

**République algérienne démocratique et populaire**  
**Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique**  
**Université a. Mira de Bejaia**



**Faculté de Technologie**  
**Département de Génie des procédés**

**Mémoire**  
**EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE**  
**Master**  
**Domaine : Science et Technologie Filière : Génie des Procédés**  
**Spécialité : Génie pharmaceutique**

Présenté par

**Ali Salem Yasmine**

*Thème*

***Microencapsulation de l'insuline injectable par PLA/PVA***

**Soutenue le 28/09/2022**

**Devant le jury composé de :**

<b>Nom et Prénom</b>		
Ounissa Senhadji	Université de Bejaia	Président
Ferhat Sellami	Université de Bejaia	Examineur
Djamila Kerrouche	Université de Bejaia	Encadrant
Lynda Zaidi	Université de Bejaia	Co- Encadrant

**Année Universitaire : 2021/2022**

## **Remerciements**

*J'adresse mes remerciements à mes encadrantes, Mme.Zaidi et Mme.Amimer, pour leur suivi et leurs sacrifices.*

*J'offre ma reconnaissance au personnel et techniciennes du bloc 11 ; à savoir Mme. Baradai, Mme. Amrani, Mmes. Adrar (Kahina et Magda) ainsi que Mme. Rabhi et M. Bouhali, pour leur aide et leur support malgré la difficulté de mon projet et tous mes moments de déprime.*

*Je confère mon immense gratitude aux personnes m'ayant prêté du matériel, un grand merci à Mme.Habi, Mme. Sifaoui, Mlle. Idres, Mme. Senhadji et à plusieurs autres âmes charitables dont je ne connais pas le nom.*

*M. Sellami, tout particulièrement, est un nom à qui je dois beaucoup et dont je n'oublierais pas de sitôt, son accompagnement était d'un secours inespéré.*

*Mme. Senhadji, toute aussi héroïque, était avec M. Sellami les piliers de cette recherche. Dont j'espère d'ailleurs seront-ils un tant soit peu fiers.*

*Pour finir, je résume mes années d'étude en faisant révérence et salut à tous mes mentors, mes enseignants et mes guides dans cette quête qu'est la vie.*

## *Dédicaces*

*Je remercie ma famille, mon adorable petit frère pour leur soutien dans cette épreuve difficile qu'était le mémoire. J'espère que mon travail prouvera mon dur labeur. Le manque de moyen et le fait que ce thème ait déjà 100 ans d'études à son actif ne m'ont pas simplifié les choses. Cependant, je ne regrette rien peu importe ma note car j'ai énormément appris, mais dommage que je ne puisse pas tout transmettre.*

*Il m'incombe aussi de m'adresser une toute dernière fois à moi-même et me féliciter de ne pas avoir abandonné. Par contre, si il y'a bien une leçon à retenir c'est ce dicton : « à problème pharmaceutique, solution hospitalière ! ».*

*Evidemment, j'ai gardé le meilleur pour la fin, celui sans qui je n'aurais rien pu sortir.... le site Sndl, qui m'obligea à prendre des pauses dans mes recherches en restant inaccessible durant les vacances.*

*PS : désolée, papa et maman.*

## Liste des figures

<b>Figure I.1 :</b> Structure de la molécule d'insuline humaine et ses terminaisons.....	4
<b>Figure I.2 :</b> Structure d'un hexamère d'insuline. ....	4
<b>Figure I.3 :</b> (a) Les états T (bleu sarcelle) et R (rouge) de l'insuline. (b) L'auto-association de l'insuline humaine est induite par le zinc (vert) et le conservateur phénolique (bleu). ....	6
<b>Figure I.4 :</b> La charge nette $Z$ de l'insuline monomère en fonction du pH. Les valeurs suivantes de pKa ont été utilisées pour le calcul : 7,2 ( $\alpha$ -NH <sub>2</sub> ), 9,6 ( $\epsilon$ -NH <sub>2</sub> ), 6,0 (groupe imidazole), 11,9 (groupe guanidine), 3,6 ( $\alpha$ -COOH), 4,7 ( $\gamma$ -COOH) et 9,6 (groupes phénoliques). ....	7
<b>Figure I.5 :</b> Représentation schématique du glucose et de la sécrétion d'insuline correspondante, pendant une période de 24 heures, chez des individus non diabétiques .....	9
<b>Figure I.6 :</b> Segments du tube digestif et les obstacles à une administration efficace de l'insuline par voie orale.....	23
<b>Figure I.7 :</b> Schéma récapitulatif des attribues du véhicule nano/micro-particulaire idéal .....	26
<b>Figure I.8 :</b> Morphologie des microparticules.....	27
<b>Figure I.9 :</b> Structure chimique des PLA's .....	31
<b>Figure I.10 :</b> Diagramme de phase simplifié d'un tensioactif.....	36
<b>Figure I.11 :</b> Schéma du modèle pour le calcul de la distance entre les gouttes de PA .....	39
<b>Figure II.1 :</b> Schématisation du concept du vecteur pharmaceutique pour la délivrance d'insuline par voie orale.....	50
<b>Figure II.2 :</b> Schéma explicatif du principe de rotor-stator.....	54
<b>Figure II.3 :</b> Ultra-turrax IKA T25 digital et sa tête de dispersion S 25 N - 25 F. ....	54

<b>Figure II.4 :</b> Granulomètre laser (ANALYSETTE 22).....	55
<b>Figure II.5 :</b> Dispositif de mesure pour les classes granulométriques basses (vert) et élevées (rouge).....	55
<b>Figure II.6 :</b> Dispositif de mesure pour les classes granulométriques dans la plage nanométrique.....	56
<b>Figure II.7 :</b> Procédé de microencapsulation par double émulsion/évaporation de solvant ( $W_1$ : phase aqueuse dispersée, O : phase organique intermédiaire, $W_2$ : phase aqueuse continue).....	58
<b>Figure II.8 :</b> Principe des instruments de diffusion de la lumière.....	60
<b>Figure II.9 :</b> Organigramme du développement de plans d'expérience et de surfaces de réponse pour l'optimisation. (ANN : réseau de neurones artificielles, LS : moindres carrés).....	62
<b>Figure III.1 :</b> Temps de dissolution en fonction de la masse ajoutée totale.....	69
<b>Figure III.2 :</b> Image du microscope optique pour la microémulsion en phase test (avant évaporation).....	71
<b>Figure III.3 :</b> Image du microscope optique pour les microcapsules en phase test (après évaporation).....	71
<b>Figure III.4 :</b> Distribution de la taille de la microémulsion test .....	72
<b>Figure III.5 :</b> Distribution de la taille des microcapsules test .....	73
<b>Figure III.6 :</b> Influence de la concentration de PVA sur la taille des MP (r : le reste des paramètres fixés à -1 ou 1).....	76
<b>Figure III.7 :</b> Influence du volume d'insuline sur la taille des MP (r : le reste des paramètres fixés à -1 ou 1).....	77
<b>Figure III.8:</b> Influence du temps d'agitation sur la taille des MP (r : le reste des paramètres fixés à -1 ou 1).....	77

<b>Figure III.9 :</b> Influence de la vitesse d'agitation sur la taille des MP (r: le reste des paramètres fixés à -1 ou 1).....	78
<b>Figure III.10 :</b> La variation des erreurs résiduelles en fonction de la réponse prédite.....	81
<b>Figure III.11 :</b> La surface de réponse obtenue par notre plan factoriel.....	83
<b>Figure III.12 :</b> Distribution de la taille des MP pour l'essai standard .....	84
<b>Figure III.13 :</b> Distributions de la taille des MP pour l'essai standard et l'essai 12 (optimum).....	85
<b>Figure III.14 :</b> Distribution de la taille des MP pour l'essai placebo.....	85
<b>Figure III.15 :</b> Fréquences de distribution de la taille des MP pour l'essai standard et le blanc.....	86
<b>Figure III.16 :</b> Distribution de la taille pour la formule 1.....	87
<b>Figure III.17 :</b> Distributions de la taille des MP pour l'essai standard et la formule 1.....	87
<b>Figure III.18 :</b> Distribution de la taille des MP pour la formule 2.....	88
<b>Figure III.19 :</b> Spectre IRTF de l'insuline Actrapid.....	89
<b>Figure III.20 :</b> Structure secondaire des protéines. (a) hélice $\alpha$ ; (b) feuillet $\beta$ ; (c) Bobine aléatoire.....	90
<b>Figure III.21 :</b> Spectre IRTF du PLA L9000.....	91
<b>Figure III.22 :</b> Spectres IRTF du blanc (a) et du PLLA (b).....	92
<b>Figure III.23 :</b> Spectres IRTF de l'essai 11 (a), du blanc (b), de l'insuline Actrapid (c) et du PLLA(d).....	93
<b>Figure III.24 :</b> Spectres IRTF de l'essai 11 (a), du blanc (b), de l'insuline Actrapid (c) et du PLLA(d) en régions Amide I et II.....	94
<b>Figure III.25 :</b> Spectre de la formule 2 en région des amides I et II.....	95

## Liste des tableaux

<b>Tableau I.1 :</b> Classification des types de diabète par l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) datant de 2019 .....	13
<b>Tableau I.2 :</b> Exemples de solvants communs à la microencapsulation.....	32
<b>Tableau I.3 :</b> Paramètres opératoires et leur influence sur les microcapsules finales.....	40
<b>Tableau II.1 :</b> Produits utilisés et leurs propriétés.....	51
<b>Tableau II.2 :</b> Résumé des expériences effectuées.....	58
<b>Tableau II.3 :</b> Composition de la phase test.....	63
<b>Tableau II.4 :</b> Domaine d'étude du plan factoriel.....	64
<b>Tableau II.5 :</b> Formulations pour l'étape de vérification.....	65
<b>Tableau III.1 :</b> La masse ajoutée de PLA au temps t.....	66
<b>Tableau III.2:</b> La masse ajoutée de PVA au temps t. ....	70
<b>Tableau III.3 :</b> Domaine d'étude du plan factoriel.....	74
<b>Tableau III.4 :</b> Matrice d'effets et d'interactions pour le plan factoriel $2^4$ .....	75
<b>Tableau III.5 :</b> Matrice des essais au centre.....	76
<b>Tableau III.6 :</b> Vecteurs des coefficients $b_j$ et $t_j$ .....	78
<b>Tableau III.7 :</b> Les coefficients significatifs.....	79
<b>Tableau III.8 :</b> Analyse des courbes résiduelles.....	81
<b>Tableau III.9 :</b> Attributions des bandes du PLA L9000. (as : asymétrique, s : symétrique) .	91

## Liste des abréviations

AGL : Acides gras libres

BM : Bleu de méthylène

CMC : Concentration micellaire critique

CSII : Perfusion sous-cutanée continue d'insuline

DAI : Insuline désalanine

DCM : Dichlorométhane

DT1 : Diabète de type 1

DT2 : Diabète de type 2

E. coli : Escherichia coli

EPPI : Eau pour préparation injectable

GAD65 : Glutamate décarboxylase

HLA : Antigènes des leucocytes humains

HLB : Hydrophilic-Lipophilic Balance

IA-2 et IA-2b : Anticorps anti-tyrosine phosphatase (Receptor-type tyrosine-protein phosphatase-like N)

IDA : Amylose dérivée de l'insuline

ILPS : Suspension protaminique d'insuline lispro

Ins : Insuline

MDI : Multi-injections journalières

MP : Micropaticule

MW : Masse molaire

NICE : National Institute for Health and Care Excellence



NP : Nanoparticule

NPH : Insuline Isophane

PA : Principe actif

PC/PD : Pharmacocinétique et pharmacodynamie

PLA : Acide polylactique

PVA : Alcool polyvinylique

*S. cerevisiae* : *Saccharomyces cerevisiae*

SC : Sous-cutané

W/O/W : Eau/huile/eau

# Sommaire

Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des abréviations	
Introduction .....	1
Chapitre I : Microencapsulation de l'insuline .....	3
I.1. L'insuline .....	3
I.1.1. Molécule d'insuline humaine .....	3
I.1.2. Rôle dans l'organisme .....	8
I.1.3. Synthèse d'insuline humaine .....	10
I.1.4. Différentes formulations d'insuline humaine développées par l'industrie pharmaceutique .....	10
I.1.5. Diabète .....	12
I.1.6. L'insulinothérapie .....	16
I.1.7. L'insuline par voie orale, pourquoi ? .....	19
I.1.8. Contraintes de la voie orale .....	21
I.2. Microencapsulation .....	25
I.2.1. Principe .....	26
I.2.2. Emulsion avec évaporation du solvant .....	27
I.2.3. Stabilité de l'insuline .....	41
I.3. Recherches bibliographiques sur la microencapsulation de l'insuline .....	47
Chapitre II : Matériel et méthodes .....	50
II.1. Matériel .....	51
II.1.1. Produits .....	51
II.1.2. Appareillage et fonctionnement .....	53
II.2. Uniformité des granulés de PLA .....	56

II.3. Test de solubilité.....	56
II.4. Préparation des microcapsules de PLA .....	57
II.4.2. Test de la formulation .....	58
II.5. Caractérisation .....	59
II.5.1. Microscopie optique .....	59
II.5.2. Granulométrie laser.....	59
II.5.3. Description des plans d'expérience .....	61
II.5.4. Vérification .....	65
II.5.5. Spectroscopie infrarouge - Transformée de Fourier .....	66
Chapitre III : Résultats et discussion .....	68
III.1. Test de solubilité.....	68
III.2. Microscope optique .....	70
III.3. Granulométrie laser .....	72
III.4. Plan factoriel complet à 2 niveaux .....	73
III.6. Infrarouge - Transformée de Fourier .....	89
Conclusion.....	96
Références bibliographiques	

# Introduction

## **Introduction**

En 1921, l'insuline fut découverte par Frederick Grant Banting, jeune chirurgien canadien de 29 ans, qui supposa que le pancréas pouvait en plus de sa fonction exocrine (de sécrétion d'enzymes agissant sur la digestion), avoir une fonction endocrine : production d'une hormone par les îlots de Langerhans capable de réguler la glycémie.

Le 11 janvier 1922, le premier patient diabétique (Léonard Thompson) est traité par une préparation d'extraits alcoolisés du pancréas de bœuf et ce fut un succès. Dès 1923 celle-ci sera commercialisée à grande échelle. L'insuline se révèle alors « la protéine du XXe siècle ». Non seulement est elle un véritable miracle pour les patients diabétiques, mais aussi pour les chercheurs. Elle ne justifiera pas moins de trois prix Nobel, à Banting et MacLeod pour la première protéine à utilisation thérapeutique, à Frédéric Sanger en 1958, pour la première détermination de la séquence d'une protéine, à Rosalyn Yalow en 1977 pour le premier dosage radio-immunologique [1].

Aujourd'hui, cette protéine est devenue plus que nécessaire ; le nombre de personnes atteintes de diabète ne cesse d'augmenter, l'OMS estimant qu'il y avait 422 millions d'adultes diabétiques dans le monde en 2014. La prévalence ajustée à l'âge chez les adultes est passée de 4,7 % en 1980 à 8,5 % en 2014. L'augmentation la plus importante ayant été enregistrée dans les pays à revenu faible ou intermédiaire par rapport aux pays à revenu élevé. En outre, la Fédération internationale du diabète (FID) estime que 1,1 million d'enfants et d'adolescents âgés de 14 à 19 ans sont atteints de DT1. En l'absence d'interventions visant à enrayer l'augmentation du diabète, il y aura au moins 629 millions de personnes vivant avec le diabète en 2045 [2].

Malgré tout, le premier obstacle au traitement par insuline, reste son administration. L'injection ou la perfusion sous-cutanée est un handicap au quotidien pour les malades, elle provoque moult complications dermatiques, risques d'hypoglycémie, inconfort et hyperinsulinémie périphérique. Pour y remédier, cela fait 100 ans cette année, depuis la toute première tentative de mise en place d'une formulation d'insuline à prise orale.

L'administration orale permettrait de résoudre maintes problématiques des systèmes d'administration actuelle à commencer par le passage pancréatique.

Dans cette optique, nous mettons au point cette brève recherche avec pour thème la microencapsulation de l'insuline. Nous verrons tout d'abord un intermède théorique en chapitre I, où nous nous approfondirons sur l'insuline en tant que polypeptide, puis sur la microencapsulation et ses paramètres essentiels, et nous finirons sur quelques recherches bibliographiques pour renseigner sur la thématique.

Par la suite, nous entamerons la partie expérimentale en chapitres II et III, l'un décrivant notre contexte et les méthodes employées, compte à l'autre il sera dédié aux résultats du chapitre II ; dedans nous essayerons de bâtir un plan factoriel à deux niveaux visant à déterminer l'impacte des différents facteurs de la microencapsulation sur le diamètre des microparticules et conclurons par leurs caractérisations.

# **Chapitre I: Microencapsulation de l'insuline**

## **Chapitre I : Microencapsulation de l'insuline**

### **I.1. L'insuline**

Le marché de l'insuline en Algérie représente 400 millions d'euros par an. En 2023, Biopharm ambitionne de prendre d'assaut tout ce secteur en fournissant le double de la consommation du pays, munie d'insuline produite localement [3].

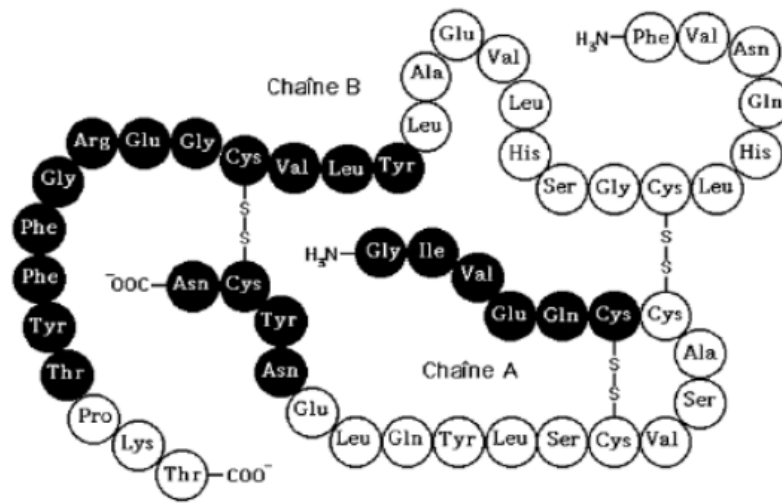
Dans ce chapitre, nous aborderons la description, le fonctionnement et le rôle de l'insuline, ses maintes formes disponibles à l'usage. Par la suite, nous acquiescerons vers la pandémie du diabète et terminerons par notre sujet convoité que sont les voies d'administration.

#### **I.1.1. Molécule d'insuline humaine**

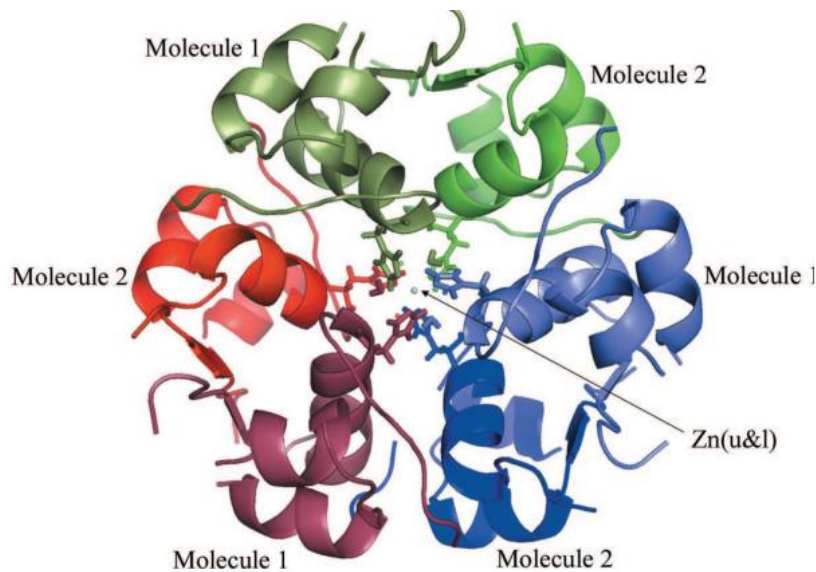
La molécule d'insuline est communément appelée polypeptide ou encore protéine. Une protéine est une macromolécule biologique composée par une ou plusieurs chaînes d'acides aminés liées entre elles par des liaisons peptidiques. Un polypeptide est une chaîne linéaire composée de plus de 10 acides aminés. En général, on parle de protéine lorsque la chaîne contient plus de 50 acides aminés ; elle peut comprendre un ou plusieurs polypeptides. L'ordre dans lequel les acides aminés s'enchaînent est codé par le génome et constitue la structure primaire de la protéine. La protéine se replie sur elle-même pour former des structures secondaires, dont les plus importantes quantitativement sont l'hélice alpha et le feuillet bêta. Enfin, les différentes structures secondaires sont agencées les unes par rapport aux autres pour former la structure tertiaire, souvent renforcée par des ponts disulfures.

Dans le cas de l'insuline humaine (voir figure I.1), sa structure primaire est formée de deux chaînes polypeptidiques : la chaîne A (21 acides aminés) et la chaîne B (30 acides aminés), réunies par deux ponts disulfures qui relient les cystéines A<sup>7</sup> et A<sup>20</sup> de la chaîne A à leurs homologues B<sup>7</sup> et B<sup>19</sup> de la chaîne B. Le poids moléculaire de l'insuline humaine est 5734 Daltons [4].





**Figure I.1 :** Structure de la molécule d'insuline humaine et ses terminaisons.



**Figure I.2 :** Structure d'un hexamère d'insuline.

L'insuline s'auto-associe en dimères non covalents par des interactions hydrophobes à l'extrémité C-terminale de la chaîne B, stabilisant le feuillet  $\beta$  intermoléculaire. Physiologiquement, l'insuline est stockée sous forme d'hexamère contenant du zinc (Comme montré en figure I.2) dans les granules de sécrétion des cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans du pancréas, dans lequel, trois dimères d'insuline s'assemblent pour former un hexamère

d'insuline équilibré par deux ions de zinc. Les ions de zinc sont coordonnés à travers un réseau octaédrique créé, en partie, par trois résidus His B<sup>10</sup> [5].

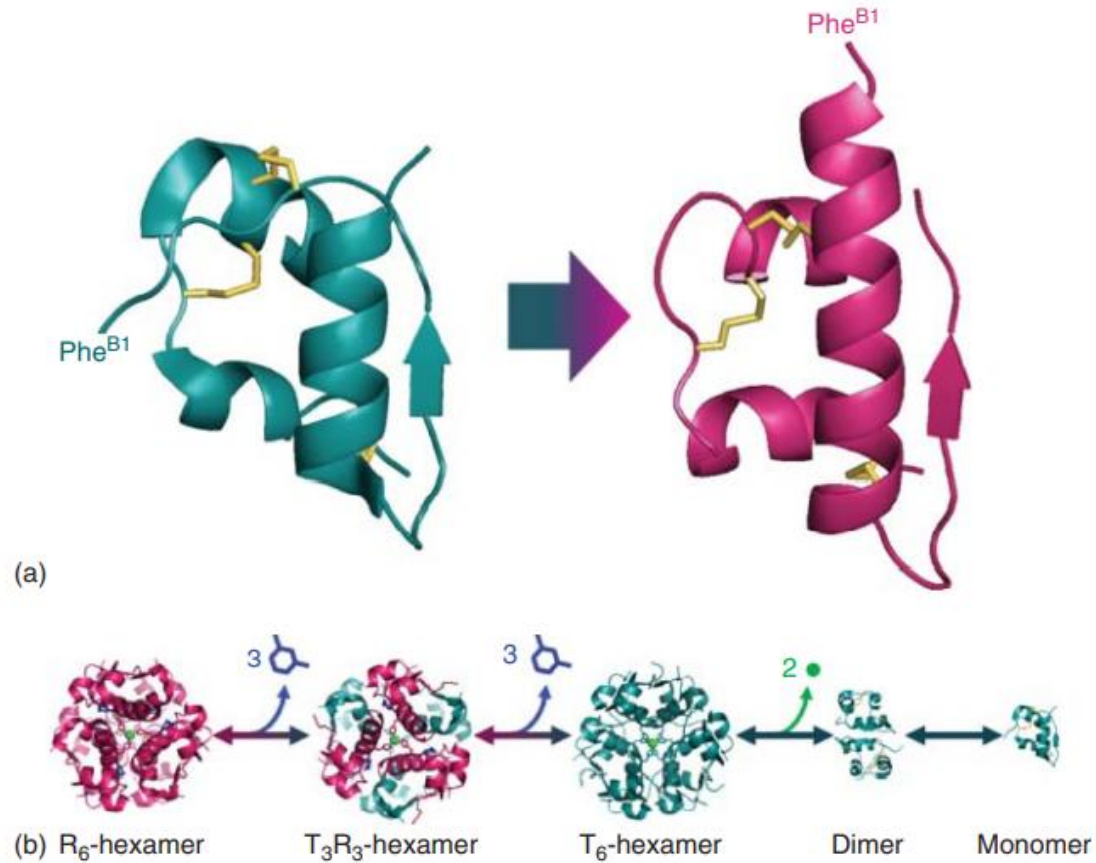
Les rôles attribués à cette association, sont notamment ;

- La stabilisation chimique et thermique de la molécule lors du stockage dans la vacuole intracellulaire.
- La protection de l'insuline monomère contre la fibrillation in vivo.
- Une substitution à la stabilisation et au repliement assisté par chaperon pendant l'expression intracellulaire.
- Essentiel au trafic sécrétoire.

La capacité de l'insuline à s'auto-associer en hexamères en présence de zinc et de conservateurs phénoliques, par exemple le phénol ou le m-crésol, a et est toujours exploitée dans la préparation de formulations commerciales d'insuline. Ces ligands hétérologues provoquent des changements conformationnels à l'hexamère, améliorant sa conformation chimique et physique.

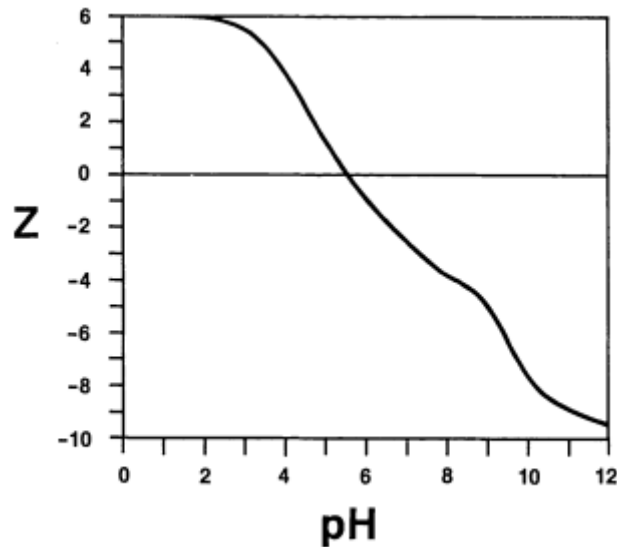
La liaison entre ligands phénoliques monitoré un changement conformationnel qui se produit à l'extrémité N-terminale de la chaîne B des monomères du hexamère, déplaçant un équilibre conformationnel dans les résidus Phe B<sup>1</sup> à Gly B<sup>8</sup> d'une structure étendue (état T) à une structure  $\alpha$ -hélicoïdale (état R). Cette liaison se produit dans une cavité entre les monomères de dimères adjacents et est stabilisée par les interactions hydrogène-oxygène carbonyle de Cys A<sup>6</sup>, hydrogène-proton amide de CysA<sup>11</sup>, et en général les liaisons de van der Waals. Ce changement de conformation est appelé la transition T  $\leftrightarrow$  R et est utilisée afin d'augmenter la stabilité chimique, physique et thermique de l'insuline commerciale (figure I.3).

Bien que le zinc et les ligands phénoliques veillent à la conservation, ils peuvent aussi altérer l'absorption sous-cutanée de l'insuline, c'est-à-dire retarder l'insuline prandiale (à action rapide) et prolonger l'insuline basale (à action lente) [6].



**Figure I.3 :** (a) Les états T (bleu sarcelle) et R (rouge) de l'insuline. (b) L'auto-association de l'insuline humaine est induite par le zinc (vert) et le conservateur phénolique (bleu).

La figure I.4 montre la charge nette de la molécule d'insuline en fonction du pH, calculée sur la base des valeurs intrinsèques de pKa trouvées par Tanford et Epstein (1954). La charge nette est nulle à pH 5,5, en bon accord avec le pH isoélectrique déterminé par électrophorèse de 5,3 à 5,4. Un ou plusieurs des 6 groupes amide de la molécule d'insuline peuvent être perdus par hydrolyse en solution (en particulier à faible pH, par exemple dans du HCl 0,1 N à 37 °C) conduisant à la formation de jusqu'à 6 groupes carboxyle. L'insuline se dégrade dans les milieux alcalins (pH > 10) principalement en raison de sa teneur en résidus cystine. L'insuline peut être dégradée par les enzymes protéolytiques, y compris celles présentes dans le pancréas, comme la trypsine, les chymotrypsines et les carboxypeptidases.



**Figure I.4 :** La charge nette Z de l'insuline monomère en fonction du pH. Les valeurs suivantes de pKa ont été utilisées pour le calcul : 7,2 ( $\alpha$ -NH<sub>2</sub>), 9,6 ( $\epsilon$ -NH<sub>2</sub>), 6,0 (groupe imidazole), 11,9 (groupe guanidine), 3,6 ( $\alpha$ -COOH), 4,7 ( $\gamma$ -COOH) et 9,6 (groupes phénoliques).

La solubilité de l'insuline dépend d'un certain nombre de facteurs, tels que la nature du solvant, du pH, de la température et de la concentration en ions métalliques divalents et sels. En milieu aqueux, l'insuline peut être précipitée à un intervalle de pH autour du pH isoélectrique de 5,3 à 5,4. L'insuline bovine est précipitée plus facilement que l'insuline porcine. À un pH inférieur à 4 et supérieur à 7, les deux insulines sont assez solubles en l'absence de Zn<sup>2+</sup>. La zone de précipitation est élargie vers des valeurs de pH plus élevées avec une concentration croissante de Zn<sup>2+</sup>. L'insuline peut être relarguée à des concentrations élevées de sels. Même à une concentration d'insuline aussi élevée que 0,2 g/l, une précipitation presque complète se produit dans du NaCl 2 M à pH 2 - 3. L'insuline est très soluble dans des mélanges homogènes d'eau et de matières organiques ou solvants, par ex. dans 50 - 70 % (v/v) d'éthanol. Cette propriété peu commune d'une protéine peut être attribuée au poids moléculaire relativement faible de l'insuline et à sa teneur en résidus d'acides aminés hydrophobes (Val, Ile, Leu, Tyr, Phe). Quand la teneur en solvant organique du mélange est très élevée, la solubilité de l'insuline diminue en fonction du type de solvant, de la température, du pH et de la teneur en sel.

En solution aqueuse, l'insuline forme de nombreux types de composés d'association dus aux liaisons non covalentes. L'ajout d'urée ou de solvants organiques miscibles à l'eau, tels que l'éthanol et l'acide acétique, s'oppose à ces associations. Cet effet, est utilisé en purification chromatographique de l'insuline [7].

### **I.1.2. Rôle dans l'organisme**

En résumé, l'insuline engage à la fois les organes cibles "classiques" (muscle, graisse et foie) et "non classiques" (les cellules  $\beta$  pancréatiques, le système nerveux central et les cellules vasculaires) dans l'orchestration du contrôle du métabolisme du glucose.

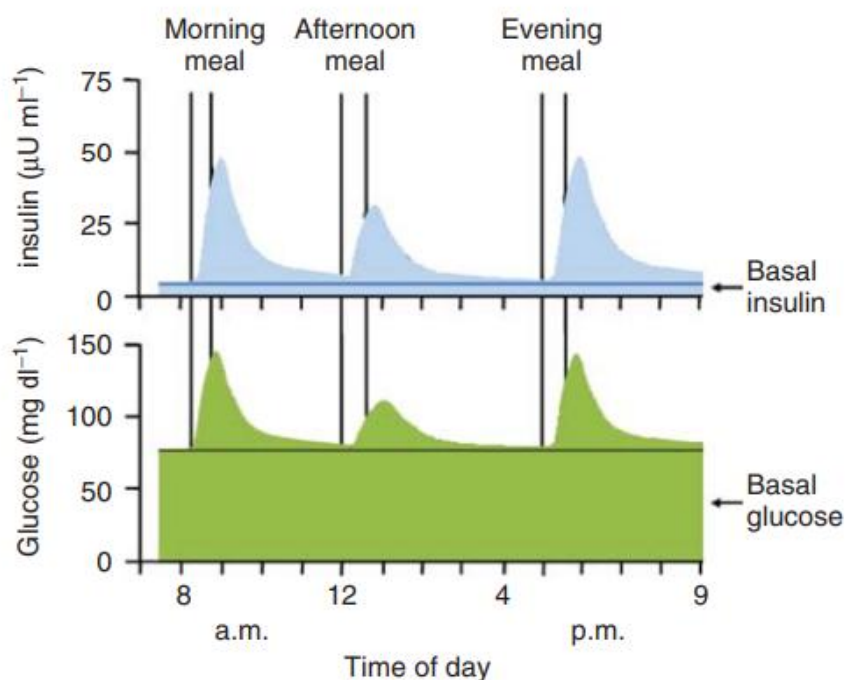
Dans ses organes cibles classiques, l'insuline module directement l'absorption, le métabolisme et la production de glucose. En plus d'augmenter l'absorption du glucose dans le muscle squelettique et le tissu adipeux, l'insuline favorise le stockage du glucose sous forme de glycogène (principalement dans les muscles et le foie) ou de lipides (surtout dans les graisses et le foie). Pour éviter des cycles métaboliques inutiles, l'insuline inhibe simultanément la dégradation de ces macromolécules par glycogénolyse et lipolyse, respectivement. De plus, l'hormone affecte le métabolisme du glucose secondairement aux altérations du métabolisme d'autres macronutriments et en utilisant des mécanismes complexes de diaphonie inter-organes.

Bien que l'effet majeur de l'insuline soit sur ses organes cibles classiques, pratiquement tous les types de cellules expriment les récepteurs de l'insuline et l'ablation tissulaire spécifique du récepteur d'insuline a révélé les cibles «non classiques», comprenant les cellules  $\beta$  pancréatiques, le système nerveux central et les cellules vasculaires. Les résultats suggèrent que ces tissus peuvent exercer des effets indirects sur le métabolisme du glucose au niveau du corps entier. Par exemple, les souris dépourvues de récepteurs d'insuline dans les cellules  $\beta$  manifestent une sécrétion altérée d'insuline médiée par le glucose. À l'inverse, les souris chez lesquelles le récepteur de l'insuline a été enlevé dans les cellules neuronales présentent une consommation alimentaire élevée et une obésité induite par la surconsommation, ce qui suggère que l'insuline délivre un apport anorexigène au système nerveux central. Enfin, les cellules vasculaires sont une cible pour la vasodilatation induite par l'insuline et le recrutement capillaire qui, en améliorant l'apport de glucose, peut compléter l'effet stimulant direct de l'hormone sur l'absorption du glucose dans le muscle [8].

### I.1.2.1. Profil de sécrétion d'insuline

L'insuline chez une personne non diabétique est libérée par les cellules pancréatiques  $\beta$  dans un mode pulsatile vers la circulation portale et sa sécrétion endogène se décompose en deux différents profils ; (i) réponse insulinaire à un repas, appelée profil prandial et (ii) sécrétion d'insuline de fond, continuellement sécrétée entre les repas et pendant les heures nocturnes, appelée profil d'insuline basale (Figure I.5). Plus précisément, la sécrétion d'insuline prandiale endogène produit un pic d'insuline entre 60 et 80  $\mu\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$  alors que la sécrétion basale d'insuline varie généralement de 5 à 15  $\mu\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Ainsi, l'insuline administrée de manière exogène doit reproduire ces deux profils d'action temporelle très différents [9, 10].

La sécrétion d'insuline diminue en présence d'hypoglycémie et augmente face à l'hyperglycémie, à certains acides aminés (par exemple, arginine, leucine, phénylalanine, tyrosine), aux acides gras non estérifiés et à la stimulation sympathique et parasympathique [11].



**Figure I.5 :** Représentation schématique du glucose et de la sécrétion d'insuline correspondante, pendant une période de 24 heures, chez des individus non diabétiques [9].

En riposte, des efforts considérables ont été déployés pour tenter de développer des formulations d'insuline et d'analogues qui répondent aux exigences pharmacocinétiques et pharmacodynamiques de chaque cas, tout en essayant d'éliminer l'hypoglycémie et le gain de poids qui a été observé en thérapie intensive [9].

### **I.1.3. Synthèse d'insuline humaine**

Il existe 4 approches potentielles pour la production d'insuline humaine :

1. A partir du pancréas humain. Toutefois, la quantité d'insuline humaine qui peut être préparée par les glandes pancréatiques cadavériques est totalement inadéquate à la consommation mondiale.
2. A partir de la synthèse peptidique d'acides aminés. Néanmoins, les 200 étapes réactionnelles d'une synthèse totale rendent le produit extrêmement coûteux.
3. A partir d'insuline porcine (ou bovine) par une conversion semi-synthétique en insuline humaine. L'insuline porcine peut être fabriquée en quantités suffisantes pour répondre aux demandes des prochaines décennies et un processus de conversion quantitative pour une production à grande échelle a déjà été développé.
4. Depuis la fermentation de bactéries *E. coli* ou de levure *Saccharomyces cerevisiae*, convenablement codée par des méthodes de recombinaison d'ADN. Cette source est, en théorie, illimitée.

Les méthodes semblant les plus pertinentes pour la fabrication d'insuline humaine sont; la 3 développée par NOVO et la 4 développée par E. Lilly (*E. coli*) et plus tard par NOVO (*Saccharomyces cerevisiae*) [12].

### **I.1.4. Différentes formulations d'insuline humaine développées par l'industrie pharmaceutique**

Les insulines humaines actuellement sur le marché comprennent des formulations à action rapide (*Regulière*), à action intermédiaire (*NPH* et *lente*) et à action prolongée (*Ultralente*).

La première est une solution aqueuse limpide et incolore tamponnée à pH neutre (7-7,8). Le méta-crésol est ajouté comme conservateur, le glycérol comme stabilisateur tonique, ainsi que le chlorure de zinc. Les hexamères, rendus stables par les ions zinc, sont la structure

quaternaire prédominante de l'insuline pharmacologique ; d'autres structures comprennent des dimères et des tétramères. La molécule a tendance à s'agréger dans le flacon et dans le tissu où elle est injectée. Les hexamères doivent être divisés pour l'absorption de l'insuline à partir du site d'injection sous-cutané. Pour cette raison, l'insuline régulière entre dans la circulation générale après une phase de latence d'environ 30 minutes suivant l'injection. Elle atteint le pic plasmatique en 2 à 4 h et dure 6 h.

L'absorption de l'*NPH* est compte à elle retardée par la protamine, une protéine extraite du noyau du sperme de poisson, où son rôle est de stabiliser l'ADN. La forme commerciale de l'insuline Isophane-*NPH*, est une suspension blanche de cristaux orthorhombiques contenant 0,9 molécules de protamine et deux atomes de zinc par hexamère. Dans le cristal, la protamine régule les interactions entre dimères et hexamères. Le véhicule est de l'eau tamponnée à pH 6,9 - 7,5, du phénol ou du méta-crésol sont ajoutés comme conservateurs. Les cristaux d'insuline sont insolubles dans l'eau et ont tendance à précipiter au fond du flacon, il faut agiter plusieurs fois pour les remettre en suspension avant utilisation. La *NPH* a une action plus longue : en effet, son absorption sanguine commence 1h30 après l'injection sous-cutanée ; elle a un pic de concentration plasmatique vers 4 à 12 h et disparaît en 24 h. Bien que, la *NPH* présente l'absorption la plus constante de toutes les insulines à action intermédiaire et prolongée, la variabilité inter et intra-individuelle est élevée.

La *lente*, retardée sans adjonction de protamine, est obtenue par précipitation de l'hormone en présence de sels de zinc. Lorsque son rapport molaire à l'insuline est supérieur à 1, l'ion zinc réduit la solubilité de l'insuline dans le solvant neutre. Lorsqu'une solution acide d'insuline est amenée à pH 7,4 avec un excès d'ions zinc, le précipité résultant est amorphe et présente une absorption modérément retardée après injection sous-cutanée. Ce type de formulation d'insuline est connu sous le nom de *Semi-lente* et a été produite il y a plusieurs années. Si on laisse l'insuline cristalliser à pH 5,5 avant d'ajouter du zinc et de corriger le pH, la formulation obtenue est connue sous le nom d'*Ultralente*. Cette insuline est constituée de cristaux insolubles dans l'eau qui restent en suspension et sont absorbés très lentement.

Un mélange 3:7 d'insuline amorphe (*semi-lente*) et cristalline (*Ultra-lente*), connu sous le nom de *Lente*, a un profil d'absorption intermédiaire. Dans les préparations commerciales, le parahydroxybenzoate de méthyle est utilisé comme conservateur et la



suspension est tamponnée à pH 7-7,8. Il apparaît dans la circulation 2,5 h après l'injection, a un pic de concentration plasmatique entre 7 et 15 h et disparaît à 20 h.

Les insulines *NPH* et *Lente* peuvent être mélangées avec *Régulière* dans la seringue. Cependant, alors que *NPH* et *Régulière* conservent leurs caractéristiques pharmacocinétiques, le mélange *Lente/Régulière* évolue dans le temps car l'excès d'ions zinc lie une partie de l'insuline à action rapide, la transformant en une forme similaire à *Semi-lente*.

L'insuline à action prolongée (*Ultralente*) est une suspension aqueuse de cristaux de zinc-insuline à pH neutre, d'aspect laiteux. Il a un début d'action après 4 h, atteint une concentration plasmatique maximale légère mais indésirable à 7 h et maintient les niveaux d'insuline dans le sang pendant environ 8 à 20 h ; il imite de manière incohérente la sécrétion basale endogène. De plus, son absorption est totalement irrégulière et elle ne peut pas être mélangée à l'insuline *Régulière* dans la seringue car l'action de cette dernière serait excessivement retardée [10].

## **I.1.5. Diabète**

### **I.1.5.1. Définition**

Le terme diabète décrit un groupe de troubles métaboliques caractérisés et identifiés par la présence d'une hyperglycémie en l'absence de traitement. L'étiopathologie hétérogène comprend des défauts de sécrétion d'insuline, d'action de l'insuline, ou les deux, et des perturbations du métabolisme des glucides, des graisses et des protéines. Les effets spécifiques à long terme du diabète comprennent la rétinopathie, la néphropathie et la neuropathie, entre autres complications. Les personnes atteintes de diabète courent également un risque accru d'autres maladies, notamment les maladies cardiaques, artérielles périphériques et cérébrovasculaires, l'obésité, les cataractes, la dysfonction érectile et la stéatose hépatique non alcoolique. Ils sont également exposés à un risque accru de certaines maladies infectieuses, telles que la tuberculose.

Le diabète peut présenter des symptômes caractéristiques tels que soif, polyurie, troubles de la vision et perte de poids. Les mycoses génitales sont fréquentes. Les manifestations cliniques les plus sévères sont l'acidocétose ou un état hyperosmolaire non cétosique pouvant entraîner une déshydratation, un coma et, en l'absence de traitement

efficace, la mort. Cependant, dans le DT2, les symptômes ne sont souvent pas sévères, ou peuvent être absents, en raison de la lenteur avec laquelle l'hyperglycémie s'aggrave. Causant, en l'absence de tests biochimiques, une hyperglycémie suffisante pour provoquer des modifications pathologiques et fonctionnelles (complications) déjà présentes avant qu'un diagnostic ne soit posé. On estime qu'un pourcentage important de cas de diabète (30 à 80 %, selon les pays) ne sont pas diagnostiqués [13]. Dans le tableau I.1, les types de diabète seront classés et brièvement abordés :

**Tableau I.1 :** Classification des types de diabète par l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) datant de 2019 [2, 90].

<b>Type de diabète</b>	<b>Brève description</b>
<b>Diabète de type 1</b>	Destruction des cellules $\beta$ (principalement immunitaire) et carence d'insuline absolue; démarre en majorité à l'enfance et au pré-âge adulte.
<b>Diabète de type 2</b>	Type le plus courant avec divers degrés de dysfonctionnement des cellules $\beta$ et d'insulinorésistance; communément associé au surpoids et à l'obésité.
<b>Formes hybrides du diabète</b>	
Diabète auto-immun à évolution lente chez l'adulte	Similaire au type 1 à évolution lente chez l'adulte mais a plus de caractéristiques du syndrome métabolique, un seul auto-anticorps GAD et qui retient plus de fonction des cellules $\beta$ .
Diabète de type 2 sujet à la cétose	Présente une cétose et une carence en insuline mais plus tard ne nécessite pas d'insuline; épisodes fréquents de cétose, sans cause auto-immune.

<b>Autres types spécifiques</b>	
<p>Diabète monogénique :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▫ Défauts monogéniques dans la fonction des cellules <math>\beta</math></li>   <li>▫ Défauts monogéniques de l'action de l'insuline</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▫ Causés par des mutations génétiques spécifiques, a plusieurs manifestations cliniques nécessitant un traitement différent, certaines survenant en période néonatale, d'autres au début de l'âge adulte.</li> <li>▫ Causés par des mutations génétiques spécifiques; a des caractéristiques d'insulinorésistance sévère sans obésité; le diabète se développe lorsque les cellules <math>\beta</math> ne compensent pas la résistance à l'insuline.</li> </ul>
Maladies du pancréas exocrine	<p>Multiples conditions qui affectent le pancréas pouvant engendrer une hyperglycémie (pancréatite, néoplasie, mucoviscidose, hémochromatose).</p>
Troubles endocriniens	<p>Se produit dans les maladies avec un excès de sécrétion d'hormones antagonistes à l'insuline (acromégalie, syndrome de Cushing, glucagonome, phéochromocytome, hyperthyroïdie).</p>
D'origine médicamenteuse ou chimique	<p>Quelques médicaments et produits chimiques altèrent la sécrétion ou l'action de l'insuline, et d'autres peuvent détruire les cellules <math>\beta</math> (vacor, streptozotocine, alloxane, glucocorticoïdes, hormone thyroïdienne, diazoxide, diurétiques thiazidiques, minoxidil, contraceptifs oraux, L-dopa,</p>

	agonistes alpha-adrénergiques, agonistes bêta-adrénergiques, dilantin, pentamidine, acide nicotinique, interféron-alpha).
diabète lié à une infection	Certains virus ont été associés à la destruction directe des cellules $\beta$ (rubéole congénitale, cytomégalovirus).
Formes spécifiques rares de diabète auto-immun	Associés à des maladies auto-immunes rares (Syndrome de l'homme raide, anticorps anti-récepteur de l'insuline).
D'autres syndromes génétiques parfois associé au diabète	De nombreuses maladies génétiques et anomalies chromosomiques augmentent le risque de diabète (syndrome de Down, syndrome de Klinefelter, syndrome de Turner).
<b>Diabète non-classé</b>	Utilisé pour décrire le diabète qui n'entre pas exactement dans l'une des autres catégories. Cette catégorie doit être utilisée temporairement lorsqu'il n'y a pas de diagnostic clair.
<b>Hyperglycémie détectée pour la première fois pendant la grossesse</b>	
Diabète sucré pendant la grossesse	Diabète de type 1 ou de type 2 diagnostiqué pour la première fois pendant la grossesse.
Diabète sucré gestationnel	Hyperglycémie inférieure aux seuils du diabète pendant la grossesse (critères du diabète : glycémie à jeun $\geq 7,0$ mmol/L ou glycémie post-charge de 2 heures $\geq 11,1$ mmol/L ou HbA1c $\geq 48$ mmol/mol).

### **I.1.5.2. Diabète de type 1 (DT1) insulino-dépendant**

Cette forme de diabète représente environ 5 % des personnes atteintes de diabète et résulte d'une destruction auto-immune à médiation cellulaire des cellules  $\beta$  du pancréas. Les marqueurs de la destruction immunitaire de la cellule  $\beta$  comprennent les auto-anticorps des cellules insulaires, les auto-anticorps contre l'insuline, les auto-anticorps contre l'acide glutamique déshydrogénase (GAD65) et les auto-anticorps contre les tyrosines phosphatases IA-2 et IA-2b. Un ou plusieurs de ces auto-anticorps sont habituellement présents chez près de 90 % des individus lorsqu'ils sont initialement détectés. De plus, il existe une forte association HLA (antigènes des leucocytes humains), avec une liaison aux gènes DQA et DQB, et elle est influencée par les gènes DRB. Ces allèles HLA-DR/DQ peuvent soit prédisposer, soit protéger contre le développement du diabète. Le diabète à médiation immunitaire survient fréquemment pendant l'enfance et l'adolescence, mais il peut survenir à tout âge, même dans les huitièmes et neuvièmes décennies de la vie.

La destruction auto-immune des cellules  $\beta$  a de multiples prédispositions génétiques (conférées par des gènes diabétogènes sur le bras court du chromosome 6, faisant partie ou à proximité de la région du complexe majeur d'histocompatibilité (MHC)) et est liée à des facteurs déclencheurs environnementaux (éventuellement infections virales, toxines chimiques ou exposition aux protéines du lait de vache dans la petite enfance) celles-ci sont encore mal connues. Ces patients sont également sujets à d'autres troubles auto-immuns tels que la maladie thyroïdienne auto-immune, la maladie d'Addison, le vitiligo, l'hépatite auto-immune, la myasthénie grave, la sprue coeliaque et l'anémie pernicieuse. Dans le DT1, le taux de destruction des cellules  $\beta$  est variable. Elle est généralement rapide chez les nourrissons et les enfants, et souvent lente chez les adultes. Lorsqu'une destruction aiguë ou rapide des cellules  $\beta$  se produit, le développement d'une acidocétose peut être la première manifestation. D'autres, en particulier chez les adultes, peuvent avoir un processus plus insidieux qui peut rapidement évoluer vers une hyperglycémie sévère et/ou une acidocétose en présence de facteurs de stress tels qu'une infection [14, 15].

### **I.1.6. L'insulinothérapie**

L'objectif de l'insulinothérapie dans le DT1 est de faire correspondre les besoins physiologiques en insuline à la fois pendant la période de jeûne et de post-absorption, de

même que d'optimiser une augmentation anticipée de la glycémie après un repas glucidique. L'insulinothérapie doit être initiée immédiatement (dans les 6 h si une cétonurie est présente) après le diagnostic pour prévenir les crises hyperglycémiques. La dose quotidienne totale d'insuline peut dépendre de l'âge, différer d'une personne à l'autre et changer au fil du temps ainsi qu'au jour le jour en raison de l'activité physique, du stress et des changements hormonaux tels que l'évolution de l'insensibilité à l'insuline pendant la puberté, d'où le besoin d'une réévaluation régulière des besoins individuels en insuline

Au cours de la dernière décennie, les régimes intensifs tels que les injections quotidiennes multiples (MDI) et le régime de perfusion sous-cutanée continue (CSII) en comparaison aux régimes d'une à deux injections d'insuline basale seule ou en combinaison avec l'insuline prandiale, sont de plus en plus utilisés. Malgré que les modes intensifs offrent une certaine flexibilité dans les habitudes alimentaires et la vie sociale et familiale, ils nécessitent également des niveaux élevés de motivation, d'éducation des patients, d'augmentation de l'apport en soins de santé et de ressources. Qui plus est, les omissions (ou la non-observance) d'insuline et le manque d'ajustement de la dose peuvent avoir un impact sur le contrôle glycémique [16].

### **I.1.6.1. Dispositifs d'administration d'insuline**

#### **1. Les seringues (injection intraveineuse) :**

Les seringues à insuline conviennent si un mélange libre d'insuline (insuline à action courte et intermédiaire) est souhaité, pour ceux qui s'injectent des doses d'insuline supérieures à 60-80 unités par jour et/ou comme dispositif de secours. Cela nécessite de la dextérité manuelle et de l'acuité visuelle pour s'assurer que des doses précises d'insuline peuvent être préparées pour l'injection.

#### **2. Les stylos (injection sous-cutanée):**

Les stylos à insuline sont disponibles en modèles pré-remplis jetables ou réutilisables avec des cartouches rechargeables. Ces stylos ont une aiguille courte, fine et une fenêtre de doseur avec un cadran qui peut être tourné par incréments d'une ou deux unités jusqu'à quantité requise. Le dispositif est discret, durable, a un design extérieur attrayant, nécessite moins de force d'injection et certains ont une fonction de mémoire intégrée qui est particulièrement utile chez les enfants ou les patients étourdis.

Des stylos à insuline sont disponibles pour toutes les formulations d'insuline analogique et la plupart des formulations d'insuline humaine. De surcroît, presque tous sont exclusifs et conçus pour n'être utilisés qu'avec l'insuline du même fabricant, et le choix du stylo se résume au choix de l'insuline [17].

Les problèmes rencontrés lors de la prise d'insuline par injection sous-cutanée ; complications dermatologiques (cicatrisation, érythème, nodules sous-cutanés, lipohypertrophie, lipoatrophie ou dystrophie, infection cutanée localisée et abcès), la phobie des aiguilles et la prise de poids [18].

### **3. Les pompes (perfusion) :**

Perfusion sous-cutanée continue d'insuline (CSII) ou régime de pompe à insuline. La CSII implique l'utilisation d'une pompe à insuline, dont il existe de nombreux types différents. Les principales indications de leur utilisation sont :

- L'âge ; chez les enfants de moins de 4 ans, les injections quotidiennes multiples (MDI) peuvent être peu pratiques et la CSII peut être commencée dès le diagnostic ;
- Hypoglycémies répétées; chez les enfants > 12 ans ;
- Échec de l'optimisation de l'HbA1c ; chez les enfants > 12 ans.

La CSII nécessite une compréhension considérable de la part de l'enfant et de la famille pour la réussite du traitement. Cela requiert de revoir et d'affiner les connaissances sur le comptage des glucides et des stylos à insuline de rechange en cas de panne de la pompe.

Les progrès technologiques ont conduit à plusieurs systèmes d'administration de pompes à insuline disponibles pour les patients qui répondent aux critères NICE. Il existe actuellement des systèmes de pompe à insuline capables de suspendre l'administration d'insuline en prévision d'une hypoglycémie (Medtronic 640G) et d'ajuster le débit basal d'insuline tout au long de la journée (Medtronic 670G). Il existe également des systèmes hybrides en boucle fermée (CamAPS FX, Tandem T Slim X2 et Medtronic 780G) qui utilisent des algorithmes pour augmenter, diminuer ou suspendre l'administration d'insuline à l'aide d'une technologie prédictive afin de prévenir ou de minimiser l'impact de l'hyperglycémie ou de l'hypoglycémie. Il y a un ajustement continu du débit de base tout au

long de la journée en réponse aux informations fournies par le capteur du moniteur de glucose en continu (CGM).

Comme la CSII ne comporte pas d'insuline à action prolongée, l'interruption de l'administration peut entraîner une hyperglycémie et une cétose dans les 4 à 6 heures. Une défaillance de la pompe peut survenir suite à plusieurs raisons, notamment une batterie déchargée, un blocage dans le dispositif d'administration, une fuite au niveau du site de la canule ou une utilisation récurrente du même site entraînant une lipohypertrophie et une administration erratique d'insuline [19].

### **I.1.7. L'insuline par voie orale, pourquoi ?**

La sécrétion et la cinétique physiologiques de l'insuline ont un certain nombre de spécificités à reproduire pour atteindre une normoglycémie maintenue lors du DT1 :

1. À l'état basal, les besoins en insuline peuvent varier selon l'ampleur de la consommation calorique au cours des 24 heures précédentes, avec l'expérience d'une hypoglycémie, d'activité physique ou de stress aigu, et au cours de quelques d'heures pour une maladie concomitante (infection, traumatisme). Ceci est centralement régulé à travers le glucose plasmatique, détecté intra-vasculairement par la glucokinase des cellules  $\beta$ .
2. La fonction de détection est très rapide avec une régulation sur une base de 1 à 3 minutes.
3. La sécrétion d'insuline est elle-même pulsatile avec des oscillations de 3 à 10 min, ce qui est probablement nécessaire pour garantir une sensibilité rapide au changement [20].
4. L'administration d'insuline est directe dans le sang via la veine porte et, passe d'abord par le foie pour une extraction d'environ 50 % - 80% [21].
5. Une fois dans la circulation, le  $t_{1/2}$  de la concentration d'entrée est d'environ 4 à 5 min avec élimination via le récepteur de l'insuline, même si la moitié du temps d'action au niveau muscles squelettiques soit de 20 min et plus courte au niveau du foie.

En mangeant, la sécrétion d'insuline augmente considérablement, remplissant tout le volume de distribution d'insuline (environ 15 L) à une concentration bien supérieure à celle



des concentrations périphériques basales en seulement 30 minutes. Il s'agit principalement d'une réponse aux réflexes nerveux et aux hormones incrétines de la paroi intestinale, et non d'une réponse directe au glucose ou aux acides aminés des aliments. Cependant, ceux-ci modulent la chute de la sécrétion d'insuline jusqu'aux niveaux de base sur environ 4 h après un repas riche en glucides. Ainsi, les excursions de glucose sont limitées à un pic d'environ 7,0 mmol/l et ne dépassent pas 5,5 mmol/l pendant plus d'environ 30 min. Sans compter qu'il n'y a pas d'hypoglycémie tardive (< 3,0 mmol/l).

Ce contrôle performant du glucose évite sa toxicité aigüe à long terme, tout en gardant ses propriétés de carburant. A ce jour, aucun traitement d'insuline n'a réussi à relever le pari de cocher ces cases [20].

#### **I.1.7.1. Avantages de l'insuline orale**

Les voies d'administration non parentérales minimiseraient le risque pour la santé créé par l'injection répétée d'insuline, surpasseraient les complications résultant de la nécessité de techniques stériles associées aux formulations parentérales et pourraient fournir un moyen plus approprié de contrôler leur profil de libération. Malgré le succès limité de ces voies, la désirabilité de l'insuline orale encourage la poursuite des recherches. La commodité d'une pilule orale améliorerait la compliance du patient à l'insulinothérapie, et par conséquent, un meilleur contrôle métabolique serait atteint ainsi que la réduction des complications liées au diabète et de toutes leurs conséquences. Cependant, l'amélioration de la qualité de vie permise par l'insuline orale n'est pas la seule caractéristique qui en fait la voie la plus souhaitable. Jugée comme la voie alternative la plus physiologique après absorption gastro-intestinale, l'insuline permettrait une meilleure homéostasie du glucose et serait fusionnée à une hyperinsulinémie périphérique réduite (celle-ci est élevée dans le cas sous-cutané), ce qui peut déclencher une sur-stimulation délétère de la croissance, de la division cellulaire et d'autres réponses métaboliques. L'insuline orale est la méthode optimale d'administration d'insuline, car elle est sûre, rend l'hormone disponible d'une manière qui compense les anomalies métaboliques du diabète sucré et est psychologiquement et socialement acceptable [22].

### **I.1.8. Contraintes de la voie orale**

Conçu fondamentalement pour la digestion et l'absorption de nutriments, d'électrolytes et de fluides, le tube digestif doit aussi agir simultanément comme une première ligne de défense contre les toxines et les agents pathogènes exogènes. De ce fait, les médicaments protéiques administrés par voie orale, comme l'insuline, sont normalement dégradés par les barrières chimiques et enzymatiques du tube digestif. Le temps de transit moyen dans l'estomac étant 2,5 h et le temps de séjour dans l'intestin grêle 3-4 h. Additionnellement, le transport intestinal est limité en raison des barrières d'absorption présentes dans l'épithélium (figure I.6). Il est donc essentiel de comprendre les caractéristiques et la fonction de ces barrières pour concevoir un vecteur efficace d'administration [23,24].

#### **I.1.8.1. Barrière chimique**

Pour être efficace, un médicament protéique administré par voie orale doit transiter le long du tube digestif, adhérer et s'infiltrer à travers la couche de mucus, traverser l'épithélium intestinal, entrer dans la veine porte et enfin atteindre la circulation périphérique. Toutefois, de nombreux MP sont sensibles à la variation du pH dans le tube digestif. Le pH luminal varie de très acide dans l'estomac (pH 1,2 - 3,0) à légèrement basique dans l'intestin (pH 6,5 - 8,0). Ces variations de pH peuvent provoquer l'oxydation, la désamidation ou l'hydrolyse des protéines médicamenteuses induites par le pH, entraînant une perte de leur activité.

#### **I.1.8.2. Barrière enzymatique**

Les protéases gastro-intestinales digèrent généralement 94 à 98 % des protéines administrées par voie orale et produisent des fragments peptidiques et des acides aminés plus petits qui peuvent être absorbés par les entérocytes. La plupart des médicaments protéiques sont donc vulnérables à la dégradation enzymatique par les protéases présentes dans le tube digestif. Ces protéases peuvent être divisées en trois classes : les protéases luminales, membranaires et cytosoliques. Les protéases luminales sont sécrétées par le pancréas et libérées dans l'intestin grêle, tandis que les protéases membranaires et cytosoliques sont groupées aux entérocytes.

Les protéines thérapeutiques à voie orale sont soumises à une dégradation protéolytique dans l'estomac par la pepsine et, ensuite, dans l'intestin grêle par des enzymes pancréatiques telles que la trypsine, la chymotrypsine, l'élastase et les carboxypeptidases. Elles sont ensuite digérées par les aminopeptidases présentes dans la membrane de la bordure en brosse lors de leur passage à travers les entérocytes. Parmi les diverses protéases mentionnées ci-dessus, l'insuline est principalement dégradée par la trypsine, la chymotrypsine et les carboxypeptidases dans la lumière intestinale ainsi que dans la couche de mucus. En plus de l'enzyme-de-dégradation-de-l'insuline et autres enzymes spécifiques dans le cytosol. Enfin, même si une quantité significative d'un médicament protéique réussit à traverser l'épithélium intestinal, un métabolisme de premier passage important par les microsomes du foie réduit encore la fraction de la dose entrant dans la circulation systémique. Expliquant, le peu de médicaments protéiques survivant à l'attaque enzymatique, lors de l'absorption dans le tractus GI.

### **I.1.8.3. Barrières d'absorption**

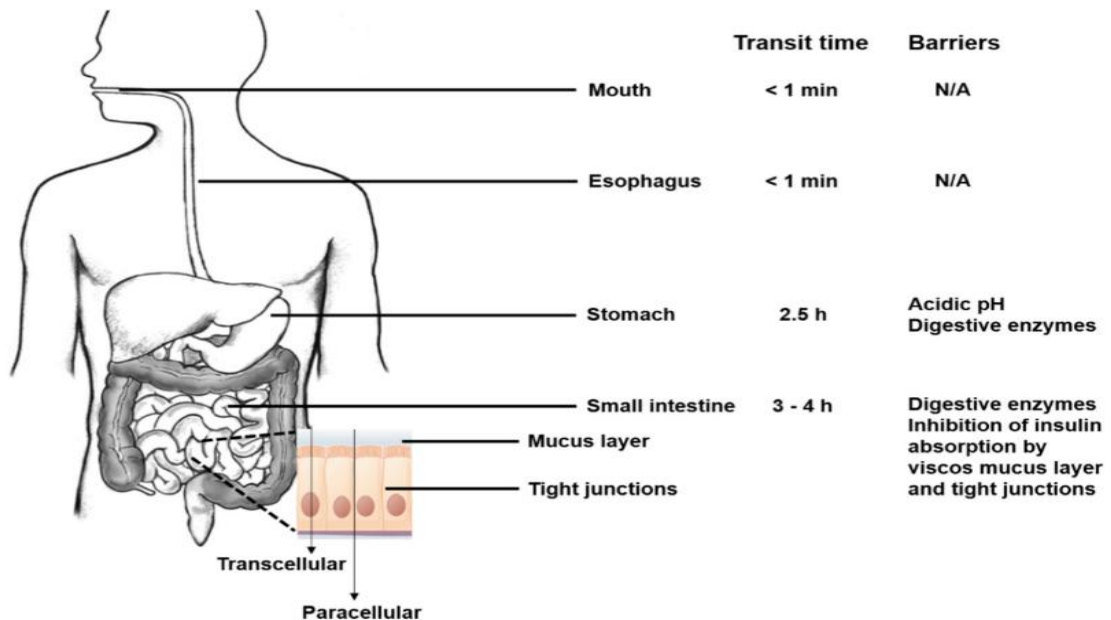
Les barrières d'absorption sont toutes aussi difficiles. La première barrière rencontrée par ces médicaments est la couche de mucus, qui fonctionne comme une barrière diffusionnelle et enzymatique. Physiologiquement, le mucus est continuellement sécrété et détaché de la surface épithéliale, renouvelé toutes les 4 à 5 h. Cette paroi semi-perméable, est perméable aux des nutriments, à l'eau et aux petites molécules, tout en restant imperméable aux bactéries et aux agents pathogènes. Ainsi, un médicament administré par voie orale doit s'infiltrer à travers la couche non remuée de mucus avant d'atteindre la surface de l'épithélium intestinal. De plus, il faut prendre en considération la répulsion électrostatique entre les médicaments protéiques et la couche de mucus (chargée négativement), empêchant le contact étroit avec les cellules épithéliales absorbantes.

La deuxième barrière est l'épithélium intestinal. Le passage peut se faire à travers l'épithélium, soit par la voie transcellulaire, ou la voie paracellulaire. La quasi-totalité des médicaments cliniques administrés par voie orale sont absorbés par diffusion passive transcellulaire, ce qui est favorisé par une perméabilité élevée et un gradient de concentration élevé à travers la membrane cellulaire. Les membranes cellulaires étant basiquement constituées de bicouches phospholipidiques, l'absorption par diffusion passive est largement limitée aux médicaments lipophiles dont le poids moléculaire ( $M_w$ ) est inférieur à 700 Da.

Bien qu'elle augmente proportionnellement à la lipophilie du médicament, la perméabilité intestinale est inversement proportionnelle au  $M_w$  des médicaments. La plupart des médicaments protéiques sont hydrophiles avec un  $M_w$  supérieur à 3000 Da, d'où la difficulté du passage par les membranes cellulaires.

Le transport à travers l'épithélium intestinal par la voie paracellulaire est minime, en raison des jonctions serrées entre les cellules voisines. Seuls les petits médicaments hydrophiles, dont le  $M_w$  est inférieur à 200 Da et  $R < 15\text{\AA}$ , peuvent être transportés par la voie paracellulaire. En l'absence d'amplificateurs d'absorption, les protéines sont généralement exclues de cette voie. Par conséquent, malgré l'existence de multiples voies de transport, la plupart des médicaments protéiques présentent une absorption inadéquate après administration orale [24,25].

En ce qui concerne l'insuline, sa tendance à l'agrégation à des concentrations supérieures à 100nM, la fait passer d'une dimension monomérique d'environ 12 - 14Å à une conformation hexamérique plus volumineuse, entravant son transport à travers l'épithélium intestinal [26].



**Figure I.6 :** Segments du tube digestif et les obstacles à une administration efficace de l'insuline par voie orale.

#### **I.1.8.4. Contrainte de formulation**

La stabilité de l'insuline, est une contrainte indéniable, en raison de sa sensibilité au pH, à la température, à l'agitation, aux acides, aux bases et aux ions de métaux lourds. Tout changement dans l'environnement externe peut entraîner une modification de sa structure tridimensionnelle, qui à son tour peut modifier son activité biologique donc biodisponibilité (ceci sera abordé plus précisément en chapitre 2) [26]. Sans oublier, le thème de la conservation, du stockage et de la projection à grande échelle. La composition ne doit comporter aucun élément ayant un risque pour la santé.

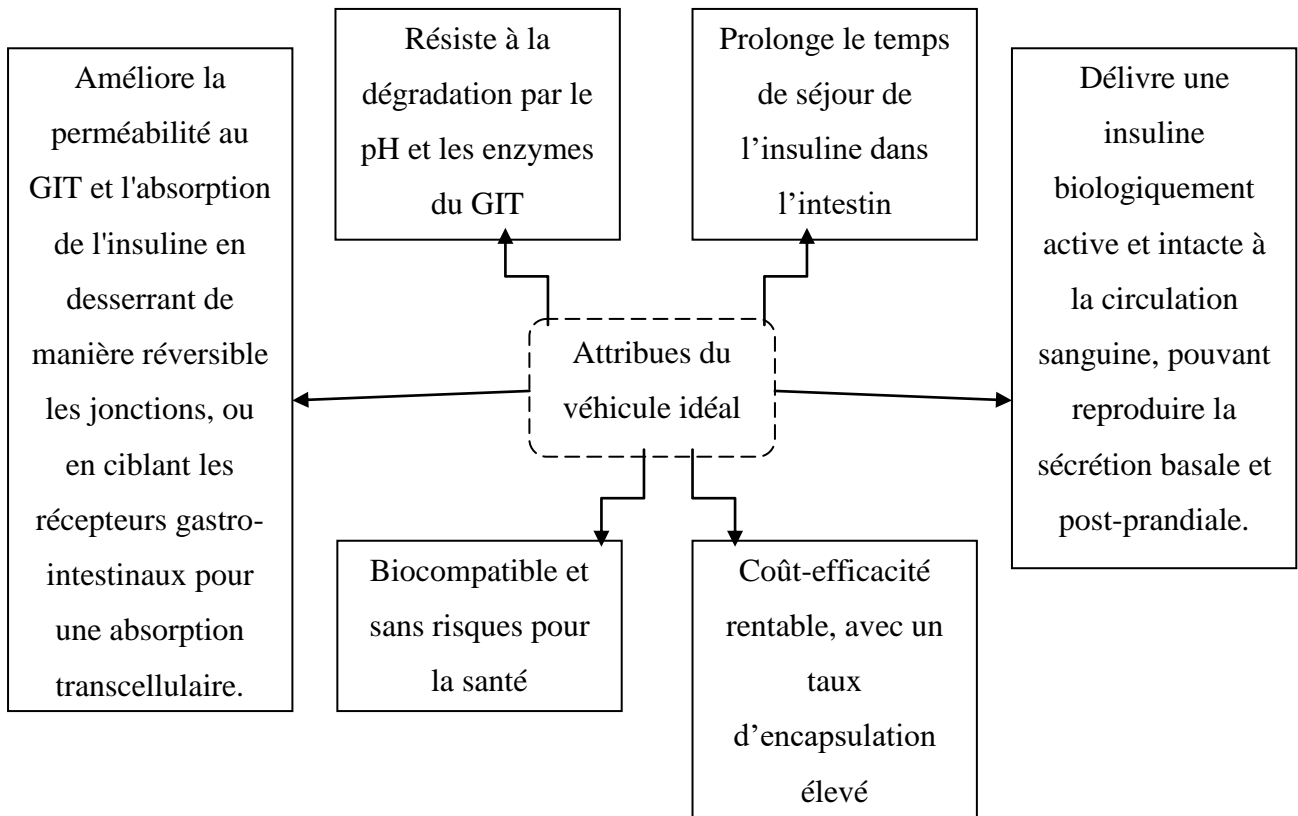
Les scientifiques ont tenté de surmonter ces obstacles lors de l'administration orale d'insuline en exploitant maintes stratégies de formulation, dont la PEGylation, l'endocytose médiée par récepteurs, les peptides pénétrant dans les cellules ainsi que la création de nanoparticules, microparticules, d'hydrogels, de technologies innovantes de comprimés, capsules avancées et même des formulations à base de solutions ioniques, des patchs GIT, etc [26].

## **I.2. Microencapsulation**

En septembre 2019, le comprimé semaglutide de Novo Nordisk (Rybelsus®) est entré sur le marché. Bien qu'il s'agisse d'une grande avancée dans les médicaments peptidiques oraux pour le traitement du diabète sucré, la biodisponibilité orale de Rybelsus® n'est que de 0,4% à 1% après administration orale [27].

La faible biodisponibilité orale des médicaments peptidiques comme l'insuline, qui ont une faible lipophilie et un poids moléculaire élevé, est majoritairement due à leur instabilité dans l'environnement physiologique gastro-intestinal et à leur mauvaise perméabilité épithéliale [27, 28].

Au fil des années, les systèmes d'administration de médicaments microparticulaires composés de biopolymères ont été étudiés pour administrer l'insuline de manière spécifique et contrôlée. Les microparticules, lorsqu'elles sont formulées avec des excipients et des polymères appropriés, sont des systèmes d'encapsulation prometteurs pour protéger la protéine/peptide de la dégradation *in vitro* et *in vivo*, améliorer sa stabilité, fournir un rapport surface/volume accru pour la libération du peptide et l'absorption gastro-intestinale, réduire les effets indésirables et donc améliorer la biodisponibilité [29]. Sur cette base, voici un schéma explicatif des différents critères structurant le véhicule (nano/microcapsules) idéal à l'administration orale (figure I.7) :



**Figure I.7 :** Schéma récapitulatif des attribues du véhicule nano/micro-particulaire idéal [30].

Dans cette seconde partie nous entamerons les techniques de microencapsulation avec leur évaluation, nous distinguerons les facteurs déterminants pour la stabilité de l'insuline et pour le rendement de la microencapsulation par émulsion/ évaporation de solvant, et finirons sur la cinétique de libération de ces microcapsules.

### I.2.1. Principe

La microencapsulation regroupe l'ensemble des technologies qui permettent la préparation de microparticules individualisées, constituées d'un matériau enrobant contenant une matière active. Les microparticules présentent une taille comprise entre 1  $\mu\text{m}$  et 1 mm et contiennent typiquement entre 5 et 90 % (en masse) de matière active. Les matières actives sont d'origines très variées : principes actifs pharmaceutiques, actifs cosmétiques, additifs alimentaires, produits phytosanitaires, essences parfumées, micro-organismes, cellules, ou encore catalyseurs de réaction chimique... Les matériaux enrobants sont des polymères d'origine naturelle ou synthétique, ou des lipides. Les microparticules obtenues présentent deux types de morphologies (figure I.8) :

- soit une microcapsule, c'est-à-dire une particule réservoir constituée d'un cœur de matière active liquide (plus ou moins visqueux) ou solide, entouré d'une membrane solide continue de matériau enrobant ;
- soit une microsphère, c'est-à-dire une particule constituée d'un réseau macromoléculaire ou lipidique continu formant une matrice dans laquelle se trouve finement dispersée la matière active, à l'état de molécules, de fines particules solides ou encore de gouttelettes de solutions [31].

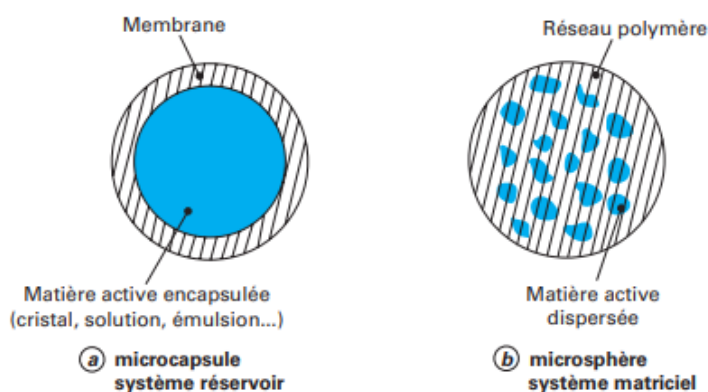


Figure I.8 : Morphologie des microparticules.

### I.2.2. Emulsion avec évaporation du solvant

La technique de microencapsulation par évaporation de solvant est largement appliquée dans l'industrie pharmaceutique pour obtenir une libération contrôlée d'un médicament. Cette libération contrôlée du médicament présente des avantages cliniques remarquables : réduction de la fréquence de dosage, plus de commodité et d'acceptation pour les patients, et ciblage du site d'action, ce qui se traduit par une efficacité accrue.

Constituée de deux étapes majeures étant l'émulsification puis l'élimination du solvant, diverses approches sur cette méthode sont disponibles et dépendent de l'hydrophilie ou de la lipophilie du principe actif :

1. Pour les PAs insolubles ou peu solubles dans l'eau : la méthode huile dans l'eau (o/w) est fréquemment utilisée. Cette méthode est la plus simple et les autres méthodes dérivent de celle-ci. Elle comporte quatre grands niveaux : (1) dissolution du médicament hydrophobe dans un solvant organique contenant le polymère ; (2)



émulsification de cette phase organique, appelée phase dispersée, dans une phase aqueuse appelée phase continue; (3) extraction du solvant de la phase dispersée par la phase continue, accompagnée de l'évaporation du solvant, transformant les gouttelettes de la phase dispersée en particules solides ; et (4) récupération et séchage des microsphères pour éliminer le solvant résiduel.

Les dérivés de ce procédé comprennent la méthode du co-solvant (o/w) ; lorsque le médicament n'est pas soluble dans le solvant principal, un second solvant est utilisé. La méthode de dispersion s/o/w ; où le médicament est dispersé sous forme de poudre solide dans la solution polymérique de solvant organique. La méthode non-aqueuse o/o ; la phase aqueuse est remplacée par une huile (ex. l'huile minérale).

2. Pour les PAs hydrophiles : la méthode de la double émulsion w/o/w, où la solution aqueuse contenant la molécule thérapeutique est émulsionnée avec une phase organique polymérique (w/o), cette émulsion est ensuite dispersée dans une seconde solution aqueuse formant une seconde émulsion (double émulsion w/o/w) [32].

### **I.2.2.1. Facteurs déterminants**

Durant les maintes procédures employées, compte nombre de facteurs influençant les propriétés des microparticules finales ; nous essayerons d'en énumérer le maximum.

#### **I.2.2.1.1. Matières premières**

Composée de plusieurs phases ; la microencapsulation repose sur le choix du polymère, du solvant et des tensioactifs.

##### **I.2.2.1.1.1. Polymère**

La biodégradabilité ou la biocompatibilité est une propriété essentielle pour le polymère utilisé en applications pharmaceutiques. La "biodégradabilité" signifie que les composants sont dégradés en segments inoffensifs qui sont soit métabolisés, soit excrétés. La "biocompatibilité" signifie que le composant doit être physiologiquement tolérable et ne doit pas provoquer de réaction locale ou systémique indésirable après administration [32].

Les polymères biodégradables ont été largement classés en deux grandes catégories en fonction de leur origine en tant que polymères naturels et synthétiques. Les polymères

biodégradables naturels peuvent être obtenus à partir de plantes, d'animaux ou de micro-organismes, tandis que les polymères biodégradables synthétiques sont synthétisés chimiquement. Quelques exemples de polymères naturels biodégradables sont le dextrane, la gélatine, l'alginate, le chitosane, l'agarose et l'acide hyaluronique. Plusieurs polymères ont été synthétisés pour délivrer des médicaments, des macromolécules, des protéines et ceux-ci peuvent être manipulés à diverses fins en incorporant plusieurs groupes labiles tels que l'ester, le carbonate, l'anhydride, l'amide, l'urée, etc. dans leur squelette. Le polymère naturel présente certains avantages tels que la biocompatibilité, la biodégradabilité et le faible coût, tandis que les polymères synthétiques tels que PLGA (poly (acide lactique-co-acide glycolique)) et PELA (polyéthylène acide lactique) offrent une meilleure propriété de réticulation [33].

Des polymères non biodégradables présentant une bonne biocompatibilité sont également utilisés comme vecteurs de libération. L'éthylcellulose (dégradable mais non biodégradable) peut être administrée par voie orale pour protéger le médicament du tractus gastro-intestinal ou administrée par voie intraduodénale pour une absorption intestinale prolongée. Les microsphères de polyméthacrylate de méthyle (biocompatible mais non dégradable) sont largement utilisées comme matériau de ciment osseux dans la libération d'antibiotiques pour les infections osseuses (telles que l'ostéomyélite) et les tumeurs osseuses. Un retrait chirurgical est ensuite nécessaire car le polyméthacrylate de méthyle n'est pas dégradable, celui-ci est également utilisé comme polymère modèle pour l'optimisation des processus à grande échelle (jusqu'à un lot de 100 L) dans les travaux de Maa et Hsu (1996), car il s'est avéré avoir un comportement similaire à celui du PLGA du point de vue de l'ingénierie et il est beaucoup moins cher que le PLGA.

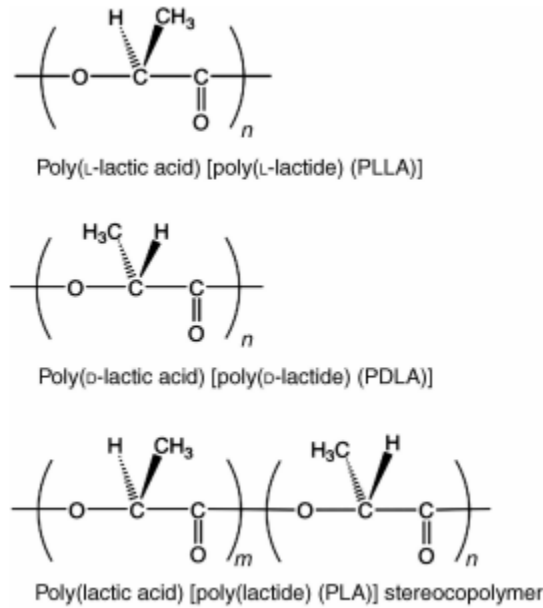
Le choix du polymère utilisé comme support de médicament dépend également de la vitesse de libération souhaitée, qui est essentiellement déterminée par les propriétés physiques du polymère. Si un polymère ne peut offrir une libération satisfaisante, nous pouvons opter pour un copolymère, construit à partir de deux polymères existants, ses propriétés sont améliorées puisqu'il possède deux segments sur la chaîne. Dans le travail de Huang et al. (1997), un copolymère (PEG/PLA) a été synthétisé à partir de polyéthylène glycol (PEG) et d'homopolymères d'acide polylactique (PLA) afin d'augmenter la vitesse de dégradation.

Les polymères et copolymère de PLA et PLGA, sont les plus couramment employés avec l'approbation de la FDA (Food and Drug Administration) [32].

❖ **Acide polylactique (PLA) :**

Le PLA est un polymère chiral contenant des atomes de carbone asymétriques avec une conformation hélicoïdale. Deux isomères optiques, l'acide L- et D-lactique, sont utilisés pour synthétiser le PLA. L'acide lactique peut être produit biologiquement ou chimiquement. Par fermentation, il existe exclusivement sous forme d'acide L-lactique et sa polymérisation par condensation conduit à du PLLA de faible poids moléculaire, tandis que l'acide lactique produit par des procédés chimiques pourrait être obtenu avec divers rapports de L- et D -acide lactique. Les réactions chimiques qui forment l'acide lactique dimère cyclique en tant qu'étape intermédiaire de la production de PLA pourraient entraîner des chaînes macromoléculaires avec des unités monomères LLA et DLA et la voie de polymérisation par ouverture de cycle (ROP) présente l'avantage de produire des polymères de haut poids moléculaire tout en permettant le contrôle des propriétés du PLA en ajustant les ratios et la séquence des unités d'acide L- et D-lactique.

Le PLA commercial est un mélange de PLLA et de PDLA ou de copolymère PDLLA (figure I.9), obtenu par la polymérisation de LLA et DLLA, respectivement. De nombreuses propriétés importantes du PLA sont contrôlées par le rapport des énantiomères D, L et leur séquence d'arrangement. Le PLLA constitue la principale fraction du PLA dérivé de sources renouvelables puisque la majorité de l'acide lactique obtenu à partir de sources biologiques existe sous forme de LLA. Le PLA avec une teneur en PLLA supérieure à 90 % a tendance à être cristallin tandis que celui avec une pureté optique inférieure est amorphe. La température de fusion ( $T_m$ ), la température de transition vitreuse ( $T_g$ ) et la cristallinité du PLA diminuent avec la diminution des quantités de PLLA [34].



**Figure I.9 :** Structure chimique des PLA's.

Ces PLA et copolymères appartiennent à la famille des polyesters aliphatiques, et donc leurs groupements esters sont dégradés hydrolytiquement en présence d'eau. Ce sont des matériaux solides insolubles dans l'eau. La dégradation du PLA se fait par la scission des chaînes principales ou des chaînes latérales et peut être causée par nombre de mécanismes chimiques (dégradation mécanique, réactionnelle, thermique et photonique) ou biologiques (par microorganisme ou enzymatique). La biodégradabilité ou la vitesse de biodégradation du PLA dépend de la structure, de la morphologie, la cristallinité (avec une relation inverse), du poids moléculaire (avec une proportionnalité inverse), de l'introduction de fonctionnalité, d'additifs et des conditions environnementales [35].

Afin de prévoir la compatibilité et la solubilité du PLA dans un solvant donné. Les HSP (Hansen Solubility Parameters) furent élaborés, rendant le calcul plus pratique d'après la similitude entre les paramètres thermodynamiques, comme suit dans cette équation :

$$distance = \left[ 4(\delta D_s - \delta D_p)^2 + (\delta P_s - \delta P_p)^2 + (\delta H_s - \delta H_p)^2 \right]^{1/2} \dots\dots\dots (1)$$

Où :

$\delta D_s$  et  $\delta D_p$  ; Coefficient de dispersion pour le solvant et le polymère.

$\delta P_s$  et  $\delta P_p$  ; Coefficient de liaison polaire pour le solvant et le polymère.

$\delta H_s$  et  $\delta H_p$  ; Coefficient de liaison hydrogène pour le solvant et le polymère.

Lorsque la distance = 0, le solvant et le polymère sont si thermodynamiquement similaire que le polymère sera très soluble. Plus la distance augmente, plus la solubilité diminue. Au-dessus d'une certaine distance la solubilité est négligeable. Le calcul indique que les HSP (dD, dP, dH) pour le PLA sont (18,6 ; 9,9 ; 6,0) et que le rayon de 10,7 est assez détendu, ce qui signifie qu'une gamme assez large de solvants dissoudra ou au moins gonflera le PLA [36].

### I.2.2.1.1.2. Solvant

Un solvant approprié doit répondre aux exigences suivantes :

- pouvoir dissoudre le polymère choisi ;
- être faiblement soluble dans la phase continue ;
- avoir une volatilité élevée et un point d'ébullition bas ;
- avoir une faible toxicité [32].

**Tableau I.2** : Exemples de solvants communs à la microencapsulation [37].

Solvant	Solubilité (% m/m) à 20°C		Point d'ébullition (°C)	Classe du solvant (USP)	Limite (ppm)
	S / W	W / S			
Dichlorométhane	2.00	0.20	39.8	Class 2	600
Acétate de butyle	0.68	1.20	126.6	Class 3	5000
Acétate d'éthyle	8.70	3.30	76.7	Class 3	5000
Formiate d'éthyle	13.60	4.50	54.7	Class 3	5000
Butanone	26.80	11.80	79.6	Class 3	5000

S/W : solvant dans l'eau, W/S : eau dans solvant

Le dichlorométhane est le solvant le plus courant pour l'encapsulation utilisant la technique d'évaporation de solvant en raison de sa volatilité élevée, de son point d'ébullition bas et de sa haute immiscibilité avec l'eau (tableau I.2). Sa pression de vapeur saturante élevée par rapport aux autres solvants (453 mbar à 20°C) promet un taux d'évaporation élevé, ce qui raccourcit la durée de fabrication des microsphères. Cependant ce solvant est confirmé cancérigène selon les données de l'EPA (Environmental Protection Agency) et les recherches sont en cours pour trouver des substituts moins toxiques.

L'acétate d'éthyle présente un potentiel prometteur en tant que substitut. Mais du fait de la miscibilité partielle de l'acétate d'éthyle dans l'eau, les microsphères ne peuvent pas se former si la phase dispersée est introduite directement dans la phase continue. L'extraction soudaine d'une grande quantité d'acétate d'éthyle de la phase dispersée fait précipiter le polymère en agglomérats semblables à des fibres. Pour résoudre ce problème créé par la miscibilité du solvant avec l'eau, trois méthodes peuvent être utilisées :

- la solution aqueuse est pré-saturée avec le solvant ;
- la phase dispersée est d'abord émulsionnée dans une petite quantité de solution aqueuse ; après la formation de gouttes, cette émulsion est versée dans une grande quantité de solution aqueuse ;
- la phase dispersée est émulsifiée dans une petite quantité de solution aqueuse, la solution est agitée et le solvant s'évapore conduisant à la solidification des microsphères.

Après avoir utilisé des consignes sur-mentionnées, les microsphères sont fabriquées avec succès. Toutefois, celles préparées par le DCM sont sphériques et plus uniformes, tandis que l'utilisation d'acétate d'éthyle donne des particules qui semblent partiellement effondrées. De même pour l'efficacité d'encapsulation du médicament, qui diminue de manière significative par rapport aux microsphères de DCM. Nous supposons que cela est dû à la forte solubilité de l'acétate d'éthyle dans l'eau, entraînant la perte du médicament [32].

#### **I.2.2.1.1.3. Tensioactifs**

Le tensioactif, est fréquemment employé pour la dispersion de deux phases non miscibles et pour la stabilisation de l'émulsion obtenue. Il réduit la tension superficielle de la phase continue, évite la coalescence et l'agglomération des gouttes.

Un tensioactif adapté doit être capable de donner aux microsphères une taille régulière et une étroite distribution de taille, garantissant une libération du PA plus prévisible. Avant de choisir le type de tensioactif et sa concentration, il est important de connaître la polarité des deux phases non miscibles, la taille de microsphères souhaitée et la demande sur la sphéricité des microsphères. Les tensioactifs pour émulsions sont amphiphiles, lorsqu'il est présent dans une émulsion, le tensioactif recouvre la surface des gouttes avec sa partie hydrophobe et dirige sa partie hydrophile vers l'eau.

Il existe quatre types différents de tensioactifs classés selon la nature de la partie hydrophile de la molécule : anionique, cationique, amphotère et non ionique. Les tensioactifs anioniques libèrent une charge négative dans la solution aqueuse. Ils ont un niveau HLB (équilibre hydrophile-lipophile) relativement élevé car ils ont tendance à être hydrophiles. Les tensioactifs cationiques au contraire libèrent une charge positive et les amphotères se comportent comme les anioniques à pH alcalin et comme les cationiques à pH acide. Les tensioactifs non ioniques n'ont pas de charge.

Pour l'émulsion de dichlorométhane/eau, les stabilisants typiques comprennent : non ionique : PVA partiellement hydrolysé (alcool polyvinylique), méthylcellulose, tween et span ; anionique : dodécylsulfate de sodium (SDS) ; cationique : bromure de cetyltriméthylammonium (CTAB) [32].

Les tensioactifs peuvent également être classés en fonction de leurs propriétés physicochimiques. Ces propriétés sont exprimées au travers d'un nombre adimensionnel : le HLB (Hydrophilic-Lipophilic Balance). Le HLB représente le pourcentage en masse du pôle hydrophile par rapport à la masse du tensioactif. La première échelle établie par Griffin (1949) permettait de classer les tensioactifs entre 0 et 20. Une autre échelle, basée sur la contribution des différents pôles, a été ensuite développée par Davies (1957). Cette échelle s'étend aux tensioactifs ioniques et permet d'obtenir des valeurs de HLB allant jusqu'à 50 [38].

– pour un tensioactif polyoxyéthyléné :

$$\text{HLB} = \frac{\text{Masse moléculaire de l'hydrophile}}{\text{Masse moléculaire totale}} \times 20$$

– pour un ester d'acide gras :

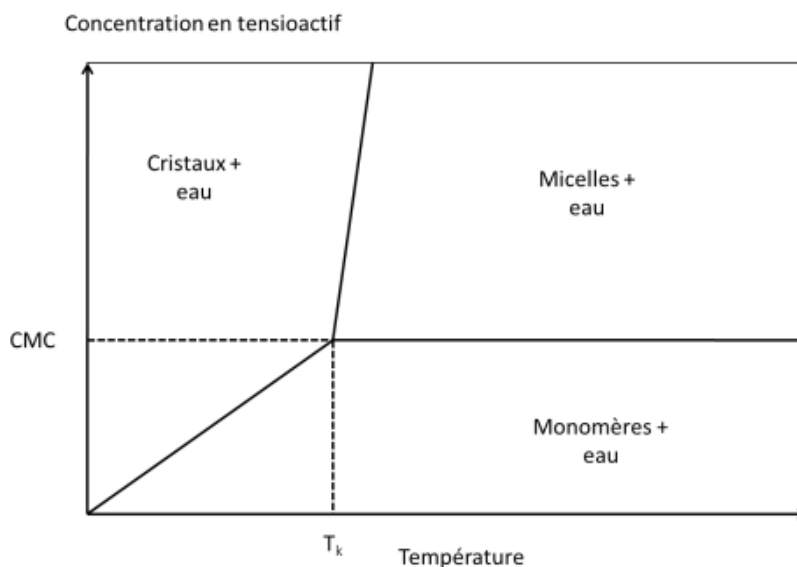
$$\text{HLB} = 1 - \left( \frac{\text{Indice de saponification de l'ester}}{\text{Indice d'acide de l'acide gras}} \right) \times 20$$

En outre, le système HLB ne donne aucune indication ni sur la stabilité de l'émulsion, ni sur les structures optimales du tensioactif non ionique à employer et peut être utilisé avec une certaine fiabilité seulement dans des séries homologues de tensioactifs éthoxylés. Il est dépourvu d'utilité pour les émulsions avec des systèmes mixtes ioniques/non ioniques, avec des phases huileuses complexes et pour les dispersions [39].

Parmi les tensioactifs, le PVA partiellement hydrolysé est majoritairement utilisé car il donne les plus petites microsphères. L'ajout de tensioactif diminue la tension superficielle de la phase continue et la diminution de celle-ci minimise la taille des particules. Cependant, en raison de la concentration micellaire critique (CMC), la tension superficielle ne peut pas diminuer à l'infini. Lorsque la concentration de tensioactif atteint un certain niveau, la surface de la solution est complètement chargée. Tout ajout supplémentaire de tensioactif se disposera sous forme de micelles et la tension superficielle de la phase aqueuse ne diminuera plus [32].

La conformation en micelles se forme à partir de la concentration micellaire critique (CMC) et de la température de Krafft ( $T_K$ ) (voir figure I.10). Si la formulation se situe sous la CMC, le film interfacial n'est pas saturé en tensioactifs et la stabilisation du système est insuffisante. Au-dessus de la CMC, le système est stable car saturé. De plus, l'excès de tensioactif peut apporter des propriétés intéressantes pour la formule (propriétés solubilisantes des micelles) [38].





**Figure I.10 :** Diagramme de phase simplifié d'un tensioactif.

Les excipients pharmaceutiques en formulations, notamment les tensioactifs non ioniques, modifient la fonction des protéines transporteuses membranaires, affectant ainsi le transport des médicaments. Le principal corpus de preuves à cet égard repose sur des expériences *in vitro* utilisant des modèles de culture cellulaire ou des tissus excisés, alors que les études précliniques disponibles dans la littérature sont limitées. Peu d'études ont cherché à savoir si les surfactants réduisent le transport membranaire et augmentent ainsi la biodisponibilité orale ; et aucune étude *in vivo* n'a étudié si les excipients inhibent les porteurs, et pourraient donc diminuer la biodisponibilité orale. Par conséquent, davantage d'études précliniques sont nécessaires pour déterminer si les surfactants à une concentration susceptible d'être atteinte dans la lumière intestinale peuvent modifier l'exposition des substrats de transporteurs et revoir leur innocuité [40].

#### I.2.2.1.2. Conditions opératoires

Dans le but de synthétiser l'ensemble de paramètres entrants en jeu, nous débutons par citer les lois empiriques connues liées, puis à la fin, nous résumerons les effets de chaque paramètre dans le tableau I.3.

##### I.2.2.1.2.1. Viscosité

Nous avons deux voies possibles :

- **Le diamètre de Sauter :**

$$d_{32} = A \left( \frac{\mu_d}{\mu_c} \right)^{0.25} \dots\dots\dots (2)$$

Où  $d_{32}$  est le diamètre moyen des microsphères,  $\mu_d$  est la viscosité de la phase dispersée,  $\mu_c$  la viscosité de la phase continue et A est un coefficient qui dépend de plusieurs autres facteurs (qu'on verra plus bas) [32].

- **La déformation des gouttelettes :** dû à l'évaporation du solvant ;

$$M = \frac{\eta_d}{\eta_s}$$

$$Ca = \frac{\gamma \eta_s \alpha}{\Gamma} \dots\dots\dots (3)$$

Deux paramètres contrôlent la déformation des gouttelettes ; M représente le rapport de viscosité entre la phase dispersée ( $\eta_d$ ) et la phase continue ( $\eta_s$ ), Ca est le nombre capillaire,  $\gamma$  est le taux de cisaillement,  $\alpha$  est la taille des gouttelettes et  $\Gamma$  est la tension interfaciale entre la gouttelette et la phase continue phase. Généralement, un indice Ca élevé (forces visqueuses élevées ou tension interfaciale faible) et/ou un indice M faible conduisent à des conditions favorisant la déformation voire la rupture des gouttelettes. Les nombres Ca et M peuvent être de bons indicateurs de la forme des particules finales [41].

**I.2.2.1.2.2. Agitation**

La corrélation la plus basique et la plus employée est basée sur la théorie de Kolmogoroff, elle s'exprime par :

$$\frac{d_{\max}}{D} = c_1 \left( \frac{\rho_c N^2 D^3}{\sigma} \right)^{-3/5} \dots\dots\dots (4)$$

Dans cette équation,  $d_{\max}$  est la plus grande taille de goutte pouvant exister sous turbulence, D est le diamètre de l'agitateur (m),  $\rho_c$  est la densité de la phase continue ( $\text{kg/m}^3$ ), N est la vitesse d'agitation (tours/s) ,  $\sigma$  est la tension interfaciale entre la phase dispersée et la

phase continue (N/m) et  $c_1$  est une constante. La valeur de la constante  $c_1$  est déterminée expérimentalement. Le diamètre de Sauter  $d_{32}$  est proportionnelle au diamètre maximal de la  $d_{\max}$ .

$$d_{32} = c_2 d_{\max} \dots\dots\dots (5)$$

Où  $c_2$  est une constante.

D'autres termes peuvent être introduits dans l'équation pour inclure l'influence des facteurs tels que la fraction volumique de la phase dispersée sur la phase continue ainsi que leur rapport de viscosité.

$$\frac{d_{32}}{D} = c_3 (1 + c_4 \Phi) \left( \frac{\rho_c N^2 D^3}{\sigma} \right)^{-3/5}$$

$$\frac{d_{32}}{D} = c_5 \Phi \left( \frac{\rho_c N^2 D^3}{\sigma} \right)^{-3/5} \left( \frac{\mu_d}{\mu_c} \right)^{0.25} \dots\dots\dots (6)$$

Sachant que  $c_3$  à  $c_5$ ; sont des constantes et que la valeur de  $c_5 \Phi ((\rho_c N^2 D^3)/\sigma)^{-3/5} D$  égale à A [32].

D'un autre point de vue, l'énergie surface  $E_s$  d'une émulsion au diamètre  $d$ , est donnée par :

$$E_s = \frac{6V\sigma}{d} \dots\dots\dots (7)$$

Où  $\sigma$  est la tension interfaciale entre les deux phases et  $V$  représente le volume total de la phase dispersée. L'énergie de cisaillement est usée pour fournir l'énergie de surface [41].

**I.2.2.1.2.3. Quantité de PA en phase dispersée**

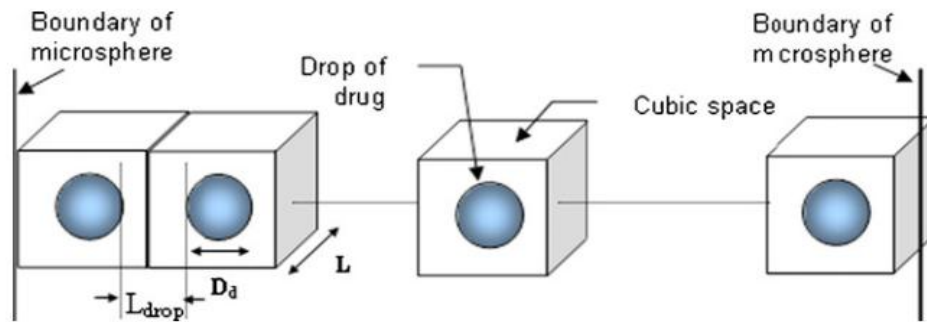
Supposons que le médicament (solide ou en solution aqueuse) est dispersé de manière homogène à l'intérieur de la microsphère. Le médicament forme des gouttes sphériques et la distance entre chaque goutte est égale. En supposant que la charge de PA est  $N_d$  (% , v/v) dans

la phase dispersée et qu'une goutte de diamètre  $D_d$  dans un espace cubique de longueur  $L$ ,  $N_d$  peut prendre la forme suivante :

$$N_d = \frac{(\pi/6)D_d^3}{L^3} \dots\dots\dots (8)$$

En prenant en compte que la longueur entre chaque goutte  $L_{drop} = L - D_d$  ; (figure I.11). Nous obtenons la loi suivante :

$$L_{drop} = D_d \left[ \left( \frac{\pi}{6N_d} \right)^{1/3} - 1 \right] \dots\dots\dots (9)$$



**Figure I.11** : Schéma du modèle pour le calcul de la distance entre les gouttes de PA [32].

#### I.2.2.1.2.4. Evaporation du solvant

Le processus de formation des particules s'accompagne de l'élimination du solvant, et il a été rapporté que le taux d'extraction/d'évaporation du solvant a une influence sur les caractéristiques définitives des particules. Pendant un long processus d'évaporation, les gouttelettes subissent une période d'instabilité prolongée lors de la solidification pouvant entraîner leur allongement durant l'agitation.

De plus, le taux d'évaporation du solvant semble affecter la structure interne des particules. Dans des recherches récentes, il a été observé que les particules obtenues à basse température (4°C) présentaient une structure dure et dense, tandis que celles à 26° C et 39°C avaient une structure «en nid d'abeille» et l'autre creuse, respectivement.

Le taux d'évaporation du solvant est fortement lié à sa volatilité. Katou et al. ont élucidé la cinétique du processus d'extraction/évaporation par solvant avec un modèle mathématique pour prédire la durée de l'extraction par solvant dans une émulsion huile-eau (H/E) :

$$nd = k_{sa} \alpha P_{evp}^{slv} \dots\dots\dots (10)$$

Où  $nd$  est le flux à travers la solution/la surface du film, c'est-à-dire le taux d'évaporation,  $k_{sa}$  est le coefficient de transfert de masse,  $\alpha$  représente l'activité du solvant dans la solution et  $P_{evp}^{slv}$  est la pression de vapeur du solvant pur. Il a également été constaté que le solvant résiduel dans la phase d'extraction affecte de manière significative la morphologie des particules finales [41].

**Tableau I.3 :** Paramètres opératoires et leur influence sur les microcapsules finales [32,41].

<b>Elément</b>	<b>Influence</b>
<b>Viscosité de la phase dispersée</b>	L'augmentation de la viscosité améliore également le taux d'encapsulation du PA, fait grossir les particules et leur confère une surface lisse et une libération lente.  La concentration du polymère et son poids moléculaire sont tous deux proportionnels à la viscosité de la phase dispersée (la baisse de température a aussi le même effet).
<b>Agitation</b>	Si une taille de gouttelette plus petite est souhaitée, alors une énergie de cisaillement plus élevée est nécessaire.
<b>Quantité de PA</b>	Il a été observé que l'augmentation de la quantité de PA améliore l'efficacité de l'encapsulation. Les auteurs supposent que la perte de médicament dans la phase continue est constante alors que les autres conditions opératoires ne changent pas. Évidemment, il y a une limite pour la quantité de PA ( $N_d = 50\%$ avant solidification, donne $L_{drop} = 0$ ). Sauf que, la microsphère rétrécit en raison de l'élimination du

	<p>solvant alors le calcul de la charge limite doit se faire en fonction de la taille après solidification.</p> <p>Si la limite est dépassée, le taux d'encapsulation diminue et la surface des capsules devient poreuse et irrégulière.</p>
<b>Pression et température</b>	<p>Avec la température, le diamètre s'élève mais le taux d'encapsulation baisse.</p> <p>Avec une pression réduite, le diamètre diminue et la surface des microcapsules est plus lisse (dense).</p>

### I.2.3. Stabilité de l'insuline

L'insuline forme des agrégats de type amyloïdes ou sphérulites, ces fibrilles coexistent à faible pH avec déstabilisation thermique. Celles-ci, ont été découvertes près des sites d'injection SC causant des inflammations répétées et délétères, nommées amylose dérivée de l'insuline (IDA) ou «boule d'insuline». Le nombre de cas d'IDA rapportés a augmenté de manière significative au cours des dernières années. Lorsque l'IDA se produit, il entraîne un mauvais contrôle glycémique et également une occlusion du cathéter en cas de perfusion continue. Qui plus est, ces agrégats sont positifs à la thioflavine T (ThT), ce qui indique la présence d'une structure fibrillaire croisée comme on le trouve pour les protéines amyloïdes toxiques telles que la  $\tau$ - ou l' $\alpha$ -synucléine [42].

#### I.2.3.1. Facteurs d'agrégation

L'agrégation des protéines peut être induite par une grande variété de facteurs in vitro et in vivo. Les facteurs environnementaux in vitro comprennent la température, le pH, la présence de co-solvant, les ions métalliques, la congélation et la décongélation, le stress dû à l'agitation et les surfactants (tensioactifs). Ces facteurs peuvent déplier partiellement la protéine ou augmenter la propension de la protéine à former des intermédiaires partiellement repliés, conduisant à l'agrégation de la protéine. D'autre part, les éléments in vivo se déroulant à la biosynthèse, par exemple un changement ou une mutation dans la chaîne polypeptidique du chaperon, assurant le repliement correcte, conduisant à une altération de la liaison avec la

cible voire son annulation. Sinon, des défauts dans la machinerie de synthèse des protéines (tels qu'une traduction incorrecte, une mauvaise incorporation d'acide aminé, etc.) peuvent également servir de producteurs d'agrégats, ou la distorsion de facteurs liés à la protéostase normale comme, au cours du vieillissement, la capacité du protéasome cellulaire à éliminer les protéines altérées ou mal repliées est réduite, ce qui engendre leur accumulation et agrégation [43].

Dans ce qui suit, nous ne nous intéresserons qu'aux causes extérieures de la dénaturation des protéines :

#### **I.2.3.1.1. Température**

Les protéines sont stables dans leurs conditions natives grâce à l'équilibre entre les forces de dé/stabilisation. La température élevée a un impact direct sur la conformation des protéines (niveaux secondaire, tertiaire et quaternaire), et elle provoque une dénaturation des protéines qui est irréversible par nature (réversible dans certains cas), ce qui entraîne l'agrégation des protéines. En outre, la chaleur catalyse les réactions d'oxydation et de désamination, ce qui peut également entraîner leur agrégation. Ainsi que, la fréquence élevée des collisions moléculaires, le renforcement des interactions hydrophobes, la diminution de l'énergie d'activation et la diffusion accrue des molécules à température élevée.

À faible pH et à forte concentration d'insuline, la fibrillation est caractérisée par des courbes temporelles typiques de formation amyloïde autocatalytique et le processus global est constitué d'une phase de retard initiale, d'une phase de croissance ultérieure et d'une phase d'équilibre finale. La fibrillation de l'insuline est significativement accrue avec l'augmentation de la température. En dessous de 40°C, aucune formation d'amyloïde n'a été observée mais à des températures plus élevées la constante de vitesse de fibrillation a augmenté et la période de latence a diminué, d'ailleurs à partir de 60°C le temps de latence est si étroit que les fibrilles ne sont presque plus formés par seconde nucléation.

La stabilité de l'insuline suit une loi sur le modèle d'Arrhenius qui réfère à l'activité biologique, comme suit :

$$P(t) = P_0 e^{-kt} \text{ avec } k = e^{\alpha - B/T} \dots\dots\dots (11) [48].$$

Où :  $t$  = temps,  $P_0$  = activité biologique à  $t = 0$ ,  $P(t)$  = activité biologique à  $t$  (mois de stockage) et  $k$  = la constante de vitesse pour  $T$  = température absolue ( $^{\circ}k$ ) et  $\alpha$ ,  $B$  = constantes de proportionnalité.

L'enthalpie d'activation  $E_a = 33,8$  kJ/mol a été trouvée à partir de la pente du graphique d'Arrhenius. Il convient de noter que les insulines en solution acide forment des fibrilles en quelques heures à  $37^{\circ}C$ . En revanche, la même insuline en solution aqueuse à pH 7 peut être conservée (sans agitation) à  $37^{\circ}C$  pendant plusieurs mois sans formation de fibrilles [44 - 48].

#### **I.2.3.1.2. pH**

Le pH est l'un des paramètres clés des bioprocédés, il régule la croissance cellulaire ainsi que la production de métabolites. Le pH et les forces ioniques influencent également la stabilité des colloïdes. Une variation importante du pH par rapport au point isoélectrique (pI) entraîne un dépliage partiel des protéines, ce qui augmente la propension à l'agrégation. Un changement de pH modifie la charge nette des protéines, et une augmentation de la force ionique entraîne une diminution des répulsions de la charge nette (blindage de la charge). Normalement, un déplacement du pH vers le pI et une augmentation de la force ionique favorisent l'agrégation, sauf dans les cas où la formation d'agrégats est dominée par des attractions électrostatiques.

Noormägi et al. ont prouvé que la relation inverse entre le pH et la concentration d'insuline était déclencheuse de la fibrillation, c'est-à-dire qu'à concentration de  $2,5 \mu M$ , pour un pH 7.0 - 7.8 il y'a une accélération de l'agrégation contrairement à pH 2,5 où le phénomène est inexistant, compte à la concentration de  $250 \mu M$ , nous obtenons l'inverse. Cela dit, entre 50 -  $150 \mu M$  cette loi n'est plus applicable car la concentration n'entre plus en jeu. Il fut aussi constaté que l'agitation n'avait pas d'effet sur le taux de fibrillation à pH bas contrairement au pH physiologique où il y'a dépendance. À faible pH, des fibrilles courtes sont formées, tandis que des " réseaux " de fibrilles plus longues sont détectés à pH neutre. L'énergie d'activation de la croissance des fibrilles à pH 2,5 était significativement plus faible (33 kJ/mol) que celle du pH physiologique (84 kJ/mol). Dans une autre étude, on a constaté que l'intensité de l'agrégation de l'insuline diminuait à un pH de solution de 8,0 par rapport à 7,0 en raison de la répulsion électrostatique. La charge et la lipophilie (hydrophobie) d'une



protéine varient avec le pH de la solution, ce qui module la formation d'agrégats. Dans une étude, l'agrégation en fonction du pH dans les protéines intrinsèquement désordonnées a été déterminée par la charge et la lipophilie. La solubilité des protéines a été mise en relation avec l'équation empirique suivante:

$$\text{solubilité} = \alpha \times \text{hydrophobie} + \beta \times [\text{charge nette}]^2 + \gamma \times [\text{charge nette}] + \delta \dots (12)$$

$\alpha, \beta$  et  $\delta$  sont des paramètres modèles. [44, 49].

### **I.2.3.1.3. Force ionique**

L'influence prononcée de la force ionique sur la vitesse de formation des fibrilles d'insuline a été démontrée par Waugh et al. qui ont comparé la fibrillation dans des solutions d'acide acétique 8 M (pH 1,6) avec différentes forces ioniques, obtenues par addition de chlorure de sodium. La réaction de croissance a été examinée en ensemençant des fibrilles d'insuline préformées dans les solutions organiques d'insuline, et la réaction globale (nucléation + croissance) a été examinée en chauffant des solutions d'insuline à 1 - 2% dans le milieu organique.

À la plus faible force ionique de 0,04, la croissance a été considérablement retardée dans l'acide acétique par rapport à une solution d'acide chlorhydrique de même pH, mais cet effet fut stoppé par une augmentation de cette force.

Alors que la réaction globale, qui dépend de la nucléation, était pratiquement absente après 18 h à 50 °C et une force ionique de 0,04, la croissance des fibrilles après l'ajout de germes de fibrilles était complète à 52 % après moins de 4 h dans les mêmes conditions. Par ailleurs, l'augmentation de la force ionique à 0,11 a mené vers l'accroissement considérable du taux de nucléation (84 % de fibrillation après 16 h à 50 °C). L'influence promotrice de la force ionique sur la formation des fibrilles est probablement due à son effet neutralisant sur les forces répulsives entre les groupes de charge similaire. Cette hypothèse est étayée par l'observation selon laquelle le chlorure de sodium inhibe la renaturation des fibrilles d'insuline en milieu alcalin [47].

#### **I.2.3.1.4. Agitation**

L'agitation est un terme qui comprend souvent un ou plusieurs de ces processus : rotation, secouage, agitation, vortex ou autres formes de mélange. Il a été démontré que l'agitation ou le remuement induit l'agrégation d'un certain nombre de protéines ou de peptides différents, ceci a été attribué à un ou plusieurs des effets suivants : formation d'une interface air/liquide supplémentaire pour l'adsorption/dépliage/agrégation des protéines ; exposition à une surface hydrophobe telle qu'une barre d'agitation et simple abrasion/broyage. Les agrégats/particules induits par l'agitation peuvent être constitués de protéines non covalentes et covalentes (par exemple, liées par des disulfures) et peuvent être morphologiquement différents, selon les conditions de stress. Ces agrégats ou particules non covalents peuvent se dissocier partiellement en monomères avec le temps [50].

L'insuline sans Zn ou la K-insuline (0,5 mg.ml<sup>-1</sup> dans un tampon phosphate de sodium 0,05 M, pH 7,4), a été soumise à une agitation de 300 rpm à 37 °C pour imiter les conditions de stockage accéléré. L'agrégation a été confirmée par une augmentation de la turbidité en solution et la valeur maximale fut atteinte en 120 min [51].

#### **I.2.3.1.5. Tensioactifs**

Les tensioactifs sont des molécules amphipathiques qui possèdent à la fois un groupe hydrophile (groupe chargé) et un groupe hydrophobe (groupe non polaire). Les molécules tensioactives peuvent stabiliser, déstabiliser ou induire l'agrégation des protéines. Dans le processus d'agrégation, les molécules tensioactives (qu'elles soient cationiques ou anioniques) neutralisent la charge respective de la molécule et, à leur tour, déplient partiellement la protéine, ce qui favorise l'association par l'interaction hydrophobe. L'hydrophobie est assurée à la fois par les résidus d'acides aminés hydrophobes et par la queue hydrophobe de l'agent de surface [52].

#### **I.2.3.1.6. Modification chimique**

La modification chimique est une autre méthode qui joue un rôle important dans l'agrégation des protéines. Les réactions chimiques telles que l'hydrolyse, l'oxydation, l'isomérisation, la désamidation peuvent être responsables de la déstabilisation de la structure des protéines et ainsi favoriser l'agrégation. De plus, l'agrégation est également induite par la

dégradation photolytique des protéines qui implique l'oxydation des résidus aromatiques, His, Cys et Met [45].

### **I.3. Recherches bibliographiques sur la microencapsulation de l'insuline**

Young Min Kwon et al. ont lancé une étude sur la stabilité de l'insuline à l'interface eau/huile lors de la microencapsulation, à l'interface eau/dichlorométhane l'insuline s'agrège de façon destructrice, l'agrégation est proportionnelle à la concentration d'insuline dissoute, il a été remarqué une augmentation de la fibrillation à l'ajout de PLGA, le tensioactif nonionique dodecyl maltoside(DDM) réussi à stabiliser l'insuline à l'interface eau/solide, air/eau mais échoue à l'interface riche en dichlorométhane, ce tensioactif possède aussi un effet déstabilisant lorsqu'il est en excès. A contrario, le Laurylsulfate de sodium(SDS) lui, grâce à ses groupements négatifs réussi à empêcher le contact entre l'insuline et le DCM, ce qui prolonge sa stabilité [53].

Quaglia et al. ont étudié l'influence du polysorbate 20, poloxamer 188, et les complexes cyclodextrins sur les propriétés des microcapsules de PLGA chargées d'insuline, obtenues par spray-drying de suspension (s/o), émulsion (w/o) et d'une solution glaciale d'acide acétique. Cela, démontra que la suspension n'était pas adaptée avec une stabilité et un taux d'encapsulation faibles, la libération n'aura duré que 24h à cause de l'effet burst. Compte aux émulsions à base de poloxamer et polysorbate, il y'eut agrégation des microsphères et effet burst par l'hydrophilisation des matrices de PLGA. Les complexes de cyclodextrins ont révélé un diamètre inférieur mais comme pour l'émulsion, le taux d'encapsulation resta très faible [54].

Hamishehkar et al. ont élaboré une formulation eau dans huile dans huile (w/o/o)-évaporation de solvant, l'insuline est dissoute dans du HCl 0.01M puis ajoutée à la solution de PLGA et acétonitrile, celle-ci sera dispersée dans de l'huile minérale en présence du Span 80, ensuite une optimisation sur 4 facteurs fut réalisée. L'utilisation de PLGA avec une masse molaire supérieure, avec de grandes concentrations de polymère et tensioactif, permet d'avoir un meilleur taux d'encapsulation, et une courbe de libération plus satisfaisante (moins d'effet burst) [55].

Elsayed et al. préparèrent des microémulsions sur la base des complexes polyelectrolytes entre du chitosan, à masse molaire réduite par dépolymérisation, et l'insuline. Ceux-là, véhiculés par dispersion dans l'acide oléique. Leur diamètre moyen est de  $108 \pm 9$  nm. L'insuline a été protégée des enzymes gastriques et a gardé sa bioactivité et sa stabilité

sur 1 mois à 4°C et 25°C. De plus, l'effet hypoglycémiant des nanoparticules administrées par voie orale a duré plus longtemps par rapport à l'injection sous-cutanée [56].

Andreas et al. ont microencapsulé l'insuline par 3 différentes méthodes ; solide dans huile dans eau (s/o/w) où l'insuline est sous forme cristalline, eau dans huile dans eau (w/o/w) et huile dans huile dans eau (o/o/w) où l'insuline est dissoute, avec évaporation du solvant selon une matrice de PLGA 50:50 100 mg/ml (dichlorométhane) et une phase externe contenant 1% PVA (m/v) avant dilution. Les microcapsules produites ont une forme sphérique sans agrégation ni pores, leurs tailles moyennes varient entre  $18.2 \pm 0.3 \mu\text{m}$  (o/o/w),  $20.9 \pm 0.1 \mu\text{m}$  (s/o/w),  $21.5 \pm 0.2 \mu\text{m}$  (w/o/w), toutes chargées négativement avec les taux d'encapsulation suivants :  $59.0 \pm 1.2 \%$  (s/o/w),  $79.9 \pm 2.3\%$  (w/o/w),  $25.2 \pm 1.1\%$  (o/o/w) [57].

Mutaliyeva et al. compte à eux, ont constitué une double émulsion w/o/w, où l'insuline en solution aqueuse de PBS fut dispersée dans de l'huile de soja contenant du AOT par ultrasonication, puis re-émulsionnée dans une solution chitosan-gomme de xanthan, avant d'être re-re-émulsionnée dans deux solutions aqueuses de chitosan et de gomme de xanthan, à tour de rôle. Le diamètre w/o variait de 202 à 393 nm; avec une émulsion stable au long terme et la concentration optimale de AOT correspondant au diamètre minimum se trouvait être  $1,18 \cdot 10^{-3}$  -  $2,25 \cdot 10^{-3}$  M. Les résultats confirment que l'ajout de gomme au chitosan permet d'atteindre des rendements d'encapsulation de 65,6 à 77,5 % et lors de la cinétique de libération 15%, 40%, 70% d'insuline furent libérées en 30min, 1h, 1.5h [58].

Meneguín et al. ont élaboré des microparticules par gélification ionotropique (gélification de goutte), où l'insuline fut encapsulée dans des microcapsules de gomme gellane (GG) mucoadhésives enrobées d'un polymère retrogradé RS/P. La GG en dispersion aqueuse est déposée à travers une aiguille à bout plat dans une solution refroidie de chlorure d'aluminium contenant l'insuline (Novolin R), maintenue sous agitation magnétique pendant 24 h pour obtenir une réticulation maximale. Ensuite, les microparticules (MP) furent recouvertes d'un mélange filmogène de glycérine et de polymère sec (pectine et amidon retrodégrados). Les MP de GG ont présenté une bonne sphéricité (0,69 à 0,76) avec des tailles moyennes comprises entre 1000 et 1200  $\mu\text{m}$ . Les résultats importants sont ; la protection de l'insuline à 80 % après incubation avec de la trypsine et de l'alpha-chymotrypsine, libération pH-

dépendante atteinte et perméabilité accrue sur les cellules Caco-2 et l'intestin de rat excisé [59].

Wen Yao Hu et al. ont préparé des micelles polymériques cationiques sensibles au pH, à base du copolymère P(MMA-coMAA)-b-PAEMA dissous dans du DMF (N,N-diméthylformamide), l'insuline solutionnée fut ajoutée goutte par goutte avec agitation, par la suite, la mixture a été placée en sac de dialyse dans un bain tamponné d'acétate (pH 5) puis le dialysat fut récupéré. La taille des micelles allait de 200 à 300 nm avec une forme sphérique, leur potentiel zêta est de 15 - 25 mV à pH 7.4. Moins de 20 % d'insuline chargée fut libérée dans le liquide gastrique simulé en 2 h, mais près de 60 % en 10 h dans le fluide intestinale et le taux de libération augmente avec le ratio de MAA [60].

D'après la thèse de Mimi, ayant préparé des nanoparticules par double émulsion avec évaporation du solvant. 1ml d'insuline est dispersé dans 5ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> contenant 250mg de polymères (PCL, ERS, ethylcellulose et PLA) seuls ou combinés (PCL/ERS, PCL/ethylcellulose et PCL/PLA) 50/50 sous agitation ultrasonique à une amplitude 80 pendant 30 secondes. Cette première émulsion est dispersée dans 40ml d'une solution aqueuse de PVA à 0.1% pendant 60 secondes. Après évaporation du solvant sous pression réduite pendant 10mn, les nanoparticules sont séparées par centrifugation à 42 000 tr/mn pendant 20min à 20°C puis lyophilisés et conservés à 4°C. Résultats ; les tailles des nanoparticules étaient comprises entre 245 nm et 817 nm, les potentiels zêta étaient négatifs pour tous les polymères mise à part ERS et PCL/ERS étant positifs, les taux d'encapsulation par rapport à l'insuline Actrapid, étaient comme suit : 80.72% (ERS), 76.45% (PCL), 87.09% (PCL/ERS), 81.40% (ethylcellulose), 60.93% (PCL/ ethylcellulose), 67.68% (PLA) et 85.95% (PCL/PLA). Les cinétiques de libération de l'insuline de toutes les formulations préparées obéissent au modèle fickien d'ordre 1 [72].

# **Chapitre II :**

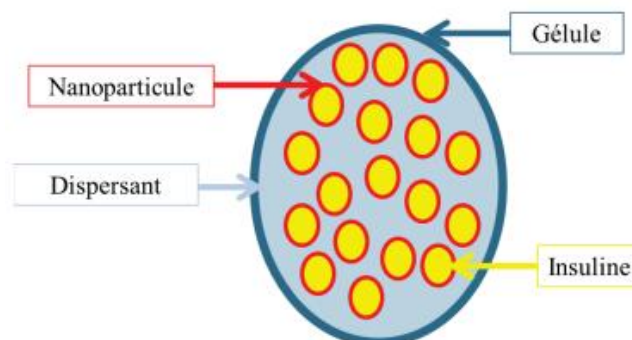
## **Materiel et méthodes**

## Chapitre II : Matériel et méthodes

### Le contexte

L'administration d'insuline par voie orale permettrait une délivrance de l'hormone simple, rapide et discrète, ne nécessitant ni injection ni matériel médical particulier, et permettant un premier passage hépatique de l'hormone limitant la survenue d'hypoglycémies sévères. Partant de ce postulat, le Centre européen d'étude du Diabète (CeeD, Strasbourg, France), en collaboration avec l'Institut Charles Sadron (ICS, Strasbourg, France), a déposé un brevet concept (Frère Y., Danicher L., Belcourt A., « Vecteurs pour administration par voie orale » WOFR2004000974) en 2004, basé sur des vecteurs protégeant l'insuline de l'environnement du tractus gastrointestinal et permettant le passage de la barrière intestinale. Ce projet, nommé « Oral Administration of Insulin » (ORAIL) repose sur un système de double encapsulation de l'insuline via un vecteur pharmaceutique composé de trois éléments (figure II.1):

1. des NPs contenant l'insuline, et dont la surface peut être traitée pour faciliter le contact avec la barrière intestinale.
2. un véhicule, la gélule, qui protège les NPs contenant l'insuline durant le passage de la cavité orale jusqu'à l'estomac, et qui se dégrade une fois dans l'intestin et permet la libération des NPs.
3. un agent dispersant lipophile qui permet d'équilibrer les forces osmotiques et empêche ainsi la diffusion du principe actif vers l'extérieur de la NP.



**Figure II.1 :** Schématisation du concept du vecteur pharmaceutique pour la délivrance d'insuline par voie orale [20].



En partant de ce point de repère, nous mettons en place des microcapsules (moins toxiques et risquées que des nanoparticules [20,61]), à base de PLA selon la double émulsion avec évaporation de solvant ; nous en optimiserons la taille grâce aux plans d'expériences, puis en évaluerons l'efficacité sachant qu'elles sont censées être double encapsulées dans une gélule gastro-résistante voire aussi potentialisées.

## II.1. Matériel

### II.1.1. Produits

PLA L9000 Biomer  $M_w = 220$  kDa, PVA-124 for synthesis Sigma Aldrich, insuline Actrapid novo nordisk, Jusline R Julphar, Dichlorométhane DCM Biochem, Acétate d'éthyle for synthesis AcEt Biochem, laurylsulfate de sodium SDS, Acide chlorhydrique HCl, NaOH Hydroxyde de sodium, Bleu de méthylène BM, Eau distillée et Eau pour préparation injectable EPPI (tableau II.1). Pour d'avantage de renseignements sur les produits, consultez : [62-67].

**Tableau II.1** : Produits utilisés et leurs propriétés.

Produits	Nomenclature	Propriétés
PLA	Acide poly-L-lactique	<p>Polymère biodégradable ;</p> <p><math>M_w = 220</math> kDa ;</p> <p>Contient environ 8% de D-lactique acide, a été acheté sous forme de granulés;</p> <p>L'hydrolyse est rapide dans des conditions humides à des températures supérieures à la température de transition vitreuse de 50 à 60°C ;</p> <p>Absorption d'humidité à l'équilibre : 0.3%;</p>

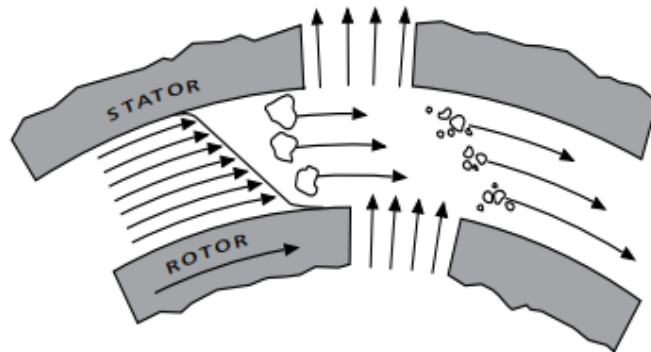
		Soluble dans le DCM.
PVA	Alcool polyvinylique	<p>Polymère biodégradable, surfactant et plastifiant;</p> <p>Degré d'hydrolyse min 95% ;</p> <p>Matière volatile max 5% ;</p> <p><math>M_w \sim 30-70</math> kDa;</p> <p>HLB = 18 ;</p> <p>Forme poudreuse.</p>
Insuline Actrapid	Insuline humaine ADNr	<p>Flacon de 100 UI/ml, 1 unité d'insuline humaine USP(UI) équivaut à 0,0347 mg d'insuline humaine pure.</p> <p>Excipients Actrapid: chlorure de zinc, glycérol, méta-crésol, hydroxyde de sodium et acide chlorhydrique (pour l'ajustement du pH), eau PPI.</p> <p>Excipients Jusline R: glycérol, méta-crésol, eau PPI.</p> <p>Conditions de stockage : entre 2 - 8 °C durant 6 mois et ne se conserve qu'un mois après ouverture du flacon.</p>
Insuline Jusline R		
DCM	Dichlorométhane ou chlorure de méthylène	<p>Solvant organique ;</p> <p><math>P_{vap} = 453</math> mbar à 20°C ;</p> <p><math>P_{ébu} = 40</math>°C ;</p> <p><math>M_w = 84.93</math> Da.</p>
AcEt	Acétate d'éthyle ou éthanoate	Solvant organique ;

	d'éthyle	$P_{\text{vap}} = 100 \text{ mbar à } 20^{\circ}\text{C} ;$ $P_{\text{ébu}} = 77^{\circ}\text{C} ;$ $M_w = 88.12 \text{ Da.}$
SDS	Laurylsulfate de sodium	Tensioactif ; Solubilité : 100 g/l à 20 °C (eau) ; Soluble dans les solvants polaires ; $M_w = 288.4 \text{ Da} ;$ HLB = 40 ; Forme poudreuse.
HCl	Acide chlorhydrique	Pureté = 37.25% ; $M_w = 36.46 \text{ Da.}$
NaOH	Hydroxyde de sodium	Pureté = 97% ; $M_w = 40 \text{ Da.}$
BM	Bleu de méthylène ou chlorure de 3,7- bis(diméthylamino)phénothiazin-5-ium	Colorant hydrophile.

### II.1.2. Appareillage et fonctionnement

- 1. Ultra-turrax IKA T25 digital :** est un homogénéisateur fonctionnement sous principe du rotor-stator (voir figure II.2), en usant de la vitesse de rotation du rotor, la matière à traiter est aspirée en direction axiale (Y) dans la tête dispersante et ensuite en direction radiale par pressage dans les rainures agencées. Le matériau est soumis à de hautes contraintes d'efforts tranchants et de cisaillement. Dans l'entrefer à encoches entre le

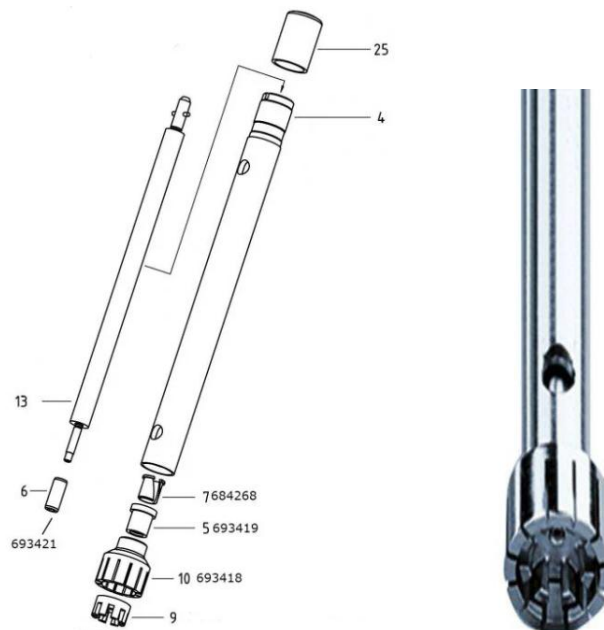
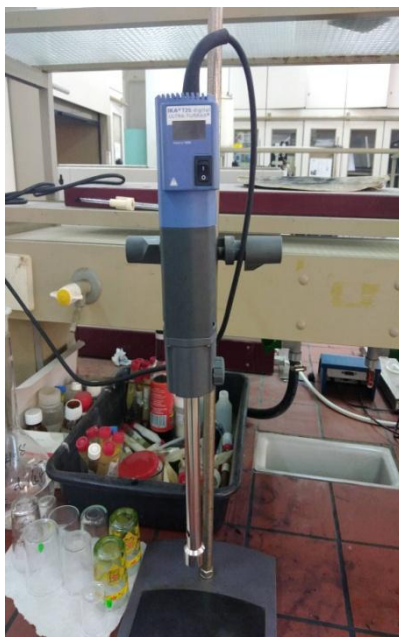
rotor et le stator, il apparaît une grande turbulence supplémentaire conduisant à un mélange optimal de la suspension.



**Figure II.2 :** Schéma explicatif du principe de rotor-stator.

Un temps de traitement de quelques minutes suffit la plupart du temps pour créer la finesse finale désirée. Les longs temps de traitement n'améliorent que de peu la finesse atteinte, ils contribuent uniquement à élever la température de la matière par l'énergie apportée.

Cet appareil possède une gamme de vitesse entre 3000 et 25000 rpm avec une résolution d'affichage de 200rpm, viscosité maximale admise de 5000mPas pour une température ambiante entre 5 - 40°C. La tête de dispersion S25N-25F donne une finesse d'émulsion entre 1 - 5  $\mu\text{m}$  (figure II.3) [68 - 70].



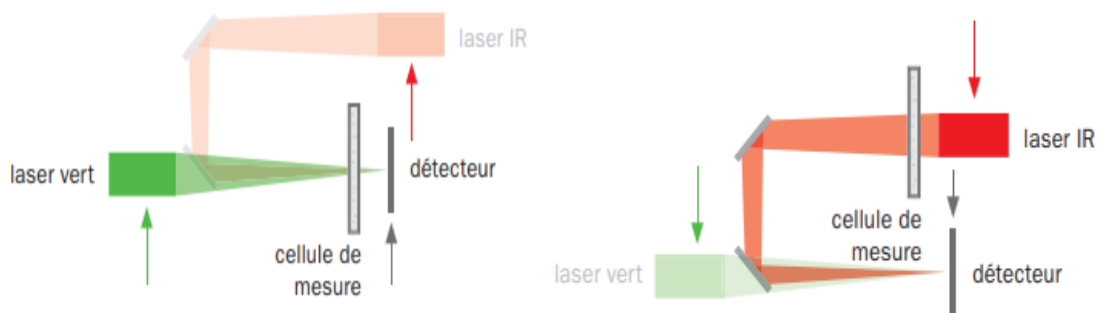
**Figure II.3 :** Ultra-turrax IKA T25 digital et sa tête de dispersion S 25 N - 25 F.

2. **Fritsch ANALYSETTE 22 NanoTec plus** : est un granulomètre laser composé de deux unités de dispersion, l'une sèche et l'autre humide, et d'un module de mesure, sa plage étant de 0.01 à 2000  $\mu\text{m}$  (figure II.4).



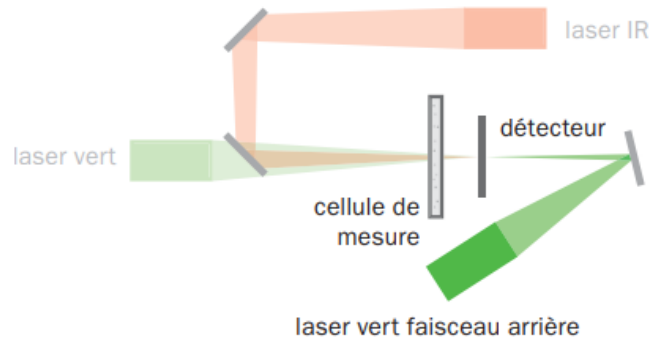
**Figure II.4** : Granulomètre laser (ANALYSETTE 22).

L'ANALYSETTE 22 MicroTec plus met en œuvre d'une part un laser à semi-conducteur émettant dans le vert pour la mesure des petites particules, d'autre part un laser à semi-conducteur dans l'infrarouge pour la mesure des particules de grande taille. Ces deux lasers s'alignent indépendamment l'un de l'autre de façon complètement automatique (voir figure II.5).



**Figure II.5** : Dispositif de mesure pour les classes granulométriques basses (vert) et élevées (rouge).

FRITSCH a mis au point pour l'ANALYSETTE 22 NanoTec plus, un troisième faisceau laser permettant d'exploiter la lumière réfléchie pour les mesures dans les plages nanométriques. Ce faisceau illumine par l'arrière l'échantillon déplacé devant le détecteur, le faisceau passant par un micro-perçage au centre du détecteur (figure II.6).



**Figure II.6 :** Dispositif de mesure pour les classes granulométriques dans la plage nanométrique.

Son logiciel MaS control utilise deux modèles pour le traitement des données selon les propriétés des particules : la théorie de Fraunhofer pour les particules de grande taille dont les propriétés optiques ne sont pas connues, et la théorie de Mie pour les particules de petite taille avec des propriétés optiques connues [71].

3. **Autres :** appareil Infrarouge (Shimadzu), microscope optique, bécher, éprouvette, boîte de pétrie, plaque chauffante, pipette, balance ( $\pm 0.0001\text{g}$ ), verre de montre, seringue, flacon, barreau magnétique, entonnoir, poire, cristalliseur, spatule, fiole, pH-mètre.

## II.2. Uniformité des granulés de PLA

**Biomer L9000 :** nous avons pesé 24 granulés, pour déterminer le poids moyen du PLA commercial.

Résultat, la moyenne des masses du PLA en granulé, est :  $m_{\text{moy}} = 0.034425 \text{ g}$  et l'écart-type est :  $\sigma = 0.007301 \text{ g}$ . Donc nous considérerons pour la suite des études qu'un granulé pèse environ  $0.034 \pm 0.007 \text{ g}$ .

## II.3. Test de solubilité

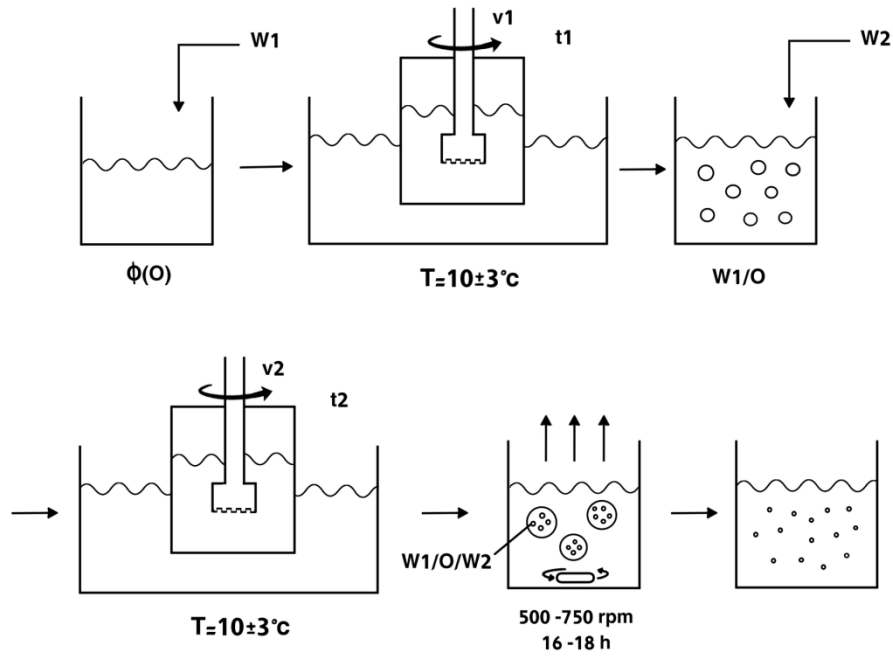
- **PLA L9000 :** nous préparons 5ml de dichlorométhane dans un flacon fermé sous agitation 500-750 rpm, et nous ajoutons au fur et à mesure 1 granulé ou un nombre de granulés préalablement pesés, puis nous attendons leur dissolution. Une fois que nous constatons la saturation souhaitée, nous laissons pendant 10 min sous agitation.
- **PVA :** nous préparons 5ml d'eau distillée dans un bécher couvert sous agitation 500-750 rpm à  $82^\circ\text{C}$  (bain marie). Nous ajoutons au fur et à mesure une masse « m » de PVA, tout

en attendant sa dissolution. Une fois que nous remarquons qu'il y a saturation, nous laissons pendant 30min sous agitation, avant de le laisser refroidir à température ambiante.

## II.4. Préparation des microcapsules de PLA

La conception des microcapsules se fait en quatre manches (illustrée en figure II.7) :

- 1. Préparation de la phase organique (O) :** nous dissolvons une quantité «  $m_1$  » de PLA sous agitation magnétique de 500-750 rpm, dans 5ml de DCM, tout ceci dans un flacon hermétiquement fermé.
- 2. Préparation de la phase aqueuse continue ( $W_2$ ) :** dissoudre une masse «  $m_2$  » de PVA dans un volume «  $V$  » d'eau distillée sous agitation magnétique de 500-750 rpm, se trouvant dans une fiole à +80°C au bain marie.
- 3. Emulsification :** nous homogénéisons un volume «  $x$  » de phase organique présent dans un bécher refroidie au bain marie (environ 10°C), avec un volume «  $y$  » d'insuline injectable ( $W_1$ ) pendant un temps «  $t_1$  » et une vitesse «  $v_1$  » ; à l'aide de l'ultra-turrax. Puis, nous y ajoutons un volume «  $z$  » de phase continue et re-mélangeons le tout durant un temps «  $t_2$  » et une vitesse «  $v_2$  ». Lors du mixage le bécher est plus ou moins recouvert de papier aluminium.
- 4. Evaporation du solvant :** la double émulsion ( $W_1/O/W_2$ ) obtenue sera mise sous agitation magnétique de 500-750 rpm à l'air libre dans un bécher, durant 16-18h avant d'être analysée.



**Figure II.7 :** Procédé de microencapsulation par double émulsion/évaporation de solvant ( $W_1$ : phase aqueuse dispersée,  $O$ : phase organique intermédiaire,  $W_2$ : phase aqueuse continue).

#### II.4.2. Test de la formulation

En premier lieu, nous débutâmes par la mise au point des quantités adéquates pour l'obtention d'une double émulsion, puis de microcapsules. Cette formulation illustrée dans le tableau II.2 :

**Tableau II.2 :** Composition de la phase test [72].

Phase	Composition
$W_1$	1ml d'insuline Actrapid
$O$	5ml DCM + 0.238 g PLA
$W_2$	40 ml de 0.1% PVA (m/v)

Les vitesses  $v_1 = 6600$  rpm,  $v_2 = 9600$  rpm pour un temps d'émulsification constant de 1min [20]. Cette méthode sera appliquée en deux fois, l'une pour l'analyse de la double émulsion et l'autre pour les microcapsules.



## II.5. Caractérisation

Nous aurons besoin de caractériser la double émulsion de la phase test, ainsi que toutes les microcapsules obtenues d'après plusieurs formulations.

### II.5.1. Microscopie optique

Un microscope est un système optique qui présente à l'œil une image agrandie d'un objet proche. L'image est agrandie dans le sens où elle sous-tend (de l'œil) un angle plus grand que l'objet lorsqu'il est vu à une distance de visualisation normale. La « distance de visualisation normale » est classiquement considérée comme étant d'environ 10 pouces (254 mm) ; cela représente une valeur moyenne pour la distance à laquelle la plupart des gens voient le détail le plus clairement. Le grossissement ou la puissance de grossissement ( $M$ ) d'un microscope est défini comme le rapport entre l'angle visuel sous-tendu par l'image et l'angle sous-tendu par l'objet à une distance de 10 pouces de l'œil.

Un microscope se compose d'une lentille d'objectif et d'une lentille oculaire. L'objectif produit une image réelle inversée (généralement agrandie) de l'objet. La lentille ré-image l'objet à une distance de vision confortable et agrandit encore l'image [73].

**Analyse :** nous caractériserons donc avec un microscope optique la microémulsion et les microcapsules de la phase test, cela seront mélangés à du bleu de méthylène. Une fois placé entre des lames de verre, nous réglons l'image par rapprochement, angle de vue et résolution du zoom.

### II.5.2. Granulométrie laser

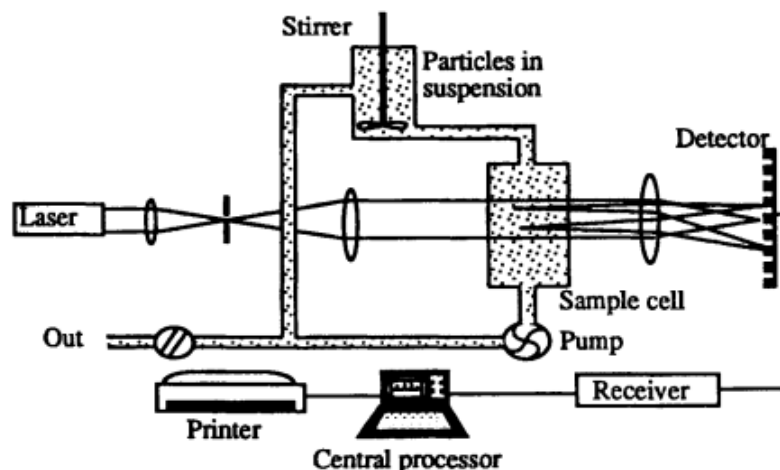
La granulométrie laser repose sur plusieurs principes. Nous ne nous focaliserons que sur la diffraction laser (plus précisément SLS à angles multiples ou MALLS) employée par notre appareil.

La diffraction laser ou la diffusion statique de la lumière repose sur des mesures d'intensité moyennées dans le temps. Les angles de détection peuvent être fixes ou variables, l'intensité de la lumière diffusée étant enregistrée à différents angles de détection. En général, les particules dont les vitesses de sédimentation dépassent le mouvement brownien doivent être mesurées par diffraction laser.

Les instruments MALLS (multi-angles) utilisent la théorie de Lorenz-Mie (souvent appelée Mie) ou la théorie de la diffraction de Fraunhofer.

- La théorie de Mie est la théorie classique reliant la diffusion de la lumière à la taille des particules. Elle nécessite la connaissance des parties réelles et imaginaires (absorption) de l'indice de réfraction.
- La théorie de Fraunhofer est limitée aux particules opaques ou grandes par rapport à la longueur d'onde de la lumière et, puisque seule la diffraction est prise en compte, aucune connaissance de l'indice de réfraction n'est nécessaire. Le motif d'interférence diffracté est d'autant plus grand comparé à l'image géométrique, que les particules sont petites. Le système est disposé sur un banc optique dont la longueur doit donc être supérieure pour des grosses particules.

Les MALLS collectent la lumière, diffusée par les particules dans un faisceau laser collimaté, par un réseau de détecteurs dans le plan focal de la lentille collectrice. Les échantillons peuvent être introduits directement dans le faisceau laser, comme c'est le cas pour les aérosols et les inhalateurs-doseurs, passés à travers une cellule d'échantillon dont les verres sont transparents au faisceau laser, ou suspendus dans une cuvette sous agitation (figure II.8). Les poudres sèches sont soit soufflées à travers le faisceau, soit laissées tomber à travers celui-ci par gravité tandis que les particules en suspension sont re-circulées à travers le faisceau via une pompe.



**Figure II.8 :** Principe des instruments de diffusion de la lumière.

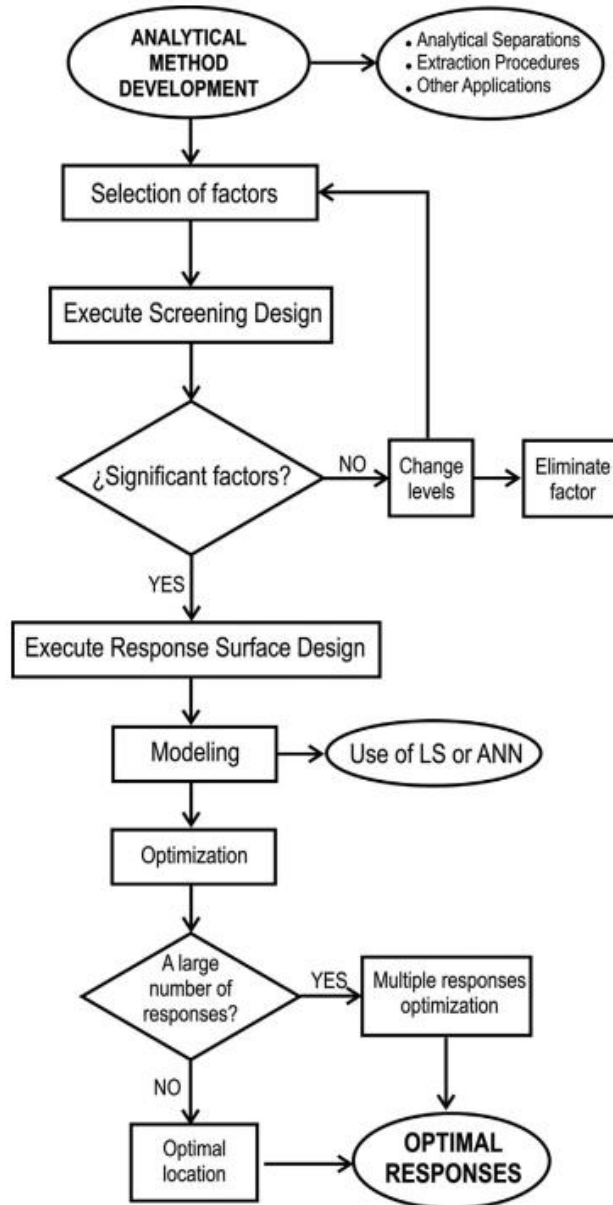
Quotidiennement, le diamètre moyen en volume (VMD ou  $D(4,3)$ ) est rapporté, et les centiles de distribution peuvent également être rapportés ;  $D(10)$ ,  $D(50)$  et  $D(90)$  représentent

le volume d'échantillon (10 %, 50 % et 90 % respectivement) avec un diamètre jusqu'à la valeur indiquée. Il est assez typique que le VMD soit plus grand que le D(50), et indiquera un profil de distribution asymétrique. L'écart type ou le Span donne une indication de l'uniformité de la distribution globale des tailles, et est calculé comme suit  $(D_{90}-D_{10})/D_{50}$  [74,75].

**Analyse :** nous caractériserons par granulométrie laser, toutes les microcapsules des différentes formulations, en plus de la microémulsion en phase test. Celles-ci vont être versées goutte par goutte dans le bain ultrason jusqu'à ce que l'appareil signale que la quantité est suffisante par un voyant vert consommant au passage 2.5L d'eau distillée par analyse.

### **II.5.3. Description des plans d'expérience**

Le rôle majeur des plans expérimentaux concerne les optimisations, où le but principal est de découvrir les conditions expérimentales qui produisent les meilleures performances possibles. Deux étapes peuvent être envisagées dans l'optimisation : (1) une étape de sélection, où de nombreux facteurs sont étudiés pour identifier ceux qui ont des effets significatifs sur les variables critiques, et (2) l'optimisation, où les facteurs sont examinés plus en détail en élaborant les conditions optimums (voir figure II.9).



**Figure II.9 :** Organigramme du développement de plans d’expérience et de surfaces de réponse pour l’optimisation. (ANN : réseau de neurones artificielles, LS : moindres carrés)

Deux stratégies d'optimisation préliminaire peuvent être distinguées : l'approche uni-variée et l'approche multi-variée. Dans la première, un seul facteur est varié à la fois (OVAT), tandis que les autres facteurs restent constants. Cette procédure d'application classique ne tient pas compte des interactions entre facteurs. De surcroît, le nombre d'expériences est proportionnel au nombre de facteurs, et communément le domaine exploré est plus petit par rapport à celui examiné avec l'approche multi-variée. En revanche, dans la stratégie multi-variée, plusieurs facteurs sont étudiés simultanément dans un nombre prédéfini d'expériences, faisant varier ensemble les niveaux de tous les facteurs impliqués dans le processus [76].

Afin d'évaluer l'impacte de diverses facteurs indépendants sur le diamètre des microcapsules. Nous construisons un plan factoriel à deux niveaux ( $2^k$ , k : nombre de variable) faisant partie de l'approche à multi-variables.

**II.5.3.1. Plan factoriel complet à deux niveaux**

Les paramètres fixés sont : la température ( $T_{\text{bain}} = 10 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$ ), la pression ( $P = P_{\text{atm}}$ ), la concentration du PLA en  $\varphi_{\text{org}}$  ( $C_{\text{PLA}} = 0.034 \text{ g/ml}$ ), volume de la  $\varphi_{\text{org}} = 5 \text{ ml}$ , volume de la  $\varphi_{\text{aq2}} = 40\text{ml}$ . Les variables prises en compte sont (tableau II.3) :

**Tableau II.3** : Domaine d'étude du plan factoriel.

Variables réelles	Variables codées	Minimum du domaine ( $Z_{\text{min}}$ )	Centre du domaine ( $Z_{\text{centre}}$ )	Maximum du domaine ( $Z_{\text{max}}$ )
$Z_1$ : $C_{\text{PVA}}$ [%, m/v]	$x_1$	0.5	1.5	2.5
$Z_2$ : $V_{\text{insuline}}$ [ml]	$x_2$	0.5	0.75	1
$Z_3$ : Temps [s]	$x_3$	30	60	90
$Z_4$ : vitesse [rpm]	$x_4$	5200	7600	10000

\*Insuline : Actrapid,  $v_1 = v_2 =$  vitesse,  $t_1 = t_2 =$  Temps

$C_{\text{PVA}}$  ; la concentration du PVA en  $W_2$ ,  $V_{\text{insuline}}$  ; le volume d'insuline ajouté à O, Temps ; le temps d'agitation pour une émulsification et vitesse ; la vitesse de rotation de l'Ultra-turrax.

La variable codée :  $x_i = 2 \times \frac{Z_i - Z_{\text{centre}}}{Z_{\text{max}} - Z_{\text{min}}}$  ;  $i = 1, 2, 3, \dots, k$  ..... (13)

Le modèle mathématique, donnant la réponse y (diamètre des microcapsules) est décrit par une expression du premier degré :

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{1 \leq i < j \leq k} \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \dots \dots \dots (14)$$

Où  $\beta_0$  est l'effet moyen global,  $\beta_i$  représente l'effet du facteur  $x_i$ ,  $\beta_{ij}$  est l'effet de l'interaction ij entre les facteurs  $x_i$  et  $x_j$ , et  $\varepsilon$  est une composante d'erreur aléatoire. Ce dernier

terme remonte à d'autres sources de variabilité non prises en compte dans le modèle, il inclut des effets tels que l'erreur de mesure sur la réponse, ainsi que les erreurs inhérentes au système comme le bruit de fond instrumental, les effets de variables non étudiées, etc [76].

La résolution de ce système, se fait par la méthode des moindres carrées après régression, on obtient :

$$B = ({}^tX.X)^{-1}.{}^tX.Y \dots\dots\dots (15)$$

Avec ; B : le vecteur des effets, X: la matrice des variables codées, Y : le vecteur des réponses [77].

• **Détermination des variables significatives :**

L'influence des coefficients  $\beta$  est vérifiée par le test de student. Pour ce faire, nous calculons les valeurs de  $t_j$  à partir de la relation :

$$t_j = \frac{|b_j|}{S_{bj}} \text{ avec } S_{bj} = \frac{S_{rep}}{\sqrt{N}} \text{ et } S_{rep} = \sqrt{\frac{\sum_1^{n_0} (y_i - \bar{y}_0)^2}{n_0 - 1}} \dots\dots\dots (16)$$

Où :  $S_{rep}$  la variance de reproductibilité au centre;  $S_{bj}$  écart quadratique moyen;  $y_i$  les réponses au centre du domaine;  $\bar{y}_0$  la moyenne des réponses au centre ;  $n_0$  le nombre d'essai au centre, N nombre d'essai.

S'en suivra une validation du modèle par la recherche de biais, l'analyse des résidus et la validation au centre (tableau II.4) :

**Tableau II.4 :** Tests à effectuer pour la validation du modèle [78].

Test	Loi
Recherche de biais à l'aide du test de Fisher Snedecor	$F_b = \frac{\frac{\sum_1^N (y_i - \hat{y}_i)^2}{N-l}}{\frac{\sum_1^{n_0} (y_i - \bar{y}_0)^2}{n_0 - 1}}$ , avec $\hat{y}$ : la réponse prédite, l : nombre de coefficients significatifs
Signification de la régression à l'aide du test de Fisher Snedecor	$F_v = \frac{\frac{\sum_1^N (\bar{y}_i - \bar{y})^2}{l-1}}{\frac{\sum_1^N (y_i - \bar{y}_i)^2}{N-l}}$ , avec $\bar{y}$ : la moyenne des réponses

Moyenne des résidus $\approx 0$	$e_{\text{moy}} = \frac{\sum_1^N (y_i - \hat{y}_i)}{N}$
Validation au centre	$\bar{y}_0 \approx \beta_0$
Coefficient de détermination	$R^2 = \frac{\sum_1^N (\hat{y}_i - \bar{y})^2}{\sum_1^N (y_i - \bar{y})^2}$ et sa correction : $R^2_c = R^2 - (1 - R^2) \times \frac{l-1}{N-l}$
Analyse résiduelle	$y_i - \hat{y}_i = f(\hat{y}_i)$

**Note :** le domaine mis en place est le fruit de recherches bibliographiques et de tests intrinsèques ; la fourchette pour la concentration de PVA correspond au domaine où se trouve la CMC, pour l'insuline nous l'avons limité à 20% de charge  $N_d$  avant évaporation, puis en ce qui concerne la vitesse et le temps d'agitation, les références les plus marquantes pour le choix de la plage ; sont [20,79].

#### II.5.4. Vérification

Une fois, que l'effet de chaque paramètre sur la taille des microcapsules est connu, la dernière étape reste à reproduire l'optimum du domaine, le comparer à son placebo (la même formulation mais au lieu de l'insuline, nous mettons de l'EPPI).

Comme valeur ajoutée, nous peaufinerons deux autres formulations en gardant le même procédé d'émulsification que l'optimum.

- (1): la  $W_1$  est composée de 0.5 ml d'une solution mère de 10ml d'HCl 0.01M, de 2ml d'insuline Jusline R et de 0.003g de SDS, préalablement dissous. La phase O, elle, reste la même mais le volume sera de 2ml et pour  $W_2$ , elle sera en 5% PVA et de l'ordre de 5ml.
- (2):  $W_1$  ; avec 1 ml de la même phase aqueuse qu'en (1). O ; avec 0.17g de PLA dissous dans 1ml de DCM, auquel nous versons 4ml d'acétate d'éthyle et  $W_2$  ; avec 10ml de PVA 5%.

Le second changement pour ces deux formulation, sera au niveau de l'évaporation, puisqu'une fois les doubles émulsions obtenues, celles-ci seront toutes deux diluées dans 20ml de PVA 0.5% avant l'élimination du solvant (tableau II.5). **Note :** une fois l'acétate ajouté, le PLA ne se dissout plus.

**Tableau II.5** : Formulations pour l'étape de vérification.

Essai	W <sub>1</sub>	O	W <sub>2</sub>	v (rpm)	t (s)
Standard	0.5 ml Ins Actrapid	5ml DCM + 0.17g PLA	40 ml de 2.5% PVA (m/v)	10000	90
Blanc	0.5ml EPPI	5ml DCM + 0.17g PLA	40 ml de 2.5% PVA (m/v)	10000	90
Formule 1	0.5 ml d'une solution 2 : 10 v/v (Ins Jusline R : HCl) 0.01M) + 0.003g SDS	2ml DCM + 0.068g PLA	5 ml de 5% PVA (m/v) + 20 ml de 0.5% PVA (m/v)	10000	90
Formule 2	0.5 ml d'une solution 2 : 10 v/v (Ins Jusline R : HCl 0.01M) + 0.003g SDS	1ml DCM + 0.17g PLA et 4ml AcEt	10 ml de 5% PVA (m/v) + 20 ml de 0.5% PVA (m/v)	10000	90

### II.5.5. Spectroscopie infrarouge - Transformée de Fourier

**La spectroscopie infrarouge (IR)** : utilise la plage spectrale entre 12 500 et 20 cm<sup>-1</sup>, qui peut être subdivisée en IR lointain (FIR : 400–20 cm<sup>-1</sup>), IR moyen (MIR : 4 000-400 cm<sup>-1</sup>) et le proche infrarouge (NIR : 12 500–4 000 cm<sup>-1</sup>). Les signaux spectraux dans les gammes MIR et NIR sont des bandes d'absorption résultant des vibrations moléculaires. L'absorbance de l'échantillon est enregistrée à chaque longueur d'onde (nm) et, à l'exception des instruments NIR dispersifs, tracée par rapport à l'inverse de la longueur d'onde, c'est-à-dire le nombre d'onde (cm<sup>-1</sup>). L'absorbance dans la gamme MIR provient de deux types de vibrations fondamentales, à savoir l'étirement et la flexion. Les fréquences vibrationnelles peuvent être décrites de manière simpliste par un modèle mécanique "boules sur ressort" et corrélées avec des paramètres moléculaires basés sur une approximation d'oscillateur harmonique en considérant la force de la liaison et la masse des atomes comme variables centrales.

Pour qu'une vibration soit active dans le MIR, il faut une interaction moléculaire du champ électrique oscillant de l'onde électromagnétique. Comme cela n'est possible que si le déplacement conduit par les vibrations des atomes, induise également une modulation du



moment dipolaire, ainsi le vecteur du champ électrique du rayonnement doit osciller à la même fréquence que le moment dipolaire moléculaire.

De ce fait, la spectroscopie MIR est particulièrement sensible aux fonctionnalités polaires. La fréquence et l'intensité du rayonnement absorbé dépendent de la force de la liaison, des atomes dont la molécule est composée, de l'ampleur du changement de moment dipolaire et de l'environnement chimique. Par conséquent, la position, l'intensité et la largeur des pics d'absorption MIR fournissent des informations sur la structure moléculaire de l'échantillon, y compris les interactions inter et intramoléculaires telles que les liaisons hydrogène [80].

**Analyse :** nous caractériserons par IRTF sur une plage de  $400-4000\text{cm}^{-1}$ , en premier lieu, le PLA L9000 sous forme de film d'après un tâtonnement de 1 granulé pour environ 1ml de DCM ultérieurement étalé dans une boîte pétrie puis analysé à l'aide d'un porte-échantillon, et l'insuline Actrapid sous forme liquide passée sur disque de KBr. En second lieu, se sera pour les formulations établies en phase de vérification (essai 11, blanc, formule 2), une fois qu'elles auront séché à l'air libre. Celles-ci étant de forme poudreuse, sont compressées avec du KBr en ration de 2:98 % massique par presse hydraulique pour obtenir des pastilles.

# **Chapitre III :**

## **Résultats et discussion**

## Chapitre III : Résultats et discussion

Dans ce chapitre, nous étalerons nos résultats sur tout le long de la partie expérimentale, discuterons de leur contenus et essayerons de justifier les éventuelles erreurs de notre approche.

Les réponses que nous recherchons sont la CMC du PVA, la formation d'une double émulsion et dans quel sens, la réduction de la taille engendrée par l'évaporation, l'influence de la concentration de PVA, du volume d'insuline, de la vitesse d'agitation et du temps, l'optimum du domaine et avons nous atteint les 1  $\mu\text{m}$ , la stabilité de l'insuline encapsulée et au final, la possibilité d'améliorer la formulation optimale.

### III.1. Test de solubilité

- **PLA L9000** : consistant à incorporer du PLA dans du DCM, attendre sa dissolution et refaire le processus jusqu'à constatation d'un épaissement. Ceci est le tableau III.1 obtenu :

**Tableau III.1** : La masse ajoutée de PLA au temps t.

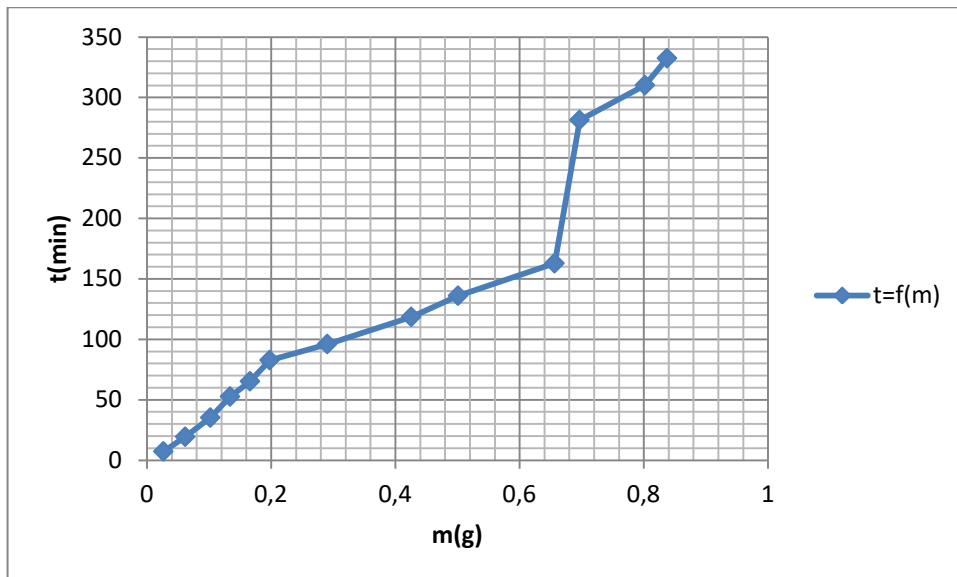
Temps <sub>dis</sub> [min]	0.00	7.27	19.37	35.23	52.62	65.23	82.75
Masse <sub>ajoutée</sub> [g]	0.0266	0.0352	0.0404	0.0318	0.0321	0.0316	0.0928
Temps <sub>dis</sub> [min]	96.07	118.50	136.00	162.83	281.33	310.12	332.42
Masse <sub>ajoutée</sub> [g]	0.1352	0.0753	0.1554	0.0402	0.1054	0.0355	0.0370

A 0.6564 g de masse totale, la solution devient visqueuse, et vers 0.802g, un blanchiment est perceptible. De ce fait, nous considérons la saturation souhaitée à 0.6564 g. D'où ;  $S_{\text{PLA}} = 0.1313 \text{ g/ml}$ .

Cette saturation linéaire, correspond au dépassement de la concentration de recouvrement critique qui s'extériorise par une augmentation de la viscosité, celle-ci est un facteur clé déteignant sur la taille des microcapsules. D'ailleurs, une fois le DCM évaporé nous notons la formation d'un réseau polymérique poreux (des mailles).

A très faible concentration, les macromolécules sont des pelotes isolées, très éloignées les unes des autres qui adoptent par conséquent un comportement conformationnel quasi

identique à celles d'une macromolécule unique en solution. Le régime est alors qualifié de régime dilué. Plus la concentration en polymère augmente, et plus les chaînes sont proches les unes des autres. Au delà de la concentration critique de recouvrement  $c^*$ , les chaînes se recouvrent et le régime est dit semi-dilué. Les solutions sont toujours principalement constituées de solvant mais une grande partie de leurs propriétés physico-chimiques sont dictées par les recouvrements entre macromolécules. En régime concentré, les interactions de type volume exclu sont inexistantes [81].



**Figure III.1 :** Temps de dissolution en fonction de la masse ajoutée totale.

La courbe (figure III.1) ne décrit pas le temps nécessaire à la dissolution d'une masse de PLA mais uniquement l'avancement de l'expérimentation, car le temps inscrit comprend plusieurs temps de dissolution de quantités fractionnées.

**N.B :** l'erreur expérimentale est assez importante, puisque toute la manipulation dépend des constations du manipulateur. Et autre remarque, le PLLA ne se dissout pas dans l'acétate d'éthyle à moins de chauffer à plus de 80°C.

- **PVA :** consistant à incorporer du PVA dans de l'eau distillée, attendre sa dissolution et refaire le processus jusqu'à constatation d'un épaissement. voici le résultat (tableau III.2) :

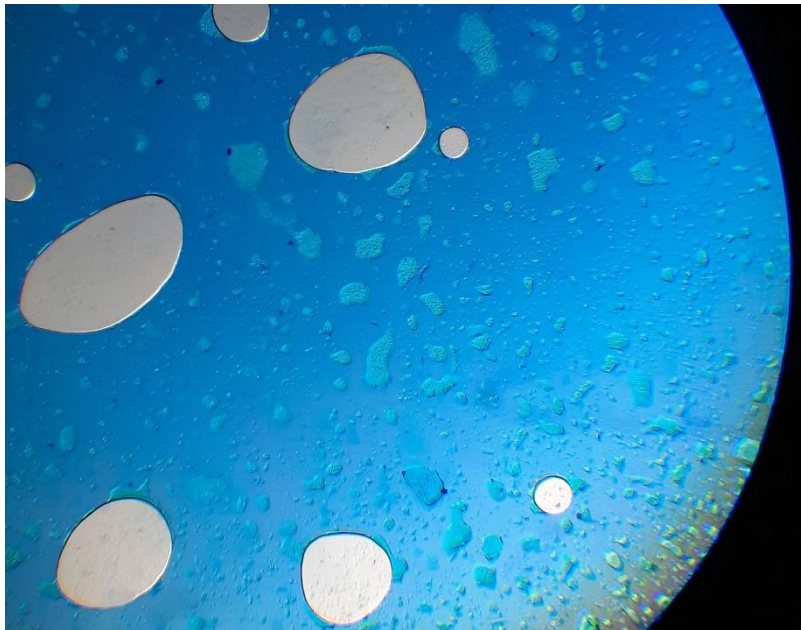
**Tableau III.2:** La masse ajoutée de PVA au temps t.

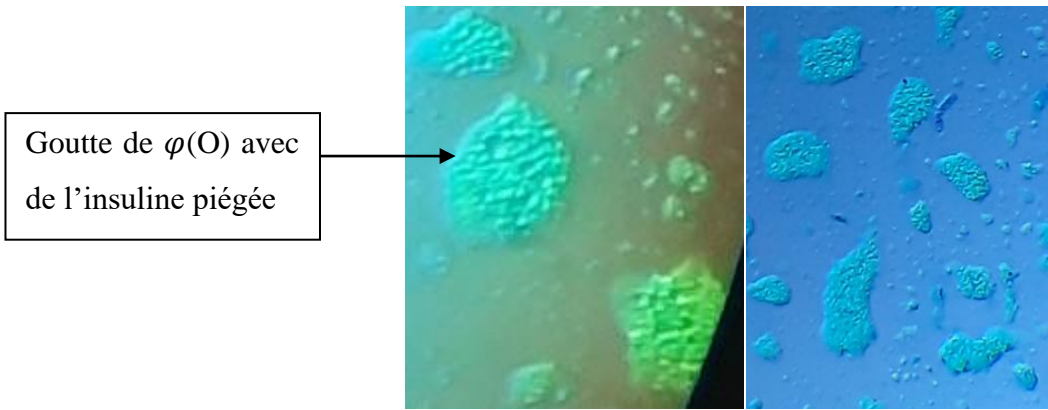
Temps <sub>dis</sub> [min]	0.00	4.45	9.87	27.58
Masse <sub>ajoutée</sub> [g]	0.0750	0.0849	0.1535	0.0062

A 15.75 min, formation d'un dépôt collant de PVA au tour du barreau magnétique. A 20.15 min, la solution apparait huileuse. A 34.22, apparition d'une mousse et de bulle en solution. Nous considérons donc le dépassement de la concentration micellaire critique vers 20.15 (l'augmentation de la viscosité reflète la présence de micelles piégeant le solvant), pour cela nous considérons la saturation souhaitée à  $S_{PVA} = 0.06268$  g/ml.

### III.2. Microscope optique

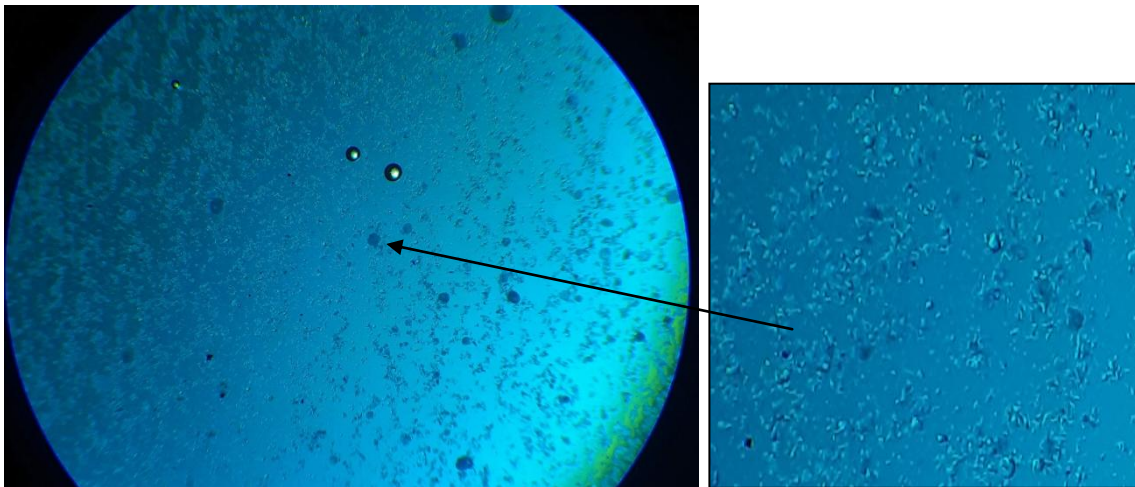
Nous nous attaquons ainsi à l'analyse de la formulation test, et obtenons ces photos prises par appareil, de l'avant/après évaporation (figure III.2/III.3) :





**Figure III.2 :** Image du microscope optique pour la microémulsion en phase test (avant évaporation).

Nous validons grâce à l'image du microscope la formation d'une double émulsion dans le sens  $W_1/O/W_2$ . Le colorant n'a pas infiltré les gouttes car celles-ci sont hydrophobes à l'interface, et on en remarque la démarcation. De plus, à l'intérieur de chaque goutte nous observons des gouttelettes piégées d'insuline.

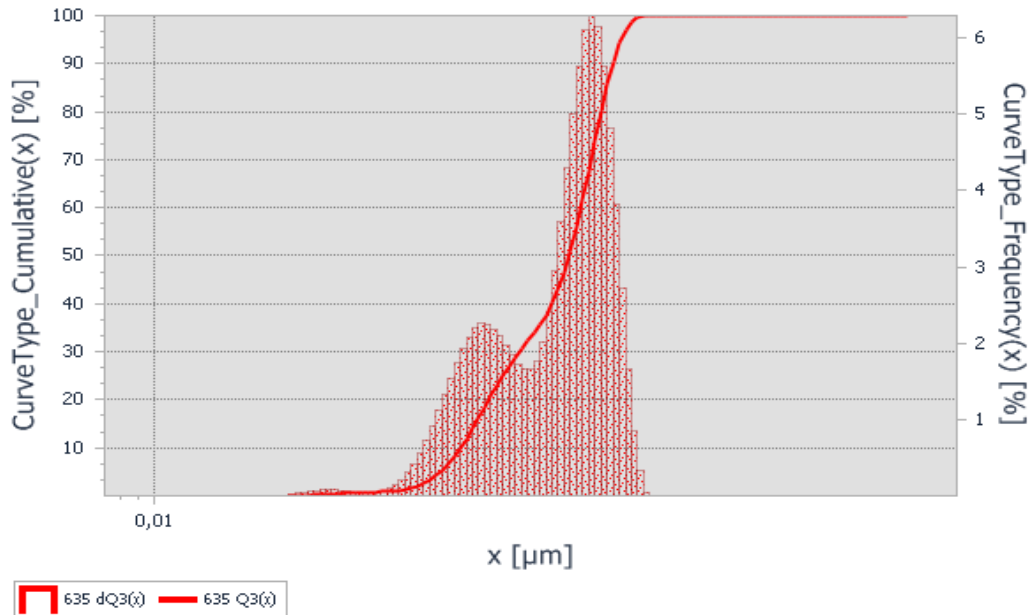


**Figure III.3 :** Image du microscope optique pour les microcapsules en phase test (après évaporation).

Les microparticules sont bien présentes en solution, à l'œil nous pouvons déduire que leur forme diffère mais elles ont plus ou moins toutes un aspect sphérique. Nous soulignerons notamment la présence d'agrégation des MP.

### III.3. Granulométrie laser

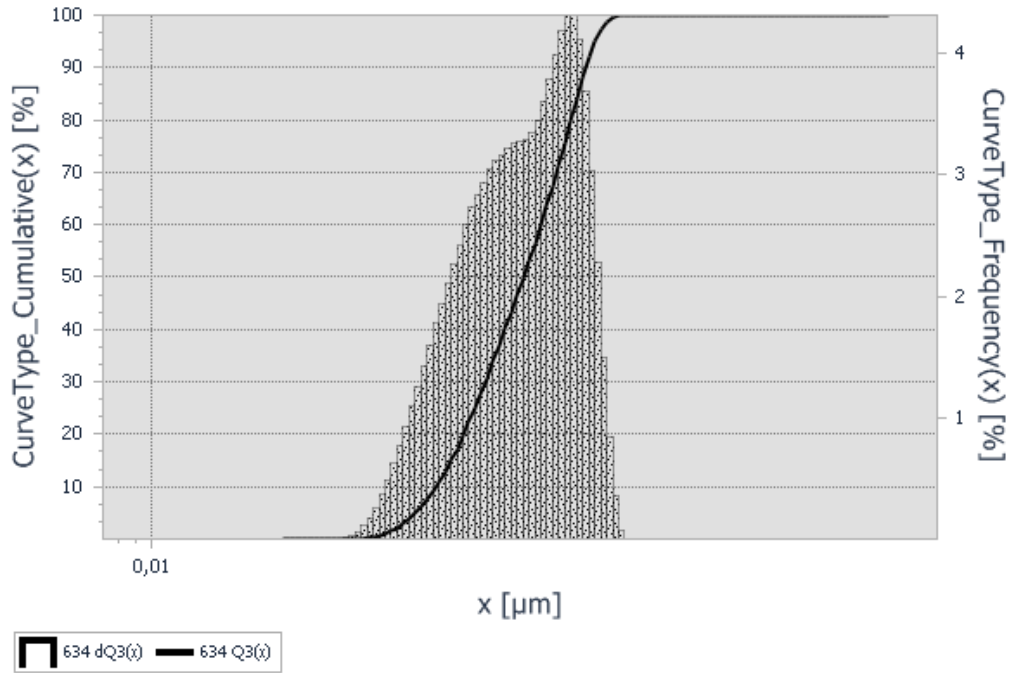
- **Analyse granulométrique de la formulation test** : nous avons les histogrammes acquis par granulométrie laser l'un pour la microémulsion et l'autre pour les microcapsules (figure III.4 et III.5) :



**Figure III.4** : Distribution de la taille des gouttes de la microémulsion test.

La granulométrie laser, nous a fournis les  $D(10) = 1.4249\mu\text{m}$ ,  $D(50) = 8.3662\mu\text{m}$  et  $D(90) = 16.9399\mu\text{m}$ . Donc, nous calculons le  $\text{Span} = 1.8545$ .

La courbe du diamètre est sous-forme bimodale, cela signifie que la taille est hétérogène selon un pic à ampleur dominante  $d = 12.7152\mu\text{m}$  pour une fréquence de 6.2928% et un second pic d'ampleur bien inférieure à  $d = 2.1256\mu\text{m}$ , fréquence = 2.2652%. Le  $D(4,3)$ , étant le diamètre volumique moyen, correspond à  $8.6618\mu\text{m}$ .



**Figure III.5:** Distribution de la taille des microcapsules test.

L'étape d'évaporation du solvant fait croître l'hétérogénéité de la distribution  $\text{Span} = 2.5824$ , mais a diminué le diamètre des particules comme suit :  $D(10) = 1.1101\mu\text{m}$ ,  $D(50) = 4.7260\mu\text{m}$  et  $D(90) = 13.3506\mu\text{m}$ , le  $D(4,3) = 6.1438\mu\text{m}$ .

De ce fait, nous déduisons que l'évaporation réduit la taille moyenne des microparticules pour cette formulation de 29.07%.

### III.4. Plan factoriel complet à 2 niveaux

Les paramètres fixés sont : la température ( $T_{\text{bain}} = 10 \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), la pression ( $P = P_{\text{atm}}$ ), la concentration du PLA en  $\varphi_{\text{org}} (C_{\text{PLA}} = 0.034\text{ g/ml})$ , volume de la  $\varphi_{\text{org}} = 5\text{ ml}$ , volume de la  $\varphi_{\text{aq2}} = 40\text{ ml}$ . Les variables prises en compte sont (tableau II.3) :



**Tableau II.3** : Domaine d'étude du plan factoriel.

Variables réelles	Variables codées	Minimum du domaine ( $Z_{\min}$ )	Centre du domaine ( $Z_{\text{centre}}$ )	Maximum du domaine ( $Z_{\max}$ )
$Z_1$ : $C_{\text{PVA}}$ [%, m/v]	$x_1$	0.5	1.5	2.5
$Z_2$ : $V_{\text{insuline}}$ [ml]	$x_2$	0.5	0.75	1
$Z_3$ : Temps [s]	$x_3$	30	60	90
$Z_4$ : vitesse [rpm]	$x_4$	5200	7600	10000

\*Insuline : Actrapid,  $v_1 = v_2 =$  vitesse,  $t_1 = t_2 =$  Temps

$C_{\text{PVA}}$  ; la concentration du PVA en  $W_2$ ,  $V_{\text{insuline}}$  ; le volume d'insuline ajouté à O, Temps ; le temps d'agitation pour une émulsification et vitesse ; la vitesse de rotation de l'Ultra-turrax.

- **Matrice :**

Le nombre d'expérience égal :  $2^k = 2^4 = 16$  (k, le nombre de facteurs), nous y ajouterons par la suite les essais au centre. La réponse correspond au D (4,3) [ $\mu\text{m}$ ].

**Tableau III.4** : Matrice d'effets et d'interactions pour le plan factoriel 2<sup>4</sup>.

N°essai	Variables réelles				Variables codées																réponse
	Z <sub>1</sub>	Z <sub>2</sub>	Z <sub>3</sub>	Z <sub>4</sub>	x <sub>0</sub>	x <sub>1</sub>	x <sub>2</sub>	x <sub>3</sub>	x <sub>4</sub>	x <sub>1</sub> x <sub>2</sub>	x <sub>1</sub> x <sub>3</sub>	x <sub>1</sub> x <sub>4</sub>	x <sub>1</sub> x <sub>2</sub> x <sub>3</sub>	x <sub>1</sub> x <sub>2</sub> x <sub>4</sub>	x <sub>1</sub> x <sub>3</sub> x <sub>4</sub>	x <sub>1</sub> x <sub>2</sub> x <sub>3</sub> x <sub>4</sub>	x <sub>2</sub> x <sub>3</sub>	x <sub>2</sub> x <sub>4</sub>	x <sub>2</sub> x <sub>3</sub> x <sub>4</sub>	x <sub>3</sub> x <sub>4</sub>	y
1	0.5	0.5	30	5200	1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	7.724
2	0.5	0.5	30	10000	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	1	-1	3.360
3	0.5	0.5	90	5200	1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	5.616
4	0.5	0.5	90	10000	1	-1	-1	1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	4.062
5	0.5	1	30	5200	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	8.271
6	0.5	1	30	10000	1	-1	1	-1	1	-1	1	-1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	4.982
7	0.5	1	90	5200	1	-1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	-1	7.812
8	0.5	1	90	10000	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1	3.981
9	2.5	0.5	30	5200	1	1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	4.521
10	2.5	0.5	30	10000	1	1	-1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	1.923
11	2.5	0.5	90	5200	1	1	-1	1	-1	-1	1	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1	-1	3.244
12	2.5	0.5	90	10000	1	1	-1	1	1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	-1	-1	-1	1	1.551
13	2.5	1	30	5200	1	1	1	-1	-1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	1	4.770
14	2.5	1	30	10000	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	2.187
15	2.5	1	90	5200	1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	-1	3.612
16	2.5	1	90	10000	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2.050

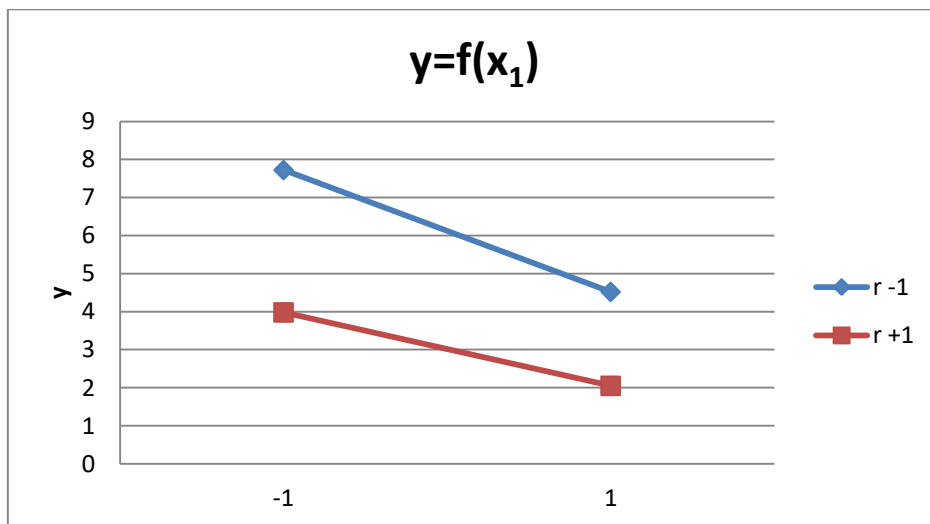
**Essais au centre :** le nombre d'essais au centre est sensé être 12 (dû à la propriété d'orthogonalité), mais par manque de temps et dû aux conditions de manipulation défavorables (canicule), seulement 5 furent réalisés.

**Tableau III.5 :** Matrice des essais au centre.

n <sub>0</sub> essai	Variables réelles				Variables codées					réponse
	Z <sub>1</sub>	Z <sub>2</sub>	Z <sub>3</sub>	Z <sub>4</sub>	x <sub>0</sub>	x <sub>1</sub>	x <sub>2</sub>	x <sub>3</sub>	x <sub>4</sub>	y <sub>0</sub>
1	1.5	0.75	60	7600	1	0	0	0	0	1.944
2	1.5	0.75	60	7600	1	0	0	0	0	2.236
3	1.5	0.75	60	7600	1	0	0	0	0	3.686
4	1.5	0.75	60	7600	1	0	0	0	0	4.504
5	1.5	0.75	60	7600	1	0	0	0	0	2.937

En s'armant de ces données nous allons évaluer qualitativement l'impacte de chaque facteur étudié sur le diamètre des microcapsules, les effets globaux :

**1. La concentration en PVA :**



**Figure III.6 :** Influence de la concentration de PVA sur la taille des MP (r : le reste des paramètres fixés à -1 ou 1).

2. Le volume d'insuline :

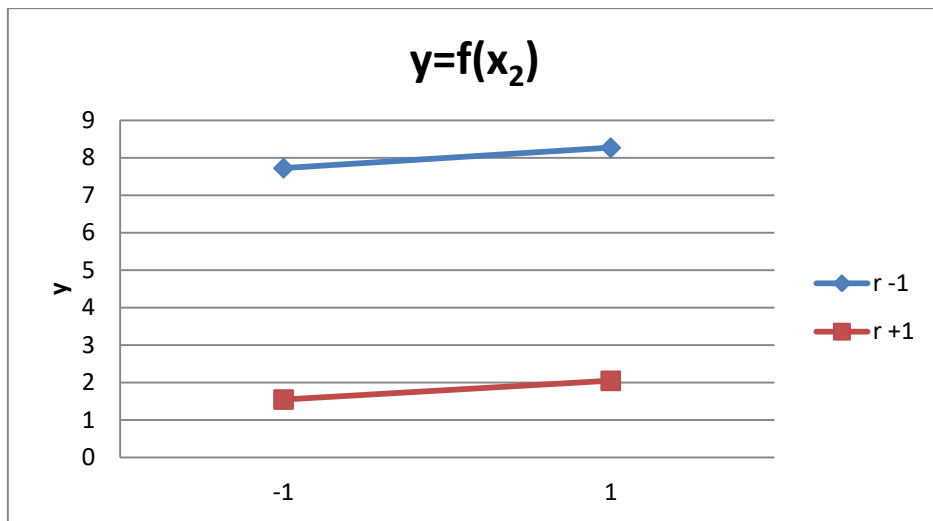


Figure III.7 : Influence du volume d'insuline sur la taille des MP (r : le reste des paramètres fixés à -1 ou 1).

3. Le temps d'agitation :

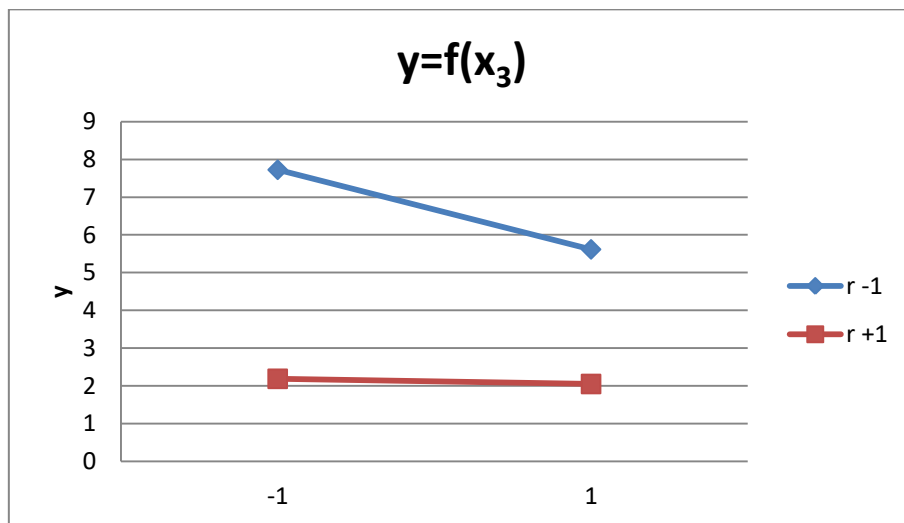
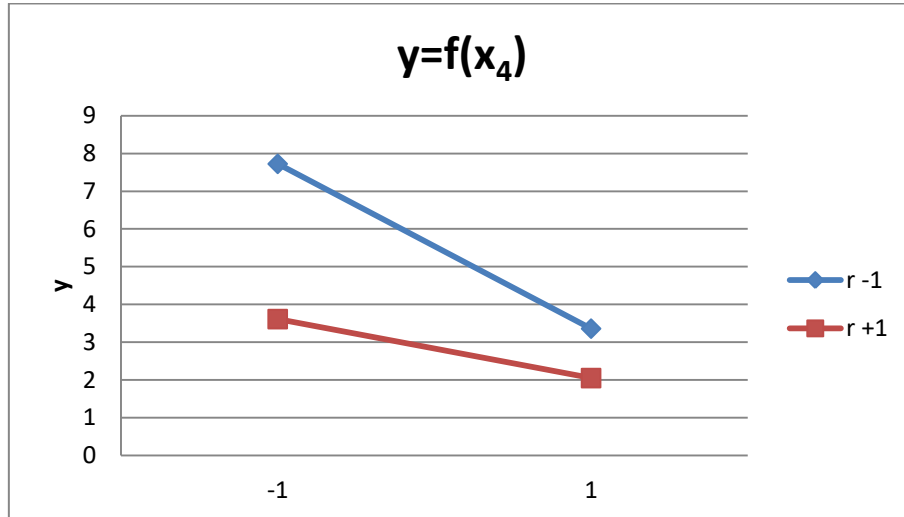


Figure III.8 : Influence du temps d'agitation sur la taille des MP (r : le reste des paramètres fixés à -1 ou 1).

#### 4. La vitesse d'agitation :



**Figure III.9 :** Influence de la vitesse d'agitation sur la taille des MP ( $r$  : le reste des paramètres fixés à -1 ou 1).

De ces graphes (figure III.6, III.7, III.8, III.9), nous faisons lumière d'une confirmation avec la théorie sur le fait que la taille des microcapsules soit inversement proportionnelle à la concentration de PVA, au temps et à la vitesse d'agitation, et qu'elle soit proportionnelle au volume d'insuline ajouté (le volume de la phase aqueuse  $W_1$ ). Nous pouvons même nous permettre la supposition que les paramètres les plus influents soient la concentration de PVA et la vitesse d'agitation.

- **Déterminations des paramètres significatifs :**

Nous obtenons les vecteurs suivants (tableau III.6):

**Tableau III.6 :** Vecteurs des coefficients  $b_j$  et  $t_j$ .

$j$	$b_j$	$t_j$
0	4,354125	15,9313882
1	-1,371875	5,0195787
2	0,354	1,29525712
3	-0,363125	1,32864475
4	-1,342125	4,91072588

12	-0,1815	0,66409369
13	-0,004875	0,01783723
14	0,287625	1,05239641
123	0,0255	0,09330242
124	0,08425	0,30826388
134	-0,021375	0,07820938
1234	0,21675	0,79307057
23	0,01875	0,06860472
24	-0,066	0,24148862
234	-0,20225	0,74001625
34	0,262125	0,95909399

D'après la table de Student relative à un test bilatéral, nous lisons la valeur de  $t_{\alpha}(f)$  pour le niveau de signification  $\alpha = 0,05$  et le nombre de degrés de liberté  $f = n_0 - 1 = 4$ , soit  $t_{0,05}(4) = 2,78$ . Donc, nous trions les  $t_j > 2,78$  et les faisons croiser les effets associés, pour réussir à déduire les coefficients et effets significatifs (voir tableau III.7) :

**Tableau III.7** : Les coefficients significatifs.

j	$b_j$
0	4,354125
1	-1,371875
4	-1,342125

Par cela, nous venons de confirmer notre précédente hypothèse. Les paramètres les plus influents dans notre domaine sont bien la concentration en PVA et la vitesse d'agitation.

Mon modèle linéaire s'écrit alors :

$$\hat{y} = 4,354125 - 1,371875 x_1 - 1,342125 x_4 \dots \dots \dots (17)$$

$\hat{y}$  : réponse prédite pour le D (4,3) [ $\mu\text{m}$ ];

$x_1$  :  $C_{\text{PVA}}$  [% , m/v] ;

$x_4$  : vitesse [rpm].

Ce qui nous donne :

$$D(4,3) = 4,354125 - 1,371875 C_{\text{PVA}} - 1,342125 v \dots\dots\dots(18)$$

• **Validation et recherche de biais :**

$$F_b = 0,55855254$$

La valeur tabulée du test de Fisher  $F_{0,95}(N - 1, n_0 - 1) = F_{0,95}(13, 4)$  est comprise entre [5.86 , 5.91]. Comme la valeur calculée est inférieure à 5,86, le modèle est alors sans biais.

$$F_v = 44,1421316$$

Selon Fisher,  $F_{0,95}(1 - 1, N - 1) = F_{0,95}(2, 13)$  est égale à 3,81. La valeur de  $F_v$  étant supérieure indique que l'équation de régression peut être considérée comme adéquate et le modèle est valide à 95%.

$$e_{\text{moy}} = 1,80411 \cdot 10^{-16} \mu\text{m}$$

La valeur moyenne des résidus est très proche de 0.

$$\bar{y}_0 = 3,1116 \mu\text{m}$$

$$\Delta\text{erreur} (\%) = \frac{|\beta_0 - \bar{y}_0|}{\beta_0} \times 100 = 28,5367324 \%$$

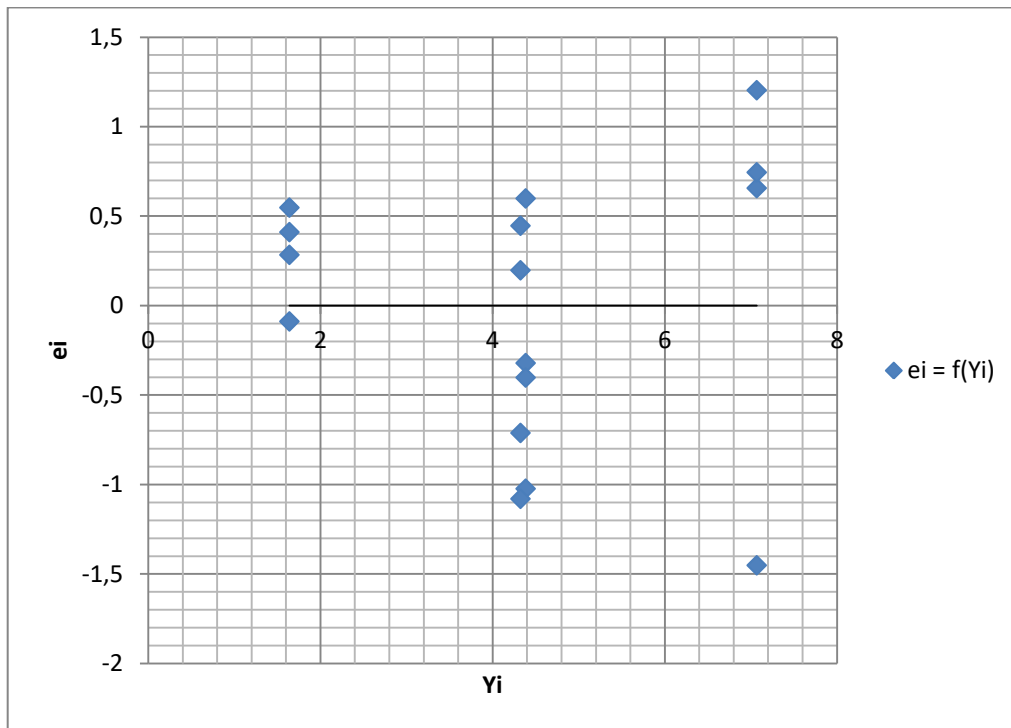
Le pourcentage d'erreur est supérieur à 5%, et le modèle n'est pas valide au centre du domaine.

**La corrélation :**

$$R^2 = 0,87164837 \text{ et } R_c^2 = 0,85190197$$

Le coefficient de détermination est proche de 1, le modèle est donc adéquat.

• Analyse résiduelle :



**Figure III.10 :** La variation des erreurs résiduelles en fonction de la réponse prédite.

L'analyse (figure III.10) révèle que notre modèle est incomplet, les résidus forment des droites sur 3 valeurs de  $\hat{y}$ , tableau III.8:

**Tableau III.8 :** Analyse des courbes résiduelles.

$\hat{y}$	$x_1$	$x_2$	$x_3$	$x_4$
7,068125	-1	-1	-1	-1
4,383875	-1	-1	-1	1
7,068125	-1	-1	1	-1
4,383875	-1	-1	1	1
7,068125	-1	1	-1	-1
4,383875	-1	1	-1	1
7,068125	-1	1	1	-1



4,383875	-1	1	1	1
4,324375	1	-1	-1	-1
1,640125	1	-1	-1	1
4,324375	1	-1	1	-1
1,640125	1	-1	1	1
4,324375	1	1	-1	-1
1,640125	1	1	-1	1
4,324375	1	1	1	-1
1,640125	1	1	1	1

Le facteur manquant semble être une corrélation entre la concentration de PVA et la vitesse d'agitation. Nous supposons que le facteur le plus probable soit l'énergie thermique apportée par l'agitation (et l'environnement) à la phase aqueuse continue. Dans l'objectif d'appuyer cette théorie, se présente l'étude de Maria Bercea et al. sur une solution aqueuse de PVA 3%, ayant appliqué un taux de cisaillement entre  $0.01 - 1000 \text{ s}^{-1}$  et une température entre  $4 - 80 \text{ }^\circ\text{C}$ , constatèrent que la solution présentait deux comportements ; une région newtonienne et une autre non-newtonienne, or entre  $0.7 - 70 \text{ s}^{-1} / 37 - 70^\circ\text{C}$  un rhéoépaississement est nettement visible, cet effet est dû à la rupture et à la réorganisation des agrégats dans des conditions de cisaillement modéré [82]. Cette augmentation de la viscosité dynamique entraîne de ce fait et comme vu dans les lois en chapitre I.2, un boost dans la réduction du diamètre (la viscoélasticité de plusieurs expériences prouve ce point).

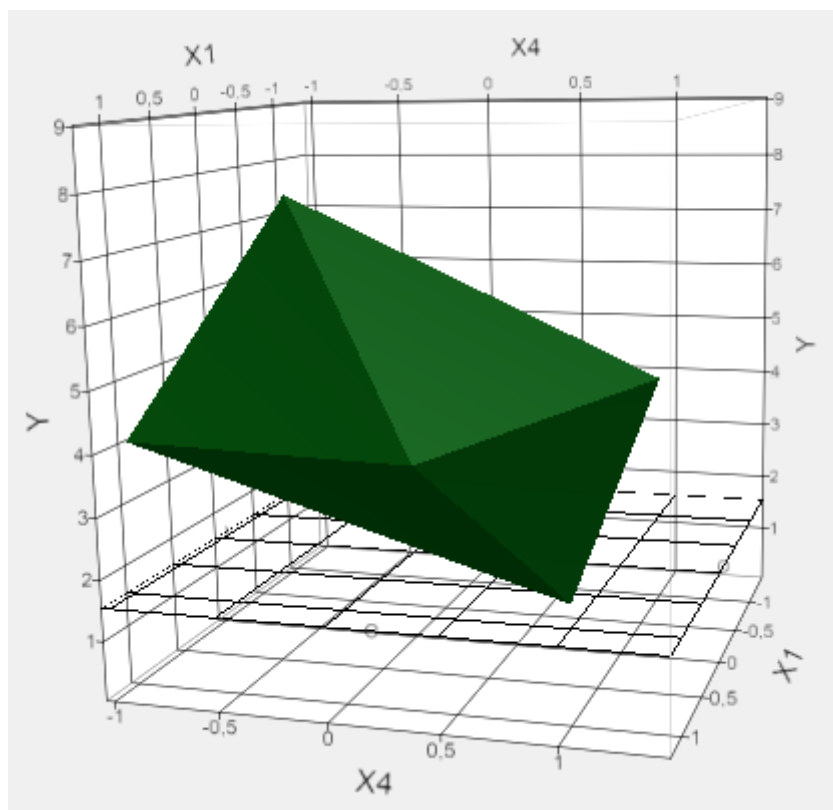
Néanmoins, la partie reflétant cela n'est d'autre que la validité au centre du domaine. Si nous ne prenons que les 2 tests (3 et 4) valides au centre, nous obtenons un modèle sans problèmes et valide en tout point aux conditions (12 essais). De ce fait, il est essentiel de refaire les essais au centre dans des conditions thermiques climatiques adéquates.

- **Les conditions optimales du domaine :**

Sachant que notre modèle est linéaire et de premier degré, nous pouvons affirmer que la valeur minimum de  $y$ , est celle des conditions expérimentales ; ( $x_1=1, x_2= -1, x_3= 1, x_4= 1$ ) pour  $y = 1.551\mu\text{m}$ .

- **Surface de réponse :**

Après avoir confirmé nos résultats sur le logiciel JMP 10(SAS) et dans une approche purement démonstratrice, nous traçons la surface de réponse dans le but de voir l'aspect d'un modèle linéaire (figure III.11).



**Figure III.11 :** La surface de réponse obtenue par notre plan factoriel.

La surface de réponse est plane, et la grille en dessous correspond à  $y = 1.551\mu\text{m}$ . Ce qui réaffirme les conditions optimales citées juste avant.

- **Critique du modèle :**

En premier lieu, hors mis le fait que notre modèle soit incomplet, il garde tout de même une erreur non-négligeable au moment de la double-émulsion, en opérant un

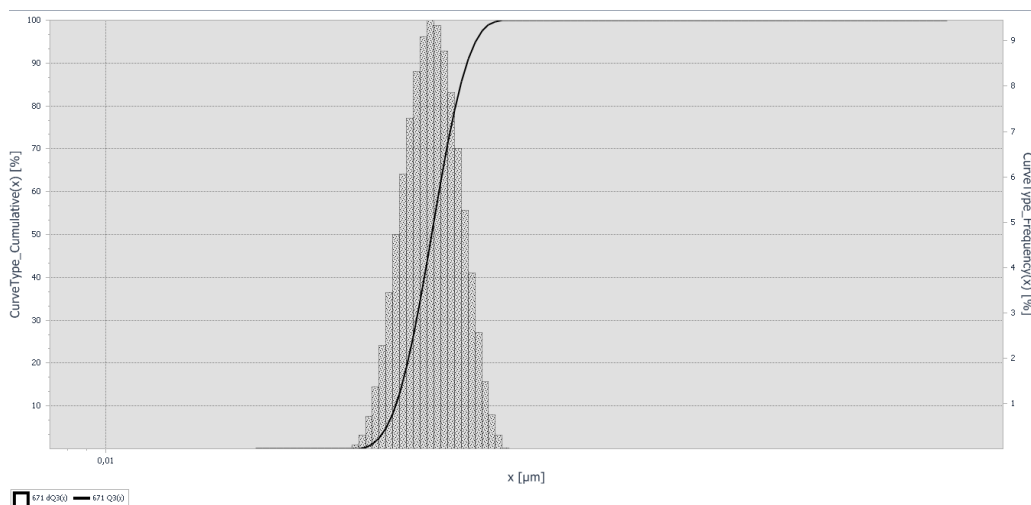
transvasement, conduisant à une perte de phase dispersée ( $W_1/O$ ). Il y'a aussi, une erreur au niveau de l'agitation car la hauteur d'immersion de l'ultra-turrax n'est pas fixée.

En second lieu, nous avons omis de prendre en compte l'hétérogénéité des distributions mesurées. Nous nécessitons donc d'une condition pour l'élimination du domaine hétérogène. Dans ce cas, 2 options simples s'offrent à nous ; soit user du Span en le délimitant ou bien du calcul d'uniformité fournis dans les statistiques de la distribution. De plus, l'hétérogénéité est proportionnelle à la taille et indique souvent la présence d'agrégation des particules.

### III.5. Vérification

Le palier de vérification comporte une remise en question de la formulation, pour cela nous débutâmes en recréant des microcapsules standards, celles-ci sont juste une confirmation des conditions optimales, que nous analysons par granulométrie laser :

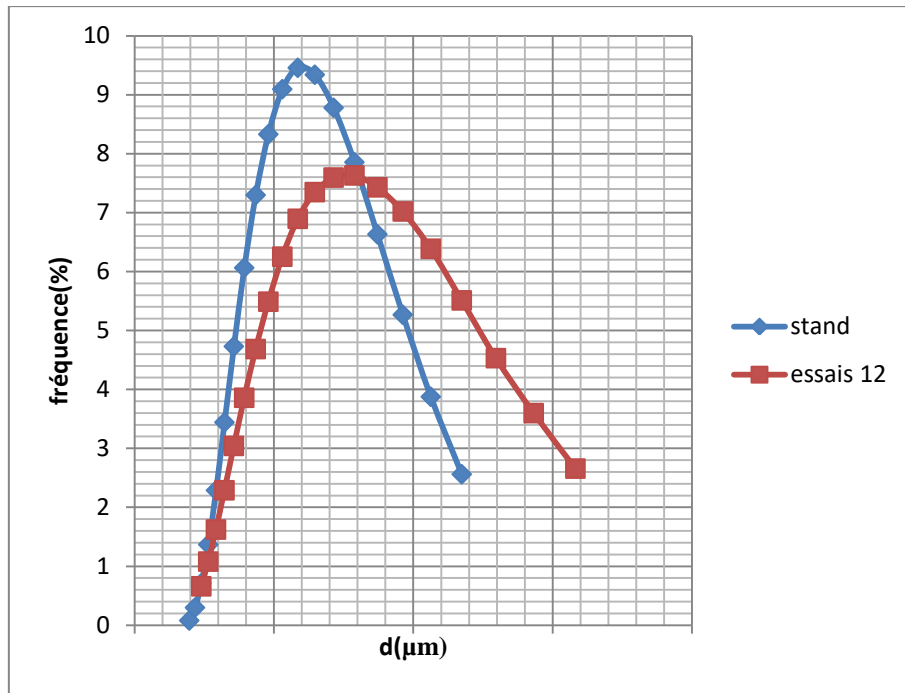
- **Standard :**



**Figure III.12 :** Distribution de la taille des MP pour l'essai standard.

Selon la figure III.12, le  $D(10) = 0.6710 \mu\text{m}$ ,  $D(50) = 1.1341 \mu\text{m}$ ,  $D(90) = 1.8893 \mu\text{m}$  et  $D(4,3) = 1.2167 \mu\text{m}$ .

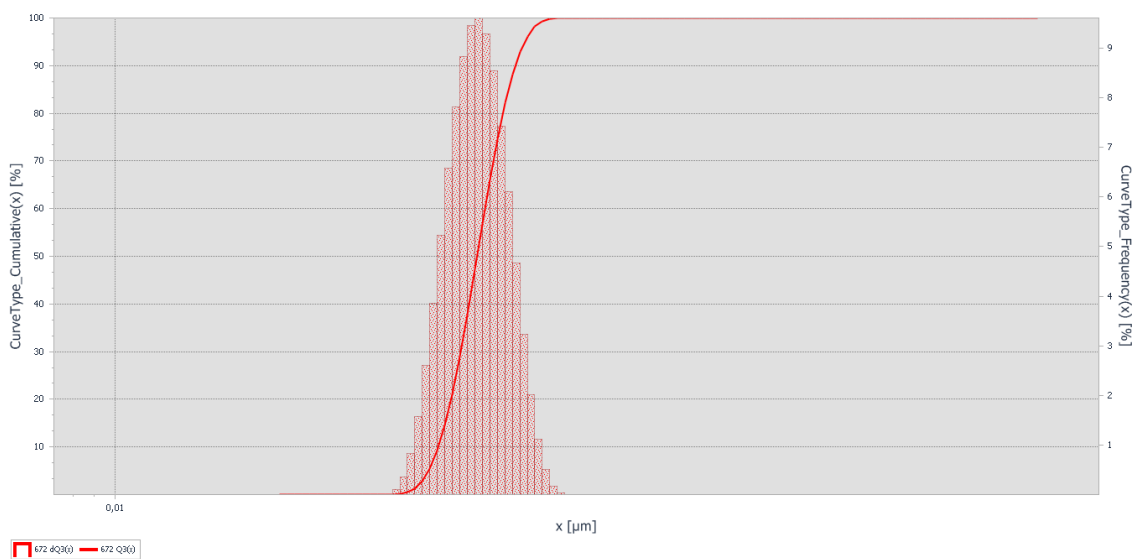
- **Comparaison entre standard et optimum :** étant la même formulation, l'intérêt de cette démarche est de tester à nouveau la reproductibilité.



**Figure III.13 :** Distributions de la taille des MP pour l’essai standard et l’essai 12 (optimum).

La superposition des deux histogrammes (en figure III.13) prouve l’infime différence en fréquence qu’ils ont pour une même plage de diamètre. Nous pouvons ainsi prétendre à une bonne reproductibilité. **Note :** les microcapsules standards ne résistent pas à un pH de 5.5.

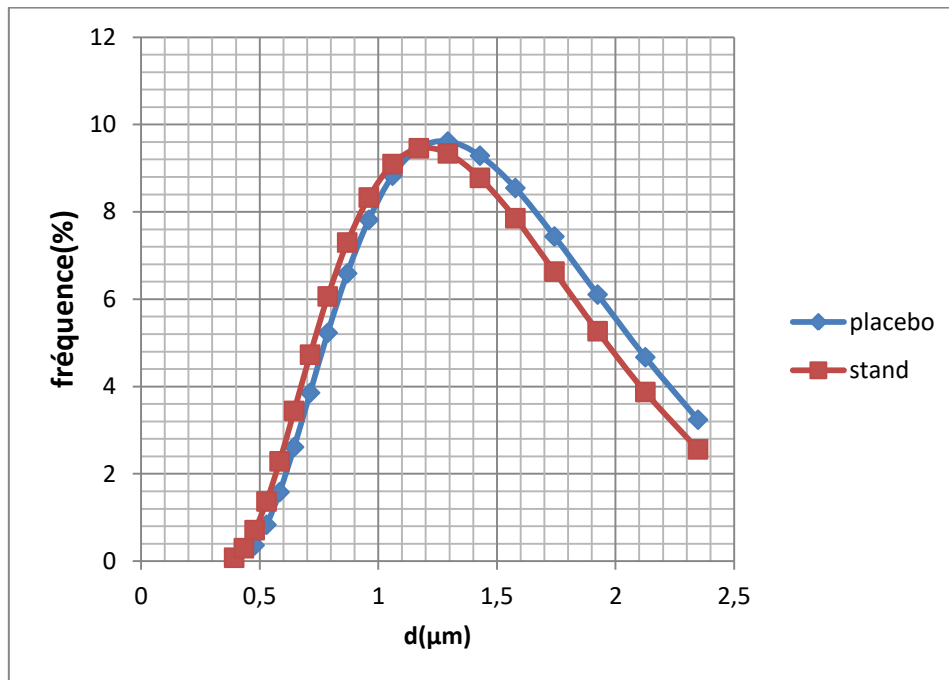
- **Blanc ou placebo:** exactement les mêmes conditions que l’essai standard, sauf que l’EPPI remplace l’insuline Actrapid.



**Figure III.14 :** Distribution de la taille des MP pour l’essai placebo.

Selon la figure III.14, le  $D(10) = 0.7216 \mu\text{m}$ ,  $D(50) = 1.2056 \mu\text{m}$ ,  $D(90) = 1.9994 \mu\text{m}$  et  $D(4,3) = 1.3132 \mu\text{m}$ .

Lorsque nous comparons le diamètre volumique moyen de l'essai placebo à celui du standard (figure III.15), la différence est de 7.35%. Nous additionnons à cela une superposition des histogrammes comme suit :



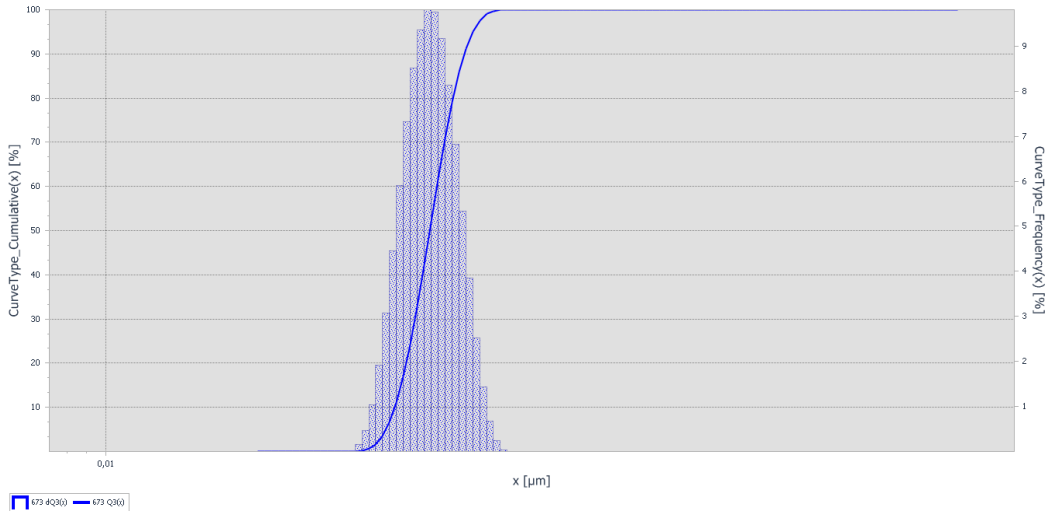
**Figure III.15 :** Fréquences de distribution de la taille des MP pour l'essai standard et le blanc.

Nous observons une similitude ; ces courbes sont quasi-identiques, desquelles nous déduisons que l'insuline tout comme l'EPPI n'influence presque pas la taille des microcapsules, donc nous suggérons pour les prochaines recherches de justement n'utiliser que l'eau afin d'être plus économe. Autre point prometteur du fait qu'il n'y ait presque aucun écart, est que cela signifie aussi que la viscosité de la phase dispersée est la même que l'eau, et de ce fait que l'insuline ne s'est presque pas agrégée.

- **Formule 1 :**

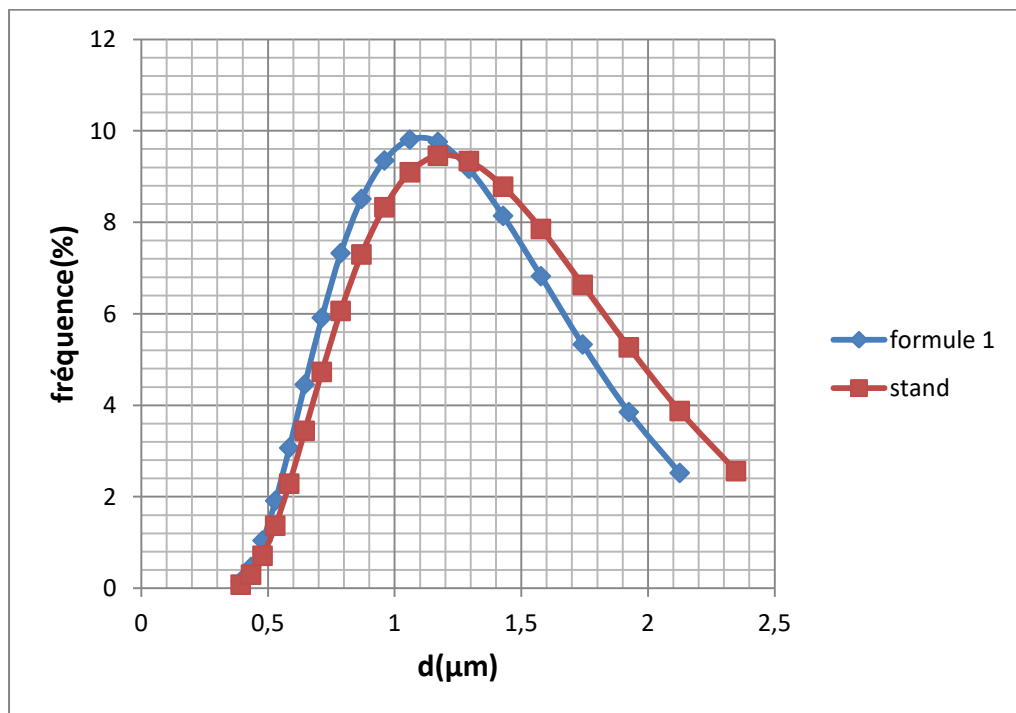
Dans cette mixture, nous remplaçons l'insuline commerciale Actrapid par une solution aqueuse composée d'insuline Jusline R (cette insuline ne contient pas de zinc ce qui signifie que la conformation en est dimérique et monomérique), dissoute dans du HCl 0.01M (pH  $\approx$  2 – 3), contenant le SDS un tensioactif reporté dans les recherches de Young Min Kwon et

al.(2001) prouve qu'il arrive à stabiliser l'insuline à l'interface W/O une fois leur ratio supérieur à 1 : 4 (ins :SDS) [52]. La concentration en PVA est de 5% (à 80% du  $S_{PVA}$ ). Les résultats sont :



**Figure III.16 :** Distribution de la taille des MP pour la formule 1.

Selon la figure III.16, le  $D(10) = 0.6300 \mu\text{m}$ ,  $D(50) = 1.0397 \mu\text{m}$ ,  $D(90) = 1.7044 \mu\text{m}$  et  $D(4,3) = 1.1119 \mu\text{m}$ . La comparaison au standard donne une différence de 8.61% pour le  $D(4,3)$ . Et la comparaison des histogrammes, nous donne (figure III.17) :

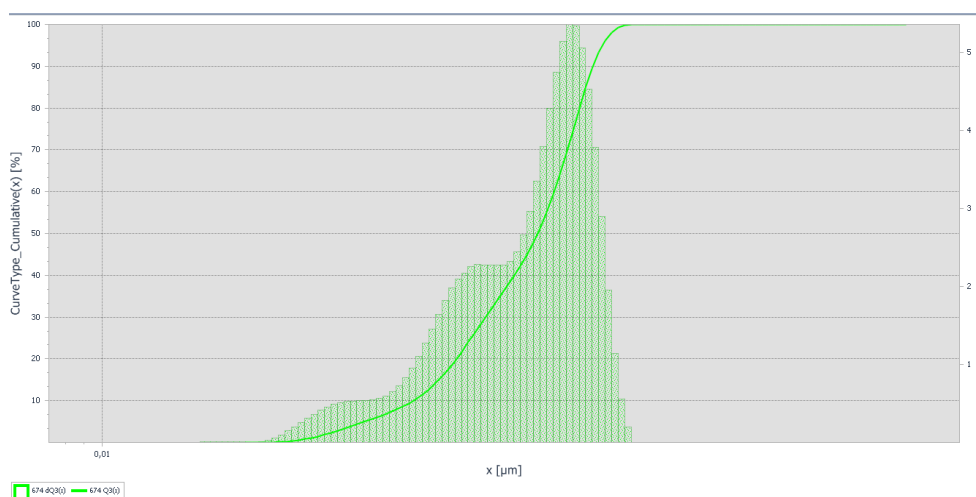


**Figure III.17 :** Distribution de la taille des MP pour l'essai standard et la formule 1.

Même constat que pour le placebo la distribution est presque identique. Ce qui signifie que 5% de PVA ne réduit plus la tension de surface comparé au 2.5%. Du coup, cela nous amène à conclure que la concentration micellaire critique du PVA se trouve aux alentours de 2.5% et l'ajout d'un second tensioactif anionique en fines quantités ainsi que la réduction de la phase aqueuse en émulsification ne déteint pas sur le diamètre des microcapsules. De quoi, encourager à saturer en CMC tout en diminuant grandement le volume afin d'éviter le transvasement.

- **Formule 2 :**

Dans cette mixture, nous voulions baisser la quantité de DCM utilisée mais garder le même rapport W/O, en le remplaçant par de l'acétate d'éthyle.



**Figure III.18 :** Distribution de la taille des MP pour la formule 2.

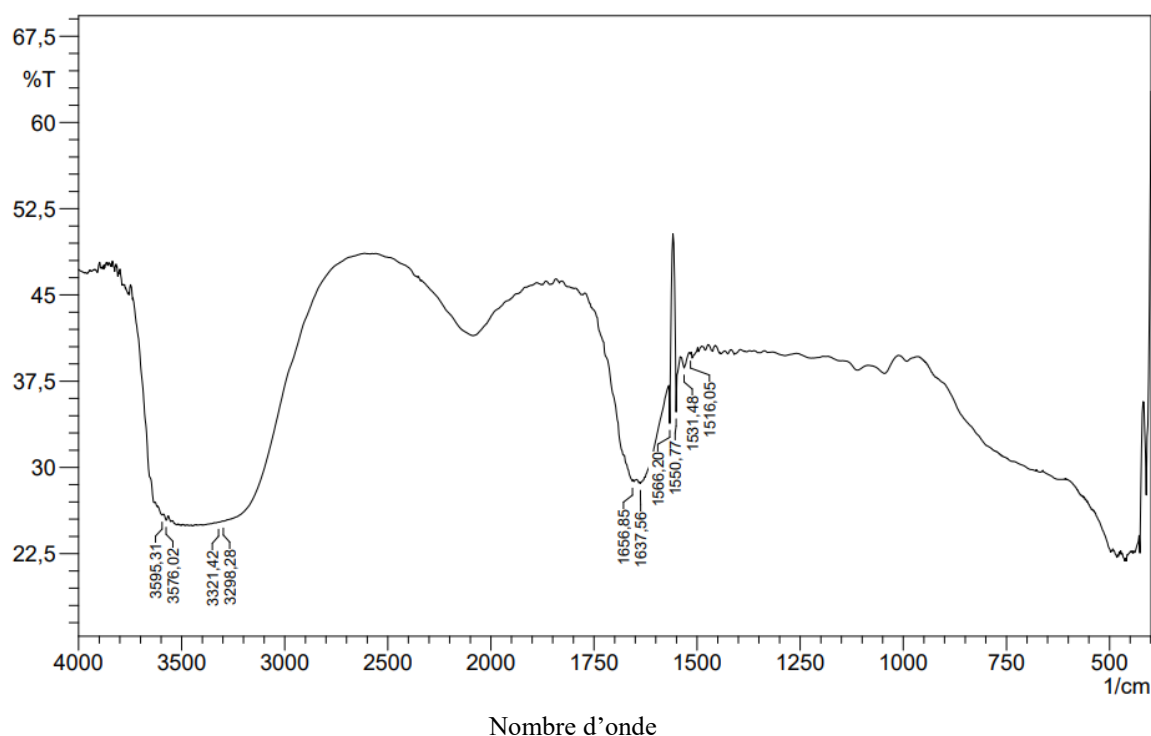
Selon la figure III.18, le  $D(10) = 1.1309 \mu\text{m}$ ,  $D(50) = 7.4661 \mu\text{m}$ ,  $D(90) = 17.3830 \mu\text{m}$  et  $D(4,3) = 8.3922 \mu\text{m}$ .

La courbe indique un pic dominant et 2 autres parasites. Cette non-uniformité, se traduit aussi par la présence d'agrégats en solution. Lors de l'évaporation, l'acétate d'éthyle soluble dans l'eau se diffuse en solution aqueuse et l'extraction soudaine d'une grande quantité d'acétate d'éthyle de la phase dispersée fait précipiter le polymère et agglomérer les microcapsules.

### III.6. Infrarouge - Transformée de Fourier

Nous analysons par IRTF l'insuline Actrapid, le PLA, l'essai n°11 (après que se soit passée une semaine) et le blanc. Ainsi qu'un autre échantillon la formule 2, ayant des microcapsules très agrégées et non symétriques, n'a pas semblé nécessiter d'un blanc. Cela dit, son seul intérêt à l'analyse fut la stabilité de l'insuline.

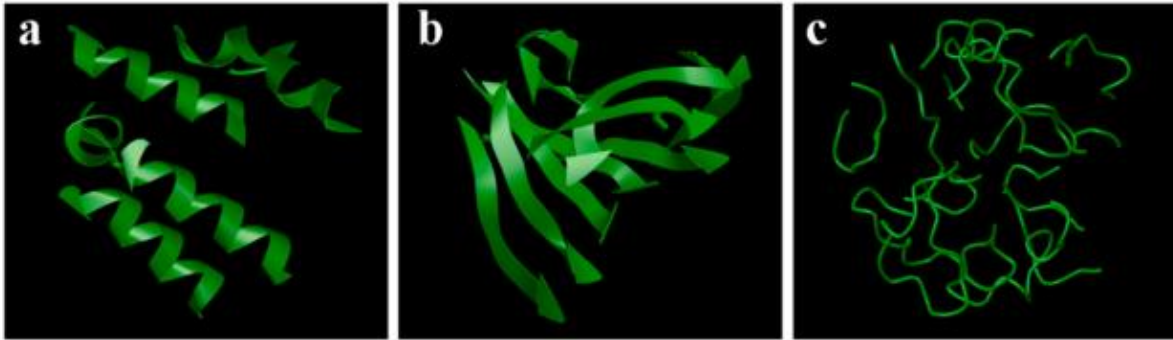
- **Analyse IRTF de l'insuline Actrapid :** ce produit commercial comporte plusieurs composants cités en amont mais nous ne nous intéresserons qu'à la protéine y figurant.



**Figure III.19 :** Spectre IRTF de l'insuline Actrapid.

L'absorption IR de l'insuline dans la région IR moyen donne les régions Amide A (~ 3300cm<sup>-1</sup>) et Amide B (~ 3100cm<sup>-1</sup>) en bande large, et les Amide I à Amide III, utilisées pour l'identification de la structure secondaire des protéines. Parmi celles-ci, la région Amide I, entre 1700 et 1600 cm<sup>-1</sup>, est la plus sensible à la structure secondaire des protéines et correspond à la vibration d'étirement C=O de la liaison peptidique. La bande d'absorption pour l'amide I de 1650-1658 cm<sup>-1</sup>, 1640-1648 cm<sup>-1</sup> et 1620-1640 cm<sup>-1</sup> symbolise la conformation  $\alpha$ -hélicoïdale, en bobine aléatoire, ou feuillet  $\beta$  respectivement (figure III.20) [83,84]. En projetant ces informations sur notre spectre d'absorbance (figure III.19) ; nous détectons les pics de l'amide I : 1653cm<sup>-1</sup>( $\alpha$ -hélicoïdale), 1637.56 cm<sup>-1</sup> (feuillet  $\beta$ ).

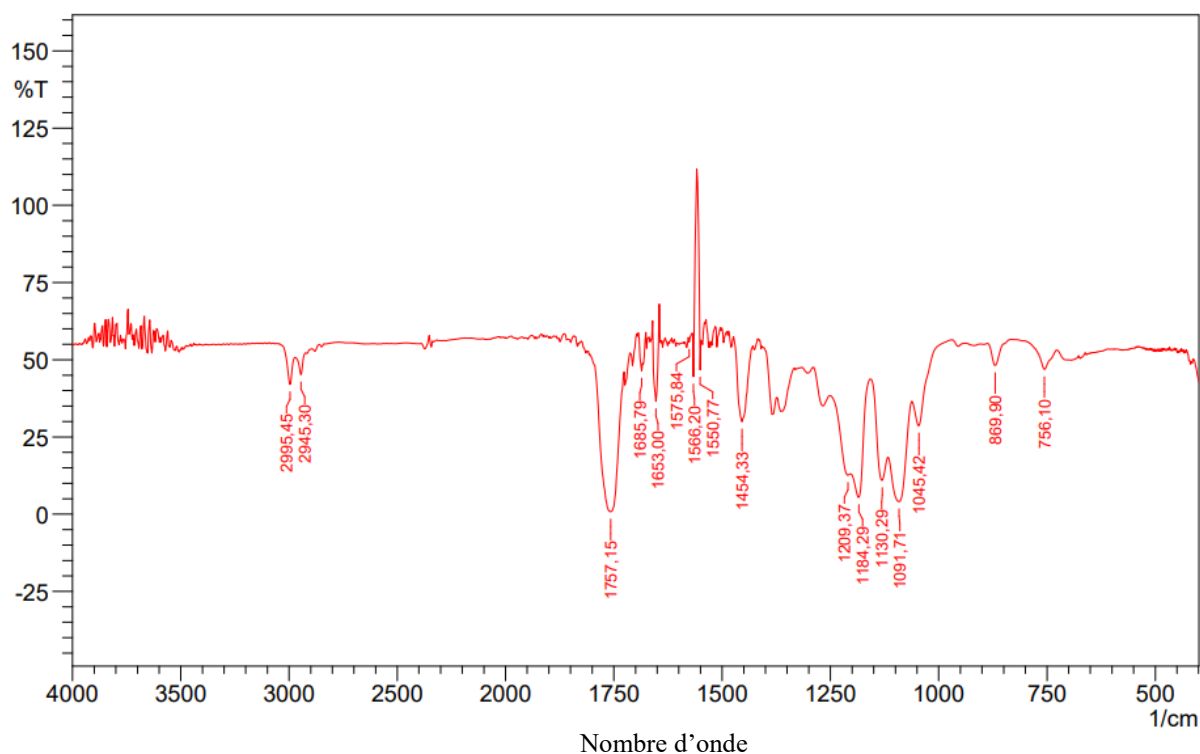




**Figure III.20 :** Structure secondaire des protéines. (a) hélice  $\alpha$  ; (b) feuillet  $\beta$ ; (c) Bobine aléatoire.

La bande Amide II, qui couvre la région spectrale entre  $1550$  et  $1540\text{ cm}^{-1}$  avec 2 pics à  $1566.20\text{ cm}^{-1}$  et  $1550.77\text{ cm}^{-1}$ , représente la flexion N-H dans le plan (60%) et à l'étirement C-N (40%). La région spectrale Amide III ( $1350\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$ ) est due à une combinaison d'étirements C-C et C-N et de vibrations de flexion C-H et est appelée la région d'empreintes digitales parce que chaque série d'absorption produit des modèles de pics différents et compliqués. Elle est relativement faible en signaux, mais n'a pas l'interférence de la bande vibrationnelle de l'eau qui affecte la région Amide I. D'ailleurs, les régions Amide I et II sont sensibles à la structure secondaire de la protéine parce que le C = O et les liaisons N-H sont impliquées dans les liaisons hydrogène de la structure secondaire des protéines [83].

- **Analyse IRTF du PLA :** cette analyse qualitative, nous permet d'identifier les pics du PLLA.



**Figure III.21** : Spectre IRTF du PLA L9000.

Les attributions générales pour les bandes présentes en analyse du PLA semi-cristallin (en figure III.21) sont présentées dans le tableau III.9 ci-dessous.

**Tableau III.9** : Attributions des bandes du PLA L9000. (as : asymétrique, s : symétrique)

Position (cm <sup>-1</sup> )	Attribution	Intensité
756,10	$\delta C = O$	0,3337
869,90	$\nu C - COO$	0,3184
1045,42	$\nu C - CH_3$	0,5472
1089,78	$\nu_s COC$	1,3876
1130,29	$r_{as} CH_3$	0,9642
1184,29	$\nu_{as} COC$	1,2853
1211,30	$\nu_{as} COC$	0,9009
1269,16	$\delta CH + \nu COC$	0,4551
1365,60	$\delta CH + \delta_s CH_3$	0,4816
1381,03	$\delta_s CH_3$	0,5025
1450,47-1458,18	$\delta_{as} CH_3$	0,5380 - 0,5308
1757,15	$\nu(C = O)$	2,2001

2945,30	$\nu_s \text{CH}_3$	0,3467
2995,45	$\nu_{as} \text{CH}_3$	0,3788

Les bandes IR à 2995, 2945  $\text{cm}^{-1}$  sont attribuées à la région d'étirement CH ( $-\text{CH}_3(\text{asym}), \text{CH}_3(\text{sym})$ ), qui dans notre polymère sont faibles. La région d'étirement C=O apparaît dans les spectres IR à environ 1759  $\text{cm}^{-1}$  sous la forme d'une large bande asymétrique principalement due aux modes actifs A et E1, mais qui dans notre cas est symétrique à 1757  $\text{cm}^{-1}$ . Le  $\text{CH}_3$  est responsable de l'apparition des pics à 1450-1458  $\text{cm}^{-1}$  et la déformation CH apparaît à 1381 et 1365  $\text{cm}^{-1}$ .

Les modes d'étirement C–O du groupe ester se montrent à 1211  $\text{cm}^{-1}$  et le mode asymétrique C–O–C apparaît à 1184  $\text{cm}^{-1}$ . A 871 et 756  $\text{cm}^{-1}$ , surgissent deux pics relativement faibles attribuables respectivement aux phases amorphe et cristalline du PLA. Les plages en dessous de 300  $\text{cm}^{-1}$  sont principalement dues aux styles de torsion  $\text{CH}_3$  et aux torsions squelettiques C–C [85].

- **Analyse IRTF du blanc :** des microcapsules composés d'exactly la même formulation que l'essai 11, mais en guise de phase aqueuse  $W_1$  (insuline) nous avons pris de l'EPPI ( $W_1 : 0.5\text{ml EPPI}, W_2 : 40\text{ml } 2.5\% \text{ PVA}$ ).

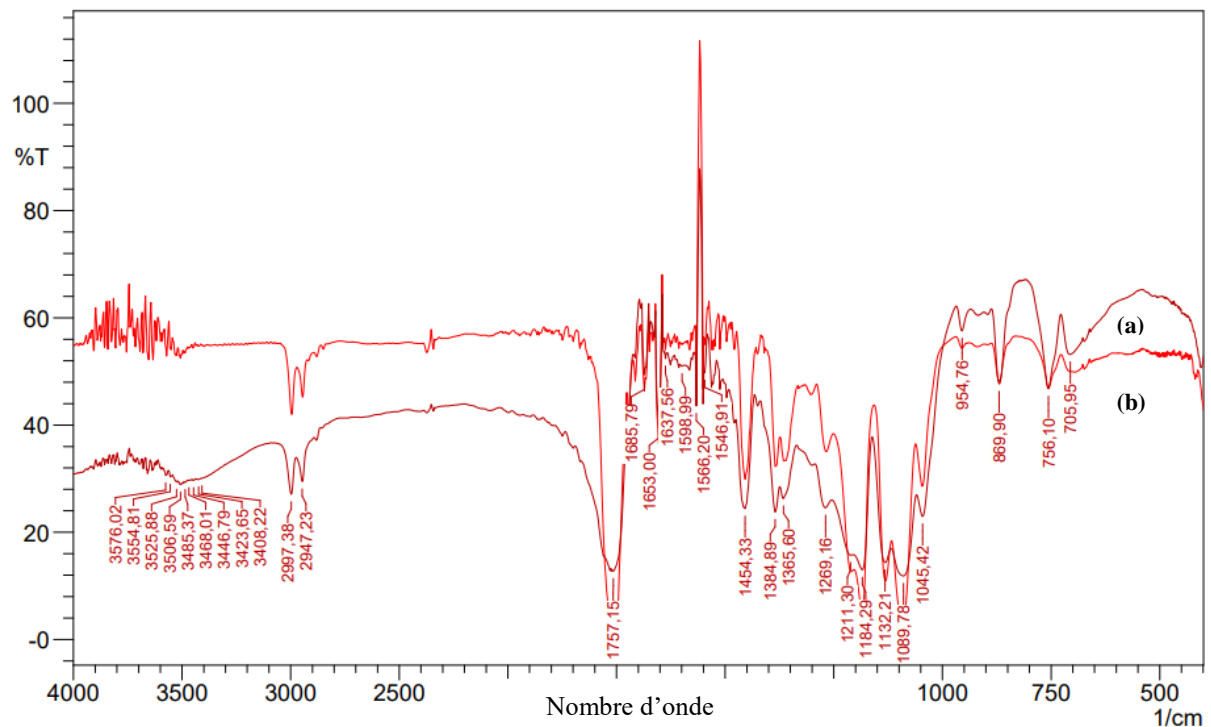
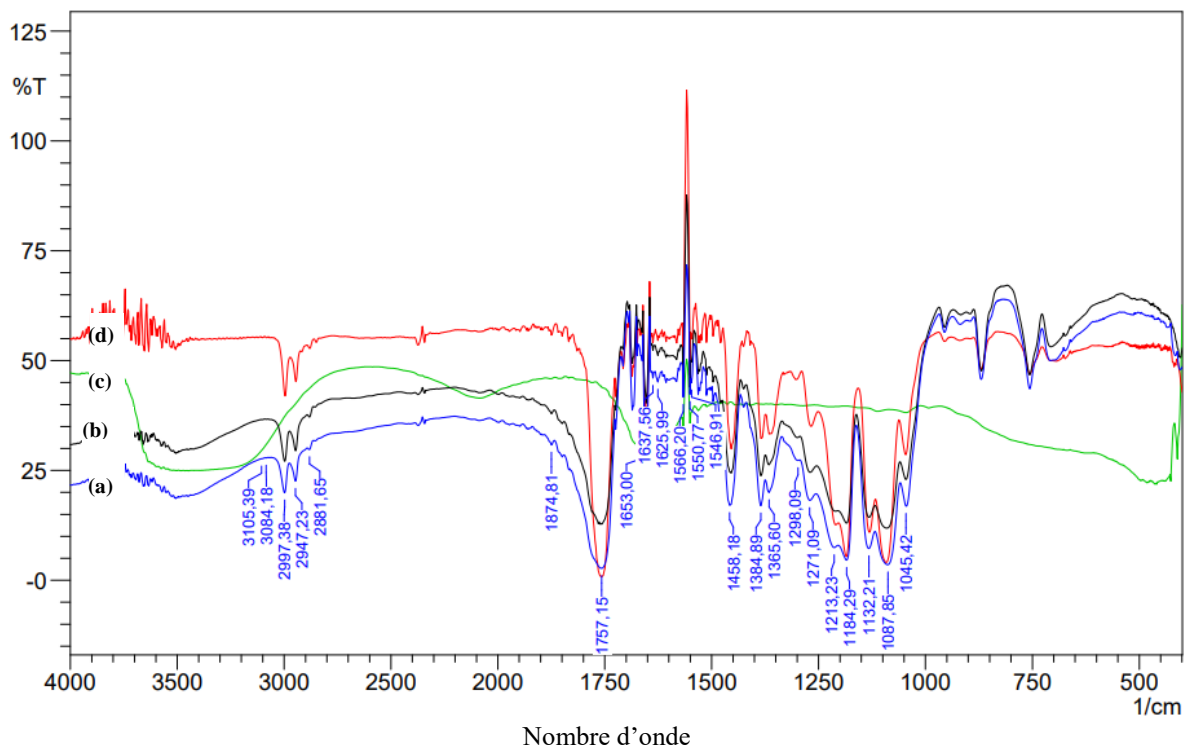


Figure III.22 : Spectres IRTF du blanc (a) et du PLLA (b).

Nous remarquons en figure III.22, la présence de tous les pics distinctifs du PLA dans le blanc et une atténuation du pic  $1757\text{cm}^{-1}$ , correspondant à  $\text{C}=\text{O}$ , que nous attribuons à une diminution de l'épaisseur du film. Les phases organiques (DCM + PLA) préparées pour l'obtention du film PLLA et des microcapsules du blanc, ont une composition identique. De ce fait, en prenant compte de la surface d'étalement dans les deux cas, nous pouvons suggérer que la diminution du pic caractéristique du PLA revient à une quantité moindre dans le cas des microcapsules [86].

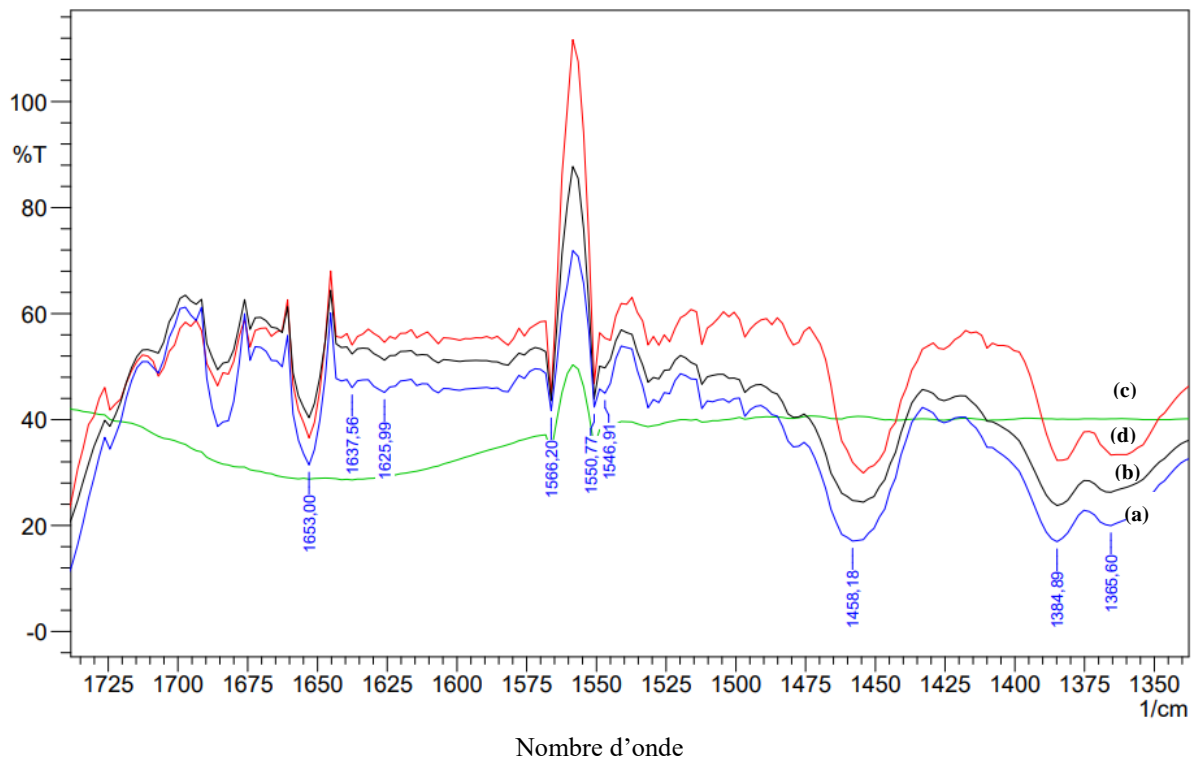
- **Analyse IRTF de l'essai 11** : cet échantillon correspond à des microcapsules de PLA renfermant de l'insuline ( $W_1$  : 0.5ml Ins,  $W_2$  : 40ml 2.5% PVA).



**Figure III.23** : Spectres IRTF de l'essai 11 (a), du blanc (b), de l'insuline Actrapid (c) et du PLLA(d).

Dans la figure III.23, la comparaison des spectres rapporte que les pics entre l'essai 11 et le blanc sont identiques il n'y a que leurs intensités qui diffèrent, ce qui entrave la lecture de la présence et de la stabilité de l'insuline, cela dit, nous remarquons un pic négligeable  $3105\text{cm}^{-1}$  à la région de l'Amide B. De plus, l'intensité du pic  $\text{C}=\text{O}$  a augmenté grandement, en suivant la logique évoquée en amont, cela reviendrait cette fois à l'augmentation de l'épaisseur du film due à une surface d'étalement inférieure (diamètre plus grand des microcapsules) et autre remarque, nous ne distinguons pas le pic du groupement OH vers

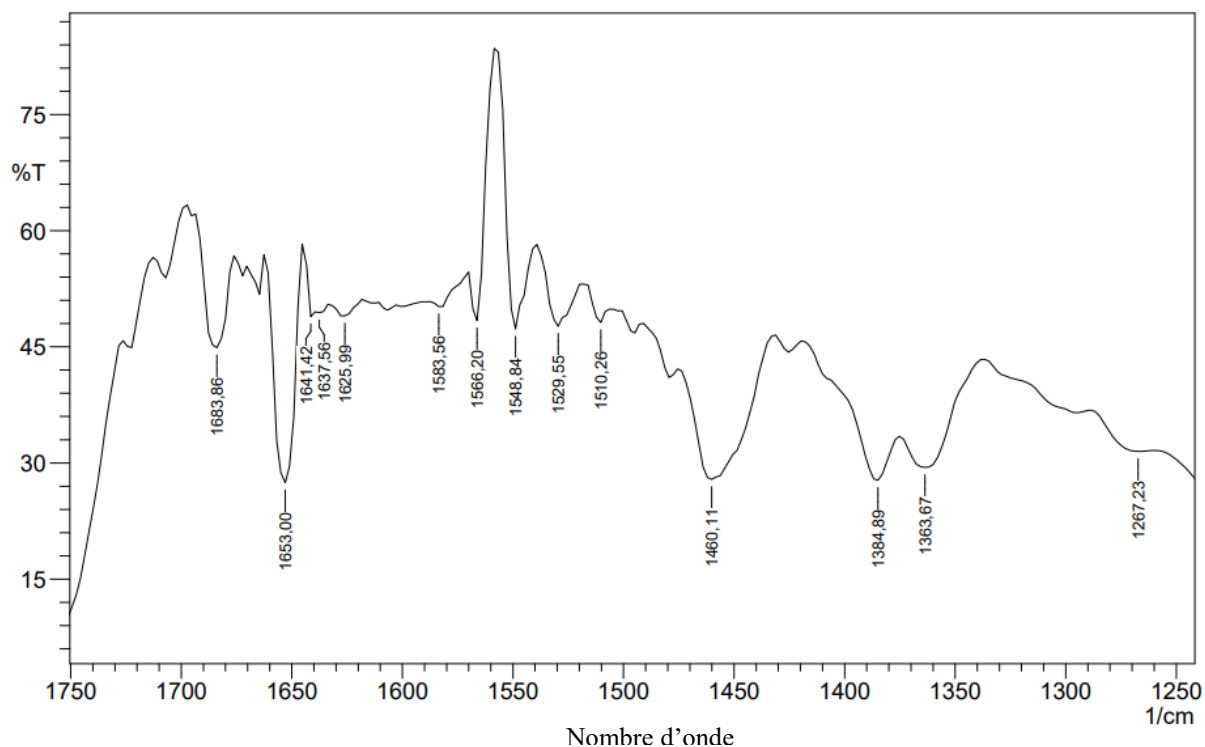
$3280\text{cm}^{-1}$  censé être distinctif pour le PVA [87]. Pour améliorer ces conditions, nous opérons un zoom sur les régions amide I et II.



**Figure III.24 :** Spectres IRTF de l'essai 11 (a), du blanc (b), de l'insuline Actrapid (c) et du PLLA(d) en régions Amide I et II.

Selon la figure III.24, nous pouvons avancer la présence d'insuline par l'augmentation des pics  $1653\text{cm}^{-1}$ ,  $1637\text{cm}^{-1}$ ,  $1566\text{cm}^{-1}$ ,  $1550\text{cm}^{-1}$  appartenant aux amides I et II mais en vu de la légère variation que celle-ci représente nous notons tout de même la quasi-inexistence d'insuline en surface des MP donc nous en concluons que l'insuline a bien été encapsulée [88]. Cependant, nous pouvons également constater l'augmentation de la bande  $1625\text{cm}^{-1}$ , celle-ci est représentative au niveau des protéines, d'un pic d'agrégats [89]. Ce qui remet en doute la stabilité de l'insuline surfacique après une semaine de stockage à température ambiante.

- **Analyse IRTF de la formule 2 :** ces microcapsules ont été analysées de la même manière que les échantillons précédents. Cette formule renferme de l'insuline Jusline R en phase aqueuse.



**Figure III.25 :** Spectre de la formule 2 en région des amides I et II.

Le but de cette formulation était d'induire l'agrégation de l'insuline en l'exposant à un pH acide sachant que l'insuline est sous forme dimérique et non hexamérique en vu de l'absence de chlorure de zinc, tout en la stabilisant avec du SDS car l'ajout d'acétate d'éthyle provoque l'agglomération et l'agrégation des MP. En figure III.25, nous ne constaterons pas une grande différence sur cette région comparer à l'essai 11, mise à part que les pics ont été déplacés ( $1641\text{cm}^{-1}$ ,  $1548\text{cm}^{-1}$ ), cela pourrait être présumé comme apparenté au phénomène d'agrégation et de dégradation, ainsi que le pic à  $1625\text{cm}^{-1}$  possiblement attribuable aux amyloïdes [89].

# Conclusion

## Conclusion

Le contexte étudié se base sur une microencapsulation, dans le but de protéger l'insuline bioactive et augmenter la surface de contact avec la paroi intestinale tout en allongeant le temps de contact, ces microcapsules devant être en milieu potentialisant par rapport à la perméation de cette paroi. Le tout, encapsulé une seconde fois dans des gélules gastro-résistantes disponibles sur le marché.

Les conclusions fournies par cette étude sont :

- Par la microscopie : la formation d'une double émulsion dans le sens  $W_1/O/W_2$ .
- Granulométrie laser : l'évaporation réduit la taille moyenne des microparticules de 29.07 % dans le cas de la formulation test.
- Plan factoriel à 2 niveaux : parmi les facteurs variés la concentration de PVA et la vitesse d'agitation sont les plus influents, la taille des MP est inversement proportionnelle à la concentration de PVA et à la vitesse d'agitation dans notre domaine, la CMC du PVA est aux alentours de 2.5% (m/v). Par action de l'agitation et de la chaleur, il se produit un rhéoépaississement du PVA engageant un ajustement au niveau des facteurs choisis, pour remplacer la concentration de PVA par sa viscosité dynamique ou ajouter une correction au modèle sur le comportement du PVA.
- Autres points, réduire la toxicité du solvant en le mélangeant à l'acétate d'éthyle, est un levier d'agrégation des MP.
- Par IRTF : l'imprécision de l'analyse IRTF car les bandes des composants hors-insuline se superposent aux pics caractéristiques de l'insuline néanmoins la quasi-inexistence de l'insuline à la surface des MP sachant qu'elles n'ont pas été purifiées et en les comparant aux blancs suggérerait une bonne encapsulation.

Nos résultats se sont révélés probant aux recherches en bibliographie, et notre modèle a plusieurs aspects à critiquer, notamment, la condition d'uniformité des tailles omise. Par contre, il semble applicable à toute autre molécule hydrophile vu que les diamètres du blanc étaient très proches du standard.

Si de tout ce qui précède, nous devons synthétiser la méthode de préparation la plus adaptée, celle-ci serait comme suit : phase aqueuse dispersée (0.2ml Ins Actrapid), phase



organique (2ml DCM + 0.068g PLA), phase continue (5 ml de 2.5% PVA (m/v) + 20 ml de 0.5% PVA (m/v)) et  $v = 10000$  rpm,  $t = 90$ s.

Au final, la clôture de ce mémoire se fera en soulignant que la microencapsulation n'est pas le seul but à atteindre. Il reste à agrandir le domaine du plan, faire pivoter les facteurs fixes, introduire les notions de taux d'encapsulation et de bioactivité de l'insuline comme réponses. Pour après, se pencher sur le contrôle de la libération et la perméation au travers de la paroi intestinale voire même opter pour la microencapsulation avec membrane, et réduire nettement l'indice de polydispersion ou le Span. Pour au bout du chemin, faire des tests sur des animaux *in vivo*.

## Références bibliographiques

- [1]: Mghari. G & Baki. S & EL ansari. N (2014). Histoire de l'insuline : entre le biologique et l'artificiel. HEGEL, N° 2, p. 208-211.
- [2]: World Health Organization. (n.d.). Classification of diabetes mellitus 2019. World Health Organization. [en ligne] : <https://www.who.int/publications-detail-redirect/classification-of-diabetes-mellitus>.
- [3]: A. CALLET (2010), Administration orale d'insuline par double encapsulation : développement du système nanoparticulaire par coacervation complexe insuline / chitosane, thèse, chimie physique, université de Strasbourg.
- [4]: [En ligne]: <https://www.miph.gov.dz/fr/premiere-unite-production-stylo-insuline/>.
- [5]: BITIL.A (2015), les insulines, médicaments actuels et évolution de la prise en charge du diabète insulino-dépendant, thèse, pharmacie, université de Rouen.
- [6]: Fischer, J., & Rotella, P. D. (2015). successful drug discovery (Vol. 1). Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag & Co. KGaA, p.41.
- [7]: J. Brange (1987), Galenics of Insulin The Physico-chemical and Pharmaceutical Aspects of Insulin and Insulin Preparations, New York : Springer-Verlag Berlin Heidelberg, p. 2.
- [8]: S. Kumar & S. O'Rahilly (2005), Insulin Resistance Insulin Action and Its Disturbances in Disease, West Sussex PO19 8SQ, England: John Wiley & Sons Ltd, p. 65-67.
- [9]: Fischer, J., & Rotella, P. D. (2015). successful drug discovery (Vol. 1). Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag & Co. KGaA, p.39.
- [10]: Gualandi-Signorini, A. M., & Giorgi, G. (2001). Insulin formulations--a review. European review for medical and pharmacological sciences, 5(3), 73-83.
- [11]: W. Crasto, J. Jarvis & M. J. Davies (2016), Handbook of Insulin Therapies, Springer International Publishing Switzerland, p. 6.

- [12]: J. Brange (1987), *Galenics of Insulin The Physico-chemical and Pharmaceutical Aspects of Insulin and Insulin Preparations*, New York : Springer-Verlag Berlin Heidelberg, p. 75.
- [13]: W. Crasto, J. Jarvis & M. J. Davies (2016), *Handbook of Insulin Therapies*, Springer International Publishing Switzerland, p.25.
- [14]: Poretsky, L. (2017). In *Principles of diabetes mellitus* (3rd ed.). Springer, p. 127.
- [15]: Lavin, N. (2019). In *Manual of Endocrinology and metabolism* (5th ed.). Wolters Kluwer, p. 701.
- [16]: W. Crasto, J. Jarvis & M. J. Davies (2016), *Handbook of Insulin Therapies*, Springer International Publishing Switzerland, p. 139-140
- [17]: W. Crasto, J. Jarvis & M. J. Davies (2016), *Handbook of Insulin Therapies*, Springer International Publishing Switzerland, p. 177-183
- [18]: Adams, Sean & Newman, John. (2015). *International Textbook of Diabetes Mellitus, Fourth Edition*, John Wiley & Sons, p 892.
- [19]: Home, Philip. (2021). Future directions in insulin therapy. *Metabolism*. 124.
- [20]: Pauline Guhmann (2013), *Délivrance orale d'insuline par double encapsulation : développement et évaluation de l'efficacité et de la sécurité des systèmes entériques et nanoparticulaires*. Thèse, Sciences pharmaceutiques, Université de Strasbourg.
- [21]: Lopes, M., Simões, S., Veiga, F., Seica, R., & Ribeiro, A. (2015). Why most oral insulin formulations do not reach clinical trials. *Therapeutic Delivery*, 6(8), p. 973–987.
- [22]: Hu, Qiaobin & Luo, Yangchao. (2018). Recent advances of polysaccharide-based nanoparticles for oral insulin delivery. *International Journal of Biological Macromolecules*.
- [23]: Chen, M.-C., Sonaje, K., Chen, K.-J., & Sung, H.-W. (2011). A review of the prospects for polymeric nanoparticle platforms in oral insulin delivery. *Biomaterials*, 32(36), p. 9826–9838.

- [24]: Iyer, Gayatri & Dyawanapelly, Sathish & Jain, Ratnesh & Dandekar, Prajakta. (2022). An overview of oral insulin delivery strategies (OIDS). *International Journal of Biological Macromolecules*.
- [25]: Alai, Milind & Lin, Wen-Jen & Pingale, Shailaja. (2015). Application of polymeric nanoparticles and micelles in insulin oral delivery. *Journal of Food and Drug Analysis*.
- [26]: Ismail, Ruba & Csoka, Ildiko. (2017). Novel strategies in the oral delivery of antidiabetic peptide drugs – Insulin, GLP 1 and its analogs. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*.
- [27]: Wong, Chun Yuen Jerry & Martinez, Jorge & Dass, Crispin. (2016). Oral delivery of insulin for treatment of diabetes: status quo, challenges and opportunities. *The Journal of pharmacy and pharmacology*.
- [28]: Wong, C. Y., Al-Salami, H., & Dass, C. R. (2018). Microparticles, microcapsules and microspheres: A review of recent developments and prospects for oral delivery of insulin. *International Journal of Pharmaceutics*, 537(1-2), p. 223–244.
- [29]: Wong, Chun Yuen Jerry & Al-Salami, Hani & Dass, Crispin. (2017). Potential of insulin nanoparticle formulations for oral delivery and diabetes treatment. *Journal of Controlled Release*.
- [30]: J-P. Benoît, J. Richard, M-C. Venier-Julienne (2013), *Microencapsulation. Médicaments et produits pharmaceutiques*, [en ligne], Editions T.I. [Paris, France].
- [31]: É-M. Soares Soares-Latour (2012). *Synthèse de microcapsules biosourcées pour des applications cosméto-textiles*, thèse. Université Claude Bernard - Lyon I.
- [32]: Li, Ming & Rouaud, Olivier & Poncelet, Denis. (2008). Microencapsulation by solvent evaporation: State of the art for process engineering approaches. *International journal of pharmaceutics*. 363, p. 26-39.
- [33]: Jana, Pradip & Dev, Abhimanyu & Jayaprakash, Venkatesan & Shyam, Mousumi. (2020). Biodegradable polymers in drug delivery and oral vaccination. *European Polymer Journal*.
- [34]: Auras, Rafael & Lim, Loong-Tak & Selke, Susan & Tsuji, Hideto. (2010). *Poly(Lactic Acid): Synthesis, Structures, Properties, Processing, and Applications*. Wiley, p.69-70.

- [35]: Jie Ren (2010). *Biodegradable Poly(Lactic Acid): Synthesis, Modification, Processing and Applications*, Tsinghua University Press, Beijing and Springer-Verlag Berlin Heidelberg, p. 275.
- [36]: Auras, Rafael & Lim, Loong-Tak & Selke, Susan & Tsuji, Hideto. (2010). *Poly(Lactic Acid): Synthesis, Structures, Properties, Processing, and Applications*. Wiley, p. 84-85.
- [37]: Wischke, Christian & Schwendeman, Steven. (2008). Principles of encapsulating hydrophobic drugs in PLA/PLGA microparticles. *International Journal of Pharmaceutics*.
- [38]: F. Stauffer (2014), *La préparation d'émulsions doubles par un système microfluidique*, thèse, faculté de pharmacie, Université de lorraine.
- [39]: B. Guido. (2013), *Tensioactifs non ioniques Mise en œuvre industrielle. Médicaments et produits pharmaceutiques*, [en ligne], Editions T.I. [Paris, France].
- [40]: Al-Ali, Ahmed A. Abdulhussein & Nielsen, Rasmus & Steffansen, Bente & Holm, René & Nielsen, Carsten. (2019). Nonionic surfactants modulate the transport activity of ATP-binding cassette (ABC) transporters and solute carriers (SLC): Relevance to oral drug absorption. *International Journal of Pharmaceutics*.
- [41]: Cun, Dongmei & Zhang, Chengqian & Bera, Hriday & Yang, Mingshi. (2021). Particle engineering principles and technologies for pharmaceutical biologics. *Advanced drug delivery reviews*.
- [42]: Pounot, Kevin & Grime, Geoffrey & Longo, Alessandro & Zamponi, Michaela & Noferini, Daria & Cristiglio, Viviana & Seydel, Tilo & Garman, Elspeth & Weik, Martin & Fodera, Vito & Schiro, Giorgio. (2020). Zinc Determines Dynamical Properties and Aggregation Kinetics of Human Insulin.
- [43]: Salahuddin, Parveen & Khan, Rizwan Hasan & Furkan, Mohammad & Uversky, Vladimir & Islam, Zeyaul & Fatima, Munazza T. (2021). Mechanisms of amyloid proteins aggregation and their inhibition by antibodies, small molecule inhibitors, nanoparticles, and nano-bodies. *International Journal of Biological Macromolecules*.
- [44]: Noormägi, A., Valmsen, K., Tõugu, V., & Palumaa, P. (2015). Insulin Fibrillization at Acidic and Physiological pH Values is Controlled by Different Molecular Mechanisms. *The Protein Journal*, 34(6), p. 398-403.

- [45]: Zaman, Masihuz & Khan, Asra & Wahiduzzaman, & Zakariya, Syed & Khan, Rizwan Hasan. (2019). Protein misfolding, aggregation and mechanism of amyloid cytotoxicity: An overview and therapeutic strategies to inhibit aggregation. *International Journal of Biological Macromolecules*..
- [46]: Loughheed, W & Woulfe-Flanagan, H & Clement, J & Albisser, A. (1980). Insulin aggregation in artificial delivery systems. *Diabetologia*.
- [47]: Brange, Jens & Andersen, Lennart & Laursen, Erik & Meyn, Giorgio & Rasmussen, Eigil. (1997). Toward Understanding Insulin Fibrillation. *Journal of pharmaceutical sciences*.
- [48]: J. Brange (1987), *Galenics of Insulin The Physico-chemical and Pharmaceutical Aspects of Insulin and Insulin Preparations*, New York : Springer-Verlag Berlin Heidelberg, p.58.
- [49]: Pandey, Lalit. (2022). Physicochemical factors of bioprocessing impact the stability of therapeutic proteins. *Biotechnology Advances*.
- [50]: Wang, Wei & Roberts, Christopher. (2018). Protein Aggregation - Mechanisms, Detection, and Control. *International Journal of Pharmaceutics*.
- [51]: Malik, Ravinder & Roy, Ipsita. (2011). Probing the mechanism of insulin aggregation during agitation. *International journal of pharmaceutics*. 413, p.73-80.
- [52]: Alam, P., Siddiqi, K., Chturvedi, S. K., & Khan, R. H. (2017). Protein aggregation: From background to inhibition strategies. *International Journal of Biological Macromolecules*, 103, p. 208–219.
- [53]: Young Min Kwon; Baudys, Miroslav; Knutson, Kristine; Sung Wan Kim (2001), In situ study of insulin aggregation induced by water-organic solvent interface, *Pharmaceutical Research*; New York Vol. 18, N° 12, 1754-9.
- [54]: Quaglia, Fabiana & De Rosa, Giuseppe & Granata, Elena & Ungaro, Francesca & Fattal, Elias & Rotonda, Maria. (2003). Feeding liquid, non-ionic surfactant and cyclodextrin affect the properties of insulin-loaded poly (lactide-co-glycolide) microspheres prepared by spray-drying. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 86. 267-78.

- [55]: Hamishehkar, Hamed & Emami, Jaber & Rouholamini Najafabadi, Abdolhossein & Gilani, Kambiz & Minaiyan, Mohsen & Mahdavi, Hamid & Nokhodchi, Ali. (2009). The effect of formulation variables on the characteristics of insulin-loaded poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres prepared by a single phase oil in oil solvent evaporation method. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*. 74. 340-9.
- [56]: Elsayed, Amani & Al-Remawi, Mayyas & Qinna, Nidal & Farouk, Asim & Badwan, Adnan. (2009). Formulation and characterization of an oily-based system for oral delivery of insulin. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*. 73. 269-79.
- [57]: Kristin Andreas, KristinAndreas RolfZehbe MajaKazubek KarolinaGrzeschik NadineSternberg HansBäumler HelmutSchubert MichaelSittinger JochenRinge (2011), Biodegradable insulin-loaded PLGA microspheres fabricated by three different emulsification techniques: Investigation for cartilage tissue engineering, *Acta Biomaterialia* Volume 7, Issue 4, p. 1485-1495.
- [58]: Mutaliev, B. & Grigoriev, Dmitry & Madibekova, G. & Sharipova, Altynay & Aidarova, S. & Saparbekova, A. & Miller, Reinhard. (2016). Microencapsulation of insulin and its release using w/o/w double emulsion method. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*.
- [59]: Meneguín, Andréia & Beyssac, Eric & Garrait, Ghislain & Hsein, Hassana & Cury, Beatriz. (2017). Retrograded starch/pectin coated gellan gum-microparticles for oral administration of insulin: A technological platform for protection against enzymatic degradation and improvement of intestinal permeability. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*.
- [60]: Hu, W. Y., Wu, Z. M., Yang, Q. Q., Liu, Y. J., Li, J., & Zhang, C. Y. (2019). Smart pH-responsive polymeric micelles for programmed oral delivery of insulin. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*.
- [61]: Thomas Stalder, Taghrid Zaiter, Wassim El Basset, Raphaël Cornu, Hélène Martin, Mona Diab, Arnaud Béduneau. (2022). Interaction and Toxicity of Ingested Nanoparticles on the Intestinal Barrier. *Toxicology*. 153353.
- [62]: [en ligne] : <https://www.matweb.com/>

- [63]: Xu, Q., Crossley, A., & Czernuszka, J. (2009). Preparation and characterization of negatively charged poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 98(7), p. 2377–2389.
- [64]: USP 41-NF 36, The United states pharmacopeia, volume 1, the national formulary, The United States Pharmacopeial Convention 12601 Twinbrook Parkway, Rockville, MD 20852, 2017, p. 2171.
- [65]: [en ligne] : <https://www.vidal.fr/medicaments/actrapid-100-ui-ml-sol-inj-20677.html>
- [66]: Dichlorométhane Fiche toxicologique n°34, inrs, [En ligne] sur : [https://www.inrs.fr/publications/bdd/fichetox/fiche.html?refINRS=FICHETOX\\_34](https://www.inrs.fr/publications/bdd/fichetox/fiche.html?refINRS=FICHETOX_34)
- [67]: Acétate d'éthyle Fiche toxicologique n°18, inrs, [En ligne] sur : [https://www.inrs.fr/publications/bdd/metropol/fiche.html?refINRS=METROPOL\\_354](https://www.inrs.fr/publications/bdd/metropol/fiche.html?refINRS=METROPOL_354)
- [68]: Mode d'emploi IKA n° : IKA ULTRA-TURRAX® T 25 digital, [En ligne] : [https://www.imlab.eu/sites/default/files/generated/bestanden/Manuel-FR-ULTRA-TURRAX-T-25-digital-Ika-Imlab\\_0.pdf](https://www.imlab.eu/sites/default/files/generated/bestanden/Manuel-FR-ULTRA-TURRAX-T-25-digital-Ika-Imlab_0.pdf)
- [69]: [En ligne] : <https://www.ika.com/fr/Produits-Lab-Eq/Disperseurs-csp-177/S-25-N-25-F-Outils-de-dispersion-Donnees-techniques-cptd-1713800/>
- [70]: Data Sheet T 25 digital Package, [En ligne] : [https://image.indotrading.com/co43618/pdf/p844761/data\\_sheet\\_t\\_25\\_digital\\_package.pdf](https://image.indotrading.com/co43618/pdf/p844761/data_sheet_t_25_digital_package.pdf)
- [71]: Mode d'emploi ANALYSETTE 22, [En ligne] sur : <https://www.fritsch-france.fr/granulometrie/diffusion-statique-de-la-lumiere/details/produit/granulometre-laser-analysette-22-next-nano/>
- [72]: N. MIMI (2015), Etude de la microencapsulation et du relargage de l'insuline, thèse, génie chimique, université de Bejaïa.
- [73]: Warren J. Smith (2000), *Modern Optical Engineering The design of optical systems*, Third Edition, The McGraw-Hill Companies, Inc. Printed in the United States of America, p. 267-269.



- [74]: Anette Müllertz, Yvonne Perrie, Thomas Rades (2016), *Analytical Techniques in the Pharmaceutical Sciences*, Springer, p.684-685.
- [75]: Terence Allen (2003), *Powder Sampling and Particle Size Determination*, Elsevier, Amsterdam, p. 544-548.
- [76]: Vera Candiotti, Luciana & De Zan, Maria & María S. Cámara & Héctor C Goicoechea (2014). Experimental design and multiple response optimization. Using the desirability function in analytical methods development. *Talanta*.
- [77]: Jacques Goupy, Lee Creighton (2006), *Introduction aux plans d'expériences*, 3e édition, Dunod, Paris.
- [78]: Yahiaoui.I (2014/2015), *Les plans d'expériences Initiation à la construction et l'analyse des plans factoriels complets à deux niveaux et du plan composite centré*, cours, université de Bejaïa.
- [79]: Cárdenas-Bailón, F., Osorio-Revilla, G., & Gallardo-Velázquez, T. (2015). Microencapsulation of insulin using a W/O/W double emulsion followed by complex coacervation to provide protection in the gastrointestinal tract. *Journal of Microencapsulation*, 32(3), p. 308–316
- [80]: Anette Müllertz, Yvonne Perrie, Thomas Rades (2016), *Advances in Delivery Science and Technology*, Series editor Michael J. Rathbone, p.62-66, Springer.
- [81]: C. Robin (2016), *Structure et rhéologie du poly(acide méthacrylique) en régime semi-dilué : organisation sous cisaillement et en température*, Thèse, Spécialité Sciences des matériaux, Université Paris-Est.
- [82]: Bercea, Maria & Gradinaru, Luiza-Madalina & Mihaela, Mandru & Vlad, Stelian & Nita, Loredana & Plugariu, Ioana-Alexandra & Albulescu, Radu. (2021). Shear flow of associative polymers in aqueous solutions. *Journal of Molecular Structure*.
- [83]: Kieaibi Ellis Wilcox (2014), *Using Regression Analyses For the Determination of Protein Structure From IRTF Spectra*, thèse, science de la vie, University of Manchester.
- [84]: Zaman, Masihuz & Khan, Asra & Wahiduzzaman, & Zakariya, Syed & Khan, Rizwan Hasan. (2019). Protein misfolding, aggregation and mechanism of amyloid cytotoxicity:

An overview and therapeutic strategies to inhibit aggregation. *International Journal of Biological Macromolecules*.

- [85]: Auras, Rafael & Lim, Loong-Tak & Selke, Susan & Tsuji, Hideto. (2010). *Poly(Lactic Acid): Synthesis, Structures, Properties, Processing, and Applications*. Wiley, p. 101-102.
- [86]: Thanki, Paragkumar & Edith, Dellacherie & Six, Jean-luc. (2006). Surface characteristics of PLA and PLGA films. *Applied Surface Science*. 253, p. 2758-2764.
- [87]: Chinavinijkul, Panarin & Riansuwan, Kongkhet & Kiratisin, Pattarachai & Srisang, Siriwan & Nasongkla, Norased. (2021). Dip- and Spray-coating of Schanz pin with PLA and PLA nanosphere for prolonged antibacterial activity. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 65.
- [88]: Eid, Ahmed & Uddin, Nazim & Girgis, Samuel. (2019). Formulation and optimization of biodegradable insulin loaded nanoparticles. *International journal of pharmaceutical science and health care*. 3.
- [89]: Schaefer, Anna & Naser, Dalia & Siebeneichler, Bruna & Tarasca, Michael & Meiering, Elizabeth. (2022). Methodological advances and strategies for high resolution structure determination of cellular protein aggregates. *Journal of Biological Chemistry*. 298.
- [90]: Ali, Mennatallah Ahmed Ismail (2015). *A new approach in Type 2 diabetes mellitus treatment: Evaluation of the beneficial effect of L-cysteine in the treatment of type 2 diabetes mellitus*. Hamburg, Anchor Academic Publishing,.

## **Résumé :**

Pour une insuline orale, la microencapsulation dans du PLA par double émulsion avec évaporation du solvant, fut la méthode adoptée. Nous avons notamment élaboré un plan factoriel complet à 2 niveaux, révélant que la taille des microcapsules (obtenue par granulométrie laser) soit inversement proportionnelle à la concentration de PVA, au temps et à la vitesse d'agitation, et qu'elle soit proportionnelle au volume d'insuline ajouté. L'IRTF et la microscopie se sont montrées douteuses et sans réel résultat. Enfin, les tests en aval ont démontré que la CMC du PVA était bien aux alentours de 2,5% (m/v) et que la dilution avant évaporation tout comme l'emploi d'EPPI au lieu d'Actrapid, n'influçait pas la taille des MP.

**Mots-clés :** Insuline, microencapsulation, acide polylactique, alcool polyvinylique, plan factoriel.