



HAL
open science

Sphéroïdes et formes vectorisées

Philippe Legrand, Jean-Pierre Benoit, Stéphanie Briançon, Elias Fattal,
Hatem Fessi, Catherine Passirani

► **To cite this version:**

Philippe Legrand, Jean-Pierre Benoit, Stéphanie Briançon, Elias Fattal, Hatem Fessi, et al.. Sphéroïdes et formes vectorisées. Maloine. Pharmacie Galénique: Formulation et Technologie pharmaceutique, Maloine, pp.221-250, 2007. hal-00385473

HAL Id: hal-00385473

<https://hal.science/hal-00385473>

Submitted on 19 May 2009

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Chapitre 7

SPHEROIDES ET FORMES VECTORISEES

J.P. Benoît, S. Briançon, E. Fattal, H. Fessi, P. Legrand et C. Passirani

1. MICROPARTICULES

- 1.1. Caractéristiques générales des microparticules**
- 1.2. Microencapsulation en milieu dispersant liquide**
- 1.3. Microencapsulation en milieu dispersant gazeux**
- 1.4. Microencapsulation en milieu supercritique**
- 1.5. Microencapsulation en absence de solvant**

2. NANOPARTICULES

- 2.1. Caractéristiques générales**
- 2.2. Méthodes de préparation utilisant des polymères préformés**
- 2.3. Méthodes de préparation par polymérisation**
- 2.4. Méthodes de préparation de nanoparticules lipidiques**
- 2.5. Caractérisation**

3. LIPOSOMES

- 3.1. Caractéristiques générales**
- 3.2. Méthodes de préparation par réhydratation de film suite à l'évaporation du solvant organique**
- 3.3. Méthodes fondées sur la dispersion d'une solution organique de phospholipides**
- 3.4. Méthodes par élimination de détergents au sein de micelles mixtes**
- 3.5. Méthodes par réduction de taille de vésicules**
- 3.6. Méthodes pour augmenter l'encapsulation des principes actifs**
- 3.7. Caractérisation**

Les sphéroïdes et les formes vecteurs sont de nouveaux systèmes particuliers de délivrance de médicaments, sphériques et de taille variable allant de 10 nm à 1 mm pouvant, de par leur taille et leur structure, améliorer l'administration des principes actifs. Les objectifs recherchés lors de la préparation de microparticules sont à la fois de disperser au sein d'un support, protéger, ou stabiliser une matière active tout en contrôlant sa libération. Ceux des formes vectorisées telles que les nanoparticules et les liposomes incluent en plus la capacité de délivrer la molécule active plus spécifiquement au niveau du site d'action, indépendamment de ses propriétés physico-chimiques [1]. Le principe actif associé sera principalement libéré par diffusion et/ou dégradation du matériau support, de façon contrôlée et pré-déterminée par les propriétés physico-chimiques des particules et par leur procédé de fabrication. Après un aperçu des caractéristiques générales de ces systèmes de délivrance particuliers polymères et lipidiques, ce chapitre se propose de décrire l'ensemble des technologies existantes permettant leur préparation ainsi que de définir les avantages et les limites de chaque procédé de préparation.

Objectifs pédagogiques

A la fin de ce chapitre, vous devriez être capable de:

- décrire les caractéristiques générales des microparticules, des nanoparticules et des liposomes : dimensions, excipients mis en oeuvre, propriétés d'usage.
- définir les principales applications de ces sphéroïdes
- décrire leurs différents procédés de fabrication avec leurs avantages et inconvénients respectifs
- connaître les principales caractérisations majeures à mettre en oeuvre

1. MICROPARTICULES

1.1. Caractéristiques générales des microparticules

1.1.1. Structure et taille

Les microparticules sont composées d'un matériau enrobant constitué de polymères synthétiques ou naturels ou encore de lipides et, en général, d'une matière active. Elles présentent une taille comprise entre 1 et 1000 μ m. Leur distribution granulométrique est de type gaussien, varie avec le procédé de fabrication choisi et est déterminée par granulométrie à variation de résistance électrique ou diffraction laser. La morphologie des microparticules peut être observée par microscopie optique ou électronique. Deux structures peuvent exister : les microsphères et les microcapsules (Figure 1). Les premières sont formées d'une matrice continue de polymère ou de lipide au sein de laquelle le principe actif est dissout ou dispersé. Les microcapsules sont quant à elles des réservoirs constitués d'un cœur de principe actif sous forme liquide, solide ou éventuellement gazeux, entouré par une membrane de matériau enrobant.

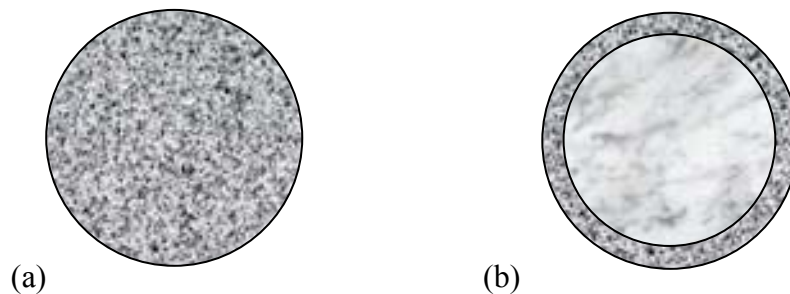


Figure 1. Microsphère (a) et microcapsule (b)

Les polymères formant le matériau enrobant peuvent être d'origine naturelle (gélatine, chitosane, alginate de sodium, agarose...), hémisynthétique (dérivés de la cellulose...) ou synthétique comme les copolymères des acides lactique et glycolique couramment utilisés. Selon le domaine d'application des microparticules, des propriétés de biocompatibilité et/ou de biodégradabilité seront requises. Les lipides (acides gras, alcools gras, glycérides, cholestérol...) seront plutôt utilisés sous forme solide, de même que les cires naturelles ou minérales. D'autres matériaux tels que des stabilisants (tensioactifs, dispersants, anti-mottants...) ou des cryoprotecteurs peuvent être ajoutés à la formulation des microparticules. L'ensemble des composés va intervenir dans le profil de libération de la matière active.

1.1.2. Encapsulation et cinétique de libération

Les microparticules contiennent de manière très variable entre 1 et 90% en masse de matière active. Les taux d'encapsulation déterminés par HPLC ou spectrophotométrie sont généralement plus élevés au sein des réservoirs formés par les microcapsules. Différents facteurs physico-chimiques tels que la charge électrique de surface, la mouillabilité, la porosité et le degré de gonflement des microparticules, ainsi que les polymères utilisés (caractérisés par analyse calorimétrique différentielle ou chromatographie d'exclusion stérique) peuvent influencer la libération du principe actif encapsulé. L'état physique de ce dernier est également un facteur à connaître. En effet, une dispersion moléculaire de matière active encapsulée ne se libérera pas de la même manière que des cristaux et n'aura pas non plus la même stabilité au sein du système.

Certaines particules fabriquées pour l'encapsulation de cellules, d'enzymes ou de bactéries sont destinées à garder leur contenu. D'autres doivent le libérer de manière brutale comme dans le domaine des autocopiants en papeterie, par exemple. Dans ce cas, la membrane doit être étanche et la libération se fera par éclatement ou fusion de la particule sous les effets respectifs de la pression ou de la température. Lorsque la libération de la matière active doit être prolongée, deux mécanismes principaux existent et peuvent cohabiter : diffusion passive et dégradation ou dissolution du matériau enrobant. Les cinétiques de libération obtenues par diffusion passive pour des microcapsules suivent logiquement les lois de Fick et sont généralement d'ordre 0 ou 1. Dans ce dernier cas, la vitesse initiale de libération peut être soit accélérée (« burst ») si beaucoup de matière active se trouve à la surface de la particule, soit retardée si au contraire, un laps de temps est nécessaire pour que la matière active imprègne la membrane de la microcapsule, étape indispensable à sa libération dans le milieu extérieur. Dans le cas des microsphères, les cinétiques obtenues par diffusion passive suivent la loi d'Higuchi décrivant une quantité de matière libérée proportionnelle à la racine carrée du temps.

1.1.3. Domaines d'application

Les microparticules présentent un très large champ d'applications puisqu'il va du domaine pharmaceutique au domaine alimentaire en passant par la cosmétique, la parfumerie, les produits phytosanitaires, la chimie, le domaine biomédical... Une des premières applications de la microencapsulation a été le papier autocopiant sans carbone à base de microcapsules d'encre sensibles à la pression. Depuis les années 80, la communication olfactive s'est développée sous forme d'encarts parfumés dans les magazines pour faire connaître un parfum ou un adoucissant. Des encres contenant des microcapsules enferment le parfum et le libèrent au moment opportun. Récemment, le domaine du textile utilise les microparticules pour parfumer les tissus ou déposer sur la peau des actifs cosmétiques. D'autres applications sont à l'étude comme les répulsifs pour insectes, les colorants, les vitamines, les antimicrobiens ou encore les cristaux liquides. Dans le domaine pharmaceutique, certaines stratégies de délivrance sur site telles que la chimio-embolisation ou l'implantation intracrânienne sont spécifiques aux microparticules. Quelques exemples des matériaux les plus utilisés principalement dans le domaine pharmaceutique et des procédés correspondants sont décrits dans le tableau 1.

Trois grandes classes de procédés existent [2-4]:

- les procédés physico-chimiques basés sur des variations de solubilité des agents enrobants sous l'effet de variations de conditions physiques (température, pH, changement d'état...),
- les procédés mécaniques comme l'extrusion ou la formation de gouttes...,
- les procédés chimiques au cours desquels se déroulent de manière simultanée la synthèse de la membrane (ou de la matrice) et l'encapsulation de la matière active.

La législation concernant les traces de solvant résiduel, dont le dosage est généralement réalisé par chromatographie en phase gazeuse, est de plus en plus contraignante. Nous avons donc choisi de présenter les divers procédés de microencapsulation en fonction de la présence ou non de solvant et de la nature du milieu dispersant (liquide, gazeux, à l'état supercritique ou à sec). Les avantages et limites de ces divers procédés sont rassemblés dans le tableau 2.

Matériaux enrobants	Procédés	Applications principales	Produits commercialisés en France
Homopolymères et copolymères des acides lactique et glycolique (PLA, PLGA)	Evaporation-extraction de solvant Milieu supercritique Spray-drying Coacervation simple Extrusion-broyage-sphéronisation	Libération prolongée de petites molécules ou de peptides par voie parentérale	Enantone LP Sandostatine LP Décapeptyl LP Somatuline LP Risperdal Consta
Copolymères acryliques	Evaporation-extraction de solvant Spray-drying ,Spray-coating	Libération prolongée, gastrique, entérique et masquage de goût par voie orale	
Ethylcellulose Hydroxypropylméthylcellulose Esters de cellulose	Coacervation simple Spray-drying ,Spray-coating Evaporation-extraction de solvant	Masquage de goût et libération prolongée par voie orale	Pentasa Diffu-K
Gélatine / Polysaccharides	Coacervation complexe	Pharmacie – Parfums – Arômes	Parapsyllium
Chitosane	Coacervation complexe Gélification ionique Spray-drying, Spray-coating	Libération gastrique et masquage de goût par voie orale	
Alginate de sodium	Coacervation complexe Gélification ionique	Encapsulation de cellules et levures. Parfums – Arômes Cosmétiques – Agro alimentaire	
Cires	Milieu supercritique Spray-coating	Masquage de goût. Chimie – Cosmétique	
Corps gras solides (esters, alcools, acides gras)	Milieu supercritique Congélation de gouttes	Masquage de goût. Chimie – Cosmétique	
Glycérides	Gélification thermique (Hot melt)	Masquage de goût. Chimie – Cosmétique	
Amidon	Spray-drying	Ferments – Epices - Huiles – Vitamines	Biacton (Vétérinaire)
Polyurée (diamine+diisocyanate)	Polycondensation interfaciale	Phytoprotecteur	Penncap M, Sectrol Capsolane

Tableau 1 : Matériaux et procédés les plus couramment utilisés en microencapsulation

1.2. Microencapsulation en milieu dispersant liquide.

1.2.1. Coacervation

Le procédé de coacervation consiste à abaisser la solubilité d'un polymère (coacervation simple) initialement solubilisé dans un solvant organique ou en milieu aqueux, en variant la température ou par ajout d'un électrolyte, d'un non-solvant ou d'un deuxième polymère (agent de coacervation). Il se formera deux phases liquides : l'une riche en polymère appelée coacervat et l'autre pauvre en polymère. Mais, l'encapsulation d'un principe actif ne s'opérera que dans des conditions strictes de coacervation pouvant être déterminées en établissant un diagramme ternaire. Sur ce diagramme faisant apparaître le solvant, le polymère et l'agent de coacervation, seule une surface déterminée appelée fenêtre de stabilité matérialise l'obtention de gouttelettes de coacervat suffisamment stables pour permettre l'encapsulation d'un principe actif. Dans les bonnes conditions d'encapsulation gouvernées par des tensions interfaciales optimales entre les différentes phases en présence, un principe actif dispersé dans la solution initiale de polymère se retrouvera au sein des gouttelettes de coacervat (Figure 2). De nombreux paramètres influencent la stabilité de ces gouttelettes qui ont tendance à être très collantes (type de polymère, concentration, vitesse d'agitation du système, vitesse d'ajout et viscosité de l'agent de coacervation ...). Ces dernières une fois obtenues sont durcies ou réticulées par un agent de solidification et les microparticules (sphères ou capsules) sont lavées, filtrées ou centrifugées puis séchées. Ce procédé permet l'encapsulation de molécules hydrophiles et lipophiles.

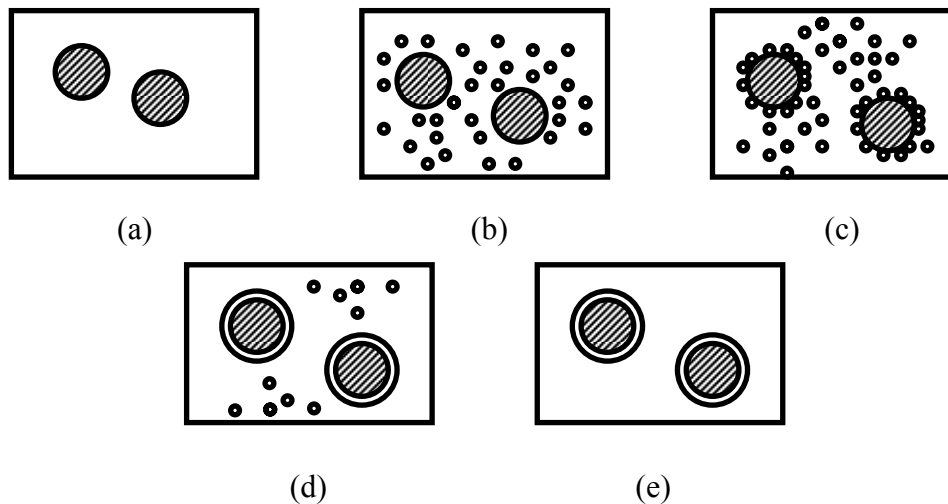


Figure 2. Principe de la coacervation simple : dispersion du principe actif dans la solution de polymère (a), formation des gouttelettes de coacervat (b), dépôt du coacervat (c), fusion des gouttelettes de coacervat et formation d'un enrobage continu (d), solidification de l'enveloppe (e)

La coacervation est dite complexe lorsque la désolvatation simultanée de deux polymères de type polyélectrolytes hydrosolubles de charge opposée, est provoquée, suite à une modification du pH du milieu réactionnel et à l'attraction électrostatique induite des deux polymères. La macromolécule chargée positivement est le plus souvent la gélatine de type A qui ne se dissout dans l'eau qu'à partir de 50°C et la molécule chargée négativement, un polysaccharide acide. Une fois le coacervat formé et déposé autour du principe actif lipophile (huiles végétales, minérales ou essentielles...), la température est abaissée à 5°C afin d'obtenir une gélification de l'enrobage. La réticulation des microcapsules obtenues se fait par ajout de glutaraldéhyde ou d'acide tannique, ce qui permet de solidifier les particules.

1.2.2. Emulsion et évaporation-extraction de solvant

Ce procédé est basé sur l'évaporation de la phase interne d'une émulsion donnant lieu à la précipitation du polymère d'enrobage préalablement dissous dans cette phase, sous forme de microsphères. Les polymères généralement hydrophobes sont tout d'abord dissous dans un solvant organique peu miscible avec l'eau comme le dichlorométhane. Puis, le principe actif est dissous ou dispersé dans la solution de polymère. Le mélange est émulsifié dans un grand volume d'eau contenant des tensioactifs tels que l'alcool polyvinylique, afin d'obtenir une émulsion huile-dans-eau. L'évaporation du solvant après diffusion progressive dans la phase continue est réalisée sous pression atmosphérique ou pression réduite et sous agitation lente. Cette technique est à déconseiller si le principe actif est volatil ou possède une grande affinité pour la phase continue aqueuse. L'extraction consiste, elle, à transférer l'émulsion dans un grand volume d'eau contenant ou non des surfactifs et permettant la diffusion rapide du solvant. Après élimination du solvant, les particules sont lavées, collectées par filtration ou centrifugation puis séchées ou lyophilisées. Le procédé choisi ainsi que sa vitesse de réalisation vont influencer les caractéristiques des microsphères obtenues. Une extraction de solvant, plus rapide que l'évaporation, peut par exemple entraîner la formation de microsphères poreuses.

La méthode telle que décrite ci-dessus est appropriée dans le cas de molécules actives lipophiles. Deux types de modifications peuvent être apportés pour l'encapsulation de principes actifs polaires. Premièrement, l'émulsion huile-dans-eau peut être remplacée par une émulsion huile-dans-huile, en utilisant, en phase interne, un solvant organique volatile (acétonitrile, acétone...) qui contient alors les polymères et la molécule active et, en phase continue, une huile non volatile et non miscible (minérale ou végétale) contenant un surfactif de faible HLB. L'autre possibilité est de former une émulsion multiple eau-dans-huile-dans-eau. La phase aqueuse contenant la molécule hydrophile est ajoutée à la phase organique volatile contenant les polymères sous très forte agitation (sonicateur, homogénéisateur haute pression...) pour former la première émulsion eau-dans-huile. Celle-ci est ensuite ajoutée sous faible agitation dans un grand volume d'eau contenant les tensioactifs. Le solvant organique est évaporé ou extrait comme précédemment décrit et les microsphères, lavées, collectées et séchées ou lyophilisées. Cette méthode dite de double émulsion permet d'obtenir de très forts rendements d'encapsulation de molécules hydrophiles telles que les protéines, par exemple. Elle nécessite cependant un contrôle strict, à toutes les étapes, de la température et de la viscosité de l'émulsion interne et n'est appropriée que pour de faibles quantités de matière active à encapsuler.

1.2.3. Gélification de gouttes

Il existe deux procédés de gélification de gouttes : la gélification thermique (« hot melt ») et la gélification ionique.

Le principe du premier procédé consiste à dissoudre ou disperser la matière active à encapsuler dans le matériau d'enrobage en fusion puis à émulsionner l'ensemble dans une phase dispersante à une température supérieure à la température de fusion du matériau enrobant. On utilise en général, pour le matériau d'enrobage, des lipides de bas point de fusion (cire de Carnauba, alcool cétylique...). Le milieu est ensuite refroidi brutalement afin de solidifier les particules obtenues. Ce procédé permet la microencapsulation de molécules hydrophiles et lipophiles si l'on choisit une phase dispersante pour laquelle ces molécules ont peu d'affinité (huile de silicone et eau respectivement). Une technique similaire consiste à utiliser des polymères hydrophiles capables de former des gels lors du refroidissement (gélatine, agarose...).

Le procédé de gélification ionique consiste à extruder au travers d'une aiguille de seringue ou d'une buse, une solution aqueuse de polymère dans laquelle la matière active est dissoute, dispersée ou émulsionnée. Les gouttelettes formées sont réceptionnées dans une phase liquide dispersante pour se transformer, après réaction chimique, en particules de gel sphériques. C'est le cas par exemple lorsque l'on utilise de l'alginate de sodium avec une phase dispersante de chlorure de calcium ou du chitosane et une solution réceptrice alcaline.

1.2.4. Polycondensation interfaciale

Ce procédé qui appartient aux procédés chimiques d'encapsulation consiste à faire réagir deux monomères, l'un dans la phase dispersée, l'autre dans la phase dispersante, afin d'obtenir une membrane de polymère à la surface des gouttelettes formées. Dans le cas d'un principe actif lipophile, la première étape consiste à préparer une solution contenant cette molécule et un premier monomère dans un solvant organique puis de former une émulsion de cette phase organique dans une phase aqueuse contenant un tensioactif. On ajoute ensuite dans cette phase aqueuse, le second monomère hydrosoluble afin d'induire la réaction des deux monomères à l'interface huile/eau où ils auront diffusé. Les monomères les plus couramment utilisés dans ce cas sont des chlorures d'acide ou des diisocyanates couplés à des diamines conduisant respectivement à des membranes de polyamide ou de polyurée. Pour un principe actif hydrophile, on forme une émulsion inverse (eau/huile) dans un solvant de température d'ébullition élevée, à partir d'une solution aqueuse contenant le principe actif et le monomère hydrosoluble. Puis le monomère organo-soluble est ajouté dans la phase dispersante. La taille des microsphères obtenues est comprise entre 0,5 et 100 μm et dépend principalement de l'agitation du système, de la vitesse d'ajout des deux monomères et de la cinétique de diffusion. La formation et les caractéristiques de la membrane vont dépendre, elles, de la nature et de la concentration en monomères, tensioactifs et solvants.

1.2.5. Polymérisation en milieu dispersé

Ces procédés permettent la formation de microparticules à partir de monomères synthétiques du type acrylique, vinylique ou cyanoacrylate d'alkyle. Ils mettent en jeu une phase de formation des particules appelée nucléation suivie d'une phase de croissance donnant lieu à des particules de type matriciel. Deux mécanismes principaux sont à distinguer : la polymérisation en émulsion et la polymérisation en dispersion. Dans le premier cas, une émulsion des monomères en phase aqueuse est réalisée avant la polymérisation, le principe actif étant préalablement solubilisé ou dispersé dans les monomères. La réaction de polymérisation radicalaire ou anionique selon les monomères utilisés s'initie respectivement par l'ajout d'un amorceur ou par simple contact avec la phase aqueuse. Dans le cas de la polymérisation en dispersion, la nucléation se fait en phase homogène, les monomères et la matière active étant initialement solubilisés dans la phase continue. La croissance des oligomères suite à la polymérisation amorcée par un initiateur, donne lieu à leur précipitation sous forme d'agrégats stabilisés par les tensioactifs présents dans la phase continue. Cette technique conduit à des particules de diamètre nettement supérieur à celui des particules obtenues par polymérisation en émulsion (respectivement 1 à 15 μm et 100 nm à 5 μm).

1.3. Microencapsulation en milieu dispersant gazeux

1.3.1. Enrobage en lit d'air fluidisé (« spray-coating »)

La première étape de cette technique de microencapsulation consiste à fluidiser une poudre de particules de principe actif (granulés, cristaux...) dans une colonne placée sous un courant d'air ascendant (chambre cylindrique verticale). Cette fluidisation permet d'assurer un mélange constant des particules avec un transfert de chaleur optimal entre l'air et la surface des particules. Puis, une buse de pulvérisation placée au sommet ou à la base de la suspension fluide permet de disperser, sous forme de fines gouttelettes, le matériau enrobant à la surface des particules. Un enrobage continu et homogène s'obtient suite à des passages successifs et cycliques des particules dans la zone de pulvérisation et dans la zone d'expansion où a lieu le séchage. La formation du film d'enrobage s'effectue au contact des particules après des étapes successives de mouillage, étalement puis séchage par évaporation du solvant contenant les gouttelettes de matériau enrobant. Celui-ci est constitué en général de solutions organiques ou dispersions aqueuses de polymères (dérivés cellulosiques ou acryliques) qui peuvent contenir des plastifiants afin de favoriser la formation du film d'enrobage à la température de séchage ainsi que des additifs (anti-mottants, lubrifiants...). Des corps gras ou des cires peuvent également être utilisés. L'obtention d'un bon enrobage va dépendre à la fois des paramètres de pulvérisation (concentration de la formulation, débit, taille des gouttelettes) et des paramètres de séchage (volume d'air de fluidisation, température de l'air, degré d'humidité). L'épaisseur des films d'enrobage déposés sur les particules est généralement comprise entre quelques micromètres et 20 μm et doit être suffisante pour masquer les défauts de surface.

1.3.2. Nébulisation-séchage (« spray-drying »)

Le principe de la nébulisation-séchage est basé sur la nébulisation d'une formulation liquide contenant le polymère et le principe actif pour la transformer en microparticules sèches. La nébulisation s'effectue à travers une buse d'atomisation pneumatique, ultrasonore ou rotative et permet la formation d'un aérosol. Celui-ci est mis en contact avec un flux d'air chaud ou d'azote comprimé dans une chambre de dessiccation permettant un séchage rapide par évaporation du solvant initial et la formation de microparticules solides. Cette technique permet la production de microsphères ou de microcapsules, selon la nature initiale de l'aérosol (solution, suspension ou émulsion). La taille des particules obtenues se situe généralement autour de 10 μm avec une distribution de type gaussien assez large. 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 sur les parois de l'appareil ou à leur agglomération. L'utilisation d'un anti-adhérent (mannitol) peut alors être envisagée.

1.4. Microencapsulation en milieu supercritique

Les techniques récentes de microencapsulation en milieu supercritique permettent de produire des microparticules en s'affranchissant au maximum de la toxicité des solvants organiques mis en œuvre dans les procédés classiques, aussi bien vis-à-vis de l'environnement que de l'utilisateur. Une substance se trouve à l'état supercritique lorsque sa température et sa pression sont supérieures à celles du point critique C (Figure 3). Cet état intermédiaire entre l'état liquide et l'état gazeux confère au fluide des propriétés remarquables, notamment en terme de pouvoir solubilisant (lié à la masse volumique), de viscosité et de coefficient de diffusion. Parmi tous les composés pouvant être amenés à un état supercritique, le dioxyde de carbone (CO_2) possède des points critiques facilement atteignables ($T_c=31,1^\circ\text{C}$ et

$P_c=73,8\text{bar}$) et est de plus non toxique et non inflammable. Il constitue donc un composé de choix.

Dans les techniques décrites ci-dessous, le milieu dispersant n'est pas nécessairement à l'état supercritique et peut être liquide ou gazeux, comme présenté dans les paragraphes précédents. Cependant, étant donné la spécificité de l'état supercritique, nous avons choisi de regrouper dans ce même chapitre tous les procédés faisant intervenir un fluide supercritique.

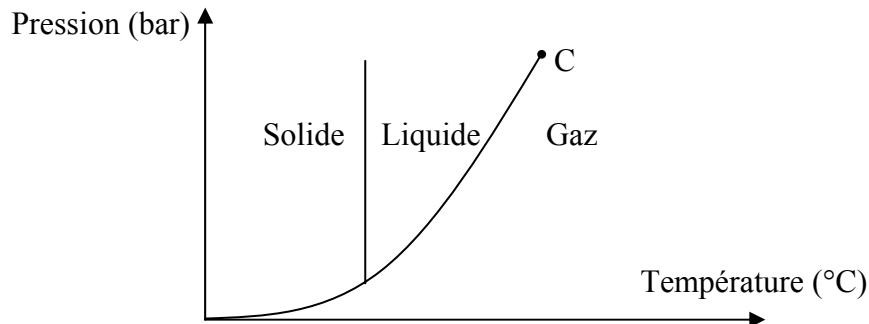


Figure 3. Diagramme d'état d'un corps pur

1.4.1. Fluide supercritique utilisé en tant que non solvant

Les procédés utilisant les fluides supercritiques en tant que non solvant, encore appelés procédés SAS (« supercritical fluid antisolvent »), peuvent s'assimiler aux procédés de coacervation en milieu liquide, avec l'avantage de limiter les traces de solvant résiduel. Ils permettent d'encapsuler des composés tels que les peptides et les protéines, non solubles dans le fluide supercritique ou trop fragiles pour subir l'expansion rapide du procédé RESS décrit plus loin.

ASES (« aerosol solvent extraction system »)

Ce procédé consiste à dissoudre le matériau d'enrobage et dissoudre ou disperser la matière active dans un solvant organique puis à atomiser l'ensemble dans une colonne où circule le fluide en phase supercritique. Une extraction rapide du solvant que l'atomisation a dispersé sous forme de gouttelettes dans le fluide en phase supercritique est alors observée, précipitant le matériau d'enrobage sur la matière active et entraînant l'encapsulation.

Autres procédés

Certains procédés ne diffèrent du précédent que par le mode d'injection de la solution contenant les matériaux dans le fluide supercritique et portent divers noms tels que PCA (« precipitation with a compressed fluid antisolvent ») ou SEDS (« solution enhanced dispersion by supercritical fluids »). D'autres méthodes en mode « batch », couramment appelées GAS (« gas antisolvent precipitation »), consistent à ajouter le fluide supercritique dans le solvant, dans les bonnes conditions de température et de pression. La solution « expansée » étant moins solubilisante que le solvant pur, les solutés précipitent pour former les particules. Il est également possible d'ajouter le solvant liquide doucement dans le fluide supercritique et la précipitation des particules aura lieu cette fois dans la phase supercritique.

1.4.2. Fluide supercritique utilisé en tant que solvant

RESS (« rapid expansion of supercritical solutions »)

Cette méthode s'apparente au « spray-drying » puisqu'il s'agit de l'atomisation d'une solution de fluide supercritique contenant le matériau d'enrobage et le principe actif. Cette solution est nébulisée dans un milieu de pression inférieure au point critique, entraînant l'expansion brutale du fluide se trouvant initialement à l'état supercritique et la précipitation des solutés sous forme de microsphères. En effet, grâce aux propriétés du fluide supercritique, une forte

diminution de la densité du solvant peut être obtenue par un léger changement de pression, donnant lieu à une forte diminution de la solubilité des composés initialement dissous.

Autres procédés

Un procédé moins brutal consiste à dissoudre dans un autoclave le matériau d'enrobage dans le fluide supercritique puis à ajuster les conditions de température et de pression de manière à ce qu'il précipite autour de la matière active en suspension. Ce procédé se rapproche du procédé de coacervation simple et permet l'obtention de microcapsules.

Un autre procédé dit d'« imprégnation » consiste à charger de matière active des particules de polymère préformées. La première phase de ce procédé consiste à augmenter la porosité des particules par gonflement du polymère exposé au fluide supercritique. Puis, du fluide supercritique contenant le principe actif est introduit entraînant le transfert de ce dernier vers la phase polymère. Enfin, le fluide supercritique est évacué de manière progressive provoquant le piégeage du principe actif à l'intérieur des particules. Cette technique est intéressante de par le fait qu'elle se déroule à température ambiante et permet un contrôle précis de la taille étant donné que les particules sont préparées avant d'être chargées en matière active.

1.5. Microencapsulation en absence de solvant

1.5.1. Extrusion sphéronisation

L'extrusion permet de disperser de manière homogène un principe actif dans une matrice polymère et a pour but de convertir un matériau brut en un produit de forme définie et de densité uniforme, en le forçant à passer à travers une filière sous des conditions de température contrôlée (entre 70 et 150°C). Elle peut s'appliquer à des produits en fusion ainsi qu'à des produits semi-solides (dispersions contenant une forte proportion de produit solide et une phase liquide). Les polymères utilisés doivent être thermoplastiques et posséder une température de transition vitreuse suffisamment basse. Le filament obtenu après extrusion est refroidi et sectionné de manière régulière. Le broyage des microcylindres obtenus va permettre d'obtenir des microparticules. Il existe plusieurs types de broyage (broyage à boulet, broyage à jet, pulvérisation cryogénique...). Cependant, le simple broyage peut conduire à des irrégularités de surface et à des tailles très hétérogènes, d'où une étape supplémentaire: la sphéronisation. Durant le procédé mécanique de sphéronisation, les cylindres obtenus après extrusion sont déposés sur un disque tournant strié. Le disque les entraîne dans son sens de rotation tandis que la force centrifuge les envoie contre la paroi du sphéroniseur. Ce mouvement intensif de rotation et de friction façonne la surface des particules et entraîne la formation de sphères de taille généralement assez élevée (supérieure à 200 µm) dépendant essentiellement de la vitesse de rotation et du temps de sphéronisation.

1.5.2. Congélation de gouttes (« spray congealing »)

Les matériaux utilisés dans ce procédé sont généralement des cires, lipides ou corps gras de bas point de fusion permettant de solubiliser la matière active lorsqu'ils sont à l'état fondu. Ce mélange fondu est extrudé à une température supérieure à celle du point de fusion à travers une buse vibrante. Le jet de sortie est sectionné sous l'effet de la vibration et les gouttelettes obtenues sont refroidies par de l'air froid ou de l'azote. Les microparticules obtenues ont généralement un diamètre compris entre 200 et 800 µm et leur distribution granulométrique est très étroite. Ce procédé est une variante de la méthode de microencapsulation par gélification thermique.

Procédés	Structure	Taille (µm)	Avantages	Limites
Coacervation simple	MS*/MC*	20-200	Forts rendements production et encapsulation	Nécessité d'un savoir-faire
Coacervation complexe	MC	5-200	Pas de solvant organique Rendement de production très élevé	Choix limité de couples d'électrolytes Difficulté à encapsuler des PA* hydrosolubles
Evaporation-extraction de solvant	MS	0,5-200	Rendement de production proche de 100% Procédé facile à mettre en œuvre Pas d'équipement sophistiqué	Traces de solvant organique résiduel Volumes de solvant organique évaporé à recycler
Gélification thermique	MS	30-300	Procédé simple Transposition d'échelle simple	Polymorphisme de certains lipides pouvant entraîner des formes cristallines non souhaitées
Gélification ionique	MS	>200	Procédé réalisable à température ambiante Adapté aux cellules vivantes	Choix limité des polymères Taille élevée des MS
Polycondensation interfaciale	MC	0,5-100	Membrane polymère semi-perméable Activité biologique protégée	Réaction possible entre le PA et les monomères Solubilité possible du PA dans les solvants
Polymérisation en milieu dispersé	MS	0,1-15	Technologie bien établie Coût relativement faible	Conditions de production industrielle incompatibles avec les normes pharmaceutiques
Spray-coating	MC	>100	Capacité de production élevée Coût de revient faible Simplicité de mise en oeuvre	Agglomération des particules < 100µm Faible homogénéité de l'enrobage Contraintes mécaniques
Spray-drying	MS/MC	1-50	Procédé facilement industrialisable	Pertes importantes sur les parois de l'appareil Morphologie irrégulière et PA en surface
ASES	MS	1-50	Bons rendements de fabrication PA polaire	Traces potentielles de solvant résiduel
RESS	MS	0,5-20	Absence de tout solvant Température de mise en œuvre peu élevée	Matière première doit être soluble dans le CO ₂ supercritique (polarité proche de l'hexane) MS très poreuses
Extrusion-broyage-sphéronisation	MS	>50	Absence de tout solvant Appareillage facilement disponible	PA doit être stable entre 70 et 150°C Nécessité d'un savoir-faire
Congélation de gouttes	MS	>200	Transposition d'échelle simple Distribution granulométrique très étroite	Taux d'encapsulation faibles Taille élevée des MS

Tableau 2 : Avantages et limites des procédés de microencapsulation - * MS : microsphères, MC : microcapsules, PA : principe actif

2. NANOPARTICULES

2.1. Caractéristiques générales

Les nanoparticules sont des systèmes colloïdaux dont la taille est comprise entre 10 et 1000 nm, à base de polymères généralement biodégradables, ou de lipides capables de retenir une ou des molécules actives par séquestration et/ou adsorption. Les nanoparticules d'oxyde de fer sont quant à elles commercialisées dans le domaine du diagnostic (Endorem[®], Sinerem[®]).

Les nanoparticules peuvent être de type matriciel, le principe actif est dispersé ou dissous dans la matrice de polymère, ou de lipides, on parle alors de nanosphères (NS). Les nanoparticules peuvent aussi être de type réservoir, il s'agit alors de nanocapsules (NC), constituées d'un cœur généralement liquide entouré d'une fine membrane de polymère généralement dont l'épaisseur ne dépasse pas quelques nanomètres. Des nanosuspensions de principe actif dépourvues de polymères et de lipides peuvent être obtenues en présence d'agents de surface. Le principe actif peut également être adsorbé à la surface des nanoparticules, profitant ainsi de la surface spécifique élevée due à la faible taille des nanoparticules. La figure 4 représente les différentes structures de nanoparticules.

Les nanoparticules polymères ont été développées dans les années 1970 comme une alternative aux liposomes, permettant d'obtenir une meilleure stabilité in vivo et durant le stockage. Les nanoparticules lipidiques offrent la possibilité d'éviter la présence de produits de dégradation des polymères.

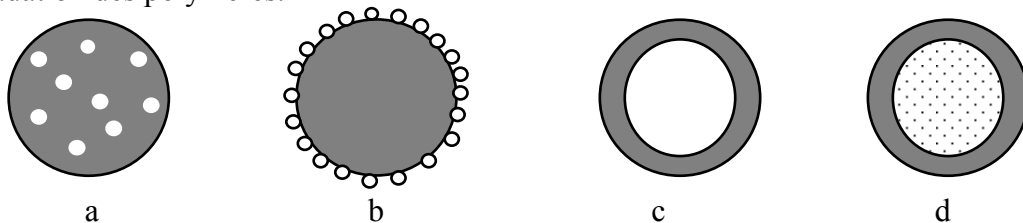


Figure 4 : Représentation schématique de nanoparticules. a : nanosphères (NS), b : nanosphères + principe actif adsorbé, c, d : nanocapsules (NC) principe actif dissous (c) ou dispersé(d)

Les nanoparticules présentent de nombreux intérêts par rapport aux autres formes vecteurs, essentiellement liés à leur faible taille permettant d'envisager l'administration parentérale et en particulier intraveineuse et leur grande surface spécifique qui facilite l'adsorption en surface et offre ainsi de meilleures possibilités de ciblage. Les nanoparticules se sont avérées être des vecteurs très intéressants pour de nombreux principes actifs administrés par voie parentérale, orale ou topique (anti-cancéreux, anti-inflammatoires, anti-fongiques, protéines...) en fonction de la nature des polymères ou des lipides utilisés.

De nombreuses techniques existent pour la préparation des nanoparticules ; ce qui a l'avantage d'offrir la possibilité de produire des nanoparticules de structure et propriétés physico-chimiques désirées. Le choix de la méthode dépend essentiellement des propriétés du principe actif (solubilité, coefficient de partage) et du matériau encapsulant (polymère ou monomère) ainsi que des propriétés souhaitées pour les particules. Pour le matériau encapsulant, le choix est déterminé principalement par des critères comme la biocompatibilité, la biodégradation, la voie d'administration et le profil de libération de principe actif.

Les méthodes de préparation des nanoparticules polymères sont basées soit sur des mécanismes de polymérisation de monomères soit sur l'utilisation de polymères préformés, afin de contourner les inconvénients liés à la polymérisation in situ. Les méthodes de préparation des nanoparticules lipidiques peuvent nécessiter quant à elles la mise en œuvre de méthodes spécifiques [5-7].

2.2. Méthodes de préparation utilisant des polymères préformés

Le principe de ces méthodes, développées plus récemment que les méthodes de polymérisation, consiste à insolubiliser un polymère préalablement dissous dans un solvant, pour former des nanoparticules solides. Les méthodes diffèrent essentiellement par le fait d'utiliser ou non une étape préalable d'émulsification et par la façon de provoquer l'insolubilisation du polymère. La figure 5 représente les principales méthodes décrites dans les paragraphes suivants.

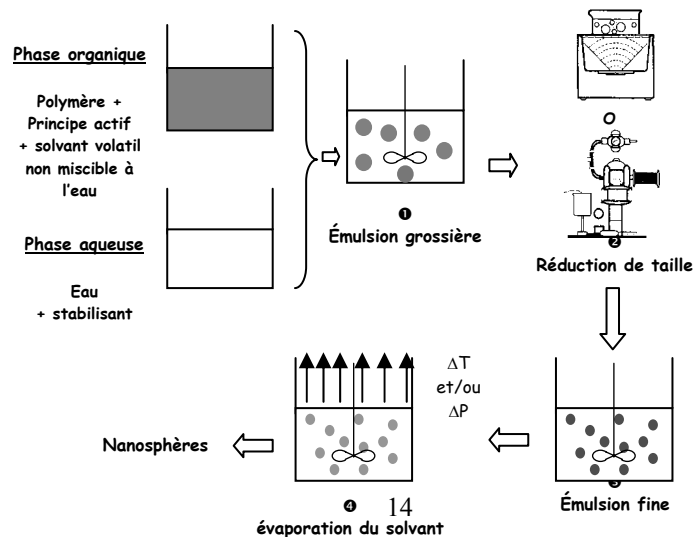
2.2.1. Emulsification - évaporation de solvant

Cette méthode est adaptée de celle permettant de produire des microparticules (paragraphe 1.2). Le polymère synthétique et le principe actif sont dissous dans une phase organique non miscible à l'eau. La solution ainsi obtenue est dispersée dans l'eau pour former une émulsion grossière. L'émulsion est ensuite traitée pour obtenir des gouttelettes plus fines (homogénéisateurs, ultrasons). L'élimination de la phase organique volatile sous l'effet de la chaleur, du vide ou encore sous l'action combinée des deux conduit à l'obtention des nanosphères : chaque gouttelette de l'émulsion donne naissance à une nanoparticule après évaporation de la phase organique (figure 5a).

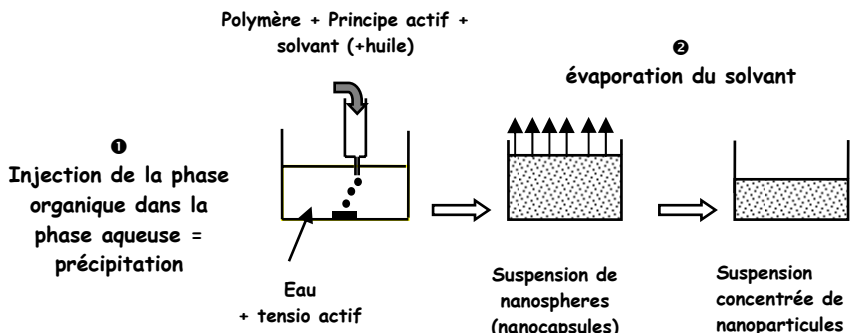
La technique d'émulsification-évaporation permet de produire des particules dont la taille dépend des conditions de l'étape d'homogénéisation et de réduction de taille. Elle est adaptée aux principes actifs lipophiles. Les PA hydrophiles qui diffusent vers la phase externe pendant l'émulsification ne sont donc pas piégés dans les particules.

2.2.2. Nanoprécipitation

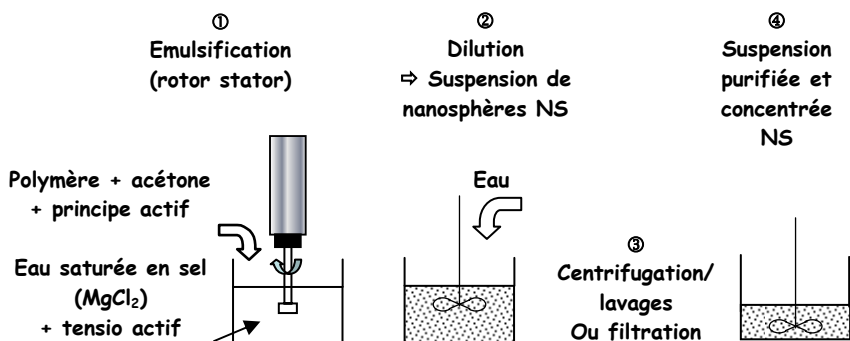
La technique de nanoprécipitation, décrite parfois sous le nom de « déplacement de solvant », permet de produire des nanosphères ou des nanocapsules. Elle consiste à dissoudre un principe actif et éventuellement une huile (pour des nanocapsules) dans une solution organique de polymère. Le solvant choisit est généralement un solvant semi polaire tel que l'acétone ou l'éthanol qui doit être miscible à l'eau en toutes proportions. Cette solution est injectée, sous agitation modérée, dans une phase aqueuse comprenant éventuellement un surfactant hydrophile, dans laquelle le polymère, l'huile (si elle est présente) et le principe actif ne sont pas solubles. Les nanoparticules se forment alors instantanément sous l'effet de la diffusion du solvant vers la phase aqueuse. Le polymère, insoluble dans le mélange eau-solvant précipite sous forme de nanosphères piégeant le principe actif. Dans le cas de nanocapsules, le polymère quitte les gouttelettes et se dépose à l'interface du fait de son insolubilité à la fois dans la phase externe (mélange eau-solvant) et dans l'huile. Le solvant organique est ensuite éliminé par évaporation sous pression réduite. Le procédé est schématiquement représenté sur la figure 5b.



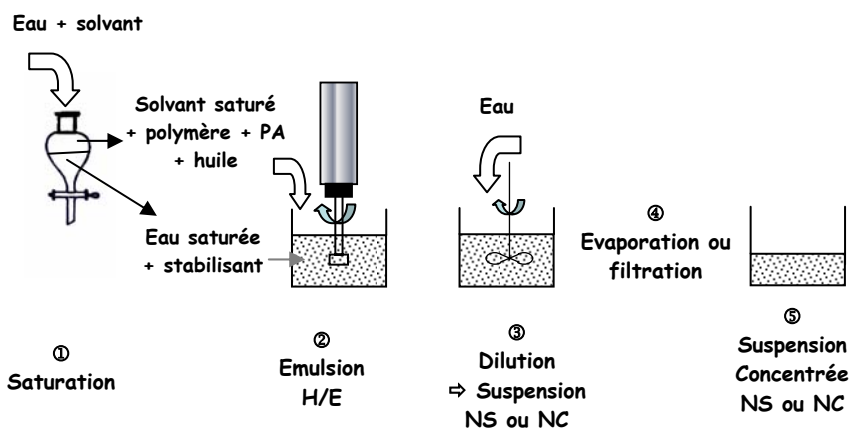
a) Méthode d'émulsification-évaporation de solvant - obtention de nanosphères



b) Procédé de nanoprécipitation – obtention de nanosphères ou nanocapsules



c) Méthode de « salting out » pour l'obtention de nanosphères



d) Méthode d'émulsification-diffusion - obtention de nanosphères ou nanocapsules

Figure 5 : Méthodes de préparation utilisant des polymères préformés

La méthode de nanoprécipitation présente l'avantage principal de ne pas utiliser d'énergie (agitation mécanique, ultra sons, homogénéisation haute pression) pour obtenir des particules de taille comprise entre 100 et 500nm. En effet, la formation des particules est spontanée et

instantanée si les conditions de miscibilité entre solvant et eau et de solubilité du polymère sont respectées. Tout comme la méthode précédente elle est bien adaptée aux principes actifs lipophiles. Les principes actifs hydrophiles conduisent eux à des rendements d'encapsulation très faibles dus à leur diffusion vers la phase aqueuse lors de la précipitation.

L'inconvénient majeur de cette technique est le manque de contrôle de la taille des particules obtenues, lié aux conditions opératoires (concentrations en polymère et stabilisant, nature du solvant).

2.2.3. « Salting out »

Contrairement au précédent, le procédé de salting out passe par une étape d'émulsification préalablement à la production de nanoparticules. Le polymère et le principe actif sont dissous dans un solvant organique miscible à l'eau, généralement l'acétone. Une émulsion huile/eau est obtenue en ajoutant, sous agitation mécanique vigoureuse (de type rotor stator), la solution organique dans une solution aqueuse saturée en électrolyte (chlorure de magnésium la plupart du temps) et contenant un stabilisant. La saturation de la solution aqueuse empêche la diffusion de l'acétone et permet l'obtention d'une émulsion. L'émulsion est ensuite diluée par une quantité suffisante d'eau afin de provoquer la diffusion de l'acétone vers la phase aqueuse et la formation des nanosphères par agrégation du polymère. Enfin, une dernière étape de purification (filtration ou cycles centrifugation/lavages) est nécessaire pour éliminer le sel et le solvant. Le schéma récapitulatif des étapes de préparation est donné figure 5c.

La méthode de salting out est, comme les précédentes, limitée aux principes actifs lipophiles. Elle permet un meilleur contrôle de la taille des particules cependant, une étape de purification est nécessaire afin d'éliminer le sel utilisé pour la saturation de la phase aqueuse. Il faut également s'assurer de la compatibilité des autres constituants (principe actif, tensio actif) avec le sel et vérifier la non toxicité de ce dernier.

2.2.4. Emulsification - Diffusion »

La méthode d'émulsification diffusion est une alternative à la méthode précédente permettant d'éviter l'utilisation d'un électrolyte dont l'élimination est parfois longue et difficile. Le principe est basé sur l'emploi d'un solvant partiellement miscible à l'eau (acétate d'éthyle par exemple). Le solvant et l'eau sont mutuellement saturés avant leur utilisation pour la préparation des phases organique et aqueuse. La phase organique contient le polymère, le principe actif et éventuellement une huile pour la production de nanocapsules, la phase aqueuse contient un stabilisant. L'émulsion est réalisée comme précédemment sous agitation mécanique de type rotor stator. Sa dilution provoque ensuite la formation de nanoparticules par diffusion du solvant vers la phase aqueuse externe. Le solvant est enfin éliminé par évaporation ou filtration selon sa volatilité. La méthode est représentée sur la figure 5d.

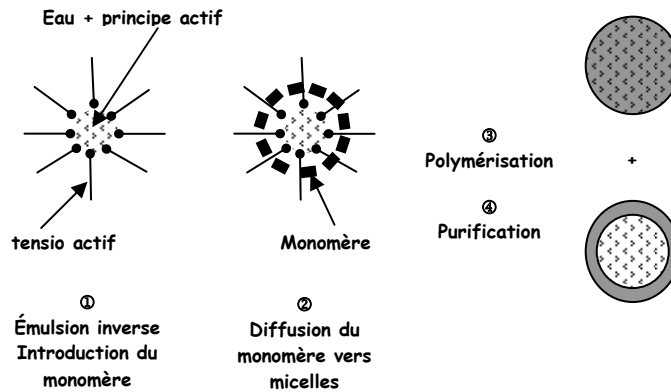
La technique d'émulsification diffusion permet l'obtention de nanoparticules de taille comprise entre 100 et 1000 nm contrôlée par l'étape d'émulsion, en étant adaptée aux principes actifs lipophiles. Elle permet la production de nanosphères ou de nanocapsules par ajout d'huile dans la phase organique.

2.3. Méthodes de préparation par polymérisation

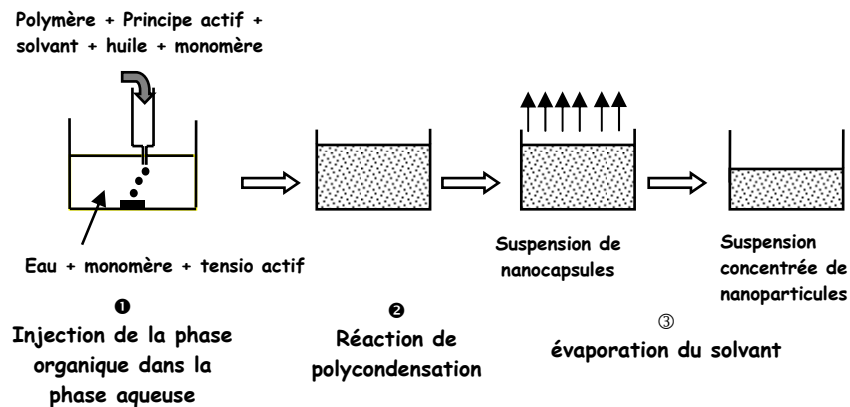
Il y a deux grandes approches pour la préparation des nanoparticules par polymérisation in situ : lorsque le monomère à polymériser est émulsionné dans un non-solvant, on parle de *polymérisation en émulsion*; dans le cas où le monomère est dissous dans un solvant qui se comporte comme un non-solvant du polymère à obtenir, on parle de *polymérisation en dispersion*.

2.3.1. Polymérisation micellaire : microémulsion inverse

Cette technique est employée pour préparer des nanosphères de polyacrylamide. Le principe actif est dissous dans la phase aqueuse interne émulsionnée dans une phase organique contenant des quantités importantes de tensio actif. Les monomères hydrophiles sont ajoutés à l'émulsion, ils diffusent vers les micelles inverses stabilisées par le tensio actif. La polymérisation est initiée par irradiation γ ou par voie chimique en présence d'un initiateur, elle aboutit à la formation de nanosphères ou nanocapsules qui peuvent être isolées et purifiées par ultracentrifugation ou dialyse.



a) polymérisation micellaire



b) Polycondensation interfaciale couplée à l'émulsification spontanée : nanocapsules

Figure 6 : Méthodes de polymérisation

Cette technique permet d'encapsuler essentiellement des principes actifs hydrophiles. Elle a l'inconvénient d'utiliser de grandes quantités de solvants organiques et de surfactants toxiques nécessitant des étapes de purification difficiles. D'autre part, l'absence de biodégradabilité du polymère est un handicap majeur pour l'utilisation de ces particules.

2.3.2. Polymérisation en dispersion

Le principe de la polymérisation en dispersion consiste à dissoudre un monomère hydrophile dans un milieu aqueux contenant éventuellement un surfactant non ionique. La polymérisation est directement initiée dans le milieu aqueux par irradiation γ ou par des agents chimiques (peroxodisulfate d'ammonium ou de sodium). La polymérisation conduit à la formation

d'oligomères qui, au-delà d'une certaine masse moléculaire, précipitent pour donner naissance à des particules primaires stabilisées par le surfactant. Enfin, ces particules fusionnent pour donner naissance à des nanoparticules. Le principe actif est introduit avant la formation (cas des P.A. hydrophiles) ou après la formation (cas des P.A. lipophiles) des nanoparticules. Cette méthode présente l'avantage de se développer en milieu aqueux contrairement à la précédente, cependant la polymérisation est initiée par voie chimique ou physique entraînant des risques de dégradation du principe actif et une purification nécessaire.

2.3.3. Polymérisation en émulsion : phase continue aqueuse

Ce procédé consiste à émulsionner un monomère insoluble ou partiellement soluble à l'eau dans une phase aqueuse additionnée d'une quantité importante de tensio actif. La méthode a été appliquée à la production de nanoparticules à base de polyalkylcyanoacrylates. Les monomères de type cyanoacryliques présentent en effet l'avantage de polymériser spontanément au contact des anions présents dans le milieu (polymérisation anionique). Les monomères lipophiles d'alkylcyanoacrylate sont émulsionnés dans une phase continue aqueuse contenant un principe actif et un stabilisant. Le principe actif peut être introduit dans le milieu réactionnel après la formation des nanosphères ; il est alors adsorbé en surface. La polymérisation est initiée par des ions hydroxydes (OH^-) présents dans le milieu aqueux et se propage soit au sein des micelles contenant les monomères (si le monomère est très lipophile) soit dans le milieu aqueux puis dans les micelles (si le monomère n'est pas très lipophile). La vitesse de polymérisation est dépendante du pH du milieu. A pH trop élevé, la polymérisation est très rapide et conduit à la prise en masse ; inversement à pH trop faible, le ralentissement de la polymérisation conduit à la formation de grosses particules. Le pH doit se situer dans un intervalle idéal de 2 à 3 afin d'assurer l'obtention de nanosphères monodispersées de l'ordre de 200nm. Cette acidité du milieu représente l'inconvénient majeur de cette technique, elle peut en effet nuire à la stabilité de certains principes actifs.

2.3.4. Polymérisation interfaciale

La polymérisation interfaciale est pratiquement la seule technique de polymérisation conduisant à des nanocapsules. Elle est appliquée aux monomères cyanoacryliques décrits précédemment ainsi qu'aux polymères classiques en polycondensation interfaciale (polyamide, polyurée... du paragraphe 1.2). Dans les deux cas, le phénomène d'émulsification spontanée par diffusion du solvant (similaire à celui intervenant dans la nanoprecipitation au paragraphe 2.2) est utilisé pour la formation de nanoémulsion suivie de polymérisation à l'interface.

Dans le cas des cyanoacrylates, les monomères sont dissous dans une solution d'éthanol contenant une huile et un principe actif. Cette solution est ensuite injectée dans une phase aqueuse contenant un tensio actif, la diffusion de l'éthanol provoque la formation instantanée de nanogouttelettes. Parallèlement les monomères s'orientent à l'interface huile/eau et la polymérisation est initiée par les ions OH^- du milieu à pH neutre (4-10) résultant en la formation d'une membrane de polymère autour des gouttes huileuses. Cette méthode a également été adaptée à l'encapsulation de principes actifs hydrophiles en travaillant en phase externe organique, ce qui requiert cependant une étape supplémentaire de purification.

La deuxième méthode, représentée sur la figure 3b, consiste à introduire un monomère dans chacune des phases organique et aqueuse. La solution organique est alors composée d'un solvant polaire miscible à l'eau (acétone, alcool), d'une huile, d'un principe actif et du monomère lipophile ; la phase aqueuse contient le monomère hydrophile et un tensio actif. Comme précédemment, la diffusion du solvant dans l'eau provoque la formation de nanogouttelettes, la réaction entre les deux monomères à l'interface conduit à la formation de

la membrane des capsules. Selon le choix des monomères, cette méthode peut être appliquée à la formation de membrane en polyamide (chlorure d'acide + amine), polyurée (isocyanate + amine), polyuréthane (isocyanate + alcool).

Les méthodes d'encapsulation utilisant la polymérisation permettent de produire des nanosphères et des nanocapsules de petite taille (inférieure à 500 nm). Plusieurs techniques de polymérisation ont été développées, adaptées à l'encapsulation de principes actifs lipophiles ou hydrophiles avec des efficacités d'encapsulation importantes. Malgré des efforts permettant de réduire les quantités de solvants organiques et de surfactants utilisés, la présence de monomères et oligomères mal connus et potentiellement toxiques dans le milieu réactionnel reste un inconvénient majeur de ces techniques. D'autre part, le contrôle de la polymérisation conduisant à la formation d'un polymère de masse molaire définie est parfois difficile et les risques de dégradation du principe actif dans le milieu réactionnel sont une autre limite.

En comparaison les méthodes utilisant des polymères synthétiques biodégradables décrites au paragraphe 2.2. permettent également de former des nanosphères ou nanocapsules de taille variable (100 – 1000nm) avec des polymères dont les propriétés sont bien définies. Les étapes de purification des monomères résiduels et tensio actif (utilisé en faible quantité) ne sont plus nécessaires, cependant l'utilisation de solvant organique peut être une limite à ces techniques. Elles sont plus généralement appliquées aux principes actifs lipophiles, l'efficacité d'encapsulation de principes actifs hydrophiles est très faible.

2.4. Méthodes de préparation de nanoparticules lipidiques

Ces particules sont de 2 types :

2.4.1. Nanoparticules lipidiques solides

Dans ce cas les lipides (triglycérides, mélanges de glycérides ou des cires) qui constituent la matrice des particules ont la particularité d'être à l'état solide à température ambiante et à température du corps.

La principale technique de fabrication de ces particules repose sur le principe d'homogénéisation à haute pression à température élevée ou à température inférieure à la température ambiante, suivant la sensibilité des PA à la chaleur.

Dans le premier cas on prépare au dessus de la température de fusion des lipides une pré-émulsion sous une forte agitation de la phase lipidique dans une phase aqueuse associée à des agents de surface, avant de la soumettre à plusieurs cycles de plusieurs centaines de bars de pression au sein d'un homogénéisateur. Une recristallisation s'opère après refroidissement.

A froid il s'agit dans un premier temps de disperser des particules de lipides et de PA finement broyées, dans l'eau associée à des agents de surface sous forme d'une suspension avant de les homogénéiser dans les mêmes conditions que précédemment.

Des techniques de préparation à partir d'un système de microémulsification formé à chaud et dispersé dans l'eau froide ou d'émulsification-évaporation ou d'émulsification-diffusion en dissolvant les lipides dans des solvants organiques adaptés sont aussi rapportées (voir 2.2.).

2.4.2. Nanocapsules lipidiques

Ces particules sont constituées d'un cœur huileux à base de triglycérides recouvert d'une paroi rendue rigide par l'association d'un couple d'agent de surface lécithine / Solutol HS15[®] (hydroxystéarate de polyéthylène glycol 660 et polyéthylène glycol 660 libre). La préparation est basée sur un procédé par inversion de phase obtenue en faisant varier la température du

mélange des excipients au dessus et au dessous de la température d'inversion de phase du système. Dans un deuxième temps le mélange d'huile et de surfactifs soumis à des cycles de température subit un choc thermique irréversible avec une dilution dans de l'eau à une température proche de 0°C qui rigidifie la membrane. Les objets obtenus présentent une structure de nanocapsules à cœur lipophile de granulométrie monodisperse dans une gamme de taille allant de 20 à 100 nm et contrôlable en fonction des proportions respectives de départ.

2.5. Caractérisation

Les propriétés physicochimiques des nanoparticules sont en relation avec leur capacité d'encapsulation et de stockage du principe actif d'une part, mais interviennent aussi sur les interactions avec les membranes biologiques et les profils de libération. Ces propriétés sont principalement la distribution de taille, la nature et l'épaisseur de la membrane, la charge en surface, l'hydrophobie. La mesure du taux d'encapsulation ainsi que les études de libération du principe actif in vitro permettent aussi de caractériser les nanoparticules.

2.5.1. Distribution de taille et structure

La distribution de taille des nanoparticules est généralement mesurée par des techniques de granulométrie laser en milieu dilué, basées sur la diffusion quasi élastique de la lumière associée au mouvement Brownien des particules. En effet, les nanoparticules en suspension sont en mouvement constant et aléatoire fonction de leur faible taille. Les fluctuations d'un faisceau laser traversant la suspension sont reliées à la taille des nanoparticules. Les granulomètres lasers spécifiques aux systèmes dispersés de taille submicronique permettent d'obtenir une mesure simple et rapide de la distribution de taille des particules.

La taille des particules peut également être déterminée par observation microscopique et analyse des images obtenues. La microscopie électronique (à balayage ou à transmission) est nécessaire pour atteindre la résolution suffisante à l'observation des nanoparticules. La microscopie électronique à balayage (MEB) permet d'obtenir des informations basiques sur la forme des particules et leurs caractéristiques de surface, la microscopie à force atomique (AFM) peut être utilisée pour accéder aux détails de la morphologie, elle conduit à des images en trois dimensions de la surface des particules. La microscopie électronique à transmission (MET) est plus utilisée pour déterminer la distribution de taille et la structure des particules, elle peut être associée à une étape de préalable de cryofracture. Il est ainsi possible de confirmer la structure vésiculaire ou matricielle des particules ainsi que d'estimer l'épaisseur de la membrane dans le cas des capsules (quelques nanomètres en général). La structure des nanoparticules peut également être déterminée par des mesures de densité en utilisant une technique de centrifugation sur gradient de densité qui permet de séparer les particules en fonction de leur densité. La densité des nanocapsules est en effet inférieure à celle des nanosphères qui contiennent plus de polymère et supérieure à celle des nanoémulsions qui n'en contiennent pas du tout.

2.5.2. Propriétés de surface

La propriété la plus évidente des systèmes dispersés de type nanoparticules est leur grande aire interfaciale inversement proportionnelle à leur taille. Cette surface a une charge qui influence la stabilité des systèmes d'une part et leurs interactions avec le milieu biologique d'autre part.

La caractérisation de surface des particules passe par la mesure du potentiel Zéta qui représente le potentiel de surface dû à la présence de charges provenant du polymère ou des

tensio actifs adsorbés. Le potentiel Zéta peut être mesuré par l'intermédiaire de la mobilité électrophorétique des particules (déplacement dans un champ électrique), il permet de prédire la stabilité des nanoparticules en suspension et les interactions par attractions électrostatiques. Il est généralement admis qu'une valeur élevée, supérieure à 30mV en valeur absolue, est nécessaire pour garantir la stabilité de la dispersion.

L'hydrophobie de surface peut être approchée par adsorption de fluorochrome hydrophobe ou par la mesure d'angle de contact. Des techniques de spectroscopie aux rayons X développées récemment permettent l'identification chimique des éléments présents en surface des particules.

La modification de l'état de surface des nanoparticules est une technique envisagée afin d'augmenter les potentialités de ciblage de ces vecteurs. Il est en effet reconnu que la présence de groupes hydrophiles en surface permet de réduire la capture des particules par les macrophages et de prolonger ainsi le temps de résidence dans la circulation après administration intraveineuse : on parle alors de vecteurs furtifs. Généralement le polyéthylène glycol est utilisé comme groupe hydrophile, sa présence en surface peut être obtenue soit par adsorption de tensio actif sur les nanoparticules, soit en utilisant des copolymères à base de PEG pour la formation des particules. De nombreux travaux sont également développés pour coupler en surface des nanoparticules des éléments de reconnaissance (anticorps monoclonaux, sucres, peptides...) afin d'accroître leur capacité de vectorisation et donc leur spécificité d'action.

2.5.3. Capacité d'encapsulation

La capacité d'encapsulation dépend à la fois des propriétés du principe actif et du procédé utilisé. Elle est généralement supérieure pour les principes actifs lipophiles sauf si la production des particules se fait en phase externe organique.

La mesure de l'efficacité d'encapsulation se fait après séparation des nanoparticules du milieu par ultrafiltration et/ou ultracentrifugation. La quantité de principe actif contenue dans les particules est alors dosée après dissolution, la quantité de principe actif non encapsulé dans la phase externe peut également être dosée. L'efficacité d'encapsulation est alors décrite comme le rapport entre la quantité de principe actif initialement introduite dans la formule et la quantité incorporée dans les nanoparticules. Elle dépend de la solubilité du principe actif dans le cœur huileux pour les nanocapsules, de son coefficient de partage entre les phases organique et aqueuse, de la concentration initiale et des interactions éventuelles polymère/principe actif. La capacité d'incorporation est bien sûr très supérieure pour les nanocapsules, le rapport principe actif/polymère est alors élevé (>1) alors qu'il est généralement inférieur à 0,5 pour les nanosphères.

2.5.4. Libération *in vitro*

La libération du principe actif *in vitro* dans différents milieux caractéristiques permet d'évaluer le comportement des nanoparticules après administration. Les études de libération sont confrontées à des difficultés liées à la faible taille des particules. La séparation du principe actif libéré dans la phase externe par rapport aux nanoparticules en est une. La méthode par dialyse permet d'éviter la séparation, les nanoparticules étant séparées du milieu récepteur par une membrane perméable au principe actif. Le couplage entre centrifugation et filtration permet également d'accéder à la quantité de principe actif libéré. Enfin il est également possible de mesurer *in situ* par spectrométrie le principe actif libéré et dissous dans la suspension, s'il possède des propriétés spectroscopiques différentes de celle du principe actif contenu dans les particules.

La libération du principe actif dépend essentiellement de sa solubilité dans le milieu externe, de son coefficient de partage entre les phases, du milieu et des volumes de dilution utilisés pour la mesure, mais aussi des propriétés des particules : taille, structure de la particule, nature et épaisseur de la membrane. Le mécanisme de dégradation éventuelle ou de gonflement du polymère est également un élément influençant la libération.

2.5.6. Stabilité

La stabilité des nanoparticules sous entend la stabilité physique de la dispersion, la stabilité chimique du système ainsi que la stabilité de l'encapsulation. La stabilité physique de la dispersion correspond à l'absence de sédimentation ou d'agglomération, elle peut être évaluée par des contrôles de distributions de taille qui doivent restées inchangées lors du stockage. La stabilité peut être améliorée en ajoutant un dispersant dans la préparation. Dans le cas des nanoparticules lipidiques solides, les lipides utilisés possèdent plusieurs formes cristallines vers lesquelles ils peuvent évoluer en modifiant l'encapsulation et la libération des actifs.

La stabilité chimique permet d'assurer la non dégradation du polymère ou des phospholipides. Elle peut être suivie par mesure de la variation éventuelle de la masse molaire du polymère ou par une modification du pH du milieu.

Il est également nécessaire de s'assurer de la permanence de l'encapsulation, en vérifiant que la charge des nanoparticules en principe actif n'évolue pas au cours du temps au stockage et qu'il n'y a pas de dégradation du principe actif encapsulé.

La stabilité physicochimique des nanoparticules à long terme peut être améliorée en ajoutant une étape de séchage des suspensions. La lyophilisation est alors généralement utilisée, elle permet, moyennant l'utilisation d'agents cryoprotecteurs et le choix des conditions opératoires (en particulier lors de la congélation) de présenter les nanoparticules sous forme de poudre aisément redispersible dans l'eau.

3. LIPOSOMES

3.1. Caractéristiques générales

Les liposomes sont des structures vésiculaires constituées de bicouches de molécules amphiphiles qui délimitent deux compartiments aqueux : un compartiment aqueux interne ou cavité aqueuse et un compartiment aqueux externe dans lequel les vésicules se trouvent en suspension. Les méthodes de préparation des liposomes sont nombreuses et peuvent aboutir à la formation de plusieurs types de vésicules différant par leur taille, leur structure et leur capacité d'encapsulation. Selon la méthode utilisée, il est possible d'obtenir des vésicules de type multi ou oligo ou unilamellaires. Les liposomes multi ou oligolamellaires (MLV ou OLV "multi ou oligolamellar vesicles") ont un diamètre moyen qui varie généralement de 400 nm à quelques μm . Les liposomes unilamellaires peuvent être de grande taille (LUV ou "large unilamellar vesicles") avec un diamètre moyen allant de 80 nm à 1 μm ou de petite taille (SUV ou "small unilamellar vesicles") avec un diamètre moyen variant de 20 à 80 nm.

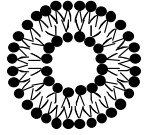
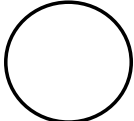


			
DENOMINATION	LUV	MLV/OLV	SUV
DIAMETRE (nm)	80-1000	100-4000	20-80

Table 3 : Caractéristiques des principaux types de liposomes

3.1.1. Lipides des liposomes conventionnels

La membrane des liposomes est généralement composée d'un mélange de substances lipidiques. Les phospholipides entrant dans la composition des liposomes sont soit des glycérophospholipides d'origine naturelle ou synthétique, saturés ou insaturés, soit des sphingolipides. L'addition de phospholipides chargés négativement (10 mol%) permet de diminuer les phénomènes d'agrégation des vésicules entre elles. Par ailleurs, le cholestérol, ajouté dans une proportion de 30 mol%, améliore la stabilité *in vitro* et *in vivo* des liposomes. Enfin, des agents antioxydants, tels l' α -tocophérol, le BHT ou le BHA (butylhydroxytoluène, butylhydroxyanisole) sont utilisés pour réduire les phénomènes d'oxydation des liaisons insaturées des chaînes acylées des phospholipides.

Les phospholipides insaturés sont des molécules qu'il est important de manipuler avec précaution afin de diminuer les risques d'oxydation en présence de l'oxygène de l'air. Les phénomènes d'oxydation peuvent donner naissance à des peroxydes, qui sont des composés toxiques. Les phospholipides doivent être conservés sous leur forme solide ou en solution à -20°C ou à -70°C , en présence d'azote ou d'argon. Les solutions doivent être conditionnées dans des tubes scellés de façon hermétique ou dans des ampoules injectables, à l'abri de la lumière. Les solvants les plus couramment utilisés pour dissoudre les phospholipides sont, soit le chloroforme pur, soit un mélange méthanol/chloroforme (1/2 : v/v). Les phospholipides en solution peuvent être facilement dosés par la détermination du phosphore inorganique.

Le choix de l'utilisation d'autres phospholipides dépend des caractéristiques physico-chimiques des molécules associées aux liposomes et de leur site d'action.

3.1.2. Lipides cationiques

Les lipides cationiques sont de deux types. Ils peuvent être monovalents (une seule charge positive) ou multivalents (plusieurs charges positives). Leur utilisation se limite à la condensation des acides nucléiques. Par conséquent, les liposomes cationiques n'encapsulent pas les acides nucléiques mais sont associés physiquement à ces molécules. Lorsque ce mélange est réalisé avec un excès de liposomes cationiques, ces derniers sont capables de condenser les acides nucléiques par des interactions entre leurs charges positives et les charges négatives des groupements phosphates provenant des acides nucléiques. Ces complexes, dénommés « lipoplexes » favorisent l'internalisation intracellulaire de l'ADN, des oligonucléotides antisens ou des SiRNA.

3.1.3. Lipides sensibles au pH

Les liposomes pH-sensibles sont préparés à partir d'un phospholipide particulier, la dioleoylphosphatidyléthanolamine. Cette molécule s'assemble sous forme de liposomes à pH neutre notamment en présence de molécules chargées négativement qui stabilisent la structure lamellaire par répulsion électrostatique (acide oléique, cholestérol hémisuccinate...). Cependant, la structure vésiculaire se déstabilise à pH acide. Deux objectifs peuvent être envisagés:

- Au niveau tissulaire, il est possible d'obtenir une libération sélective de principes actifs dans certains tissus pathologiques caractérisés par un pH différent de celui des tissus normaux : par exemple, des sites faisant l'objet d'une inflammation ou d'une infection
- Au niveau cellulaire, il est possible de faire échapper le contenu des liposomes au compartiment lysosomal riche en enzymes susceptibles de dégrader certains principes actifs. Les liposomes pH-sensibles sont en effet rapidement déstabilisés après endocytose, par le pH acide des endosomes, permettant ainsi au principe actif d'être directement libéré dans le cytoplasme sans passer par le compartiment lysosomal.

3.1.4. Lipides sensibles à la température

Les phospholipides sont caractérisés par une température de transition de phase (T_c) pour laquelle les liposomes se trouvent à l'état « gel » en dessous de cette valeur et à l'état dit « fluide » au dessus de la T_c . L'état fluide se traduit par une grande perméabilité vis-à-vis des molécules encapsulées dans la cavité aqueuse. Si la T_c est légèrement supérieure à la température du corps humain, l'application d'une hyperthermie locale va entraîner la libération immédiate du principe actif au niveau d'un site local défini.

3.1.5. Lipides couplés avec des PEG

Le couplage de molécules de polyéthylène glycol (PEG) de bas poids moléculaire (2000 ou 5000 g/mol) aux phospholipides permet la formulation de liposomes dits «furtifs». Pour réaliser de telles vésicules, les molécules de phosphatidyléthanolamine sont couplées chimiquement à un carboxy-PEG via une liaison amide. Capables d'échapper à la reconnaissance par les macrophages du système des phagocytes mononucléés, ces liposomes possèdent une demi-vie plasmatique très longue.

3.1.6. Lipides couplés à des ligands

Les ligands sont généralement, attachés à la surface des liposomes par une association avec des ancrs hydrophobes possédant des groupes fonctionnels. Ces ancrs sont soit des acides gras (acide palmitique), soit des phospholipides tels que la phosphatidyléthanolamine et le phosphatidylinositol. Ces molécules sont incorporées dans la membrane des liposomes au moment de leur préparation. Deux approches sont utilisées pour le couplage covalent des ligands. La première consiste en un couplage préalable du ligand. Dans la seconde méthode, le ligand est couplé aux lipides une fois les liposomes formés. Les lipides les plus efficaces pour

le ciblage actif sont ceux contenant des PEG tels que le maléimidométhylcyclohexane-carboxylate-PEG-DSPE ou le maléimidophénylpropionate-PEG-DSPE. Le groupement maléimide étant réactif et capables de former des thioéthers en présence de protéines contenant des groupements thiols. Les ligands couplés peuvent être de différentes natures. Le plus souvent, il s'agit d'anticorps ou de fragments d'anticorps reconnus par des cellules tumorales ou encore de sucres reconnus par des lectines tel que le galactose ou le mannose reconnus par les hépatocytes et les macrophages hépatiques, respectivement.

Les principaux liposomes commercialisés sont des formulations contenant de l'amphotéricine B, un antifongique systémique (AmBisome® commercialisé par Gilead Sciences/Fujisawa Healthcare), et des agents anti-cancéreux, la daunorubicine (DaunoXome® commercialisé par Gilead Sciences) et la doxorubicine (Caelyx® commercialisé par Schering Plough ou le Myocet® commercialisé par Zeneus pharma).

Pour toute formulation de liposomes, le choix de la méthode de préparation dépend non seulement de la composition lipidique, de la structure des liposomes (uni ou multilamellaires) et de leur taille mais aussi en fonction de critères de stabilité et de devenir *in vivo*. Les volumes et les taux d'encapsulation doivent être élevés si l'on veut encapsuler des quantités importantes de macromolécules tout en limitant les volumes à administrer. La méthode de préparation ne doit pas être agressive vis-à-vis des substances à encapsuler. Enfin, la simplicité, la rapidité ainsi que la possibilité de mise en oeuvre à l'échelle industrielle sont aussi des paramètres importants.

La plupart des méthodes de préparation des liposomes font appel aux étapes suivantes:

- dissolution des lipides dans un solvant organique;
- élimination du solvant organique (évaporation sous vide, filtration dialysante);
- dissolution de la substance à encapsuler dans la solution organique ou dans la solution aqueuse en fonction de sa balance hydrophile/lipophile;
- élimination des substances non encapsulées par des techniques de séparation: filtration sur gel, dialyse, centrifugation.

Les méthodes de préparation des liposomes décrites diffèrent généralement par le mode de dispersion des phospholipides dans la phase aqueuse (figure 7). Des techniques complémentaires permettent ensuite d'optimiser la taille et la charge en principe actif des liposomes formés [8, 9].

3.2. Méthodes de préparation par réhydratation de film suite à l'évaporation du solvant organique

Cette technique initiée dès les années 60 consiste à évaporer une solution organique (généralement du chloroforme) de phospholipides jusqu'à la formation d'un film phospholipidique sur les parois du récipient avant de le réhydrater à une température supérieure à la température de transition de phase gel-cristal liquide (T_c) des phospholipides utilisés dans la préparation. Au cours de la préparation, le film phospholipidique, au contact de la solution aqueuse, gonfle, puis se décolle des parois du ballon pour former spontanément des vésicules de type MLV. Le diamètre des vésicules obtenues par cette méthode est très élevé, de l'ordre de quelques micromètres et la distribution de la taille est très hétérogène. Les techniques d'homogénéisation telles que les ultrasons, l'extrusion ou la microfluidisation (voir paragraphe 3.5.) permettent de réduire la taille et l'hétérogénéité des vésicules. Enfin, le faible volume aqueux encapsulé peut être augmenté par addition de 10 à 20 mol% de lipides chargés. Les taux d'encapsulation peu élevés (2 à 15%) peuvent être majorés par une

augmentation de la durée d'hydratation qui par contre entraîne une augmentation du diamètre des vésicules.

3.3. Méthodes fondées sur la dispersion d'une solution organique de phospholipides

3.3.1. Injection d'une solution organique de phospholipides

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

3.3.2 Evaporation en phase inverse

Afin d'améliorer le rendement d'encapsulation des liposomes, une méthode de préparation, dite d'évaporation en phase inverse (REV) a été mise au point afin de permettre de préparer des liposomes LUV constitués d'une grande cavité aqueuse. Dans ce procédé, les phospholipides sont dissous dans un solvant organique tel que l'éther éthylique. La phase aqueuse est ensuite ajoutée à un excès de phase organique émulsionnée aux ultrasons (H/L), avec des lipides se plaçant à l'interface. L'élimination du solvant par évaporation sous pression réduite conduit au rapprochement des micelles inverses puis à la formation d'un gel. Au cours de cette étape, les micelles inverses, formées de monocouches de phospholipides entourant des compartiments aqueux, s'agrègent pour former un réseau compact gélifié. Au cours de l'étape suivante, la pression est réduite davantage afin de favoriser l'évaporation totale de l'éther. Ceci entraîne la rupture de la phase gel et le rapprochement des monocouches pour former des liposomes. Les vésicules ainsi obtenues sont unilamellaires avec un diamètre moyen de 0,5 μm et une encapsulation maximale de la phase aqueuse (65%) en présence d'une solution de faible force ionique (0,01M NaCl). La filtration des liposomes sur des membranes de polycarbonate de diamètre de pores décroissants jusqu'à 0,1 μm permet d'obtenir des liposomes homogènes d'un diamètre moyen de 150 nm mais en diminuant le taux d'encapsulation de 48 à 12%. Un excès de lipides augmente le volume d'encapsulation et le taux d'encapsulation de ces liposomes.

3.4. Méthodes par élimination de détergents au sein de micelles mixtes

Dans cette méthode, les phospholipides sont d'abord dispersés, en milieu aqueux, à l'aide d'un détergent. Il se forme alors des micelles mixtes. Ensuite, le détergent est éliminé par dialyse, filtration sur gel ou par adsorption par des polymères. Au fur et à mesure de cette élimination, les micelles s'enrichissent en phospholipides et finalement, deviennent coalescentes pour former les vésicules unilamellaires de type SUV ou LUV. Les détergents non ioniques (Tween 20[®], Triton[®] X100) qui possèdent, à l'exception de l'octyl glucoside, une concentration critique pour la formation de micelles (CCFM) faible et un nombre d'agrégation élevé sont plus difficiles à éliminer que les détergents ioniques qui ont une CCFM élevée et un faible nombre d'agrégation.

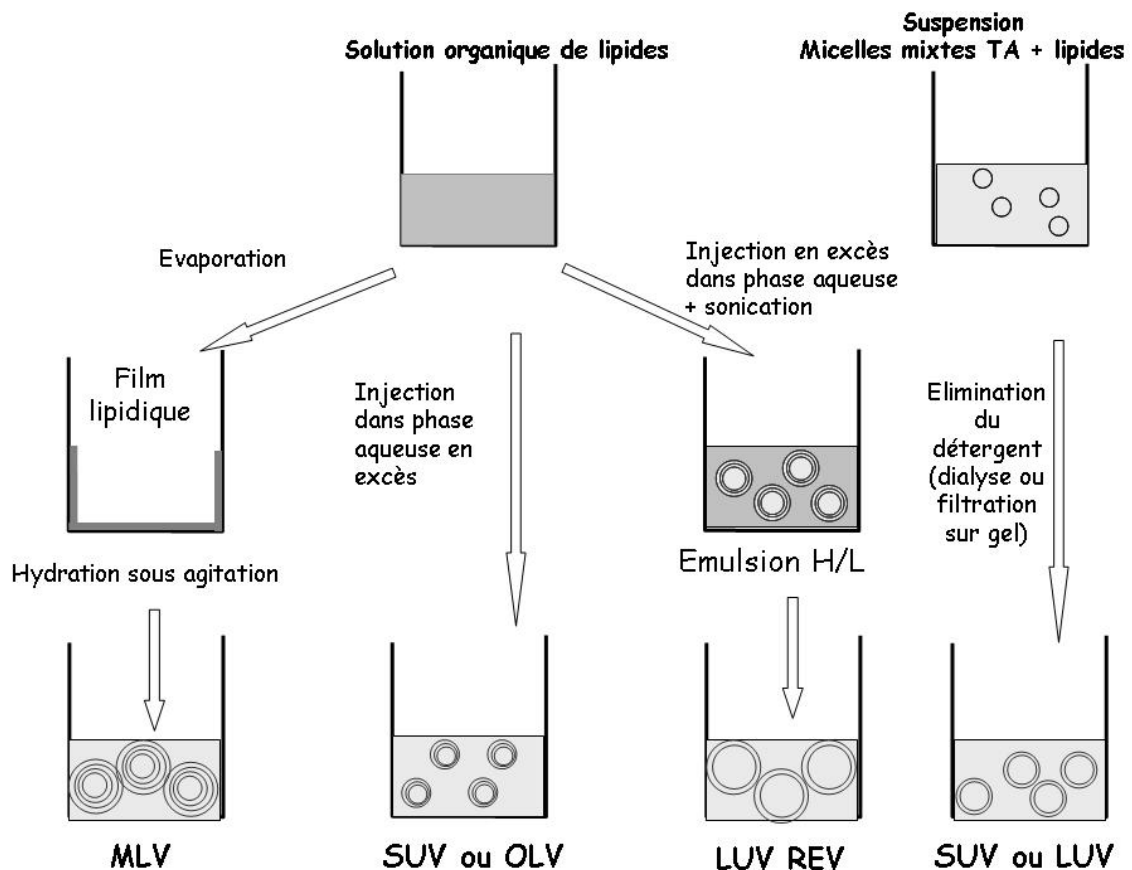


Figure 7 : Méthodes de formation des liposomes

3.5. Méthodes de réduction de taille des vésicules

3.5.1. Utilisation des ultrasons

Afin de réduire le diamètre des liposomes MLV, obtenus par hydratation d'un film phospholipidique, la suspension liposomale peut être soumise à l'action des ultrasons dans un bain ou plus efficacement à l'aide d'une sonde pour former des SUV de 20 à 50 nm. Cette taille très réduite de vésicules limite fortement les volumes encapsulés et les taux d'encapsulation (< 1%). Il est possible en fin de préparation d'éliminer tous les liposomes MLV qui contaminent la suspension en les centrifugeant à grande vitesse.

3.5.2. Extrusion sur des membranes de polycarbonate

Ce procédé consiste à calibrer la taille des liposomes MLV ou des LUV en les faisant passer à travers des membranes, dont le diamètre des pores est bien défini. Quand les liposomes sont filtrés sous faible pression d'azote sur des cellules de filtration munies de plusieurs membranes en polycarbonate de diamètres de pores décroissants (1 - 0,8 - 0,6 - 0,4 - 0,2 μm) les diamètres descendent jusqu'à 200-300 nm. Avec des pressions d'azote atteignant 800 psi les réductions de taille vont jusqu'à 60-100 nm après 5 à 10 passages sur des membranes de 0,1 μm . Le volume aqueux encapsulé est assez faible, entre 1 et 3 $\mu\text{l}/\mu\text{mol}$ de lipides et les taux d'encapsulation varient entre 5 à 30%.

3.5.3. Microfluidisation

Cette technique permet d'homogénéiser les suspensions de liposomes MLV. La suspension de vésicules passe par l'intermédiaire d'une pompe, sous de fortes pressions (10000 psi), à travers

un filtre, comportant des pores de 5 μm de diamètre, pour se retrouver ensuite dans une chambre d'interaction. A ce niveau, les fluides sont séparés en deux canaux qui se rejoignent au bout de la chambre à des vitesses très importantes (>500 m/s). Des collisions de vésicules se produisent et s'accompagnent d'un transfert d'énergie élevé. Le choc des particules entre elles provoque la rupture des grandes vésicules qui se reforment pour donner de petites vésicules de taille homogène. Ainsi, au bout de deux passages de liposomes MLV, le diamètre diminue jusqu'à 0,1-0,2 μm . Après 10 passages, les liposomes obtenus sont des SUV avec un diamètre inférieur à 0,1 μm .

3.6. Méthodes pour augmenter l'encapsulation des principes actifs

Les substances actives sont généralement ajoutées au cours du procédé de fabrication des liposomes par encapsulation dite passive dans la phase au sein de laquelle elles sont les plus solubles : phase organique pour les PA lipophiles, phase aqueuse pour les PA hydrophiles. Afin de majorer la faible capacité d'encapsulation des molécules hydrophiles dans certains cas, différentes méthodes de préparation ont été développées :

3.6.1. Encapsulation passive

Dispersion de liposomes deshydratés

Cette méthode consiste à disperser dans une solution aqueuse de produit à encapsuler, une suspension de liposomes SUV préformés préalablement lyophilisée. Après reconstitution par une solution aqueuse de faible volume, on obtient des liposomes dont le diamètre moyen est inférieur à 1 μm et qui autorisent des pourcentages d'encapsulation élevés, de l'ordre de 40%. Contrairement aux lipides séchés par évaporation de solvant, les SUV lyophilisés conservent leur structure membranaire. Au moment de l'hydratation du lyophilisat, les membranes des SUV fusionnent pour former des vésicules multilamellaires avec un volume d'encapsulation important.

Une modification de cette méthode consiste à sécher les lipides sur des particules de chlorure de sodium ou de sorbitol. On obtient ainsi une poudre déshydratée connue sous le nom de "proliposome". Après hydratation, le film phospholipidique formé sur les particules gonfle pendant que le support pulvérulent se dissout rapidement. Il se forme par cette technique des liposomes MLV.

Dispersion de liposomes congelés

Dans ce procédé de préparation, les liposomes SUV et le soluté à encapsuler sont congelés dans de l'azote liquide puis ensuite ramenés à température ambiante. A ce stade, une sonication permet de réduire la perméabilité des vésicules en accélérant la disparition des défauts des membranes qui surviennent lors de la congélation. Il est ainsi possible d'obtenir par cette technique des vésicules qui possèdent un volume d'encapsulation de l'ordre de 10 $\mu\text{l}/\mu\text{mol}$ de lipides avec des taux d'encapsulation de 30%. Les liposomes formés sont des LUV et résultent de la fusion des liposomes SUV de départ. Cette technique n'est réalisable qu'en présence d'une charge au sein des lipidiques des vésicules et sans cryoprotecteurs comme le saccharose, ou sans cations divalents ou encore de solutions à force ionique élevée. Les LUV obtenus sont extrudables pour former des vésicules entre 50 et 150 nm.

3.6.2. Encapsulation dite active par création de gradient de concentration

L'encapsulation dite active consiste à introduire les substances à encapsuler dans des liposomes préformés. La principale technique développée au niveau industriel consiste à charger les liposomes par création d'un gradient de pH transmembranaire soit en production

soit extemporanément au chevet du patient. Un tampon alcalin extraliposomal permet aux principes actifs, qui sont des bases faibles, de perdre leur charge et ainsi de diffuser au travers de la bicouche lipidique des liposomes préformés, avant de s'ioniser et d'être piégés au contact de la cavité lipidique interne acidifiée. Des taux d'encapsulation de plus de 90% avec des fuites très limitées sont ainsi obtenus. Une autre méthode d'encapsulation active alternative consiste à introduire, pendant quelques minutes, dans la membrane, un détergent (le cholate de sodium ou l'octylglucopyranoside) capable de former des pores transitoires laissant diffuser les substances du milieu extérieur vers la cavité aqueuse. Les taux d'encapsulation sont de l'ordre de 50%.

3.7. Caractérisation

Les techniques évoquées dans le paragraphe 2.5. pour déterminer la taille, la morphologie, la surface des nanoparticules s'appliquent aussi aux liposomes. De manière complémentaire la diffraction des rayons X aux petits angles et la RMN permettent d'obtenir des renseignements sur la lamellarité des structures vésiculaires. Des techniques de fluorescence au moyen de sondes et la résonance paramagnétique électronique rendent accessible le volume de la cavité aqueuse interne.

Les liposomes ayant généralement une taille beaucoup plus grande que le matériel incorporé la séparation des molécules non encapsulées peut donc utiliser des techniques fondées sur la différence de taille des composés à séparer telles que la chromatographie d'exclusion-diffusion, la centrifugation, la dialyse ou l'ultrafiltration.

Une attention particulière doit être portée à la stabilité des liposomes après leur préparation en raison de leurs instabilités d'origine chimique ou physique qui peuvent modifier d'une manière importante l'activité biologique des principes actifs encapsulés.

Ainsi des phénomènes d'oxydation et d'hydrolyse des phospholipides sont susceptibles de survenir une fois les liposomes préparés. Toutefois, les risques sont mineurs lorsque sont prises les précautions de conservation et d'utilisation des phospholipides décrites précédemment. Les liposomes doivent cependant être conservés à +4°C sous argon, dans des tubes scellés de manière hermétique. La lyophilisation en présence de cryoprotecteurs permet d'améliorer la conservation des liposomes même si l'intégrité des liposomes en terme de taille et de rétention des molécules encapsulées, après reconstitution du lyophilisat est difficile à retrouver.

L'agrégation des liposomes est provoquée par des interactions de type Van der Waals, plus particulièrement présente pour les grands liposomes à grande surface de contact et les liposomes non chargés. Un moyen simple de réduire ce phénomène consiste à ajouter un lipide chargé négativement aux liposomes. La fusion ne touche que les petits liposomes unilamellaires (<40 nm) en raison du stress provoqué par la courbure très importante de ces vésicules. Ce phénomène est particulièrement important lorsque les liposomes sont conservés à une température proche de leur T_c. La rétention des produits encapsulés varie selon la nature des liposomes (MLV>LUV>SUV). Elle est aussi fonction de la température (4°C>25°C>37°C) et de la composition en phospholipides (saturés de T_c élevée > insaturés). Enfin, la rétention dépend également des propriétés physico-chimiques des produits encapsulés. C'est ainsi que les molécules lipophiles de haut poids moléculaire ou les molécules hydrophiles ionisées sont mieux retenues.

Méthodes de préparation des liposomes	Avantages	Limites
Méthodes de formation		
Hydratation d'un film phospholipidique	Simple, rapide	Inadaptée à la production industrielle. Faibles taux d'encapsulation. Taille hétérogène.
Injection d'une solution éthanolique.	Simple, rapide adaptée à la production industrielle Taille des liposomes homogène.	Faible taux d'encapsulation.
Infusion d'éther	Adaptée à la production industrielle. Volume d'encapsulation élevé.	Faible taux d'encapsulation. Matériaux exposés aux solvants oxydants et à des températures élevées.
Evaporation en phase inverse	Volume et taux d'encapsulation élevés.	Technique complexe inadaptée à la production industrielle Matériaux exposés aux ultrasons et aux solvants. Limite de solubilité des lipides dans la phase organique.
Élimination de détergents	Taille homogène. Conditions d'encapsulation douces.	Procédé long. Faibles taux d'encapsulation Difficulté d'élimination du détergent.
Méthodes de réduction de taille		
Ultrasons	Petites vésicules de taille homogène.	Inadaptée à la production industrielle. Préparation préalable de MLV. Faibles taux d'encapsulation. Contamination par des particules de métal. Production d'aérosol pouvant être toxique pour le manipulateur.
Extrusion sur filtres de polycarbonate	Rapide non agressive et reproductible. Taille des liposomes homogène et adaptable en fonction du filtre utilisé. Concentrations en lipides et taux d'encapsulation élevés.	Inadaptée à la production industrielle de grands volumes. Préparation préalable de MLV.
Microfluidisation	Adaptée à la production industrielle. Concentrations lipidiques et taux d'encapsulation en PA hydrophiles élevés.	Coût et maintenance de l'appareil. Préparation préalable de MLV.

Tableau IV: Avantages et inconvénients des méthodes de préparation des liposomes.

Méthodes de préparation des liposomes	Avantages	Limites
Méthodes de majoration de l'encapsulation		
Lyophilisation/ Réhydratation	Adaptée à la production industrielle. Taux d'encapsulation élevés. Simple et non agressive. Permet de conserver la préparation	Taille hétérogène. Préparation préalable de MLV.
Congélation/ Décongélation (MLV)	Procédé rapide. Taux d'encapsulation élevé.	Préparation préalable de MLV.
Congélation/ Décongélation (SUV)	Procédé simple et rapide.	Préparation préalable de SUV. Difficile à réaliser en présence de phospholipides neutres, de sucres, de hautes concentrations en ions ou de cations divalents.

Tableau IV (suite): Avantages et inconvénients des méthodes de préparation des liposomes.

Conclusion

Parallèlement aux paramètres de taille, de taux d'encapsulation et de cinétique de libération à partir des formes particulières, les contraintes de stabilité au cours de la conservation et de la mise en œuvre, ainsi que les contraintes réglementaires liées au domaine d'application ou au mode d'administration sont autant de nouveaux éléments à prendre en compte. Le choix du bon procédé de formulation des particules ne pourra donc se réaliser qu'en fonction d'un cahier des charges bien défini. L'action de certains principes actifs majeurs dans l'arsenal thérapeutique, faiblement solubles dans l'eau ou fragiles en milieu biologique dépendra directement de la parfaite maîtrise de la conception et de la réalisation des systèmes particuliers en adéquation avec leur cible thérapeutique et leur voie d'administration.

Références bibliographiques

- [1]. Barratt G., Colloidal drug carriers: achievements and perspectives, Cellular and Molecular Life Sciences, 60, 21-37, 2003.
- [2]. Benita S. Microencapsulation. Methods and industrial applications. Marcel Dekker, Inc. p640, 1996.
- [3]. Richard J. and Benoit J.P. Microencapsulation. Techniques de l'ingénieur, traité Génie des procédés, mars 2000.
- [4]. Tewes F., Boury F. and Benoit J.P., Biodegradable Microspheres: Advances in Production Technology in "Microencapsulation, Methods and Industrial Applications" Second Edition - Benita eds Taylor and Francis Books (in press).
- [5]. Hans M.L., A.M. Lowman, Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting, Current Opinion in solid state and material science, 6, 319-327, 2002.

- [6]. Majeti N.V. Ravi Kumar, N. Kumar, AJ Domb, M. Arora, Pharmaceutical Polymeric Controlled Drug Delivery Systems, Advances in Polymer Sciences, vol 160, 50-61, 2002.
- [7]. Wissing S.A., Kayser O., Mueller R.H. Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. Advanced Drug Delivery Reviews, 56, 1257-1272, 2004.
- [8]. Kirby C. and Gregoriadis G. "Liposomes". The Encyclopedia of Controlled Drug Delivery. Ed E Mathiowitz, 1999.
- [9]. New R.R.C., Liposomes - A practical approach. ed. Rickwood D., Hames B.M. (1990), New York: IRL Press, Oxford University Press.

Mots clés:

Coacervation
Dispersion de solvants
Elimination de détergents
Emulsification-diffusion
Emulsion-Evaporation
Evaporation en phase inverse
Extrusion-sphéronisation
Gélification
Hydratation de film
Lipides
Liposomes
Microencapsulation en milieu supercritique
Microcapsule
Microparticules
Nanocapsules
Nanoparticules
Nanosphères
Nanoprécipitation
Spray-coating
Spray-drying
Spray-congealing
Polycondensation interfaciale
Polymères
Polymérisation en émulsion
Polymérisation interfaciale
Salting out
Vecteurs
Vésicules