UNIVERSITÉ DE NANTES

FACULTÉ DE PHARMACIE

ANNÉE 2008 **N°62**

THÈSE

POUR LE

DIPLÔME D'ÉTAT

DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Par

MENDOUME – NZE Jeanne Stella

Présentée et soutenue publiquement le

LES HYDROGELS ET LES NANOGELS : DES FORMES GALÉNIQUES INNOVANTES POUR UNE LIBÉRATION CIBLÉE DES PRINCIPES ACTIFS

Président : M. Christian MERLE, Professeur

Membres du jury :

Mme Aurélie BILLON–CHABAUD, Maître de Conférence Universitaire

M. Pierre WEISS, Professeur

SOMMAIRE

I. INTRODUCTION 8

II. PRINCIPES GÉNÉRAUX DE PHARMACOCINÉTIQUE APPLIQUÉE À LA CLINIQUE 10

A. QU'EST CE QUE LA PHARMACOCINETIQUE ? 10
B. CINETIQUE DE PREMIER ORDRE 10
C. MODELES EMPIRIQUE ET MATHEMATIQUE 11
1. Voie parentérale et voie orale 12
2. Cas particuliers : la perfusion et les administrations réitérées 15
a) La perfusion 15
b) L'administration réitérée 16
D. LES QUATRE ETAPES DE LA MODELISATION PHARMACOCINETIQUE 18
1. Absorption 19
a) Les effets de premier passage 19
- Premier passage gastrique 19
- Premier passage intestinal 19
- Premier passage hépatique 19

b) Paramètres cinétiques qui décrivent l'absorption orale 20
2. Distribution 21
3. Métabolisme 23
4. Élimination 23
a) La clairance (Cl) 23
b) *La demi-vie ($t_{1/2}$)* 23

III. LES FORMES GALÉNIQUES CONVENTIONNELLES 24

A. FORMES GALENIQUES ORALES 24
1. Notions de biopharmacie 24
2. Comprimés 25
a) Définition 25
b) Comprimés simples 25
c) Comprimés à libération modifiée 27
- Formes à libération accélérée 27
- Formes à libération différée 28
- Formes à libération ralentie ou prolongée 29

3. Les capsules 32
a) Définition 32
b) Capsules simples 32
c) Gélules à libération modifiée 33
- Formes à libération différée 33
- Formes à libération ralentie ou prolongée 34

B. LES PREPARATIONS PARENTERALES 34
C. LES LIMITES DE CES FORMES CONVENTIONNELLES 35

IV. LES HYDROGELS, UN NOUVEAU MODE D'ADMINISTRATION DES PRINCIPES ACTIFS 36

A. LES GELS ET LES SUBSTANCES COLLOÏDALES 36
1. Qu'est ce qu'un gel ? 36
2. Les familles de gel 37
a) Les gels chimiques (ou permanents) 37
b) Les gels physiques (ou réversibles) 37
3. La structure colloïdale 38
B. LES HYDROGELS 38
1. Définition 38
2. Formulation des hydrogels 39
3. La structure des hydrogels 40

C. DIFFUSION DES PRINCIPES ACTIFS DANS LES HYDROGELS 43
1. Principes de la diffusion simple 43
2. Détermination du coefficient de diffusion 44
3. Diffusion dans les systèmes à libération contrôlée 47
a) Libération par contrôle de la diffusion 47
b) Libération par contrôle chimique du système 48
c) Libération par contrôle du gonflement 48
d) Cas particulier : Diffusion dans un système continu 49
D. MISE EN ÉVIDENCE EXPÉRIMENTALE DE LA DIFFUSION DES PRINCIPES ACTIFS DANS LES GELS 52
1. Pénétration totale du PA/soluté dans le gel 52
a) Principe 52
b) Résultats 53
2. La technique du « slicing » 53
a) Principe 53
b) Résultats 54
3. Diffusion dans une matrice polymère 55
a) *Détermination in situ du profil de concentration 55*
- Principe 55
- Résultats 56

b) Mise en évidence de l'évaluation du front de solubilité 58
- Principe 58
- Résultats 59

4. Cellule de diffusion de Valia-Chen 60
a) Principe 60
b) Analyse de la diffusion 61
5. Cellule de diffusion FTIR – ATR 63
a) Rappels sur la cellule de diffusion de Franz 63
b) Principe de la méthode 64
c) Résultats 64
6. Discussion 66

V. DES HYDROGELS AUX NANOGELS 67

A. QU'EST CE QU'UN NANOGEL ? 67
1. Définition 67
2. Structure chimique d'un nanogel 68
3. Propriétés et objectifs des nanogels destinés aux applications thérapeutiques 70
a) Propriétés des nanogels 70
- Stabilité 70
- Fonctionnalisation des nanogels 71
- Taille des NP 71
- Inertie et biodégradabilité des nanogels 72

b) Objectifs des nanogels 72
B. METHODES DE FABRICATION DES NANOGELS 73
1. Synthèse du PEG activé 73
2. Techniques de polymérisation des monomères 75
a) *La polymérisation simple 75*
b) La polymérisation par précipitation 77
c) La polymérisation par microémulsion 80
3. Techniques de dispersion des polymères préformés 83
a) Émulsification par évaporation de solvant 83
b) Le « salting-out » 84
4. Discussion 84
C. MISE EN EVIDENCE EXPERIMENTALE DE LA DIFFUSION DES PRINCIPES ACTIFS DANS LES NANOGELS 87
1. Principes de la libération des principes actifs inclus dans les nanogels 87
2. Étude de la diffusion par dialyse 88
a) Principe 88

b) Mise en évidence expérimentale 88
- Matériel et méthode 88
- Résultats 90

3. Cellules de diffusion bicompartimentée (Side by side drug diffusion cell) *91*
a) Principe 91
b) Mise en évidence expérimentale 92
- Matériel et méthode 92
- Résultats 92

4. L'ultracentrifugation *93*
a) Principe 93
b) Mise en évidence expérimentale 94
- Matériel et méthode 94
- Résultats 94

5. Discussion *95*

VI. APPLICATIONS THÉRAPEUTIQUES DES HYDROGELS ET DES NANOGELS 97

A. LA LIBERATION CONTROLEE DES MEDICAMENTS 97
1. Rappels *97*
2. Systèmes de libération contrôlée « intelligents » *98*
3. La vectorisation thérapeutique *101*
B. LES HYDROGELS ET LES NANOGELS : UNE ALTERNATIVE POUR DIFFERENTES VOIES D'ADMINISTRATION 102
1. La voie orale *103*
2. La voie rectale *104*
3. La voie oculaire *105*
4. La voie sous-cutanée *105*
5. La voie nasale *106*
6. La voie pulmonaire *107*
7. La voie intraveineuse *110*
C. LES NANOGELS ET LES HYDROGELS A L'ETUDE POUR LE TRAITEMENT OU LA PREVENTION DE PATHOLOGIES LES PLUS FREQUENTES : LE CANCER, LE DIABETE, LES MALADIES INFECTIEUSES, LE GENIE TISSULAIRE ET LES VACCINS. .. 110
1. Le cancer *110*
2. Le diabète *112*
3. Les maladies infectieuses *113*
4. Génie tissulaire *116*
5. Les vaccins *117*

VII. CONCLUSION 120

VIII. BIBLIOGRAPHIE 122

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1 : MODELISATION PHARMACOCINETIQUE 11
FIGURE 2 : CONCENTRATION PLASMATIQUE VERSUS TEMPS..... 12
FIGURE 3 : REPRESENTATION LOGARITHMIQUE DE LA CONCENTRATION PLASMATIQUE APRES UNE ADMINISTRATION IV 14
FIGURE 4 : CINETIQUE DE L'ABSORPTION D'UN COMPRIME PAR VOIE ORALE 14
FIGURE 5 : REPRESENTATION LOGARITHMIQUE DE LA CONCENTRATION PLASMATIQUE APRES UNE ADMINISTRATION PAR VOIE ORALE 15
FIGURE 6 **:** BIODISPONIBILITE D'UN MEDICAMENT DANS L'ORGANISME AU COURS D'UNE PERFUSION. 16
FIGURE 7 17
FIGURE 8 : LES QUATRE ETAPES DE LA MODELISATION PHARMACOCINETIQUE 18
FIGURE 9 : DETERMINATION DE LA BIODISPONIBILITE D'UN PRINCIPE ACTIF 21
FIGURE 10 : LES MODELES COMPARTIMENTAUX EN PHARMACOCINETIQUE. 22
FIGURE 11 : LE SYSTEME DES COMPRIMES MUPS : EXEMPLE DE L'INEXIUM® 29
FIGURE 12 : LIBERATION DES PELLETS DANS LE TUBE DIGESTIF 29
FIGURE 13 : LE SYSTEME OROS 30
FIGURE 14 : STRUCTURE D'UN COMPRIME MULTICOUCHE 31
FIGURE 15 : ILLUSTRATION DE LA TRANSITION SOL – GEL 37
FIGURE 16 : ARCHITECTURE DES POLYMERES. 42
FIGURE 17: GEOMETRIE DE DIFFUSION DU MODELE THEORIQUE. 50
FIGURE 18: TECHNIQUE DE « SLICING » : ÉVOLUTION DE LA DIFFUSION DU PA/SOLUTE AU SEIN DU GEL 54
FIGURE 19: PROFILS DE REPARTITION DE L'ACTIVITE DANS UNE MEME CELLULE POUR QUATRE TEMPS DE DIFFUSION 56
FIGURE 20**:** ÉVOLUTION DU RAPPORT M_T/M_0 EN FONCTION DE √T, POUR LES GELS A BASE D'AEROSIL 57
FIGURE 21: ÉVOLUTION DE 1/ IERF ($C_M - C_0$) EN FONCTION DE √T, POUR LES GELS D'AEROSIL 58
FIGURE 22: CINETIQUES DE DEPLACEMENT DU FRONT DE SOLUBILITE Δ EN FONCTION DE √T POUR LES GELS A BASE DE CARBOPOL 59
FIGURE 23: REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA CELLULE DE DIFFUSION VALIA-CHEN 61
FIGURE 24: DIFFUSION DE LA THEOPHYLLINE A TRAVERS UNE MEMBRANE DE GEL DE PVA / PAA INTERPENETRANT. 63
FIGURE 25: REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA CELLULE DE DIFFUSION FTIR – ATR 65
FIGURE 26: SCHEMA ET HYPOTHESE DU MODELE MATHEMATIQUE INTERVENANT AU COURS DE L'ETUDE 65
FIGURE 27: PHOTOGRAPHIE REPRESENTANT DES NANOPARTICULES D'HYDROGEL 68
FIGURE 28: SYNTHESE DU CH_2=CH - BZ - PEG - COOK 75
FIGURE 29: REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA FABRICATION DE NANOPARTICULES DE POLYALKYLCYANOACRYLATE PAR POLYMERISATION ANIONIQUE 77
FIGURE 30: FABRICATION DES NANOGELS PAR POLYMERISATION PAR PRECIPITATION 78
FIGURE 31: SCHEMA DE SYNTHESE D'UN NANOGEL PEGYLE REPONDANT AUX STIMULI EXTERIEURS 79
FIGURE 32: IMAGES DE MICROSCOPIE ELECTRONIQUE PAR TRANSMISSION DE NANOPARTICULES D'HYDROGELS OBTENUS AVEC 0,5% D'ETHYLENE GLYCOL DIMETHACRYLATE (EGDMA) ET D'UN RESEAU DE POLY-AN ET DE PNIPAAM. 81
FIGURE 33: REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES MECANISMES DES REACTIONS DE COPOLYMERISATION ET DE RETICULATION DE L'ACRYLONITRILE (AN) ET DU N-ISOPROPYLACRYLAMIDE (NIPAAM) DANS LES MICELLES DE SDS 82

FIGURE 34: SCHEMA ILLUSTRANT LE PRINCIPE DE DIALYSE. 89
FIGURE 35: LIBERATION IN VITRO DE FATP INCLUS DANS LES NANOGELS 90
FIGURE 36: REPRESENTATION D'UNE CELLULE DE DIFFUSION BICOMPARTIMENTEE (SIDE-BI-SIDE CELL® COMMERCIALISE PAR LE LABORATOIRE PERMEGEAR, USA) 91
FIGURE 37: DIFFUSION DE NUCLEOTIDES LIBRES (SODN) ET DE NUCLEOTIDES INCLUS DANS DES NANOGELS (NG) A TRAVERS LA MONOCOUCHE DE CELLULE CACO-2 93
FIGURE 38: INFLUENCE DE LA TAILLE DES NP D'ALCOOL POLYVINYLIQUE SUR LE TAUX DE LIBERATION DE LA SAVOXEPINE 95
FIGURE 39: LIBERATION CONTROLEE VERSUS DOSAGE CONVENTIONNEL 98
FIGURE 40: LES DIFFERENTS STIMULI AGISSANT SUR LES HYDROGELS SENSIBLES A L'ENVIRONNEMENT 100
FIGURE 41: UN HYDROGEL DE PMAA-G-PEG SENSIBLE A L'ENVIRONNEMENT POUR LA LIBERATION CONTROLEE D'INSULINE 113
FIGURE 42: CIBLAGE D'UNE BACTERIE INTRACELLUALIRE LOCALISEE DANS UN ENDOSOME MACROPHAGIQUE PAR DES NANOPARTICULES 114
FIGURE 43: PHOTOGRAPHIE D'UN HYDROGEL PUR ET D'UN HYDROGEL CHARGE EN PARTICLE D'ARGENT POSES SUR DES *ESCHERICHIA COLI* 115

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1 : LES MONOMERES LES PLUS SOUVENT UTILISES DANS LA SYNTHESE D'HYDROGELS UTILISES DANS LES APPLICATIONS PHARMACEUTIQUES 40
TABLEAU 2: ÉVOLUTION DE D EN FONCTION DES MOLECULES 46
TABLEAU 3: BIOTHERAPEUTIQUES ADMINISTRES PAR VOIE PULMONAIRE 109

I. INTRODUCTION

L'adressage de molécules thérapeutiques vers un organe, un tissu ou une cellule malade constitue aujourd'hui un défi majeur pour le traitement des maladies humaines, notamment infectieuses, cancéreuses ou d'origine génétique.

Il y'a cinquante ans, les formes galéniques conventionnelles (comprimés, gélules, préparations injectables…) offraient une large satisfaction à ses utilisateurs ainsi qu'aux industries pharmaceutiques qui les fabriquaient. Puis, très tôt, sont apparues des limites entravant l'efficacité thérapeutique des traitements : effets indésirables, biodisponibilité des principes actifs faible ou variable, manque de ciblage thérapeutique…
Il a fallu trouver une solution à ces inconvénients majeurs d'autant plus que les maladies dites « de longue durée » tendent à avoir d'importantes prévalences dans notre société.
Un des axes suivi par les chercheurs est de trouver des alternatives aux formes galéniques actuelles grâce à une administration par voie intraveineuse pour améliorer les traitements actuellement mis à la disposition des patients.

Ce travail va présenter différentes formes galéniques innovantes permettant de vectoriser des molécules thérapeutiques vers leur site d'action. Ces nouvelles formes galéniques, les hydrogels et les nanogels, prennent le relais des formes conventionnelles administrées par voie orale, c'est-à-dire les comprimés et les gélules en majeure partie, ou les préparations parentérales (il existe d'autres formes galéniques que nous n'aborderons pas ici).

Nous allons, en première partie, faire un rappel des principes généraux de pharmacocinétique appliquée à la clinique et ensuite présenter les formes galéniques conventionnelles que nous avons précédemment citées. Nous rentrerons dans le vif du sujet en présentant les hydrogels ainsi que les méthodes de diffusion des principes actifs dans ceux-ci, puis nous continuerons notre discussion en présentant une forme galénique innovante : le nanogel. Enfin, nous finirons par les

applications thérapeutiques à l'étude pouvant être attribuées aux hydrogels et aux nanogels.

II. PRINCIPES GÉNÉRAUX DE PHARMACOCINÉTIQUE APPLIQUÉE À LA CLINIQUE

Avant de débuter ce travail, il est essentiel de comprendre les principes de pharmacocinétique qui s'appliquent aux voies orale et parentérale.

A. Qu'est ce que la pharmacocinétique ?

La pharmacocinétique est une modélisation qui, à partir de données expérimentales et de paramètres tels que la clairance et le volume de distribution[1], permet d'étudier le devenir du médicament dans le corps (figure 1) [1].

Elle va orienter :

- le choix des voies d'administration
- l'adaptation des posologies
- le choix de l'intervalle thérapeutique.

B. Cinétique de premier ordre

La cinétique de la plupart des médicaments est dite linéaire, ce qui veut dire que le transfert des principes actifs à l'organisme s'effectue par des processus de premier ordre.

Une fois l'état d'équilibre atteint, les concentrations plasmatiques sont proportionnelles à la dose administrée [1].

Certaines substances ont une cinétique non linéaire par saturation de leur métabolisme ; leur cinétique n'est plus de premier ordre mais varie selon la dose. Les concentrations à l'état d'équilibre ne sont plus proportionnelles à la dose administrée.

Les modèles que nous allons évoquer ne s'appliquent qu'à une cinétique de premier ordre.

[1] Nous reviendrons sur ces deux notions au chapitre D.

C. Modèles empirique et mathématique

Les modélisations empirique et mathématique de la pharmacocinétique ont pour objectif principal d'accorder la théorie aux données observées ; ils doivent donc fournir des résultats en adéquations avec les données expérimentales.

La pharmacocinétique fait intervenir des modèles mathématiques (= modélisation mathématique) représentés par un ensemble d'équations mettant en relation des variables opératoires qui sont des grandeurs connues (dose, temps écoulé) ou mesurées au moyen de paramètres pharmacocinétiques qui sont en fait des variables biologiques (Exemple : Clairance, Volume de distribution V_d…) à résoudre [2]. Ces modèles mathématiques se veulent

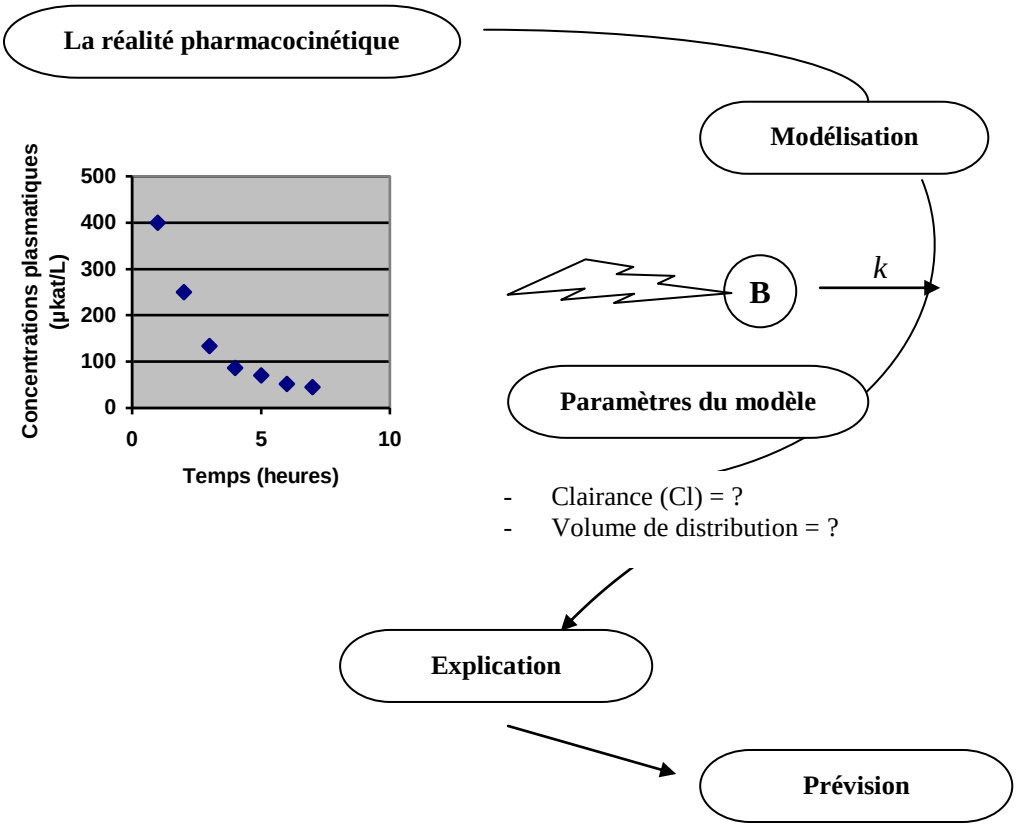


Figure 1 : Modélisation pharmacocinétique

un reflet de la réalité, elle-même révélée par la modélisation empirique.

1. Voie parentérale et voie orale

Présentons tout d'abord la voie parentérale et plus particulièrement la voie intraveineuse (voie IV).

La principale finalité pratique de la pharmacocinétique est de substituer la notion de concentration (ou taux) plasmatique à la dose. Le paramètre qui relie ces deux variables entre elles est le volume de distribution (ou V_d), dit apparent parce qu'entité mathématique virtuelle.

Pour établir une relation quantitative entre :

- la dose (dimension : masse ; unité : mg ou µmol) et
- la concentration (dimension : masse/ volume ; unité : mg/L ou µmol/L),

il faut un paramètre ayant pour dimension un volume et pour unité le litre [3].

Si le système peut se ramener à un compartiment unique rempli d'un milieu solvant homogène et d'élimination infiniment lente (figure 2), il suffit d'appliquer le raisonnement suivant : on introduit dans ce système simplifié de volume V (Litres ou L) une dose D (Grammes ou g) d'un principe actif [2]. Quand la dissolution est complète et homogène, la concentration C_0 (en g/L) est :

$$C_0 = \frac{D}{V}$$

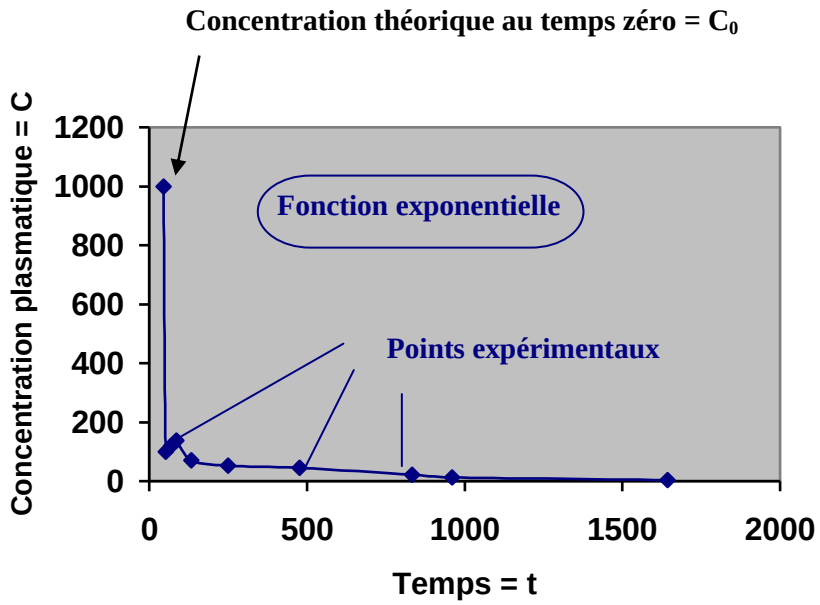


Figure 2 : Concentration plasmatique versus temps

Connaissant la dose D administrée et en mesurant la concentration C_0 par un dosage, on peut déterminer le volume V (réel et homogène) du système par une représentation logarithmique (figure 3). Cette façon de procéder correspond au modèle empirique. Dans cette structure simple, le modèle mathématique s'applique également [3].

En effet, il existe une décroissance de la concentration plasmatique en fonction du temps qui peut être représentée par l'équation suivante :

$$-\frac{dC}{dt} = -kt$$ avec k, vitesse de transfert

Cette équation peut être intégrée et devient :

$$C(t) = C_0 e^{-kt}$$

La constante C_0 est la concentration à l'instant zéro, c'est-à-dire au moment de l'administration (t= 0 donc $e^0 = 1$ et $C_t = C_0$) [1].

Des règles similaires à celles de l'administration en IV peuvent être appliqués pour décrire ce qu'il se passe après une absorption orale (figure 4).

Pour cette voie d'administration, les équations représentant l'évolution des concentrations en fonction du temps sont représentées par deux phénomènes différents :

- le phénomène d'élimination :

$F_e(t) = Z e^{-ke(t)}$ avec k_e, constante d'élimination

Z, coefficient qui joue le rôle de C_0

- le phénomène d'absorption :

$F_a(t) = -Z e^{-ka(t)}$ avec k_a, constante d'absorption.

Lorsque l'on combine ces deux équations, on obtient l'équation suivante, qui permet de prévoir le profil des concentrations plasmatiques en fonction du temps après une administration par voie orale [1]:

$$C(t) = Z (e^{-ke(t)} - e^{-ka(t)})$$

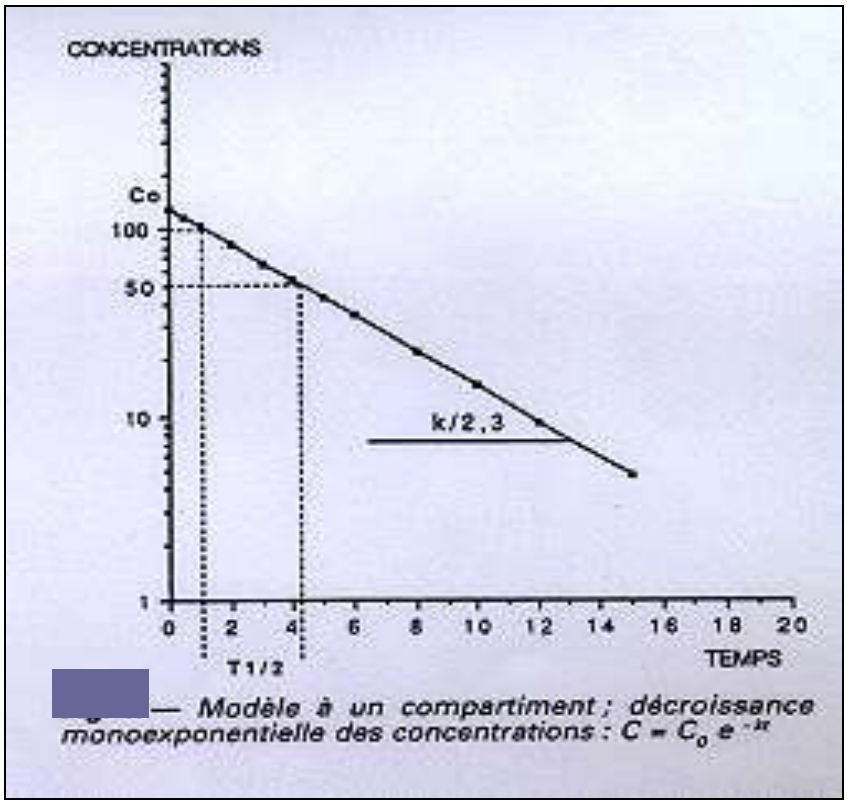


Figure 3 : Représentation logarithmique de la concentration plasmatique après une administration IV [4].

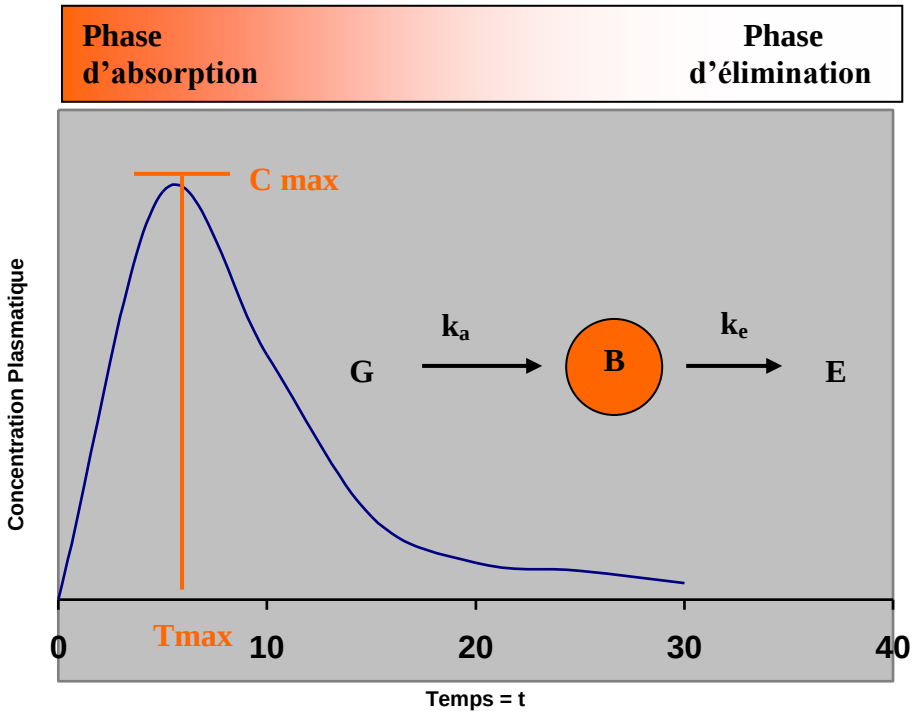


Figure 4 : Cinétique de l'absorption d'un comprimé par voie orale [1].

Comme pour l'administration en IV, la courbe exponentielle de la figure 4 peut être représentée par une droite logarithmique (figure 5) qui va permettre de déterminer la concentration maximale Cmax et le temps nécessaire pour atteindre cette concentration, Tmax. Cmax va permettre de quantifier le facteur de vitesse de biodisponibilité, F, d'un principe actif (PA) après une absorption orale [1].

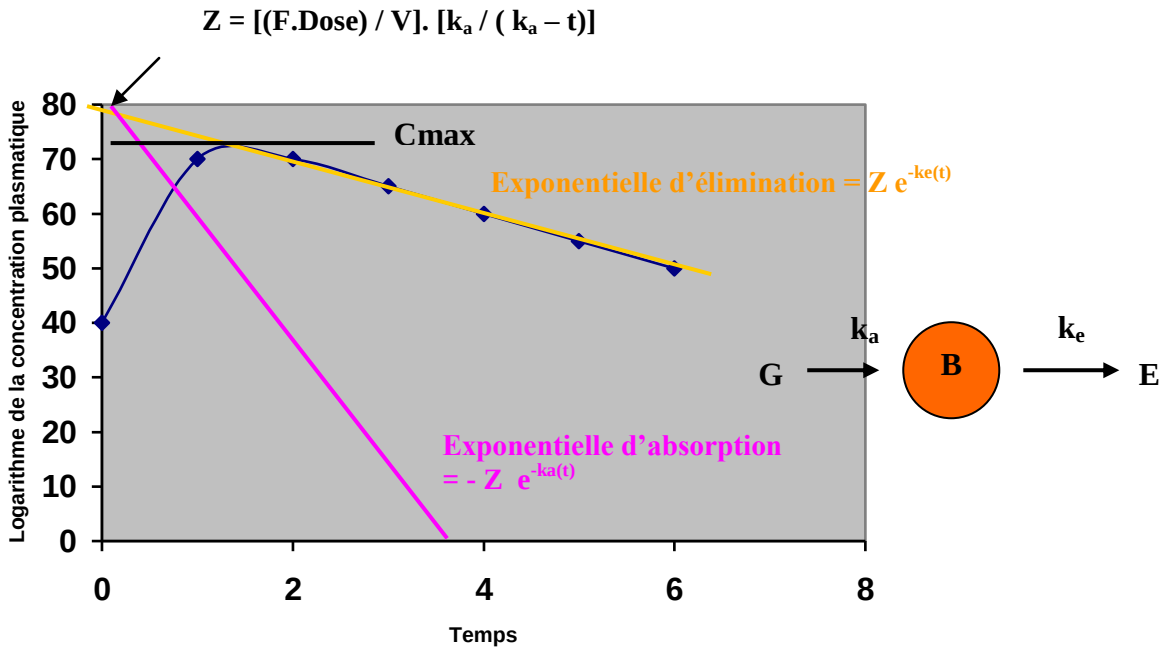


Figure 5 : Représentation logarithmique de la concentration plasmatique après une administration par voie orale [1].

2. Cas particuliers : la perfusion et les administrations réitérées

a) La perfusion [4]

Quand on administre un médicament par perfusion continue à un débit constant R_0 (figure 6), on remarque qu'après un certain temps, la concentration plasmatique cesse d'augmenter. Ce processus est régi par une fonction exponentielle.

En effet, on observe deux processus opposés qui entrent en compétition :

- la vitesse d'apport du médicament, c'est-à-dire le débit de la perfusion R_0
- la vitesse d'élimination qui dépend de la constante de vitesse d'élimination R_e et de la quantité de médicament présent.

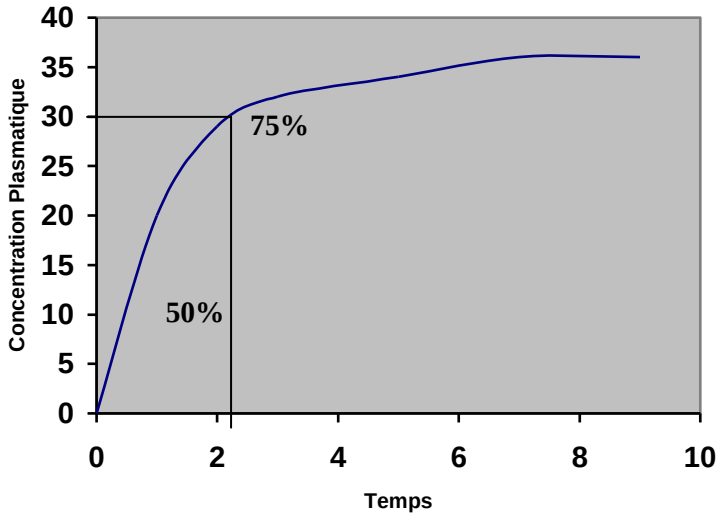


Figure 6 : Biodisponibilité d'un médicament dans l'organisme au cours d'une perfusion.

Dans la perfusion continue (administrée par voie intraveineuse), la vitesse de perfusion est constante. Au fur et à mesure que la concentration plasmatique augmente, la vitesse d'élimination augmente également jusqu'au moment où un état d'équilibre est atteint, tel que ce qui rentre est égal à ce qui sort.
La concentration plasmatique reste alors constante : c'est l'état d'équilibre.

b) L'administration réitérée

En thérapeutique, l'administration réitérée, le plus souvent par voie orale, est la plus utilisée. Elle implique une certaine accumulation du médicament, ou de ses métabolites, dont l'importance dépend du schéma posologique utilisé.

Les équations qui représentent l'évolution des concentrations lorsque le médicament est administré de façon répétée sont identiques pour les voies IV et per os, au facteur de biodisponibilité, F, près.

Soit un médicament M administré par voie orale à une dose D avec un intervalle de temps d'administrationτ. Le médicament est donné alors que la dose précédente n'est pas encore totalement éliminée ; la quantité administrée s'ajoute donc à la quantité non éliminée provenant des doses précédentes (c'est le principe de la superposition) [4]. On assiste à un

phénomène d'accumulation qui traduit le fait que l'organisme n'est pas capable d'éliminer tout ce qui rentre dans l'intervalle de tempsτ.

Après un certain temps, la quantité de médicament résorbé compense la quantité de médicament éliminé pendant l'intervalle τ ; un pseudo- plateau est atteint, les concentrations fluctuent entre une concentration minimale Cmin et une concentration maximale Cmax (figure 7) [3].

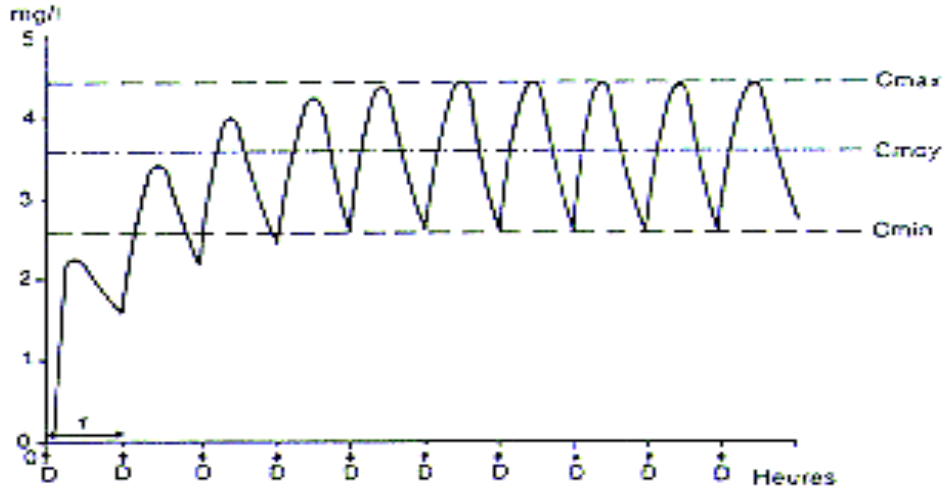


Figure 7 . — *Évolution des concentrations plasmatiques médicament administré de façon réitérée à une dose D tous les intervalles de temps τ (d'après SINGLAS et TABURET).* [5]

Les concentrations au plateau sont :

- proportionnelles à la dose administrée et à la biodisponibilité
- inversement proportionnelles à l'intervalle τ et à la clairance.

Plus la demi-vie est longue par rapport à l'intervalle d'administration, plus la concentration au plateau est élevée et inversement.

La fluctuation des concentrations entre Cmin et Cmax dépend aussi des valeurs de τ et de la demi-vie : si τ est petit par rapport à la demi-vie, les fluctuations seront très faibles et si τ est grand, les fluctuations seront fortes [5].

D. Les quatre étapes de la modélisation pharmacocinétique

La pharmacocinétique étudie la distribution dans le temps d'un médicament et de ses métabolites dans les différents compartiments du corps (sang, liquide interstitiel, cellules) ainsi que son absorption, sa distribution, son métabolisme et son élimination (figure 8).

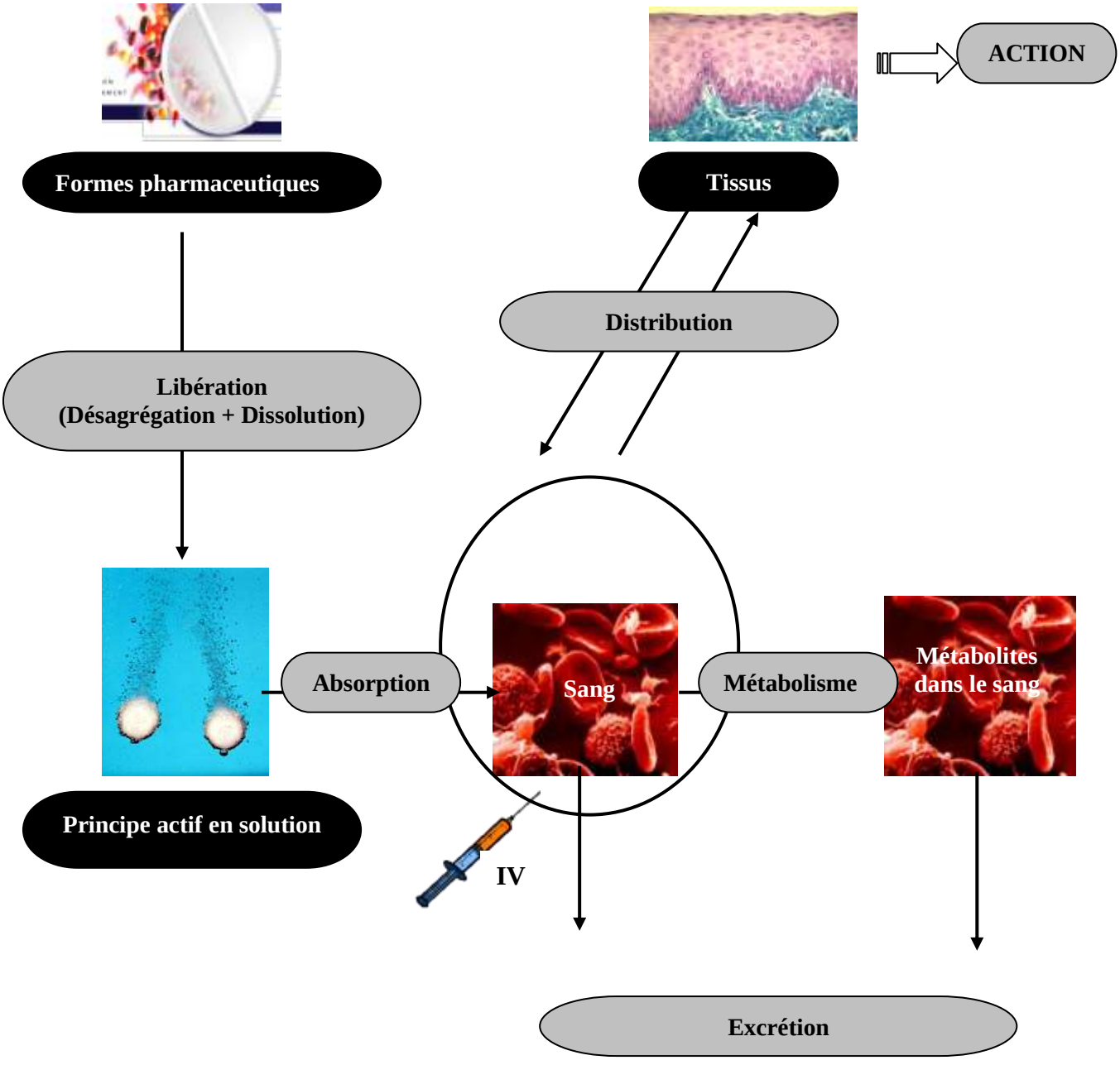


Figure 8 : Les quatre étapes de la modélisation pharmacocinétique [1].

1. Absorption

a) Les effets de premier passage [1]

L'absorption est le processus par lequel le médicament passe de son site d'administration à la circulation générale. Elle va dépendre de la voie d'administration. La voie IV est la voie de référence car l'absorption y est complète par définition, c'est-à-dire de 100%.

Ainsi, l'absorption est décrite pour la voie orale en référence à la voie IV. Lorsqu'on avale un comprimé ou une gélule, une partie est éliminée avant qu'il arrive dans la circulation sanguine. Ce phénomène est dû aux effets de premier passage.

- **Premier passage gastrique**

Le suc gastrique est un liquide acide (pH = 1) qui contient de la pepsine. Cette pepsine va permettre la digestion des substances dans l'estomac. Pour éviter cet effet de premier passage gastrique, la galénique crée des formes gastro-résistantes.

Il faut cependant ajouter que l'estomac n'est pas un site d'absorption majeur.

- **Premier passage intestinal**

L'intestin et le duodénum en particulier, est le site d'absorption préférentiel de nombreuses substances en raison de sa grande surface d'absorption (il possède une muqueuse avec de nombreuses villosités) et du pH neutre à basique.

Au niveau intestinal, le passage des médicaments se fait essentiellement par diffusion passive.

- **Premier passage hépatique**

Après son passage par l'intestin, la substance passe par le foie via la veine porte, avant d'atteindre la circulation systémique.

Comme le foie est un organe majeur dans le métabolisme des médicaments, une partie de la substance est métabolisée avant d'arriver à la circulation systémique. En principe, il existe une perte d'une partie du principe actif.
Toutefois, certaines substances ont besoin d'être bio activées dans le foie pour assurer leur rôle : on profite parfois de cette contrainte anatomique.

Les mêmes phénomènes peuvent se produire au niveau de la paroi intestinale, mais ils sont quantitativement bien moins importants.

b) Paramètres cinétiques qui décrivent l'absorption orale

Nous avons présenté plus haut deux de ces paramètres, à savoir la concentration maximale Cmax ainsi que le temps pour l'obtenir, Tmax (voir figure 4).

Après une administration orale, l'absorption digestive proprement dite est difficile à mesurer ; on se contente, pour l'apprécier, de la mesure de la biodisponibilité F, c'est-à-dire la fraction de la dose qui atteint la circulation générale sous forme inchangée et la vitesse avec laquelle elle l'atteint.

Par définition, elle est de 100% pour les formes parentérales. De ce fait, la quantification de F ne peut se faire que par comparaison de la voie orale à la voie IV.

Le facteur F est déterminé par le rapport des aires sous courbe (ASC) des concentrations en fonction du temps des deux formes à comparer (figure 9). Ces ASC (ou AUC, Area Under Curve) représentent bien la quantité de médicament disponible au niveau sanguin en fonction du temps [4].

Pour le calcul de la biodisponibilité absolue, la forme de référence est le même médicament administré par la voie IV. On a :

$F = (\text{AUC oral} / \text{AUC IV}) \times 100$ (la biodisponibilité est alors exprimée en pourcentage).

Il existe plusieurs paramètres qui limitent la biodisponibilité, notamment :

- la diffusion passive lors du transport de la substance à travers le tube digestif. Cette diffusion dépend de la solubilité de la substance.
- le transport actif et la dégradation de la substance au sein de la paroi intestinale.
- le métabolisme hépatique dû à l'effet de premier passage hépatique [1].

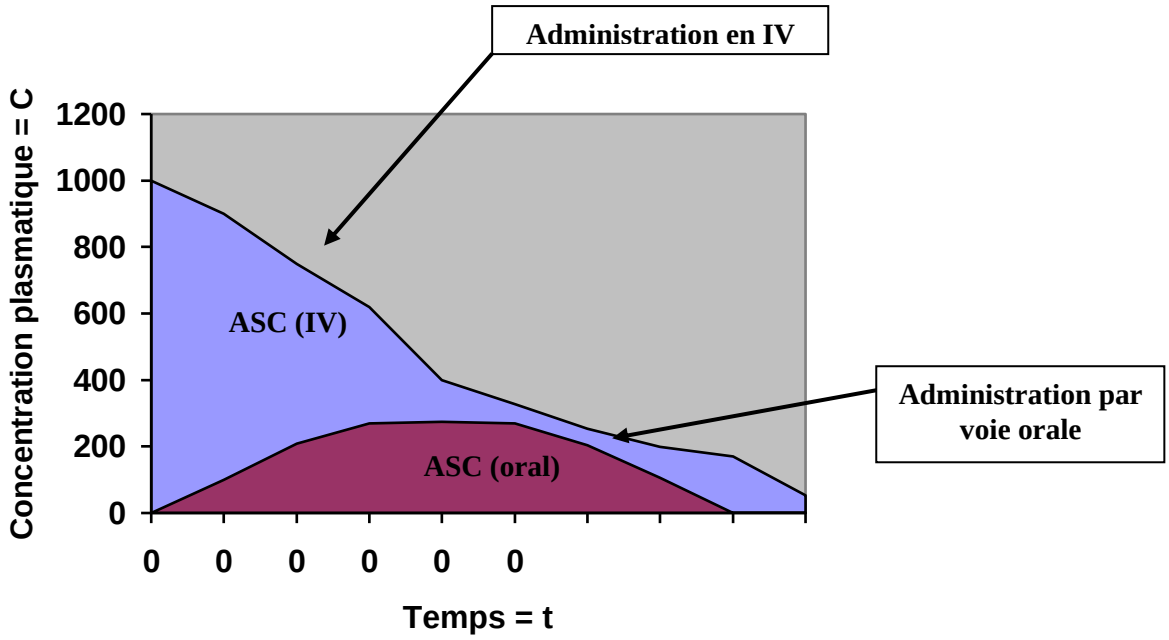


Figure 9 : Détermination de la biodisponibilité d'un principe actif (ASC = Aire Sous Courbe)

2. Distribution

Depuis le sang, le principe actif est distribué dans les tissus. Cette distribution est un transfert réversible vers les organes.

En réalité, l'organisme a plutôt la structure d'un ensemble de compartiments communicants de dimension et de composition différentes (et inconnues) (figure 10) [1].

La dose D diffuse et se dissout à concentrations inégales dans les différents compartiments jusqu'à l'équilibre (le plasma sanguin est le seul secteur accessible à la mesure de concentration, les autres sont des secteurs tissulaires).

Ainsi le médicament peut rester dans la circulation sanguine mais également se distribuer dans le reste du milieu extracellulaire ou dans le milieu intracellulaire. Selon la répartition du médicament dans l'organisme, la concentration sanguine est un mauvais reflet de la quantité de substance effectivement présente dans l'organisme [2].

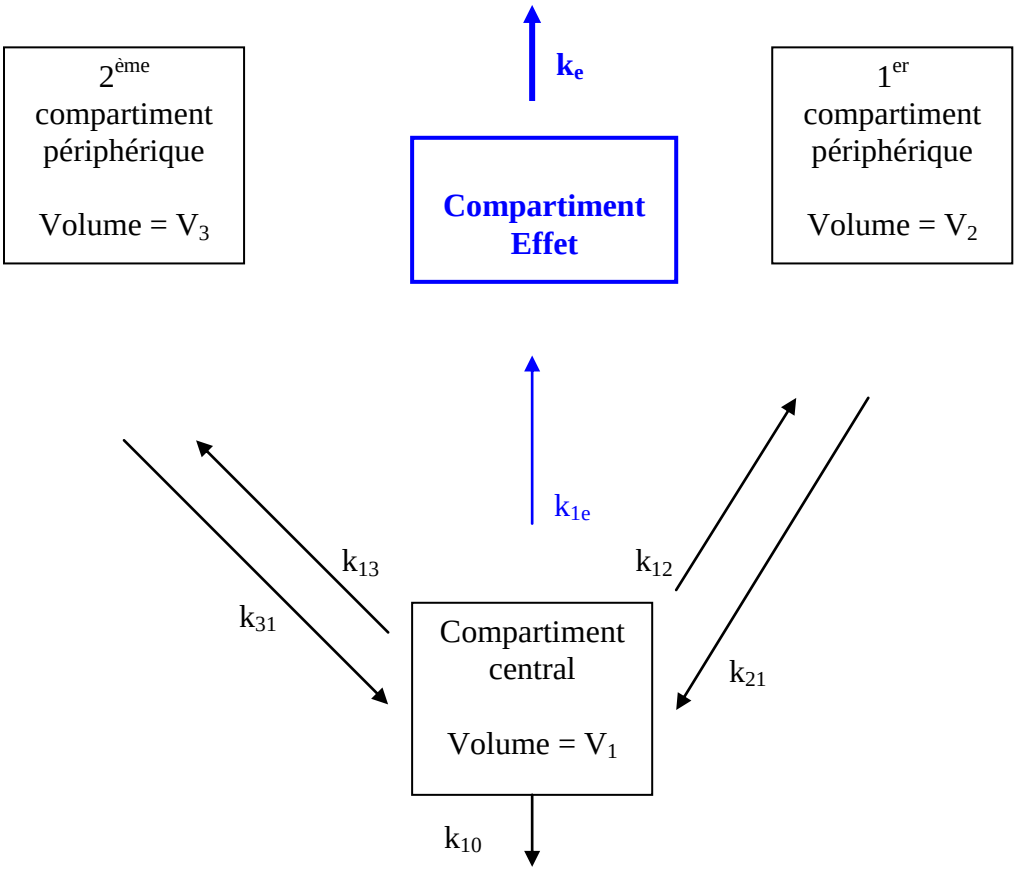


Figure 10 : Les modèles compartimentaux en pharmacocinétique.

Le paramètre pharmacocinétique qui décrit le mieux la distribution est le volume de distribution V_d. Il met en relation la concentration plasmatique et la quantité de substance présente dans l'organisme. Le volume de distribution est un paramètre introduit mathématiquement qui ne recouvre pas une entité physiologique. Il s'exprime en unité de volume, généralement le litre, parfois rapporté au poids.

Si la substance reste essentiellement dans le plasma, elle aura un V_d proche du volume plasmatique qui est de 3 à 4 litres. Si par contre, elle se distribue essentiellement dans l'eau corporelle, elle aura un V_d de l'ordre de 50 litres. Enfin, si elle se distribue essentiellement dans les tissus, elle aura un V_d de l'ordre de 1000 litres [1].

Ainsi, plus la substance a un volume de distribution proche de celui du plasma, c'est-à-dire un petit volume de distribution, plus la concentration plasmatique est un bon reflet de la quantité substance qui se trouve dans le corps.

En pratique, le V_d va permettre le calcul de la dose de charge d'un médicament afin d'aboutir à la concentration plasmatique souhaitée.

3. Métabolisme [1]

Le métabolisme d'un principe actif va aboutir à sa transformation par des réactions enzymatiques. D'un point de vue cinétique, c'est une « disparition » de la substance par transformation chimique.
Le métabolisme est essentiellement réalisé par le foie.

4. Élimination [1]

Les principales voies d'élimination d'un principe actif sont : l'urine, la bile et les selles. Du point de vue cinétique, c'est une « disparition » de la substance du compartiment de mesure c'est-à-dire le sang.
Il existe deux paramètres pharmacocinétiques qui décrivent la capacité de l'organisme à éliminer une substance : la clairance et la demi-vie.

a) La clairance (Cl)

La clairance peut être hépatique, rénale ou totale (ou systémique). Quand elle est :

- Hépatique : c'est la capacité du foie à éliminer un médicament donné en le métabolisant ou en le sécrétant dans la bile.
- Rénale : c'est la capacité du rein à éliminer le médicament dans l'urine.
- Totale (ou systémique) : c'est la capacité globale du corps à éliminer le médicament. Elle représente la somme des différentes clairances.

On la quantifie comme un volume de sang épuré par unité de temps (mL / min) et elle va permettre de relier la vitesse d'élimination à la concentration.

b) *La demi-vie ($t_{1/2}$)*

La demi-vie est le temps nécessaire pour réduire la quantité de principe actif dans l'organisme de moitié, ce qui fait intervenir la notion de volume de distribution. La demi-vie peut être déterminée de façon graphique (voir figure 3) ou de façon mathématique à l'aide de la formule suivante :

$t ½ = 0,693 / K_e$ avec K_e, constante d'élimination

La vitesse d'élimination étant fonction de la clairance et du volume de distribution V_d, il est possible d'exprimer K_e en fonction de ces deux paramètres ; on a :

$K_e = Cl / V_d$ et $K_e = 0,693 / t ½$ d'où

$Cl = 0,693 / (t ½ \times V_d)$. Donc :

$t ½ = (0,693\ V_d) / Cl$

III. LES FORMES GALÉNIQUES CONVENTIONNELLES

La pharmacie galénique est l'art de préparer, conserver et présenter les médicaments [6]. Chaque forme galénique se compose d'un principe actif et d'un ou plusieurs excipients. Les formes orales, en particulier les comprimés et les capsules, sont les plus fréquemment utilisées, suivies de près par les préparations parentérales, plutôt réservées à l'usage hospitalier.

A. Formes galéniques orales

1. Notions de biopharmacie

La phase biopharmaceutique d'un médicament précède l'absorption du principe actif à travers les membranes biologiques (muqueuse gastro-intestinale par exemple) qui permet à celui-ci de pénétrer dans la circulation systémique après passage dans le foie. La phase biopharmaceutique constitue la mise à disposition de l'organisme des principes actifs (figure 8). Elle comprend une étape de libération, qui a généralement lieu par désagrégation de la forme solide en particules de petite taille, suivie d'une étape de dissolution, qui consiste en une dispersion d'un principe actif à l'état moléculaire en milieu aqueux, au site d'absorption. Le temps de désagrégation constitue l'un des essais à effectuer après la fabrication de comprimés ou de capsules [6,7].

2. Comprimés

a) Définition

La Pharmacopée Européenne définit les comprimés comme des préparations solides contenant une unité de prise d'une ou plusieurs substances actives. Ils sont généralement obtenus en agglomérant par compression un volume constant de particules.

Certains comprimés sont avalés ou croqués, d'autres sont dissous ou désagrégés dans de l'eau avant administration, d'autres encore doivent séjourner dans la bouche pour y libérer la substance active.

Les particules sont constituées d'une ou plusieurs substances actives, additionnées ou non d'excipients tels que : diluants, liants, désagrégeants, agents d'écoulement, lubrifiants, composés pouvant modifier le comportement de la préparation dans le tube digestif, colorants autorisés par l'Autorité compétente [8].

b) Comprimés simples

Les comprimés sont fabriqués par compression d'un mélange de poudres constitué du principe actif et d'excipients. Ils peuvent être enrobés ou non. Les comprimés enrobés doivent se désagréger en moins de quinze minutes et ce temps de désagrégation dépend de la nature de l'enrobage. Ce dernier peut être constitué de substances diverses : résines, gommes, sucres, colorants [6].

En fonction du type d'enrobage, on distingue :

Type de comprimé	Enrobage	Temps de désagrégation	Exemples [9]
Pelliculé	Polymère filmogène très fin	30 à 60 minutes	VIAGRA®
Dragée	À base de sucre	≤ 60 minutes	OENOBIOL®

La technique de dragéification transposée avec succès sur les solides pharmaceutiques a vu son importance diminuer au fil de ces vingt dernières années. En effet, ce procédé multi-étapes, dont certaines délicates comme les phases de montage et de coloration, présente en outre l'inconvénient de consommer beaucoup de temps (environ trois jours pour la fabrication d'un lot de comprimés) [10].

Pour pallier ces inconvénients, on a introduit le pelliculage par film : c'est la principale technique de macro-enrobage pratiquée dans l'industrie pharmaceutique. Il peut être défini comme un procédé permettant de déposer sur un support solide (cristaux, grains, minigranules, comprimés…) une mince pellicule de film à base de polymère. L'épaisseur de ce film est généralement comprise entre 20 et 100 µm [10].

Les objectifs d'un enrobage peuvent être :

- masquage d'une odeur ou d'un goût désagréable
- protection du principe actif, contre la lumière ou l'humidité par exemple
- faciliter l'identification (VALIUM® : 2 mg = blanc, 5mg = jaune, 10 mg = bleu) [6].

c) *Comprimés à libération modifiée*

- **Formes à libération accélérée**

Les comprimés à libération accélérée sont formulés de façon à obtenir un temps de désagrégation court. Ils comprennent :

- les comprimés effervescents
- les comprimés orodispersibles

Leur but est essentiellement de faciliter la prise du médicament, en cas de problème de déglutition par exemple. Pour l'administration par sonde, les comprimés orodispersibles peuvent être dissous dans un peu de liquide [6].

Type de comprimé	Utilisation	Particularité	Temps de désagrégation	Exemples [9]
Effervescent	À dissoudre dans l'eau avant administration	Libération de gaz carbonique en milieu aqueux	≤ 3 minutes	DAFALGAN®
Orodispersible	À faire « fondre » sur la langue	Comprimés lyophilisés	Quelques secondes	ZOMIGORO®

Il existe plusieurs technologies pharmaceutiques permettant d'aboutir aux comprimés orodispersibles, dans le but d'obtenir une désagrégation rapide.

Compte tenu de leur procédé de fabrication (lyophilisation), les comprimés orodispersibles sont très friables. Ils sont donc à utiliser avec précaution lors du déconditionnement [6, 7].

Des confusions peuvent être faites entre les comprimés orodispersibles et les comprimés sublinguaux. Nous allons récapituler les différences qui existent entre ces deux formes au sein du tableau suivant :

Type de comprimé	But	Utilisation	Lieu d'absorption du principe actif	Exemples [9]
Orodispersible	Difficulté de déglutition	À placer sur la langue	Muqueuse gastro-intestinale	ZOMIGORO®
Sublingual	Éviter le métabolisme pré-systémique	À placer sous la langue	Muqueuse sublinguale	TEMGÉSIC®

Les comprimés sublinguaux sont destinés à être placés sous la langue. Après dissolution, le principe actif est absorbé à travers la muqueuse sublinguale, de façon plus ou moins rapide, et ne subit ainsi pas de métabolisme pré-systémique dans le tractus gastro-intestinal ou le foie. Le métabolisme pré-systémique réduit la biodisponibilité du principe actif.

Les comprimés orodispersibles permettent de prendre de gros comprimés sans risque de fausse route [6].

- **Formes à libération différée [6]**

Ces formes galéniques sont destinées à libérer le principe actif à un moment différent par rapport à un comprimé simple. Ce sont par exemple les comprimés gastro-résistants, formulés de façon à résister aux sucs gastriques puis à se désagréger dans l'intestin. Ces comprimés ne doivent pas être écrasés. Leur but est :

- de protéger le principe actif contre une dégradation par les acides de l'estomac (INEXIUM®)
- de protéger la muqueuse gastrique contre une irritation par le principe actif (ASPIRINE pH 8®).

Une libération différée du principe actif dans l'intestin peut être obtenue soit en enrobant le comprimé d'un film gastro-résistant (ASPIRINE pH 8®), soit par des technologies pharmaceutiques plus sophistiquées, telles que les MUPS (Multiple Unit Pellet System) (figure 11).

Les comprimés MUPS d'INEXIUM® contiennent de nombreux pellets (c'est-à-dire des microgranules, microsphères ou microbilles) de 0,5 mm de diamètre recouverts d'une couche protectrice gastro-résistante. Les pellets sont rapidement libérés dans l'estomac et transportés jusqu'à l'intestin où le principe actif est absorbé (figure 12).

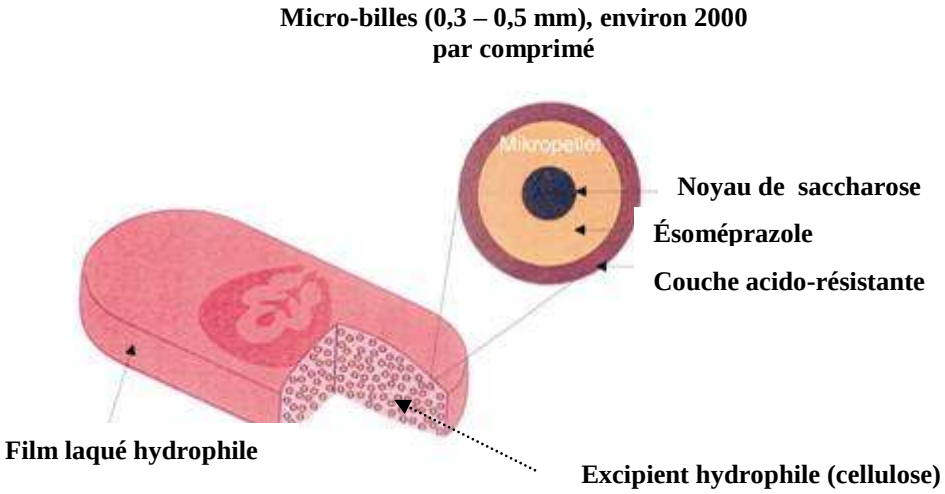


Figure 11 : Le système des comprimés MUPS : exemple de l'INEXIUM® [6].

Figure 12 : Libération des pellets dans le tube digestif [11].

- **<u>Formes à libération ralentie ou prolongée</u>**

Plusieurs technologies pharmaceutiques permettent de prolonger la libération d'un principe actif et ainsi de réduire la fréquence d'administration en comparaison aux comprimés simples. Ces formes galéniques ne doivent pas être écrasées.

La vitesse de libération du principe actif peut simplement être prolongée par la présence d'un enrobage (Exemple : ADALATE® LP 20 mg, comprimé filmé).

Le système Oros® (Oral Osmotic System) est basé sur la pression osmotique (figure 13). Les comprimés sont constitués d'un noyau à deux compartiments (un compartiment avec le principe actif et un compartiment faisant office de « moteur osmotique »). Le noyau est entouré d'une membrane semi-perméable percée d'un orifice. La pénétration d'eau dans le noyau génère une pression osmotique permettant l'expulsion du principe actif à travers l'orifice de sortie à vitesse constante.

Les comprimés avec pellets permettent également une libération à vitesse constante du principe actif. C'est la technologie utilisée dans les comprimés de SELOZOK® LP. Les comprimés sont constitués d'une multitude de pellets entourés d'un film contrôlant la libération du principe actif. Après l'administration, le comprimé se désintègre en nombreux pellets qui libèrent le métoprolol de façon continue durant 20 heures [6].

Une autre technologie est utilisée : celle utilisant les comprimés multicouches. L'invention concerne un comprimé prévoyant de multiples libérations de médicaments et dans lequel la libération de médicaments d'une couche contenant un médicament ne perturbe pas celle d'une autre couche contenant un médicament (figure 14). Le comprimé contient au moins une couche à libération rapide et/ou au moins une couche à libération prolongée ainsi qu'une couche barrière inerte interposée de façon superposée, le comprimé comptant au moins un

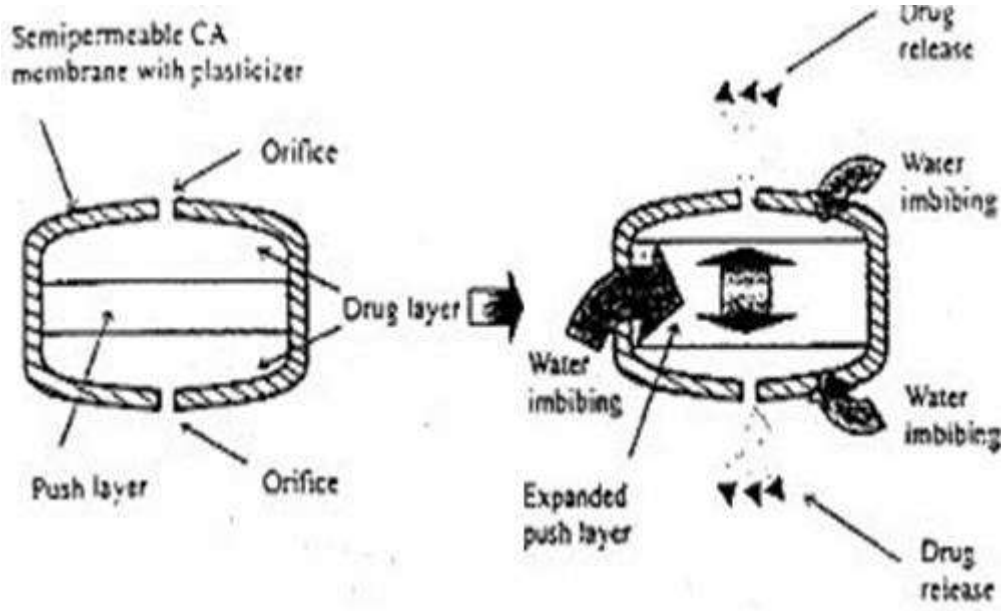


Figure 13 : Le système Oros [12].

total de trois couches. Le médicament se trouvant dans la couche à libération rapide peut être identique ou différent du médicament de la couche à libération retard. La couche barrière inerte est adaptée pour se désintégrer, subir une érosion, se dissoudre et/ou se séparer d'une autre façon complètement de chaque couche contenant un médicament en quelques minutes suivant l'exposition à un milieu aqueux. La surface d'une couche contenant un médicament reste exposée après la séparation de la couche barrière de sorte que la libération du médicament de la couche contenant un médicament se produise indépendamment de la couche barrière et de n'importe quelle autre couche contenant un médicament. La couche à libération rapide est adaptée pour libérer sa charge de médicament en moins de deux heures après le début de la libération et la couche à libération retard est adaptée pour libérer sa charge de médicaments au cours d'une période prolongée allant de quelques heures jusqu'à approximativement 24 heures. La libération de médicaments de chacune des couches contenant un médicament peut être retardée selon les nécessités du schéma thérapeutique [13].

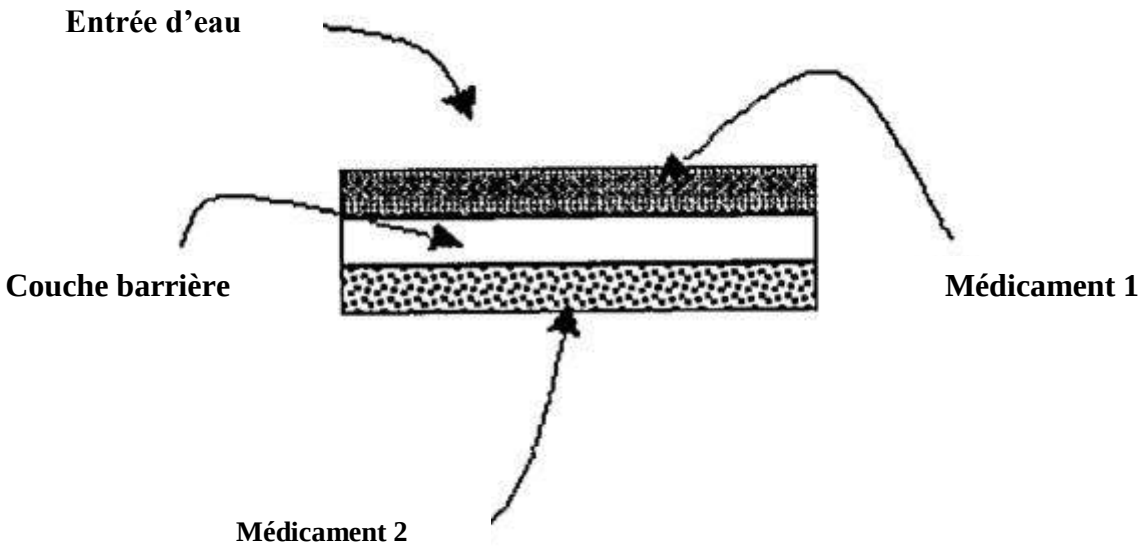


Figure 14 : Structure d'un comprimé multicouche [13].

3. Les capsules

a) Définition

Selon la Pharmacopée Européenne, les capsules sont des préparations solides constituées d'une enveloppe dure ou molle, de forme et de capacité variables, contenant généralement une dose unitaire de substance (s) active (s). Les capsules sont destinées à l'administration par voie orale.

L'enveloppe est à base de gélatine ou d'autres substances dont la consistance peut être adaptée par addition, par exemple, de glycérol ou de sorbitol. D'autres excipients tels que des agents tensioactifs, des opacifiants, des conservateurs antimicrobiens, des édulcorants, des colorants autorisés par l'Autorité compétente et des aromatisants peuvent également être ajoutés. Les capsules peuvent porter des indications imprimées.

Le contenu des capsules peut être solide, liquide ou de consistance pâteuse. Il est constitué d'une ou plusieurs substances actives additionnées ou non d'excipients tels que solvants, diluants, lubrifiants et désintégrants. Le contenu ne doit pas provoquer de détérioration de l'enveloppe. En revanche, celle-ci est profondément altérée par les sucs digestifs ; il en résulte la libération du contenu [8].

b) Capsules simples

Le temps de désagrégation des capsules doit être inférieur à trente minutes, excepté pour les capsules à libération modifiée (voir paragraphe suivant). Les différents types de capsules sont représentés dans le tableau suivant :

Type de capsule	Enveloppe	Contenu	Exemples [9]
Dure (= gélule)	Dure, en 2 parties emboîtables	Solide (poudre)	GINKOR FORT®
Molle	Molle et épaisse, en une seule partie	Visqueux ou pâteux	ROACCUTANE® 10 mg

En cas de difficultés de déglutition ou d'administration par sonde, seules les capsules dures peuvent être ouvertes, et leur contenu dispersé dans un peu d'eau [6].

c) Gélules à libération modifiée

- **Formes à libération différée**

Tout comme avec les comprimés, il peut exister des capsules conçues dans le but d'obtenir une gastro-résistance. Elles sont élaborées dans le même principe que les comprimés MUPS.
En effet, dans certains cas, il peut exister des pellets à enrobage gastro-résistant contenus dans une capsule. Celle-ci se désagrège dans l'estomac, libérant les pellets qui sont transportés dans l'intestin, lieu d'absorption du principe actif.
Ces capsules peuvent être ouvertes, mais les pellets ne doivent pas être écrasés. Les pellets peuvent être dispersés dans un peu de liquide pour une administration par sonde, mais ils risquent de boucher la sonde en raison du diamètre souvent faible de celle-ci (Exemple : CRÉON® 12000 U, VIDEX®) [6, 9].

- **<u>Formes à libération ralentie ou prolongée</u> [6]**

Comme pour les capsules à pellets gastro-résistants, il existe des capsules avec pellets à libération prolongée. Les pellets sont dans ce cas enrobés par un film contrôlant la vitesse et/ ou le lieu de libération du principe actif. Comme ci-dessus, ces capsules peuvent être ouvertes et les pellets ne doivent pas être écrasés. Les pellets peuvent également être dispersés dans un peu de liquide pour une administration par sonde avec le risque de la boucher.

Exemple : L'ENTOCORT® CIR (Controlled Ileal Release) libère de façon prolongée le principe actif au niveau de l'iléon et de la première partie du gros intestin. L'indication de ces capsules étant la maladie de Crohn, ce contrôle de la libération permet de cibler le lieu de l'inflammation [14].

B. Les préparations parentérales

D'après la Pharmacopée Européenne, les préparations parentérales sont stériles, destinées à être injectées, perfusées ou implantées dans le corps humain ou animal.
Elles sont préparées par des méthodes visant à assurer leur stérilité et à empêcher l'introduction de contaminants, la présence de pyrogènes et la croissance de microorganismes. Ces préparations peuvent nécessiter l'emploi d'excipients, par exemple pour assurer l'isotonie au sang, ajuster le pH, augmenter la solubilité, permettre la conservation d'un principe actif ou pour assurer une action antimicrobienne.

La Pharmacopée Européenne [8] distingue :

- Les préparations injectables : elles peuvent être unidoses ou multidoses. Ces préparations peuvent être administrées en sous cutané, en intradermique, en intramusculaire ou en intraveineux le plus souvent.

- Les préparations pour perfusion : ce sont des solutions administrées obligatoirement par voie IV, après dilution. Elles sont administrées en injection lentes au « goutte à goutte » au moyen d'un perfuseur.

- Les préparations à diluer pour injection ou pour perfusion.

- Les poudres pour injection ou pour perfusion.

- Les implants.

- Les gels injectables.

Les voies parentérales permettent [7, 10] :

- une rapidité d'action des médicaments, c'est-à-dire quelques minutes à quelques dizaines de minutes suivant la voie d'abord.
- L'administration de produits non absorbables par d'autres voies
- L'obtention d'une biodisponibilité maximale.
- L'administration de substances à faible durée d'action et à faible marge de sécurité (ces substances ne s'administrent que par voie IV).
- L'apport massif de liquides.

C. Les limites de ces formes conventionnelles

Les moyens traditionnels d'administration de médicament les plus couramment utilisés incluent les voies IV et orale. Ces voies sont toujours le plus largement utilisées aujourd'hui, cependant chacune comporte ses inconvénients.

La libération des principes actifs par voie orale via les comprimés ou les capsules est en grande partie inefficace en raison de l'exposition des ingrédients pharmaceutiques actifs aux processus métaboliques de l'organisme [15]. De ce fait, une plus forte dose que nécessaire est souvent exigée et l'efficacité maximale du médicament est alors limitée.

L'administration IV traditionnelle est beaucoup plus problématique. La spécificité des médicaments injectés en intraveineux est souvent faible, ce qui nécessite d'injecter de grands volumes de médicaments aux patients, créant ainsi une forte concentration de ce médicament dans la circulation sanguine. Cette situation pourrait potentiellement mener à des effets secondaires toxiques [16].

Pour pallier cela, il a été mis au point de nouvelles formes galéniques : les hydrogels. Ces formes, utilisant des polymères dégradables et absorbables, représentent l'alternative la plus efficace et la moins risquée sur le plan médical.

IV. LES HYDROGELS, UN NOUVEAU MODE D'ADMINISTRATION DES PRINCIPES ACTIFS

Au cours des cinquante dernières années, il y'a eu de nombreux changements dans le domaine pharmaceutique qui ont permis d'apporter des solutions majeures sur le plan médical.

Les traitements du diabète, de l'ostéoporose, de l'asthme, des troubles cardiaques, du cancer et d'autres maladies utilisent de nouvelles formes pharmaceutiques et ne sont plus uniquement basés sur des formes d'administration conventionnelles [17].

Ces formes nouvelles sont représentées par les gels, notamment les hydrogels, qui sont des formes galéniques permettant, entre autres, une libération contrôlée et ciblée (via les nanogels que nous étudierons au chapitre IV) du principe actif (PA) ou du soluté[2].

Le contrôle de la libération des PA s'applique en jouant sur la diffusion du PA ou du soluté au sein du gel.

A. Les gels et les substances colloïdales

1. Qu'est ce qu'un gel ? [18]

Le gel est une substance colloïdale (milieu dit « solide ») dispersée dans un liquide (milieu liquide « solvant ») avec lequel elle réagit pour former un réseau tridimensionnel poreux.

Ce réseau comprend des points de réticulation (ou zone de fixation) entre les particules colloïdales au sein desquels disparaît tout mouvement brownien.

Selon le type d'édification des réseaux et en fonction de la forme, du nombre, de l'arrangement et de la nature des points de réticulation des particules colloïdales, on pourra distinguer la forme gel ou sol (figure 15).

Le sol est une solution colloïdale au sein de laquelle le milieu « solide » n'est pas connecté. Il correspond soit :

- au stade intermédiaire avant la formation du gel (= transition sol-gel)
- au résultat de la destruction du gel après un traitement.

[2] Tout au long de ce travail, il faudra considérer que les méthodes de diffusion au sein d'un gel s'appliquent au PA et au soluté.

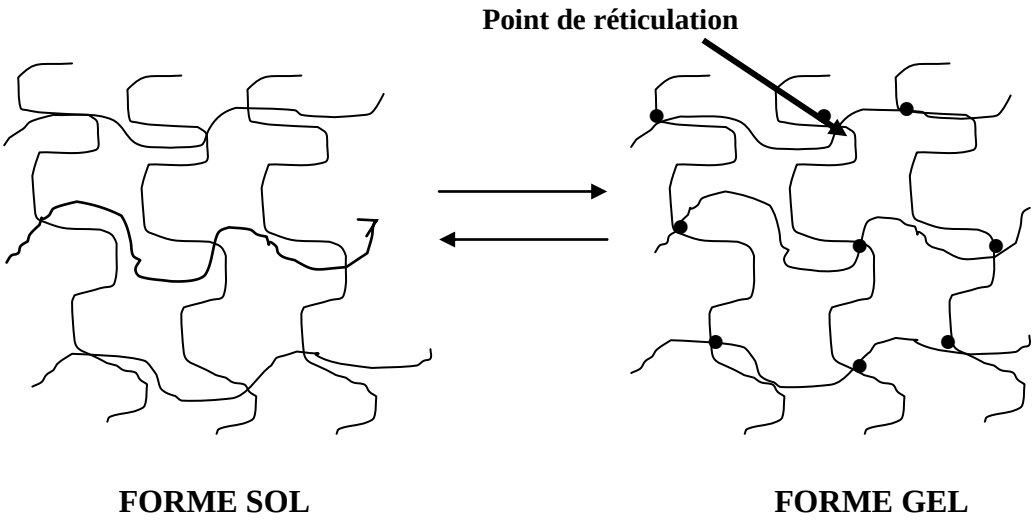


Figure 15 : Illustration de la transition sol – gel [19].

2. Les familles de gel

On distingue deux grandes familles de gels [19] :

- les gels chimiques (ou permanents)
- les gels physiques (ou réversibles)

a) Les gels chimiques (ou permanents)

Les points de réticulation sont formés par réaction chimique pour constituer le milieu « solide ». Celui-ci ne peut être dissous que par dégradation.

b) Les gels physiques (ou réversibles)

Les longues molécules sont reliées entre elles, en certains points, par des liaisons faibles ou par enchevêtrement de zones cristallisées [20]. Pour liquéfier les gels réversibles, il suffit de modifier les conditions physiques (Exemple : la température, le pH) ou de les soumettre à une agitation mécanique (= thixotropie).

Le gel se reforme lorsqu'on le replace dans les conditions physiques initiales.

3. La structure colloïdale [18]

Elle est caractérisée par :

- un nombre d'atomes de 10^3 à 10^9 molécules reliées par des forces de Van der Waals, de covalence homopolaire, d'attraction dipolaire entre dipôles permanents et ions ou par des liaisons hydrogènes. Ces liaisons sont détruites par le chauffage ou par des variations de pH.
- une taille des particules de 1 à 100 nm.

On distingue :

- Les colloïdes sphériques :
    - inorganiques de forme tubulaire ou cubique.
    - organiques disposés en pelote

- Les colloïdes linéaires :
    - inorganiques
    - macromoléculaires fibrillaires étirés organiques.

Selon la nature chimique et l'affinité pour l'eau de la particule colloïdale, nous distinguerons les hydrogels et les oléogels (nous nous intéresserons plus particulièrement aux hydrogels tout au long de ce travail).

B. Les hydrogels

1. Définition

Les hydrogels sont des réseaux tridimensionnels réticulés gonflant en présence d'eau et qui sont constitués d'homopolymères ou de copolymères hydrophiles synthétiques ou naturels. Ils sont rendus insolubles grâce à une réticulation chimique ou physique. Cette réticulation confère au réseau sa structure et son intégrité physique.

Les hydrogels peuvent être neutres ou ioniques suivant la nature des groupements latéraux. Ils peuvent également être classés en produits amorphes ou semi-cristallins, en structures

composées majoritairement de liaisons hydrogènes, en assemblages supramoléculaires ou en agrégats d'hydrocolloïdes [17].

Certains hydrogels sont sensibles aux conditions environnementales et répondent à des stimuli aussi variés que la température, le pH et les champs électriques. Dans ce cas, les hydrogels sont composés de polymères physiologiquement sensibles. Ceux-ci peuvent être représentés par des complexes polymériques pouvant être cassés ou par des réseaux qui peuvent gonfler suite à une modification de l'environnement externe. Ces systèmes ont tendance à montrer des changements radicaux de leur proportion en augmentant considérablement de volume. De ce fait, on parlera d'hydrogels conventionnels et d'hydrogels intelligents qui sont sensibles aux conditions de l'environnement [21] (cf. Chapitre V).

2. Formulation des hydrogels

Une façon commode de classifier les hydrogels est basée sur la nature des groupements latéraux; ils peuvent être neutres ou ioniques. La nature chimique et le nombre de ces groupes peuvent être précisément contrôlés par le choix des entités chimiques utilisées dans la synthèse de polymères. Le tableau 1 donne un résumé des monomères les plus généralement utilisés pour la fabrication des polymères entrant dans la structure des hydrogels.

Les recherches sur la synthèse de nouvelles matières polymériques ont éclaté depuis la première utilisation médicale du Poly Hydroxyéthyl Méthacrylate, plus connu sous le nom de PHEMA.

Au lieu d'utiliser des polymères conçus pour une utilisation « grand public » et les adapter à des applications médicales, les chercheurs essayent de concevoir de nouveaux polymères qui résoudraient des problèmes spécifiques de libération des principes actifs des médicaments.

Donc, tandis que de nouveaux hydrogels composés de polymères comme PHEMA, l'alcool polyvinylique (PVA), le poly-N- isopropylacrylamide (PNIPAAm), sont synthétisés principalement par des techniques de préparation nouvelles et innovatrices, un certain nombre de nouveau monomères a été synthétisé pour la production de polymères ayant des propriétés spécifiques [17].

Les hydrogels sont également utilisés en tant que transporteurs qui peuvent interagir réciproquement avec la muqueuse tapissant la paroi gastro-intestinale, le côlon, le vagin, le

nez ainsi que d'autres parties du corps en raison de leur capacité à prolonger leur temps de résidence au niveau du site ciblé. L'interaction entre de tels transporteurs et les glycoprotéines de la muqueuse s'effectue principalement via des liaisons hydrogènes. De ce fait, les hydrogels contenant une forte proportion de groupements carboxyle et hydroxyle semblent être adéquats pour ce type d'application médicale.

Les monomères les plus souvent utilisés pour la synthèse de polymères mucoadhésifs incluent les acides acrylique et méthacrylique (MAA). Le Polyéthylène glycol (PEG), polymère très sollicité dans les hydrogels, va être utilisé pour réduire la dégradation des particules d'hydrogel par le système réticuloendothélial. Il a également été démontré que ce PEG permet d'allonger la demi-vie biologique et de réduire l'immunogénicité de protéines de haut poids moléculaire, comme l'adénosine désaminase et l'asparaginase [22].

Abréviations des monomères	***Monomères***
HEMA	*Hydroxyéthylméthacrylate*
HEEMA	*Hydroxyéthoxyéthylméthacrylate*
HDEEMA	*Hydroxydiéthoxyéthylméthacrylate*
MEMA	*Méthoxyéthylméthacrylate*
MEEMA	*Méthoxyéhoxyéthylméthacrylate*
MDEEMA	*Méthoxydiéthoxyéthylméthacrylate*
EGDMA	*Éthylène glycol diméthacrylate*
NVP	*N-vinyl-2-pyrrolidone*
NIPAAm	*N-isopropyl AAm*
VAc	*Vinyl acétate*
AA	*Acide acrylique*
MAA	*MAA*
HPMA	*N-(2-hydroxypropyl) méthacrylamide*
EG	*Éthylène glycol*
PEGA	*PEG Acrylate*
PEGMA	*PEG méthacrylate*
PEGDA	*PEG diacrylate*
PEGDMA	*PEG diméthacrylate*

Tableau 1 : Les monomères les plus souvent utilisés dans la synthèse d'hydrogels utilisés dans les applications pharmaceutiques [17].

3. La structure des hydrogels [22]

La pertinence de l'utilisation d'un hydrogel en tant que dispositif de libération de principe actif et sa performance dans une application thérapeutique particulière dépend en grande partie du réseau tridimensionnel formé par les hydrogels. Les paramètres les plus importants permettant de caractériser la structure de ce réseau sont : le volume du polymère à l'état gonflé, le poids moléculaire de la chaîne polymérique entre deux nœuds (ou points de réticulation) du réseau macromoléculaire (M_c) et la taille de la maille (ξ) correspondante.

Le volume du polymère à l'état gonflé est une mesure de la quantité de liquide absorbé et retenue par l'hydrogel. Le poids moléculaire entre deux nœuds du réseau tridimensionnel formé par un hydrogel est une mesure du degré de réticulation du polymère. Il est important de noter qu'en raison de la nature aléatoire du processus de polymérisation, seule la moyenne des valeurs de M_c peut être calculée.

La distance entre points de réticulation adjacents, ξ, fournit une mesure de l'espace disponible entre les chaînes macromoléculaires pour la diffusion de médicament; tout comme ci-dessus, cette distance ne peut être établie qu'en tant que valeur moyenne.

Il faut également ajouter que l'architecture polymérique va décrire la forme d'une molécule polymérique simple, ce qui va être l'élément essentiel pour déterminer les propriétés physicochimiques d'un hydrogel. On peut citer l'exemple d'un hydrogel très largement étudié : cet hydrogel est composé de copolymères linéaires obtenus de façon aléatoire à partir de monomères sensibles à la température, les PNIPAAm, et de monomères sensibles au pH, l'acide méthacrylique (MAA). On a pu démontrer que la sensibilité de cet hydrogel à la température disparaissait avec une quantité appréciable de MAA.

Cela donne une idée de la signification que peuvent avoir l'architecture et le choix des monomères lors de la manipulation des propriétés polymériques.

Pareillement à la formulation d'un hydrogel, lorsque l'on parle de structures polymériques pour la fabrication de nouveaux systèmes d'administration de molécules thérapeutiques via des hydrogels, on fait généralement appel à une classification des polymères selon leur nature chimique, leur stabilité structurale (biodégradable ou non) et leur comportement en milieu aqueux (hydrophile, hydrophobe).

Des exemples d'architecture polymérique que l'on retrouve au sein hydrogels destinés à des applications thérapeutiques sont représentés en figure 16.

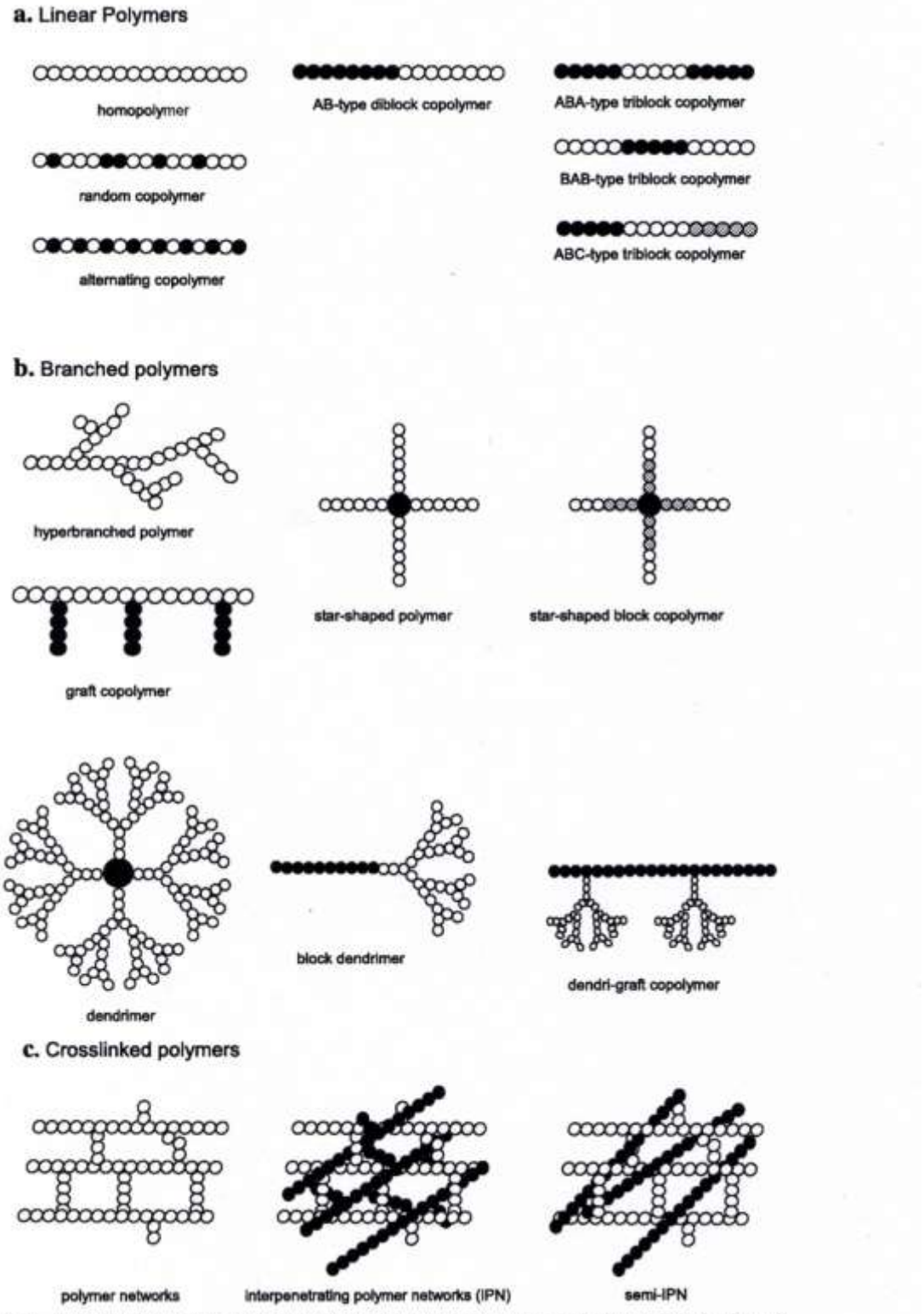


Fig. 1. Polymer architectures: (a) linear polymers, (b) branched polymers, and (c) cross-linked polymers.

Figure 16 : Architecture des polymères : (a) Polymères linéaires (b) Polymères branchés et (c) Polymères formant un réseau [22].

C. Diffusion des principes actifs dans les hydrogels

1. Principes de la diffusion simple

Le mécanisme de libération d'un PA contenu dans un gel est lié à un processus diffusionnel au sein d'excipients de nature polymérique.

La diffusion est définie par le mouvement de molécules d'un milieu de forte concentration vers un milieu de plus faible concentration (ou de concentration initialement nulle). Cette diffusion a lieu dans une géométrie plane et est régie par le coefficient de diffusion de la molécule étudiée et va être modifiée selon la structure polymérique du gel.

Dans une telle configuration de diffusion, les équations de profil de concentration peuvent être déterminées à partir de la deuxième équation de Fick, dans l'hypothèse d'un coefficient de diffusion indépendant de la concentration C :

$$\partial C/\partial t = D\, \partial^2 C/\partial x^2 \qquad (1)$$

où :

D : coefficient de diffusion du PA/soluté dans le gel considéré

C : concentration du PA/soluté

x : variable de position

t : variable de temps

Cette diffusion est en grande partie atténuée par les limitations de transfert de matière survenant à l'interface entre le gel et son environnement.

La limite de l'équation (1) vient du fait qu'elle ne s'applique qu'à des gels de fine épaisseur et de géométrie plane.

Des équations équivalentes ont donc été établies pour des gels à structure colloïdale, sphérique, cylindrique ou pour des gels ayant une épaisseur plus importante [17].

Afin d'améliorer la capacité prédictive de la théorie de diffusion de Fick, un coefficient de diffusion dépendant de la concentration, D.C, est utilisé dans l'équation (1) et on obtient :

$$\partial C/\partial t = \partial/\partial z\, (D.C\, (\partial C/\partial x)) \qquad (2)$$

Le coefficient D.C est fonction de la structure du gel [17]. Si on intègre l'équation (1) selon les conditions suivantes :

- concentration constante de PA, C_0, à l'interface x = 0
- épaisseur infinie du gel
- concentration nulle à t = 0 pour toutes les valeurs de x au sein du gel

On obtient la solution suivante :

$$dC/dx = (- 2C'/ (4\pi Dt))^{½} e^{x^2/ 4Dt} \qquad (3)$$

On a :
$C' = C_0 (1- \varphi)$, φ étant la fraction volumique du gel.

2. Détermination du coefficient de diffusion

Supposons un gel de structure colloïdale sphérique contenant initialement l'espèce diffusante, l'équation (1) peut alors être intégrée et on obtient [19] :

$$M/M_f = 6. (Dt/ r^2)^{0,5}. (\pi^{-0,5} + 2.\sum_{n=1}^{\infty} ierfc (nr/ (Dt)^{0,5})) - 3Dt/ r^2 \qquad (4)$$

où:

M: masse de soluté relarguée à un instant t

M_f : masse de soluté relarguée à l'équilibre (c'est-à-dire au temps infini)

r : rayon de la sphère

ierfc : inverse de la fonction erreur

Dans les premiers temps du relargage, c'est-à-dire jusqu'à un instant tel que $M/M_f \leq 0,5$ environ, l'équation (4) peut être écrite de la façon suivante :

$$M/M_f = 6/ r (Dt/\pi)^{0,5} \qquad (5)$$

En traçant la courbe $M/M_f = f(\sqrt{t})$, on peut vérifier que le relargage du PA suit bien la loi de Fick quand on réalise des études expérimentales.

Si le relargage suit bien la loi de Fick pour $0 \leq M/M_f \leq 0,5$, la courbe est une droite qui passe par zéro et le coefficient directeur de cette droite permet de calculer D avec précision de l'ordre de 5%.

Une autre méthode peut être proposée pour évaluer le coefficient de diffusion d'une matrice polymérique en se basant sur la première loi de Fick [23].

Cette loi permet de décrire un flux de matière, Ψ (= débit massique ou volumique, c'est-à-dire le nombre de particules molaires, moléculaires, atomiques, subatomiques ou photoniques, par unité de temps à travers une surface) en fonction des paramètres suivant :

- la surface S offerte à la diffusion
- le gradient de concentration en fonction de la distance, $\partial C/\partial x$
- le coefficient de diffusion D, caractéristique des interactions soluté-solvant, D :

$$\Psi = - D.S\ (\partial C/\partial x) \qquad (6)$$

On remarque la présence du signe «- » dans la formule. Il indique que, physiquement, le flux de diffusion se fait toujours dans le sens contraire du gradient, donc de la zone la plus concentrée en soluté vers celle la moins concentrée en soluté.

D'après le tableau 2, on constate que D diminue lorsque la masse molaire M augmente (donc quand la taille de la molécule augmente). En fait, D est fonction des caractéristiques du milieu (plus précisément de la température T) et du soluté via le coefficient de friction, f. Soit la formule d'Einstein suivante :

$$D = k.T / f \qquad (7)$$

où :

k représente la constante de Boltzmann.

Molécules	Masse Molaire M (g)	Coefficient de diffusion $D.10^5$ cm²/ s
H_2	2	5,2
O_2	32	1,98
NaCl	58,5	1,39
Lactose	342	0,48
Myoglobine	17500	0,11
Hémoglobine	68000	0,063
Autres Macromolécules	2946000	0,018

Tableau 2: Évolution de D en fonction des molécules

Le coefficient de diffusion D augmente lorsque la température augmente (il y'a plus d'agitation moléculaire) ou lorsque f diminue (il y'a moins de frottements). Par ailleurs, Stockes a relié le coefficient de friction f, avec le coefficient de viscosité η du milieu et le rayon r de la particule supposée sphérique. Soit :

$$f = 6\pi\eta r \qquad (8)$$

où l'on voit que f augmente quand la viscosité du milieu augmente ou que la particule est plus grande. La formule d'Einstein devient :

$$D = k.T/6\,\pi\eta r \qquad (9)$$

Si la particule est sphérique (approximativement vrai pour les grosses molécules), on a $m = \rho V = M/N$, soit :

$$r = (3M/4\pi\rho N)^{1/3} \qquad (10)$$

Cela nous ramène à l'équation suivante :

$$D = A.T/\,(M)^{1/3} \qquad (11)$$

avec :

$$A = (k/6\pi\eta).\,(4\eta\rho N/3)^{1/3}$$

Une fois A évalué, on peut calculer les masses molaires des macromolécules par la méthode de diffusion.

3. Diffusion dans les systèmes à libération contrôlée

Les mécanismes de diffusion des PA dans les gels permettent de classer les systèmes de libération contrôlée dans différentes catégories :

- libération par contrôle de la diffusion
- libération par contrôle chimique du système
- libération par contrôle du gonflement
- cas particulier : diffusion dans un système continu

a) Libération par contrôle de la diffusion [17]

Les systèmes réservoirs contrôlant la diffusion sont des agents bioactifs contenant un noyau séparé du milieu externe par une membrane polymère.
Le mode de libération dans un tel système est indépendant du temps (c'est une libération d'ordre zéro) aussi bien pour des gels à géométrie plane que sphérique ou cylindrique.
Dans le cas de gels à géométrie sphérique, les équations 12 et 13 nous donnent respectivement le taux de libération en PA et la quantité totale de PA libéré :

$$dM_t/dt = (4\pi DK\,(c_2 - c_1)) / ((r_e - r_i) / r_e r_i) \qquad (12)$$

$$M_t = (4\pi DK\,(c_2 - c_1)) / ((r_e - r_i) / r_e r_i) \qquad (13)$$

avec :

D : coefficient de diffusion indépendant de la concentration

M_t : quantité de PA libéré au temps t

K : coefficient de partage du PA

r_e et r_i : rayons interne et externe de la sphère

c_1 et c_2 : concentrations en PA à l'intérieur et à l'extérieur de la matrice respectivement.

On peut observer que la quantité de PA libérée est dépendante de l'épaisseur de la membrane, de la différence de concentration en PA de part et d'autre de la membrane, des

caractéristiques thermodynamiques du système par le biais du coefficient de partage et de la structure du polymère via le coefficient de diffusion du PA.

b) *Libération par contrôle chimique du système [17]*

Il existe des systèmes érodibles au sein desquels le taux de libération des PA est déterminé par la dégradation ou la dissolution du polymère composant le gel. Dans ces systèmes, le phénomène de libération en PA est conditionné par la diffusion ou l'érosion selon que l'un ou l'autre soit le mécanisme prépondérant.

Si la diffusion est majoritaire, le phénomène est étudié par les équations 12 et 13. Dans le cas contraire, le PA diffuse lentement et reste incorporé dans la matrice : la libération est donc fonction de l'érosion.

c) *Libération par contrôle du gonflement [17]*

Le PA est dissous ou dispersé au sein de la matrice polymère sans être capable d'en sortir. Avec l'entrée du solvant, le polymère solide à l'état vitreux gonfle. La température de transition vitreuse diminuant, le polymère passe à un état caoutchouteux pour ressembler à un gel. Il se crée ainsi un front de séparation gel-solide qui progresse vers le centre du système. Avec la relaxation moléculaire associée au passage à l'état caoutchouteux, le PA est alors capable de diffuser vers l'extérieur. Ce phénomène est représenté par l'équation suivante (cette équation n'est applicable que si la quantité de PA libérée est inférieure ou égale à 60% de la quantité totale) :

$$M_t / M_\infty = k' t^n \qquad (14)$$

avec :

M_t , M_∞ : quantités de PA/ soluté libéré au temps t, à l'équilibre

k' : constante de proportionnalité

n : exposant de diffusion

Le système à gonflement est particulièrement intéressant pour la libération de protéines parce qu'il est le seul à laisser diffuser ces molécules de masse molaire élevée, grâce aux

canaux de fluide présents dans la matrice à l'état de gel. Le système à gonflement typique est l'hydrogel, polymère très hydrophile, qui absorbe le solvant en grande quantité.

La diffusion du PA dans la phase caoutchouteuse est généralement de type fickien lorsque le système a atteint son équilibre de gonflement (c'est le gonflement limité). Cependant, si cet équilibre n'est pas atteint (gonflement continu), la diffusion est de type anormal et possède une cinétique d'ordre zéro quand le front de séparation avance à vitesse constante. Quel que soit le type de diffusion, la vitesse de libération du PA est proportionnelle à celle de la pénétration du solvant dans la matrice polymère.

À la différence des systèmes de libération contrôlée par diffusion, le système à gonflement a l'avantage de donner un type de libération indépendant des propriétés du PA. Il n'est pas nécessaire ainsi, d'établir une nouvelle formulation pour un PA ayant des propriétés différentes. Le système à gonflement peut tout de même être considéré comme un système matriciel particulier [24].

d) Cas particulier : Diffusion dans un système continu [25]

G. Conrath *et al.* se sont penchés sur l'étude de libération du PA dans un récepteur liquide. Il apparaît que ce type d'étude peut être à l'origine de nombreux artéfacts qui nuisent à la qualité de la détermination expérimentale. Ils se sont donc attachés à mettre au point des techniques expérimentales fiables pour déterminer le coefficient de diffusion du PA dans les gels polymères afin d'obtenir des valeurs représentatives de la diffusion pour le seul compte PA-polymère sans recourir à l'utilisation d'un milieu récepteur de nature différente.

Pour cela, on va intercaler le gel à étudier, chargé de PA, entre deux portions du même gel, mais dépourvu de PA. On se retrouve donc dans la situation expérimentale désirée avec la diffusion d'un PA dans un milieu continu et cette diffusion peut être suivie au niveau des deux interfaces système chargé-système non chargé (figure 17).

Pour résoudre l'équation de Fick (équation 1), des solutions différentes doivent être développées selon que la concentration C_0 en PA est supérieure ou inférieure à la concentration limite de solubilité C_s dans le système de gel.

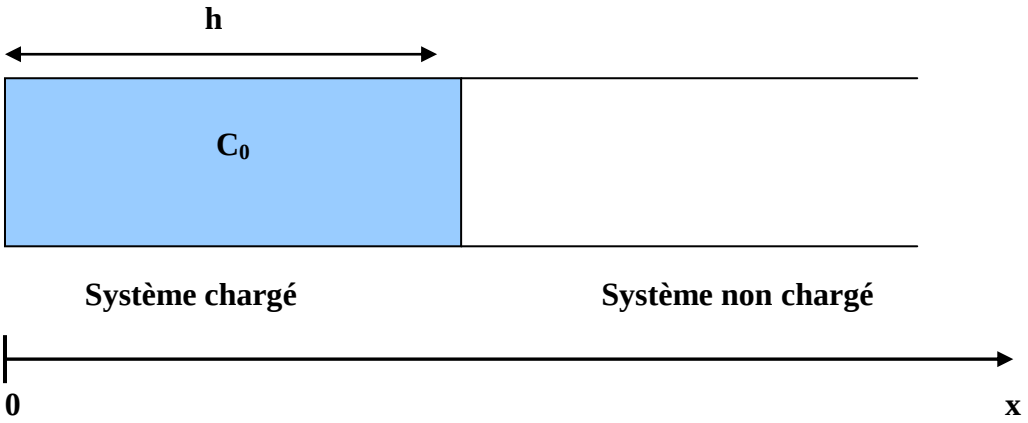


Figure 17: Géométrie de diffusion du modèle théorique. Gel de concentration C_0 et d'épaisseur h au contact d'un même gel de concentration nulle et d'épaisseur infinie [25].

- **Concentration $C_0 < C_s$**

L'équation de BAKER & LONSDALE va nous permettre d'exprimer les quantités libérées dans une configuration de géométrie plane et pour un milieu receveur maintenu à une concentration nulle. Cette expression est donnée pour les petits temps de libération :

$$M_t/M_0 = 2.\ (\sqrt{D}/\ h\sqrt{\pi}).\sqrt{t} \qquad \text{pour } M_t/M_0 \leq 0{,}6 \qquad (15)$$

où :

M_t : quantité libérée au temps t

M_0 : quantité totale

D : coefficient de diffusion

t : temps

h : épaisseur de la matrice chargée

Une expression simplifiée, avec une excellente approximation allant jusqu'à 40% de libération de PA, peut être exprimée sous la forme :

$$M_t/M_0 = 2.\ (\sqrt{D}\ \sqrt{t})/\ (h\sqrt{\pi}) \qquad \text{pour } M_t/M_0 \leq 0{,}4 \qquad (16)$$

Une autre expression peut être proposée pour évaluer le coefficient de diffusion. Cette expression représente l'évolution de la concentration maximale C_m dans le système

initialement chargé. Dans une configuration où un système chargé est intercalé entre deux systèmes non chargés, cette concentration maximale se situe à tout instant au centre du système chargé. Sa valeur initialement égale à C_0, décroît selon l'équation suivante :

$C_m = C_0\ erf\ (h/\ 2\sqrt{D}\ \sqrt{t})$ avec erf : fonction erreur (17)

Ainsi :

$1/\ ierf\ (C_m/\ C_0) = 2.\ (\sqrt{D}\ \sqrt{t})/\ h$ (18)

avec :

ierf: fonction inverse de la fonction erreur

- **<u>Concentration $C_0 > C_s$</u>**

Dans de telles conditions de concentration, le PA se trouve, dans le gel chargé, pour partie sous forme dissoute et pour partie en suspension. Seule la fraction de PA dissous peut diffuser, ce qui va entraîner une dissolution progressive de la fraction en suspension. Il apparaît donc un front de solubilité (situé initialement à l'interface gel chargé – gel non chargé) dont le recul témoigne du phénomène de diffusion vers la région non chargée.

Deux expressions mathématiques ont été développées permettant l'évaluation du coefficient de diffusion.

- La première expression s'attache à décrire le recul du front de solubilité situé au temps t et à la distance δ de sa position initiale. Il apparaît que le recul du front de solubilité suit une loi en √t dont l'expression est :

$\delta = \alpha\ \sqrt{D}\ \sqrt{t}$ (19)

où α est une constante qui ne dépend que du rapport C_0/C_s et on a l'équation suivante :

$C_s/\ (C_0 - C_s) = \sqrt{\pi}\ (\alpha/2)\ erfc\ (-\alpha/2).e^{[(\alpha/2)^2]}$ (20)

Avec erfc = 1- erf

- La deuxième expression définit l'évolution des quantités dans le système initialement non chargé :

$M_t / M_0 = \beta . (\sqrt{D}\sqrt{t}) / (h\sqrt{\pi})$ (21)

où β est une constante qui ne dépend que du rapport C_0 / C_s selon l'équation suivante :

$\beta = 2C_s / C_0 \, erfc(-\alpha/2)$ (22)

De par sa définition, le coefficient β tend vers 1 quand C_0 tend vers C_s, ce qui donne par l'équation 21, l'expression classique des quantités libérées dans le cas d'un PA/soluté totalement dissous (cf. équation 16).

D. MISE EN ÉVIDENCE EXPÉRIMENTALE DE LA DIFFUSION DES PRINCIPES ACTIFS DANS LES GELS

1. Pénétration totale du PA/soluté dans le gel [23]

a) *Principe*

Un des moyens de détermination du coefficient de diffusion d'un PA/soluté est de mesurer la quantité totale de PA/soluté, ΔS, qui pénètre dans un gel, pendant un temps t, quand une solution de ce PA/soluté à concentration constante C_0 se trouve au contact d'une surface de gel plane et d'aire Q.

Ces études peuvent être menées dans des boîtes de Pétri. Durant cette manipulation, il faut conserver la concentration en PA/soluté constante, et pour cela il existe deux possibilités :

- soit par un apport continuel du PA/soluté dans le milieu
- soit en apportant au départ une quantité en soluté supérieure à celle qui doit diffuser dans le gel et ensuite assurer une agitation.

L'épaisseur du gel devrait être supérieure ou égale à $3/2 . (2Dt)^{½}$; cela permet de s'assurer que le PA/soluté qui pénètre dans le gel au niveau de l'interface gel/solution n'en ressortira pas.

b) *Résultats*

La relation entre ΔS et D peut être obtenue en posant, dans l'équation 3, x = 0 à l'interface gel/solution. On va appliquer le résultat obtenu pour dC/dx à l'équation suivante :

$$dS = - DQ\,(dC/dx)\,dt \qquad (23)$$

et on obtiendra l'équation :

$$dS = \frac{\sqrt{D}\ Q\ C'}{\sqrt{\pi}\ \sqrt{t}}\ dt \qquad (24)$$

Après intégration, on a :

$$\Delta S = 2.\,(C'\,Q\sqrt{D}\,\sqrt{t})/\sqrt{\pi} \qquad (25)$$

Rappelons que C' = C_0 (1-φ), φ étant la fraction volumique du polymère et C_0 la concentration constante en PA/soluté à l'interface gel/solution de position x = 0.
C' peut être obtenue en agitant de façon continue une solution externe de volume suffisamment grand pour obtenir une quantité en PA/soluté plus grande que celle qui va diffuser dans le gel.

Si la densité de la solution est significativement différente de celle du solvant, on va alors utiliser un dispositif permettant une convection dans le but de maintenir la concentration de départ à la surface du gel.

2. La technique du « slicing » [23]

Cette méthode a été approfondie par Schanz et Lauffer.

a) *Principe*

Considérons un tube cylindrique (seul le paramètre des abscisses, x, est à prendre en compte) exposé à une solution du PA/soluté à étudier. Les molécules vont diffuser horizontalement telles qu'indiquées sur la figure 18, en fonction de x. Ce procédé va nous

permettre d'évaluer la concentration en PA/soluté à chaque position de x, à un temps t après la diffusion.

Après la diffusion, le gel est isolé et coupé en tranches qui vont être analysées par une méthode appropriée au PA/soluté à l'étude.

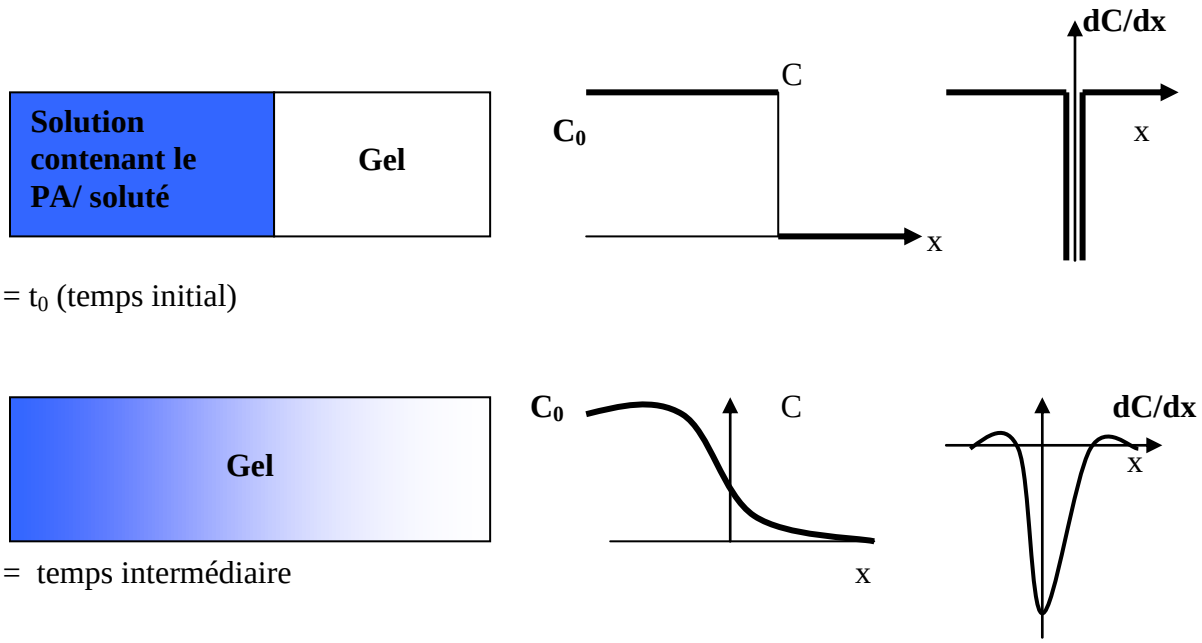


Figure 18: Technique de « slicing » : Évolution de la diffusion du PA/soluté au sein du gel [23].

b) *Résultats*

Chaque tranche, d'épaisseur p, est analysée et on obtient C, la quantité en PA par unité de volume de gel. On pose :

$$C/C' = 2/(\sqrt{2}\sqrt{\pi}) \int_z^{\infty} e^{-z^2/2}\, dz \qquad (26)$$

avec :

C' : concentration en PA par unité de volume de solution en contact avec le gel × (1- φ)

z : x. $(2Dt)^{-½}$ pour $t \geq 0$.

On peut obtenir la valeur expérimentale de z en résolvant l'équation 26 et en utilisant une table d'intégration de la fonction normale ou une feuille de probabilité.

Ensuite, à partir de la pente du tracé obtenu avec la feuille de probabilité ou du rapport x_m/z (x_m, distance interface/ milieu de la tranche), on peut calculer D à l'aide de l'équation suivante :

$$x_m/z = (\sqrt{2D}\sqrt{t}) / [(1 - p^2)/(48Dt)] \qquad (27)$$

avec

p : épaisseur de chaque tranche.

3. Diffusion dans une matrice polymère [25]

Nous avons défini précédemment le cadre théorique de la diffusion en milieu continu. G. Conrath et ses collaborateurs ont par la suite mis au point deux méthodes expérimentales afin de déterminer le coefficient de diffusion du soluté dans des gels polymères, à savoir :

- la détermination *in situ* du profil de concentration
- la mise en évidence de l'évolution du front de solubilité.

Ces deux méthodes consistent à intercaler un gel chargé en PA entre deux gels, de même composition, non chargés en PA. Elles diffèrent par le mode de caractérisation de la diffusion.

a) *Détermination in situ du profil de concentration*

- **Principe**

Cette méthode est utilisable quelles que soient les conditions de concentration du PA dans le gel et va mettre en évidence le profil de concentration à différents temps de diffusion. Elle nécessite l'utilisation de PA radiomarqués et d'un compteur de radioactivité linéaire multicanaux. Le protocole expérimental a été décrit à partir d'un exemple d'application à un gel (à base d'Aérosil) pharmaceutique de testostérone.

Un traceur radioactif, le ^{14}C testostérone, est rajouté au gel. Le gel, ainsi chargé, est introduit dans la cellule de diffusion avec, de part et d'autre, le même gel non chargé en PA. La cellule présente donc deux interfaces au niveau desquelles la diffusion va pouvoir débuter.

Afin de déterminer le profil de concentration dans une cellule, il a été utilisé un compteur de radioactivité linéaire : des déterminations de ces profils ont été réalisées à des temps différents.

- **Résultats**

La figure 19 donne, pour une cellule, l'évolution des profils de répartition de l'activité en fonction du temps. Nous pouvons observer sur ces profils de concentration deux phénomènes dont l'évolution est représentative de la diffusion :

- On a un élargissement des pics (= aires sous courbe hachurées) au fur et à mesure de la diffusion de la testostérone vers les régions non chargées : cela représente la quantité libérée. On peut ainsi calculer le rapport M_t / M_0 de l'équation 16 par le rapport de l'aire hachurée sur l'aire totale du pic.
- On a une diminution progressive de la hauteur du pic : la hauteur du pic obtenu à un temps t, rapportée à la hauteur du pic au temps t_0 correspond à la valeur C_m / C_0 intervenant dans l'équation 17.

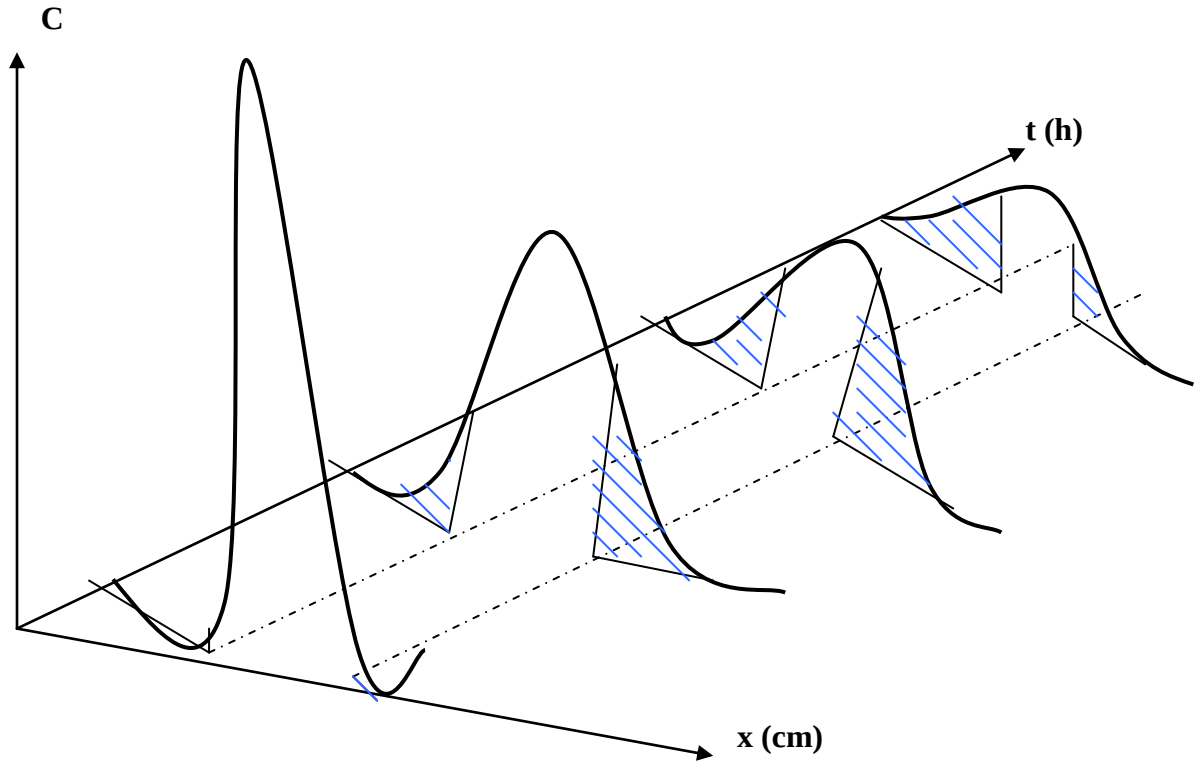


Figure 19: Profils de répartition de l'activité dans une même cellule pour quatre temps de diffusion [25].

Les deux grandeurs expérimentales M_t / M_0 et C_m / C_0 doivent être affectées d'un paramètre de correction car il existe des erreurs liées au mode de fonctionnement du compteur de radioactivité (émission latérale β^-) qui vont influer sur le chromatogramme. Cependant, cette erreur s'est avère plus importante dans les petits temps de mesure et très faible dans les grands temps.

Il existe donc deux modes d'interprétation des résultats :

- Une évaluation directe du coefficient de diffusion peut être faite au temps limite de validité du modèle théorique (à 40% de libération du PA, voir chapitre III. C) sans apporter de correction sur les valeurs expérimentales.

- Une quantification de l'effet d'émission latérale peut être faite si on veut utiliser tous les résultats expérimentaux ; cette quantification se fait à l'aide d'une modélisation mathématique, ce qui permet d'apporter une correction sur chaque valeur expérimentale.

Les valeurs de M_t / M_0 peuvent être linéarisées en fonction de la racine carrée du temps (figure 20) comme l'indique l'équation 16. Les valeurs de C_m / C_0 exprimées sous la forme 1 /ierf (C_m / C_0) donnent également une droite en fonction de la racine carrée du temps (cf. équation 18 et figure 21).

Des pentes de ces droites, le coefficient de diffusion peut être calculé. Il apparaît, à la fin de cette étude, que les deux méthodes d'interprétation sont, chacune, très reproductibles.

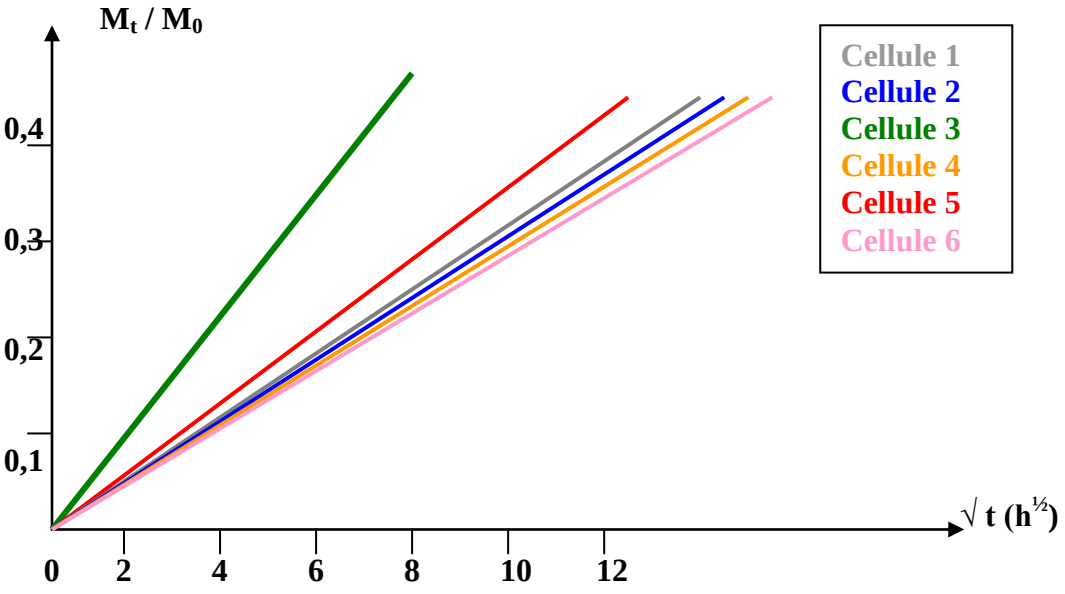


Figure 20: Évolution du rapport M_t/M_0 en fonction de √t, pour les gels à base d'Aérosil [25].

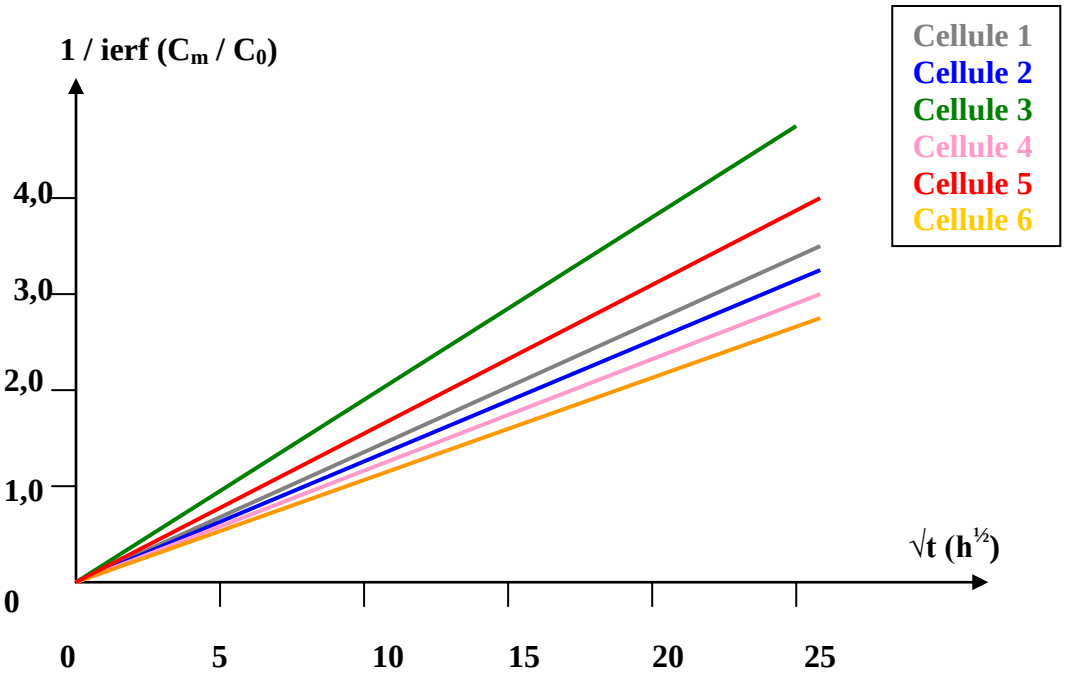


Figure 21: Évolution de 1/ ierf ($C_m - C_0$) en fonction de √t, pour les gels d'Aérosil [25].

b) Mise en évidence de l'évaluation du front de solubilité

- **Principe**

Cette technique est le plus souvent appliquée à un gel contenant un PA en suspension. Lorsqu'on incorpore un PA dans un système polymère, il existe une concentration maximale de solubilité C_s au-delà de laquelle le soluté se trouve partiellement à l'état dispersé non solubilisé. Dès lors que le système polymère présente une certaine transparence à l'état naturel, le PA en suspension apparaît visuellement.

Ainsi, si on juxtapose un gel chargé entre deux gels non chargés, la partie centrale de gel contenant le PA en suspension apparaîtra bien distincte, matérialisée par deux frontières ou fronts de solubilité.

Au fur et à mesure de la diffusion du PA vers les zones de gel initialement non chargées, un recul des fronts de solubilité pourra être observé jusqu'à la disparition de cette zone sursaturée.

La technique expérimentale repose ici sur l'observation de ce phénomène afin de déterminer le coefficient de diffusion. Conrath *et al.* ont étudié pour cela un gel pharmaceutique de testostérone constitué de Propylène Glycol et de Carbopol (= polymères d'acide acrylique).

La diffusion de la testostérone a été étudiée dans ce gel pour cinq concentrations différentes et tous les gels sont en sursaturation.

Au début de la diffusion (t = 0), la longueur L_0 de la zone centrale de chaque tube est mesurée, ainsi qu'aux différents temps t (L_t). À ces différents temps de diffusion, l'épaisseur de la zone centrale où le PA apparaît en suspension est mesurée par visée optique à l'aide d'un cathétomètre.

- **Résultats**

Le recul δ du front de solubilité, observé au temps t, est calculé selon l'expression :

$$\delta\,(t) = (L_0 - L_t) / 2 \qquad (28)$$

Les résultats δ (t) du recul des fronts de solubilité peuvent être interprétés selon une dépendance linéaire en fonction de la racine carrée du temps (cf. équation 19 et figure 22). Des pentes de ces droites, il est possible de calculer le coefficient de diffusion.

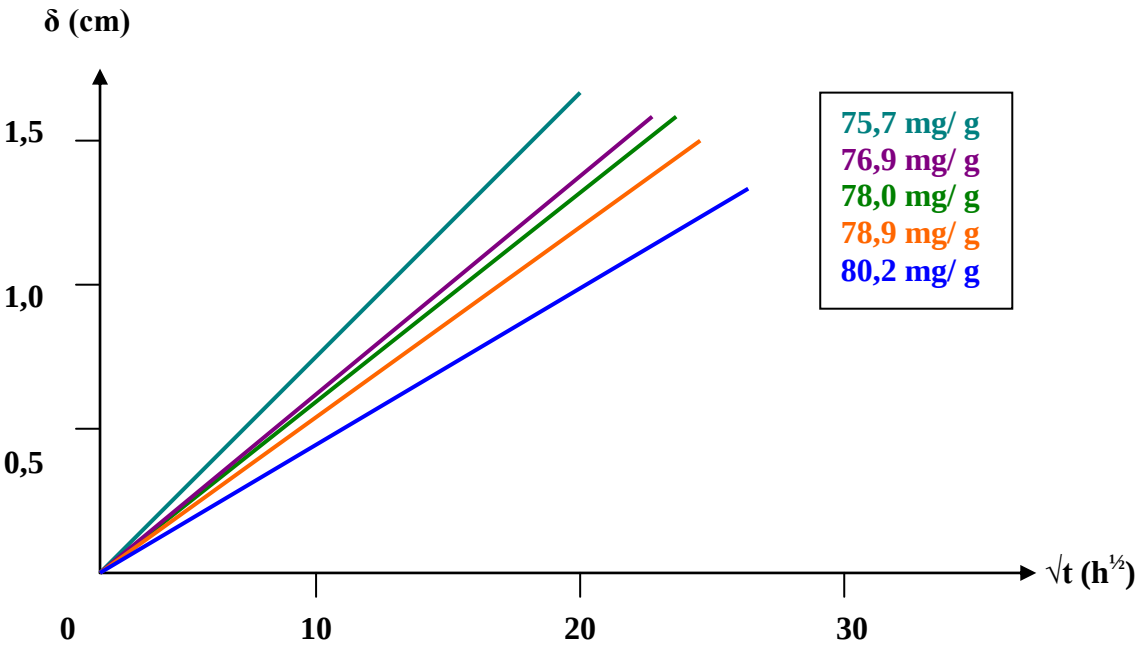


Figure 22: Cinétiques de déplacement du front de solubilité δ en fonction de √t pour les gels à base de Carbopol [25].

4. Cellule de diffusion de Valia-Chen

a) Principe

Les études de diffusion d'un soluté dans un gel peuvent être réalisées en utilisant la cellule de diffusion de Valia-Chen (figure 23).

Nous disposons de deux demi-cellules (compartiment donneur et compartiment receveur) ouvertes chacune sur une extrémité. Un barreau magnétique est placé dans chaque demi-cellule pour conserver une agitation continue durant l'étude [26].

Entre les deux demi-cellules va être intercalée une membrane de gel pré-calibrée (dans l'étude de Peppas [27, 28], elle est composée d'un réseau de polymère interpénétrant, c'est-à-dire l'acide polyacrylique ou PAA) protégée de l'atmosphère pour éviter l'évaporation du solvant à travers cette membrane.

Cette technique est menée à 37 °C avec des solutés qui diffèrent selon trois critères :

- le poids moléculaire (PM)
- le degré d'ionisation
- la forme

Un des travaux de Peppas *et al.* [27] a consisté à étudier la théophylline, la vitamine B12 et la myoglobine à des concentrations spécifiques dans le compartiment donneur et à des longueurs d'ondes λ maximales pour faciliter les méthodes de détection dans le compartiment receveur.

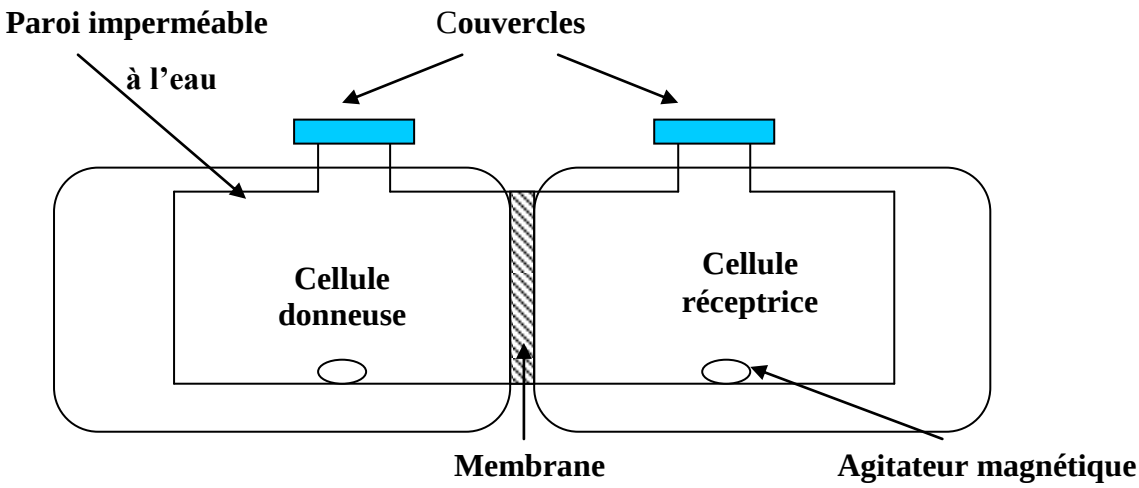


Figure 23: Représentation schématique de la cellule de diffusion Valia-Chen [26].

b) Analyse de la diffusion

Cette méthode va nous permettre d'obtenir les coefficients de diffusion de chaque PA et d'observer les effets de leur taille et de leur degré d'ionisation ainsi que ceux du pH et du degré d'ionisation de la membrane de la cellule de Valia-Chen sur la diffusion.

❖ **Exemple : Étude de la diffusion de la théophylline [27]**

Sa diffusion à travers la membrane est linéaire à pH 3 et à pH 6 (figure 24) et la quantité qui diffuse à pH 6 est supérieure à celle qui diffuse à pH 3. Étant donné que la taille de la théophylline est inférieure à la taille des mailles du réseau polymère (« mesh size ») aux deux pH, les résultats obtenus ne peuvent être expliqués par un phénomène d'exclusion.

Or, à pH 6, la théophylline et la membrane sont ionisées. En effet, le pKa du PAA est inférieur à pH 6 mais supérieur à pH 3.

De ce fait, à pH 6, les charges du PAA et de la théophylline sont opposées, ce qui peut entraîner des liaisons faibles et des interactions ioniques causant ainsi un retard à la diffusion de la théophylline.

À pH 3, la théophylline n'est pas ionisée et il n'y a donc pas de formation de liaison avec le PAA du gel.

Il faut cependant ajouter qu'à pH 6, la petite taille de la théophylline (180 Da) et l'augmentation de la taille des mailles du réseau polymère jouent également un rôle sur les résultats obtenus au cours de la diffusion.

Le coefficient de diffusion est calculé à partir du coefficient de perméabilité P et du coefficient de partage K_d de la théophylline selon l'équation suivante :

$$D = P.l / K_d \qquad (29)$$

avec :

l : épaisseur de la membrane à l'état gonflé et à pH constant

K_d : C_m / C_s et C_m, concentration du soluté dans la membrane et C_s, concentration du soluté dans la solution à l'équilibre.

Le coefficient de perméabilité P est obtenu à partir de l'équation suivante :

$$- ln (1 – (2C_t / C_0)) = 2AP_t / V \qquad (30)$$

avec :

C_t : concentration en soluté dans la demi-cellule réceptrice au temps t

C_0 : concentration initiale en soluté dans la demi-cellule donneuse

V : volume de chaque demi-cellule

A : aire effective de diffusion

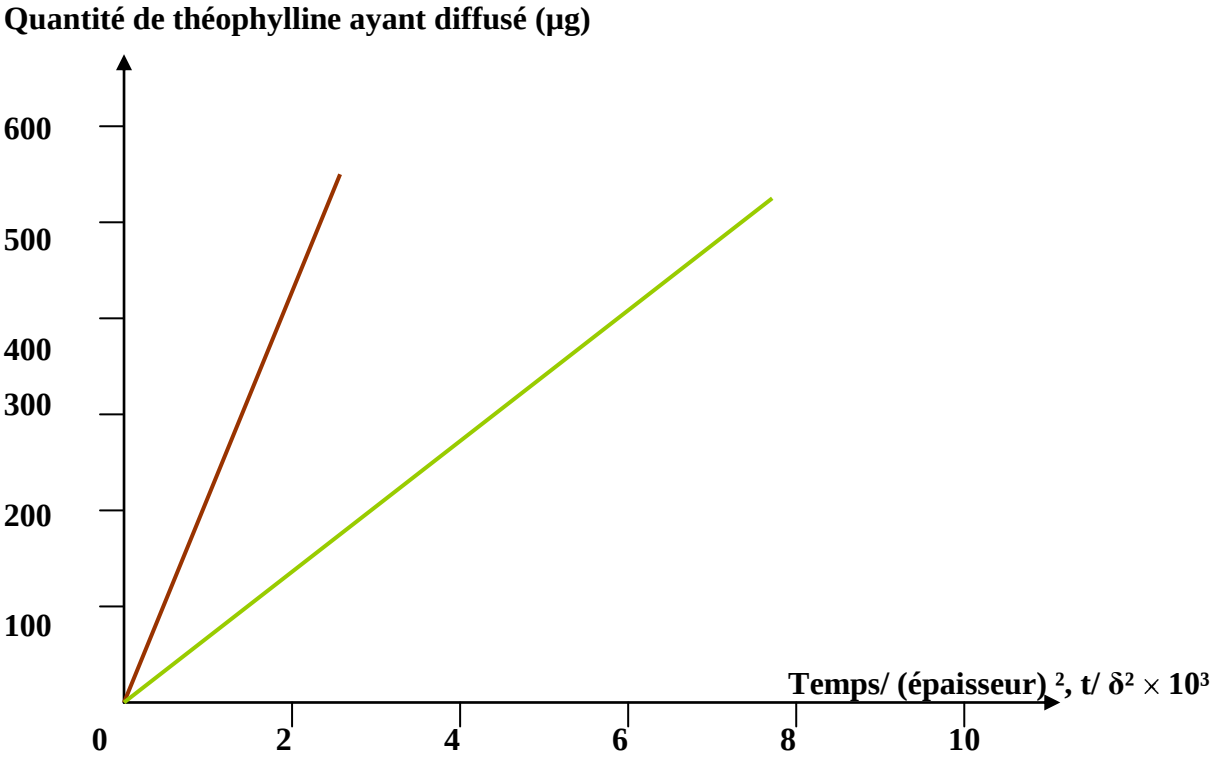


Figure 24: Diffusion de la théophylline à travers une membrane de gel de PVA / PAA interpénétrant contenant 40% de PAA et taille de mailles de 319 Å à pH 3 (——) et de 420 Å à pH 6 (——) [27].

5. Cellule de diffusion FTIR – ATR

a) Rappels sur la cellule de diffusion de Franz

Cette technique permet d'étudier la diffusion du PA dans un gel. La barrière de diffusion est membrane artificielle ou naturelle (ex. HEM, human epidermal membrane) associée à une membrane d'acétate de cellulose. Les composants de cette barrière sont trempés dans la solution du récepteur avant de commencer la diffusion (cette solution est un tampon phosphate).

Le gel contenant le PA à étudier est déposé sur la partie supérieure du compartiment donneur et le tout est étroitement mis en contact à l'aide d'un parafilm.

Le compartiment accepteur est agité tout au long de l'expérience, tout en s'assurant de l'absence de bulles d'air. À des intervalles de temps réguliers, un certain volume est retiré du compartiment accepteur et est analysé selon les méthodes adaptées au PA (Exemple : HPLC). Le volume retiré est tout de suite remplacé par du tampon phosphate [29, 30].

b) *Principe de la méthode*

La cellule de diffusion FTIR – ATR (= Fournier Transform Infrared Spectroscopy with Attenuated Total Reflection) combine les avantages de l'ATR et de la cellule de diffusion de type Franz (figure 25) [31].

Le compartiment accepteur ne recouvre qu'une partie du cristal de l'ATR et le faisceau infrarouge (IR) incident balaye toute la surface du cristal. S'il existe des fuites au niveau de la cellule, cela pourrait causer une modification majeure du spectre IR du compartiment accepteur (cela permet de s'assurer que la cellule est correctement fixée au cristal) [27].

c) *Résultats [31]*

Pour obtenir le coefficient de diffusion à partir des données expérimentales recueillies, on va tenir compte de l'équation 1 (figure 26). Les conditions limites sont les suivantes :

$C\ (t, x = 0) = C_D = Constante$

$C\ (t, x = L) = v\ (t)$

avec :

C (t, x) : concentration du PA à travers la membrane

C_D : concentration du PA dans le compartiment donneur

v (t) : concentration du PA dans le compartiment accepteur

Les conditions limites sont les suivantes :

$C\ (t = 0, x) = 0$

$v\ (t = 0) = 0$

Le coefficient de diffusion va être obtenu en utilisant la série de Fourier (équation 31) ainsi qu'un logiciel mathématique :

$$C\ (t, x) = C_D\ (1 - \sum_{n=0}^{\infty} u_n \exp\ (-\lambda_n^2\ Dt / L^2)\ \sin\ (\lambda_n^x\ /L)) \qquad (31)$$

avec :

L : épaisseur de la membrane

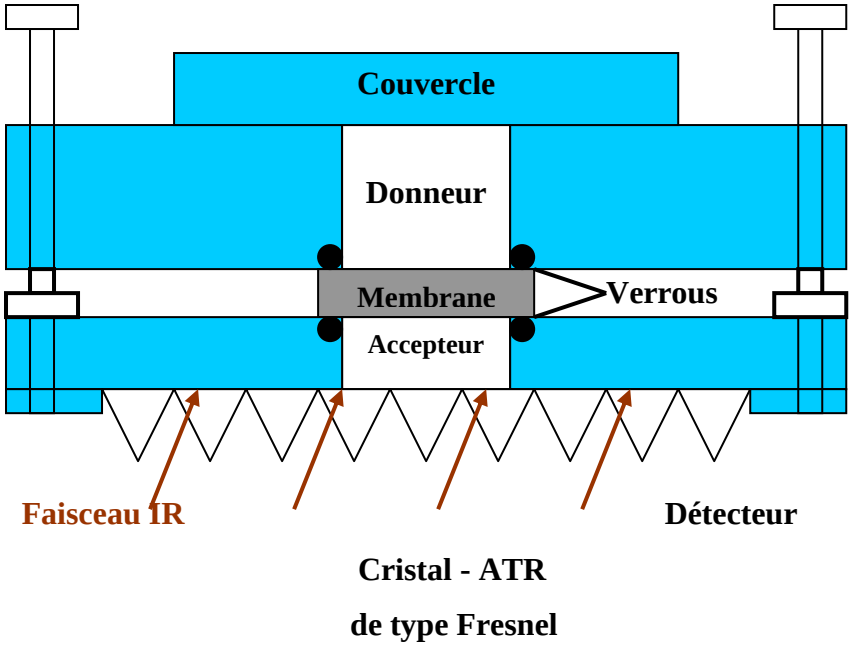


Figure 25: Représentation schématique de la cellule de diffusion FTIR – ATR [31].

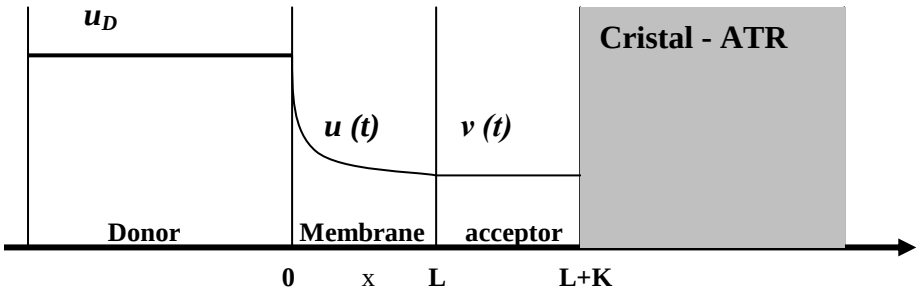


Figure 26: Schéma et hypothèse du modèle mathématique intervenant au cours de l'étude (K est la hauteur du compartiment accepteur) [31].

6. Discussion

Toutes ces méthodes permettent de mettre au point des hydrogels adaptés au PA ou au soluté pour lesquels ils vont servir d'excipients à des fins diverses et variées. Chaque PA / soluté étant différent et possédant des caractéristiques bien définies, il faut pouvoir les étudier de façon appropriée.

La méthode de pénétration totale du soluté dans le gel et la technique du « slicing » sont des études expérimentales simples à réaliser au laboratoire et ont le mérite d'être peu coûteuses. Cependant, la technique du « slicing » a l'avantage de pouvoir s'appliquer aux gels lorsqu'il n'y a pas d'interaction PA / soluté – polymère ni d'effet de filtre [23]. Lors de l'utilisation de cette technique, il faut tenir compte de la relation suivante :

$$D = D_0 (1 - \alpha\varphi) \qquad (32)$$

où :

α : constante dépendant de la forme et de l'orientation des obstacles

φ : fraction volumique du polymère

Dans les cas des gels où le polymère peut être assimilé à des longues chaînes orientées de façon aléatoire, α est égal à 5/3. Des mesures de diffusion de différentes substances dans un gel d'agar, réalisées par Schantz et Laufer [23] ont permis de valider ce modèle.

Les cellules de diffusion de Valia-Chen ou de Franz peuvent, au contraire, mettre en évidence des interactions entre le soluté et les polymères. Elles peuvent également servir à étudier la diffusion du PA contenu dans un gel à travers une membrane naturelle afin de prévoir le comportement du PA / soluté et du gel dans l'organisme.

L'association de la FTIR – ATR à la cellule de Franz possède l'avantage d'être non destructif et permet d'obtenir immédiatement des résultats sur la diffusion des PA / solutés. De plus, cette méthode est représentative des conditions physiologiques [31].

Toutes les techniques citées ci-dessus utilisent un milieu liquide servant de donneur ou d'accepteur du PA / soluté contenu dans un gel.

Les méthodes de diffusion dans une matrice polymère présentent un seul milieu de diffusion et la possibilité de suivre, sans destruction du système, l'évolution temporelle soit des profils

de concentration par l'utilisation d'un traceur radioactif soit de la position du front de solubilité. Ces méthodes permettent d'éliminer tous les phénomènes liés à la présence d'un milieu récepteur de nature différente et conduisent à l'évaluation d'une valeur intrinsèque du coefficient de diffusion du PA / soluté dans la matrice polymère [25].

Il faut noter que la faible dispersion des résultats expérimentaux montre que ces techniques possèdent une précision supérieure à la plupart des techniques classiquement utilisées. L'exploitation de la fiabilité de ces méthodes permet d'étudier l'influence des propriétés physico-chimiques polymériques sur la diffusion des molécules actives dans les milieux polymères et d'optimiser ainsi la conception de systèmes à libération contrôlée.

Les hydrogels, bien que pouvant être utilisés tels quels, présentent également un intérêt majeur dans le ciblage thérapeutique, plus communément appelé la vectorisation thérapeutique. En effet, les hydrogels sont le point de départ de formes pharmaceutiques utilisées pour la délivrance de médicaments *in situ*, à savoir les nanogels (c'est-à-dire des particules d'hydrogel ayant une taille de l'ordre du nanomètre).

V. DES HYDROGELS AUX NANOGELS

A. Qu'est ce qu'un nanogel ?

1. Définition

Grâce à leurs propriétés naturelles et à leur capacité à répondre à l'environnement qui les entoure, les hydrogels constituent des biomatériaux très utilisés et faisant l'objet de nombreuses études de la part des chercheurs et notamment des galénistes. En effet, il existe plusieurs domaines qui vouent un intérêt particulier à ces formes atypiques tels que la croissance cellulaire, l'ingénierie tissulaire ou la synthèse de nouvelles formes d'administration des médicaments [32].

Outre les avantages cités ci-dessus, les hydrogels ont également la capacité de former des nanogels, c'est-à-dire des particules de l'ordre du nanomètre (nm).

Ces nanoparticules[3] (NP), de formes sphériques ou vésiculaires comme le démontre la figure 27 [33], ont généralement un diamètre compris entre 10 et 1000 nm.

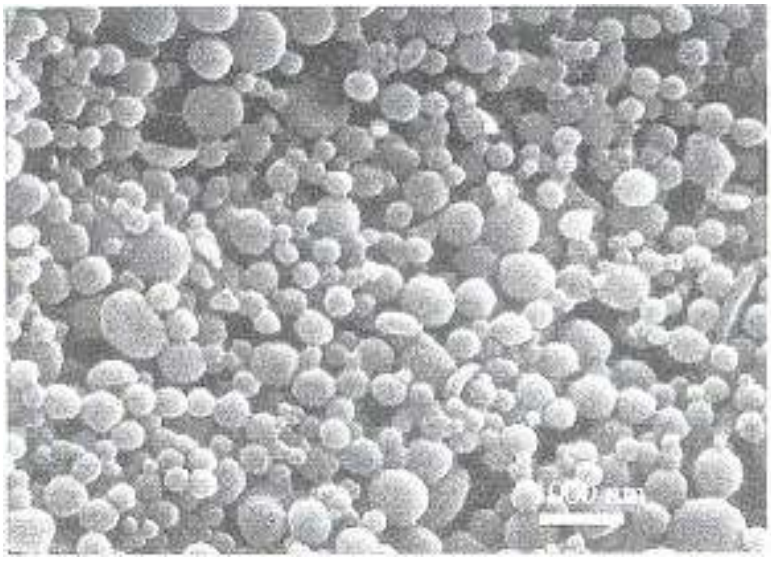


Figure 27: Photographie représentant des nanoparticules d'hydrogel [34].

Les nanogels sont formés par l'affaissement de molécules polymériques (composant les hydrogels) à l'état gonflé ; des différences de taille et de forme peuvent être obtenues selon les formulations et les méthodes de fabrication mises en application [34]. Les molécules thérapeutiques d'intérêt peuvent être incorporées dans ces NP ou adsorbées à la surface de celles-ci [35]. La compatibilité nanogel – PA est assurée par des liaisons faibles telles que les interactions électrostatiques, les liaisons hydrogène ou les interactions hydrophobes, ou par des liaisons covalentes formées à la surface du gel [36].
Nous verrons plus tard, des méthodes d'obtention des nanogels présentant un intérêt particulier en thérapeutique.

2. Structure chimique d'un nanogel

Les nanogels étant fabriqués à partir des hydrogels, il est donc logique que ces NP soient constitués par les mêmes polymères que ceux cités dans le tableau 1.

[3] Tout au long de ce travail, les termes « nanogel » et « nanoparticule » seront confondus, pour éviter trop de répétitions. Ainsi, le terme « nanoparticule » signifiera « particule d'hydrogel de l'ordre du nanomètre ».

Étant donné que différents nanosystèmes ont été développés, l'importance de la relation qui existe entre les propriétés de ces NP et leur architecture polymérique a été étudiée de façon approfondie (Cf. Structure des hydrogels, Chapitre III).

Les polymères caractérisant les nanogels sont choisis selon la méthode de fabrication préconisée pour l'usage auquel vont être destinés ces NP. Citons quelques exemples.

Le PNIPAAm, que nous avons déjà introduit, est un polymère thermo-sensible qui, à 32 °C, induit le passage d'un hydrogel à un nanogel [32, 37].

De même, plusieurs études ont été réalisées en utilisant le polyéthylène oxyde (PEO) et le polyéthylène imine (PEI), qui sont des polymères cationiques ; ces polymères, une fois réduits à une taille nanométrique, peuvent former des liaisons faibles avec des PA chargés négativement et amphiphiles (Exemple : les oligonucléotides). Il y'aura ainsi la formation d'un complexe hydrophobe polyionique d'une part et de régions hydrophiles (représentées par les chaînes de PEO) d'autre part. Ce système va ainsi permettre d'immobiliser certaines molécules de l'organisme ayant des charges négatives (telles que l'acide rétinoïque, l'indométacine) ou de molécules hydrophobes [36, 38].

D'autres polymères, tels que les poly (D, L- Lactide-co-glycolide) ou PLGA, sont biodégradables et biocompatibles. Ils ont fait l'objet de nombreux travaux et sont d'autant plus intéressants qu'ils ont été approuvés par la FDA (Food and Drug Administration) [35]. En effet, ces polymères sont retrouvés dans la formulation de microparticules contenant un agoniste de la LHRH, la leuprolide et commercialisées sous le nom de LUPRON DEPOT® (c'est-à-dire l'acétate de leuprolide sous forme de dépôt).

Ces PLGA sont des copolymères d'acides lactiques et de (D, L – glycolides). Ces monomères sont très souvent utilisés (ou font l'objet de multiples travaux de recherche) dans les formulations pour libération contrôlée des médicaments et suscitent de ce fait, un intérêt particulier auprès de nombreux chercheurs [33].

L'objectif majeur des nanogels est la vectorisation thérapeutique. Pour arriver à cette fin, la surface des nanogels peut être modifiée en y incorporant différents ligands biospécifiques, des nanocristaux inorganiques ou des particules magnétiques bien souvent utilisées pour l'imagerie cellulaire ou pour un usage ophtalmologique [35, 39].

Ainsi, les propriétés pharmacologiques et pharmacocinétiques d'un ingrédient pharmaceutique actif (IPA) peuvent être modulées en modifiant les propriétés physiques et / ou chimiques du ou des polymères constituant un nanogel. Par exemple, un PA insoluble en milieu aqueux peut être solubilisé par incorporation au sein d'un nanogel auquel on a ajouté des fonctions solubilisant le PA. Cela va ainsi contribuer à améliorer la biodisponibilité et l'élimination dudit PA [40].

Les nanogels peuvent donc avoir des formulations diverses et variées qui dépendent de la finalité thérapeutique.

3. Propriétés et objectifs des nanogels destinés aux applications thérapeutiques

a) Propriétés des nanogels

Les multiples études dont les nanogels ont fait l'objet ces dernières années ont permis de leur attribuer des propriétés incontournables et indispensables pour leur utilisation. Nous allons les présenter ci-après.

- **Stabilité**

La stabilité est le premier critère à considérer quand on souhaite que les nanogels résident plus longtemps dans la circulation sanguine et donc que leur demi-vie soit allongée.

En effet, si ce critère n'est pas respecté, il s'en suit une libération précoce des PA inclus dans les nanogels, entraînant l'apparition d'effets secondaires défavorables.

Il existe plusieurs techniques permettant de répondre à cette propriété. Parmi elles, on dénombre la pégylation, c'est-à-dire un greffage de molécules de polyéthylène glycol (PEG). Cette pégylation va permettre d'accroître la stabilité des NP après leur agrégation ainsi que leur persistance dans l'organisme [39, 41].

- **Fonctionnalisation des nanogels**

.Afin que s'effectuent des reconnaissances spécifiques à différents endroits de l'organisme, on peut greffer, à la surface des nanogels, des ligands spécifiques qui vont reconnaître des récepteurs spécifiques sur des cellules [42].

Par exemple dans le cas des cancers, on a souvent recours à des ligands tels que les dérivés de l'acide folique, des peptides, des protéines ou des anticorps.

Nous pouvons citer un autre exemple très étudié : celui de l'inclusion d'oligonucléotides dans des nanogels.
Avant l'inclusion, ces NP peuvent être modifiées après polymérisation du gel en y greffant des groupements quaternaires alkyles. Ces derniers vont apporter des charges positives, afin de permettre la création de liaisons ioniques avec les charges négatives portées par les oligonucléotides (Exemple : ADN) [41].

Ainsi, en traitant la surface des NP en y associant certains groupements fonctionnels ou protéines spécifiques, on peut en théorie assurer une meilleure vectorisation thérapeutique et engendrer moins d'effets secondaires qui se révèleraient agressifs pour l'organisme [39].

- **Taille des NP**

Les nanogels ont généralement un diamètre inférieur à 200 nm. Cette petite taille leur accorde l'avantage d'être capturés par les cellules (via une endocytose) tandis que des particules d'un diamètre supérieur seraient dégradées ou directement éliminées telles qu'elles par l'organisme [39, 43]. Cela peut être utile en application thérapeutique pour une meilleure vectorisation cellulaire des PA et plus particulièrement en utilisant des NP non reconnus par le système immunitaire. En effet, la capture cellulaire des nanogels peut favoriser une accumulation de PA dans la ou les cellules concernées [38].

Ce faible diamètre apporte également l'avantage de diminuer la capture des nanogels par les macrophages du foie, permettant ainsi de significativement augmenter leur demi-vie dans la circulation sanguine [43].

- **Inertie et biodégradabilité des nanogels**

Ces deux propriétés sont les plus importantes. En effet, les polymères utilisés pour la fabrication des nanogels doivent être inertes et ne doivent pas être la source d'impuretés toxiques. Actuellement, les polymères les plus utilisés ou étudiés à cette fin sont les alcools polyvinyliques, les poly-*N*- vinyl pyrrolidones et les polyacrylamides [39].

Le deuxième point important est la biodégradabilité des nanogels. Les polymères qui les constituent doivent impérativement pouvoir être métabolisés et éliminés par les voies d'élimination usuelles. Certains facteurs vont influer sur cette biodégradabilité à savoir les structures chimique et moléculaire des nanogels, leurs propriétés diffusionnelles, leur morphologie, leur forme, leur poids moléculaire ainsi que la présence ou non de groupements ioniques. L'acide poly-*α, 1*-glutamique (PG) est justement très étudiée pour d'intéressantes propriétés de biodégradabilité. Ce polymère est naturellement composé de monomères d'acide *L*-glutamique reliés entre eux par des liaisons amides.

Cela rappelle donc la structure primaire des protéines correspondant à la succession linéaire d'acides aminés les constituants. Les protéines sont donc des polymères d'acides aminés, reliés entre eux par des liaisons peptidiques. De ce fait, le PG, avec ces ressemblances, est un candidat idéal pour une biodégradabilité efficace [40].

b) Objectifs des nanogels

Des percées majeures ont été réalisées dans la découverte de formes galéniques afin de conduire à une meilleure biodisponibilité des PA intervenant dans le traitement de maladies chroniques.

Pour cela, on a recours aujourd'hui à la nanotechnologie, via les nanogels dans les cas qui nous intéressent, ce qui va aboutir à une vectorisation médicamenteuse, une meilleure efficacité et observance des traitements et diminution des effets secondaires toxiques sur l'organisme [42, 44].

Plusieurs médicaments actuellement utilisés contiennent des principes actifs qui sont des agonistes ou antagonistes de plusieurs récepteurs dans l'organisme. C'est la raison pour laquelle il existe des effets secondaires car ces PA vont se fixer non seulement sur les sites cibles mais également à d'autres endroits non ciblés.

Pour éviter ces inconvénients majeurs, plusieurs études sur les nanogels ont pour objectifs de créer des formulations permettant le contrôle de la libération des PA ainsi que leur vectorisation.

L'utilisation des nanogels est intéressante pour l'administration de molécules telles que les protéines ou l'ADN qui se retrouvent piégées dans des réseaux polymériques et libérées au niveau cellulaire et à des concentrations contrôlées.

Ces nanogels présentent une ouverture vers un nouveau mode de traitement des maladies les plus rencontrées, à savoir les cancers, le diabète, les infections bactériennes ou peuvent être utilisés en prévention avec les vaccins [39].

Un autre grand domaine prometteur est la synthèse de tissus biocompatibles [42]. Nous reviendrons sur les applications thérapeutiques en cinquième partie.

B. Méthodes de fabrication des nanogels

La taille des nanogels ainsi que la diffusion des PA au sein de ceux-ci dépendent en grande partie de la méthode de fabrication de ces NP.

Il faut donc procéder à un choix très rigoureux des polymères, des solvants de réaction et des conditions du milieu de réaction (la température, le pH, l'humidité).

De ce fait, plusieurs méthodes de fabrication ont été décrites dans différentes études afin d'obtenir des systèmes de nanogels homogènes et répondant à des critères prédéfinis.

Nous allons exposer les plus pertinentes de ces méthodes de fabrication puis discuter du choix d'une méthode par rapport à une autre ainsi que des avantages et inconvénients qu'elles présentent.

1. Synthèse du PEG activé

Nous avons expliqué précédemment que le PEG attribuait aux nanogels des propriétés de stabilité, conduisant ainsi à une prolongation de leur demi-vie dans la circulation sanguine.

Les chaînes de PEG se retrouvent à la surface des nanogels ou les entourent formant ainsi une coquille de protection. Elles vont chasser l'eau lorsque les nanogels sont introduits dans un milieu aqueux créant ainsi un environnement hydrophobe. Cela s'explique par le fait que ces chaînes créent une répulsion stérique due à la perte de leur entropie conformationnelle et donc

de la diminution de l'énergie libre interfaciale. Ces caractéristiques constituent les points d'intérêts majeurs des nanogels pégylés [41].

Plusieurs études ont vu le jour afin d'élaborer la synthèse de nanogels pégylés. Oishi *et al.* [45] ont étudié des NP contenant de chaînes de PEG. Ils ont proposé une synthèse de PEG activés (devant ensuite être greffés sur des NP), c'est-à-dire des chaînes de PEG bifonctionnelles possédant un groupement 4-vinylbenzyle en α et un groupement carboxylate potassique en ω (CH_2 ═CH —Bz —PEG —COOK).

Comme le démontre la figure 28 ci-après, l'alcool vinylbenzylique (VBA) et l'énolate de potassium sont les réactifs de départ et servent à la sélectivité de la réaction.

D'autres équipes ont utilisé le naphtalène au lieu de l'acétone mais elles se sont rapidement aperçues que le premier conduisait au naphtalène de potassium, ce dernier réagissant avec les doubles liaisons du VBA et créant ainsi des impuretés toxiques.

L'anion généré au cours de la réaction de l'acétone avec l'hydrure de potassium n'est pas assez réactif pour attaquer la double liaison du vinylbenzyle du VBA. Cela permet à ce groupement de rester intact jusqu'à la formation du PEG activé.

Suite à cela, il y'a une polymérisation d'oxyde d'éthylène qui va conduire à l'obtention de polymères PEG. Enfin, l'alkoxyde en ω est ensuite converti en carboxylate par addition d'anhydride succinique. Ces carboxylates tiennent lieu de plateforme permettant une éventuelle vectorisation cellulaire ultérieure.

Les PEG ainsi synthétisés doivent avoir des longueurs et des poids moléculaires prédéfinis. Pour vérifier que les objectifs ont été atteints, il va être réalisé une chromatographie

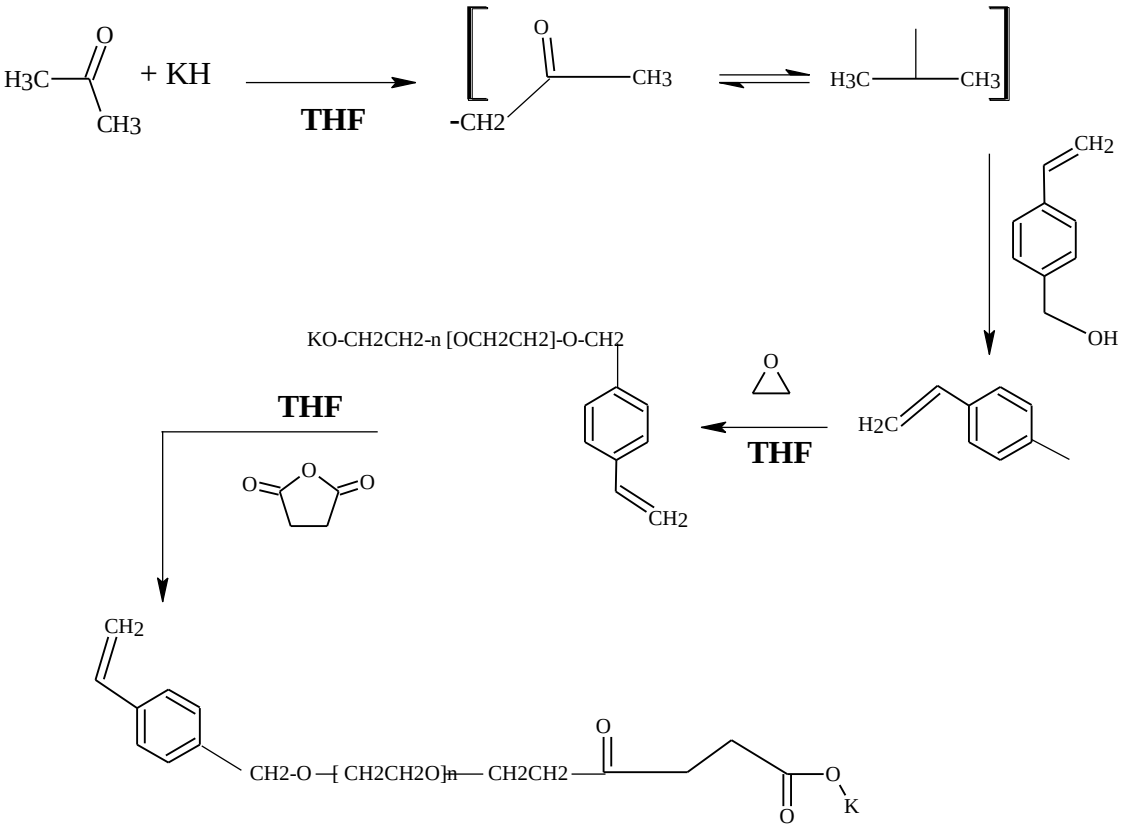


Figure 28: Synthèse du CH_2═CH — Bz — PEG — COOK [45].

d'exclusion (on utilise en général des PEG de 8 kDa car ils permettent d'obtenir des nanogels de petite taille).

Ces chaînes, ainsi synthétisées, peuvent ensuite être utilisées pour réaliser le réseau polymère d'une NP d'hydrogel.

2. Techniques de polymérisation des monomères

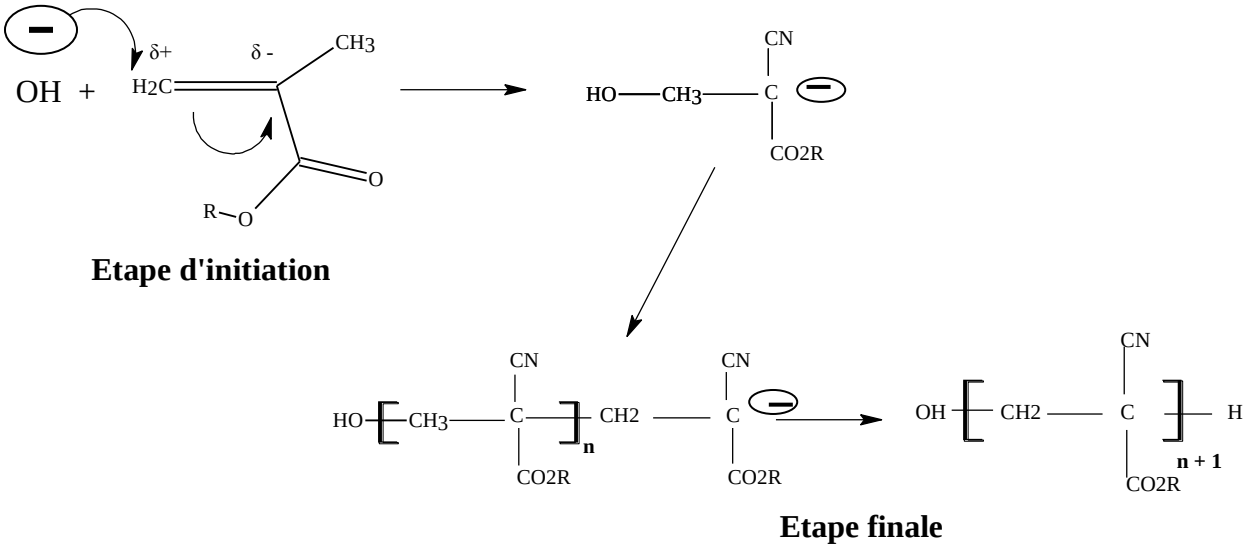
a) *La polymérisation simple [33]*

Les NP peuvent être obtenues par polymérisation de monomères. Couvreur *et al.* ont décrit une méthode au cours de laquelle on polymérise du méthyl- ou de l'éthylcyanoacrylate dispersé dans une solution aqueuse acide, en présence d'un surfactant, le polysorbate 20 (il n'y a pas d'irradiant ou d'initiateur pour amorcer cette polymérisation).

Pour démarrer la polymérisation, le monomère cyanoacrylique est ajouté à une solution aqueuse de polysorbate 20 (cette solution représente le milieu de polymérisation). La

polymérisation se produit à température ambiante et sous agitation mécanique afin de favoriser le bon déroulement de la polymérisation de l'alkylcyanoacrylate.
Le PA peut être dissous dans le milieu de polymérisation avant l'ajout du monomère ou en fin de réaction. Les NP obtenues vont ensuite être purifiées par ultracentrifugation ou par dispersion dans un milieu isotonique dépourvu de surfactant.

Voyons plus en détail le déroulement de polymérisation réalisée au cours du travail de Couvreur *et al*. Le mécanisme de la réaction faisant intervenir le polyalkylcyanoacrylate ou PACA (monomère cyanoacrylique biodégradable) est le suivant :



Il se produit une attaque nucléophile en présence d'OH^-, $CH3O^-$ ou $CH3COO^-$ qui, si la polymérisation est conduite de manière trop rapide, peut conduire à la formation de NP de faible poids moléculaire, instables et facilement dégradables. Pour éviter d'en arriver là, la polymérisation se fait en milieu acide (pH 1-3,5) en présence d'un surfactant et d'un agent stabilisant. Le pH sera augmenté au cours de la réaction afin d'obtenir des particules du diamètre souhaité (figure 29).

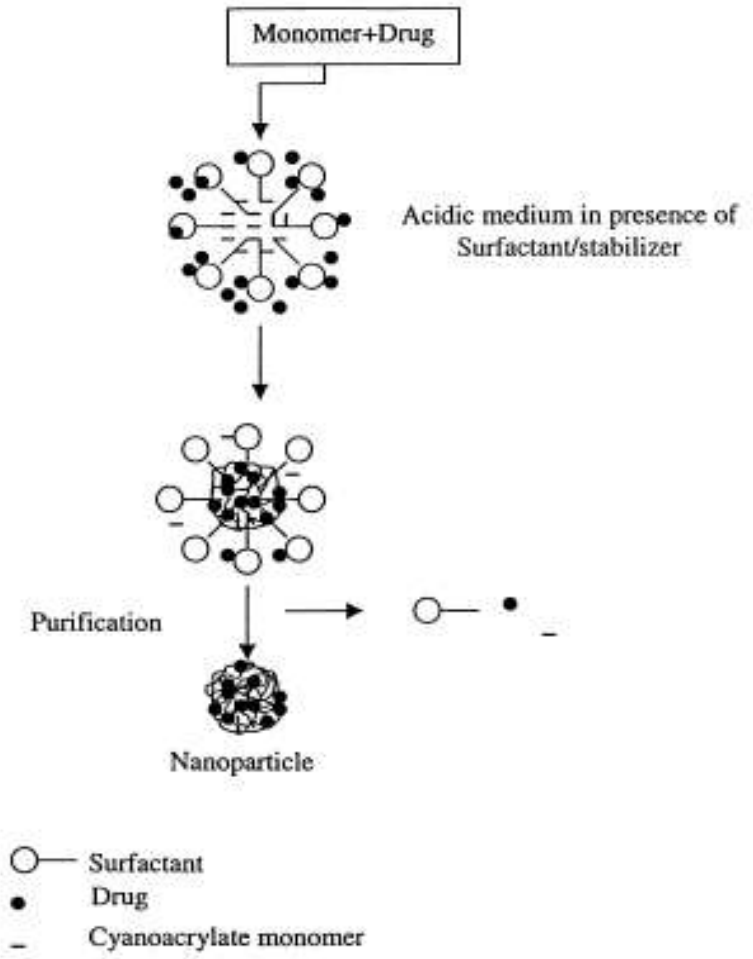


Figure 29: Représentation schématique de la fabrication de nanoparticules de polyalkylcyanoacrylate par polymérisation anionique [33].

b) La polymérisation par précipitation

Il existe plusieurs variantes de la polymérisation simple qui se différencient par la forme et la nature des particules à obtenir. Parmi elles, on compte la polymérisation par précipitation (ou polymérisation par émulsion en absence de surfactant).

Cette technique est utilisée pour synthétiser des NP à partir d'hydrogels thermosensibles et permet d'obtenir des NP de faibles diamètres de façon reproductible (écart-type faible).

Elle fût utilisée pour la première fois en 1978 par Philip Chibante [37].

La méthode de Chibante fait intervenir des monomères de NIPAAm et un réticulant (crosslinker), le *N, N'*- méthylènebisacrylamide (BIS). On dissout tous ces réactifs dans de l'eau pour obtenir une solution purgée avec de l'azote N_2 et chauffée à une température

supérieure à la température critique inférieure de solubilité (TCIS) du NIPAAm (elle est de 70 °C).

Puis, un initiateur capable de produite des radicaux sulfate indispensables à la polymérisation, le persulfate d'ammonium ou le sulfate de potassium, est ajouté.

Les radicaux sulfate sont formés grâce à la température élevée de la réaction et contribuent à stabiliser les particules primaires (voir plus loin) une fois formées. Suite à l'initiation, les monomères de NIPAAm sont attaqués par ces radicaux, entraînant une propagation radicalaire. Quand les chaînes atteignent une taille dite critique, elles se recroquevillent sue elles-mêmes pour ainsi former des particules primaires de faible diamètre.

Ces particules primaires vont voir leur diamètre augmenter par agrégation avec d'autres particules primaires, par capture des oligoradicaux en cours de polymérisation ou par greffage à des monomères de NIPAAm (figure 30).

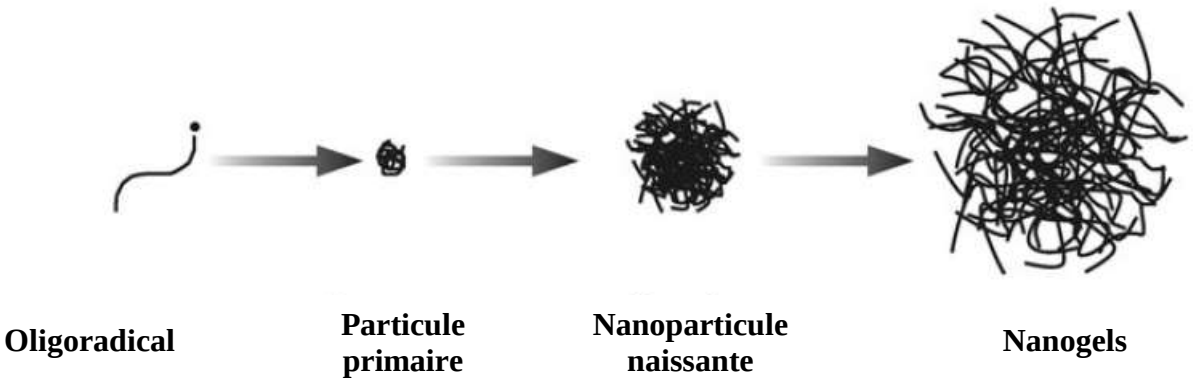


Figure 30: Fabrication des nanogels par polymérisation par précipitation [37].

La polymérisation par précipitation est une méthode qui peut être aisément modifiée pour permettre le contrôle du diamètre des nanogels à obtenir. Par exemple, pour synthétiser des NP de diamètre plus faible, les particules primaires doivent être stabilisées de manière plus stricte. Les radicaux sulfates n'étant pas assez nombreux pour les stabiliser, on peut ajouter un surfactant ionique dans le milieu de réaction. De même, pour ne pas obtenir des NP de diamètre trop important, on peut diminuer la concentration du surfactant.

La polymérisation par précipitation peut également être utilisée lorsque l'on désire obtenir des nanogels avec des monomères de natures différentes (des co-monomères) afin de conférer à ces NP des propriétés multiples.

Oishi *et al.* [45] ont co-polymérisé le PEG et le poly-2- *N*, *N*-diéthylaminoéthylméthacrylate ou le PDEAMA afin d'obtenir des NP sensible aux stimuli extérieurs.

Ici, le PEG, préalablement fonctionnalisé (voir paragraphe précédent) est un co-polymère qui va être incorporé dans le réseau des nanogels. Au cours de l'étude, le DEAMA a été choisi en tant que deuxième co-monomère en raison de sa nature hydrophobe variant avec le pH du milieu environnant.

La co-polymérisation du $CH_2 = CH - Bz - PEG - COOK$ et du PDEAMA a été réalisée en présence de sulfate de potassium et d'éthylène glycol diméthacrylate (EGDMA) qui est un réticulant (figure 31).

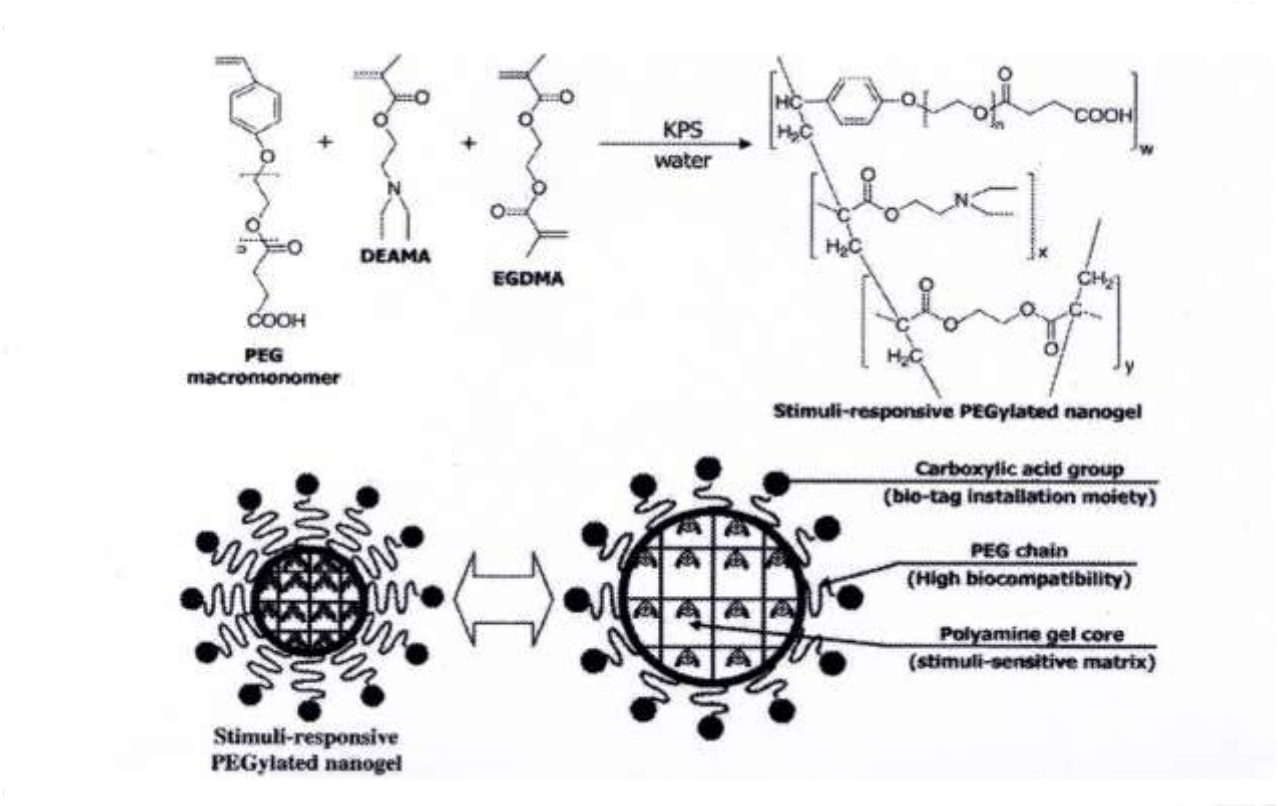


Figure 31: Schéma de synthèse d'un nanogel pégylé répondant aux stimuli extérieurs [45].

Comme expliqué précédemment, le PEG 8 kDa va permettre d'obtenir des NP de faible diamètre ; cela est dû à l'activité qui se produit à la surface de ces nanogels.

En effet, au cours de la polymérisation, la variation de pH, la taille des chaînes de PEG bifonctionnelles et les groupements carboxylates peuvent induire une variation du potentiel

zéta des nanogels. Ce potentiel indique la force de répulsion présente et permet de prédire la stabilité à long terme des NP. Si toutes les NP en suspension ont un potentiel zéta négatif ou positif important, elles tendent à se repousser mutuellement et ne peuvent plus se rassembler. En revanche, si leur potentiel zéta est faible, aucune force ne les empêche de se rassembler et de floculer.

La polymérisation par précipitation implique la formation d'un mélange homogène en début de réaction ainsi que le déroulement simultané de l'initiation et de la polymérisation au sein de cette solution homogène. Les polymères formés étant solubles mais ne gonflant pas dans cette solution, l'utilisation d'un réticulant est donc nécessaire pour former des réseaux de chaînes polymériques et ainsi isoler les NP.

Toutefois la bonne concentration de réticulant doit être évaluée de manière stricte sous peine d'obtenir des NP de formes irrégulières avec une forte variabilité [39].

c) La polymérisation par microémulsion

Afin d'échapper aux exigences (strictes) requises pour la polymérisation par précipitation, il a été porté à l'attention des chercheurs une méthode de polymérisation par microémulsion [32]. Avec cette méthode, on peut obtenir des NP de tailles et de formes variées en modulant les proportions des monomères et de réticulants (figure 32).

Sahiner *et al.* [32] ont fait réagir de l'acrylonitrile (AN), un monomère, et du NIPAAm en proportion égales (1 :1) et en présence de persulfate d'ammonium qui est l'initiateur. Deux réticulants différents vont être testés, l'EGDMA et divinylbenzène (DVB), afin d'obtenir des particules physiquement différentes.

Cette polymérisation se déroule à chaud (car le NIPAAm est un hydrogel thermosensible), à agitation constante et en présence de sodium dodécyl sulfate (SDS) servant à la formation d'une microémulsion huile dans eau, H/E (figure 33).

En effet, les molécules de SDS forment des micelles quand elles se trouvent dans un milieu de concentration supérieure à la concentration critique micellaire. La phase huileuse (à l'intérieur des micelles) solubilise des molécules hydrophobes telles que l'AN et peut être le siège des réactions de polymérisation ultérieurement.

Les monomères de NIPAAm, solubilisées dans la phase aqueuse, possèdent une balance hydrophile/ hydrophobe qui est susceptible de créer une séparation de phase : en dessous de la TCIS du NIPAAm, c'est-à-dire à température ambiante, ce monomère est hydrophile et se

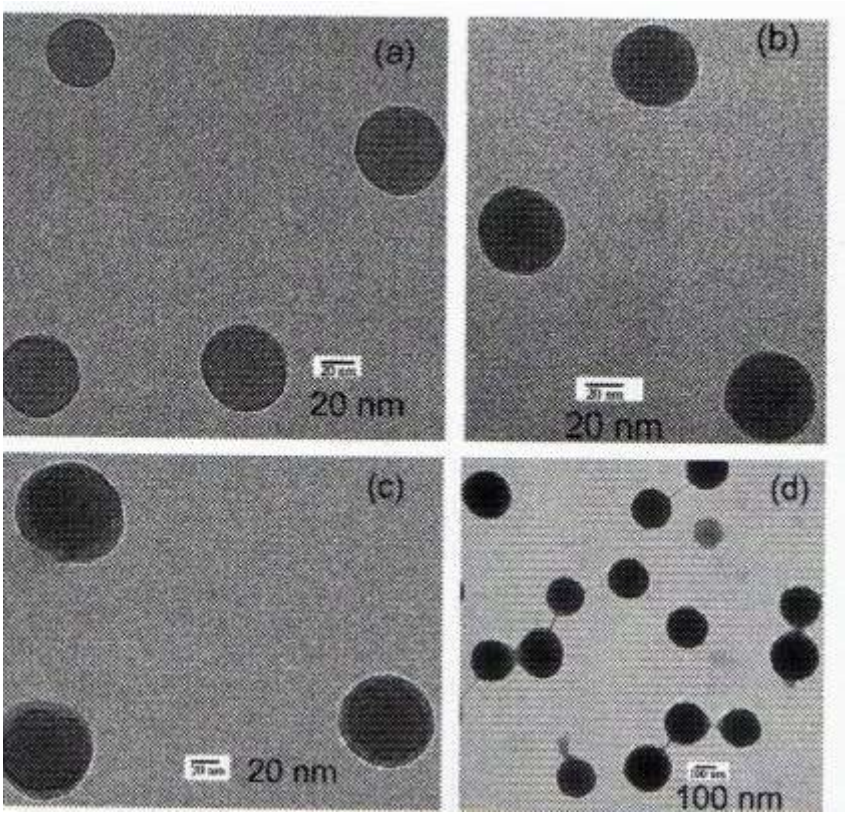


Figure 32: Images de microscopie électronique par transmission de nanoparticules d'hydrogels obtenus avec 0,5% d'éthylène glycol diméthacrylate (EGDMA) et d'un réseau de poly-AN et de PNIPAAm à des proportions respectives de (a) 4 :1, (b) 2 :1, (c) 1 :1 et (d) 1 :2 [32].

retrouvera donc dissous dans la phase aqueuse. Cela est lié à la présence de liaisons hydrogènes qui vont se créer.

Au dessus de la TCIS, les liaisons hydrogènes vont être rompues et les chaînes monomériques vont former des globules par le biais d'interactions hydrophobes entre les chaînes. Ces globules vont donc migrer vers la phase huileuse des micelles qui contiennent déjà les monomères hydrophobes d'AN.

Les micelles ainsi chargées sont ensuite le siège d'une polymérisation et d'une réticulation après ajout d'un initiateur et d'un réticulant (EGDMA ou DVB) dans le milieu de réaction.

En parallèle de la polymérisation par microémulsion, plusieurs chercheurs ont mis au point une méthode de polymérisation par microémulsion inverse.

Dans cette technique, une solution aqueuse contenant les monomères d'intérêt est ajoutée à une quantité appropriée d'huile et de surfactant. L'ensemble est agité dans le but de former

une microémulsion eau dans huile (E/ H) thermodynamiquement stable. La polymérisation est initiée en ajoutant un initiateur dans la phase aqueuse ou dans la phase huileuse [37].

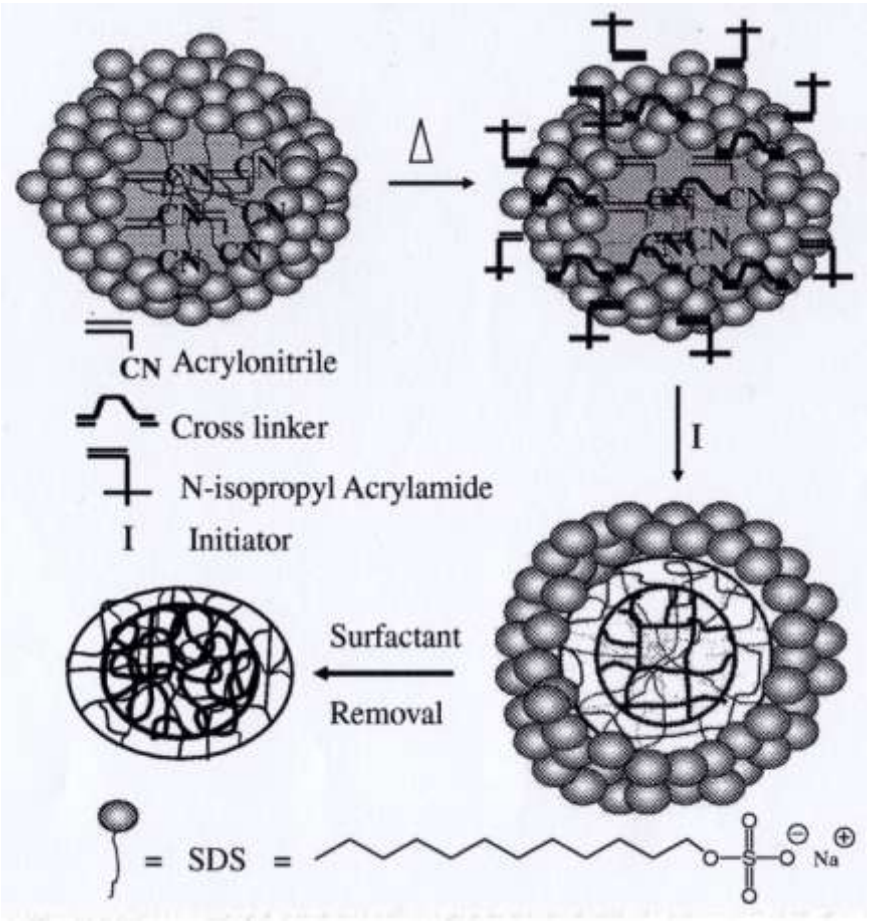


Figure 33: Représentation schématique des mécanismes des réactions de copolymérisation et de réticulation de l'acrylonitrile (AN) et du N-isopropylacrylamide (NIPAAm) dans les micelles de SDS [32].

McAllister *et al.* ont synthétisé des nanogels chargés positivement en utilisant des photoinitiateurs activés par des rayons UV, dissous dans la phase organique [37].

La polymérisation inverse peut également faire intervenir une polymérisation par oxydoréduction comme l'ont démontré Sahiner *et al.* [46, 47]. Le principe reste le même mais dans ce cas, les nanogels, emprisonnés dans une phase aqueuse, doivent être lavés pour éliminer l'excès de surfactant et ensuite, être centrifugés.

Toutes ces techniques exposées comportent le même point négatif, c'est-à-dire le risque d'observer une perte en polymères lors des opérations de purification des nanogels.

3. Techniques de dispersion des polymères préformés

Plusieurs méthodes ont été suggérées afin d'obtenir des nanogels biodégradables par dispersion de polymères préformés.

a) Émulsification par évaporation de solvant

Dans cette méthode, un polymère préformé est dissous dans un solvant organique (Exemple : dichlorométhane, chloroforme, éthylacétate). Le PA est dissous ou dispersé dans cette solution de polymère. L'ensemble est ensuite émulsifié dans une solution aqueuse afin de donner lieu à une émulsion H/E.

La formation de cette émulsion est facilitée par l'ajout dans le mélange d'un surfactant (Exemple : gélatine, polyvinylalcool, polysorbate 80…)

Après l'obtention d'une émulsion stable, la phase organique va être évaporée en augmentant la température, sous pression atmosphérique réduite ou par simple agitation continue [33].

C'est par cette méthode que sont obtenues les NP du NANOGEL®[4] [41].

Dans une étude réalisée par Vinogradov *et al.* [33], on dissous du PEG activé dans du dichlorométhane ; l'ensemble est ensuite émulsifié dans une solution aqueuse de PEI en utilisant un sonicateur[5] (pour obtenir une émulsion très fine). Le dichlorométhane est ensuite évaporé. La suspension obtenue a une très faible densité et ne peut donc être précipitée par ultracentrifugation lors de sa purification. Pour cela, l'équipe a donc eu recours à la chromatographie par gel-perméation.

Pour de meilleurs résultats, on peut également avoir recours à une émulsion E/H/E (eau dans huile dans eau) qui va donner des NP solubles en milieu aqueux.

Quel que soit la technique choisie, l'émulsification par évaporation de solvant nécessite une homogénéisation à haute vitesse ou une sonication.

Toutefois, cette émulsification n'est une technique intéressante qu'à l'échelon du laboratoire car elle permet d'obtenir des lots de faibles quantités. Pour des lots plus importants

[4] NANOGEL® est une marque déposée par le laboratoire Pharma Inc. (Montréal, Canada)

[5] Le sonicateur est un appareil qui transforme l'énergie électrique en énergie mécanique en créant des ondes ultrasoniques.

(transposition à l'échelon industriel), il faut avoir recours à des émulsifications moins avides en énergie.

b) Le « salting-out » [16]

Leroux *et al*. ont décrit une méthode de « salting-out » à l'étude dans la conception des médicaments à base de nanogels.

Dans ces travaux, un gel aqueux contenant 35% d'acétate de magnésium tétrahydraté et de l'alcool polyvinylique (dont la concentration va dépendre du diamètre des NP souhaité) est agité sous agitation constante à une solution d'acétone contenant un PA ou un traceur fluorescent mélangée à 5 à 18% d'acide polylactique. Cela va mener à une émulsion E/H.

En effet, bien que l'eau et l'acétone soient miscibles, on obtient tout de même un système à deux phases grâce la présence d'un agent de « salting-out », à savoir l'acétate de magnésium. Au fur et à mesure qu'on continue à ajouter le gel aqueux, on observe une inversion de phase avec la formation d'une émulsion H/E. Les deux monomères vont copolymériser et former des nanogels sphériques. De l'eau pure va être ajoutée au mélange afin de permettre le passage de l'acétone de la phase huileuse à la phase aqueuse. La purification des NP va être réalisée par filtration à flux tangentiel (crossflow filtration). Cette filtration, associant des membranes et un flux tangentiel, consiste à séparer, en fonction de leur poids moléculaire et de leur taille, les NP dissous ou en suspension.

4. Discussion

Les NP de PACA (voir polymérisation simple) ont connu une forte popularité au cours des dernières années malgré des inconvénients majeurs comme l'utilisation d'un pH acide (de l'ordre de 2) ou la cytotoxicité du PACA [33].

Toutefois, pour contrer ces points faibles, des nouveaux monomères d'esters d'acide malonique dialkylmethylidène ont été synthétisés. Ainsi, on a pu fabriquer des NP de polyméthylidène malonate qui malgré de nombreuses propriétés intéressantes ont vite été abandonnées car ils n'étaient biodégradables ni in vitro ni in vivo.

Ces polymères ont de ce fait été modifiés pour obtenir des NP d'éthyl-2-éthoxycarbonylméthylénoxycarbonylacrylate (PMM). Ces NP sont obtenus par la même méthode que celle adoptée pour la polymérisation simple c'est-à-dire une polymérisation

anionique. Il existe une différence qui réside dans le pH du milieu qui sera moins acide, c'est-à-dire de 5,5 à 6. Cela va influer sur les propriétés physico-chimiques des NP obtenues.
Malgré de nombreux avantages, la polymérisation simple n'est pas une méthode de choix car produit des oligomères responsables d'une trop grande variabilité de la taille et des formes des nanogels.

Pour limiter ce phénomène, on peut avoir recours à la polymérisation par précipitation. C'est une méthode qui permet d'obtenir des suspensions de NP de tailles homogènes.
Elle très utilisée dans le domaine biomédical et fait souvent usage de polymères sensibles à l'environnement extérieur comme le PNIPAAm, ce qui rend cette méthode intéressante pour l'administration de médicaments à libération contrôlée (par des stimuli extérieurs) [39]. Le bémol qui peut être posé avec l'utilisation de polymères comme le PNIPAAM est la limite posée par leurs propriétés physico-chimiques qui sont peu intéressantes. C'est la raison pour laquelle on introduit des PEG bifonctionnels, conduisant ainsi à des nanogels « fonctionnalisés ». Ce sont des NP qui jouissent donc des propriétés de co-polymères différents.
Par exemple, les groupements carboxylates des nanogels contenant le $CH_2 = CH - Bz - PEG - COOK$ leur confèrent les propriétés suivantes :

- Ils peuvent servir de sites d'action pour des post-modifications des nanogels. On peut, en exemple, greffer des molécules biologiques telles l'acide folique, des protéines ou des anticorps pour permettre une meilleure vectorisation cellulaire une fois les nanogels introduits dans l'organisme.

- Ils peuvent immobiliser des précurseurs inorganiques présents dans les nanogels par des interactions ioniques.

- Les nanogels « fonctionnalisés » par des groupements acides sont à l'étude en tant que formes galéniques pour la libération d'insuline [39].

Toutefois, la polymérisation présente certains points négatifs :

- Cette méthode n'est applicable que pour des polymères stables à température ambiante et ne peut donc être utilisée pour incorporer des macromolécules biologiques dans les nanogels.

- Cette méthode est idéale pour des polymères hydrophobes car ils peuvent ainsi se lier aux particules primaires plus facilement. Par contre, dans le cas de polymères hydrophiles, seul un faible pourcentage peut être intégré dans les NP. Le reste est trop hydrophile pour entraîner un recroquevillement des particules primaires. Cela conduit donc à des nanogels de tailles variées ou à une absence de formation des nanogels.

C'est pour surmonter ces difficultés que plusieurs chercheurs ont eu recours à la polymérisation par microémulsion simple ou inverse [37] ou à l'émulsification par évaporation de solvant [48]. Ces trois méthodes permettent également d'obtenir des nanogels composés de polymères formant des réseaux en 3D.

Toutes les méthodes décrites ci-dessus nécessitent l'utilisation de solvants organiques qui portent préjudice à l'environnement ainsi qu'à l'organisme. La FDA a d'ailleurs établi les valeurs minimales acceptables de ces solvants organiques dans les médicaments utilisées par voie orale ou par voie injectable.

Dans un but écologique et thérapeutique, Allemann *et al.* ont développé la méthode du « salting-out » [33].
Cette nouvelle technique a l'avantage d'éviter l'utilisation de solvants toxiques tels que le chlorure de méthylène ou le chloroforme. On utilise le plus souvent les alcools polyvinyliques en tant que polymères avec cette technique car ils sont biodégradables et atoxiques. Le « salting-out » peut être utilisé en production médicamenteuse industrielle car il permet de fabriquer des lots de nanogels à grande échelle.
Cette technique a d'ailleurs déjà fait ses preuves dans le domaine biomédical car elle sert à la fabrication d'un médicament déjà commercialisé, le PARLODEL® (ce médicament contient des microparticules d'hydrogel et non des nanoparticules d'hydrogel mais le principe de la méthode reste le même).

C. Mise en évidence expérimentale de la diffusion des principes actifs dans les nanogels

1. Principes de la libération des principes actifs inclus dans les nanogels

Tout comme les hydrogels, les nanogels sont principalement à l'étude pour la libération contrôlée des PA mais également pour la vectorisation thérapeutique. La libération des PA inclus dans les nanogels rejoint celle décrite pour les hydrogels. En effet, les schémas de libération dépendent entièrement des polymères qui constituent le réseau 3D au sein des nanogels.

Si le réseau se présente sous forme de matrice, le PA est dissous de façon homogène dans cette matrice, et la libération du PA dans le milieu extérieur est réalisée par diffusion ou érosion de la matrice polymérique [36].

Si la diffusion du PA est plus rapide que la désintégration de la matrice, alors la libération du PA est uniquement régie par le phénomène de diffusion. Dans le cas contraire, elle va dépendre de la désintégration de la matrice polymérique.

Dans certaines études, on peut observer une libération précoce du PA : ce phénomène s'explique par le fait qu'il existe un faible pourcentage de PA adsorbé sur les NP ou lié à la surface de celles-ci par des liaisons faibles (ces PA ne se retrouvent donc pas dans le cœur des nanogels). Ainsi, suite à la dissolution des NP dans un milieu liquide, dans des conditions sink, le PA est libéré précocément dans le milieu environnant, ce qui entraîne une brusque augmentation de sa concentration au niveau du site de libération.

Puis, une libération plus tardive, de type exponentielle, est observée. Elle provient de la diffusion du PA (inclus dans le cœur des nanogels) à travers la matrice polymérique, entraînant un retard de la biodisponibilité immédiate de la molécule thérapeutique.

Plusieurs études ont contribué à prouver que la libération du PA, après diffusion à travers la matrice polymérique, suit une cinétique d'ordre 1 [33].

Il faut également ajouter que les nanogels peuvent délivrer des PA de façon spécifique au niveau des cellules.

Cela se produit par diffusion à travers la membrane cellulaire (après diffusion à travers le réseau polymérique), par fusion avec la membrane cellulaire ou par internalisation (endocytose). Ces phénomènes sont de plus en plus à l'étude, notamment en greffant des sites

de reconnaissance sur les nanogels (Exemple : les anticorps) afin d'améliorer la vectorisation [36].

2. Étude de la diffusion par dialyse

a) Principe

La dialyse est basée sur les principes régissant la diffusion à travers une membrane perméable ou semi-perméable (« le boudin » de dialyse). Deux mécanismes entrent en jeu dans ce processus. Tout d'abord, les molécules diffusibles vont traverser selon un gradient de concentration. Il y'aura donc un déplacement net des molécules du côté le plus concentré vers le côté le moins concentré. Chaque espèce chimique en solution subit individuellement ce processus. À l'équilibre, les concentrations de chaque espèce diffusible seront égales de part et d'autre. Si le volume du liquide à l'extérieur du boudin est très grand par rapport à celui de la solution à dialyser, cette égalité des concentrations implique que la majorité des molécules diffusibles, en terme de quantité (ou poids), a traversé la membrane de dialyse.

Dans le cas d'une suspension de nanogels, cette dernière va être placée dans le boudin de dialyse et, après avoir diffusé au sein du réseau polymérique des nanogels, les PA vont traverser la membrane de dialyse.
Cette étude est, en général, réalisée pour comparer deux systèmes de nanogels différents ou pour comparer la libération contrôlée induite par un nanogel par rapport à la libération immédiate d'une forme conventionnelle.

b) Mise en évidence expérimentale [48]

- **Matériel et méthode**

Vinogradov *et al.* ont utilisé cette méthode pour comparer la libération prolongée de deux formulations différentes de nanogels (A et B) contenant un anticancéreux, le 5-fluoroadénine arabinoside, ou la fludarabine (FATP). Ces deux formulations ont été dissoutes dans du PBS

(Phosphate Buffer Solution), une solution de tampon phosphate salin, afin d'obtenir deux dispersions différentes.

Les absorbances initiales de ces dispersions vont être mesurées avant de débuter l'étude. Puis on place chaque dispersion dans un boudin constitué d'une membrane semi-perméable. On place le boudin dans un grand contenant 4 litres de PBS (qui est la solution de contre-dialyse, c'est-à-dire contre laquelle on veut faire la dialyse).

Les membranes de dialyse utilisées au cours des travaux de Vinogradov *et al.* avaient une limite d'exclusion (« cut-off ») de 2000 Da, ce qui est représentatif de la taille approximative des molécules de FATP.

Le montage utilisé pour cette dialyse est celui d'une dialyse en milieu clos, le modèle le plus courant (figure 34).

On laisse aux molécules diffusibles le temps de s'équilibrer de part et d'autre de la membrane. On peut accélérer ce processus en agitant le liquide de contre-dialyse (par exemple avec un barreau magnétique).

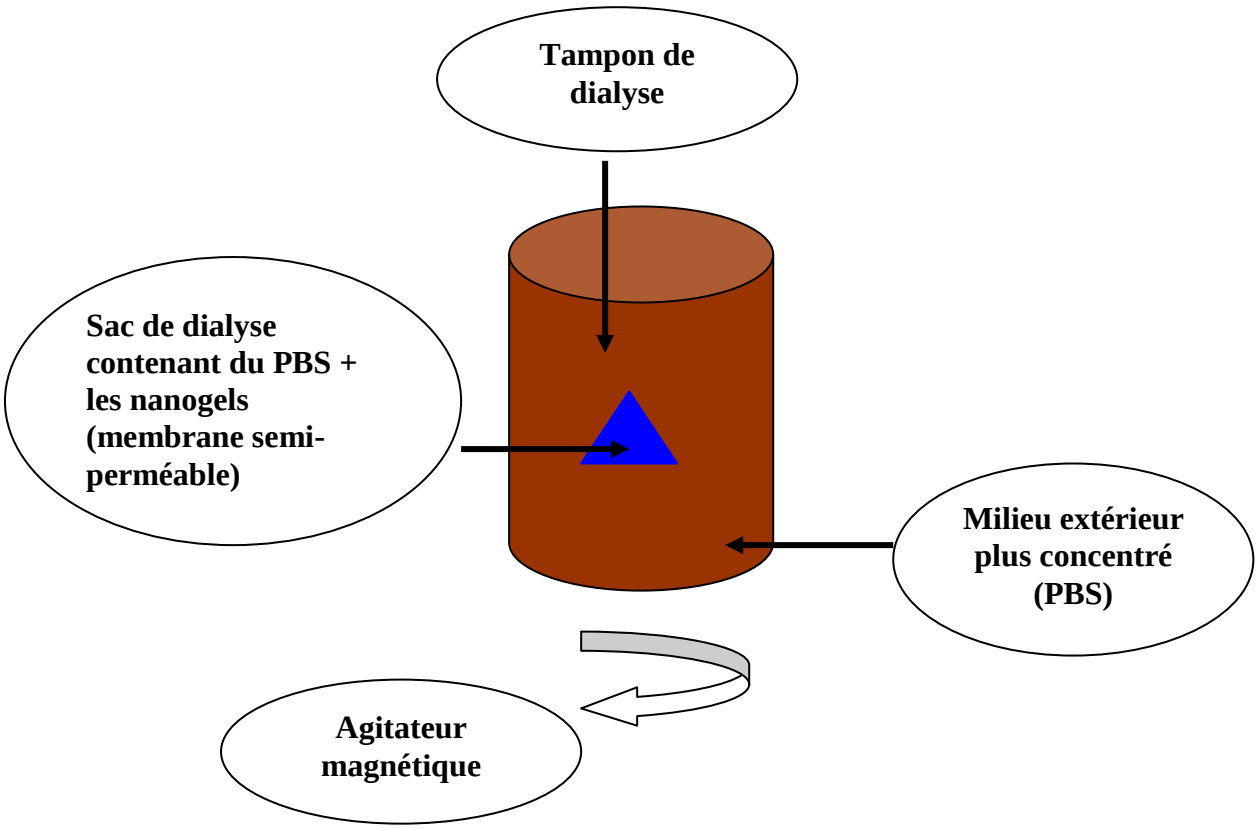


Figure 34: Schéma illustrant le principe de dialyse.

Des échantillons du milieu externe vont être prélevés et analysés au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 260nm.

- **Résultats**

Les résultats obtenus sont représentés sur une courbe avec, en abscisses, le temps d'incubation et en ordonnées, le pourcentage de FATP libéré par les nanogels (figure 35).

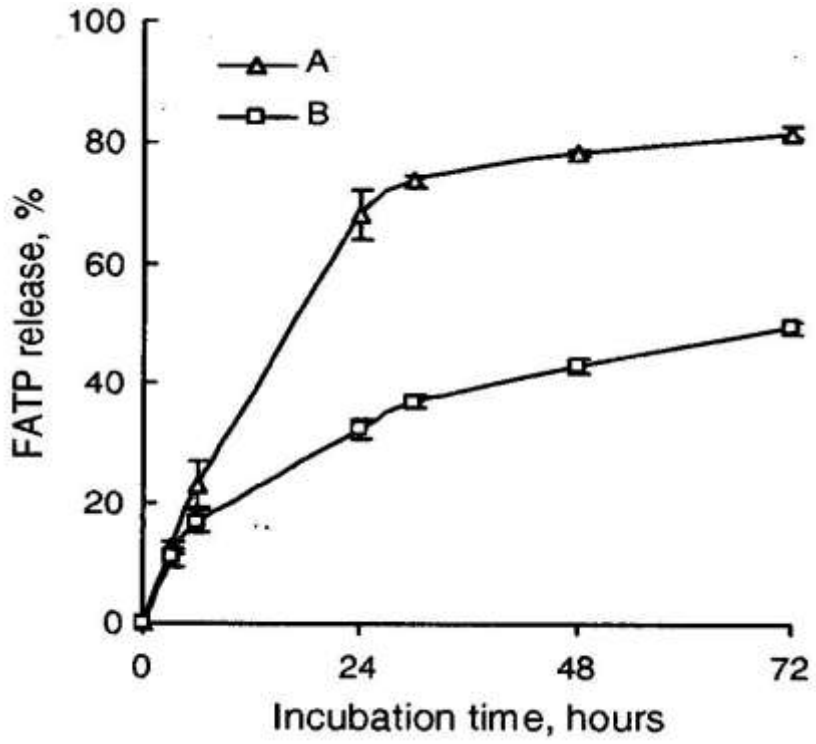


Figure 35: Libération in vitro de FATP inclus dans les nanogels dans la formulation A (△, faible concentration en PA) et la formulation B (□, forte concentration en PA) [48].

Cette étude a permis d'observer deux phénomènes :

- Les deux formulations ont des cinétiques similaires.
- La courbe de la formulation B est plus étalée que celle de la formulation A. Cela signifie qu'en terme de libération contrôlée, le choix portera évidemment sur la formulation B (elle libère 33% de FATP après 24h d'incubation tandis que la formulation A en libère 68%).

3. Cellules de diffusion bicompartimentées (Side by side drug diffusion cell)

a) *Principe [49]*

Le principe de fonctionnement de cette cellule de diffusion est calqué sur celui de la cellule de diffusion Valia-Chen que nous avons présenté au chapitre III. Rappelons brièvement le principe : une cellule de diffusion bicompartimentée, tout comme la cellule de Valia-Chen, comporte deux compartiments différents : un compartiment donneur et un compartiment receveur de capacités égales et séparés par une membrane artificielle (caractérisée par un « cut-off » déterminé) ou biologique (figure 36).

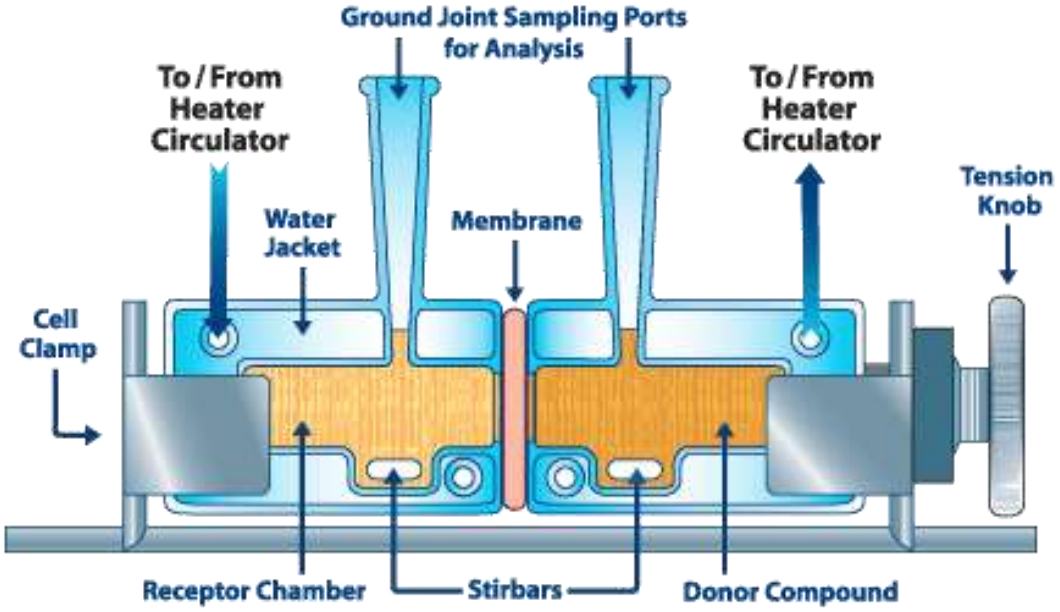


Figure 36: Représentation d'une cellule de diffusion bicompartimentée (Side-Bi-Side Cell® commercialisé par le laboratoire PermeGear, USA) [50].

La solution ou suspension à analyser est placée dans le compartiment donneur et une solution tampon est introduite dans le compartiment receveur. Le taux d'apparition d'un PA dans le compartiment receveur est déterminé par prélèvement, à intervalles de temps réguliers, d'échantillons qui sont analysés.

b) Mise en évidence expérimentale [38]

- **Matériel et méthode**

Vinogradov *et al.* ont utilisé cette technique pour étudier l'administration orale de nucléotides insérés dans des nanogels.

Cette voie serait idéale car elle permettrait d'avoir une meilleure observance thérapeutique.

Cependant les oligonucléotides sont rapidement détruits dans le tractus gastro-intestinal et leur biodisponibilité est inférieure à 1%. Cette faible biodisponibilité est en majeure partie due à la faible efficacité du transport des oligonucléotides à travers l'épithélium gastro-intestinal.

Aussi, pour évaluer cette nouvelle forme d'administration des oligonucléotides, on étudie la libération des PA à l'aide d'une cellule de diffusion bicompartimentée (la membrane de séparation étant recouverte d'une monocouche de cellules Caco-2).

Ce montage *in vitro* tient lieu de simulation de l'épithélium gastro-intestinal. Les cellules Caco-2 sont des cellules différenciées qui présentent les propriétés morphologiques et physiologiques de l'intestin humain.

Au début de l'étude, les nanogels en suspension dans du PBS sont placés dans le compartiment donneur et on retrouve du PBS pur, dans le compartiment receveur. Une comparaison va être faite entre la diffusion du PA isolé dans la cellule bicompartimentée et celle des PA inclus dans les nanogels. Le transfert des oligonucléotides dans le compartiment receveur va être déterminé par des mesures de fluorescence de ces molécules.

- **Résultats**

Comme le montre la figure 37, il existe une nette amélioration du transport des oligonucléotides à travers la monocouche de cellules Caco-2 quand ils sont inclus dans des NP.

Au cours de l'expérience, on a réalisé le co-transfert d'un marqueur paracellulaire, c'est-à-dire le H^3-mannitol. Ce transfert n'a en rien été perturbé par la forme « nanogel » des oligonucléotides. Cela prouve donc que l'amélioration de la biodisponibilité des

oligonucléotides inclus dans les NP est due au passage transcellulaire de ces PA sans qu'ils ne soient détruits par les enzymes locales.

Des échantillons d'oligonucléotides ont été prélevés dans le compartiment receveur afin d'être analysés par Chromatographie Liquide Haute Performance. Cette dernière étape a également permis de démontrer que les oligonucléotides provenant des nanogels ont traversé la monocouche sans avoir été dégradés, contrairement à la forme libre.

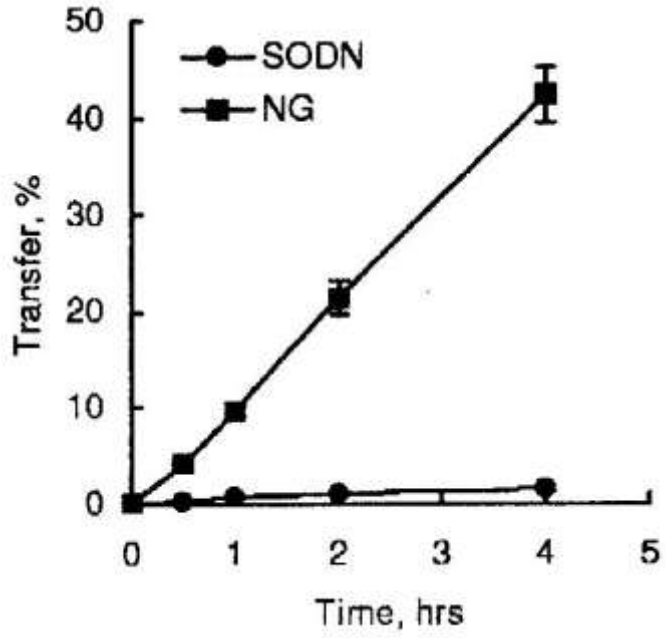


Figure 37: Diffusion de nucléotides libres (SODN) et de nucléotides inclus dans des nanogels (NG) à travers la monocouche de cellule Caco-2. La concentration en SODN est de 5 µM. La quantité de SODN traversant la monocouche de cellules est mesurée par HPLC [38].

4. L'ultracentrifugation

a) Principe [51]

L'ultracentrifugation est une technique utilisant une force centrifuge très élevée pour séparer des éléments solides en suspension dans un fluide. L'ultracentrifugation n'est utilisée ici que pour séparer les NP du surnageant qui contient la molécule ayant été libérée par la matrice polymérique.

Au cours de cette technique, les nanogels ne doivent pas se dissoudre complètement dans le milieu liquide sous peine de biaiser les résultats. On aura donc recours à l'ultracentrifugation uniquement si la structure polymérique des nanogels le permet.

b) Mise en évidence expérimentale [16]

- **Matériel et méthode**

J-C Leroux *et al.* ont étudié la cinétique de la savoxépine, incluse dans des NP, en utilisant la technique de l'ultracentrifugation.

Ces NP vont être mis en suspension dans un tampon phosphate (pH 7,4) contenant du laurylsulfate de sodium. Pour réaliser cette étude, on se place dans des conditions sink. La suspension va ensuite être agitée en conservant une température de 37 °C. À des intervalles de temps réguliers, on prélève de petites quantités de suspension qui vont être centrifugées à une vitesse de $55\,000 \times g$.

L'absorbance du surnageant va être mesurée par spectrophotométrie.

- **Résultats**

Cette technique permet de comparer des NP de tailles différentes ainsi que leur taux de libération en PA. J-C Leroux et son équipe ont, en effet, démontré que des NP d'environ 300 nm vont libérer 50% de leur contenu en PA en 2,7 jours tandis que des NP de 671 nm vont libérer 50% de leur contenu en 18,1 jours (figure 38). Il a donc été démontré, à l'aide de l'ultracentrifugation, qu'avec des NP de plus grosses tailles, les PA sont libérés plus lentement.

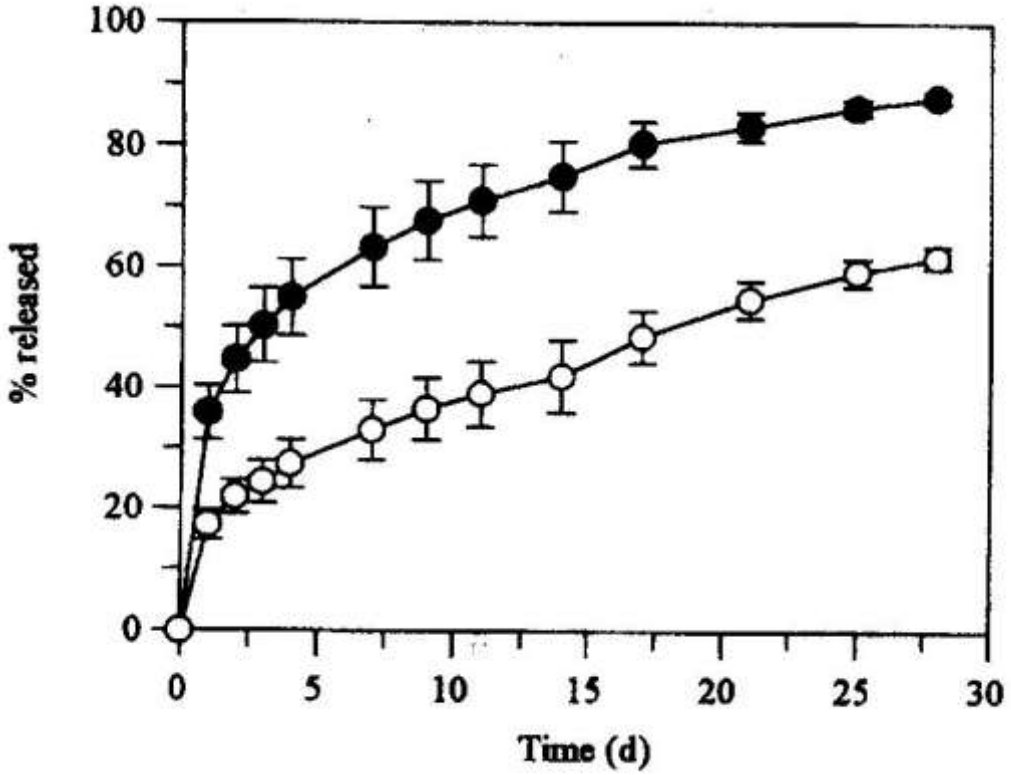


Figure 38: Influence de la taille des NP d'alcool polyvinylique sur le taux de libération de la savoxépine (●, 303 nm ;○ , 671 nm) ; moyenne ± écart-type (*n* = 4) [16].

5. Discussion

Il existe plusieurs méthodes d'étude *in vitro* de la libération des PA inclus dans des nanogels (il faut rappeler que cette libération de PA est régie par un phénomène de diffusion et/ou de dégradation de matrice polymérique) :

- la diffusion par dialyse
- la cellule de diffusion bicompartimentée avec membrane artificielle ou biologique
- l'ultracentrifugation.

Bien qu'on ait souvent recours à ces techniques, il persiste toujours certaines contraintes techniques quant à l'étude de la libération *in vitro* des PA contenus dans les nanogels [33]. Cela est principalement dû à une séparation physique entre la solution de nanogels et le milieu de libération *in vitro*.

La diffusion par dialyse, qui est justement basée sur ce principe, a longtemps servi dans de nombreuses études car cette technique présentait l'avantage d'être rapide ; cette méthode a en effet pour principe de transférer une suspension de nanogel dans un boudin de dialyse. Ce

boudin est une membrane possédant une certaine limite d'exclusion variant selon la ou les molécules à l'étude. Une seconde technique faisant intervenir une membrane a également vu le jour : l'étude de la diffusion par une cellule de diffusion bicompartimentée. Ces deux méthodes sont de plus en plus abandonnées car elles ne respectent pas les conditions sink. Cela s'explique par deux points majeurs :

- La surface de la membrane impliquée dans la diffusion des PA du compartiment donneur vers le compartiment receveur (ou du boudin vers le milieu extérieur) est faible par rapport à la surface représentée par tous les nanogels en suspension [49].

- Les NP ne sont pas directement diluées dans le compartiment receveur et le PA doit traverser une membrane pour se retrouver dans ce compartiment. De ce fait, la quantité de PA que l'on retrouve dans le compartiment receveur n'est pas un bon reflet de la quantité réelle pouvant être libérée.

Pour pallier ces inconvénients, plusieurs chercheurs ont mis en œuvre une technique appelée « la dialyse en retour » (ou « reverse dialysis »). Cette technique va mimer la situation qui se produit *in vivo* de façon plus rigoureuse que la diffusion par cellule bicompartimentée et par dialyse.

Elle est le plus souvent utilisée pour l'étude des émulsions H/E ou de dispersions destinées à être administrées par voie IV ou par voie orale. Cette technique est d'autant plus intéressante que les NP vont directement être dissoutes dans le milieu de libération des PA, ce qui entraînera une forte dilution des NP jusqu'à l'obtention des conditions sink [49].

Bien qu'ayant des propriétés avantageuses, la dialyse en retour est une méthode uniquement restreinte aux formulations de nanogels permettant une libération prolongée des PA s'étalant sur une période minimale d'une heure. En effet, cette méthode n'est pas assez sensible pour l'étude des PA à libération immédiate [33].

Comparée à toutes ces études, l'ultracentrifugation est la moins utilisée. Elle possède cependant l'avantage d'être réalisée dans des conditions sink et ainsi, la libération des PA contenus dans les nanogels et déterminée par cette méthode est représentative de la réalité.

VI. APPLICATIONS THÉRAPEUTIQUES DES HYDROGELS ET DES NANOGELS

A. La libération contrôlée des médicaments

1. Rappels

Le domaine de la libération contrôlée des médicaments est un secteur de la technologie pharmaceutique en pleine expansion. Les systèmes de libération contrôlée offrent des avantages intéressants quand ils sont comparés aux formes galéniques conventionnelles : on observe en effet une efficacité thérapeutique accrue, une toxicité diminuée et une meilleure observance du traitement par le patient [52].

Les hydrogels jouent un rôle prépondérant dans cette forme de libération et il en découle des vecteurs de PA plus petits, les nanogels. Ces derniers représentent un des principaux vecteurs de transport des PA faisant l'objet de nombreuses recherches pour certains ou ayant obtenus des autorisations de mise sur le marché pour d'autres.

Mais qu'entend-on par libération contrôlée ?

Ce concept regroupe tout système exerçant un contrôle soit spatial, soit temporel ou bien les deux à la fois sur la libération d'un médicament [52]. Un tel système comporte plusieurs avantages comparativement au médicament classique parmi lesquels on a :

- le maintien prolongé de la concentration thérapeutique du médicament (figure 39).
- une diminution des effets indésirables par ciblage du médicament à un type cellulaire donné (cette propriété s'applique aussi bien aux hydrogels qu'aux nanogels, bien que les derniers permettent une meilleure vectorisation).
- une diminution de la dose requise pour obtenir l'effet thérapeutique souhaité.
- un meilleur respect de la posologie par les patients.
- un outil approprié pour l'administration de PA biologiques ayant une demi-vie trop courte *in vivo* (protéines et peptides) [53].

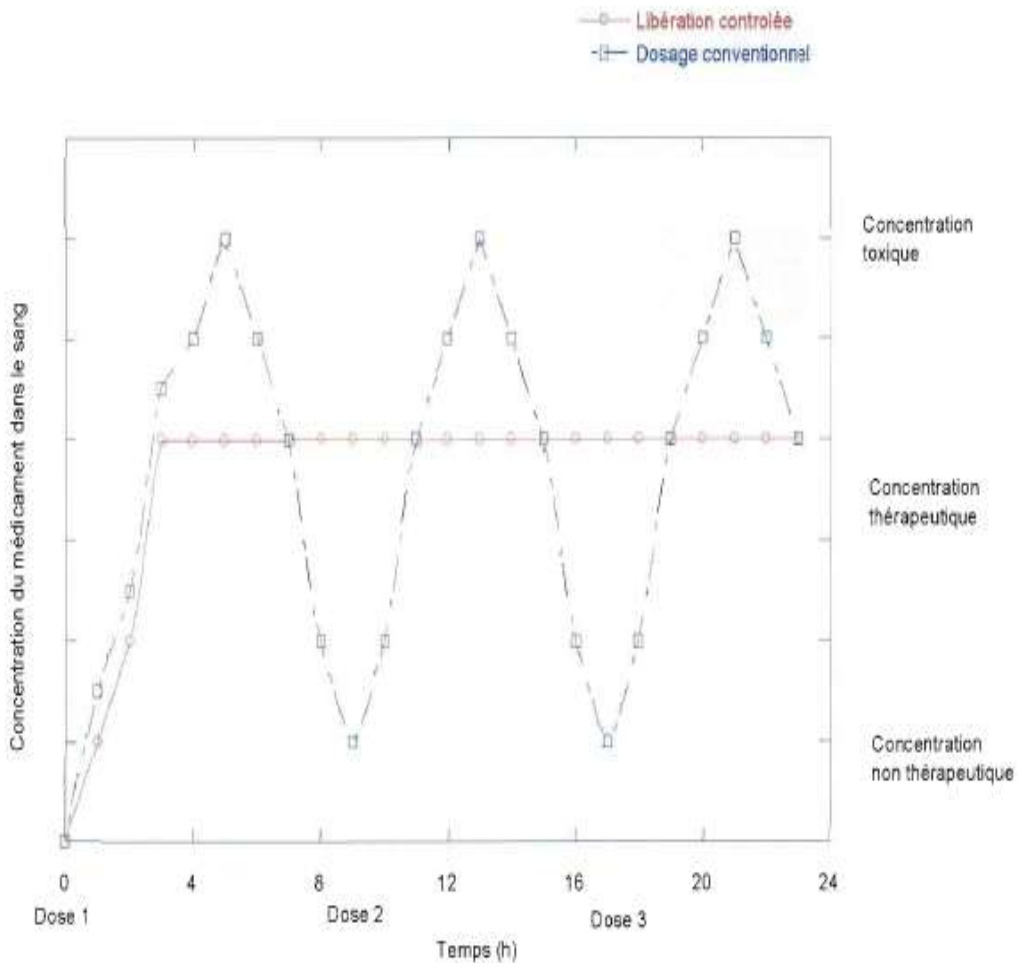


Figure 39: Libération contrôlée versus dosage conventionnel. Pour maintenir une concentration thérapeutique, il faut trois doses du dosage conventionnel contre une dose unique en libération contrôlée pour la même période de temps [52].

De manière générale, ces systèmes de libération contrôlée ont une vitesse de libération d'ordre zéro, donc indépendante de la concentration du médicament.

2. Systèmes de libération contrôlée « intelligents »

Ces systèmes réagissent en fonction des conditions du milieu et sont encore au stade de développement, constituant le sujet de nombreuses études de recherches. Cela est dû aux résultats prometteurs que l'on observe lors d'essais sur les animaux ou au cours des études cliniques [21].

En effet, les systèmes de libération contrôlée présentent des avantages considérables par comparaison avec les formulations conventionnelles. Cependant, ils montrent leurs limites lorsque l'on veut axer des recherches expérimentales sur des pathologies à caractère rythmique et chronique (par exemple, le diabète) : ils libèrent le PA qu'ils contiennent de façon prédéterminée et toujours de la même manière sans pouvoir répondre aux fluctuations métaboliques qui pourraient survenir (exemple : variation du taux d'insuline en réponse à une hyper- ou hypoglycémie) [52].

Un système dit « intelligent » est par contre capable de libérer un PA uniquement lorsqu'un stimulus spécifique est présent [52].
Pour comprendre ces systèmes « intelligents », il faut pouvoir judicieusement choisir les polymères de synthèse qui composent les hydrogels et les nanogels car leur rôle va être déterminant pour la réalisation de ces systèmes.

Les polymères constituant les systèmes « intelligents » doivent arborer des caractéristiques comparables aux polymères naturels du corps humain qui sont à la base de la chimie des organismes vivants. Les trois principales classes de biopolymères (les protéines, les sucres et les acides nucléiques) permettent d'assurer le fonctionnement cellulaire par le biais de mécanismes chimiques, moléculaires ou génétiques. Mais, la caractéristique primordiale de ces biopolymères est leur capacité à réagir suite à des changements, même minimes, survenant dans le milieu environnant [54].
C'est ce critère très intéressant qui a conduit les chercheurs à synthétiser des polymères sensibles à des variations du milieu environnant telles que le pH, la température ou le champ magnétique (figure 40). Ils vont attribuer leur nom aux systèmes « intelligents » du fait de leur similarité avec les polymères biologiques.

Des tels systèmes représentent un intérêt particulier en thérapie car ils possèdent la capacité d'être modulés pour répondre aux stimuli externes ou peuvent répondre à ces milieux par un mode « on/ off » (ou « tout ou rien ») [54].

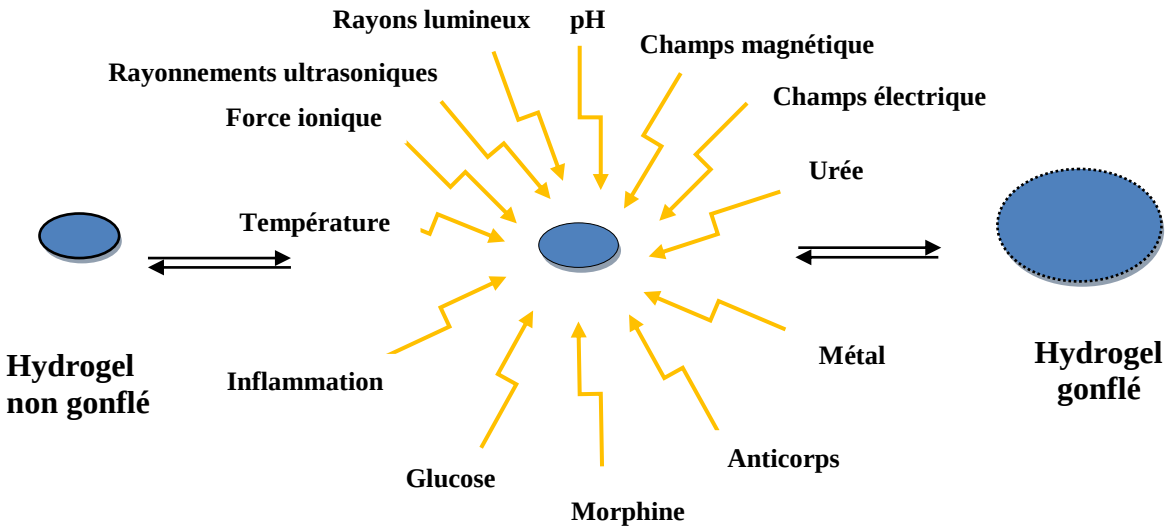


Figure 40: Les différents stimuli agissant sur les hydrogels sensibles à l'environnement [54].

Tout au long de ce travail nous avons cité à plusieurs reprises les polymères de NIPAAm qui ont comme propriété de passer d'une phase à une autre (soluble ou insoluble) en fonction de la température. En deçà de leur TCIS, ces polymères sont solubles.

En les introduisant dans des systèmes « intelligents », ces polymères vont induire l'insolubilité de l'ensemble quand il y' aura une augmentation de la température. Ce mécanisme repose sur l'accroissement des interactions hydrophobes qui existent dans le polymère et une fragilisation des liaisons hydrogènes existant entre les groupements amides et les molécules d'eau à une température supérieure à la TCIS.

Il en résulte un rétrécissement des hydrogels ou des nanogels par expulsion de l'eau contenue dans ceux-ci en réponse à l'association plus étroite qui se créent entre les chaînes des polymères [37].

Cette transition de phase peut être contrôlée en modifiant la composition du polymère : en co-polymérisant le NIPAAm avec des monomères hydrophobes (exemple : butylméthacrylate), on diminue la TCIS tandis que des monomères hydrophiles (exemple : acide acrylique, hydroxyéthylméthacrylate…) vont l'augmenter [54].

La voie de recherche privilégiée par les chercheurs est la voie orale pour les multiples avantages qu'elle revêt, particulièrement pour le patient. Le pH acide de l'estomac (de l'ordre

de 3) ainsi que le pH neutre de l'intestin représentent des milieux différents et cela peut être exploité pour la libération ciblée d'un PA dans le tractus gastro-intestinal [52]. Or, comme cité précédemment, les systèmes « intelligents » peuvent être sensibles au pH : ainsi, les hydrogels ou nanogels sensibles au pH sont préférentiellement composés de groupements acides (acide carboxylique, acide sulfonique…) ou basiques (exemple : sels d'ammonium) qui acceptent ou libèrent des électrons en réponse aux changements de pH du milieu. Ainsi, la caféine incorporée dans des hydrogels de copolymère de méthacrylate de méthyl et de N, N-diméthylaminoéthylméthacrylate (DMAEM) n'est pas libérée à pH neutre mais à un pH de 3-5 où le DMAEM est ionisé [55].

3. La vectorisation thérapeutique

Les recherches scientifiques ont bien évolué depuis vingt ans dans le domaine de la libération des PA. Auparavant, les chercheurs mettaient l'accent sur « l'ajustement » du taux de libération des PA. Aujourd'hui, une voie de recherche est privilégiée : la vectorisation thérapeutique.

La vectorisation thérapeutique connaît un essor considérable dans les études actuelles, notamment les études menées sur des maladies (diabète, cancers…) dont les traitements actuels montrent de nombreux aspects négatifs.

Des NP sont étudiées pour être administrées par voie orale. En effet, les NP ont un diamètre tel qu'elles acquièrent une surface volumique très élevée, ce qui permet une interaction maximisée entre la surface des NP et le mucus gastro-intestinal. Additionnellement, ces nanovecteurs de PA, du fait de leur petite taille, vont être en mesure de diffuser plus profondément dans le mucus et peuvent ainsi atteindre les cellules de la couche épithéliale [56].

Afin de mieux cibler différents sites au niveau du tube digestif, des chercheurs ont mis en œuvre des NP bioadhésives et mucoadhésives formées de polymères (exemple : acide polyacrylique) capables d'adhérer plus facilement à la muqueuse gastro-duodénale par le biais de liaisons hydrogènes et / ou par la pénétration des chaines polymériques à travers la muqueuse [17]. Des chaines linéaires peuvent être rajoutées aux chaines polymériques constituant ces systèmes mucoadhésifs pour servir de promoteur à la mucoadhésion [52].

Cependant, la vectorisation thérapeutique ne se résume pas uniquement à la voie orale. En effet, afin de mieux contrôler la libération de molécules actives dans le temps et dans l'espace, la recherche galénique a permis d'imaginer des systèmes d'administration injectables et plus particulièrement ceux administrés en intraveineux.

Dans le cas du passage des hydrogels aux nanogels, des procédés de type « top-down » (c'est-à-dire une réduction de taille partant d'un objet de taille supérieure ou miniaturisation). Nous avons abordé certains de ces procédés au chapitre IV. Ces NP, lorsqu'elles sont administrées par voie intraveineuse, peuvent interagir fortement avec les protéines plasmatiques (les opsonines) en raison de la très grande surface spécifique qu'elles développent (plusieurs dizaines de m^2/ g). Les NP, ainsi recouvertes d'opsonines, peuvent être capturées par des cellules hépatiques spécifiques, les cellules de Kupfer. Ces nanovecteurs, que l'on appelle vecteurs à tropisme hépato-splénique, constituent un moyen intéressant de vectorisation des PA vers le foie [57].

Ces nanogels peuvent également être recouvertes de PEG, qui vont leur conférer un temps de résidence accru et une immunogénicité moindre. La présence des chaines de PEG crée une barrière stérique sur la surface des NP et restreint son accès aux opsonines, et par conséquent restreint la capture hépatique [52]. De telles NP sont appelées vecteurs de deuxième génération ou vecteurs « furtifs » à rémanence vasculaire prolongée. Ces vecteurs ont une probabilité importante de traverser les endothéliums vasculaires de perméabilité accrue comme ceux localisés au niveau de tumeurs, des foyers infectieux ou au niveau des barrières hémato-encéphaliques perméabilisées par certaines maladies [57].

Bien que futuristes, ces avancées ont dépassé le stade de la simple curiosité de laboratoire puisqu'elles donnent lieu à plusieurs travaux et études cliniques qui présentent des résultats sur les animaux très intéressants. De plus, certains vecteurs pegylés se trouvent déjà sur le marché.

B. Les hydrogels et les nanogels : une alternative pour différentes voies d'administration

Les hydrogels et les nanogels véhiculant des PA peuvent être utilisés pour des administrations par voie orale, rectale, oculaire, sous cutanée, nasale, pulmonaire ou IV. Pour cela, ces vecteurs doivent présenter certaines caractéristiques afin d'optimiser l'action des PA.

1. La voie orale

Les études concernant cette voie ciblent tout particulièrement la bouche et le tube digestif et privilégient la libération contrôlée des PA. Pour cela les hydrogels ou nanogels doivent être conçus de manière à maîtriser leurs propriétés de gonflement ainsi que leurs caractéristiques bio- ou muco-adhésives en présence de fluides biologiques. En effet, quelquesoit le site de libération lors de cette administration, les hydrogels et les nanogels vont baigner dans un fluide biologique abondant (salive, mucus, suc digestif…) afin que se déploient leurs caractéristiques bio- ou muco-adhésives [17].

La voie orale est plus facile et plus pratique d'utilisation et permet un meilleur respect de la posologie principalement lors de traitements à long terme.
C'est pour cela que, malgré les obstacles reliés à l'administration orale des protéines, des formulations à base d'hydrogels ou de nanogels ont été étudiées pour la voie orale afin d'augmenter l'absorption gastro-intestinale des protéines et des peptides [52].
Plusieurs substances composant les nanogels et les hydrogels ont été proposées pour augmenter la biodisponibilité orale des protéines thérapeutiques ; en effet, il a été développé des nanogels fonctionnels permettant d'obtenir des nanobiomatériaux innovants en associant des polymères fonctionnels et structuraux. Akiyoshi *et al.* décrit des pullulans qui sont rendus hydrophobes par greffage de cholestérol et qui forment des NP dans l'eau. Ces NP, aptes à se complexer de manière réversible avec l'insuline, forment des suspensions colloïdales stables [58]. De plus, ces composés facilitent l'absorption en augmentant la perméabilité épithéliale et cela, en perturbant la membrane des entérocytes et en induisant l'ouverture des jonctions serrées [52].
En plus des polymères nécessaires à la formation des hydrogels ou des nanogels, on peut également avoir recours à des promoteurs d'absorption, tels le chitosan, qui vont inhiber les enzymes protéolytiques et réduire la viscosité de la couche de mucus.

Le chitosan cité en exemple plus haut est un polymère biodégradable et biocompatible, utilisé comme excipient dans plusieurs formulations thérapeutiques. Ce biopolymère ouvre la voie à de nouvelles possibilités [52].
Le chitosan et ses dérivés ont, en plus de leur propriété de promoteur de l'absorption, de très bonnes propriétés mucoadhésives. Ces deux caractéristiques en font des composés de choix pour l'administration orale de peptides et de protéines.

2. La voie rectale

Cette voie est privilégiée pour éviter la dégradation des PA due aux effets de premier passage hépatique.

La pratique courante met à disposition des suppositoires pour cette voie. Ils sont solides à température ambiante et liquide à la température corporelle. Il se pose un problème couramment rencontré lors de l'utilisation des suppositoires : selon la position du suppositoire dans le rectum, le PA va être retenu *in situ* ou va migrer vers le côlon (via les veines hémorroïdales supérieures) et ainsi subir l'effet de premier passage hépatique. Cela conduit donc à une biodisponibilité qui va varier et qui ne pourra être aisément contrôlée.

Dans ce contexte, les hydrogels peuvent se révéler être une solution aux inconvénients que représentent les suppositoires car ils peuvent déployer des propriétés bioadhésives une fois administrés par voie rectale, augmentant ainsi la diffusion des PA au niveau de la muqueuse rectale [17].

Plusieurs chercheurs ont étudié le xyloglucane, un polymère ayant une transition sol-gel à une température allant de 22 à 27°C. Ce polymère se retrouve donc sous forme gel à la température corporelle. Il est facilement administrable par la voie rectale car il est liquide à température ambiante.

Peppas *et al.* [17] ont rédigé une publication faisant état des travaux réalisés sur ce polymère : des hydrogels de xyloglucane dans lesquels a été introduit de l'indométacine ont été synthétisé et ont été comparés aux suppositoires d'indométacine déjà commercialisés.

Ces hydrogels, ainsi chargés, ont été administrés *in vivo* à des lapins par voie rectale. On a ainsi pu observer un profil de libération contrôlée de l'indométacine au niveau plasmatique au fil du temps sans réduction de la biodisponibilité du PA.

Un autre avantage de l'utilisation des hydrogels pour cette voie est la diminution de l'irritation de la muqueuse rectale souvent causée par les excipients qui sont contenus dans les suppositoires.

3. La voie oculaire [17]

Cette voie présente plusieurs contraintes physiologiques lorsqu'on y administre des médicaments, notamment les mécanismes de protection de l'œil (à savoir les battements de paupière, le larmoiement, la faible perméabilité de la cornée) qui altèrent l'efficacité thérapeutique.

En effet, les gouttes oculaires conventionnelles sont rapidement éliminées et les PA administrés sont de ce fait peu absorbés, ce qui se traduit par une faible biodisponibilité. Pour remédier à cela, les gouttes oculaires sont « surdosées » pour aboutir aux objectifs thérapeutiques souhaités.

Ces circonstances ont poussé les chercheurs à travailler sur des formes à libération prolongée et compatibles avec cette voie. Les hydrogels ont des propriétés élastiques et sont résistants à certains mécanismes de protection de l'œil tels que le larmoiement. Nous pouvons citer en exemple l'OCUSERT® PILO (commercialisé aux États-Unis) qui est un hydrogel de forme ellipsoïdale conçu pour la libération prolongée de pilocarpine dans l'œil, après introduction dans le cul-de-sac oculaire. Une évaluation clinique auprès de certains patients a permis de démontrer l'efficacité thérapeutique du système ainsi placé dans l'oeil pour une durée d'une semaine. Deux dosages sont actuellement disponibles : les PILO-20 et PILO-40 [59, 60].

Ils offrent un intérêt particulier pour le confort des patients car ils ne sont pas susceptibles d'entraîner des démangeaisons et peuvent être utilisés pour la libération contrôlée dans le temps de certains PA.

4. La voie sous-cutanée [17]

Les hydrogels sont des matériaux pouvant être utilisés pour l'administration sous cutanée de PA. L'organisme répond à cette voie de différentes manières. On peut citer :

- l'inflammation
- l'immunogénèse
- la carcinogénèse (ce dernier phénomène va dépendre des polymères utilisés).

De ce fait, la biocompatibilité est un pré-requis indispensable pour l'utilisation d'hydrogels implantables et ces derniers remplissent bien ces conditions car ils contiennent une forte proportion d'eau.

Les hydrogels sont actuellement étudiés car ils offrent des aspects d'utilisation très prometteurs :

- Les hydrogels sont souples et élastiques : ils n'entraineraient donc pas ou peu d'irritation mécanique en cas d'implantation *in vivo.*
- la faible tension interfaciale entre l'eau et les hydrogels permet l'adhésion cellulaire et prévient l'adsorption des protéines.
- Les différents polymères disponibles aujourd'hui permettent l'incorporation de PA de poids moléculaires différents et possédant des caractéristiques hydrophobes ou hydrophiles.
- La formation d'un réseau au sein des hydrogels va permettre une libération contrôlée des PA.

Cette voie voit également se développer des hydrogels implantables biodégradables qui ne nécessitent donc plus d'intervention chirurgicale ultérieure pour retirer les implants.
Comme l'a souligné J.-F. Jacques dans sa thèse [52], un tel hydrogel a été développé par Cho *et al.* et est composé de poly – ε - caprolactone et de PEG. L'hydrogel ainsi formé a permis une libération prolongée (durant quarante cinq jours) de clonazépam *in vivo* et a pu être dégradé dans l'organisme des souris sans que l'on ait observé d'effets toxiques.

5. La voie nasale [52]

La recherche sur l'absorption nasale a connu un essor rapide suite aux pressions des compagnies pharmaceutiques et d'études qui montraient que les patients n'aimaient pas recevoir des injections et que la voie *per os* n'était pas un succès pour l'administration de macromolécules biologiques. Cet essor de la recherche a conduit à l'obtention de nanogels ayant des propriétés bioadhésives. En effet, ces propriétés permettent une réduction de la vitesse de la clairance mucociliaire (sous l'action du battement des cils des cellules ciliées de l'épithélium nasal, le mucus et les particules qui s'y trouvent sont évacués vers l'œsophage. Ce mécanisme s'appelle la clairance mucociliaire) favorisant ainsi une meilleure absorption du PA.

De plus, lors de l'introduction de nanogels dans la cavité nasale, ces derniers vont s'hydrater et entrainer la déshydratation du mucus conduisant à l'ouverture transitoire des jonctions serrées entre les cellules de l'épithélium nasal. Cela permet ainsi de faire plus facilement passer des macromolécules hydrophiles.

De nombreuses études ont permis de démontrer que plus le temps de contact NP/ muqueuse nasale sera long, plus l'absorption nasale des PA pourra se faire.

Les hydrogels peuvent également s'avérer intéressants pour cette voie.
Le poly (oxyéthylène-b-oxypropylène-b-oxyéthylène)-acide polyacrylique est un hydrogel liquide à la température de la pièce, solide à la température corporelle et qui permet de réduire la vitesse de clairance mucociliaire. Cet hydrogel a été étudié et on a pu observer que près de 10% de l'hydrogel était retenu dans la cavité nasale, 20 heures après son administration par vaporisation.

6. La voie pulmonaire [52]

La voie pulmonaire possède une large surface d'absorption au niveau des alvéoles, une distance minimale entre la voie air/ sang et elle permet d'éviter le premier passage hépatique. De par ces caractéristiques, la voie pulmonaire peut devenir, à l'instar de la voie orale, une nouvelle voie non-invasive d'administration des biothérapeutiques (peptides et protéines) et devrait être bien acceptée par les patients.

Les principaux systèmes servant à livrer les médicaments aux poumons fonctionnent par nébulisation lorsque le médicament est sous forme de solution ou d'émulsion, ou par un inhalateur à doses pré mesurées lorsque le médicament est sous forme d'une fine poudre. L'action du médicament peut être locale ou bien systémique suite à son passage dans la circulation sanguine (Tableau 3).

Peu d'études ont été réalisées sur l'utilisation de NP pour l'administration pulmonaire de biothérapeutiques dû en outre à la difficulté du dosage.
Nous pouvons tout de même citer deux exemples d'études menées sur les molécules biologiques dans l'optique de les administrer par voie pulmonaire à l'aide de nanogels :

1) De l'insuline a été incorporée dans des NP de PLGA ayant un diamètre de 400 nm et ont été administrées par nébulisation chez le cochon d'Inde à une dose d'insuline de 3,9 UI/kg. Une diminution significative de la glycémie, et même une hypoglycémie, a été observée sur une période de 48 heures, comparativement à une période de 6 heures lorsqu'une solution d'insuline est employée [52].

2) Des résultats similaires ont été obtenus avec des NP de 256 nm de diamètre, faites de polybutylcyanoacrylate (PBCA) et qui ont été administrées par instillation intratrachéale chez des rats. Dans ce cas, la glycémie a diminué de 50 % en moins de 4 heures suivant l'administration d'une dose de 5 UI/ kg d'insuline tandis qu'on obtient une diminution de 22 % avec une dose identique d'insuline libre. De plus l'effet hypoglycémiant durait plus longtemps avec l'insuline incorporée aux nanoparticules [52].

Biothérapeutique	*Masse moléculaire (kDa)*	*Action du médicament*	*Pathologie traitée*
Oxytocine	1	Systémique	Remplacement d'hormone
Leuprolide	1,2	Systémique	Endométriose
Glucagon	3,5	Systémique	Remplacement d'hormone
Calcitonine	4,5	Systémique	Ostéoporose
Insuline	6	Systémique	Diabète
Interleukine-2	15,4	Local	Cancer métastatique du poumon
Interféron	19,6	Local/ Systémique	Hépatite C
Somatotrophine	22,1	Systémique	Nanisme
DNAse	33	Local	Fibrose cystique
Antitrypsine	42	Local	Fibrose cystique
Catalase	240	Local	Toxicité à l'oxygène
Gène CFTR	----	Local	Thérapie génique/ fibrose cystique

Tableau 3: Biothérapeutiques administrées par voie pulmonaire [52].

7. La voie intraveineuse

Cette voie fait principalement l'objet de recherche pour approfondir les connaissances actuelles sur les vecteurs à tropisme hépato-splénique et les vecteurs de deuxième génération. Nous avons déjà défini précédemment leurs principales caractéristiques ainsi que le but de leur utilisation.

C. Les nanogels et les hydrogels à l'étude pour le traitement ou la prévention de pathologies les plus fréquentes : le cancer, le diabète, les maladies infectieuses, le génie tissulaire et les vaccins.

Le cancer et le diabète sont des pathologies très fréquentes et connaissent une prévalence considérable en raison des différents modes de vie qui s'étendent sur les tous les continents du fait de la mondialisation, à savoir une alimentation déséquilibrée (« junk food ») ou une certaine sédentarité due à pléthore d'innovations (exemple : les jeux vidéos).
De plus ces deux maladies ont comme inconvénient de nécessiter des traitements à long terme.
C'est pour ces différentes raisons que plusieurs chercheurs s'accordent à l'unisson pour trouver de nouveaux traitements qui seraient susceptibles de fournir une qualité de vie meilleure pour les patients par rapport à celle qu'ils connaissent avec les traitements actuels.

Les traitements pour maladies infectieuses, la « vaccinothérapie » et le génie tissulaire sont également des sujets d'étude très prisés par les chercheurs pour les mêmes raisons que citées précédemment mais également pour permettre la disponibilité de médicaments en ville (dans le cas des voies nasale, orale ou pulmonaire) et pour diminuer les effets secondaires indésirables causés par les traitements actuels.

1. Le cancer

Nous avons présenté précédemment des nanogels à tropisme hépato-splénique ; Ces nanogels ont une distribution qui cible le foie, la rate et les lysosomes hépatiques. Ces caractéristiques ont été mises à profit pour vectoriser des molécules d'intérêt thérapeutique au niveau de ces sites biologiques et traiter ainsi différentes pathologies, notamment les cancers, auxquels de nombreux travaux sont consacrés.

Par exemple, la distribution hépatique de ces vecteurs a été exploitée pour traiter les métastases hépatiques [57]. Dans cet exemple précis, il s'agit d'un ciblage indirect puisque le médicament anticancéreux est livré aux cellules de Küpfer (cellules spécifiques du foie) qui jouent ainsi le rôle de réservoir de médicaments. Le PA peut alors diffuser dans l'ensemble du tissu et notamment vers les cellules cancéreuses.

Plusieurs chercheurs ont pu démontrer qu'après internalisation cellulaire, le PA contenu dans les nanogels se retrouve dans l'espace périnucléaire, ce qui suggère que les agents cytotoxiques à visée nucléaire peuvent directement être libérés sur leur site d'action. Cela permet de diminuer considérablement les effets secondaires toxiques causés par certaines chimiothérapies [61].

Un des grands challenges qu'ont connu les chercheurs ces dernières années, consiste en l'adressage spécifique de PA vers des tissus cancéreux déterminés [62]. Pour cela, ils ont fixé des ligands sur des vecteurs de deuxième génération (anticorps, peptides, sucres, acide folique…) qui seront capables de reconnaitre de manière sélective des antigènes ou des récepteurs qui sont hyper-exprimés à la surface des cellules cibles. Dans ce cas, les nanogels sont recouverts d'une couche de polymères hydrophiles et flexibles (exemple : PEG) pour éviter la reconnaissance hépato-splénique et peuvent également se voir ajouter des ligands de reconnaissance membranaire à l'extrémité de certaines chaines de PEG [63].

La cible biologique (récepteur ou antigène) doit :

- être présente à la surface des cellules pour permettre leur reconnaissance
- être internalisée dès qu'elle a été reconnue par son ligand afin de permettre la libération du PA associé au vecteur à l'intérieur de la cellule (et non à l'extérieur) [57].

Nous ne pouvons établir une liste exhaustive de toutes les études qui sont actuellement réalisées mais nous pouvons tout de même, préciser que chacune d'elles semble très prometteuse en raison des résultats encourageants qui sont obtenues au cours des essais expérimentaux.

Nous allons en citer un exemple : des analogues nucléosidiques 5'triphosphates, généralement toxiques, ont été incorporés dans des nanogels pour être délivrés spécifiquement au niveau des cellules tumorales dans le cas d'un cancer du sein. Les résultats expérimentaux ont

démontré que de telles formulations améliorent la délivrance *in situ* de ces molécules cytotoxiques ainsi que le potentiel thérapeutique de cette chimiothérapie anticancéreuse [64].

2. Le diabète

Plusieurs études que l'on retrouve dans la littérature scientifique sont centrées sur les moyens de libération de l'insuline afin d'apporter un nouvel élan aux traitements contre le diabète. Ces études font intervenir des systèmes de gels aussi bien sensibles au pH qu'à la température.

Les principales tentatives de développement de vecteurs de libération de PA hormonaux concernent la libération d'insuline en réponse à la concentration en glucose dans le sang. Typiquement des systèmes sophistiqués ont été développés permettant de libérer de l'insuline en fonction de la concentration de glucose sanguin. Les hydrogels utilisés dans ces systèmes sont constitués de polymères cationiques, anioniques ou neutres. Ces hydrogels, sensibles à l'environnement, vont gonfler en fonction de la concentration de glucose qui les entoure [65].
Un exemple de tels systèmes de libération d'insuline a été étudié par C. de la Heras Alarcon *et al.* [66].
En effet cette équipe a développé un système composé d'insuline, d'une enzyme, la glucose oxydase, immobilisés dans un hydrogel sensible au pH à base d'acide polyméthacrylique lié à du PEG ou PMAA-*g*- PEG.
La surface du polymère comporte une série d' « entrées moléculaires » qui s'ouvrent afin de libérer de l'insuline en fonction de la concentration de glucose du milieu extérieur. La présence d'une forte concentration sanguine de glucose cause une augmentation du sucre à l'intérieur de l'hydrogel, et il subit alors une transformation en acide glucuronique par la glucose oxydase. La formation d'acide induit une diminution du pH à l'intérieur de l'hydrogel ce qui conduit au gonflement de l'hydrogel permettant la diffusion de l'insuline et de l'acide gluconique (figure 41). Une diminution de la concentration de glucose diminue l'activité de la glucose oxydase et le pH revient vers des valeurs de pH neutres.
Une caractéristique supplémentaire de ce système tient à la présence du réseau de PEG, qui, à l'état gonflé de l'hydrogel, est capable d'adhérer sur des régions spécifiques de l'intestin. De cette façon, la libération d'insuline peut être vectorisée vers des parties spécifiques de l'organisme.

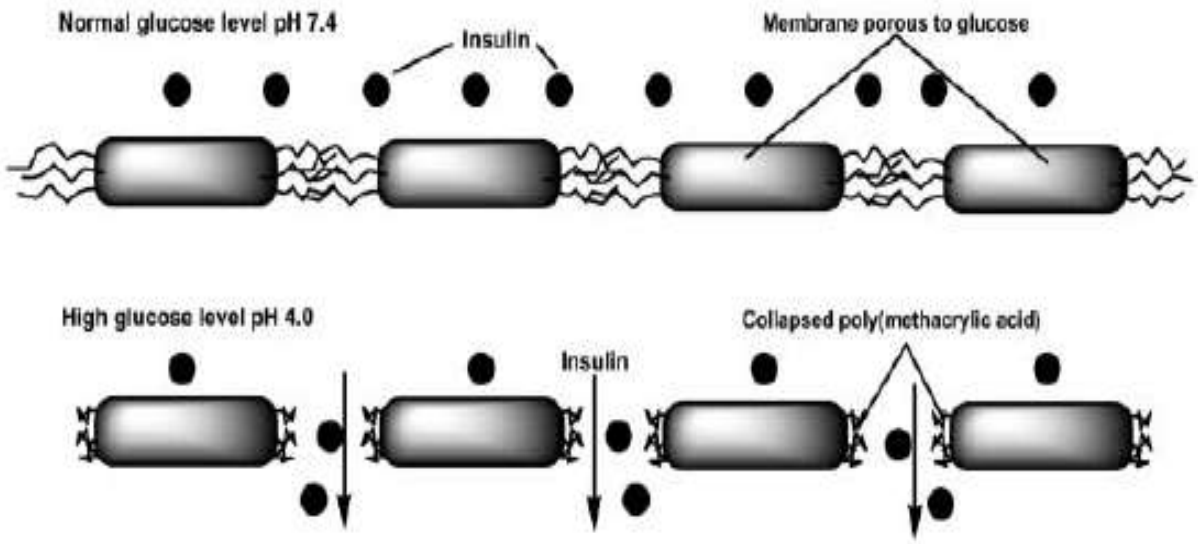


Figure 41: Un hydrogel de PMAA-g-PEG sensible à l'environnement pour la libération contrôlée d'insuline [66].

Une autre approche exploite l'usage d'hydrogels de polyélectrolytes simultanément sensibles à deux facteurs : le pH et la température. Pour cela, les polymères composant ces systèmes doivent être élaborés à partir de monomères possédant une faible TCIS [65].

3. Les maladies infectieuses

Le traitement des infections intracellulaires a fait l'objet de travaux particulièrement prometteurs.

En effet, lorsqu'elles se trouvent dans le compartiment sanguin, les bactéries sont opsonisées et captées par les macrophages du foie, de la rate et de la moelle osseuse. Dans certaines situations (immunodépression, maladies opportunistes…), les lysosomes de ces macrophages constituent des sanctuaires pour la multiplication des bactéries intracellulaires. Beaucoup d'antibiotiques sont peu actifs sur ces germes à localisation intracellulaire car ils diffusent mal à l'intérieur de la cellule ou ils n'atteignent pas les compartiments intracellulaires infectés (endosomes/ lysosomes). La localisation tissulaire (foie, rate), cellulaire (macrophage) et subcellulaire (endosomes/ lysosomes) des vecteurs à tropisme hépato-splénique en font donc une navette de tout premier choix pour le transport efficace d'antibiotiques au niveau de

cellules infectées (figure 42). Des résultats spectaculaires ont d'ailleurs été obtenus avec les NP sur des modèles d'infection expérimentale [57].

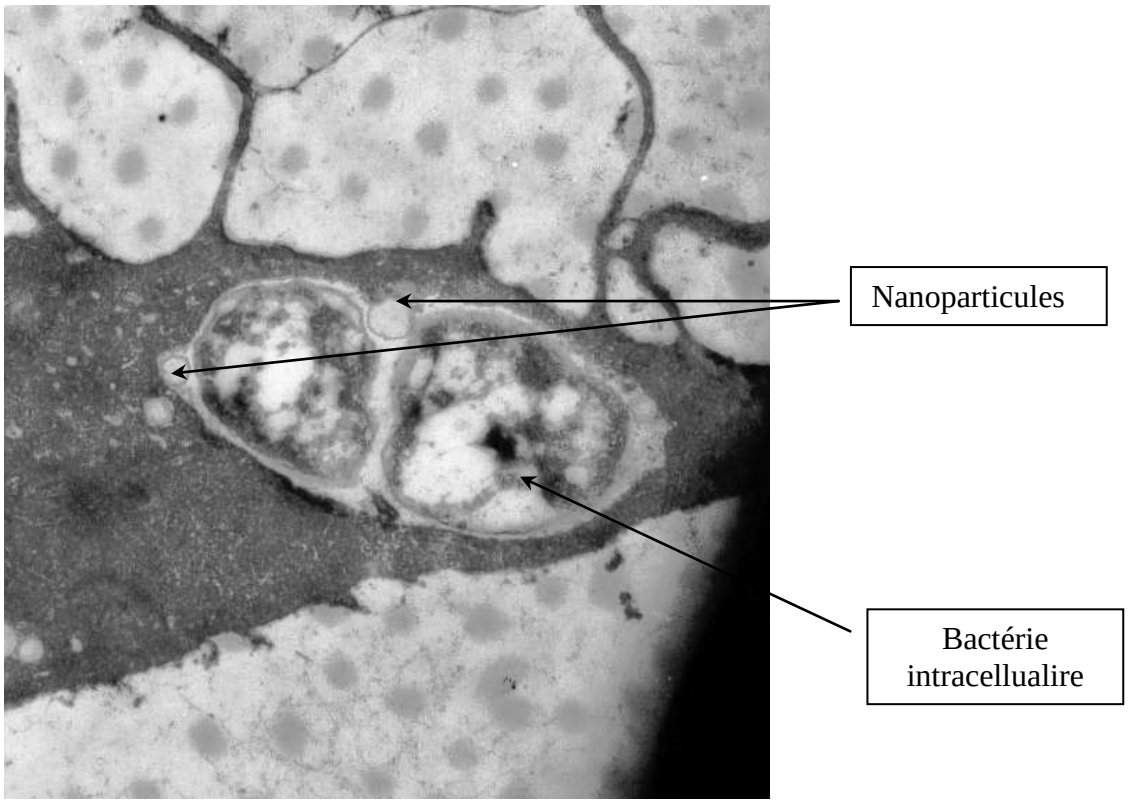


Figure 42: Ciblage d'une bactérie intracellulaire localisée dans un endosome macrophagique par des nanoparticules [57].

Ainsi, dans un modèle d'infection expérimentale à *Salmonella typhimurium,* il a été démontré qu'un antibiotique vectorisé par des NP biodégradables de polyalkylcyanoacrylate était 100 fois plus efficace que lorsqu'il était administré sous une forme pharmaceutique conventionnelle [57].

PSK Murthy *et al.* [67] se sont penchés sur l'étude d'hydrogels contenant des particules d'argent. La tâche de cette étude consistait à démontrer l'activité antibactérienne prononcée de tels hydrogels. L'intérêt majeur des particules d'argent introduites dans ces hydrogels consiste au fait que les particules d'argent, réparties de façon homogène dans le réseau, sont libérées au fil du temps une fois que l'hydrogel se retrouve dans un milieu aqueux.
Ainsi, les particules d'argent s'échappent du réseau structurant l'hydrogel avec le temps et agissent sur les bactéries.

Du fait d'une bonne dispersion des particules d'argent dans les hydrogels, l'effet antibactérien des hydrogels purs et des hydrogels chargés en argent a été évalué sur *Escherichia coli*. La figure 43 illustre l'effet antibactérien de ces deux hydrogels différents sur *Escherichia coli*. Les résultats obtenus vont dans le sens de ceux attendus : il n'y a presqu'aucune colonie qui a poussé au sein du gel chargé en particules d'argent contrairement au gel pur qui n'a démontré aucune activité antibactérienne. Cette étude a ainsi permis de conclure que des hydrogels chargés en particules d'argent peuvent s'avérer être d'excellents supports pour un effet antibactérien.

Il existe tout de même des conditions nécessaires :

- une quantité adéquate de réticulant pour obtenir un réseau assez serré pouvant retenir les particules d'argent.
- une homogénéité parfaite de ces particules d'argent au sein de l'hydrogel.

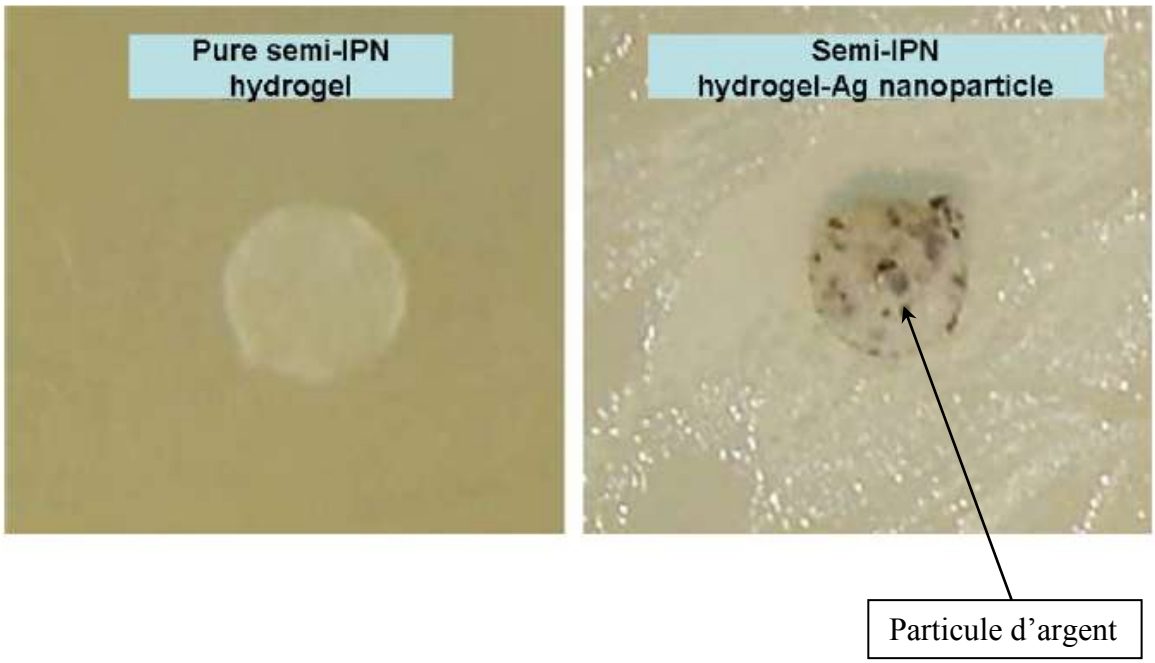


Figure 43: Photographie d'un hydrogel pur et d'un hydrogel chargé en particule d'argent posés sur des *Escherichia coli*. L'aspect blanchâtre et poudreux que l'on observe sur l'hydrogel pur indique la croissance de colonies bactériennes [67].

4. Génie tissulaire

Un autre grand domaine prometteur est la synthèse de tissus biocompatibles. Les recherches réalisées dans ce domaine sont à l'origine d'une très grande activité en synthèse nanométrique.

En effet, on pense pouvoir insérer des nanomatériaux dans les tissus vivants après les avoir rendus biocompatibles par leur structure et leurs propriétés de surface, de façon à leur permettre de s'insérer dans l'architecture du vivant. On pourrait alors créer des substrats pour activer la régénération des cellules. On peut ainsi espérer sur le long terme réaliser des fonctions de reconstruction de tissus nerveux détruits, ou encore de régénération de la rétine [42].

L'usage des nanogels dans le domaine du génie tissulaire n'en est qu'à ses premières heures et la plupart des applications sont encore en cours d'études.

Aujourd'hui, les applications sont limitées aux usages suivants :

- conception de biomatériaux de support pour permettre un contrôle de l'adhésion cellulaire, moduler l'organisation spatiale des cellules sur le support ou pour moduler les biomolécules dans leur environnement local,
- combinaison des fonctionnalités de biomolécules avec celles de biomatériaux synthétiques ou naturels pour une meilleure régénération cellulaire,
- la synthèse de tissus de cellules spécifiques.

Bien qu'il y' ait encore plusieurs zones d'ombre dans le tableau, la synthèse de tissus à base de nanogels n'est pas une utopie et plusieurs études montrent des résultats encourageants.

Le génie tissulaire sera est un excellent domaine d'étude pour explorer les applications pratiques de la nanotechnologie via les nanogels [36].

L'utilisation des nanogels peut également faire intervenir un autre domaine dans le génie tissulaire : la régénération osseuse et pour cela, Kato *et al.* [68] ont étudié des nanogels chargés en prostaglandine E_2.

La régénération osseuse est nécessaire dans un certain nombre de cas de déficit osseux chez l'adulte tels que d'importantes fractures, des tumeurs ou des blessures. La prostaglandine E_2, PGE_2, est un agent anabolique qui, au cours de différentes études sur des modèles expérimentaux *in vivo*, a démontré qu'il stimule la formation osseuse. Cependant, elle n'a pas

encore été cliniquement utilisée pour la réparation de déficits osseux en raison de sa faible efficacité lorsqu'elle est administrée en injection unique *in vivo*.

Plusieurs problèmes sont posés par la PGE_2 lors de sont utilisation :

- il y' a apparition d'effets secondaires importants au cours des expérimentations animales. En effet, quand les animaux ont été traités avec trois injections par jour de PGE2 pendant 4 semaines pour obtenir des effets anaboliques sur l'os, on a observé des cas diarrhées et perte de poids corporel associées aux modifications osseuses.
- elle est labile en raison de son inactivation immédiate après une circulation dans les poumons.
- Elle a une courte demi-vie ce qui résulte en des administrations quotidiennes multiples.

Les résultats de cette étude ont montré que les nanogels de PGE_2 libéraient de manière efficace l'agent anabolique permettant ainsi d'augmenter la charge osseuse au niveau de sites ciblés sans qu'il n'y ait apparition d'effets secondaires systémiques sur les animaux. L'utilisation de ces nanogels a permis d'observer des résultats efficaces avec une faible concentration en PGE_2 (0,6 µg) ainsi qu'une seule injection par mois. Les nanogels de PGE_2 résolvent donc le problème des injections multiples et cela grâce aux réseaux polymériques des nanogels qui emprisonnent de façon efficace la molécule. Cela indique donc l'efficacité de ce système qui, par ailleurs, empêche l'inactivation des PGE_2 dans le poumon une fois que ces derniers ont atteint la circulation générale.

Pour récapituler, on peut souligner les avantages qu'a pu démontrer cette étude : on évite de multiples injections quotidiennes contournant ainsi les possibilités d'infection et, si l'on considère cette prostaglandine pour des applications thérapeutiques ultérieures, cela contribue donc à une certaine rentabilité en termes de coûts.

5. Les vaccins

La voie orale est de loin la plus attrayante pour l'administration de vaccins. Elle est facile d'utilisation, ne nécessite pas un personnel qualifié, améliore l'efficacité du vaccin en stimulant les muqueuses qui sont les sites d'entrée primaires des pathogènes.

Le système immun de la muqueuse intestinale est constitué de tissus lymphoïdes dispersés et de tissus lymphoïdes organisés (dômes de Peyer). La réponse immune à un antigène débute

par sa capture par les cellules M des dômes de Peyer et à son transfert à des cellules présentatrices de l'antigène comme les cellules dendritiques, les macrophages et les cellules B. La phase suivante passe par l'activation des cellules $CD4^+$ qui produisent les cytokines interleukine-4 et interleukine-5 qui permettent la différenciation des cellules B IgA^+ en cellules B sécrétrices d'IgA.

Comme les vaccins sont le plus souvent de nature polypeptidique et polysaccharidique, ils sont incorporés dans des particules synthétiques pour éviter leur dégradation avant leur absorption intestinale. L'association de l'antigène à une particule polymérique de taille nanométrique, offre cette protection et ralentit le transit gastrique de l'antigène ce qui facilite sa capture par les dômes de Peyer. Des NP de faible diamètre peuvent être utilisées pour protéger l'antigène jusqu'à sa libération au niveau des dômes de Peyer. Un des polymères les plus utilisés pour la préparation de vaccins encapsulés est le poly (lactide-co-glycolide) (PLG) qui est biodégradable et biocompatible [52].

La vaccination nasale présente également beaucoup d'attraits ; en effet, la muqueuse nasale est une composante importante du système immunitaire mucosal car elle est le point d'entrée pour les particules inhalées. L'immunisation par voie nasale s'est donc imposée comme étant la voie la plus efficace pour l'immunité mucosale et périphérique. Parmi les avantages reliés à la vaccination par voie nasale, on peut citer [52] :

- facilité d'accès,
- riche vascularisation pour l'absorption systémique,
- présence de microvillosités qui augmente la surface d'absorption,
- induction d'une réponse immune et systémique,
- vaccination rapide de larges groupes,
- ne nécessite pas l'emploi de seringues et d'aiguilles qui sont sources d'infections potentielles et d'inconfort.

Ainsi chez l'homme, la cible d'un vaccin administré par voie nasale est le NALT (Nasal Associated Lymphoid Tissue) qui est situé principalement dans le pharynx. Actuellement, le PLGA est le polymère le plus utilisé pour la fabrication de vaccins nanoencapsulés car il empêche la dégradation précoce de l'antigène et permet son ciblage vers les tissus lymphoïdes des muqueuses. Par exemple, l'administration d'antigènes *Bordetella pertussis* encapsulés dans des microparticules de PLGA induit chez la souris une immunité contre le pathogène [52].

Plusieurs industries pharmaceutiques se penchent sur ces alternatives en termes de « vaccinothérapie ».

Lipoxen Plc est une société biopharmaceutique qui est spécialisée dans la recherche et le développement pouvant conduire à l'amélioration de plusieurs formes galéniques, notamment celles permettant l'administration de vaccins, en utilisant des technologies brevetées qui leur sont propres.

Cette industrie travaille actuellement sur les différentes voies d'administration des vaccins citées ci-dessus à l'aide de NP. Plusieurs de ces études ont montré des résultats très encourageants et sont aujourd'hui au stade d'études précliniques [69, 70].

VII. CONCLUSION

Un long parcours a été mené depuis l'émergence des formes galéniques conventionnelles. Aujourd'hui, l'avènement des hydrogels et des nanogels semble être la réponse aux nombreux inconvénients qui existent avec les formes conventionnelles actuellement disponibles et semble s'appliquer à plusieurs domaines thérapeutiques.

Les chercheurs s'intéressent de plus près à la formulation de nanogels souvent obtenus à partir d'hydrogels.
En effet, de telles formes sont issues d'un domaine émergent, la nanotechnologie. Dans le domaine biologique, tout se passe à l'échelle nanométrique et les systèmes vivants mettent en œuvre des fonctions dont les détails nous échappent souvent, mais que l'on souhaiterait réaliser. Le vivant est donc à la fois un domaine d'application immense des nanotechnologies puisqu'elles travaillent à la bonne dimension pour s'insérer dans les systèmes, mais aussi une grande source d'inspiration pour les chercheurs [38].

On peut donc ainsi penser que l'usage des hydrogels et des nanogels nous mènera vers une thérapie ciblée et individualisée car ils nous permettraient d'acquérir une meilleure connaissance du génôme ainsi que des dysfonctionnements génomiques (exemple : la cellule cancéreuse). Ils pourraient également conduire à une découverte des réseaux génétiques qui représentent « l'usine nanométrique » des cellules ; plusieurs études sont actuellement en cours pour le traitement de cellules cancéreuses afin d'agir sur le(s) gène(s) déviant(s) à l'origine de l'apparition du dysfonctionnement cellulaire.

Aujourd'hui les galénistes cherchent à atteindre le noyau des cellules pour aller modifier un gène mais un enjeu technologique se pose et fait l'objet de plusieurs travaux à l'heure actuelle : comment réussir à obtenir des nanogels efficaces pour l'administration par voies orale (qui est la voie privilégiée), nasale ou pulmonaire d'oligopeptides ou de molécules peptiques ?

Cependant, il faut souligner qu'il existe aujourd'hui un vide légal concernant toutes ces études sur les nanogels, ce qui pourrait poser un problème de sécurité. En effet, on ne connait pas encore la toxicité de plusieurs polymères synthétiques dans le corps humain à long terme.

L’Union Européenne a de ce fait mis en place des groupes de réflexion sur l’éthique de l’utilisation des nanotechnologies, sujet qui fait partie des objectifs thématiques majeurs lors de la phase d’élaboration du 6ème programme cadre de recherche et de développement (PCRD) [38].

VIII. BIBLIOGRAPHIE

1. BESSON M. (2008) Principes de pharmacocinétique appliqués à la clinique. Service de pharmacologie et toxicologie cliniques des hôpitaux universitaires de Genève.

2. LABAUNE J.-P. (1991) Propriétés pharmacocinétiques des médicaments. Masson, Paris, **1ère édition**, 1-454.

3. LABAUNE J.-P. (1989) Pharmacocinétique, principes fondamentaux. Masson, Paris, **4ème édition**, 34 - 436.

4. REYMANN J.-M., BENTUÉ-FERRER D. (1996) Éléments de pharmacocinétique quantitative – Adaptations de posologie, Laboratoire de pharmacologie (Pr ALLAIN), Faculté de médecine, Rennes.

5. SINGLAS E., TABURET A.M. (1987) Abrégé de pharmacocinétique. Laboratoire Hoechst, Paris.

6. http://www.hcuge.ch/Pharmacie/infomedic/cappinfo.htm,CAPP-INFO-N°36, septembre 2005.

7. LE HIR A. (2001) Abrégé de pharmacie galénique : Bonnes pratiques de fabrication des médicaments. Masson, Paris, **8e édition**, 237 - 334.

8. Pharmacopée Européenne (2008) **6ème édition**, Édition du Conseil de l'Europe, Strasbourg.

9. Vidal (2008), Vidal, Paris, **84ème édition**.

10. WEHRLÉ P. (2007) Pharmacie galénique : Formulation et technologie pharmaceutique. Maloine, Paris, **1ère édition**. Chapitres IV et VII.

11. http://www.magen-spezial.de

12. http://www.pharmainfo.net/reviews/osmotic-controlled-drug-delivery-system.

13. http://www.freepatentsonline.com

14. http://www.kompendium.ch/FrmMainMonographie.aspx
Information professionnelle du Compendium suisse des médicaments

15. WILLIAMS J., LANSDOWN R., SWEITZER R., ROMANOWSKI M., LABELL R., RAMASWAMI R., UNGER E. (2003) Nanoparticle drug delivery system for intravenous delivery of topoisomerase inhibitors. *J. Control. Release* **91**, 167 – 172.

16. LEROUX J.-C., ALLEMANN E., DA JAEGHERE F., DOELKER E., GURNY R. (1996) Biodegradable nanoparticles – From sustained release formulations to improved site specific drug delivery. *J. Control. Release* **39**, 339 – 350.

17. PEPPAS N.A., WRIGHT S.L. (2000) Hydrogels in pharmaceutical formulations, *Eur. J. Pharm. Biopharm* **50**, 27 – 46.

18. KLOTAREK P. (1983) Gels et gélifiants : les hydrocolloïdes végétaux, Thèse de Doctorat en Pharmacie, Université de Nantes.

19. PAGE V. (2001) Diffusion de matière dans les gels : application aux systèmes à libération contrôlée, Thèse de Doctorat en Pharmacie, Université de Nancy.

20. KASHYAP N., KUMAR N., RAVI KUMAR M.N.V. (2005) Hydrogels for pharmaceutical and biomedical applications, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* **22 (2)**, 107 – 149.

21. PEPPAS N.A. (2006) Vecteurs de médicaments innovants et "intelligents": leurs applications pharmaceutiques, *Ann. Pharm. Fr.* **64**, 260 – 275.

22. QIU L. Y., BAE Y. H. (2006) Polymer Architecture and Drug Delivery, *Pharm. Res.* **23 (1)**, 1 – 30.

23. LAUFFER M.A. (1961) Theory of diffusion in gels, *Biophys. J.* **1**, 205 – 213.

24. DESÉVAUX C. (2002) Développement d'un implant solide biodégradable à base d'amidon réticulé à teneur élevée en amylose, pour la libération contrôlée d'un principe actif, Thèse de Doctorat en Pharmacie, Montréal.

25. CONRATH G., COUARRAZE G., FALSON F., LECLERC B., BESNARD M., DEVISSAGUET J.P., PUISIEUX F. (1992) Détermination d'une valeur intrinsèque

du coefficient de diffusion d'un principe actif dans une matrice polymérique en vue de la formulation d'un système à libération contrôlée, *Ann. Pharm. Fr.* **50 (2)**, 79-91.

26. AM ENDE M.T., PEPPAS N.A. (1997) Transport of ionizable drugs and proteins in crosslinked poly (acrylic acid) and poly (acrylic acid co-2-hydroxyethylmethacrylate) hydrogel.II. Diffusion and release studies. *J. Control. Release* **48**, 47 – 56.

27. PEPPAS N.A., WRIGHT S.L. (1996) Solute diffusion in Poly(vinylalcohol)/ Poly(acrylic acid) Interpenetrating Networks, *Macromolecules* **29**, 8798 – 8804.

28. PEPPAS N.A., WRIGHT S.L. (1998) Drug diffusion and binding in ionizable Interpenetrating Networks from poly (vinylalcohol) and Poly (acrylic acid), *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **46**, 15 – 29.

29. MOLDOVAN M., LEUCUTA S.E., BAKRI A. (2006) Preparation, *in vitro* release and skin absorption of hydrocortisone acetate from a liposome gel, *J. Drug. Del. Sci. Tech.* **16 (2)**, 127 – 132.

30. KHALIL E., SCHAEFER U.F., SALLAM A. (2006) Release characteristics of diclofenac diethylamine from emulgels containing Pluronic F127, *J. Drug Del. Sci. Tech.* **16 (5)**, 381 – 387.

31. HARTMANN M., HANH B. D., PODHAISKY H., WENSCH J., BODZENTA J., WARTEWIG S., NEUBERT R. H. H. (2004) A new FTIR – ATR cell for drug diffusion studies, *Analyst* **129**, 902 – 905.

32. SAHINER N. (2007) Macromolecular Nanotechnology - Hydrogel nanonetworks with functional core – shell structure, *Eur. Poly. J.* **43**, 1709 – 1717.

33. SOPPIMATH K., AMINABHAVI T., KULKARNI A., RUDZINSKI W. (2001) Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices, *J. Control. Release* **70**, 1 – 20.

34. CHAWLA J. S., AMIJI M. M. (2002) Biodegradable poly (ε – caprolactone) nanoparticles for tumor targeted delivery of tamoxifen, *Intl. J. Pharmaceutics* **249**, 127 – 138.

35. PANYAM J., LABHASETWAR V. (2003) Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **55**, 329 – 347.

36. WEN X., SHI D., ZHANG N. (2005) Applications of Nanotechnology in Tissue Engineering *in Handbook of Nanostrutured Biomaterials and Their Applications in Nanobiotechnology*, Edited by Nalwa H. S, **Volume 1 (Chapter U)**, 1 – 23.

37. NAYAK S., LYON L. A. (2005) Nanotechnology – Soft nanotechnology with Soft Nanoparticles, *Angew. Chem. Int. Ed*. **44**, 7686 – 7708.

38. VINOGRADOV S. V., BRONICH T. K., KABANOV A. V. (2002) Nanosized cationic hydrogels for drug delivery: preparation, properties and interactions with cells, *Adv. Drug deliv. Rev.* **54**, 135 – 147.

39. KWON OH J., DRUMRIGHT R., SIEGWART D. J., MATYJASZEWSKI K. (2008) The development of microgels/ nanogels for drug delivery applications, *Prog. Polym. Sci.* **33**, 448 – 477.

40. SINHA R., KIM G. J., NIE S., SHIN D. M. (2006) Nanotechnology in cancer therapeutics: bioconjugated nanoparticles for drug delivery, *Mol. Cancer Ther.* **5 (8)**, 1909 – 1917.

41. VINOGRADOV S., BATRAKOVA E., KABANOV A. (1999) Poly (ethylene glycol) – polyethyleneimine NanoGel^{TM} particles: novel drug delivery systems for antisense oligonucleotides, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **16**, 291 – 04.

42. BORDÉ C., BOST P. – E., CANDEL S., CAUSSE J. – P., CORRIU R., COURTOIS M., KOVALEVSKY J., LENFANT J., LÉVI F., MAITENAZ B., POUCHARD M., SPITZ E., TOURNOIS P., WEISBUCH C. (2002) Les Nanotechnologies : enjeux et conditions de réussite d'un projet national de recherche. Rapport du groupe de travail « Nanotechnologies » de l'Académie des technologies, Académie des technologies, 28 rue Saint Dominique, Paris 7ème.
http : //www. academie – technologies. fr

43. LA VAN D. A., McGUIRE T., LANGER R. (2003) Small – scale systems for *in vivo* drug delivery, *Nature Biotechnology* **21 (10),** 1184 – 1191.

44. PEPPAS N. – A. (2004) Preface – Intelligent therapeutics: biomimetic systems and nanotechnology in drug delivery, *Adv. Drug deliv. Rev.* **56**, 1529 – 1531.

45. OISHI M., NAGASAKI Y. (2007) Synthesis, charaterization, and biomedical applications of core – shell – type stimuli – responsive nanogels – Nanogel composed of poly[2 – (N, N – diethylamino)ethyl methacrylate] core and PEG tethered chains, *Reactive & Functional Polymers* **67**, 1311 – 1329.

46. SAHINER N., GODBEY W. T., McPHERSON G. L., JOHN V. T., Microgel, nanogel and hydrogel – hydrogel semi – IPN composites for biomedical applications : synthesis and characterization, *Colloid. Polym. Sci.* **284**, 1121 – 1129.

47. SAHINER N. (2007) Colloidal nanocomposite hydrogel particles, *Colloid. Polym. Sci.* **285**, 413 – 321.

48. VINOGRADOV S. V., ZEMAN A., D, BATRAKOVA V., KABANOV. (2005) Polyplex Nanogel formulations for drug delivery of cytotoxic nucleoside analogs, *J. Control. Release* **107**, 143 – 157.

49. CHIDAMBARAM N., BURGESS D. J. (1999) A novel *in vitro* release method for submicronsized dispersed systems, *AAPS Pharm. Sci*. **1 (3)**, article 11.

50. http://www.labecx.com/t-Diffusion_Cells.aspx

51. http://www.wikipedia.com

52. JACQUES JEAN – FRANÇOIS (2004) Synthèse et Évaluation *in vivo* de microparticules d'hydrogel, Thèse de Doctorat en Biochimie, Université du Québec à Montréal.

53. LANGER R. (1998) Drug delivery and targeting, Nature **392**, 5 – 10.

54. LANE E. M., HADGRAFT J. (2006) Scientifically Speaking – Drug Release from Stimuli – Sensitive Polymers, *J. Control. Release (Controlled Release Society, Newsletter)* **23 (2)**, 5 – 6.

55. SIEGEL R. A., FALAMARZIAN M., FIRESTONE B. A., MOXLEY B. C. (1988) pH – controlled release from hydrophobic/polyelectrolyte copolymer hydrogels. *J. Control. Release* **8**, 179 – 182.

56. PEPPAS N. A., BYRNE M. E. (2003) New biomaterials for intelligent biosensing, recognitive drug delivery and therapeutics, *Bull. Gattefossé* **96**, 23 – 25.

57. ANDRIEUX K., DESMAËLE D., D'ANGÉLO J., COUVREUR P. (2003) Nanotechnologies et nouveaux médicaments, *L'actualité chimique* **269**, 135 – 139.

58. AKIYOSHI K., KOBAYASHI S., SHICHIBE S., MIX D., BAUDYS M., WAN KIM S., SUNAMOTO J. (1998) Self-assembled hydrogel nanoparticle of cholesterol-bearing pullulan as a carrier of protein drugs: Complexation and stabilization of insulin, *J. Control. Release* **54**, 313 – 320.

59. www.wipo.int (WO/1997/033562) Ophtalmological composition of the type which undergoes liquid-gel phase transition.

60. www.ocusert.com

61. BAKER J. R., QUINTANA A., PIEHLER L., BANAZAK – HOLL M., TOMALIA D., RACZKA E. (2001) The Synthesis and Testing of Anti – Cancer Therapeutic Nanodevices, *Biomedical Microdevices* **3 (1)**, 61 – 69.

62. BRANNON – PEPPAS L., BLANCHETTE J. O. (2004) Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy, *Adv. Drug deliv. Rev.* **56**, 1649 – 1659.

63. GUENCA A. G., JIANG H., HOCHWALD S. N., DELANO M., CANCE W. G., GROBMYER S. R. (2006) Emerging Implications of Nanotechnology on Cancer Diagnostics and Therapeutics, *Cancer* **107** (3), 459 – 466.

64. VINOGRADOV S. V., KOHLI E., ZEMAN A. D. (2006) Comparison of Nanogel Drug Carriers and their Formulations with Nucleoside 5' – Triphosphates, *Pharm. Res.* **23 (5)**, 920 – 930.

65. PILLAI O., PANCHAGNULA R. (2001) Polymers in drug delivery, *Current Opinion in Chemical Biology* **5**, 447 – 451.

66. DE LAS HERAS ALARĆON C., PENNADAM S., ALEXANDER C. (2005) Stimuli responsive polymers for biomedical applications, *Chem. Soc. Rev.* **34**, 276 – 285.

67. MURTHY P. S. K., MOHAN MURALI Y., VARAPRASAD K., SREEDHAR B., RAJU MOHANA K. (2008) First successful design of semi – IPN hydrogel – silver nanocomposites : A facile approach for antibacterial application, *Journal of Colloid and Interface Science* **318**, 217 – 224.

68. KATO N., HASEGAWA U., MORIMOTO N., SAITA Y., NAKASHIMA K., EZURA Y., KUROSAWA H., AKIYOSHI K., EZURA Y., KUROSAWA H., AKIYOSHI K., NODA M. (2007) Nanogel – Based Delivery System Enhances PGE_2 Effects on Bone Formation, *J. Cell. Biochem.* **101**, 1063 – 1070.

69. GREGORIADIS G. (2006) Lipoxen plc – The Drug and Vaccine delivery Company, *J. Control. Release (Controlled Release Society, Newsletter)* **23 (2)**, 9 – 10.

70. http://www.lipoxen.com

UNIVERSITÉ DE NANTES **Année de la soutenance**
FACULTÉ DE PHARMACIE **2008**

Nom – Prénoms : MENDOUME – NZE Jeanne Stella

Titre de la thèse : Les hydrogels et les nanogels : des formes galéniques innovantes pour une libération ciblée des principes actifs.

Résumé de la thèse :

La délivrance spécifique des molécules thérapeutiques vers un organe, un tissu ou une cellule malade constitue aujourd'hui un défi majeur pour le traitement des maladies humaines, notamment infectieuses, cancéreuses ou d'origine génétique.

Des chercheurs se sont donc attelés à élaborer de nouvelles formes galéniques, les hydrogels et les nanogels, afin d'améliorer la biodisponibilité des médicaments ainsi que la vectorisation des principes actifs au niveau des sites d'action.

Cette thèse va présenter ces nouvelles structures galéniques ainsi que les méthodes de diffusion des principes actifs au sein de réseaux polymériques composant les hydrogels ou les nanogels ; ces formes galéniques ont des propriétés qui vont entièrement dépendre de leurs méthodes de fabrication ainsi que des polymères qui les composent.

Les hydrogels et les nanogels connaissent actuellement une grande phase de développement notamment pour deux propriétés qui les définissent : la vectorisation thérapeutique des principes actifs au niveau de sites cibles et la libération contrôlée des principes actifs. Ces recherches ciblent plus particulièrement certaines maladies (cancer, diabète, maladies infectieuses…), des traitements préventifs (vaccins) ou le génie tissulaire.

MOTS CLÉS : HYDROGEL, NANOGEL, VECTORISATION DES PRINCIPES ACTIFS LIBÉRATION CONTRÔLÉE, FORMES GALÉNIQUES, POLYMÈRES

JURY

PRÉSIDENT : M. Christian MERLE, Professeur

ASSESSEURS : Mme Aurélie BILLON – CHABAUD, Maître de Conférences

M. Pierre WEISS, Professeur

Adresse de l'auteur :

87 Boulevard Saint – Aignan 44100 NANTES