevée dans l'eau permet un transfert de masse relativement rapide entre la phase dispersée et la phase continue, ainsi une précipitation rapide du polymère <sup>[69]</sup>. Bodmeier *et al.* ont trouvé que le chlorure de méthylène permet l'obtention d'une efficacité d'encapsulation élevée comparativement au chloroforme et au benzène. Sachant que le chlorure de méthylène est plus soluble dans l'eau que les deux autres <sup>[68]</sup>.
- **Le ratio de la phase dispersée et de la phase continue:** l'efficacité d'encapsulation augmente avec l'augmentation du volume de la phase continue. Il est probable qu'un grand volume de phase continue dilue le solvant organique conduisant ainsi à une solidification rapide des MP <sup>[69]</sup>.
- **La solubilité de la substance active dans la phase continue :** ce paramètre joue un rôle important dans la détermination de l'efficacité d'encapsulation. Si la solubilité de la SA dans la phase continue est supérieure à celle dans la phase dispersée, elle diffusera facilement. La perte de SA se produit quand la phase dispersée est à l'état transitionnel, semi-solide <sup>[69]</sup>.

## **II.5 Mécanismes et profils de libération de la substance active**

L'étude de la libération de la SA *in vitro* à partir de MP à base de PLGA est un outil indispensable pour évaluer des systèmes destinés à la libération contrôlée de substance thérapeutiques. Le but est de répondre aux besoins thérapeutiques et de limiter les effets secondaires toxiques, tout en contrôlant la libération de SA en quantité désirée sur des périodes de temps de quelques heures à quelques mois. Les MP sont conçues pour libérer la SA de manière déclenchée ou continue. En général, les systèmes à libération déclenchée sont capables de libérer la substance encapsulée brutalement par éclatement de la membrane. Ce dernier est provoqué par une contrainte du milieu extérieur tels que la pression, la variation de température ou de pH. Contrairement à une libération continue, où la substance encapsulée est capable soit de diffuser à travers la matrice (selon la loi de Fick) soit d'être libérée par dégradation ou dissolution de matrice.

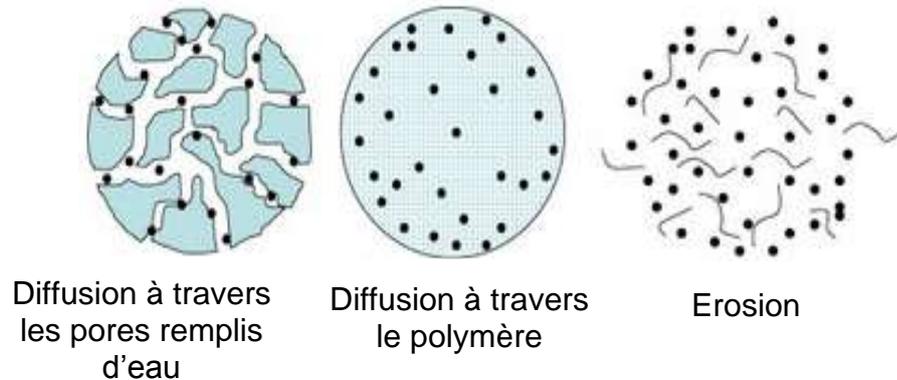
### **II.5.1 : Les mécanismes de libération**

Divers procédés, tels que la diffusion, l'érosion et/ou gonflement peuvent être impliqués dans le contrôle du taux de libération de la SA, et dans l'ensemble il en résulte un large éventail de profils de libération. Fredenberg *et al.* ont identifié dans une revue trois mécanismes possibles qui participent à la libération de substances actives à partir de systèmes de libération à base de PLGA <sup>[70]</sup> (**Figure 6**):

II.5.1.1 : Diffusion à travers les pores remplis d'eau : Ce mécanisme a été utilisé pour décrire la première étape de libération avant le début de l'érosion du polymère <sup>[71]</sup>. Elle est très dépendante de la structure poreuse du polymère, et est donc dépendante des processus qui favorisent la formation et la fermeture de ces derniers. Les pores doivent être continus à partir de la molécule de la SA jusqu'à la surface du système et suffisamment grands pour que la SA puisse passer au travers. Il y a plusieurs facteurs qui peuvent influencer le taux de diffusion de la SA. La diffusion à travers les pores remplis d'eau est le véritable mécanisme de libération pendant toute la durée de libération, à moins que la diffusion ait lieu dans le polymère ou que le transport de la SA soit entraîné par la pression osmotique.

II.5.1.2: Diffusion à travers le polymère : il concerne les SA hydrophobes de bas poids moléculaire. La vitesse de diffusion est très dépendante de l'état physique du polymère, elle peut augmenter quand le polymère passe de l'état vitreux à l'état caoutchouteux (Karlsson *et al.*) et contrairement à la diffusion à travers les pores remplis d'eau, elle ne dépend pas de la structure poreuse. La diffusivité est souvent plus élevée dans les polymères de bas poids moléculaire, cela est dû à une plus grande mobilité des chaînes polymériques (Faisant *et al.*) [72,73].

II.5.1.3: Erosion : elle représente souvent le mécanisme qui contrôle la vitesse de diffusion de la SA au cours de la dernière période de libération [74]. La molécule encapsulée est également libérée en raison de la dégradation du polymère par hydrolyse des liaisons esters. Plusieurs évènements peuvent influencer la vitesse de libération telles que la solubilité de la SA, l'interaction polymère-SA et l'importance de l'hydratation (gonflement du polymère).



**Figure 6: Schémas représentatifs des différents mécanismes de libération.**

## **II.5.2 Les profils de libération obtenus à partir de microparticules à base d'acide poly(lactique-co-glycolique)**

Les profils de libération obtenus sont la combinaison des mécanismes décrits précédemment. Plusieurs types de profils ont été rapportés dans la littérature (**Figure 7**) :

**a) Profil monophasique ou cinétique d'ordre zéro** : il s'agit d'une libération constante d'agent thérapeutique qui est contrôlée seulement par un phénomène de diffusion rapide <sup>[75]</sup>. Une cinétique d'ordre zéro de petites molécules à partir de MP est difficile à obtenir. Souvent, la libération des petites molécules encapsulées dans des particules polymériques est typiquement dominée par une libération initiale rapide «burst». Narayani et al. ont montré qu'une cinétique d'ordre zéro peut être obtenue en utilisant un mélange de gamme de MP de différentes tailles plutôt qu'une gamme de MP de la même taille <sup>[76]</sup>.

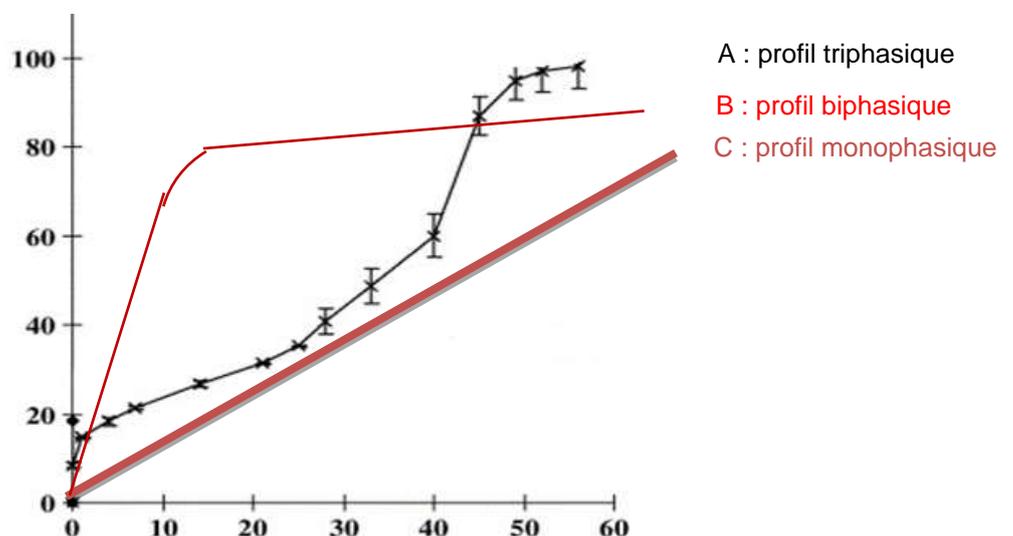
**b) Profil biphasique** : il comprend deux phases <sup>[73,77,78,79]</sup>.

- **Phase I** : appelé effet «burst», qui est le résultat d'une libération rapide de la SA qui est faiblement liée à la surface ou incorporée dans une région superficielle des MP. La SA diffuse à travers la matrice polymérique ainsi que les micropores de la structure polymérique remplis d'eau, une fois ces dernières en contact avec le milieu de libération. La pénétration d'eau dans la matrice polymérique provoque une scission aléatoire des liaisons esters du PLGA. Cela conduit à une diminution du poids moléculaire sans aucune perte de poids appréciable, ni formation de monomères solubles dans cette phase.
- **Phase II** : le procédé implique l'érosion du polymère. L'eau à l'intérieur de la matrice provoque une hydrolyse du polymère en oligomères et monomères solubles. Cela permet la libération de la SA par diffusion et dissolution totale du polymère.

**c) Profile tri-phasique** : c'est le profil le plus observé, il se déroule en trois phases <sup>[80,81,82]</sup>.

- Phase I : une libération rapide «effet burst» comme décrit précédemment. L'étendue et la durée de cette phase peut dépendre de la distribution de la SA dans la matrice ainsi que l'efficacité d'encapsulation au cours de l'étape de durcissement des MP.
- Phase II : il s'agit d'une diffusion lente de la SA à travers la matrice polymérique et les pores remplis d'eau. L'apparition de la phase II peut être le résultat de la difficulté de la SA à diffuser hors de la matrice.
- Phase III : elle est marquée par une libération rapide de la SA qui correspond à une érosion massive de la matrice polymérique. La taille des chaînes polymériques atteint une valeur critique au-dessous de laquelle la matrice perd sa cohésion. Elle est déterminée principalement par la vitesse de diffusion à partir de la matrice en raison de sa dégradation.

Le profil tri-phasique est observé, en général, avec des MP obtenues par méthode d'extraction et évaporation du solvant.



**Figure 7: Représentation schématique des différents profils de libération.**

Un système de libération avec un profil de libération approprié doit être choisi avec soin pour obtenir l'effet pharmacologique désiré. Par conséquent, les essais de libération sont effectués dans un tampon phosphate à pH constant de 7,4 (pH physiologique) à 37 °C.

## **II.6 Les facteurs influençant la libération de substances actives et la dégradation du polymère**

Pour améliorer les propriétés du dispositif de libération de SA à base de PLGA, il est essentiel de comprendre les facteurs qui affectent la dégradation du PLGA pour concevoir un dispositif efficace. Parmi ces facteurs :

**II.6.1 la composition du copolymère** : est le facteur le plus important pour déterminer le caractère hydrophile et la vitesse de dégradation. L'augmentation du pourcentage d'acide glycolique accélère la perte du poids du polymère. PLGA 50 : 50 (PLA : PGA) a montré une dégradation plus rapide que le PLGA 65 : 35 car il a la plus forte teneur en acide glycolique qui présente un caractère plus hydrophile accélérant donc ainsi la dégradation. La quantité d'acide glycolique est un paramètre critique dans la détermination du caractère hydrophile de la matrice polymérique et ainsi la vitesse de dégradation et de la libération de la SA. Si la quantité relative d'acide lactique est augmentée, le polymère va subir une dégradation plus lente et donc une libération plus lente de la SA.

**II.6.2. Le poids moléculaire du polymère** : les polymères de poids moléculaire élevé sont généralement exposés à des taux de dégradation plus faibles. Les polymères ayant un poids moléculaire plus élevé ont des chaînes de polymère plus longues, ainsi ils nécessitent plus de temps pour se dégrader que les polymères de petites chaînes. L'augmentation du poids moléculaire diminue également la mobilité de la SA au sein du système en raison de l'encombrement stérique accru <sup>[83]</sup>.

**II.6.3. La cristallinité et la température de transition vitreuse** : la composition du copolymère affecte également les propriétés physiques du polymère telles que la Tg et la cristallinité, qui ont des effets indirects sur la vitesse de dégradation. Lorsque le polymère est à l'état amorphe, la SA peut diffuser plus rapidement que lorsqu'il est à l'état cristallin. Cela est dû à la plus grande mobilité des chaînes polymériques à l'état amorphe. Un polymère cristallin est plus rigide et donc la diffusion de la SA est ralentie. A l'état humide, la Tg du PLGA peut devenir inférieure à 37 °C, ce qui augmente la mobilité des chaînes polymériques et accélère la libération de la SA.

**II.6.4. La nature de la substance active**: les acides ainsi que les bases peuvent catalyser le clivage des liaisons esters. La SA en elle-même peut subir des interactions avec le polymère, ce qui entraîne une libération plus lente. Le PLGA contient des extrémités carboxyliques libres, qui sont chargées négativement à pH physiologique de 7,4. Si une SA basique est incorporée dans les MP, elle sera chargée positivement à pH physiologique. Par conséquent, la charge négative des extrémités carboxyliques fera l'objet d'une interaction ionique avec la charge positive de la molécule. Par conséquent, la diffusion sera entravée et la libération sera ralentie.

**II.6.5 La taille et la porosité des microparticules**<sup>[84]</sup> : l'effet de la taille et de la porosité des MP à base de PLGA ont été montrés par Klose *et al.*. Théoriquement, la vitesse de libération de la SA devrait diminuer en augmentant les dimensions du système. Comme la diffusion est connue pour jouer un rôle majeur dans le contrôle de la libération des molécules à partir de MP à base de PLGA<sup>[85]</sup>, une augmentation de la taille du système devrait se traduire par des taux de libération relatifs réduits en raison de l'augmentation de la longueur des voies des diffusions, par conséquent, une diminution du gradient de concentration de la SA. Après imbibition par l'eau, le polyester est hydrolysé et clivé en chaînes d'acide plus courtes. En raison du gradient de concentration, celles-ci diffusent dans la masse de fluide environnant, où ils sont neutralisés. Cependant, les processus diffusionnels dans les systèmes polymériques sont relativement lents et la vitesse à laquelle les acides sont générés peut être supérieure à la vitesse à laquelle ils sont neutralisés. Par

conséquent, le pH à l'intérieur des MP peut chuter de manière significative et comme le clivage de la liaison ester est catalysée par des protons, des diminutions significatives du micro-pH conduit à une dégradation accélérée du polymère (autocatalyse). Cela conduit à une augmentation de la mobilité des molécules ainsi qu'une augmentation des taux libérés. Dans les MP de PLGA poreuses, la diffusion des acides solubles dans l'eau est beaucoup plus rapide que dans les systèmes non-poreux. Ainsi, les effets auto-catalytiques doivent être beaucoup moins importants dans ce type de systèmes. Ils doivent être réduits ou même complètement supprimés (en fonction de la vitesse de dégradation du polymère et la mobilité de l'espèce en cause).

**II.6.6 L'effet du pH** : le pH acide peut être utilisé pour accélérer la libération des SA à partir de MP de PLGA <sup>[86]</sup>. Zolnik *et al.* ont conclu qu'un pH inférieur n'a pas d'influence sur le «burst», mais en a une sur l'évolution de la morphologie pendant la libération. A pH 7,4, la morphologie des MP montrent la création de pores en raison de l'effet autocatalytique. A pH 2,4, la surface extérieure est restée lisse tout au long de la libération et est devenue très fragile, ce qui provoque parfois leur rupture. Cela peut être expliqué par le fait que les oligomères formés ont une faible solubilité à pH 2,4 et, par conséquent, ils restent à l'intérieur de la particule.

**II.6.7. L'effet des enzymes** : des résultats contradictoires ont été publiés sur l'effet des enzymes sur les mécanismes de dégradation (hydrolyse par rapport à un clivage enzymatique) en partie due aux observations que la dégradation *in vivo* ne peut être totalement corrélée à l'évaluation *in vitro*. Il a été proposé que le PLGA se dégrade en premier lieu par hydrolyse, mais il a également été suggéré que la dégradation enzymatique peut jouer un rôle dans le processus. En raison d'un manque d'uniformité dans les tests *in vivo*, il est difficile de comparer et de démontrer le choix des enzymes proposés et de leur contribution dans le processus de dégradation <sup>[87]</sup>.

**II.6.8. L'effet des conditions de libération (ex gel versus tubes)** <sup>[88,89]</sup> : Différentes techniques sont utilisées pour étudier la libération de SA *in vitro*. Comme pour les tests de libération conventionnelle, la sélection de la

température et du milieu de libération sont importants. La sélection du milieu est régie par la solubilité et la stabilité de la SA pendant toute la durée de l'étude, tandis que la température utilisée est de 37°C pour simuler la température physiologique. Un tampon phosphate à pH 7,4 (pH physiologique) est souvent utilisé. Les méthodes souvent utilisées sont regroupées en trois grandes catégories: cellule à flux continu, méthode de dialyse et la méthode la plus utilisée consiste à disperser des MP chargées en SA dans des tubes ou flacons contenant le milieu de libération. Le volume du milieu est choisi d'une manière à maintenir les conditions Sink. Les MP sont placées dans des tubes ou flacons qui sont soumis à une agitation continue ou intermittente à une vitesse fixe et incubés à 37 °C pendant toute la durée de l'étude pour simuler les conditions physiologiques. La libération de SA est mesurée en séparant les MP du milieu par filtration ou centrifugation. Le volume du milieu prélevé est ensuite remplacé partiellement ou totalement par un milieu frais pour éviter l'accumulation des produits de dégradation du polymère dans la solution. Cette technique permet une évaluation précise et directe de la libération *in vitro* mais il y a une perte possible de MP au cours du prélèvement. La technique décrite auparavant ne simule pas réellement les conditions auxquelles les MP sont exposées *in vivo*. Par exemple, après une injection sous-cutanée ou intramusculaire, les MP ne sont pas en contact avec un fluide mais avec un tissu vivant. Ainsi, les systèmes de libération sont exposés à un environnement complètement différent de celui généralement utilisé dans les tests de libération *in vitro*. Malheureusement, cette différence peut affecter les cinétiques de libération *in vitro*, surtout dans le cas de MP à base de PLGA. En effet, le PLGA est un polyester dont la dégradation est pH-dépendante, son hydrolyse est catalysée par les bases et les acides. Une étude de libération a été réalisée par Klose *et al.* dans un gel d'agarose pour simuler le transport de SA dans les tissus vivants lors d'une administration parentérale. Des boîtes de pétri ont été remplies avec du gel d'agarose et maintenues à 37 °C. Au milieu du gel, un réservoir de SA est déposé (MP chargées en SA). A des moments prédéterminés, des échantillons de gel ont été prélevés à différentes distances du bord de la boîte de pétri et analysés pour déterminer la teneur en SA. La méthode décrite ci-dessus simplifie considérablement des conditions de libération *in vivo* dont la complexité réelle

est difficile à reproduire. En outre, il faut toujours garder à l'esprit que les mécanismes de libération de SA sont complexes et peuvent être significativement modifiés par les conditions d'essai.

## **II.7 Les mécanismes de dégradation de l'acide poly(lactique-co-glycolique)**

Plusieurs processus contribuent à la cinétique de la libération de SA à partir de MP de PLGA dont la dégradation chimique du polymère: l'hydrolyse autocatalytique des liaisons ester, l'érosion du polymère, l'évolution de la structure des pores en raison de l'érosion de masse, et le transport par diffusion de la SA au sein de la matrice de polymère et la structure de pores aqueux <sup>[70]</sup>. La dégradation se réfère au processus par lequel les chaînes du polymère sont hydrolysées pour former des oligomères et les monomères. Le terme «érosion» se réfère à la perte de masse due à la diffusion des petits oligomères et des monomères de la matrice polymérique qui sont solubles dans l'eau. Les définitions de la dégradation et de l'érosion sont les mêmes que celles données par Göpferich <sup>[90]</sup> et ont été largement adoptées dans la littérature. Pour les polyesters biodégradables tels que le PLGA, la libération d'agents thérapeutiques se produit par une combinaison de dégradation et d'érosion du polymère et du transport de SA, et est classée comme étant à érosion contrôlée. Ashlee N. Ford Versypt *et al.* ont cité dans leur revue trois mécanismes <sup>[91]</sup>: la dégradation du PLGA, l'érosion, et le transport de SA. Le couplage entre les trois phénomènes est important pour comprendre comment l'un des trois peut être dominant ou associé aux autres dans des conditions différentes. Le mécanisme de dégradation autocatalytique peut accélérer la dégradation et l'érosion dans le centre des MP et améliorer le transport qui dépend de la taille de la SA.

- **Dégradation du PLGA** : le PLGA est un polyester qui est dégradé en présence d'eau. La réaction d'hydrolyse permet le clivage des liaisons esters de la chaîne polymérique. La réaction peut être catalysée par des acides et des bases, mais les données expérimentales suggèrent que seul le mécanisme catalysé par les acides est pertinent <sup>[92,93,94]</sup>. La source du catalyseur acide peut être externe à partir d'un acide fort dans le milieu (réaction non-

autocatalytique) ou interne des groupes terminaux d'acides carboxyliques des chaînes de polymère (réaction autocatalytique).

- Érosion du PLGA : l'érosion du polymère est classée comme étant une érosion de surface ou érosion de masse. Pour l'érosion en surface, la vitesse de dégradation du polymère à la surface est plus rapide que la vitesse de pénétration de l'eau à partir de fluides corporels *in vivo* ou à partir du milieu de libération *in vitro* dans la masse du polymère. Les polymères ayant une érosion en surface s'érodent de la surface vers l'intérieur. Les polymères ayant une érosion masse présentent un taux de pénétration de l'eau plus rapide que le taux de dégradation du polymère. La dégradation et l'érosion dans les polymères ayant une érosion en masse se produit dans toute la masse du polymère. Le PLGA est un polymère qui subit une hydratation qui est de l'ordre de quelques minutes par rapport à la dégradation qui peut durer de quelques semaines à quelques mois. L'hydratation conduit à une hydrolyse du polymère qui génère des acides de chaînes courtes et en raison de leur concentration, ils diffusent dans l'environnement environnant, où ils sont neutralisés. Cependant, le transport de masse par diffusion est généralement lent et la vitesse à laquelle les acides sont générés peut être supérieure à la vitesse à laquelle ils sont neutralisés, ce qui entraîne des chutes dans le micro-pH à l'intérieur des MP.
- Transport de la substance active : la libération contrôlée des SA à partir de MP de PLGA dépend des propriétés de transport de la molécule et de l'état dynamique du polymère dégradé. La molécule dans des MP de PLGA peut être libérée par une combinaison de diffusion à travers la matrice de polymère, diffusion à travers les pores aqueux, et avec la dissolution du polymère. La diffusion à travers la matrice de polymère dense est possible mais limitée à de petites molécules hydrophobes étant donné que la matrice de PLGA est hydrophobe. Pour les molécules très solubles dans l'eau et les macromolécules telles que les protéines et les peptides, la diffusion à travers les pores aqueux est le mode de transport dominant. La dissolution de la matrice polymérique pour libérer la SA sans transport de masse est typique des polymères qui subissent une érosion de surface plutôt que des polymères

ayant une érosion de masse. Les transports de SA augmentent rapidement, une fois que les pores sont suffisamment développés et leur taille soit plus grande que la taille de la SA.

## **OBJECTIF DU TRAVAIL**

L'objectif général de cette étude était d'obtenir un aperçu sur les mécanismes de transport de masse sous-jacents qui contrôlent la libération de SA à partir de MP à base de PLGA.

L'objectif spécifique était de :

- Préparer des MP de PLGA chargées en prilocaïne tout en variant la charge initiale de 1 % à 50 %.
- Caractériser les changements dans les propriétés dès lors de l'augmentation de la charge initiale en SA de 1% à 50 %, conduisant à des profils de libération mono-, bi-, et tri-phasique (tout en gardant tous les autres facteurs constants).
- Elucider des mécanismes de libération.

# **PARTIE EXPERIMENTALE**

## **I. MATERIELS ET METHODES**

### **I.1. MATERIELS**

L'acide poly(D,L lactique-co-glycolique) (PLGA, Resomer RG 504H, 50:50 acide lactique: acide glycolique, terminaison acide, viscosité inhérente d'une solution à 0,1 % dans le chloroforme à 25 °C= 0,16-0,24 et 0,45-0,60 dl/g selon le fournisseur ; Boehringer Ingelheim, Ingelheim, Allemagne), prilocaïne (base libre) (BASF ; Ludwigshafen ; Allemagne), acétonitrile et dichlorométhane (VWR ; Fontenoy-sous-Bois ; France), THF (grade CLHP ; Fisher Scientific ; Illkirch ; France), alcool polyvinylique (Mowiol 4-88 ; Sigma-Aldrich).

### **I.2. METHODES**

#### **I.2.1. Préparation des microparticules**

Des MP non-poreuses de PLGA encapsulant la prilocaïne base libre ont été préparées par une simple émulsion huile-dans-eau (H/E) en utilisant une technique d'extraction et d'évaporation du solvant : 46mg de prilocaïne et 1 g de PLGA 504 H ont été dissouts dans 7 ml de dichlorométhane. Cette phase organique a été émulsionnée dans 2,5 L d'une solution aqueuse contenant 0,25 % (m/v) d'alcool polyvinylique pendant 30 minutes sous agitation avec une hélice à trois pales à 2000 tours/minute. Les MP obtenues ont été durcies par addition de 2,5 L d'une solution aqueuse externe de l'APV à 0,25 %, sous agitation à 700 tours/minute pendant 4 heures. Les particules ont été récupérées par filtration et ensuite lyophilisées pour minimiser leur teneur en solvant résiduel. Le taux de chargement théorique en SA varie de 1 % (10,46 mg de prilocaïne et 1,035 g de PLGA) à 50 % (523 mg de prilocaïne et 523 mg de PLGA). La phase organique a été optimisée en gardant la même viscosité (quantité de polymère : volume de dichlorométhane) dans les différentes formulations.

### **I.2.2. Mesure de la stabilité de la prilocaïne**

Une quantité connue de prilocaïne (base libre) a été exposée à 100 ml de tampon phosphate pH= 7,4 (USP 32) dans des flacons en verre, placés à 37 °C sous agitation à 80 tours/min (GFL 3033 ; Gesellschaft fuer Labortechnik, Burgwedel ; Allemagne). Toutes les 24 heures, un échantillon est prélevé, filtré (filtre seringue PTFE ; 0,45 µm), et analysé par CLHP (pompe Prostar 210 ; échantillonneur automatique 410 ; détecteur UV-Visible 325 ; Logiciel Galaxie ; Varian ; Les Ulis, France). Une colonne C18 phase inverse (Gemini 5 µm, 110 Å, 150 mm x 4,6 mm ; Phenomenex, Le Pecq ; France) est utilisée. La phase mobile est un mélange d'acétonitrile : tampon phosphate pH=8 (Pharm. Euro. 7) (40/60, v/v), respectivement, pompée à un débit de 1 ml/min. cinquante microlitres d'échantillon sont injectés, et la longueur d'onde utilisée était de 260 nm.

### **I.2.3 Mesure de la taille des microparticules**

La taille des MP a été déterminée par microscopie optique. Les photos ont été prises à l'aide d'un microscope Axiovision ZEISS Scope-A1 en utilisant une caméra Carl ZEISS Microimaging GmbH, Gottingen, Allemagne). Chaque mesure inclut 200 particules (résultat exprimé en moyenne ± écart-type).

### **I.2.4. Détermination de la teneur réelle en substance active**

Le taux de chargement réel des MP est déterminé en dissolvant une quantité bien précise de MP dans de l'acétonitrile. Les échantillons sont, par la suite, filtrés (filtre seringue PTFE 0,45 µm) et analysés par CLHP (comme décrit dans la section II.2) mais seulement 20 µl d'échantillon sont injectés. Mesure effectuée en tripliquée.

### **I.2.5. Étude de la libération de substance active *in vitro***

Cinquante milligrammes de MP chargées en SA ont été placées dans des tubes en verre et exposées à 10 ml de tampon phosphate pH= 7,4 (USP 32). La libération de la SA a été mesurée à 37 °C, sous agitation (80 tours/min). À des intervalles de temps prédéterminés, 2 ml d'échantillon ont été prélevés et remplacés par un milieu frais. Les échantillons ont été filtrés, en utilisant des filtres seringues PTFE 0,45 µm et analysés par CLHP. Chaque expérience a été tripliquée (n=3). Les conditions Sink parfaites ont été respectées durant toute l'expérimentation.

### **I.2.6. Chromatographie par perméation de gel**

La diminution du poids moléculaire du PLGA a été caractérisée par CPG (pompe Prostar 230 ; échantillonneur automatique 410 ; détecteur infrarouge 365-LC ; Varian ; Les Ulis ; France). Une colonne (PLgel 5  $\mu$ m MIXED-D ; 7,5 x 300 mm ; Polymer Laboratories ; Varian ; Les Ulis ; France) a été utilisée et chauffée à 35 °C. Le THF a été utilisé comme phase mobile à un débit de 1 ml/min. Une quantité connue de MP a été placée dans 10 ml de tampon phosphate pH= 7,4 dans des tubes en verre et incubée à 37 °C, sous agitation (80 tours/min). Les échantillons sont retirés à des intervalles de temps prédéterminés, filtrés et lyophilisés. Les échantillons à analyser sont préparés par dissolution de 3 mg de MP lyophilisées dans le THF. Cinquante microlitres ont été injectés. Le poids moléculaire a été calculé en utilisant le logiciel Cirrus CPG (Polymer Laboratories) et calibré par une série de standards de polystyrène (Polymer Laboratories).

### **I.2.7. Calorimétrie différentielle à balayage**

La température de transition vitreuse ( $T_g$ ) du polymère a été mesurée en utilisant la calorimétrie différentielle à balayage (DSC1 Star System ; Mettler Toledo ; Greinfensee ; Suisse). Approximativement, 3 mg de MP ont été chauffées dans des mini-coupelles percées et scellées à 100 °C, à une vitesse de 10 °C/min. La même expérience a été effectuée avec des MP incubées pendant 48 heures dans du tampon phosphate pH= 7,4 à 37 °C, sous agitation, pour évaluer l'effet plastifiant de l'eau sur le PLGA. 3 mg de MP sont chauffés dans des coupelles non percées. Dans les deux cas, la  $T_g$  a été déterminée au cours du deuxième cycle de chauffage.

### **I.2.8. Diffraction des rayons-X**

Cette expérience a été réalisée à l'aide d'un diffractomètre Pro Panalytical X'pert ( $\lambda$  Cu, K  $\alpha$  = 1.54 Å) dans la géométrie de  $\Theta$ - $\Theta$  de Bragg-Brentano (PANalytical ; Almelo ; Pays-Bas) pour étudier l'état physique de la SA, du polymère ainsi que les MP chargées en SA.

### **I.2.9. Microscopie électronique à balayage**

La forme, la morphologie interne et externe des MP ont été étudiées à l'aide d'un microscope électronique à balayage (S-4000 ; Hitachi High-Technologies

Europe ; Kiefeld ; Allemagne). Les échantillons, avant et après 48 heures d'exposition au tampon phosphate pH=7,4, ont été fixés sur un porte-échantillon avec un ruban adhésif de carbone double face et recouvert d'une fine couche de carbone. Des coupes transversales ont été obtenues après inclusion des MP exposées dans une colle à base d'eau et coupées à l'aide d'une lame de rasoir.

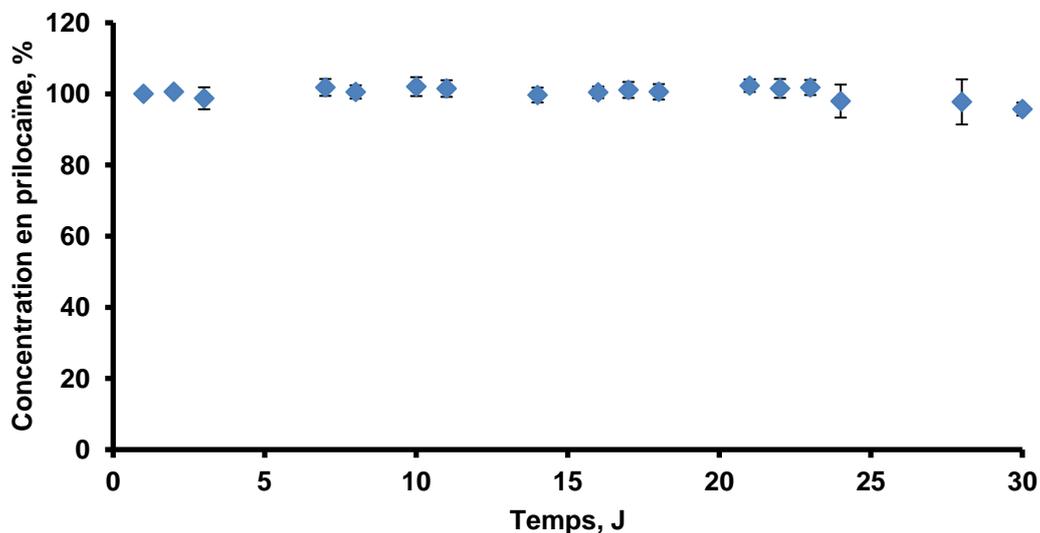
#### **I.2.10. Test de gonflement**

Des petites quantités de MP chargées de prilocaïne de 1 %, 20 % et 50 % ont été introduites dans une plaque de 96 puits. Cent microlitres de tampon phosphate pH 7,4 ont été ajoutés. La plaque est incubée à 37 °C, mise sous agitation à 80 tours/min. La plaque est couverte de Parafilm afin de minimiser l'évaporation du solvant. À des intervalles de temps prédéterminés, des photos ont été prises à l'aide d'un microscope Axiovision Zeiss (Carl ZEISS, Göttingen, Allemagne) en utilisant une caméra AxioCam ICc1 (Carl Zeiss, Léna, Allemagne). Le diamètre de trois MP a été mesuré (une petite, une moyenne, et une grande). Les mesures ont été comparées au diamètre initial des microparticules avant incubation dans le tampon phosphate pH 7,4.

## II. RESULTATS ET DISCUSSION

### II.1. Stabilité de la prilocaïne

La **figure 8** présente les résultats de l'essai de stabilité réalisé avec de la prilocaïne base libre dans du tampon phosphate pH 7,4 (qui est utilisé comme milieu pour les études de dissolution) à 37 °C. La stabilité est indiquée en pourcentage par rapport à la concentration de départ, qui est fixée à 100 %. Elle montre que la concentration de prilocaïne en solution de tampon phosphate reste stable pendant toute la durée de l'étude de libération *in vitro*, au moins 30 jours. Ainsi, la prilocaïne ne se dégrade pas pendant le test de dissolution.



**Figure 8:** Figure montrant la stabilité de la prilocaïne dans le tampon phosphate pH 7,4 à 37 °C reportée en % dosé par rapport à la concentration de départ.

### II.2. Taille, morphologie des microparticules et efficacité d'encapsulation

La SA modèle utilisée dans cette étude est la prilocaïne base libre. Elle est peu soluble dans l'eau selon les données de la pharmacopée européenne. Elle est encapsulée dans du PLGA 504 H de haut poids moléculaire par une simple émulsion type huile-dans-eau (H/E) tout en gardant les autres paramètres constant pour les différents lots. La vitesse d'agitation était à 2000 tours/minute, la concentration en tensio-actif était à 0,25 % (m/v), le volume de la phase aqueuse, ainsi que le temps

global de la manipulation étaient constants. Le seul paramètre qui varie était la viscosité de la phase organique en adaptant le volume de dichlorométhane rajouté par rapport à la quantité de polymère utilisée dans chaque formulation. Le but était d'obtenir une même gamme de taille. Les MP obtenues et observées au microscope optique étaient bien sphériques, lisses, et non-poreuses (ce qui a été confirmé par MEB (résultats mentionnés dans la section microscopie électronique à balayage). En outre, le taux de chargement de la prilocaïne n'a eu aucun effet sur la morphologie de surface des MP formées. La taille des microparticules obtenues varie de 20 à 170  $\mu\text{m}$  (**tableau 1**).

Le pourcentage de l'efficacité d'encapsulation de la prilocaïne ainsi que le taux de chargement réel de toutes les formulations sont présentés dans le **tableau 1**. Les taux de chargement réels sont inférieurs aux taux de chargement théoriques, cela est dû au passage de la SA dans le milieu aqueux au cours de l'émulsification et l'étape d'évaporation du solvant organique. Une solubilité élevée dans la phase externe peut conduire à une augmentation des pertes de la SA lors de la préparation des MP [31,32].

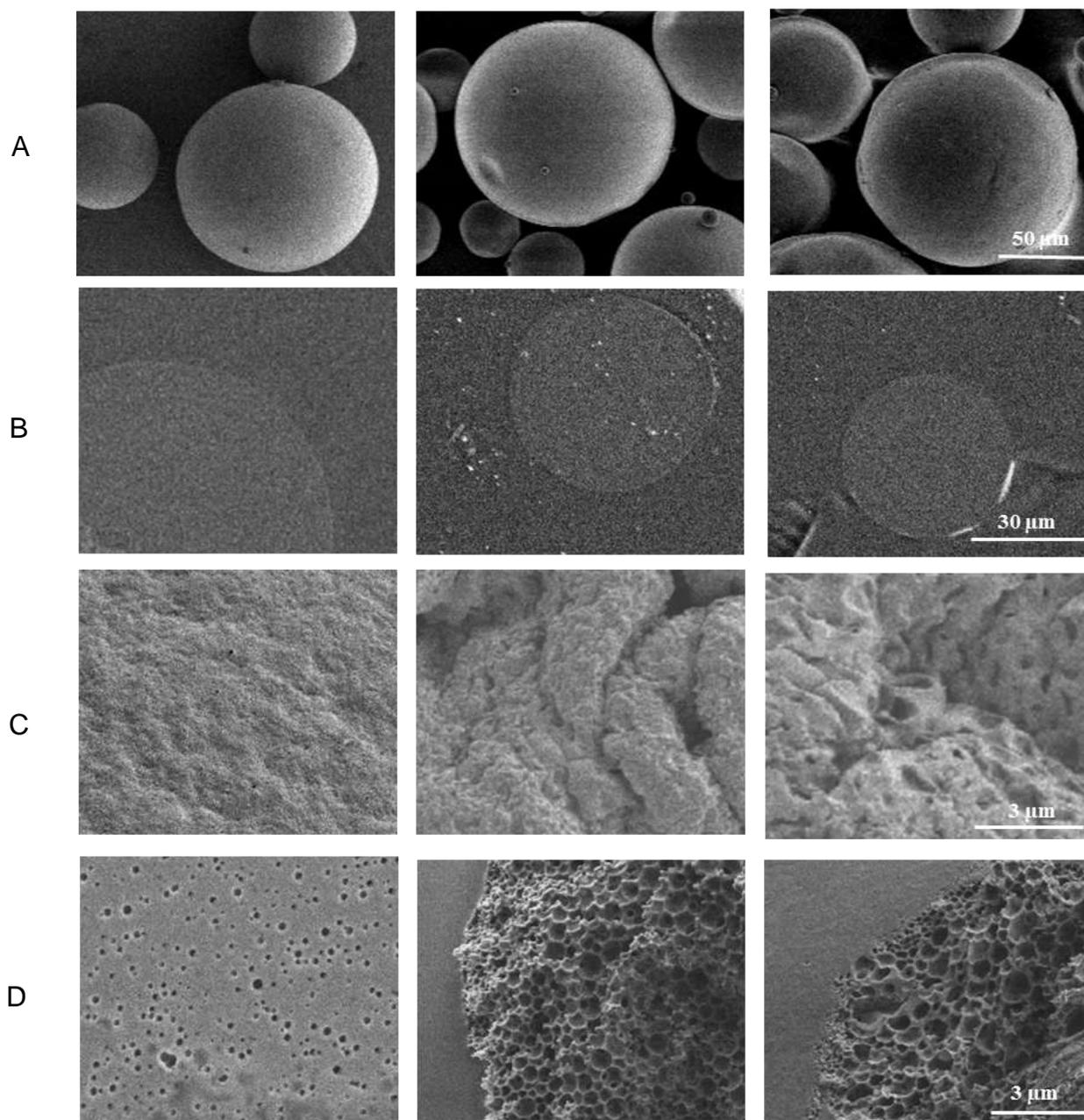
**Tableau 1: Les caractéristiques des différentes formulations de microparticules chargées en prilocaïne.**

Taux de chargement théorique (%)	Poids polymère (mg)	Volume $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (ml)	Taille moyenne $\pm \sigma$ ( $\mu\text{m}$ )	Taux de chargement réel (%)	Efficacité d'encapsulation (%)
1%	1035,0	8,1	87 $\pm$ 30	0,6	55,0
3%	1015,1	8,0	89 $\pm$ 30	2,1	69,0
7%	978,5	7,7	89 $\pm$ 34	4,6	69,0
10%	951,6	7,6	89 $\pm$ 25	7,0	70,0
15%	877,1	7,0	85 $\pm$ 34	11,0	72,0
20%	804,6	6,4	89 $\pm$ 27	16,0	69,0
30%	698,9	5,5	81 $\pm$ 27	23,4	70,0
40%	625,5	5,0	82 $\pm$ 24	29,0	71,5
50%	518,8	4,1	82 $\pm$ 31	35,0	69,0

### II.3. Microscopie électronique à balayage

La figure 9 montre des images de MEB des MP à base de PLGA à différents taux de chargement initial (1 %, 20 %, et 50 %), respectivement. Les images ont été prises pour des MP avant incubation dans le tampon phosphate (A, B) et des MP après 48 h d'incubation dans du tampon phosphate (B, C). La figure (9A) montre une surface lisse de ces dernières. Aucun cristal de prilocaïne non encapsulée n'a été mis en évidence en surface. Ainsi, l'effet « burst » observé dans les profils de libération (représentés ultérieurement dans la section II.6) ne peut être attribué ni à la prilocaïne non encapsulée, ni à la libération de la SA à travers des « macropores » à la surface des MP dont la taille est  $> 100 \mu\text{m}$  [73]. L'absence de ces derniers est confirmée par des coupes transversales (Figure 9B). Wang *et al.* ont montré que l'effet « burst » observé avec leur système de MP de PLGA chargées d'octréotide acétate peut probablement être attribué à des pores dont la taille est de 0,1 à 1  $\mu\text{m}$ . Ils sont présents à la surface avant incubation dans le milieu de libération. D'après cette étude, on peut conclure que l'absence de macropores visibles à la surface lisse des MP n'exclut pas l'absence de nanopores qui ne sont pas visibles avec la technique appliquée. Notre système est peut être similaire à celui de Wang [57].

La figure (9C) montre l'apparition de pores qui sont devenus de plus en plus visibles, et leur nombre augmente avec l'augmentation du taux de chargement initial en SA. Cela est confirmé par des coupes transversales qui ont été effectuées sur des MP après 48 h d'exposition au tampon phosphate pH 7,4 (Figure 9D). De toute évidence, les MP sont devenues beaucoup plus poreuses comparativement à leur état initial. Cela pourrait être dû à la dégradation hydrolytique du polymère qui est accélérée par la nature basique de la SA.

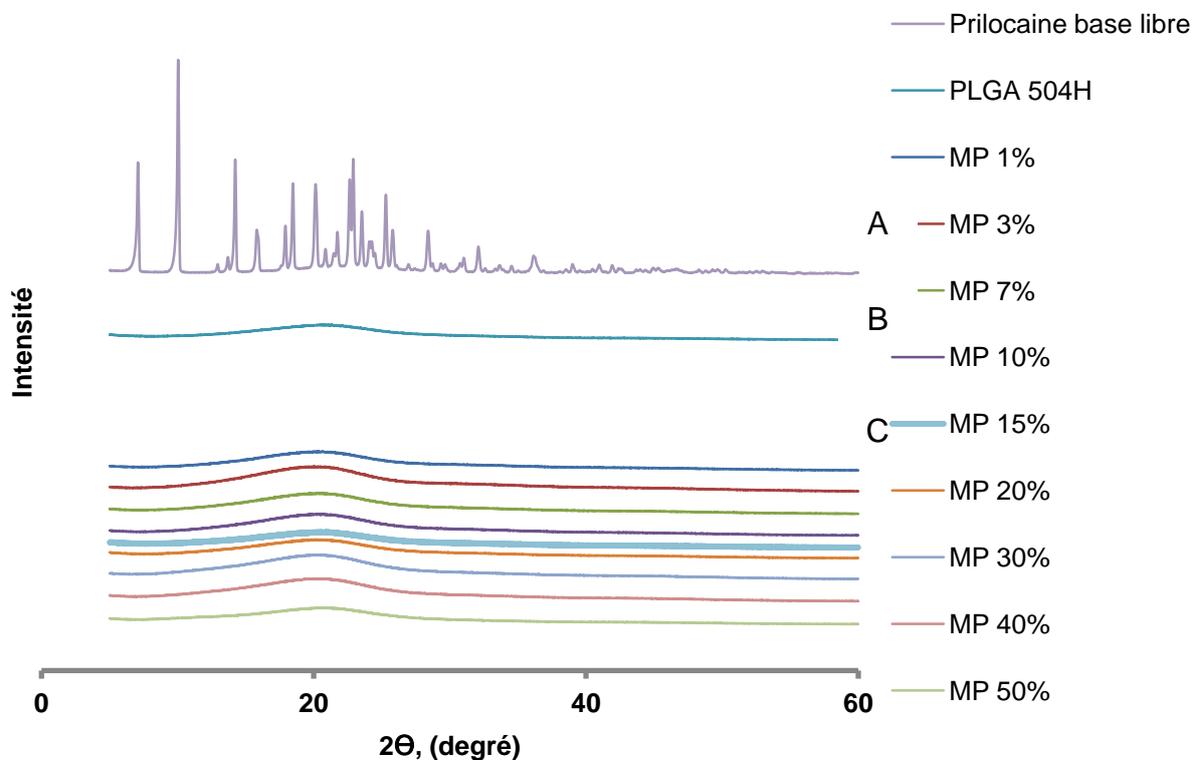


**Figure 9:** Images MEB des MP à base de PLGA chargées en prilocaïne base libre (1%, 20%, et 50%), respectivement, avant (A) et après 48h d'exposition (C) au tampon phosphate pH 7,4 ainsi que des coupes transversales (B, D).

#### II.4. Diffraction des rayons-X

Les résultats de la diffraction des rayons X de la prilocaïne base libre présentent des pics nets qui indiquent son état cristallin (**Figure 10A**). En revanche, l'absence de pics nets pour le PLGA 504H confirme son état amorphe (**Figure 10B**). Les MP

avec un taux de chargement initial en prilocaïne variant de 1 % à 50 % ne montrent aucun pic de diffraction des rayons X. Cela indique que la prilocaïne est entièrement dissoute ou dissoute et dispersée à l'état amorphe dans la matrice polymérique quel que soit le taux de chargement initial (**Figure 10C**). Cela montre qu'il y a une modification de l'état cristallin de la prilocaïne. Il a été rapporté dans la littérature que certaines SA ont leur état physique de départ qui est modifié une fois incorporées dans des MP à base de PLGA. Par exemple, l'acyclovir conserve son état cristallin lorsqu'il est encapsulé dans des MP à base de PLGA. En revanche, l'encapsulation de l'ibuprofène dans des MP de PLGA a également conduit à l'amorphisation de ce dernier, alors qu'il était à l'état cristallin au départ <sup>[95,96]</sup>.



**Figure 10:** DRX de la prilocaïne base libre (A), du PLGA 504H pur (B), et des MP avec des taux de chargement de 1 % à 50 % en prilocaïne (C).

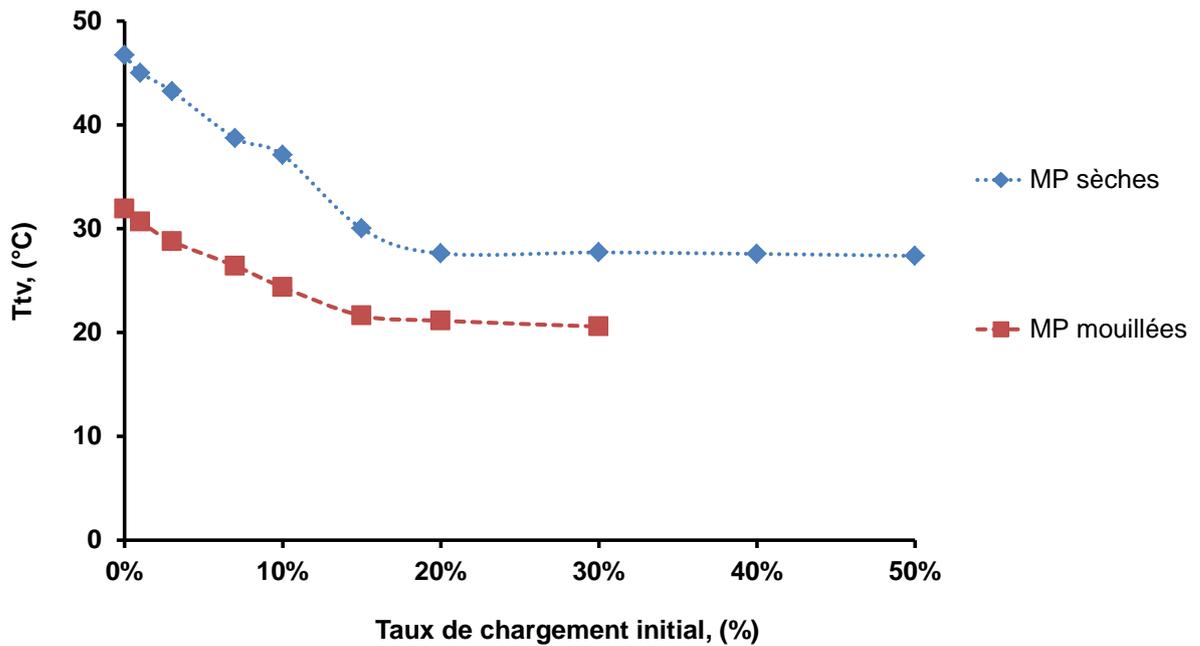
## II.5. Calorimétrie différentielle à balayage

La température de transition vitreuse du polymère et son évolution au cours de la libération de SA est un paramètre très important pour l'élucidation des mécanismes de libération à partir de système à libération contrôlée. La température de transition

vitreuse est déterminée par calorimétrie différentielle à balayage durant le deuxième cycle de chauffage. Si le polymère est à l'état vitreux ( $T < T_g$ ), la mobilité des molécules est faible, par conséquent, le taux de SA qui diffuse à travers la matrice polymérique est faible aussi <sup>[16]</sup>. En revanche, si le polymère est à l'état caoutchouteux ( $T > T_g$ ), les molécules sont beaucoup plus mobiles et le coefficient de diffusion de la SA qui en résulte va augmenter comparativement à l'état vitreux <sup>[72]</sup>. La diffusion des molécules à travers la matrice polymérique peut être le seul mécanisme de transport, ou combinée à la diffusion de la SA à travers les pores remplis d'eau. La température de transition vitreuse du PLGA 504H, des MP exemptes de SA et des MP chargées en prilocaïne à différents taux de chargement, avant et après 48 h d'exposition au milieu de libération, a été déterminée par calorimétrie différentielle à balayage. Aucune réaction endothermique n'a été observée pendant le premier cycle de chauffage indiquant que la prilocaïne est présente à l'état amorphe et/ou dissous dans la matrice polymérique. En outre, aucun phénomène de cristallisation n'a été observé au cours du deuxième cycle de chauffage. Cette hypothèse a été confirmée par diffraction des rayons X (**Figure 10C**). **La figure 11** montre l'évolution de la  $T_g$  du polymère dans les MP avant et après 48 h d'exposition au milieu de libération, tandis que le **tableau 3** rapporte les valeurs de la  $T_g$  déterminée sur le deuxième cycle de chauffage. La  $T_g$  du PLGA pur a une valeur d'environ 47,5 °C. Comme on peut le voir, pour les MP avant exposition au milieu de libération, la  $T_g$  du polymère diminue progressivement en augmentant le taux de chargement initial. Cela montre que la prilocaïne est plastifiant pour le polymère. L'effet maximal a été observé avec les MP dosées à 20 % en prilocaïne et au-dessus de ce taux de chargement, la valeur de la  $T_g$  reste constante aux alentours de 27 °C. Ceci est en accord avec ce qui a été rapporté dans la littérature sur d'autres types de SA qui agissent comme plastifiant pour ce polymère <sup>[97]</sup>.

**Le tableau 3** montre que la  $T_g$  du polymère pour les MP chargées de 15 % à 50 % de prilocaïne est inférieure à la température utilisée pour l'étude (37°C). Ainsi, le polymère est à l'état caoutchouteux, permettant des vitesses de diffusion de la SA à partir de la matrice relativement élevées. Cela est associé aussi à l'augmentation du taux de chargement. Pour les MP ayant un taux de chargement variant de 1 % à 10 %, le polymère ont une  $T_g$  du PLGA qui est au-dessus de 37 °C, ce qui signifie que le polymère est à l'état vitreux. En ce qui concerne les MP incubées pendant 48 h

dans du tampon phosphate, la Tg est au-dessous de 37 °C quel que soit le taux de chargement initial. Cela montre clairement l'importance de l'eau agissant comme un plastifiant <sup>[98,99]</sup> (**Figure 11**).



**Figure 11:** Evolution de la température de transition vitreuse des MP sèches, ainsi que des MP incubées dans le PBS pH 7,4, déterminée par calorimétrie différentielle à balayage durant le deuxième cycle de chauffage.

**Tableau 2: La Tg du PLGA dans des MP sèches et incubées pendant 48 h dans du tampon phosphate pH 7,4.**

Taux de chargement (%)	Tg des MP sèches (°C)	Tg des MP incubées pendant 48 h dans le tampon phosphate pH 7,4 (°C)
0%	46,72	31,91
1%	45,00	30,67
3%	43,24	28,77
7%	38,72	26,40
10%	37,09	24,36
15%	30,02	21,62
20%	27,61	21,13
30%	27,71	20,57
40%	27,56	ND
50%	27,38	ND

## II.6. Étude de la libération de la substance active encapsulée

La figure 12 représente les cinétiques de libération de la prilocaïne en fonction du temps dans du tampon phosphate pH 7,4 à 37 °C à partir des MP à base de PLGA. Le taux de chargement théorique en SA varie de 1 % à 50 %. La figure 12A montre que les cinétiques de libération de SA à partir des MP chargées de 1 % à 15 % ont un profil tri-phasique <sup>[100,101,102]</sup>. Ce dernier représente l'un des profils les plus observés avec des MP de PLGA. Il est caractérisé par un effet « burst » qui augmente avec l'augmentation du taux de chargement initial en SA. Les pourcentages de prilocaïne libérés après 4 jours d'incubation dans le milieu de libération passent de 21 % à 56 % pour les MP avec un taux de chargement de 1 % à 15 %, respectivement. Les profils sont caractérisés par une phase initiale de libération rapide de la SA située près de la surface des MP à travers la matrice polymérique les 2 premiers jours, contrôlée par un phénomène de diffusion. Dans la deuxième phase, la SA est libérée lentement par un processus de diffusion à travers la matrice polymérique ainsi que les pores remplis d'eau. Ces derniers apparaissent après incubation dans le tampon phosphate pH 7,4 à 37 °C (Figure 9c). Cette phase

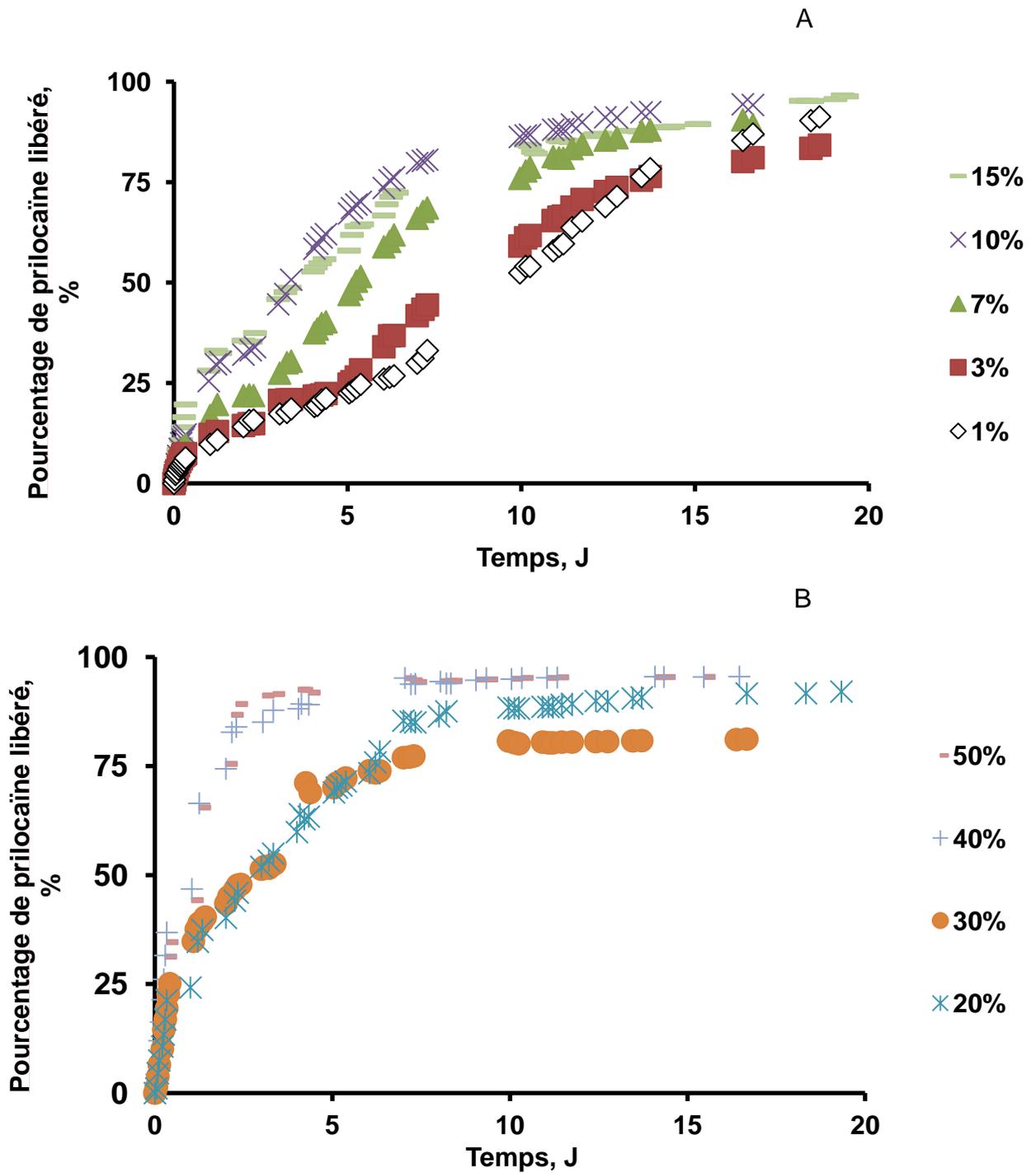
de 3 à 7 jours pour les MP chargées de 15 % et 1 % en prilocaïne, respectivement. La troisième phase est marquée par une augmentation progressive après 3 et 7 jours pour les MP à 15 % et 1 % de prilocaïne, respectivement. Elle correspond ainsi à l'érosion massive de la matrice polymérique. Cela aboutit à une libération accrue de la SA. **La figure 12b** représente les profils de libération des MP chargées de 20 % à 50 % en SA et montre des profils bi-phasiques caractérisés par deux phases distinctes. Les pourcentages de prilocaïne libérés après 4 jours d'incubation dans le milieu de libération passent de 70 % à 90 % pour les MP chargées de 20 % à 50 %, respectivement.

Les profils de libération de la prilocaïne à partir de MP de PLGA ont montré un changement dans la cinétique de libération en augmentant le taux de chargement initial en SA : non seulement la pente, mais aussi la forme des courbes de libération est modifiée en augmentant le taux de chargement en prilocaïne. Cela peut être expliqué par une augmentation du coefficient de diffusion de la SA, entraînant ainsi une augmentation de l'effet « burst » comme rapporté par Siepmann *et al.* pour les SA miscibles au PLGA <sup>[103]</sup>. Nous pouvons noter que plus le taux de chargement initial des MP est augmenté, plus l'effet «burst » se manifeste rapidement. Les MP dosées à 50 % en prilocaïne ont un profil bi-phasique avec un effet « burst » qui se manifeste plutôt que pour les MP chargées à 1 % en prilocaïne. Ceci pourrait être expliqué de trois façons :

- 1- Tout d'abord, la connaissance de l'état physique du polymère est d'une importance majeure pour l'étude des mécanismes de libération de la SA. L'analyse par calorimétrie différentielle à balayage (**Figure 11**) a montré que la température de transition vitreuse du polymère a chuté de façon significative par rapport à sa valeur initiale. Elle a atteint une température inférieure à la température du polymère après incubation des MP dans le tampon phosphate pour l'étude de la libération (37 °C, température corporelle). Par conséquent, les MP ayant un taux de chargement supérieur (à partir de 20 %) sont à l'état caoutchouteux au début de la libération. Cela signifie que la diffusion de la SA et du milieu d'incubation à travers la matrice polymérique est beaucoup plus rapide que lorsque le polymère est à l'état vitreux (comme pour les MP chargées de 1 % à 15 %). De plus, lors de l'exposition au milieu de la libération, ce dernier diffuse dans le système,

agissant ainsi comme un plastifiant pour le PLGA. Comme ça a été montré précédemment, la Tg décroît pour atteindre des valeurs inférieures à 37 °C [73,104]. Cette différence fondamentale dans l'état physique du polymère explique la différence significative observée dans les profils de libération de la SA.

- 2- D'autre part, le fait que la prilocaïne soit chargée positivement à pH 7,4 signifie qu'il y a une présence de protons. Ceci peut être la cause d'une autocatalyse accélérée des liaisons esters du polymère [105,86,106]. Il a été rapporté que le pH du micro-environnement des MP varie considérablement en raison de l'accumulation d'oligomères d'acide suite à la dégradation du PLGA [86]. La dégradation accélérée du polymère a bien été confirmée par les résultats de CPG (résultats présentés dans la section II.7). De toute évidence, la **Figure 9c** montre une porosité interne assez élevée, ce qui confirme l'importance de la croissance de l'effet auto-catalytique avec l'augmentation du taux de chargement initial.
  
- 3- Enfin, il y a aussi l'influence du taux de chargement initial en SA. A des taux de chargement élevés, la longueur des chemins de diffusion est plus courte pour les molécules situées près de la surface des MP. La libération de la SA dans les couches externes conduit à la formation de pores rendant les régions internes plus accessibles [107]. Un cas similaire a été rapporté par Chen et Shingh concernant l'encapsulation de la testostérone dans un système formant un gel *in situ* à base de PLGA. Les auteurs ont rapporté que l'augmentation du taux de chargement initial fournit des voies simples, une tortuosité inférieure, et une plus grande porosité ce qui facilite la diffusion et la circulation du milieu dans la matrice polymérique [108].



**Figure 12:** Comparaison des profils de libération de la prilocaïne à partir des MP ayant des taux de chargement théoriques de 1 %, 3 %, 7 %, 10 %, 15 % (A) et celles à 20 %, 30 %, 40 %, et 50 % (B), respectivement.

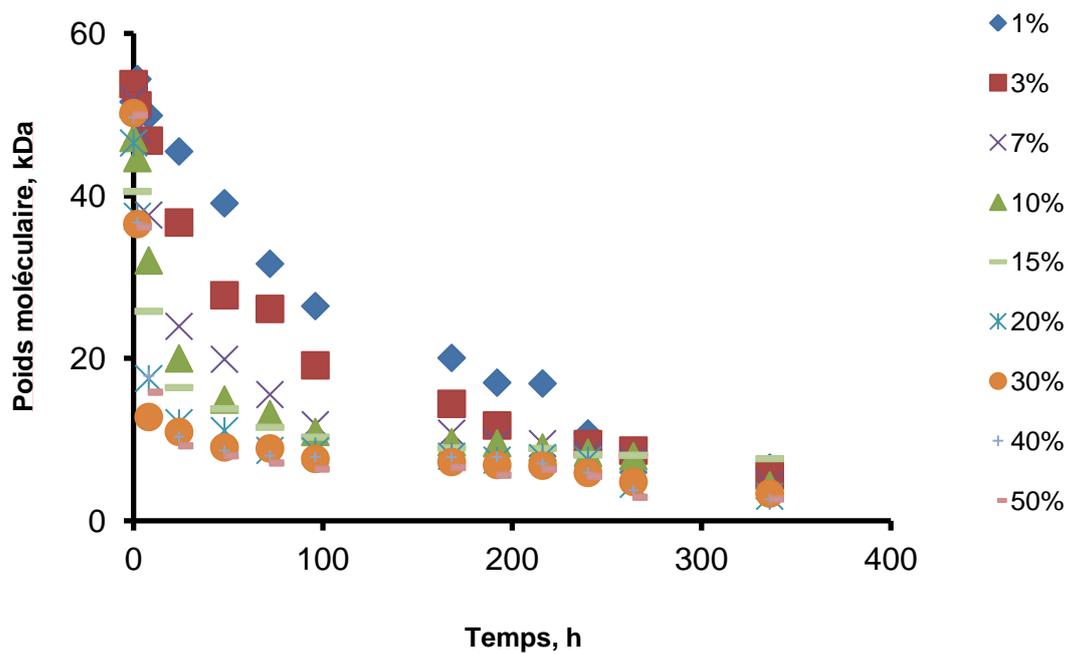
## II.7. Chromatographie par perméation de gel

La **figure 13** montre que la diminution du poids moléculaire du PLGA est accélérée par la présence de la prilocaïne. Le poids moléculaire du PLGA pur obtenu est de 54,5 kDa. Une diminution du poids moléculaire du PLGA a été observée après 48h d'incubation dans le milieu de libération pH 7,4 à 37 °C. Il diminue à 39 kDa et jusqu'à 15 kDa pour les MP ayant un taux initial en prilocaïne qui varie de 1 % à 15 %, respectivement. En revanche une diminution drastique a été observée pour les MP ayant un taux de chargement initial variant de 20 % à 50 % (de 11 à 8 kDa, respectivement). Ceci peut être expliqué par la nature basique de la prilocaïne et le fait que le clivage des chaînes du PLGA est accéléré par l'hydrolyse des liaisons esters. La **figure 14** montre l'évolution du poids moléculaire du polymère en fonction du taux de chargement initial à des intervalles de temps prédéterminés. On remarque que le poids moléculaire du polymère baisse progressivement tout en augmentant le taux de chargement initial jusqu'à 15 %, et à partir de 20 %, l'évolution du poids moléculaire reste stable quel que soit le taux de chargement. Ceci est en accord avec les résultats de la Tg obtenue par calorimétrie différentielle à balayage.

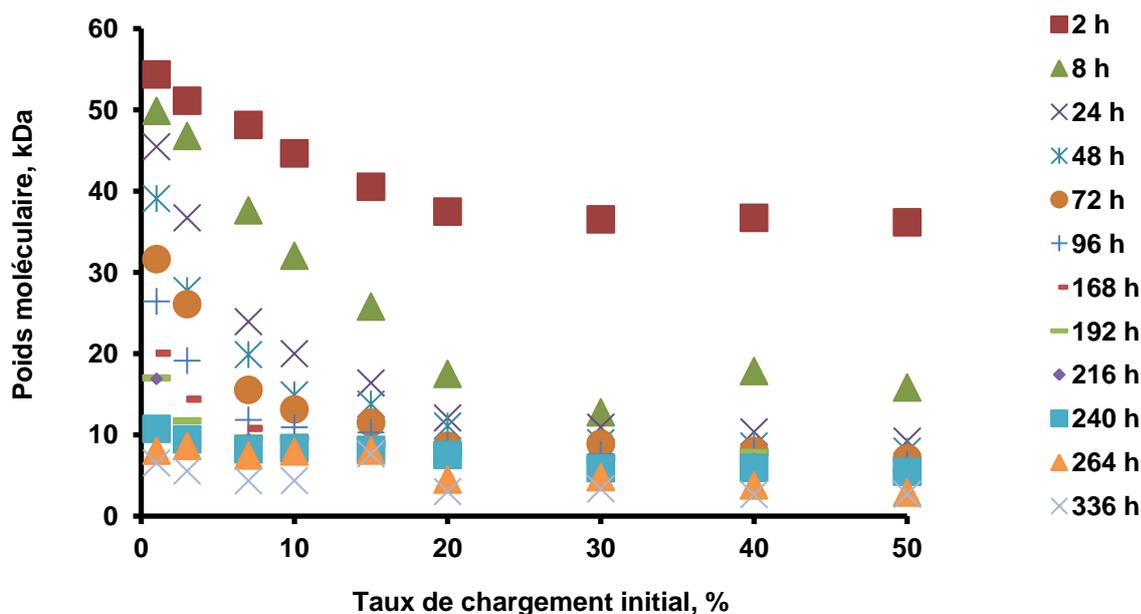
La différence observée dans la cinétique de dégradation du polymère a des conséquences importantes sur le mécanisme de libération de la SA : plus le poids moléculaire du polymère est diminué, plus le degré d'enchevêtrement des chaînes polymériques diminue, et par conséquent, la mobilité des molécules augmente. Selon la théorie du volume libre de diffusion, cela se traduit par une augmentation du coefficient de diffusion de la SA, et par conséquent, une augmentation des taux libérés. En outre, les modifications de la température de transition vitreuse du polymère (**tableau 3**) lors de l'exposition des MP dans le milieu de libération reflètent la dégradation du PLGA : la connaissance de l'état physique initial de la matrice (état vitreux ou caoutchouteux) est d'une importance majeure pour l'étude des mécanismes de libération de la SA. Avec la diminution du poids moléculaire du polymère, le degré d'enchevêtrement des chaînes de polymère diminue, la mobilité des macromolécules augmente et par conséquent, la Tg décroît. Lors de l'exposition au milieu de libération, l'eau diffuse dans le système, agissant comme un plastifiant pour le PLGA. Comme montré précédemment, la Tg des MP exposées décroît de manière significative, pour atteindre des valeurs inférieures à 37 °C (température physiologique) <sup>[73]</sup>. Ainsi, l'état initial de la matrice était

caoutchouteux lors de la libération de la SA, ce qui permet des vitesses de diffusion beaucoup plus élevées qu'à l'état vitreux.

L'analyse CPG a révélé que les changements observés dans la libération de la SA sont bien corrélés avec la cinétique de dégradation du polymère, indiquant l'importance de la création d'un microclimat basique qui accélère l'hydrolyse de l'ester.



**Figure 13:** Effet du taux de chargement initial sur le poids moléculaire du PLGA après exposition des MP au tampon phosphate pH 7,4 à 37 °C.



**Figure 14:** Effet du taux de chargement initial sur le poids moléculaire de PLGA après exposition des MP au tampon phosphate pH 7,4 à 37 °C à différents intervalles de temps.

Les MP de PLGA sont connues pour être érodées en masse [83,109, 110,111,112,113,114]. La diffusion d'eau est plus rapide que la dégradation [115]. Les chaînes du polymère à l'intérieur de la matrice commencent à être clivées par hydrolyse [116,25,117,118,119,120]. L'eau pénètre dans la matrice et implique une scission des liaisons esters qui constituent le squelette du polymère. Etant un polyester, le PLGA est clivé en alcool et en acide à chaînes courtes. Siepmann et al. ont rapporté qu'en raison du gradient de concentrations, Les oligomères résultants diffusent dans et en dehors de la matrice, dans le liquide environnant. D'autre part, les bases à partir du milieu de libération (tampon phosphate pH 7,4) diffusent dans les MP (également en raison du gradient de concentration). Les deux types de procédés de transfert de masse conduisent à la neutralisation des acides générés. Cependant, les processus diffusionnels sont relativement lents. Ainsi, la vitesse à laquelle les acides sont générés dans le dispositif peut être supérieure à la vitesse à laquelle ils sont neutralisés. Cela est particulièrement vrai pour le centre des MP, car ici les chemins de diffusion sont les plus longs. Une chute subséquente dans le pH du microenvironnement conduit à une dégradation accélérée du PLGA parce que le clivage de la liaison ester est catalysée par des protons en raison des groupes carboxyles des oligomères générés. La dégradation peut aussi accélérer ou ralentir

le processus en fonction des interactions spécifiques (polymère/substance active)  
[121,122].

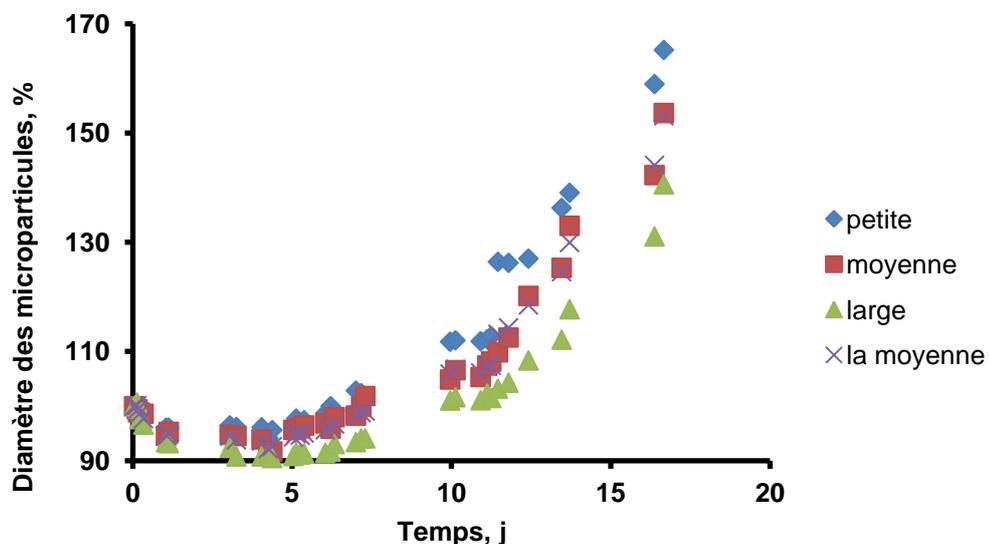
Actuellement, il est largement admis que le mécanisme de dégradation dépend également de la géométrie du dispositif. Von Burkersroda a défini une épaisseur critique qui détermine le mécanisme de dégradation : lorsque la longueur du dispositif est supérieure à l'épaisseur critique, l'érosion de surface se produit, alors que l'érosion de masse se déroule autrement [109]. Chen *et al.* ont montré que les produits de dégradation générés à l'intérieur de MP par voie autocatalytique accélèrent le processus de dégradation [91,106,123,124,125,]. Cela est dû à une quantité accrue de groupes acides carboxyliques terminaux, qui sont responsables de la dégradation plus rapide dans le centre du dispositif qu'à la surface. Ces études ont été réalisées sur des MP de PLGA en absence de toute SA. Le taux de chargement en SA peut avoir des effets importants sur le mécanisme de libération de la SA, ainsi que le mécanisme de dégradation de la matrice polymérique. Le taux de chargement en SA accélère la dégradation des MP [97,126,127,128]. Bittner *et al.* ont rapporté que le processus de dégradation peut être divisé en trois phases. Au cours de la première phase de décomposition du polymère, le poids moléculaire diminue sans variation observée de la masse du système. Pendant la deuxième phase, une perte de poids est observée, indiquant une libération des fragments de polymères solubles dans l'eau [129]. Après cela, au cours de la troisième phase, la diminution du poids moléculaire semble être ralentie. Une plus grande quantité de monomères et d'oligomères solubles est libérée. En conséquence, ces chaînes de bas poids moléculaire ne sont plus détectables et sont non disponibles pour les calculs des données de CPG [130].

## **II.8. Test de gonflement**

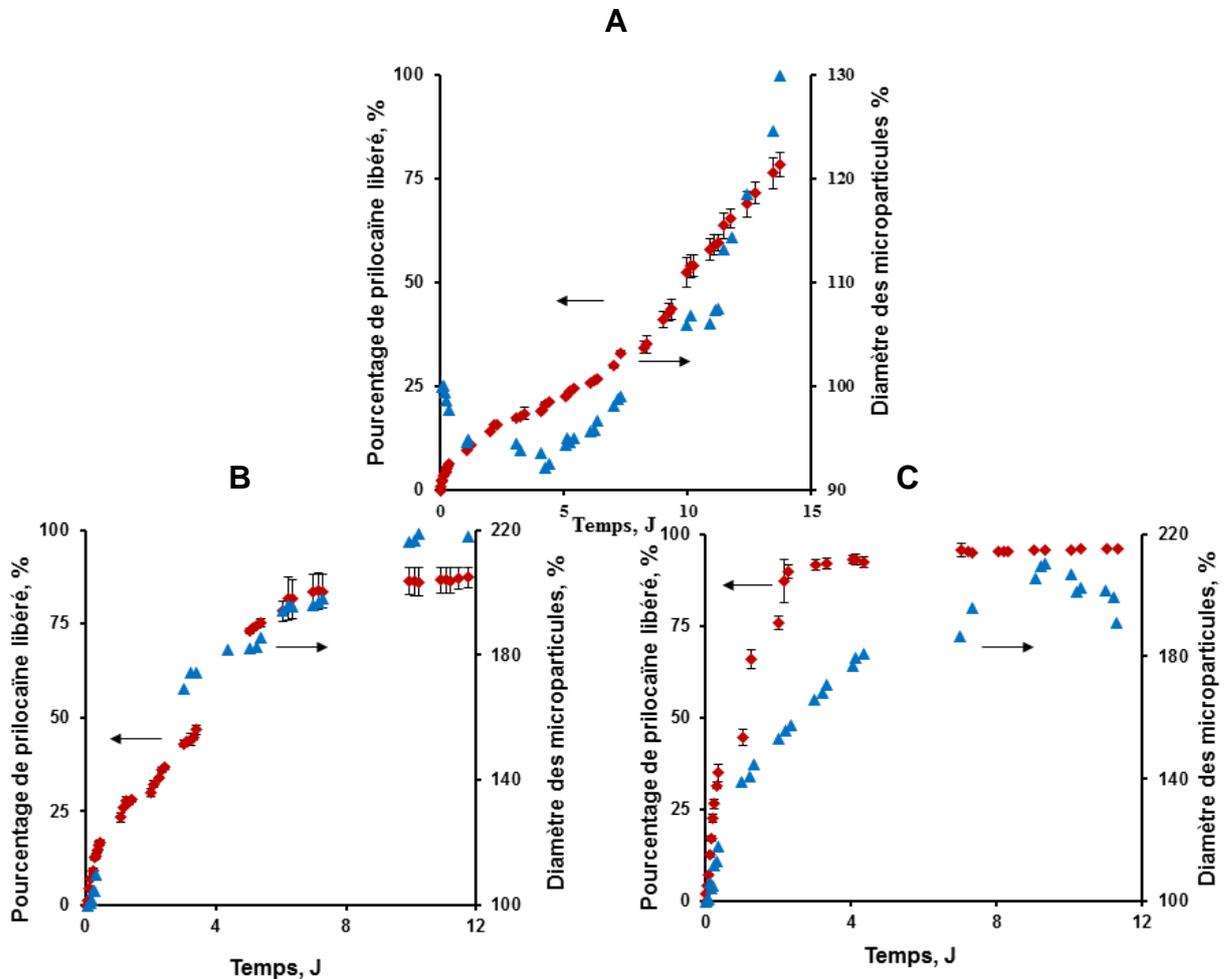
Ce test est réalisé pour mieux comprendre l'importance potentielle du gonflement lors d'une étude de libération de la SA encapsulée. En effet, ce phénomène est souvent négligé. En utilisant le microscope optique, des changements du diamètre des MP ont été contrôlés individuellement. Les résultats sont comparés aux mesures de libération de la SA de l'ensemble des MP. La libération de la SA à partir de l'ensemble des MP (environ 50 mg) a été mesurée dans un tampon phosphate pH 7,4 dans des flacons à 37 °C sous agitation horizontale (80 tours/min). Le gonflement des MP individuelles a été effectué dans

des microplaques standards de 96 puits, remplies avec du tampon phosphate pH 7,4, sous agitation horizontale en utilisant un microscope optique avec un système d'analyse d'image. Les profils de gonflement des MP ont été obtenus par détermination de l'augmentation du diamètre des particules à des intervalles de temps prédéterminés par microscopie optique.

La **figure 15** montre que le diamètre des MP chargées de 1 % de prilocaïne ne change pas le premier jour d'incubation dans le milieu de libération. Le deuxième jour, un faible rétrécissement de la taille est observé et qui reste stable jusqu'à J6. Au-delà de J6, une augmentation de la taille est observée. Cela correspond partiellement au changement de phase observé dans le profil de libération comme le montre **la figure 16A**. Les MP chargées de 20 % et de 50 % de prilocaïne présentent un gonflement à partir des six premières heures comme on peut le voir sur **la figure 16B** et **16C**, respectivement. Ce gonflement continue régulièrement dans le temps pour atteindre 215 % et 221 % de la taille initiale à J9 avec les MP dosées à 20 % et 50 % en prilocaïne, respectivement (**Figure 17**).



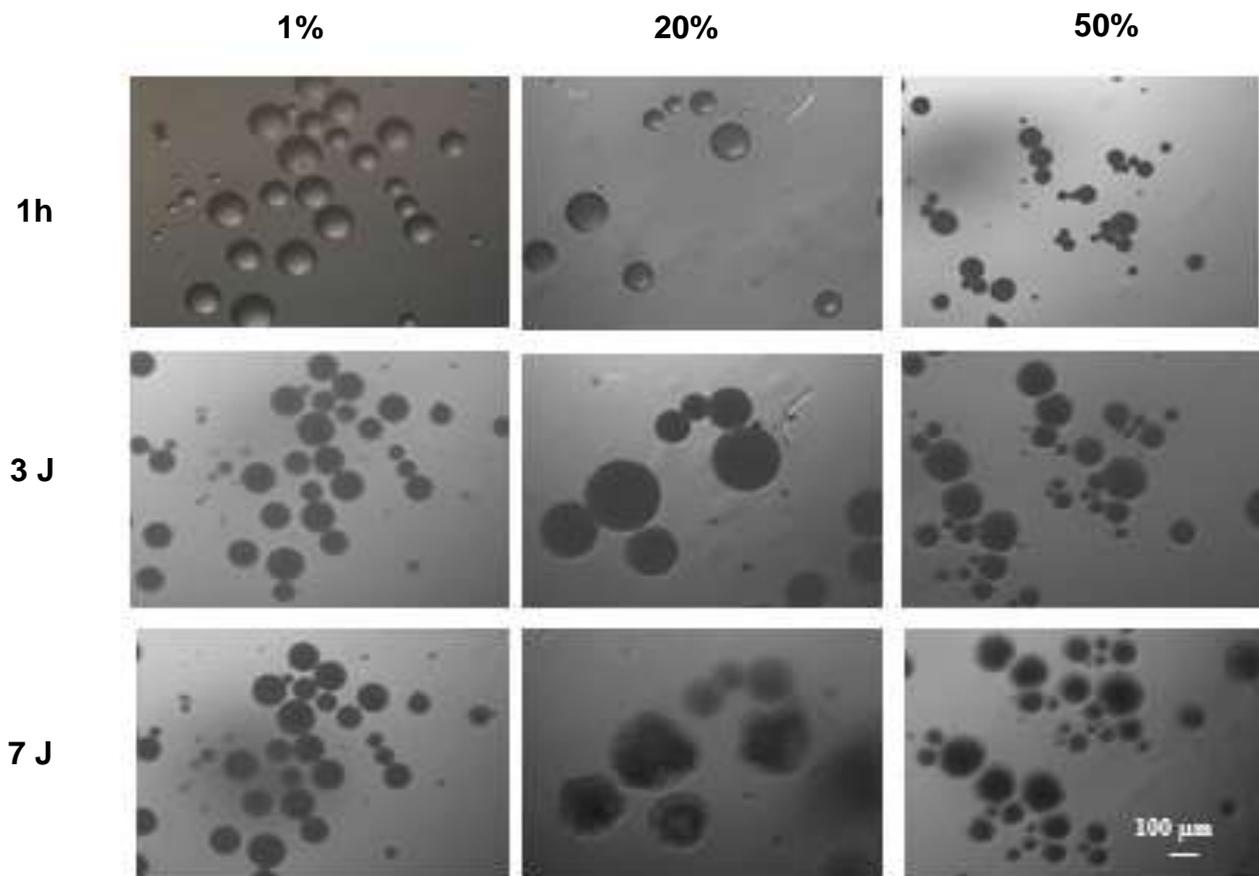
**Figure 15:** Les changements dans la taille des microparticules de PLGA à 1 % de taux de chargement théorique lors de l'exposition au tampon phosphate pH 7,4 : petite (66 μm), moyenne (98 μm), large (144 μm) ainsi que la valeur moyenne.



**Figure 16:** Les changements de diamètre des MP de PLGA dosées à 1 % (A), 20 % (B) et 50 % (C) de prilocaïne après exposition au tampon phosphate pH 7,4 37 °C à et comparés à la cinétique de libération.

Le gonflement de ces MP pourrait être expliqué par la création de groupes hydrophiles résultant de la dégradation par hydrolyse du PLGA. Les résultats de la CPG montrent que la vitesse de dégradation des MP dosées à 20 % et 50 % était rapide contrairement à celle observée pour les MP dosées à 1 %. A ce stade de la dégradation, les oligomères n'étaient pas suffisamment solubles pour diffuser dans le milieu de libération et sont restés à l'intérieur, ce qui rend les MP hautement

hydrophiles. Cela peut expliquer le gonflement des deux échantillons. Le même phénomène a été rapporté par Tingfei *et al.* sur des revêtements à base de film de PLGA [131]. Cela coïncide également bien avec les MP chargées à 1 % de prilocaïne, le polymère se dégrade moins vite comparé aux autres formulations. Donc le polymère reste hydrophobe, pas d'hydratation et donc par la suite pas de gonflement. Après quelques jours, le polymère commence à s'hydrater et par la suite les microparticules commencent à gonfler et se dégrader en même temps.



**Figure 17: Images de microscope optique des MP à base de PLGA chargées de 1 %, 20 % et 50 % en prilocaïne après 1heure, 3 et 7 jours d'exposition au tampon phosphate pH 7,4 à 37 °C, respectivement .**

## **CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES**

L'augmentation de la charge initiale en SA affecte fortement les résultats de la cinétique de libération : non seulement la pente mais aussi la forme des courbes de libération sont modifiées, ainsi que les propriétés clés du système : la calorimétrie différentielle à balayage confirme que la prilocaïne agit comme plastifiant sur le PLGA. L'analyse CPG a révélé que les changements observés dans la libération sont bien corrélés avec la cinétique de dégradation du polymère, indiquant l'importance de la création d'un microclimat basique du à la SA qui accélère l'hydrolyse des liaisons esters. La diffraction des rayons X indique que la prilocaïne pure est à l'état cristallin, le PLGA et les MP chargées sont à l'état amorphe. Le MEB montre que les MP (avec 1 %, 20 % et 50 % de la charge initiale en SA) ont une surface lisse. Après 48 h d'exposition au milieu de libération, les images MEB révèlent que les MP sont devenues poreuses. Cette porosité augmente avec la charge initiale en SA.

Comme pour les cinétiques de libération obtenues à partir des MP à base de PLGA, différentes phases peuvent être distinguées pour les profils de gonflement. Les transitions d'une phase à une autre semblent- au moins partiellement- s'accorder entre le profil de libération et celui du gonflement. Ainsi, le gonflement des MP pourrait contribuer au contrôle de la libération de la SA à partir des MP à base de PLGA.

Les changements observés dans les cinétiques de libération ainsi que dans les autres propriétés clés du système avant et après exposition au milieu de libération tout en variant la charge initiale en substance active serviront de base pour la modélisation mathématique des cinétiques de libération.

Enfin, il sera nécessaire d'effectuer la même étude en utilisant d'autres substances actives (acide et neutre) pour mieux comprendre les phénomènes qui contribuent au contrôle de la libération de SA permettant ainsi d'en tirer des conclusions fiables.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES:

1. Shive, Anderson. Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. *Adv Drug Deliv Rev.* 13 oct 1997;28(1):5-24.
2. Makadia HK, Siegel SJ. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. *Polymers (Basel).* 1 sept 2011;3(3):1377-97.
3. Alcalá-Alcalá S, Urbán-Morlán Z, Aguilar-Rosas I, Quintanar-Guerrero D. A biodegradable polymeric system for peptide-protein delivery assembled with porous microspheres and nanoparticles, using an adsorption/infiltration process. *Int J Nanomedicine.* 2013;8:2141-51.
4. Jain RA. The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. *Biomaterials.* déc 2000;21(23):2475-90.
5. Huang S, Li I-H, Hong P, Yeh M. Evaluation of protective efficacy using a nonstructural protein NS1 in DNA vaccine-loaded microspheres against dengue 2 virus. *Int J Nanomedicine.* 2013;8:3161-9.
6. Présemy J, Salzano G, Courties G, Shires M, Ponchel F, Jorgensen C, et al. PLGA microspheres encapsulating siRNA anti-TNFalpha: efficient RNAi-mediated treatment of arthritic joints. *Eur J Pharm Biopharm.* nov 2012;82(3):457-64.
7. Mountziaris PM, Tzouanas SN, Sing DC, Kramer PR, Kasper FK, Mikos AG. Intra-articular controlled release of anti-inflammatory siRNA with biodegradable polymer microparticles ameliorates temporomandibular joint inflammation. *Acta Biomater.* oct 2012;8(10):3552-60.
8. Cilurzo F, Selmin F, Minghetti P, Montanari L. Design of methylprednisolone biodegradable microspheres intended for intra-articular administration. *AAPS PharmSciTech.* 2008;9(4):1136-42.
9. He Y, Liu Y, Liu Y, Wang J, Zhang X, Lu W, et al. Cyclosporine-loaded microspheres for treatment of uveitis: in vitro characterization and in vivo pharmacokinetic study. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* sept 2006;47(9):3983-8.
10. Mundargi RC, Srirangarajan S, Agnihotri SA, Patil SA, Ravindra S, Setty SB, et al. Development and evaluation of novel biodegradable microspheres based on poly(D,L-lactide-co-glycolide) and poly(epsilon-caprolactone) for controlled delivery of doxycycline in the treatment of human periodontal pocket: in vitro and in vivo studies. *J Control Release.* 14 mai 2007;119(1):59-68.
11. Giteau A, Venier-Julienne MC, Aubert-Pouëssel A, Benoit JP. How to achieve sustained and complete protein release from PLGA-based microparticles? *Int J Pharm.* 28 févr 2008;350(1-2):14-26.
12. Burgess DJ, Crommelin DJA, Hussain AS, Chen M-L. Assuring quality and performance of sustained and controlled release parenterals: EUFEPS workshop report. *AAPS J.* 2004;6(1):100-11.
13. Cynthia D'Avila Carvalho erbeta, alves RJ, Magalhães Resende J, Freiyas RF de S, de Sousa RG. Synthesis and Characterization of Poly(D,L-Lactide-co-Glycolide) Copolymer. *Scientific research.* janv 2012;3:208-25.
14. Mundargi RC, Babu VR, Rangaswamy V, Patel P, Aminabhavi TM. Nano/micro technologies for delivering macromolecular therapeutics using poly(D,L-lactide-co-glycolide) and its derivatives. *J Control Release.* 11 févr 2008;125(3):193-209.

15. Zaghloul AA. beta-Estradiol biodegradable microspheres: effect of formulation parameters on encapsulation efficiency and in vitro release. *Pharmazie*. sept 2006;61(9):775-9.
16. Sperling LH. *Introduction to Physical Polymer Science*. John Wiley & Sons; 2005. 878 p.
17. Passerini N, Craig DQ. An investigation into the effects of residual water on the glass transition temperature of polylactide microspheres using modulated temperature DSC. *J Control Release*. 18 mai 2001;73(1):111-5.
18. Okada H, Doken Y, Ogawa Y, Toguchi H. Preparation of three-month depot injectable microspheres of leuprorelin acetate using biodegradable polymers. *Pharm Res*. août 1994;11(8):1143-7.
19. Kitchell JP, Wise DL. [32] Poly(lactic/glycolic acid) biodegradable drug—polymer matrix systems. In: Kenneth J. Widder RG, éditeur. *Methods in Enzymology* [Internet]. Academic Press; 1985 [cité 30 août 2014]. p. 436-48. Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0076687985120343>
20. Brady JM, Cutright DE, Miller RA, Battistone GC, Hunsuck EE. Resorption rate, route of elimination, and ultrastructure of the implant site of polylactic acid in the abdominal wall of the rat. *J Biomed Mater Res*. 1 mars 1973;7(2):155-66.
21. Agrawal CM, Niederauer GG, Athanasiou KA. Fabrication and Characterization of PLA-PGA Orthopedic Implants. *Tissue Eng*. 1995;1(3):241-52.
22. Kumari A, Yadav SK, Yadav SC. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 1 janv 2010;75(1):1-18.
23. Panyam J, Labhasetwar V. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Adv Drug Deliv Rev*. 24 févr 2003;55(3):329-47.
24. Kreitz MR, Domm JA, Mathiowitz E. Controlled delivery of therapeutics from microporous membranes. II. In vitro degradation and release of heparin-loaded poly(D,L-lactide-co-glycolide). *Biomaterials*. déc 1997;18(24):1645-51.
25. Chen X, Ooi CP. Hydrolytic degradation and drug release properties of ganciclovir-loaded biodegradable microspheres. *Acta Biomater*. juill 2008;4(4):1046-56.
26. Danny H, Lewis S. Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymers. *Biodegradable polymers as Drug Delivery Systems* [Internet]. Mark Chasin and Rober Langer; [cité 31 août 2014]. p. 01-41. Disponible sur: [http://www.ajprd.com/download ebooks\\_pdf/38.pdf](http://www.ajprd.com/download ebooks_pdf/38.pdf)
27. Engineer C, Parikh J, Raval A. Review on Hydrolytic Degradation Behavior of Biodegradable Polymers from Controlled Drug Delivery System. *Trends in Biomaterials and Artificial Organs*. 4 mai 2011;25(2):79-85.
28. Holland SJ, Tighe BJ, Gould PL. Polymers for biodegradable medical devices. 1. The potential of polyesters as controlled macromolecular release systems. *Journal of Controlled Release*. oct 1986;4(3):155-80.
29. Visscher GE, Robison MA, Argentieri GJ. Tissue response to biodegradable injectable microcapsules. *J Biomater Appl*. juill 1987;2(1):118-31.
30. Spilizewski KL, Marchant RE, Hamlin CR, Anderson JM, Tice TR, Dappert TO, et al. The effect of hydrocortisone acetate loaded poly(DL-lactide) films on the inflammatory response. *Journal of Controlled Release*. nov 1985;2:197-203.

31. Jalil R, Nixon JR. Biodegradable poly(lactic acid) and poly(lactide-co-glycolide) microcapsules: problems associated with preparative techniques and release properties. *J Microencapsul.* sept 1990;7(3):297-325.
32. McGinity null, O'Donnell null. Preparation of microspheres by the solvent evaporation technique. *Adv Drug Deliv Rev.* 13 oct 1997;28(1):25-42.
33. Cavalier M, Benoit JP, Thies C. The formation and characterization of hydrocortisone-loaded poly((+/-)-lactide) microspheres. *J Pharm Pharmacol.* avr 1986;38(4):249-53.
34. Tsai DC, Howard SA, Hogan TF, Malanga CJ, Kandzari SJ, Ma JK. Preparation and in vitro evaluation of polylactic acid-mitomycin C microcapsules. *J Microencapsul.* sept 1986;3(3):181-93.
35. Wang N, Wu XS. Synthesis, characterization, biodegradation, and drug delivery application of biodegradable lactic/glycolic acid oligomers: Part II. Biodegradation and drug delivery application. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition.* 1 janv 1998;9(1):75-87.
36. Chaisri W, Hennink WE, Okonogi S. Preparation and characterization of cephalexin loaded PLGA microspheres. *Curr Drug Deliv.* janv 2009;6(1):69-75.
37. Wischke C, Schwendeman SP. Principles of encapsulating hydrophobic drugs in PLA/PLGA microparticles. *Int J Pharm.* 8 déc 2008;364(2):298-327.
38. Jalil R, Nixon JR. Microencapsulation using poly (L-lactic acid) II: Preparative variables affecting microcapsule properties. *J Microencapsul.* mars 1990;7(1):25-39.
39. Jalil R, Nixon JR. Microencapsulation using poly(DL-lactic acid). I: Effect of preparative variables on the microcapsule characteristics and release kinetics. *J Microencapsul.* juin 1990;7(2):229-44.
40. Jalil R, Nixon JR. Microencapsulation using poly (L-lactic acid) III: Effect of polymer molecular weight on the microcapsule properties. *J Microencapsul.* mars 1990;7(1):41-52.
41. Rosca ID, Watari F, Uo M. Microparticle formation and its mechanism in single and double emulsion solvent evaporation. *J Control Release.* 30 sept 2004;99(2):271-80.
42. Alonso MJ, Gupta RK, Min C, Siber GR, Langer R. Biodegradable microspheres as controlled-release tetanus toxoid delivery systems. *Vaccine.* mars 1994;12(4):299-306.
43. Gupta null, Singh null, O'Hagan null. Poly(lactide-co-glycolide) microparticles for the development of single-dose controlled-release vaccines. *Adv Drug Deliv Rev.* 6 juill 1998;32(3):225-46.
44. Huang S, Li I-H, Hong P, Yeh M. Development of Yersinia pestis F1 antigen-loaded microspheres vaccine against plague. *Int J Nanomedicine.* 2014;9:813-22.
45. Fu Y, Du L, Wang Q, Liao W, Jin Y, Dong A, et al. In vitro sustained release of recombinant human bone morphogenetic protein-2 microspheres embedded in thermosensitive hydrogels. *Pharmazie.* avr 2012;67(4):299-303.
46. Rui J, Dadsetan M, Runge MB, Spinner RJ, Yaszemski MJ, Windebank AJ, et al. Controlled release of vascular endothelial growth factor using poly-lactic-co-glycolic acid microspheres: in vitro characterization and application in polycaprolactone fumarate nerve conduits. *Acta Biomater.* févr 2012;8(2):511-8.
47. Ravi S, Peh KK, Darwis Y, Murthy BK, Singh TRR, Mallikarjun C. Development and characterization of polymeric microspheres for controlled release protein loaded drug delivery system. *Indian J Pharm Sci.* juin 2008;70(3):303-9.

48. Giri TK, Choudhary C, Ajazuddin null, Alexander A, Badwaik H, Tripathi DK. Prospects of pharmaceuticals and biopharmaceuticals loaded microparticles prepared by double emulsion technique for controlled delivery. *Saudi Pharm J.* avr 2013;21(2):125-41.
49. Ito F, Fujimori H, Makino K. Factors affecting the loading efficiency of water-soluble drugs in PLGA microspheres. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 15 janv 2008;61(1):25-9.
50. Ruan G, Feng S-S, Li Q-T. Effects of material hydrophobicity on physical properties of polymeric microspheres formed by double emulsion process. *J Control Release.* 5 déc 2002;84(3):151-60.
51. Herrmann J, Bodmeier R. Biodegradable, somatostatin acetate containing microspheres prepared by various aqueous and non-aqueous solvent evaporation methods. *Eur J Pharm Biopharm.* janv 1998;45(1):75-82.
52. Du L, Cheng J, Chi Q, Qie J, Liu Y, Mei X. Biodegradable PLGA microspheres as a sustained release system for a new luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) antagonist. *Chem Pharm Bull.* sept 2006;54(9):1259-65.
53. Cleland JL, Powell MF, Shire SJ. The development of stable protein formulations: a close look at protein aggregation, deamidation, and oxidation. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* 1993;10(4):307-77.
54. Tamber H, Johansen P, Merkle HP, Gander B. Formulation aspects of biodegradable polymeric microspheres for antigen delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 10 janv 2005;57(3):357-76.
55. Dai C, Wang B, Zhao H. Microencapsulation peptide and protein drugs delivery system. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 25 mars 2005;41(2-3):117-20.
56. Kala H, Traue J, Moldenhauer H, Zessin G. [The use of spray drying in pharmacy (author's transl)]. *Pharmazie.* déc 1979;34(12):779-84.
57. Wang FJ, Wang C-H. Effects of fabrication conditions on the characteristics of etanidazole spray-dried microspheres. *J Microencapsul.* août 2002;19(4):495-510.
58. Wagenaar BW, Müller BW. Piroxicam release from spray-dried biodegradable microspheres. *Biomaterials.* janv 1994;15(1):49-54.
59. Takada S, Uda Y, Toguchi H, Ogawa Y. Application of a spray drying technique in the production of TRH-containing injectable sustained-release microparticles of biodegradable polymers. *PDA J Pharm Sci Technol.* août 1995;49(4):180-4.
60. Song X, Song S-K, Zhao P, Wei L-M, Jiao H-S.  $\beta$ -methasone-containing biodegradable poly(lactide-co-glycolide) acid microspheres for intraarticular injection: effect of formulation parameters on characteristics and in vitro release. *Pharm Dev Technol.* oct 2013;18(5):1220-9.
61. Maia JL, Santana MHA, Ré MI. The effect of some processing conditions on the characteristics of biodegradable microspheres obtained by an emulsion solvent evaporation process. *Brazilian Journal of Chemical Engineering.* janv 2004;21(1):01-12.
62. D'Aurizio E, van Nostrum CF, van Steenberg MJ, Sozio P, Siepmann F, Siepmann J, et al. Preparation and characterization of poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres loaded with a labile antiparkinson prodrug. *Int J Pharm.* 16 mai 2011;409(1-2):289-96.
63. Ito F, Fujimori H, Honnami H, Kawakami H, Kanamura K, Makino K. Study of types and mixture ratio of organic solvent used to dissolve polymers for preparation of drug-containing PLGA microspheres. *European Polymer Journal.* mars 2009;45(3):658-67.

64. Yang YY, Chia HH, Chung TS. Effect of preparation temperature on the characteristics and release profiles of PLGA microspheres containing protein fabricated by double-emulsion solvent extraction/evaporation method. *J Control Release*. 3 oct 2000;69(1):81-96.
65. Choi HS, Seo SA, Khang G, Rhee JM, Lee HB. Preparation and characterization of fentanyl-loaded PLGA microspheres: in vitro release profiles. *Int J Pharm*. 2 mars 2002;234(1-2):195-203.
66. Freytag T, Dashevsky A, Tillman L, Hardee GE, Bodmeier R. Improvement of the encapsulation efficiency of oligonucleotide-containing biodegradable microspheres. *J Control Release*. 3 oct 2000;69(1):197-207.
67. Li M, Rouaud O, Poncelet D. Microencapsulation by solvent evaporation: state of the art for process engineering approaches. *Int J Pharm*. 3 nov 2008;363(1-2):26-39.
68. Bodmeier R, McGinity JW. Solvent selection in the preparation of poly(dl-lactide) microspheres prepared by the solvent evaporation method. *International Journal of Pharmaceutics*. avr 1988;43(1-2):179-86.
69. Yeo Y, Park K. Control of encapsulation efficiency and initial burst in polymeric microparticle systems. *Arch Pharm Res*. janv 2004;27(1):1-12.
70. Fredenberg S, Wahlgren M, Reslow M, Axelsson A. The mechanisms of drug release in poly(lactic-co-glycolic acid)-based drug delivery systems--a review. *Int J Pharm*. 30 août 2011;415(1-2):34-52.
71. Alexis F, Venkatraman SS, Rath SK, Boey F. In vitro study of release mechanisms of paclitaxel and rapamycin from drug-incorporated biodegradable stent matrices. *J Control Release*. 23 juill 2004;98(1):67-74.
72. Karlsson OJ, Stubbs JM, Karlsson LE, Sundberg DC. Estimating diffusion coefficients for small molecules in polymers and polymer solutions. *Polymer*. mai 2001;42(11):4915-23.
73. Faisant N, Siepmann J, Benoit JP. PLGA-based microparticles: elucidation of mechanisms and a new, simple mathematical model quantifying drug release. *Eur J Pharm Sci*. mai 2002;15(4):355-66.
74. Grayson ACR, Voskerician G, Lynn A, Anderson JM, Cima MJ, Langer R. Differential degradation rates in vivo and in vitro of biocompatible poly(lactic acid) and poly(glycolic acid) homo- and copolymers for a polymeric drug-delivery microchip. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2004;15(10):1281-304.
75. Kim K « Kevin », Pack DW. Microspheres for Drug Delivery. *Biological and Biomedical Nanotechnology* [Internet]. Ferrari, Mauro; 2006 [cité 4 oct 2014]. p. 19-50. Disponible sur: <http://www.springer.com/978-0-387-25563-7>
76. R. Narayani KPR. Gelatin microsphere cocktails of different sizes for the controlled release of anticancer drugs. *International Journal of Pharmaceutics*. 1996;(2):255-8.
77. Khang G, Seo S-A, Choi HS, Rhee JM, Lee HB. Evaluation of in vitro release profiles of fentanyl-loaded PLGA oligomer microspheres. *Macromol Res*. 1 oct 2002;10(5):246-52.
78. Rivera PA, Martinez-Oharriz MC, Rubio M, Irache JM, Espuelas S. Fluconazole encapsulation in PLGA microspheres by spray-drying. *J Microencapsul*. mars 2004;21(2):203-11.
79. Le Corre P, Estèbe JP, Clément R, Du Plessis L, Chevanne F, Ecoffey C, et al. Spray-dried bupivacaine-loaded microspheres: in vitro evaluation and biopharmaceutics of bupivacaine following brachial plexus administration in sheep. *Int J Pharm*. 15 mai 2002;238(1-2):191-203.

80. Diwan M, Park TG. Pegylation enhances protein stability during encapsulation in PLGA microspheres. *J Control Release*. 15 juin 2001;73(2-3):233-44.
81. Luan X, Bodmeier R. Modification of the tri-phasic drug release pattern of leuprolide acetate-loaded poly(lactide-co-glycolide) microparticles. *Eur J Pharm Biopharm*. juin 2006;63(2):205-14.
82. Kim TH, Lee H, Park TG. Pegylated recombinant human epidermal growth factor (rhEGF) for sustained release from biodegradable PLGA microspheres. *Biomaterials*. juin 2002;23(11):2311-7.
83. Klose D, Siepmann F, Willart JF, Descamps M, Siepmann J. Drug release from PLGA-based microparticles: effects of the « microparticle:bulk fluid » ratio. *Int J Pharm*. 4 janv 2010;383(1-2):123-31.
84. Klose D, Siepmann F, Elkharraz K, Krenzlin S, Siepmann J. How porosity and size affect the drug release mechanisms from PLGA-based microparticles. *Int J Pharm*. 18 mai 2006;314(2):198-206.
85. Siepmann J, Göpferich A. Mathematical modeling of bioerodible, polymeric drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 11 juin 2001;48(2-3):229-47.
86. Zolnik BS, Burgess DJ. Effect of acidic pH on PLGA microsphere degradation and release. *J Control Release*. 8 oct 2007;122(3):338-44.
87. Cai Q, Shi G, Bei J, Wang S. Enzymatic degradation behavior and mechanism of poly(lactide-co-glycolide) foams by trypsin. *Biomaterials*. févr 2003;24(4):629-38.
88. D'Souza SS, DeLuca PP. Methods to assess in vitro drug release from injectable polymeric particulate systems. *Pharm Res*. mars 2006;23(3):460-74.
89. Klose D, Azaroual N, Siepmann F, Vermeersch G, Siepmann J. Towards more realistic in vitro release measurement techniques for biodegradable microparticles. *Pharm Res*. mars 2009;26(3):691-9.
90. Göpferich A. Mechanisms of polymer degradation and erosion. *Biomaterials*. janv 1996;17(2):103-14.
91. Ford Versypt AN, Pack DW, Braatz RD. Mathematical modeling of drug delivery from autocatalytically degradable PLGA microspheres--a review. *J Control Release*. 10 janv 2013;165(1):29-37.
92. Ding AG, Schwendeman SP. Acidic microclimate pH distribution in PLGA microspheres monitored by confocal laser scanning microscopy. *Pharm Res*. sept 2008;25(9):2041-52.
93. Fu K, Pack DW, Klibanov AM, Langer R. Visual evidence of acidic environment within degrading poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) microspheres. *Pharm Res*. janv 2000;17(1):100-6.
94. Brunner A, Mäder K, Göpferich A. pH and osmotic pressure inside biodegradable microspheres during erosion. *Pharm Res*. juin 1999;16(6):847-53.
95. Martínez-Sancho C, Herrero-Vanrell R, Negro S. Study of gamma-irradiation effects on aciclovir poly(D,L-lactic-co-glycolic) acid microspheres for intravitreal administration. *J Control Release*. 14 sept 2004;99(1):41-52.
96. Fernández-Carballido A, Herrero-Vanrell R, Molina-Martínez IT, Pastoriza P. Biodegradable ibuprofen-loaded PLGA microspheres for intraarticular administration. Effect of Labrafil addition on release in vitro. *Int J Pharm*. 26 juill 2004;279(1-2):33-41.

97. Blasi P, Schoubben A, Giovagnoli S, Perioli L, Ricci M, Rossi C. Ketoprofen poly(lactide-co-glycolide) physical interaction. *AAPS PharmSciTech*. 2007;8(2):Article 37.
98. Blasi P, D'Souza SS, Selmin F, DeLuca PP. Plasticizing effect of water on poly(lactide-co-glycolide). *J Control Release*. 2 nov 2005;108(1):1-9.
99. Liang R, Li X, Shi Y, Wang A, Sun K, Liu W, et al. Effect of water on exenatide acylation in poly(lactide-co-glycolide) microspheres. *Int J Pharm*. 15 sept 2013;454(1):344-53.
100. Siepmann J, Faisant N, Benoit J-P. A new mathematical model quantifying drug release from bioerodible microparticles using Monte Carlo simulations. *Pharm Res*. déc 2002;19(12):1885-93.
101. Sales-Junior PA, Guzman F, Vargas MI, Sossai S, Patarroyo V. AM, González CZL, et al. Use of biodegradable PLGA microspheres as a slow release delivery system for the *Boophilus microplus* synthetic vaccine SBm7462. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 15 sept 2005;107(3-4):281-90.
102. Faisant N, Akiki J, Siepmann F, Benoit JP, Siepmann J. Effects of the type of release medium on drug release from PLGA-based microparticles: experiment and theory. *Int J Pharm*. 18 mai 2006;314(2):189-97.
103. Siepmann J, Faisant N, Akiki J, Richard J, Benoit JP. Effect of the size of biodegradable microparticles on drug release: experiment and theory. *J Control Release*. 16 avr 2004;96(1):123-34.
104. Zolnik BS, Leary PE, Burgess DJ. Elevated temperature accelerated release testing of PLGA microspheres. *J Control Release*. 30 mai 2006;112(3):293-300.
105. Schliecker G, Schmidt C, Fuchs S, Wombacher R, Kissel T. Hydrolytic degradation of poly(lactide-co-glycolide) films: effect of oligomers on degradation rate and crystallinity. *Int J Pharm*. 6 nov 2003;266(1-2):39-49.
106. Siepmann J, Elkharraz K, Siepmann F, Klose D. How autocatalysis accelerates drug release from PLGA-based microparticles: a quantitative treatment. *Biomacromolecules*. août 2005;6(4):2312-9.
107. Zidan AS, Sammour OA, Hammad MA, Megrab NA, Hussain MD, Khan MA, et al. Formulation of anastrozole microparticles as biodegradable anticancer drug carriers. *AAPS PharmSciTech*. 2006;7(3):61.
108. Chen S, Singh J. Controlled delivery of testosterone from smart polymer solution based systems: in vitro evaluation. *Int J Pharm*. 13 mai 2005;295(1-2):183-90.
109. Von Burkersroda F, Schedl L, Göpferich A. Why degradable polymers undergo surface erosion or bulk erosion. *Biomaterials*. nov 2002;23(21):4221-31.
110. Xu Q, Chin SE, Wang C-H, Pack DW. Mechanism of drug release from double-walled PDLLA(PLGA) microspheres. *Biomaterials*. mai 2013;34(15):3902-11.
111. Körber M. PLGA erosion: solubility- or diffusion-controlled? *Pharm Res*. nov 2010;27(11):2414-20.
112. Antheunis H, van der Meer J-C, de Geus M, Heise A, Koning CE. Autocatalytic equation describing the change in molecular weight during hydrolytic degradation of aliphatic polyesters. *Biomacromolecules*. 12 avr 2010;11(4):1118-24.

113. Batycky RP, Hanes J, Langer R, Edwards DA. A theoretical model of erosion and macromolecular drug release from biodegrading microspheres. *J Pharm Sci.* déc 1997;86(12):1464-77.
114. Sanders LM, Kell BA, McRae GI, Whitehead GW. Prolonged controlled-release of nafarelin, a luteinizing hormone-releasing hormone analogue, from biodegradable polymeric implants: influence of composition and molecular weight of polymer. *J Pharm Sci.* avr 1986;75(4):356-60.
115. Arifin DY, Lee LY, Wang C-H. Mathematical modeling and simulation of drug release from microspheres: Implications to drug delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev.* 30 nov 2006;58(12-13):1274-325.
116. Selmin F, Blasi P, DeLuca PP. Accelerated polymer biodegradation of risperidone poly(D, L-lactide-co-glycolide) microspheres. *AAPS PharmSciTech.* déc 2012;13(4):1465-72.
117. Chen X, Ooi CP, Lim TH. Effect of ganciclovir on the hydrolytic degradation of poly(lactide-co-glycolide) microspheres. *J Biomater Appl.* janv 2006;20(3):287-302.
118. Tomoda K, Kojima S, Kajimoto M, Watanabe D, Nakajima T, Makino K. Effects of pulmonary surfactant system on rifampicin release from rifampicin-loaded PLGA microspheres. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 25 sept 2005;45(1):1-6.
119. Park TG. Degradation of poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres: effect of copolymer composition. *Biomaterials.* oct 1995;16(15):1123-30.
120. Andersson SR, Hakkarainen M, Inkinen S, Södergård A, Albertsson A-C. Customizing the hydrolytic degradation rate of stereocomplex PLA through different PDLA architectures. *Biomacromolecules.* 9 avr 2012;13(4):1212-22.
121. Siegel SJ, Kahn JB, Metzger K, Winey KI, Werner K, Dan N. Effect of drug type on the degradation rate of PLGA matrices. *Eur J Pharm Biopharm.* nov 2006;64(3):287-93.
122. Frank A, Rath SK, Venkatraman SS. Controlled release from bioerodible polymers: effect of drug type and polymer composition. *J Control Release.* 2 févr 2005;102(2):333-44.
123. Zolnik BS, Burgess DJ. Evaluation of in vivo-in vitro release of dexamethasone from PLGA microspheres. *J Control Release.* 21 avr 2008;127(2):137-45.
124. Mao S, Shi Y, Li L, Xu J, Schaper A, Kissel T. Effects of process and formulation parameters on characteristics and internal morphology of poly(d,l-lactide-co-glycolide) microspheres formed by the solvent evaporation method. *Eur J Pharm Biopharm.* févr 2008;68(2):214-23.
125. Dunne M, Corrigan I, Ramtoola Z. Influence of particle size and dissolution conditions on the degradation properties of polylactide-co-glycolide particles. *Biomaterials.* août 2000;21(16):1659-68.
126. Kranz H, Ubrich N, Maincent P, Bodmeier R. Physicomechanical properties of biodegradable poly(D,L-lactide) and poly(D,L-lactide-co-glycolide) films in the dry and wet states. *J Pharm Sci.* déc 2000;89(12):1558-66.
127. Akala EO, Wiriyaconkasem P, Pan G. Studies on in vitro availability, degradation, and thermal properties of naltrexone-loaded biodegradable microspheres. *Drug Dev Ind Pharm.* juin 2011;37(6):673-84.
128. Blasi P, Giovagnoli S, Schoubben A, Ricci M, Rossi C, Luca G, et al. Preparation and in vitro and in vivo characterization of composite microcapsules for cell encapsulation. *Int J Pharm.* 31 oct 2006;324(1):27-36.

129. Schmitt EA, Flanagan DR, Linhardt RJ. Degradation and release properties of pellets fabricated from three commercial poly(D,L-lactide-co-glycolide) biodegradable polymers. *J Pharm Sci.* mars 1993;82(3):326-9.
130. Bittner B, Mäder K, Kroll C, Borchert HH, Kissel T. Tetracycline-HCl-loaded poly(DL-lactide-co-glycolide) microspheres prepared by a spray drying technique: influence of gamma-irradiation on radical formation and polymer degradation. *J Control Release.* 1 mai 1999;59(1):23-32.
131. Xi T, Gao R, Xu B, Chen L, Luo T, Liu J, et al. In vitro and in vivo changes to PLGA/sirolimus coating on drug eluting stents. *Biomaterials.* juill 2010;31(19):5151-8.

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1:</b> Représentations schématiques des deux catégories de MP : .....	14
<b>Figure 2:</b> Structure de l'acide poly(lactique-co-glycolique) avec x et y le ratio de monomères d'acide lactique et d'acide glycolique, respectivement.....	15
<b>Figure 3:</b> Hydrolyse de l'acide Poly(lactique-co-glycolique). .....	17
<b>Figure 4:</b> Préparation de MP par procédé d'émulsion simple (H/E). .....	21
<b>Figure 5:</b> Principe de la coacervation simple. ....	22
<b>Figure 6:</b> Schémas représentatifs des différents mécanismes de libération. ....	28
<b>Figure 7:</b> Représentation schématique des différents profils de libération.....	30
<b>Figure 8:</b> Figure montrant la stabilité de la prilocaïne dans le tampon phosphate pH 7,4 à 37°C reportée en % dosé par rapport à la concentration de départ.....	42
<b>Figure 9:</b> Images MEB des MP à base de PLGA chargées en prilocaïne base libre (1%, 20%, et 50%), respectivement, avant (A) et après 48h d'exposition (B) au tampon phosphate pH 7,4 ainsi que des coupes transversales (C).....	45
<b>Figure 10:</b> DRX de la prilocaïne base libre (A), du PLGA 504H pur (B), et des MP avec des taux de chargement de 1% à 50% en prilocaïne (C). .....	46
<b>Figure 11:</b> Evolution de la température de transition vitreuse des MP sèches, ainsi que des MP incubées dans le PBS pH 7,4, déterminée par calorimétrie différentielle à balayage durant le deuxième cycle de chauffage. ....	48
<b>Figure 12:</b> Comparaison des profils de libération de la prilocaïne à partir de MP ayant des taux de chargement théoriques de 1%, 3%, 7%, 10%, 15% (A) et celles à 20%, 30%, 40%, et 50% (B), respectivement. ....	52
<b>Figure 13:</b> Effet du taux de chargement initial sur le poids moléculaire du PLGA après exposition des MP au tampon phosphate pH 7,4 à 37°C. ....	54
<b>Figure 14:</b> Effet du taux de chargement initial sur le poids moléculaire du PLGA après exposition des MP au tampon phosphate pH 7,4 à 37°C à différents intervalles de temps.....	55
<b>Figure 15:</b> Les changements dans la taille des microparticules de PLGA à 1% de taux de chargement théorique lors de l'exposition au tampon phosphate pH 7,4 : petite (66 µm), moyenne (98 µm), large (144 µm) ainsi que la valeur moyenne.....	57
<b>Figure 16:</b> Les changements de diamètre des MP de PLGA dosées à 1% (A), 20% (B) et 50% (C) de prilocaïne après exposition au tampon phosphate pH 7,4 37°C à et comparés à la cinétique de libération. ....	58

**Figure 17:** Images de microscope optique des MP à base de PLGA chargées de 1%, 20% et 50% en prilocaïne après 1, 72 et 168 heures d'exposition au tampon phosphate pH 7,4 à 37°C, respectivement ..... 59

## LISTE DES TABLEAUX

**Tableau 1:** Les caractéristiques des différentes formulations de microparticules chargées en prilocaïne.. ..... 43

**Tableau 2:** La Tg du PLGA dans des MP sèches et incubées pendant 48 h dans du tampon phosphate pH 7,4. .... 49

Université de Lille 2  
FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES DE LILLE  
**MEMOIRE de DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES**  
**(tenant lieu de Thèse en vue du Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie)**  
Année Universitaire 2014/2015

**Nom : GASMI**  
Prénom : Hanane

**Titre du mémoire / thèse :** Microparticules à base d'acide poly (lactique-co-glycolique) : Elucidation des mécanismes de libération.

**Mots-clés :** PLGA, microparticules, libération contrôlée, prilocaïne base libre

---

**Résumé :**

Le but de ce travail était de caractériser les changements dans les propriétés clés de MP à base de PLGA en augmentant la charge initiale en SA afin de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents de libération. Les MP ont été préparées par simple émulsion type H/E contenant une quantité différente de la prilocaïne base libre variant de 1 % à 50 % avec une taille de particule constante (80 à 90 µm). La libération de la SA a été mesurée dans du tampon phosphate pH 7,4 à 37 ° C et les MP ont été caractérisées par DSC, CPG, diffraction des rayons X, MEB et étude de gonflement. L'augmentation de la charge initiale en SA affectent fortement les résultats de la cinétique de libération: non seulement la pente, mais aussi la forme des courbes de libération sont modifiées, ainsi que les propriétés clés du système: la DSC confirme que la prilocaïne agit comme plastifiant sur le PLGA. L'analyse CPG a révélé que les changements observés dans la libération sont bien corrélés avec la cinétique de dégradation du polymère, indiquant l'importance de la création d'un microclimat basique du à la SA qui accélère l'hydrolyse des liaisons ester. La diffraction des rayons X indique que la prilocaïne pure est à l'état cristallin, le PLGA et les MP chargées sont à l'état amorphe. Le MEB montre que les microparticules (avec 1 %, 20 % et 50 % de la charge initiale en SA) ont une surface lisse. Après 48h d'exposition au milieu de libération, les images MEB révèlent que les MP sont devenues poreuses. Cette porosité augmente avec la charge initiale en SA. Les transitions d'une phase à une autre semblent dans les profils de libération semble -au moins partiellement- s'accorder avec le profil de gonflement. Les changements observés dans les cinétiques de libérations ainsi que dans les autres propriétés clés du système tout en variant la charge initiale en SA serviront de base pour la modélisation mathématique des cinétiques de libération.

---

**Membres du jury :**

**Président :**

**Pr. Bertrand DECAUDIN**

Professeur des Universités en pharmacie galénique, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille 2 - Pharmacien Praticien Hospitalier, CHRU de Lille

**Assesseur(s) :**

**Mme Florence SIEPMANN :** Maître de Conférences Universitaire, Université de Lille 2

**Mme Sophie LIABEUF :** Maître de conférences en pharmacologie clinique, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques d'Amiens, Université de Picardie Jules Vernes à Amiens, Praticien Hospitalier, Centre Hospitalier Universitaire d'Amiens

**Mme Michèle VASSEUR,** Pharmacien Praticien Hospitalier, CHRU de Lille