

Université de Montréal

**Contribution à la mise au point d'un système  
mucoadhésif thermoréversible pour une libération  
topique contrôlée d'un médicament modèle**

par

Noha Mamdouh Zaky-Eldine Gouda

Département de Technologie pharmaceutique

Faculté de Pharmacie

Mémoire présentée à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade maîtrise ès science M.Sc.

En Pharmacie

Option Technologie pharmaceutique

Octobre, 2006

© Noha Mamdouh Zaky-Eldine Gouda, 2006



QV

705

U58

2007

V. 006

**Direction des bibliothèques**

**AVIS**

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

**NOTICE**

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Contribution à la mise au point d'un système mucoadhésif thermoréversible pour une  
libération topique contrôlée d'un médicament modèle

présenté par :

Noha Mamdouh Zaky-Eldine Gouda

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Fahima Nekka, présidente-rapporteuse

Patrice Hildgen, directeur de recherche

Jérôme Del Castillo, membre du jury

## Résumé

Ce mémoire porte sur la contribution dans le développement d'un système à libération contrôlée d'un principe actif modèle. La forme pharmaceutique choisie est l'hydrogel physique thermoréversible mucoadhésif (TRG-M). Plusieurs des paramètres mécaniques de cette forme, liés à sa composition polymérique, sont pertinents à une performance efficace in vivo. Pourtant, aucune technique n'est utilisée présentement dans le criblage rapide de ses formulations. D'autre part, un principe actif insoluble tel que la base de la chlorhexidine (CHX) semble présenter une contrariété, face à la maîtrise de la libération offerte par la forme pharmaceutique. Le travail inclut en introduction une revue bibliographique récente portant sur ces sujets : hydrogels en général, types, propriétés mécaniques et techniques de caractérisation, la technique de l'analyse du profil de texture (TPA), les réseaux de neurones (RNA), ainsi que sur la faible solubilité d'un principe actif : généralités et moyens d'amélioration en incluant les cyclodextrines et la CHX. Le corps du travail comprend d'une part, la préparation des TRG-M à base de polymères biocompatibles et leurs évaluations. D'autre part, il comprend une étude sur la solubilisation de la CHX par sa complexation avec des cyclodextrines et les méthodes optimales de fabrication de ces complexes. Ce travail a montré la validité de l'application innovatrice de la TPA dans le criblage et l'évaluation des propriétés mécaniques des TRG-M. Il a innové l'exploitation de l'approche statistique de l'analyse factorielle et des RNA dans l'identification des rôles des polymères et de leurs interactions qui dominent ces propriétés. La cyclodextrine et la méthode de fabrication optimales utilisées dans la solubilisation de la CHX ont aussi été constatées de façon quantitative. Ce mémoire présente donc les résultats d'une recherche dans le domaine de la technologie pharmaceutique concernée par la mise au point d'une forme pharmaceutique à libération contrôlée.

**Mots-clés :** Forme à libération contrôlée, hydrogels thermoréversibles, mucoadhésion, analyse du profil de texture, réseaux de neurones artificiels, cyclodextrines, chlorhexidine.

## Abstract

This mémoire represents a contribution to the development of controlled release dosage form of a model active principle. The selected dosage form is the thermoreversible mucoadhesif physical hydrogel (TRG-M). This dosage form has many mechanical parameters which depend on its polymeric composition. These parameters are crucial for an efficient controlled release performance. So far, no technique is available for a fast screening of formulations of this type. On the other hand, the control of release offered by a dosage form is usually hindered by the poor solubility of an active principle such the chlorhexidine base (CHX). This study begins by an introduction of the recent scientific literature review on these topics: hydrogels in general, types, mechanical properties and characterisation techniques, texture profile analysis technique (TPA), artificial neural networks (RNA), as well as poor solubility : generalities and methods of improvement including cyclodextrins use. The body of the study is concerned from one part with the preparation of the TRG-M from biocompatible polymers and their mechanical evaluation. The other part is concerned by solubilisation of CHX through cyclodextrin complexation. The results have shown the validity of the innovative application of the TPA in the screening and mechanical evaluation of the TRG-M. A novel use of the statistical approach represented by both the factorial analysis and the RNA has been innovated to identify the dominating effect of the polymers and their interactions on the mechanical properties of TRG-M. The optimal cyclodextrin and its method of complex formation with the CHX have also been quantitatively estimated. This study presents the results of a research in the pharmaceutical technology domain especially concerned with formulation of a controlled release dosage form

**Keywords :** Thermoreversible hydrogels, mucoadhesion, texture profile analysis, artificial neural networks, cyclodextrins, chlorhexidine.

# Table des matières

RÉSUMÉ.....	III
ABSTRACT .....	IV
TABLE DES MATIÈRES .....	V
LISTE DES TABLEAUX.....	VIII
LISTE DES FIGURES .....	XI
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS .....	XIV
REMERCIEMENTS .....	XVII
AVANT-PROPOS.....	XIX
CHAPITRE I.....	1
<b>1 INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
1.1 MISE EN CONTEXTE.....	1
1.2 HYDROGELS : GÉNÉRALITÉS .....	1
1.2.1 <i>Hydrogels in situ</i> .....	2
1.2.1.1 Hydrogels physiques thermoréversibles.....	3
1.2.1.2 Hydrogels thermoréversibles mucoadhésifs (TRG-M) .....	5
1.2.2 <i>Caractérisation d'hydrogels thermoréversibles mucoadhésifs</i> .....	6
1.2.3 <i>Analyse du profil de texture (TPA)</i> .....	11
1.3 RÉSEAUX DE NEURONES ARTIFICIELS (RNA) .....	13
1.4 POLYMÈRES ACTEURS DE L'ÉTUDE.....	15
1.4.1 <i>Poloxamère 407 (PF127)</i> .....	15
1.4.2 <i>Poloxamère 188 (PF68)</i> .....	17
1.4.3 <i>Carbopol 934P (CP934P)</i> .....	17
1.4.4 <i>Polycarbophil (PC)</i> .....	18
1.5 FAIBLE SOLUBILITÉ AQUEUSE DU PRINCIPE ACTIF COMME FACTEUR DE LA LIBÉRATION CONTRÔLÉE .....	19
1.5.1 <i>Chlorhexidine (CHX)</i> .....	20
1.5.2 <i>Cyclodextrines (CD)</i> .....	21
1.5.2.1 Le 2-hydroxypropyl- $\beta$ -CD (l'HP- $\beta$ -CD) .....	23
1.5.3 <i>Complexation avec les cyclodextrines</i> .....	24

1.5.3.1	Mécanismes de formation.....	24
1.5.3.2	Mécanismes de libération .....	25
1.5.3.3	Caractérisation .....	26
1.5.3.4	Préparation des complexes des cyclodextrines.....	26
1.6	ELABORATION DU SCHEMA DE L'ETUDE .....	27
1.6.1	<i>Orientation de l'étude</i> .....	28
1.6.2	<i>Description des projets</i> .....	28
1.7	OBJECTIFS .....	30
1.7.1	<i>Objectifs généraux</i> .....	30
1.7.2	<i>Objectifs spécifiques</i> .....	30
<b>CHAPITRE II. ....</b>		<b>31</b>
<b>2 CRIBLAGE DES SYSTÈMES D'HYDROGELS PHYSIQUES</b>		
<b>THERMORÉVERSIBLES ET MUCOADHÉSIFS. ....</b>		<b>31</b>
2.1	MATÉRIAUX .....	32
2.2	MÉTHODOLOGIE.....	32
2.2.1	<i>Préparation des « hydrogels physiques thermogélifiants (TRG) mucoadhésifs »</i> .....	32
2.2.2	<i>Caractérisation des hydrogels</i> .....	32
2.2.2.1	Détermination de la température de transition de phase sol-gel ( $T_{gel}$ ).....	32
2.2.2.2	Évaluation des propriétés mécaniques des TRG-M par la technique de l'analyse du profil de texture (TPA) .....	34
2.2.2.3	Approche statistique .....	36
2.3	RÉSULTATS ET DISCUSSION .....	40
2.3.1	<i>Détermination de la <math>T_{gel}</math></i> .....	41
2.3.1.1	Les solutions aqueuses de PF127 .....	41
2.3.1.2	Effet du polymère mucoadhésif sur les solutions aqueuses de PF127 .....	42
2.3.1.3	Effet du PF68 sur les solutions aqueuses de PF127 .....	42
2.3.1.4	Effet du polymère mucoadhésif sur les solutions aqueuses de PF127/PF68 .....	44
2.3.2	<i>Évaluation des propriétés mécaniques par la TPA</i> .....	47
2.3.3	<i>Approche statistique</i> .....	49
2.3.3.1	Analyse factorielle.....	50
2.3.3.2	Application des réseaux de neurones artificiels (RNA) dans l'analyse de propriétés mécaniques des TRG-M .....	63



2.4	CONCLUSION.....	66
<b>CHAPITRE III.....</b>		<b>67</b>
<b>3</b>	<b>COMPLEXES DE LA CHLORHEXIDINE AVEC LES CYCLODEXTRINES.....</b>	<b>67</b>
3.1	MATÉRIAUX.....	68
3.2	MÉTHODOLOGIE.....	68
3.2.1	<i>Préparation du mélange Physique (MP)</i> .....	68
3.2.2	<i>Préparation des systèmes binaires</i> .....	68
3.2.2.1	Lyophilisation.....	69
3.2.2.2	Évaporation.....	69
3.2.2.3	Pétrissage.....	69
3.2.2.4	Méthode de la boue.....	69
3.2.3	<i>Caractérisation des systèmes binaires</i> .....	70
3.2.3.1	Établissement des courbes d'étalonnage de chlorhexidine.....	70
3.2.3.2	Étude de la courbe du profil de solubilité de la CHX.....	70
3.2.3.3	Rendement.....	71
3.2.3.4	Calorimétrie différentielle à balayage (DSC).....	71
3.2.3.5	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR).....	72
3.2.3.6	Spectrométrie de Résonance magnétique nucléaire (RMN) en solution.....	72
3.2.4	<i>Approche statistique</i> .....	73
3.3	RÉSULTATS ET DISCUSSION.....	73
3.3.1	<i>Courbes d'étalonnage de la chlorhexidine</i> .....	73
3.3.2	<i>Étude de la courbe du profil de solubilité de la CHX</i> .....	73
3.3.3	<i>Caractérisation des systèmes binaires de la CHX avec la CD</i> .....	76
3.3.3.1	Rendement.....	76
3.3.3.2	Calorimétrie différentielle à balayage (DSC).....	77
3.3.3.3	FT-IR.....	83
3.3.3.4	Spectrométrie RMN en solution.....	88
3.4	CONCLUSION.....	94
<b>CHAPITRE IV.....</b>		<b>115</b>
<b>4</b>	<b>CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>115</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>		<b>119</b>

## Liste des tableaux

Tableau 2-1. Plan expérimental employé dans la détermination de la température de transition sol-gel ( $T_{gel}$ ), illustrant les groupes de solutions aqueuses examinées. ....	33
Tableau 2-2. Plan expérimental employé dans la caractérisation des propriétés mécaniques par la TPA et illustrant la composition des formulations aqueuses des hydrogels thermoréversibles mucoadhésifs. ....	35
Tableau 2-3. Plans factoriels : Séries 1 et 2, de formulations utilisées dans l'analyse factorielle $2^3$ . Les niveaux sont exprimés dans la forme codée. ....	38
Tableau 2-4. Niveaux des facteurs causaux interprétés dans la forme physique. ....	38
Tableau 2-5. Plans factoriels : Séries 3 et 4, de formulations utilisées dans l'analyse factorielle $3 \times 2 \times 2$ . Les niveaux sont exprimés dans la forme codée. ....	39
Tableau 2-6. Niveaux des facteurs causaux interprétés dans la forme physique. ....	39
Tableau 2-7. Effet de l'augmentation de la concentration de PF68 sur la température de transition sol-gel ( $T_{gel}$ ) de la solution aqueuse de PF127. ....	43
Tableau 2-8. Valeurs actuelles des propriétés mécaniques des hydrogels examinés, mesurées par la TPA à $34 \pm 1$ °C. ....	48
Tableau 2-9. Corrélation linéaire, représentée par la valeur du coefficient de détermination linéaire ( $R^2$ ), entre chacun des facteurs causaux versus chacun des paramètres mécaniques des TRG. ....	50
Tableau 2-10. Coefficient multiple de détermination ( $R^2$ ) et valeurs de la précision adéquate, calculées par l'analyse factorielle pour chaque série d'hydrogels. ....	54
Tableau 2-11. Niveau de signification de l'effet des facteurs causaux sur chacune des propriétés mécaniques : dureté, adhésion, cohésion et compressibilité. Le seuil de signification $\alpha$ est de 0,05. ....	54
Tableau 2-12. Modèles statistiques valides obtenus au moyen de l'analyse factorielle illustrant l'effet des facteurs causaux ( $X_1, X_2, X_3$ ) sur la propriété mécanique (Y) : dureté, adhésion, cohésion ou compressibilité. ( $Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{12} X_1 X_2 + \dots + \beta_{123} X_1 X_2 X_3$ ). ....	55

Tableau 2-13. Paramètres de validation et de corrélation entre les valeurs actuelles des propriétés mécaniques des hydrogels thermoréversibles et les valeurs prédites par les RNA. ....	63
Tableau 3-1. Paramètres statistiques obtenus de l'étude du profil de solubilité de phase de la CHX avec la CD, calculés par la régression linéaire combinée avec ANOVA à un facteur.....	74
Tableau 3-2. La variation de la solubilité aqueuse et l'incrément relatif de solubilité déterminés pour la CHX à 25 °C par l'étude du profil de la solubilité de phase en fonction de la concentration de chacune des CD. ....	75
Tableau 3-3. Rendement en pourcentage de la CHX dans son système binaire avec la $\beta$ -CD ou avec l'HP- $\beta$ -CD préparés par diverses méthodes. ....	77
Tableau 3-4. $T_{pic}$ , intervalle de fusion, enthalpie de fusion ( $\Delta H_f$ ) et degré de cristallisation réduite (DCR %) déterminés à partir de la calorimétrie DSC pour la CHX et ses systèmes binaires avec la $\beta$ -CD. ....	80
Tableau 3-5. $T_{pic}$ , intervalle de fusion, enthalpie de fusion ( $\Delta H_f$ ) et degré de cristallisation réduite (DCR %) déterminés à partir de la calorimétrie DSC pour la CHX et ses systèmes binaires avec l'HP- $\beta$ -CD. ....	82
Tableau 3-6. Pics d'absorbance IR des groupes fonctionnels des systèmes binaires de la CHX avec la $\beta$ -CD préparés par les différentes méthodes d'obtention. ....	84
Tableau 3-7. Pics de l'absorbance IR des groupes fonctionnels des systèmes binaires de l'HP- $\beta$ -CD avec la CHX préparés par les différentes méthodes de préparation.....	86
Tableau 3-8. Déplacements chimiques RMN- $^1H$ de la $\beta$ -CD pure ou en systèmes binaires avec la CHX dans le DMSO- $d_6$ .....	89
Tableau 3-9. Déplacements chimiques RMN- $^{13}C$ de la $\beta$ -CD pure et ses systèmes binaires avec la CHX dans le DMSO- $d_6$ à 25°C.....	90
Tableau 3-10. Déplacements chimiques RMN- $^1H$ de la CHX pure ou en systèmes binaires avec la $\beta$ -CD dans le DMSO- $d_6$ à 25°C. ....	91
Tableau 3-11. Déplacements chimiques ( $\delta$ ) de carbones RMN- $^{13}C$ de la CHX et ses systèmes binaires avec la $\beta$ -CD dans le DMSO- $d_6$ à 25°C.....	91
Tableau 3-12. Déplacements chimiques ( $\delta$ ) de carbones RMN- $^{13}C$ de l'HP- $\beta$ -CD et de ses systèmes binaires avec la CHX dans le DMSO- $d_6$ à 25°C.....	92

Tableau 3-13. Déplacements chimiques RMN- <sup>1</sup> H des protons de la CHX pure et dans ses systèmes binaires avec l'HP-β-CD dans le DMSO-d <sub>6</sub> à 25°C. ....	94
Tableau 3-14. Déplacements chimiques RMN- <sup>13</sup> C (δ) de la CHX et ses systèmes binaires avec l'HP-β-CD dans DMSO-d <sub>6</sub> à 25°C. ....	94

## Liste des figures

Figure 1-1. Illustration du mécanisme de transition sol-gel des hydrogels physiques.....	4
Figure 1-2. Représentation schématique de l'interpénétration des chaînes de polymère mucoadhésif (A) avec les glycoprotéines du mucus (B) [32]. .....	9
Figure 1-3. Réseau multicouches non récurrent comportant 4 neurones d'entrée pour les variables indépendants ( $X_1$ , $X_2$ , $X_3$ et $X_4$ ), 9 neurones cachés et 2 neurones de sortie pour les variables dépendants ( $Y_1$ et $Y_2$ ) [54]. .....	14
Figure 1-4. Structure chimique générale des poloxamères; EO : Éthylène oxyde, PO : Propylène oxyde.....	16
Figure 1-5. Structure chimique du polycarbophil [33]. .....	18
Figure 1-6. $\beta$ -CD (a) Structure chimique ; (b) forme toroïdale [124] ; (c) unité de $\alpha$ -D-glucopyranose. ....	23
Figure 1-7. Schéma illustrant l'interaction du médicament libre $M_L$ avec une cyclodextrine libre $CD_L$ pour former un complexe $MCD$ , ayant une constante de stabilité $K_{stb}$ . .....	24
Figure 1-8. Schéma illustrant la libération du médicament libre $M_L$ par captation préférentielle dans les tissus au site d'application, à partir de son complexe avec la cyclodextrine $MCD$ . .....	26
Figure 2-1. Courbe résultante de l'analyse de texture à l'aide de la TPA ; la force est tracée en fonction du temps. ....	36
Figure 2-2. Schéma de la structure de RNA employée dans l'évaluation des propriétés mécaniques des hydrogels thermoréversibles. ....	40
Figure 2-3. Température de transition de phase sol-gel ( $T_{gel}$ ) des solutions aqueuses de PF127 en fonction de la concentration (moyenne de 3 observations). ....	41
Figure 2-4. Effet de la concentration du polymère mucoadhésif sur la température de transition sol-gel de la solution aqueuse de PF127 16%. .....	42
Figure 2-5. Effet de la concentration de CP934P sur la $T_{gel}$ des solutions aqueuses de PF127/PF68. ....	45
Figure 2-6. Effet de la concentration de PC sur la $T_{gel}$ de différents mélanges de PF127/PF68. ....	46
Figure 2-7. Effet de la concentration du polymère mucoadhésif sur la $T_{gel}$ de la solution aqueuse de PF127/PF68 15/25 (g%). .....	46

Figure 2-8. Graphique d'échelle fonctionnelle normale des résiduels.....	52
Figure 2-9. Graphique des résiduels versus le nombre d'essais de la variable de réponse..	52
Figure 2-10. Graphique des résiduels versus les valeurs prédites de la variable de réponse. .....	52
Figure 2-11. Graphique de corrélation entre les valeurs actuelles de la variable de réponse et les valeurs prédites par le modèle statistique factoriel.....	52
Figure 2-12. Graphique de Box-Cox avant et après la transformation de puissance pour la dureté de la série 1 d'hydrogels thermoréversibles.....	53
Figure 2-13. Exemple de graphique fonctionnel normal des effets avant et après la sélection des effets significatifs : PF127(A) ; PF68 (B) et CP934P (C) et les interactions AB et AC, pour la variable de réponse : la dureté, dans le cas de la série 1. ....	53
Figure 2-14. Importance de la concentration de chaque polymère (A : PF127 ; B : PF68 ; C : CP934P), représentée par le degré de déviation du point de référence du modèle factoriel employé, sur la dureté des hydrogels thermoréversibles dans la série 1. ....	56
Figure 2-15. Graphique 3D des surfaces de réponses illustrant l'effet de l'interaction entre le PF127 et le PF68 sur la dureté des hydrogels thermoréversibles (série 1). ....	57
Figure 2-16. Graphique 3D des surfaces de réponses illustrant l'effet entre le PF127 et le PF68 sur la dureté des hydrogels thermoréversibles (série 3).....	57
Figure 2-17. Effet de l'interaction entre le PF127 et le PC sur la dureté des hydrogels thermoréversibles de série 2.....	57
Figure 2-18. Importance de la concentration de chaque polymère (représentée par le degré de déviation du point de référence du modèle factoriel employé) sur l'adhésion relative des hydrogels thermoréversibles. A : PF127 ; B : PF68 ; C : CP934P (Séries 1 et 3) ou PC (Séries 2 et 4). ....	58
Figure 2-19. Effet de l'interaction entre le PF127 et le PF68 sur l'adhésion relative des hydrogels thermoréversibles de la Série 1 (I) et la Série 3 (II). A : PF127 ; B : PF68. ■ : B en concentration basse, ▲ : B en concentration haute.....	59
Figure 2-20. Corrélation entre les valeurs mesurées de la cohésion des hydrogels thermoréversibles déterminées par la TPA et les valeurs prédites par les modèles statistiques factoriels. I : Série 3 ; II : Série 4. ....	60

- Figure 2-21. Effet de l'interaction entre le PF127 et le PF68 sur la cohésion des hydrogels thermoréversibles. I : Série 1 ; II : Série 2. A : PF127 ; B : PF68. ■ : B = 20%, ▲ : B = 25%. ..... 60
- Figure 2-22. Effet de l'interaction entre le PF68(B) et le PC (C) sur la cohésion des hydrogels thermoréversibles de la Série 2. B : PF68 ; C : PC. ■ : C = 0,0%, ▲ : C = 0,1%. ..... 61
- Figure 2-23. Effet de l'interaction entre le PF127 et le PF68 sur la compressibilité des hydrogels thermoréversibles de la Série 1. ■ : B en concentration basse, ▲ : B en concentration haute. .... 62
- Figure 2-24. Importance relative de chaque polymère selon les RNA pour chaque propriété mécanique. .... 64
- Figure 3-1. Diagramme de solubilité de phase de la base de la CHX avec les cyclodextrines dans l'eau ultrapure à 25°C..... 75
- Figure 3-2. Structure chimique de la base de la chlorhexidine où les carbones et les protons sont numérotés. .... 76
- Figure 3-3. Thermogrammes DSC de : CHX (a), MP de la CHX avec la  $\beta$ -CD (b); systèmes binaires préparés par : Pétrissage (c) ; BMSol (d); Évaporation(e); Lyophilisation (f); BE (g); La  $\beta$ -CD pure (h). .... 78
- Figure 3-4. Thermogrammes de la CHX avec l' HP- $\beta$ -CD : CHX (a), MP avec l'HP- $\beta$ -CD (b), des systèmes binaires préparés par : BEL (c), BE (d), pétrissage (e), BMSol (f); Évaporation (g) ; Lyophilisation (h); L' HP- $\beta$ -CD pure (i). .... 81
- Figure 3-5. Spectres FT-IR (I) 4000-500  $\text{cm}^{-1}$ , (II) 1730-1230  $\text{cm}^{-1}$  et (III) 1100-500  $\text{cm}^{-1}$  de: la CHX —(a); MP de la CHX et la  $\beta$ -CD —(b); Systèmes binaires de la  $\beta$ -CD avec CHX préparés par : les méthodes de boue : BMSol (c) et BE (d); Évaporation—(e); Pétrissage—(f) ; Lyophilisation —(g); la  $\beta$ -CD pure—(h). \*Les zones ombrées désignent les bandes examinées. .... 85
- Figure 3-6. Spectres FT-IR (I) 4000-500  $\text{cm}^{-1}$ , (II) 1730-1230  $\text{cm}^{-1}$  et (III) 1000-530  $\text{cm}^{-1}$  de :CHX (a); MP de CHX et l'HP- $\beta$ -CD (b);Systèmes binaires de l'HP- $\beta$ -CD avec CHX préparés par : Pétrissage (c); Méthodes de boue: BE (d), BMSol (e), et BEL (g); Évaporation (f); Lyophilisation (h); l'HP- $\beta$ -CD pur (i). \*Les zones ombrées désignent les bandes examinées. .... 87

## Liste des sigles et abréviations

<b><math>\beta</math>-CD</b>	$\beta$ -cyclodextrine
<b><math>\Phi_m</math></b>	Fraction du volume des micelles
<b>BE</b>	Méthode de la boue en utilisant l'eau ultrapure comme solvant
<b>BEL</b>	Méthode de la boue en utilisant l'eau ultrapure comme solvant suivi par la lyophilisation
<b>BMSol</b>	Méthode de la boue en utilisant le mélange de solvants
<b>CD</b>	Cyclodextrine(s)
<b>CHX</b>	Base de la chlorhexidine
<b>CMC</b>	Concentration micellaire critique
<b>CP934P</b>	Carbopol 934P
<b>DCR%</b>	Degré de cristallisation réduite
<b>DMSO-<sub>d6</sub></b>	Diméthylsulfoxyde hexadeutééré
<b>DSC</b>	Calorimétrie différentielle à balayage
<b>FT-IR</b>	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier
<b>G'</b>	Module élastique (module de stockage)
<b>G''</b>	Module de perte (module de viscosité)
<b>HLB</b>	Balance hydrophile/lipophile
<b>HP-<math>\beta</math>-CD</b>	2-Hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrine
<b>IRS</b>	Incrément relatif de la solubilité
<b><math>K_{stb}</math></b>	Constante de stabilité apparente
<b>MP</b>	Mélange physique
<b>MSE</b>	Somme des carrés des écarts à la moyenne
<b>MSR</b>	Méthode des surfaces de réponse (Response Surface Method)
<b>PC</b>	Polycarbophil
<b>PEO</b>	Polyéthylène oxide
<b>PF127</b>	Poloxamère 407
<b>PF68</b>	Poloxamère 188
<b>PPO</b>	Polypropylène oxide
<b>RMN</b>	Résonance magnétique nucléaire
<b>RMN-<sup>13</sup>C</b>	Résonance magnétique nucléaire du carbone



<b>RMN-<sup>1</sup>H</b>	Résonance magnétique nucléaire du proton
<b>RNA</b>	Réseaux de neurones artificiels
<b>T<sub>pic</sub></b>	Température de pic
<b>TEA</b>	Triéthanolamine
<b>T<sub>gel</sub></b>	Température de transition de phase sol-gel
<b>TPA</b>	Analyse du profil de texture (Texture Profile Analysis)
<b>TRG</b>	Hydrogel(s) physique(s) thermogélifiant(s)
<b>TRG-M</b>	Hydrogel(s) physique(s) thermogélifiant(s) mucoadhésif(s)
<b>UV</b>	Ultra-violet

*À mes chers parents, présents dans les bons  
comme dans les pires moments.*

*À mon fiancé, qui m'encourage toujours.*

## Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier mon directeur de recherche, le Dr Patrice Hildgen, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire, pour ses précieux conseils, son sens pédagogique, son sens envers le développement de la motivation et l'autonomie pendant mes recherches, et pour sa patience et son respect envers moi. Je le remercie autant pour me donner l'opportunité à participer aux plusieurs congrès scientifiques canadiennes et internationaux. J'aimerais aussi remercier tout l'équipe du Dr Hildgen pour leur soutien, soit Névine Rizkalla, Véronique Nadeau, Shilpa Sant, Nicolas Bertrand et Esmâ Lejmi.

Je remercie spécialement tous les professeur(e)s qui m'ont donné un coup de main au cours de ma maîtrise : Dr Françoise Winnik pour son support technique et scientifique et pour m'avoir donné l'opportunité de travailler sur le spectrophotomètre infrarouge dans ses laboratoires, Dr Jean-Norbert McMullen, Dr Roch Thibert et Dominic Caron pour leurs appuis techniques inestimables au DSC, comme en TPA; Dr Daniel Lamontagne, Dr Viviane Naggar, Dr Nawal Khalafallah, et Dr Labiba El-Khordagui pour leurs conseils et encouragements.

Mes remerciements infinis sont dirigés vers le jury de mon mémoire : Dr Fahima Nekka et Dr Jérôme Del Castillo, pour avoir accepté d'évaluer ce mémoire. Leur travail de révision et de correction et leurs commentaires constructifs m'ont beaucoup aidé. Dans ce contexte, je remercie aussi le reviseur linguistique Ahmed Loutfi pour avoir relu ce mémoire.

Un gros merci à l'équipe du Programme Canadien de Bourses de la Francophonie (PCBF) pour son soutien financier et pédagogique tout au long de mes études graduées, dès le début de mon arrivée au Canada jusqu'à mon départ.

J'aimerais remercier chaleureusement mes parents pour leur amour, leur appui, leur générosité, et leur sacrifice avec lequel ils ont enduré mon absence afin de compléter mes études au Québec. Je veux reconnaître notamment la participation de l'amie généreuse Andrée Bisson. C'est ailleurs elle qui a imprimé les exemplaires de ce mémoire. Et à ma sœur Yomna, à mes amis May, Ahmed Elzayat, Adham Mancini, Chérine Fahim, et Hagar,

ainsi qu'à prof Dr et Mme Rashad Tawashi et à Hesham M. Ez-eldine, votre amitié, support et encouragement à travers les moments les plus difficiles au cours de mon plus grand accomplissement académique jusqu'à présent, sont pour l'infini enregistrés dans mon cœur😊.

## Avant-propos

Il y a des décennies que les recherches pharmaceutiques sont dirigées vers le développement de nouveaux systèmes pharmaceutiques à libération contrôlée. L'évolution a commencé par les comprimés oraux enrobés ou multicouches et continue jusqu'aux systèmes d'hydrogels réflexifs et les systèmes microparticulaires tels que les liposomes, les microparticules, les nanoparticules et les micelles polymériques. Ce volet est adopté grâce aux avantages que la libération contrôlée confère à l'effet thérapeutique du principe actif. Ces avantages incluent la maîtrise du site et/ou du taux de libération : la localisation de la livraison et/ou le ciblage du principe actif au site désiré, ainsi que l'amélioration de sa biodisponibilité, la diminution de ses effets secondaires et l'encouragement de la persévérance du patient dans le traitement médicamenteux, une persévérance revivifiée par la fréquence réduite du dosage.

La conception d'une forme pharmaceutique à libération contrôlée est influencée par plusieurs facteurs. Certains sont liés à la composition de la forme pharmaceutique. D'autres sont concernés par les propriétés physicochimiques du principe actif telles que la solubilité aqueuse, le coefficient de partage, la taille moléculaire, l'affinité du principe actif pour les protéines et sa stabilité. Au cours de ce mémoire, nous allons contribuer à la mise au point d'un système pharmaceutique à libération contrôlée en abordant deux de ces facteurs : la composition d'une forme pharmaceutique à libération contrôlée, la forme choisie sera l'hydrogel physique thermoréversible mucoadhésif, et le deuxième facteur sera la faible solubilité. A cet égard, notre principe actif modèle sera la base de la chlorhexidine.

Les hydrogels physiques thermoréversibles mucoadhésifs (TRG-M), des formes pharmaceutiques topiques à libération contrôlée, sont capables de contenir des principes actifs variés ayant des effets thérapeutiques locaux ou systémiques. Étant des solutions aqueuses à températures basses, la thermoréversibilité de ces hydrogels leur confère un étalement et un enlèvement aisés au site d'application; alors que leur gélification à températures élevées leur attribue un aspect mécanique protecteur, ainsi qu'une libération ralentie pour le principe actif inclus. En outre, leur mucoadhésion localise et prolonge cette libération. La variation dans la composition de ces matrices pharmaceutiques modifie un éventail de propriétés pertinentes à leur fonctionnement comme des matrices à libération contrôlée. Par la suite, pour le criblage de ces formulations, un éventail de techniques est

utilisé afin d'estimer chacune de ces propriétés. L'aspect innovateur de ce travail sera dans l'utilisation de la technique d'analyse du profil de texture (TPA) pour cribler les hydrogels physiques thermoréversibles et mucoadhésifs. La simplicité, la rapidité et la capacité de cette technique d'estimer à la fois quatre propriétés mécaniques dans un seul procédé la rendent avantageuse. Des approches statistiques telles que l'analyse factorielle et les réseaux de neurones artificiels seront employées pour valider l'utilisation innovée de cette technique.

Le deuxième volet de notre contribution sera consacré à la solubilisation de la base de la chlorhexidine (CHX). La CHX est un antiseptique à large spectre, largement commercialisé sous la forme de solutions où ses sels solubles sont employés. Pour prolonger son effet sur les muqueuses, sa forme insoluble semble intéressante. Cependant, la faible solubilité devient l'étape cinétiquement limitant dans le processus de la libération. Pour affronter ce rôle de limitation, la solubilisation par complexation avec une des cyclodextrines hydrophiles sera entreprise, tout en insistant sur la méthode optimale à préparer un complexe hydrosoluble de la CHX.

# Chapitre I.

## 1 Introduction

---

### 1.1 Mise en contexte

Le travail présenté dans ce mémoire se veut une contribution dans la mise au point d'un hydrogel physique thermoréversible et mucoadhésif pour une libération topique contrôlée d'un principe actif modèle. Au cours de ce chapitre introductif, on va décrire les éléments clé sur lesquels ce travail est fondé. En premier lieu, un bref rappel sur les hydrogels en général, avec certains types de leurs générations modernes sera exposé. En second lieu, leurs propriétés les plus adaptées à la libération contrôlée, ainsi que les techniques utilisées pour leurs évaluations seront répertoriées. À propos de ces dernières, un accent sera mis sur la technique de l'analyse du profil de texture. Ensuite, une des techniques statistiques utilisées au cours de ce travail, les réseaux de neurones artificiels, sera introduite, avant que les polymères acteurs de l'étude soient étudiés. Comme cette recherche est fondée aussi sur l'étude de l'amélioration de la faible solubilité de la base de la chlorhexidine par les cyclodextrines, un survol sera fait des propriétés principales de la chlorhexidine. Les dernières sections seront consacrées aux cyclodextrines. Enfin, on va élaborer le schéma de l'étude, tout en décrivant les projets et les objectifs à réaliser.

### 1.2 Hydrogels : Généralités

La nature molle généralement biocompatible des hydrogels les rend des candidats indispensables pour les matrices des formes pharmaceutiques. L'hydrogel est un système riche en eau formé de réseaux polymériques qui possèdent des segments hydrophiles. Il jouit d'une morphologie tridimensionnelle fournie par la réticulation entre ses chaînes polymériques. Celle-ci joue un rôle crucial dans la prévention de la dissolution de l'hydrogel dans son milieu aqueux [1]. Pour une forme galénique à base d'hydrogel, la densité des points de réticulation définit l'espace entre les chaînes polymériques et développe un réseau de « pores » remplis d'eau [2], au travers desquels les molécules solubles du principe actif diffusent. Une densité supérieure de points de réticulations dénote un aspect mécanique désirable : un gel dur et une capacité de maintenir l'intégrité morphologique de l'hydrogel [3]. De ce fait, l'hydrogel fournit une bonne protection pour

l'agent thérapeutique qu'il contient et présente une forme de dépôt qui ralentit la libération [4].

Pour la réticulation, elle peut être permanente au moyen de liaisons covalentes, ou non permanente via des interactions hydrophobes, des interactions électrostatiques, ou des ponts hydrogène. Elle est permanente dans le cas d'un « hydrogel chimique ». Une réticulation non permanente ou plutôt un enchevêtrement de polymères constitue ce qu'on appelle un « hydrogel physique » [5]. Ce dernier est un système viscoélastique souvent désigné par le terme « gel » [6].

Pour répondre au besoin accru de développer des formes pharmaceutiques capables de s'adapter aux nouvelles tendances dans la livraison maîtrisée des principe actifs, soit pour assurer la stabilité et l'efficacité thérapeutique, cibler, minimiser la toxicité soit pour contrôler le taux et le temps de la libération des molécules bioactives, de nouvelles générations d'hydrogels ont évolué : hydrogels bioadhésifs, hydrogels in-situ, hydrogels biodégradables, ou hydrogels qui associent plus qu'une de ces caractéristiques. Le principe clé est de varier le type des polymères qui constituent l'hydrogel. Dans le but de cerner le thème de cette étude, nous allons nous concentrer sur les hydrogels « réactifs à l'environnement » : les hydrogels in-situ.

### **1.2.1 Hydrogels in situ**

Les hydrogels in situ (« hydrogels réactifs à l'environnement », « hydrogels réflexifs » ou « hydrogels intelligents ») ont récemment émergé comme des formes pharmaceutiques à libération maîtrisée pour une variété de principes actifs soit molécules de petite taille, soit biomacromolécules telles que protéines et polypeptides [3]. Plusieurs mécanismes rendent les hydrogels réactifs à l'environnement [7]. La réaction in situ peut être initiée suite à l'exposition à des stimuli externes : une exposition au champ électrique ou magnétique, à l'irradiation UV ou visible ou une exposition à une température qui dépasse 37°C, ou au changement de force ionique ou de solvant. Elle peut aussi être activée en présence d'un stimulus interne tel qu'un enzyme (la thrombine), une biomolécule (le glucose ou un antigène) ou un changement de pH ou de température. Selon la nature de l'hydrogel, cette réaction réversible prend une de deux formes de transition : une transition de volume de phase ou une transition de phase. Dans le cas d'hydrogels chimiques, une transition du volume de phase se produit durant laquelle l'hydrogel se transforme de l'état expansé à



l'état contracté, ou vice-versa. Pour les hydrogels physiques, les interactions temporaires déclenchent une transition de phase; la transition sol-gel. Cette dernière illustre la transition de l'état d'un liquide newtonien (sol) à l'état d'un gel : l'état où le système est viscoélastique dont l'écoulement ne survient pas même sous l'influence de la gravité [8].

### 1.2.1.1 Hydrogels physiques thermoréversibles

Un « hydrogel physique thermoréversible » est un hydrogel physique réactif à la température; la solution aqueuse de son polymère se transforme en gel en fonction de la température. On distingue deux types d'hydrogels physiques thermoréversibles : les hydrogels ayant des propriétés de thermofusion « gels classiques » et les hydrogels thermogélifiants « TRG » [5]. La solution aqueuse des gels classiques se transforme en gel par refroidissement grâce aux liaisons non-covalentes impliquées dans cette transition qui sont souvent les ponts hydrogène. Ces liaisons se forment à des températures basses et se rompent par échauffement. Pour les TRG, la transition sol-gel arrive par échauffement. Elle est procurée suite à des interactions hydrophobes incitées par l'élévation de température. Bromberg *et coll.* [9] ont résumé les propriétés requises pour qu'un système polymérique d'hydrogel physique devienne un TRG. Le polymère doit être un copolymère. Ce copolymère contient un segment hydrophobe et un autre hydrophile. À l'état sol, les segments hydrophobes du polymère sont dispersés et entourés par les molécules d'eau dans une structure ressemblant à une « cage ». Une élévation de température entraîne l'évasion de ces molécules d'eau suite à la rupture des ponts hydrogène entre elles et favorise les interactions hydrophobes. Les blocs hydrophobes sont capables d'interagir fortement entre eux pour fournir des réticulations temporaires hydrophobes et promouvoir les associations des chaînes polymériques. D'autre part, le bloc hydrophile permet au système de rester toujours en solution. Une fois une température critique est atteinte, le nombre croissant des associations hydrophobes soutient la formation d'une structure tridimensionnelle. La transition de phase sol-gel a lieu (Figure 1-1). Cette température critique est nommée la « température de gélification » ou la « température de transition sol-gel » ( $T_{gel}$ ). Si nous regardons ces systèmes du point de vue thermodynamique,

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad \text{Équation 1-1}$$

où  $\Delta G$  est la variation de l'énergie libre du système;  $\Delta H$  est la variation de l'enthalpie;  $\Delta S$  est la variation de l'entropie et  $T$  est la température en °K.

Dans un système TRG, une variation négative dans l'énergie libre du système ( $\Delta G$ ) est nécessaire pour obtenir un état stable du gel. Par l'élévation de la température, la variation positive dans l'enthalpie  $\Delta H$  devient plus petite que le terme de la variation de l'entropie. Celui-ci s'accroît spontanément grâce aux interactions hydrophobes qui augmentent l'entropie ( $\Delta S$ ) positivement [5].

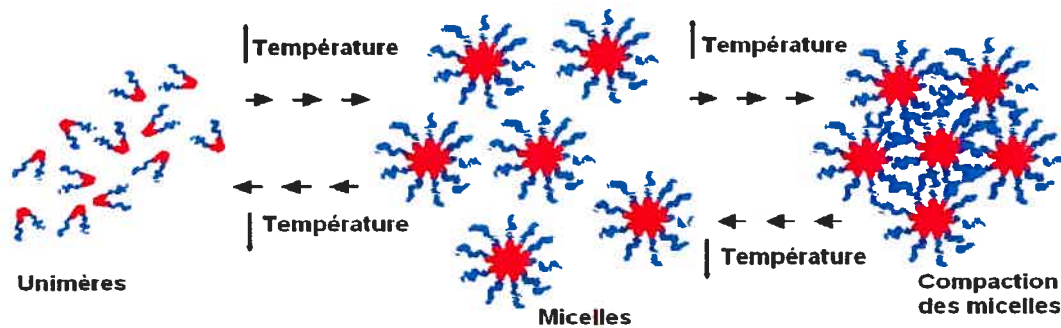


Figure 1-1. Illustration du mécanisme de transition sol-gel des hydrogels physiques.

Les TRG sont des systèmes captivants dans le domaine de la libération maîtrisée des médicaments [8]. En comparaison avec les gels conventionnels, ces derniers sont souvent difficiles à injecter. Par la voie topique, leurs systèmes viscoélastiques sont difficiles à appliquer sur la muqueuse nasale à partir d'un dispositif d'aérosol nasal. Un gel est difficile à administrer dans l'œil. Par ailleurs, les TRG sont des solutions aqueuses à la température ambiante. Ils sont faciles à injecter ou à appliquer sous leur forme liquide (sol) avant de se transformer en gel et fournir une forme de dépôt pour le principe actif [4]. De même, les TRG sont avantageux face aux hydrogels chimiques. Parmi leurs avantages, on trouve leur bonne biocompatibilité, l'aisance de leur préparation à partir des solutions aqueuses de polymères hydrophiles sûrs par de simples procédures d'échauffement, de refroidissement ou de lyophilisation. Ils sont simples à être chargés par la dose adéquate du principe actif. De même, le TRG est caractérisé par une absence de toxicité. Une toxicité est provoquée souvent dans le cas des hydrogels chimiques à cause de l'implication des agents de réticulation non-sûrs et des procédés assez compliqués dans leur préparation, ce qui met en danger la stabilité du principe actif [9].

La littérature scientifique sur les TRG comprend plusieurs exemples de copolymères synthétiques : le poly (N-isopropylacrylamide), les poly(organophosphazenes) [10], le polymère bioadhésif Pluronic-g-poly(acide acrylique) qui est aussi réactif au pH [11] et le polymère biodégradable : le poly(d,l-acide lactique-co-acide glycolique)-b-poly(éthylène glycol)-b-poly(d,l-acide lactique-co-acide glycolique)[12]. Pourtant, les polymères les plus

fréquemment utilisés sont les copolymères blocs amphiphiles de polyoxyéthylène-polyoxypropylène-polyoxyéthylène (PEO-PPO-PEO) « les poloxamères » [7].

### 1.2.1.2 Hydrogels thermoréversibles mucoadhésifs (TRG-M)

Un contact plus intime procuré par une propriété mucoadhésive supplémentaire permet au TRG de localiser l'effet et la libération du principe actif et de prolonger son temps de séjour au site d'application sur la muqueuse buccale, nasale, oculaire, rectale ou urogénitale [13]. Les TRG mucoadhésifs (TRG-M) sont des formes pharmaceutiques topiques dont la préparation a déjà fait l'objet dans certains nombre de travaux. Certains étaient dirigés vers la synthèse de copolymères sensibles à la température ayant simultanément une propriété mucoadhésive [11]. D'autres ont essayé de combiner des polymères mucoadhésifs dans la solution aqueuse du TRG [14-18]. Les polymères mucoadhésifs interagissent avec le mucus grâce à leur haute masse molaire, l'abondance des groupes fonctionnels (des groupes carboxyliques ou des hydroxyles) sur leurs chaînes flexibles, et leur haute densité de charges. Ceci leur donne la capacité de s'enchevêtrer avec les glycoprotéines du mucus, qui portent des charges négatives au pH physiologique (>2,6), et interagir avec eux via les ponts hydrogène et les interactions électrostatiques [19]. Par conséquent, la nouvelle forme pharmaceutique offrira deux caractéristiques à la libération contrôlée d'un principe actif : une transition sol-gel in situ sensible à la température et une mucoadhésion.

Dans la plupart des études sur les TRG-M, la formulation était à base du poloxamère 407 (PF127), le poloxamère le plus fréquemment utilisé dans la préparation des TRG. Choi *et coll.* [14] l'ont utilisé, en combinaison avec le poloxamère 188 (PF68) et une gamme de polymères mucoadhésifs, pour formuler des suppositoires liquides qui forment un gel dur mucoadhésif à la température du corps, dans le but de localiser la libération de l'acétaminophène au rectum. Lin et Sung [15] ont procuré pour leur TRG-M destiné à une application oculaire, la transition de phase in situ en réponse au changement de température et de pH. Celui-là était formé de PF127/Carbopol 934P(CP934P) non neutralisé, à concentration de 14/0,3 % p/p et avait un écoulement newtonien à la température ambiante. Park *et coll.* [16] ont employé un mélange de PF127/PF68 (20/12 % p/p) en combinaison avec les mucoadhésifs polycarbophil (PC) (0,2 %) ou polyoxyéthylène (0,4 ou 0,8 %) pour l'application nasale de l'ADN. Ils ont trouvé que les polymères mucoadhésifs ont légèrement baissé la  $T_{gel}$  désirée être dans l'intervalle de 31-35 °C, la température de la

cavité nasale. Pourtant, l'effet mucoadhésif a prolongé la rétention nasale de l'ADN. Dans une autre étude, on a essayé deux combinaisons de polymères PF127/PF68/PC : 15/15/0,2 et 15/20/0,2 % p/p. Bien que les deux formulations aient une  $T_{gel}$  similaire, les propriétés viscoélastiques de leurs gels ont différencié après l'application vaginale [20]. L'addition du polymère mucoadhésif l'hyaluronate sodique n'a pas amélioré le temps de résidence oculaire de la combinaison PF127/PF68 (21/10 %). Pourtant, il a affaibli la dureté du gel produit [21].

À part la versatilité des sites d'application des systèmes TRG-M, certains points sont à souligner d'après ces études. Le premier est le fait que la  $T_{gel}$  du TRG-M a été influencée par sa composition; l'ajout du PF68 et des polymères mucoadhésifs au TRG du PF127 a modulé sa  $T_{gel}$ . La modulation, d'un côté a été exigée afin de contrebalancer la  $T_{gel}$  relativement basse du TRG du PF127 et la situer à proximité de la température du corps. D'autre part, elle a été le résultat naturel de l'existence de plusieurs composants en différentes concentrations dans la même formulation, ce qui provoque des effets et des interactions qui finissent par influencer les propriétés physicochimiques du TRG. Deuxièmement, l'obtention d'une  $T_{gel}$  dans le même intervalle ne reflète pas un même comportement rhéologique. Le troisième point est l'effet de ces combinaisons sur la dureté du gel produit après la transition de phase. La dureté a été généralement modifiée, ce qui pourrait se refléter sur le taux de libération du principe actif et sur l'intégrité morphologique du gel, surtout si une fuite du TRG de son site d'application est encouragée par une dureté faible.

Par respect à ce qui précède, on voit qu'il y a des propriétés qu'il nous importe de considérer dans la conception d'une matrice pharmaceutique à base du TRG-M, notamment la  $T_{gel}$ , la dureté et la mucoadhésion. Elles sont influencées par la composition de la matrice pharmaceutique, particulièrement par les types et les concentrations des composants polymériques, ainsi que leurs interactions. L'ensemble de ces propriétés aide à inciter à cette matrice d'hydrogel une performance in vivo acceptable qui maîtrise la libération du principe actif dans le temps comme dans le lieu.

### **1.2.2 Caractérisation d'hydrogels thermoréversibles mucoadhésifs**

Parmi les propriétés du TRG-M à considérer sont : la  $T_{gel}$ , et les propriétés mécaniques : la dureté, l'adhésion, la cohésion et la compressibilité. Rapidement, on va survoler

l'importance de chacune de ces propriétés, ainsi que les techniques généralement utilisées dans leurs évaluations avant de nous centrer sur la technique qui nous semble optimale pour cribler les TRG-M.

Pour un TRG, la **température de transition sol-gel** «  $T_{gel}$  » est préférablement ajustée à la température corporelle. Ceci assure qu'à la température ambiante, la formulation du TRG-M est dans sa phase liquide quand appliquée. Son étalement sur le site d'application est ainsi aisé et sa transformation en phase de gel ne survient qu'au contact du corps. Une  $T_{gel}$  basse rend l'application difficile, et rend indispensable une réfrigération préalable à l'instillation du TRG-M [21]. Une  $T_{gel}$  qui dépasse 37°C, aussi bien qu'elle retarde la transition en gel et gêne ainsi la création de la forme du dépôt qui ralentit la libération du principe actif; elle pourrait causer la fuite du TRG, qui continue à exister dans la phase sol, de son site d'application. Un point reste à noter, selon la « théorie du gel » de Flory [5], la température critique de transition sol-gel, la  $T_{gel}$ , d'un hydrogel physique dépend de la concentration des polymères qui le forment.

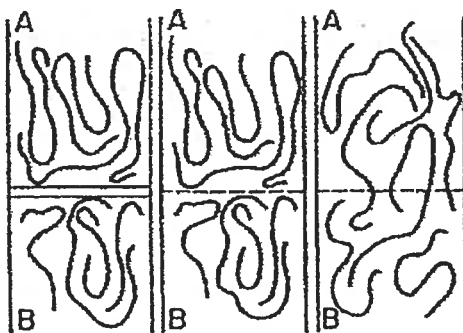
Nombreuses techniques existent pour déterminer la  $T_{gel}$  des TRG. Parmi celles-ci, des techniques simples comme la méthode d'« écoulement renversé » qui définit la  $T_{gel}$  par la température à laquelle l'écoulement qui caractérise le système sol de l'hydrogel physique cesse quand celui-ci est renversé par 90 ° [12], la méthode de la chute de la balle [8] et la méthode d'aimant [20]. D'autres sont plus sophistiquées. Dans la microcalorimétrie différentielle à balayage, l'apparence du pic endothermique de transition de phase sol-gel détermine la  $T_{gel}$  [8]. La spectrométrie mécanique désigne la  $T_{gel}$  par la température à laquelle la production d'une augmentation brusque et maintenue dans le module d'élasticité «  $G'$  », est associée avec un changement dans le module de perte «  $G''$  » et les deux modules deviennent indépendants d'une élévation additionnelle de température [17, 22]. Pour déterminer la  $T_{gel}$ , la troisième technique, la spectroscopie RMN, dépend des décalages dans les déplacements chimiques des groupes fonctionnels des polymères mucoadhésifs en fonction de température [10, 23].

La **dureté** est la force maximale de résistance de l'hydrogel physique à la compression [24]. Comme précédemment illustré, la dureté préserve la morphologie tridimensionnelle du gel et protège le principe actif inclus. Néanmoins, elle est la réflexion de la densité de réticulations dans la phase du gel [3] et évolue selon l'architecture de réseaux de pores dans l'hydrogel en ce qui concerne le nombre, la taille des pores et leurs connexions. Une petite

taille de pores confère au gel une dureté supérieure qui ralentit la diffusion du principe actif [10]. Ceci relie la dureté du gel au taux de libération d'un principe actif diffusé à travers ces pores.

La détermination de la dureté du gel est réalisée par plusieurs méthodes. Certaines utilisent la mesure de la viscosité comme indice de la dureté [10, 18]. D'autres estiment, au moyen de la rhéométrie oscillatoire, le module d'élasticité [21]. Pourtant, la viscosité comme une mesure de la dureté d'un hydrogel ne donne pas une vraie image. Il était noté que la dureté joue un rôle plus important que la viscosité dans la libération du principe actif [25]. Comme technique similaire à la pénétrométrie, des appareils adaptés qui mesurent en temps la distance traversée par un poids défini dans le gel, ont été utilisés pour déterminer la dureté [25-27]. Une technique semblable mais fortement sensible aux forces exercées par le gel durant sa compression a été employée : l'analyse de texture [28, 29].

Quant à l'**adhésion**, elle décrit les propriétés adhésives relatives de chaque formulation et présente une propriété corrélée à la **mucoadhésion** [29, 30]. Dans le but d'élucider les principes des techniques utilisées pour son estimation, il nous importe de comprendre le processus et les stades qui caractérisent la mucoadhésion. La mucoadhésion, comme processus, est complexe; elle est expliquée selon différentes théories qui se contredisent en partie [31]. Cependant, il est reconnu que la mucoadhésion est un processus où trois régions sont impliquées : la surface du système mucoadhésif, la première couche du mucus et la région interfaciale entre les deux surfaces [13, 32]. Pour les stades, la mucoadhésion consiste en deux. Une étape initiale durant laquelle un contact interfacial intime est établi entre l'adhésif et la surface muqueuse, au moyen d'un mouillage adéquat de la surface muqueuse. La deuxième étape représente l'interpénétration ou l'interdiffusion des chaînes du polymère adhésif avec le mucus (Figure 1-2), ou leur simple pénétration dans les pores et les fissures du tissu muqueux. Cette étape finit par installer des liens chimiques temporaires entre les groupes hydroxyles, sulfatés ou carboxyliques de la mucine et le polymère mucoadhésif. Subséquemment, une « synergie rhéologique » est provoquée ; autrement dit, un renforcement des modules viscoélastiques ( $G'$  et  $G''$ ) du gel de mucus et de celui du mucoadhésif, est produit dans la région interfaciale entre la surface de la formulation mucoadhésive et la surface muqueuse [32].



**Figure 1-2.** Représentation schématique de l'interpénétration des chaînes de polymère mucoadhésif (A) avec les glycoprotéines du mucus (B) [32].

La mucoadhésion d'une formulation pharmaceutique peut être estimée par des méthodes *in vivo* qui tracent ses composants marqués avec des molécules radioactives ou fluorescentes [11, 33] ou par des méthodes *in vitro*. Les méthodes *in vitro* mesurent principalement soit la faillite de la mucoadhésion de la formulation mucoadhésive [34], soit le synergisme rhéologique. Pour la première catégorie, les méthodes de mesure sont basées sur l'évaluation des forces mécaniques impliquées dans la mucoadhésion. Le moyen est de mesurer la force maximale de détachement ou le travail maximum requis pour séparer le mucoadhésif du mucus ou d'une partie de l'épithélium muqueux aux moyens de certains appareils. Ceux-ci fonctionnent par l'application d'une contrainte de traction comme le testeur de traction [17, 35], ou une balance adaptée [36] ou par **pénétrométrie** comme l'analyseur de texture [34, 37].

La deuxième catégorie comprend les méthodes de **rhéométrie dynamique oscillatoire**. À l'aide de l'application des contraintes de cisaillement aux formulations examinées, ces méthodes estiment l'accroissement de leur résistance à la déformation « le synergisme rhéologique », en présence du mucus [19]. La capacité du mucoadhésif de renforcer les composants viscoélastiques de deux systèmes impliqués est calculée d'après les équations 1-1 et 1-2.

$$\Delta G' = G'_{(\text{mélange})} - (G'_{(\text{polymère})} + G'_{(\text{mucine})}) \quad \text{Équation 1-1}$$

$$\Delta G'' = G''_{(\text{mélange})} - (G''_{(\text{polymère})} + G''_{(\text{mucine})}) \quad \text{Équation 1-2}$$

Dans un grand nombre d'études, les méthodes qui mesurent la force de traction sont utilisées pour étudier la mucoadhésion des formes pharmaceutiques solides et semi-solides,

alors que les méthodes rhéologiques sont limitées à l'estimation de la mucoadhésion des systèmes hydratés, comme les hydrogels.

Quant à la **cohésion**, elle décrit la reformation structurale de la formulation quand des contraintes de déformation y sont appliquées [38]. Comme illustré dans la section précédente, la faillite de la mucoadhésion est un des principes utilisés pour estimer le pouvoir mucoadhésif d'une formulation pharmaceutique. Cette faillite de mucoadhésion pourrait se produire dans une des trois régions impliquées dans la mucoadhésion : dans l'interface entre la surface de la formulation mucoadhésive et la surface du mucus, dans le mucus, ou dans la formulation mucoadhésive elle-même suite à la faiblesse de ses forces cohésives. Autrement dit, la cohésion de la formulation joue un rôle dans la mucoadhésion ; une formulation ayant une faible cohésion est plus susceptible de subir une chute relativement rapide dans sa mucoadhésion [32].

La **compressibilité** est une caractéristique qui définit la variation relative de volume d'un fluide, sous l'effet d'une pression appliquée. Selon Jones [38], pour un gel pharmaceutique, elle est une propriété mécanique liée à la facilité de son étalement au moyen d'une seringue. Pourtant, pour un TRG, l'étalement serait dans sa phase sol, ce qui lui évite la nécessité de posséder une propriété de compressibilité optimale. Toutefois, la compressibilité nous semble assez intéressante si les TRG sont appliqués à la muqueuse nasale. Ces TRG-M doivent d'une part s'enchevêtrer avec le mucus. D'autre part, ils ne devraient pas présenter une résistance éminente ni au mouvement des cils nasaux ni au taux de clairance mucociliaire qui sont responsables de maintenir l'intégrité de la voie aérienne nasale [39]. A cet égard, une compressibilité appropriée est requise.

Malgré leurs rôles influant sur la performance in vivo des formes pharmaceutiques, les deux propriétés mécaniques : la cohésion et la compressibilité sont rarement considérées dans l'évaluation des hydrogels pharmaceutiques. Elles sont souvent négligées dans la caractérisation des TRG-M. Cependant, un analyseur de texture pourrait facilement être utilisé dans leur évaluation [24, 40].

Après avoir exploré les propriétés du TRG-M pertinentes à maîtriser sa fonction d'une forme pharmaceutique à libération contrôlée ainsi que les techniques diverses utilisées dans leur caractérisation, et si on les associe à la plupart d'études mentionnées dans la section 1.3.1.2., on constate que la tendance générale était d'examiner aléatoirement chacune de



ces propriétés pour de différentes combinaisons de polymères, qui varient en concentrations ou en polymère mucoadhésif, avant d'étudier leur comportement in vivo. Pourtant, aucune étude n'a essayé, soit dans la phase de préformulation soit dans la phase de formulation, de cribler ces formulations de TRG-M au moyen d'une technique unique qui pourrait donner une idée globale sur la performance in vivo. Par contre, l'examen de chaque propriété pour chaque combinaison a été munie par des techniques diverses qui diffèrent selon le principe, ainsi que selon la procédure suivie.

Le besoin d'appliquer une méthode fiable qui pourrait être employée dans les phases de préformulation et/ou formulation pour cribler les formulations TRG-M dans le plus court délai, donner un indice significatif sur la qualité de leur performance in vivo, tout en aidant dans l'identification des rôles qu'exercent leurs composants sur leurs propriétés mécaniques, semble nécessaire.

### **1.2.3 Analyse du profil de texture (TPA)**

L'analyse du profil de texture (La TPA) est une technique de pénétrométrie mise au point par l'équipe de Szczesniak en 1963 dans le domaine des aliments. Il l'a utilisée dans la classification des paramètres mécaniques de texture des aliments et pour les corrélés à l'évaluation sensorielle de leur texture [41]. L'importance de la TPA dans la caractérisation des gels pharmaceutiques a été soulignée vers 1995 par les laboratoires de Tobyn [42]. La TPA analyse une série de paramètres mécaniques de texture dans un test singulier à l'aide de l'instrument : le « pénétromètre » ou l'« analyseur de texture ».

L'analyseur de texture comporte une plaque fixe qui supporte l'échantillon et un axe transversal, flexible et mobile. L'axe transversal s'attache à une extrémité à un calibre qui sert à détecter la tension de déformation engendrée sur le gel. À l'autre extrémité de l'axe, une cellule de charge changeable est attachée. La cellule de charge est reliée à son tour à une sonde qui, par un mouvement rectiligne à des vitesses constantes et prédéterminées-- allant de 0,01 à 10,00 mm/s-- comprime l'échantillon du gel examiné deux fois consécutives (une double compression). Ces deux cycles de compression sont séparés par une période de repos. La tension mesurée est représentée graphiquement en fonction du temps ou de la distance. D'après ces graphiques, les paramètres mécaniques suivants sont quantifiés [28] :

1. Dureté : « la force requise pour arriver à une certaine déformation ». Elle dénote la force maximale détectée dans l'hydrogel durant la pénétration de la sonde.
2. Adhésion : la force requise pour vaincre les force d'attraction entre la surface de l'hydrogel et le substrat muqueux. elle est représentée par le travail nécessaire pour le retrait de la sonde loin de l'échantillon examiné.
3. Cohésion : le travail de résistance à la pénétration.
4. Compressibilité : le travail nécessaire pour déformer l'échantillon examiné durant le premier cycle de compression de la sonde.

La TPA représente une technique applicable, reproductible pour les mêmes conditions de tests [38]; on peut contrôler la température, la vitesse de la sonde, la profondeur de pénétration de la sonde dans le gel et la surface de contact entre la sonde et le système de l'hydrogel. En plus, la précision et l'exactitude de mesures de la TPA et la richesse de paramètres fournis durant une seule procédure favorisent son utilisation dans le criblage des formulations semi-solides mucoadhésives. Pour la dureté et la compressibilité, nous avons déjà exposé leur importance et les méthodes optimales pour leur estimation, notamment par l'analyse de texture. Pour l'adhésion, étant une technique in-vitro, la TPA ne présente pas une vraie valeur prédictive de performance mucoadhésive in vivo. Pourtant, Jones [28, 38] l'a mise en profit dans l'évaluation et le développement des formulations topiques pharmaceutiques, ainsi que le criblage des formulations mucoadhésives. Tamburic *et coll.* [43] ont comparé trois méthodes d'étude de mucoadhésion : La rhéométrie oscillatoire dynamique, l'analyse de texture des mélanges de polymères/mucine (par rapport aux polymères en absence de mucine), et la technique de mesure de force de traction des gels de polymères où l'analyseur de texture a la sonde enrobée par une couche de la mucine. Ils ont montré que la dureté et l'adhésion des hydrogels examinés, dans l'étude de traction, correspondait aux résultats des examens rhéologiques et d'analyse de texture pour tous les polymères examinés (le polycarbophil, le Carbopol 971 et le Carbopol 974) en absence ou en présence de la mucine. Une corrélation entre les propriétés viscoélastiques mesurées rhéologiquement pour les hydrogels physiques et leurs paramètres mécaniques détectés par la pénétrométrie a été établie [43, 44]. Similairement aux résultats de Tamburic, la ressemblance entre la TPA et la rhéométrie dynamique ou les méthodes de mesure de force de traction semble en faveur de l'utilisation de la TPA [45]. Cependant, la possibilité de mesurer simultanément la cohésion et l'adhésion de la formulation mucoadhésive par la

TPA présente un avantage additionnel. La plupart des méthodes *in vitro*, soit des méthodes de mesure de forces de traction soit des méthodes rhéologiques, ne peuvent pas distinguer entre les deux types de forces. Une distinction des formulations, qui à forces cohésives faibles dans un premier stade de préformulation, aide à les éliminer des expériences *in vivo* subséquentes.

### 1.3 Réseaux de neurones artificiels (RNA)

Dans cette étude, deux approches statistiques seront utilisées pour évaluer les propriétés mécaniques et leur corrélation à la composition polymérique des TRG-M: l'analyse factorielle et les réseaux de neurones artificiels (« RNA » ou Artificial neural networks « ANN »). L'analyse factorielle est une méthode utilisée depuis longtemps dans les recherches pharmaceutiques. Pour plus de détails, le lecteur peut référer à cette bibliographie [46]. Dans cette section, nous allons nous concentrer sur les RNA.

Les RNA sont une technique d'apprentissage informatique, un type d'intelligence artificielle, qui simulent les processus et les capacités neurologiques cognitives du cerveau humain. Ils évaluent les données (paramétriques ou non-paramétriques), identifient et analysent simultanément dans le même modèle les corrélations compliquées qui peuvent exister entre plusieurs facteurs causaux et plusieurs variables dépendantes. Ils ont émergé dans le domaine pharmaceutique comme une approche d'analyse comparable aux méthodes de régression multiple [47]. On a utilisé les RNA dans la prédiction des propriétés physicochimiques ou pharmacocinétiques d'un principe actif [48, 49], et dans l'optimisation des formulations des systèmes de libération médicamenteuse [47, 50-53]. Pourtant, jusqu'à présent à notre connaissance, les RNA n'ont pas été utilisés dans la formulation ou la préformulation des TRG-M.

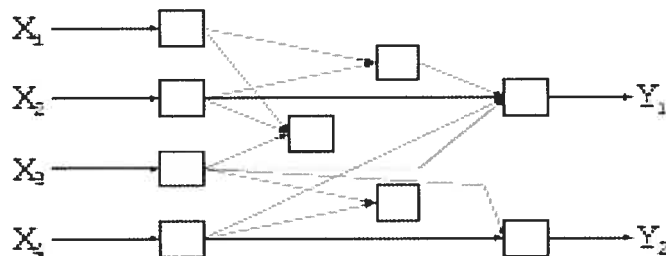
Jetons un coup d'œil sur la composition et le fonctionnement d'un RNA. Un RNA consiste en un ensemble d'unités nommées les « neurones ». Il se distingue par le type de ses neurones et par sa topologie. Un RNA multicouches « un perceptron multicouches » comprend des neurones répartis dans trois types de couches interconnectées :

1. Une couche d'entrée recevant les données du monde extérieur et qui correspond au nombre des variables indépendantes (les variables d'entrée).

2. Une ou plusieurs couches cachées qui s'ajustent dans le but de minimiser l'erreur (l'écart) entre les valeurs expérimentales des variables d'entrée et les valeurs prédites par le modèle statistique généré.
3. Une couche de sortie qui correspond au nombre de variables dépendantes (variables de réponses).

Les neurones appartenant aux couches adjacentes sont interconnectés à travers des synapses. Selon le type d'interconnexion : récurrente (cycliques) versus non récurrente, la topologie des RNA diffère : RNA récurrent ou RNA non-récurrent (Figure 1-3). En général, la force de chaque interconnexion synaptique est définie par un « poids » ou « un coefficient synaptique ». Un poids synaptique initial est assigné aléatoirement pour correspondre à l'écart déduit entre les valeurs de sortie actuelles et celles calculées. Pour chaque couche cachée et la couche de sortie, les neurones font la somme de leurs fonctions pour calculer leurs sorties pour la couche suivante à partir des algorithmes.

Selon l'algorithme utilisé, l'introduction des données au RNA initie un « processus d'apprentissage ». L'apprentissage est distingué en un « apprentissage supervisé » quand les couples de données (données d'entrée et de sortie) sont présentés au réseau, ou un « apprentissage non-supervisé » lors de la présentation des données d'entrée seulement. Dans l'apprentissage supervisé, les poids synaptiques sont automatiquement modifiés en se propageant d'une couche à l'autre, à chaque présentation d'un nouveau couple de données.



**Figure 1-3. Réseau multicouche non récurrent comportant 4 neurones d'entrée pour les variables indépendants ( $X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_3$  et  $X_4$ ), 9 neurones cachés et 2 neurones de sortie pour les variables dépendants ( $Y_1$  et  $Y_2$ ) [54].**

La modification a comme but de minimiser soit l'erreur calculée pour chaque donnée soit l'erreur globale de l'ensemble de données. Ce processus d'itération est répété. Quand le nombre d'itérations déjà effectuées peut pondérer la modification des poids synaptiques, rendre leur valeur numérique minimale et inchangeable, ou lorsque l'erreur estimée passe sous un seuil prédéfini, l'algorithme d'apprentissage s'arrête. Ainsi, un réseau adapté a

reconnu et a « appris » la corrélation entre les différentes variables en question. L'apprentissage est considéré plus difficile avec les RNA récurrents qu'avec les RNA non-récurrents [51]. Un apprentissage peut être aussi effectué au moyen de l'algorithme génétique (parfois appelé « algorithme évolutionnaire »). Celui-ci utilise des processus de sélection, de recombinaison et de mutation, similairement au processus de l'évolution des gènes biologiques, pour générer des nouveaux points ayant un ajustement supérieur et de meilleurs poids synaptiques.

## 1.4 Polymères acteurs de l'étude

Pour la composition polymérique des TRG-M étudiés dans ce travail, on a utilisé quatre polymères : le poloxamère 407, le poloxamère 188, le Carbopol 934P et le polycarbophil.

### 1.4.1 Poloxamère 407 (PF127)

Le poloxamère 407 (PF127) est un membre des poloxamères (les Pluronic<sup>®</sup>, Lutrol<sup>®</sup> ou Synperonic<sup>®</sup>) qui sont des agents tensioactifs non-ioniques ayant la structure d'un tribloc copolymère amphiphile du type ABA. Son centre est hydrophobe (le polypropylène oxyde « PPO ») et ses deux extrémités sont les blocs hydrophiles du polyéthylène oxyde « PEO » (Figure 1-4). La haute masse moléculaire moyenne du PF127 (12600 g/mol) et les 30 % du PPO qui constituent son centre hydrophobe, incitent sa solution aqueuse à se transformer en gel rigide et transparent, en réponse à une élévation de température [55]. La  $T_{gel}$  de ce TRG dépend de la concentration. Sa transition sol-gel est précédée par un processus de micellisation. Celle-ci est induite quand la concentration du PF127 dans sa solution aqueuse dépasse sa concentration micellaire critique « CMC » équivalente à 1 mg/mL [56]. L'augmentation de la température incite les interactions hydrophobes des segments PPO qui agrègent les unimères du PF127 aux micelles sphériques. En continuant à élever la température, le rayon hydrodynamique des micelles reste constant, alors que leur nombre, et par la suite, la fraction du volume des micelles «  $\Phi_m$  » s'accroissent [57]. Lorsque la valeur de  $\Phi_m$  dépasse 0,53, l'élévation de la température provoque l'enchevêtrement et la compaction des micelles et augmente brusquement leur rayon hydrodynamique apparent dans la région de la transition pour finir par former une structure organisée du gel [58-60]. Une deuxième transition de phase : une transition gel-sol, arrive en élevant davantage la température. Connue pour les gels de poloxamères, elle dépend des concentrations utilisées.

Malgré que la cause soit non-comprise jusqu'à présent, on suggère qu'un relâchement des contraintes de micelles enserrées par la transformation de la forme des agrégats des micelles, de la forme sphérique à celle de baguettes, soit à l'origine d'une telle transition. Ceci est expliqué par une modification probable de la solubilité des fractions PEO en fonction de la température [61, 62].

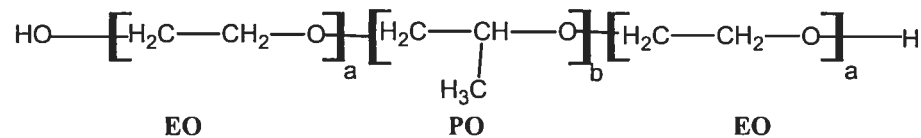


Figure 1-4. Structure chimique générale des poloxamères; EO : Éthylène oxyde, PO : Propylène oxyde.

Poloxamère 407 (PF127) : a=101 ; b=56

Poloxamère 188 (PF68) : a=79 ; b=28

Quant à la préparation des hydrogels de PF127, deux procédures sont généralement suivies : la méthode chaude et la méthode froide [55].

1. Méthode chaude : Le PF127 et de l'eau sont agités à basse vitesse et le mélange est chauffé jusqu'à 90°C durant quatre heures environ.
2. Méthode froide : Le PF127 est ajouté lentement à l'eau froide (5-10°C) avec agitation modérée. Le mélange est entreposé à 4°C toute la nuit pour compléter la dissolution.

La modulation de la  $T_{gcl}$  du TRG du PF127 est un concept étudié. En solution, les interactions hydrophobes et par la suite la  $T_{gcl}$ , sont influencées par la présence des molécules de natures diverses. Le PEG 400 diminue sa  $T_{gcl}$  [63], alors que le PEG 6000 (2 % et 5 %) l'augmente pour les solutions aqueuses à 22 % et 25 % de PF127. Un effet expliquée par la nature hydrophile du PEG qui perturbe le mécanisme de gélification de PF127 [64]. Cet effet est plus noté avec les solutions diluées du poloxamère [22]. Le chlorure de sodium a diminué la  $T_{gcl}$  [26, 65]. L'agent tensioactif anionique, le sulfate lauryle de sodium, en concentration plus haute que 2 % empêche la gélification d'une solution à 20 % du PF127 [66].

Étant le plus sûr de tous les poloxamères, approuvé par FDA et inclus dans son guide des ingrédients non-médicinaux, le PF127 est fréquemment employé comme matrice pour des systèmes de livraison médicamenteux [55, 67]. Il a été utilisé pour prolonger l'effet local de la lidocaïne [63]. Sous la forme d'un liquide injectable, Lee *et coll.* [68] l'ont employé dans la libération topique de l'antibiotique de vancomycine. D'autres ont bénéficié de la

transparence de son TRG dans la formulation d'un pansement qui permet la visualisation de blessures, l'absorption d'exsudats et la diffusion d'oxygène aidant la cicatrisation. Sa sensibilité à la température est avantageuse; elle a facilité son enlèvement sans douleur, puisqu'il suffisait de le laver avec de l'eau froide [69, 70].

#### 1.4.2 Poloxamère 188 (PF68)

Le PF68, un poloxamère de masse moléculaire moyenne de 8350 g/mol, Figure 1-4, a des nombreuses utilisations : agent mouillant dans des formulations laxatives, agent nettoyeur pour les blessures et émulsifiant (E/H) [71]. Il a été utilisé en différentes concentrations pour moduler la  $T_{gel}$  du TRG du PF127 dans de nombreuses recherches [14, 18]. Nystrom *et coll.* [72] ont démontré par des études de rhéométrie oscillatoire dynamique qu'à haute concentration (35 %), le PF68 est capable de former son propre gel à partir de sa solution aqueuse. Cette haute concentration induit la formation brusque d'un réseau fort de micelles interconnectées et une transition sol-gel est observée dans l'intervalle de 34-37 °C. Pourtant, Yong *et coll.*[73] l'ont utilisé seul, à une concentration de (15 %), pour former des gels, une thermoréversibilité n'était pas réclamée.

#### 1.4.3 Carbopol 934P (CP934P)

Le Carbopol 934P (CP934P) appartient à la famille des « carbomères » ou les « carbopols ». Ils sont des polyacrylates linéaires, branchés ou réticulés qui diffèrent entre eux par la masse moléculaire, le degré et l'agent de réticulation. Celui-ci peut être l'éther allyle du saccharose ou du pentaéthythrytol. Le CP934P est le poly (acide acrylique) linéaire légèrement réticulé par l'éther allyle du pentaéthythrytol [74 , 75]. Il constitue avec le Carbopol 971P et le Carbopol 974P les trois sortes de Carbopols de grade pharmaceutique. La masse molaire moyenne est de  $3 \times 10^6$  g/mol du CP934P, et il contient entre 56,0-68,0 % de groupes carboxyliques. Son pouvoir mucoadhésif est excellent [75, 76]. Le CP934P a été utilisé pour la première fois comme un mucoadhésif par le groupe de Nagai [77] dans la formulation d'un gel de prednisolone pour le traitement des ulcères aphteux. Sa performance mucoadhésives réside essentiellement dans la similarité de sa structure avec celle de la mucine [78]. Au pH physiologique (un pH supérieur à son  $pK_a$  de 4,75), le CP934P devient négativement chargé grâce à ses groupes carboxyliques ionisés. La répulsion entre ses chaînes augmente en leur accordant une grande mobilité et un enchevêtrement accru avec les chaînes glycoprotéïniques de la mucine [19, 79] et sa

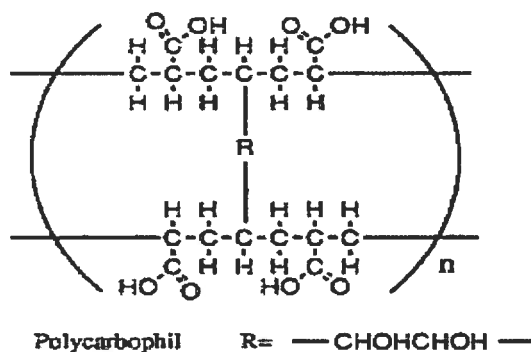
solution aqueuse se transforme en gel [77]. Le CP934P neutralisé par le sodium montre une meilleure adhésion que le CP934P non-neutralisé comme évalué par des tests de traction sur la muqueuse gastrique du porc [74].

Le CP934P est incorporé dans de nombreux systèmes de livraison médicamenteux mucoadhésifs [80]. Il ne cause ni hypersensibilité, ni réactions allergiques lors d'administration chez les humains. Il est aussi utilisé comme laxatif à une dose orale de 1 à 3 g/jour et comme un agent épaississant à faible concentration [81]. Le CP934P, à une concentration de 3 %, est bien toléré pendant 72 heures suite à son instillation oculaire chez les lapins [82].

### 1.1.1 Polycarbophil (PC)

Le polycarbophil (PC) (Carbopol EX-55 ou Noveon AA-1<sup>®</sup>) est le poly (acide acrylique) linéaire légèrement réticulé avec le divinyle glycol. Sa masse molaire moyenne est de  $2,2 \times 10^5$  g/mol. Sa réticulation et sa teneur en groupes carboxyliques le rendent un hydrogel chimique : insoluble mais gonflable dans l'eau. Son degré de gonflement dépend de la quantité d'eau libre dans la formulation [38].

Le PC est capable de former des adhésions fortes et de longue durée avec les muqueuses [76, 83, 84]. On explique son pouvoir mucoadhésif par deux facteurs principaux : son gonflement rapide qui permet l'enchevêtrement des ses chaînes avec les chaînes des glycoprotéines du mucus [83], et le pouvoir de ses groupes carboxyliques non-ionisés de se lier aux glycoprotéines au moyen des ponts hydrogène à des pH favorables [80].



**Figure Error! No text of specified style in document.-1. Structure chimique du polycarbophil [33].**

Cependant, un environnement où l'hydratation est limitée permet la formation d'un hydrogel rigide de PC qui, à son tour, prolonge la durée de la mucoadhésion [85]. Sa



neutralisation augmente la répulsion électrostatique entre ses groupes carboxyliques ionisés [86]. La haute sensibilité du PC au pH et aux électrolytes du milieu a été exploitée dans la libération maîtrisée des médicaments. Ce système mucoadhésif gélifiant est appliqué pour la libération oculaire prolongée de tropicamide [87] et rend possible l'administration du propranolol sous la forme d'un comprimé buccal mucoadhésif [88], de l'apomorphine par la voie nasale [89], de l'insuline par la voie rectale [90], et de la progestérone par la voie vaginale [91].

## **1.5 Faible solubilité aqueuse du principe actif comme facteur de la libération contrôlée**

Un deuxième volet des facteurs qui jouent un rôle dans la conception d'une forme pharmaceutique à libération contrôlée réside dans les propriétés physicochimiques du principe actif. La solubilité aqueuse du principe actif est une de ses propriétés physicochimiques qui lance plusieurs défis pharmaceutiques. Une faible solubilité (< 100 µg/mL) mène à une mauvaise absorption et une biodisponibilité faible par voie orale [92]. La formation des agrégats du médicament insoluble aboutit à une concentration haute et localisée dans son site d'application ou de déposition, ce qui peut provoquer une toxicité locale ou une biodisponibilité systémique basse. L'important encore est l'effet de la faible solubilité sur le taux de dissolution. Seulement les molécules solubles du principe actif sont capables de diffuser à travers la matrice pharmaceutique; leur flux détermine le taux de dissolution et par la suite, le taux de libération du principe actif [92]. Par conséquent, la faible solubilité devienne l'étape cinétiquement déterminante dans l'acheminement de l'effet thérapeutique. Pour remédier à la faible solubilité du principe actif, on a eu recours à plusieurs moyens : l'utilisation des excipients comme les solvants organiques, les co-solvants et/ou les tensioactifs, l'ajustement du pH pour le principe actif ionisable, ou la formation des sels solubles du principe actif. Des approches récentes ont utilisé les systèmes microparticulaires comme les liposomes, les microparticules, les nanoparticules, les micelles polymériques ou les microémulsions, ou la formation des complexes hydrosolubles avec les cyclodextrines [93].

### 1.5.1 Chlorhexidine (CHX)

la chlorhexidine (CHX) est un agent antiseptique à large spectre. Elle est utilisée, sous forme de solutions ou de rinçages, dans le lavage chirurgical des mains, le nettoyage des lésions, des brûlures et des champs opératoires et comme agent conservateur dans les préparations ophtalmiques [94-96]. Elle est aussi employée dans le traitement périodontique de la gingivite, le combat contre la plaque dentaire, et le contrôle des infections produites par : les *Staphylococcus aureus* résistants à la méticilline, les entérocoques résistants à la vancomycine, les infections fongiques de la cavité orale et les infections causées par certains virus lipophiles comme certains adénovirus, le virus de l'herpès, et le virus de l'influenza [97-100]. Selon la concentration, la CHX peut être bactériostatique (20-50 µg/mL) ou bactéricide (>100 µg/mL). Elle démontre son activité antibactérienne optimale quand le pH du milieu est entre 5-8 grâce à sa nature bi-cationique aux pKa de 2,2 et 10,3. Dans cet intervalle, sa charge positive neutralise les charges négatives de la surface membranaire du micro-organisme et ainsi, son adsorption rapide sur la paroi de la cellule altère la membrane du micro-organisme. [94, 95, 101].

Malgré toutes les formes pharmaceutiques, souvent des solutions, dont la CHX fait part, la CHX base ou le 1,6-bis-(p-chlorophényl-biguanido)hexane est pratiquement insoluble dans l'eau, selon l'USP (1 dans 13,000 à 20°C) [95]. Ce sont plutôt ses sels plus hydrosolubles (notamment le digluconate et le diacétate) qui sont incorporés. Par ailleurs, des études antérieures [102-104] ont essayé de complexer ces sels de CHX avec des cyclodextrines diverses pour alléger l'hydrophobicité.

En outre, la base de CHX est peu soluble dans l'éthanol et l'acétone. En solution aqueuse, sa photolyse produit la phénylbiguanidine. Son hydrolyse donne la 4-chloroaniline et le p-chlorophénylbiguanidine [105, 106]. L'hydrolyse en 4-chloroaniline se fait lentement et s'accélère en augmentant le pH de la solution. À l'état solide, la CHX est stable à la température ordinaire, mais se décompose en 4-chloroaniline par la chaleur (>115°C), son point de fusion se situe à 134°C [95].

À propos de sa toxicité pour les muqueuses, la CHX a un seuil limite d'irritation oculaire chez l'homme de 0,02 %. Une concentration entre 0,5 et 2 % fait apparaître des lésions de cornée et de conjonctive; et une concentration de 4 % entraîne des opacifications irréversibles dans la cornée [107]. Sur la muqueuse nasale, la CHX est tolérée sous forme

de solution à 0,01 % quand diluée dans une solution de chlorure de sodium à 0,9 %. Sur la muqueuse buccale, une absence d'effets secondaires a été montrée après 2 ans d'utilisation régulière. Pourtant, des ulcérations et des irritations occasionnelles, une altération du goût, une sécheresse buccale et un blocage de la sécrétion parotidienne peuvent être observés. Une coloration réversible jaune ou brune des dents, qui dépend de la concentration, de la fréquence d'utilisation et des habitudes alimentaires, est notée lors de l'utilisation des bains de bouche de la CHX [108]. Quand absorbée, le taux de CHX sérique est indétectable. Moins de 0,3% de la dose est retrouvé dans l'urine. L'absorption systémique à travers les muqueuses vaginale (1%), péritonéale, et vésicale (0,02%), oculaire (0,2%) et nasale (0,01%), est négligeable [101]. La 4-chloroaniline peut provoquer des brûlures cutanées et des lésions oculaires [94]. À haute concentration, elle est carcinogène [109], apte d'entraîner l'hémolyse [95] et se polymérise sous l'effet de la lumière provoquant une coloration de la solution [101].

### 1.5.2 Cyclodextrines (CD)

Grâce à leur profil d'innocuité, les cyclodextrines (CD) représentent un élément intéressant en technopharm. Il existe au minimum 21 formulations médicamenteuses commercialisées contenant les CD sur le marché mondial : 11 en Europe, 9 au Japon et 6 aux États Unis [110-112]. Les CD ont le pouvoir de former des complexes, souvent des complexes d'inclusion, avec de nombreux principes actifs sans altérer l'effet thérapeutique de ces derniers, ni toucher à leurs pharmacocinétiques [113]. Quand inclus dans la cavité de la CD, le médicament est protégé contre l'oxydation, l'hydrolyse, l'isomérisation, le polymorphisme et/ou la lumière [114].

Les CD naturelles représentent une famille d'oligosaccharides cycliques où 6, 7 ou 8 unités de  $\alpha$ -D-glucopyranose sont reliées par des liaisons de type ( $\alpha$ -1,4) pour former respectivement une  $\alpha$ -,  $\beta$ - ou  $\gamma$ -CD. Produites suite à l'hydrolyse de l'amidon par la cyclodextrine glycosyltransférase (CGT), les CD ont été découvertes par Villiers en 1891. Par la suite, les trois CD naturelles  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  ont été caractérisées par Schardinger et nommées « Schardinger's  $\alpha$ -,  $\beta$ - et  $\gamma$ -dextrines ». Entre 1911 et 1935, Freudenberg *et coll.*, ont étudié la capacité de ces composés à former des complexes solubles dans l'eau avec certaines molécules [115]. Les liaisons ( $\alpha$ -1,4), la conformation  ${}^4C_1$  du glucopyranose et les ponts hydrogène formés entre le groupe hydroxyle sur  $C_2$  d'une unité de glucopyranose et

le groupe hydroxyle en C<sub>3</sub> d'une unité de glucopyranose adjacente, limitent la rotation libre des unités de glucopyranose, ce qui donne de la rigidité à la structure de cône tronqué ou de tore des CD (Figure 1-6). La surface externe du tore est hydrophile, alors que sa cavité centrale est hydrophobe. L'architecture rigide du cône tronqué permet l'organisation des groupes d'hydroxyles primaires (OH-6) sur le côté étroit du cône (la « face primaire ») alors que les groupes hydroxyles secondaires (OH-2, OH-3) sont localisés sur le bord le plus évasé (la « face secondaire »). La cavité centrale est tapissée par les atomes d'hydrogène (H<sub>3</sub> près de la face secondaire et H<sub>5</sub> près de la face primaire) et les ponts d'oxygène glycosidiques [116]. Ce doublement de la cavité intérieure la rend relativement apolaire (hydrophobe). Ainsi, la CD possède un caractère amphiphile qui lui permet de former des complexes d'inclusion avec des molécules diverses en offrant ou acceptant des électrons [117].

Quant à leurs propriétés physicochimiques, les CD naturelles sont des composés cristallins qui se décomposent à une température supérieure à 200 °C, sans avoir des points de fusion définis [111]. Elles sont non hygroscopiques, mais leurs cavités sont associées avec un nombre de molécules d'eau, qui varient d'une CD à autre [118]. Les CD naturelles ont une bonne solubilité aqueuse hormis la β-CD dont la solubilité aqueuse est de 1,85 % p/v. Cette faible solubilité est expliquée par l'énergie réticulaire élevée du cristal de β-CD et par les ponts hydrogène intramoléculaires qui se forment entre ses groupes hydroxyles secondaires [119, 120].

La modification chimique des groupes hydroxyles des CD mène à la synthèse de centaines de dérivés de CD qui diffèrent entre eux par leurs propriétés physicochimiques. La substitution des hydrogènes des groupes hydroxyles de CD (sur C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub> ou C<sub>6</sub> pour la β-CD) déränge la formation des ponts hydrogène intramoléculaires, ce qui améliore la solubilité aqueuse de la CD puisque le caractère cristallin de la CD naturelle est remplacé par un caractère amorphe [118]. Selon le type de la CD, la nature du médicament complexé, les additifs de formulation et la forme pharmaceutique, les CD contribuent à la modulation de la libération du principe actif: une libération prolongée ou immédiate [121]. Les dérivés de CD forment trois catégories ayant des applications pharmaceutiques diverses: les CD hydrophiles; les CD hydrophobes et les CD ionisés [122]. Les premiers sont généralement utilisés pour l'amélioration de la solubilité, du taux de dissolution, de la mouillabilité ou de la stabilité de la molécule convive. Les dérivés de CD hydrophobes et les CD ionisables

sont plutôt avantageux dans les cas de la libération ralentie, la vectorisation et/ou le ciblage des molécules complexées ou même conjuguées [123, 124]. Par exemple, on a investi la voie du métabolisme de CD pour diriger la libération du principe actif au côlon [125].

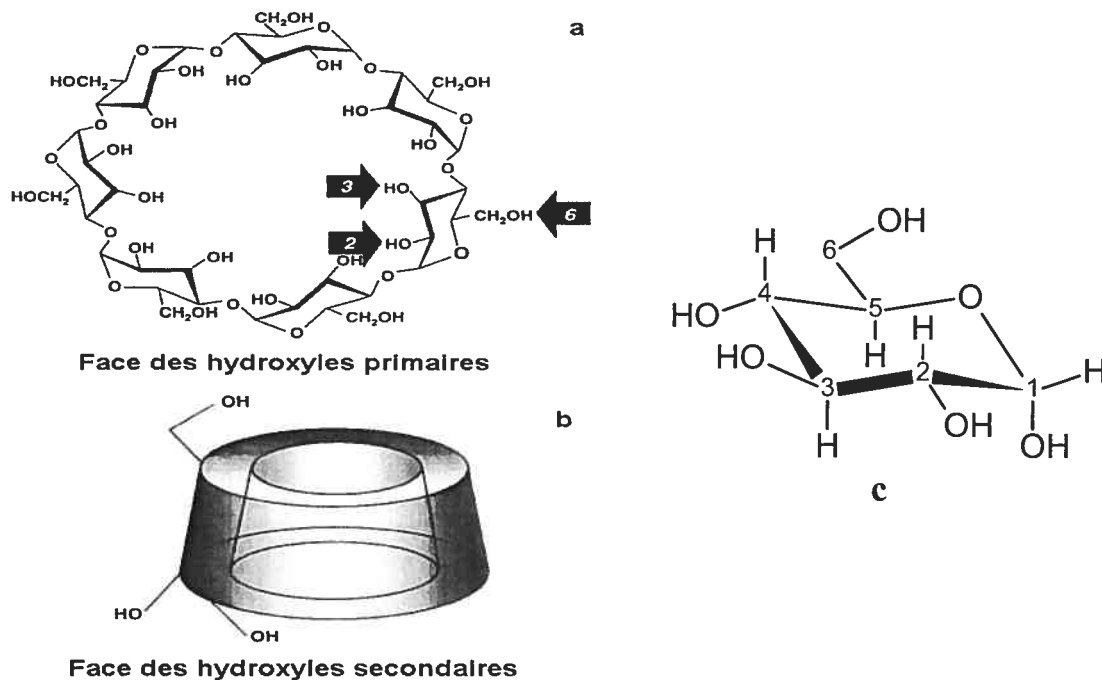


Figure 1-6.  $\beta$ -CD (a) Structure chimique ; (b) forme toroïdale [124] ; (c) unité de  $\alpha$ -D-glucopyranose.

### 1.5.2.1 Le 2-hydroxypropyl- $\beta$ -CD (l'HP- $\beta$ -CD)

La  $\beta$ -CD et la 2-hydroxypropyl- $\beta$ -CD (HP- $\beta$ -CD) sont deux CD hydrophiles qui solubilisent des principes actifs divers. L'HP- $\beta$ -CD, approuvée par FDA, est une des CD hydroxyalkylées. Elle est un agent solubilisant puissant [111]. Sa molécule a un degré de substitution<sup>1</sup> qui varie de 0,6 à 1. Son aspect amorphe, incité par la présence d'un mélange d'une centaine d'isomères de position dans son composé [126], lui accorde une solubilité aqueuse qui dépasse le 60% p/v. Elle est aussi soluble dans l'éthanol, le méthanol et le DMSO [127]. En hautes concentrations (respectivement 20 % et 12,5 %), l'HP- $\beta$ -CD ne touche ni à l'intégrité de la muqueuse nasale [128], ni à celle de la cornée des lapins [122]. Par voie dermique, étant une CD hydrophile, Elle est non irritant et incapable de pénétrer la peau [122].

<sup>1</sup> Le nombre moyen des groupes hydroxyles dérivés pour chaque unité de glucose.

### 1.5.3 Complexation avec les cyclodextrines

#### 1.5.3.1 Mécanismes de formation

Dans la formation d'un complexe d'inclusion, la force motrice dominante est la libération des molécules d'eau, riche en enthalpie, de la cavité hydrophobe de la CD. Ces molécules d'eau ont une enthalpie supérieure puisqu'elles ne peuvent pas s'organiser par des ponts hydrogène intermoléculaires, pareilles aux molécules d'eau du milieu. Elles sont facilement remplacées par une molécule invitée d'une polarité inférieure, ou plus souvent par la partie hydrophobe de la molécule [120]. De cette façon, une complexation est établie entre la molécule invitée du principe actif et la cavité de la CD. Les liaisons établies sont des liaisons non-covalentes (des interactions hydrophobes, des ponts hydrogène ou des interactions électrostatiques telles que les interactions dipôle-dipôle, les forces de van der Waals et le transfert des charges), ainsi elles sont réversibles [117]. La réversibilité confère au complexe, sous forme dissoute, un aspect dynamique où le principe actif et la CD s'associent et se dissocient continuellement. La réaction réversible est très rapide [113]. À l'équilibre, chacune des deux entités se trouve dans deux états : libre ou liée avec l'autre molécule. L'équilibre, Figure 1-7, est symbolisé par une constante d'équilibre appelée dans ce cas, « constante de stabilité apparente ( $K_{stb}$ ) ». Elle est obtenue à partir de l'équation suivante :

$$K_{stb} = K_f / K_r = [MCD] / ([M_L][CD_L]) \quad \text{Équation 1-3}$$

Où  $K_f$  et  $K_r$  sont respectivement les constantes de vitesse des réactions de l'avance et de l'inverse.



Figure 1-7. Schéma illustrant l'interaction du médicament libre  $M_L$  avec une cyclodextrine libre  $CD_L$  pour former un complexe  $MCD$ , ayant une constante de stabilité  $K_{stb}$ .

L'ampleur de la valeur de  $K_{stb}$  indique le degré d'affinité et d'interaction entre la molécule invitée et la CD. Elle dénote le potentiel d'avoir un complexe assez dynamique. Une valeur modeste de  $K_{stb}$  dénote un taux d'échange intermoléculaire rapide entre la molécule complexée et la CD [129]. Dans le cas de solubilisation d'un principe actif peu hydrosoluble, la  $K_{stb}$  donne un indice sur l'amélioration de sa solubilité aqueuse.

Outre, elle pourrait être réduite dans les cas de molécules ionisables. En effet, l'ionisation restreint l'affinité de la molécule invitée à la cavité de la CD [113]. Un effet prouvé par Piel *et coll.* [129, 130] qui ont démontré que le miconazole ionisé a été inclus dans la cavité de la  $\beta$ -CD de la même manière que le miconazole neutre, mais avec une affinité diminuée. Récemment, d'autres formes de complexation entre la CD et une molécule complexée ont été suggérées. Les CD libres et leurs complexes sont caractérisés par leur pouvoir de s'associer pour former à l'état solide des agrégats hydrosolubles ou, des micelles quand en solution [131]. Ces agrégations pourraient à leur tour enfermer des molécules supplémentaires de l'invité. Un deuxième type de complexes est alors formé par non-inclusion [132]. La solubilité de l'invité est augmentée davantage. Magnusdottir et Loftsson [131, 133] ont proposé ce mécanisme de complexation pour l'ibuprofène et le diflunisal avec l'HP- $\beta$ -CD. Par une démarche mathématique, ils ont prouvé que le concept de la formation d'un complexe par non-inclusion ne peut pas être négligé.

### 1.5.3.2 Mécanismes de libération

Généralement pour une constante de stabilité élevée ou basse, le principe actif complexé par une CD est facile à libérer. Sa libération peut être incitée par plusieurs mécanismes: sa dilution au site d'administration, son déplacement compétitif par d'autres molécules dans le milieu, son affinité aux protéines ou par la captation du principe actif dans les tissus. Quand le complexe de la CD est administré par voie orale ou parentérale, la libération des molécules complexées par la CD prend part via la dilution qui est le mécanisme prééminent, de même que par l'affinité du principe actif pour les protéines. Le déplacement compétitif pourrait se réaliser en présence des protéines du plasma, ainsi qu'en présence d'autres constituants de la forme pharmaceutique tel que des solvants organiques, des agents tensioactifs, des lipides, des sels de tampons ou des préservatives. Une remarque à noter, Stella *et coll.*[113] ont mentionné qu'au contraire de la plupart des solvants organiques, l'éthanol est inapte à déplacer les molécules incluses dans la cavité de la CD. Fromming et Szjetli [114] ont cité que celui-ci a tendance de le faire.

Pour les voies topiques (oculaire, nasale, buccale, rectale ou dermique), la dilution est minimale. Dans les cas des CD hydrophiles, la libération du principe actif est accélérée suite à la captation préférentielle de sa forme libre dans les tissus au site d'application, **Figure 1-8.** Ceci est dû à sa liposolubilité par rapport à l'hydrophilie externe de la CD libre et

le complexe d'inclusion [113]. En outre, les CD hydrophiles semblent améliorer la perméabilité du principe actif sans toucher à l'intégrité de la barrière biologique [113, 124, 134].

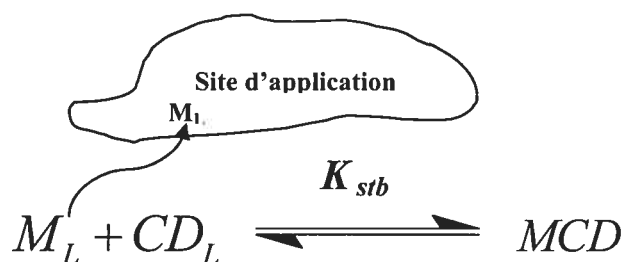


Figure 1-8. Schéma illustrant la libération du médicament libre  $M_L$  par captation préférentielle dans les tissus au site d'application, à partir de son complexe avec la cyclodextrine  $MCD$ .

### 1.5.3.3 Caractérisation

La complexation avec la CD modifie certaines propriétés physicochimiques de molécules invitées: le déplacement chimique des leurs protons ou carbones en RMN, leur activité optique si elles sont optiquement actives, la possibilité d'un déplacement de leur  $\lambda_{max}$  en UV, leur fluorescence peut être désactivée puisque la molécule fluorescente passe d'un milieu aqueux au milieu apolaire de la cavité de la CD.

Cette modification est investie dans la détermination de la  $K_{stb}$  du complexe formé et dans sa caractérisation. Nombreuse techniques sont utilisées pour estimer la  $K_{stb}$  : les diagrammes de solubilité de phase [135], la caractérisation des propriétés optiques, par la spectroscopie RMN [133] ou par la titrimétrie calorimétrique [123]. Le complexe formé est pareillement vérifié et caractérisé par plusieurs méthodes [118] : la spectroscopie RMN, l'analyse thermique tel que la DSC, la spectroscopie UV-visible, la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR) et d'autres méthodes comme la spectroscopie de fluorescence, le dichroïsme circulaire, l'analyse cristallographique : rayons-X et les méthodes d'analyses électrochimiques.

### 1.5.3.4 Préparation des complexes des cyclodextrines

Fernandes *et coll.* [136] ont montré que la méthode de préparation d'un complexe de la CD influence le degré d'interaction entre le même agent thérapeutique et la même CD et par conséquent, le degré de leur complexation. Ce phénomène a eu lieu dans le cas de la nicardipine, l'inhibiteur calcique, avec la  $\beta$ -CD ou l'HP- $\beta$ -CD [136] et dans le cas du glisentide, l'agent antidiabétique, avec l' $\alpha$ -CD, la  $\beta$ -CD et la  $\gamma$ -CD [137].



Pour qu'un complexe d'un composé se forme avec la CD, la méthode de préparation doit être sélectionnée selon certains critères : un bon rendement avec un coût faible, une simplicité et une vitesse optimale de procédure, ainsi qu'une bonne possibilité pour la production à l'échelle industrielle.

Les méthodes généralement utilisées pour la production des complexes de la CD sont décrites par Hedges [138]. Les complexes peuvent être préparés à partir des phases liquide, semi-solide ou solide. Pour la préparation en phase liquide, l'eau est souvent le solvant de choix, mais des co-solvants ou des solvants non aqueux peuvent aussi être utilisés. Plusieurs méthodes sont comprises dans ce genre de préparation. L'étape commune est d'ajouter une quantité excédentaire du principe actif à la solution de la CD; la suspension formée est équilibrée pour un certain temps avant d'y obtenir une solution claire du principe actif et son complexe via la filtration ou la centrifugation. Pour obtenir la forme solide du complexe, on a recours à l'évaporation, la co-précipitation, la pulvérisation sèche ou la lyophilisation. Pour les méthodes de préparation de boue et de pétrissage, elles sont des modes de préparation en phase semi-solide au cours desquelles l'eau ou les solvants sont utilisés en quantités insuffisantes pour dissoudre la CD et/ou la molécule à complexer. La méthode du broyage (en phase solide) est considérée quand aucun solvant n'est impliqué dans la préparation du complexe. Quelquefois, l'efficacité de la complexation est relativement faible. Pour l'améliorer, des quantités supplémentaires de la CD sont ajoutées, ou bien d'autres additifs sont incorporés pour former des systèmes ternaires. Les polymères hydrosolubles améliorent le processus de complexation. Ils augmentent la solubilité aqueuse des CD naturelles et stabilisent les complexes formés [139].

## **1.6 Elaboration du schéma de l'étude**

Après avoir mentionné les facteurs qui déterminent la libération d'un principe actif à partir d'une forme pharmaceutique, nous avons souligné l'importance de la matrice d'un TRG-M comme une matrice pharmaceutique à libération contrôlée. Également, nous avons insisté sur le rôle limitant de la faible solubilité aqueuse des principes actifs dans la maîtrise de la vitesse de libération, D'autre part, la solubilisation du principe actif par la CD aura pour effet de diminuer ce rôle. La prise en compte de ces facteurs va délimiter le cadre de cette étude.

### 1.6.1 Orientation de l'étude

A l'issue de ce premier chapitre bibliographique, il nous a paru que la thermoréversibilité et la mucoadhésion de la matrice du TRG-M contrôlent la libération d'un principe actif incorporé en temps comme en site. Par ailleurs, nous avons vu que cette libération contrôlée est dépendante de la composition de la matrice. Cette dernière s'avère être le principal facteur qui détermine la  $T_{gel}$  et les propriétés mécaniques pertinentes (la dureté, l'adhésion, la cohésion et la compressibilité) à la performance in vivo du TRG-M. De même, nous avons exposé la méthode de la TPA et ses capacités dans la caractérisation mécanique des gels pharmaceutiques, surtout sa capacité d'estimer plusieurs propriétés dans un seul test. En outre, au travers des nombreuses études réalisées sur les TRG-M, il ressort qu'on n'a jamais essayé d'appliquer la TPA dans la sélection de la formulation la plus apte à maîtriser la libération. Deux questions sont posées : Que sont les effets et les interactions que les composants d'un TRG-M exercent sur ses propriétés ? Est-ce que la TPA pourrait être une technique de choix pour le criblage des TRG-M ?

D'autre part, un principe actif dans sa forme insoluble dans l'eau, tel que la base de la CHX, pourrait ralentir la libération à partir de la forme pharmaceutique. En revanche, une telle insolubilité prédomine le rôle gouvernant la vitesse de la libération, face à la composition de la matrice pharmaceutique. Une complexation avec une CD hydrophile bornerait ce rôle. Pourtant, la méthode de préparation du complexe pourrait influencer le degré d'interaction entre les deux molécules. Par la suite, l'effet solubilisant de la CD est touché. Les questions sont donc : quelle est la CD qui améliorerait la solubilité aqueuse de la CHX ? Que serait la méthode optimale pour préparer un complexe de la CHX avec la CD ?

### 1.6.2 Description des projets

En répondant à ces questions, nous allons contribuer à la mise au point d'un système TRG-M à libération contrôlée pour un principe actif modèle. Notre contribution est alors répartie en deux axes différents. Le premier axe traitera la conception de la forme pharmaceutique du TRG-M. L'autre approchera la faible solubilité du principe actif en prenant comme modèle la CHX.

Dans le deuxième chapitre, le premier axe sera approché. Notre conception des TRG-M prendra comme base polymérique des polymères sûrs, principalement le poloxamère 407.

Nous allons combiner avec ses solutions aqueuses d'autres polymères, en concentrations différentes, afin de moduler sa  $T_{gel}$  pour être autour de 34 °C. Ensuite, nous caractériserons les formulations les plus aptes à former des TRG-M à la température corporelle au moyen de la TPA. L'identification adéquate de l'impact que chaque composant du système joue sur les propriétés mécaniques sera estimée par les méthodes statistiques concrètes et fiables. À ce propos, nous avons sélectionné l'analyse factorielle et les réseaux de neurones artificiels. Les résultats obtenus, en association avec des études bibliographiques précédentes, nous serviront à valider l'application de la TPA dans le criblage des TRG-M.

Dans le troisième chapitre, la deuxième approche sera étudiée. Nous nous servirons de deux CD conventionnelles et approuvées par FDA, pour complexer la CHX : la  $\beta$ -CD et l'HP- $\beta$ -CD. Nous essayerons de déterminer la CD la plus efficace quant à la solubilisation. Le complexe entre la CHX et la CD sera préparé par des méthodes de fabrication variées, soit en phase liquide, soit en phase semi-solide. La méthode optimale de préparation du complexe hydrosoluble sera enquêtée en employant les techniques de caractérisation appropriées.

Dans le quatrième chapitre, nous conclurons quant à l'ensemble des résultats obtenus au cours de ce travail. Nous envisagerons les améliorations possibles des systèmes développés, ainsi que les applications potentielles de ces deux approches.

## **1.7 Objectifs**

### **1.7.1 Objectifs généraux**

L'objectif général de ce travail de mémoire était de contribuer à la mise au point d'un système d'hydrogel physique thermoréversible mucoadhésif destiné à une libération contrôlée pour l'agent topique : la base de la chlorhexidine. Cette forme pharmaceutique doit être sûre, biocompatible et performante quand appliquée in vivo.

### **1.7.2 Objectifs spécifiques**

Afin de développer une formulation d'hydrogel physique thermoréversible mucoadhésif regroupant ces propriétés, cette recherche a portée sur différents axes associés à la préformulation de ce système in vitro. Les objectifs spécifiques relatifs à la conception de tel système étaient de :

- a. Préparer des systèmes biocompatibles d'hydrogels physiques thermoréversibles mucoadhésifs ayant une température de transition sol-gel autour de 34°C à partir des polymères sûrs.
- b. Caractériser et cribler les systèmes obtenus, au moyen de la technique de l'analyse du profil de texture, en basant sur l'évaluation de leurs propriétés mécaniques pertinentes à la libération contrôlée.
- c. Valider la technique du profilage textural comme une technique de criblage pour les hydrogels physiques thermoréversibles mucoadhésifs.
- d. Analyser adéquatement les effets et les interactions provoqués par les composants polymériques d'hydrogels étudiés.
- e. Evaluer la capacité de cyclodextrines hydrophiles à solubiliser la chlorhexidine.
- f. Enquêter le procédé de fabrication du complexe de la chlorhexidine avec la cyclodextrine, optimal à inciter l'interaction la plus forte entre les deux entités.

## **Chapitre II.**

### **2 Criblage des systèmes d'hydrogels physiques thermoréversibles et mucoadhésifs.**

---

La composition de la matrice de la forme pharmaceutique est parmi les facteurs qui contribuent à lui acquérir l'aspect de la libération contrôlée. A l'occasion de ce chapitre nous aborderons, la caractérisation mécanique d'une des formes pharmaceutiques matricielles à libération contrôlée topique : l'hydrogel physique thermoréversible mucoadhésif (TRG-M). La caractérisation trace l'influence de la variation dans la composition polymérique de cette matrice, en termes de concentration, sur ses propriétés mécaniques pertinentes à la maîtrise de la libération : la dureté, l'adhésion, la cohésion et la compressibilité. Elle est effectuée par l'application de la technique d'analyse du profil de texture (TPA) : une technique de pénétrométrie qui mesure à la fois ces quatre propriétés mécaniques.

Les objectifs sont de cribler des formulations TRG-M se basant sur l'évaluation de leurs propriétés mécaniques afin de distinguer les formulations les plus efficaces à remplir la fonction d'une forme pharmaceutique à libération contrôlée, de vérifier la technique de TPA comme une technique de criblage et d'identifier adéquatement les rôles et les interactions qui se déroulent au sein de ce type de système et qui sont exercés par ses différents composants sur ses propriétés mécaniques.

La réalisation de ces objectifs s'articule principalement autour de trois parties. Une première partie est consacrée à la sélection des intervalles de concentrations des différents polymères qui, en combinaison, sont plus adaptés à former un TRG-M in-situ autour de la température des sites muqueux du corps. La seconde partie traitera l'utilisation de la TPA pour estimer quantitativement les propriétés mécaniques des systèmes sélectionnés afin de les cribler. La troisième partie est concernée par l'approche statistique, l'analyse factorielle et les réseaux de neurones artificiels, visée à la fois, à adéquatement identifier les rôles des composants du système et à vérifier l'application de la TPA comme une technique de criblage des formulations TRG-M. Une comparaison avec ce qui est déjà affirmé dans la littérature est employée. A ce titre, les matériaux, le protocole expérimental de la sélection

et de la caractérisation des systèmes TRG-M y sont détaillés. Enfin, les résultats obtenus y sont exposés et discutés.

## **2.1 Matériaux**

Le Poloxamère 407 (PF127) et le Poloxamère188 (PF68) de grade pharmaceutique (respectivement Lutrol<sup>®</sup> F 127 et Lutrol<sup>®</sup> F 68) ont été fournis par BASF, Canada. Les polymères mucoadhésifs : Le carbopol 934P (CP934P) et le polycarbophil (PC) (Noveon<sup>®</sup> AA-1) ont été offerts par Noveon Inc., Cleveland, Ohio. La triéthanolamine (TEA) est fournie par Sigma Aldrich Chemical Co. (St. Louis, Mo, USA). L'eau ultrapure est préparée à l'aide du système Milli Q water system (Millipore corporation, Bedford, MA, USA) où l'eau est doublement déionisée à travers deux cartouches filtrantes pour échange ionique (Carbon cartridge et Organax Q<sup>™</sup> cartridge) avant de passer par le filtre bactérien (Millipak<sup>™</sup>).

## **2.2 Méthodologie**

### **2.2.1 Préparation des « hydrogels physiques thermogélifiants (TRG) mucoadhésifs »**

La formulation du TRG-M est préparée en triplicata en suivant la méthode d'incorporation froide de Schmolka [55]. Selon la concentration désirée, le poloxamère est dispersé lentement à la surface de la quantité déterminée d'eau ultrapure froide, tout en agitant doucement le mélange à l'aide d'un agitateur magnétique. L'agitation est maintenue pendant au minimum 4 heures à 4 °C. La préparation est ensuite conservée à 4 °C. Après la dissolution complète des poloxamères (environ 24 heures), les polymères mucoadhésifs, CP934P ou PC sont ajoutés quand désiré et laissés le temps nécessaire pour gonfler. Après 24 heures, les solutions sont neutralisées par la TEA, pour atteindre une valeur du pH entre 6,8 et 7,2 mesurée à l'aide d'un pH mètre (Hanna Instruments, Laval, Qc, Canada).

### **2.2.2 Caractérisation des hydrogels**

#### **2.2.2.1 Détermination de la température de transition de phase sol-gel ( $T_{gel}$ )**

Pour la détermination de la  $T_{gel}$ , on a planifié cinq groupes des solutions aqueuses : A, B, C, D et E (Tableau 2-1). Les groupes contenaient différentes concentrations des polymères thermoréversibles (PF127 ou PF127/PF68), en l'absence ou la présence d'un des polymères

mucoadhésifs (CP934P ou PC). Des précautions ont été prises pour que les formulations soient fraîchement préparées et manipulées de la même manière.

Tableau 2-1. Plan expérimental employé dans la détermination de la température de transition sol-gel ( $T_{gel}$ ), illustrant les groupes de solutions aqueuses examinées.

Groupes de solutions aqueuses	Concentration en % p/p			
	Polymères Thermoréversibles		Polymères Mucoadhésifs	
	PF127	PF68	CP934P	PC
Groupe A	9	—	—	—
	12	—	—	—
	14	—	—	—
	15	—	—	—
	16	—	—	—
	18	—	—	—
	20	—	—	—
Groupe B	16	—	0,1	—
		—	0,2	—
		—	0,3	—
		—	—	0,1
		—	—	0,2
Groupe C	9	20	—	—
		25	—	—
	12	10	—	—
		15	—	—
		20	—	—
		25	—	—
	15	3	—	—
		5	—	—
		8	—	—
		10	—	—
		15	—	—
		20	—	—
		25	—	—
	20	10	—	—
		12	—	—
15		—	—	
20		—	—	
25		—	—	

Groupes de solutions aqueuses	Concentration en % p/p			
	Polymères Thermoréversibles		Polymères Mucoadhésifs	
	PF127	PF68	CP934P	PC
Groupe D	9	20	0,1	—
			0,2	—
			0,3	—
	12	20	0,1	—
			0,2	—
			0,3	—
		25	0,1	—
			0,2	—
			0,3	—
	15	10	0,1	—
			0,2	—
			0,3	—
		15	0,1	—
			0,2	—
			0,3	—
20		0,1	—	
		0,2	—	
		0,3	—	
20	10	0,1	—	
		0,2	—	
		0,3	—	
Groupe E	9	20	—	0,1
			—	0,2
			—	0,3
	12	20	—	0,1
			—	0,2
			—	0,3
		25	—	0,1
			—	0,2
			—	0,3
	15	10	—	0,1
			—	0,2
			—	0,3
		15	—	0,1
			—	0,2
			—	0,3
		20	—	0,1
			—	0,2
			—	0,3
25	—	0,1		
	—	0,2		
	—	0,3		
20	10	—	0,1	
		—	0,2	
		—	0,3	

Pour chacune de ces 80 formulations, la  $T_{gel}$  est déterminée en triplicata par la méthode de l'éprouvette renversée [12] dont la procédure est comme suit. La solution aqueuse de polymères est versée, jusqu'à 3 cm de hauteur, dans un flacon à scintillation que l'on ferme hermétiquement. Le flacon est placé dans un bain-marie ayant une température de 5 °C. La température du bain-marie est augmentée à un taux de 1 °C / 5 minutes dans une plage de températures de 5 à 50 °C. La  $T_{gel}$  est détectée visuellement. Une absence d'écoulement, par inclinaison du flacon de 90°, dénote la présence d'une transition de phase de l'état liquide (sol) à l'état d'un hydrogel physique (gel).

#### **2.2.2.2 Évaluation des propriétés mécaniques des TRG-M par la technique de l'analyse du profil de texture (TPA)**

Un nouveau plan expérimental de formulations aqueuses des polymères thermoréversibles et mucoadhésifs (Tableau 2-2) a été accompli. Pour estimer les propriétés mécaniques, chaque formulation a été versée jusqu'à 3 cm de hauteur dans un flacon à scintillation et maintenue à 34 °C ± 0,5 pendant 30 minutes afin d'assurer la formation de la phase du gel. Elle a été ensuite inspectée pour assurer que la surface exposée a été aplatie et que l'hydrogel formé était caractérisé par l'absence de bulles d'air. Lorsque le flacon contenant l'hydrogel a été bien sécurisé en place et stabilisé à une température de 34 °C, une analyse du profil de texture (TPA) était faite en utilisant l'analyseur de texture TA-XT2i (Texture Technologies Corp. NY). Cet appareil possède une cellule de charge de 5 kg, une précision de mesure de force de 0,0025 % et une distance de résolution de 0,0025 mm. Sa sonde cylindrique en polyacrylate, de 10,0 mm de diamètre, a été appuyée deux fois sur chaque hydrogel jusqu'à ce qu'elle pénétrait à une profondeur de 5,0 mm. La vitesse de la sonde était maintenue à un taux défini pour tous les essais. On appliquait une vitesse pré-test de 5,0 mm/s, une vitesse de test et post-test de 1,0 mm/s avec une période de repos de 15 s entre les 2 cycles de pénétration et un taux d'acquisition de 200 points/s. Chaque cycle comprenait 2 phases : une compression suivie par une décompression. La résistance de l'hydrogel à la pénétration, puis, celle au retrait de la sonde, ont été mesurées pour chaque cycle. Les données des forces ont été ensuite traitées au moyen de « Texture Profile Analysis (TPA) » une option disponible dans le logiciel « Texture Expert ». La courbe résultante donnait la force en fonction du déplacement en temps.

À partir des courbes obtenues par TPA (Figure 2-1), les quatre paramètres mécaniques suivants ont été extraits et quantifiés pour chaque TRG :-



1. Dureté : Hauteur du pic positif du premier cycle de compression.
2. Adhésion : Aire du pic négatif ( $A_3$ ) pour le premier cycle de compression.
3. Cohésion : Rapport entre l'aire positive durant le deuxième cycle de compression à celle durant le premier cycle de compression ( $A_2/A_1$ ).
4. Compressibilité : Aire du pic positif ( $A_1$ ) pour le premier cycle de compression.

**Tableau 2-2. Plan expérimental employé dans la caractérisation des propriétés mécaniques par la TPA et illustrant la composition des formulations aqueuses des hydrogels thermoréversibles mucoadhésifs.**

Concentration en % p/p		Formulation	Concentration en % p/p	
PF127	PF68		CP934P	PC
9	20	A	—	—
		B	—	0,1
		C	0,1	—
9	25	D	—	—
		E	—	0,1
		F	0,1	—
15	10	G	—	—
		H	—	0,1
		I	0,1	—
15	15	J	—	—
		K	—	0,1
		L	0,1	—
15	20	M	—	—
		N	—	0,1
		O	0,1	—
15	25	P	—	—
		Q	—	0,1
		R	0,1	—
18	10	S	—	—
		T	—	0,1
		U	0,1	—
18	15	V	—	—
		W	—	0,1
		X	0,1	—
21	10	Y	—	—
		Z	—	0,1
		AA	0,1	—
21	15	AB	—	—
		AC	—	0,1
		AD	0,1	—

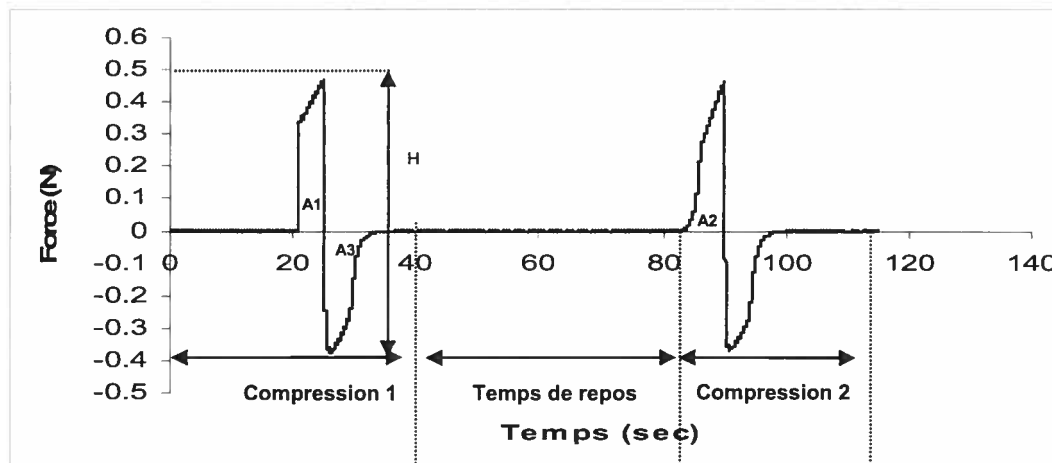


Figure 2-1. Courbe résultante de l'analyse de texture à l'aide de la TPA ; la force est tracée en fonction du temps.

### 2.2.2.3 Approche statistique

Deux méthodes d'analyse statistiques non-paramétriques sont exploitées pour évaluer les paramètres mécaniques des hydrogels : l'analyse factorielle et les réseaux de neurone artificiels (RNA). Les variables indépendantes (également référées à par : « variables d'entrée » ou « facteurs causaux ») étaient les concentrations de chacun des polymères impliqués : Le PF127, le PF68, le CP934P et le PC. Les variables dépendantes, « variables de sortie » ou « variables de réponse », étaient les quatre paramètres mécaniques : La dureté, l'adhésion, la cohésion et la compressibilité. Le logiciel « Design-Expert 6.0.11 Trial Version » (Statease.com) a été utilisé pour effectuer l'analyse statistique factorielle. Afin d'évaluer les corrélations entre les facteurs causaux et les variables de réponse par l'analyse factorielle, les données ont été réparties sur quatre plans factoriels (4 séries), et deux méthodes d'analyse factorielle ont été employées. Le design des séries a été planifié selon deux paramètres : la concentration du PF68 (10/15 ou 20/25 % p/p) et le type du polymère mucoadhésif (CP934P ou PC) dans la formulation liquide. Selon les niveaux de concentrations de PF68, les plans factoriels étaient :

1. Plan factoriel entier de  $2^3$  (3 facteurs à 2 niveaux), pour les niveaux du PF68 de 20 et 25 % p/p.  $2^3$  essais en triplicata ont été requis pour deux séries : 1 et 2 :  $2^3 \times 3 = 24$  expériences pour chaque série. Les facteurs et leurs niveaux sont indiqués au Tableau 2-3 dans la forme codée. Les codes sont interprétés en unités physiques au Tableau 2-4.

2. Plan factoriel entier de  $3 \times 2 \times 2$  (en triplicata : 36 expériences pour chacune des séries 3 et 4), pour les niveaux du PF68 de 10 et 15 % p/p. Les facteurs et leurs niveaux sont indiqués au Tableau 2-5 dans la forme codée. La transformation des codes en unités physiques se trouve au Tableau 2-6. La méthode des surfaces de réponse (MSR : Response Surface Method) a été utilisée et le critère d'optimisation sélectionné était la méthode D-Optimale.

Comme noté, chacun de ces deux plans factoriels a été répété selon le type du polymère mucoadhésif, pour finir par former deux séries. Séries 1 et 3 sont alloués pour les formulations qui contenaient le CP934P. Séries 2 et 4 sont consacrées au PC.

Pour chacun des plans factoriels, un modèle statistique, sous la forme d'une équation polynomiale linéaire ou quadratique, a été généré pour évaluer les variables de réponse :

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{12} X_1 X_2 + \dots + \beta_{123} X_1 X_2 X_3 \quad \text{Équation 2-1}$$

Où Y est la variable de réponse,  $X_1$ ,  $X_2$  et  $X_3$  sont les variables indépendantes (Tableau 2-4 et Tableau 2-6),  $\beta_0$  est l'intercept,  $\beta_i$  ( $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$ ),  $\beta_{ij}$  ( $\beta_{12}$ ,  $\beta_{13}$ ,  $\beta_{21}$  et  $\beta_{23}$ ) et  $\beta_{ijk}$  ( $\beta_{123}$ ) représentent les coefficients estimés de l'équation de régression multiple obtenue. L'analyse de variance (ANOVA) sert à examiner l'absence d'une différence de traitement statistique, en se basant sur des hypothèses fondamentales. Les hypothèses fondamentales suggèrent que le modèle statistique généré par l'analyse factorielle décrit adéquatement les observations, et que les erreurs (les résiduels : différence entre les valeurs actuelles de la variable de réponse et les valeurs prédites à partir de l'équation de régression) sont indépendants, distribués normalement et ont un moyen de zéro et une variance inconnue mais constante. De ce fait, le respect des hypothèses et l'adéquation du modèle sont enquêtés en examinant des résiduels. Ils sont examinés par leur analyse graphique (graphique à échelle fonctionnelle normale des résiduels, graphique des résiduels versus les valeurs ajustées «prédites»). Une fois l'adéquation du modèle est montrée, la validité du modèle est évaluée par ANOVA. Les rapports F, les coefficients de corrélation et la précision adéquate (une mesure de contraste d'une valeur prédite par rapport à son résiduel) sont les critères de validation. Une  $p < 0,05$  est acceptée et dénote signification.

Tableau 2-3. Plans factoriels : Série 1 et 2, de formulations utilisées dans l'analyse factorielle 2<sup>3</sup>. Les niveaux sont exprimés dans la forme codée.

Serie 1				Série 2			
Numéro d'essai	PF127	PF68	CP934P	Numéro d'essai	PF127	PF68	PC
1	-1	-1	1	25	-1	-1	1
2	-1	-1	-1	26	-1	-1	-1
3	1	-1	-1	27	1	-1	-1
4	1	1	1	28	1	1	1
5	-1	-1	-1	29	-1	-1	-1
6	-1	1	-1	30	-1	1	-1
7	1	1	1	31	1	1	1
8	1	-1	-1	32	1	-1	-1
9	1	1	-1	33	1	1	-1
10	-1	1	1	34	-1	1	1
11	1	1	-1	35	1	1	-1
12	-1	-1	-1	36	-1	-1	-1
13	1	1	1	37	1	1	1
14	1	-1	1	38	1	-1	1
15	1	1	-1	39	1	1	-1
16	1	-1	1	40	1	-1	1
17	1	-1	1	41	1	-1	1
18	-1	1	-1	42	-1	1	-1
19	-1	1	-1	43	-1	1	-1
20	-1	-1	1	44	-1	-1	1
21	1	-1	-1	45	1	-1	-1
22	-1	-1	1	46	-1	-1	1
23	-1	1	1	47	-1	1	1
24	-1	1	1	48	-1	1	1

Tableau 2-4. Niveaux des facteurs causaux interprétés dans la forme physique.

Variable Codée	Variable Indépendante	Niveau du facteur dans la forme codée	
		-1	1
X <sub>1</sub>	PF127**	9,0	15,0
X <sub>2</sub>	PF68**	20,0	25,0
X <sub>3</sub> *	CP934P**	0,0	0,1
X <sub>3</sub> *	PC**	0,0	0,1

(\*): Dénote le CP934P pour la série 1 ou le PC pour la série 2.

(\*\*): Concentration en % (p/p). Chaque hydrogel est examiné en triplicata.

Tableau 2-5. Plans factoriels : Séries 3 et 4, de formulations utilisées dans l'analyse factorielle 3×2×2. Les niveaux sont exprimés dans la forme codée.

Série 3				Série 4			
Numéro d'essai	PF127	PF68	CP934P	Numéro d'essai	PF127	PF68	PC
49	-1	-1	-1	85	1	1	1
50	0	-1	-1	86	-1	1	-1
51	1	-1	-1	87	0	-1	1
52	-1	1	-1	88	-1	-1	1
53	0	1	-1	89	0	-1	-1
54	1	1	-1	90	0	1	-1
55	-1	-1	1	91	1	-1	1
56	0	-1	1	92	-1	-1	-1
57	1	-1	1	93	1	-1	-1
58	-1	1	1	94	1	1	-1
59	0	1	1	95	-1	1	1
60	1	1	1	96	0	1	1
61	-1	-1	1	97	1	1	1
62	-1	-1	1	98	1	1	1
63	0	1	-1	99	-1	1	-1
64	0	1	-1	100	-1	1	-1
65	0	1	1	101	0	-1	1
66	0	1	1	102	0	-1	1
67	0	-1	1	103	-1	-1	1
68	0	-1	1	104	-1	-1	1
69	-1	-1	-1	105	0	-1	-1
70	-1	-1	-1	106	0	-1	-1
71	1	-1	1	107	0	1	-1
72	1	-1	1	108	0	1	-1
73	1	-1	-1	109	1	-1	1
74	1	-1	-1	110	1	-1	1
75	0	-1	-1	111	-1	-1	-1
76	1	1	-1	112	-1	-1	-1
77	0	-1	-1	113	1	-1	-1
78	1	1	-1	114	1	-1	-1
79	-1	1	-1	115	1	1	-1
80	-1	1	-1	116	1	1	-1
81	1	1	1	117	-1	1	1
82	1	1	1	118	-1	1	1
83	-1	1	1	119	0	1	1
84	-1	1	1	120	0	1	1

Tableau 2-6. Niveaux des facteurs causaux interprétés dans la forme physique.

Variable Codée	Variable Indépendante	Niveau du facteur dans la forme codée		
		-1	0	1
X <sub>1</sub>	PF127**	15,0	18,0	21,0
X <sub>2</sub>	PF68**	10,0	—	15,0
X <sub>3</sub> *	CP934P**	0,0	—	0,1
X <sub>3</sub> *	PC**	0,0	—	0,1

(\*): Dénote le CP934P pour la série 3 ou le PC pour la série 4.

(\*\*): Concentration en % (p/p). Chaque hydrogel est examiné en triplicata.

La deuxième approche statistique était les RNA. Ils utilisaient l'algorithme de prédiction « TurboProp2 », exploité dans le logiciel « NeuroShell predictor » (Ward Systems Group Inc., Frederick, MD, USA). La structure intérieure des RNA non-récurrents employés et la répartition des facteurs causaux et des variables de réponse entre leurs différentes couches, sont illustrées sur la Figure 2-2. Le paramètre d'arrêt du processus d'apprentissage supervisé était la valeur minimale de MSE (Somme des carrés des écarts à la moyenne), pour chacun des 4 variables de réponse. Le nombre total de neurones cachés était de 24. L'importance relative de chaque polymère dans chacun des paramètres mécaniques a été estimée.

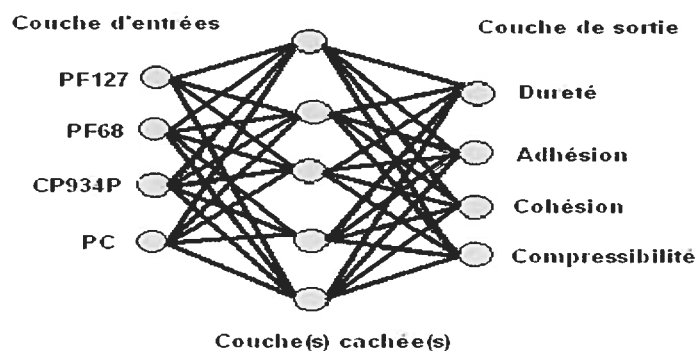


Figure 2-2. Schéma de la structure de RNA employée dans l'évaluation des propriétés mécaniques des hydrogels thermoréversibles.

### 2.3 Résultats et discussion

Tout d'abord, quelques points sont à noter. Les polymères sûrs et biocompatibles mis en profit pour composer la matrice aqueuse du TRG-M sont le poloxamère 407 (PF127), le poloxamère 188 (PF68), le carbopol 934P (CP934P) et/ou le polycarbophil (PC). La solution du PF127, connu par son innocuité, a été choisie comme la base de la formation du TRG-M. Toutes ses solutions aqueuses ont contenu des concentrations qui dépassaient sa CMC, afin d'assurer qu'une transition sol-gel en fonction de température serait provoquée. Le PF127, qui forme un TRG à la température ambiante, était combiné avec le PF68, le CP934P et/ou le PC, aussi bien pour moduler la température de transition sol-gel ( $T_{gel}$ ) de son TRG et la situer autour de 34°C, que pour lui acquérir une propriété mucoadhésive. Un avantage additionnel se présente dans le fait que quelques unes de ces combinaisons ont été préalablement examinées in vitro ou in vivo comme des matrices pharmaceutiques[14, 16, 20]. Enfin, toutes les formulations liquides préparées au cours de cette étude ont été

neutralisées afin de s'adapter aux conditions biologiques où l'application sur les muqueuses exige que les formes pharmaceutiques soient non irritantes.

### 2.3.1 Détermination de la $T_{gel}$

Pour déterminer la  $T_{gel}$ , on a eu recours à la méthode d'« écoulement renversé ». Elle est une méthode visuelle, simple et reproductible, qui dépend de l'aspect viscoélastique du gel dans l'estimation de la  $T_{gel}$ . La répartition des formulations liquides sur cinq groupes (A, B, C, D, et E) dépendant de leur composition, nous a facilité l'obtention d'une première idée sur l'effet par lequel chaque composant de la formulation influence la  $T_{gel}$  finale.

#### 2.3.1.1 Les solutions aqueuses de PF127

Pour le groupe « A », les concentrations examinées commençaient à partir de 9 % p/p de PF127. Ces solutions n'ont subi aucune transition de phase sol-gel que dès la concentration de 15%. Comme le montre la Figure 2-3, pour des concentrations de 15 à 25 % p/p, la  $T_{gel}$  a proportionnellement diminué en fonction de la concentration de PF127 dans une relation linéaire.

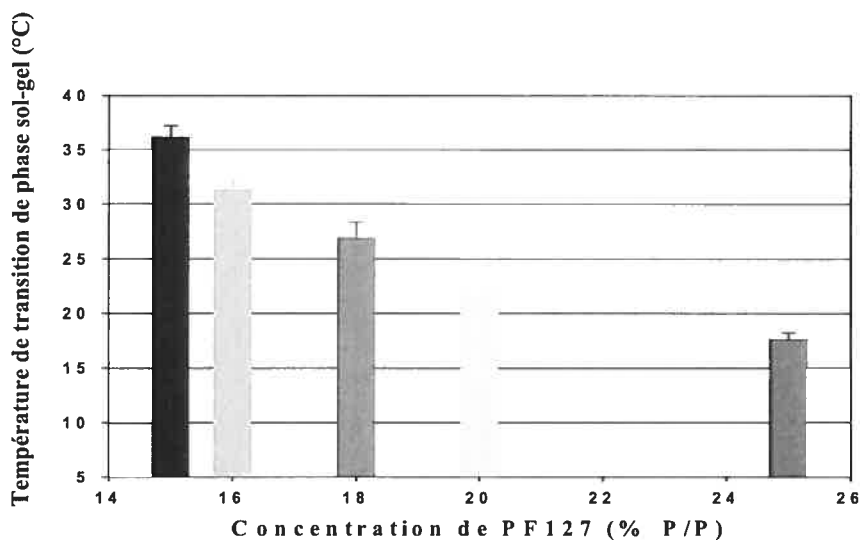


Figure 2-3. Température de transition de phase sol-gel ( $T_{gel}$ ) des solutions aqueuses de PF127 en fonction de la concentration (moyenne de 3 observations).

Le coefficient de détermination ( $R^2$ ) était 0,9794 pour les concentrations de 15 jusqu'à 20 % p/p, alors qu'il avait baissé jusqu'à 0,9098 en incluant la concentration de 25 %. Cette réduction dans l'association linéaire entre la concentration et la  $T_{gel}$  pourrait être anticipée du mécanisme de transition de phase sol-gel du PF127. Cette transition dépend principalement sur le fait qu'une fois, la fraction du volume des micelles ( $\Phi_m$ ) dans le

milieu dépasse 0,53, une phase de gel est formée brusquement. Ceci pourrait arriver facilement avec la concentration de 25% de PF127.

Bien que seulement les solutions de 15 et de 16% de concentration soient gélifiées autour de 34 °C (respectivement  $36,15 \pm 1,06$  et  $33,39 \pm 1,02$ °C), les deux sont rapidement retournées à la phase sol (transition gel-sol) en augmentant davantage la température. Ainsi, l'instabilité des gels formés par ces deux concentrations nous a conduits à les éliminer de nos futures expériences.

### 2.3.1.2 Effet du polymère mucoadhésif sur les solutions aqueuses de PF127

Les formulations aqueuses du groupe « B » ont montré une diminution de la  $T_{gel}$ , (Figure 2-4). La  $T_{gel}$  a diminué en fonction de la concentration du polymère mucoadhésif et selon son type. On a discerné une grande différence d'abaissement de  $T_{gel}$  entre les deux mucoadhésifs à la concentration de 0,3 % (respectivement, 26 et 9,7 °C pour le CP934P et le PC). Pourtant, tous les hydrogels physiques formés étaient notés plus résistants à une transition gel-sol face à l'élévation de la température jusqu'à 50 °C.

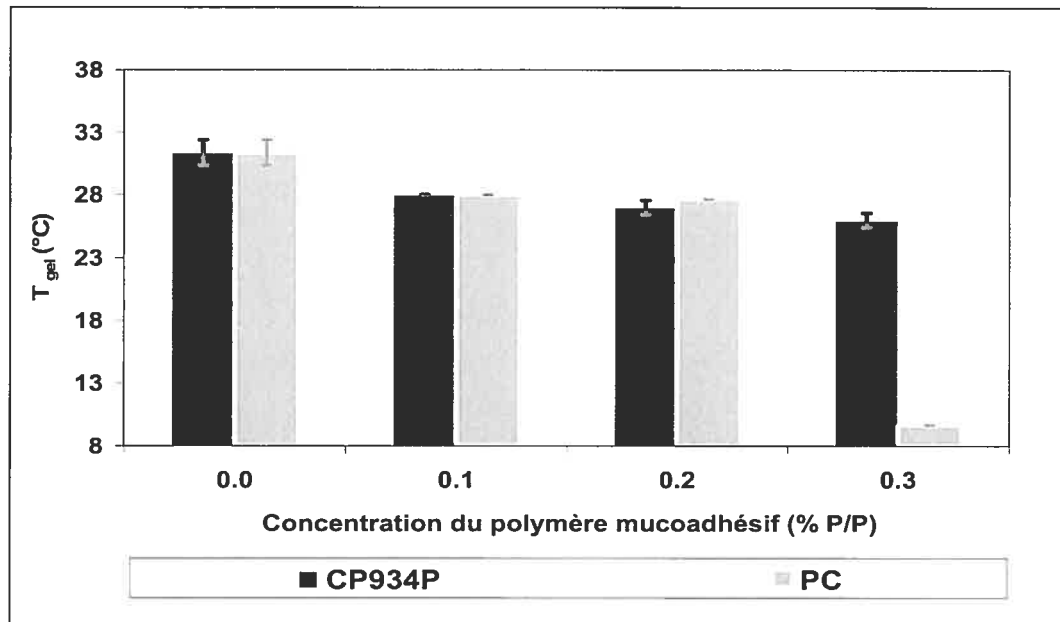


Figure 2-4. Effet de la concentration du polymère mucoadhésif sur la température de transition sol-gel de la solution aqueuse de PF127 16%.

### 2.3.1.3 Effet du PF68 sur les solutions aqueuses de PF127

Un premier coup d'œil sur les  $T_{gel}$  obtenues (Tableau 2-7), pour les formulations aqueuses du groupe « C » montre que l'incorporation de PF68 a modulé les  $T_{gel}$  du système des



solutions de PF127. La modulation a varié selon la concentration initiale de ce dernier. Pour les mêmes concentrations de 9 et 12 % de PF127, l'addition de PF68 a fait naître une transition sol-gel, déjà absente pour le PF127 seul; la  $T_{gel}$  a ensuite diminué en croissant la concentration de PF68. Quant aux concentrations de 15 et 20 % du PF127, la  $T_{gel}$  initiale a été augmentée par l'addition des concentrations basses de PF68, avant de diminuer par des concentrations plus élevées de ce dernier.

**Tableau 2-7. Effet de l'augmentation de la concentration de PF68 sur la température de transition sol-gel ( $T_{gel}$ ) de la solution aqueuse de PF127.**

Concentration de PF127 (g%)	Concentration de PF68 (g%)	$T_{gel}^*$ (°C)
9	0	— <sup>a</sup>
	20	49,00 ± 0,00
	25	40,33 ± 0,58
12	0	— <sup>a</sup>
	10	51,00 ± 0,00
	15	46,00 ± 0,00
	20	40,33 ± 0,58
	25	35,00 ± 0,00
15	0	36,15 ± 1,06
	3	47,67 ± 0,58
	5	47,67 ± 0,58
	8	45,67 ± 0,58
	10	41,67 ± 0,58
	15	37,33 ± 0,52
	20	37,67 ± 1,97
	25	32,67 ± 1,03
20	0	22,00 ± 0,00
	10	31,00 ± 0,00
	12	31,00 ± 0,00
	15	28,67 ± 0,00
	20	25,33 ± 0,58
	25	19,00 ± 0,58

\* Dénote la valeur moyenne de la température de transition sol-gel ( $T_{gel}$ ) ± écart type (n=3).

a : Absence de transition sol-gel dans l'intervalle de températures étudiées.

L'augmentation de la  $T_{gel}$  pourrait provenir de l'effet de PF68 sur les interactions hydrophobes de segments de PPO du PF127 et, par la suite, sur sa thermogélification [5, 60]. Le PF68, diffère du PF127 dans la proportion de PEO par rapport au PPO ; respectivement (5,64 :1) et (3,61 :1) pour le PF68 et le PF127 (Figure 1-4). Selon le fabricant, ils diffèrent de même dans leurs valeurs de HLB : respectivement 29 et 22, pour le PF68 et le PF127. De cette façon, le PF68 se voit une molécule hydrophile par rapport au PF127; il augmenterait l'hydrophilicité dans le milieu. Une hydrophilicité accrue retarderait

l'initiation des interactions hydrophobes des micelles du PF127 et par la suite, retarderait leur agrégation et la transition de phase sol-gel en fonction de la température [140]. La diminution subséquente de  $T_{gel}$  par les hautes concentrations de PF68 peut provenir d'une formation accrue des micelles de deux poloxamères où le rythme des interactions hydrophobes et la  $\Phi_m$  s'y élèvent; et la transition sol-gel arrive à une  $T_{gel}$  plus basse. Ceci est faisable puisqu'on a observé que le PF68 en soi était capable de former un réseau fort interconnecté de micelles et subséquemment un gel thermosensible, à haute concentration qui atteignait 35 % [72].

#### 2.3.1.4 Effet du polymère mucoadhésif sur les solutions aqueuses de PF127/PF68

Similairement au groupe « B », les  $T_{gel}$  des groupes « D » et « E » semblaient varier selon le type du polymère mucoadhésif, sa concentration et la concentration initiale de polymères thermoréversibles. Généralement, on a remarqué des effets communs sur la  $T_{gel}$  des formulations, entre le CP934P et le PC (Figure 2-5 et Figure 2-6). La différence de la concentration initiale de PF127/PF68 a affecté la modulation de la  $T_{gel}$  produite par les deux mucoadhésifs. Pour les formulations de 9 et 12 % de concentration de PF127, la  $T_{gel}$  a d'abord augmenté par l'addition de 0,1 % du mucoadhésif avant de diminuer en élevant davantage sa concentration jusqu'à 0,3%. Les nouvelles  $T_{gel}$  sont restées au-dessus de la  $T_{gel}$  initiale des formulations de PF127/PF68. Au dessus de 12 % du PF127, une différence s'est révélée. Malgré que les deux mucoadhésifs soient des polyacrylates, les mêmes concentrations du CP934P et du PC n'avaient pas joui du même effet sur la  $T_{gel}$  des solutions contenant des concentrations identiques des PF127/PF68. On trouve que le CP934P a modulé la  $T_{gel}$  comme suit :

- Les concentrations (0,1, 0,2 ou 0,3 %) ont diminué la  $T_{gel}$  dans les cas des mélanges PF127/PF68 : 15/15, 15/20 et 15/25 %.
- La variation de la  $T_{gel}$  a été absente dans le cas du mélange PF127/PF68 20/10 %, ce qui indiquait une perte probable de la propriété de thermoréversibilité de la transition pour cette catégorie.

Cependant, la variabilité de la  $T_{gel}$  observée dans le cas du PC suivait un autre plan :

- La  $T_{gel}$  a augmenté par l'addition de 0.1 % du PC dans la plupart des cas de 15% de PF127.

- Les concentrations (0,1, 0,2 ou 0,3 %) ont diminué la  $T_{gel}$ , seulement, quand les concentrations initiales de PF127/PF68 étaient de 15/25 et 20/10 %.

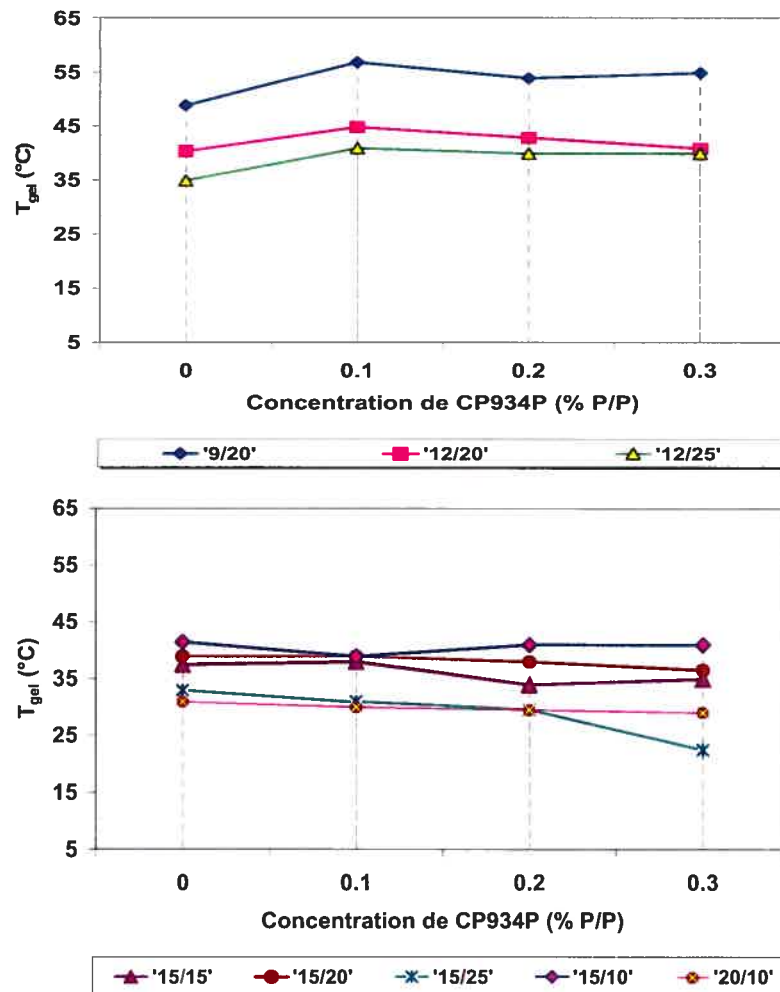


Figure 2-5. Effet de la concentration de CP934P sur la  $T_{gel}$  des solutions aqueuses de PF127/PF68.

Figure 2-7 illustre la comparaison entre les effets réducteurs de CP934P et de PC sur la  $T_{gel}$  de la formulation de PF127/PF68 :15/25. À une concentration de 0,1% p/p, le PC formait un hydrogel à une température moins élevée que le CP934P, alors que ce dernier formait un hydrogel à une température plus basse uniquement quand sa concentration était de 0,3 %. D'autre part, le système risquait de perdre la propriété de thermoréversibilité autour de 34°C à partir de la concentration de 0,2 % pour les deux mucoadhésifs, ce qui était considéré dans les expérimentations subséquentes.

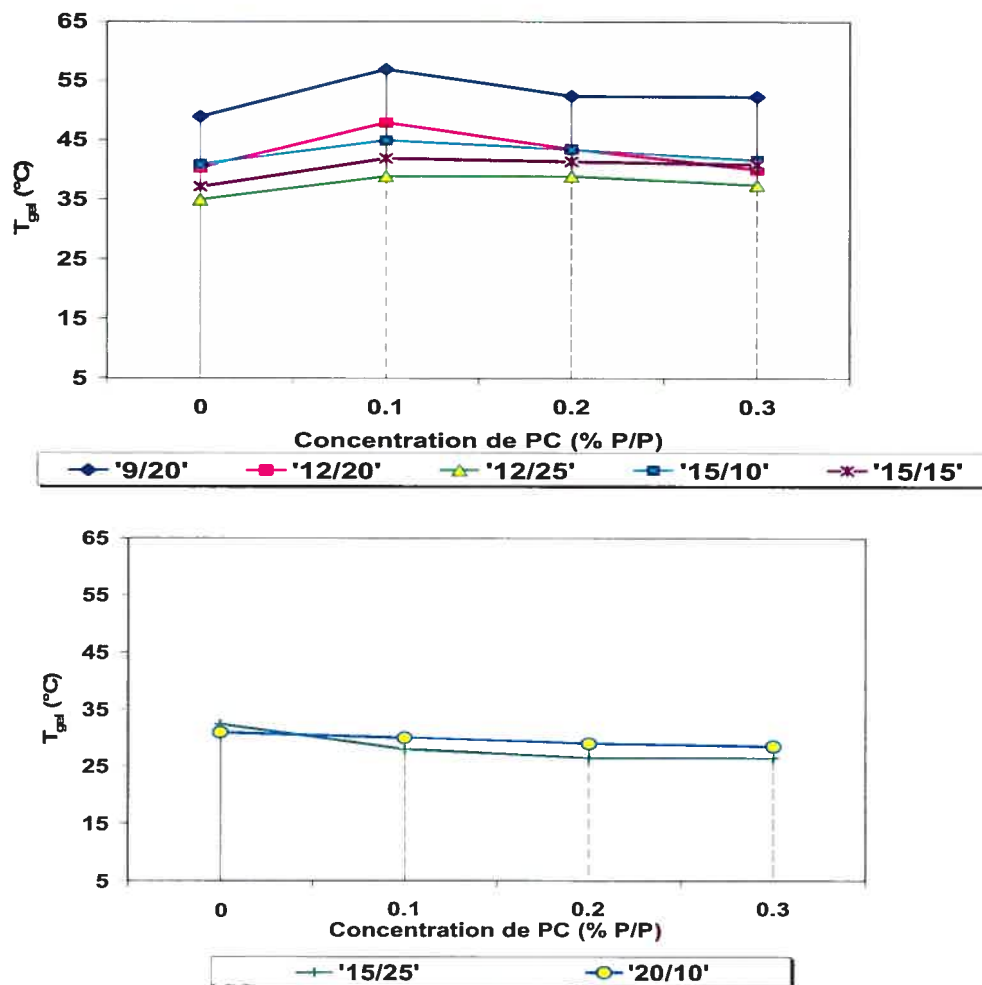


Figure 2-6. Effet de la concentration de PC sur la  $T_{gel}$  de différents mélanges de PF127/PF68.

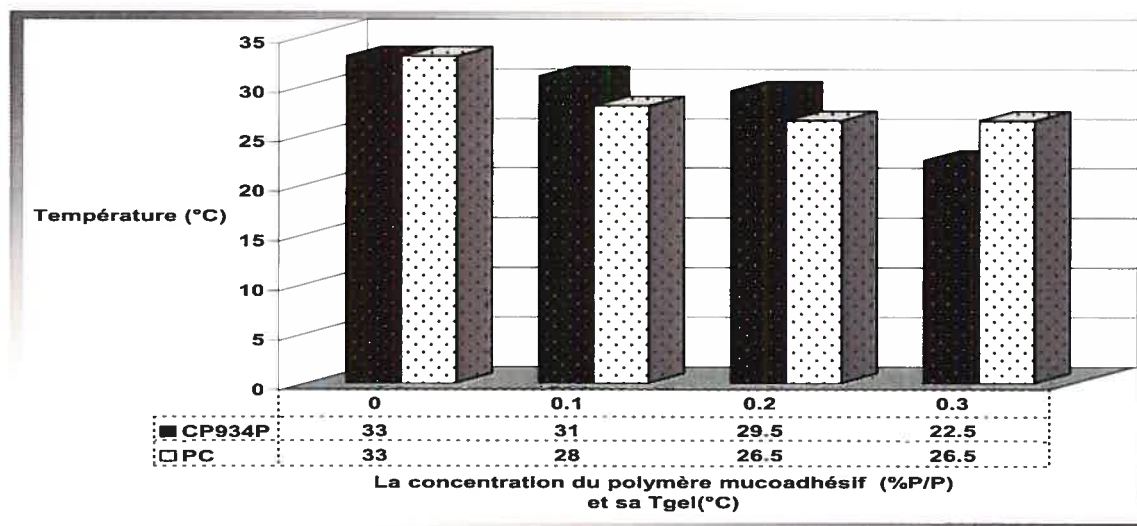


Figure 2-7. Effet de la concentration du polymère mucoadhésif sur la  $T_{gel}$  de la solution aqueuse de PF127/PF68 15/25 (g%).

D'après les études de la détermination de la  $T_{gel}$  des hydrogels physiques, quelques points sont à souligner. Premièrement, la thermoréversibilité se révèle être touchée par les quatre facteurs causaux suivants :

1. Concentration de PF127.
2. Concentration de PF68.
3. Type de polymère mucoadhésif utilisé : PC versus CP934P.
4. Concentration du polymère mucoadhésif.

Par la suite, ces mêmes quatre facteurs causaux et leurs interactions influenceraient les propriétés mécaniques (la dureté, l'adhésion, la cohésion et la compressibilité) des hydrogels thermoréversibles. Deuxièmement, une idée s'est formée à propos des formulations aptes de constituer un système TRG à la température corporelle. C'est pourquoi un nouveau plan expérimental a été développé, dans lequel une attention particulière a été portée sur le pourcentage des polymères mucoadhésifs (la concentration de CP934P ou de PC n'a pas dépassé 0,1 % p/p). Il consistait en formulations capables de subir une transition sol-gel autour de 34°C.

### **2.3.2 Évaluation des propriétés mécaniques par la TPA**

Les quatre propriétés mécaniques mentionnées ci-dessus influencent la capacité d'un TRG-M à exceller dans sa fonction d'une matrice pharmaceutique à libération contrôlée. L'analyse du profil de texture (TPA) est une technique *in vitro* capable d'évaluer quantitativement à la fois les quatre propriétés mécaniques des formulations multipolymériques des TRG-M et, éventuellement à notre avis, de cribler ces derniers.

Le Tableau 2-8 nous montre les valeurs obtenues des propriétés mécaniques ainsi que leurs écarts-type pour chaque formulation examinée en triplicata. Une des premières observations est la grande variation des valeurs, pour le même paramètre mécanique, parmi les 30 formulations examinées en triplicata. La dureté variait entre 0,006 et 2,033 N, l'adhésion entre 0,014 et 7,199 N.mm, la compressibilité s'étendait de 0,012 à 7,304. La dureté, l'adhésion et la compressibilité étaient supérieures dans les combinaisons polymériques PF127/PF68 : 15/20, 15/25, 18/15, 21/10 et 21/15 % p/p (Formulations de M à R et de V à AD). La cohésion, dont la valeur dans la plupart des formulations tournait autour de l'unité, a montré une diminution pour atteindre une valeur moyenne et minimale de 0,595 dans le groupe des TRG où la concentration de la combinaison de PF127/PF68

était de 15/20 % p/p (formulations M, N et O). De même, une autre valeur minimale moyenne de 0,624 a été quantifiée dans le groupe de 18/10 % de PF127/PF68 (formulations S, T et U).

**Tableau 2-8. Valeurs actuelles des propriétés mécaniques des hydrogels examinés, mesurées par la TPA à 34 ± 1 °C.**

Formulation	Dureté <sup>a</sup> (N)	Adhésion <sup>a</sup> (N.mm)	Cohésion <sup>a</sup>	Compressibilité <sup>a</sup> (N.mm)
A	0,008 ± 0,002	0,014 ± 0,000	0,960 ± 0,083	0,027 ± 0,013
B	0,007 ± 0,001	0,016 ± 0,001	0,967 ± 0,119	0,024 ± 0,003
C	0,008 ± 0,001	0,015 ± 0,001	0,945 ± 0,077	0,027 ± 0,003
D	0,006 ± 0,001	0,017 ± 0,003	1,018 ± 0,085	0,012 ± 0,002
E	0,007 ± 0,001	0,016 ± 0,002	0,945 ± 0,106	0,020 ± 0,001
F	0,010 ± 0,001	0,017 ± 0,003	0,924 ± 0,035	0,029 ± 0,011
G	0,006 ± 0,003	0,015 ± 0,001	0,884 ± 0,063	0,018 ± 0,014
H	0,009 ± 0,002	0,018 ± 0,001	0,974 ± 0,068	0,027 ± 0,005
I	0,008 ± 0,001	0,016 ± 0,003	0,918 ± 0,024	0,027 ± 0,007
J	0,009 ± 0,001	0,018 ± 0,001	1,001 ± 0,011	0,033 ± 0,006
K	0,012 ± 0,005	0,019 ± 0,003	1,022 ± 0,132	0,040 ± 0,018
L	0,009 ± 0,001	0,021 ± 0,001	0,932 ± 0,011	0,020 ± 0,001
M	0,316 ± 0,036	0,653 ± 0,138	0,595 ± 0,062	1,041 ± 0,216
N	0,437 ± 0,132	0,908 ± 0,290	0,845 ± 0,013	1,267 ± 0,443
O	0,458 ± 0,069	0,820 ± 0,108	0,651 ± 0,049	1,455 ± 0,100
P	1,737 ± 0,065	5,492 ± 0,347	1,196 ± 0,118	4,780 ± 0,217
Q	2,033 ± 0,237	7,199 ± 2,314	1,063 ± 0,119	7,304 ± 2,924
R	1,878 ± 0,123	6,318 ± 0,471	1,100 ± 0,052	6,173 ± 0,789
S	0,044 ± 0,003	0,121 ± 0,024	0,757 ± 0,058	0,106 ± 0,019
T	0,215 ± 0,014	0,622 ± 0,056	0,705 ± 0,051	0,761 ± 0,036
U	0,098 ± 0,010	0,244 ± 0,021	0,624 ± 0,038	0,358 ± 0,018
V	0,468 ± 0,031	1,400 ± 0,341	0,961 ± 0,110	1,527 ± 0,152
W	0,613 ± 0,034	2,164 ± 0,386	0,962 ± 0,030	2,362 ± 0,523
X	0,599 ± 0,033	2,112 ± 0,558	0,967 ± 0,040	2,434 ± 0,806
Y	0,485 ± 0,002	1,685 ± 0,055	1,076 ± 0,037	1,583 ± 0,137
Z	0,604 ± 0,010	1,850 ± 0,179	1,061 ± 0,038	1,937 ± 0,134
AA	0,625 ± 0,035	2,190 ± 0,324	1,031 ± 0,032	2,381 ± 0,444
AB	0,976 ± 0,041	3,745 ± 0,736	1,011 ± 0,042	3,898 ± 0,746
AC	1,260 ± 0,134	4,136 ± 1,141	0,986 ± 0,043	4,732 ± 1,446
AD	1,245 ± 0,018	4,540 ± 0,295	0,983 ± 0,010	4,986 ± 0,333

<sup>a</sup> la valeur moyenne ± écart-type (n=3).

L'implication des forces cohésives dans le mécanisme de la mucoadhésion [32] fait allusion que la cohésion faible de ces deux séries, malgré leur dureté relativement haute, mènerait à une faillite dans leur mucoadhésion quand appliquée in vivo. Les valeurs quantitatives relativement basses de leur adhésion relative, entre 0,121 et 0,908 N.mm, confirment cette suggestion. En accord avec une étude précédente [20] où les combinaisons 15/15 et 15/20

% de PF127/PF68 ont été examinées pour leur pouvoir de former un gel dans des conditions physiologiques simulant le fluide vaginal, les formulations M, N et O (15/20 %) ont formé une phase de gel d'une dureté supérieure à celle des formulations J, K et L (15/15 %).

Dans un nombre limité d'études [14, 16], des combinaisons de ces mêmes polymères ont été examinées pour estimer leurs propriétés mucoadhésives et de dureté in vivo. Des formulations TRG-M composées principalement de PF127/PF68 (15/15 et 15/20 %) ont manifesté une bonne mucoadhésion à la muqueuse rectale des lapins pour 6 heures [14]. D'autres formulations de 20/12/0,2 % du PF127/PF68/PC ont étendu le temps de séjour à la muqueuse nasale, par rapport à des solutions de saline [16]. Ainsi, malgré les conditionnements expérimentaux différents, si on les compare avec les valeurs obtenues par la TPA, des formulations ayant des valeurs d'adhésion relative dans l'entour de ou dépassent 0,820 N.mm (où la concentration de PF127/PF68/PC est de 15/20/0,1 % p/p), peuvent inciter une mucoadhésion acceptable in vivo. Celles qui ont une dureté qui dépasse 0,458 N, ne provoqueraient pas une fuite de la formulation liquide quand appliquée dans une cavité corporelle. D'autre part, une telle dureté va probablement mener à une vitesse de libération réduite du principe actif [16]. Quand ces valeurs sont associées avec une bonne cohésion (valeur proche de l'unité), les formulations TRG-M auront vraisemblablement un comportement acceptable in-vivo concernant la mucoadhésion et la libération ralentie.

### **2.3.3 Approche statistique**

A part la comparaison avec la littérature, une approche statistique a été adoptée pour deux raisons. Premièrement, elle représente une tentative visée à vérifier la capacité de la TPA à cribler les systèmes TRG-M. La deuxième raison était de déceler et d'identifier quantitativement les rôles et les interactions que les facteurs causaux significativement exerçaient sur les propriétés mécaniques des TRG-M. Ceux-ci sont extraits après que la validité et l'adéquation des modèles statistiques générés par les méthodes d'analyse sont vérifiées par des critères concrets et robustes dont la description serait élaborée à place. En réalité, les deux raisons ont le même trajet; la vérification de la TPA comme une technique fiable de criblage pourrait se réaliser en inspectant son pouvoir de fournir des résultats. Quand adéquatement analysés, ils mènent à l'identification des rôles que chaque composant dans un système de TRG-M joue sur ses propriétés mécaniques. Comme une mesure de

validation, les rôles identifiés pourraient être comparés avec les rôles préalablement connus pour ces composants dans la littérature.

Due à la multitude des facteurs causaux impliqués, les valeurs obtenues pour tous les paramètres mécaniques, n'étaient pas reliées linéairement à chaque facteur causal (Tableau 2-9). Ce qui nous a poussés à employer deux procédures statistiques non paramétriques : L'analyse factorielle et les réseaux de neurones artificiels.

**Tableau 2-9. Corrélacion linéaire, représentée par la valeur du coefficient de détermination linéaire ( $R^2$ ), entre chacun des facteurs causaux versus chacun des paramètres mécaniques des TRG.**

Paramètre mécanique	Facteur causal			
	PF127	PF68	CP934P	PC
	Coefficient de détermination ( $R^2$ )			
Dureté	0,5318	0,2257	0,0006	0,0031
Adhésion	0,1608	0,0823	0,0008	0,0025
Cohésion	0,0008	0,0412	0,0175	0,0068
Compressibilité	0,1852	0,0692	0,0022	0,0044

### 2.3.3.1 Analyse factorielle

L'analyse factorielle est compétente dans la quantification des effets significatifs des facteurs causaux, ainsi que dans la quantification des effets de leurs interactions, sur les variables de réponse. Nous avons procédé à la répartition du nouveau plan expérimental en 4 séries différentes (4 plan factoriels) pour répondre à l'inflexibilité de l'expérience factorielle de comprendre le tout de notre design dans un plan unique.

L'inflexibilité a été générée puisque, premièrement, les concentrations de PF68 qui assistaient dans la modulation de la  $T_{gel}$  du TRG pour qu'elle soit proche de 34°C, n'avaient pas une séquence homogène par rapport aux concentrations du PF127 : hautes concentrations de PF68 (20 ou 25 %) pour les concentrations basses de PF127 (9 ou 15 %); basses concentrations (10 ou 15 %) pour les concentrations de PF127 de 15, 18 ou 21 %. Ainsi, deux plans ont été construits : un plan factoriel entier de  $2^3$  (trois facteurs : PF127, PF68 et le polymère mucoadhésif, chacun à deux niveaux) et un deuxième plan factoriel de  $2 \times 2 \times 3$  (les mêmes trois facteurs, chacun à deux niveaux sauf pour le PF127 où 3 niveaux ont été examinés). Dans ce dernier cas, la méthode sélectionnée pour l'optimisation du modèle était le « D-optimale » qui minimise la variance associée aux coefficients estimés.

La deuxième origine de l'inflexibilité était le type du polymère mucoadhésif, puisqu'un seul était inclus dans la formulation liquide sous examen. Pour surmonter cette difficulté, après la répartition en deux plans comme c'est précédemment détaillé, chacun d'eux était



réparti en deux « sous-plans » factoriels : un conçu pour les formulations contenant le CP934P et l'autre pour celles où le PC est utilisé.

Le traitement des données obtenues a généré un modèle statistique pour chaque paramètre mécanique dans chaque plan factoriel. L'analyse graphique des résiduels dans le modèle servait à vérifier l'adéquation du modèle. Pour tous les modèles acceptés, le graphique de l'échelle fonctionnelle des résiduels était un rectiligne, dénotant une distribution normale des résiduels (Figure 2-8). Les résiduels sont tombés dans une limite de  $\pm 3$ , indiquant l'absence des observations aberrantes (Figure 2-9). Leur graphique versus les valeurs prédites des variables de réponse n'a pas formé une structure définie, ce qui assume que la variance a été constante (Figure 2-10). Si la variance n'était pas constante, une approche de transformation de variance serait appliquée pour la stabiliser au moyen de la graphique de Box-Cox. Cette graphique est une directive qui aide à sélectionner une loi correcte de transformation de puissance. Une transformation serait recommandée en se basant sur la valeur optimale de lambda (la valeur située dans le minimum de la courbe générée par le log de la somme des carrés des écarts à la moyenne), Figure 2-12. Le résultat est une corrélation linéaire, entre les valeurs prédites et les valeurs actuelles, pour chacun des paramètres mécaniques (Figure 2-11), après un ajustement du modèle initial s'il était exigé. Un modèle initial qui contenait des termes significatifs et d'autres non-significatifs, exigeait un ajustement par la sélection des termes significatifs : les facteurs lointains du rectiligne du graphique de l'échelle fonctionnelle normale des effets (Figure 2-13). Le modèle statistique est finalement validé en appliquant ANOVA. Un ajustement idéal du modèle d'analyse statistique existait quand la valeur du coefficient multiple de détermination ( $R^2$ ) est le maximum : égale ou proche de l'unité, quand la précision adéquate a une valeur  $\geq 4$  (Tableau 2-10). Un Rapport F ("Probabilité < F") inférieur à 0,05 prouve la signification du modèle, (Tableau 2-11).

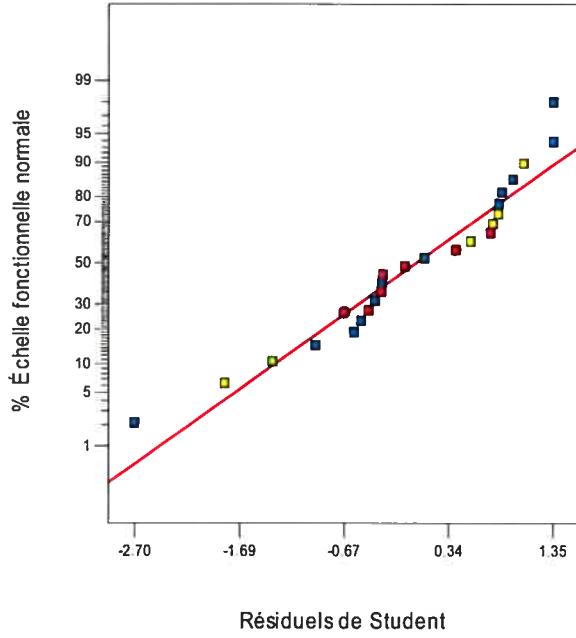


Figure 2-8. Graphique d'échelle fonctionnelle normale des résiduels.

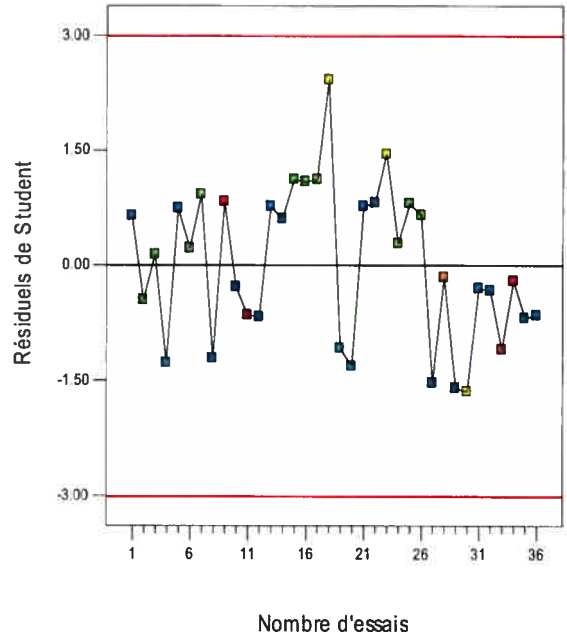


Figure 2-9. Graphique des résiduels versus le nombre d'essais de la variable de réponse.

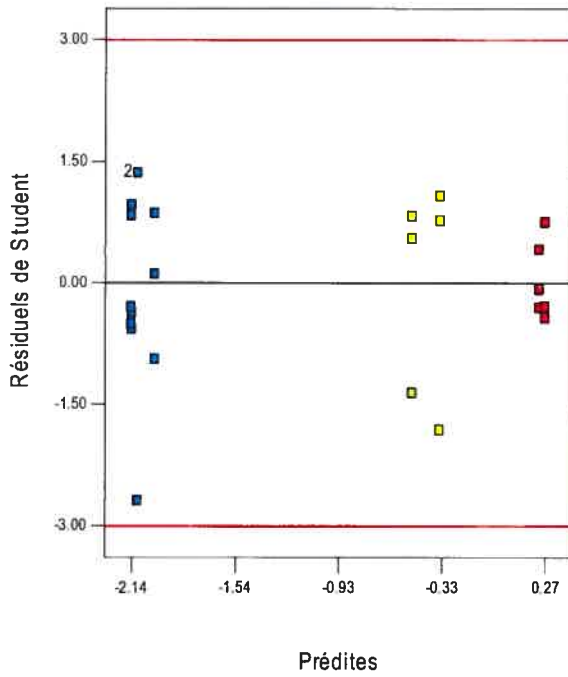


Figure 2-10. Graphique des résiduels versus les valeurs prédites de la variable de réponse.

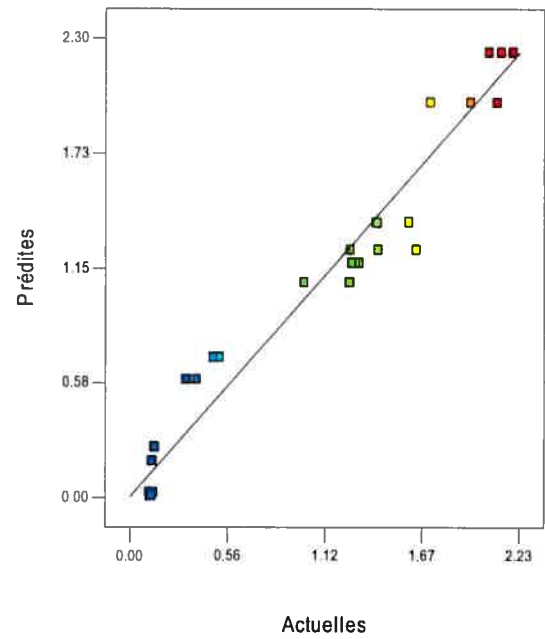


Figure 2-11. Graphique de corrélation entre les valeurs actuelles de la variable de réponse et les valeurs prédites par le modèle statistique factoriel.

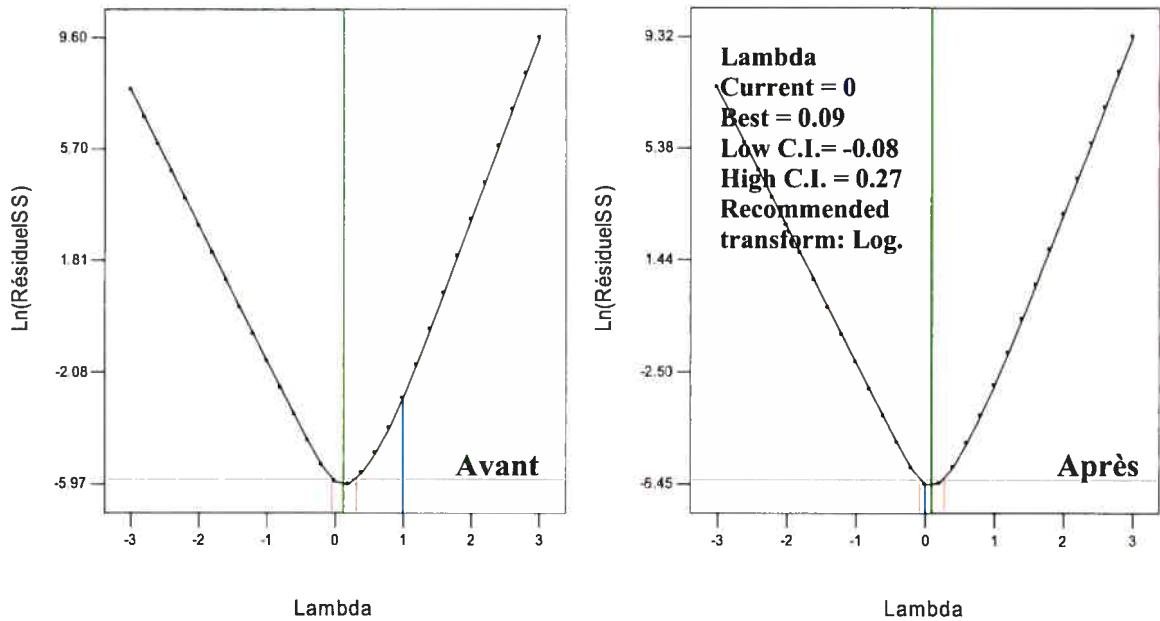


Figure 2-12. Graphique de Box-Cox avant et après la transformation de puissance pour la dureté de la série 1 d'hydrogels thermoréversibles.

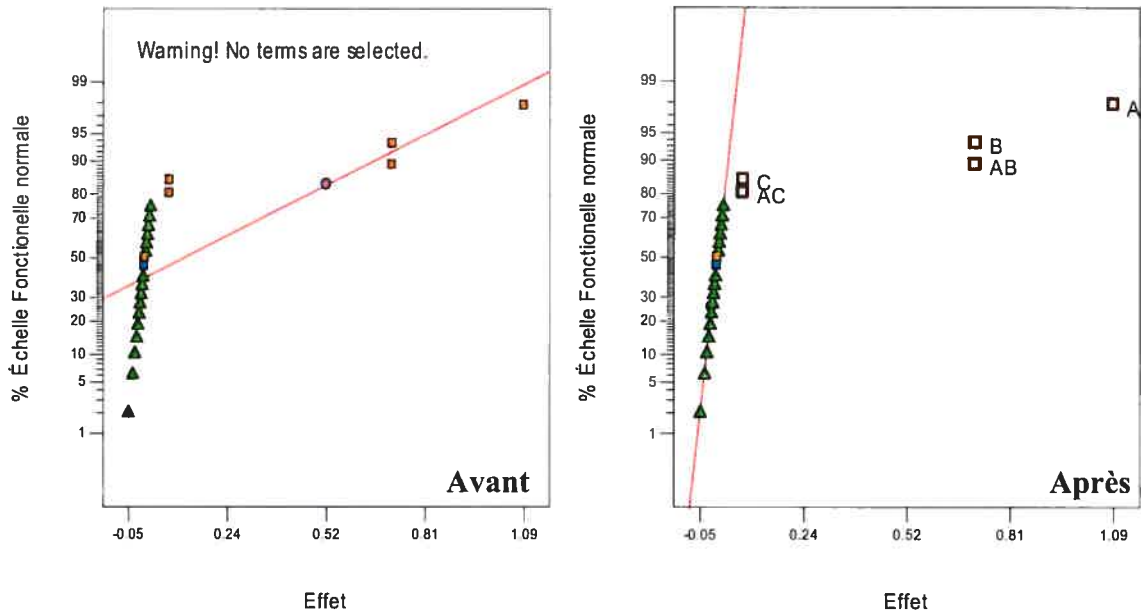


Figure 2-13. Exemple de graphique fonctionnel normal des effets avant et après la sélection des effets significatifs : PF127(A) ; PF68 (B) et CP934P (C) et les interactions AB et AC, pour la variable de réponse : la dureté, dans le cas de la série 1.

Une fois validé pour chaque plan factoriel, le modèle statistique est considéré comme illustrant adéquate des effets des facteurs causaux sur les propriétés mécaniques des TRG. Le Tableau 2-12 renferme tous les modèles statistiques générés des plans factoriels après

leur validation. Par simplicité, nous allons présenter et discuter les résultats analysés par les modèles obtenus des quatre plans factoriels (les 4 séries) pour chaque propriété mécanique.

Tableau 2-10. Coefficient multiple de détermination ( $R^2$ ) et valeurs de la précision adéquate, calculées par l'analyse factorielle pour chaque série d'hydrogels.

Variable de Réponse	$R^2$				Précision adéquate			
	Série 1	Série 2	Série 3	Série 4	Série 1	Série 2	Série 3	Série 4
Dureté	0,9982	0,9963	0,9597	0,9632	78,526	67,788	31,286	33,082
Adhésion	0,9985	0,9952	0,9521	0,9467	119,328	67,782	28,479	26,953
Cohésion	0,9061	0,8184	0,2487	0,0000	16,279	10,995	5,787	—
Compressibilité	0,9900	0,9829	0,9507	0,9467	45,758	40,151	28,637	27,548

Précision adéquate : une valeur au-dessus de 4 démontre la validité du modèle statistique employé.

Tableau 2-11. Niveau de signification de l'effet des facteurs causaux sur chacune des propriétés mécaniques : dureté, adhésion, cohésion et compressibilité. Le seuil de signification  $\alpha$  est de 0,05.

Facteur Causal	Probabilité < F							
	Dureté				Adhésion			
	Série 1	Série 2	Série 3	Série 4	Série 1	Série 2	Série 3	Série 4
$X_1$	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
$X_2$	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
$X_3$	0,0042	0,5034 *	0,0154	0,0009	0,003	0,0487	0,03	0,0186
$X_1X_2$	< 0,0001	< 0,0001	0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	0,0002	0,0001
$X_1X_3$	0,2851*	0,0231	—	0,1263*	—	—	0,217*	0,6381*
$X_2X_3$	0,613*	—	—	0,4398*	—	—	0,6692*	0,7193*
$X_1X_2X_3$	0,0035	—	—	—	—	—	—	—
Facteur Causal	Cohésion				Compressibilité			
	Série 1	Série 2	Série 3	Série 4	Série 1	Série 2	Série 3	Série 4
	$X_1$	0,0179	0,2381	0,065	—	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
$X_2$	< 0,0001	< 0,0001	0,0208	—	< 0,0001	< 0,0001	0,001	< 0,0001
$X_3$	0,2165*	0,75*	0,3178*	—	0,0423	0,0487	—	0,0031
$X_1X_2$	< 0,0001	0,0001	—	—	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	0,0001
$X_1X_3$	—	0,2501*	—	—	—	—	—	0,338*
$X_2X_3$	0,062*	0,0086	—	—	—	—	—	0,4971*
$X_1X_2X_3$	—	0,068	—	—	—	—	—	—

\*La valeur calculée dénote la non-signification du facteur causal en question.

Tableau 2-12. Modèles statistiques valides obtenus au moyen de l'analyse factorielle illustrant l'effet des facteurs causaux ( $X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_3$ ) sur la propriété mécanique ( $Y$ ) : dureté, adhésion, cohésion ou compressibilité. ( $Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{12} X_1 X_2 + \dots + \beta_{123} X_1 X_2 X_3$ )

Coefficient	Paramètre mécanique (Y)							
	Dureté				Adhésion			
	Série 1 <sup>a</sup>	Série 2 <sup>a</sup>	Série 3 <sup>b</sup>	Série 4 <sup>b</sup>	Série 1 <sup>a</sup>	Série 2 <sup>a</sup>	Série 3 <sup>b</sup>	Série 4 <sup>b</sup>
$\beta_0$	0,28778	0.7290	-0.2320	-0.1603	0.6969	0.5836	0.1500	-0.0395
$\beta_1$	-0.2507	-0.2710	0.0020	-0.0020	-0.3005	-0.2932	-0.0134	-0.0196
$\beta_2$	-0.2397	-0.2594	-0.1262	-0.1319	-0.2535	-0.2510	-0.2778	-0.2866
$\beta_3$	-28.0022	-2.8343	-2.4398	-1.0336	0.6783	0.7498	-5.4099	0.4895
$\beta_{12}$	0.0259	0.0268	0.0099	0.0102	0.0290	0.0289	0.0209	0.0214
$\beta_{13}$	2.3099	0.2536	0.1742	0.1681	—	—	0.3046	0.1164
$\beta_{23}$	1.2341	—	0.0012	-0.0820	—	—	0.1021	-0.0871
$\beta_{123}$	-0.0991	—	—	—	—	—	—	—
	Cohésion				Compressibilité			
	Série 1 <sup>c</sup>	Série 2 <sup>c</sup>	Série 3 <sup>d</sup>	Série 4	Série 1 <sup>a</sup>	Série 2 <sup>a</sup>	Série 3 <sup>b</sup>	Série 4 <sup>b</sup>
	$\beta_0$	4.1670	4.5328	0.4398	—	-0.2294	2.3450	0.1810
$\beta_1$	-0.3924	-0.4229	0.0152	—	-0.1550	-0.3425	-0.0408	-0.0517
$\beta_2$	-0.1365	-0.1513	0.0189	—	-0.2002	-0.3212	-0.2977	-0.3134
$\beta_3$	4.8612	-18.5424	-0.3941	—	1.0519	0.0309	-5.7021	-0.3078
$\beta_{12}$	0.0169	0.0181	—	—	0.0220	—	0.0228	0.0236
$\beta_{13}$	—	2.4245	—	—	—	—	0.4503	0.2459
$\beta_{23}$	0.2327	0.7476	—	—	—	—	-0.0410	-0.1701
$\beta_{123}$	—	-0.1009	—	—	—	—	—	—

<sup>a</sup> Les valeurs transformées ( $\text{Log}_{10}$ ) de la propriété mécanique (Y) sont estimées par la méthode factorielle 2<sup>3</sup>.

<sup>b</sup> Les valeurs transformées (Racine carrée) de la propriété mécanique (Y) sont estimées par la méthode D-Optimale.

<sup>c</sup> Les valeurs (sans transformation) de la propriété mécanique (Y) sont estimées par la méthode factorielle 2<sup>3</sup>.

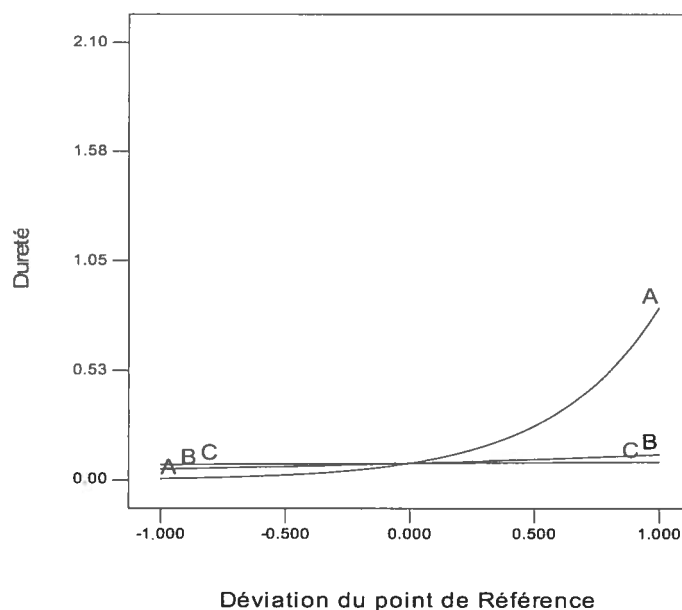
<sup>d</sup> Les valeurs (sans transformation) de la propriété mécanique (Y) sont estimées par la méthode D-Optimale.

### 2.3.3.1.1 Dureté

La dureté d'hydrogels semblait augmenter significativement avec les incréments de concentrations des trois polymères dans leur solution aqueuse. Le plus grand effet sur la dureté de l'hydrogel dans les 4 séries était la concentration de PF127, suivie de celle de PF68 (Figure 2-14). Sous un seuil de signification de 0,05, l'impact négatif du polymère mucoadhésif CP934P sur la dureté était significatif dans les séries (1 et 3), respectivement  $p=0,0042$  et  $0,0154$ ; alors que le PC possédait un effet significatif qui baissait la dureté pour la série 4 seulement ( $p=0,0009$ ), Tableau 2-11 et Tableau 2-12.

Les coefficients des modèles statistiques (Tableau 2-12) soulignent deux types d'interactions significatives. La première est l'interaction positive entre le PF127 et le PF68 (Figure 2-15 et Figure 2-16),  $p < 0,001$ , qui augmentait la dureté des 4 séries (Tableau 2-11 ; Tableau 2-12). Pour les séries 1 et 2, l'interaction entre PF127 et PF68 suivait plutôt une loi

exponentielle. La dureté accrue pourrait être due à l'encouragement de la formation des micelles, suite à l'augmentation de concentration des deux poloxamères. Le nombre accru des micelles inciterait leur compaction. La compaction des micelles augmenterait la rigidité de l'hydrogel formé [58].



**Figure 2-14. Importance de la concentration de chaque polymère (A : PF127 ; B : PF68 ; C : CP934P), représentée par le degré de déviation du point de référence du modèle factoriel employé, sur la dureté des hydrogels thermoréversibles dans la série 1.**

Le deuxième type d'interaction est avec le polymère mucoadhésif. Aux concentrations de PF127 et de PF68 examinées dans la série 2, le PC interagissait significativement avec le PF127 (Figure 2-17 et Tableau 2-11) ; tandis que le CP934P semblait interagir avec les deux poloxamères, seulement dans la série 1 pour finir par amoindrir la dureté. Dans cette optique, on pourrait déduire que, malgré sa concentration faible (0,1 %), le CP934P avec sa nature légèrement réticulée et ses chaînes polymériques flexibles [75] à l'état de répulsion après sa neutralisation par la TEA, contribue à une interaction affectant la dureté dans séries 1 et 3. Son interaction significative avec le PF127 et avec le PF68 indiquait qu'il pourrait s'enchevêtrer avec les micelles et perturber leur agrégation et ainsi influencer la dureté de l'hydrogel provoquée in-situ.

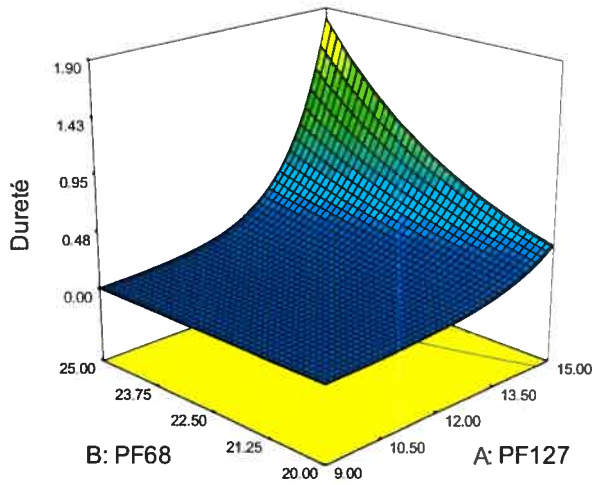


Figure 2-15. Graphique 3D des surfaces de réponses illustrant l'effet de l'interaction entre le PF127 et le PF68 sur la dureté des hydrogels thermoréversibles (série 1).

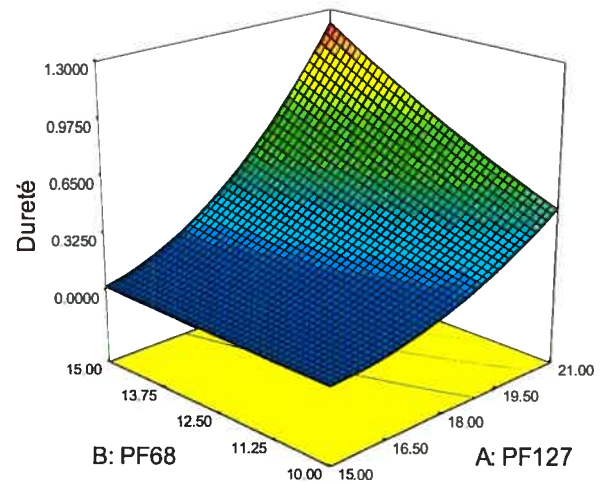


Figure 2-16. Graphique 3D des surfaces de réponses illustrant l'effet entre le PF127 et le PF68 sur la dureté des hydrogels thermoréversibles (série 3).

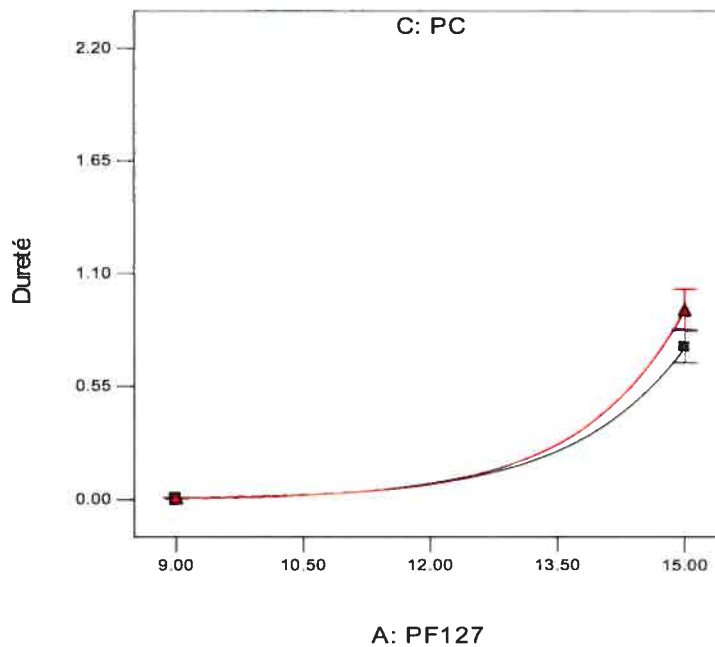


Figure 2-17. Effet de l'interaction entre le PF127 et le PC sur la dureté des hydrogels thermoréversibles de série 2.

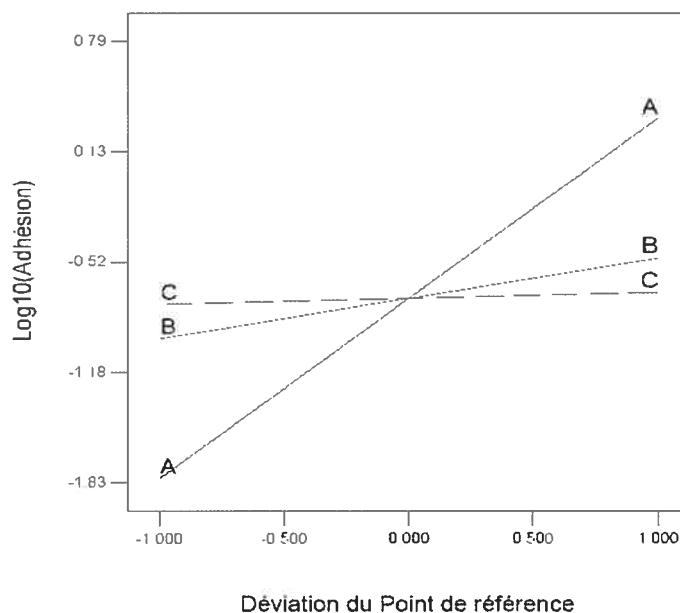
■ : C en concentration basse,  
▲ : C en concentration haute.

### 2.3.3.1.2 Adhésion

Le deuxième paramètre mécanique à évaluer était l'adhésion. Pour les quatre séries d'hydrogels thermoréversibles, la concentration accrue des polymères impliqués semblait influencer positivement l'adhésion relative (Figure 2-18). Les équations des modèles statistiques validés (Tableau 2-12), analysaient l'effet individuel de chacun des

poloxamères sur l'adhésion, dans les 4 séries. Leur effet était négatif. Le PF127 semblait avoir l'impact le plus important sur l'adhésion. Son effet négatif diminuait dans les séries 3 et 4, apparemment grâce à sa concentration qui dépassait 15 %.

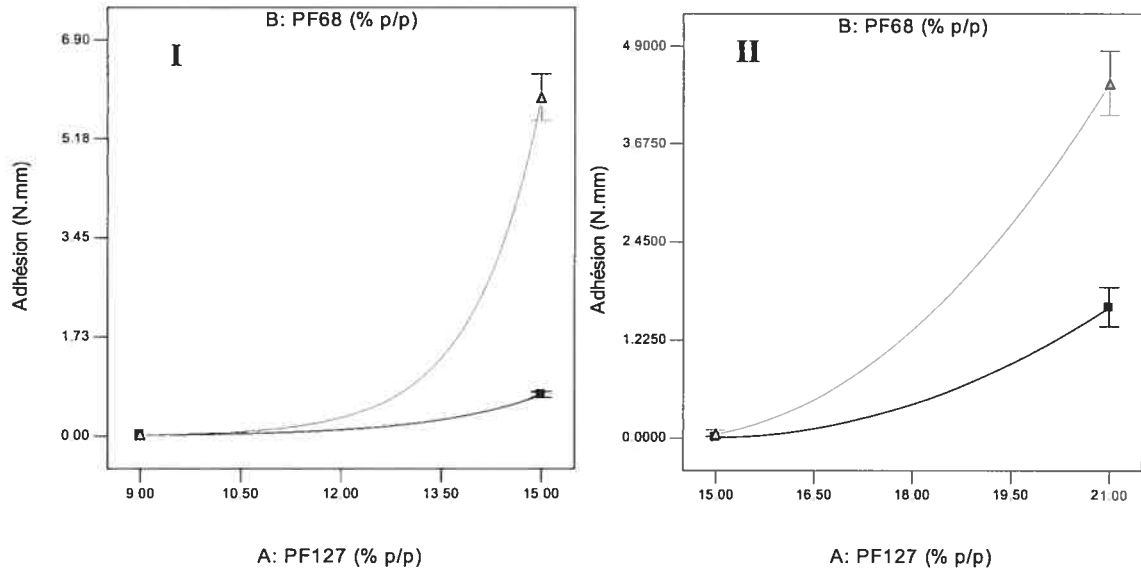
Pourtant, l'interaction des poloxamères était significative et elle renforçait l'adhésion. L'accroissement exponentiel de l'adhésion observé en augmentant la concentration des PF127 et PF68 dans les séries 1 et 2, a été transformé en relation relativement linéaire quand la concentration de PF127 dépassait 15 % dans les séries 3 et 4 (Figure 2-19). Dans cette optique, l'adhésion pourrait être influencée par la dureté générée par l'interaction entre les micelles des deux poloxamères à haute concentration. Un hydrogel relativement plus dur est plus apte à adhérer effectivement à la sonde du pénétromètre.



**Figure 2-18. Importance de la concentration de chaque polymère (représentée par le degré de déviation du point de référence du modèle factoriel employé) sur l'adhésion relative des hydrogels thermoréversibles. A : PF127 ; B : PF68 ; C : CP934P (Séries 1 et 3) ou PC (Séries 2 et 4).**

D'autre part, sauf le CP934P dans la série 3 qui baissait l'adhésion notamment, le polymère mucoadhésif semblait jouer le rôle principal dans le renforcement de l'adhésion, Tableau 2-12. Il avait un effet individuel positif significatif sur l'adhésion relative. Quoique non-significatives, des interactions existaient, dans les séries 3 et 4, entre le CP934P ou le PC d'une part et chacun des poloxamères. Ces interactions augmentaient l'adhésion sauf pour le PC et le PF68 dans la série 4 où leur interaction affectait négativement l'adhésion.



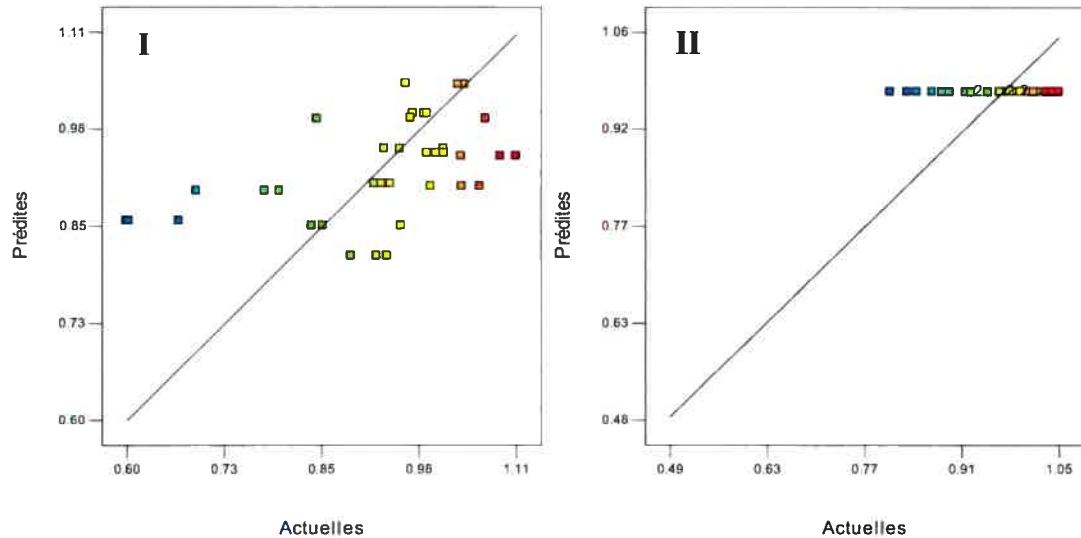


**Figure 2-19. Effet de l'interaction entre le PF127 et le PF68 sur l'adhésion relative des hydrogels thermoréversibles de la Série 1 (I) et la Série 3 (II). A : PF127 ; B : PF68. ■ : B en concentration basse, ▲ : B en concentration haute.**

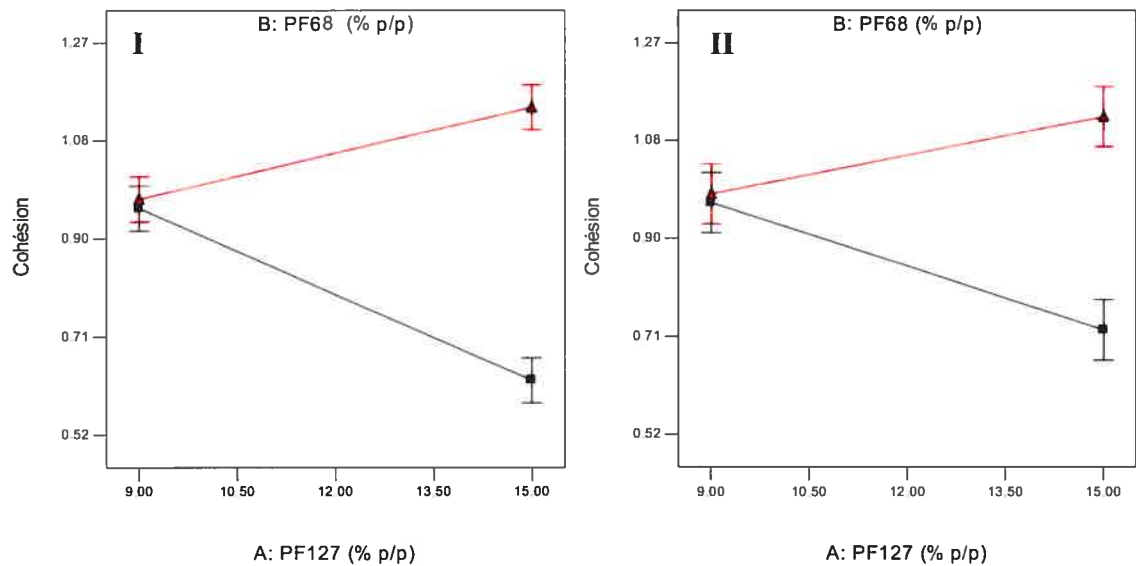
### 2.3.3.1.3 Cohésion

Avec un coefficient multiple de détermination  $R^2$ , respectivement de 0,25 et 0,00 pour les séries 3 et 4 (Tableau 2-10), et par la suite un coefficient de corrélation multiple qui approche le zéro, on pense à une absence de corrélation linéaire entre les valeurs prédites et celles actuelles (Figure 2-20). Ainsi, la cohésion n'a pas pu être analysée pour ces séries d'hydrogels puisque leurs modèles statistiques n'étaient pas adéquats (Tableau 2-12). Pour les séries 1 et 2, on peut déduire que la présence de chacun de deux poloxamères dans la formulation liquide ébranlait la cohésion du système. Pourtant, leur interaction significative la renforçait. En augmentant la concentration de PF127 de 9 à 15 %, la cohésion a été détériorée sensiblement pour une concentration de PF68 de 20 %, alors que, lors du rehaussement de la concentration de ce dernier pour atteindre 25 %, la cohésion se fortifiait (Figure 2-21). Ceci pourrait indiquer que le PF68, à 20 %, a été incapable de former ses propres micelles en quantité suffisante, alors que ses unimères présentaient une opposition face à la formation des micelles pures de PF127 qui existait à concentration basse. En augmentant la concentration des deux entités, une multiplication du nombre total des micelles dans le système, soit ceux du PF68 soit du PF127, a existé. L'association de leurs micelles par les interactions hydrophobes a mené à la formation d'un hydrogel cohésif.

Quant aux polymères mucoadhésifs, leur interaction significative avec le PF68 semblait renforcer la cohésion d'hydrogels formés (Figure 2-22). Seul, ou en interagissant avec l'ensemble des deux poloxamères, le PC semblait profondément affaiblir la cohésion, malgré que son interaction avec le PF127 seul, l'augmentait. Il est probable que le réseau tridimensionnel rigide de ce premier intervenait dans l'association des micelles des deux poloxamères.

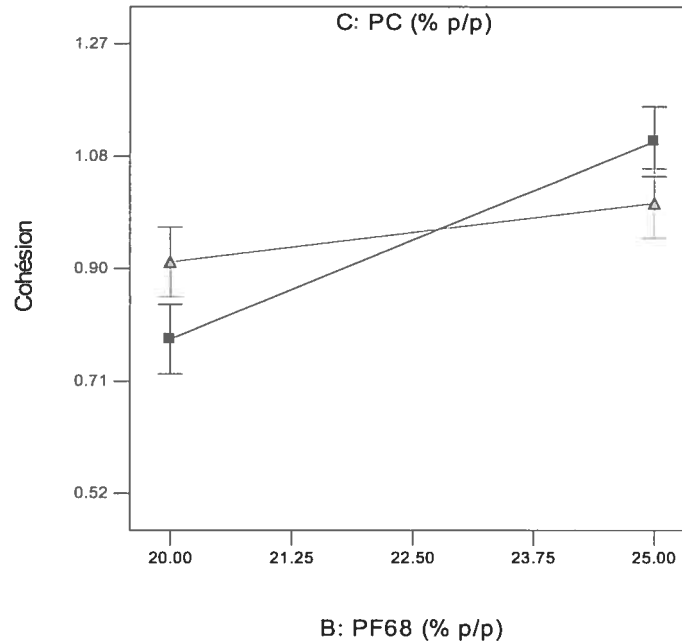


**Figure 2-20. Corrélation entre les valeurs mesurées de la cohésion des hydrogels thermoréversibles déterminées par la TPA et les valeurs prédites par les modèles statistiques factoriels. I : Série 3 ; II : Série 4.**



**Figure 2-21. Effet de l'interaction entre le PF127 et le PF68 sur la cohésion des hydrogels thermoréversibles. I : Série 1 ; II : Série 2. A : PF127 ; B : PF68. ■ : B = 20%, ▲ : B = 25%.**

Pour tous ses effets significatifs, le CP934P avait comme résultats de renforcer la cohésion. Ce polymère semblait s'enchevêtrer avec les micelles du système, probablement par des ponts hydrogène entre ses groupes carboxyliques neutralisés, et exposés grâce à sa nature linéaire flexible légèrement réticulée, et les groupes hydroxyles des poloxamères, ce qui garantissait une interconnexion et une compaction adéquates des particules dans le système d'hydrogels formés.

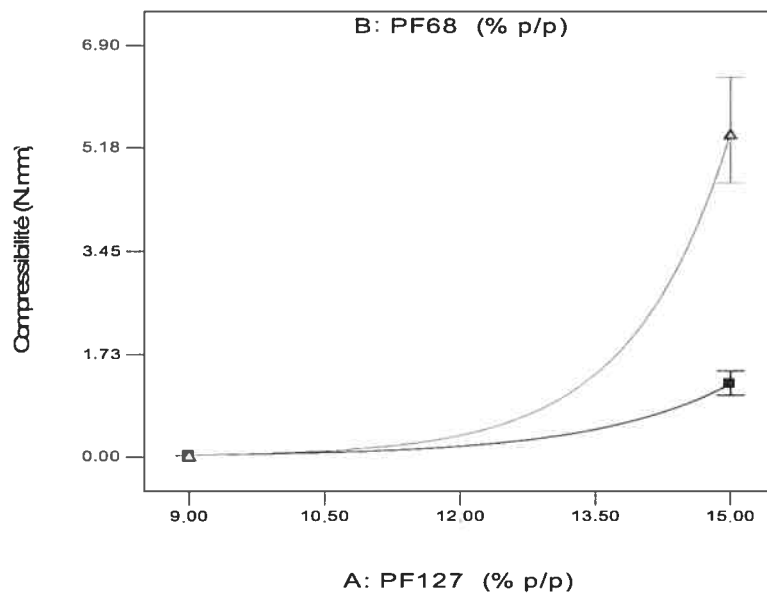


**Figure 2-22. Effet de l'interaction entre le PF68(B) et le PC (C) sur la cohésion des hydrogels thermoréversibles de la Série 2. B : PF68 ; C : PC. ■ : C = 0,0%, ▲ : C = 0,1%.**

#### 2.3.3.1.4 Compressibilité

L'analyse factorielle a démontré que les quatre facteurs causaux affectaient avec signification la compressibilité d'hydrogels. Leur effet général était un accroissement de compressibilité en fonction de concentration. Dans les quatre séries, les poloxamères avaient un effet négatif. L'interaction entre eux était significative dans les séries 1 (Figure 2-23), 3 et 4; elle a provoqué une augmentation de compressibilité des hydrogels thermoréversibles (Tableau 2-12). Les polymères mucoadhésifs avaient l'effet positif dans les séries 1 et 2, bien qu'il ait été négatif dans les séries 3 et 4 (à hautes concentrations de PF127). Quant à leurs interactions, les polymères mucoadhésifs ont positivement interagi avec le PF127, mais, négativement avec le PF68 dans les séries 3 et 4. Pourtant, les interactions n'étaient pas significatives sous un seuil de signification de 0,05. Dans les

séries 3 et 4, l'impact négatif de ces interactions pourrait provenir d'un regroupement de micelles perturbé par la présence des polymères mucoadhésifs. La perturbation pourrait provenir de la structure physique des polymères mucoadhésifs. Le PC formait un hydrogel chimique, en présence d'eau dans le système. Quand la concentration de PF127 était relativement basse (série2), il n'atténuait pas la compressibilité des hydrogels thermoréversibles formés in-situ. Pourtant, quand la concentration des micelles de PF127 et PF68 dans les systèmes d'hydrogel s'accroissait, alors que la quantité d'eau dans le système devenait limitée (série 4), l'effet de la structure rigide de l'hydrogel chimique du PC, diminuait leur compressibilité. À haute concentration de poloxamères (série 3), le CP934P pourrait, élever les interconnexions entre les micelles et s'enchevêtrer par ses chaînes flexibles avec elles, tout en formant des ponts hydrogène, pour finir par accentuer leur compaction et par la suite diminuer leur compressibilité.



**Figure 2-23. Effet de l'interaction entre le PF127 et le PF68 sur la compressibilité des hydrogels thermoréversibles de la Série 1. ■ : B en concentration basse, ▲ : B en concentration haute.**

L'analyse factorielle a analysé les effets et les interactions qui existent entre les facteurs causaux et les variables de réponse par des modèles statistiques validés. Ceux-ci pourraient quand même être employés dans la prédiction d'une formulation optimale d'un hydrogel mucoadhésif à libération contrôlée. Pourtant, puisque les données n'étaient pas complètement traitées dans un modèle unique et une répartition des résultats en 4 plans a été exigée, ceci présente un désavantage. L'interprétation exacte des résultats est rendue difficile. C'est pourquoi, nous avons eu recours aux réseaux de neurones artificiels.

### 2.3.3.2 Application des réseaux de neurones artificiels (RNA) dans l'analyse de propriétés mécaniques des TRG-M

Les RNA sont utilisés pour comprendre la totalité de notre plan expérimental, un seul plan statistique. C'est une flexibilité que les RNA offrent dû à leur pouvoir d'inclure plusieurs facteurs causaux répartis en différents niveaux dans le même test, avant d'estimer l'influence de chacun et le rôle qu'il en joue sur les variables de réponses mesurées. Nous avons utilisé des RNA non-récurrents afin de faciliter le processus d'apprentissage supervisé. La fonction d'activation et de transfert entre les couches cachées et la couche de sortie était une tangente hyperbolique. Celle-ci est une fonction flexible, non-linéaire et continue.

A propos de la validité des modèles statistiques générés par les RNA, le Tableau 2-13 présente le coefficient de détermination ( $R^2$ ), l'erreur moyenne, la corrélation et la MSE obtenus pour le modèle statistique proposé à chaque propriété mécanique. Tous les modèles statistiques avaient une valeur de  $R^2$  qui approchait l'unité : la contribution des variables d'entrée dans l'explication de la variable de sortie est considérée parfaite. Ceci montre que le modèle proposé par les RNA était valide et qu'il était capable d'évaluer et de quantifier la relation entre les variables d'entrée et les variables de réponse: entre les concentrations et les types de polymères utilisés dans la préparation des TRG-M et leurs propriétés mécaniques. La Figure 2-24 élucide les résultats analysés par les RNA en ce qui concerne cette relation.

**Tableau 2-13. Paramètres de validation et de corrélation entre les valeurs actuelles des propriétés mécaniques des hydrogels thermoréversibles et les valeurs prédites par les RNA.**

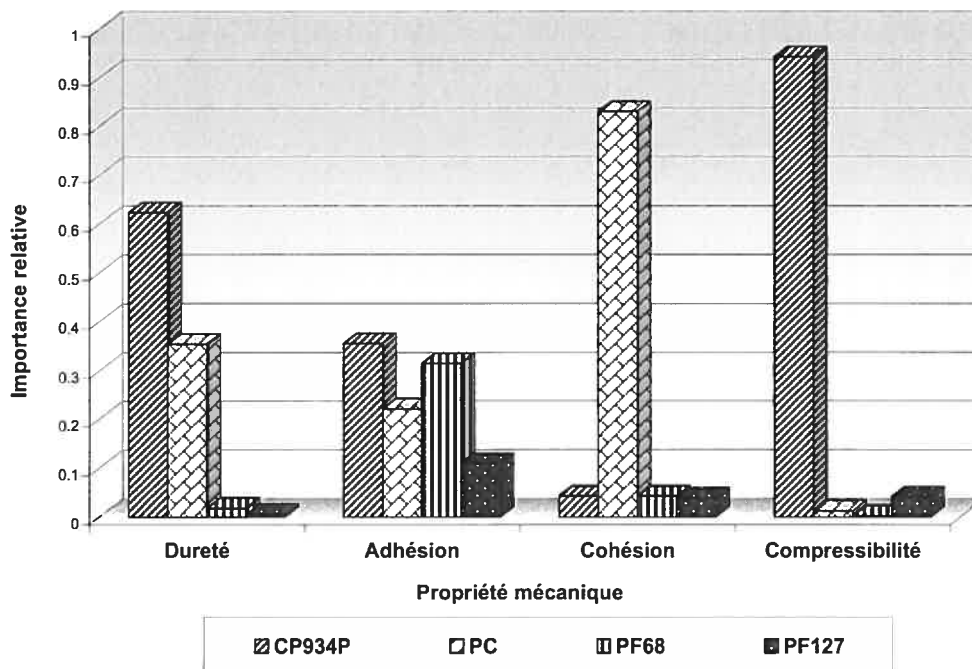
Propriété mécanique	RNA			
	$R^2$	Erreur moyenne	Corrélation	MSE
Dureté	0,951711	0,084437	0,975559	0,016086
Adhésion	0,996472	0,608968	0,998234	0,001397
Cohésion	0,946099	0,024559	0,972676	0,001089
Compressibilité	0,988822	0,164433	0,994105	0,047158

$R^2$  : Coefficient de détermination.

MSE: la somme des carrés des écarts à la moyenne.

Les RNA nous ont montré que la présence de CP934P était le facteur principal influençant la dureté avec une importance relative de 0,623, suivi du deuxième facteur causal : la présence de PC dont l'importance relative avait une valeur de 0,355. La notion « importance relative » ne détermine pas si l'effet était négatif ou positif sur la dureté. Il est connu que le CP934P et le PC sont des agents épaississants en concentrations faibles [81,

85] ; cependant, l'analyse factorielle montrait qu'en combinaison avec les poloxamères dans la même formulation, le polymère mucoadhésif affaiblissait généralement la dureté. Ainsi, l'importance estimée par les RNA dénote plutôt leur impact négatif sur la dureté, tout en soulignant que le CP934P est plus puissant que le PC comme illustré également par l'analyse factorielle, probablement à cause d'une interaction plus prononcée du premier avec les poloxamères.



**Figure 2-24. Importance relative de chaque polymère selon les RNA pour chaque propriété mécanique.**

Quant à l'adhésion, les quatre polymères semblaient y contribuer. Bien qu'il fut montré dans des études antérieures que les polymères polyacrylates neutralisés par la TEA ont une meilleure adhésion que ceux non-neutralisés [43], il y avait un débat à propos d'une différence du pouvoir adhésif des deux polymères mucoadhésifs après leur neutralisation. La capacité d'adhésion de CP934P augmente quand il est neutralisé, alors que la neutralisation du PC affaiblit apparemment sa mucoadhésion [38, 141, 142], une constatation assurée par Tobyn et coll. [74]. A partir des résultats obtenus par la TPA, les RNA ont montré que le CP934P (importance relative de 0,355) avait un impact plus élevé que le PC (0,221) sur l'adhésion. Par ailleurs, les RNA ont montré qu'avec une importance relative de 0,109 qui dépasse 10 %, le PF127 en soi semblait avoir un effet adhésif. En effet, son potentiel mucoadhésif a été suggéré suite à une réduction du taux de clairance des

microsphères chargées dans son gel [143], de même, l'adhésion de son hydrogel thermoréversible au segment iléal du chien a été notée [144]. Pour le PF68, sa contribution de 31,5 % à l'adhésion requiert une étude plus approfondie. La formation de ponts hydrogène entre ses groupes hydroxyles et les groupes carboxyliques de la sonde acrylique, qui pourtant est supposée inerte, serait un argument. D'autre part, cette contribution importante pourrait aller en sens contraire vers une réduction d'adhésion des hydrogels thermoréversibles. Cette suggestion est proposée par l'analyse factorielle puisque l'effet individuel significatif du PF68 était un affaiblissement d'adhésion. Ainsi, en accord avec l'analyse factorielle, les polymères mucoadhésifs sont considérés les facteurs les plus influençant sur l'adhésion d'une formulation TRG.

Comme précédemment illustré, l'évaluation des effets des polymères sur la cohésion n'a pas pu être discriminée entièrement par l'analyse factorielle. Par contre, les RNA ont montré que la cohésion était principalement affectée par le PC (83%). Ce dernier forme un hydrogel chimique intrinsèquement dans un milieu aqueux. Il pourrait perturber significativement l'homogénéité et les forces cohésives entre associations de micelles du PF68 et du PF127, pour finir par affecter la cohésion finale du système TRG.

La compressibilité, le dernier des paramètres mécaniques, était affectée principalement par la présence du CP934P (0,942) dans les systèmes des hydrogels. Cette sensibilité pourrait venir de la nature linéaire du CP934P, puisqu'aucune interaction avec les poloxamères n'a été détectée par l'analyse factorielle.

Une remarque s'impose : Les RNA semblent être extrêmement sensibles aux valeurs numériques des facteurs causaux. Ils permettent la distinction entre les hautes concentrations avec lesquelles le PF127 et le PF68 sont utilisés (respectivement de 9 à 25 % et de 10 à 25 %) et la concentration minimale avec laquelle le CP934P ou le PC sont ajoutés (0,1 %), une distinction que l'analyse factorielle n'arrive pas à déceler complètement. Cependant, l'importance de PF127 et de PF68 donnée par l'analyse factorielle ne peut pas être négligée, puisque ces deux derniers sont les facteurs responsables de la formation des hydrogels physiques autour de 34 °C, par l'agrégation de leurs micelles. La comparaison entre les deux méthodes d'analyse statistique nous engage à conclure que, pour le même degré d'incrément des concentrations, CP934P et PC semblent plus influents sur l'augmentation de la dureté que PF127 et PF68. Enfin, on peut considérer que les deux méthodes statistiques étaient complémentaires; l'une a soutenu l'autre pour

nous fournir un aperçu adéquat sur les rôles et les interactions joués par les multi-composants d'un système TRG-M.

## 2.4 Conclusion

Tout au long de ce chapitre, nous avons tenté de cribler des formulations de TRG-M par la TPA, se basant sur leurs propriétés mécaniques. Le travail a inclus la sélection des combinaisons des polymères (le PF127, le PF68 avec le CP934P ou le PC) dont leurs solutions aqueuses sont aptes à former un TRG-M autour de 34 °C, la validation de la TPA comme une technique in-vitro d'évaluation des propriétés mécaniques pour le criblage des formulations TRG-M, tout en discernant les rôles et les interactions joués par la composition polymérique du système et qui influencent son aspect mécanique.

Concernant la sélection des combinaisons des polymères, nous avons déterminé la  $T_{gel}$  des solutions aqueuses des cinq groupes de combinaisons. Les résultats ont montré que le PF127, le PF68, ainsi que le type et la concentration du polymère mucoadhésif (CP934P versus PC) étaient les quatre facteurs principaux qui affectaient la  $T_{gel}$  du TRG. En plus, une concentration du mucoadhésif qui dépassait 0,1 % p/p pourrait éliminer la propriété de thermoréversibilité. À la fin de cette partie, un nouveau plan expérimental a été développé pour évaluer les propriétés mécaniques. Il conçoit les formulations aqueuses les plus capables de former un TRG-M à  $34 \pm 1$  °C.

Concernant l'évaluation quantitative de l'aspect mécanique des TRG-M de ce plan, l'analyse du profil de texture (TPA) a réussi à cribler ces systèmes. La réussite a été affirmée par une comparaison avec le comportement in-vivo des systèmes qui ont une composition similaire et qui sont cités dans la littérature. Un seuil des valeurs minima requises pour accomplir la fonction d'une forme pharmaceutique à libération contrôlée sur un niveau acceptable, a été quasiment établi.

A propos de l'approche statistique, l'alliance des deux méthodes statistiques non paramétriques : l'analyse factorielle et les RNA, a analysé adéquatement les facteurs principaux qui affectent les propriétés mécaniques des TRG-M formés in-situ. Les modèles statistiques générés et validés ont pu identifier les effets significatifs qu'exerçaient les quatre polymères, ainsi que leurs interactions sur les propriétés mécaniques. Les effets analysés sont en accord avec les effets préalablement cités dans la littérature dénotant, aussi bien la validité de l'analyse statistique que la fiabilité des résultats obtenus par la TPA.



## Chapitre III.

### 3 Complexes de la chlorhexidine avec les cyclodextrines.

---

Après avoir, au chapitre précédent, concentré sur la caractérisation d'une des formes matricielles pharmaceutiques à libération contrôlée : l'hydrogel physique thermoréversible mucoadhésif, en insistant sur l'évaluation de son aspect mécanique et le criblage de ses formulations par la TPA, ce troisième chapitre aborde un autre type de facteurs qui contribuent à la libération contrôlée d'un principe actif. Ce type de facteurs concerne les propriétés physicochimiques du médicament, plus spécifiquement sa faible solubilité aqueuse : l'étape cinétiquement déterminante dans le processus de sa libération de la forme pharmaceutique.

Le principe actif sélectionné est la base de la chlorhexidine (CHX) qui représente un médicament topique insoluble dans l'eau. En solution aqueuse, elle est sujette à être hydrolysée et photolysée en 4-chloroaniline et p-chlorophénylbiguanidine. Afin d'être incorporée dans une forme pharmaceutique matricielle, la CHX en forme du complexe avec une cyclodextrine (CD) semble approprié. Le complexe pourrait améliorer la stabilité de la CHX en solution, sa solubilité aqueuse tout en maîtrisant sa libération. Pourtant, le dynamisme qui caractérise un complexe de la CD et qui lui garantit d'effectuer une solubilisation optimale d'un principe actif, requiert une bonne interaction entre les deux molécules impliquées. Des études antérieures [136, 137] ont montré que le procédé de préparation du complexe de la CD influence le degré d'interaction de cette dernière avec la molécule complexée.

Les objectifs de ce chapitre seraient donc d'enquêter l'effet de CD hydrophile sur la solubilité aqueuse de la CHX, de sélectionner la CD optimale (la  $\beta$ -cyclodextrine «  $\beta$ -CD » versus la 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrine « HP- $\beta$ -CD ») à interagir avec la CHX et de discerner la méthode de préparation du complexe CHX-CD, la plus efficace en ce qui concerne l'incitation d'une forte interaction entre les deux entités et la pureté de leur complexe. A cette fin, plusieurs sortes d'expériences ont été réalisées. Une étude du profil de la courbe de la solubilité de la CHX était exécutée. Des systèmes binaires de la CHX avec la  $\beta$ -CD et l'HP- $\beta$ -CD étaient préparés par des procédés différents : méthodes de préparation en phase liquide comme la lyophilisation et l'évaporation, et méthodes de

préparation en phase semi-solide : le pétrissage et la méthode de la boue. Les systèmes binaires obtenus ont été caractérisés à l'état solide par la calorimétrie différentielle à balayage (DSC) et la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR) et, en solution par la résonance magnétique nucléaire (RMN) du  $^{13}\text{C}$  et du  $^1\text{H}$ . Pour ces expérimentations, les matériaux et la méthodologie sont détaillés, tout en exposant à leur suivi les résultats et leurs discussions.

### **3.1 Matériaux**

La chlorhexidine (CHX) sous forme de base 98% et 99,5% de pureté, la  $\beta$ -cyclodextrine ( $\beta$ -CD) et l'hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrine (HP- $\beta$ -CD) ayant un degré de substitution de 0,6, et le diméthylsulfoxyde hexadeutééré ( $\text{DMSO-}d_6$ ) étaient fournis par Sigma Aldrich Chemical Co. (St. Louis, Mo, USA). L'éthanol 50%, l'acétone et le chloroforme étaient procurés par les Laboratoires MAT, Montréal, Canada. L'eau ultrapure était préparée à l'aide du système Milli Q water system (Millipore corporation, Bedford, MA, USA).

### **3.2 Méthodologie**

Comme la solution de la base de la chlorhexidine est sensible à la lumière, nous avons fait presque toutes les préparations et les expérimentations à l'abri de la lumière, à l'aide d'un emballage avec du papier d'aluminium.

#### **3.2.1 Préparation du mélange Physique (MP)**

Un mélange physique équimolaire (1:1) de la CHX avec la  $\beta$ -CD ou l'HP- $\beta$ -CD était préparé dans un mortier par simple mélange à sec des deux substances, préalablement pesées, en adoptant la méthode de la dilution géométrique où la quantité calculée de la CHX est placée dans le mortier avant d'ajouter, à des étapes précises, une quantité semblable de la CD, tout en soigneusement broyant au pilon le mélange .

#### **3.2.2 Préparation des systèmes binaires**

Le complexe entre la base de la CHX et la  $\beta$ -CD ou l'HP- $\beta$ -CD a été préparé avec une stoechiométrie de 1:1 par des procédés divers. Une fois que le système binaire était obtenu, il a été passé, si nécessaire, à travers un tamis numéro 11 (100 Mesh, Fisher Scientific Company, USA) pour que les particules aient une taille maximum de 150  $\mu\text{m}$ . La manipulation était effectuée avec une attention particulière, afin d'obtenir des échantillons dépourvus d'humidité. Les flacons contenant les échantillons étaient hermétiquement

bouchés, scellés par un Parafilm (Fisher Scientific Company, USA), et conservés congelés dans un récipient contenant le dessiccant : le sulfate de calcium. Les procédés employés dans la préparation des complexes étaient :

### **3.2.2.1 Lyophilisation**

Une quantité stoechiométrique de la CHX était ajoutée à une solution aqueuse de la CD. Après une agitation de 72 heures, la suspension était filtrée à travers un papier filtre Whatmann 45  $\mu\text{m}$ , puis transférée dans un tube centrifuge pour ajuster le volume à 25 ml. Une fois le volume ajusté, le tube était immergé dans de l'azote liquide ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) pendant 5 minutes, afin de congeler son contenu, puis, il était placé dans le lyophilisateur (Labconco Corporation, Kansas city, Missouri, USA).

### **3.2.2.2 Évaporation**

À une solution de  $\beta$ -CD ou d'HP- $\beta$ -CD dans l'eau ultrapure, la quantité exacte de la CHX était ajoutée. La suspension était agitée pendant 72 heures dans le cas de la  $\beta$ -CD et 24 heures dans le cas de l'HP- $\beta$ -CD. La solution claire obtenue après filtration était ensuite évaporée sous vide à  $45^{\circ}\text{C}$  à une vitesse de rotation de 100 rpm à l'aide de l'appareil Rotavapor RE111 (Büchi Laboratoriums Technik Ag, Flawil, Schweiz). Ensuite, le résidu était séché à  $40^{\circ}\text{C}$  pendant 48 heures.

### **3.2.2.3 Pétrissage**

Dans un mortier en verre, la CD était mouillée jusqu'à la formation d'une pâte avec une quantité d'éthanol à 50 % (v/v), atteignant à peu près 30% du poids total de la CD et la CHX. La quantité calculée de CHX était ensuite ajoutée. Ce mélange était pétri pendant 60 minutes. La pâte ainsi obtenue était séchée dans une étuve à  $40^{\circ}\text{C}$  pendant 48 heures.

### **3.2.2.4 Méthode de la boue**

Dans un mortier en verre, une quantité calculée de la CD était mouillée avec une quantité double du solvant. La quantité stoechiométrique de CHX était ajoutée et le mélange était agité pendant 24 heures à la température ambiante. Il était ensuite séché dans une étuve à  $40^{\circ}\text{C}$  pendant 72 heures. Cette méthode a compris plusieurs systèmes de solvants pour être classifiée en sous-type comme ce suit:

1. Méthode de la boue en utilisant l'eau ultrapure comme solvant (BE)

2. Méthode de la boue en utilisant l'eau ultrapure comme solvant (BEL). Le mélange de la CHX et de la CD est ensuite filtré avant d'être lyophilisé. Cette procédure a été utilisée uniquement dans le cas de l'HP- $\beta$ -CD.
3. Méthode de la boue en utilisant le mélange de solvants (BMSol). Le mélange de solvants consistait en eau:chloroforme:acétone:éthanol (1 :1 :1 :1).

### **3.2.3 Caractérisation des systèmes binaires**

#### **3.2.3.1 Établissement des courbes d'étalonnage de chlorhexidine**

Afin d'établir les courbes d'étalonnage pour la CHX, différentes concentrations de la chlorhexidine 99,5 % étaient préparées dans l'eau ultrapure ayant le but d'obtenir des concentrations finales entre 4-20  $\mu\text{g/ml}$ . Le dosage de la CHX était réalisé par la mesure de l'absorbance dans la région UV à  $\lambda_{\text{max}}$  253,5 nm, en utilisant un spectrophotomètre à double faisceau (U-2001 spectrophotometer, Hitachi, USA).

#### **3.2.3.2 Étude de la courbe du profil de solubilité de la CHX**

La surveillance du profil de solubilité de phase de la CHX a été effectuée dans un milieu aqueux de pH autour de 5,5, la valeur du pH de l'eau ultrapure [102] à 25 °C. Les études du profil de solubilité de phase ont été menées selon la méthode de Higuchi et Connors [135]. Une quantité en excès de la solubilité aqueuse intrinsèque de la CHX (50 mg; 0,99 M) a été ajoutée à 10 ml d'eau ultrapure ou à 10 ml d'une solution aqueuse de la CD. La concentration de la CD variait dans ses solutions aqueuses. Les solutions de la  $\beta$ -CD avaient des concentrations allant de 4 à 20 mM; celles de l'HP- $\beta$ -CD avaient des concentrations de 20 à 120 mM. Les suspensions, mises dans des fioles bouchées de 20 ml de capacité, étaient ensuite agitées pendant au minimum 72 heures à 300 rpm à  $25 \pm 2$  °C (G24 Environmental Incubator Shaker, New Brunswick, NJ, USA). Quand l'équilibre était atteint, le contenu de chaque fiole était filtré à travers une membrane 0,45  $\mu\text{m}$ . La concentration de CHX a été déterminée dans la solution filtrée par spectrophotométrie UV. Toutes les solutions étaient produites en triplicata, la moyenne et l'écart type de 3 mesures étaient calculés. La constante de stabilité apparente du complexe ( $K_{\text{stb}}$ ) a été calculée à partir de la ligne droite du diagramme du profil de solubilité de phase selon l'équation suivante :

$$K_{sb} = \frac{S}{S_0(1-S)} \quad \text{Équation 3-1}$$

Où  $S_0$  est la solubilité aqueuse intrinsèque de la CHX (M/L) en absence de la CD; et  $S$  est la pente de la droite. Alors que l'incrément relatif dans la solubilité ( $IRS$ ) de la CHX est calculé d'après l'équation :

$$IRS = \frac{Sol_{sb}}{S_0} \quad \text{Équation 3-2}$$

Où  $Sol_{sb}$  est la solubilité aqueuse de la CHX en présence de la CD.

### 3.2.3.3 Rendement

Pour toutes les méthodes d'obtention, la CHX est mesurée quantitativement par la spectrométrie UV. Le rendement en pourcentage était calculé d'après l'équation :

$$\%rendement = \frac{Q_F}{Q_I} \times 100 \quad \text{Équation 3-3}$$

Où  $\% rendement$  est le rendement final de la CHX dans le système binaire;  $Q_F$  est la quantité de la CHX dans le produit final ;  $Q_I$  est la quantité exacte initiale de la CHX.

### 3.2.3.4 Calorimétrie différentielle à balayage (DSC)

Les thermogrammes de la DSC sont enregistrés sur un calorimètre différentiel à balayage Mettler TA3000 (Mettler Toledo, OH, USA), muni d'un processeur TC-11 pour le traitement des données. L'indium (99,99 %, Tf 156,6 °C,  $\Delta H_f$  28,45 Jg<sup>-1</sup>, Mettler Toledo, OH, USA) a été utilisé comme standard pour la calibration de l'instrument. Une microbalance AT261 DeltaRange® (Metler Toledo, Swizerland) a été utilisée pour peser les échantillons dont chacun contenait une quantité équivalente à 1 mg de la CHX. Dans des coupelles d'aluminium (Mettler Toledo) bouchées et ayant une perforation dans le couvercle, les échantillons de la CHX, les CD, leur mélange physique et leurs systèmes binaires ont été chauffés dans un intervalle de température de 25 à 400 °C, avec une vitesse d'échauffement de 10 °C.min<sup>-1</sup>, sous une atmosphère d'azote sèche ayant un débit de 50 ml.min<sup>-1</sup>. Le degré de cristallisation réduite [145] de la CHX exprimé en pourcentage est calculé à partir de l'équation :

$$Médicament_{DCR\%} = \frac{\Delta H_{mél}}{\Delta H_p} \times 100 \quad \text{Équation 3-4}$$

Où  $DCR\%$  est le degré de cristallisation réduite;  $\Delta H_{mél}$  est l'enthalpie du pic endothermique de la fusion de la CHX en mélange physique ou en système binaire avec la CD et  $\Delta H_p$  est l'enthalpie de la fusion de la CHX pure. Cette équation évalue la puissance de l'action d'amorphisation que la CD exerce sur la CHX.

### 3.2.3.5 Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR)

Les mesures d'infrarouge ont été menées à l'état solide. Les spectres d'IR ont été enregistrés sur un spectrophotomètre d'infrarouge Vector22 de Brüker. Les données sont obtenues sous la forme de transformées de Fourier et traitées par le logiciel OPUS NT 3.1 Build : 3.0.19 (20010420). Tous les spectres étaient la moyenne de 35 balayages de 4000 à 500  $\text{cm}^{-1}$ , à une résolution de 4  $\text{cm}^{-1}$ . Les spectres étaient normalisés avant l'analyse numérique. Un spectre de fond ne contenant aucun échantillon a été soustrait de chaque spectre obtenu. Un décalage de pic est considéré significatif quand il dépasse 8  $\text{cm}^{-1}$  (2 fois la résolution).

### 3.2.3.6 Spectrométrie de Résonance magnétique nucléaire (RMN) en solution

Les données de RMN ont été obtenues à 25 °C à l'aide du spectrophotomètre AMX-400 WB de Brüker, opérant à 400 MHz pour le proton sur des solutions de complexes dans le solvant : le DMSO- $d_6$ . Les valeurs de déplacements chimiques de  $^{13}\text{C}$  ( $\delta^{13}\text{C}$ ) et de  $^1\text{H}$  ( $\delta^1\text{H}$ ) sont exprimées en ppm et ils avaient comme référence interne les signaux du DMSO- $d_6$  respectivement à 39,43 ppm et à 2,5 ppm. La procédure du balayage magnétique de la RMN- $^{13}\text{C}$  découplé pour  $^1\text{H}$  avait les paramètres typiques suivants : une résolution de 0,3 Hz/pt, un délai de relaxation de 5 s, des lectures de pouls à 45°, et un nombre de balayages total de 512 pour chaque échantillon. Tous les spectres obtenus ont été traités par le logiciel MestRe-C (version Beta 3.6.9).

Les déplacements chimiques des protons de la CHX sont attribués d'après le spectre type de 1-(p-chlorophényle)-5-isopropylbiguanide hydrochlorure [102, 146], alors que ceux du carbone  $^{13}\text{C}$  sont alloués selon les données citées par Cortés et coll. [103]. Pour la  $\beta$ -CD et l'HP- $\beta$ -CD, les valeurs des déplacements chimiques des protons et des carbones  $^{13}\text{C}$  sont attribuées d'après celles mentionnées respectivement par les équipes de Schneider et de Kim [147, 148]. Afin d'obtenir les changements dans les déplacements chimiques, l'équation suivante a été utilisée :

$$\Delta\delta = \delta_{\text{complexe}} - \delta_{\text{libre}} \quad \text{Équation 3-5}$$

Où  $\delta_{\text{complexe}}$  est le déplacement chimique du proton ou du carbone du système binaire de la CHX avec la CD;  $\delta_{\text{libre}}$  est le déplacement chimique de la molécule pure de la CHX ou de la CD  $\Delta\delta$  est la différence dans ces deux types de déplacements chimiques.

### 3.2.4 Approche statistique

Les résultats de l'étude du profil de solubilité de phase de la CHX en présence de chacune des deux CD, étaient analysés statistiquement par la régression linéaire suivie du test  $t$  et l'analyse de variance ANOVA à un critère de classification. Le logiciel utilisé dans l'analyse statistique était SigmaStat pour Windows version 3.0.1. (SPSS. Inc.).

## 3.3 Résultats et Discussion

Il faut noter qu'au cours de cette étude, nous avons utilisé le terme « système binaire » pour décrire le produit obtenu lors de chacune des méthodes d'obtention exploitées pour préparer le complexe de la CHX avec les CD étudiées. Ce terme nous semble plus précis que le terme 'complexe' puisqu'une assurance que le produit obtenu est un complexe n'est garantie qu'après sa caractérisation.

### 3.3.1 Courbes d'étalonnage de la chlorhexidine

Les courbes d'étalonnage de la CHX ont été établies en fonction de sa concentration. Un exemple d'une équation obtenue pour une courbe d'étalonnage est illustré comme suit :

$$A = -0,0103 + 0,0569 C \quad \text{Équation 3-6}$$

Où  $A$  est l'absorbance en UV de la CHX à  $\lambda_{\text{max}}$  253,5 nm ;  $C$  est la concentration de la CHX en  $\mu\text{g/ml}$ .

### 3.3.2 Étude de la courbe du profil de solubilité de la CHX

La CHX a montré une interaction avec chacune des deux CD : la  $\beta$ -CD et l'HP- $\beta$ -CD. Le diagramme du profil de la solubilité de phase (Figure 3-1) nous montre que la solubilité de la CHX a augmenté. L'augmentation de la solubilité a suivi un modèle linéaire avec l'accroissement de la concentration de 4 à 16 mM pour la  $\beta$ -CD et de 20 à 120 mM pour l'HP- $\beta$ -CD. Afin d'éliminer toute source de variabilité aléatoire due aux processus de préparation, de manipulation ou de dilution que l'expérimentation et l'estimation de la

solubilité exigent, une analyse statistique a été exécutée, suivie de l'analyse de variance ANOVA à un facteur (Tableau 3-1). Ainsi, la nature de la relation linéaire entre la solubilité aqueuse accrue de la CHX et la concentration de la CD a été évaluée. La régression linéaire a produit des coefficients de corrélation respectivement de 0,997 et 0,998 pour la  $\beta$ -CD et l'HP- $\beta$ -CD. Les valeurs obtenues de F (respectivement 2010,337 et 4847,726) dépassaient la valeur critique de F pour un niveau de confiance de 99 %. Ceci confirme sans aucun doute que chacune des deux CD : la  $\beta$ -CD et l'HP- $\beta$ -CD a augmenté significativement la solubilité aqueuse de la CHX. Les valeurs de la pente de la portion linéaire des courbes de solubilité ont été respectivement de 0,0705 et 0,0375 pour la  $\beta$ -CD et l'HP- $\beta$ -CD, Figure 3-1. Cette valeur qui est inférieure à l'unité, confirme que le complexe formé était du premier ordre par rapport à la CD. Par conséquent, on peut supposer que la stoechiométrie du complexe est équimolaire (1:1). Quant à la valeur déterminée de la constante de stabilité  $K_{stab}$ , elle était de  $456,19 \pm 11,78 \text{ M}^{-1}$  pour les triplicatas du complexe de la CHX avec la  $\beta$ -CD, et de  $184,64 \pm 20,21 \text{ M}^{-1}$  pour l'HP- $\beta$ -CD. Dans cette optique, on assume que la  $\beta$ -CD formait un complexe avec la CHX plus stable et moins dynamique que le complexe formé par l'HP- $\beta$ -CD avec la même molécule. La stabilité relativement inférieure du complexe de la CHX avec l'HP- $\beta$ -CD peut avoir son origine de l'encombrement stérique du groupe hydroxypropyle qui pourrait gêner une interaction forte entre la CHX et la cavité de l'HP- $\beta$ -CD [136].

**Tableau 3-1. Paramètres statistiques obtenus de l'étude du profil de solubilité de phase de la CHX avec la CD, calculés par la régression linéaire combinée avec ANOVA à un facteur.**

Paramètre	$\beta$ -CD	HP- $\beta$ -CD
Équation de régression	$X = 0,159 + 0,0705Y$	$X = 0,216 + 0,0375Y$
Coefficient de corrélation (de Pearson)	0,997	0,998
Coefficient de détermination	0,994	0,996
Degrés de liberté	(1, 13)	(1, 19)
F	2010,337	4847,726
Probabilité > F	<0,001	<0,001

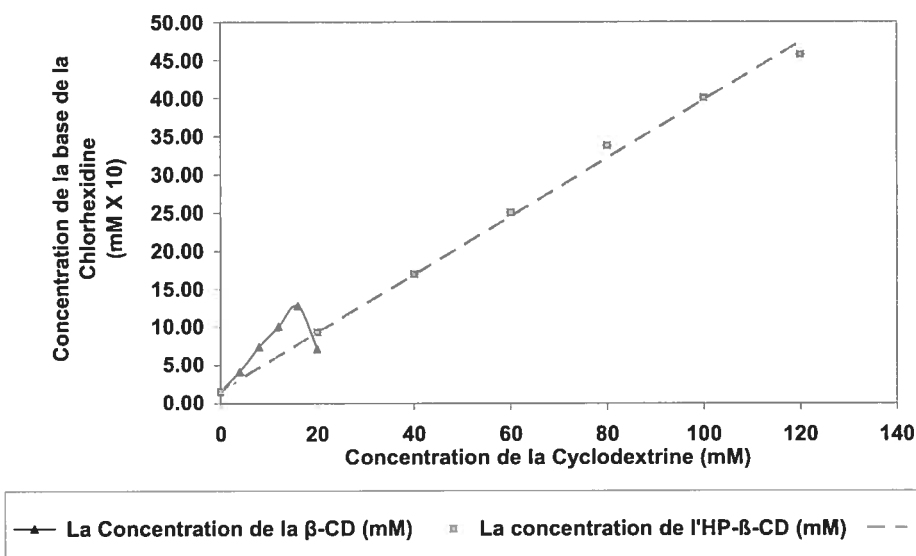
Où X= Solubilité aqueuse de la CHX en mM;  
Y= Concentration de la CD en mM.

Valeurs critiques de F à P = 0,01 : F (1, 13) = 9,33  
F (1, 19) = 8,18

À une concentration de  $\beta$ -CD au-dessus de 16 mM (la limite de sa solubilité aqueuse correspondant à 1,85 % p/v), la solubilité aqueuse accrue de la CHX commençait à diminuer, mais elle restait au-dessus de sa solubilité intrinsèque (Figure 3-1). Cette réduction de solubilité semble être liée directement à la faible solubilité de la  $\beta$ -CD dans l'eau. Ainsi, selon Higuchi [135], les diagrammes de solubilité de phase de la CHX avec



chacune des deux CD sont du type « A », dénotant la formation d'un complexe soluble dans l'eau. Pourtant, elles sont classifiées différemment : Une courbe était de type  $A_N$  dans le cas de la  $\beta$ -CD et l'autre était du type  $A_L$  avec l'HP- $\beta$ -CD, suggérant que cette dernière pourrait être un agent solubilisant plus efficace pour la CHX par rapport à la  $\beta$ -CD. En effet, cette observation est confirmée en suivant les incréments relatifs de la solubilité aqueuse (IRS) de la CHX en présence de chacune des CD, Tableau 3-2. La valeur maximale de l'IRS atteignait respectivement 7,74 et 27,64 pour la  $\beta$ -CD et l'HP- $\beta$ -CD. L'effet solubilisant relativement haut de l'HP- $\beta$ -CD peut provenir de sa solubilité aqueuse supérieure.



$\beta$ -CD :CHX :  $K_{stb} = 456,19 \pm 11,78 \text{ M}^{-1}$  (n=3).

HP- $\beta$ -CD :CHX :  $K_{stb} = 84,64 \pm 20,21 \text{ M}^{-1}$  (n=3).

Figure 3-1. Diagramme de solubilité de phase de la base de la CHX avec les cyclodextrines dans l'eau ultrapure à 25°C.

Tableau 3-2. La variation de la solubilité aqueuse et l'incrément relatif de solubilité déterminés pour la CHX à 25 °C par l'étude du profil de la solubilité de phase en fonction de la concentration de chacune des CD.

Concentration de la $\beta$ -CD (mM)	Solubilité aqueuse de la CHX (mM) <sup>a</sup>	IRS de la CHX	Concentration de l'HP- $\beta$ -CD (mM)	Solubilité aqueuse de la CHX (mM) <sup>a</sup>	IRS de la CHX
0	0,17 ± 0,01	1,00	0	0,17 ± 0,02	1,00
4	0,42 ± 0,03	2,53	20	0,94 ± 0,04	5,67
8	0,74 ± 0,06	4,49	40	1,70 ± 0,01	10,30
12	1,01 ± 0,01	6,10	60	2,50 ± 0,04	15,14
16	1,28 ± 0,04	7,74	80	3,38 ± 0,03	20,42
20	0,71 ± 0,08	4,32	100	4,00 ± 0,05	24,22
—	—	—	120	4,57 ± 0,03	27,64

<sup>a</sup> Chaque valeur est la moyenne ± écart-type (n=3).

Les rangs ombrés représentent le rehaussement relatif maximum de la solubilité aqueuse de la CHX dans l'intervalle de concentrations étudié pour la  $\beta$ -CD ou l'HP- $\beta$ -CD.

### 3.3.3 Caractérisation des systèmes binaires de la CHX avec la CD

Afin d'évaluer les différentes méthodes destinées à former le complexe de la CHX avec la CD, certains critères ont été étudiés. Le rendement en pourcentage est intéressant à explorer, si la méthode d'obtention du complexe serait appliquée sur une échelle industrielle. Le degré d'interaction entre la CHX, Figure 3-2, et la CD, est ensuite examiné par la DSC, la FT-IR et la RMN en solution. La DSC donne une idée générale sur le degré d'interaction dans un système donné entre une CD et une molécule invitée, alors que la FT-IR et la RMN fournissent un aperçu plus approfondi sur le degré et le type d'interaction qui pourraient y exister sur le niveau moléculaire. Puisque nous utilisons deux CD pour interagir individuellement avec la CHX, pour les trois techniques, nous allons exposer séparément les résultats concernant la  $\beta$ -CD, et celles concernant l'HP- $\beta$ -CD dans le but de faciliter l'interprétation des résultats.

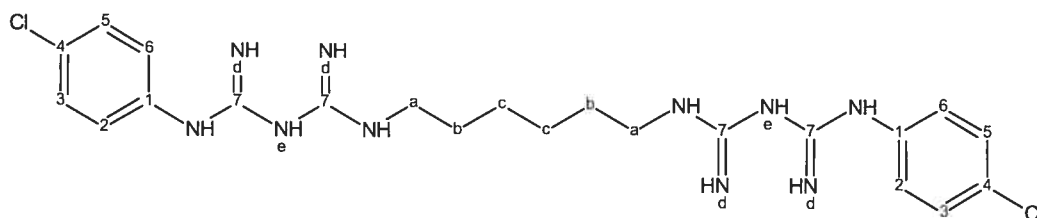


Figure 3-2. Structure chimique de la base de la chlorhexidine où les carbones et les protons sont numérotés.

#### 3.3.3.1 Rendement

Nous avons commencé une comparaison entre les différentes méthodes d'obtention du complexe de la CHX avec la  $\beta$ -CD ou l'HP- $\beta$ -CD par l'estimation du rendement de la CHX dans son système binaire avec la CD pour chaque méthode (Tableau 3-3). Puisque, pour toutes les méthodes, la présence de la CD n'a pas modifié la  $\lambda_{\max}$  de la CHX, la détermination quantitative était considérée précise. Dans le cas des deux CD, l'évaporation et la lyophilisation semblaient être les méthodes qui produisaient le plus bas niveau de rendement final de la CHX dans le système binaire, respectivement 47,6 et 54,2 % pour la  $\beta$ -CD et 49,5 et 66,3 % pour l'HP- $\beta$ -CD. De même, la perte de la CHX semblait être grave dans le cas de la BEL (36,9 %). Le rendement bas peut être expliqué par la procédure assez compliquée suivie dans chacune de ces méthodes. Pour la lyophilisation et la BEL, la filtration exige la formation d'une solution claire de la CHX avant d'effectuer le séchage à froid. Ceci élimine la CHX non-solubilisée et amplifie la pureté du complexe de la CHX :

CD dans leur système binaire. Quant à l'évaporation, une perte semblait inévitable à cause de la manipulation du mélange de la CHX avec la CD et son transfert d'un équipement à l'autre afin d'évaporer l'eau utilisée dans cette préparation.

**Tableau 3-3. Rendement en pourcentage de la CHX dans son système binaire avec la  $\beta$ -CD ou avec l'HP- $\beta$ -CD préparés par diverses méthodes.**

Méthode	CHX : $\beta$ -CD	CHX :HP- $\beta$ -CD
Évaporation	47,6	49,5
Lyophilisation	54,2	66,3
Pétrissage	94,1	94,4
BE	91,2	96,5
BEL	—	36,9
BMSol	95,4	97,1

### 3.3.3.2 Calorimétrie différentielle à balayage (DSC)

La DSC démontre facilement une interaction entre la CD et la molécule invitée. Un changement de comportement thermique de cette dernière : une disparition ou une réduction dans l'intensité de son pic de fusion, par la suite dans l'enthalpie de fusion «  $\Delta H_f$  », ou un décalage de la température du pic «  $T_{pic}$  » sont des indices sur l'action d'amorphisation que la CD exerce sur la molécule complexée. Pour explorer l'interaction entre la CHX et chacune des deux CD, nous avons procédé à balayer thermiquement non seulement le système binaire obtenu par chaque méthode d'obtention, mais aussi, le mélange physique (MP). Une action d'amorphisation détectée dans un système binaire, et non dans le système du MP, dénote une interaction incitée par la méthode d'obtention en question.

#### 3.3.3.2.1 Thermogrammes des systèmes binaires de la CHX avec la $\beta$ -CD

Les thermogrammes de la CHX et de la  $\beta$ -CD pures ainsi que ceux de MP et de systèmes binaires préparés sont illustrés sur la Figure 3-3. Le thermogramme de la CHX pure, courbe « a », se montrait tel qu'un thermogramme typique d'un composé cristallin non hydraté, avec son pic endothermique aigu et fort à 136,6 °C provenant de sa fusion. Ce pic endothermique était accompagné par deux autres pics. Il était précédé d'un pic endothermique faible qui s'étendait de 107,8 à 129,5 avec une  $T_{pic}$  de 125,3 °C et une enthalpie  $\Delta H$  de 9,02 J/gm. Ce pic endothermique minime pourrait résulter de la 4-chloroaniline étant donné que la CHX avait une pureté de 98 % et que la 4-chloroaniline pourrait être le produit de la décomposition thermique au cours de la procédure de DSC. Le

deuxième pic (165,3 °C à 222,7 °C) était exothermique avec une  $T_{pic}$  de 188,7 °C et une enthalpie de 66.94 J/gm; il dénotait plutôt la décomposition de la CHX.

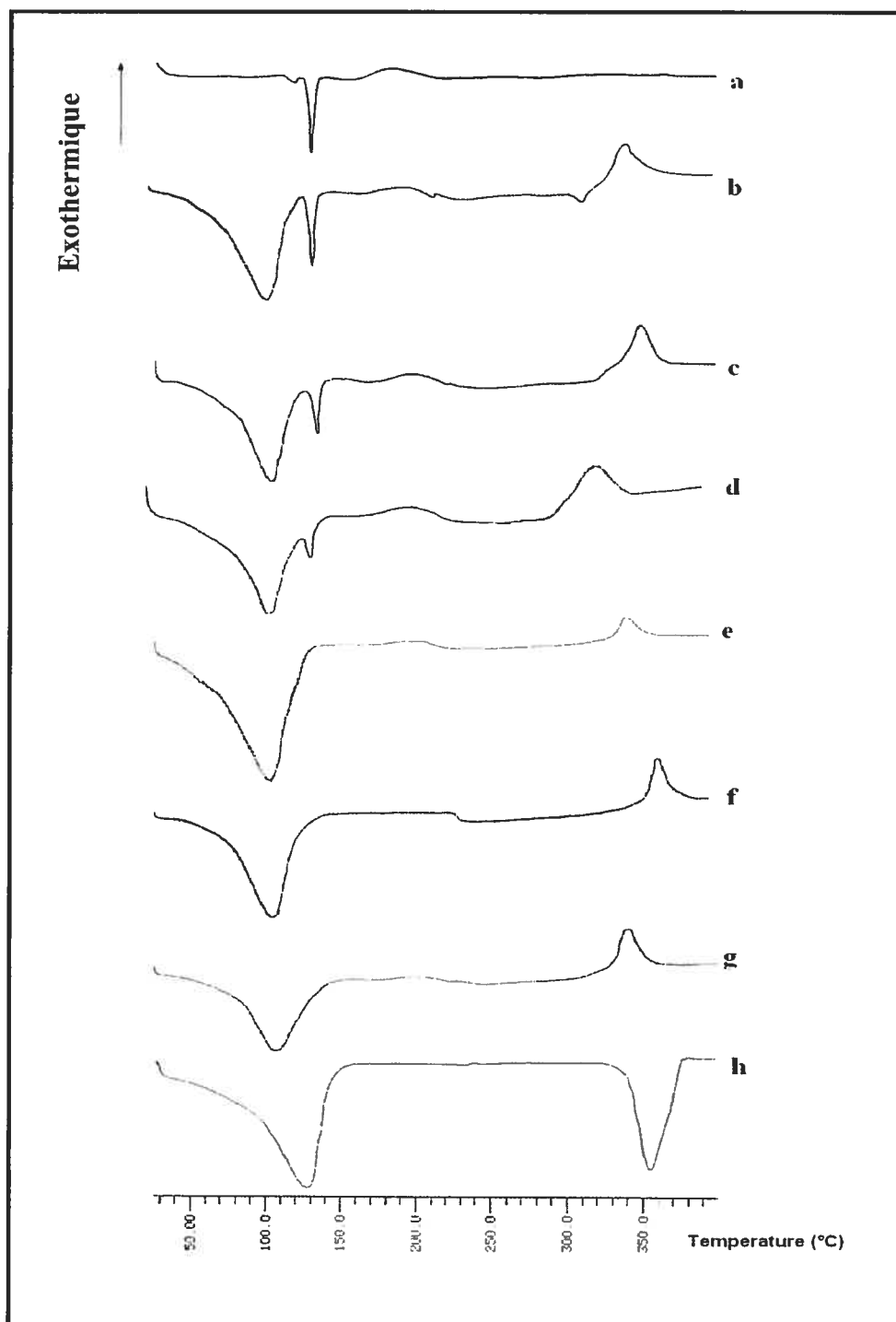


Figure 3-3. Thermogrammes DSC de : CHX (a), MP de la CHX avec la  $\beta$ -CD (b); systèmes binaires préparés par : Pétrissage (c) ; BMSol (d); Évaporation(e); Lyophilisation (f); BE (g); La  $\beta$ -CD pure (h).

Quant au thermogramme « h » qui appartient à la  $\beta$ -CD pure, il était en accord avec son comportement thermique étudié par Giordano[149]. Il montrait une large bande endothermique qui s'étendait de 25 à 138,4 °C avec une  $T_{pic}$  de 118,4 °C provenant de la déshydratation de sa cavité hydrophobe. Deux autres pics apparaissaient. Le premier était un pic exothermique (217,3 °C à 224,4 °C) avec une  $T_{pic}$  de 220,4 °C qui représentait la transition et le réarrangement de la structure du cristal suite à la perte des molécules d'eau de cristallisation. Le deuxième pic était endothermique et commençait autour de la température de 320 °C et représentait la combustion de la  $\beta$ -CD.

Comparons d'abord le thermogramme du MP de la CHX et de la  $\beta$ -CD, courbe « b », versus les thermogrammes individuels de chacune de ces molécules. Le profil thermique dans la première partie du thermogramme (de 25 à 250 °C) est similaire au résultat d'un simple ajout des deux thermogrammes individuels de la CHX et de la  $\beta$ -CD. Le pic endothermique de la fusion de la CHX est apparu après le pic endothermique provenant de la déshydratation de la CD. Comme indiqué au Tableau 3-4, l'intensité du pic endothermique de la CHX pure est réduite de seulement 5,8 %, tout en conservant la température de fusion autour de 136,6 °C.

Par respect à ce qui précède, les différentes méthodes d'obtention des complexes de la CHX avec la  $\beta$ -CD ont démontré une variation quant au degré de l'action d'amorphisation de la  $\beta$ -CD sur la CHX, représenté par la réduction de l'intensité du pic de fusion de cette dernière. Cette variation s'est manifestée aussi dans l'élargissement de la base du pic, dans son aire,  $\Delta H_f$ , et dans le décalage de la  $T_{pic}$ . Une disparition complète du pic endothermique de fusion de la CHX dénotait un degré de cristallisation réduite (DCR %) maximal comme dans les cas de l'évaporation, de la lyophilisation et de la BE (100%). Le DCR % a atteint 46 % dans le cas du pétrissage et 69 % pour la BMSol. Notons qu'en BE et BMSol, la même procédure a été suivie, seulement le solvant a différencié. Si nous arrangeons les méthodes d'obtention des complexes de la CHX avec la  $\beta$ -CD, dans l'ordre décroissant selon le pouvoir de rendre amorphe la molécule de la CHX, on trouve ce qui suit: Évaporation, lyophilisation, BE >> BMSol > pétrissage. Prenons en compte que la lyophilisation est une procédure d'amorphisation en soi. Ainsi, la disparition du pic endothermique de la fusion de la CHX dans un cas où la lyophilisation a été employée, ne pourrait pas être traduite exclusivement en terme d'une inclusion ou d'une interaction optimale de la CHX avec la cavité hydrophobe ou les agrégats de la CD. Elle pourrait être

due au procédé. Dans cette optique, la DSC ne permet pas de juger le degré exact de l'interaction dans les lyophilisats de la CHX avec la  $\beta$ -CD.

Tableau 3-4.  $T_{pic}$ , intervalle de fusion, enthalpie de fusion ( $\Delta H_f$ ) et degré de cristallisation réduite (DCR %) déterminés à partir de la calorimétrie DSC pour la CHX et ses systèmes binaires avec la  $\beta$ -CD.

Méthode de préparation	$T_{pic}$ (°C)	intervalle de fusion (°C)	$\Delta H_f$ (J/gm)	DCR %
CHX pure	136,6	121,9-138,2	85,4	0,0
MP	136,6	127,1-147,3	80,4	5,8
Évaporation	—	—	0,0	100,0
Lyophilisation	—	—	0,0	100,0
Pétrissage	133,7	128,1-148,8	46,1	46,0
BE	—	—	0,0	100,0
BMSol	135,8	131,3-145,7	35,1	68,9

### 3.3.3.2.2 Thermogrammes des systèmes binaires de la CHX avec l'HP- $\beta$ -CD

La Figure 3-4 montre les thermogrammes de la CHX pure, l'HP- $\beta$ -CD pure, leur MP ainsi que leurs systèmes binaires obtenus par les méthodes d'obtention diverses. Abordons d'abord le thermogramme de l'HP- $\beta$ -CD pure, courbe « i ». Celui-ci ne différait pas du thermogramme de la  $\beta$ -CD en ce qui concerne les plages de températures des pics : un pic endothermique de déshydratation s'étendait de 25 °C à 140 °C et un pic endothermique qui correspondait à la combustion de l'HP- $\beta$ -CD (296,7 °C à 356,8 °C). Normalement, le pic exothermique (autour de 220 °C) qui correspondait à la transition de la forme de cristal de la  $\beta$ -CD a disparu dans le thermogramme de l'HP- $\beta$ -CD, puisque celle-ci est d'une nature amorphe [127].

En comparaison avec le thermogramme de la CHX, courbe « a », le MP de l'HP- $\beta$ -CD avec la CHX, courbe « b », a démontré un élargissement léger de la base de son pic de fusion, accompagné par une réduction de seulement de 6,2 % dans l'enthalpie. La réduction pourrait se produire suite au processus d'échauffement mené durant la DSC. À l'exception de la réduction légère d'enthalpie de fusion de la CHX, le thermogramme du MP se montre comme le résultat de combinaison des deux thermogrammes des composés purs dans la plage de température de 25 à 300 °C. Les méthodes d'obtention du complexe de la CHX avec l'HP- $\beta$ -CD ont différencié à propos de leur pouvoir d'inclure la CHX dans la cavité ou parmi les agrégats de l'HP- $\beta$ -CD. Selon leur DCR %, ils avaient cet ordre décroissant : Évaporation, Lyophilisation > BEL > BMSol > BE > pétrissage. Pour les méthodes où le pic endothermique était détectable, on peut déceler qu'il y avait un déplacement de  $T_{pic}$  de

fusion de la CHX (de  $-5,1$  à  $+0,2$  °C), accompagné par un élargissement de sa base, Tableau 3-5.

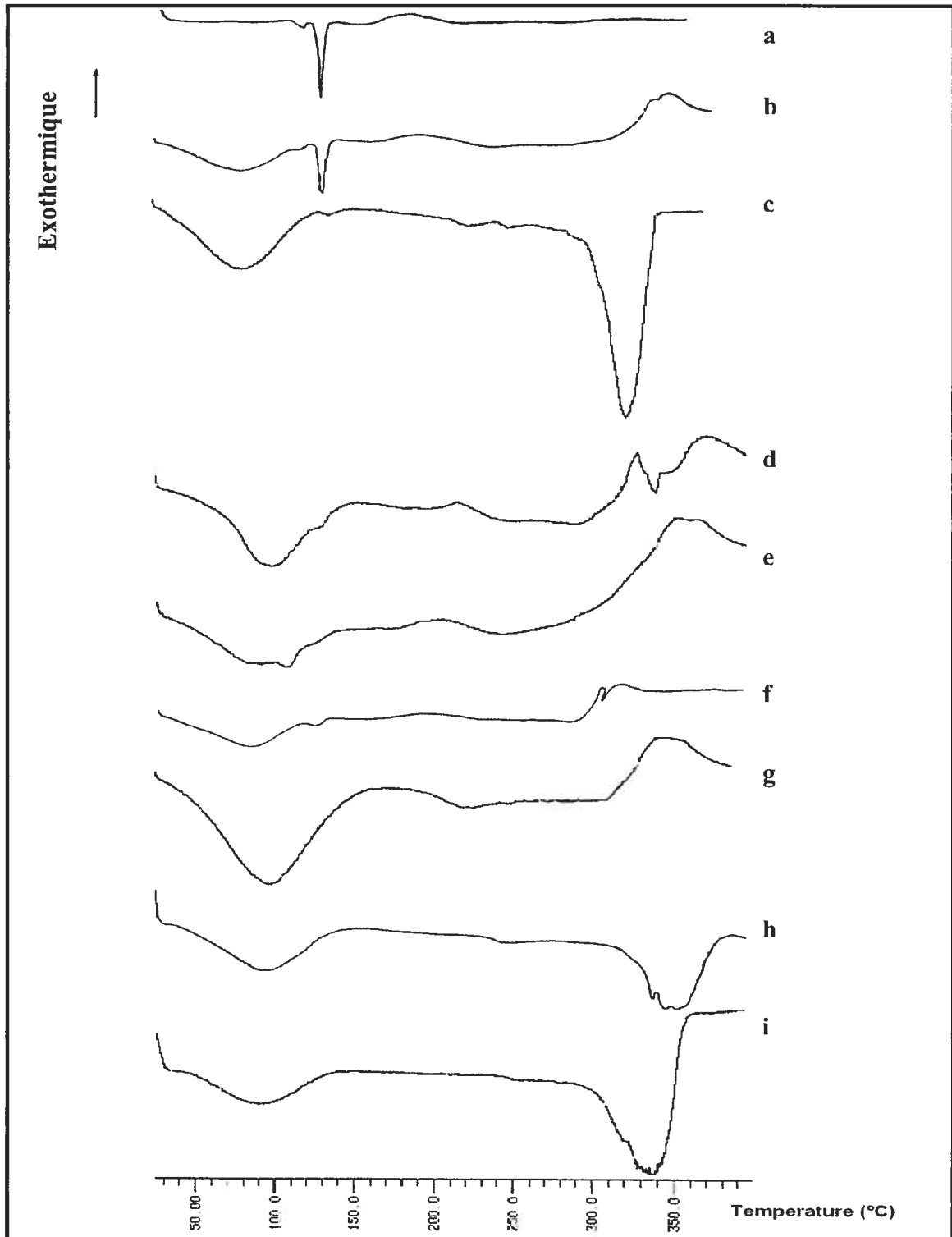


Figure 3-4. Thermogrammes de la CHX avec l' HP- $\beta$ -CD : CHX (a), MP avec l'HP- $\beta$ -CD (b), des systèmes binaires préparés par : BEL (c), BE (d), pétrissage (e), BMSol (f); Évaporation (g) ; Lyophilisation (h); L' HP- $\beta$ -CD pure (i).

Pour une deuxième fois, la même procédure ne provoquait pas une interaction identique puisque la BMSol a encouragé l'interaction de l'HP- $\beta$ -CD avec la CHX plus que la BE (respectivement la DCR % de la CHX était de 91,2 % et 81,6 %). L'ordre de ces deux méthodes de boue était inversé en comparaison avec la  $\beta$ -CD, ce qui indiquait que le solvant et le type de la CD influençaient le degré d'interaction avec la CHX. La BEL a produit un DCR % de 91,7 %, on peut songer à son efficacité supérieure par rapport au BMSol et à la BE. Pourtant cette supériorité peut être expliquée partiellement par l'effet d'amorphisation du séchage à froid impliqué dans sa procédure. En outre, la disparition incomplète de ce pic de fusion pourrait dénoter la recristallisation partielle de la CHX en élevant la température durant le balayage en DSC [150]. Dans cette optique, l'absence d'une réapparition du pic de fusion –une recristallisation--de la CHX pour la méthode de lyophilisation (respectivement courbe « h » Figure 3-4 , et courbe « f » Figure 3-3, pour l'HP- $\beta$ -CD et la  $\beta$ -CD) pourrait suggérer qu'une interaction assez importante entre la CHX et la CD en question a été incitée par la lyophilisation.

**Tableau 3-5.**  $T_{pic}$ , intervalle de fusion, enthalpie de fusion ( $\Delta H_f$ ) et degré de cristallisation réduite (DCR %) déterminés à partir de la calorimétrie DSC pour la CHX et ses systèmes binaires avec l'HP- $\beta$ -CD.

Méthode de préparation	$T_{pic}$ (°C)	intervalle de fusion (°C)	$\Delta H_f$ (J/gm)	DCR %
CHX pure	136,6	121,9-138,2	85,4	0,0
MP	136,6	122,9-139,8	80,1	6,2
Évaporation	—	—	0,0	100,0
Lyophilisation	—	—	0,0	100,0
Pétrissage	136,2	129,5-145,7	21,4	74,9
BE	136,8	118,6-144,3	15,7	81,6
BEL	134,2	127,1-149,1	7,1	91,7
BMSol	131,5	120,1-138,3	7,5	91,2

En comparaison avec la  $\beta$ -CD, l'HP- $\beta$ -CD a paru comme une meilleure candidate pour maintenir une interaction relativement forte avec la CHX puisque, le DCR % n'a diminué en aucune méthode au-dessous de 74,9 %, face à 46,0% pour la  $\beta$ -CD. Les deux pourcentages concernaient le pétrissage. Le pétrissage, où l'éthanol 50 % est utilisé, s'avérait être la méthode la plus pauvre à induire une interaction. Ce solvant est soupçonné être en compétition avec les molécules extrêmement hydrophobes sur l'inclusion dans la cavité de la CD [151]. Pourtant, Stella et coll. [113] ont mentionné qu'au contraire aux solvants organiques, l'éthanol ne déplace pas les molécules invitées de la cavité hydrophobe de la CD.



### 3.3.3.3 FT-IR

La méthode de la FT-IR a été sélectionnée afin d'évaluer et de comparer au niveau moléculaire l'interaction entre la CHX et la CD dans leurs systèmes binaires à l'état solide. Les déplacements de la position des maximums et les changements dans le comportement des bandes d'absorbance ont été étudiés. Ces changements sont accouplés aux variations de l'environnement moléculaire de la CHX ou de la CD et peuvent être corrélés à leur complexation. Une réduction d'intensité pourrait être considérée puisque les échantillons examinés ont été manipulés pareillement : même quantité du système binaire a été utilisée, aucun solvant, ni des pastilles de KBr dont la variation en épaisseur pourrait affecter l'intensité des bandes, n'ont été employés dans les échantillons examinés.

L'étude des bandes d'absorbance des groupements fonctionnels qui caractérisent le spectre FT-IR de la CHX a compris quatre régions principales :

1. 3550-3275  $\text{cm}^{-1}$  : des bandes étroites et multiples ayant une absorbance faible dues aux vibrations d'élongation ( $\nu_{\text{N-H}}$ ) symétriques et asymétriques des liens N-H des groupes iminés et aminés secondaires des deux groupements guanidines.
2. 1650-1571  $\text{cm}^{-1}$  : des bandes fortes dues aux vibrations de déformation angulaire des liens N-H et des vibrations d'élongation des liens C=N des groupements guanidines.
3. 1600-1560 et 1501-1430  $\text{cm}^{-1}$  : des bandes moyennes des vibrations d'élongation des liens C=C aromatiques, des vibrations de déformation angulaire dans le plan des liens C-H du cycle du p-chlorophényle ayant des pics d'une intensité moyenne dans les nombre d'ondes entre 1630-1590, 1430-1320, 1120-1050, et 1030-975  $\text{cm}^{-1}$ , les bandes de la p-substitution dans la région de 1501-1430  $\text{cm}^{-1}$ .
4. À 859  $\text{cm}^{-1}$ , une bande à absorbance faible de la déformation angulaire hors plan des liens C-H du cycle aromatique de la p-chlorophényle.

Pour les CD, soit la  $\beta$ -CD soit l'HP- $\beta$ -CD, on a étudié la bande distincte et large des vibrations d'élongation des groupements hydroxyles primaires et secondaires [152]. Son intensité est faible à l'état solide grâce à la présence des ponts hydrogène intramoléculaires entre les groupes hydroxyles de la CD. Son maximum est situé à 3335  $\text{cm}^{-1}$  pour la  $\beta$ -CD et 3364  $\text{cm}^{-1}$  pour l'HP- $\beta$ -CD. Les vibrations de la déformation angulaire dans le plan provenant des groupements hydroxyles ont été considérées. Elles ont une faible absorbance avec un maximum à 1647  $\text{cm}^{-1}$  pour la  $\beta$ -CD et 1635  $\text{cm}^{-1}$  pour l'HP- $\beta$ -CD [126, 152].

### 3.3.3.3.1 Les spectres FT-IR des systèmes binaires de la CHX avec la $\beta$ -CD

Dans le cas de la  $\beta$ -CD avec la CHX (Figure 3-5 « I »), les bandes d'élongation des liens N-H ( $\nu_{N-H}$ ) des groupements guanidines de la CHX (3550-3275  $\text{cm}^{-1}$ ) étaient élargies, intensifiées et déplacées vers des fréquences plus basses. Un décalage de pic de 28 à 42  $\text{cm}^{-1}$  pourrait être significatif dans le cas des méthodes de la lyophilisation, de l'évaporation, et de la méthode de boue BE (Tableau 3-6). Pour le pétrissage et le BMSol, le déplacement était moins prononcé. Le MP montre quand même un décalage assez important (19  $\text{cm}^{-1}$ ) d'un des pics de la bande d'élongation. L'élargissement des bandes étroites de liens N-H ou leur camouflage par la bande large des hydroxyles de la  $\beta$ -CD pointe vers une perturbation des ponts hydrogène intramoléculaires des guanidines. Une formation de ponts hydrogène intermoléculaires avec les groupements hydroxyles de la  $\beta$ -CD serait probable.

Tableau 3-6. Pics d'absorbance IR des groupes fonctionnels des systèmes binaires de la CHX avec la  $\beta$ -CD préparés par les différentes méthodes d'obtention.

La CHX, la $\beta$ -CD ou leur système binaire	Élongation des liens N-H des groupements guanidines de la CHX ou des hydroxyles de la $\beta$ -CD		Déformation angulaire des liens N-H des groupements guanidines		Déformation angulaire dans le plan des liens C-H du cycle de la p-chlorophényle	
	Pic ( $\text{cm}^{-1}$ )	Pic ( $\text{cm}^{-1}$ )	Pic ( $\text{cm}^{-1}$ )	Classement selon l'intensité	Pic ( $\text{cm}^{-1}$ )	Classement selon l'intensité
CHX	3368	3475	1600	1	1472	1
$\beta$ -CD	3326	—	—	—	—	—
MP	3349	3475	1601	2	1470	2
Lyophilisation	3340	—	1611	7	1484	7
Évaporation	3336	—	1608	6	1482	6
Pétrissage	3363	3475	1605	3	1481	3
BMSol	3336	3470	1605	5	1478	5
BE	3326	—	1611	4	1490	4

Pour les vibrations de déformation angulaire des mêmes liens N-H des groupements guanidines (Figure 3-5 « II », entre 1650-1571  $\text{cm}^{-1}$ ), le déplacement était relativement faible vers des fréquences plus hautes pour toutes les méthodes de préparation. Le déplacement était plus prononcé dans le cas de la lyophilisation, de l'évaporation, et de la BE, alors qu'il était moins significatif dans le cas du pétrissage et de la BMSol. Les vibrations dans le cas du MP étaient presque immuables. Pour le troisième type de bandes d'absorbance (Figure 3-5 « II ») provenant des vibrations de déformation angulaire dans le plan des liens C-H du cycle de p-chlorophényle, l'intensité de la bande a été réduite.

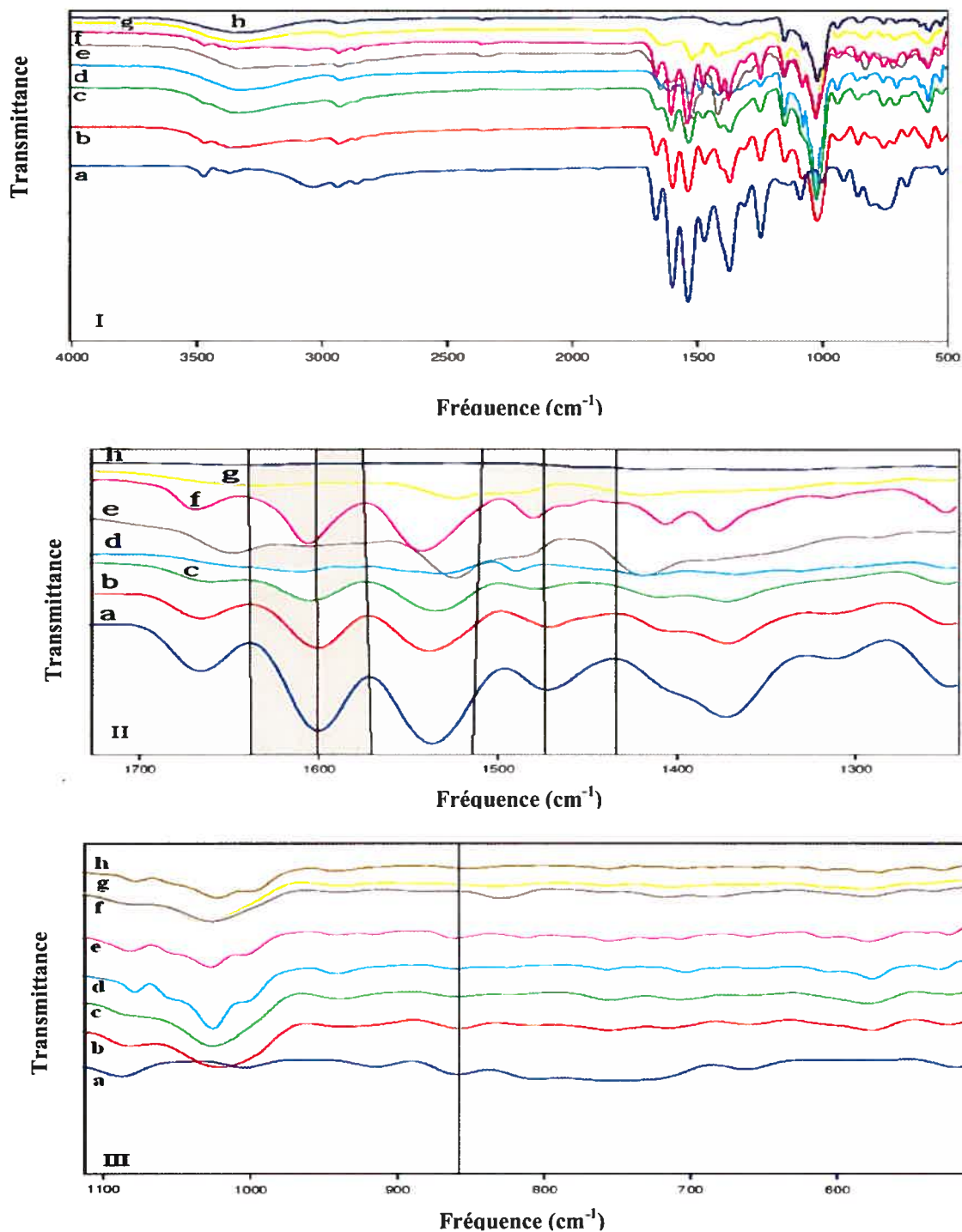


Figure 3-5. Spectres FT-IR (I) 4000-500 cm<sup>-1</sup>, (II) 1730-1230 cm<sup>-1</sup> et (III) 1100-500 cm<sup>-1</sup> de: la CHX — (a); MP de la CHX et la  $\beta$ -CD —(b); Systèmes binaires de la  $\beta$ -CD avec CHX préparés par : les méthodes de boue : BMSol (c) et BE (d); Évaporation— (e); Pétrissage—(f) ; Lyophilisation —(g); la  $\beta$ -CD pure—(h). \*Les zones ombrées désignent les bandes examinées.

La réduction d'intensité, de la plus haute à la plus basse réduction était dans l'ordre : Lyophilisation > Évaporation > BE > BMSol > Pétrissage > MP > CHX.

Sur la Figure 3-5 « III », on voit que les bandes des vibrations de déformation angulaire hors du plan des liens C-H du cycle p-chlorophényle (à  $859\text{ cm}^{-1}$ ) ont complètement disparu dans les spectres de la lyophilisation et de l'évaporation, alors que leur intensité était, soit atténuée dans le cas de la BE et de la BMSol, soit non touchée dans les cas du pétrissage et du MP. En outre, on décèle un décalage léger du pic dans le cas du pétrissage. Cela pourrait signaler une inclusion du groupement p-chlorophényle dans la cavité de la  $\beta$ -CD pour les méthodes de la lyophilisation et de l'évaporation.

### 3.3.3.3.2 Les spectres FT-IR des systèmes binaires de la CHX avec l'HP- $\beta$ -CD

Dans les spectres des systèmes binaires obtenus avec l'HP- $\beta$ -CD, Figure 3-6 « I », toutes les méthodes ont incité une seule bande large au lieu de bandes multiples ( $\nu_{\text{N-H}}$ ) des liens N-H de la CHX pure ( $3368$  et  $3475\text{ cm}^{-1}$ ). L'évaporation a provoqué le décalage le plus prononcé ( $35\text{ cm}^{-1}$ ), alors que le pétrissage et la BMSol étaient les moins efficaces à cet égard. Le spectre du pétrissage a montré certains pics étroits similaires à ceux de la CHX dans la même région ( $\approx 3470\text{ cm}^{-1}$ ), et celui du MP a montré un décalage hypsochrome très faible du pic.

Les vibrations de déformation angulaire de ces liens N-H des groupements guanidines, Figure 3-6 « II », ont subi des déplacements hypsochromes significatifs pour toutes les méthodes de préparations des complexes de l'HP- $\beta$ -CD avec la CHX. L'élargissement de la bande était associé avec une augmentation d'intensité et était caractérisé par un décalage significatif du pic principal (de  $9$  à  $25\text{ cm}^{-1}$ ) vers des fréquences plus hautes (Tableau 3-7).

**Tableau 3-7. Pics de l'absorbance IR des groupes fonctionnels des systèmes binaires de l'HP- $\beta$ -CD avec la CHX préparés par les différentes méthodes de préparation.**

La CHX, l'HP- $\beta$ -CD, ou leur système binaire	Élongation des liens N-H des groupements guanidines de la CHX ou des hydroxyles de l'HP- $\beta$ -CD		Déformation angulaire des liens N-H des groupements guanidines		Déformation angulaire dans le plan des liens C-H du cycle de la p-chlorophényle	
	Pic ( $\text{cm}^{-1}$ )	Pic ( $\text{cm}^{-1}$ )	Pic ( $\text{cm}^{-1}$ )	Pic ( $\text{cm}^{-1}$ )	Pic ( $\text{cm}^{-1}$ )	Pic ( $\text{cm}^{-1}$ )
La CHX	3368	3475	1600	1	1472	1
l'HP- $\beta$ -CD	3364	—	—	—	—	—
MP	3370	3474	1600	2	1473	2
Évaporation	3333	—	1621	7	—	7
Lyophilisation	3350	—	1613	6	1483	6
Pétrissage	3359	3470	1609	3	1477	3
BMSol	3354	—	1609	4	1475	4
BE	3351	—	1611	5	—	7
BEL	3352	—	1625	8	1480	5

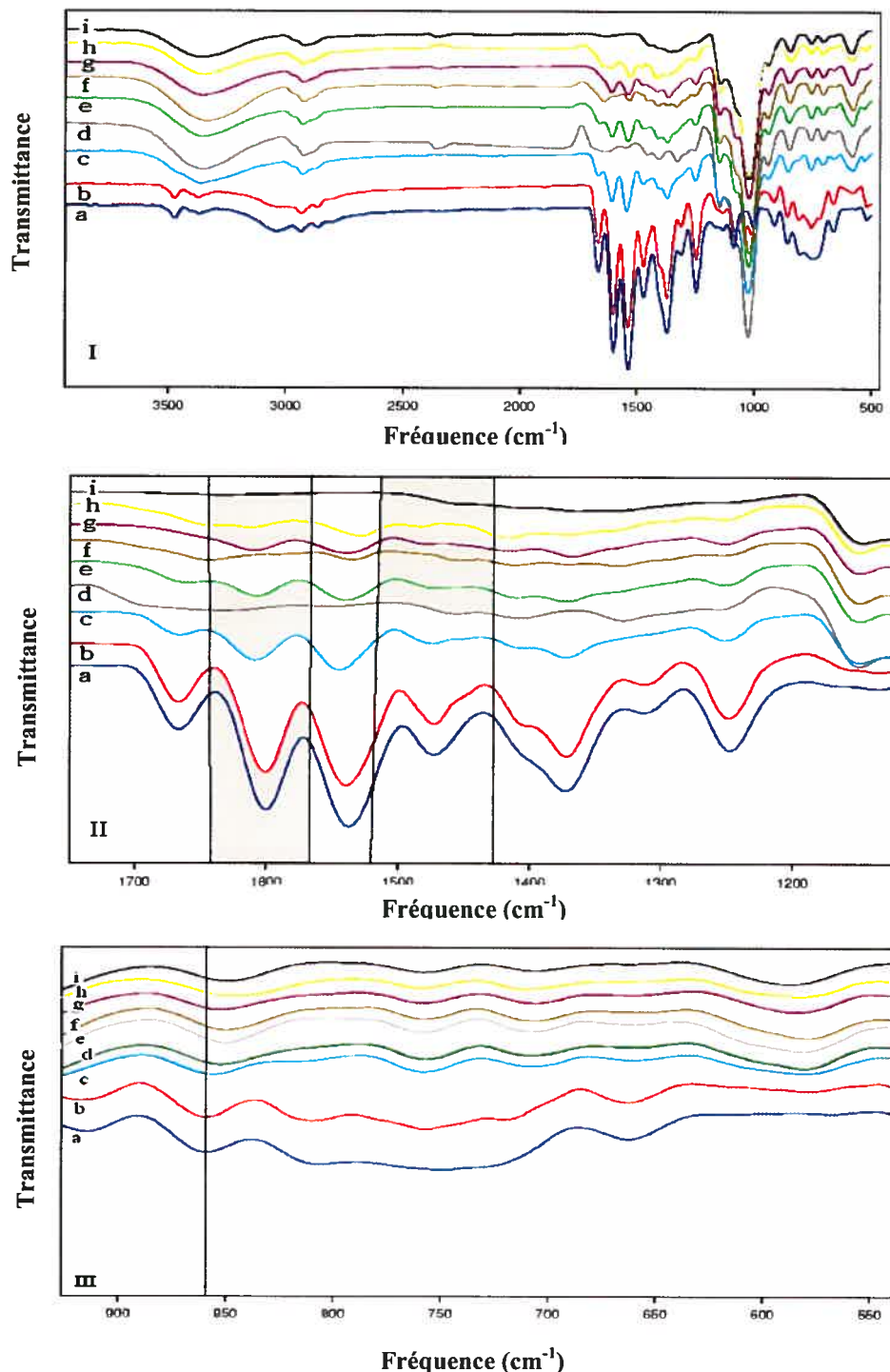


Figure 3-6. Spectres FT-IR (I) 4000-500 cm<sup>-1</sup>, (II) 1730-1230 cm<sup>-1</sup> et (III) 1000-530 cm<sup>-1</sup> de :CHX (a); **MP de CHX et l'HP-β-CD (b)**; Systèmes binaires de l'HP-β-CD avec CHX préparés par : **Pétrissage (c)**; Méthodes de boue: **BE (d)**, **BMSol (e)**, et **BEL (g)**; **Évaporation (f)**; **Lyophilisation (h)**; l'HP-β-CD pur (i). \*Les zones ombrées désignent les bandes examinées.

Le décalage était dans l'ordre décroissant : BEL > Évaporation > Lyophilisation > BE > Pétrissage, BMSol. La déformation angulaire des liaisons C-H du cycle aromatique p-chlorophényle (Figure 3-6 « II ») a été presque non décalée dans le cas du MP. Elle a

subi un déplacement faible vers des fréquences plus hautes et son intensité était légèrement plus basse dans les cas du pétrissage et de la BMSol. La bande d'absorbance dans le cas de la lyophilisation et de la BEL, était décalée significativement vers une fréquence plus haute et l'intensité était minimale. Par contre, l'HP- $\beta$ -CD a masqué complètement ces vibrations dans le cas de l'évaporation et de la méthode BE. Ces changements pointaient vers une inclusion probable de la CHX dans la cavité de l'HP- $\beta$ -CD.

#### 3.3.3.4 Spectrométrie RMN en solution

La troisième des méthodes utilisées pour caractériser les systèmes binaires de la CHX avec les CD était la spectrométrie RMN. Elle est sensible aux changements dans le microenvironnement moléculaire, provoqués par l'association non covalente de la CD avec une molécule complexée et donne une idée sur l'orientation de celle-ci par rapport à la CD. Deux types de RMN en solution sont utilisés : la RMN- $^1\text{H}$  et la RMN- $^{13}\text{C}$ . La RMN- $^{13}\text{C}$ , avec les déplacements chimiques relativement larges du  $^{13}\text{C}$  et ainsi sa sensibilité supérieure, discerne les complexes les plus faibles, et peut servir à confirmer les observations obtenues à partir des spectres de la RMN- $^1\text{H}$ . Le solvant de choix pour ces études était le DMSO- $d_6$ . Nous l'avons sélectionné pour permettre la visualisation des signaux des hydroxyles des CD séparés puisqu'il ralentit relativement la vitesse d'échange isotopique entre le deutérium et le proton en comparaison avec l'eau deutérée. Par conséquent, nous avons pu distinguer entre les protons habituellement impliqués dans les ponts hydrogène intramoléculaires (OH-2, OH-3 à  $\delta$  respectivement de 5,74 et 5,69 ppm pour la  $\beta$ -CD) qui sont relativement plus déblindés que les protons libres de l'hydroxyle OH-6 situés à  $\delta$  4,47 ppm. Cette distinction nous a permis de discerner les interactions des groupes hydroxyles avec les protons de la CHX assez clairement.

##### 3.3.3.4.1 La RMN des systèmes binaires de la CHX avec la $\beta$ -CD

Les résultats obtenus à partir des spectres RMN des systèmes binaires de la CHX avec les CD ont démontré l'absence de nouveaux pics dans tous les spectres de RMN de ces systèmes. Les nouveaux pics pourraient émerger dans un système binaire de deux molécules suite à une réaction chimique par des liens covalents [153]. L'absence de nouveaux pics démontre que la complexation était un processus dynamique via des liens

non covalents où la CHX subissait un échange rapide entre l'état libre et l'état complexé avec la CD.

### 3.3.3.4.1.1 *Effet de la CHX sur la $\beta$ -CD*

Pour toutes les méthodes de préparation d'un complexe entre la CHX et la CD, l'analyse des spectres RMN- $^1\text{H}$  de la  $\beta$ -CD (Tableau 3-8) montre que les protons de l'intérieur de la cavité  $\text{H}_3$  et  $\text{H}_5$  étaient quasiment non touchés avec une ampleur négligeable des déviations des déplacements chimiques. Pourtant, le  $\text{H}_5$  semblait être toujours plus perturbé par rapport au  $\text{H}_3$ , excepté le pétrissage. La face primaire de la  $\beta$ -CD avec ses groupes OH-6 et  $\text{H}_{6a,b}$  a été légèrement touchée. Les signaux des hydroxyles, qui sont habituellement étroits et sous la forme de doublets, étaient élargis et transformés en singulets. Cependant, les changements les plus notables étaient obtenus avec la face secondaire de la  $\beta$ -CD où trois effets ont été détectés :

- Transformation des signaux des hydroxyles de la forme de doublets ou triplets à celles des singulets élargis.
- Déblindage du signal du groupe OH-3 dans toutes les méthodes d'obtention des systèmes binaires de la CHX avec la  $\beta$ -CD, sauf pour la méthode BE où l'effet était plutôt un blindage. Accompagné par un effet qui variait entre le déblindage, pour le pétrissage et l'évaporation, et le blindage pour le reste des méthodes, sur les protons des OH-2.
- Décalage des déplacements chimiques des protons de l'extérieur  $\text{H}_2$  et  $\text{H}_4$ . L'évaporation et la BE, ont provoqué les décalages les plus notables.

Tableau 3-8. Déplacements chimiques RMN- $^1\text{H}$  de la  $\beta$ -CD pure ou en systèmes binaires avec la CHX dans le DMSO- $d_6$ .

$\beta$ -CD	$\Delta\delta$ (ppm)	CHX : $\beta$ -CD <sup>a</sup>	CHX : $\beta$ -CD <sup>b</sup>	CHX : $\beta$ -CD <sup>c</sup>	CHX : $\beta$ -CD <sup>d</sup>	CHX : $\beta$ -CD <sup>e</sup>
4,824	$\text{H}_1$	0,000	0,002	0,001	0,004	-0,001
3,296	$\text{H}_2$	-0,006	-0,008	-0,009	-0,001	-0,002
3,627	$\text{H}_3$	0,003	0,008	0,004	0,003	-0,001
3,348	$\text{H}_4$	0,020	0,001	0,000	-0,002	-0,022
3,555	$\text{H}_5$	0,014	0,018	0,006	0,013	0,018
3,629	$\text{H}_{6a,b}$	0,022	0,028	0,025	0,023	0,000
t 4,470	OH-6	b.s. 0,037	b.s. -0,017	b.s. 0,010	b.s. 0,025	b.s. -0,012
d 5,740	OH-2	b.s. 0,026	b.s. -0,034	b.s. 0,039	b.s. -0,018	b.s. -0,024
d 5,685	OH-3	b.s. 0,081	b.s. 0,021	b.s. 0,094	b.s. 0,037	b.s. -0,024

a : Évaporation; b : Lyophilisation; c : Pétrissage; d : BMSol; e : BE.  
t : triplet; d : doublet; b.s.: singulet élargi.

Examinons les spectres RMN-<sup>13</sup>C de ces différentes méthodes de préparation (Tableau 3-9). Partout, il y avait un blindage du signal pour C<sub>3</sub> et un déblindage pour celui de C<sub>5</sub> de la β-CD. Les deux méthodes de préparation en phase liquide ont incité les changements les plus notés. Pour l'évaporation, les carbones, excepté C<sub>3</sub>, ont été déplacés assez clairement vers des champs magnétiques plus bas. Dans le cas de la lyophilisation, on a trouvé que les carbones de la β-CD avaient subi généralement un blindage. De tels décalages pourraient pointer vers un changement dans la conformation de la β-CD lors de son interaction avec la CHX.

**Tableau 3-9. Déplacements chimiques RMN-<sup>13</sup>C de la β-CD pure et ses systèmes binaires avec la CHX dans le DMSO-d<sub>6</sub> à 25°C.**

β-CD	Δδ (ppm)	CHX : β-CD <sup>a</sup>	CHX : β-CD <sup>b</sup>	CHX : β-CD <sup>c</sup>	CHX : β-CD <sup>d</sup>	CHX : β-CD <sup>e</sup>
101,886	C <sub>1</sub>	0,062	-0,036	0,020	0,022	0,030
72,993	C <sub>2</sub>	0,067	-0,039	0,024	0,025	0,030
72,354	C <sub>3</sub>	-0,312	-0,405	-0,350	-0,348	-0,343
81,474	C <sub>4</sub>	0,054	-0,027	0,017	0,019	0,023
71,983	C <sub>5</sub>	0,421	0,340	0,386	0,389	0,395
59,850	C <sub>6</sub>	0,069	-0,025	0,024	0,025	0,030

a : Évaporation; b : Lyophilisation; c : Pétrissage; d : BMSol; e : BE.

#### 3.3.3.4.1.2 *Effet de la β-CD sur la CHX*

Dans les systèmes binaires de la CD, une complexation est souvent éprouvée par les changements proportionnellement amples, dans les déplacements chimiques des protons ou des carbones de la molécule invitée par rapport à ceux de la CD [154]. La molécule invitée pourrait posséder une capacité faible à induire des décalages importants dans les déplacements chimiques de la molécule de la CD, alors que la CD est capable de provoquer des décalages considérables dans l'environnement électronique de la molécule de l'invitée [147]. Dans cette optique, l'interaction de la CHX avec les CD serait relativement clairement étudiée en inspectant les déplacements chimiques des protons et des carbones de la CHX.

La RMN-<sup>1</sup>H montre que la β-CD a causé un déblindage des protons 2 et 6 de p-chlorophényle de la CHX, dans les cas de la BE, de la BMSol, du pétrissage et de l'évaporation (Tableau 3-10). Leur déblindage était plus clair que celui des protons 3 et 5 du même cycle. La transformation de la forme de leurs signaux du doublet à celle d'un singulet élargi est observée dans les cas de la BMSol et la BE; un effet qui peut se produire



en conséquence d'un couplage de second ordre avec la CD. La lyophilisation, a seulement provoqué un blindage du déplacement chimique du groupe guanidine.

Quant aux études RMN-<sup>13</sup>C (Tableau 3-11), elles ont révélé qu'un blindage dans les carbones 2 et 6 de p-chlorophényle de la CHX était survenu. Cet effet était observé pour le pétrissage et la BMSol, et il a émergé pour la lyophilisation puisqu'il n'était pas évident dans le spectre RMN-<sup>1</sup>H. L'évaporation a évoqué un déblindage relativement prononcé de C<sub>3</sub>, C<sub>5</sub> et C<sub>7</sub>. Le déblindage de C<sub>7</sub> était aussi évident pour le reste des méthodes de préparation. Par la suite, on pourrait assumer qu'il existait une interaction entre la β-CD et la CHX dans toutes les méthodes d'obtention comme vu dans tous les spectres RMN, notamment ceux de la RMN-<sup>13</sup>C. Cette interaction se concentrait dans deux régions par rapport à la β-CD : sa cavité et la face extérieure de son cône. Le déblindage modeste de H<sub>3</sub> et H<sub>5</sub> de la cavité de la β-CD, associé au déblindage de protons et des carbones 2 et 6 du cycle benzénique suggère qu'un processus d'inclusion orienté dans la cavité de la β-CD a pu être engendré du côté hydrophobe de la CHX (son cycle aromatique).

**Tableau 3-10. Déplacements chimiques RMN-<sup>1</sup>H de la CHX pure ou en systèmes binaires avec la β-CD dans le DMSO-d<sub>6</sub> à 25°C.**

CHX	Δδ (ppm)	CHX : β-CD <sup>a</sup>	CHX : β-CD <sup>b</sup>	CHX : β-CD <sup>c</sup>	CHX : β-CD <sup>d</sup>	CHX : β-CD <sup>e</sup>
3,10	a	-0,008	0,001	-0,006	-0,007	-0,006
1,44	b	-0,002	0,003	-0,002	-0,001	-0,004
1,31	c	-0,008	0,001	-0,006	0,001	-0,007
4,93	d,e	0,838	0,778	0,851	0,794	0,814
d 6,82	2,6	d 0,040	d 0,001	d 0,032	b. s 0,036	b. s 0,015
dd 7,20	3,5	d 0,007	dd 0,000	dd 0,010	d 0,008	d 0,004
3,35	7	0,086	-0,012	0,040	0,041	0,050

a : Évaporation; b : Lyophilisation; c : Pétrissage; d : BMSol; e : BE.  
t : triplet; d : doublet; b.s.: singulet élargi.

**Tableau 3-11. Déplacements chimiques (δ) de carbones RMN-<sup>13</sup>C de la CHX et ses systèmes binaires avec la β-CD dans le DMSO-d<sub>6</sub> à 25°C.**

CHX	Δδ (ppm)	CHX : β-CD <sup>a</sup>	CHX : β-CD <sup>b</sup>	CHX : β-CD <sup>c</sup>	CHX : β-CD <sup>d</sup>	CHX : β-CD <sup>e</sup>
124,046	1	— <sup>f</sup>	— <sup>f</sup>	— <sup>f</sup>	0,434	— <sup>f</sup>
124,383	2,6	— <sup>f</sup>	-0,277	-0,261	-0,291	— <sup>f</sup>
128,522	3,5	0,122	0,008	0,076	0,079	0,091
124,433	4	-0,142	-0,143	-0,153	-0,145	-0,118
157,945	7	0,445	0,295	0,347	0,388	0,329
29,182	a	-0,025	-0,038	-0,034	-0,042	-0,020
26,126	b,c	0,036	-0,025	0,014	0,015	0,024

a : Évaporation; b : Lyophilisation; c : Pétrissage; d : BMSol; e : BE ; f: le signal est indétectable.

Pourtant, cette inclusion paraît être peu profonde puisque l'effet d'un blindage, qui est provoqué habituellement quand les électrons- $\pi$  des cycles aromatiques sont profondément inclus dans la nanocavité de la CD, s'y absente [153, 155]. Pour la face extérieure, les changements de la forme et des déplacements chimiques des raies des protons ( $H_2$ ,  $H_4$  et  $H_{6a,b}$ ) comme avec ceux des hydroxyles OH-2, OH-3 et OH-6, peuvent être attribués à la formation de ponts hydrogène intermoléculaires, probablement avec le groupe guanidine de la CHX. Cette suggestion est appuyée par le fait que les protons et le  $C_7$  appartenant à ce groupe ont montré des décalages dans leurs déplacements chimiques pour toutes les méthodes de préparation. Ce type d'interaction probablement menait à la formation d'un complexe par non-inclusion entre la CHX et les agrégats de la  $\beta$ -CD.

### 3.3.3.4.2 La RMN des systèmes binaires de la CHX avec l'HP- $\beta$ -CD

#### 3.3.3.4.2.1 Effet de la CHX sur l'HP- $\beta$ -CD

Pour la molécule de l'HP- $\beta$ -CD, sa nature amorphe a rendu la détection précise des changements dans les déplacements chimiques des protons et des carbones, ainsi que leur interprétation, assez compliquées. Les signaux de RMN des systèmes binaires de la CHX et l'HP- $\beta$ -CD peuvent être non seulement attribués au résultat de l'interaction de l'HP- $\beta$ -CD avec la CHX, mais aussi peuvent être la conséquence de l'existence d'une certaine d'isomères de position dans le composé pur de l'HP- $\beta$ -CD. Cependant, la RMN- $^{13}C$  montrait que la lyophilisation a provoqué des blindages dans les  $C_2$  et  $C_5$  d'une amplitude relativement haute (respectivement  $\Delta\delta$  étaient -0,184 et -0,354), incitant un changement de conformation par la présence de la CHX, (Tableau 3-12).

**Tableau 3-12. Déplacements chimiques ( $\delta$ ) de carbones RMN- $^{13}C$  de l'HP- $\beta$ -CD et de ses systèmes binaires avec la CHX dans le DMSO- $d_6$  à 25°C.**

HP- $\beta$ -CD	$\Delta\delta$ (ppm)	CHX : HP- $\beta$ -CD <sup>a</sup>	CHX : HP- $\beta$ -CD <sup>b</sup>	CHX : HP- $\beta$ -CD <sup>c</sup>	CHX : HP- $\beta$ -CD <sup>d</sup>	CHX : HP- $\beta$ -CD <sup>e</sup>	CHX : HP- $\beta$ -CD <sup>f</sup>
102,25	C1	-0,288	-0,365	-0,353	-0,330	-0,329	-0,318
71,94	C2	0,153	-0,184	-0,095	0,072	0,081	0,113
72,96	C3	0,102	0,021	0,050	0,075	0,070	0,124
81,40	C4	0,111	0,017	0,083	0,134	0,081	0,215
72,34	C5	0,075	-0,354	-0,016	0,036	0,042	0,038
59,80	C6	0,145	0,036	0,066	0,099	0,082	0,100

a : Évaporation; b : Lyophilisation; c : Pétrissage; d : BMSol; e : BE; f : BEL.

#### 3.3.3.4.2.2 *Effet de l'HP- $\beta$ -CD sur la CHX*

Les systèmes binaires de la CHX avec l'HP- $\beta$ -CD préparés par différentes méthodes montrent des degrés différents d'interaction dans les spectres RMN- $^1\text{H}$ , ce qui est illustré au Tableau 3-13. La disparition de certains pics était observée. Dans le cas du pétrissage, le pic des hydrogènes « d » et « e » pourrait être indétectable à cause de son camouflage par le singulet élargi des ponts hydrogène de la CD, situé dans la même plage de déplacements chimiques. Ce camouflage aurait été décelé par une intégration de ce singulet élargi. Pourtant, les protons des groupes hydroxyles et imines, en RMN- $^1\text{H}$  sont en échange isotopique assez lent avec le solvant, ce qui a rendu leur intégration non indicative. En outre, le pétrissage n'avait presque aucun effet sur les déplacements chimiques des protons de la CHX.

Les protons du cycle benzénique ( $\Delta\delta$  des protons « 2 et 6 » et « 3 et 5 » respectivement sont de 0,142 et 0,035) et les protons du groupe guanidine ( $\Delta\delta$  0,169) sont devenus plus déblindés dans le cas de la lyophilisation. Un blindage relativement fort des protons 2,6 de p-chlorophényle a été observé dans le cas de l'évaporation ( $\Delta\delta=-0,094$ ). Par ailleurs, les protons 3 et 5 sont déblindés ( $\Delta\delta=0,175$ ). Ces protons ont été aussi influencés dans les cas des trois méthodes de la boue. Pourtant, les changements dans les déplacements chimiques étaient plus élevés pour la BMSol : le blindage des protons 2 et 6 des cycles aromatiques de la CHX. Ceci impliquait que leur inclusion était plus profonde dans la cavité de l'HP- $\beta$ -CD que dans les cas de la BE ou de la BEL. Généralement, l'interaction de la CHX avec l'HP- $\beta$ -CD s'avérait plus notable par rapport à la  $\beta$ -CD puisque, les décalages aperçus pour les protons de la CHX dans ses systèmes binaires, étaient globalement plus prononcés.

Quant à l'analyse par RMN- $^{13}\text{C}$  (Tableau 3-14), un blindage des carbones 1, 2 et 6, muni du déblindage du reste des carbones du cycle benzénique de la CHX, ont été provoqués dans le cas de la lyophilisation. Ceci suggère une inclusion relativement profonde dans la cavité de l'HP- $\beta$ -CD. Pour le pétrissage, les carbones 2 et 6 des cycles benzéniques de la CHX ont été blindés, un effet qui était non détecté par la RMN- $^1\text{H}$ . Pour le reste des méthodes, l'effet sur ces carbones était plutôt un déblindage ou une non-détection. La méthode BMSol influençait plus sérieusement ces déplacements chimiques que la méthode BE.

D'autre part, les raies de  $\text{C}_7$ , les carbones des groupes guanidines, pour tous les types de préparations, étaient déblindés probablement suite à la formation des liaisons hydrogènes avec les hydroxyles de l'HP- $\beta$ -CD. Ainsi, les deux types d'interaction (par inclusion

superficielle et par non-inclusion) existaient entre la CHX et l'HP- $\beta$ -CD pour toutes les méthodes de préparation. Dépendant des spectres RMN- $^1\text{H}$  de la CHX, les deux méthodes de préparation en phase liquide incitaient une interaction relativement forte entre les deux molécules, par rapport aux méthodes de préparation en phase semi-solide.

Tableau 3-13. Déplacements chimiques RMN- $^1\text{H}$  des protons de la CHX pure et dans ses systèmes binaires avec l'HP- $\beta$ -CD dans le DMSO- $d_6$  à 25°C.

CHX	$\Delta\delta$ (ppm)	CHX : HP- $\beta$ -CD <sup>a</sup>	CHX : HP- $\beta$ -CD <sup>b</sup>	CHX : HP- $\beta$ -CD <sup>c</sup>	CHX : HP- $\beta$ -CD <sup>d</sup>	CHX : HP- $\beta$ -CD <sup>e</sup>	CHX : HP- $\beta$ -CD <sup>f</sup>
3,095	a	-0,035	-0,021	-0,006	-0,012	-0,017	-0,011
1,442	b	0,006	0,003	0,000	-0,002	-0,003	-0,002
1,307	c	-0,054	-0,015	-0,002	-0,009	-0,011	-0,008
4,928	d,e	0,088	0,169	— <sup>g</sup>	-0,072	0,132	0,095
6,820	2,6	-0,094	0,142	0,000	-0,092	0,058	0,041
7,200	3,5	0,175	0,035	-0,004	0,043	0,012	0,027
3,345	7	— <sup>g</sup>	-0,002	0,001	— <sup>g</sup>	— <sup>g</sup>	0,012

a : Évaporation; b : Lyophilisation; c : Pétrissage; d : BMSol; e : BE; f : BEL; g : signal est indétectable.

Tableau 3-14. Déplacements chimiques RMN- $^{13}\text{C}$  ( $\delta$ ) de la CHX et ses systèmes binaires avec l'HP- $\beta$ -CD dans DMSO- $d_6$  à 25°C.

CHX $\delta$ (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)	CHX : HP- $\beta$ -CD <sup>a</sup>	CHX : HP- $\beta$ -CD <sup>b</sup>	CHX : HP- $\beta$ -CD <sup>c</sup>	CHX : HP- $\beta$ -CD <sup>d</sup>	CHX : HP- $\beta$ -CD <sup>e</sup>	CHX : HP- $\beta$ -CD <sup>f</sup>
124,05	1	— <sup>g</sup>	-0,248	— <sup>g</sup>	0,203	0,189	— <sup>g</sup>
124,38	2,6	— <sup>g</sup>	-0,076	-0,237	0,016	— <sup>g</sup>	— <sup>g</sup>
128,52	3,5	0,033	0,143	0,082	0,096	0,096	0,127
124,43	4	— <sup>g</sup>	-0,083	-0,008	0,128	0,082	-0,081
157,95	7	— <sup>g</sup>	— <sup>g</sup>	0,283	0,416	0,500	0,384
29,18	a	0,110	-0,119	0,016	-0,044	-0,064	-0,008
26,13	b,c	-0,193	-0,063	0,035	0,018	0,011	0,046

a : Évaporation; b : Lyophilisation; c : Pétrissage; d : BMSol; e : BE; f : BEL; g : signal est indétectable.

### 3.4 Conclusion

Les différents résultats exposés dans ce chapitre ont permis de valider et de caractériser à la fois l'effet de solubilisation que chacune des CD hydrophiles exerce sur la CHX, d'étudier l'interaction qui existe entre les deux entités et qui diffère en variant le procédé de préparation du complexe, et de conclure les meilleures CD et méthodes à inciter l'interaction et par la suite la solubilisation de la CHX.

L'étude du profil de solubilité a montré que les deux CD : la  $\beta$ -CD et l'HP- $\beta$ -CD ont significativement augmenté la solubilité aqueuse de la CHX au-dessus d'un niveau de confiance de 99 % et que le complexe formé avait un rapport molaire de 1 : 1. Avec une

constante de stabilité de  $456,19 \pm 11,78 \text{ M}^{-1}$ , le complexe de la CHX avec la  $\beta$ -CD était plus stable et moins dynamique que celui formé avec l'HP- $\beta$ -CD ( $K_{stab} = 84,64 \pm 20,21 \text{ M}^{-1}$ ). Pourtant, l'HP- $\beta$ -CD s'est avéré un agent solubilisant de la CHX plus efficace que la  $\beta$ -CD.

Pour les différentes méthodes de préparation, soit en phase liquide soit en phase semi-solide, les complexes entre la CHX et chacune de deux CD ont été caractérisés. Leur caractérisation a souligné certains points. Pour toutes les méthodes employées pour la préparation des complexes, la DSC, la FT-IR et l'examen des décalages des déplacements chimiques de protons et de carbones de la CHX en RMN- $^1\text{H}$  et en RMN- $^{13}\text{C}$ , on peut déduire ce qui suit :

- La CHX interagissait avec la  $\beta$ -CD ou l'HP- $\beta$ -CD.
- La méthode de préparation du complexe et le type de la CD influençaient le type et le degré d'interaction entre la CHX et la CD.

Le complexe pourrait se former par inclusion superficielle dans la cavité de la CD, ou par non-inclusion via la formation de ponts hydrogène entre la CHX et les agrégats de la CD. Malgré la complexité des résultats, on peut assumer que l'évaporation et la lyophilisation, les méthodes de préparation du complexe de la CHX avec la CD en phase liquide, en revanche de leur rendement assez pauvre, ont provoqué une meilleure interaction, soit par inclusion soit par non-inclusion. Pour les méthodes de boue, la BE était plus disposée à initier une interaction entre la CHX et la CD la moins soluble (la  $\beta$ -CD), bien que la BMSol, ayant le système de solvant d'une polarité inférieure, ait provoqué une interaction relativement plus intime dans le cas l'HP- $\beta$ -CD. L'interaction était la plus pauvre en utilisant le pétrissage.

La solubilité aqueuse supérieure et l'interaction assez forte avec la CHX par rapport à la  $\beta$ -CD, nous encourage à utiliser l'HP- $\beta$ -CD via la lyophilisation ou l'évaporation pour former un complexe soluble avec la CHX.

## Chapitre IV.

### 4 Conclusion Générale et perspectives.

---

Une variété de facteurs est considérée dans le processus du design d'un système médicamenteux à libération contrôlée. Certains sont liés à la composition de la matrice pharmaceutique souvent à base de polymères. Ils déterminent la vitesse, le site ou le mécanisme de libération du principe actif dans le corps. D'autres facteurs ont comme origine les propriétés physicochimiques du principe actif. Ces dernières jouent un rôle dominant dans le processus de la formulation et le design de systèmes à libération maîtrisée puisqu'elles sont habituellement difficiles à modifier sans influencer l'efficacité thérapeutique visée.

Dans ce contexte, l'objectif de ce travail était de contribuer à la mise au point d'un système voué à la libération contrôlée topique d'un principe actif modèle. La matrice pharmaceutique choisie était l'hydrogel physique thermoréversible (TRG) mucoadhésif. Elle représente une matrice aqueuse, liquide à la température ambiante, facile à incorporer avec un principe actif par une simple mixtion, facile à étaler sur un site d'application muqueux et à ôter quand désiré. Elle est sensible à la température et se transforme en un gel qui agit en tant que dépôt. Sa mucoadhésion prolonge son temps de séjour sur la surface muqueuse, alors que sa dureté détermine le taux de ralentissement dans la libération du principe actif. Le principe actif modèle était la base de la chlorhexidine (CHX), un antiseptique insoluble dans l'eau. Sa faible solubilité lui confère le rôle de l'étape cinétiquement déterminante dans le processus de libération quand incorporé dans une forme pharmaceutique.

Dans ce projet, la contribution dans la mise au point d'un tel système a divergé dans deux axes différents :

- ☞ Le premier a traité la sélection de la matrice TRG mucoadhésif, optimale à maîtriser la libération, par l'estimation de ses propriétés mécaniques pertinentes.
- ☞ Le second axe était impliqué dans la solubilisation adéquate de la CHX, tout en maintenant son intégrité en solution. Le raisonnement est de faciliter sa diffusion à travers la matrice aqueuse de la forme pharmaceutique et ainsi, surmonter son rôle

limitant et déterminant dans le processus de libération. Cette dernière est désirée être uniquement dépendante de la structure et la composition de la matrice pharmaceutique.

Concernant la sélection de la matrice TRG mucoadhésif, les polymères biocompatibles choisis pour former cette matrice étaient les polymères thermoréversibles PF127, le PF68 et les polymères mucoadhésifs : le CP934P et le PC. Une expérience préliminaire consacrée à sélectionner les solutions aqueuses de combinaisons polymériques aptes à former un TRG à  $34\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ , a confirmé que chacun des trois polymères : le PF68, le CP934P et le PC modulait la  $T_{\text{gel}}$  de l'hydrogel du PF127. Elle a révélé que quatre facteurs causaux pourraient dominer les propriétés mécaniques : la concentration de chacun des trois polymères impliqués dans la formulation du TRG mucoadhésif (les deux poloxamères et le mucoadhésif), ainsi que le type du polymère mucoadhésif (CP934P versus PC). Elle a pareillement indiqué que la concentration du polymère mucoadhésif ne devait pas excéder 0,1 % pour garantir au système une sensibilité à la température corporelle.

Le criblage des formulations sélectionnées des TRG mucoadhésifs au moyen de la TPA a réussi. Basée sur l'estimation quantitative des propriétés mécaniques, la TPA a montré que la dureté, l'adhésion relative et la compressibilité étaient supérieures dans les formulations qui contenaient des concentrations relativement hautes de poloxamères (PF127/PF68 : 15/20, 15/25, 18/15, 21/10 et 21/15 % p/p). Sachant par ailleurs qu'une cohésion affaiblie influence négativement le pouvoir mucoadhésif, nous serions engagés à éliminer les formulations des combinaisons PF127/PF68 15/20 et 18/10 % p/p d'une application possible comme des TRG mucoadhésifs. D'autre part, la comparaison avec le comportement in vivo des combinaisons polymériques semblables en composition et en concentration, a vérifié les distinctions entre les formulations issues de cette technique. Par la suite, cette comparaison a vérifié la capacité de la TPA comme un outil de criblage des formulations TRG mucoadhésifs, surtout quand des valeurs numériques de propriétés mécaniques sont suggérées comme un seuil pour une performance acceptable in-vivo.

L'approche statistique, au moyen des RNA et l'analyse factorielle, a pu identifier les effets significatifs ainsi que les interactions, que les quatre polymères exerçaient sur les propriétés mécaniques d'hydrogels formés in-situ. Parmi toutes les interactions, l'interaction entre le PF127 et le PF68 avait significativement affecté les différentes propriétés mécaniques,

surtout en hautes concentrations. Pour la dureté, la propriété mécanique reliée à la libération maîtrisée, les polymères mucoadhésifs l'affaiblissait. Le CP934P avait l'impact le plus important (62,3 %), suivi par le PC (35,5 %). L'adhésion a été principalement affectée par les polymères mucoadhésifs. Néanmoins, le PF68 pourrait l'influencer négativement. La comparaison entre le CP934P et le PC à propos de leur pouvoir adhésif, a montré que le CP934P neutralisé est un adhésif plus puissant que le PC neutralisé. Ce dernier avait un impact important sur la cohésion (83%). Son interaction avec les deux poloxamères indiquait que l'impact était négatif. Cet impact négatif sur la cohésion pourrait expliquer son pouvoir adhésif relativement inférieur à celui du CP934P. La compressibilité était significativement affectée par le CP934P ayant une importance relative de 94,2%. L'ensemble de ces résultats semble en accord avec les bibliographiques préexistants sur le sujet. De ce fait, il aide à vérifier l'utilisation de la TPA dans le criblage des formulations TRG.

Au deuxième axe, nous nous sommes servis de deux cyclodextrines, la  $\beta$ -CD et l'HP- $\beta$ -CD, pour solubiliser la CHX. Les deux CD ont amélioré la solubilité de la CHX. Son complexe avec l'HP- $\beta$ -CD était plus hydrosoluble et plus dynamique que celui avec la  $\beta$ -CD. Une variation dans la méthode de préparation du complexe de la CHX avec, soit la  $\beta$ -CD soit l'HP- $\beta$ -CD, a provoqué une différence dans le degré et le type de complexation entre les deux entités. Malgré leur rendement assez bas, les procédés de préparation du complexe en phase liquide ont démontré une meilleure interaction de la CHX avec la  $\beta$ -CD et avec l'HP- $\beta$ -CD. Le mécanisme suggéré pour l'interaction pourrait prendre la forme d'une inclusion partielle des cycles aromatiques de la CHX dans la cavité de la CD, ou/et une complexation par non-inclusion via des ponts hydrogène entre les groupes guanidines de la CHX et les hydroxyles de la face extérieure de la CD, probablement entre ses agrégats. Les procédés de préparation en phase semi-solide ont montré une interaction, qui différait selon la CD impliquée; la BE est efficace dans le cas de la  $\beta$ -CD. La BMSol est influente dans le cas de l'HP- $\beta$ -CD. Le pétrissage se montrait comme un dernier choix si une solubilisation adéquate par complexation entre la CHX avec la  $\beta$ -CD ou l'HP- $\beta$ -CD, est requise.

Concernant maintenant les perspectives à ce travail, elles sont de deux sortes :

- ☛ Des perspectives *immédiates* à engager pour confirmer certaines hypothèses soulevées par ce travail.



- ☛ Des *perspectives applicatives* qui concernent plus particulièrement les débouchés de ce travail.

Pour ce qui est des *perspectives immédiates*, l'amélioration de la solubilité aqueuse de la CHX par sa complexation avec l'HP- $\beta$ -CD, ainsi que leur bonne interaction quand leur complexe est préparé via la lyophilisation ou l'évaporation, nous encouragent à incorporer cette encapsulation moléculaire de la CHX dans la matrice aqueuse de l'hydrogel thermoréversible mucoadhésif. La composition de la matrice contiendra le mucoadhésif le CP934P dans une concentration de 0,1 %. Le rapport PF127/PF68 pourrait être un des trois choix : 15/25, 18/15 ou 21/10 % p/p. Ces compositions matricielles possédaient des valeurs élevées de dureté, d'adhésion relative et de cohésion. Une suite à ce travail consistera à observer la diffusion et la libération topique de la CHX à travers la matrice du TRG afin de déceler le modèle de libération de la CHX et estimer l'efficacité thérapeutique du système. L'impact du complexe CHX : HP- $\beta$ -CD sur les propriétés mécaniques du système du TRG pourrait être étudié dans le but d'optimiser la formulation.

En ce qui concerne maintenant les applications de ce travail, elles peuvent s'organiser selon deux grandes orientations :

Une première orientation concerne la technique du profilage textural. L'application de la TPA dans le criblage des formulations TRG mucoadhésifs à base de poloxamères pourrait être adoptée pour d'autres matrices à base de polymères divers. Avec sa simplicité et sa précision, la TPA pourrait servir comme une technique universelle pour prédire la mucoadhésion et la dureté *in vivo*. L'essentiel est d'établir une corrélation *in vitro/in vivo* qui traduit les valeurs obtenues pour les propriétés mécaniques estimées et le comportement de ces matrices *in vivo*, tout en précisant le conditionnement préalable à l'expérimentation.

La seconde orientation considère les RNA et l'analyse factorielle. À notre connaissance, cette étude était la première à utiliser des RNA et l'analyse factorielle dans l'analyse statistique des propriétés mécaniques des TRG mucoadhésifs. D'un côté, la combinaison de deux techniques a pu identifier l'importance relative de chaque composant dans le système, ainsi que la tendance de son impact (négatif ou positif). De l'autre, les modèles statistiques générés à partir des deux méthodes statistiques non paramétriques ont été validés. Ceux-ci

peuvent être utilisés dans la prédiction des valeurs des propriétés mécaniques des systèmes du même genre, dans l'intervalle de concentrations étudié, et aussi pour leur optimisation.

## Bibliographie

1. Hennink, W.E. and C.F. van Nostrum, *Novel crosslinking methods to design hydrogels*. Adv. Drug Deliv. Rev, 2002. **54**(1): p. 13-36.
2. Hoffman, A.S., *Hydrogels for biomedical applications*. Adv. Drug Deliv. Rev, 2002. **54**(1): p. 3-12.
3. Peppas, N.A., et al., *Hydrogels in pharmaceutical formulations*. Eur J Pharm Biopharm, 2000. **50**(1): p. 27-46.
4. Kissel, T., Y. Li, and F. Unger, *ABA-triblock copolymers from biodegradable polyester A-blocks and hydrophilic poly(ethylene oxide) B-blocks as a candidate for in situ forming hydrogel delivery systems for proteins*. Adv. Drug Deliv. Rev, 2002. **54**: p. 99-134.
5. Park, K., W.S.W. Shalaby, and H. Park, *Physical Gels*, in *Biodegradable Hydrogels for Drug Delivery*, K. Park, W.S.W. Shalaby, and H. Park, Editors. 1993, technomic Publishing Co., Inc.: Pennsylvania. p. 99-140.
6. Almdal, K., et al., *Towards a phenomenological definition of the term 'gel'*. Polymer Gels and Networks, 1993. **1**(1): p. 5-17.
7. Qiu, Y. and K. Park, *Environment-sensitive hydrogels for drug delivery*. Adv. Drug Deliv. Rev, 2001. **53**: p. 321-339.
8. Jeong, B., S.W. Kim, and Y.H. Bae, *Thermosensitive sol-gel reversible hydrogels*. Adv. Drug Deliv. Rev, 2002. **54**: p. 37-51.
9. Bromberg, L.E. and E.S. Ron, *Temperature-responsive gels and thermogelling polymer matrices for protein and peptide delivery*. Adv. Drug Deliv. Rev, 1998. **31**: p. 197-221.
10. Kang, G.D., et al., *Thermosensitive poly(organophosphazene) hydrogels for a controlled drug delivery*. Eur J Pharm Biopharm, 2006. **63**(3): p. 340-346.

11. Bromberg, L.E., *Enhanced nasal retention of hydrophobically modified polyelectrolytes*. J Pharm Pharmacol 2001. **53**: p. 109-114.
12. Shim, M.S., et al., *Poly(D,L-lactic acid-co-glycolic acid)-b-poly(ethyleneglycol)-b-poly(D,L-lactic acid-co-glycolic acid) triblock copolymer and thermoreversible phase transition in water*. J. Biomed. Mater. Res., 2002. **61**: p. 188-196.
13. Peppas, N.A., M.D. Little, and Y. Huang, *Bioadhesive controlled release systems*, in *Handbook of Pharmaceutical Controlled Release Technology*, D.L. Wise, Editor. 2000, Marcel Dekker, Inc.: New York. p. 255-269.
14. Choi, H.-G., et al., *Development of in situ gelling and mucoadhesive acetaminophen liquid suppository*. Int. J. Pharm., 1998. **165**(1): p. 33-44.
15. Lin, H.-R. and K.C. Sung, *Carbopol/pluronic phase change solutions for ophthalmic drug delivery*. J. Control. release, 2000. **69**(3): p. 379-388.
16. Park, J.-S., et al., *In situ gelling and mucoadhesive polymer vehicles for controlled intranasal delivery of plasmid DNA*. J. Biomed. Mater. Res., 2002. **59**(1): p. 144-151.
17. Koffi, A.A., et al., *Modulation of the rheological and mucoadhesive properties of thermosensitive poloxamer-based hydrogels intended for the rectal administration of quinine*. Eur J Pharm Sci, 2006. **27**(4): p. 328-335.
18. Kim, E.-Y., et al., *rhEGF/HP- $\beta$ -CD complex in poloxamer gel for ophthalmic delivery*. Int. J. Pharm., 2002. **233**(1-2): p. 159-167.
19. Madsen, F., K. Eberth, and J.D. Smart, *A rheological examination of the mucoadhesive/mucus interaction: the effect of mucoadhesive type and concentration*. J. Control. release, 1998. **50**: p. 167-178.
20. Chang, J.Y., et al., *Rheological evaluation of thermosensitive and mucoadhesive vaginal gels in physiological conditions*. Int. J. Pharm., 2002. **241**(1): p. 155-163.
21. Wei, G., et al., *Thermosetting gels with modulated gelation temperature for ophthalmic use: the rheological and gamma scintigraphic studies*. J. Control. release, 2002. **83**(1): p. 65-74.

22. Edsman, K., J. Carlfors, and R. Petersson, *Rheological evaluation of poloxamer as an in situ gel for ophthalmic use*. Eur J Pharm Sci, 1998. **6**(2): p. 105-112.
23. Jeong, B., L.-Q. Wang, and A. Gutowska, *Biodegradable thermoreversible gelling PLGA-g-PEG copolymers*. Chem. Commun., 2001(16): p. 1516-1517.
24. Jones, D.S., A.D. Woolfson, and A.F. Brown, *Textural, viscoelastic and mucoadhesive properties of pharmaceutical gels composed of cellulose polymers*. Int. J. Pharm., 1997. **151**(2): p. 223-230.
25. Ferrari, F., et al., *Description and validation of an apparatus for gel strength measurements*. Int. J. Pharm., 1994. **109**: p. 115-124.
26. Yong, C.S., et al., *Effect of sodium chloride on the gelation temperature, gel strength and bioadhesive force of poloxamer gels containing diclofenac sodium*. Int. J. Pharm., 2001. **226**: p. 195-205.
27. Choi, H.-G., Y.-K. Oh, and C.-K. Kim, *In situ gelling and mucoadhesive liquid suppository containing acetaminophen: enhanced bioavailability*. Int. J. Pharm., 1998. **165**(1): p. 23-32.
28. Jones, D.S., A.D. Woolfson, and J. Djokic, *Texture profile analysis of bioadhesive polymeric semisolids: Mechanical characterization and investigation of interactions between formulation components*. J Appl Polym Sci Symp, 1996. **61**(12): p. 2229-2234.
29. Jones, D.S., et al., *Design, characterisation and preliminary clinical evaluation of a novel mucoadhesive topical formulation containing tetracycline for the treatment of periodontal disease*. J. Control. release, 2000. **67**(2-3): p. 357-368.
30. Jones, D.S., et al., *Physicochemical characterization and preliminary in vivo efficacy of bioadhesive, semisolid formulations containing flurbiprofen for the treatment of gingivitis*. J Pharm Sci, 1999. **88**(6): p. 592-8.
31. Duchêne, D., F. Touchard, and N.A. Peppas, *Pharmaceutical and medical aspects of Bioadhesive systems for drug administration*. Drug Dev. Ind. Pharm., 1988. **14**(2&3): p. 283-318.

32. Caramella, C.M., S. Rossi, and M.C. Bonferoni, *A rheological approach to explain the mucoadhesive behavior of polymer gels*, in *Bioadhesive Drug Delivery Systems Fundamentals, Novel Approaches and Development*, E. Mathiowitz, D.E. ChickeringIII, and C.-M. Lehr, Editors. 1999, Marcel Dekker, Inc.: New York. p. 25-65.
33. Lee, J.W., J.H. Park, and J.R. Robinson, *Bioadhesive-based dosage forms: The next generation*. *J Pharm Sci*, 2000. **89**(7): p. 850-866.
34. Hagerstrom, H. and K. Edsman, *Interpretation of mucoadhesive properties of polymer gel preparations using a tensile strength method*. *J Pharm Pharmacol* 2001. **53**: p. 1589-1599.
35. Blanco-Fuente, H., et al., *In-vitro bioadhesion of carbopol hydrogels*. *Int. J. Pharm.*, 1996. **142**: p. 169-174.
36. ChickeringIII, D.E., C.A. Santos, and E. Mathiowitz, *Adaptation of a microbalance to Measure Bioadhesive Properties of Microspheres*, in *Bioadhesive Drug Delivery Systems Fundamentals, Novel Approaches and Development*, E. Mathiowitz, D.E. ChickeringIII, and C.-M. Lehr, Editors. 1999, Marcel Dekker, Inc.: New York. p. 131-146.
37. Blanco-Fuente, H., et al., *Use of  $\beta$ -cyclodextrins to prevent modifications of the properties of carbopol hydrogels due to carbopol–drug interactions*. *Chem. Pharm.Bull*, 2002. **50**(1): p. 40-46.
38. Jones, D.S., A.D. Woolfson, and A.F. Brown, *Textural analysis and flow rheometry of novel, bioadhesive antimicrobial oral gels*. *Pharm. Res.*, 1997. **14**(4): p. 450-457.
39. Quraishi, M.S., N.S. Jones, and J. Mason, *The rheology of nasal mucus: a review*. *Clin. Otolaryngol.*, 1998. **23**: p. 403-413.
40. Andrews, G.P., S.P. Gorman, and D.S. Jones, *Rheological characterisation of primary and binary interactive bioadhesive gels composed of cellulose derivatives designed as ophthalmic viscosurgical devices*. *Biomaterials*, 2005. **26**(5): p. 571-580.

41. Pons, M. and S.M. Fiszman, *Instrumental texture profile analysis with particular reference to gelled systems*. J Texture Stud, 1996. **27**(6): p. 597-624.
42. Tobbyn, M.J., J.R. Johnson, and P.W. Dettmar, *Factors affecting in vitro gastric mucoadhesion I. Test conditions and instrumental parameters*. Eur J Pharm Biopharm, 1995. **41**(4): p. 235-241.
43. Tamburic, S. and D.Q.M. Craig, *A comparison of different in vitro methods for measuring mucoadhesive performance*. Eur J Pharm Biopharm, 1997. **44**(2): p. 159-167.
44. Jones, D.S., M.S. Lawlor, and A.D. Woolfson, *Examination of the flow rheological and textural properties of polymer gels composed of poly(methylvinylether-co-maleic anhydride) and poly(vinylpyrrolidone): Rheological and mathematical interpretation of textural parameters*. J Pharm Sci, 2002. **91**(9): p. 2090-2101.
45. Jones, D.S.W., A. Davida; Brown, Andrew F., *Viscoelastic properties of bioadhesive, chlorhexidine-containing semisolids for topical application to the oropharynx*". Pharm. Res., 1998. **15**(7): p. 1131-1136.
46. Bolton, S. and C. Bon, *Factoriel Designs, in Pharmaceutical Statistics, Practical and Clinical Applications*, S. Bolton, Editor. 2004, Marcel Dekker, Inc.: New York. Basel. p. 265-288.
47. Bourquin, J., et al., *Advantages of Artificial Neural Networks (ANNs) as alternative modelling technique for data sets showing non-linear relationships using data from a galenical study on a solid dosage form*. Eur J Pharm Sci, 1998. **7**(1): p. 5-16.
48. Taskinen, J. and J. Yliruusi, *Prediction of physicochemical properties based on neural network modelling*. Adv. Drug Deliv. Rev, 2003. **55**(9): p. 1163-1183.
49. Roy, J.J., et al., *PII-76: Application of an artificial neural network (ANN) for the monitoring of vancomycin IV in the intensive care unit*. Clinical Pharmacology & Therapeutics. Abstracts of Papers - 2006 Annual Meeting of the American Society for Clinical Pharmacology and Therapeutics, 2006. **79**(2): p. P56.
50. Hussain, A.S., X. Yu, and R.D. Johnson, *Application of neural computing in pharmaceutical product development*. Pharm. Res., 1991. **8**(10): p. 1248-11252.

51. Sun, Y.C., et al., *Application of artificial neural networks in the design of controlled release drug delivery systems*. Adv. Drug Deliv. Rev, 2003. **55**(9): p. 1201-1215.
52. Takayama, K., et al., *Neural network based optimization of drug formulations*. Adv. Drug Deliv. Rev, 2003. **55**(9): p. 1217-1231.
53. Rizkalla, N. and P. Hildgen, *Artificial Neural Networks: Comparison of Two Programs for Modeling a Process of Nanoparticle Preparation*. Drug Dev. Ind. Pharm., 2005. **31**(10): p. 1019-1033.
54. Schoenauer, M., *Algorithmes évolutionnaires pour l'optimisation numérique : Identification de fonctions et Programmation Génétique*. 2005, Equipe TAO - INRIA Futurs: France.
55. Schmolka, I.R., *Artificial skin I. preparation and properties of Pluronic 127 gels for treatment of burns*. J. Biomed. Mater. Res., 1972. **6**: p. 571-582.
56. Alexandridis, P., J.F. Holzwarth, and T.A. Hatton, *Micellization of poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) triblock copolymers in aqueous solutions: thermodynamics of copolymer association*. Macromolecules, 1994. **27**(9): p. 2414-2425.
57. Attwood, D., J.H. Collett, and C.J. Tait, *The micellar properties of the poly(oxyethylene)-poly(oxypropylene) copolymer Pluronic F127 in water and electrolyte solution*. Int. J. Pharm., 1985. **26**(25-33).
58. Mortensen, K. and J.S. Pedersen, *Structural study on the micelle formation of poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) triblock copolymer in aqueous solution*. Macromolecules, 1993. **26**(4): p. 805-812.
59. Zhou, Z. and B. Chu, *Light-scattering study on the association behavior of triblock polymers of ethylene oxide and propylene oxide in aqueous solution*. J. Colloid Inter. Sci., 1988. **126**: p. 171-180.
60. Wanka, G., H. Hoffmann, and W. Ulbricht, *The aggregation behavior of poly-(oxyethylene)-poly-(oxypropylene)-poly-(oxyethylene)-block-copolymers in aqueous solution*. colloid polym Sci 1990. **268**: p. 101-117.

61. Glatter, O., et al., *Characterization of a poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide) triblock copolymer (EO27-PO39-EO27) in aqueous solution*. *Macromolecules*, 1994. **27**(21): p. 6046-6054.
62. Jorgensen, E.B., et al., *Effects of salts on the micellization and gelation of a triblock copolymer studied by rheology and light scattering*. *Macromolecules*, 1997. **30**(8): p. 2355-2364.
63. Ricci, E.J., et al., *Rheological characterization of Poloxamer 407 lidocaine hydrochloride gels*. *Eur J Pharm Sci*, 2002. **17**(3): p. 161-167.
64. Gilbert, J.C., et al., *The effect of solutes and polymer on the gelation properties of pluronic F-127 solution for controlled drug delivery*. *J. Control. release*, 1987. **5**.
65. El-Kamel, A.H., *In vitro and in vivo evaluation of Pluronic F127-based ocular delivery system for timolol maleate*. *Int. J. Pharm.*, 2002. **241**: p. 47-55.
66. Almgren, M., et al., *Aggregation of poly(ethylene oxide)-poly(propylene-oxide)-poly(ethylene oxide) triblock copolymers in the presence of sodium dodecyl sulfate in aqueous solution*. *J. Phys. Chem*, 1991. **95**: p. 5677-5684.
67. Kibbe, A.H., *Poloxamer*, in *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, A.H. Kibbe, Editor. 2000, American Pharmaceutical Association, Pharmaceutical Press: Washington, D.C. ; London. p. 386-388.
68. Lee, S.H., et al., *Regional delivery of vancomycin using pluronic F-127 to inhibit methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) growth in chronic otitis media in vitro and in vivo*. *J. Control. release*, 2004. **96**(1): p. 1-7.
69. Corkhill, P.H., C. J.Hamilton, and B. J.Tighe, *Synthetic hydrogels VI. Hydrogels composites as wound dressings and implant materials*. *Biomaterials*, 1989. **10**: p. 3-10.
70. Beynon, T., et al., *Lutrol gel: A potential role in wounds?* *J Pain Symptom Manage*, 2003. **26**(2): p. 776-780.
71. Schmolka, I.R., *Poloxamers in the pharmaceutical industry*, in *Polymers for controlled drug delivery*, P.J. Tarcha, Editor. 1991, CRC Press: Florida. p. 189-214.



72. Nystrom, B. and H. Walderhaug, *Dynamic viscoelasticity of an aqueous system of a poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) triblock copolymer during gelation*. J. Phys. Chem., 1996. **100**(13): p. 5433-5439.
73. Yong, C.S., et al., *Enhanced rectal bioavailability of ibuprofen in rats by poloxamer 188 and menthol*. Int. J. Pharm., 2004. **269**(1): p. 169-176.
74. Tobyn, M.J., J.R. Johnson, and P.W. Dettmar, *Factors affecting in vitro gastric mucoadhesion II. Physical properties of polymers*. Eur J Pharm Biopharm, 1996. **42**(1): p. 56-61.
75. Park, H. and J.R. Robinson, *Mechanisms of mucoadhesion of poly (acrylic acid) hydrogels*. Pharm. Res., 1987. **4**: p. 457-464.
76. Smart, J.D., *An in vitro assessment of some mucosa-adhesive dosage forms*. Int. J. Pharm., 1991. **73**: p. 69-74.
77. Ishida, M., N. Nambu, and T. Nagai, *Ointment type oral mucosal dosage form of carbopol containing prednisolone for treatment of aphtha*. Chem. Pharm.Bull, 1983. **31**: p. 1010-1014.
78. Mortazavi, S.A., B.G. Carpenter, and J.D. Smart, *A comparative study on the role played by mucus glycoproteins in the rheological behaviour of the mucoadhesive/mucosal interface*. Int. J. Pharm., 1993. **94**: p. 195-201.
79. Patel, M.M., et al., *Mucin/Poly(acrylic acid) interactions: A spectroscopic investigation of mucoadhesion*. Biomacromolecules, 2003. **4**: p. 1184-1190.
80. Ahuja, A., R.K. Khar, and J. Ali, *Mucoadhesive drug delivery systems*. Drug Dev. Ind. Pharm., 1997. **23**(5): p. 489-515.
81. Rowe, R.C., P.J. Sheskey, and P.J. Weller, *Carbomers*, in *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, R.C. Rowe, P.J. Sheskey, and P.J. Weller, Editors. 2003, American Pharmaceutical Association, Pharmaceutical Press: Washington, D.C. ; London. p. 71-73.
82. Gurtler, F., et al., *Development of a novel soluble ophthalmic insert: evaluation of ocular tolerance in rabbits*. Eur J Pharm Biopharm, 1996. **42**(6): p. 393-398.

83. Park, H. and J.R. Robinson, *Physicochemical properties of water insoluble polymers important to Mucin/Epithelial adhesion*. J. Control. release, 1985. **2**: p. 47-52.
84. Lehr, C.-M., et al., *Intestinal transit of bioadhesive microspheres in an in situ loop in the rat - A comparative study with copolymers and blends based on poly(acrylic acid)*. J. Control. release, 1990. **13**: p. 51-62.
85. Mortazavi, S.A. and J.D. Smart, *An in-vitro method for assessing the duration of mucoadhesion*. J. Control. release, 1994. **31**: p. 207-212.
86. Rodriguez, B.E., M.S. Wolfe, and M. Fryd, *Nonuniform Swelling of Alkali Swellable Microgels*. Macromolecules, 1994. **27**(22): p. 6642-6647.
87. Nagarsenker, M.S., V.Y. Londhe, and G.D. Nadkarni, *Preparation and evaluation of liposomal formulations of tropicamide for ocular delivery*. Int. J. Pharm., 1999. **190**(1): p. 63-71.
88. Akbari, J., et al., *Development and evaluation of buccoadhesive propranolol hydrochloride tablet formulations: effect of fillers*. Farmaco, 2004. **59**(2): p. 155-61,.
89. Ugwoke, M.I., et al., *Nasal mucoadhesive delivery systems of the anti-parkinsonian drug, apomorphine: influence of drug-loading on in vitro and in vivo release in rabbits*. Int. J. Pharm., 1999. **181**(1): p. 125-38.
90. Hosny, E.A., *Relative hypoglycemia of rectal insulin suppositories containing deoxycholic acid, sodium taurocholate, polycarbophil, and their combinations in diabetic rabbits*. Drug Dev. Ind. Pharm., 1999. **25**(6): p. 745-52.
91. Penzias, A.S. and M.M. Alper, *Luteal support with vaginal micronized progesterone gel in assisted reproduction*. Reprod Biomed Online, 2003. **6**(3): p. 287-95.
92. Horter, D. and J.B. Dressman, *Influence of physicochemical properties on dissolution of drugs in the gastrointestinal tract*. Adv. Drug Deliv. Rev, 2001. **46**(1-3): p. 75-87.

93. Lukyanov, A.N. and V.P. Torchilin, *Micelles from lipid derivatives of water-soluble polymers as delivery systems for poorly soluble drugs*. Adv. Drug Deliv. Rev, 2004. **56**(9): p. 1273-1289.
94. Reverdy, M.E., *La Chlorhexidine*, in *Antisepsie et Désinfection*, J. Fleurette, J. Freney, and M.E. Reverdy, Editors. 1995, Editions Eska: Paris. p. 135-168.
95. Huchon-Becel, D., *La chlorhexidine*, in *Hygiène hospitalière pratique*, A. Dauphin and J.C. Darbord, Editors. 1990, Technique et documentation- Lavoisier.
96. Caso, A., L.K. Hung, and O.R. Beirne, *Prevention of alveolar osteitis with chlorhexidine: A meta-analytic review*. Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod, 2005. **99**(2): p. 155-159.
97. Parras, F., et al., *Comparative study of Mupirocin and oral Co-trimoxazole plus topical fusidic acid in eradication of nasal carriage of methicillin-resistant staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother, 1995. **39**(1): p. 175-179.
98. Santos, S., et al., *A randomized clinical trial on the short-term clinical and microbiological effects of the adjunctive use of a 0.05% chlorhexidine mouth rinse for patients in supportive periodontal care*. J Clin Periodontol, 2004. **31**: p. 45-51.
99. Block, C., et al., *Evaluation of chlorhexidine and povidone iodine activity against methicillin-resistant Staphylococcus aureus and vancomycin-resistant Enterococcus faecalis using a surface test*. J Hosp Infect, 2000. **46**: p. 147-152.
100. Desai, D., et al., *Carriage of methicillin-resistant Staphylococcus aureus is associated with an increased risk of infection after liver transplantation*. Liver Transpl, 2003. **9**(7): p. 754-759.
101. Rowe, R.C., P.J. Sheskey, and P.J. Weller, *Chlorhexidine*, in *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, R.C. Rowe, P.J. Sheskey, and P.J. Weller, Editors. 2003, American Pharmaceutical Association, Pharmaceutical Press: Washington, D.C. ; London. p. 136-140.
102. Qi, H., T. Nishihata, and J.H. Rytting, *Study of the interaction between  $\beta$ -cyclodextrin and chlorhexidine*. Pharm. Res., 1994. **11**(8): p. 1207-1210.

103. Cortés, M.E., et al., *The chlorhexidine:  $\beta$ -cyclodextrins inclusion compound : preparation, characterization and microbiological evaluation*. J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem, 2001. **40**: p. 297-302.
104. Yue, I.C., et al., *A novel polymeric chlorhexidine delivery device for the treatment of periodontal disease*. Biomaterials, 2004. **25**(17): p. 3743-3750.
105. Stevens, L.E., J.R. Durrwachter, and D.O. Helton, *Analysis of chlorhexidine sorption in soft contact lenses by catalytic oxidation of [ $^{14}$ C]chlorhexidine and by liquid chromatography*. J Pharm Sci, 1986. **75**(1): p. 83-86.
106. Ha, Y. and A.P. Cheung, *New stability-indicating high performance liquid chromatography assay and proposed hydrolytic pathways of chlorhexidine*. J Pharm Biomed Anal, 1996. **14**: p. 1327-1334.
107. Tabor, E., D.C. Bostwick, and C.C. Evans, *Corneal damage due to eye contact with chlorhexidine gluconate*. JAMA, 1989. **261**: p. 557-558.
108. Addy, M. and J. Moran, *Extrinsic tooth discoloration by metals and chlorhexidine, iron and tea*. Br Dent J, 1985. **159**: p. 331-334.
109. Chhabra, R.S., et al., *Carcinogenicity of p-chloroaniline in rats and mice*. Food Chem. Toxicol., 1991. **29**(2): p. 119-124.
110. Szente, L. and J. Szejtli, *Highly soluble cyclodextrin derivatives: chemistry, properties, and trends in development*. Adv. Drug Deliv. Rev, 1999. **36**(1): p. 17-28.
111. Mosher, G. and D.O. Thompson, *Complexation and cyclodextrins*, in *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*, J. Swarbrick and J.C. Boylan, Editors. 2002, Marcel Dekker, Inc.: New York. p. 531-558.
112. Strickley, R.G., *Solubilizing excipients in oral and injectable formulations*. Pharm. Res., 2004. **21**(2): p. 201-230.
113. Stella, V.J., et al., *Mechanisms of drug release from cyclodextrin complexes*. Adv. Drug Deliv. Rev, 1999. **36**(1): p. 3-16.

114. Fromming, K.-H. and J. Szejtli, *Cyclodextrin inclusion complexes*, in *Cyclodextrins in Pharmacy*, J.E.D. Davies, Editor. 1994, Kluwer Academic Publishers: Dordrecht. p. 45-82.
115. Szejtli, J., *Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry*. Chem. Rev., 1998. **98**(5): p. 1743-1753.
116. Engeldinger, E., D. Armspach, and D. Matt, *Capped Cyclodextrins*. Chem. Rev., 2003. **103**(11): p. 4147-4173.
117. Douhal, A., *Ultrafast guest dynamics in cyclodextrin nanocavities*. Chem. Rev., 2004. **104**(4): p. 1955-1976.
118. Fromming, K.-H. and J. Szejtli, *Cyclodextrins in pharmacy*. Topics in Inclusion Science, ed. J.E.D. Davies. Vol. 5. 1994, Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
119. Singh, M., R. Sharma, and U.C. Banerjee, *Biotechnological applications of cyclodextrins*. Biotechnol Adv, 2002. **20**(5-6): p. 341-359.
120. Liu, L. and Q.-X. Guo, *The driving forces in the inclusion complexation of cyclodextrins*. J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem, 2002. **42**(1): p. 1-14.
121. Pose-Vilarnovo, B., et al., *Modulating drug release with cyclodextrins in hydroxypropyl methylcellulose gels and tablets*. J. Control. release, 2004. **94**(2-3): p. 351-363.
122. Irie, T. and K. Uekama, *Pharmaceutical applications of cyclodextrins. III. Toxicological issues and safety evaluation*. J Pharm Sci, 1997. **86**(2): p. 147 - 162.
123. Loftsson, T. and M.E. Brewster, *Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 1. Drug solubilization and Stabilization*. J Pharm Sci, 1996. **85**(10): p. 1017-1025.
124. Uekama, K., F. Hirayama, and T. Irie, *Cyclodextrin drug carrier systems*. Chem. Rev., 1998. **98**(5): p. 2045-2076.
125. Yano, H., et al., *Colon-specific delivery of prednisolone-appended [alpha]-cyclodextrin conjugate: alleviation of systemic side effect after oral administration*. J. Control. release, 2002. **79**(1-3): p. 103-112.

126. Vandelli, M.A., et al., *A solution and solid state study on 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin complexation with hyodeoxycholic acid*. J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem, 2000. **37**: p. 237-251.
127. Pitha, J., et al., *Hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin: Preparation and characterisation; effects on solubility of drugs*. Int. J. Pharm., 1986. **29**: p. 73-82.
128. Asai, K., et al., *The effects of water-soluble cyclodextrins on the histological integrity of the rat nasal mucosa*. Int. J. Pharm., 2002. **246**: p. 25-35.
129. Piel, G., et al., *A nuclear magnetic resonance study of the miconazole- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex in an acidic medium : determination of the structure and stability constants*. S.T.P. pharma, 2001. **11**(3): p. 235-238.
130. Piel, G., et al., *Comparison of the IV pharmacokinetics in sheep of miconazole-cyclodextrin solutions and a micellar solution*. Int. J. Pharm., 1999. **180**: p. 41-45.
131. Magnusdottir, A., M. Masson, and T. Loftsson, *Self association and cyclodextrin solubilization of NSAIDs*. Journal of Inclusion Phenomena and Molecular Recognition in Chemistry, 2002. **44**(1-4): p. 213-218.
132. Loftsson, T., et al., *Self-association and cyclodextrin solubilization of drugs*. J Pharm Sci, 2002. **91**(11): p. 2307-2316.
133. Loftsson, T., M. Masson, and M.E. Brewster, *Self-association of cyclodextrins and cyclodextrin complexes*. J Pharm Sci, 2004. **93**(5): p. 1091-1099.
134. Loftsson, T. and T. Jarvinen, *Cyclodextrins in ophthalmic drug delivery*. Adv. Drug Deliv. Rev, 1999. **36**(1): p. 59-79.
135. Higuchi, T. and K.A. Connors, *Phase solubility techniques*. Advances in analytical chemistry and instrumentation, 1965. **4**: p. 117-212.
136. Fernandes, C.M., M.T. Vieira, and F.J.B. Veiga, *Physicochemical characterization and in vitro dissolution behavior of nicardipine-cyclodextrins inclusion compounds*. Eur J Pharm Sci, 2002. **15**: p. 79-88.
137. Zornoza, A., et al., *Inclusion complexation of glisentide with [ $\alpha$ ]-, [ $\beta$ ]- and [ $\gamma$ ]-cyclodextrins*. Int. J. Pharm., 1998. **169**(2): p. 239-244.

138. Hedges, A.R., *Industrial applications of cyclodextrins*. Chem. Rev., 1998. **98**(5): p. 2035-2044.
139. Loftsson, T., *Increasing the cyclodextrin complexation of drugs and drug bioavailability through addition of water-soluble polymers*. Pharmazie, 1998. **53**(11): p. 733-740.
140. Bahadur, P., et al., *Effect of potassium fluoride on the micellar behavior of Pluronic F-68 in aqueous solution*. Langmuir, 1992. **8**(8): p. 1903-1907.
141. Jones, D.S., et al., *Development and mechanical characterization of bioadhesive semisolid, polymeric systems containing tetracycline for the treatment of periodontal diseases*. Pharm. Res., 1996. **13**(11): p. 1734-1738.
142. Gandhi, R.B. and J.R. Robinson, *Oral cavity as a site for bioadhesive drug delivery*. Adv. Drug Deliv. Rev, 1994. **13**: p. 43-74.
143. Zhou, M. and M.D. Donovan, *Intranasal mucociliary clearance of putative bioadhesive polymer gels*. Int. J. Pharm., 1996. **135**(1-2): p. 115-125.
144. Juhasz, J., C. Pimienta, and V. Lenaerts, *Adhesion of poloxamer 407 formulations on dog ileal segments in vitro*. Eur J Pharm Biopharm, 1991. **37**(4): p. 262-265.
145. Mura, P., et al., *Differential scanning calorimetry as an analytical tool in the study of drug cyclodextrin interactions*. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, 2003. **73**: p. 635-646.
146. *Standard proton NMR spectrum*, in *Sadtler Research Laboratories Inc*. 1967. p. 3992 M.
147. Schneider, H.-J.r., et al., *NMR studies of cyclodextrins and cyclodextrin complexes*. Chem. Rev., 1998. **98**: p. 1755-1785.
148. Kim, J.H., et al., *Development of parenteral formulation for a novel angiogenesis inhibitor, CKD-732 through complexation with hydroxypropyl-beta-cyclodextrin*. Int. J. Pharm., 2004. **272**(1-2): p. 79-89.
149. Giordano, F., C. Novak, and J.R. Moyano, *Thermal analysis of cyclodextrins and their inclusion compounds*. Thermochemica Acta, 2001. **380**(2): p. 123-151.

150. Jug, M. and M. Becirevic-Lacan, *Influence of hydroxypropyl-[beta]-cyclodextrin complexation on piroxicam release from buccoadhesive tablets*. Eur J Pharm Sci, 2004. **21**(2-3): p. 251-260.
151. Connors, K.A., *The stability of cyclodextrin complexes in solution*. Chem. Rev., 1997. **97**(5): p. 1325-1358.
152. Gavira, J.M., A. Hernanz, and I. Bratu, *Dehydration of  $\beta$ -cyclodextrin An IR  $\nu$ (OH) band profile analysis*. Vibrational Spectroscopy, 2003. **32**: p. 137-146.
153. Djedaini, F., et al., *High-field nuclear magnetic resonance techniques for the investigation of a  $\beta$ -cyclodextrin:indomethacin inclusion complex*. Int. J. Pharm., 1990. **79**(7): p. 643-647.
154. Ikeda, Y., et al., *NMR spectroscopic characterization of Metoprolol/Cyclodextrin complexes in aqueous solution: Cavity size dependency*. J Pharm Sci, 2004. **93**(7): p. 1659-1671.
155. Ganza-Gonzalez, A., et al., *A proton nuclear magnetic resonance study of the inclusion complex of naproxen with  $\beta$ -cyclodextrin*. Int. J. Pharm., 1994. **106**(3): p. 179-185.