

Chapitre II: Technologie de la délivrance ciblée

II.1. NANOSCIENCE ET NANOTECHNOLOGIE

II.1.1. Généralités

La nanotechnologie et la nanoscience sont largement considérées comme ayant un grand potentiel pour apporter des avantages à de nombreux domaines de recherche et d'applications. La «**nanoscience**» a été définie de diverses manières dans différents forums, livres, revues et sur le Web, mais une chose est commune; il implique l'étude du phénomène, des propriétés et du comportement de la matière à l'échelle atomique et moléculaire. Alors que la «**nanotechnologie**» est l'étude, la conception, la caractérisation, la production et les applications de matériaux et de systèmes à l'échelle nanométrique. Le préfixe «**nano**» est dérivé du mot grec nain. Un nanomètre (nm) est égal à un milliardième de mètre, soit 10^{-9} m. Cette gamme de tailles présente autant d'intérêt, que dans cette gamme, le matériau peut avoir des propriétés différentes et améliorées par rapport au même matériau à une taille plus grande.

II.1.2. Nanotechnologie pharmaceutique

L'application de la nanotechnologie dans le domaine des soins de santé a fait l'objet d'une grande attention ces derniers temps. Il existe aujourd'hui de nombreux traitements qui prennent beaucoup de temps et qui sont également très coûteux. En utilisant la nanotechnologie, des traitements plus rapides et beaucoup moins chers peuvent être développés. La nanotechnologie pharmaceutique couvre un large aspect de la nanoscience et de la pharmacie, y compris les systèmes d'administration de médicaments. Normalement, les médicaments agissent dans tout le corps avant d'atteindre la zone touchée par la maladie. En utilisant la nanotechnologie, le médicament peut être ciblé sur un emplacement précis, ce qui le rendrait beaucoup plus efficace et réduirait les risques d'effets secondaires possibles.

II.1.3. Système de délivrance de médicaments

Le système de délivrance de médicaments (SDM) est défini par l'institut national de la santé des États-Unis comme suit: «Formulation d'un dispositif qui permet l'introduction de substances thérapeutiques dans le corps et améliore l'efficacité et la sécurité en contrôlant le taux, l'heure et le lieu de libération du médicament dans le corps».

Les systèmes de distribution de médicaments habituels ne sont pas au niveau satisfaisant. Il y avait de nombreux inconvénients, notamment une mauvaise biodisponibilité, générer des effets secondaires, une faible capacité de charge du médicament, une faible capacité à contrôler la gamme de tailles, la fluctuation plasmatique des niveaux de médicament, une faible efficacité thérapeutique, une faible stabilité in vivo, une faible solubilité, aucun contrôle sur le temps, le manque de distribution cible sur le site d'action. Si la concentration est au-dessus du niveau seuil, elle devient toxique, si elle manque peu d'effet thérapeutique. Ces inconvénients poussent les scientifiques à enquêter davantage sur le nouveau SDM et à contrôler et à déterminer le taux et le lieu de libération du médicament.

Le nouveau système d'administration de médicament possède deux éléments: la capacité de cibler et de contrôler la libération de médicament. Le ciblage garantira une efficacité élevée du médicament et réduira les effets secondaires, en particulier lorsqu'ils traitent avec des médicaments qui sont supposés tuer les cellules cancéreuses, mais peuvent aussi tuer les cellules saines lors de la livraison à eux. La réduction ou la prévention des effets secondaires peut également être obtenue par une libération contrôlée.

II.1.4. Systèmes nanoparticulaires d'administration de médicaments

Les systèmes d'administration de médicaments à base de nanoparticules sont des supports nanométriques utilisés pour administrer des médicaments ou des biomolécules. En général, les nanoparticules sont des particules colloïdales solides, dont la taille varie de 1 à 1000 nm, dans lesquelles les médicaments thérapeutiques peuvent être adsorbés, piégés ou fixés de manière covalente. Les nanoparticules peuvent piéger des médicaments ou des biomolécules dans leurs structures intérieures et / ou absorber des médicaments ou des biomolécules sur leurs surfaces extérieures. Actuellement, les nanoparticules ont été largement utilisées pour délivrer des médicaments, des polypeptides, des protéines, des vaccins, des acides nucléiques, des gènes, etc. Les supports nanométriques ont diverses morphologies, notamment: amorphes, cristallins, sphériques, aiguilles, etc. Les systèmes nanoparticulaires d'administration de médicaments peut offrir de nombreux avantages par rapport aux formes posologiques conventionnelles, dont certains comprennent: (1) ils peuvent passer à travers les plus petits vaisseaux capillaires en raison de leur volume ultra-minuscule et évitent une clairance rapide par les phagocytes de sorte que la durée de la circulation du médicament dans la circulation sanguine est considérablement prolongée avec une stabilité élevée du médicament et peut voyager sans sédimentation ni blocage; (2) Leur surface peut facilement être manipulée et fournir une action spécifique, par conséquent, ils sont utilisés dans le ciblage de médicaments sur un site spécifique du corps, dans lequel ils peuvent pénétrer dans les

cellules et les espaces tissulaires pour arriver aux organes cibles tels que le foie, la rate, les poumons, la colonne vertébrale cordon et lymphes; (3) ils pourraient présenter des propriétés de libération contrôlée de médicaments sur le site particulier en raison de la biodégradabilité, du pH, de la sensibilité aux ions et / ou à la température des matériaux; (4) Le ciblage et la libération contrôlée garantiront une efficacité élevée du médicament et réduiront les effets secondaires, en particulier lorsqu'il s'agit de médicaments qui sont présumés tuer les cellules cancéreuses, mais peuvent également tuer les cellules saines lorsqu'ils sont administrés; (5) ils peuvent améliorer l'utilité des médicaments et réduire les effets secondaires toxiques; (6) Les deux médicaments hydrophiles et hydrophobes peuvent incorporer avec le transporteur, de sorte qu'il peut améliorer la solubilité aqueuse des médicaments peu solubles.

Actuellement, les recherches sur le système d'administration de médicaments à base de nanoparticules se concentrent sur: (1) la sélection et la combinaison de matériaux de support pour obtenir une vitesse de libération de médicament appropriée; (2) la modification de surface des nanoparticules pour améliorer leur capacité de ciblage; (3) l'optimisation de la préparation des nanoparticules pour augmenter leur capacité de délivrance de médicaments, leur application dans les cliniques et la possibilité de production industrielle; (4) l'investigation du processus dynamique in vivo pour révéler l'interaction des nanoparticules avec le sang et cibler les tissus et organes, etc.

II.2. LES MICROSPHERES

II.2.1. Généralités

Historiquement la recherche sur les microsphères a débuté dans les années du 20^{ème} siècle précédant dans le domaine biomédical. Les premiers scientifiques à se pencher sur le problème n'ont pas découvert le concept mais l'ont seulement emprunté à la nature qui produit des microsphères depuis des millions d'années. A partir de 1946, lorsqu'a débuté la recherche sur la synthèse de polymères synthétiques, la préparation de particules par polymérisation en émulsion et suspension a été systématiquement étudiée. Les années 60 ont vu émerger les premières études de préparation de microsphères à base de polymère naturel ou extrait de substances naturelles, comme les microsphères de gel d'agarose.

Les microsphères peuvent être appelées billes ou microbilles. Les microsphères sont souvent décrites comme étant des objets sphériques uniformes du cœur à la surface de taille comprise entre 20 nm et 2000 µm, composées de un ou plusieurs matériaux polymériques. Les microcapsules sont sensiblement similaires aux microsphères, mais elles sont constituées d'une substance cœur comprenant le composé actif et d'une matrice polymère formant une capsule ou paroi (barrière

protectrice ou excipient). Les microsphères sont préparées soit à partir de molécules inorganiques et/ou organiques se présentant sous forme de monomères, soit à partir de polymères d'origine naturelle, semi synthétique ou synthétique. Elles sont fabriquées par une large variété de techniques de polymérisation. Ces nombreuses méthodes donnent naissance à des microsphères de taille, forme, texture (porosité et surface spécifique), structure (réseau, rigidité), différentes.

II.2.2. Formation des microsphères

La préparation de microsphères polymériques est usuellement décrite en termes de procédé de formation (polymérisation par : suspension, émulsion, dispersion, précipitation) ou par les matériaux précurseurs (monomères ou polymères).

II.2.2.1. La polymérisation en suspension

Dans la polymérisation en suspension, l'amorceur est soluble dans le monomère et ils sont tous les deux insolubles dans le milieu de polymérisation. Le monomère, au moyen d'un agitateur et d'un agent de suspension (stabilisateur) approprié est suspendu dans le milieu sous forme de petites gouttelettes (microgouttes). L'agent stabilisateur forme une couche ou film protecteur autour des gouttes. Mais celui-ci ne peut pas être assimilé à un agent émulsifiant (tensio-actif) qui a un rôle différent dans la polymérisation en émulsion. Souvent la polymérisation est activée par un effet thermique (20-100°C), et ainsi laissée à une température constante jusqu'à un accomplissement total de la polymérisation. Dans ces conditions, les microgouttes de monomère sont converties directement en microsphères polymériques de taille sensiblement identique.

Les difficultés principales de cette technique de préparation de microparticules résident dans le choix de l'agent stabilisateur, du mode d'agitation, de la forme du réacteur et de toutes les opérations qui gouvernent la stabilité de la suspension. En pratique, tous ces paramètres restent difficiles à contrôler.

II.2.2.2. Polymérisation en émulsion

Dans la plupart des cas le monomère est insoluble dans le milieu de la polymérisation, il est donc émulsionné à l'aide d'un tensioactif. Ainsi le monomère se présente sous forme de gouttes (1-10 μm) avec un recouvrement micellaire (0,05-0,1 μm) dépendant de la nature du tensioactif et de sa concentration. L'amorceur est introduit dans le milieu mais n'est pas présent dans les gouttes de monomère. Donc, l'état initial du mélange de polymérisation en émulsion est très différent de celui de la polymérisation en suspension ce qui implique un mécanisme de formation des particules complètement différent.

II.2.2.3. Polymérisations en précipitation et dispersion

Dans la précipitation polymérisation, le mélange de la réaction est initialement homogène. Cependant le milieu de polymérisation utilisé dissout le monomère et précipite le polymère. Donc, les molécules de polymères initiales vont collapser et coaguler dans le milieu en formant des particules « nucléons ». Ces « nucléons » (particules primaires) flocculent graduellement pour mener à la formation de particules précipitées d'où le terme polymérisation en précipitation. De cette nucléation continue, résultent des précipités dont la forme est irrégulière et de taille polydispense.

Dans la dispersion polymérisation, l'état initial du mélange de polymérisation est le même que pour la polymérisation précipitation, mais dans ce cas le milieu de polymérisation est un mauvais solvant (pas un précipitant) pour le polymère formé. Ainsi les chaînes polymériques s'accroissent, avant de précipiter dans le milieu. La nucléation et la formation des particules primaires sont pratiquement identiques à la polymérisation précipitation, la seule différence réside dans le fait que les particules primaires sont solubles dans le milieu de polymérisation. Donc, ces conditions de polymérisation mènent à la formation de particules monodisperses de taille comprise entre 0,1 et 10 μm .

II.3. LES NANOSPHERES

II.3.1. Généralités

Les nanosphères sont des particules sphériques qui ont une taille comprise entre 10 et 200 nm de diamètre et qui présentent un taux de clairance réduit et donc un temps de circulation prolongé par rapport aux sphères plus grandes. Les matrices utilisées dans les nanosphères sont des polymères ou lipides naturels et synthétiques qui doivent répondre à certaines exigences. Ils doivent être biodégradables et biocompatibles. Ils ne peuvent pas être toxiques ou cancérigènes, ne doivent pas induire de réponse immunitaire. En tant que matrices, on utilise principalement des polymères d'acide lactique (PAL), des polymères d'acide glycolique (PAG) ou des mélanges de ceux-ci (PLGA), ainsi que du poly (méthacrylate de méthyle) (PMAM).

Fondamentalement, le médicament est dissous, piégé, encapsulé ou attaché à la matrice. L'administration de médicaments via de tels systèmes est avantageuse car les nanosphères ont la capacité de protéger le médicament contre la dégradation enzymatique et chimique, elles peuvent également être ingérées ou injectées et elles peuvent être adaptées aux profils de libération souhaités et utilisés livraison spécifique au site de médicaments et dans certains cas peuvent même fournir une libération ciblée sur les organes. Ces systèmes selon la biodégradabilité, il peut être divisé en nanosphères biodégradables et nanosphères non biodégradables. Les nanosphères biodégradables

comprennent les nanosphères d'albumine, les nanosphères d'amidon modifiées, les nanosphères de gélatine, les nanosphères de polypropylène dextrane et les nanosphères d'acide polylactique, etc. Selon les rapports actuels de la littérature sur les nanosphères non biodégradables, l'acide polylactique est le seul polymère approuvé pour être utilisé par les humains et utilisé comme agent à libération contrôlée.

II.3.2. Administration des nanosphères

La dose de substance active est répartie entre plusieurs nanoparticules, permettant une libération ciblée au bon moment et au bon endroit. L'administration intraveineuse est une voie d'administration optimale. Les capillaires humains et animaux ont un diamètre de 7 à 15 μm , donc l'administration intraveineuse des nanosphères réduit le risque de blocage. Les nanoparticules peuvent également pénétrer la barrière hémato-encéphalique, permettant le traitement des tumeurs du cerveau. Récemment, des nanosphères en tant que porteurs potentiels de composés peptidiques pour le dosage oral sont étudiés. On a découvert qu'ils pénètrent profondément dans la muqueuse intestinale et protègent le médicament contre l'acide gastrique et les enzymes protéolytiques. Les nanosphères peuvent délivrer des médicaments directement dans l'organe ou le tissu. Des nanosphères peuvent également être injectées dans le corps vitré de l'œil.

II.3.3. Libération des médicaments de nanosphères

La vitesse de libération de la substance médicamenteuse dépend: des méthodes de préparation, du type de polymère, de la quantité de substance active dans le support, de la solubilité de la substance médicamenteuse et du polymère dans la phase aqueuse, de la vitesse de diffusion des fluides corporels dans la matrice, le taux d'hydrolyse des liaisons entre le polymère et l'agent actif, et le taux de diffusion du médicament.

II.3.4. Avantages du système nanosphérique d'administration des médicaments:

- Elles peuvent être facilement administrés par diverses voies, y compris orale, nasale, parentérale, etc.
- Les nanosphères peuvent facilement traverser les plus petits vaisseaux capillaires en raison de leur très petit volume.
- Ils peuvent éviter la clairance rapide par les phagocytes afin que la durée dans la circulation sanguine puisse être prolongée.
- Ciblage spécifique au site en attachant les ligands à la surface des sphères.
- Elles montrent la propriété de libération contrôlée.
- La réduction de la toxicité est également un avantage important des nanosphères.

II.4. LES LIPOSOMES

II.4.1. Généralités

Les liposomes ont d'abord été un outil d'étude précieux pour les biophysiciens dans la compréhension du comportement des composés amphiphiles en solution. Ils furent ensuite utilisés par les biologistes comme modèles pour l'étude de la perméabilité cellulaire avant d'être proposés, par la suite, comme vecteurs intracellulaires de substances médicamenteuses. Les applications des liposomes sont maintenant très variées dans des secteurs aussi différents que l'agro-alimentaire, cosmétique et la pharmacie.

La première méthode utilisée pour la préparation des liposomes est la méthode de Bangham. Elle consiste à évaporer une solution organique de phospholipides jusqu'à la formation d'un film phospholipidique sec sur les parois d'un récipient. La dispersion du film lipidique dans un milieu aqueux accompagnée d'une agitation régulière permet d'obtenir des liposomes. Mais c'est Mezei, qui le premier a suggéré que les liposomes pouvaient se relever utiles comme systèmes de transport médicamenteux pour le traitement des maladies cutanées.

II.4.2. Définition des liposomes

Les liposomes sont des systèmes d'encapsulation de structures sphériques fermées constituées d'un espace aqueux interne. Ils sont caractérisés par la courbure des bicouches lipidiques composées de phospholipides (**Figure.II.1**).

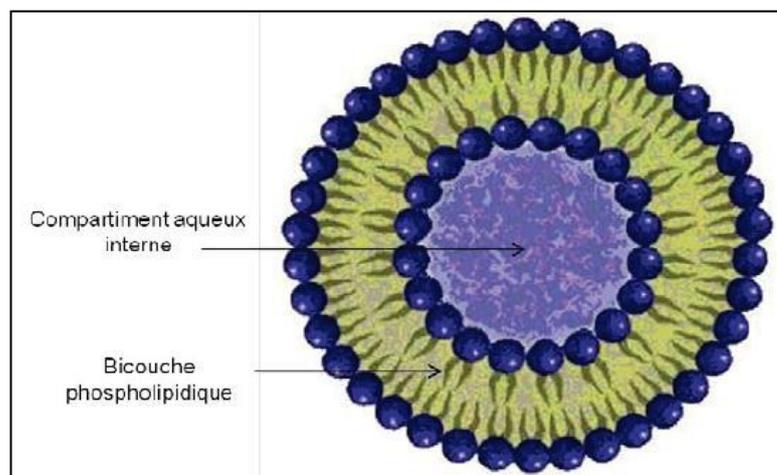


Figure.II.1. La structure d'un liposome.

La taille du liposome va dépendre de la technique utilisée pour le synthétiser, elle est environ 70 fois plus petite qu'un globule rouge, de l'ordre de quelques dizaines à quelques milliers de nanomètres de diamètre.

Les liposomes peuvent encapsuler et délivrer efficacement à la fois des substances hydrophiles (dans le noyau central aqueux), lipophiles (dans la membrane) et amphiphiles (à l'interface membrane/eau).

II.4.3. Composition des liposomes

Les liposomes peuvent être formés à partir de divers phospholipides avec ou sans cholestérol.

II.4.3.1. Les phospholipides

Les phospholipides (PLs) sont des molécules amphiphiles constituées d'une zone polaire ou chargée à forte affinité pour l'eau, et d'une zone apolaire hydrophobe constituée de chaînes aliphatiques (**Figure.II.2**).

Les phospholipides (PLs) sont formés d'un glycérol estérifié par deux acides gras (R1 et R2) et à un groupement phosphoryle. C'est ce groupement qui donne le nom aux différents PLs.

- ✓ phosphatidylcholine (PC).
- ✓ phosphatidyléthanolamine (PE).
- ✓ phosphatidylsérine (PS).
- ✓ phosphatidylinositol (PI).
- ✓ phosphatidylglycérol (PG).

Les liposomes sont constitués à partir de différents phospholipides avec ou sans certains additifs. Les phospholipides les plus utilisés peuvent être d'origine naturelle (phosphatidylcholine d'oeuf ou de soja) ou synthétique (par exemple la dimyristoylphosphatidylcholine, la dipalmitoylphosphatidylcholine)].

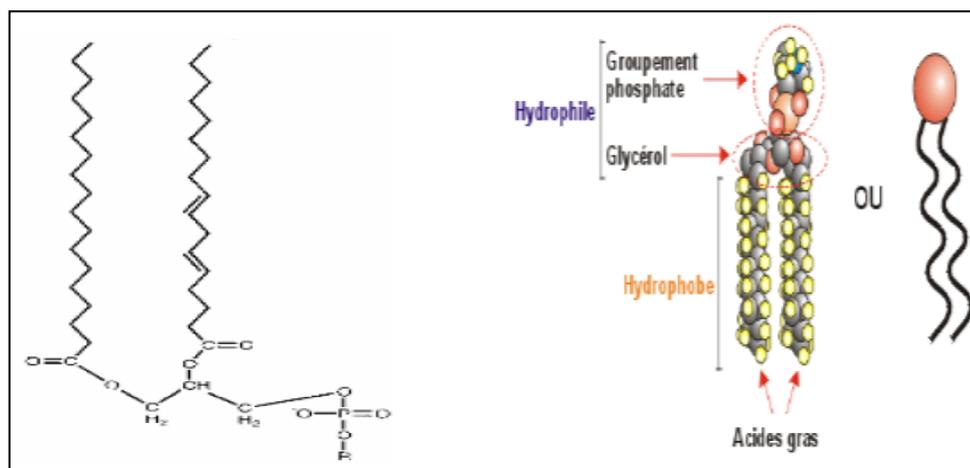


Figure.II.2. Structure chimique d'un phospholipide et représentation du caractère amphiphile.

II.4.3.2. Les stéroïdes

Le stérol le plus employé est le cholestérol (ajouté généralement à raison de 30% dans la composition lipidique). Il a une grande influence sur la fluidité de la paroi et sur la stabilité des liposomes dans le sang après leur administration.

II.4.3.2.1. Le cholestérol

Le cholestérol est une substance cireuse molle, trouvée parmi les lipides dans le sang et dans toutes les membranes cellulaires, concentrée essentiellement dans le cerveau et la moelle épinière (**Figure.II.3**). Il est le stérol majeur dans le corps humain et appartient à une classe de molécules appelées stéroïdes, il nécessaire pour la biosynthèse des membranes cellulaires, plusieurs hormones, la vitamine D et les acides biliaires nécessaires pour digérer les graisses présentes dans nos aliments.

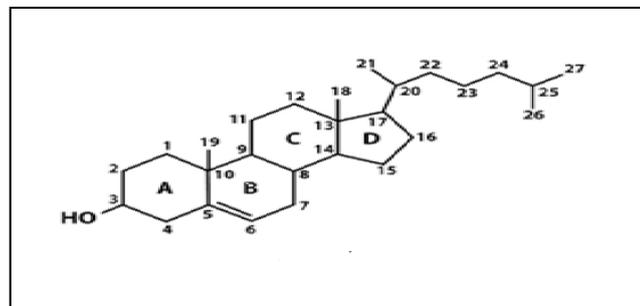


Figure.II.3. Structure de la molécule de cholestérol.

Le cholestérol peut être ajouté au niveau des bicouches lipidiques des liposomes pour améliorer leurs caractéristiques, notamment en augmentant la micro viscosité, en réduisant la perméabilité aux molécules hydrophiles, en stabilisant la membrane et en augmentant la rigidité des vésicules.

II.4.4. Classification des liposomes

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

II.4.4.1. Classification de liposomes selon leurs critères morphologique

Les différents liposomes se distinguent selon leur taille mais aussi selon leur nombre de bicouches lipidiques ou lamellarité (**Figure.II.4** et **Tableau.II.1**). Plusieurs abréviations sont utilisées pour les désigner d'après ces deux critères.

II.4.4.1.1. Les liposomes multilamellaires

Sont des liposomes comportant soit plusieurs bicouches concentriques (**O.L.V.** pour « oligo-lamellar vesicles » qui ont environ 5 bicouches, **M.L.V.** pour « multi lamellar vesicles » qui ont entre 5 et 20 bicouches), soit plusieurs bicouches non concentriques délimitant plusieurs compartiments aqueux (**M.V.V.** pour « multi vesicular vesicles »). Leur diamètre total, suivant le nombre de lamelles, est compris entre 400 à 3500 nm.

II.4.4.1.2. Les liposomes unilamellaires

Ne comportent qu'une seule paroi et une seule cavité aqueuse. Ils peuvent être de grande taille (**L.U.V.** ou « large unilamellar vesicles ») avec un diamètre moyen allant de 100 nm à 1 µm, ou de petite taille (**S.U.V.** pour « small unilamellar vesicles ») avec un diamètre moyen variant de 20 à 100 nm.

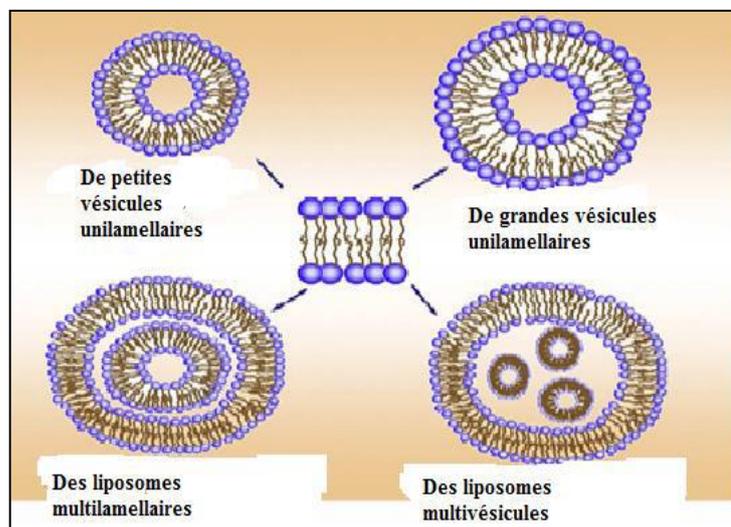


Figure.II.4. Classification des liposomes.

Tableau.II.1. Classification des liposomes selon.

Structure	SUV	LUV	MLV et OLV	MVV
Représentation				
Taille	20-100 nm	100-1000 nm	Taille très hétérogène	> 1 µm
Capacité	Contient peu de principe actif	Contient beaucoup de principe actif	Capacité intermédiaire à celle de SUV et LUV.	peu utilisés
% d'encapsulation	0,5-1	35-60	5-15	

II.4.4.2. Classification selon leur composition et leur application in vivo

II.4.4.2.1. Les liposomes conventionnels

Ils peuvent être définis comme les liposomes typiquement composés de phospholipides (neutres ou chargés négativement) et /ou cholestérol. La plupart des liposomes utilisés comme vecteurs de médicaments sont des liposomes conventionnels. Ils sont caractérisés par un temps de circulation sanguine relativement court. En effet, après administration in vivo, on observe une captation rapide de ces liposomes par les cellules phagocytaires (macrophages) du système réticuloendothélial. Ils s'accumulent alors dans le foie et la rate principalement. La capture naturelle des liposomes par les macrophages permet leur utilisation pour cibler et libérer des agents antimicrobiens vis-à-vis un certain nombre de microorganismes infectieux.

II.4.4.2.2. Les liposomes furtifs

L'élimination rapide des liposomes conventionnels de la circulation sanguine, par les macrophages du foie et de la rate, a sérieusement compromis leur application pour un grand nombre de traitements concernant l'affection d'autres tissus. A la fin des années 80, la découverte de liposomes dit furtifs a élargi les potentialités thérapeutiques des liposomes, grâce à l'amélioration de leurs temps de circulation dans l'organisme.

Le principe de ces liposomes est de réduire les interactions avec les protéines plasmatiques et d'échapper à la phagocytose par les cellules du système réticuloendothélial, en modifiant leur membrane.

II.4.4.2.3. Immunoliposomes

Ce sont des liposomes qui portent à leur surface des anticorps ou des fragments d'anticorps spécifiques d'une cible antigénique et pouvant contenir différents composés à activité biologique. Grâce à ce système de vectorisation et de protection des molécules encapsulées, il est possible de fixer spécifiquement ces liposomes à la surface des cellules cibles (tumoraux par exemple) afin d'y déverser leur contenu.

Plusieurs études ont été réalisées où les immunoliposomes sont également rendus furtifs afin de prolonger leur demi-vie dans l'organisme et de favoriser leur passage vers les tissus ciblés.

II.4.4.2.4. Les liposomes cationiques

Les liposomes cationiques sont utilisés dans une nouvelle technique de transfection cellulaire appelée lipofection. Du fait de leur nature lipidique et de leurs propriétés d'encapsulation de grosses molécules, les liposomes cationiques sont des candidats potentiels au transfert de gènes et font

l'objet, depuis une vingtaine d'années, d'études intensives comme véhicules d'ADN. Ces liposomes sont composés d'un lipide cationique synthétique, les liposomes cationique et l'ADN interagissent spontanément par interaction de charges pour former un complexe de grande taille (environ 500 nm) et chargé positivement.

II.4.5. Avantages et inconvénients des liposomes

II.4.5.1. Avantages

- ✓ Les liposomes sont biocompatibles, entièrement biodégradables, non toxiques et non immunogènes.
- ✓ Les liposomes sont adaptés pour la livraison du PA d'hydrophobe et hydrophile.
- ✓ Les liposomes protègent le PA encapsulé dans le milieu extérieur.
- ✓ Les liposomes réduisent la toxicité des agents encapsulés et augmentent l'effet des médicaments chimio- thérapeutiques.
- ✓ Les liposomes réduisent l'exposition des tissus sensibles aux PAs toxiques.
- ✓ Les liposomes fournissent une libération prolongée.
- ✓ Les liposomes modifient la pharmacocinétique et la pharmacodynamie du médicament.
- ✓ Les liposomes peuvent être administrés par des voies diverses.

II.4.5.2. Inconvénients

- ✓ Le coût de production élevé.
- ✓ Courte demi-vie.
- ✓ Problème de stabilité.
- ✓ Fuites et fusion des PA(s) encapsulés.

II.4.6. Préparation du liposome par la méthode d'hydratation du film lipidique

Cette méthode décrite par Bangham et al., 1965 est la plus utilisée pour la préparation des MLV (**Figure.II.5**). C'est une méthode simple et rapide. Les lipides sont tout d'abord dissous dans un solvant organique ou dans un mélange de solvants organiques. Le mélange chloroforme: méthanol (2 :1) est souvent utilisé. Le solvant est ensuite évaporé ce qui provoque la formation d'un film lipidique mince sur la paroi du ballon. Le film lipidique est hydraté en ajoutant une phase aqueuse; la dispersion ainsi formée est agitée par vortex pour une durée de quelques minutes. L'étape d'hydratation est réalisée à une température au-dessus de la T_m du phospholipide ou à la T_m la plus élevée si un mélange de phospholipides est utilisé. Les composés à encapsuler sont ajoutés, en fonction de leur solubilité, soit dans la phase aqueuse soit dans le solvant organique contenant les lipides. Cette méthode possède certains inconvénients comme: un petit volume aqueux interne, une

faible efficacité d'encapsulation et une distribution de taille des liposomes très hétérogène. Ce procédé nécessite des méthodes d'homogénéisation et de réduction de taille des MLV par traitement mécanique, comme la sonication et l'extrusion.

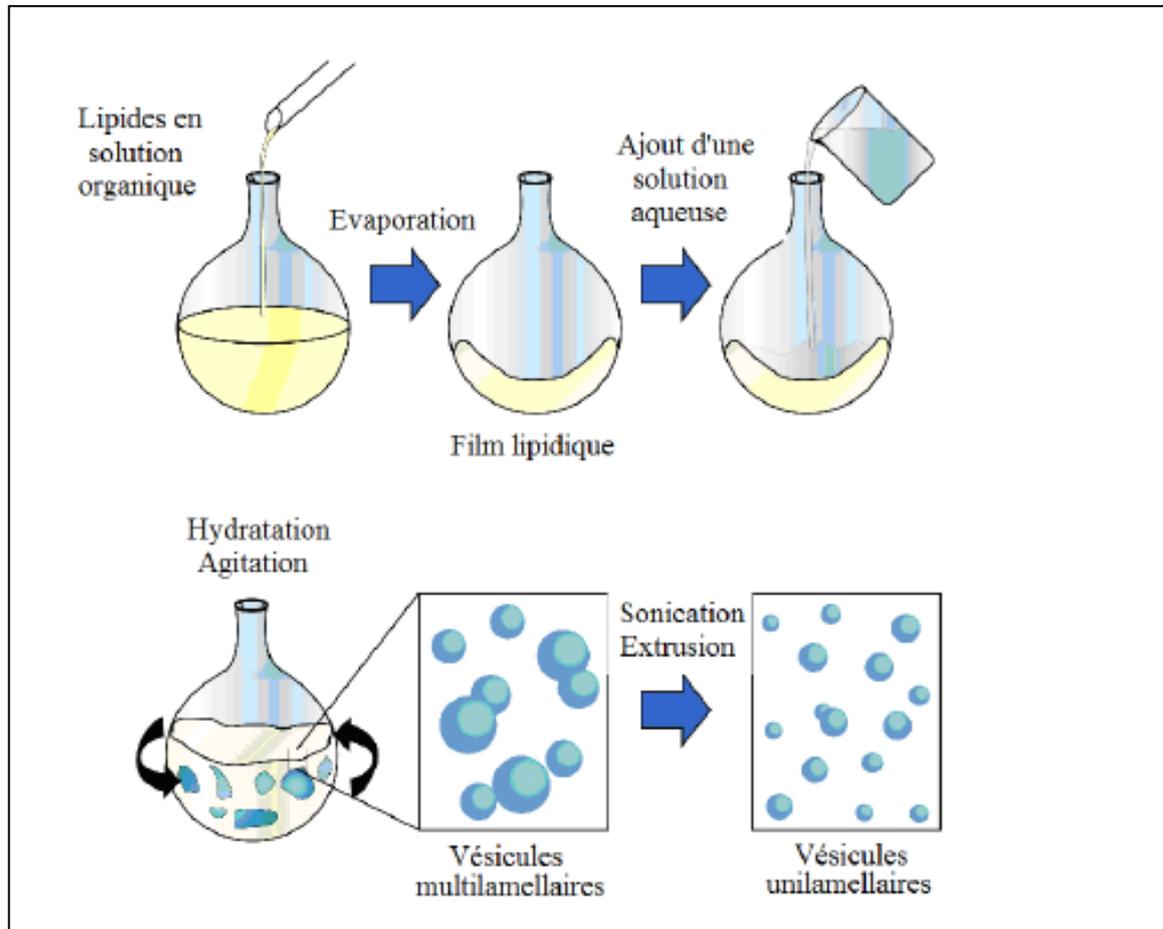


Figure.II.5. Préparation des liposomes par la méthode d'hydratation du film lipidique.

II.4.6.1. Sonication

Les MLV subissent une sonication soit dans un bain à ultrasons à une température supérieure à la T_m du phospholipide ou bien en utilisant une sonde à ultrasons plongée directement dans la dispersion de liposomes. Les ultrasons fournissent de l'énergie acoustique induisant une pression brisant les MLV en petites vésicules unilamellaires de type SUV. La durée et la force de sonication influencent les vésicules traitées. En effet, une augmentation de la durée et de la force de sonication entraînent une réduction de la taille des liposomes. Cependant, cette méthode possède plusieurs inconvénients comme: un faible volume aqueux interne, une faible efficacité d'encapsulation, une possible dégradation des phospholipides et des molécules encapsulées, une contamination du milieu par le métal de la sonde (titanium) dans le cas de la sonication par une sonde à ultrasons.

II.4.6.2. Extrusion

L'extrusion des liposomes est réalisée soit à travers des membranes de polycarbonate : Cette technique consiste à forcer une suspension des liposomes à traverser un filtre de polycarbonate ayant une taille des pores bien définies afin d'obtenir des liposomes d'un diamètre proche de la taille des pores de la membrane utilisée; ou bien sur une presse de French : Une suspension de liposomes est placée dans une chambre de presse de French à température ambiante et extrudée à l'aide d'un piston sous haute pression de 20000 psi à travers un petit orifice. Elle nécessite donc des pressions plus élevées que celles utilisées avec les membranes de polycarbonate.

II.4.7. Encapsulation de substances dans les liposomes

Les liposomes sont capables d'encapsuler des principes actifs lipophiles au niveau de leur bicouche lipidique ainsi que des principes actifs hydrophiles au niveau de leur cavité aqueuse. Dans toutes les méthodes de préparation des liposomes, on peut incorporer des substances dans la phase aqueuse ou dans la phase organique selon leur polarité. Le principe actif est ajouté avec la phase organique quand il est lipophile ou la phase aqueuse lorsqu'il est hydrophile. On peut alors schématiquement définir deux types d'association des molécules à l'intérieur des vésicules : dans le compartiment aqueux (ou les espaces inter lamellaires) pour les substances hydrosolubles, et dans les bicouches lipidiques pour les substances liposolubles.

L'encapsulation efficace et stable de substances médicamenteuses dans les liposomes est l'un des principaux challenges de l'industrie pharmaceutique depuis plus de 10 ans. L'encapsulation d'une molécule dépend beaucoup de ses propriétés physico-chimiques (taille, charge, hydrophobicité...) mais aussi des caractéristiques du liposome lui-même (taille, type, composition et concentration en lipides...).

D'autre part, l'encapsulation des substances peut se faire de façon passive au cours de leur préparation, ou de façon dite active, en introduisant les substances à encapsuler dans des liposomes pré-formés. Différents paramètres permettent d'évaluer l'efficacité de l'encapsulation après élimination des substances non encapsulées.

II.4.8. Principaux modes d'encapsulation

Les substances actives sont généralement ajoutées au cours du procédé de fabrication des liposomes par encapsulation dite passive dans la phase au sein de laquelle elles sont les plus solubles : phase organique pour les PAs lipophiles, phase aqueuse pour les PAs hydrophiles. Afin

de majorer la faible capacité d'encapsulation des molécules hydrophiles dans certains cas, différentes méthodes de préparation ont été développées :

II.4.8.1. Encapsulation passive

L'encapsulation passive a lieu lors de la synthèse des liposomes en hydratant le film lipidique directement avec une solution aqueuse contenant la molécule hydrophile à encapsuler. Elle est également possible avec des principes actifs lipophiles. Il suffit de les ajouter à la phase organique contenant les phospholipides et ils sont intégrés à la bicouche des liposomes au cours de leur préparation.

II.4.8.2. Encapsulation active

Les différentes méthodes de préparation des liposomes se font souvent dans des conditions rigoureuses, avec des solvants organiques, des agitations, sonication sous hautes températures qui peuvent conduire à la destruction, l'inactivation ou la perte d'activité de la substance que l'on veut encapsuler, particulièrement des peptides. D'où l'intérêt d'utiliser une autre technique d'encapsulation que celle qui a été précédemment citée.

L'encapsulation active consiste à introduire les substances à encapsuler dans des liposomes pré-formés. Les molécules non chargées et suffisamment lipophiles diffusent à travers la bicouche lipidique et se retrouvent dans la phase aqueuse des liposomes. Elles peuvent alors s'y retrouver dans la phase aqueuse des liposomes, piégées comme elles peuvent en ressortir rapidement. Plusieurs méthodes d'encapsulation active ont été décrites, utilisant des gradients de pH ou des différences de pression de part et d'autre de la membrane liposomale, permettant de remédier à ce problème et d'obtenir une encapsulation à la fois efficace et stable.

II.4.9. Mesure de l'efficacité d'encapsulation

Quelle que soit l'application envisagée ; les effets observés sont généralement dépendants de la dose utilisée et il convient donc de déterminer au préalable ; la quantité de molécules encapsulées dans les vésicules. Différents paramètres servent à quantifier le contenu interne liposomal.

II.4.10. Pourcentage d'encapsulation (ou taux d'encapsulation)

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

II.4.11. Encapsulation pondérée

L'encapsulation pondérée correspond à la quantité de molécule encapsulée rapportée à la quantité de lipides (en g/mol ou en g/mg). Il y a plusieurs possibilités pour quantifier l'encapsulation d'une molécule dans les vésicules. On peut utiliser un analogue radiomarqué de la molécule et compter la radioactivité des liposomes. On peut également doser l'activité biologique d'une molécule après lyse des vésicules par un solvant.

Dans le cas d'une molécule hydrosoluble, qui n'interagit pas avec les bicouches lipidiques, on peut déduire une autre expression de l'encapsulation pondérée qui définit plus la vésicule elle-même que son contenu : le volume aqueux interne. Pour cela, il faut bien sûr considérer que le marqueur (ou la molécule à encapsuler) a la même concentration dans la phase aqueuse initiale. Le marqueur doit donc se répartir uniquement dans l'espace aqueux des liposomes et ne pas subir de fuite lors de l'étape d'élimination de la substance non encapsulée.