



Intérêt des nanosphères comme forme orale à libération modifiée pour améliorer la biodisponibilité et le profil pharmaco-dynamique de l'isradipine

Laurence Fluckiger

► To cite this version:

Laurence Fluckiger. Intérêt des nanosphères comme forme orale à libération modifiée pour améliorer la biodisponibilité et le profil pharmaco-dynamique de l'isradipine. Médecine humaine et pathologie. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 1999. Français. NNT : 1999NAN12012 . tel-01747576

HAL Id: tel-01747576

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01747576>

Submitted on 29 Mar 2018

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

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



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITE HENRI POINCARE - NANCY I
1999

ECOLE DOCTORALE "BIOLOGIE ET SANTE"

THESE

Présentée et soutenue publiquement
le 18 juin 1999



pour obtenir le titre de *Dr 18021*

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE
HENRI POINCARE - NANCY I**
Mention "Sciences du médicament"

par

Laurence FLUCKIGER

Titulaire du Diplôme d'Etudes Approfondies

Sujet :

**INTERET DES NANOSPHERES COMME
FORME ORALE A LIBERATION MODIFIEE
POUR AMELIORER LA BIODISPONIBILITE ET LE PROFIL
PHARMACO-DYNAMIQUE DE L'ISRADIPINE.**

MEMBRES DU JURY

Juges :

Pr P. MAINCENT, Directeur de Thèse
Pr J. ATKINSON, Co-Directeur de Thèse
Pr M. HOFFMAN
Dr F. ZANNAD
Dr D. BAZILE

Rapporteurs :

Pr J.P. DEVISSAGUET
Pr A. GAYOT

BU PHARM. ODONTOL.



D 104 048693 4

FACULTE DE PHARMACIE

UNIVERSITE Henri Poincaré - NANCY I

Membres du personnel enseignant

Doyen : C. VIGNERON

Vice Doyen : G. CATAU

PROFESSEURS HONORAIRES

M. BERNANOSE André
Mlle BESSON Suzanne
Mlle GIRARD Thérèse

M. MEUNIER André
M. MIRJOLET Marcel
M. PIERFITTE Maurice

PROFESSEUR EMERITE

M. LOPPINET Vincent

PROFESSEURS

M. ASTIER Alain	Pharmacie Clinique
M. ATKINSON Jeffrey	Pharmacologie
M. BAGREL Alain	Biochimie fondamentale et clinique, Biotechnologies
Mlle BATT Anne Marie	Toxicologie
M. BLOCK Jean Claude	Santé et Environnement
M. BONALY Roger	Biochimie microbienne
Mme CAPDEVILLE-ATKINSON	Pharmacologie Cardiovasculaire
Mme FINANCE Chantal	Microbiologie moléculaire
Mme FRIANT-MICHEL Pascale	Biomathématiques, Biophysique et Audioprothèse
Mlle GALTEAU Marie Madeleine	Biochimie
M. HENRY Max	Biologie végétale
M. HOFFMAN Maurice	Pharmacie clinique
M. JACQUE Michel	Pharmacodynamie
M. LABRUDE Pierre	Physiologie
M. LALLOZ Lucien	Chimie organique
M. LECTARD Pierre	Biologie végétale et Cryptogamie
M. MAINCENT Philippe	Pharmacie galénique
M. MARSURA Alain	Chimie thérapeutique
M. MARTIN Jean Armand	Chimie minérale et Minéralogie
M. MORTIER François	Pharmacognosie
M. NICOLAS Alain	Chimie analytique et Bromatologie
M. REGNOUF DE VAINS Jean Bernard	Chimie Thérapeutique
Mme SCHWARTZBROD Janine	Bactériologie - Parasitologie
M. SCHWARTZBROD Louis	Virologie - Immunologie
M. SIEST Gérard	Chimie Biologique
M. SIMON Jean Michel	Droit et Economie de la Santé
M. VIGNERON Claude	Hématologie

MAITRES DE CONFERENCES

Mme ALBERT Monique	Bactériologie - Virologie
M. BAUDOT Philippe	Toxicologie
Mme BENOIT Emmanuelle	Chimie Analytique
M. BONNEAUX François	Chimie Thérapeutique
M. CATAU Gérald	Pharmacodynamie
M. CHEVIN Jean Claude	Chimie minérale
M. COLLIN Jean François	Pôle européen
Mme COLLOMB Jocelyne	Parasitologie
M. COULON Joël	Biochimie
M. DECOLIN Dominique	Chimie analytique
M. DUCOURNEAU Joël	Biophysique, Audioprothèse, Acoustique
Mme FAIVRE-FIORINA Béatrice	GBM - Hématologie
M. FERRARI Luc	Biochimie
Mme FUZELLIER Marie Claude	Pharmacognosie
M. GHERMANI Nour-Eddine	Biophysique - Biomathématiques
Mme HASENFRATZ-SAUDER Marie Paule	Biologie Végétale
Mlle HINZELIN Françoise	Biologie végétale et Pharmacognosie
M. HUMBERT Thierry	Interactions moléculaires
Mlle IMBS Marie Andrée	Bactériologie - Virologie et Parasitologie
M. JORAND Frédéric	Santé et Environnement
Mme KEDZIEREWICZ Francine	Pharmacie Galénique
Mme LARTAUD-IDJOUADIENE Isabelle	Pharmacologie
Mme LEININGER-MULLER Brigitte	Biochimie
M. LEROY Pierre	Chimie analytique
Mme LETOT Michèle	Bactériologie - Virologie et Parasitologie
Mme LIVERTOUX Marie Hélène	Toxicologie
Mme MARCHAND-ARVIER Monique	Immunologie - Hématologie
M. MENU Patrick	Physiologie
M. MIGNOT Bernard	Physique
M. MONAL Jean Louis	Chimie Thérapeutique
M. NOTTER Dominique	Biologie cellulaire
Mme PAULUS Francine	Informatique
Mme PERDIAKIS Christine	Chimie organique
Mme PICHON Virginie	Biophysique et Mathématiques
Mme POCHON Marie France	Chimie analytique
Mme ROVEL Anne	Immunologie - Hématologie
M. VISVIKIS Athanase	Toxicologie
Mme WELLMAN-ROUSSEAU Maria Monika	Biochimie
Mme ZINUTTI Colette	Pharmacie galénique

ASSISTANTS

Mme BERTHE Marie-Catherine	Biochimie
M. DANGIEN Bernard	Botanique
Mme MOREAU Blandine	Pharmacognosie
Mme PAVIS Annie	Parasitologie
M. TROCKLE Gabriel	Pharmacodynamie

PROFESSEUR ASSOCIE

Mme GRISON Geneviève	Pratiques officinales (50%)
----------------------	-----------------------------

PROFESSEUR AGREGÉ

M. COCHAUD Christophe	Anglais
-----------------------	---------

Au terme de ce travail, il m'est agréable d'adresser mes remerciements à tous ceux qui m'ont aidé à le réaliser et en premier lieu, à ceux qui me font l'honneur d'en être les juges.

Je remercie très sincèrement

Monsieur le Professeur Jean-Philippe DEVISSAGUET,
du Centre d'Etudes Pharmaceutiques de Paris XI,
Madame le Professeur Anne GAYOT,
de la Faculté de Pharmacie de Lille,
pour l'honneur qu'ils me font d'avoir accepté de juger ce travail et d'en être les rapporteurs.

Mes remerciements s'adressent aussi à :

Monsieur le Professeur Maurice HOFFMAN,
de la Faculté de Pharmacie de Nancy, praticien hospitalier à l'Hôpital Central au CHU de Nancy, qui m'a encouragé dès le début de mon internat à faire de la recherche en pharmacie galénique. Qu'il soit assuré de mon profond respect.

Monsieur le Professeur Jeffrey ATKINSON,
de la Faculté de Pharmacie de Nancy, qui a dirigé les études pharmacodynamiques de cette thèse et dont les conseils et la rigueur scientifique ont été une aide précieuse. Qu'il trouve ici le témoignage de ma considération.

Monsieur le Docteur Faiez ZANNAD,
Maître de Conférences à la Faculté de Médecine de Nancy I et praticien hospitalier au CHU de Nancy (Cardiologie D et Centre d'Investigation Clinique), qui m'a initié à la recherche clinique en cardiologie. Qu'il soit assuré de mon admiration et de mon profond respect.

Monsieur le Docteur Didier BAZILE,
pharmacien responsable de l'unité Préformulation Pharmaceutique (Rhône Poulenc Rorer) pour l'honneur qu'il me fait de participer au jury de cette thèse.

Que Monsieur le Professeur Philippe MAINCENT trouve ici l'expression de ma gratitude et de mon profond respect. Je le remercie pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire, pour la confiance qu'il m'a témoignée durant toutes ces années et pour la disponibilité dont il a fait preuve à mon égard. Puissiez-vous trouver dans ce travail l'expression de mon respectueux dévouement et de ma sincère reconnaissance.

Je souhaiterais témoigner ma profonde reconnaissance à :

Madame Sylvette Boyer (INSERM) qui m'a appris la technique de canulation du canal mésentérique chez le rat.

Monsieur le Professeur Jean-Pierre BENOIT (Faculté de Pharmacie d'Angers) pour avoir réalisé les études de calorimétrie différentielle.

Madame le Docteur Isabelle LARTAUD-IDJOUADIENE (Laboratoire de pharmacologie cardio-vasculaire) qui a cathétérisé les rats ayant servi aux études de pharmacocinétique sanguine.

Monsieur LIMINANA qui m'a aidé à mesurer la pression artérielle des rats.

Madame le Docteur Colette ZINUTTI (Laboratoire de pharmacie galénique), qui m'a encouragé tout le long de ce travail et dont les conseils ont été précieux pour les études de pharmacocinétique.

Monsieur Francis MARCHAL (Faculté de Médecine) qui a réalisé les observations en microscopie électronique à balayage.

Monsieur Jean-François REMY (ENSIC), qui a réalisé les photographies en microscopie électronique à transmission.

Madame le Docteur Emmanuelle BENOIT (Faculté de Pharmacie) qui m'a conseillé dans la mise au point du dosage par CLHP.

Madame Francine KEDZIEREWICZ (Laboratoire de pharmacie galénique).

J'adresse mes sincères amitiés à Martine LE VERGER et Young-Il KIM, mes compagnons de thèse de la première heure.

Enfin je remercie très chaleureusement tous mes collègues et amis du Laboratoire de Pharmacie Galénique et Biopharmacie pour leur amitié, leur bonne humeur, leur soutien et leurs encouragements, et en particulier :

Madame FRENOT et Monsieur HOUPPERT (pour leur serviabilité)

Monica HOMBREIRO-PEREZ (le rayon de soleil du labo), Valérie HOFFART (pour sa pêche), Nathalie UBRICH (pour son enthousiasme pour la recherche).

A mes parents

A ma famille

A mes amis

SOMMAIRE



INTRODUCTION 8

RAPPELS 12

1. L'ISRADIPINE 12

1.1 LES ANTAGONISTES CALCIFIQUES	12
1.1.1 LES ANTAGONISTES CALCIFIQUES DE PREMIERE GENERATION	12
1.1.2 LES ANTAGONISTES CALCIFIQUES DE DEUXIEME GENERATION	13
1.1.3 LES ANTAGONISTES CALCIFIQUES DE TROISIEME GENERATION	13
1.2 MECANISME D'ACTION DES DIHYDROPYRIDINES	14
1.2.1 LES CANAUX CALCIFIQUES	14
1.2.2 MECANISME D'ACTION	15
1.2.3 ACTIVATION SYMPATHIQUE	15
1.3 L'ISRADIPINE	16
1.3.1 PROPRIETES PHARMACODYNAMIQUES	16
1.3.2 PROPRIETES PHARMACOCINETIQUES	17
1.3.3 TOLERANCE	18
1.3.4 DOSAGE ET ADMINISTRATION	18
1.3.5 RAPPORT VALLEE/PIC	18

2. LES NANOSPHERES 19

2.1 GENERALITES SUR LES VECTEURS DE PRINCIPES ACTIFS	19
2.1.1 LES VECTEURS MACROMOLECULAIRES	19
2.1.2 LES VECTEURS CORPUSCULAIRES	19
2.2 LES METHODES DE PREPARATION DES NANOSPHERES	21
2.2.1 RETICULATION DE MACROMOLECULES NATURELLES	21
2.2.2 POLYMERISATION DE MONOMERES	21
2.2.3 PRECIPITATION DE POLYMERES PREFORMES	22
2.2.3.1 Emulsion/évaporation de solvant	23
2.2.3.2 Méthode par relargage d'un sel ("Salting-out")	23
2.2.3.3 Nanoprécipitation	23

3. LES POLYMERES 25

3.1 DEFINITION D'UN POLYMERE BIODEGRADABLE	25
3.1.1 MECANISMES DE DEGRADATION	25
3.1.2 APPLICATIONS DES POLYMERES BIORESORBABLES	27
3.2 COPOLYMERES D'ACIDES LACTIQUES ET GLYCOLIQUES	28
3.2.1 STRUCTURE CHIMIQUE	28
3.2.2 NOMENCLATURE	29
3.2.3 MECANISME DE DEGRADATION	29
3.3 POLY(ϵ -CAPROLACTONE)	31
3.3.1 STRUCTURE CHIMIQUE	31
3.3.2 MECANISME DE DEGRADATION	31
3.4 LES EUDRAGIT RL/RS	32

4. DEVENIR DES NANOSPHERES APRES ADMINISTRATION ORALE 3 4

4.1	ABSORPTION INTESTINALE DES NANOSPHERES	3 5
4.1.1	RAPPEL SUR LA PAROI INTESTINALE	35
4.1.2	LES DIFFERENTES VOIE DE PASSAGE	36
4.1.2.1	Passage intercellulaire et paracellulaire	37
4.1.2.2	Passage intracellulaire et transport par les cellules épithéliales	37
4.1.2.3	Phagocytose par les macrophages intestinaux	37
4.1.2.4	Capture au niveau des plaques de Peyer	37
4.1.3	RAPPEL ANATOMIQUE ET PHYSIOLOGIQUE DU SYSTEME LYMPHATIQUE DE L'HOMME	38
4.1.3.1	Les vaisseaux lymphatiques	38
4.1.3.2	Composition de la lymphe	39
4.1.3.3	Transport de la lymphe et débits lymphatiques	40
4.1.3.4	Comparaison avec le système lymphatique du Rat	41
4.2	ABSORPTION LYMPHATIQUE GASTRO-INTESTINALE	4 1
4.2.1	VIA LES TISSUS NON LYMPHOÏDES	42
4.2.1.1	Mécanismes de l'absorption lymphatique	42
4.2.1.2	Propriétés physico-chimiques de la capture lymphatique	42
4.2.2	VIA LES TISSUS LYMPHOÏDES	42
4.2.2.1	Capture par les plaques de Peyer	43
4.2.2.2	Les cellules M	43
4.2.2.3	Mécanisme de la capture	43
4.2.2.4	Mise en évidence de la capture des particules	44
4.2.2.5	Facteurs favorisant la capture par les cellules M	45
4.2.2.6	Ciblage des cellules M	46
4.2.3	INTERET DU CIBLAGE LYMPHATIQUE	47
4.2.3.1	Les formulations lipidiques	47
4.2.3.2	Les vecteurs colloïdaux polymères	48

METHODES 5 0

5. METHODES DE PREPARATION DES DIFFERENTES FORMES MEDICAMENTEUSES 5 0

5.1	PREPARATION DE LA SOLUTION D'ISRADIPINE	5 0
5.1.1	LE PRINCIPE ACTIF	50
5.1.2	METHODE DE PREPARATION	50
5.2	PREPARATION DES NANOSPHERES	5 1
5.2.1	LES DIFFERENTS CONSTITUANTS	51
5.2.1.1	Les polymères	51
5.2.1.2	Le stabilisant	51
5.2.2	MODE OPERATOIRE	52
5.2.2.1	Préparation des nanosphères de PCL ou de PLAGA	52
5.2.2.2	Préparation des nanosphères d'Eudragit	53
5.2.2.3	Préparation des nanosphères non chargées en isradipine	53

6. METHODES DE CARACTERISATION PHYSICO-CHIMIQUE DES NANOSPHERES 5 4

6.1	DETERMINATION DE LA TAILLE DES NANOSPHERES	5 4
6.1.1	GRANULOMETRIE PAR SPECTROSCOPIE DE CORRELATION DE PHOTONS	54

6.1.1.1 Principe	54
6.1.1.2 Description du montage optique	55
6.1.1.3 Méthode de calcul	55
6.1.1.4 Notion d'indice de polydispersité	56
6.1.1.5 Appareillage et mode opératoire	56
6.1.2 MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A BALAYAGE	56
6.1.3 MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A TRANSMISSION	57
6.1.4 ANALYSES STATISTIQUES	57
6.2 DETERMINATION DU POTENTIEL ZETA PAR ELECTROPHORESE LASER DOPPLER	58
6.2.1 NOTION DE POTENTIEL ZETA	58
6.2.2 PRINCIPE	58
6.2.3 APPAREILLAGE ET CONDITIONS OPERATOIRES	59
6.3 DETERMINATION DE LA STRUCTURE DES NANOSPHERES PAR CALORIMETRIE DIFFERENTIELLE A BALAYAGE	59
6.3.1 PRINCIPE DE LA METHODE	60
6.3.2 APPAREILLAGE ET MODE OPERATOIRE	60
7. METHODES DE DOSAGE DE L'ISRADIPINE	62
7.1 METHODE DE DOSAGE DE L'ISRADIPINE EN SOLUTION PAR SPECTROPHOTOMETRIE UV/VISIBLE	62
7.2 DOSAGE DE L'ISRADIPINE INCORPOREE DANS LES NANOSPHERES	62
7.2.1 PRINCIPE	62
7.2.2 MATERIEL	62
7.2.3 MODE OPERATOIRE	63
7.2.4 EXPRESSION DES RESULTATS	63
7.2.4.1 Pourcentage d'incorporation	63
7.2.4.2 Charge en principe actif	64
7.2.5 ANALYSES STATISTIQUES	64
7.3 DOSAGE DE L'ISRADIPINE DANS LES MILIEUX BIOLOGIQUES (PLASMA, LYPHE)	64
7.3.1 MATERIEL CLHP	65
7.3.2 CONDITIONS CHROMATOGRAPHIQUES	65
7.3.3 TRAITEMENT DES ECHANTILLONS BIOLOGIQUES AVANT DOSAGE	66
7.3.4 VALIDATION DE LA METHODE DE DOSAGE	67
8. ETUDE DE LA LIBERATION <i>IN VITRO</i> DE L'ISRADIPINE INCORPOREE DANS LES NANOSPHERES	68
8.1 CONDITIONS DE L'ETUDE DE LIBERATION	68
8.2 MODE OPERATOIRE	69
8.3 EXPRESSION DES RESULTATS ET ANALYSES STATISTIQUES	69
9. METHODES CONCERNANT LES ETUDES <i>IN VIVO</i>	70
9.1 EXPERIMENTATION ANIMALE ET ETHIQUE	70
9.2 METHODE D'ETUDE DE L'EVOLUTION CHRONOLOGIQUE DE LA PRESSION ARTERIELLE APRES ADMINISTRATION ORALE DES NANOSPHERES D'ISRADIPINE CHEZ LE RAT	70
9.2.1 MODELE ANIMAL	70

9.2.2 PRINCIPE DE LA METHODE	71
9.2.3 PROTOCOLE EXPERIMENTAL	71
9.2.4 FORMES ET DOSES D'ISRADIPINE TESTEES	72
9.2.4.1 Etude à la dose de 1 mg/kg	72
9.2.4.2 Etude à la dose de 2,5 mg/kg	72
9.2.5 CALCUL DES RAPPORTS « VALLEE SUR PIC »	73
9.2.6 ANALYSES STATISTIQUES	73
9.3 METHODE D'ETUDE DE L'EVOLUTION CHRONOLOGIQUE DES CONCENTRATIONS PLASMATIQUES D'ISRADIPINE APRES ADMINISTRATION PAR VOIE INTRAVEINEUSE DES NANOSPHERES CHEZ LE RAT	74
9.3.1 MODELES EXPERIMENTAUX	74
9.3.1.1 Préparation des animaux	74
9.3.1.2 Canulation veineuse	74
9.3.1.3 Canulation artérielle	74
9.3.2 PROTOCOLE EXPERIMENTAL	75
9.3.3 VARIABLES ETUDIEES	75
9.3.4 ANALYSES STATISTIQUES	75
9.4 METHODE D'ETUDE DE L'EVOLUTION CHRONOLOGIQUE DES CONCENTRATIONS PLASMATIQUES D'ISRADIPINE APRES ADMINISTRATION ORALE DES NANOSPHERES D'ISRADIPINE CHEZ LE RAT A LA DOSE DE 2,5 MG/KG	76
9.4.1 MODELE ANIMAL	76
9.4.2 PROTOCOLE EXPERIMENTAL	77
9.4.3 VARIABLES ETUDIEES	77
9.4.4 ANALYSES STATISTIQUES	77
9.5 METHODE D'ETUDE DE L'EVOLUTION CHRONOLOGIQUE DES CONCENTRATIONS LYMPHATIQUES D'ISRADIPINE APRES ADMINISTRATION INTRAGASTRIQUE DES NANOSPHERES CHEZ LE RAT	78
9.5.1 MODELES EXPERIMENTAUX	78
9.5.1.1 Préparation des animaux	78
9.5.1.2 Canulation du canal lymphatique mésentérique	78
9.5.2 SCHEMA EXPERIMENTAL	79
9.5.3 EXPRESSION DES RESULTATS	79
9.5.4 ANALYSES STATISTIQUES	80
9.6 METHODOLOGIE DES ETUDES PHARMACOCINETIQUES PLASMATIQUES ET LYMPHATIQUES	80
9.6.1 DEFINITION DES PARAMETRES PHARMACOCINETIQUES ETUDIES	80
9.6.2 ETUDE DE LA BIODISPONIBILITE	82
9.6.2.1 Définitions	82
9.6.2.2 Biodisponibilités étudiées	82
9.6.3 ANALYSES STATISTIQUES	83
RÉSULTATS	84
10. CARACTERISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES DES NANOSPHERES	84
10.1 ASPECT MACROSCOPIQUE	84
10.2 ASPECT MICROSCOPIQUE	84
10.2.1 MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A BALAYAGE	84
10.2.2 MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A TRANSMISSION	86
10.3 DIAMETRE ET POTENTIEL ZETA	86
10.3.1 NANOSPHERES NON CHARGEES EN ISRADIPINE	87

10.3.2 NANOSPHERES CHARGEES EN ISRADIPINE	87
10.4 RENDEMENT D'ENCAPSULATION ET CHARGE EN ISRADIPINE	87
10.4.1 PROFILS D'ELUTION PAR FILTRATION SUR GEL	87
10.4.2 POURCENTAGES D'INCORPORATION DANS LES NANOSPHERES	89
10.4.3 CHARGE EN ISRADIPINE	89
10.5 ANALYSE CALORIMETRIQUE DIFFERENTIELLE	90
10.5.1 CONSTITUANTS DES NANOSPHERES	90
10.5.2 NANOSPHERES NON CHARGEES EN ISRADIPINE	91
10.5.3 NANOSPHERES CHARGEES EN ISRADIPINE	91
<u>11. ETUDE DE LA LIBERATION IN VITRO DE L'ISRADIPINE</u>	<u>93</u>
11.1 DANS UN TAMPON A PH 6,8	93
11.2 DANS UN TAMPON A PH 1,4	94
11.3 DANS UNE SOLUTION D'ALBUMINE A 1,5 %	95
<u>12. EVOLUTION CHRONOLOGIQUE DE LA PRESSION ARTERIELLE APRES ADMINISTRATION ORALE DES NANOSPHERES A DES RATS SHR.</u>	<u>97</u>
12.1 APRES ADMINISTRATION DE L'EAU ET DES NANOSPHERES NON CHARGEES	97
12.2 EFFET DE LA DOSE DE 1MG/KG D'ISRADIPINE	97
12.2.1 APRES ADMINISTRATION DE LA SOLUTION D'ISRADIPINE DANS LE PEG	100
12.2.2 APRES ADMINISTRATION DES NANOSPHERES CHARGEES EN ISRADIPINE	100
12.2.2.1 Après administration des nanosphères de PCL	100
12.2.2.2 Après administration des nanosphères de PLAGA	100
12.2.2.3 Après administration des nanosphères d'Eudragit	101
12.2.3 AUTRES RESULTATS	101
12.3 EFFET DE LA DOSE DE 2,5 MG/KG D'ISRADIPINE	101
12.4 RAPPORTS VALLEE/PIC	103
<u>13. ETUDE DES CONCENTRATIONS PLASMATIQUES D'ISRADIPINE APRES INJECTION INTRA-VEINEUSE DES NANOSPHERES A DES RATS SHR</u>	<u>104</u>
13.1 EVOLUTION CHRONOLOGIQUE DES CONCENTRATIONS PLASMATIQUES	104
13.2 PARAMETRES PHARMACOCINETIQUES PLASMATIQUES	105
<u>14. ETUDE DES CONCENTRATIONS PLASMATIQUES D'ISRADIPINE APRES ADMINISTRATION PER OS DES NANOSPHERES A DES RATS SHR</u>	<u>107</u>
14.1 EVOLUTION CHRONOLOGIQUE DES CONCENTRATIONS PLASMATIQUES D'ISRADIPINE	107
14.2 PARAMETRES PHARMACOCINETIQUES PLASMATIQUES	109
14.3 BIODISPONIBILITE ABSOLUE	110
<u>15. EVOLUTION CHRONOLOGIQUE DES CONCENTRATIONS LYMPHATIQUES D'ISRADIPINE APRES ADMINISTRATION INTRAGASTRIQUE DES NANOSPHERES CHEZ LE RAT OFA</u>	<u>111</u>

15.1 VALIDATION DE LA METHODE DE DOSAGE CLHP DE L'ISRADIPINE DANS LA LYMPHE	111
15.1.1 TEMPS DE RETENTION DE L'ISRADIPINE ET DE L'ETALON INTERNE	111
15.1.2 LINEARITE	112
15.1.3 LIMITE DE DETECTION ET LIMITE DE QUANTIFICATION	113
15.1.4 REPRODUCTIBILITE ET REPETABILITE	113
15.1.5 EFFET DE LA CONGELATION	114
15.2 DEBITS ET QUANTITES DE LYMPHE RECOLTEE	114
15.3 BILAN QUANTITATIF	117
15.3.1 CONCENTRATIONS LYMPHATIQUES	117
15.3.2 QUANTITES CUMULEES ET POURCENTAGES DE LA DOSE ADMINISTREE D'ISRADIPINE RETROUVEE DANS LA LYMPHE	119
15.4 PHARMACOCINETIQUE LYMPHATIQUE	121

DISCUSSION 123

16. DISCUSSION DES RESULTATS OBTENUS *IN VITRO* 123

16.1 LA METHODE DE PREPARATION DES NANOSPHERES	124
16.2 CARACTERISTIQUES PHYSICOCHIMIQUES DES NANOSPHERES	124
16.2.1 INFLUENCE DE LA TAILLE DES NANOSPHERES	124
16.2.2 INFLUENCE DU POTENTIEL ZETA	125
16.2.3 INFLUENCE DU PLURONIC® F68	125
16.3 RENDEMENT D'INCORPORATION DE L'ISRADIPINE DANS LES NANOSPHERES	126
16.4 ETUDES DE LIBERATION <i>IN VITRO</i>	127
16.5 INFLUENCE DES PROPRIETES MECANQUES DES POLYMERES	129
16.5.1 INFLUENCE DU CARACTERE VITREUX	129
16.5.2 INFLUENCE DU DEGRE DE CRISTALLINITE	130
16.5.3 INFLUENCE DU CARACTERE HYDROPHILE DU POLYMERE	130
16.6 INFLUENCE DE L'ETAT PHYSICO-CHIMIQUE DU PRINCIPE ACTIF	131

17. DISCUSSION DES RESULTATS OBTENUS *IN VIVO* 133

17.1 PHARMACOCINETIQUE PLASMATIQUE	
17.1.1 ADMINISTRATION INTRAVEINEUSE	133
17.1.2 ADMINISTRATION ORALE	133
17.2 AUGMENTATION DE LA BIODISPONIBILITE DE L'ISRADIPINE	134
17.2.1 INHIBITION DU PROCESSUS D'OPSONISATION	134
17.2.2 PROTECTION DE L'ISRADIPINE DE TOUTE DEGRADATION AU NIVEAU DU TRACTUS DIGESTIF	136
17.2.3 AUGMENTATION DU TEMPS DE TRANSIT GASTRO- INTESTINAL	136
17.2.4 INTERACTIONS AVEC LE MUCUS INTESTINAL	137
17.2.5 CAPTURE PAR LES PLAQUES DE PEYER	137
17.3 CINETIQUE LYMPHATIQUE	138
17.3.1 LE MODELE ANIMAL	138
17.3.2 LES DEBITS LYMPHATIQUES	140
17.3.3 LES CONCENTRATIONS LYMPHATIQUES	140
17.3.3.1 Variabilité des résultats	140
17.3.3.2 Résorption lymphatique de l'isradipine	141
17.4 ACTIVITE PHARMACODYNAMIQUE	143
17.4.1 LE MODELE ANIMAL	143

17.4.2 LA DOSE D'ISRADIPINE ADMINISTREE	143
17.4.3 LA SOLUTION DE REFERENCE	144
17.4.4 METHODE DE MESURE DE LA PAS	144
17.4.5 PROFIL TENSIONNEL APRES ADMINISTRATION DES NANOSPHERES	144
17.4.6 CORRELATION PAS - CONCENTRATION PLASMATIQUE	145
17.4.7 RAPPORTS VALLEE/PIC ET IMPLICATIONS THERAPEUTIQUES	146

<u>CONCLUSION</u>	<u>148</u>
-------------------	------------

<u>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</u>	<u>152</u>
------------------------------------	------------

<u>ANNEXES</u>	<u>173</u>
----------------	------------

LISTE DES ABREVIATIONS

DSC	Analyse calorimétrique différentielle
HTA	Hypertension artérielle
IBCA	Isobutylcyanoacrylate
NS	Nanosphères
PAS	Pression artérielle systolique
PAD	Pression artérielle diastolique
PCL	Poly(epsilon-caprolactone)
PEG 400	Poly(oxyéthylèneglycol) 400
PLAxGAy	Copolymère de l'acide lactique-co-glycolique
PLAGA	Copolymère de l'acide D,L-lactique-co-glycolique 50/50
SHR	Rat spontanément hypertendu
T _g	Température de transition vitreuse
V/P	Rapport vallée/pic

INTRODUCTION

INTRODUCTION



L'hypertension artérielle est un facteur connu de risque cardio-vasculaire. Elle représente un problème de santé publique majeur dans les pays industrialisés, puisqu'elle touche près de 15 % de la population adulte et 40 à 60 % des sujets âgés de plus de 65 ans. Le traitement médical de la maladie hypertensive permet de réduire la mortalité et la morbidité cardio-vasculaires.

Le traitement de l'hypertension artérielle est *a priori* à vie et il importe de faciliter l'observance thérapeutique en simplifiant les modalités d'administration du traitement, grâce notamment à la monoprise quotidienne. Des études ont en effet montré qu'un traitement long est mieux suivi quand il est pris en une seule fois par jour plutôt qu'en plusieurs fois : une amélioration de l'observance (+ 30%) est ainsi obtenue ainsi qu'une réduction du nombre des oublis de prise de médicament [ABERNATHY, 1976 ; WAEBER et coll., 1994]. Mais encore faut-il que ce médicament antihypertenseur, pris en une seule fois, soit efficace sur les 24 heures suivantes. Il est primordial de contrôler les chiffres de pression artérielle sur tout le nycthémère, en limitant le plus possible les variations potentiellement délétères sur les organes cibles tels que le cœur, les reins et le cerveau. Plusieurs études ont rapporté que les lésions au niveau des organes périphériques étaient corrélées de façon significative et indépendante à l'amplitude des variations de pression artérielle durant le jour et la nuit. L'augmentation physiologique de la pression artérielle le matin est associée à une plus grande fréquence d'épisodes ischémiques au niveau cardiaque et cérébral et à un plus grand risque de mort subite [ROCCO et coll., 1987]. L'augmentation de la variabilité de la pression artérielle au cours de l'hypertension est associée à une plus grande occurrence de dysfonction ventriculaire gauche [WHITE et coll., 1989]. Ces études suggèrent qu'il importe dans l'hypertension artérielle, de réduire non seulement le niveau de la pression, mais aussi l'amplitude excessive des variations de pression.

Il existe plusieurs façons d'obtenir des médicaments antihypertenseurs efficaces sur l'ensemble des 24 heures :

- soit en mettant au point des molécules à demi-vie d'élimination plus longue, puisque l'effet pharmacologique de la majorité des antihypertenseurs est directement corrélé à leurs concentrations plasmatiques. C'est ainsi que les inhibiteurs calciques de type dihydropyridine de seconde génération ont succédé à ceux dits de première génération (dont le chef de file est la nifédipine) qui avaient une durée d'action brève, en rapport avec leur demi-vie

d'élimination courte. A présent, une troisième génération de molécules (amlodipine, lacidipine) est apparue, dont la demi-vie d'élimination dépasse 24 heures.

- soit en augmentant le dosage des principes actifs à courte demi-vie dans la forme pharmaceutique administrée en prise unique, pour observer un effet hypotenseur suffisant à la fin de l'intervalle de prise [ROSE et McMAHON, 1990]. Cependant, l'augmentation du dosage entraîne le plus souvent un pic hypotenseur indésirable voire dangereux survenant rapidement après la prise. Ceci va à l'encontre de la volonté de contrôler la pression artérielle des patients sur le nycthémère. C'est pourquoi, aux Etats-Unis, la « Food and Drug Administration » [FDA, 1988] a élaboré des directives concernant les qualités requises pour un médicament antihypertenseur destiné à être utilisé en monoprise. Pour s'assurer de l'efficacité constante tout au long des 24 heures du médicament, ils ont défini un nouveau paramètre, le rapport « vallée sur pic » (« trough/peak » pour les anglo-saxons) ou rapport effet résiduel /effet maximal. Selon les recommandations de la FDA, ce rapport doit être supérieur à 50%. Dans l'idéal, un antihypertenseur monoprise doit réduire la pression artérielle durant 24 h sans diminution de l'effet en fin d'intervalle de prise posologique et sans augmentation des variations tensionnelles.

- soit en utilisant des procédés galéniques adaptés pour permettre une durée d'action prolongée du principe actif. C'est le cas par exemple, du comprimé osmotique de nifédipine, dosé à 30 mg (nifédipine GITS pour « gastrointestinal therapeutic system ») et qui est aussi efficace en monoprise sur 24 heures que le comprimé de nifédipine retard dosée à 20 mg et administrée en deux prises quotidiennes [SALVETTI et coll., 1996].

D'autres formes innovantes ont fait l'objet de travaux au sein de notre laboratoire : des vecteurs colloïdaux polymères ont ainsi permis de modifier le profil d'action des inhibiteurs calciques incorporés. C'est ainsi que la darodipine a été incorporée dans des nanocapsules [HUBERT et coll., 1991], la nifédipine dans des microsphères et des nanosphères [KIM et coll., 1997] et l'isradipine [LEROUEIL-LE VERGER et coll., 1998] dans des nanosphères. Dans ces trois études, il a été montré que le profil pharmacodynamique de ces antihypertenseurs à courte demi-vie et faible biodisponibilité était modifié après leur incorporation dans les vecteurs colloïdaux administrés par voie orale à des rats. En effet, la durée d'action des molécules étudiées était prolongée et leur biodisponibilité améliorée. Non seulement les caractéristiques physico-chimiques des polymères constitutifs des nanosphères pouvaient expliquer les résultats obtenus, mais aussi le comportement *in vivo* des nanosphères pourrait contribuer à prolonger l'action des principes actifs. Les nanosphères, notamment grâce à leur taille inférieure au micron, sont théoriquement susceptibles de traverser la barrière intestinale ou de se

concentrer dans des cellules spécialisées à certains endroits de la muqueuse digestive (les plaques de Peyer). De là, les nanosphères gagneraient la circulation sanguine directement ou indirectement, après passage dans la circulation lymphatique. Cette dernière notion est particulièrement intéressante pour les principes actifs qui subissent un métabolisme hépatique important après administration orale. En effet, la fraction qui emprunte la circulation lymphatique grâce à l'incorporation dans les nanosphères échapperait ainsi au premier passage hépatique.

L'objectif de ce travail est double. Il s'agit :

1. d'une part, de montrer que l'administration orale de vecteurs colloïdaux polymères tels que les nanosphères permet de prolonger l'action hypotensive de l'isradipine, antagoniste calcique à courte demi-vie et faible biodisponibilité ;
2. d'autre part, d'étudier la pharmacocinétique de l'isradipine incorporée dans les nanosphères, à la fois au niveau plasmatique et au niveau lymphatique, afin d'évaluer la biodisponibilité des nanosphères et de vérifier l'hypothèse d'un tropisme lymphatique de l'isradipine associée aux nanosphères.

Nous avons choisi d'étudier trois formulations de nanosphères, utilisant différents polymères synthétiques biodégradables [la poly(ϵ -caprolactone), les copolymères de l'acide *D,L* lactique-co-glycolique (50/50)] mais aussi non biodégradables, les Eudragit RL et RS. Les principaux paramètres physico-chimiques ayant une éventuelle influence sur le devenir *in vivo* de l'isradipine seront déterminés à l'aide notamment de techniques classiques d'analyse des formes colloïdales polymères (microscopie électronique, granulométrie laser, analyse thermique différentielle, ...). La libération *in vitro* de l'isradipine à partir de ces formes sera aussi étudiée.

L'efficacité des nanosphères d'isradipine sera déterminée après administration orale unique à un modèle de rat hypertendu (SHR) en suivant l'évolution chronologique de la pression artérielle. La forme de référence choisie est l'isradipine en solution dans le poly(oxyéthylèneglycol) 400, en raison de sa faible hydrosolubilité. L'activité antihypertensive sera évaluée par deux paramètres principaux : la durée hypotensive et l'intensité du pic hypotenseur post-administration, permettant ainsi de calculer le rapport vallée/pic des formes étudiées. Des études pharmacocinétiques plasmatiques après administration orale et intraveineuse, chez le rat, des différentes formes d'isradipine nous permettront de déterminer leurs biodisponibilités absolues.

La biodisponibilité des nanosphères au niveau lymphatique sera déterminée après canulation chez le rat du canal lymphatique mésentérique et dosage par

CLHP de l'isradipine retrouvée dans la lymphe mésentérique après administration intra-gastrique des nanosphères.

Le plan adopté pour la présentation de nos travaux sera le suivant :

Dans une partie consacrée aux travaux de la littérature, les propriétés pharmaco-cinétiques et pharmacodynamiques de l'isradipine seront présentées. Puis nous rappellerons la notion de vecteurs colloïdaux polymères de médicaments. En particulier, nous définirons la forme nanosphère, les méthodes de préparation et les caractéristiques physico-chimiques des polymères que nous avons utilisés. Nous envisagerons ensuite le sort *in vivo* des nanosphères administrées par voie orale. La physiologie de l'absorption intestinale sera brièvement rappelée et dans l'hypothèse d'un passage dans la circulation lymphatique des nanosphères, nous évoquerons aussi la physiologie de ce dernier système et présenterons les avantages du ciblage lymphatique.

Le travail expérimental sera divisé en deux parties correspondant à l'étude des nanosphères d'isradipine *in vitro* puis *in vivo*, après administration orale à des rats.

Pour les études *in vitro*, nous préciserons les méthodes utilisées pour préparer les nanosphères d'isradipine et pour les caractériser du point de vue physico-chimique.

Pour les études *in vivo*, nous définirons les modèles animaux, la méthode de dosage de l'isradipine dans les milieux biologiques et les protocoles expérimentaux utilisés pour étudier les profils temps-activité et temps-concentrations plasmatiques et lymphatiques de l'isradipine incorporée dans les nanosphères.

Les résultats présentés seront ensuite analysés et permettront d'établir une discussion sur les paramètres *in vitro* et *in vivo* étudiés. L'intérêt des nanosphères comme forme orale à action prolongée de l'isradipine sera enfin examiné en conclusion.

RAPPELS

1. L'ISRADIPINE

La molécule étudiée est l'isradipine, un antagoniste calcique, appartenant à la sous-classe des dihydropyridines.

1.1 LES ANTAGONISTES CALCIQUES

Les antagonistes calciques [LUSCHER et COSENTINO, 1998] jouent un rôle important dans le traitement de l'hypertension artérielle depuis plus de 20 ans. Introduits à la fin des années 1970 et au début des années 1980, les antagonistes calciques représentent une des quatre principales classes médicamenteuses utilisées pour le traitement de l'hypertension, les autres étant les diurétiques, les β -bloquants et les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I.

Les propriétés pharmacologiques des antagonistes calciques permettent de les classer en trois grandes classes : les phénylalkylamines dont le chef de file est le vérapamil, les benzothiazépines dont le seul représentant est le diltiazem, et les phényldihydropyridines dont le chef de file est la nifédipine. Les deux premières d'entre elles présentent un tropisme à la fois myocardique et vasculaire et la troisième, un tropisme principalement vasculaire.

Aujourd'hui, la classification de TOYO-OKA et NAYLER [1996] permet de distinguer trois générations d'antagonistes calciques en fonction de leurs propriétés pharmacocinétiques et pharmacodynamiques et de tenir compte aussi des sélectivités d'action, artérielle ou cardiaque (Tableau 1).

1.1.1 Les antagonistes calciques de première génération

Les antagonistes calciques de première génération sont caractérisés par :

- une rapidité d'action conduisant à une activation neurohumorale (activation sympathique réflexe induite par la vasodilatation périphérique),
- une demi-vie d'élimination courte expliquant une durée d'action brève, nécessitant des administrations multiples,
- des effets dromotrope et inotrope négatifs,

Tableau 1 : Classification de TOYO-OKA et NAYLER [1996].

Génération	Première (I)	Seconde (IIa) <i>nouvelles formulations</i>	Seconde (IIb) <i>nouvelles entités chimiques</i>	Troisième (III)
<i>sélectivité tissulaire</i>				
Dihydropyridines (artère>cœur)	nifédipine nicardipine	nifédipine GITS félodipine ER ^a nicardipine LP	isradipine nitrendipine nisoldipine	amlodipine lacidipine
Benzothiazépines (artère=cœur)	diltiazem	diltiazem LP		
Phénylalkylamines (artère≤cœur)	vérapamil	vérapamil LP	(gallopamil)	
Phénylalkylamine/ benzimidazolyl (artère>cœur)	mibéfradil ^b			

^a : la félodipine peut être classée soit comme IIa ou IIb

^b : la mibéfradil est le premier agent de cette classe chimique, mais ses propriétés pharmacodynamiques et pharmacocinétiques sont semblables à celles des produits de 3ème génération.

- une contre-indication chez les patients ayant une dysfonction du ventricule gauche ou ceux ayant eu un infarctus du myocarde.

1.1.2 Les antagonistes calciques de deuxième génération

Les antagonistes calciques de deuxième génération sont divisés en 2 sous-classes :

1. la sous-classe (II a) résulte de l'apport de nouvelles formulations galéniques comme le comprimé osmotique de nifédipine (Figure 1),
2. la sous classe (II b) comprend de nouvelles molécules chimiques à demi-vie intermédiaire (isradipine, nitrendipine).

Ils présentent par rapport à ceux de première génération des propriétés pharmacodynamiques et pharmacocinétiques améliorées :

- une sélectivité vasculaire accrue,
- une durée d'action prolongée,
- une fréquence moindre d'effets secondaires dus à la vasodilatation,
- des effets dromotrope et inotrope négatifs réduits (II b).

Cependant, ils présentent encore des inconvénients : leur biodisponibilité reste faible ; leur effet sur la pression pendant les 24 h est très fluctuant ; une perte d'efficacité est observée à moyen terme ; ils activent de façon intermittente le système nerveux autonome.

1.1.3 Les antagonistes calciques de troisième génération

Les antagonistes calciques de troisième génération (amlodipine, lacidipine) sont caractérisés par une affinité hautement spécifique pour le site de liaison au canal calcique et une longue durée d'action soit en raison d'une demi-vie très longue (égale à 34 ± 5 h pour l'amlodipine), soit en raison d'une mise en réserve au sein de la membrane cellulaire (lacidipine). Ils entraînent une diminution progressive de la pression et un effet prolongé sur 24 h.

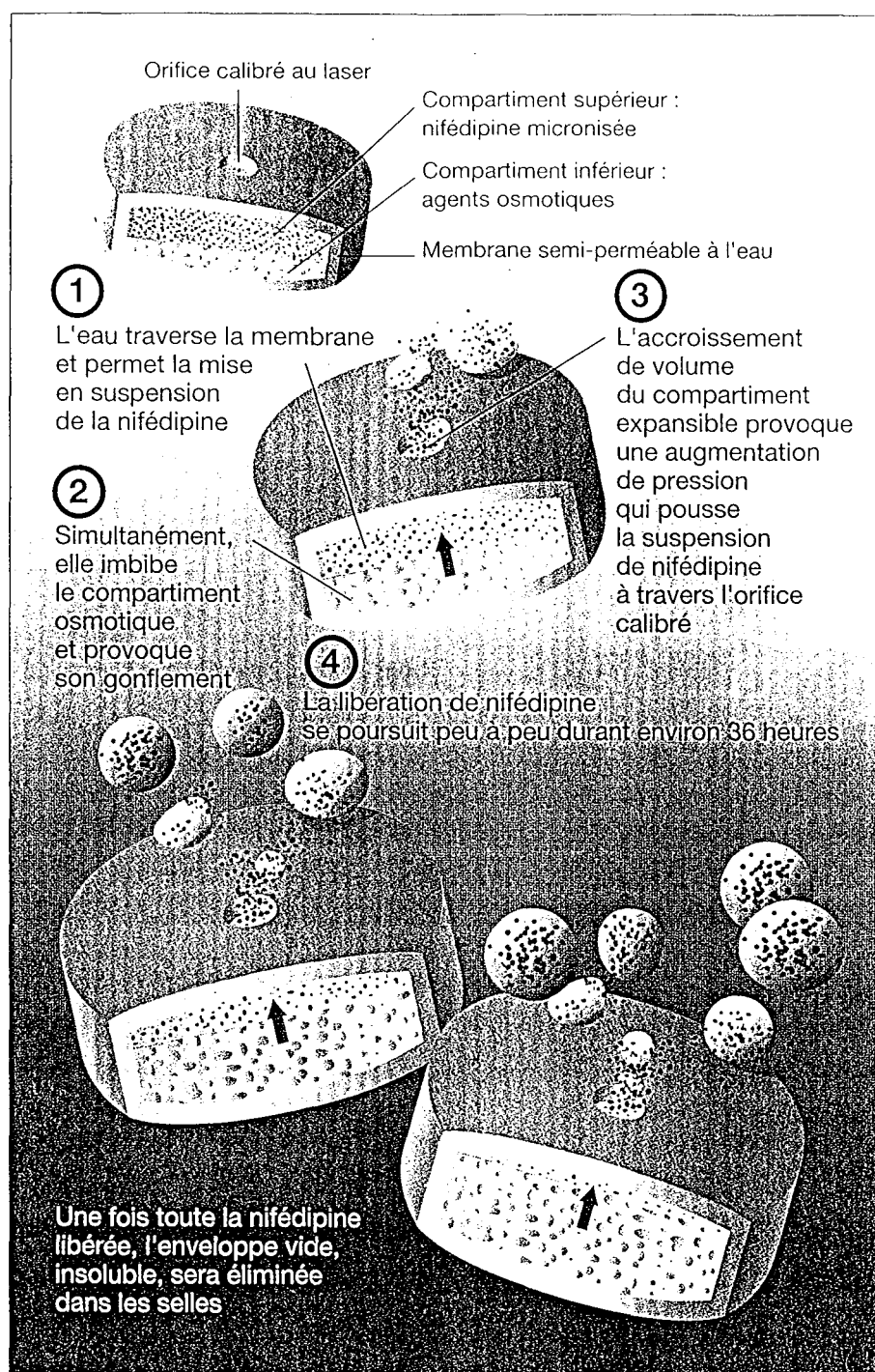


Figure 1 : Comprimé osmotique (ou gastro-intestinal therapeutic system) de nifédipine

1.2 MECANISME D'ACTION DES DIHYDROPYRIDINES

1.2.1 Les canaux calciques

Le calcium (Ca^{2+}) joue un rôle fondamental dans les régulations cardiovasculaires. L'entrée du calcium est nécessaire à la contraction myocardique. Le tonus des fibres musculaires lisses de la paroi vasculaire détermine les résistances vasculaires, et la pénétration intracellulaire du calcium est indispensable à la vasoconstriction. Dans l'hypertension artérielle, la teneur en calcium intracellulaire et sa mobilisation sont anormales. L'augmentation du calcium intracellulaire favorise la contraction musculaire, conduisant à l'élévation des résistances périphériques et de la pression artérielle.

Il existe actuellement quatre types de canaux calciques activés par dépolarisation : les canaux L, N, T, P. Les canaux calciques sont des complexes multimériques dont les sous-unités α , essentielles à l'activité du canal proprement dite, comportent environ 2000 résidus amino-acyles [GIES, 1993].

Le canal calcique le plus connu est le canal de type L (L pour *long lasting* car leur temps d'ouverture est relativement long). Il est présent principalement sur les cellules myocardiques, les cellules musculaires lisses, les cellules endocrines et certains neurones.

Les canaux calciques de type L sont hétérogènes et leur fonction est différente dans les muscles squelettiques et cardiaque (Figure 2) :

- Dans le muscle cardiaque, la présence de calcium extracellulaire, l'entrée de calcium et sa fixation sur la troponine sont nécessaires à la contraction. Celle-ci est inhibée par les dihydropyridines.
- Pour les muscles squelettiques, le couplage excitation-contraction ne nécessite pas de calcium extracellulaire et est insensible aux dihydropyridines. Le canal L squelettique présent sur la membrane plasmique (au niveau des tubules transverses) lie cependant les dihydropyridines et il est appelé "récepteur des dihydropyridines". Ce récepteur est activé par le potentiel d'action propagé le long de la membrane des tubules transverses. Il stimule un canal calcique de la membrane du réticulum. Ce canal s'ouvre et le calcium stocké dans le réticulum passe dans le cytoplasme pour induire la contraction.

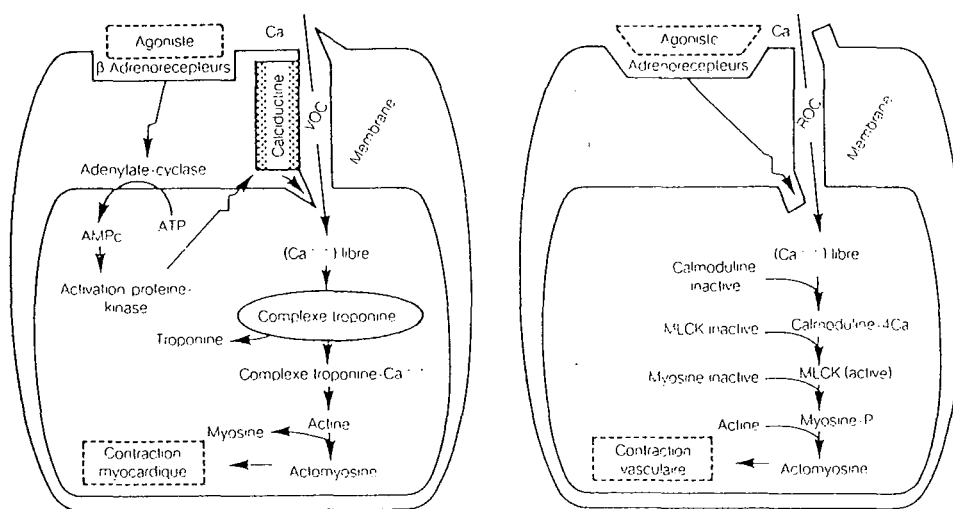


Figure 2 : Représentation schématique des canaux calciques L.

1.2.2 Mécanisme d'action

Chaque classe d'antagonistes calciques se fixe sur son récepteur spécifique. Les dihydropyridines, molécules très lipophiles, atteignent leur site de liaison sur la protéine canalaire par voie transmembranaire. Elles interagissent préférentiellement avec le canal calcique quand celui-ci est à l'état inactivé. Cette situation prévaut dans des tissus où existe une dépolarisation persistante tels que le tissu vasculaire soumis à un tonus vasoconstricteur permanent. Cette activité préférentielle des dihydropyridines sur les canaux à l'état inactivé explique qu'elles exercent des effets plus marqués au niveau des vaisseaux qu'au niveau du cœur.

L'activité des dihydropyridines résulte de la relaxation de la cellule musculaire lisse des vaisseaux induite par l'inhibition de l'entrée de calcium dans la cellule musculaire ; il s'ensuit une vasodilatation responsable de la diminution des résistances périphériques totales et de la diminution de la pression artérielle.

1.2.3 Activation sympathique

L'activation du système sympathique est secondaire à la diminution de la pression artérielle qui active le système baroréflexe, afin de préserver la perfusion des organes périphériques. Il en résulte une augmentation des catécholamines, dont les effets néfastes sur le cœur défaillant sont multiples : augmentation de la consommation en oxygène myocardique (tachycardie et vasodilatation), rétention hydrosodée (stimulation de la sécrétion de rénine, augmentation de la réabsorption tubulaire de sodium), perturbation du remplissage du ventricule gauche, diminution de la perfusion myocardique, effets arythmogènes, effets toxiques directs par libération de radicaux libres. L'activation du système sympathique générée par la nifédipine d'action immédiate est probablement à l'origine de la surmortalité cardio-vasculaire retrouvée chez les patients traités par cet agent en post-infarctus du myocarde [FURBERG et coll., 1995] et au cours de l'insuffisance cardiaque [ELKAYAM et coll., 1990].

L'action des dihydropyridines sur le système sympathique est très hétérogène, non seulement d'une molécule à l'autre, mais également en fonction de sa forme galénique.

FROHLICH et coll. [1991] ont comparé les effets de différentes formulations d'antagonistes calciques sur l'augmentation de l'activité sympathique évaluée par des mesures de la concentration en noradrénaline plasmatique. La nifédipine était administrée à des patients hypertendus, soit sous forme de comprimé osmotique, une fois par jour, soit sous une forme à action rapide à la dose de 10 mg, 3 fois par jour. Les taux de noradrénaline plasmatique

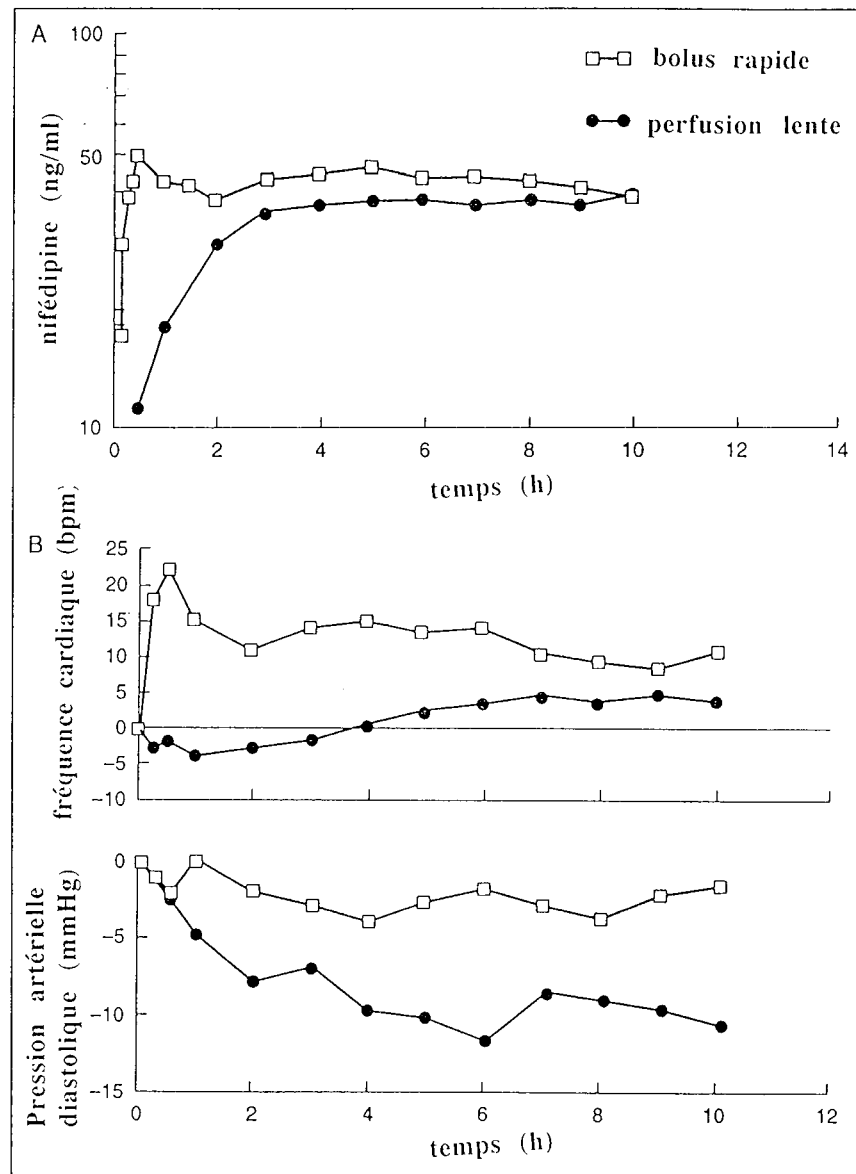


Figure 3: Comparaison des effets d'une injection intraveineuse en bolus rapide et en perfusion lente d'une solution de nifédipine sur la concentration plasmatique de nifédipine A) sur la pression artérielle et la fréquence cardiaque B), d'après [KLEINBLOESEN et coll., 1987].

après administration du comprimé osmotique étaient comparables à ceux obtenus avec un placebo, mais inférieurs à ceux obtenus avec la forme classique de nifédipine.

WENZEL et coll. [1997] ont montré que la nifédipine à action immédiate ou à action prolongée augmente l'activité sympathique nerveuse musculaire ; cependant, la fréquence cardiaque est augmentée seulement avec la forme à action immédiate. La sensibilité du baroréflexe contrôlant la fréquence cardiaque semble s'adapter plus rapidement avec les formulations à action lente et progressive, alors que l'activité sympathique périphérique reste stimulée.

La vitesse à laquelle la dihydropyridine gagne la circulation générale a une grande importance sur les réponses à la fois hémodynamique et neuro-hormonale.

KLEINBLÖESEN et coll. [1987] ont mené une étude sur la nifédipine administrée par voie intraveineuse qui montrait clairement que la vitesse de délivrance du principe actif gouverne le type de réponse. Ils ont comparé les effets d'une dose intraveineuse en bolus et d'une perfusion lente sur les paramètres hémodynamiques systémiques (Figure 3). L'obtention rapide d'une concentration plasmatique efficace avec l'injection en bolus s'accompagnait d'une faible diminution de la pression artérielle, associée à une augmentation de l'activité adrénergique et de la fréquence cardiaque. Au contraire, la même concentration plasmatique était atteinte plus lentement et progressivement lors de la perfusion et s'accompagnait d'une diminution significative de la pression artérielle, sans augmentation de la fréquence cardiaque.

1.3 L'ISRADIPINE

L'isradipine est un antagoniste calcique de deuxième génération [BRODGEN et SORKIN, 1995].

1.3.1 Propriétés pharmacodynamiques

L'isradipine se lie avec une affinité élevée aux sites de fixation des dihydropyridines situés sur les canaux calciques voltage-dépendants (canaux lents L), grâce à la présence du radical benzoxadiazolyl dans sa structure chimique (Figure 4).

Les effets cardiovasculaires de l'isradipine sont caractérisés par une activité dépressive sur l'automaticité du nœud sinoatrial faible, l'absence d'effet sur le système de conduction du cœur, l'absence d'effet chronotrope et dromotrope

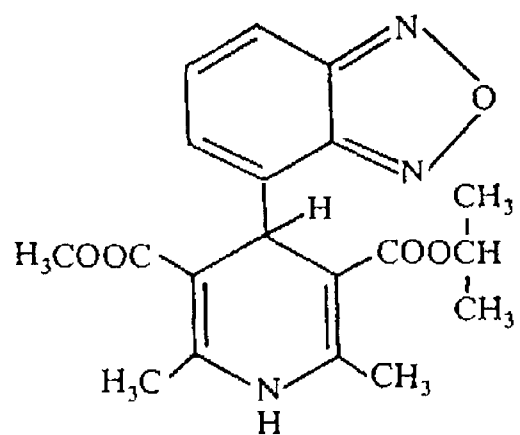


Figure 4 : Formule développée de l'isradipine.

négalif chez l'homme ayant des fonclions sinoatriale et atrieventriculaire normales.

La vasodilatation est sélective des artères et artéioles (diminution de la pression sanguine et des résistances systémiques, en l'absence de variation de la pression de remplissage cardiaque).

Chez des patients ayant une hypertension essentielle, des doses orales uniques d'isradipine produisent une diminution dose-dépendante de la pression artérielle dans les positions debout, assise et couchée, avec un effet maximal survenant 1 à 3 heures après administration.

L'isradipine augmente le flux plasmatique rénal, diminue les résistances vasculaires rénales, augmente la filtration glomérulaire rénale, et produit un effet natriurétique soutenu. Elle diminue l'indice de masse du ventricule gauche et l'épaisseur des parois intraventriculaires.

1.3.2 Propriétés pharmacocinétiques

Chez l'homme, il est retrouvé que :

- L'absorption de l'isradipine administrée *per os* est presque complète (>90%). La vitesse d'absorption est rapide (0,5 h à 2 h).
- L'effet de premier passage hépatique est important et se traduit par des variations inter-individuelles importantes de la biodisponibilité.
- La biodisponibilité systémique est faible (environ 17%).
- La fixation aux protéines plasmatiques est très élevée (97%).
- La demi-vie d'élimination est comprise entre 6,1 et 10,7 h (dose de 10 mg *per os*).
- La biotransformation est rapide et intense dans le foie selon un processus de dé-estérification et d'aromatisation de la fonction dihydropyridine en des métabolites qui ne semblent pas contribuer aux effets cardiovasculaires.
- L'élimination est rénale (>95%).
- Chez les patients hypertendus, le maximum de diminution de pression coïncide avec la concentration plasmatique maximale (C_{max}).

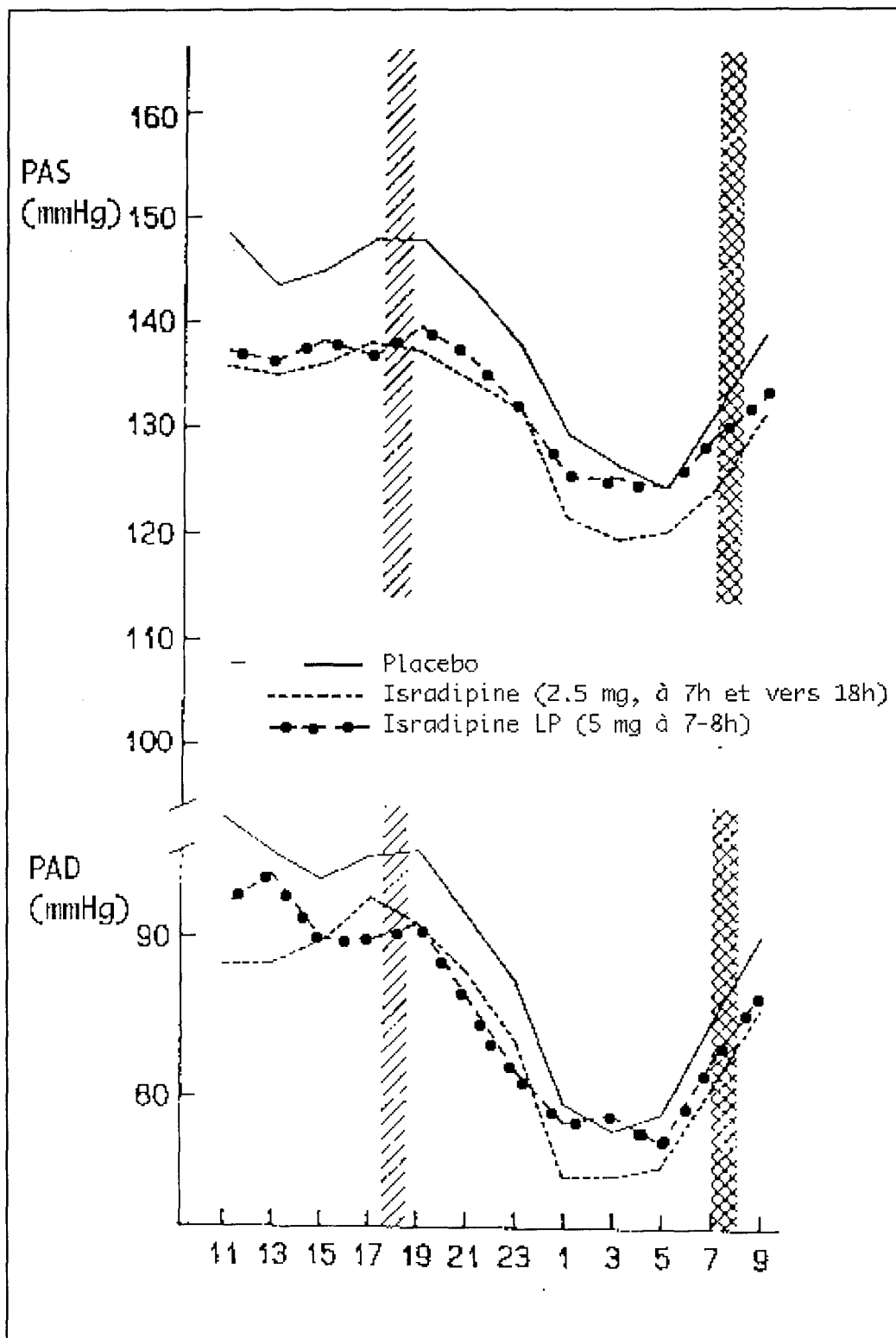


Figure 5 : Profil sur 24 h (moyennes sur 2 h) de la pression artérielle systolique et diastolique chez 12 patients hypertendus, d'après [CELIS, 1993].

1.3.3 Tolérance

L'isradipine est bien supportée. Les seuls effets secondaires résultent principalement de la vasodilatation, avec une fréquence de l'ordre de 5 % : il s'agit de céphalées, rougeur de la face ("flushing"), œdèmes périphériques, nausées, palpitations et tachycardies. Ils sont dépendants de la dose administrée.

1.3.4 Dosage et administration

La dose usuelle est 5 mg/j. La forme commercialisée en France est la gélule à libération prolongée portant le nom de spécialité « Icaz® » (laboratoire Novartis).

Après 4 semaines de traitement, l'addition d'un autre antihypertenseur d'une classe différente ou l'augmentation de la dose peut être nécessaire.

1.3.5 Rapport vallée/pic

ZANNAD et coll. [1996] ont calculé à partir de données publiées dans la littérature, les rapports vallée/pic de plusieurs antagonistes calciques et ont trouvé pour l'isradipine (administrée sous forme de gélule à libération prolongée) des valeurs comprises entre 10 et 80 % selon les études considérées et une valeur moyenne égale à 44 %.

Ces valeurs insuffisantes selon les critères de la FDA [1988] confirment l'étude de CELIS et coll. [1993] qui montre que l'action des gélules à libération modifiée d'isradipine ne permet pas de couvrir les 24 heures avec une prise unique (Figure 5). Durant la nuit, les pressions artérielles obtenues avec cette forme d'isradipine à libération modifiée étaient comparables à celles observées avec le placebo, alors que l'isradipine à libération rapide, donnée 2 fois par jour, diminuaient la pression nocturne.

Ce rappel sur l'isradipine montre que malgré l'apparition de nouvelles formes pharmaceutiques, l'augmentation de la biodisponibilité et la prolongation de la durée d'action de l'isradipine sont deux paramètres à améliorer afin de mieux contrôler le niveau de la pression artérielle sur l'ensemble du nycthémère. L'utilisation d'une nouvelle forme galénique d'isradipine pourrait être un moyen d'y parvenir ; nous avons choisi d'incorporer l'isradipine dans des vecteurs colloïdaux polymères tels que les nanosphères.

2. LES NANOSPHERES

2.1 GENERALITES SUR LES VECTEURS DE PRINCIPES ACTIFS

Par définition, un vecteur est une structure capable de véhiculer un principe actif en modifiant sa distribution tissulaire et/ou cellulaire ou son interaction avec des cellules cibles.

Les principaux objectifs de la vectorisation [COUVREUR, 1985] sont :

1. la protection éventuelle du principe actif contre son inactivation prématurée.
2. l'augmentation de la pénétration cellulaire ou intracellulaire du principe actif inaccessible par simple diffusion.
3. une meilleure spécificité d'action, grâce à un ciblage de façon à modifier la distribution tissulaire du principe actif et/ou de le détourner des tissus pour lesquels il est toxique.

Les vecteurs peuvent être divisés en deux classes : les espèces macromoléculaires solubles et les entités corpusculaires non solubles.

2.1.1 Les vecteurs macromoléculaires

L'association covalente d'un principe actif à une macromolécule définit un vecteur macromoléculaire. La macromolécule peut être soit d'origine naturelle comme le dextran ou l'albumine sérique, soit d'origine synthétique, comme le polyéthylène glycol.

2.1.2 Les vecteurs corpusculaires

Les vecteurs corpusculaires sont des réservoirs de principe actif qui permettent de l'isoler ou de le protéger de l'environnement biologique. BENOIT et coll. [1986] ont proposé une classification permettant de différencier trois générations de vecteurs particulières suivant la cible envisagée, la dimension du vecteur et le mécanisme de ciblage (Tableau 2).

Tableau 2 : Classification des vecteurs de médicaments, d'après [BENOIT et coll., 1986].

Génération	1ère	2ème		3ème
Cible	Organes	Tissus		Cellules
Diamètre	$> 1 \mu\text{m}$	$< 1 \mu\text{m}$		$< 1 \mu\text{m}$
Vecteurs	-Microsphères -Microcapsules -Microagrégats	Passifs	Actifs	-Anticorps monoclonaux -Support moléculaire -Support particulaire -Glycoprotéines
		-Liposomes -Nanosphères -Nanocapsules	-Liposomes -Nanosphères -Nanocapsules magnétiques ou thermosensibles	
Mécanisme	Embolisation	Capture par le système des phagocytes mononucléés		Reconnaissance spécifique

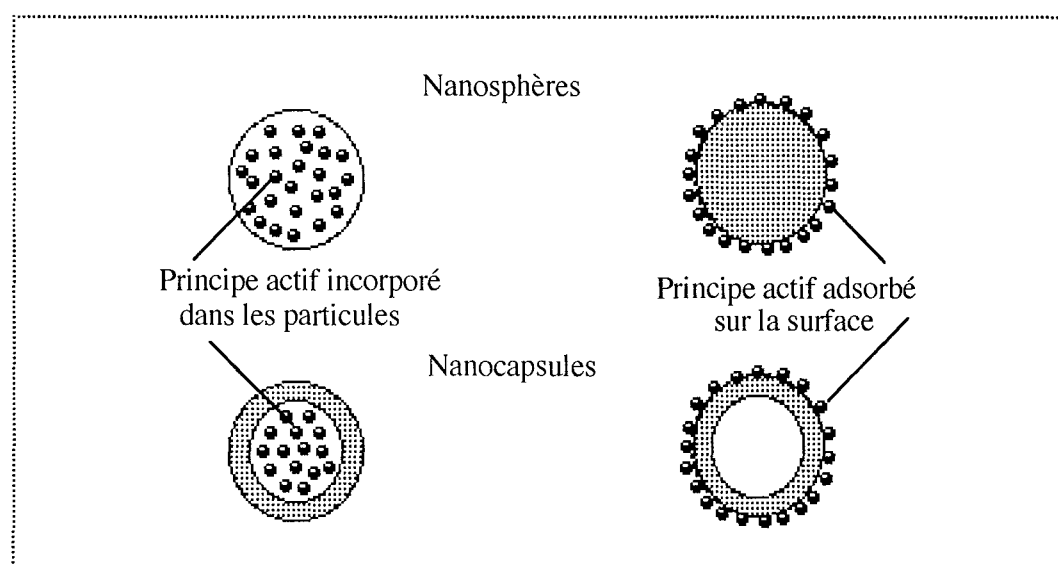


Figure 6 : Structure des nanosphères et des nanocapsules, d'après [ALLEMANN et coll., 1993].

1) Les vecteurs de première génération

Les vecteurs de première génération sont de taille supérieure au micromètre, soit de type matriciel (microsphère), soit de type vésiculaire (microcapsule).

2) Les vecteurs de deuxième génération

Ce sont des vecteurs colloïdaux, de taille inférieure au micron. Selon la nature de leurs constituants, on distingue plusieurs types :

- Les liposomes

Ce sont de petites vésicules sphériques dont la paroi est constituée par une ou plusieurs bicouches phospholipidiques délimitant une cavité centrale contenant une phase aqueuse. Ils peuvent véhiculer des principes actifs de nature hydrophile, sous forme dissoute dans la phase aqueuse centrale ou lipophile, sous forme dissoute dans la bicouche.

- Les vecteurs polymères insolubles

Il s'agit de particules solides, colloïdales, dont la taille s'étend de 10 nm à 1000 nm. Ces vecteurs regroupent les nanosphères et les nanocapsules (Figure 6).

- Les nanosphères sont des structures matricielles constituées d'un réseau polymère poreux. Le principe actif est soit adsorbé à la surface des nanosphères, soit incorporé ou dissous dans les nanosphères.

- Les nanocapsules ont un coeur central liquide entouré par une couche polymère. Dans ce cas, le principe actif est dissous en général, dans le coeur interne, mais il peut aussi être adsorbé à la surface des nanocapsules.

Etant donné l'importance toute particulière qui est accordée aux nanosphères dans notre travail, nous développerons dans le paragraphe suivant les différents procédés de préparation de ces vecteurs.

3) Les vecteurs de troisième génération

Ces vecteurs permettent le ciblage cellulaire et ce sont en fait des vecteurs de 2ème génération auxquels a été fixé un élément de reconnaissance particulier pour la cible visée (anticorps monoclonaux, lectines par exemple).

Depuis quelques années, le développement de polymères biodégradables associés à des polyoxyéthylèneglycols a permis de fabriquer des vecteurs dits

Tableau 3 : Techniques de préparation des nanosphères en fonction de la nature du polymère et du principe actif, d'après [ALONSO MJ, 1996].

<i>Nature du polymère</i>	<i>Techniques de nanoencapsulation</i>	<i>Nature du principe actif</i>
<i>Hydrophile</i>		
Albumine, Gélatine	Dénaturation par chauffage et réticulation dans une émulsion H/L	Hydrophile
	Désolvatation et réticulation dans un milieu aqueux	Hydrophile et affinité pour les protéines
Alginate, Chitosan	Réticulation en milieu aqueux	Hydrophile et affinité pour les protéines
Dextrane	Précipitation en milieu organique	Hydrophile et insoluble dans les solvants polaires
<i>Hydrophobe</i>		
Poly(alkylcyanoacrylates)	Polymérisation interfaciale	Hydrophile
	Polymérisation en émulsion	Hydrophobe (soluble dans l'huile)
Polyesters	Emulsion/évaporation de solvant	Hydrophile ou hydrophobe
	Nanoprécipitation	Soluble dans les solvants polaires
	Salting-out	Soluble dans les solvants polaires

« furtifs » qui sont caractérisés par une faible capture hépato-splénique et par un temps de circulation sanguine élevé [BAZILLE et coll., 1995].

2.2 LES METHODES DE PREPARATION DES NANOSPHERES

Le choix de la méthode de préparation des nanosphères dépend des propriétés physico-chimiques du polymère utilisé, ainsi que de celles du principe actif incorporé. Les principales techniques mises en oeuvre sont récapitulées dans le tableau 3 [ALONSO, 1996]. Les nanosphères peuvent être préparées soit à partir de macromolécules naturelles par réticulation, soit à partir de monomères par polymérisation ou de polymères synthétiques préformés par précipitation [BODMEIER et MAINCENT, 1998].

2.2.1 Réticulation de macromolécules naturelles

Les macromolécules naturelles utilisées pour préparer les nanosphères peuvent être soit des protéines (albumine, gélatine), soit des poly-saccharides (dextran, chitosan).

La technique de réticulation de l'albumine fut appliquée la première fois par KRAMER et coll. [1974], puis optimisée depuis [ARSHADY, 1990 ; MULLER et coll., 1996]. En pratique, une émulsion est réalisée entre une solution aqueuse et une phase huileuse, puis l'ajout d'un agent de réticulation, le glutaraldéhyde, permet la réticulation.

Par ailleurs, un autre procédé peut être employé pour préparer des nanosphères de protéines et de polysaccharides ; il s'agit de la séparation de phase en milieu aqueux. Celle-ci peut être induite par désolvatation des macromolécules [KRAUSE et ROHDEWALD, 1987], changement de pH [OPPENHEIM, 1986] ou de température ou par l'ajout d'un contre-ion en milieu aqueux [RAYAONARYVONY et coll., 1993 ; CALVO et coll., 1997]. La réticulation peut suivre l'étape de séparation de phase ou intervenir spontanément.

2.2.2 Polymérisation de monomères

BIRRENBACH et SPEISER [1976] ont été les premiers à rapporter la préparation de nanosphères par polymérisation de monomères acryliques dans une microémulsion inverse (H/L).

KREUTER et SPEISER [1976] se sont inspirés de la méthode précédente pour produire des nanoparticules de poly(méthyl méthacrylate). La méthode

simplifiée utilisée était une dispersion-polymérisation. Cependant, cette polymérisation nécessitait une initiation physique (irradiation gamma) ou chimique (persulfate de sodium) et le polymère étudié n'était pas biodégradable, ce qui limitait l'utilisation de tels vecteurs.

COUVREUR et coll. [1982] ont amélioré la méthode en préparant par émulsion-polymérisation des nanosphères de poly(alkylcyanoacrylate). Les gouttelettes de monomères insolubles dans l'eau sont émulsionnées dans une phase aqueuse externe acide contenant un stabilisant. Les monomères polymérisent alors par une réaction de polymérisation anionique pH-dépendante. Lorsque le principe actif hydrosoluble est solubilisé dans le milieu aqueux de polymérisation, il se retrouve après formation des nanosphères, incorporé dans la matrice polymère et/ou adsorbé en surface; si les nanosphères vides sont incubées dans une solution de principe actif, celui-ci est seulement adsorbé en surface.

L'encapsulation de principes actifs lipophiles a été possible grâce à la formation de nanocapsules [AL KHOURI et coll., 1986]. La technique de préparation fait appel à une polymérisation interfaciale où les monomères et le principe actif lipophile sont dissous dans un mélange solvant polaire/huile/tensioactif lipophile.

La méthode de préparation des nanocapsules peut aussi être appliquée aux principes actifs hydrophiles; la polymérisation interfaciale étant précédée d'une émulsion H/L [EL-SAMALIGY et coll., 1986].

Les nanosphères obtenues à partir de monomères présentent généralement une bonne stabilité mais nécessitent une purification afin d'éliminer les monomères résiduels et les initiateurs de polymérisation. Aussi les chercheurs se sont penchés sur des méthodes de préparation de nanosphères à partir de polymères préformés.

2.2.3 Précipitation de polymères préformés

De manière générale, le polymère est solubilisé dans une phase organique, puis il est dispersé dans une phase aqueuse externe dans laquelle il est insoluble.

Il y a trois procédés différents pour obtenir des nanosphères par précipitation de polymères. La principale différence réside dans la miscibilité des phases organique et aqueuse utilisées.

2.2.3.1 Emulsion/évaporation de solvant

GURNY et coll. [1981] ont rapporté pour la première fois la préparation de nanosphères par la technique d'émulsion/évaporation. Cette technique appliquée à l'encapsulation de principes actifs lipophiles repose sur l'utilisation d'un solvant insoluble dans l'eau, dans lequel le polymère et le principe actif sont solubilisés, puis émulsionnés dans une phase aqueuse contenant un tensioactif. L'évaporation du solvant conduit alors à la formation de nanosphères, le principe actif étant incorporé dans la matrice. L'émulsion peut être réalisée soit par sonication, soit par microfluidisation [BODMEIER et CHEN, 1990].

Récemment, le principe de la méthode a été modifié par BLANCO et ALONSO [1997] afin d'incorporer des principes actifs hydrosolubles tels que les protéines. Cette technique consiste à réaliser une double émulsion H/L/H. La première émulsion H/L est réalisée entre la solution de protéines et la phase organique contenant le polymère ; la seconde, entre cette première émulsion et une phase aqueuse contenant un tensioactif.

2.2.3.2 Méthode par relargage d'un sel ("Salting-out")

Cette technique a été proposée par BINDSCHAEFFER et coll. [1990].

Elle consiste à ajouter sous agitation mécanique une solution aqueuse d'alcool polyvinylique saturée en électrolyte à une solution acétonique de polymère pour former une émulsion L/H. Dans ce cas, la miscibilité des deux phases est inhibée par la saturation de la phase aqueuse. La précipitation du polymère a lieu quand une quantité d'eau suffisante est ajoutée, permettant la diffusion de l'acétone dans la phase aqueuse et la formation par précipitation des nanosphères.

2.2.3.3 Nanoprécipitation

FESSI et coll. [1986] ont mis au point une technique dite « de précipitation par diffusion de solvant » permettant la préparation de nanosphères à partir de polymères naturels, synthétiques ou hémi-synthétiques.

Le polymère est dissous dans un solvant (en général, l'acétone), avant d'être mélangé à une phase liquide contenant un non-solvant du polymère mais miscible en toute proportion avec le solvant du polymère (phase aqueuse dans cet exemple). Le polymère précipite instantanément sous forme de fines particules colloïdales.

Comme les nanosphères que nous avons étudiées sont préparées selon la technique de nanoprécipitation, nous donnerons plus de détails sur celle-ci dans la partie "Méthodes". Le chapitre suivant est consacré aux polymères qui constituent les nanosphères.

Tableau 4 : Polymères biodégradables d'origine naturelle ou synthétique, utilisés dans la délivrance de principes actifs, d'après [GOMBOTZ et PETIT, 1995].

<i>Polymères</i>
albumine
alginate
dérivés de la cellulose
chitosane
collagène
fibrine
gélatine
acide hyaluronique
polysaccharides
copolymères de l'anhydride maléique et des (alkylvinyl)éthers
polyols (Pluronic)
poly(acide acrylique)
poly(cyanoacrylates)
poly(aminoacides)
poly(anhydridee)
polyesters : poly(acide lactique), poly(acide lactique-co-glycolique), poly(β -hydroxybutyrate), polycaprolactone, poly(dioxanone)
poly(éthylèneglycols)
poly(hydroxypropylmethacrylamide)
poly(oraganophosphazènes)
poly(ortho-esters)
poly(vinylalcool)
poly(vinylpyrrolidone)

3. LES POLYMERES

On utilise depuis très longtemps en pharmacie des matériaux polymères naturels (gélatine, amidon, gommes, cellulose ...) ou artificiels (celluloses modifiées, dextrans ...) et plus récemment synthétiques (polyvinylpyrrolidone, poly-oxyéthylène glycols ...) (Tableau 4). Ces derniers s'étendent à présent à tous les domaines médico-pharmaceutiques : prothèses, matériel médico-chirurgical et formes galéniques. Le contrôle de la libération des principes actifs à partir des formes galéniques repose aujourd'hui le plus souvent sur le choix d'un polymère approprié et dépend le plus souvent des caractéristiques de dégradation de celui-ci.

Après un rappel chimique sur la notion de biodégradabilité, nous décrirons plus précisément les polymères que nous avons choisis d'utiliser pour notre étude et qui sont aussi les matériaux les plus fréquemment rencontrés dans le domaine de la vectorisation.

3.1 DEFINITION D'UN POLYMERE BIODEGRADABLE

Dans la littérature, les termes « biorésorbable », « biodégradable » et « bioérodable » sont fréquemment utilisés de façon interchangeable. Le terme biodégradabilité est défini comme un processus de décomposition chimique dépendant du temps qui trouve son origine dans l'action chimique et biochimique de l'environnement [DOELKER, 1987]. Cependant, pour être biodégradables, les polymères administrés *in vivo* doivent être « résorbables », c'est-à-dire scindés en entités chimiques éliminables de l'organisme par les voies naturelles (urinaire, fécale, respiratoire). Le terme de polymères « bioérodables » recouvre des polymères subissant seulement une perte de poids mais sans aboutir à des molécules suffisamment petites pour être éliminées. De plus, il importe pour une administration *in vivo* que la biodégradation du support intervienne dans un laps de temps compatible avec l'effet thérapeutique.

3.1.1 Mécanismes de dégradation

Les mécanismes de dégradation des systèmes polymères dépendent principalement du mode de solubilisation du polymère.

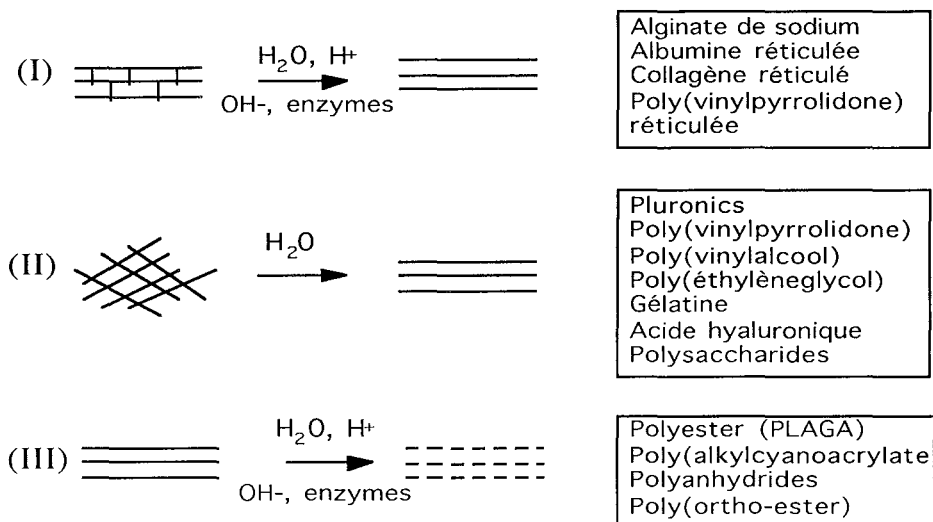


Figure 7 : Représentation schématique des différents mécanismes de dégradation des polymères, d'après [GOMBOTZ et PETIT, 1995].

HELLER [1980] distinguent trois mécanismes de dégradation différents illustrés sur la figure 7 :

Mécanisme I : Solubilisation par hydrolyse des ponts intermoléculaires

Ce mécanisme concerne tous les polymères hydrophiles réticulés comme par exemple la poly (N-vinylpyrrolidone), le polyacrylamide, l'alcool polyvinylique, la gélatine, le collagène.

L'érosion dans ces systèmes est très lente. Néanmoins, elle autorise la libération de principes actifs peu solubles ou qui resteraient piégés physiquement dans les mailles du réseau polymère.

Mécanisme II : Solubilisation par hydrolyse, ionisation ou protonation des groupements latéraux

Ce mécanisme est observé avec les polymères hydrophobes.

Il s'agit le plus souvent de polyélectrolytes faibles, qui s'ionisent à partir d'une certaine valeur de pH et se solubilisent comme les semi-esters du copolymère du méthylvinyléther et de l'anhydride maléique par exemple. En général, aucune perte du poids moléculaire du polymère n'est observée au cours de l'érosion de type II.

Mécanisme III : Solubilisation par scission des chaînes polymères en petites molécules

Les polymères dont la dégradation obéit à ce mécanisme sont des macromolécules dont les liaisons sont instables hydrolytiquement tels les acides polylactiques et copolymères avec l'acide glycolique, la poly (ϵ -caprolactone), les polypeptides, les poly (ortho-esters).

Le mécanisme de dégradation du système polymère dépend lui-même de plusieurs paramètres :

1) La perméabilité à l'eau

Si le polymère est hydrophile, l'eau peut pénétrer dans le polymère et l'érosion est dite « homogène ». La dégradation a lieu à une vitesse uniforme dans tout le système. La matrice demeure intacte tant que la masse moléculaire du polymère se maintient au-dessus d'une valeur critique, au-delà de laquelle la forme commence à se solubiliser et à disparaître du site d'administration (Figure 8).

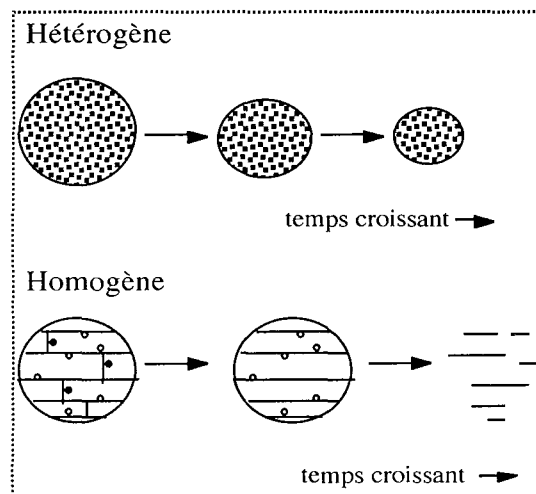


Figure 8 : Schéma des deux types de dégradation, d'après [HAUSBERGER et DE LUCA, 1995]

Si le polymère est hydrophobe, la dégradation a lieu à la surface du polymère uniquement et l'érosion est dite « hétérogène » (Figure 8).

2) La cristallinité du polymère

En effet, seule la phase amorphe est accessible au milieu aqueux. Le milieu environnant pénètre le système seulement si le polymère est à l'état caoutchoutique (donc à une température inférieure à la température de transition vitreuse).

3) La longueur des chaînes macromoléculaires

La masse moléculaire ne joue pas de rôle direct sur la perméabilité, mais elle peut influencer le degré de cristallinité ou la température de transition vitreuse du polymère.

4) Le rapport surface/volume du système

Plus le rapport surface/volume est élevé, plus la dégradation est rapide.

En outre, le mélange de polymères, la copolymérisation, l'adjonction de plastifiants, la réticulation sont des moyens permettant de modifier la perméabilité et les caractéristiques du système.

La biodégradabilité et l'hydrophilie d'un polymère peuvent régir les processus de libération du principe actif qui y est incorporé. Les polymères biodégradables permettent ainsi d'envisager deux cas :

- 1^{er} cas : la libération a lieu par un mécanisme de diffusion et la décomposition intervient après épuisement de la forme médicamenteuse ;
- 2^{ème} cas : la dégradation peut être progressive et moduler la libération.

Cependant, dans la majorité des cas, la libération du principe actif résulte de la combinaison de ces deux mécanismes [CHIU et coll., 1995].

La nature du principe actif (solubilité, diffusibilité), la structure du système de délivrance (matrice ou réservoir) jouent également un rôle prépondérant dans le processus contrôlant la libération.

3.1.2 Applications des polymères biorésorbables

Les polymères biorésorbables sont utilisés dans divers domaines [HOLLAND et TIGHE, 1992] :

- matériel de suture : Ercedex™, Dexon™, Vicryl™, Lactomer™
- médicaments à libération contrôlée :

Par exemple, dans le traitement du cancer de la prostate ou de l'infécondité féminine, des microsphères préparées avec des copolymères lactoglycoliques permettent d'administrer des analogues de la LH-RH par voie intramusculaire toutes les quatre semaines (Decapeptyl LP®, Laboratoires IPSEN/BIOTECH), et/ou par voie sous-cutanée (Enantone LP®, Laboratoires, TAKEDA), ou encore sous forme d'implant sous-cutané dans la paroi abdominale (Zoladex®, Laboratoires ZENECA).

- implants pour chirurgie osseuse [ROKKANEN et coll., 1985]
- supports pour cultures cellulaires, régénération tissulaire.

3.2 COPOLYMERES D'ACIDES LACTIQUES ET GLYCOLIQUES

Ces copolymères ont d'abord été utilisés comme matériel de suture et implants prosthétiques. L'utilisation des copolymères de l'acide lactique avec l'acide glycolique comme vecteurs de médicaments datent des années 1970 [MAUDUIT et VERT, 1994]. On peut les retrouver sous les noms de marque suivants : Medisorb® (Medisorb Technologies International LP, USA), Resomer® (Boehringer Ingelheim, Allemagne), Phusiline® (Phusis, Saint-Ismier, France).

3.2.1 Structure chimique

L'acide lactique et l'acide glycolique sont des polyesters aliphatiques de la classe des poly(α -hydroxy-acides) : il s'agit de l'acide α -hydroxypropionique et de l'acide α -hydroxyacétique respectivement (Figure 9).

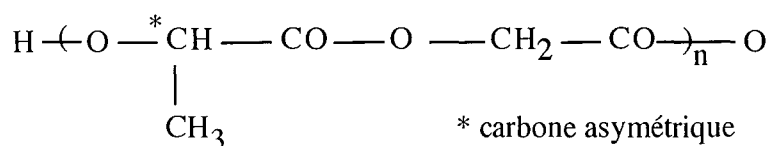


Figure 9 : Formule développée des copolymères de l'acide lactique-co-glycolique.

L'acide lactique contient un carbone asymétrique et existe sous deux formes optiquement actives, l'acide L(+) lactique, dextrogyre et l'acide D (-) lactique, lévogyre. Chez les Mammifères, seule la forme dextrogyre est métabolisée.

3.2.2 Nomenclature

L'acide polyglycolique étant hydrolytiquement trop instable car trop hygroscopique, il est copolymérisé avec l'acide lactique pour former les copolymères d'acide lactique-co-glycolique (PLAGA).

MAUDUIT et VERT [1994] ont proposé une nomenclature qui a l'avantage de donner des informations sur les proportions des monomères constitutifs et la configuration de l'acide lactique utilisé et dont vont dépendre les propriétés de chaque copolymère.

Ainsi, les copolymères d'acides lactique et glycolique sont désignés par la formule suivante :



où X est le pourcentage de motifs L-lactiques, Y est le pourcentage de motifs glycoliques et (100-X-Y) est le pourcentage de motifs D-lactiques.

3.2.3 Mécanisme de dégradation

Bien que certains auteurs aient avancé une participation d'enzymes, il est maintenant admis que la dégradation des PLAGA en milieu biologique se fait exclusivement par un mécanisme chimique d'hydrolyse non spécifique (Figure 10). Les produits de cette hydrolyse sont ensuite métabolisés en fin de glycolyse aérobie en CO_2 et H_2O . La respiration est la principale voie d'élimination.

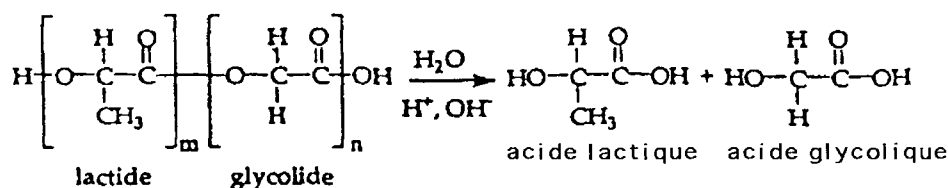


Figure 10 : Hydrolyse chimique des PLAGA.

Tableau 5 : Temps de biodégradation des PLAGA, d'après [MILLER, 1977].

Polymère	Temps approximatif de la biodégradation (mois)
Poly(L-lactide)	18 - 24
Poly(DL-lactide)	12 - 16
Poly(glycolide)	2 - 4
50:50 (DL lactide-co-glycolide)	2
85:15 (DL lactide-co-glycolide)	5
90:10 (DL lactide-co-glycolide)	2

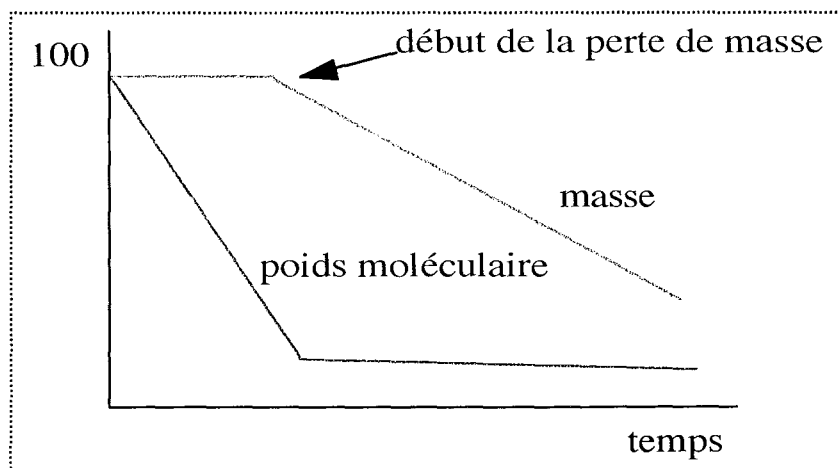


Figure 11 : Un exemple de diminution du poids moléculaire et de perte de la masse lors de la dégradation in vitro du PLAGA, d'après [HAUSBERGER et DE LUCA, 1995].

La cinétique de biodégradation des PLAGA a fait l'objet de nombreuses études. Les PLAGA se dégradent *in vivo* rapidement en quelques semaines (Tableau 5). Le temps de demi-vie *in vivo* d'un implant de PLA50GA50 est d'environ une semaine [MILLER et coll., 1977].

Les PLAGA subissent une érosion homogène (en masse ou « bulk erosion ») par comparaison à l'érosion en surface. Sous l'action de l'eau, les PLAGA subissent une scission aléatoire des chaînes polymères par simple hydrolyse des liaisons esters. Dans un premier temps, le poids moléculaire diminue et c'est seulement à la fin qu'on observe une perte de la masse, conduisant à la dégradation complète du polymère (Figure 11) [MAUDUIT et VERT, 1994].

La vitesse de dégradation des PLAGA est influencée par la cristallinité et l'hydrophilie des copolymères et elle est d'autant plus rapide que le caractère amorphe est prononcé. Ces deux propriétés dépendent de plusieurs facteurs :

1) Rapport entre les monomères glycolides/lactides

L'enchaînement de motifs identiques favorise l'arrangement ordonné des chaînes macromoléculaires et donc la cristallinité des polymères. Inversement, l'enchaînement de motifs différents perturbe cet arrangement et diminue la possibilité des chaînes à cristalliser. Cela explique que les copolymères comportant environ 20 à 70 % d'unités glycolides sont amorphes alors que les copolymères comportant plus de 70% d'un monomère sont cristallins.

2) Stéréosélectivité des unités monomères

L'acide D,L polylactique est un solide plus amorphe que l'acide L lactique.

3) Masse moléculaire des polymères

Les polymères de faible masse moléculaire sont plus hydrophiles et se dégradent plus rapidement que les polymères de masse moléculaire plus élevée.

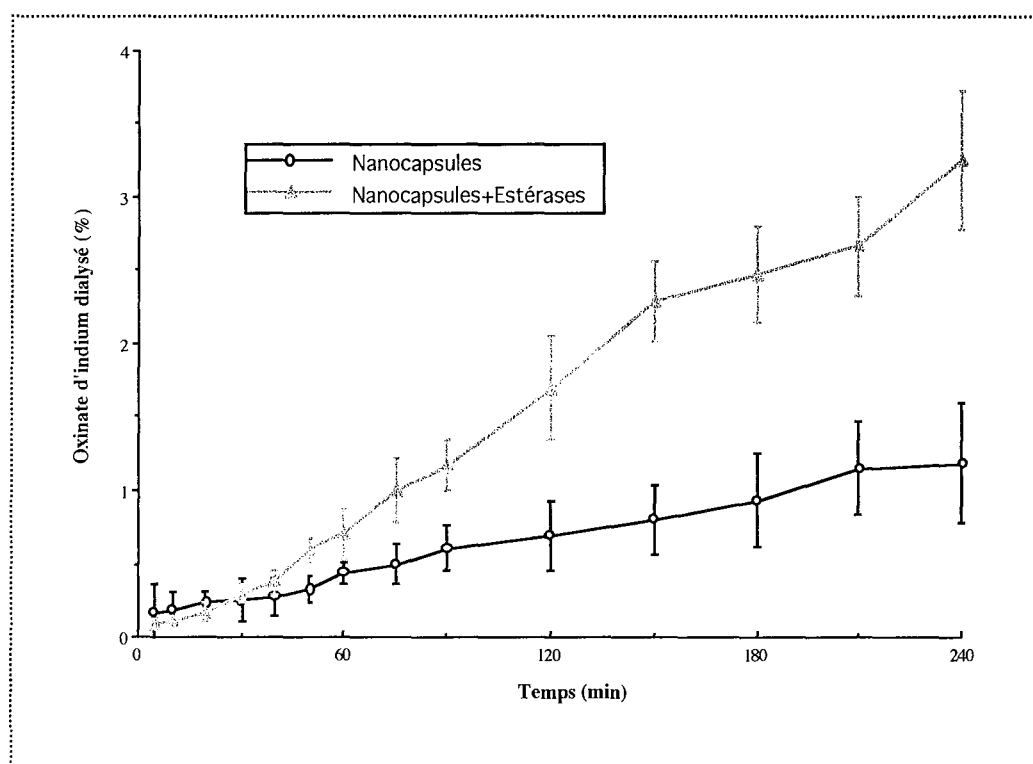


Figure 13 : Pourcentage d'Indium libéré à partir des nanocapsules de PCL dans un tampon à pH 7, en présence et en absence d'estérase, d'après [KEDZIEREWICZ et coll, 1998].

3.3 POLY(ϵ -CAPROLACTONE)

3.3.1 Structure chimique

La poly(ϵ -caprolactone) (PCL) est un polyester aliphatique, de la famille des poly(α -hydroxy acides) comme les PLAGA et dont la formule est la suivante :

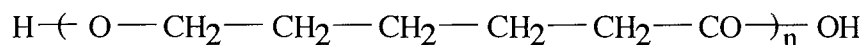


Figure 12 : Formule chimique développée de la PCL.

La PCL est un polymère semi-cristallin (degré de cristallinité : 45-50 %), relativement rigide ; son point de fusion est de +63°C. Son domaine amorphe se trouve à l'état caoutchoutique à température ambiante ($T_v = -60$ à -70°C). En comparaison des PLAGA, la poly(ϵ -caprolactone) est relativement peu hydrophile.

3.3.2 Mécanisme de dégradation

Le profil de biodégradation diffère légèrement de celui des PLAGA en raison de la nature semi-cristalline de la poly(ϵ -caprolactone). Des études réalisées *in vitro* évaluant l'action des estérases sur des nanocapsules de PCL chargées en oxinate d'indium ont montré qu'il s'écoulait un laps de temps avant d'observer une dégradation (Figure 13) et une diminution du poids moléculaire de la PCL [KEDZIEREWICZ et coll., 1998]. La PCL subirait dans un premier temps une dégradation partielle par clivage hydrolytique des groupes esters, suivie d'une érosion en surface, avec participation enzymatique [PITT et coll. 1984 ; PITT et GU, 1987].

La dégradation enzymatique concernerait uniquement la partie amorphe du polymère, condition assurant la mobilité des chaînes de polymère [PITT et coll., 1984].

Comme pour les PLAGA, l'érosion de la PCL est homogène dans tout le système, elle commence dans la phase amorphe et se poursuit dans la phase cristalline. Seule l'érosion confinée à la surface peut conduire à une libération constante de la substance médicamenteuse. Sa perméabilité élevée combinée à une vitesse d'érosion lente permettent d'expliquer que la libération des

Tableau 6 : Composition chimique des Eudragit RL et RS.

<i>EUDRAGIT</i>	<i>type</i>	<i>A / B / C</i>	<i>masse moléculaire</i>
RL	A	1 / 2 / 0.2	150 000
RS	B	1 / 2 / 0.1	150 000

A :éthylacrylate

B:méthylméthacrylate

C:triméthylammonio éthyl méthacrylate

principes actifs a lieu selon un mécanisme par diffusion à travers le polymère, avant même la dégradation du polymère.

3.4 LES EUDRAGIT RL/RS

Les Eudragit™ appartiennent à la famille des polymères acryliques tout comme le Plexiglas™ ou les Carbopol™ ; Les Eudragit de type RL et RS sont des copolymères de chlorure de triméthyl ammonioéthyl méthacrylate, dont la formule est la suivante :

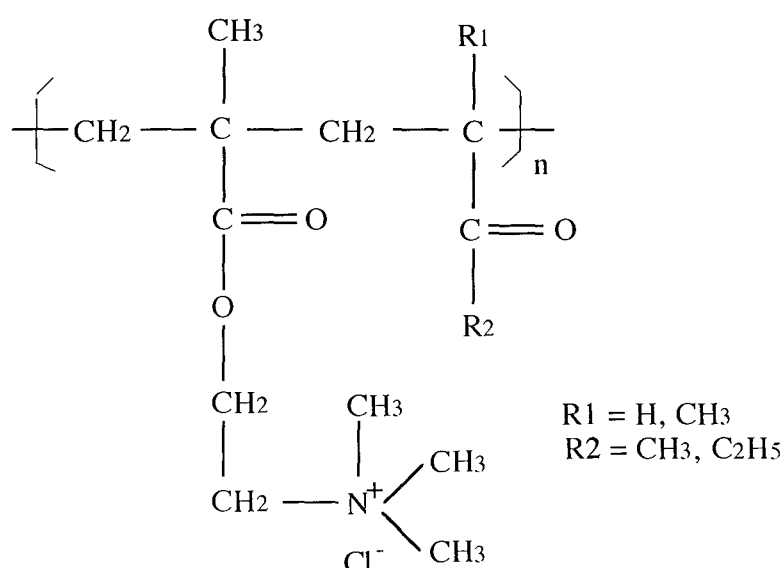


Figure 14 : Formule développée des Eudragit RL et RS.

La stabilité chimique et physique des Eudragit™ est due à la présence d'un squelette de base formé d'atomes de carbone et à des branches esters.

Les unités monomères méthacryliques assurent la rigidité. Les unités acryliques contribuent plutôt à la souplesse et à la flexibilité. Les groupes esters méthacryliques sont aussi plus stables vis-à-vis de l'hydrolyse que les esters acryliques. En raison de leur nature hydrophile, les groupes ammonium quaternaires augmentent la perméabilité du polymère.

On distingue les Eudragit™ de type A ou RL qui sont plus perméables que les Eudragit™ de type B ou RS, en raison d'une proportion plus élevée de groupements ammonium (Tableau 6).

De plus, les Eudragit restent ionisés à tous les pH physiologiques, si bien que la perméabilité *in vivo* du polymère est indépendante du pH. Ce ne sont pas des polymères biodégradables à proprement parlé, car ils ne sont ni absorbés ni métabolisés *in vivo* mais éliminés sans biotransformation [DITTAGEN et coll., 1997].

Les Eudragit sont principalement utilisés pour l'enrobage des formes pharmaceutiques classiques comme les comprimés.

De ce rappel bibliographique concernant les polymères, il ressort que de nombreux facteurs (pH, température, enzymes, masse moléculaire, morphologie, structure et composition chimique, etc.) sont susceptibles d'intervenir dans leur dégradation in vitro et in vivo et par conséquent, dans la libération des principes actifs incorporés et que ces facteurs sont tous interdépendants.

4. DEVENIR DES NANOSPHERES APRES ADMINISTRATION ORALE

La voie d'administration la plus commode pour le malade est sans conteste, la voie orale. Cependant, cette voie représente pour tout principe actif, le chemin le plus long et le plus difficile pour atteindre le sang. Le tractus gastro-intestinal possède en effet de nombreuses barrières physiologiques et morphologiques qui limitent l'absorption intestinale du principe actif. Les barrières morphologiques comprennent la couche de mucus, les *villi* et *microvilli* et les cellules épithéliales. Les barrières physiologiques sont représentées par le gradient de pH, l'action des systèmes enzymatiques localisés dans la lumière digestive et dans la paroi intestinale, le temps de transit intestinal et la présence de substances telles que les sels biliaires sécrétés dans la lumière intestinale ou encore la nourriture. Après absorption intestinale, le principe actif subit un effet de premier passage hépatique plus ou moins important avant d'être distribué dans l'ensemble de l'organisme. Ces obstacles sont, pour un grand nombre de principes actifs, infranchissables. Par exemple, l'administration orale des peptides constitue actuellement un problème majeur pour le développement de ces molécules car la plupart d'entre elles sont inactivées par les sucs digestifs ou par les enzymes du foie lors du premier passage hépatique.

Parmi les diverses solutions proposées par les chimistes ou les galénistes pour améliorer la biodisponibilité de certains principes actifs, l'une d'entre elles consiste à élaborer des systèmes médicamenteux capables d'éviter le système porte et le foie en empruntant la voie lymphatique. En effet toute molécule absorbée au niveau intestinal traverse tout d'abord les entérocytes puis atteint la *lamina propria*, espace interstitiel drainé par des vaisseaux sanguins et lymphatiques. Si la majorité des molécules se retrouve dans la circulation générale, certaines sont résorbées préférentiellement par le système lymphatique mésentérique.

Dans ce chapitre seront rappelées dans une première partie, l'anatomie et la physiologie de l'absorption intestinale dans la circulation sanguine et lymphatique, puis dans une seconde partie, l'intérêt de réaliser des vecteurs à délivrance lymphatique pour augmenter la biodisponibilité des principes actifs incorporés, sera présenté.

Tableau 7 : Principes actifs incorporés dans des nanosphères en vue d'une administration par voie orale.

<i>Principes actifs</i>	<i>Références</i>
vincamine	[MAINCENT et coll, 1986]
insuline	[DAMGE et coll, 1988]
indométhacine	[AMMOURY et coll, 1991]
darodipine	[HUBERT et coll, 1991]
cyclosporine	[BONDUELLE et coll, 1992]
MTP-cholestérol	[BARRATT et coll, 1994]
calcitonine	[LOWE et coll, 1994]
inhibiteur d'une protéase du HIV	[LEROUX et coll, 1995]
nifédipine	[KIM et coll, 1996]

4.1 ABSORPTION INTESTINALE DES NANOSPHERES

La plupart des travaux de littérature montrent qu'il existe une augmentation de la biodisponibilité des principes actifs incorporés dans des nanosphères et administrés par voie orale (Tableau 7).

4.1.1 Rappel sur la paroi intestinale

L'appareil digestif présente la même structure générale sur toute sa longueur. La paroi de l'intestin grêle dont les différents segments sont le duodénum, le jéjunum et l'iléon comporte cinq couches tissulaires distinctes : muqueuse, sous-muqueuse, couches musculaires circulaire et longitudinale, séreuse.

La muqueuse est particulièrement impliquée dans les phénomènes d'absorption. Elle comporte plusieurs éléments :

- un épithélium intestinal constitué par les entérocytes, soudés deux à deux à leurs sommets par des jonctions étroites et des desmosomes. Leur membrane s'écarte vers la base pour laisser un espace intercellulaire relativement important où parvient la majorité des substances absorbées par la cellule. Ces substances traversent la membrane basale qui délimite la face interne de l'épithélium et qui est proche de la paroi du capillaire sanguin sous-jacent. Les cellules à mucus, les cellules endocrines et les cellules de Paneth sont aussi des éléments de l'épithélium.
- la *lamina propria*, englobant du tissu conjonctif et de nombreux vaisseaux sanguins,
- la *muscularis mucosae*, couche musculaire lisse.

Par ailleurs, la muqueuse intestinale présente de nombreux replis appelés valvules conniventes, particulièrement développés au niveau du duodénum et du jéjunum et qui portent aussi des protubérances ou villosités. De plus, chaque cellule épithéliale présente de multiples microvillosités à son sommet, ce qui augmente considérablement la surface de contact avec la lumière intestinale. Chaque villosité renferme une artériole et une veinule associées à un riche réseau de capillaires sanguins et un vaisseau lymphatique.

Le tractus gastro-intestinal est tapissé en totalité par du mucus dont le rôle est de protéger l'estomac et le duodénum contre le liquide gastrique.

L'épaisseur de cette couche de mucus est variable selon les espèces : 73 μm chez le rat, 192 μm chez l'homme [ALLEN, 1983]. Le mucus se présente sous forme d'un gel viscoélastique adhérent à l'épithélium [ROBERT et BURI, 1986]. Il est composé d'au moins 95 % d'eau, 1 % d'électrolytes, 0,5 à 1 % de glycoprotéines et d'une faible quantité de lipides. Les glycoprotéines du mucus ou « mucines » sont des macromolécules constituées d'un corps polypeptidique sur lequel sont greffées des chaînes glucidiques à base de galactose, N acétylgalactosamine, N acétyl-glucosamine et fucose. Les chaînes d'hydrates de carbone sont chargées négativement en raison de la présence d'acides sialiques terminaux et de groupements sulfates [ALLEN et coll., 1983].

4.1.2 Les différentes voie de passage

L'idée que les microsphères et nanosphères puissent être absorbées au niveau du tractus gastro-intestinal semble être difficile à faire admettre encore aujourd'hui [FLORENCE, 1997]. Le sujet a pourtant déjà été évoqué, il y a plus d'un siècle, avec des travaux datant de 1854 ou ceux de HIRSCH en 1906, observant chez le rat l'absorption à travers la muqueuse intestinale de particules d'amidon.

APRAHAMIAN et coll. [1987] ont étudié chez le chien l'absorption de nanocapsules de poly(isobutylcyanoacrylate) chargées en Lipiodol® après administration dans la lumière jéjunale. Ils observent que les particules rentrent en contact étroit avec le réseau de mucus 10 à 15 minutes après leur administration.

KREUTER et coll. [1989] ont suivi le devenir de nanoparticules de 14C-poly(hexylcyanoacrylate) après administration intragastrique à des souris. Les observations autoradiographiques confirment la présence de radioactivité dans la paroi de l'intestin.

Dans notre laboratoire, nous avons pu aussi observer en microscopie électronique de nombreuses nanoparticules de poly(ϵ -caprolactone) à la surface des villosités intestinales entre 5 et 15 minutes après administration orale à des rats [LE VERGER, 1997].

Quatre possibilités de capture des particules sont à présent reconnues : entrée dans la circulation sanguine par passage soit intracellulaire (a), soit intercellulaire (b) au niveau des cellules épithéliales de la muqueuse intestinale

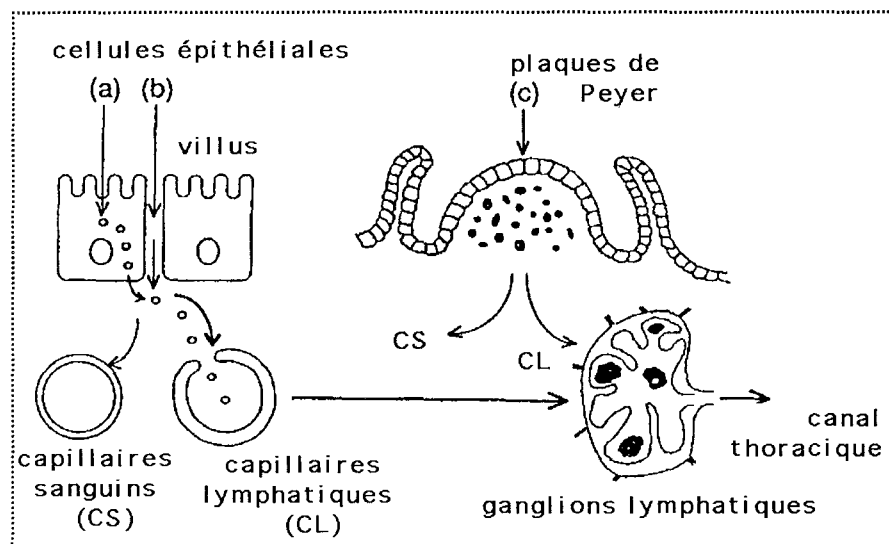


Figure 15 : Voies d'entrée possibles des micro ou nanoparticules dans le système lymphatique ou la circulation sanguine :

- (a) passage transcellulaire au niveau des entérocytes
 - (b) passage paracellulaire au niveau des jonctions serrées entre les cellules
 - (c) passage au niveau des cellules M des plaques de Peyer,
- d'après [MURANISHI et coll., 1997].

ou *via* les plaques de Peyer (c) et la circulation lymphatique (Figure 15), ou encore après phagocytose par les macrophages intestinaux.

4.1.2.1 Passage intercellulaire et paracellulaire

APRAHAMIAN et coll. [1987] ont retrouvé des nanocapsules de Lipiodol® dans les espaces intercellulaires puis dans la *lamina propria* à proximité de la membrane basale des entérocytes, 15 minutes après leur administration orale. Elles apparaissent dans les petits capillaires, près de l'épithélium intestinal puis dans les capillaires, au coeur des villosités. Après 30 minutes, les nanoparticules sont en grand nombre à la surface de l'épithélium vasculaire et forment des grappes. Après une heure, seules quelques particules sont observées dans les capillaires. Elles sont ensuite présentes en faible nombre dans les vaisseaux lymphatiques au coeur des villosités.

4.1.2.2 Passage intracellulaire et transport par les cellules épithéliales

SANDERS et coll. [1961] ont observé des particules de polystyrène dans les cellules épithéliales du jéjunum une heure après leur administration intragastrique à des rats. Elles étaient en grand nombre dans le cytoplasme des cellules épithéliales où elles étaient emprisonnées dans des vésicules. Elles sont aussi retrouvées dans les espaces intercellulaires étroits de l'épithélium.

KREUTER et coll. [1989] ont trouvé de la radioactivité à l'intérieur de l'épithélium dans les cellules en forme de gobelet entre 90 minutes et 6 jours après administration orale de nanoparticules de poly(hexyl-cyanoacrylate) marqué au carbone 14. La capture intracellulaire obéirait à un mécanisme d'endocytose.

4.1.2.3 Phagocytose par les macrophages intestinaux

Cela fait 20 ans que LE FEVRE et coll. [1978] ont observé que l'administration chronique de microsphères de polystyrène entraînait une accumulation des particules dans les macrophages intestinaux localisés au niveau des plaques de Peyer, suivie de leur apparition dans les ganglions lymphatiques mésentériques.

4.1.2.4 Capture au niveau des plaques de Peyer

Etant donnée la faible activité d'endocytose des entérocytes et la présence de jonctions serrées, la proportion de particules qui pénètrent la muqueuse digestive par voie intra- ou inter-cellulaire est très faible ; de même, la capture par les macrophages est peu probable. Le processus le plus plausible et

quantitativement le plus important aurait lieu au niveau des plaques de Peyer et de l'épithélium associé aux follicules lymphoïdes.

La capture lymphatique des particules via les plaques de Peyer sera abordée dans les paragraphes qui suivent un rappel sur le système lymphatique.

4.1.3 Rappel anatomique et physiologique du système lymphatique de l'homme

Le système lymphatique [GUENARD, 1991] comprend deux parties :

- 1) un réseau de vaisseaux lymphatiques, qui ramènent dans la circulation sanguine le surplus de liquide interstitiel résultant de la filtration des capillaires,
- 2) divers organes et tissus lymphatiques disséminés dans l'organisme, qui sont le siège de la production des phagocytes et des lymphocytes, agents essentiels de la défense immunitaire.

Les échanges de nutriments, de déchets et de gaz se déroulent entre le liquide interstitiel et le sang. Les pressions hydrostatique et osmotique s'exerçant dans les lits capillaires chassent le liquide aux extrémités artérielles des capillaires et provoquent sa réabsorption à leurs extrémités veineuses. Le liquide non réabsorbé (3 litres par jour) s'intègre au liquide interstitiel. Le liquide interstitiel et les protéines plasmatiques échappées de la circulation doivent retourner dans le sang pour que la volémie reste normale. Les vaisseaux lymphatiques assurent cette fonction. Lorsque le liquide interstitiel est entré dans les vaisseaux lymphatiques, il prend le nom de lymphe (*lymphe* = eau claire).

4.1.3.1 Les vaisseaux lymphatiques

Dans les vaisseaux lymphatiques, la lymphe circule à sens unique vers le cœur.

Les premières structures de ce réseau sont les capillaires lymphatiques, de microscopiques vaisseaux en culs-de-sac qui s'insinuent entre les cellules et les capillaires sanguins de tous les tissus, sauf du système nerveux central, des os, des dents et de la moelle osseuse. Ils sont moins nombreux mais de plus grand diamètre (20 à 30 μm) que les capillaires sanguins.

Les capillaires lymphatiques sont très perméables. Leur perméabilité est liée à deux spécialisations structurales (Figure 16) :

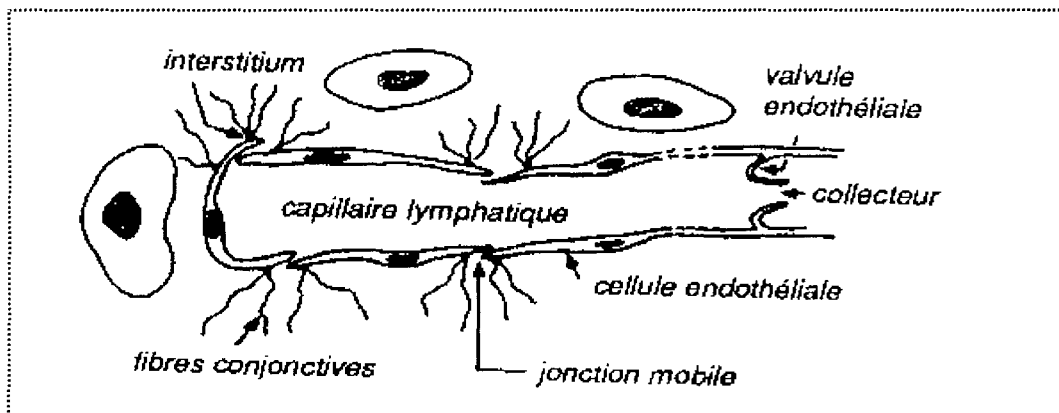


Figure 16 : Représentation d'un capillaire lymphatique et de son canal collecteur, d'après [GUENARD, 1991].

- les cellules endothéliales qui forment les parois des capillaires présentent des valvules ou disjonctions en forme de rabats, de largeur de la taille du micron (jusqu'à 10 μm) [CASLEY-SMITH, 1964],
- les faisceaux de filaments d'union qui "ancrent" les cellules endothéliales aux fibres collagènes du tissu conjonctif avoisinant, si bien que toute augmentation du volume du liquide interstitiel exerce une traction sur les disjonctions facilitant la pénétration du liquide interstitiel dans le capillaire lymphatique.

Les disjonctions s'ouvrent comme des portes battantes dès lors que la pression du liquide est plus élevée dans le compartiment interstitiel que dans le compartiment capillaire; à l'inverse, elles se ferment lorsque la pression dans le capillaire est plus grande qu'à l'extérieur.

Dans les villosités de la muqueuse intestinale se trouvent des capillaires lymphatiques hautement spécialisés appelés vaisseaux chylifères qui transportent la lymphe issue des intestins ou chyle. A partir des capillaires lymphatiques, la lymphe s'écoule dans des vaisseaux de diamètres croissants, les vaisseaux collecteurs lymphatiques, puis les troncs lymphatiques (lombaire, intestinal, broncho-médiastinal, subclavier, jugulaire ...) qui sont formés par l'union des plus gros vaisseaux collecteurs et qui drainent des régions étendues de l'organisme. La lymphe atteint finalement deux troncs situés dans le thorax : i) le canal lymphatique droit draine la lymphe du membre supérieur droit et du côté droit de la tête et du thorax ii) le canal thoracique reçoit la lymphe provenant du reste de l'organisme ; il naît sous la forme d'un sac, la citerne du chyle ou citerne de Pecquet, qui recueille la lymphe en provenance des membres inférieurs et du système digestif. La lymphe finit par être drainée dans le sang veineux à la jonction des veines sous-clavières et jugulaires internes.

4.1.3.2 Composition de la lymphe

La lymphe est un ultrafiltrat du plasma et a une composition voisine de celle du liquide interstitiel du tissu dont elle provient. Elle est donc variable selon les tissus.

La différence la plus importante concerne la teneur en protéides : pour la plupart des tissus, la concentration protéique est basse (10-20 g/l) ; pour le tube digestif, elle varie entre 30 et 50 g/l et dans le foie, elle culmine à 60 g/l. Les enzymes passent en continu dans la lymphe *via* les fluides interstitiels du plasma.

La concentration en lipides est aussi très variable (jusqu'à 10 g/l) et en période post-prandiale, la lymphe transporte les 2/3 des lipides absorbés, non en solution, mais sous forme de lipoprotéines. Ces lipides sont constitués principalement d'esters d'acides gras (esters du cholestérol, phospholipides et triglycérides), de cholestérol libre et d'acides gras libres. Ces lipoprotéines diffèrent en taille et en concentrations de lipides et d'apoprotéines. Les chylomicrons sont les plus grosses molécules de transport des lipides dans la lymphe, leur production est phasique et dépend de la quantité de lipide absorbable co-administré. Leur taille varie entre 50 et 500 nm de diamètre, le centre est constitué de triglycérides entourés à l'extérieur d'une monocouche de phospholipides et d'apoprotéines. Ils sont surtout présents dans la lymphe intestinale et sont responsables de l'aspect laiteux de la lymphe pendant l'absorption des graisses.

Le contenu en électrolytes de la lymphe ne diffère pas significativement de celui du plasma. La lymphe coagule aussi mais moins rapidement que le plasma. On retrouve aussi dans la lymphe quelques cellules sanguines, des lymphocytes, et des substances étrangères à l'organisme (bactéries) [YOFFEY et COURTICE, 1970].

4.1.3.3 Transport de la lymphe et débits lymphatiques

L'écoulement de la lymphe est dû essentiellement au fonctionnement des valves et à l'activité myogénique du muscle lisse des parois des canaux. Des facteurs extrinsèques secondaires participent à l'écoulement de la lymphe tels que la pression exercée sur les vaisseaux lymphatiques par les tissus, notamment lors de la contraction musculaire, l'onde du pouls artériel ou encore les mouvements respiratoires.

Le gradient de pression hydrostatique entre l'interstitium et la lumière lymphatique est la principale force contrôlant le flux lymphatique. La progression de la lymphe est très irrégulière et tributaire en particulier de l'état de repos ou d'activité. Le débit lymphatique est donc très variable. Pour un sédentaire ayant une activité physique modérée, le débit lymphatique total est de 2-3 l/24h (120 ml/h). Le débit de la lymphe est donc très bas comparé au débit sanguin systémique (5 l/h environ) et la réabsorption lymphatique ne porte en fait que sur 2 à 10 % des liquides filtrés. L'écoulement lymphatique de l'intestin peut augmenter lors de l'absorption d'eau. L'augmentation la plus importante se produit quand une solution isotonique de chlorure de sodium est absorbée et le volume de la lymphe peut être égal à 80 % du volume absorbé. Le débit lymphatique est augmenté d'un facteur de 5 à 20 lors d'un repas. L'absorption de glucose multiplie par 5 à 7 le débit lymphatique [GRANGER et TAYLOR, 1978].

D'un point de vue quantitatif, la circulation lymphatique joue donc un rôle négligeable dans les transferts au regard des 98 % retournant au cœur. Néanmoins, la lymphe joue un rôle qualitatif très important dans la réabsorption des grosses molécules interstitielles et du liquide qu'elles entraînent. Les vaisseaux lymphatiques intestinaux sont les sites majeurs de l'absorption et du transport des graisses, des vitamines liposolubles, des enzymes et du cholestérol.

4.1.3.4 Comparaison avec le système lymphatique du Rat

Chez le rat buvant *ad libitum* de l'eau pure mais ne consommant aucun aliment solide, le débit lymphatique est de 20 ml/24h dans le tronc lymphatique mésentérique et de 25 ml/24h dans le canal thoracique [BOLLMAN et coll., 1948]. Le débit lymphatique exprimé en ml/kg/h est relativement constant chez de nombreux animaux (entre 0,9 et 4,2) mais il existe des différences importantes si la production de lymphe est mesurée (en ml/h) au niveau des organes [FRUHLING, 1981].

Dans l'ensemble, on admet que chez les animaux à jeun, la lymphe du canal thoracique provient pour au moins 50 % de l'intestin et pour 30 % du foie.

Dans diverses espèces animales (rat, lapin, chien, singe), des communications lympho-veineuses ont pu être mises en évidence, c'est-à-dire des régions anatomiques où la lymphe se jette dans le système veineux en plus du confluent jugulo-sous-clavier. Il s'agit principalement d'anastomoses entre les lymphatiques lombaires et le système veineux cave, entre les lymphatiques mésentériques et la veine porte. Ces communications semblent jouer un rôle mineur dans les conditions physiologiques, mais important dans des conditions pathologiques. Ces communications lympho-veineuses sont moins fréquentes ou moins actives chez l'homme que chez les animaux [LEYMARIOS, 1973].

4.2 ABSORPTION LYMPHATIQUE GASTRO-INTESTINALE

RUBAS et GRASS [1991] distinguent dans leur article de revue, l'absorption lymphatique *via* les tissus non lymphoïdes, de celle impliquant uniquement les tissus lymphoïdes.

4.2.1 *Via* les tissus non lymphoïdes

Les jonctions des cellules endothéliales des vaisseaux lymphatiques sont largement séparées et permettent le passage de macromolécules telles que les chylomicrons (75 - 600 nm de diamètre) dans la lumière lymphatique ; la membrane basale des capillaires lymphatiques est fragmentée, offrant une faible barrière aux solutés, fluides et grosses particules [GRANGER et KVIETYS, 1981].

4.2.1.1 Mécanismes de l'absorption lymphatique

La voie intercellulaire est le principal mécanisme de transport [CLEMENTI et PALADE, 1969]. Des particules de 3 à 50 nm de diamètre peuvent passer à travers les jonctions intermédiaires (*zonulae adherens*) des cellules endothéliales des vaisseaux lymphatiques.

Il existe d'autres mécanismes pouvant aussi expliquer le passage lymphatique.

Certaines particules (5 à 70 μ m de diamètre) telles que pollen, spores, cellulose, diatomées passeraient par voie paracellulaire (persorption) [APRAHAMIAN et coll., 1986].

Une autre voie est la route des lipides qui gagnent la circulation lymphatique sous forme de chylomicrons.

4.2.1.2 Propriétés physico-chimiques de la capture lymphatique

L'absorption d'une particule au niveau des vaisseaux lymphatiques dépend principalement de sa taille. Les cellules des vaisseaux lymphatiques possèdent des jonctions bien séparées permettant le passage des chylomicrons mais aussi de toute particule de taille inférieure à 600 nm dans la lumière lymphatique [YOSHIKAWA et coll., 1984].

Les petites molécules peuvent gagner la lumière lymphatique après incorporation aux chylomicrons en fonction de leur hydrophobicité et liposolubilité.

4.2.2 *Via* les tissus lymphoïdes

L'absorption des particules par les tissus lymphoïdes est le mécanisme le plus plausible.

Tableau 8 : Plaques de Peyer et différences d'espèces.

<i>Espèce animale</i>	<i>Age</i>	<i>Nombre de plaques de Peyer</i>
Rat [KANOU T, 1984]	10 jours	5 - 6
	1 an	15 - 18
Homme [CORNES JS, 1965]	21 - 29 ans	161 (109 - 201)
	30 - 50 ans	134 (104 - 217)
	> 51 ans	123 (59 - 169)

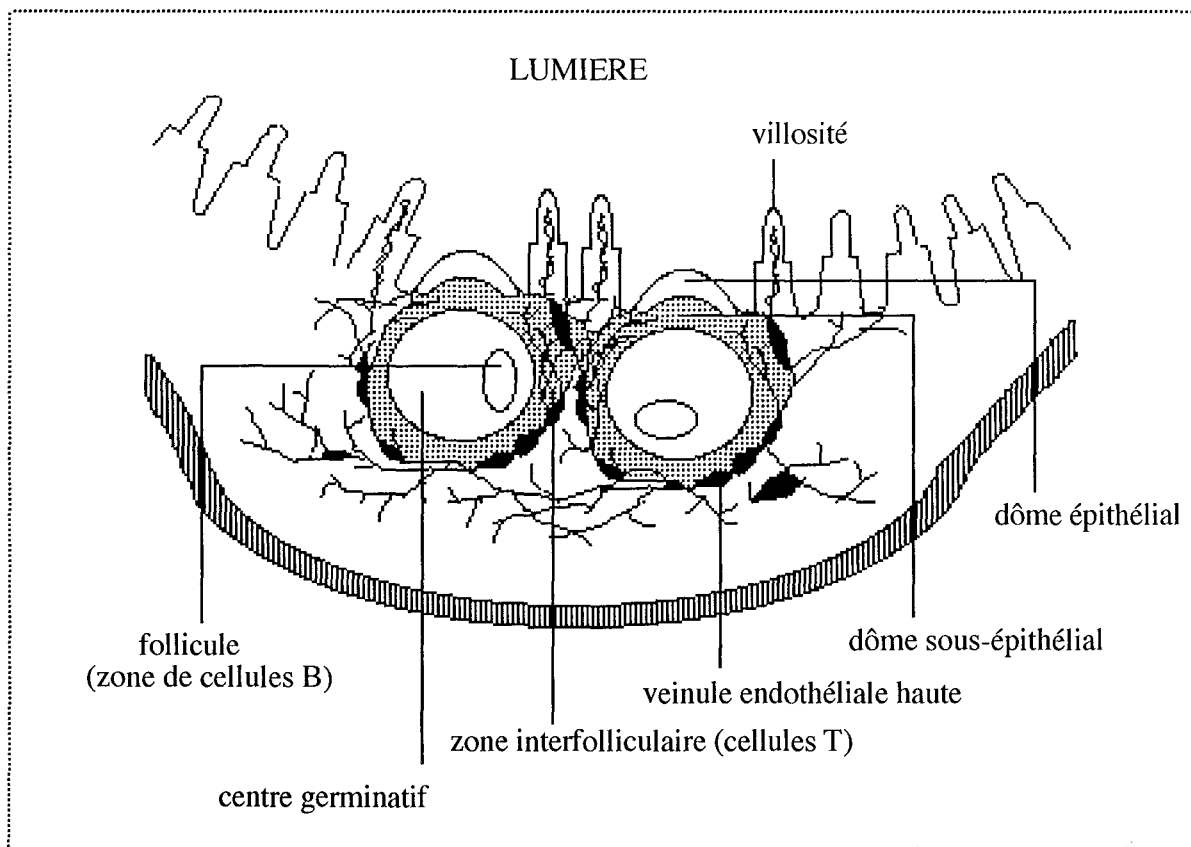


Figure 17 : Schéma des plaques de Peyer, d'après [Male, 1987].

4.2.2.1 Capture par les plaques de Peyer

En 1676, Peyer décrit pour la première fois des plaques appartenant au tissu lymphoïde associé au tube digestif (« Gut-Associated Lymphoid Tissue », GALT). Le nombre et la localisation des plaques de Peyer varient selon les espèces (environ 200 chez l'homme et 12 chez la souris) et aussi l'âge (Tableau 8). En général, l'iléum est plus riche en plaques de Peyer que le jéjunum et le duodénum en contient très peu.

Les plaques de Peyer ont une forme généralement rectangulaire ou ovale et elles sont situées sur le côté anti-mésentérique de l'intestin et elles se développent à travers la *lamina propria*, la sous-muqueuse et l'épithélium luminal.

Chaque plaque de Peyer (Figure 17) est formée d'un petit agrégat de follicules lymphoïdes comprenant principalement des lymphocytes B. Les espaces interfolliculaires, en particulier ceux proches de la lumière intestinale sont riches en lymphocytes T. Les dômes des plaques de Peyer, situés entre la lumière et les follicules, sont formés de régions épithéliales et sous-épithéliales.

4.2.2.2 Les cellules M

L'épithélium au niveau des plaques de Peyer contient une cellule spécialisée, la cellule M, dont la fonction est de filtrer le contenu de la lumière intestinale (Figure 18). Les cellules M ont pour rôle de capturer les virus, les bactéries et protozoaires se trouvant dans la lumière intestinale et de les transporter vers les cellules immunocompétentes, dans la couche sous-épithéliale du dôme de la plaque.

4.2.2.3 Mécanisme de la capture

La capture par les cellules M des particules est semblable à celle des bactéries et le mécanisme de capture le plus probable est la phagocytose, après extension de la membrane apicale de la cellule [EBEL, 1990 ; ELDRIDGE et coll., 1990].

Dans la cellule, le phagosome internalisé peut contenir parfois plusieurs particules en fonction de leur taille. Puis la membrane du phagosome fusionne au pôle opposé de la cellule avec la membrane basolatérale. Les particules sont soit libérées dans une poche intra-épithéliale ou bien traversent directement la lamina de la région sous-épithéliale du dôme, avant d'être pris en charge par les lymphocytes ou macrophages au niveau des centres germinaux des follicules lymphoïdes.

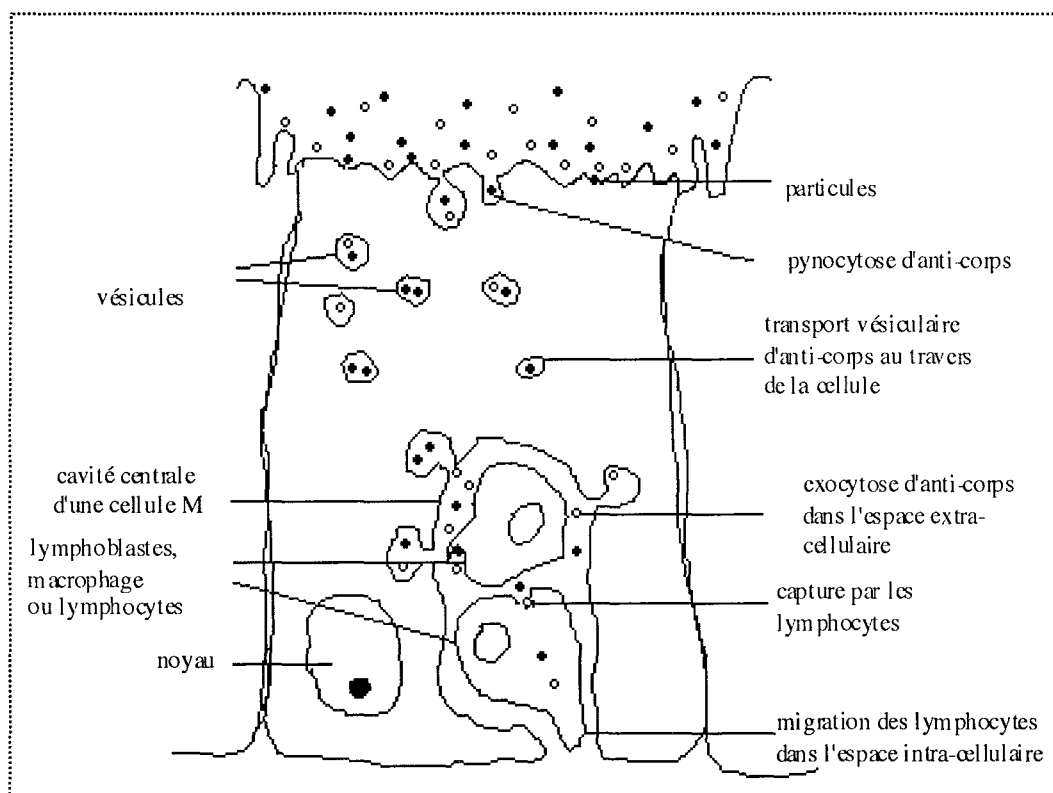


Figure 18 : Mécanisme d'absorption des particules capturées par les cellules M, d'après [O'Hagan, 1990].

Les particules quittent le site d'entrée et vont par les vaisseaux lymphatiques efférents, vers les ganglions mésentériques et ensuite retournent dans le sang par le canal thoracique. Une partie peut gagner directement les capillaires sanguins des follicules dont la paroi est moins épaisse et non fenestrée [YEH et coll., 1998].

Au sein des cellules M, les particules ne seraient pas dégradées car les cellules M seraient déficientes en lysosomes. La capacité métabolique en terme de dégradation peptidique y est aussi plus faible que dans les autres cellules [HEYMAN et coll., 1982 ; KELJO et HAMILTON, 1983].

4.2.2.4 Mise en évidence de la capture des particules

Les travaux de la littérature sont maintenant suffisamment abondants pour affirmer que le mécanisme principal d'absorption des nanosphères administrées par voie orale résulte d'une capture par les plaques de Peyer, via les cellules M.

PAPPO et ERMAK [1989] ont quantifié la capture de latex fluorescents chez le lapin et ont observé que les particules de 600 à 750 nm de diamètre étaient internalisées par les cellules M et transportées vers l'espace sous-épithélial dès la 10ème minute après leur administration, à une vitesse de 2 $\mu\text{m}/\text{min}$.

JANI et coll. [1992] ont étudié la localisation de nanosphères de polystyrène fluorescentes, de taille comprise entre 50 nm et 3 μm , après administration orale pendant 10 jours à des rats. Toutes les nanosphères, à l'exception de celles de 3 μm , ont été retrouvées concentrées dans la membrane séreuse des plaques de Peyer et sont ensuite transportées dans les vaisseaux lymphatiques mésentériques. Les particules de 50 nm s'étaient accumulées dans la région capsulaire du rein, dans les nodules lymphatiques et le foie après 10 jours.

SCHERER et coll. [1993] ont observé après administration orale, de nombreuses nanoparticules de poly(isobutylcyanoacrylate) d'une taille de 200 nm dans la paroi intestinale et au niveau des plaques de Peyer. La pénétration des nanoparticules dans la paroi intestinale s'effectue sur une période de 4 heures et se limite aux 2 à 3 premières couches de la paroi.

CARR et coll. [1996] ont administré par voie orale à des rats des latex en polystyrène de différentes tailles (2, 6, 10 et 20 μm de diamètre). Ils ont pu observer par microscopie à fluorescence 30 min après administration, que toutes les microsphères se trouvaient au niveau des plaques de Peyer et

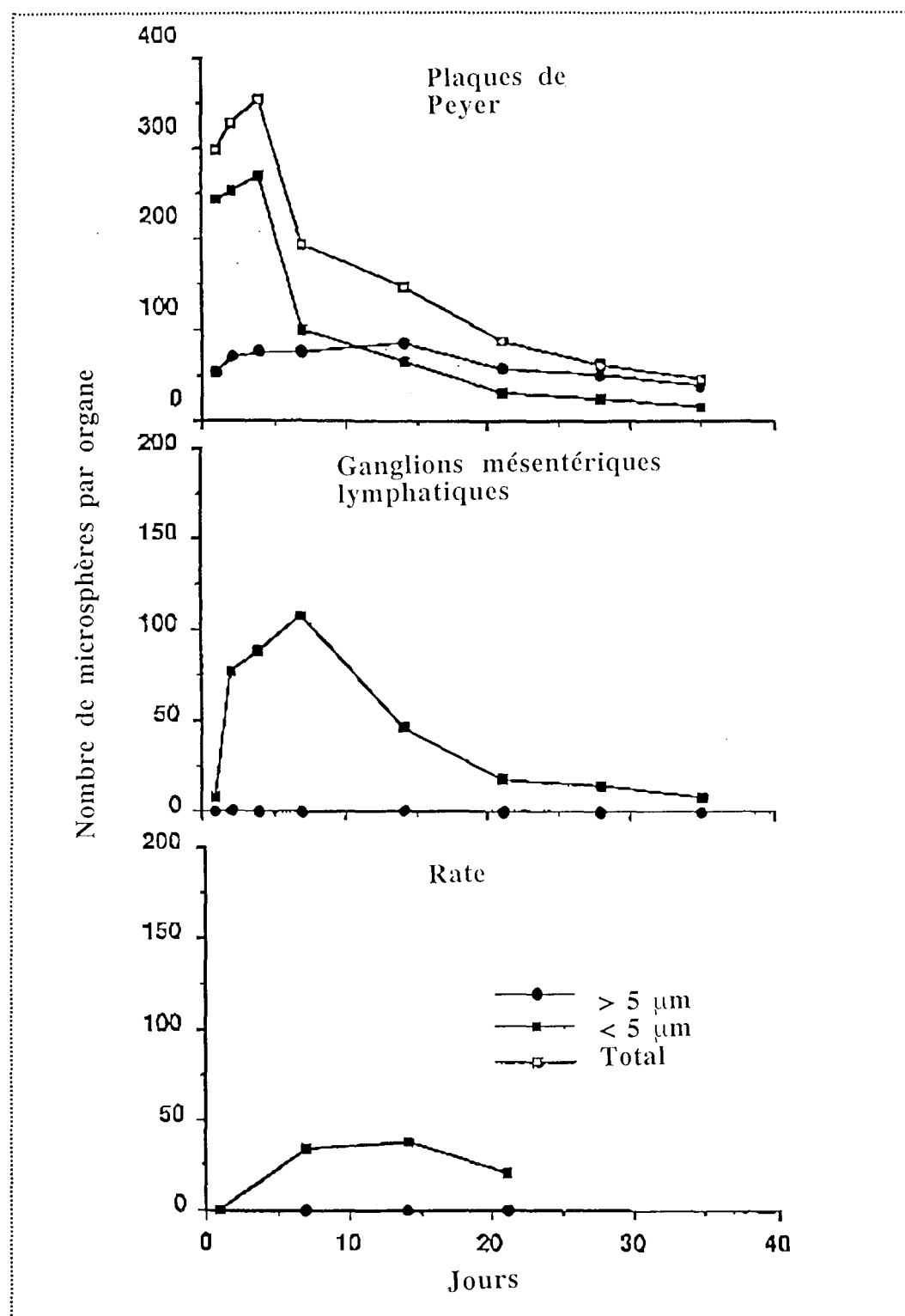


Figure 19 : Nombre de microsphères par organe après administration orale, d'après [ELDRIGE et coll., 1990].

seules celles de 2 μm étaient présentes au niveau des ganglions lymphatiques mésentériques.

Notre équipe, dans un travail de thèse précédent, s'est aussi intéressée au devenir de nanoparticules de polycaprolactone après administration orale à des rats [LE VERGER, 1997]. Les nanoparticules ont pu être observées entre 5 et 15 minutes après leur administration à la surface des villosités intestinales et des plaques de Peyer où elles pénétraient rapidement.

Même si les méthodes mises à disposition pour évaluer la capture des particules [DELIE, 1998] sont très variées (microscopie par fluorescence, microscopie confocale, microscopie électronique, fluorométrie, chromatographie par perméation de gel, utilisation de radio-isotopes), il est toujours difficile de quantifier l'importance du passage des particules, comme le montre la grande hétérogénéité des résultats : selon les études, l'efficacité de la capture par les plaques de Peyer varie entre 0,1 % et 60 % (Tableau 9).

4.2.2.5 Facteurs favorisant la capture par les cellules M

L'importance de la capture dépend de plusieurs facteurs et principalement de la taille des particules.

a) Influence de la taille des particules

ELDRIDGE et coll. [1990] ont pu remarquer que, jusqu'à 5 μm , les particules quittent le site d'entrée et gagnent les vaisseaux lymphatiques efférents, alors que les particules de taille supérieure à 5 μm , restent dans les plaques de Peyer (Figure 19).

JANI et coll. [1992] ont montré que la vitesse de la capture de particules de latex par les plaques de Peyer dépendait de la taille des particules, les plus petites gagnant les tissus plus rapidement. Les particules de 50 nm étaient détectées dans le mésentère, 6 heures après leur administration orale à des rats, tandis que les particules de 1 μm et celles de 500 nm et 1 μm de diamètre sont observées à cet endroit, seulement 12 heures et 18 heures après (Tableau 10).

b) *Influence des propriétés de surface des particules*

Les particules ayant les surfaces les plus hydrophobes seraient absorbées préférentiellement au niveau des plaques de Peyer.

Tableau 9 : Evaluation de la quantité de nanosphères absorbées au niveau du tractus gastro-intestinal.

Références	Polymère	Taille	Quantité absorbée (% quantité administrée)
[HILLERY et coll, 1994]	polystyrène	60 nm	10 % 60 % (PP)
[FLORENCE et coll, 1995]	polystyrène	500 nm	4,28 % 12,8 % (conjugaison avec des lectines)
		100 nm	28-35 % 30-49 % (PP)
[DESAI et coll, 1996]	PLAGA	500 nm	0,06-0,27 % 0,11-0,12 % (PP)

Tableau 10 : Influence de la taille sur la capture des latex observée au microscope, d'après [JANI, 1992].

Organes	Taille des latex (nm)	6 h	12 h	18 h	24 h	36 h
Plaques de Peyer	50	+++	+++	++	-	-
	500	+	++	+++	++	+
	1000	+	+	++	+	+
Ganglions lymphatiques mésentériques/canal	50	+++	+++	++	+	-
	500	++	+++	++	++	+
	1000	-	+		++	+
Foie	50	-	+	++	++	+
	500	-	+	++	++	+
	1000	-	-	+	+	+
Rate	50	-	-	+	++	+
	500	-	-	+	+	+
	1000	-	-	-	+	+

(-) aucune capture ni présence de latex ; (+) faible capture ou présence de latex ; (++) capture ou présence de latex évidente ; (+++) capture importante ou présence de latex en grand nombre.

ILLUM et coll. [1987] ont montré qu'en diminuant l'hydrophobicité de la surface de latex (par adsorption à leur surface de poloxamers ou poloxamines différents), la capture par les plaques de Peyer diminuait.

ELDRIGE [1990] a étudié la capture de microsphères préparées à partir de 10 sortes de polymères. La capture était plus importante pour les polymères les plus hydrophobes (polystyrène, polyméthylméthacrylate, polyhydroxybutyrate) que pour les polymères moins hydrophobes (poly(acide lactique), copolymères des acides lactique et glycolique) ; avec les dérivés de la cellulose, polymères hydrophiles, la capture était très faible.

Par ailleurs, il a été démontré que les particules de polystyrène sont capturées sélectivement par les cellules M, alors que celles de PLAGA sont retrouvées à d'autres sites du tractus digestif [JEPSON et coll., 1996].

Ces résultats ont été confirmés par les travaux de HILLERY et FLORENCE [1996] qui ont montré que l'absorption par les plaques de Peyer représentait seulement 3 et 1,5 % de la quantité administrée quand les particules étaient recouvertes respectivement de poloxamer 188 et 407, alors que cela représentait 10 % quand les particules n'étaient pas recouvertes par ces surfactants hydrophiles.

Par ailleurs, l'ionisation de la surface des particules serait aussi un facteur important. La capture des particules non chargées serait plus importante que celle des particules chargées.

c) *Autres facteurs*

Le nombre de particules détectées dans les plaques de Peyer augmente avec la dose administrée (mais il n'existe pas de relation linéaire) [RUBAS et GRASS, 1991].

L'eau [ALPAR et coll., 1989] ou des formulations hypotoniques [EYLES et coll., 1996] seraient les meilleurs milieux dispersants.

4.2.2.6 Ciblage des cellules M

Les études sur l'utilisation des lectines [CHEN et coll., 1996] ou de mécanismes viraux ou bactériens (invasines) [IRACHE et coll., 1996 ; HUSSAIN et FLORENCE, 1998] reconnus par des récepteurs situés à la surface des cellules M, semblent très prometteuses pour cibler les cellules M et augmenter la capture des particules.

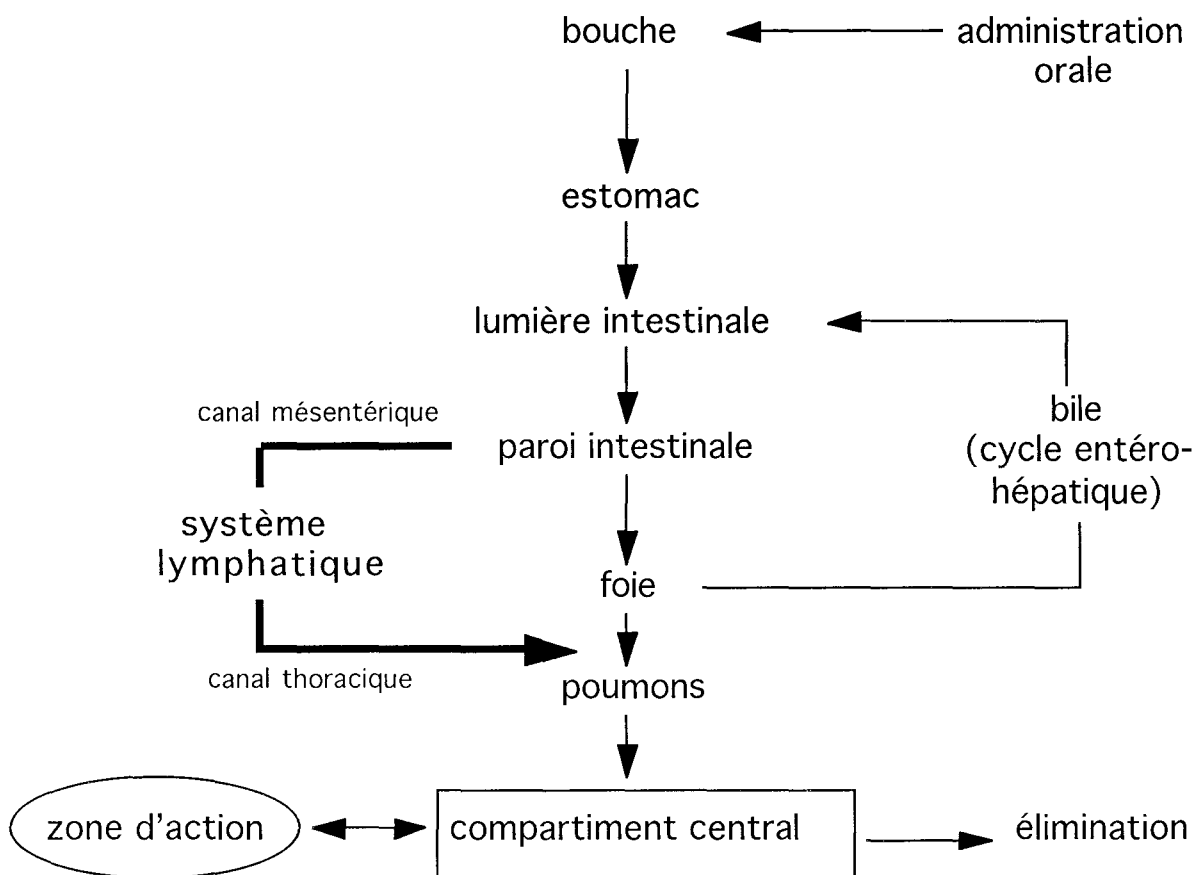


Figure 20 : Schéma montrant comment le système lymphatique permet d'éviter le foie après administration orale.

En résumé, le phénomène de capture des particules par le tractus gastro-intestinal est l'objet de nombreuses études en sa faveur. Les diverses voies de passage évoquées sont possibles et leur implication dépend du type de particules et de la localisation dans le tractus gastro-intestinal. En effet, les travaux de DAMGE et coll. [1990] sur le chien ou le rat ont montré que les nanocapsules de Lipiodol® étaient absorbées préférentiellement au niveau des espaces intercellulaires des entérocytes, alors qu'au niveau de l'iléon, les nanocapsules passaient dans les cellules M des plaques de Peyer.

Il apparaît aussi à travers la littérature que la capture au niveau des plaques de Peyer est loin d'être un phénomène négligeable pour les vecteurs colloïdaux. La circulation lymphatique semble jouer un rôle important dans le devenir in vivo des particules administrées per os. Les travaux de HILLERY et coll. [1994] sont une illustration de ce phénomène. Il a ainsi été observé pour des nanosphères de polystyrène de 60 nm administrées oralement à des rats pendant 5 jours que 60 % des nanosphères sont capturées dans le petit intestin au niveau des plaques de Peyer qui pourtant représentent moins de 1 % de la surface totale de la muqueuse de l'intestin grêle.

4.2.3 Intérêt du ciblage lymphatique

Les principes actifs qui ont été incorporés dans des nanosphères en vue d'une administration orale (Tableau 7) sont principalement les peptides (insuline, ciclosporine, ...) qui sont ainsi protégés de la dégradation acide et enzymatique, mais aussi des molécules connues pour être irritantes pour la muqueuse digestive (indométhacine), ou ayant une faible biodisponibilité en raison d'un effet de premier passage hépatique important (nifédipine, darodipine).

Le système lymphatique intestinal est une voie alternative à la circulation sanguine portale par laquelle des principes actifs peuvent rejoindre la circulation systémique. L'effet de premier passage hépatique n'existe pas et le transport lymphatique devient intéressant pour augmenter l'activité des molécules à clairance hépatique élevée (Figure 20). Le ciblage de la voie lymphatique ouvre de nouvelles perspectives pour toute forme capable d'accroître le transport lymphatique des principes actifs.

4.2.3.1 Les formulations lipidiques

Une première voie d'investigation s'intéresse aux formulations galéniques de type émulsion lipidique ou micelles mixtes qui utilisent les chylomicrons pour gagner la circulation lymphatique.

L'huile d'arachide, l'huile d'olive, l'huile de ricin hydrogénée, l'acide oléique seul ou émulsionné avec le monoglycéride d'acide oléique ou avec des taurocholates sont les lipides qui ont été utilisés pour administrer oralement des molécules telles que la ciclosporine [TAKADA et coll., 1986], la vitamine A, la vitamine D ou le DDT [CHARMANN et STELLA, 1986].

Deux études sur le propranolol, l'une menée chez l'animal et l'autre chez l'homme, montrent l'intérêt de cette recherche en thérapeutique.

L'administration chez le cochon par voie intraduodénale d'un nouveau système d'administration du propranolol (chlorhydrate) utilisant un mélange d'acides biliaires est suivie d'un transport lymphatique accru, le propranolol apparaissant très tôt dans la lymphe (dans les 30 min.) [WHITE et coll., 1991]. Des taux sanguins élevés étaient mesurés, suggérant une contribution significative du système lymphatique au système porte.

Chez l'homme, une étude croisée chez 9 sujets volontaires sains a comparé des gélules à libération prolongée de propranolol (Inderal®) à deux nouvelles formes orales visant à éviter le métabolisme dû au premier passage hépatique [BARNWELL et coll., 1992]. Les nouvelles formulations contenaient dans des gélules, un mélange d'acides gras insaturés, principalement de l'acide oléique, et des surfactants. Les paramètres pharmacocinétiques tels que l'aire sous la courbe des concentrations plasmatiques de propranolol en fonction du temps (AUC) et la concentration plasmatique maximale de propranolol (C_{max}) ont été multipliés par 6 et 4 respectivement par rapport à la forme gélule.

4.2.3.2 Les vecteurs colloïdaux polymères

Une seconde voie de recherche s'intéresse à l'utilisation des vecteurs colloïdaux polymères.

YANAGOWA et coll. [1989] ont administré *per os* à des rats, des microsphères d'une taille de 191 nm, chargées en ciclosporine A et composées d'huile d'olive ou de soja, de phosphatidylcholine et de glycérol. La concentration lymphatique thoracique de ciclosporine mesurée 2 h après administration des microsphères était 46 fois plus élevée que celle trouvée avec la forme conventionnelle de ciclosporine.

JENKINS et coll. [1994] ont canulé le canal lymphatique mésentérique chez des rats et administré par voie intraduodénale 1 ml (soit 10¹³ particules) de nanosphères de polystyrène de 150 nm de diamètre. Ils ont ensuite quantifié par cytométrie en flux, le nombre de nanosphères absorbées dans la lymphe. Les nanosphères étaient absorbées rapidement (dès 5 min), le maximum

étant atteint au bout de 65 min. Les quantités de nanosphères retrouvées dans la lymphe restent cependant très faibles, puisque seulement $5 \cdot 10^4$ particules ont pu être comptées au bout de 90 min.

Ces 2 études confirment les résultats obtenus par notre équipe [KIM et coll., 1997] qui a montré que l'administration orale à des rats de nanosphères et microsphères de nifédipine, était suivie d'une augmentation des taux lymphatiques du principe actif, ce qui concourrait à l'amélioration de la biodisponibilité de la nifédipine.

METHODES

5. METHODES DE PREPARATION DES DIFFERENTES FORMES MEDICAMENTEUSES

5.1 PREPARATION DE LA SOLUTION D'ISRADIPINE DE REFERENCE

Les différentes nanosphères étudiées ont été comparées à une solution d'isradipine dans le mélange poly(oxyéthylène glycol)400-eau (que nous appelons solution de référence).

5.1.1 Le principe actif

L'isradipine a été gracieusement fournie par les laboratoires NOVARTIS (ex SANDOZ, Bâle, Suisse).

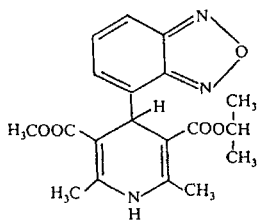
Elle se présente sous la forme d'une poudre jaune très lipophile et pratiquement insoluble dans l'eau (solubilité à 20°C inférieure à 0,01% m/m) mais très soluble dans la plupart des solvants organiques. Sa masse moléculaire est de 375, son point de fusion de 168°C. Il s'agit d'un produit photosensible (Tableau 11).

5.1.2 Méthode de préparation

Comme l'isradipine est quasiment insoluble dans l'eau, la solution de référence est préparée en dissolvant l'isradipine dans un mélange constitué de 50% d'eau et 50% de poly(oxyéthylèneglycol) 400 (PEG 400) (COOPER, Melun, France).

La solution d'isradipine dans le PEG 400 a une concentration en isradipine égale à 0,5 mg/ml.

Tableau 11 : Description chimique et propriétés physiques de l'isradipine.

PRINCIPE ACTIF	ISRADIPINE
DESCRIPTION	
Dénomination commune	isradipine
Dénomination chimique	(RS) -4 -(benzofuran-4-yl)-2,6diméthyl - 1,4 -dihydropyridine -3,5-dicarboxylate de méthyle et de 1 -méthyléthyle
Formule brute	C ₁₉ H ₂₁ N ₃ O
Formule développée	
Masse moléculaire	371,4
Aspect, couleur, odeur	poudre jaune, finement cristalline, inodore ou à faible odeur caractéristique
PROPRIETES PHYSIQUES	
Spectre UV (dans le méthanol)	longueur d'onde du maximum d'absorption : 326 nm
Point de fusion	168°C
Solubilités (à 20°C, gravimétrie en %/m)	eau <0,01 - éthanol absolu 6,7 - méthanol 7 - acétone >20 - dichlorométhane >20
STABILITE	l'isradipine en solution subit une photo- oxydation

5.2 PREPARATION DES NANOSPHERES

5.2.1 Les différents constituants

5.2.1.1 Les polymères

La poly(ϵ -caprolactone) (PCL) (Aldrich Chemical Company, Saint Quentin Fallavier, France) : il s'agit d'un polymère semi-cristallin, biodégradable, se présentant sous la forme de bâtonnets rigides de couleur blanche (masse moléculaire= 42000, température de transition vitreuse = -60°C, degré de cristallinité= 45 à 50 %, point de fusion = + 63°C).

Le copolymère d'acide DL lactique-co-glycolique (PLA50GA50) (Medisorb, Technologies International LP c/o Dupont International SA, Genève, Suisse) : c'est un polymère amorphe, biodégradable, se présentant sous forme de bâtonnets rigides translucides, hygroscopiques (masse moléculaire comprise entre 50000 et 70000, température de transition vitreuse comprise entre 45 et 50°C).

L'Eudragit RL PO et l'Eudragit RS PO (Röhm Pharma, Darmstadt, Allemagne) : il s'agit de copolymères amorphes, biorésorbables (masses moléculaires 150 000), synthétisés à partir des acides acryliques et méthacryliques avec une faible concentration en groupes ammonium quaternaires. La proportion de groupe ammonium par rapport à l'ester méthacrylate est de 1:20 pour l'Eudragit RL et de 1:40 pour l'Eudragit RS. Les Eudragit RL et RS se présentent sous forme de poudres solubles dans l'acétone et l'alcool.

5.2.1.2 Le stabilisant

Le Pluronic® F68 (BASF, Ludwigshaffen, Allemagne) : c'est un tensioactif non ionique appartenant à la famille des Pluriol PE et obtenu par copolymérisation de l'oxyde de propylène et de l'oxyde d'éthylène (Figure 21); sa masse moléculaire est d'environ 8500 ; il contient 80 % de poly(oxyéthylène) dans sa molécule et la masse moléculaire approximative de la séquence hydrophobe de poly(oxypropylène) est de 1750.

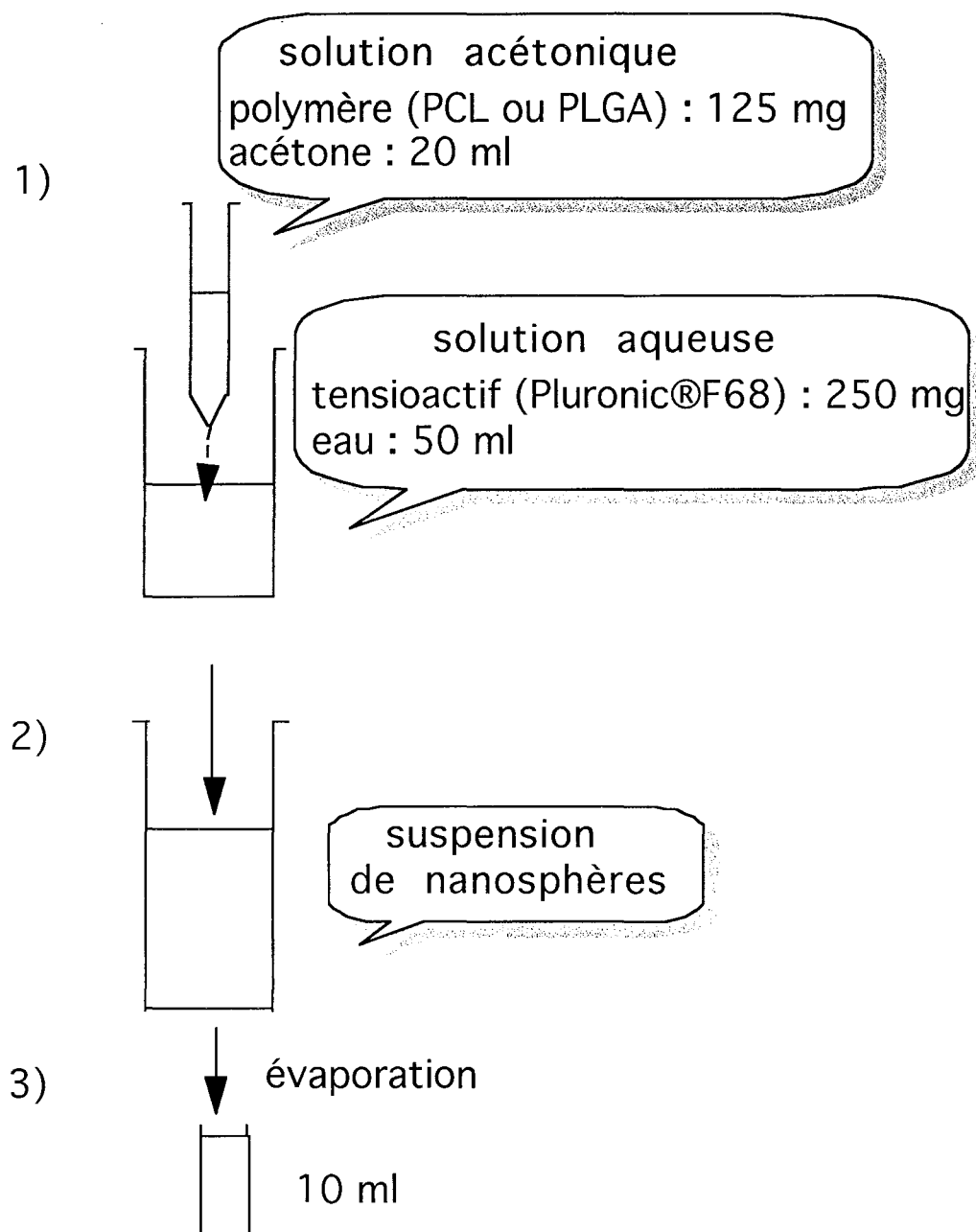
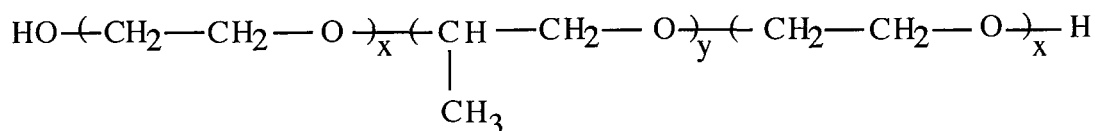


Figure 22 : Préparation des nanosphères de PCL ou PLGA selon la méthode de nanopréciipitation de FESSI et coll. [1988].



x varie de 2 à 130 et y varie de 15 à 67 selon le Pluriol (x = 75 et y = 30 pour le Pluriol PE 6800).

Figure 21 : Formule chimique des Pluriol PE.

Les appellations " Pluronic 68 ", " Pluriol PE 6800 " ou " Poloxamer 188 " désignent le même produit. Le Pluronic® F68 se présente sous forme de granulés blancs.

5.2.2 Mode opératoire

Le principe de préparation des nanosphères repose sur la méthode de nanoprécipitation de FESSI et coll. [1986].

5.2.2.1 Préparation des nanosphères de PCL ou de PLAGA

D'une part, 0.125 g de PCL (ou PLAGA) et 0,005 g d'isradipine sont dissous dans 20 ml d'acétone par passage dans une cuve à ultrasons (cuve Bioblock Scientific 88155, Illkirch, France) pendant 15 minutes. D'autre part, 0,25 g de Pluronic F68® sont dissous dans 50 ml d'eau distillée.

La phase organique est ensuite injectée lentement au travers du corps d'une seringue en verre (seringue de 10 ml, COOPER, Melun, France) dans la phase aqueuse maintenue sous agitation magnétique (550 rpm) (agitateur électronique LMC, Merck, Nogent sur Marne, France) (Figure 22).

L'acétone diffuse alors dans la phase aqueuse et il se forme une émulsion de type L/H. Le polymère insoluble dans la phase continue aqueuse précipite et forme des nanosphères. On obtient une suspension laiteuse présentant l'effet Tyndall caractéristique des suspensions colloïdales.

La suspension de nanosphères est ensuite concentrée par élimination de l'acétone et d'une partie de l'eau à un volume final de 10 ml dans un évaporateur rotatif (Heidolph 94200, Bioblock Scientific, Illkirch, France), sous pression réduite à 40 °C .

Comme l'isradipine est photosensible, tous les récipients contenant l'isradipine sont protégés de la lumière par un film d'aluminium.

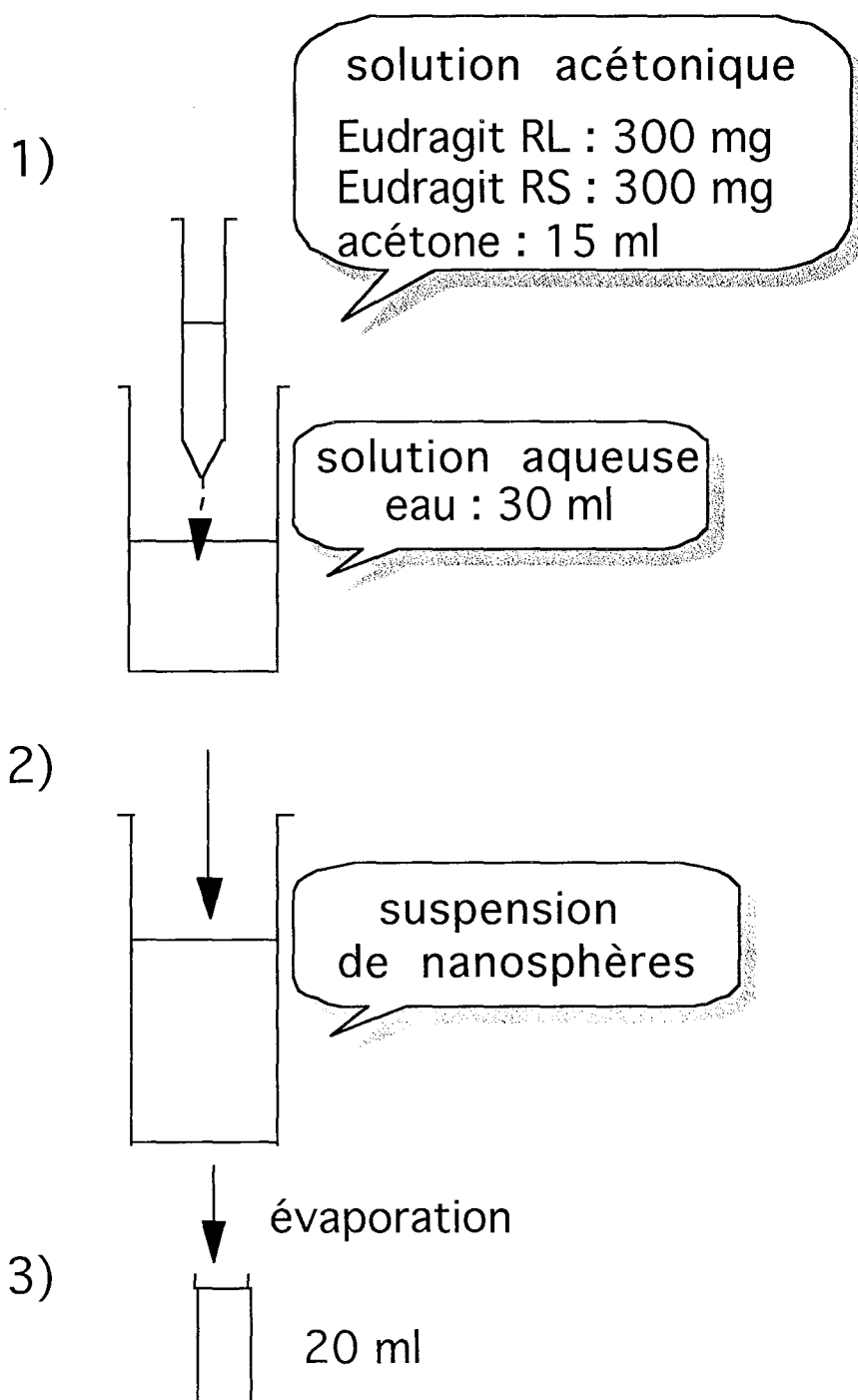


Figure 23 : Préparation des nanosphères d'Eudragit® RL et RS selon la méthode de nanopréciptation de FESSI et coll. [1988].

La suspension de nanosphères de PCL ou de PLAGA présente une concentration en polymère de 1,25 %, en Pluronic F68® de 2,5 % et en isradipine de 0,05 % (soit 0,5 mg/ml).

5.2.2.2 Préparation des nanosphères d'Eudragit

Tout d'abord, 0,3 g d'Eudragit RL, 0,3 g d'Eudragit RS et 0,01 g d'isradipine sont dissous dans 15 ml d'acétone. Puis, la phase acétonique est injectée dans 30 ml d'eau distillée, sous agitation magnétique (500 rpm). L'acétone est éliminé et la suspension est concentrée à un volume final de 20 ml (Figure 23).

La suspension de nanosphères d'Eudragit présente une concentration en polymère de 3 % et en isradipine de 0,05 % (soit 0,5 mg/ml).

5.2.2.3 Préparation des nanosphères non chargées en isradipine

Des nanosphères sans principe actif (nanosphères blanches) sont aussi préparées pour chaque polymère étudié, selon les méthodes décrites précédemment.

6. METHODES DE CARACTERISATION PHYSICO-CHIMIQUE DES NANOSPHERES

De nombreuses techniques peuvent être utilisées pour la caractérisation des nanosphères. La taille du vecteur ainsi que l'état physique du polymère sont des paramètres importants qui agissent sur les propriétés de libération du principe actif incorporé et sur la dégradation des nanosphères. Par ailleurs, les propriétés de surface des nanosphères auront une influence sur leur interaction avec l'environnement biologique après administration *in vivo*, et donc sur leur biodistribution.

6.1 DETERMINATION DE LA TAILLE DES NANOSPHERES

6.1.1 Granulométrie par spectroscopie de corrélation de photons

Cette technique permet de déterminer le diamètre moyen et l'indice de polydispersité des nanosphères.

6.1.1.1 Principe

La limite basse de la granulométrie par diffusion et diffraction statique de la lumière est environ égale au dixième de la longueur d'onde du laser utilisé, soit en général environ 50 nm. En dessous de cette limite, la dispersion de la lumière est isotropique ; c'est-à-dire que l'intensité lumineuse dispersée est égale dans toutes les directions. La granulométrie par spectroscopie de corrélation de photons permet de descendre en dessous de cette limite et de mesurer des suspensions colloïdales de 1 nm à quelques microns.

Le principe de cette technique [VIZCAINO, 1986] repose sur la mesure du mouvement brownien des particules (mouvement aléatoire des particules provoqué par les impacts des molécules du solvant sur la surface de la particule). La fréquence et l'amplitude de ce mouvement brownien dépendent de la taille de la particule et de la viscosité du solvant. A une viscosité donnée, plus la particule est petite et plus son mouvement brownien présente une fréquence et une amplitude relative importantes. De même, pour une taille donnée, plus la viscosité du solvant est faible (en raison d'une température plus élevée par exemple), plus ce mouvement brownien est rapide et ample.

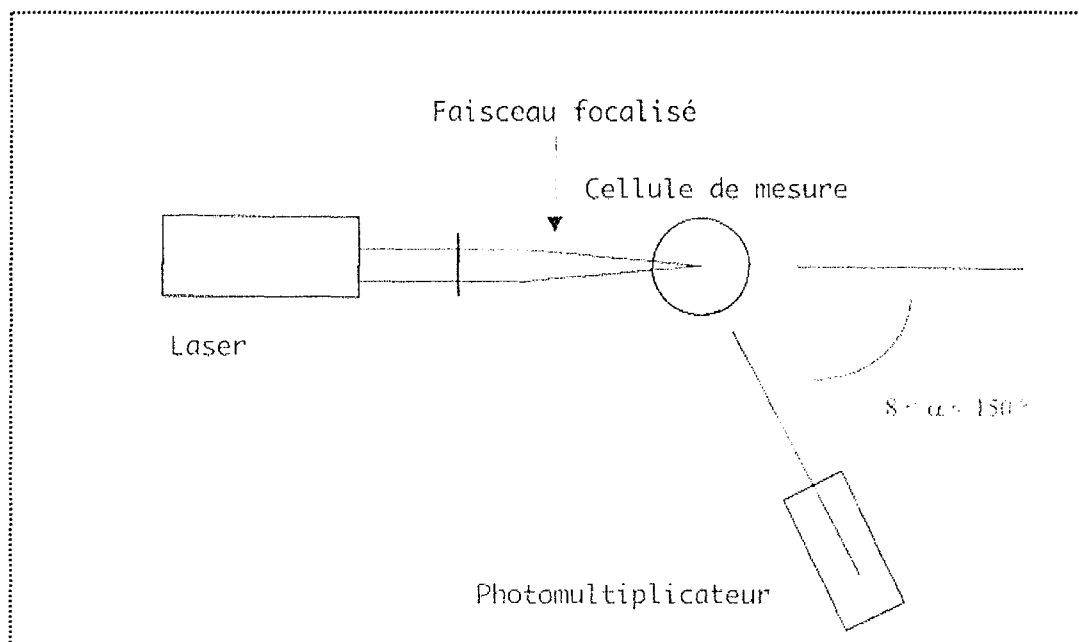


Figure 24 : Schéma descriptif du montage optique classique utilisé en granulométrie par spectroscopie de corrélation de photons.

La vitesse de déplacement des particules est définie par le coefficient de diffusion de translation qui est lui-même, proportionnel au diamètre hydrodynamique de la particule, selon la loi de Stokes Einstein :

$$d(H) = \frac{KT}{3\pi\eta D}$$

avec $d(H)$: diamètre hydrodynamique de la particule, D : coefficient de diffusion de translation isotherme de la particule, K : constante de Boltzman, T : température et η : viscosité du milieu dispersant.

La détermination du coefficient de diffusion translationnel permet la mesure du diamètre hydrodynamique, correspondant au diamètre des particules entourées de la couche d'hydratation.

6.1.1.2 Description du montage optique

Le montage optique est constitué d'une source LASER (Helium-Néon, Argon), d'une cellule de mesure et d'un photomultiplicateur choisi pour la mesure d'intensités diffusées très faibles, générées par des particules de très petites tailles (Figure 24).

Le laser est équipé d'un filtre spatial et d'une optique de focalisation du faisceau au milieu de la cellule.

Le photomultiplicateur est placé sur un goniomètre afin d'obtenir un angle d'incidence variable de 8 à 150°.

6.1.1.3 Méthode de calcul

Le signal mesuré par le photomultiplicateur correspond aux fluctuations de la lumière diffusée dues au mouvement brownien des particules. Ce signal est ensuite traité par un corrélateur numérique afin d'obtenir la fonction d'autocorrélation du signal.

La fonction d'autocorrélation (G) représente la probabilité de retrouver une particule à un instant $t+\delta t$ au même point de l'espace où elle se trouvait à l'instant t ; plus une particule est petite et plus cette probabilité est faible et inversement.

(G) est une fonction exponentielle décroissante, traduisant la réduction de corrélation de l'intensité du signal en fonction du temps. Le corrélateur

multiplie les intensités à t et à $t+\delta t$, et additionne la totalité sur une période de temps égale au temps de la mesure.

La fonction d'autocorrélation G a pour équation :

$$G(\tau) = \sum c_i \exp(-\gamma_i \tau)$$

avec :

c_i est l'intensité diffusée par les particules, τ est la période d'échantillonnage,

$\gamma_i = D q^2$ avec D , coefficient de diffusion translationnel,

$$q = (4\pi n_1 / \lambda_0) \sin(\theta/2),$$

n_1 étant l'indice de réfraction des particules, λ_0 la longueur d'onde du laser et θ l'angle d'observation.

6.1.1.4 Notion d'indice de polydispersité

La méthode des cumulants est le traitement mathématique qui permet d'étudier la répartition granulométrique de l'échantillon lorsque sa distribution est monomodale et de calculer un indice de polydispersité, correspondant à la variance de la distribution.

Un indice de polydispersité inférieur à 0,3 est le témoin d'une population homogène du point de vue de la taille, une valeur supérieure à 0,3 révèle la présence de plusieurs distributions.

6.1.1.5 Appareillage et mode opératoire

L'appareil utilisé pour déterminer le diamètre moyen en volume des nanosphères est le Zetamaster (Malvern Instruments, Orsay, France).

Après dispersion au 1/20 des suspensions de nanosphères dans une solution de NaCl 10^{-3} M, un volume de 2 ml est placé dans la cuve de mesure. Au préalable, la taille d'échantillons standard (nanosphères de polystyrène, de taille 96 ± 3 nm et 560 ± 5 nm, Duke Scientific Corporation, Paolo Alto, CA, USA) est déterminée pour s'assurer du bon calibrage de l'appareil.

6.1.2 Microscopie électronique à balayage

La microscopie électronique à balayage (MEB) permet de visualiser un ensemble de particules et de confirmer une éventuelle polydispersité de l'échantillon observé.

Les particules en suspension dans l'eau ou lyophilisées sont déposées sur un support cylindrique en laiton recouvert d'une membrane Nucléopore (Millipore, Saint Quentin en Yvelines, France). Lorsque les nanosphères sont en suspension, l'évaporation de l'eau est nécessaire et elle est obtenue à température ambiante avant la métallisation de la surface des échantillons. Celle-ci est réalisée à l'aide d'un mélange constitué de 60% de palladium et 40% d'or, pendant 5 minutes sous vide à 1,2 kV et 5 mA de courant imposé. La couche métallique ainsi déposée a une épaisseur d'environ 7 nm.

Les observations en MEB ont été effectuées avec l'appareil JEOL JSM T33A (Tokyo, Japon) par le Dr JF REMY, Laboratoire des Sciences du Génie Chimique, UPR CNRS 6811, ENSIC, Nancy.

6.1.3 Microscopie électronique à transmission

La microscopie électronique à transmission (MET), en particulier couplée à la cryofracture, est une technique puissante de caractérisation de la forme et de l'état de surface ainsi que de la structure interne des nanosphères. La première observation en 1979 de nanosphères de polycyanoacrylate en MET après cryofracture montra une structure matricielle continue [COUVREUR P et coll., 1979]. Inversement, l'appellation de nanocapsule fut justifiée par l'observation d'une structure de fine enveloppe entourant un coeur huileux [ROLLLOT et coll., 1986].

Les nanosphères en suspension dans l'eau sont tout d'abord congelées pendant une heure à -150°C dans le glycérol 30% (v/v) afin d'éviter toute variation de volume. Ensuite, elles sont montées entre deux supports de cryofracture. La fracture des échantillons est obtenue à -150°C sous vide. Les échantillons sont enfin recouverts d'une couche de 2 nm de platine, puis d'une couche de carbone. Les replicats sont lavés dans l'eau avant observation.

Les observations en MET ont été réalisées par le Dr MARCHAL, Laboratoire de Microscopie électronique, Faculté de Médecine, Nancy.

6.1.4 Analyses statistiques

Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ écart-type.

Les différences de tailles mesurées entre les nanosphères sont déterminées à l'aide du test non paramétrique de Kruskal Wallis, au risque $p < 0,05$.

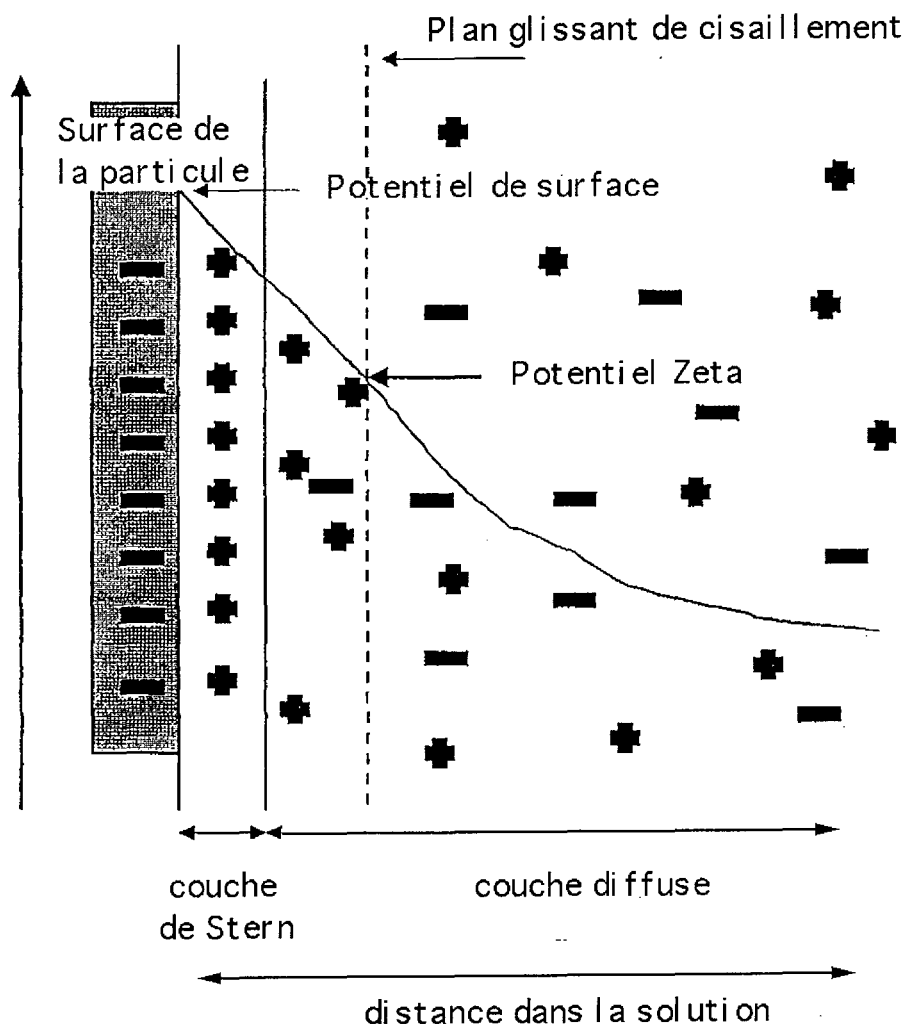


Figure 25 : Représentation schématique de la couche de Stern et de la couche diffuse à la surface d'une particule.

6.2 DETERMINATION DU POTENTIEL ZETA PAR ELECTROPHORESE LASER DOPPLER

6.2.1 Notion de potentiel Zêta

La présence d'une charge à la surface d'une particule en suspension dans un liquide affecte la distribution ionique dans la région interfaciale entre la particule et le liquide. Il en résulte une augmentation de la concentration en contre-ions près de la surface qui peut être modélisée sous la forme d'une double couche électrostatique, comme le schématise la figure 25.

La première couche, appelée couche de Stern, correspond à la région la plus proche de la surface et comporte des ions solidement liés.

La seconde couche, externe, est plus diffuse et présente une distribution ionique déterminée par les forces électriques, mais aussi par les mouvements browniens. Le plan externe glissant de la particule est situé à la surface extérieure de cette seconde couche.

Lorsque la particule se déplace dans le milieu sous l'influence d'un flux provoqué ou du mouvement brownien, la structure de ces couches est considérée comme restant stable. C'est au niveau du plan glissant que les particules interagissent réellement entre elles et c'est à ce niveau qu'est mesuré le potentiel Zêta.

6.2.2 Principe

L'électrophorèse est le phénomène exploité pour mesurer le potentiel Zêta de particules, c'est-à-dire le mouvement de particules chargées en suspension dans un liquide et sous l'influence d'un champ électrique [MULLER, 1991].

Quand un champ électrique est appliqué à travers un électrolyte, les particules en suspension dans cet électrolyte qui possèdent une charge électrique sont attirées vers l'électrode de charge opposée. La force de frottement subie par les particules tend à s'opposer à ce mouvement. Quand l'équilibre entre ces deux forces opposées est atteint, les particules se déplacent à vitesse constante. La vitesse dépend de la force du champ électrique, de la constante diélectrique, de la viscosité du milieu et du potentiel Zêta.

Le potentiel Zêta (Z) est déduit de la mobilité électrophorétique (U_E) selon la loi de Henry :

$$U_E = \frac{V}{E} = \frac{\epsilon \times Z \times f(Ka)}{6\pi\eta}$$

où V est la vitesse des particules, E est le champ électrique, ϵ est la constante diélectrique du milieu, η est la viscosité du milieu et $f(Ka)$ est le facteur dépendant du rapport entre l'épaisseur de la bicouche ionique et le diamètre de la particule.

L'approximation de Smoluchowsky, considérant que la particule est beaucoup plus grosse que la bicouche ionique, conduit à la valeur de 1,5 pour $f(Ka)$. Ainsi en milieu aqueux à 25°C et à faible concentration en électrolyte, l'expression du potentiel Zêta se simplifie selon la relation suivante :

$$Z \text{ (mV)} = 12,85 U_E \text{ (mV)}$$

Une tension est en fait appliquée à l'électrolyte contenu dans une cellule de mesure grâce à deux électrodes, provoquant la migration des particules. La vitesse des particules est évaluée par mesure de fluctuation temporelle de l'intensité diffusée par la particule en mouvement dans le réseau d'interférences.

6.2.3 Appareillage et conditions opératoires

Les mesures de potentiel Zêta des nanosphères sont effectuées à l'aide du Zetamaster (Malvern, Orsay, France).

Après dilution des suspensions de nanosphères dans une solution de NaCl 10^3 M, un volume de 2 ml est injecté dans le capillaire de mesure. Au préalable, le potentiel Zêta d'un échantillon standard ($- 55 \pm 2$ mV, Malvern Instruments Ltd, Royaume Uni) est contrôlé.

6.3 DETERMINATION DE LA STRUCTURE DES NANOSPHERES PAR CALORIMETRIE DIFFERENTIELLE A BALAYAGE

Les informations sur la structure des nanosphères, et en particulier sur le mode de dispersion du principe actif incorporé, sont accessibles par diffraction de rayons X et par analyse thermique telle que la calorimétrie différentielle à balayage (DSC). En général, les molécules de principe actif sont

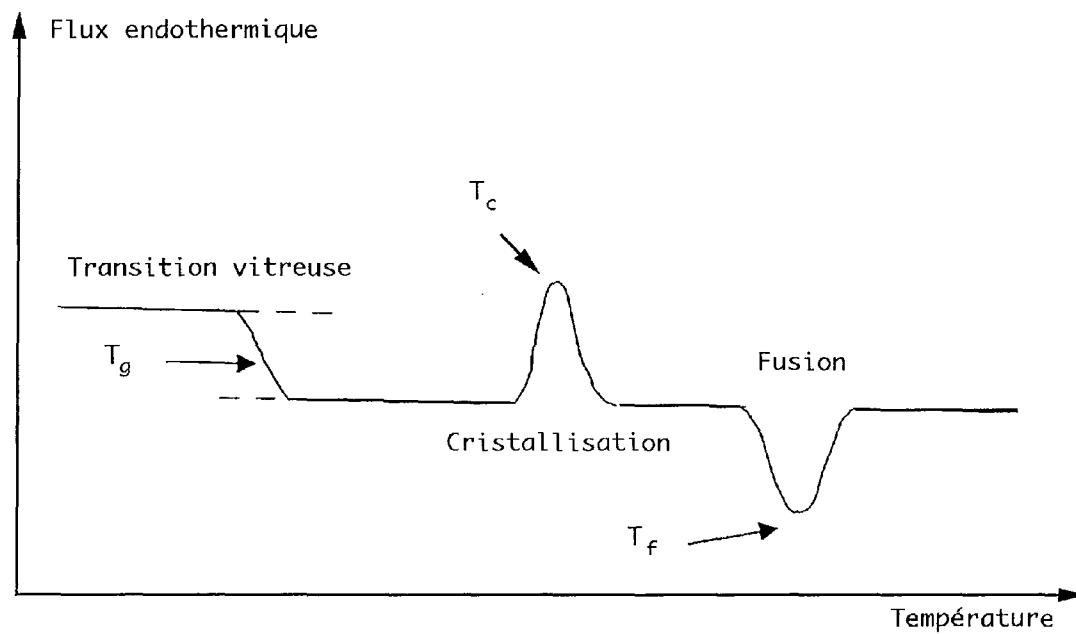


Figure 26 : Représentation schématique des trois transitions qui caractérisent un matériau lors de son analyse thermique par DSC.

T_g : température de transition vitreuse ;

T_c : température de cristallisation ;

T_f : température de fusion

incorporées dans le réseau polymère et forment une dispersion moléculaire avec le polymère qui conserve une structure amorphe. Parfois, des cristallites de médicament peuvent subsister dans la matrice polymère et la DSC permet de les mettre en évidence. C'est cette dernière technique que nous avons retenue ici.

6.3.1 Principe de la méthode

La calorimétrie différentielle à balayage (DSC, Differential Scanning Calorimetry) est une méthode d'analyse thermique qui permet de suivre les changements enthalpiques d'un matériau en fonction de la température appliquée au cours d'un chauffage, d'un refroidissement ou du temps.

Les principaux phénomènes physiques qui peuvent être mis en évidence au sein du matériau sont (Figure 26) :

- la fusion (phénomène endothermique),
- la cristallisation (phénomène exothermique),
- la transition vitreuse (phénomène endothermique).

Pour les polymères amorphes, le passage de l'état vitreux à l'état caoutchoutique est appelé transition vitreuse. Pour la déterminer, nous avons considéré la température au point d'inflexion nommé T_g .

6.3.2 Appareillage et mode opératoire

Deux microfours identiques sont fixés dans une même enceinte. A chaque instant, au cours d'un chauffage ou d'un refroidissement, la température est maintenue à une valeur identique dans les deux fours par un contrôle indépendant à l'aide d'un thermocouple et d'éléments de chauffage.

L'échantillon à analyser est placé dans un creuset d'aluminium dans un des 2 fours, le second contenant le creuset vide. Il est alors possible de mesurer l'énergie absorbée ou dégagée dans l'échantillon lorsqu'une transition a lieu au sein du matériau. Pour maintenir la température de l'échantillon équivalente à celle de la référence, le générateur lui fournit plus ou moins de puissance selon la nature endothermique ou exothermique du phénomène physique. Cette différence de puissance est enregistrée en fonction de la température ou du temps de l'expérience.

Les analyses ont été réalisées au Laboratoire de Pharmacie Galénique, Pr. JP BENOIT, Faculté de Pharmacie de Angers, au moyen d'un calorimètre METTLER 30 (METTLER TOLEDO, Viroflay, France), avec une vitesse de chauffage/refroidissement de 10°C/min. Les analyses sont effectuées sur une masse de 10 à 20 mg de produit. Pour les suspensions de nanosphères, l'analyse s'effectue après lyophilisation.

7. METHODES DE DOSAGE DE L'ISRADIPINE

7.1 METHODE DE DOSAGE DE L'ISRADIPINE EN SOLUTION PAR SPECTROPHOTOMETRIE UV/VISIBLE

Le mélange eau-alcool (70:30) v/v constitue le milieu de dosage dans lequel l'isradipine est tout à fait soluble.

Un spectre UV est réalisé entre 200 et 700 nm afin de déterminer le maximum d'absorption de l'isradipine (spectrophotomètre UV/visible, Lambda 1A, Perkin Elmer, Paris, France).

Des solutions étalons préparées à différentes concentrations en isradipine (de 0 à 200 ng/ml) dans le mélange eau-éthanol (30/70) ont permis de construire une gamme d'étalonnage.

7.2 DOSAGE DE L'ISRADIPINE INCORPOREE DANS LES NANOSPHERES

Le pourcentage d'isradipine incorporée dans les nanosphères est déterminé par la méthode de filtration sur gel [BECK et coll., 1990].

7.2.1 Principe

Le principe de la méthode repose sur le fait que les particules de taille importante ne pénètrent pas à l'intérieur de la phase stationnaire et se déplacent rapidement tandis que les particules de plus petites tailles pénètrent facilement à l'intérieur de la phase stationnaire et se déplacent lentement. La vitesse d'élution dépend essentiellement de la taille et de la forme des particules.

7.2.2 Matériel

Une colonne avec adaptateur de flux (Econo-Column, Bio-Rad, Californie, USA, 40 cm x 2,5 cm i.d.) est remplie d'une phase stationnaire constituée d'un gel Sepharose CL4B (Sigma, St. Quentin Fallavier, France). Une pompe

péristaltique (Ismatec Reglo 100, Suisse) à débit variable réglée sur 1 ml/min permet d'entraîner l'éluant.

L'éluat est fractionné au fur et à mesure de l'élution dans des tubes d'une contenance de 5 ml.

L'isradipine en solution dans l'éluat est dosée par spectrophotométrie UV à une longueur d'onde de 326 nm.

7.2.3 Mode opératoire

La première étape consiste à faire éluer 1 ml de suspension de nanosphères blanches en utilisant comme éluant l'eau distillée puis à mesurer le temps d'élution des nanosphères blanches (t), défini comme le temps nécessaire pour voir apparaître la dernière goutte d'éluant chargé en nanosphères.

La deuxième étape consiste à faire éluer 1 ml d'une solution d'isradipine de concentration connue (50 ng/ml) par un premier éluant (eau distillée) puis un second éluant à l'instant t, identifié lors de l'étape précédente et correspondant à la fin de l'élution des nanosphères. Le second éluant est constitué d'un mélange eau 80% - éthanol 20% dans lequel l'isradipine est soluble, et qui accélère son élution. A partir de ce moment l'apparition d'isradipine est suivie en dosant par spectrophotométrie UV les fractions d'éluat successives. Le temps d'élution de l'isradipine est mesuré et l'isradipine contenue dans les fractions d'éluat correspondantes est dosée par spectrophotométrie UV à 326 nm.

La dernière étape consiste à faire éluer 1 ml de nanosphères chargées en isradipine en utilisant tout d'abord l'eau comme éluant. Dès que les nanosphères sont éluées, l'eau est remplacée par le mélange eau - éthanol, ce qui permet l'élution de la fraction d'isradipine non incorporée dans les nanosphères (isradipine « libre »).

7.2.4 Expression des résultats

L'efficacité d'encapsulation se caractérise en général par deux paramètres, le pourcentage d'incorporation et la charge en principe actif.

7.2.4.1 Pourcentage d'incorporation

Le pourcentage ou rendement d'incorporation est défini par la masse de principe actif incorporée par rapport à celle introduite lors de la préparation des nanosphères.

Le pourcentage d'incorporation (R) est calculé selon la formule suivante :

$$R (\%) = 100 (Q_0 - Q_1) / Q_0$$

avec Q_0 : masse d'isradipine introduite lors de la préparation des nanosphères, Q_1 : masse d'isradipine libre dosée dans l'éluat, $(Q_0 - Q_1)$: masse d'isradipine incorporée dans les nanosphères

7.2.4.2 Charge en principe actif

La charge en principe actif est déterminée par la masse de principe actif incorporée dans les nanosphères par unité de masse de polymère.

La charge en isradipine (C) des nanosphères est déterminée de la façon suivante :

$$C = (Q_0 - Q_1) / m_p$$

avec Q_0 : masse d'isradipine introduite lors de la préparation, Q_1 : masse d'isradipine libre dosée dans l'éluat, $(Q_0 - Q_1)$: masse d'isradipine incorporée dans les nanosphères, m_p : masse de polymère utilisé pour la préparation des nanosphères

7.2.5 Analyses statistiques

Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ écart-type.

Les différences de pourcentage d'incorporation et de charge en isradipine mesurées entre les différents types de nanosphères sont déterminées à l'aide du test non paramétrique de Kruskal Wallis, au risque $p < 0,05$.

7.3 DOSAGE DE L'ISRADIPINE DANS LES MILIEUX BIOLOGIQUES (PLASMA, LYMPHE)

L'isradipine est dosée dans le plasma ou dans la lymphe, par chromatographie liquide haute performance (CLHP) en phase inverse, selon une méthode modifiée à partir de celle décrite par BOUTAGY et coll. [1989] et développée dans la thèse de Martine Le Verger [1997].

7.3.1 Matériel CLHP

La chaîne CLHP (Thermo Separation Products, Les Ullis, France) avec laquelle ont été réalisées les analyses, comprend les équipements suivants:

- pompe à gradients (P1000XR Spectra System)
- passeur automatique d'échantillons (AS1000 Spectra Physics)
- détecteur spectrophotomètre UV
- four
- intégrateur enregistreur SP4270
- programme "Winner on Windows" pour PC assurant le traitement informatique des analyses.

7.3.2 Conditions chromatographiques

Colonne: silice greffée C18, Novapak 15F 4 μm , 4,6x150 mm (Interchim, Montluçon, France)

Précolonne: cartouche remplie de la même phase que la colonne

Phase mobile: { 49 % tampon dibutylamine phosphate 0,01 M
{ (Millipore Waters, St Quentin/Yvelines, France)
{ 51 % méthanol de grade CLHP

La phase mobile est ajustée à pH = 1,3 par de l'acide orthophosphorique concentré (Prolabo, Fontenay sous Bois, France).

La phase mobile est dégazée par filtration sur un filtre de 0,45 μm (Millipore, St Quentin en Yvelines, France) puis, en continu, lors des analyses, par un flux d'hélium afin de stabiliser la ligne de base.

Débit: 1 ml/min

La pression affichée sur la pompe est de 160 bars.

Température de la colonne: 48 °C

Détection UV: 336 nm

A.U.F.S.: 0,001

Boucle d'injection: 100 μ l

Standard interne: butamben (butyl 1,4 p-aminobenzène)

(Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France).

Quantification: Mesure des rapports de surface des pics obtenus pour chaque chromatogramme.

La gamme d'étalonnage est obtenue extemporanément par dissolution d'isradipine dans les milieux biologiques (lymphe ou plasma). Les échantillons de la gamme sont traités avant dosage comme les échantillons biologiques.

7.3.3 Traitement des échantillons biologiques avant dosage

Les échantillons de lymphe ou de sang sont collectés sur tubes secs héparinés (tubes héparine-lithium, Express service, Viry-Châtillon, France), protégés de la lumière par un film d'aluminium. Le plasma est séparé après centrifugation. Les échantillons lymphatiques ou plasmatiques sont conservés à -20 °C en attendant d'être utilisés ultérieurement pour le dosage de l'isradipine.

L'extraction de l'isradipine à partir des échantillons biologiques est réalisée selon le protocole suivant :

- Un volume de 100 μ l d'une solution de NaOH 2 M et 5 ml d'une phase organique comprenant 55 % de n-hexane et 45 % de dichlorométhane sont ajoutés à 0,4 ml d'échantillon de lymphe ou de plasma décongelé.
- Le mélange obtenu est ensuite agité pendant 20 min au moyen d'un agitateur rotatif (Rotatorque, Interchim, Montluçon, France) puis centrifugé pendant 5 min à 2000 g.
- Le surnageant est récupéré dans un flacon ambré (Reacti-vials, Interchim, Montluçon, France) puis évaporé sous atmosphère d'azote à 40 °C pendant 15 min (Reacti-Therm II Heating module, Interchim, Montluçon, France).
- L'extrait sec est repris par 150 μ l de phase mobile contenant le standard interne (4 μ g/ml) et l'ensemble est agité pendant 30 secondes à 2 reprises à 5 min d'intervalle.
- Une aliquote de 100 μ l est prélevée et injectée au niveau de la colonne.

7.3.4 Validation de la méthode de dosage

La méthode de dosage chromatographique de l'isradipine a été validée selon les recommandations d'un rapport de la commission SFSTP [1997]. Plusieurs critères de validation ont été étudiés : la spécificité/sélectivité de la méthode de dosage, la linéarité de la courbe de calibration, le seuil de détection et le seuil de quantification et la stabilité.

La validation de la méthode de dosage dans le plasma a été réalisée antérieurement dans notre laboratoire (Thèse d'Université de M. Le Verger, 1997) et les résultats de cette étude sont reportés en Annexe. Nous nous sommes attachés ici, plus spécifiquement, à la validation de la méthode dans la lymphe.

La préparation des échantillons de la gamme de calibration obéit au protocole expérimental suivant :

- Une solution mère d'isradipine (100 ng/ml) est préparée dans la lymphe (ou le plasma), prélevée chez des rats n'ayant reçu aucun traitement.
- A partir de la solution mère, différentes solutions sont préparées permettant de réaliser 6 points de la gamme.
- Chaque point de la gamme sera traité à trois reprises afin d'obtenir une estimation du seuil de quantification.
- Etant donné la « rareté » du milieu biologique à analyser, une seule solution mère a été constituée à partir de laquelle trois séries de solutions filles ont été préparées de façon indépendante (phases mobiles différentes).
- Chaque point de la gamme subit une extraction avant dosage.

L'influence de la congélation et de la décongélation des échantillons lymphatiques (ou plasmatiques) est aussi étudiée. Trois échantillons contenant 2 ml de lymphe (ou de plasma) et 100 μ l d'une solution d'isradipine dans le méthanol à 2 μ g/ml sont conservés pendant 3 mois au congélateur à -20°C. Un premier dosage CLHP est réalisé à J0, puis 1 et 3 mois après J0. Les chromatogrammes sont comparés ensuite entre eux.

8. ETUDE DE LA LIBERATION *IN VITRO* DE L'ISRADIPINE INCORPOREE DANS LES NANOSPHERES

8.1 CONDITIONS DE L'ETUDE DE LIBERATION

La technique retenue pour étudier la libération *in vitro* de l'isradipine incorporée dans les nanosphères en fonction du temps est la technique du sac de dialyse [AMMOURY et coll., 1989].

Lors des études de libération *in vitro*, les conditions « sink » de mise en libération doivent être respectées. Cette concentration « sink » correspond au dixième voire au cinquième de la limite de solubilité du principe actif dans le milieu de libération considéré, si la totalité du principe actif incorporé dans les nanosphères était libéré. Lorsque cette limite est dépassée, la cinétique de libération est alors ralentie et ne reflète pas directement le comportement de la forme pharmaceutique.

La solubilité de l'isradipine dans l'eau (C_s) étant inférieure à 10 $\mu\text{g/ml}$, les conditions "sink" imposent pour le milieu de libération une concentration en isradipine inférieure à $C_s/5$, soit 2 $\mu\text{g/ml}$.

Trois milieux de libération sont étudiés (Annexe 1) :

1. une solution tampon phosphate à pH 6,8
2. une solution acide à pH 1,3

Ces deux milieux, préconisés par la Pharmacopée française (édition de janvier 1990) pour l'étude des formes à libération modifiée, simulent respectivement le milieu intestinal et le milieu gastrique.

3. une solution d'albumine à 1,5 % ; l'isradipine très lipophile présente une grande affinité pour cette protéine , aussi la vitesse de libération *in vitro* est-elle augmentée.

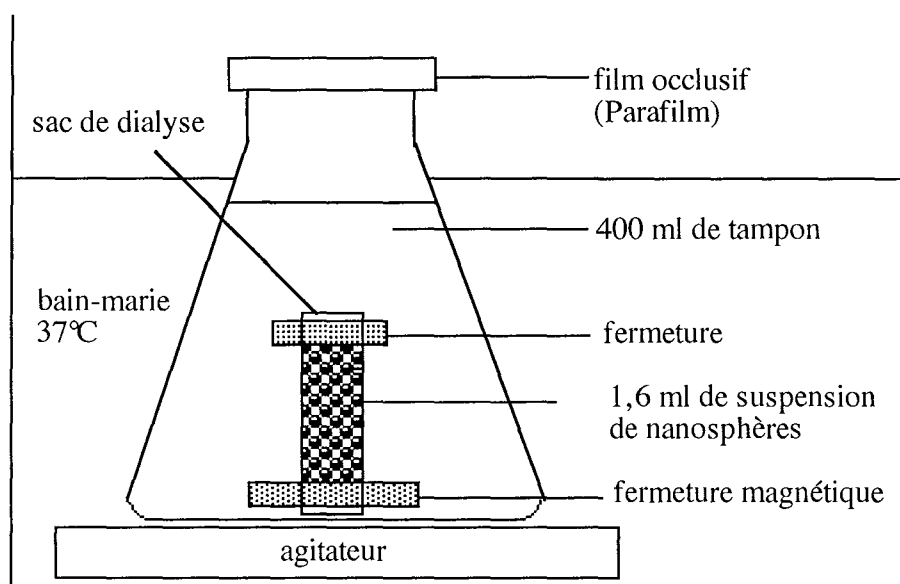


Figure 27: Schéma de l'appareillage utilisé pour les études de libération in vitro par la méthode de dialyse.

8.2 MODE OPERATOIRE

Les suspensions de nanosphères chargées en isradipine sont introduites dans un sac de dialyse formé d'un film de cellulose (seuil de rétention 50000 Da, Spectra/Por 6, Bioblock Scientific, Illkirch, France), dont les extrémités sont obturées par deux pinces (OSI, Elancourt, France), dont l'une est aimantée et permet la rotation du sac (Figure 27).

Le sac de dialyse contenant l'échantillon est immergé dans le milieu de libération placé dans un bécher, lui-même placé dans un bain-marie à 37°C sous agitation modérée à 200 rpm (agitateur immergeable Variomag telemodule 20P, Bioblock Scientific, Illkirch, France).

Pour respecter les conditions sink, le sac de dialyse renferme 1,6 ml de suspension de nanosphères et le milieu extérieur a un volume de 400 ml.

Des prélèvements d'un volume de 1 ml de milieu sont réalisés aux temps 0, 0,25, 0,5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12 et 24 heures après immersion du sac de dialyse dans le milieu de libération. L'isradipine est dosée par spectrophotométrie UV à 326 nm. A chaque mesure, le volume prélevé est réintroduit dans le milieu de libération.

8.3 EXPRESSION DES RESULTATS ET ANALYSES STATISTIQUES

La libération *in vitro* de l'isradipine à partir des diverses formes est étudiée en construisant la courbe de l'évolution chronologique des quantités d'isradipine libérée et dosée dans le milieu de libération.

Les quantités libérées moyennes sont comparées à chaque temps étudié à l'aide d'une analyse de variance (test ANOVA) couplée au test de Fisher, avec un risque égal à $p < 0,05$.

9. METHODES CONCERNANT LES ETUDES *IN VIVO*

9.1 EXPERIMENTATION ANIMALE ET ETHIQUE

En France, l'expérimentation animale est régie par la loi depuis 1986 [BRUGERE et coll., 1992].

Les principales règles sont les suivantes :

- les interventions doivent minimiser l'inconfort, la détresse et la douleur des animaux,
- les interventions qui provoquent une douleur momentanée ou légère seront réalisées sous anesthésie, à moins qu'il ne soit prouvé scientifiquement l'incompatibilité de celle-ci avec le but de la recherche,
- les personnes dirigeant les interventions doivent être de qualification appropriée et entraînée,
- les méthodes d'euthanasie doivent correspondre à celles recommandées par les textes en vigueur,
- le nombre d'animaux soumis à l'étude doit être le minimum requis pour valider les résultats,
- si un animal est gardé en vie à la fin de l'étude, il doit recevoir dès la fin de l'intervention les soins nécessaires à l'atténuation de sa souffrance.

9.2 METHODE D'ETUDE DE L'EVOLUTION CHRONOLOGIQUE DE LA PRESSION ARTERIELLE APRES ADMINISTRATION ORALE DES NANOSPHERES D'ISRADIPINE CHEZ LE RAT

9.2.1 Modèle animal

Le modèle animal choisi est le rat mâle spontanément hypertendu (SHR) (IFFA CREDO, L'Arbresle, France), âgé de 3 mois.

9.2.2 Principe de la méthode

La pression artérielle systolique est mesurée chez le rat éveillé de façon non sanglante par pléthysmographie de l'artère caudale.

Les rats sont immobilisés dans une boîte de contention. Ils sont placés dans une couveuse d'observation (Narco Air Shields, modèle S-901, Shannon, Irlande) à 38,5°C durant 10 minutes afin de dilater l'artère caudale. La boîte contenant le rat est ensuite placée sur un support et la queue de l'animal est introduite dans un manchon gonflable muni d'un microphone relié à un système d'enregistrement galvanométrique (Physiograph Desk model DMP-4A, Narco Biosystems, Houston, Texas, USA). Le manchon est gonflé progressivement à l'aide d'un manomètre à mercure de façon à appliquer sur l'artère caudale une pression légèrement supérieure à la pression systolique du rat. On relâche ensuite doucement la pression exercée sur la queue et au moment précis où la pression intraluminale de l'artère caudale est supérieure à la pression extraluminale imposée par le manchon, le microphone détecte le bruit correspondant à l'ondée systolique. Un système d'enregistrement sur papier permet de suivre l'évolution en fonction du temps de l'onde de pression ou des rythmes cardiaques selon la vitesse de déroulement du papier.

9.2.3 Protocole expérimental

Les rats sont mis à jeun la veille du jour de l'étude (15 heures avant le début) et durant les 10 premières heures de l'étude. Seule l'eau osmosée est mise à disposition *ad libitum*.

Pour chaque expérience, une randomisation stratifiée permet de répartir les rats SHR en groupes non significativement différents du point de vue de leur pression artérielle systolique, ainsi que de leur poids.

Le jour de l'étude, les rats sont pesés et leur pression artérielle est mesurée. Puis ils sont randomisés en fonction des différents groupes étudiés.

Les différentes formes médicamenteuses sont administrées par voie orale à l'aide d'une seringue munie d'une canule de gavage (le volume administré est de 5 ml/kg). Cette opération détermine le temps $t=0$.

La pression artérielle est mesurée ensuite aux temps $t = 15 \text{ min}$, 30 min , 1 h , 2 h , 4 h , 6 h , 8 h , 10 h et 24 heures .

Les rats sont ré-alimentés après la mesure de pression de $t=10 \text{ h}$.

Les formes médicamenteuses étudiées sont préparées extemporanément le jour même, préalablement à la pesée et à la première mesure de pression. Un contrôle de la taille et du potentiel Zêta des nanosphères est également effectué.

N.B. : Comme l'état d'excitation des rats peut influencer les valeurs de pression artérielle, nous habituons les rats à la prise de pression chaque jour de la semaine précédant le jour de l'étude.

9.2.4 Formes et doses d'isradipine testées

L'évolution chronologique de la pression artérielle chez le rat est étudiée à deux doses différentes : à 1 mg/kg (dose usuelle chez le rat) [BUNAG 1973], et à 2,5 mg/kg, dose supposée entraînée des valeurs de concentrations plasmatiques et lymphatiques plus facilement quantifiables par la technique CLHP développée.

9.2.4.1 Etude à la dose de 1 mg/kg

La pression artérielle est déterminée après administration par voie orale de 2 ml/kg des formes suivantes :

- eau osmosée
- solution d'isradipine dans le PEG, concentrée à 0,5 mg/ml
- suspensions de nanosphères blanches de PCL, de PLAGA, d'Eudragit
- suspension de nanosphères de PCL, de PLAGA, d'Eudragit chargées en isradipine à une concentration de 0,5 mg/ml.

Des groupes de 6 rats sont constitués pour étudier les différentes formes.

9.2.4.2 Etude à la dose de 2,5 mg/kg

La pression artérielle est déterminée après administration par voie orale de 5 ml/kg des formes suivantes :

- eau osmosée
- solution d'isradipine dans le PEG, concentrée à 0,5 mg/ml
- suspensions de nanosphères de PCL, de PLAGA, d'Eudragit chargées en isradipine à une concentration de 0,5 mg/ml.

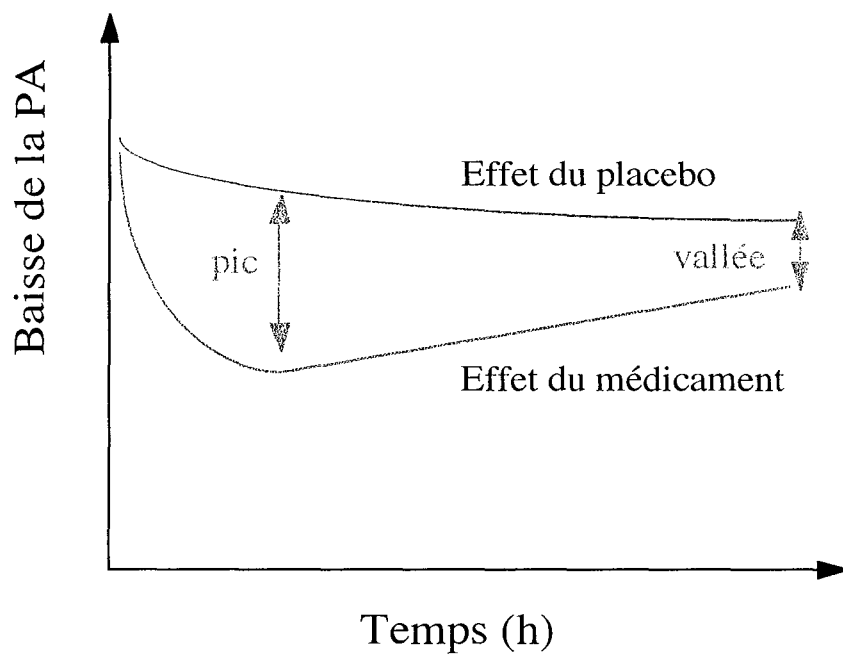


Figure 28 : Représentation du pic et de la vallée.

Le rapport vallée/pic est égal au rapport entre l'effet résiduel du médicament (observé en fin d'intervalle posologique) (vallée) et son effet maximal (pic), en tenant compte de l'effet placebo.

Des groupes de 8 rats sont constitués pour étudier les différentes formes.

9.2.5 Calcul des rapports « vallée sur pic »

Le rapport vallée sur pic (« trough : peak ratio » pour les anglo-saxons) a été proposé afin d'évaluer simultanément la durée et l'intensité de l'action antihypertensive des formes médicamenteuses [FDA, 1988].

Cet indice est calculé en effectuant le rapport entre l'effet antihypertenseur minimal qui est observé à la fin de l'intervalle de prise (vallée) et l'effet antihypertenseur maximal qui suit l'administration (pic). Les valeurs sont corrigées en tenant compte des effets liés à l'administration du placebo (Figure 28).

Une forme antihypertensive est considérée comme utile si ce rapport est supérieur à 0,5 (effet minimal supérieur à la moitié de l'effet maximal), voire supérieur à 0,66 (effet minimal supérieur au deux tiers de l'effet maximal), quand l'effet minimal est peu significatif.

Nous avons calculé le rapport V/P pour la pression artérielle systolique, le pic et la vallée étant calculés respectivement pour les différences de pression mesurées à $t=15$ min et à $t=12$ h après administration de l'eau et de chaque type de nanosphères aux rats SHR.

9.2.6 Analyses statistiques

Les valeurs sont exprimées en moyenne $\pm$ écart-type.

Les moyennes des pressions artérielles pour chaque groupe de rats sont comparées à chaque temps étudié à l'aide d'une analyse de variance (test ANOVA) couplée au test de Fisher, avec un risque égal à $p<0,05$.

Les rapports vallée/pic sont comparés entre les différentes formes d'isradipine à l'aide du test de Kruskal Wallis au risque $p<0,05$.

9.3 METHODE D'ETUDE DE L'EVOLUTION CHRONOLOGIQUE DES CONCENTRATIONS PLASMATIQUES D'ISRADIPINE APRES ADMINISTRATION PAR VOIE INTRAVEINEUSE DES NANOSPHERES CHEZ LE RAT

9.3.1 Modèles expérimentaux

9.3.1.1 Préparation des animaux

L'étude est réalisée sur des rats SHR âgés de 14 semaines et pesant 320 ± 30 g (IFFA CREDO, L'Ile d'Abresle, France).

La veille de l'étude, les rats sont cathétérisés à la fois au niveau veineux pour le site d'administration IV et au niveau artériel pour le site de prélèvement sanguin. Ces deux opérations sont réalisées par Dr Isabelle LARTAUD-IDJOUADIENE, JE2166 Physiopathologie du vieillissement, Laboratoire de Pharmacologie, Faculté de Pharmacie, Nancy.

Les rats sont anesthésiés par inhalation du mélange oxygène-halothane 1,5% (BELAMNONT, Paris, France).

9.3.1.2 Canulation veineuse

Les rats sont cathétérisés au niveau de la veine cave inférieure *via* la veine fémorale.

9.3.1.3 Canulation artérielle

Les rats sont cathétérisés au niveau de l'aorte *via* l'artère fémorale selon la technique décrite par WEEKS [1960].

La face interne de la cuisse est incisée sur 2 à 3 cm. L'artère fémorale est séparée des tissus environnants et de la veine fémorale sur une longueur de 1 cm de façon à y introduire l'extrémité d'un premier cathéter en polyéthylène de 5 cm de long (DE 0,61 mm, DI 0,28 mm, BIOTROL, Paris, France) qui a été raccordé à un second cathéter en polypropylène de 20 cm de long (DE 0,96 mm, DI 0,58 mm, LSSA, Fontenay/Bois, France). Les cathéters ont été préalablement remplis d'une solution de chlorure de sodium 0,9% (FANDRES, Ludres, France) hépariné (50 UI/ml) (héparine sodique 25000 UI/ml, LEO, St Quentin en Yvelines, France). L'extrémité libre du cathéter est passée au travers de la fosse iliaque puis sous la peau du dos de l'animal jusqu'au niveau des vertèbres cervicales où une sortie est ménagée.

A titre prophylactique, une injection intramusculaire de benzylpénicillinate de sodium est effectuée, à raison de 120000 UI/kg (pénicilline G DIAMANT, Paris, France). En dernier lieu, les rats sont placés dans des cages individuelles et mis à jeun jusqu'au lendemain.

9.3.2 Protocole expérimental

Quatre groupes de 9 rats cathétérisés la veille au niveau veineux et au niveau artériel sont randomisés selon les 4 traitements étudiés.

Dans chacun des groupes, les rats reçoivent par voie IV à l'aide du cathéter veineux, une forme pharmaceutique d'isradipine donnée.

Les différentes formes d'isradipine sont préparées extemporanément le jour même de l'étude et sont dosées chacune à 0,5 mg/ml d'isradipine. Un volume de 100 μ l/100 g de solution ou de suspension de nanosphères est injecté en IV, ce qui correspond à une dose de 0,5 mg/kg d'isradipine.

Les prélèvements, d'un volume de 1 ml de sang, sont réalisés aux temps suivants : $t = 2$ min, 10 min, 1 h, 4 h et 12 h pour 5 des 9 rats du groupe et aux temps $t = 5$ min, 30 min, 2 h et 8 h pour les 4 autres. Un prélèvement à $t = 24$ h est effectué chez tous les rats.

Les prélèvements sanguins sont recueillis dans des tubes héparinés, le plasma est séparé par centrifugation et les échantillons plasmatiques sont congelés jusqu'au moment du dosage de l'isradipine par CLHP selon la méthode décrite au paragraphe 7.3.

9.3.3 Variables étudiées

Une valeur de concentration plasmatique d'isradipine (ng/ml) est associée à chaque temps étudié. La courbe de l'évolution chronologique des concentrations plasmatiques est construite à partir des valeurs moyennes obtenues dans chaque groupe pour un temps donné.

9.3.4 Analyses statistiques

Les concentrations plasmatiques moyennes sont comparées à chaque temps étudié à l'aide d'une analyse de variance (test ANOVA) couplée au test de Fisher, avec un risque égal à $p < 0,05$.

9.4 METHODE D'ETUDE DE L'EVOLUTION CHRONOLOGIQUE DES CONCENTRATIONS PLASMATIQUES D'ISRADIPINE APRES ADMINISTRATION ORALE DES NANOSPHERES D'ISRADIPINE CHEZ LE RAT A LA DOSE DE 2,5 mg/kg

Ce paragraphe correspond à un travail réalisé dans notre laboratoire et développé conjointement dans la thèse d'Université de Martine LE VERGER [1997]. Les différentes formes étudiées (nanosphères de PCL, de PLAGA, solution dans le PEG) étaient comparables du point de vue formulation, origine des matières premières et caractéristiques physico-chimiques, à celles qui font l'objet de cette thèse aujourd'hui. Les nanosphères d'Eudragit n'avaient pas été étudiées par cet auteur. Dans la mesure où les résultats de cette étude antérieure seront repris pour calculer la biodisponibilité absolue de l'isradipine à partir de l'étude précédente des concentrations plasmatiques après administration intraveineuse de l'isradipine, il nous semble justifier de décrire la méthodologie qui a été employée par M. Le Verger, pour l'étude de la cinétique plasmatique de l'isradipine après administration orale des nanosphères à des rats.

9.4.1 Modèle animal

L'étude est réalisée sur des rats mâles spontanément hypertendus (SHR) âgés de trois mois.

La veille de l'étude, les rats sont cathétérisés au niveau de l'artère carotide gauche (cathéter de diamètre externe 0,96 mm et de diamètre interne 0,58 mm, LSSA, Fontenay/Bois, France) selon la méthode de HUBERT et coll. [1991].

Le rat est anesthésié par inhalation du mélange oxygène / halothane 1,5% (Belamont, Paris, France). Le sternum est ouvert et la carotide gauche est dégagée. Deux clamps sont alors placés sur la carotide, l'un du côté céphalique, l'autre du côté cardiaque. Une extrémité du cathéter, préalablement rempli d'une solution de NaCl à 0,9 % héparinée (50 UI/ml) (Héparine sodique, Léo, St Quentin/Yvelines, France), est introduite dans la carotide, puis fixée par une suture ; l'autre extrémité est introduite à travers la fosse iliaque puis sous la peau du rat, pour ressortir au niveau de la nuque de l'animal. Les deux plans, musculaire et cutané, sont fermés par une ligature chirurgicale. Après vérification de l'écoulement du sang par le cathéter, celui-ci est rempli d'une solution anticoagulante de viscosité élevée comprenant poly(vinylpyrrolidone) (0,5 mg/ml), héparine (200 UI/ml), NaCl 0,9 % et bleu de méthylène. Cette solution permet de bloquer la montée du sang et la coagulation à l'intérieur du cathéter. L'extrémité libre du cathéter est obturée à la flamme jusqu'au lendemain. Les rats reçoivent en prophylaxie une injection

intramusculaire de benzylpénicillinate de sodium à raison de 120 000 UI/kg (pénicilline G Diamant, Paris, France). Ils sont laissés au repos dans des cages individuelles et à jeun jusqu'au lendemain.

9.4.2 Protocole expérimental

Trois groupes de 6 rats sont constitués pour les 3 formes d'isradipine étudiées (solution de référence et nanosphères de PCL ou PLAGA). Celles-ci renferment 0,2 mg/ml d'isradipine.

Les différentes formes d'isradipine sont administrées *per os* à la dose de 2,5 mg/kg d'isradipine, correspondant à un volume de 5 ml/kg.

Les prélèvements ont lieu à $t = 0$, 10 min, 30 min, 2 h et 8 h pour 3 rats d'un groupe et à $t = 5$ min, 15 min, 1 h, 4 h et 24 h pour les 3 autres rats du même groupe.

Les prélèvements sanguins se font sur tubes secs héparinés (tubes héparine - lithium, Express Service, Viry-Châtillon, France) à l'abri de la lumière. Le plasma est immédiatement séparé par centrifugation puis congelé jusqu'au moment du dosage par CLHP de l'isradipine contenue dans l'échantillon selon la méthode décrite précédemment.

9.4.3 Variables étudiées

Une valeur de concentration plasmatique d'isradipine (ng/ml) est associée à chaque temps étudié. La courbe de l'évolution chronologique des concentrations plasmatiques est construite à partir des valeurs moyennes obtenues dans chaque groupe pour un temps donné.

9.4.4 Analyses statistiques

Les concentrations plasmatiques moyennes d'isradipine dans les différents groupes de rats sont comparées à chaque temps étudié, à l'aide d'une analyse de variance (test ANOVA) couplée au test de Fisher, avec un risque égal à $p < 0,05$.

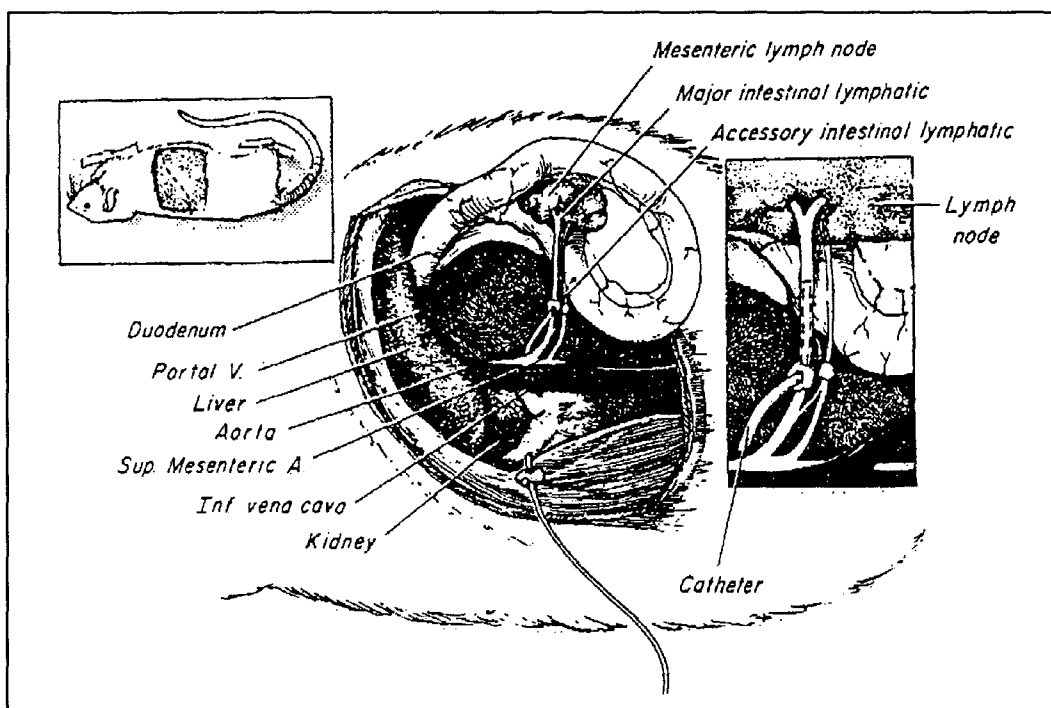


Figure 29 : Canulation du canal lymphatique mésentérique chez le rat, selon la méthode de WARSHAW et coll. [1972].

9.5 METHODE D'ETUDE DE L'EVOLUTION CHRONOLOGIQUE DES CONCENTRATIONS LYMPHATIQUES D'ISRADIPINE APRES ADMINISTRATION INTRAGASTRIQUE DES NANOSPHERES CHEZ LE RAT

9.5.1 Modèles expérimentaux

9.5.1.1 Préparation des animaux

Les animaux sont des rats mâles OFA (Laboratoire Iffa-Credo, Arbresle, France) pesant 300 ± 50 g.

Ils sont mis à jeun 12 h au moins avant toute expérience.

L'anesthésie générale est obtenue en injectant par voie intrapéritonéale une solution à 1 % de pentobarbital à usage vétérinaire (Sanofi, Montluçon, France), à la dose de 1,25 ml/kg.

9.5.1.2 Canulation du canal lymphatique mésentérique

Le canal mésentérique principal est canulé d'après la technique de BOLLMAN et coll. [1948], modifiée par WARSHAW et coll. [1972] selon le protocole suivant (Figure 29):

L'opération est réalisée sous loupe binoculaire (Stereozoom 4, LEICA, Buffalo, NY, Etats-Unis).

La paroi abdominale est incisée au niveau de la ligne médiane. La première anse intestinale est dégagée. Les canaux mésentériques principal et secondaire apparaissent de part et d'autre de l'artère mésentérique.

A l'aide d'une pince à iris courbe de Graefe, les canaux et l'artère sont débarrassés des membranes de tissus les recouvrant. Le canal mésentérique principal est séparé ensuite de l'artère sur 3-4 mm de longueur de façon à pouvoir glisser 2 fils en dessous du canal. De même, le canal mésentérique secondaire est dégagé puis ligaturé à l'aide d'un fil, cette opération ayant pour but de s'assurer que la totalité de la lymphe intestinale sera récoltée. Le fil en aval sert à ligaturer le canal, l'autre fil servira pour fixer la paroi du canal sur le cathéter. A l'aide d'une pince droite, la paroi supérieure du canal est soulevée et le canal mésentérique principal est incisé avec une paire de microciseaux.

Le cathéter (Intramedic PE 10, diamètre intérieur 0,28 mm, diamètre extérieur 0,61 mm, Laboratoire RUA) a été étiré au préalable pour le rendre plus fin, l'extrémité biseautée, puis il est rempli de sérum hépariné. Le cathéter est introduit sur 3 mm dans la direction inverse à celle du flux lymphatique. Le cathéter est fixé avec le fil placé en amont et éventuellement avec une goutte de colle biologique (Histo-acryl, laboratoires Bruneau, Boulogne, France).

A l'aide de la seringue fixée au cathéter, quelques microlitres de sérum hépariné sont injectés, la seringue est retirée et la lymphe s'écoule alors par l'extrémité libre du cathéter.

Pour augmenter la vitesse d'écoulement de la lymphe, le rat est surélevé de 5 cm par rapport à l'extrémité libre du cathéter. Le recueil de la lymphe se fait dans des tubes héparinés, à l'abri de la lumière.

9.5.2 Schéma expérimental

Les rats reçoivent 2 heures avant l'anesthésie 1,5 ml d'huile d'olive *per os*, ce qui facilite ultérieurement le repérage des canaux lymphatiques.

Les formes pharmaceutiques d'isradipine (0,5 mg/ml) sont administrées par injection intragastrique (2 ml pour un rat de 400 g correspondant à une dose d'isradipine de 2,5 mg/kg).

Toutes les heures, les rats sont réhydratés par 1 ml de solution de glucose à 5 % injectée au niveau intragastrique.

La lymphe est recueillie chez le rat inconscient, en continu pendant deux périodes de 30 min pendant la première heure (si le débit est suffisant), puis heure par heure, de la 2^{ème} à la 6^{ème} heure (si possible). Les échantillons sont ensuite pesés et congelés.

9.5.3 Expression des résultats

Les résultats des études cinétiques lymphatiques sont exprimés en concentration (ng d'isradipine par mg de lymphe). Les concentrations lymphatiques sont des valeurs moyennes sur un intervalle de temps d'une demi-heure (première heure) ou une heure (2^{ème} à la 6^{ème} heure). Il est en effet impossible de réaliser des prélèvements instantanés de lymphe, en raison du faible débit lymphatique.

Les débits lymphatiques ($\mu\text{l/h}$) seront déterminés à chaque intervalle de temps ; le débit moyen sera calculé pour la 1^{ère} heure et pour les 6 heures de

l'expérience. L'évolution des débits ainsi que celle des quantités cumulées de lympho seront suivies heure par heure.

Les résultats suivants seront également calculés pour chacune des formes d'isradipine étudiées :

- le % de la dose administrée d'isradipine par ml de lympho : cette expression permet de s'affranchir du débit lymphatique et des doses administrées ;
- le % de la dose administrée et le % de la dose administrée cumulée : ces deux dernières expressions rendent compte des quantités recueillies.

9.5.4 Analyses statistiques

Les différences entre les traitements sont déterminées en comparant les différentes variables étudiées à l'aide d'un test de Kruskal-Wallis. Les différences sont considérées significatives au seuil $p < 0,05$.

9.6 METHODOLOGIE DES ETUDES PHARMACOCINETIQUES PLASMATIQUES ET LYMPHATIQUES

L'interprétation des paramètres pharmacocinétiques est réalisée à l'aide du logiciel MicroPharm (Loginserm, Paris, France) à partir des résultats des études de l'évolution chronologique des concentrations plasmatiques après administration orale (Thèse d'Université de Le Verger M.) ou intraveineuse des nanosphères d'isradipine ou des concentrations lymphatiques après administration intragastrique des nanosphères. L'analyse est effectuée selon un modèle non compartimental.

9.6.1 Définition des paramètres pharmacocinétiques étudiés

Tous les paramètres analysés sont déterminés individuellement pour chaque rat et en moyenne pour chacune des formulations.

Les paramètres suivants seront déterminés [HOUIN, 1990] :

- C_{max} (ng/ml), concentration plasmatique ou lymphatique en isradipine la plus élevée,
- t_{max} (h), temps d'occurrence de C_{max} ,

- SSC ou surface sous la courbe correspondant à la surface délimitée par les axes et la courbe qui décrit l'évolution chronologique des concentrations. Elle peut être calculée pour une durée déterminée ou extrapolée jusqu'à l'infini. SSC est calculée selon la méthode graphique dite des trapèzes.

SSC pour les temps compris entre 0 et t, a pour équation:

$$SSC_{0 \rightarrow t} = \sum 1/2 (C_i + C_{i+1}) (t_{i+1} - t_i)$$

où i est un nombre de 1 à n, n étant le nombre de points qui représentent le couple temps (t_i), concentration (C_i).

SSC peut être extrapolée à l'infini et a pour équation:

$$SSC_{0 \rightarrow \infty} = SSC_{0 \rightarrow t} + C_t/\beta$$

où C_t est la concentration au temps t et β est la constante de vitesse liée à la phase terminale d'élimination du principe actif.

- $t_{1/2}$ ou temps de demi-vie plasmatique, appelé aussi temps de demi-vie biologique ou d'élimination représentant le temps à la fin duquel la concentration plasmatique du principe actif a diminué de moitié par rapport à la quantité administrée. Il s'exprime en unité de temps.

- MRT ou temps de résidence moyen, caractérisant l'ensemble des processus cinétiques conditionnant le devenir *in vivo* du principe actif dans l'organisme. Après administration intraveineuse, il représente le temps nécessaire à la distribution et à l'élimination du principe actif ; après administration orale, il faut ajouter le temps lié à l'absorption.

MRT est défini comme le rapport entre l'aire sous le moment d'ordre 1 (M1) de la courbe des concentrations plasmatiques en fonction du temps et le moment d'ordre 0 (M0) de la courbe du produit temps par concentration en fonction du temps (SSMC) [YAMAOKA, 1978]. Il s'exprime en unité de temps et se calcule de la façon suivante:

$$MRT = M1/M0 = SSMC/SSC$$

avec $M0 = \int C dt = SSC$ et $M1 = \int t C dt = SSMC$.

9.6.2 Etude de la biodisponibilité

9.6.2.1 Définitions

La biodisponibilité permet d'apprécier à la fois la fraction de la dose de principe actif administré qui se trouve dans la circulation générale ainsi que la vitesse de mise à disposition de celui-ci.

- La biodisponibilité absolue permet d'évaluer pour une forme médicamenteuse une voie d'administration donnée par rapport à la voie de référence, la voie intraveineuse ; exprimée en pourcentage, elle correspond pour une forme pharmaceutique donnée au rapport des SSC obtenues par la voie d'administration étudiée et par la voie intraveineuse.
- La biodisponibilité relative permet de comparer pour une voie d'administration donnée, une forme galénique à une forme de référence ; exprimée en pourcentage, elle correspond au rapport des SSC de la forme pharmaceutique et de la forme de référence.

9.6.2.2 Biodisponibilités étudiées

La biodisponibilité absolue compare après ajustement des doses d'isradipine administrées, les SSC des concentrations plasmatiques d'isradipine obtenues après administration orale à celles obtenues par voie intraveineuse. Elles sont calculées pour chaque forme étudiée selon l'équation suivante :

$$\text{Biodisponibilité absolue} = \frac{\text{SSC}^p(\text{VO})}{\text{SSC}^p(\text{IV})} \times \frac{\text{Dose d'isradipine (IV)}}{\text{Dose d'isradipine (VO)}} \times 100$$

avec SSC^p : aire sous la courbe des concentrations plasmatiques, VO : voie orale.

Les biodisponibilités relatives des nanosphères par rapport à la solution dans le PEG seront calculées pour les 2 voies étudiées, la voie intraveineuse et la voie orale (rapport des SSC plasmatiques). Exprimées en pourcentages, elles sont calculées de la façon suivante :

$$\text{Biodisponibilité relative} = \frac{\text{SSC}^p(\text{nanosphères})}{\text{SSC}^p(\text{solution})} \times 100$$

Nous avons aussi calculé le rapport des SSC des concentrations lymphatiques d'isradipine après administration intragastrique des nanosphères et de la solution d'isradipine dans le PEG afin d'évaluer l'importance de la capture

lymphatique entre les différentes formes. La biodisponibilité relative ainsi définie se calcule de la façon suivante :

$$\text{Biodisponibilité relative} = \frac{\text{SSC}^{\text{L}} (\text{nanosphères})}{\text{SSC}^{\text{L}} (\text{solution})} \times 100$$

avec SSC^{L} : aire sous la courbe des concentrations lymphatiques d'isradipine.

9.6.3 Analyses statistiques

Les valeurs de biodisponibilité calculées sont comparées entre les différentes formes d'isradipine à l'aide d'un test de Kruskal Wallis au risque $p < 0,05$.

RESULTATS

10. CARACTERISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES DES NANOSPHERES

10.1 ASPECT MACROSCOPIQUE

L'aspect macroscopique des suspensions de nanosphères après fabrication est le premier critère permettant de décrire la stabilité de la suspension.

Après 24 h de stockage à +4°C, les suspensions de nanosphères préparées avec les différents polymères ne présentent ni floculation, ni sédimentation. Elles sont considérées comme étant stables. L'incorporation d'isradipine dans la formule à la concentration de 0,5 mg/ml n'altère pas la stabilité des suspensions.

10.2 ASPECT MICROSCOPIQUE

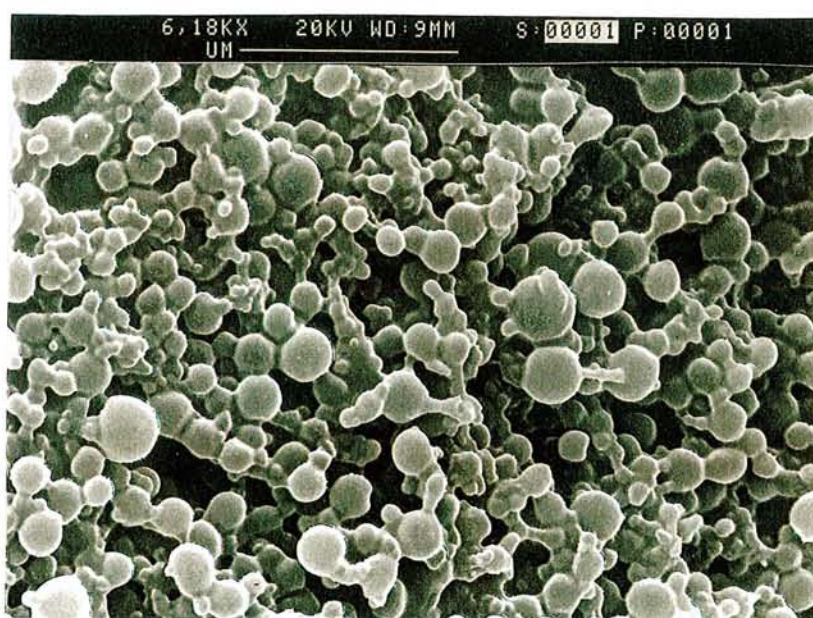
10.2.1 Microscopie électronique à balayage

La photographie 1 permet de visualiser des nanosphères d'Eudragit chargées en isradipine et de mettre en évidence leur forme sphérique.

Rappelons que ces nanosphères sont préparées sans Pluronic® F68. La présence de tensioactif (Pluronic® F68) n'a pas permis d'obtenir d'image nette en MEB des nanosphères de PCL ou de PLAGA, en raison d'interférences produites lors du balayage électronique.



Photographie 1 : Observation en microscopie électronique à balayage des nanosphères d'Eudragit chargées en isradipine.



Photographie 2 : Observation en microscopie électronique à transmission des nanosphères de PLGA chargées en isradipine.

10.2.2 Microscopie électronique à transmission

La microscopie électronique à transmission (MET) peut renseigner non seulement sur la morphologie des nanosphères mais aussi sur leur structure interne.

La photographie 2 présente des nanosphères de PLAGA chargées en isradipine. Le même type de structure a été retrouvé pour les autres nanosphères étudiées.

10.3 DIAMETRE ET POTENTIEL ZETA

10.3.1 Nanosphères non chargées en isradipine

Les valeurs moyennes des diamètres et des potentiels Zêta des nanosphères non chargées sont reportées dans le Tableau 12.

Tableau 12 : Diamètres et potentiels Zeta (moyenne $\pm$ esm) des nanosphères blanches déterminés à l'aide du Zetamaster.

NANOSPHERES NON CHARGEES	DIAMETRE (nm) (polydispersion)	POTENTIEL ZETA (mV)
PCL	208 ± 3 (0,2) ^{a b}	$-29.0 \pm 1,1$ ^b
PLAGA	125 ± 2 (0,1)	$-32,4 \pm 1,4$
Eudragit®	112 ± 2 (0,05)	$+67,2 \pm 3,5$ ^a

Pour chaque polymère, les mesures sont réalisées 3 fois sur 3 lots de fabrication différents.

^a $p < 0,05$ versus nanosphères de PLAGA, ^b $p < 0,05$ versus nanosphères d'Eudragit.

Nous pouvons faire les constatations suivantes :

- La taille des nanosphères diffère selon le polymère considéré ; les nanosphères de PCL ont un diamètre moyen significativement plus grand que celui des autres nanosphères.

- Les indices de polydispersion des diamètres des différentes nanosphères sont tous inférieurs à 0,3 ; ce qui signifie qu'il existe une population de particules de taille homogène.
- Les potentiels Zêta présentent une valeur absolue élevée, ce qui témoigne de la stabilité des suspensions.

Les nanosphères de PCL ou PLAGA sont chargées négativement, alors que les nanosphères d'Eudragit présentent une charge de surface positive.

10.3.2 Nanosphères chargées en isradipine

Les nanosphères chargées en isradipine présentent des diamètres et potentiels Zêta (Tableau 13) comparables à ceux trouvés pour les nanosphères blanches. Ces paramètres ne sont pas modifiés par l'incorporation d'isradipine dans les nanosphères.

Tableau 13 : Diamètres et potentiels Zêta (moyenne $\pm$ esm) des nanosphères chargées en isradipine (0,5 mg/ml)

NANOSPHERES CHARGEES EN ISRADIPINE	DIAMETRE (nm) (polydispersion)	POTENTIEL ZETA (mV)
PCL	195 $\pm$ 7 (0,1) ^{a b}	- 26,7 $\pm$ 0,3 ^{a b}
PLAGA	123 $\pm$ 2 (0,1)	- 32,4 $\pm$ 0,2 ^b
Eudragit	129 $\pm$ 2 (0,08)	+65,1 $\pm$ 0,5 ^b

Pour chaque polymère, les mesures sont réalisées 3 fois sur 3 lots de fabrication différents.

^a $p < 0,05$ versus nanosphères de PLAGA, ^b $p < 0,05$ versus nanosphères d'Eudragit.

10.4 RENDEMENT D'ENCAPSULATION ET CHARGE EN ISRADIPINE

10.4.1 Profils d'élution par filtration sur gel

Les paramètres d'efficacité d'incorporation de l'isradipine dans les nanosphères sont évalués par la méthode de filtration sur gel.

Dans un premier temps, selon la forme étudiée, nous avons constaté l'élution des nanosphères blanches entre la 18^{ème} et la 30^{ème} minute qui suivaient le dépôt d'un ml de suspension de nanosphères sur la colonne.

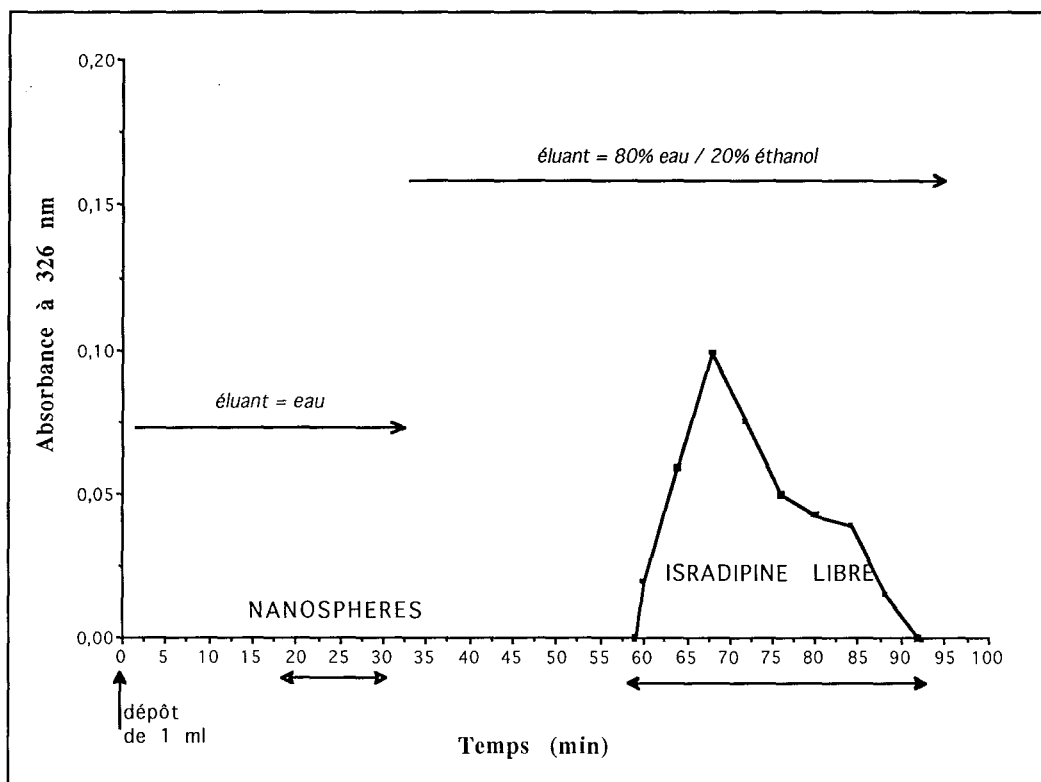


Figure 30 : Exemple de profil d'élution des nanosphères et de l'isradipine non incorporée en fonction du temps selon la méthode de filtration sur gel.

L'élution de l'isradipine en solution a lieu entre la 60^{ème} et la 90^{ème} minute, après avoir changé d'éluant à la 35^{ème} minute. Nous avons déterminé par spectrophotométrie UV que 98 % de l'isradipine déposée initialement sur la colonne était retrouvée dans les fractions d'éluat recueillies.

L'élution des différentes nanosphères chargées en isradipine a suivi cet ordre : élution des nanosphères puis de la fraction d'isradipine incorporée dans les nanosphères, enfin de la fraction d'isradipine non incorporée ou isradipine « libre » (Figure 30).

Le dosage de l'isradipine libre par spectrophotométrie UV a permis de calculer la quantité d'isradipine incorporée dans les nanosphères et de déterminer les deux paramètres suivants : le pourcentage d'incorporation et la charge en isradipine.

10.4.2 Pourcentages d'incorporation dans les nanosphères

Le dosage de l'isradipine libre par spectrophotométrie UV à 326 nm a permis le calcul des pourcentages d'incorporation de l'isradipine dans les nanosphères (Tableau 14).

Tableau 14 : Pourcentages d'incorporation (moyenne $\pm$ esm, n= 5) de l'isradipine dans les nanosphères déterminés par filtration sur gel Sépharose CL4B.

NANOSPHERES	PCL	PLAGA	EUDRAGIT
POURCENTAGE D'INCORPORATION (%)	86,8 $\pm$ 2,4	97,3 $\pm$ 3,6	76,4 $\pm$ 2,8 ^a

^a p>0,05 versus nanosphères de PLAGA

Les pourcentages d'incorporation de l'isradipine dans les nanosphères sont élevés, atteignant jusqu'à 97 % en moyenne pour les nanosphères de PLAGA.

10.4.3 Charge en isradipine

Le tableau 15 donne, pour les trois types de nanosphères étudiés, la charge en isradipine pour 100 mg de polymère.

Tableau 15 : Charges en isradipine (moyenne $\pm$ esm, n= 5) des nanosphères déterminées par filtration sur gel.

NANOSPHERES	PCL	PLAGA	EUDRAGIT
CHARGE EN ISRADIPINE (mg/100 mg de polymère)	3,5 $\pm$ 0,1 ^a	3,9 $\pm$ 0,7 ^a	1,3 $\pm$ 0,1

^a p<0,01 versus nanosphères d'Eudragit.

Le tableau 15 indique que les nanosphères de PCL et de PLAGA ont une charge en isradipine qui est en moyenne 2,7 à 3 fois plus importante respectivement que celle des nanosphères d'Eudragit.

10.5 ANALYSE CALORIMETRIQUE DIFFERENTIELLE

10.5.1 Constituants des nanosphères

L'analyse des thermogrammes obtenus par DSC des différents constituants des nanosphères a permis de déterminer les différences d'enthalpie libre et les températures de transition vitreuse des constituants (tableau 16).

Tableau 16 : Températures de fusion (T_f) et températures de transition vitreuse (T_g) des différents constituants des nanosphères.

Evénement thermique	Isradipine	Pluronic ® F68	PCL	PLAGA	Eudragit RL, RS
T_f (°C)	+ 169,4	+ 50,1	+ 65,6		
T_g (°C)		- 63,4	- 65,1	+ 40,2	+ 50,9

Les résultats sont présentés en moyenne $\pm$ esm (n=5).

Les résultats obtenus confirment ceux de la littérature :

- L'isradipine, poudre cristalline, présente un pic de fusion à +169,4 °C.
- Le Pluronic F68 ®, stabilisant de structure semi-cristalline, présente une température de fusion à +50,1 °C et une température de transition vitreuse à -63,4 °C.
- La PCL, polymère semi-cristallin, est caractérisée par une température de transition vitreuse à -65,1 °C et un endotherme de fusion à +65,6 °C.
- Le PLAGA, polymère amorphe présente une température de transition vitreuse à +48,7 °C.
- Le mélange physique d'Eudragit RL et RS, polymères amorphes, est caractérisé par une température de transition vitreuse à +50,9 °C.

10.5.2 Nanosphères non chargées

Les thermogrammes des nanosphères non chargées en isradipine présentent des événements thermiques appartenant à leurs constituants (Tableau 17).

Tableau 17 : Températures de fusion (T_f) et températures de transition vitreuse (T_g) obtenues avec les nanosphères non chargées.

Événements thermiques	Nanosphères de PCL	Nanosphères de PLAGA	Nanosphères d'Eudragit
T_f (°C)	+ 51,4		
T_g (°C)	- 65,0	+ 48,7	+ 50,0

Les résultats sont présentés en moyenne $\pm$ esm (n=5).

Les valeurs des températures de transition vitreuse et des températures de fusion sont proches de celles obtenues pour les constituants étudiés isolément (Tableau 17).

10.5.3 Nanosphères chargées en isradipine

Les thermogrammes des nanosphères chargées en isradipine présentent des différences par rapport à ceux des nanosphères non chargées en principe actif (Tableau 18).

Tableau 18 : Températures de fusion et températures de transition vitreuse obtenues avec les nanosphères chargées en isradipine.

Événements thermiques	Nanosphères de PCL	Nanosphères de PLAGA	Nanosphères d'Eudragit	Isradipine sans polymère*
T_f (°C)	+ 55,2			+ 50,7
T_g (°C)	- 53,4	+ 32,2	+ 47,3	- 58,4

Les résultats sont présentés en moyenne $\pm$ esm (n=5).

T_f : différence d'enthalpie libre, T_g : température de transition vitreuse

* il s'agit d'une suspension d'isradipine préparée selon la même méthode que les nanosphères mais en l'absence de polymère, et stabilisée par le Pluronic® F68.

L'analyse du tableau 18 permet de constater que :

- Les valeurs des températures de transition vitreuse des polymères étudiés sont moins élevées après incorporation de l'isradipine.
- Le pic de fusion de l'isradipine est absent au niveau des nanosphères.
- Le pic de fusion de la PCL est conservé.

11. ETUDE DE LA LIBERATION *IN VITRO* DE L'ISRADIPINE

Après vérification de l'absence d'affinité de l'isradipine pour la membrane des sacs de dialyse, nous avons étudié la libération *in vitro* de l'isradipine à partir des nanosphères dans trois milieux différents.

11.1 DANS UN TAMPON A pH 6,8

La libération *in vitro* a été étudiée dans un tampon à pH 6,8. Les profils de libération obtenus pour les différentes formes d'isradipine sont illustrés dans la figure 31.

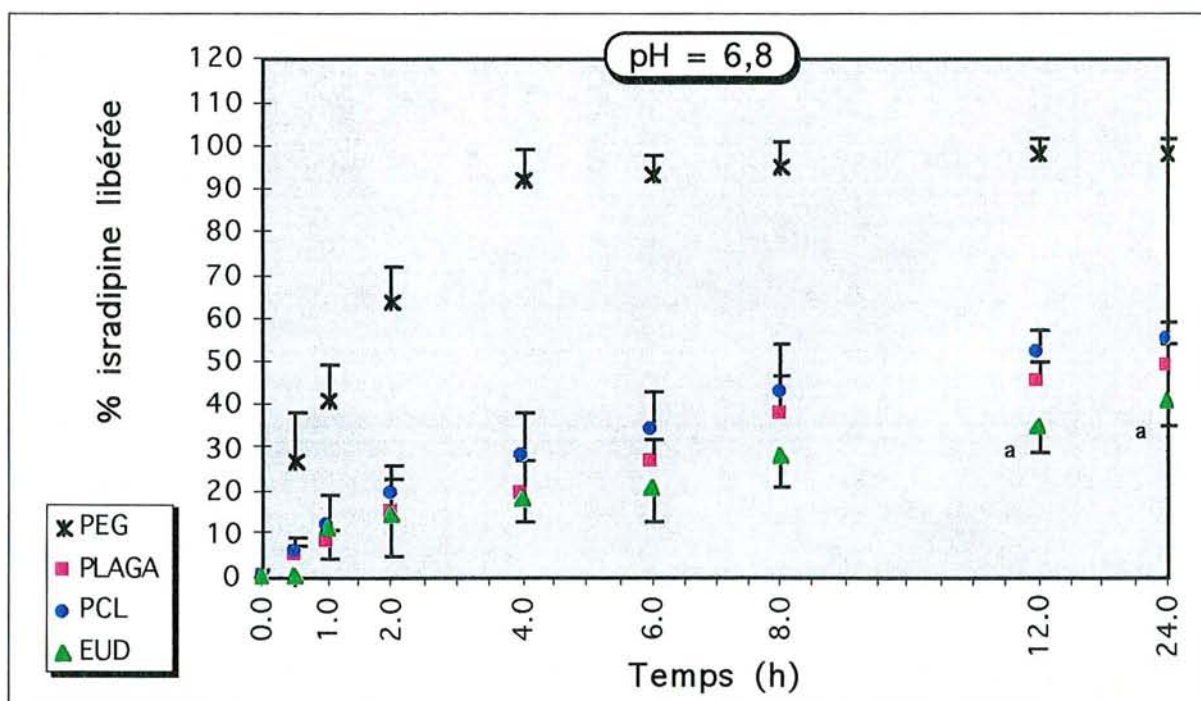


Figure 31 : Profils de libération *in vitro* dans un tampon phosphate à pH 6,8 de l'isradipine en solution dans le PEG ou incorporée dans des nanosphères de PLAGA, de PCL et d'Eudragit ($n=3$).

a : $p < 0,05$ nanosphères d'Eudragit versus nanosphères de PLAGA.

La figure 31 montre que l'isradipine sous forme de solution dans le PEG est rapidement dialysée (quantité libérée estimée à 64 ± 8 % de la quantité initiale à $t=2$ h) et la dialyse est totale dès la 4^{ème} heure.

En revanche, pour les nanosphères, l'isradipine est libérée plus lentement. Entre 8 et 12 % de la quantité initiale sont libérés pendant la première heure, et moins de 20 % sont libérés à $t=2$ h. A $t=8$ h, la quantité d'isradipine libérée est estimée à 38 ± 9 % pour les nanosphères de PLAGA, 43 ± 11 % pour les nanosphères de PCL et 28 ± 7 % pour les nanosphères d'Eudragit. A $t=24$ h, 55 ± 5 % de l'isradipine est libérée à partir des nanosphères de PCL, 49 ± 4 % pour les nanosphères de PLAGA et 41 ± 6 % pour celles d'Eudragit (la différence est significative uniquement entre les nanosphères d'Eudragit et celles de PCL, $p<0,05$).

Nous avons poursuivi l'expérience jusqu'à $t=48$ h et $t=72$ h (résultats non présentés sur la figure 31). Après 48 h de dialyse, respectivement 51 ± 8 %, 63 ± 8 % et 72 ± 5 % d'isradipine sont libérés à partir des nanosphères d'Eudragit, de PLAGA et de PCL. Après 72 h de dialyse, ces pourcentages deviennent respectivement 65 ± 6 %, 87 ± 4 % et 90 ± 4 %.

11.2 DANS UN TAMPON A pH 1,4

Les profils de libération *in vitro* dans le tampon à pH 1,4 sont présentés sur la figure 32.

Le graphe nous montre que la dialyse en milieu acide de l'isradipine en solution dans le PEG est rapide, avec un plateau atteint à $t=6$ h.

La dialyse de l'isradipine sous forme de nanosphères est significativement ralentie par rapport à celle de l'isradipine en solution. Les profils de libération sont similaires à ceux obtenus à pH 6,8, excepté le fait que des quantités moindres d'isradipine sont libérées à des temps équivalents, pour toutes les nanosphères.

A $t=2$ h, 7 ± 3 % de la quantité initiale sont libérés pour les nanosphères d'Eudragit, 9 ± 4 % pour celles de PLAGA et 12 ± 6 % pour celles de PCL.

Ces quantités sont égales respectivement à 16 ± 5 %, 19 ± 5 % et 22 ± 7 % à $t=6$ h et à 28 ± 5 %, 32 ± 4 % et 35 ± 4 % à $t=24$ h.

A $t=72$ h, les quantités libérées correspondent à 73 ± 6 %, 82 ± 4 % et 79 ± 4 %.

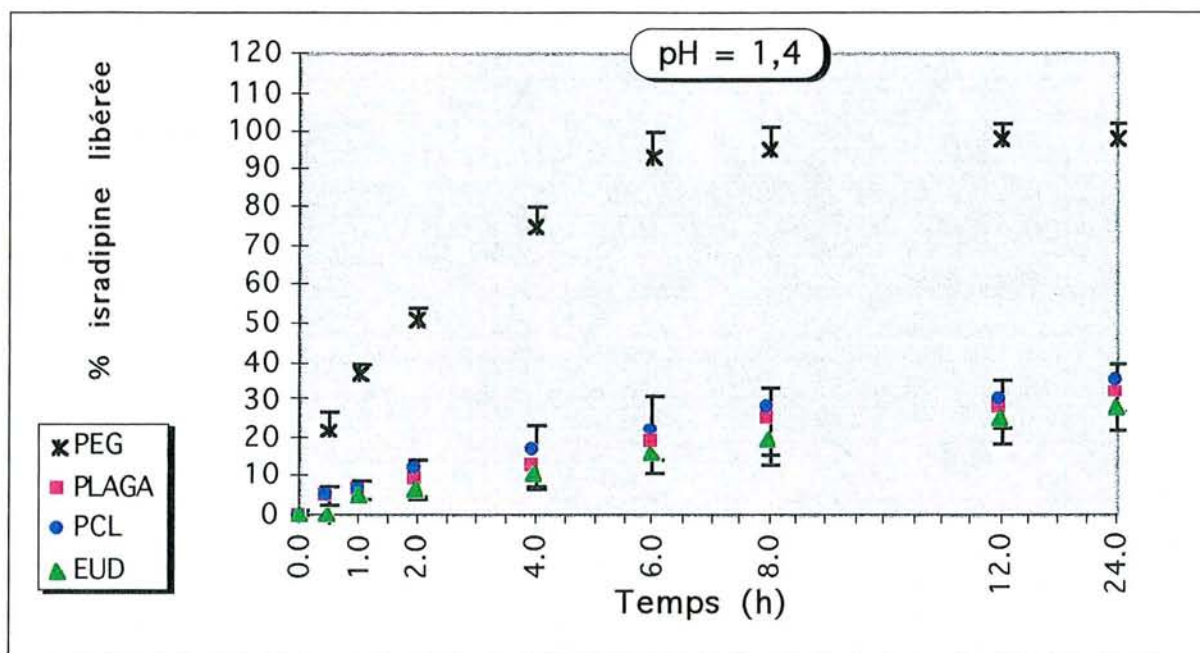


Figure 32 : Profils de libération *in vitro* dans un tampon phosphate à pH 1,4 de l'isradipine en solution dans le PEG ou incorporée dans des nanosphères de PLAGA, de PCL et d'Eudragit ($n=3$).

Aucune différence significative n'est mise en évidence entre les nanosphères en ce qui concerne les quantités d'isradipine libérée dans ce milieu.

11.3 DANS UNE SOLUTION D'ALBUMINE A 1,5 %

Les profils de libération dans la solution d'albumine à 1,5 % sont présentés dans la figure 33.

Nous pouvons remarquer que l'utilisation de la solution d'albumine comme milieu de libération à la place des tampons n'influence que très légèrement les profils de libération. En effet, une quantité supérieure, mais non significative, d'isradipine est libérée par rapport aux autres tampons étudiés (Figures 31 et 32).

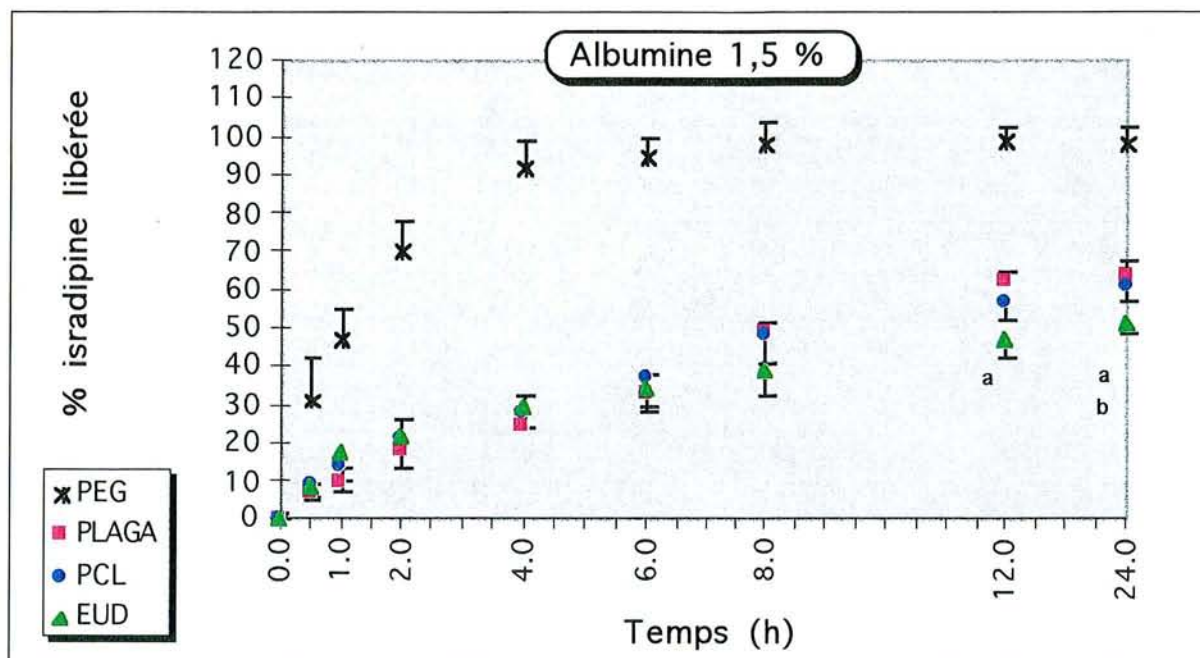


Figure 33 : Profils de libération *in vitro* dans une solution d'albumine à 1,5% de l'isradipine en solution dans le PEG ou incorporée dans des nanosphères de PLAGA, de PCL et d'Eudragit.

^a $p < 0,05$ nanosphères d'Eudragit versus nanosphères de PLAGA.

^b $p < 0,05$ nanosphères d'Eudragit versus nanosphères de PCL.

A $t=6$ h, plus de 30 % d'isradipine sont libérés (33 ± 5 % pour les nanosphères de PLAGA, 34 ± 5 % pour celles d'Eudragit et 37 ± 5 % pour celles de PCL). A $t=24$ h après dialyse, les nanosphères de PLAGA, PCL et Eudragit ont libéré respectivement $64 \pm 3\%$, 61 ± 4 % et 51 ± 3 % d'isradipine.

12. EVOLUTION CHRONOLOGIQUE DE LA PRESSION ARTERIELLE APRES ADMINISTRATION ORALE DES NANOSPHERES A DES RATS SHR.

12.1 APRES ADMINISTRATION DE L'EAU ET DES NANOSPHERES NON CHARGEES

Préalablement à l'administration de l'isradipine incorporée dans les nanosphères, l'absence d'effet des nanosphères « blanches », sans principe actif, sur la pression artérielle a été vérifiée.

Nous montrons qu'il n'existe pas de différence entre le profil tensionnel de l'eau (qui constitue le placebo) et ceux des nanosphères blanches de PCL, de PLGA et d'Eudragit (Figure 34).

On peut cependant remarquer pour tous les groupes de rats étudiés, une légère baisse de la PAS au cours de l'expérience, liée sûrement à un phénomène d'accoutumance des rats à la manipulation, conduisant à une diminution du stress au cours du temps.

12.2 EFFET DE LA DOSE DE 1 mg/kg D'ISRADIPINE

Les nanosphères d'isradipine préparées à partir des différents polymères ont été administrées *per os* à des rats SHR à la dose de 1 mg/kg ; leurs effets sur la pression artérielle systolique sont comparés à ceux obtenus pour la solution de référence (solution d'isradipine dans le PEG) et pour les suspensions de nanosphères blanches (Figure 35).

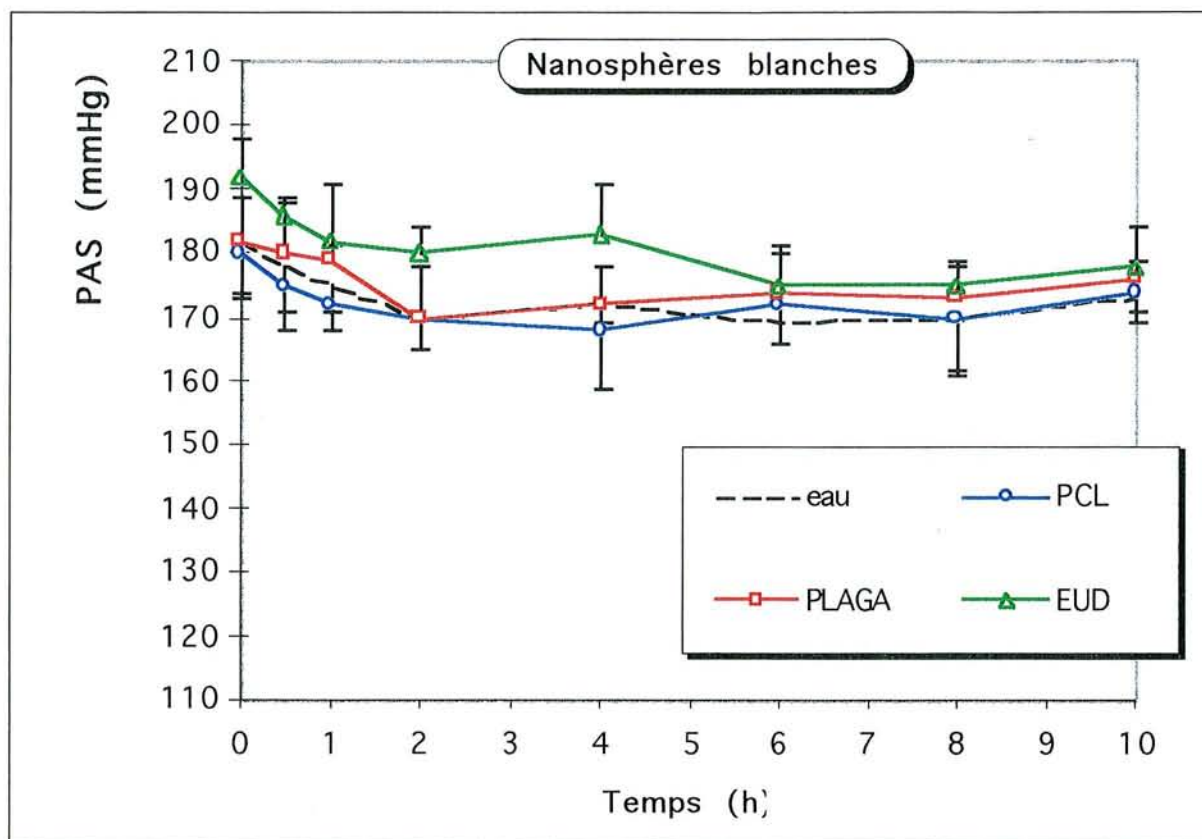


Figure 34 : Evolution chronologique de la pression artérielle systolique (PAS) après administration à des rats SHR, d'eau et de nanosphères de PCL, PLAGA et Eudragit, non chargées en isradipine (n=5).

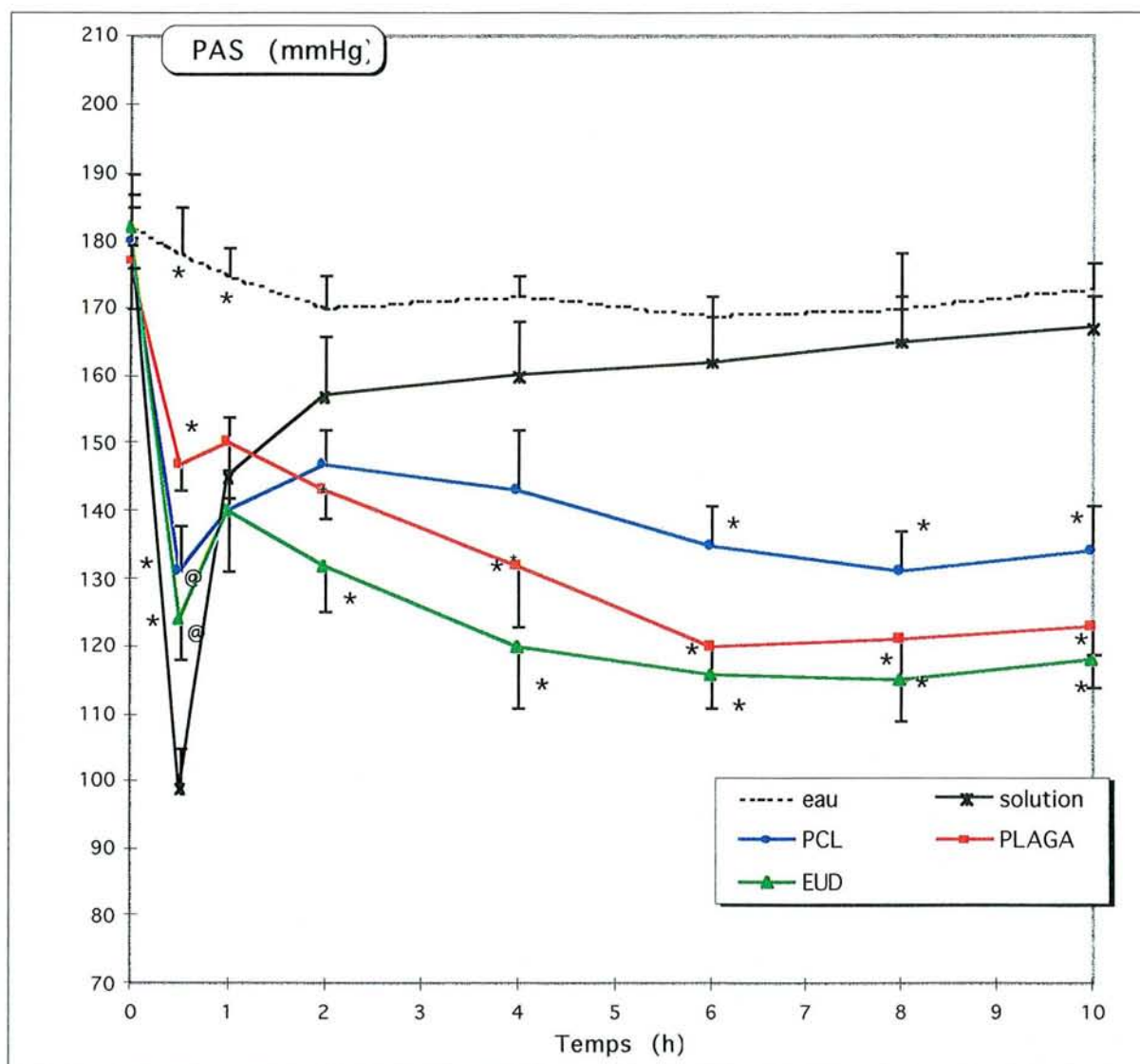


Figure 35 : Evolution chronologique de la PAS après administration *per os* à des rats SHR (n=8) d'isradipine en solution dans le PEG ou incorporée dans des nanosphères de PCL, PLAGA et Eudragit, à la dose de 1 mg/kg.

* $p < 0,05$ versus solution d'isradipine dans le PEG.

@ $p < 0,05$ versus nanosphères de PLAGA.

12.2.1 Après administration de la solution d'isradipine dans le PEG

L'administration *per os* de l'isradipine en solution dans le PEG (Figure 35) est aussitôt suivie d'un pic hypotenseur très prononcé jusqu'à la 30^{ème} minute, la PAS chutant de 81 ± 6 mmHg par rapport à la PAS initiale. Puis, la PAS remonte de façon importante (de 46 ± 9 mmHg) dans la deuxième demi-heure. Ensuite, la PAS augmente progressivement jusqu'à $t=10$ h. La diminution de pression induite par la solution d'isradipine n'est plus significative par rapport aux effets du placebo à partir de $t=2$ h. L'administration de la solution d'isradipine dans le PEG entraîne ainsi une diminution de la PAS à la fois rapide, intense et de durée brève.

12.2.2 Après administration des nanosphères chargées en isradipine

L'administration des suspensions de nanosphères chargées en isradipine conduit à des profils tensionnels différents selon le polymère qui les constitue (Figure 35).

12.2.2.1 Après administration des nanosphères de PCL

L'administration des nanosphères de PCL provoque une diminution de la PAS de 49 ± 7 mmHg pendant la première demi-heure. La chute de PAS post-administration est significativement réduite par rapport au pic hypotenseur obtenue lors de l'administration de la solution d'isradipine. La PAS remonte de 9 ± 5 mmHg dans la demi-heure suivante puis diminue de nouveau et se stabilise jusqu'à $t=10$ h à des valeurs significativement abaissées par rapport à la solution d'isradipine dans le PEG (135 ± 6 mmHg versus 162 ± 4 mmHg à $t=6$ h et 134 ± 5 mmHg versus 167 ± 4 mmHg à $t=10$ h).

12.2.2.2 Après administration des nanosphères de PLGA

L'administration des nanosphères de PLGA est suivie d'une chute de la PAS de 30 ± 4 mmHg jusqu'à $t=30$ min, avec stabilisation de la PAS à 145 ± 4 mmHg jusqu'à $t=2$ h. La PAS décroît progressivement entre la 2^{ème} et 6^{ème} heure pour atteindre la valeur de 120 ± 5 mmHg. La PAS se maintient jusqu'à la 10^{ème} heure autour de cette valeur qui reste significativement diminuée par rapport à la solution de référence (123 ± 3 mmHg versus 167 ± 4 mmHg).

12.2.2.3 Après administration des nanosphères d'Eudragit

L'administration des nanosphères d'Eudragit entraîne l'apparition d'un pic hypotenseur important durant la première demi-heure, la PAS chutant en moyenne de 58 ± 6 mmHg par rapport à la pression initiale. Cependant, la diminution de pression obtenue est significativement moins importante que celle observée avec la solution de référence. En revanche, la PAS à $t=30$ min est significativement plus abaissée avec les nanosphères d'Eudragit (124 ± 5 mmHg) qu'avec celles de PCL (131 ± 7 mmHg) ou de PLAGA (147 ± 4 mmHg). Puis, la pression remonte légèrement et diminue de nouveau, pour se stabiliser à 118 ± 4 mmHg à $t=10$ h.

12.2.3 Autres résultats

Pour toutes les formes étudiées, la PAS mesurée à $t=24$ h ne diffère pas significativement de la PAS avant administration à $t=0$.

L'analyse des enregistrements des rythmes cardiaques, concomitants de ceux de la PAS, ne met pas en évidence de différence significative entre les groupes. Les valeurs moyennes de rythme cardiaque sont reportées en annexe.

12.3 EFFET DE LA DOSE DE 2,5 mg/kg D'ISRADIPINE

Les résultats de ce paragraphe concernent l'administration *per os* à la dose de 2,5 mg/kg des différentes formes pharmaceutiques d'isradipine à des rats SHR (Figure 36).

La diminution la plus importante de la PAS après administration est observée avec la solution d'isradipine dans le PEG à $t=15$ min (chute de 100 ± 5 mmHg). Ce pic hypotenseur est réduit significativement pour les nanosphères ($p<0,05$). La diminution de la PAS est de 77 ± 3 mmHg pour les nanosphères d'Eudragit, de 65 ± 3 mmHg pour celles de PCL et seulement de 60 ± 4 mmHg pour celles de PLAGA. Pour ces dernières, la chute de la pression est significativement moins importante que pour les nanosphères d'Eudragit.

Le graphe montre également que la PAS remonte ensuite progressivement entre $t=15$ min et $t=2$ h, quelque soit la forme.

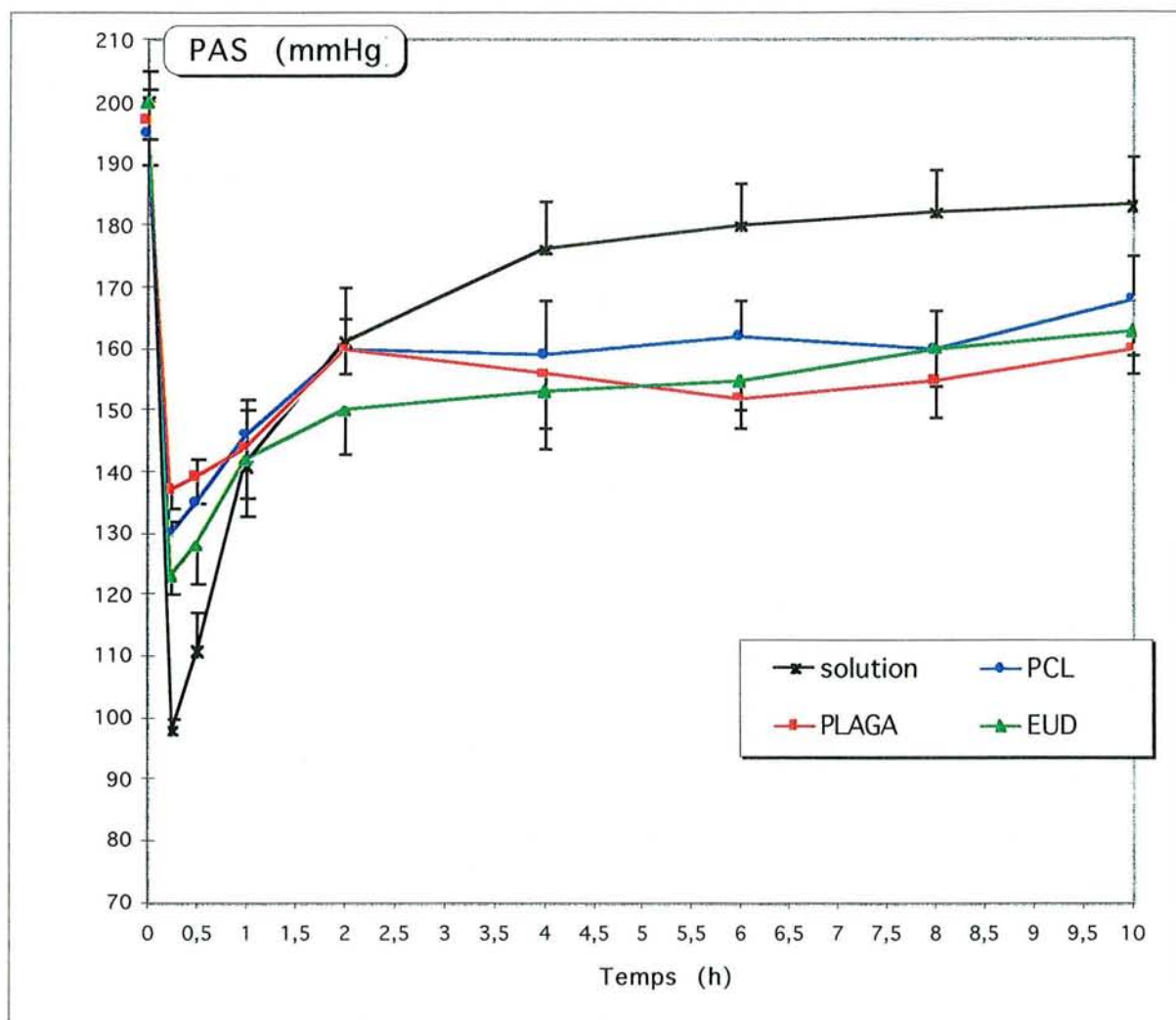


Figure 36 : Evolution chronologique de la PAS après administration *per os* à des rats SHR (n=8), d'isradipine en solution dans le PEG400 ou incorporée dans des nanosphères de PCL, PLAGA et Eudragit, à la dose de 2,5 mg/kg.

La figure 36 montre également qu'entre t=2 h et t=10 h, les valeurs de pression sont significativement diminuées chez les rats ayant reçu les nanosphères comparativement à la solution dans le PEG.

A t=10 h, il n'existe plus de différence de PAS entre la solution et les nanosphères de PCL. A t=24 h, les PAS sont identiques aux valeurs à celles de t=0 et ne diffèrent pas entre les groupes.

12.4 RAPPORTS VALLEE/PIC

Les rapports vallée/pic (Tableau 19) ont été calculés en suivant l'évolution de la PAS après administration des différentes formes d'isradipine à la dose de 2,5 mg/kg.

Tableau 19 : Rapports vallée/pic pour les différentes formes d'isradipine administrées per os à la dose de 2,5 mg/kg à des rats SHR (moyenne $\pm$ esm, n=8 par groupe).

<i>Diminution de la PAS (mmHg)</i>	<i>Solution dans le PEG</i>	<i>Nanosphères de PCL</i>	<i>Nanosphères de PLAGA</i>	<i>Nanosphères d'Eudragit</i>
Pic (15 min)	102 $\pm$ 5	65 $\pm$ 4	60 $\pm$ 4	77 $\pm$ 6
Pic corrigé*	97 $\pm$ 4	60 $\pm$ 3	55 $\pm$ 5	72 $\pm$ 5
Vallée (10 h)	17 $\pm$ 4	28 $\pm$ 4	37 $\pm$ 5	37 $\pm$ 4
Vallée corrigée*	9 $\pm$ 4	20 $\pm$ 4	29 $\pm$ 4	29 $\pm$ 5
Vallée/Pic (%)	9,3 $\pm$ 2,1	33,3 $\pm$ 3,8 ^a	52,8 $\pm$ 4,1 ^a	40,3 $\pm$ 4,2 ^a

La valeur du pic est calculée à t=15 min et celle de la vallée à t=12 h après administration.

* Les valeurs corrigées du pic et de la vallée sont calculées en soustrayant aux valeurs de pression obtenues après administration des formes d'isradipine, les valeurs de pression obtenues après administration d'eau.

^a p<0,01 versus solution d'isradipine dans le PEG.

Comparativement à celui des nanosphères, le rapport vallée/pic est très faible pour la solution d'isradipine dans le PEG.

Le rapport vallée/pic est supérieur à 50 % uniquement pour les nanosphères de PLAGA.

13. ETUDE DES CONCENTRATIONS PLASMATIQUES D'ISRADIPINE APRES INJECTION INTRA-VEINEUSE DES NANOSPHERES A DES RATS SHR

13.1 EVOLUTION CHRONOLOGIQUE DES CONCENTRATIONS PLASMATIQUES

La figure 37 montre en coordonnées semi-logarithmiques, l'évolution chronologique pendant 12 heures des concentrations plasmatiques moyennes d'isradipine, après administration par voie IV des différentes formes pharmaceutiques d'isradipine, à la dose de 0,5 mg/kg, chez des rats SHR.

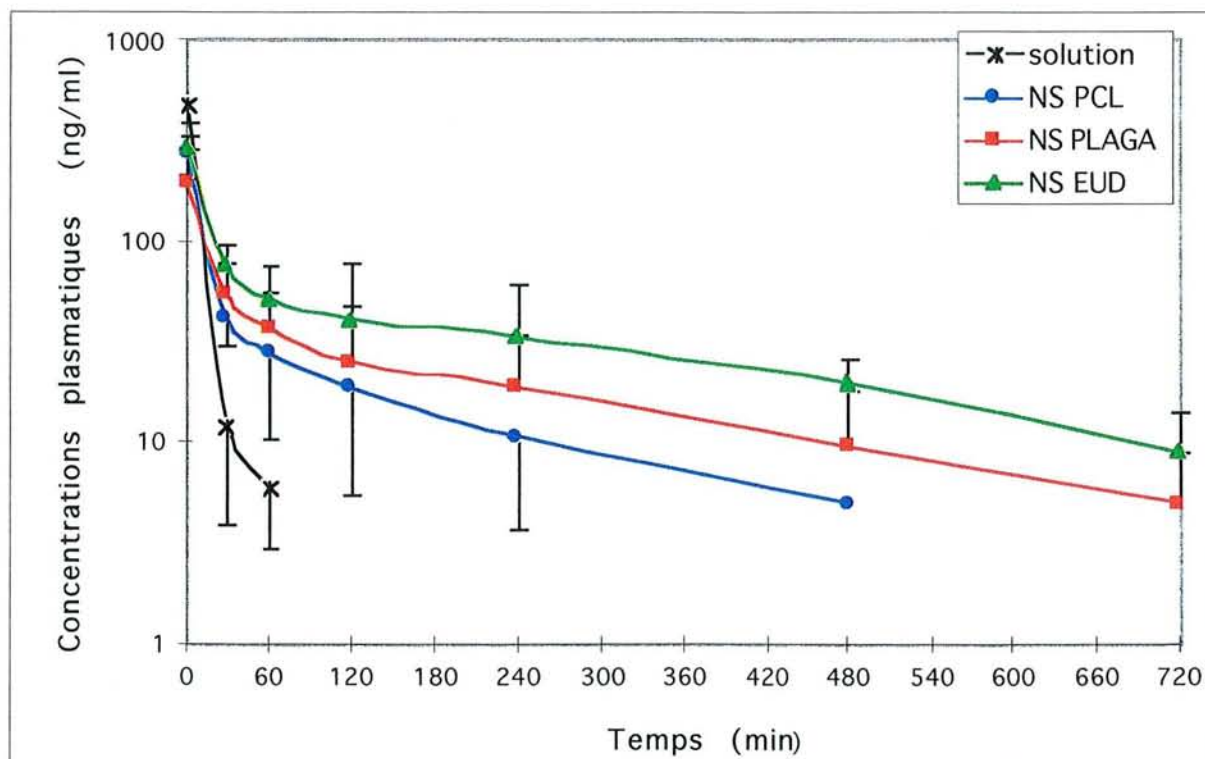


Figure 37 : Evolution chronologique des concentrations plasmatiques d'isradipine après administration intraveineuse d'isradipine (0,5 mg/kg) en solution dans le PEG ou sous forme de nanosphères de PCL, PLAGA et Eudragit (n= 5 à 7).

Les valeurs des erreurs standard sont relativement importantes par rapport à la valeur moyenne des concentrations plasmatiques et reflètent à la fois la variabilité inter et intra-individuelle des mesures (Tableau 20).

Tableau 20 : Concentrations plasmatiques moyennes ($\pm$ esm, ng/ml) d'isradipine après administration par voie intraveineuse d'isradipine (0,5 mg/ml) en solution dans le PEG ou sous forme de nanosphères à des rats SHR (n= 5 à 7).

<i>Temps (min)</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>5</i>	<i>10</i>	<i>30</i>	<i>60</i>	<i>120</i>	<i>240</i>	<i>480</i>	<i>720</i>
Solution dans le PEG	488 ± 156	112 ± 87	50 ± 23	27 15	± 14 ± 5	5 2	$\pm$ -	-	-	-
Nanosphères de PCL	252 ± 83	209 ± 75	115 ± 61	69 ± 36	38 ± 20	27 ± 12	18 ± 9	12 ± 7	6 ± 4	-
Nanosphères de PLAGA	194 ± 102	155 ± 86	130 ± 62	100 ± 34	59 ± 26	47 ± 25	25 ± 15	19 ± 12	10 ± 7	6 ± 2
Nanosphères d'Eudragit	285 ± 64	252 ± 103	151 ± 45	118 ± 57	85 ± 41	72 ± 34	41 ± 20	36 ± 11	25 ± 14	15 ± 5

L'analyse de la figure 37 et du tableau 20 permet de constater les points suivants :

- Les concentrations plasmatiques décroissent rapidement et immédiatement après administration intraveineuse des différentes formes d'isradipine.
- La solution d'isradipine présente la C_{max} la plus élevée, alors que les nanosphères ont une C_{max} nettement diminuée ($p < 0,05$).
- L'isradipine n'est plus détectable dans le plasma 2 h après administration de la solution et après la 6^{ème} heure pour les nanosphères de PCL ; l'isradipine est encore détectable dans le plasma 12 h après administration des nanosphères de PLAGA ou d'Eudragit.

13.2 PARAMETRES PHARMACOCINETIQUES PLASMATIQUES

Les principaux paramètres pharmacocinétiques sont reportés dans le tableau 21.

Tableau 21 : Paramètres pharmacocinétiques plasmatiques (moyennes $\pm$ esm) et biodisponibilité relative de l'isradipine administrée sous différentes formes pharmaceutiques par voie IV à la dose de 0,5 mg/kg chez des rats SHR.

Forme d'isradipine	n	Cmax (ng/ml)	MRT (min)	$t_{1/2}$ (min)	r^2	$SSC_{0 \rightarrow 12 \text{ h}}$ (ng.h/ml)	F (%)
Solution de référence	7	488 $\pm$ 156	16 $\pm$ 11	19	0,999	50 $\pm$ 11	100
Nanosphères de PCL	7	252 $\pm$ 83 ^a	58 $\pm$ 17 ^a	229 ^b	0,998	60 $\pm$ 16	120
Nanosphères de PLAGA	6	194 $\pm$ 102 ^a	122 $\pm$ 35 ^b	287 ^b	0,998	65 $\pm$ 23	131 ^a
Nanosphères d'Eudragit	5	285 $\pm$ 64 ^a	157 $\pm$ 47 ^b	380 ^b	0,991	94 $\pm$ 24 ^a	187 ^b

Les paramètres pharmacocinétiques sont calculés pour un modèle indépendant.

Cmax : concentration plasmatique maximale ; MRT : temps de résidence moyen, $t_{1/2}$: demi-vie d'élimination ; r^2 : coefficient de corrélation de la décroissance log linéaire des concentrations plasmatiques en fonction du temps ; SSC : surface sous la courbe des concentrations de t=0 à t=12 h ; F : biodisponibilité relative par rapport à la solution.

Significativité versus solution : ^a p<0,05 ; ^b p<0,01.

Les concentrations plasmatiques moyennes présentent une décroissance log linéaire entre t=10 et t=60 min pour la solution d'isradipine dans le PEG, entre t=120 et t=420 min pour les nanosphères de PCL et entre t=240 et t=720 min pour les nanosphères de PLAGA et d'Eudragit, ce qui permet de calculer une demi-vie d'élimination moyenne apparente (Tableau 21).

Comparée à la solution dans le PEG qui présente une demi-vie d'élimination très courte, la demi-vie d'élimination est nettement prolongée après injection I.V. des différentes nanosphères.

La biodisponibilité absolue est augmentée après injection des nanosphères, de façon significative pour les nanosphères de PLAGA et d'Eudragit.

14. ETUDE DES CONCENTRATIONS PLASMATIQUES D'ISRADIPINE APRES ADMINISTRATION PAR VOIE ORALE DES NANOSPHERES A DES RATS SHR

14.1 EVOLUTION CHRONOLOGIQUE DES CONCENTRATIONS PLASMATIQUES D'ISRADIPINE

L'évolution chronologique des concentrations plasmatiques moyennes après administration d'isradipine en solution dans le PEG ou incorporée dans des nanosphères de PCL et de PLAGA, est présentée sur la figure 38.

Nous pouvons constater :

- Pour toutes les formes étudiées, la concentration plasmatique maximale (C_{max}) est atteinte à $T_{max}=10$ min après administration par voie orale.
- La C_{max} la plus élevée est obtenue avec la solution ; la différence est significative par rapport aux nanosphères à T_{max} et aussi à $t=15$ min ($p<0,05$).
- La concentration plasmatique décroît après $t=15$ min rapidement pour la solution, atteignant des valeurs inférieures au seuil de détection à partir de $t=4$ h.
- Pour les nanosphères de PCL et de PLAGA, l'élimination plasmatique de l'isradipine est ralentie par rapport à la solution. Les concentrations plasmatiques diminuent très légèrement entre $t=1$ h et $t=8$ h.
- L'isradipine est toujours détectable dans le plasma 8 heures après administration par voie orale des nanosphères de PCL et de PLAGA.

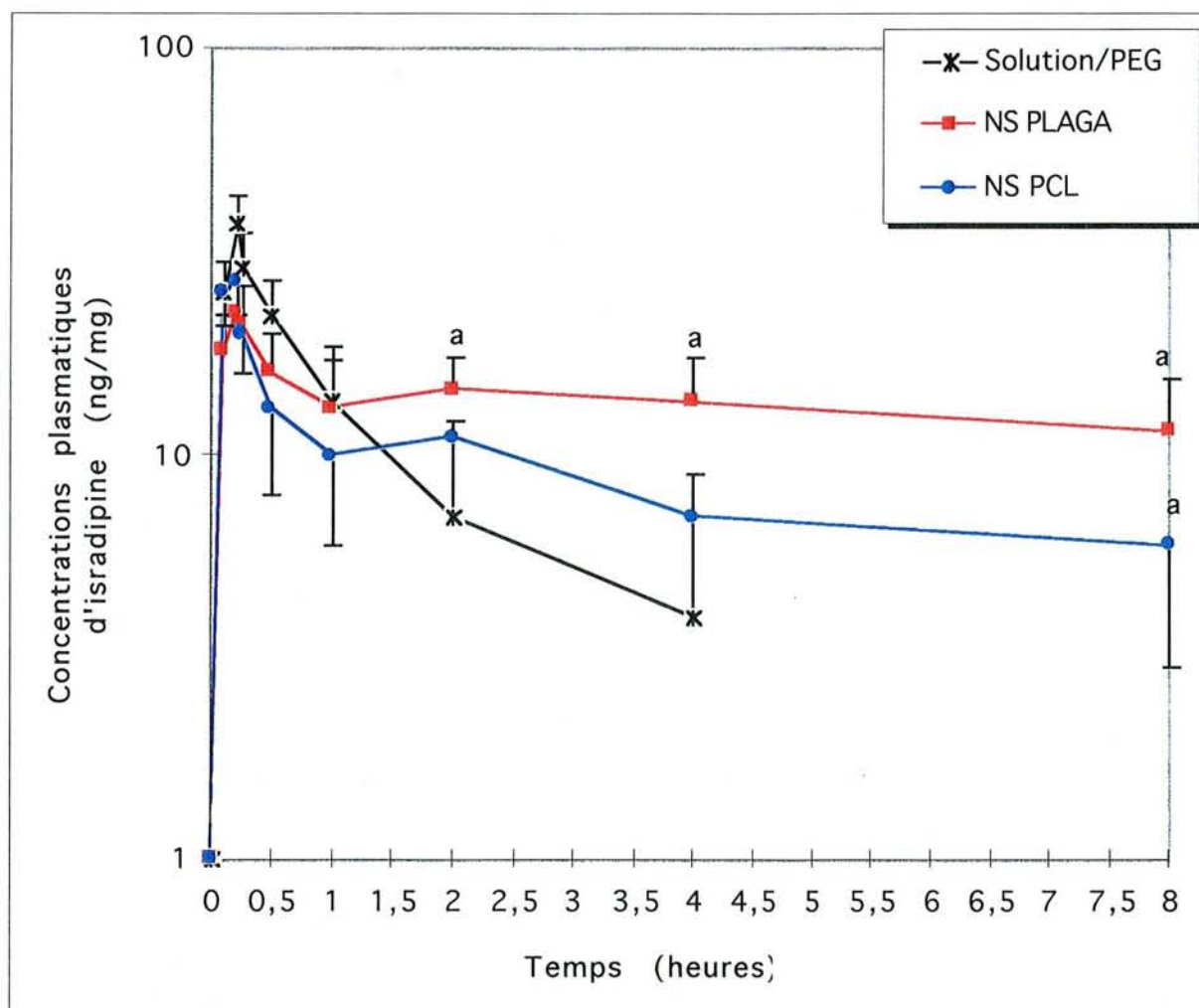


Figure 38 : Evolution chronologique des concentrations plasmatiques d'isradipine après administration orale à des rats SHR d'isradipine à la dose de 2,5 mg/kg, en solution dans le PEG ou incorporée dans des nanosphères de PCL et de PLAGA (n=3).

14.2 PARAMETRES PHARMACOCINETIQUES PLASMATIQUES

Les différents paramètres pharmacocinétiques sont présentés dans le tableau 22.

Tableau 22 : Paramètres pharmacocinétiques plasmatiques (moyennes $\pm$ esm) et biodisponibilité relative de l'isradipine administrée sous différentes formes pharmaceutiques, par voie orale, à la dose de 2,5 mg/kg, chez des rats SHR (n = 3).

<i>Formes d'isradipine</i>	<i>C_{max} (ng/ml)</i>	<i>MRT (h)</i>	<i>SSC_{0 → 8 h} (ng.h/ml)</i>	<i>F (%)</i>
Solution de référence	37 $\pm$ 13	0,9 $\pm$ 0,3	44 $\pm$ 16	100
Nanosphères de PCL	29 $\pm$ 10	3,2 $\pm$ 0,1 ^a	90 $\pm$ 7 ^a	206 ^a
Nanosphères de PLAGA	27 $\pm$ 9 ^a	3,6 $\pm$ 0,1 ^a	104 $\pm$ 5 ^a	237 ^a

Les paramètres pharmacocinétiques sont déterminés selon un modèle indépendant.

C_{max} : concentration plasmatique maximale, MRT : temps de résidence moyen ; SSC : surface sous la courbe de t=0 à t=8 h ; F : biodisponibilité relative par rapport à la solution de référence.

^a : Significativité versus solution d'isradipine dans le PEG (p<0,05).

La concentration plasmatique maximale d'isradipine après administration orale de la solution d'isradipine est plus élevée qu'après administration des nanosphères de PCL et de PLAGA.

Il n'a pas été possible de calculer la demi-vie d'élimination des différentes formes d'isradipine. La cinétique d'élimination de l'isradipine est proche d'un ordre 0 pour les nanosphères de PLAGA et dans une moindre mesure pour les nanosphères de PCL, puisque les concentrations varient peu entre les temps 1 et 8 h.

Le temps de résidence moyen et les aires sous courbes sont significativement augmentés pour les nanosphères comparées à la solution dans le PEG.

La biodisponibilité relative de l'isradipine est multipliée par un facteur supérieur à 2 quand elle est administrée sous forme de nanosphères de PCL ou de PLAGA, en comparaison à la solution dans le PEG.

Aucune différence significative n'est constatée entre les paramètres pharmacocinétiques des nanosphères de PCL et de PLAGA.

14.3 BIODISPONIBILITE ABSOLUE

Les études pharmacocinétiques réalisées sur les concentrations plasmatiques d'isradipine après administration soit orale, soit intraveineuse permettent de déterminer la biodisponibilité absolue des différentes formes d'isradipine.

En prenant comme référence la même forme pharmaceutique administrée par voie intraveineuse, les valeurs moyennes de biodisponibilité absolue sont égales à :

- $17,4 \pm 6,5$ % pour la solution dans le PEG,
- $29,9 \pm 5,1$ % pour les nanosphères de PCL,
- $31,5 \pm 8,4$ % pour les nanosphères de PLAGA.

L'analyse statistique permet de constater que la biodisponibilité absolue est augmentée de façon significative pour les nanosphères comparées à la solution ($p < 0,05$).

15. EVOLUTION CHRONOLOGIQUE DES CONCENTRATIONS LYMPHATIQUES D'ISRADIPINE APRES ADMINISTRATION INTRAGASTRIQUE DES NANOSPHERES CHEZ LE RAT OFA

15.1 VALIDATION DE LA METHODE DE DOSAGE CLHP DE L'ISRADIPINE DANS LA LYPHE

15.1.1 Temps de rétention de l'isradipine et de l'étalon interne

Un exemple de chromatogramme d'une solution dans la phase mobile contenant de l'isradipine (100 ng/ml) et du butamben (1 μ g/ml) est représenté sur la figure 39.

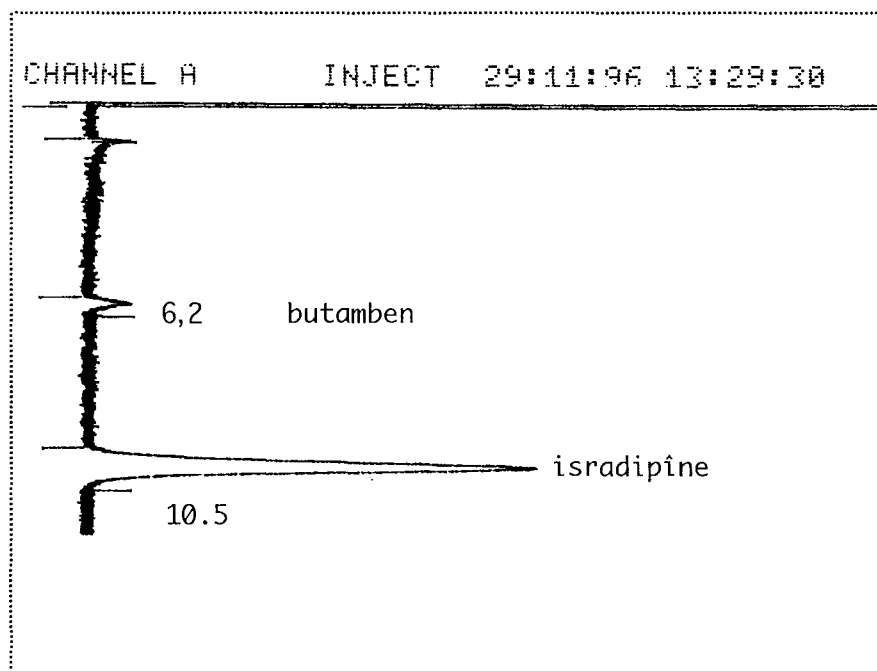


Figure 39 : Chromatogramme CLHP de l'isradipine en solution dans la phase mobile.

La figure 40 montre un chromatogramme d'un échantillon lymphatique contenant de l'isradipine et du butamben. Les pics respectifs de l'isradipine et du butamben sont facilement identifiables et situés à distance des pics correspondant aux éléments figurés de la lymphe.

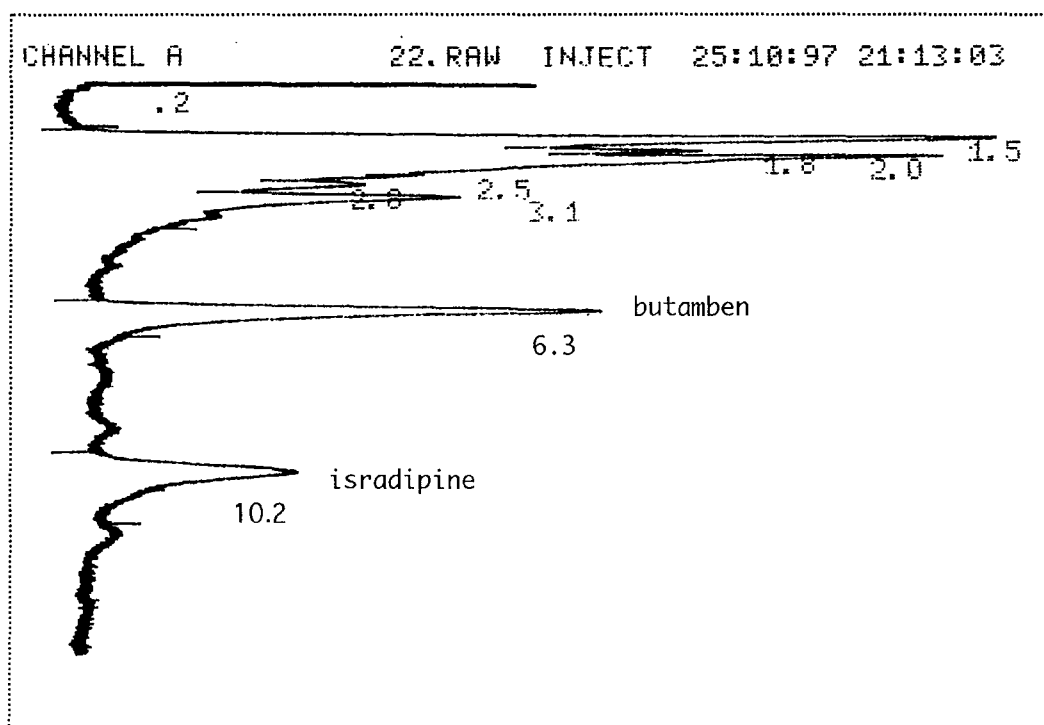


Figure 40 : Chromatogramme CLHP d'un échantillon lymphatique contenant de l'isradipine.

Dans les conditions chromatographiques choisies, nous montrons que :

- Le temps de rétention moyen du butamben est de $6,2 \pm 0,1$ min ;
- Le temps de rétention moyen de l'isradipine est de $10,4 \pm 0,2$ min.

15.1.2 Linéarité

La droite d'étalonnage construite à partir des rapports des surfaces des pics de l'isradipine et du butamben en fonction des concentrations en isradipine est représentée sur la figure 41.

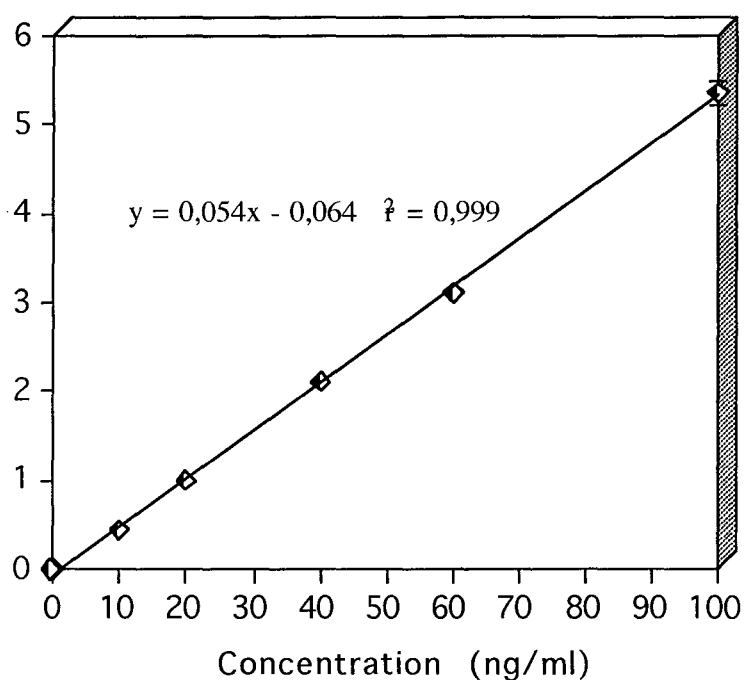


Figure 41 : Droite d'étalonnage du dosage de l'isradipine dans la lymphe par la méthode CLHP ($n=5$).

Nous montrons que la méthode est linéaire sur la gamme de concentrations lymphatiques d'isradipine comprises entre 10 et 100 ng/ml.

15.1.3 Limite de détection et limite de quantification

Nous montrons que :

- La plus faible concentration en isradipine détectable est 5 ng/ml.
- La plus faible concentration quantifiable est 10 ng/ml.

15.1.4 Reproductibilité et répétabilité

Nous montrons que :

- Le coefficient de reproductibilité déterminé sur 5 mesures pour la concentration en isradipine de 10 ng/ml est égal à 7,1 %.
- La répétabilité évaluée au cours de trois jours consécutifs est égal à 6,4 % pour la concentration en isradipine de 10 ng/ml.

15.1.5 Effet de la congélation

Les dosages, effectués le jour de l'ajout d'isradipine à un échantillon lymphatique et un mois puis 3 mois après, ont permis de constater que les concentrations trouvées dans les 3 cas sont comparables et d'affirmer que la congélation et la décongélation des échantillons biologiques n'ont aucune influence sur le dosage de l'isradipine.

15.2 DEBITS ET QUANTITES DE LYPHE RECOLTEE

Les figures 42 à 45 illustrent l'évolution chronologique des quantités moyennes cumulées de lymphe ainsi que des débits moyens lymphatiques pendant les 6 heures de prélèvement après administration intragastrique des différentes formes d'isradipine.

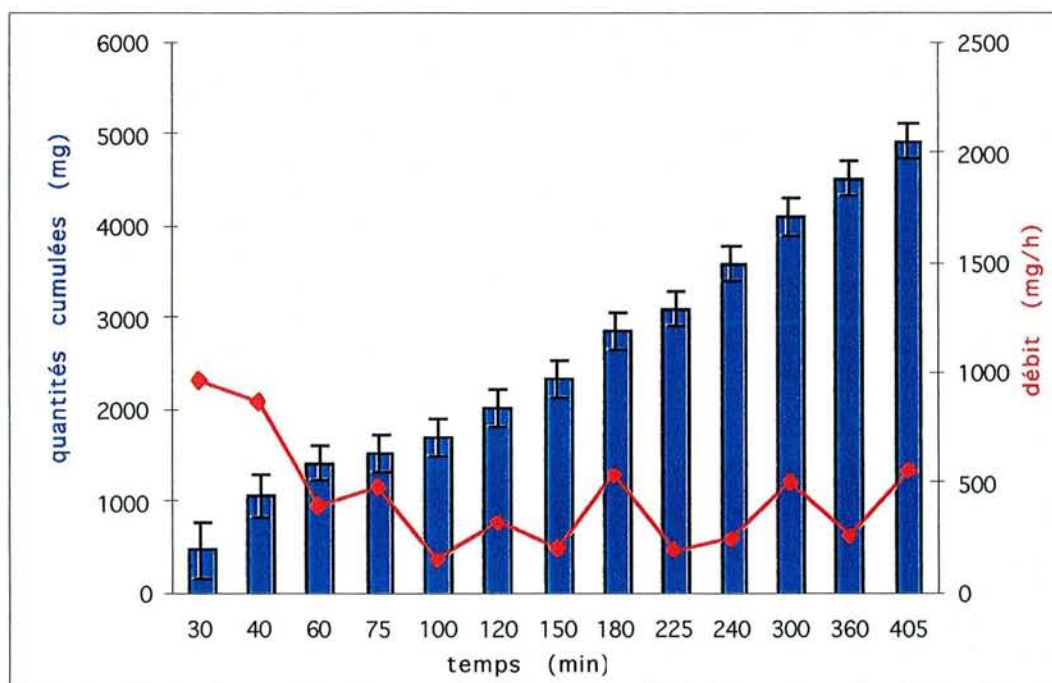


Figure 42 : Evolution chronologique des quantités lymphatiques moyennes cumulées (histogramme) et des débits lymphatiques moyens (courbe), après administration intragastrique de 2,5 mg/kg d'isradipine en solution dans le PEG chez le rat (n=5).

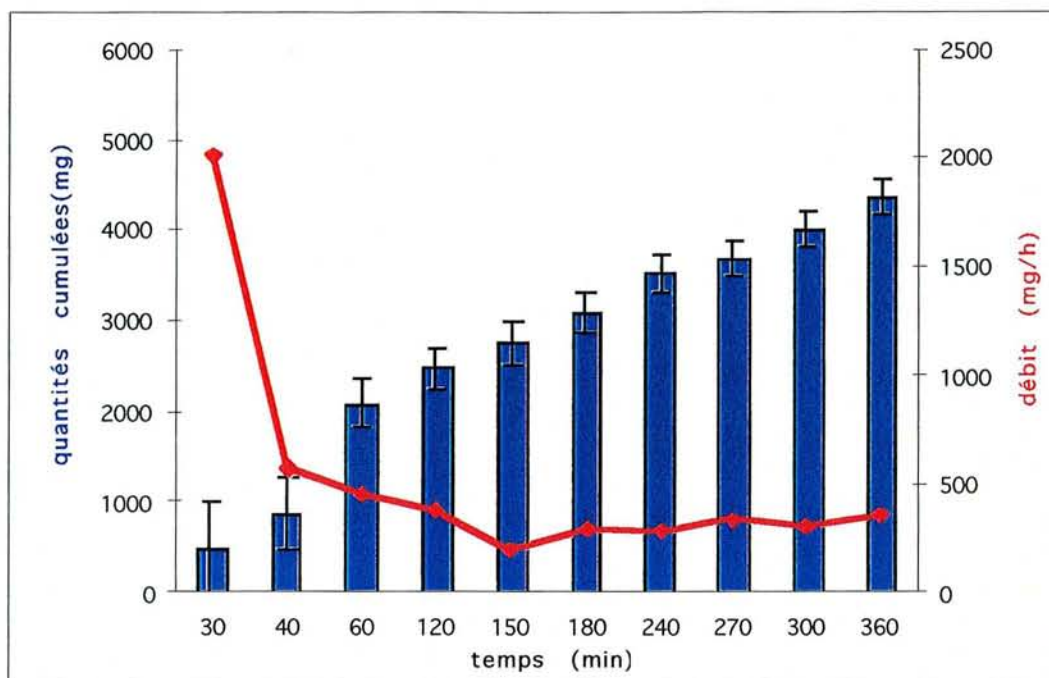


Figure 43 : Evolution chronologique des quantités de lymphe moyennes cumulées (histogramme) et des débits lymphatiques moyens (courbe) après administration intragastrique chez le rat d'isradipine (2,5 mg/kg) incorporée dans des nanosphères de PLAGA (n=5).

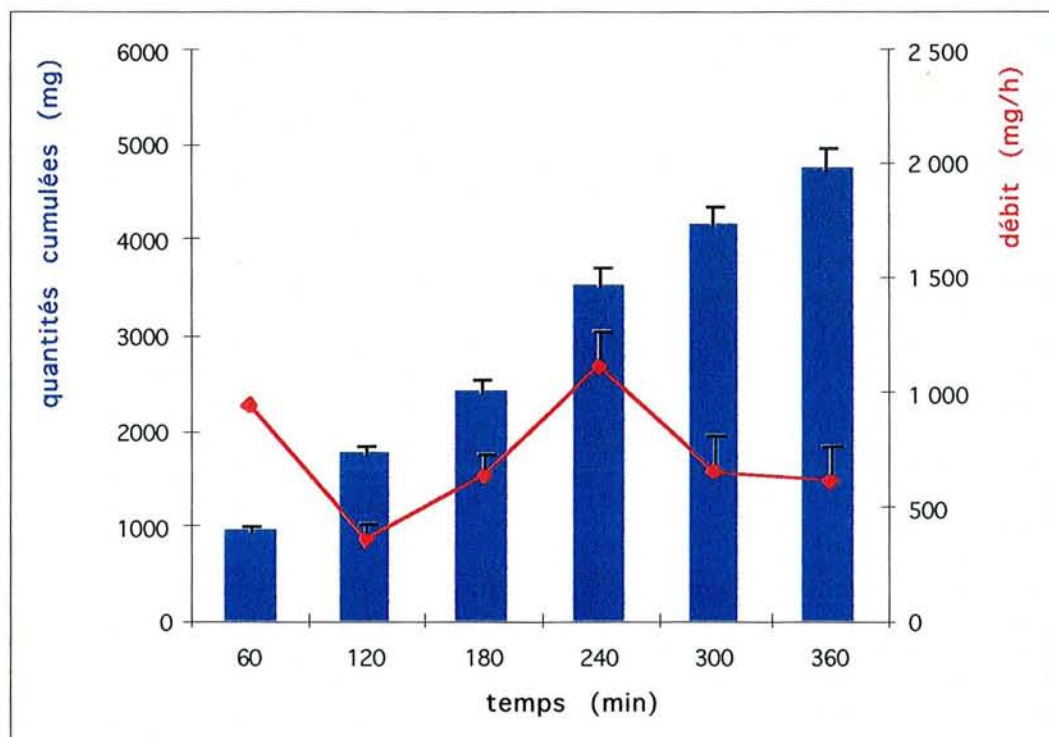


Figure 44 : Evolution chronologique des quantités lymphatiques moyennes cumulées (histogramme) et des débits lymphatiques moyens (courbe) après administration intragastrique chez le rat, d'isradipine (2,5 mg/kg) incorporée dans des nanosphères d'Eudragit.

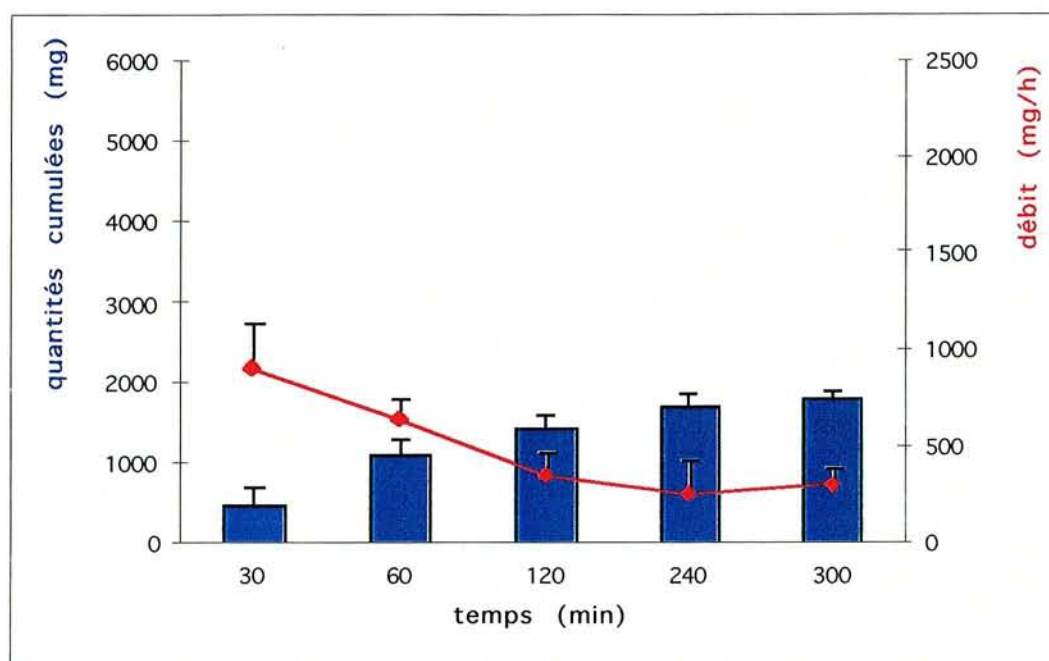


Figure 45 : Evolution chronologique des quantités lymphatiques moyennes cumulées (histogramme) et des débits lymphatiques moyens (courbe) après administration intragastrique chez le rat d'isradipine (2,5 mg/kg) incorporée dans des nanosphères de PCL (n=4).

Le tableau 23 indique les débits lymphatiques moyens observés pendant les 6 heures qui suivent l'administration intragastrique des différentes formes d'isradipine étudiées.

Tableau 23 : Débits lymphatiques moyens ($\pm$ esm) enregistrés après administration intragastrique des différentes formes d'isradipine, à la dose de 2,5 mg/kg, chez le rat.

Formes pharmaceutiques	Débit lymphatique moyen de la 1 ^{ère} heure (μ g/h)	n	Débit lymphatique moyen sur 6 h (μ g/h)	n
Eau	530 $\pm$ 105	5	422 $\pm$ 158	3
Solution de référence	543 $\pm$ 179	11	437 $\pm$ 165	5
Nanosphères de PCL	694 $\pm$ 184	5	495 $\pm$ 197	4
Nanosphères de PLAGA	452 $\pm$ 186	9	394 $\pm$ 78	5
Nanosphères d'Eudragit	847 $\pm$ 203	7	794 $\pm$ 204 *	5

* p<0,05 versus nanosphères de PLAGA.

Le tableau 23 montre que :

- Les débits lymphatiques moyens sur une heure sont comparables d'une forme à l'autre ; en revanche, le débit calculé sur 6 heures est plus élevé pour le groupe de rats ayant reçu les nanosphères d'Eudragit.
- Le débit moyen pendant la première heure est plus élevé que celui mesuré sur les 6 heures de l'expérience.

15.3 BILAN QUANTITATIF

15.3.1 Concentrations lymphatiques

La Figure 46 rend compte de l'évolution des concentrations lymphatiques moyennes d'isradipine (n= 3 à 5), exprimées en ng/mg, obtenues après administration intragastrique d'isradipine sous différentes formes, à la dose de 2,5 mg/kg.

La figure 46 permet de constater que :

- L'isradipine administrée sous forme de solution ou de nanosphères par voie intragastrique à la dose de 2,5 mg/kg chez des rats apparaît rapidement dans la lymphe mésentérique, puisqu'elle est dosable dès la première heure qui suit l'administration des différentes formes.
- L'isradipine disparaît de la lymphe mésentérique au bout de 3 h, 4 h et 6 h dans le cas de l'administration de la solution, des nanosphères de PCL et de PLAGA respectivement. L'isradipine est encore détectable au bout de 6 h pour les nanosphères d'Eudragit.
- Les concentrations maximales sont atteintes à des temps différents selon la forme considérée. Celles-ci sont obtenues dès la première heure qui suit l'administration pour la solution et les nanosphères de PCL, alors qu'elles sont atteintes durant la 2^{ème} heure et la 4^{ème} heure pour les nanosphères de PLAGA et d'Eudragit respectivement.
- Les concentrations maximales atteintes sont significativement plus importantes lorsque l'isradipine est incorporée dans des nanosphères plutôt que sous forme de solution.

15.3.2 Quantités cumulées et pourcentages de la dose administrée d'isradipine retrouvée dans la lymphe

La Figure 47 illustre l'évolution des quantités cumulées retrouvées au niveau lymphatique dont les valeurs sont reportées dans le tableau 24 ainsi que le pourcentage de la dose administrée retrouvé dans la lymphe après administration intragastrique des différentes formes d'isradipine.

Les quantités cumulées d'isradipine recueillies dans la lymphe au bout de 6 h après administration des nanosphères d'Eudragit, de PLAGA et de PCL sont respectivement environ 4,8, 4,2 et 2,5 fois plus élevées que la quantité cumulée d'isradipine retrouvée après administration de la solution d'isradipine dans le PEG (Tableau 24).

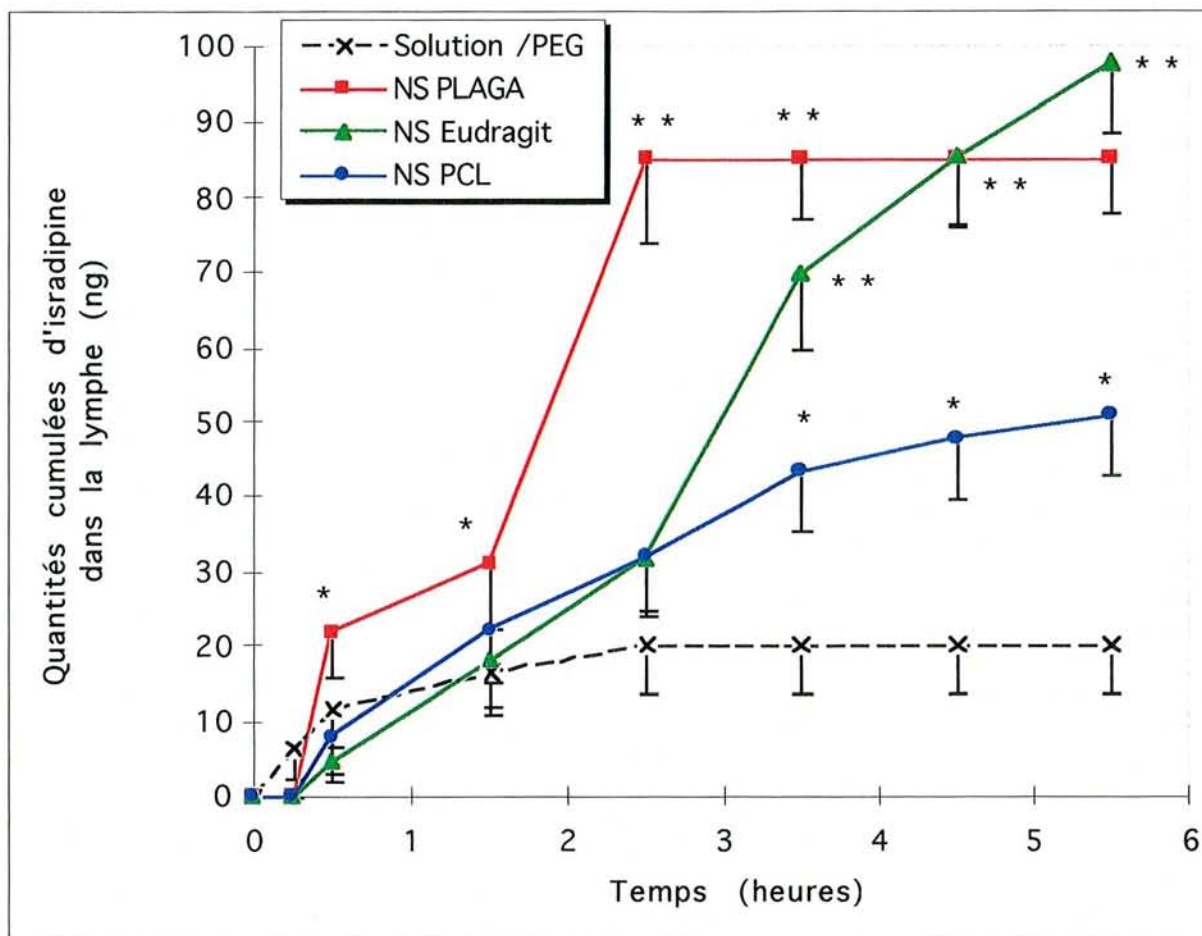


Figure 47 : Evolution chronologique des quantités cumulées moyennes d'isradipine ($n = 3$ à 5), retrouvées dans la lymphe mésentérique, après administration intragastrique de la solution dans le PEG et des nanosphères chez le rat.

Les courbes sont obtenues en assimilant chaque intervalle de temps à un point situé au centre de cet intervalle.

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ versus solution.

Tableau 24 : Comparaison des quantités cumulées et pourcentages de la dose administrée d'isradipine retrouvés dans la lymphe après administration intragastrique des différentes formes.

<i>Formes d'isradipine</i>	<i>Quantités cumulées retrouvées dans la lymphe (ng)</i>	<i>Pourcentages de la dose administrée retrouvée dans la lymphe (%)</i>
Solution dans le PEG	20 ± 9	0,003 ± 0,001
Nanosphères de PCL	51 ± 11 *	0,008 ± 0,002 *
Nanosphères de PLGA	85 ± 14 *	0,012 ± 0,004 *
Nanosphères d'Eudragit	97 ± 18 *	0,015 ± 0,004 *

* $p < 0,05$ versus solution.

Les pourcentages de la dose d'isradipine administrée retrouvés dans la lymphe au bout des 6 heures après administration des nanosphères de PCL, PLGA et Eudragit sont respectivement 2,6, 4 et 5 fois plus importantes que celles obtenues avec la solution d'isradipine dans le PEG.

15.4 PHARMACOCINETIQUE LYMPHATIQUE

Les principaux paramètres pharmacocinétiques déterminés à partir des concentrations lymphatiques d'isradipine dosées après administration intragastrique des différentes formes pharmaceutiques sont reportés dans le tableau 25.

Les résultats montrent une augmentation de la biodisponibilité relative lymphatique après incorporation de l'isradipine dans les nanosphères. Celle-ci s'accompagne d'une augmentation significative des SSC lymphatiques et des Cmax en comparaison à la solution dans le PEG.

Le temps de résidence moyen dans la lymphe de l'isradipine administrée sous forme de nanosphères est prolongé (la différence est significative pour les nanosphères d'Eudragit comparées à la solution dans le PEG).

Tableau 25 : Paramètres pharmacocinétiques lymphatiques (moyennes $\pm$ esm) et biodisponibilité lymphatique relative de l'isradipine administrée sous forme de solution dans le PEG ou de nanosphères, par voie intragastrique à des rats, à la dose de 2,5 mg/kg (calculés d'après un modèle indépendant).

Paramètres	Solution de référence n=6	Nanosphères de PCL n=4	Nanosphères de PLAGA n=6	Nanosphères d'Eudragit n=3
SSC (ng.h/ml)	27 $\pm$ 11	98 $\pm$ 32 *	105 $\pm$ 36 *	102 $\pm$ 15 *
MRT (h)	0,9 $\pm$ 0,3	1,3 $\pm$ 0,1	2,1 $\pm$ 0,6	3,20 $\pm$ 0,25 *
Cmax (ng/ml)	19 $\pm$ 7	57 $\pm$ 6 *	38 $\pm$ 11 *	35 $\pm$ 6 *
Tmax (h)	0,8 $\pm$ 0,8	0,7 $\pm$ 0,5	1,8 $\pm$ 0,5	2,5 $\pm$ 0,1 *
F (%)	100	329	392 *	383 *

SSC : surface sous la courbe (0 à 6 heures) ; CI : clairance totale ; MRT : temps de résidence moyen ; $t_{1/2}$: demi-vie d'élimination ; F : Biodisponibilité lymphatique relative

* $p < 0,05$ versus solution.

DISCUSSION

16. DISCUSSION DES RESULTATS OBTENUS *IN VITRO*

Nous avons préparé selon le même procédé de fabrication des nanosphères chargées en isradipine qui diffèrent par la nature du polymère qui les constitue. Nous avons en effet utilisé des polyesters aliphatiques biodégradables, la poly(ϵ -caprolactone) et les copolymères de l'acide D,L lactique-co-glycolique 50/50 (PLAGA), ainsi que des polymères acryliques non biodégradables, les Eudragit® RL et RS en mélange 50/50.

D'une part, la caractérisation physico-chimique des nanosphères a révélé qu'il existait des différences de taille et de charge de surface entre les nanosphères.

D'autre part, l'incorporation du principe actif, l'isradipine, dans les nanosphères est plus ou moins efficace selon le polymère considéré. Les propriétés des polymères (le caractère hydrophile ou hydrophobe, la nature biodégradable ou non, la structure amorphe ou cristalline ...) sont autant de paramètres inter-dépendants pouvant influencer le comportement *in vivo* des nanosphères ainsi que du principe actif incorporé.

Les études de libération *in vitro* qui sont réalisées à des fins pronostiques de l'action pharmacodynamique du principe actif, ont démontré que les nanosphères avaient un profil de libération modifié et ralenti par rapport à la solution de référence. Les études de libération *in vitro* n'ont cependant pas permis de différencier les nanosphères entre elles.

Une discussion des différents points soulevés jusqu'ici tentera d'apporter des explications aux résultats obtenus. Nous essaierons de discerner à la fin de cette discussion sur les paramètres physico-chimiques, quelle(s) forme(s) parmi les nanosphères de PCL, PLAGA ou Eudragit est(sont) susceptible(s) de présenter les caractéristiques d'une forme à libération prolongée, avant de le vérifier en abordant les résultats obtenus *in vivo*.

Le tableau 26 a pour intérêt de rassembler les différentes caractéristiques physico-chimiques des nanosphères étudiées, afin de pouvoir établir des comparaisons et d'en faire la discussion.

Tableau 26 : Principaux résultats concernant la caractérisation physico-chimique des nanosphères d'isradipine.

Nanosphères d'isradipine (0,5 mg/ml)	Taille (nm)	Potentiel Zeta (mV)	Pourcentage d'incorporation de l'isradipine (%)	Analyse thermique différentielle
PCL	195 †‡	- 26,7	86,9	T _f = + 55,2°C T _g = - 53,4°C
PLAGA	123 *	- 32,4	97,3	T _g = + 32,2°C
EUDRAGIT	129 *	+ 65,1	76,4 †	T _g = + 47,3°C

T_f (°C) : température de fusion ; T_g (°C) : température de transition vitreuse

* p<0,05 versus nanosphères de PCL

† p<0,05 versus nanosphères de PLAGA

16.1 LA METHODE DE PREPARATION DES NANOSPHERES

Nous avons préparé selon la méthode de nanoprecipitation des nanosphères d'isradipine à partir de trois polymères : PCL, PLAGA et Eudragit RL et RS. Cette méthode de fabrication est parfaitement adaptée à de tels polymères insolubles dans l'eau, mais solubles dans l'acétone, ainsi qu'à l'isradipine, principe actif lipophile et donc très soluble dans l'acétone. En outre, il s'agit d'une technique simple et relativement peu coûteuse, pouvant être, *a priori*, facilement transposée à l'échelon industriel. L'inconvénient est le recours à un solvant organique dont les traces après évaporation doivent pouvoir être quantifiées pour autoriser une utilisation chez l'homme.

16.2 CARACTERISTIQUES PHYSICOCHIMIQUES DES NANOSPHERES

Nous avons ensuite caractérisé les nanosphères du point de vue de leur taille et de leur charge de surface, deux caractéristiques physico-chimiques permettant d'évaluer, en premier lieu, la stabilité des suspensions obtenues.

16.2.1 Influence de la taille des nanosphères

Les nanosphères d'isradipine que nous avons étudiées ont une taille moyenne comprise entre 110 et 120 nm pour les nanosphères de PLAGA ou d'Eudragit et autour de 200 nm pour celles de PCL. Les nanosphères non chargées en isradipine ont une taille comparable à celle des nanosphères chargées ;

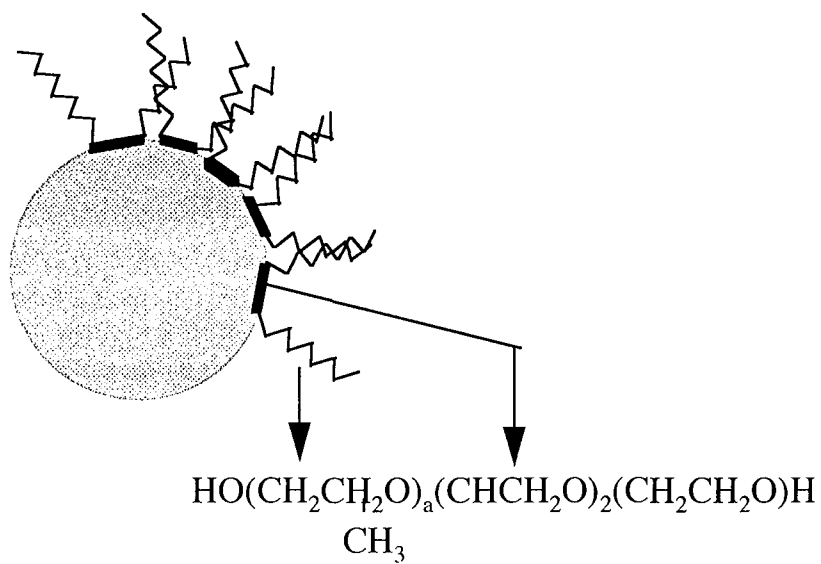


Figure 48 : Schéma d'adhésion d'un Poloxamer sur une microsphère de polystyrène, d'après [ILLUM, 1986]

l'incorporation de l'isradipine à la concentration de 0,5 mg/ml ne modifie pas ce paramètre. Les indices de polydispersion sont inférieurs à 0,3 pour les trois suspensions de nanosphères étudiées, ce qui signifie que la distribution de taille est homogène et unimodale pour chaque préparation.

16.2.2 Influence du potentiel Zêta

Les nanosphères de PCL ou de PLAGA possèdent une charge de surface négative (-29 et -32 mV, respectivement) alors que celles d'Eudragit sont chargées positivement (+67 mV).

La charge électrique de surface des particules, estimée par le potentiel Zêta, est un paramètre contrôlant aussi, avec la taille, la stabilité des suspensions de nanosphères. Selon BENITA et LEVY [1993], des valeurs élevées de potentiel Zêta traduisent l'existence d'une barrière énergétique importante autour des particules, ce qui entraîne leur répulsion. Il est admis, pour le potentiel Zêta, qu'une valeur absolue minimale de 20 mV assure la stabilité des suspensions colloïdales. Les nanosphères étudiées possèdent des valeurs de potentiel Zêta supérieures à ce seuil, ce qui assure une bonne stabilité des suspensions.

Le potentiel Zêta traduit du point de vue ionique, l'interface entre les nanosphères et le milieu liquide environnant. L'ionisation des groupements carboxyliques terminaux de la PCL ou du PLAGA, deux polyesters aliphatiques, explique la charge négative obtenue pour les nanosphères correspondantes. En revanche, la charge positive observée pour les nanosphères d'Eudragit est conférée par l'ionisation des groupements ammonium quaternaires des molécules d'Eudragit.

16.2.3 Influence du Pluronic® F68

La stabilité des suspensions des nanosphères de PCL et PLAGA est aussi apportée par la présence d'un tensioactif dans la formule, le Pluronic® F68. Ce surfactant non ionique, de la famille des Poloxamers, a pour propriété de diminuer l'adhésion des particules entre elles et donc la sédimentation, par un processus de stabilisation stérique. De telles molécules sont constituées d'une partie hydrophobe, formée par une chaîne poly(oxypropylène) très affine pour les surfaces hydrophobes (en l'occurrence, le polymère) et de deux bras hydrophiles s'étendant dans le milieu environnant, représentés par les chaînes d'oxyde d'éthylène (Figure 48). Celles-ci ont une taille estimée à 144 Angström pour le Pluronic F68®, ce qui permet de diminuer l'effet des forces attractives de type Van der Waals [ILLUM, 1987].

La présence de groupes ammonium quaternaires dans les molécules d'Eudragit est à l'origine de faibles tensions interfaciales [BODMEIER, 1991]. C'est pourquoi, il est tout à fait inutile d'ajouter un surfactant pour stabiliser les nanosphères d'Eudragit.

16.3 RENDEMENT D'INCORPORATION DE L'ISRADIPINE DANS LES NANOSPHERES

Nous avons évalué l'efficacité d'incorporation de l'isradipine dans les nanosphères par la méthode de filtration sur gel, décrite par BECK et coll. [1990]. Cette méthode présente l'avantage de pouvoir séparer la phase solide dispersée de la phase continue, aqueuse de la suspension de nanosphères. La détermination du rendement d'incorporation a révélé qu'environ 76, 87 et 98 % de l'isradipine sont respectivement incorporés dans les nanosphères d'Eudragit, de PCL et de PLAGA (Tableau 27). Le principe de la préparation des nanosphères reposant sur la précipitation du polymère et du principe actif, ce dernier peut être soit incorporé dans la matrice polymère, soit éventuellement adsorbé à la surface des nanosphères.

Tableau 27 : Comparaison des caractéristiques physico-chimiques des nanosphères.

Nanosphères	Pourcentage d'incorporation (%)	Diamètre (nm)	Charge* en isradipine (mg)	Surface** (cm ²)
PCL	86,8 ± 2,4	195 ± 7	3,5 ± 0,1 ‡	1923 ± 72 ‡
PLAGA	97,3 ± 3,6 ‡	123 ± 2 ◇	3,9 ± 0,7 ‡	3049 ± 55
Eudragit	76,4 ± 2,8	129 ± 2 ◇	1,3 ± 0,1	6976 ± 110

* charge en isradipine (mg) pour 100 mg de polymère

* * surface occupée par 1 ml de suspension de nanosphères, calculée selon la formule suivante :
$$S = \frac{3m}{r\rho}$$

où m est la masse de nanosphères dans 1 ml de suspension (≡ masse de polymère),
r est le diamètre moyen d'une nanosphère et ρ, la masse volumique du polymère (≡ 1).
‡ : p < 0,05 versus nanosphères d'Eudragit, ◇ : p < 0,05 versus nanosphères de PCL

On sait que d'une part, une surface plus importante offre une plus grande probabilité pour le principe actif de s'y fixer et que d'autre part, la surface des nanosphères est inversement proportionnelle à leur diamètre. Ces raisons peuvent expliquer la différence de pourcentage d'incorporation entre les

nanosphères de PCL et de PLAGA (Tableau 27). Malgré une surface plus élevée, les nanosphères d'Eudragit qui présentent la surface la plus élevée, en raison de la quantité de polymère aussi plus élevée (3 % contre 1,25 % pour les autres nanosphères) ont un pourcentage d'incorporation plus faible. Les nanosphères préparées avec des concentrations en Eudragit inférieures à celle utilisée (3 %) conduisaient à des suspensions instables. Une autre explication du pourcentage d'incorporation plus faible avec les nanosphères d'Eudragit est due à l'augmentation de la solubilité de l'isradipine dans le milieu à base d'Eudragit. En effet, nous avons mis en contact les suspensions de nanosphères non chargées en isradipine avec une quantité d'isradipine supérieure à la solubilité dans l'eau, puis nous avons centrifugé la suspension ainsi constituée et dosé par spectrophotométrie UV la concentration en isradipine dans le surnageant. Les résultats sont présentés dans le tableau 28.

Tableau 28 : Solubilité de l'isradipine dans une suspension de nanosphères

<i>Nanosphères</i>	<i>PCL</i>	<i>PLAGA</i>	<i>Eudragit</i>
Concentration en isradipine dans le surnageant $^*(\mu\text{g/ml})$	$4,8 \pm 1,5^{a,b}$	$26,5 \pm 2,1^a$	$114,3 \pm 4,5$

* Les suspensions de nanosphères non chargées en isradipine (n=3 par forme) ont été mises en contact pendant 30 min avec une quantité d'isradipine (25 mg/10 ml de suspension). Après centrifugation à 4000 g, la concentration en isradipine a été déterminée dans le surnageant par spectrophotométrie UV.

^a : $p < 0,05$ versus nanosphères d'Eudragit, ^b : $p < 0,05$ versus nanosphères de PLAGA.

La concentration en isradipine dans le surnageant est significativement plus élevée pour les nanosphères d'Eudragit comparées aux autres nanosphères. Cette expérience montre que la solubilité dans l'eau de l'isradipine est fortement augmentée en présence des nanosphères d'Eudragit, ce qui explique les taux d'incorporation plus faibles observés avec ces derniers. De même, la solubilité de l'isradipine est également augmentée dans le milieu à base de PLAGA par rapport au milieu à base de PCL.

16.4 ETUDES DE LIBERATION *IN VITRO*

Le mécanisme de libération, le coefficient de diffusion à l'intérieur du système polymère et la vitesse de biodégradation du polymère sont les principaux facteurs gouvernant la cinétique de libération du principe actif incorporé dans les nanosphères. La vitesse de libération du principe actif est aussi influencée par l'environnement biologique. Les nanosphères peuvent être recouvertes de

protéines (opsonisation), ce qui constitue une barrière à la diffusion, et retarde ou gêne la libération. Les nanosphères peuvent aussi interagir avec les membranes biologiques avec lesquelles elles sont en contact. Par conséquent, les cinétiques de libération *in vitro* peuvent avoir des profils différents de ceux rencontrés *in vivo*. Néanmoins, dans le but de caractériser le système et de comprendre les phénomènes mis en jeu dans le mode de libération, la détermination des profils *in vitro* s'avère de première importance.

Les études de libération *in vitro* dans les différents milieux de libération ont montré que les nanosphères ont un profil de libération ralenti et prolongé par rapport à la solution d'isradipine de référence dans le PEG.

Pour les trois types de nanosphères, quelque soit le milieu de libération considéré, on distingue une première phase de libération, pouvant être attribuée à la fraction d'isradipine qui est adsorbée ou faiblement liée à la surface des nanosphères, plutôt qu'à la fraction d'isradipine incorporée à l'intérieur de la matrice polymère. Cette phase initiale pourrait expliquer la libération initiale élevée ("burst effect"), même si la vitesse de libération est faible. La seconde phase, à vitesse de libération nettement ralentie, résulte de la pénétration du milieu de libération dans les nanosphères, de la dissolution de l'isradipine et de la diffusion hors des nanosphères, vers le milieu extérieur, puis à travers la membrane de dialyse.

La méthode du sac de dialyse présente certaines limites, en particulier le fait que les conditions « sink » ne sont respectées que dans le milieu de libération et pas à l'intérieur du sac de dialyse où commence la libération [WASHINGTON, 1989]. La libération de l'isradipine et sa dilution dans le milieu extérieur dépendent surtout du coefficient de partage entre la suspension et le milieu aqueux environnant et de la diffusion de l'isradipine à travers la membrane de dialyse. Nous avons essayé d'autres méthodes de libération *in vitro*, mais chacune présentait des inconvénients beaucoup plus limitants. Ainsi, la méthode de dialyse inverse développée par LEVY et BENITA [1990] conduisait à des résultats peu reproductibles ; la méthode par dilution directe et ultracentrifugation, utilisée par [HENRY-MICHELLAND, 1987] ou [SEIJO, 1990], ne permettait pas de réaliser une cinétique de libération, étant donnée la durée de centrifugation demandée pour séparer chaque échantillon prélevé ; la méthode d'ultracentrifugation centrifuge d'AMMOURY [1989] n'était pas applicable, en raison de l'adsorption de l'isradipine sur la membrane ultrafiltrante et du colmatage de la membrane par la suspension de nanosphères.

Comme les formes étudiées sont destinées à l'administration orale, il était logique d'utiliser des milieux de libération reproduisant les conditions physiologiques du tractus digestif, à savoir une solution aqueuse acide de

pH 1,3 (comme au niveau stomacal) et un tampon aqueux de pH 6,8 (comme au niveau intestinal), chacun des milieux étant maintenu à 37°C.

Si les profils de libération à partir des nanosphères sont similaires pour les deux pH étudiés, et correspondent à ceux d'une forme à libération ralentie, la vitesse de libération *in vitro* de l'isradipine semble dépendre du pH puisqu'elle est significativement plus rapide à pH 6,8 qu'à pH 1,3. Toutefois, la solubilité de l'isradipine est présentée comme indépendante du pH.

La libération *in vitro* a aussi été étudiée dans une solution d'albumine. Bien que l'isradipine soit fortement liée aux protéines plasmatiques, la libération *in vitro* n'est pas pour autant plus importante dans un tel milieu. Cependant, cette expérience a pour intérêt de révéler qu'à t=24 h, la quantité d'isradipine libérée est significativement moins importante pour les nanosphères d'Eudragit comparées à celles de PCL et de PLAGA (51 ± 3 % contre respectivement 61 ± 4 et 63 ± 3 %). La concentration en polymère, plus élevée pour les nanosphères d'Eudragit (3 % contre 1,25 % pour les autres nanosphères), alors que la concentration en isradipine est identique, pourrait expliquer que la libération soit plus lente à partir des nanosphères d'Eudragit.

16.5 INFLUENCE DES PROPRIETES MECANIQUES DES POLYMERES

La libération est régie par la nature et la structure du système matriciel formé par les nanosphères. Les mécanismes susceptibles de contrôler la libération sont multiples, selon qu'il y a dégradation ou non du polymère ; cependant, la diffusion est le mode intervenant le plus fréquemment. La vitesse de diffusion du principe actif au sein de la matrice polymère représente l'étape limitante de la mise à disposition du principe actif. Les propriétés mécaniques des polymères peuvent contrôler la vitesse de diffusion.

16.5.1 Influence du caractère vitreux

Le milieu environnant pénètre le système polymère seulement si le polymère est à l'état caoutchouteux, c'est-à-dire quand les chaînes macro-moléculaires jouissent d'une certaine mobilité et flexibilité et se trouvent donc à une température supérieure à la température de transition vitreuse (T_g). A des températures inférieures à T_g , le polymère est à l'état vitreux ou amorphe. A la température corporelle, la PCL qui a une T_g très abaissée (-65°C) se trouve à l'état caoutchouteux, dans les nanosphères non chargées en principe actif, alors que le PLAGA et les Eudragit restent à l'état vitreux (T_g voisines de 50°C).

Les études de DSC ont montré que l'incorporation de l'isradipine dans les nanosphères entraîne une diminution de la température de transition vitreuse de tous les polymères. Ce phénomène traduit l'action bien connue des petites molécules, et notamment des plastifiants, qui assurent la plastification des polymères. Cet effet est surtout conséquent pour les nanosphères de PLAGA puisque la T_g est abaissée à 32°C. L'augmentation de la mobilité et flexibilité des chaînes polymères qui en résulte pourrait favoriser la pénétration du milieu liquide environnant, ce qui faciliterait la libération du principe actif. En revanche, après incorporation de l'isradipine dans les nanosphères d'Eudragit, les chaînes polymères restent dans une structure figée, à l'état vitreux, ce qui ne facilite pas la libération de l'isradipine.

Le coefficient de diffusion du soluté dans le polymère varie avec la nature du polymère : il est élevé dans les polymères caoutchouteux et il est faible dans les polymères vitreux. Cette différence pourrait expliquer que les nanosphères d'Eudragit libèrent quantitativement moins d'isradipine que les autres nanosphères.

A côté de la diffusion, d'autres mécanismes de libération peuvent intervenir. ASO [1994] a montré que le mécanisme de dégradation et de libération des principes actifs à partir de microsphères de poly(D,L-lactide) dépendait de la température. A des températures supérieures à la T_g du polymère, la dégradation a lieu en profondeur et la libération est un processus contrôlé par la diffusion. Mais, à des températures inférieures à la T_g des microsphères, la dégradation de la matrice est limitée à la surface, la libération résultant de l'érosion de la matrice. Cette étude, dont les conclusions reposent sur les différences de T_g des polymères, est en faveur d'une libération à partir des nanosphères d'Eudragit selon un mécanisme de bioérosion plus lent que celui faisant intervenir la diffusion pour les nanosphères de PCL et de PLAGA.

16.5.2 Influence du degré de cristallinité

D'autre part, le coefficient de diffusion dépend aussi du degré de cristallinité du polymère : dans les polymères semi-cristallins comme la PCL, les cristallites provoquent un effet d'obstruction stérique à la diffusion, rendant le domaine cristallin imperméable au soluté. En outre, dans l'hypothèse d'une dégradation concomitante du processus de libération du principe actif, il est montré que la proportion de la phase cristalline de la PCL s'accroît au fur et à mesure du clivage des chaînes macromoléculaires du domaine amorphe [PITT, 1987].

16.5.3 Influence du caractère hydrophile du polymère

En général, la quantité de principe actif libéré dépend du caractère hydrophile du polymère. Les polymères biodégradables hydrophiles subissent une

Tableau 29 : Masse moléculaire des polymères dans les nanosphères et perte relative de la masse moléculaire des polymères après dialyse pendant 24 h des nanosphères.

<i>Polymère</i>	PCL	PLAGA
<i>Masse moléculaire dans les nanosphères</i>	54630 ± 620	51470 ± 530
<i>Perte relative de la masse moléculaire</i>	2,9 ± 0,7 %	2,3 ± 0,5 %

Les résultats sont exprimés en moyenne ± écart-type (n=3 par polymère).

Les masses moléculaires des polymères dans les nanosphères ont été déterminées par chromatographie par perméation de gel, après lyophilisation des suspensions de nanosphères [LEMOINE et coll., 1997].

La perte relative (ΔM) de la masse moléculaire des polymères dans les nanosphères après dialyse pendant 24 h des suspensions de nanosphères dans un tampon à pH 6,8, à 37°C est calculée selon la formule suivante :

$$\Delta M = \frac{Mw_f - Mw_i}{Mw_i} \times 100 \quad \text{avec} \quad \begin{array}{l} Mw_i : \text{masse moléculaire avant dialyse} \\ Mw_f : \text{masse moléculaire après dialyse} \end{array}$$

hydrolyse dans toute la masse, après pénétration du milieu aqueux environnant. Le PLAGA, polymère hydrophile par rapport à la PCL et aux Eudragit RL et RS, pourrait être plus sensible à l'hydrolyse qui interviendrait en même temps que la diffusion du principe actif.

Dans notre équipe, LE VERGER [1997] a suivi par chromatographie de perméation de gel, la modification relative de la masse moléculaire du PLAGA et de la PCL des nanosphères au cours de la libération *in vitro* de l'isradipine dans un tampon phosphate à pH 6,8. La perte de masse du PLAGA ou de la PCL au bout de 24 h de dialyse était estimée à 2 % et 3 % respectivement (Tableau 29). Ce faible taux suggère que si la bioérosion des nanosphères de PCL et de PLAGA existe, il s'agit d'un phénomène trop lent, du moins *in vitro*, pour intervenir dans les mécanismes de libération du principe actif incorporé.

16.6 INFLUENCE DE L'ETAT PHYSICO-CHIMIQUE DU PRINCIPE ACTIF

La cinétique de libération à partir des nanosphères dépend aussi de l'état physique du principe actif [WASHINGTON, 1990].

Le principe actif peut se trouver au sein des nanosphères sous deux états possibles : il peut être dispersé soit à l'état moléculaire (solution solide), soit à l'état précipité dans le polymère [MAGENHEIM et BENITA, 1991 ; BODMEIER et MAINCENT, 1998]. La disparition du pic de fusion de l'isradipine que nous avons observée après son incorporation dans les trois préparations de nanosphères traduit le passage de l'état solide, cristallin, à l'état amorphe dans les nanosphères. L'isradipine forme ainsi une "solution solide" dans les nanosphères, ce qui est favorable à sa dissolution dans les liquides environnants au sein de la matrice polymère.

Les études de DSC ont montré également que l'incorporation de l'isradipine entraînait une diminution significative de la température de transition vitreuse (T_g) du PLAGA et de celle de la PCL à l'intérieur des nanosphères ; en revanche, l'incorporation de l'isradipine dans les nanosphères d'Eudragit ne faisait pas varier la T_g des polymères.

Cet effet de l'isradipine pourrait traduire l'existence d'interactions avec la PCL et le PLAGA, avec pour conséquence une modification de leurs propriétés mécaniques. Cet effet est connu dans la littérature. BODMEIER et CHEN [1989] ont rapporté l'existence d'interactions entre les fonctions amines de principes actifs tels que la quinidine ou le propranolol, et les fonctions acides des copolymères d'acides lactique et glycolique. Ces interactions provoquent la formation d'un complexe insoluble très stable, ralentissant par conséquent la

libération du principe actif [MAULDING, 1986 ; MIYAJIMA, 1998 ; BODMER et coll., 1992].

Ce même type d'interactions a été constaté dans plusieurs études entre les groupes ammonium quaternaires des Eudragit® et les fonctions acides de certains principes actifs : acide salicylique [JENQUIN, 1990 ; BETEN, 1992], cartéolol [HOLGADO, 1995 ; VACHON, 1998]. Cependant, de telles interactions ne peuvent pas être envisagées entre les Eudragit RL/RS et l'isradipine qui n'est pas ionisable.

Les résultats obtenus *in vitro* n'ont pas permis de sélectionner un type de nanosphère plutôt qu'un autre pour les études *in vivo*. La discussion des résultats souligne la complexité des paramètres physico-chimiques caractérisant les nanosphères étudiées et la multiplicité des facteurs pouvant influencer la libération *in vitro* du principe actif incorporé. La plupart du temps, nous n'avons pu proposer que des hypothèses, quant aux mécanismes mis en jeu.

Toutefois, certaines conclusions peuvent être dégagées.

- La taille et le potentiel de surface des nanosphères préparées permettent d'assurer une bonne stabilité des suspensions. La méthode de préparation permet d'incorporer l'isradipine de façon efficace et les profils de libération *in vitro* obtenus sont ceux de formes à libération modifiée et ralentie.
- Le processus de libération *in vitro* à partir des nanosphères de PCL et de PLAGA ferait intervenir essentiellement un mécanisme de diffusion, comme en témoigne l'allure des profils de libération *in vitro*. Cependant, certaines propriétés spécifiques des polymères étudiés permettent d'envisager d'autres mécanismes.

La nature semi-cristalline de la PCL serait le principal facteur expliquant la libération ralentie à partir des nanosphères de PCL.

Les interactions entre l'isradipine et les groupes nucléophiles du PLAGA joueraient un rôle non négligeable dans le ralentissement de la libération à partir des nanosphères.

Le caractère vitreux des Eudragit, une prédisposition à un mécanisme de bioérosion et une formulation utilisant une quantité de polymère plus importante expliqueraient que les nanosphères d'Eudragit libèrent plus lentement l'isradipine que les autres nanosphères.

17. DISCUSSION DES RESULTATS OBTENUS *IN VIVO*

17.1 PHARMACOCINETIQUE PLASMATIQUE

17.1.1 Administration intraveineuse

L'isradipine administrée sous forme de solution est rapidement éliminée de la circulation ($t_{1/2}$ =19 minutes en moyenne pour la solution dans le PEG). Pour les nanosphères, la décroissance des concentrations plasmatiques d'isradipine est log linéaire et l'élimination apparente est très lente avec des demi-vies d'élimination comprises entre 229 et 380 minutes selon le polymère (Tableau 20, p 106). Le temps de présence moyen (MRT= 58 à t =122 min) de l'isradipine est extrêmement prolongé avec les nanosphères par rapport à la solution dans le PEG (MRT= 16 min), et il est multiplié par un facteur égal à respectivement 3,6, 6,2 et 7,6 selon qu'il s'agit des nanosphères de PCL, de PLGA ou d'Eudragit.

17.1.2 Administration orale

La biodisponibilité absolue de l'isradipine en solution dans le PEG est faible ($17,4 \pm 6,5$ %). Cette valeur peut s'expliquer par une absorption intestinale limitée, associée à un effet de premier passage hépatique important [BROGDEN et SORKIN, 1995].

La biodisponibilité absolue de l'isradipine sous forme de suspension de nanosphères est significativement plus importante que celle de la solution ($29,9 \pm 5,1$ % pour les nanosphères de PCL et $31,5 \pm 8,4$ % pour celles de PLGA) (cf. p 110).

La comparaison des formes galéniques d'isradipine après administration par voie orale indique que la biodisponibilité relative de la suspension de nanosphères de PCL ou de PLGA est respectivement de 206 % et 237 % environ par rapport à la solution.

L'amélioration de la biodisponibilité apportée par les suspensions de nanosphères est donc très importante. Ce résultat rejoint celui obtenu pour la

vincamine, dont la biodisponibilité relative était augmentée de 162 % après incorporation dans des nanosphères de poly(hexylcyanoacrylate) [MAINCENT et coll., 1986]. HUBERT et coll. [1991] montraient également une augmentation de la biodisponibilité de la darodipine incorporée dans des nanocapsules de PCL.

Du point de vue cinétique, la vitesse de mise à disposition de l'isradipine à partir des différentes formes galéniques a été étudiée en fonction des coordonnées des pics de concentration plasmatique de l'isradipine (Cmax et Tmax). Le Tmax moyen, reflet de la vitesse de mise à disposition, est identique pour la solution et les différentes nanosphères (Tmax= 15 min) et correspond au pic hypotenseur observé après administration de la solution et des nanosphères de PCL et d'Eudragit. La concentration maximale (Cmax), proportionnelle à la fois à la quantité disponible pour l'organisme et à la vitesse de mise à disposition, n'est pas significativement différente selon les formes administrées. Cependant, les Cmax sont légèrement diminuées après administration des nanosphères, comparées à la solution.

17.2 AUGMENTATION DE LA BIODISPONIBILITE DE L'ISRADIPINE

Plusieurs hypothèses peuvent être prises en compte pour expliquer l'augmentation importante de la biodisponibilité de l'isradipine incorporée dans les nanosphères, aussi bien après une administration intraveineuse que par voie orale.

17.2.1 Inhibition du processus d'opsonisation

Après administration intraveineuse, les particules colloïdales subissent aussitôt une opsonisation par des composants plasmatiques [ILLUM et coll., 1983] et éventuellement, une dégradation du support polymère. Généralement, les particules de taille importante sont capturées soit par les poumons, soit par le foie.

L'opsonisation est la première étape de la phagocytose correspondant à la phase de contact entre les particules et les cellules phagocytaires ; puis il y a les phases d'internalisation, d'ingestion et de digestion [BERNARD et coll., 1996]. Après injection intraveineuse, les nanosphères sont rapidement recouvertes par des protéines plasmatiques, les protéines du complément, les immunoglobulines et la fibronectine. Après reconnaissance des fragments Fc des immunoglobulines par les récepteurs, à la surface des cellules phagocytaires, les particules sont internalisées selon un processus

d'endocytose, avec formation d'un phagosome, puis d'un phagolysosome où la dégradation enzymatique se produit.

Certaines caractéristiques physico-chimiques des nanosphères peuvent s'opposer à la mise en jeu du processus d'opsonisation et ainsi prolonger le temps de circulation des nanosphères. En effet, la capture par les cellules phagocytaires dépend de la taille des particules : elle augmente avec celle-ci [DAVIS et coll., 1981]. D'autre part, les particules dont la surface est chargée négativement, sont plus rapidement éliminées de la circulation sanguine que celles dont la charge est positive ou qui sont neutres [TABATA et YKADA, 1988 ; PETRAK, 1993]. Enfin, la modification des propriétés de surface des nanosphères est une voie actuellement très étudiée qui a abouti à la notion de particules « furtives » [JEON et coll., 1991].

In vivo, il a été montré que les revêtements hydrophiles des particules colloïdales apportés par les Poloxamers permettent de diminuer leur capture après administration par voie intraveineuse chez le rat, par les cellules de Küpffer hépatiques et les macrophages de la rate [ILLUM et coll., 1987 ; TROESTER et coll., 1990]. L'adhésion des Poloxamers à la surface des particules modifierait les interactions hydrophobes avec les protéines plasmatiques ou encore provoquerait un encombrement stérique, empêchant les opsonines de recouvrir les particules.

Nos résultats montrent en effet que les nanosphères ont une influence sur le processus d'élimination de l'isradipine incorporée, comme l'augmentation de la demi-vie le confirme (passage de 19 min à plusieurs heures). Quand l'isradipine est incorporée dans les nanosphères, l'élimination de l'isradipine libre est plus rapide que sa libération à partir du vecteur. La prolongation sensible de la demi-vie d'élimination après injection des nanosphères d'isradipine serait le reflet d'une augmentation du volume de distribution de l'isradipine, en raison probablement de la capture du vecteur par le système réticulo-endothélial. La nature biodégradable des vecteurs à base de PLAGA et de PCL peut en effet expliquer la lente libération de l'isradipine. La demi-vie observée avec les nanosphères d'Eudragit encore plus longue par rapport aux 2 précédents polymères résulte du caractère non biodégradable des Eudragit. Dans ce dernier cas, seul le phénomène de diffusion peut expliquer la libération du principe actif et en conséquence, le ralentissement observé.

La présence du Poloxamer (Pluronic® F68) à la surface des nanosphères de PCL et de PLAGA et la charge de surface positive des nanosphères d'Eudragit pourraient également expliquer que les taux plasmatique et lymphatique d'isradipine soient prolongés après administration des nanosphères par rapport à la solution d'isradipine dans le PEG.

Cette augmentation de la demi-vie des principes actifs après leur incorporation dans les nanosphères a souvent été rapportée dans la littérature, notamment par MAINCENNT et coll. [1986] dans le cas de la vincamine. La demi-vie de ce principe actif passait de 75 ± 9 min après injection I.V. de la solution à 151 ± 17 min après injection de la suspension nanoparticulaire chez le lapin. Plus récemment, MARCHAL-HEUSSLER et coll. [1999] ont obtenu un résultat similaire en administrant à la souris de l'oxinate d'indium sous forme de solution ou de nanocapsules de PLGA 50/50 et 75/25. La demi-vie de l'oxinate d'indium dans la suspension de nanocapsules est également fortement augmentée par rapport à la solution.

17.2.2 Protection de l'isradipine de toute dégradation au niveau du tractus digestif

On peut tout d'abord supposer, en amont du processus d'absorption, que les nanosphères apportent une protection de l'isradipine vis à vis des milieux digestifs et de la flore intestinale. DAMGE et coll. [1988] puis MICHEL et coll. [1990] ont montré que l'insuline, incorporée dans des nanocapsules et administrée au niveau de l'iléon et le jéjunum, présente une activité hypoglycémiant pouvant durer 18 jours. Les nanocapsules ont donc protégé l'insuline de la dégradation par les enzymes protéolytiques.

Dans le cas de l'isradipine, nous pouvons supposer que les nanosphères contribuent de cette façon à diminuer la fraction d'isradipine dégradée dans le tractus digestif, augmentant ainsi la quantité d'isradipine disponible pour l'absorption.

17.2.3 Augmentation du temps de transit gastro-intestinal

Dans notre laboratoire, KIM [1996] a étudié chez le rat, le transit gastro-intestinal de la solution dans le PEG et de nanosphères de PCL, d'Eudragit et de PLGA, de compositions analogues à celles étudiées ici, mais contenant un traceur radiomarké, l'oxinate d'indium. Cette étude a eu pour intérêt de montrer d'une part, que la radioactivité était principalement retrouvée au niveau de l'estomac et de l'intestin, et d'autre part, que le transit de la solution dans le PEG semblait plus rapide qu'avec les nanosphères ; l'absence de significativité de ce dernier résultat était liée au faible effectif des groupes de rats étudiés ($n=3$). L'augmentation du temps de transit des nanosphères d'isradipine pourrait ainsi expliquer l'augmentation de la quantité d'isradipine absorbée.

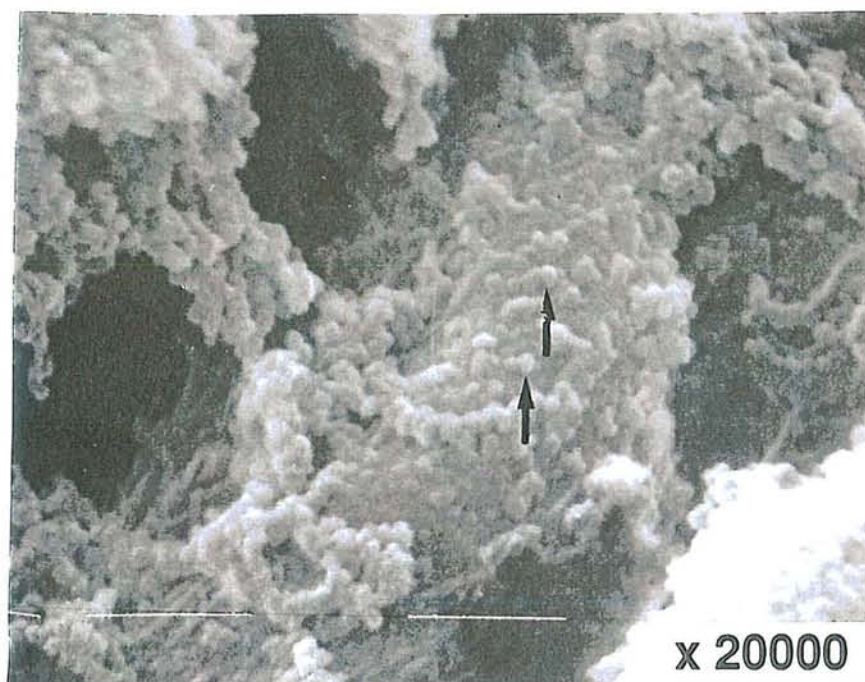
17.2.4 Interactions avec le mucus intestinal

Les interactions des particules avec les surfaces cellulaires sont le plus souvent de nature non covalente et s'établissent entre les groupements fonctionnels de la surface des cellules et la couche ionique superficielle des particules. Les travaux de LEUNG et ROBINSON [1988] montrent que la bioadhésivité des polymères au niveau des muqueuses du tractus gastro-intestinal dépend principalement des caractéristiques physico-chimiques du polymère. Les interactions chimiques (Van der Waals, liaison hydrogène) s'établissent d'autant mieux que la tension de surface du polymère est du même ordre que celle du mucus et que le polymère possède des groupements à forte densité électronique, comme par exemple des groupements carboxyliques ou hydroxyles non ionisés. De telles interactions électrostatiques pourraient concerner les nanosphères d'Eudragit et s'exercer entre les charges négatives des acides sialiques des glycoprotéines du mucus gastro-intestinal et les charges positives caractérisant la surface des nanosphères d'Eudragit [NORRIS, 1998]. Un contact renforcé et étroit entre les nanosphères d'Eudragit et la muqueuse digestive pourrait permettre une absorption prolongée du principe actif le long du tractus digestif.

La charge superficielle négative des nanosphères de PCL et de PLAGA est incompatible avec des interactions de nature électrostatique avec les groupements ionisés des éléments constitutifs du mucus. D'autres mécanismes peuvent aussi conduire à la rétention des nanosphères au niveau du tractus gastro-intestinal. Celle-ci pourrait résulter de la pénétration des chaînes polymères à l'intérieur du réseau de glycoprotéines constituant le mucus, en particulier lorsque les chaînes polymères sont très flexibles [PEPPAS et BURI, 1985]. La nature caoutchouteuse de la PCL ($T_g = -53^\circ\text{C}$), mais aussi l'augmentation de la flexibilité des chaînes polymères, après incorporation de l'isradipine dans les nanosphères de PLAGA ($T_g = 32^\circ\text{C}$) sont des propriétés favorisant l'interaction avec le mucus et donc la rétention des nanosphères à la surface du tractus gastro-intestinal. D'autre part, les chaînes d'oxyde d'éthylène du Pluronic® F68 utilisé pour la stabilisation des suspensions de nanosphères de PCL et de PLAGA pourraient aussi pénétrer le réseau polymère du mucus.

17.2.5 Capture par les plaques de Peyer

La petite taille des nanosphères permet d'envisager l'hypothèse d'un franchissement de la barrière digestive, aussi bien par voie paracellulaire que par capture par les plaques de PEYER [APRAHAMIAN et coll., 1987 ; JANI et coll., 1990 ; KREUTER et coll., 1991].



Photographie 3 : Nanosphères à l'intérieur des plaques de Peyer dans les 5 à 15 minutes qui suivent l'administration per os à des rats.

Un travail en collaboration avec l'équipe du Dr Christiane DAMGE (Systèmes Cellulaires et Biologiques de Production et d'Administration Hormonale, Hôpital Civil, Strasbourg) a permis de constater que les nanosphères de PCL se retrouvent à la surface des plaques de Peyer, entre 5 et 15 minutes après leur administration orale à des rats. Elles pénètrent ensuite à l'intérieur des plaques de Peyer (Photographie 3). Une demi-heure après, les nanosphères ne sont plus visibles au niveau des plaques de Peyer.

Il est permis de penser que les nanosphères ont alors quitté les plaques de Peyer pour gagner la circulation lymphatique, *via* le canal mésentérique, avant de retourner dans le sang, *via* le canal thoracique, comme cela est observé pour les cellules circulantes. Etant donné le faible débit lymphatique, il faut plusieurs heures à l'isradipine lymphatique pour gagner la circulation sanguine, ce qui pourrait expliquer le maintien des taux plasmatiques d'isradipine, pendant plus de 8 h après administration des nanosphères, à des valeurs permettant un effet durable sur la diminution de la pression artérielle. Par ailleurs, l'isradipine, retrouvée dans la circulation lymphatique, échappe à l'effet de premier passage hépatique et son retour directement dans la circulation sanguine concourt à l'augmentation de la demi-vie d'élimination de l'isradipine.

17.3 CINETIQUE LYMPHATIQUE

Cette étude a permis de comparer les cinétiques lymphatiques de l'isradipine après administration intragastrique, chez le rat, de la solution ou des nanosphères.

17.3.1 Le modèle animal

La mise au point d'un modèle animal pour réaliser une étude pharmacocinétique lymphatique est difficile. L'animal choisi pour ce type d'étude est le rat qui est pris comme référence dans la plupart des études menées sur la lymphe. La souris et le cochon sont aussi de bons modèles.

Le niveau de canulation sélectionné est le canal mésentérique. Il nous semble important de souligner la multiplicité des protocoles opératoires décrits dans la littérature. Certains chercheurs recueillent la lymphe mésentérique, d'autres la lymphe thoracique. Certains administrent le produit immédiatement après la canulation, d'autres attendent 24 ou 48 heures. Certains administrent les produits en perfusion duodénale, d'autre en bolus au niveau gastrique. Le recueil de la lymphe est réalisé chez le rat vigile, conscient ou bien chez le rat immobile, inconscient.

Les études de CHARMAN et coll. [1986] ainsi que celles de NOGUSHI et coll. [1985] soulignent l'importance du protocole opératoire et du niveau de canulation du système lymphatique chez le rat. Selon ces deux auteurs, il est préférable de réaliser une canulation du canal mésentérique, plutôt que du canal thoracique. En effet, le canal thoracique reçoit non seulement la lymphe mésentérique, mais également la lymphe hépatique, ce qui conduit à une surestimation des concentrations lymphatiques retrouvées (de l'ordre de 33% dans l'exemple du DDT).

Il faut rappeler d'une part, que l'implantation du cathéter chez le rat est délicate, compte tenu de la taille et de la fragilité des vaisseaux lymphatiques et d'autre part, que de nombreux facteurs risquent de perturber l'écoulement de la lymphe et donc de fausser une analyse quantitative. Le principal de ces facteurs pourrait être le cathétérisme lui-même.

La voie orale n'a pas pu être utilisée comme voie d'administration, car les expériences se faisaient sur des animaux anesthésiés. La voie duodénale est couramment utilisée, mais nous avons choisi la voie intragastrique, afin de nous rapprocher des conditions de la voie orale.

Le protocole opératoire retenu présente néanmoins certains inconvénients :

- Les rats reçoivent *per os*, deux heures avant d'être cathétersés, un volume donné d'huile d'olive. Cette huile contient des proportions élevées de linoléates, avec des triglycérides à longues chaînes, très efficaces pour augmenter le flux lymphatique et la concentration en chylomicron [NANKERVIS, 1995]. Cela nous permet surtout de repérer facilement le canal mésentérique et les conséquences sur le débit lymphatique sont négligeables, étant donné que d'autres facteurs peuvent diminuer le débit lymphatique au cours de l'expérience.
- Pendant le recueil de la lymphe, les rats sont toujours anesthésiés. Or, on sait que l'anesthésique, et en particulier le pentobarbital, a pour effet secondaire de diminuer le débit lymphatique [PORTER et coll., 1996].
- D'autre part, les rats sont réhydratés au cours de l'expérience, toutes les heures, à l'aide d'une injection intragastrique de solution de glucose à 5 %. Certaines équipes procèdent en posant chez le rat directement une voie veineuse (veine jugulaire).

Toutes ces raisons peuvent expliquer les faibles débits lymphatiques obtenus dans certains cas, ainsi que la mort précoce d'un ou deux rats dans chaque groupe étudié avant la fin des 6 h prévues par le protocole.

Au cours de l'expérimentation, nous avons enregistré deux types de données : les débits et les concentrations lymphatiques. A partir de ces données, nous pouvons calculer la quantité de principe actif récoltée. Cependant, toute valeur peut être sous-estimée, si la totalité de la lymphe n'a pas été recueillie. En effet, un caillot peut se former et bloquer momentanément le flux lymphatique qui sera détourné en amont vers la veine porte, au niveau de la *lamina propria*. C'est pourquoi, il est primordial d'analyser les débits lymphatiques, avant d'interpréter tout résultat.

17.3.2 Les débits lymphatiques

Dans les conditions opératoires sélectionnées, les débits lymphatiques obtenus sont du même ordre que ceux décrits dans la littérature, compris entre 0,3 et 1,5 ml/h [TSO, 1985 ; NOGUSHI et coll., 1985]. La comparaison des formes d'isradipine montre qu'il existe des différences de débit entre les formes étudiées, significatives entre les nanosphères de PLAGA et celles d'Eudragit.

Les débits lymphatiques observés varient surtout fortement intra- et inter-individuellement. Cette variabilité des résultats a plusieurs origines. Nous avons vu que des conditions expérimentales assez sévères peuvent conduire à une telle variabilité. La formation d'un caillot ou un déplacement du cathéter pourraient bloquer temporairement l'écoulement de la lymphe. TSO et coll. [1985] observent eux aussi, un débit lymphatique très irrégulier chez des animaux déshydratés, sous anesthésie. L'origine de cette variabilité est peut-être simplement d'ordre physiologique. Le cathétérisme, plus ou moins traumatisant, et l'état physiologique de l'animal (déshydratation, anesthésie générale, immobilité...) peuvent expliquer que le débit de la première heure de recueil de lymphe soit plus élevée que le débit moyen des 6 heures d'expérience, quelle que soit la forme administrée aux rats.

Pour ces raisons, les résultats exprimés en quantité d'isradipine récoltée sont probablement sous-estimés. L'expression des données en concentration permet, en revanche, de s'affranchir des variations de débits lymphatiques et d'approcher la réalité.

17.3.3 Les concentrations lymphatiques

17.3.3.1 Variabilité des résultats

La variabilité interindividuelle des concentrations est très élevée, sans doute en rapport à celle des débits lymphatiques. Les études publiées font toutes état

d'un faible nombre d'animaux étudiés (entre 3 et 5 rats) : la difficulté de la canulation du canal lymphatique nous semble en être l'explication. Des études réalisées sur des nombres de rats plus élevés (10 rats) n'ont pas permis de réduire la variabilité des résultats interindividuels [MAINCENT et coll., 1989]. Celle-ci doit alors être considérée comme inhérente au modèle animal choisi.

17.3.3.2 Résorption lymphatique de l'isradipine

Les concentrations moyennes d'isradipine (exprimées en ng/ml) après administration des nanosphères sont très nettement supérieures à celles obtenues pour la solution de référence. La valeur du pic de concentration maximum après administration des nanosphères de PLAGA, d'Eudragit ou de PCL est respectivement 1,8, 2 et 3 fois supérieure à la valeur du pic observé avec la solution (Tableau 25, p 122).

Les quantités d'isradipine empruntant la voie lymphatique après administration intragastrique sont très faibles : 0,003, 0,008, 0,012 et 0,015 % de la dose d'isradipine administrée sont respectivement récoltés pendant les 6 heures suivant l'administration intragastrique de la solution dans le PEG, des nanosphères de de PCL, PLAGA et d'Eudragit. Cependant, par rapport à la solution de référence, les nanosphères permettent de multiplier en moyenne par respectivement 2,6, 4 et 5, la résorption lymphatique de l'isradipine, exprimée en % de la dose administrée (Tableau 30).

Tableau 30 : Comparaison de la résorption lymphatique de l'isradipine à partir des différentes formes administrées par voie intragastrique.

<i>Formes d'isradipine</i>	<i>Quantités cumulées (Q)* (ng)</i>	<i>Pourcentages de dose administrée (AD)* (%)</i>	<i>Pourcentages de la dose théorique absorbée (AB)* (%)</i>
Solution	20 ± 9	0,003 ± 0,001	0,017
NS PCL	51 ± 12	0,008 ± 0,002	0,026
NS PLAGA	85 ± 26	0,012 ± 0,004	0,041
NS Eudragit	98 ± 28	0,015 ± 0,004	non déterminé

* : il s'agit des quantités retrouvées dans la lymphe durant les 6 heures du recueil.

AB est calculé en tenant compte de la biodisponibilité absolue F, selon la formule suivante :

AB = Q / F.

Si l'on tient compte de la biodisponibilité absolue de chaque forme étudiée, les quantités retrouvées dans la lymphe représentent 0,041 % de la dose théorique absolue pour les nanosphères de PLAGA (soit 2,4 fois le taux retrouvé pour la solution dans le PEG) et 0,026 % pour les nanosphères de PCL.

La résorption lymphatique de l'isradipine semble être plus importante à partir des nanosphères d'Eudragit. L'hydrophobicité de la surface des particules influence l'absorption des particules au niveau des plaques de Peyer [ILLUM, 1987 ; ELDRIGE, 1990 ; HILLERY et FLORENCE, 1996]. Les Eudragit RL et RS sont en effet plus hydrophobes que les poly(α -hydroxyacides) tels que la PCL ou le PLAGA.

YANAGOWA et coll. [1989] ont administré à des rats, des liposomes de diamètre 191 nm, chargées en ciclosporine. La concentration lymphatique thoracique de ciclosporine mesurée 2 heures après administration des nanosphères était 46 fois plus élevée que celle trouvée avec la forme conventionnelle de ciclosporine. Le fait que les taux lymphatiques de principe actif soient plus élevés après administration des formes particulières colloïdales est en faveur de leur passage dans la lymphe. Celui-ci a été démontré par JENKINS et coll. [1994]. En utilisant la cytométrie en flux, ces auteurs ont pu quantifier le nombre de nanosphères absorbées dans la lymphe mésentérique après administration intraduodénale à des rats. Les nanosphères de polystyrène (diamètre :150 nm) étaient absorbées rapidement (dès la 5^{ème} minute), le maximum étant atteint au bout de 65 min. Environ $5 \cdot 10^4$ particules étaient absorbées en 90 min, soit $5 \cdot 10^{-7}$ % du nombre de nanosphères administrées. Les vecteurs colloïdaux diffuseraient des espaces intercellulaires, vers la circulation lymphatique, soit après capture par les cellules M des plaques de Peyer, soit après passage paracellulaire ou endocytose au niveau de l'épithélium intestinal.

Les quantités d'isradipine retrouvées dans la lymphe restent cependant extrêmement faibles par rapport aux quantités initiales administrées dans les nanosphères. Il est possible qu'une partie de l'isradipine qui a gagné la circulation lymphatique soit localisée au niveau des ganglions lymphatiques, auquel cas les valeurs calculées au niveau de la lymphe mésentérique sous-estiment la contribution du système lymphatique. Le passage des nanosphères dans la circulation lymphatique, s'il existe, ou même un transport lymphatique accru de l'isradipine, doivent être considérés comme un processus mineur pour expliquer l'augmentation de la biodisponibilité de l'isradipine administrée *per os* sous forme de nanosphères. Nous n'avons pas observé l'apparition d'un double pic au niveau du profil temps-concentration plasmatique, comme l'ont observé HAUSS et coll. [1994] 4 heures après avoir administré au niveau

duodénal, à des rats, un principe actif sous forme d'émulsion H/L. Ce double pic correspondait à la fraction de principe actif absorbée dans la lymphe.

17.4 ACTIVITE PHARMACODYNAMIQUE

17.4.1 Le modèle animal

Pour étudier l'activité anti-hypertensive de l'isradipine incorporée dans les nanosphères, nous avons choisi comme modèle animal, le rat spontanément hypertendu (SHR). Les rats SHR sont modifiés génétiquement pour être hypertendus. Ils présentent une PAS de 170 mmHg à l'âge de 2 mois, pouvant atteindre 200 mmHg à l'âge de 12 mois (contre 130 mmHg pour les rats normotendus). Ces rats se caractérisent par une activité rénine plasmatique élevée, une résistance vasculaire augmentée, en raison d'un épaississement de la paroi vasculaire et une prolifération des fibres musculaires lisses [MULVANY et coll., 1978].

D'autre part, l'administration *per os* des nanosphères d'isradipine imposait que le modèle choisi soit comparable à l'homme du point de vue pharmacocinétique et en particulier, les capacités d'absorption au niveau du tractus digestif.

Le vieillissement étant un facteur indépendant de l'hypertension, nous avons veillé à ce que les études concernant la détermination de la PAS ou des concentrations plasmatiques et lymphatiques, après administration des nanosphères d'isradipine, soient réalisées, à chaque fois, sur des rats SHR d'âge identique (entre 12 et 14 semaines).

17.4.2 La dose d'isradipine administrée

Les travaux de HOF et coll. [1987] sur le rat spontanément hypertendu ont montré que l'isradipine exerce une activité dose-dépendante après administration orale. Ce travail portait sur les doses orales de 0,01 mg/kg, 0,1 mg/kg, 1 mg/kg, 10 mg/kg et 50 mg/kg et l'isradipine était administrée sous forme d'une suspension dans de la gélatine. Des essais menés dans notre laboratoire nous ont conduit à retenir la dose d'administration chez le rat de 1 mg/kg, dose permettant une baisse notable de la pression artérielle. Cependant, nous avons volontairement augmenté la dose d'isradipine à 2,5 mg/kg afin d'obtenir des concentrations plasmatiques

et lymphatiques supérieures au seuil de quantification de la méthode de dosage choisie (5 et 10 ng/ml respectivement).

17.4.3 La solution de référence

L'administration des nanosphères chez le rat nécessite d'avoir une forme de référence. En général, il s'agit d'une solution aqueuse du principe actif. Comme l'isradipine est quasiment insoluble dans l'eau (solubilité < 0,01 %, m/m), une solution dans le PEG 400 a été réalisée. Nous avons vu que, malgré une viscosité élevée, la solution d'isradipine dans le PEG présente *in vitro*, un profil de dissolution rapide, du moins par comparaison avec les nanosphères, dans les différents milieux considérés. Son administration *per os* à des rats SHR se traduit par un pic hypotenseur post-administration très important et des effets sur la pression artérielle non significativement différents de ceux obtenus pour le placebo à partir de la 4^{ème} heure. *In vivo*, la solution dans le PEG ne présente pas non plus les caractéristiques d'une forme retard, mais bien celles d'une forme rapidement absorbée, comme en témoignent les taux plasmatiques. PORTER et coll. [1997] qui ont aussi utilisé une solution dans le PEG pour comparer chez l'animal des formes retard d'isradipine, expliquent que l'absorption rapide de l'isradipine sous forme dissoute dans le PEG résulte d'une plus grande surface d'absorption.

17.4.4 Méthode de mesure de la PAS

La pression artérielle a été mesurée chez le rat SHR éveillé, par photopléthysmographie de l'artère caudale. Cette méthode est moins reproductible que la méthode de mesure de la pression par voie sanglante, mais elle a l'avantage d'être non invasive. BUNAG et coll. [1971] recommandent de mesurer quatre ou cinq fois la pression, avant d'obtenir une valeur de pression répétable et indépendante du stress. L'existence d'une très bonne corrélation entre ces deux méthodes est confirmée par plusieurs auteurs [BUNAG et coll., 1971 ; TATCHUM et coll., 1995] et vérifiée dans notre laboratoire pour la mesure de la pression artérielle après administration d'isradipine à des rats SHR [LE VERGER, 1997].

17.4.5 Profil tensionnel après administration des nanosphères

L'administration orale d'isradipine incorporée dans les nanosphères, à des rats SHR a permis d'une part, d'écarter de façon significative le pic hypotenseur qui suit l'administration de la solution d'isradipine, d'autre part, de prolonger l'activité de l'isradipine, en maintenant la pression artérielle à des

valeurs normales pendant 8 à 10 heures après administration selon les nanosphères considérées.

Le suivi de l'évolution de la PAS après administration orale des nanosphères est la seule expérience qui ait permis de différencier les vecteurs étudiés. Ces différences concernent l'intensité de la baisse de la pression artérielle, aussitôt après administration et dans les heures qui suivent.

La baisse de la pression artérielle la plus prononcée est obtenue pour les nanosphères d'Eudragit, puis par ordre d'intensité décroissante, pour celles de PCL et enfin de PLAGA, où l'on ne peut pas vraiment parler de pic hypotenseur, puisque la pression décroît progressivement. L'intensité de l'effet hypotenseur suivant immédiatement l'administration est en relation avec la quantité d'isradipine administrée et immédiatement disponible pour l'absorption. Dans le cas des nanosphères qui libèrent *in vitro* l'isradipine très lentement, cette quantité est représentée essentiellement par la fraction d'isradipine non incorporée dans les nanosphères. Le pourcentage d'incorporation de l'isradipine dans les nanosphères est le moins bon pour les nanosphères d'Eudragit (78%) comparé à celui des nanosphères de PCL (87%) et de PLAGA (97%). Une quantité d'isradipine non incorporée dans les nanosphères plus importante pour les nanosphères d'Eudragit pourrait expliquer les résultats observés *in vivo* sur la pression artérielle aussitôt après leur administration.

La prolongation de l'effet hypotenseur jusqu'à la 10^{ème} heure qui suit l'administration est observée pour les trois types de nanosphères étudiés. Néanmoins, la pression artérielle se maintient à des valeurs plus basses avec les nanosphères d'Eudragit ou de PLAGA comparées à celles de PCL.

17.4.6 Corrélation PAS - concentration plasmatique

Il existe pour la plupart des principes actifs antihypertenseurs, une relation linéaire entre la concentration plasmatique du principe actif et la réponse obtenue au niveau de la pression artérielle [MEREDITH et coll., 1992]. Les études réalisées chez l'homme avec l'isradipine confirment l'existence d'une relation linéaire entre les valeurs de pression artérielle et d'une part, les concentrations plasmatiques maximales ou bien les aires sous courbes des concentrations [TSE et JAFFE, 1987], et d'autre part, les doses d'isradipine administrées [WALTON et SYMES, 1993].

Les travaux au sein de notre laboratoire ont permis de constater que l'administration d'isradipine [LE VERGER, 1997] ou d'autres antagonistes

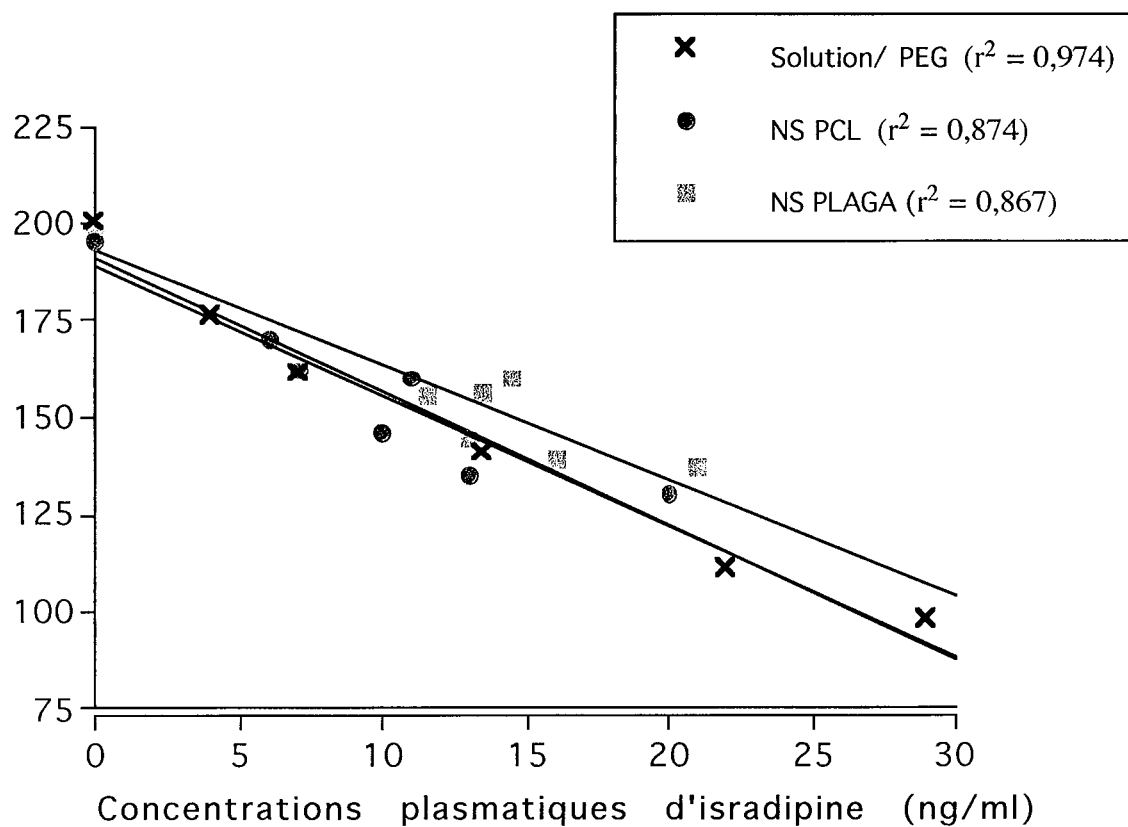


Figure 50 : Droites de régression linéaire entre la concentration plasmatique d'isradipine et la pression artérielle systolique (PAS), après administration orale à des rats SHR, des différentes formes d'isradipine (dose de 2,5 mg/kg).

r^2 représente le coefficient de régression pour chaque droite.

calciques [HUBERT et coll., 1991 ; KIM et coll. 1997], sous forme de vecteurs colloïdaux polymères, ne modifie pas cette relation. Ainsi, LE VERGER [1997] décrit une relation linéaire entre les concentrations plasmatiques d'isradipine et les valeurs de pression artérielle après administration *per os* à des rats SHR de la solution dans le PEG et des nanosphères de PCL et de PLAGA étudiées dans cette thèse (Figure 50). Nous pouvons supposer l'existence d'une telle relation avec les nanosphères d'Eudragit, dont le profil antihypertenseur diffère peu de celui des nanosphères de PLAGA. Cette relation linéaire entre les effets et les doses d'isradipine est très intéressante car elle prédit d'un effet antihypertenseur se prolongeant au delà de l'intervalle de prise, indépendamment de la dose administrée ; une relation sigmoïde décrit en revanche un effet disparaissant à la fin de l'intervalle de prise [MEREDITH et ELLIOTT, 1994].

17.4.7 Rapports vallée/pic et implications thérapeutiques

L'étude du profil tensionnel a montré que la solution d'isradipine dans le PEG 400 présente un rapport vallée/pic très faible (9,3 %) qui résulte d'un effet pic très important et de l'absence d'effet sur la pression artérielle très rapidement après administration. En revanche, le rapport V/P est nettement augmenté avec la forme nanosphère : il est supérieur respectivement à 33 et 40 % pour les nanosphères de PCL et d'Eudragit et atteint la valeur de 52,8 % pour les nanosphères de PLAGA, satisfaisant ainsi aux critères de la FDA [1988]. L'augmentation du rapport V/P traduit à la fois la réduction du pic hypotenseur post administration et l'effet prolongé de la baisse de la pression que permettent d'obtenir les nanosphères d'isradipine, comparativement à la solution de référence.

Ces résultats très intéressants, ont été obtenus chez le rat après une administration orale unique d'isradipine incorporée dans les nanosphères ; des études pharmacodynamiques après administration chronique des différentes formes permettraient de connaître encore plus précisément, le profil d'action des nanosphères sur la baisse tensionnelle. Nous avons montré, pour toutes les formes d'isradipine étudiées, que les valeurs de la pression à t=24 h étaient redevenues comparables aux valeurs de pression mesurées juste avant administration des nanosphères. Rappelons que nous nous sommes intéressés uniquement aux effets d'une prise médicamenteuse unique ; l'administration chronique des différentes formes d'isradipine, si elle avait été envisagée, aurait peut-être permis de mettre en évidence un effet résiduel encore 24 h après administration.

Nos résultats suggèrent que la forme nanosphère pourrait être un moyen d'utiliser plus efficacement les propriétés de l'isradipine. En effet, les études cliniques réalisées sur la forme actuellement commercialisée de l'isradipine révèlent l'insuffisance de cette forme pour contrôler efficacement la pression artérielle : la diminution de la pression artérielle n'est plus significative la nuit [CELIS et coll., 1993] et le rapport vallée/pic moyen est égal à 44 % [ZANNAD et coll., 1996].

Par ailleurs, la forme nanosphère pourrait contribuer à l'amélioration de la tolérance de l'isradipine, pour plusieurs raisons :

- D'une part, la réduction, voire la suppression du pic hypotenseur post-administration avec les nanosphères devrait atténuer les effets secondaires liés à ce pic. En effet, la fréquence des effets indésirables liés à l'effet vasodilatateur des dihydropyridines est moins élevée avec les formes pharmaceutiques données en monoprise et ayant un rapport V/P élevé qu'avec des formes données en prise biquotidienne et ayant un V/P moins élevé [MYERS et coll., 1994].
- D'autre part, nous avons vu que la forme nanosphère permet de maintenir dans le temps les concentrations plasmatiques d'isradipine. Or, des concentrations plasmatiques stables permettent d'éviter l'activation du système rénine-angiotensine et du système nerveux sympathique [RUZICKA, 1995]. Nous avons enregistré les rythmes cardiaques des rats en même temps que la pression artérielle, mais l'analyse statistique n'a pas mis en évidence de différence ni dans le temps, ni entre les diverses formes étudiées (cf valeurs en Annexe).
- Enfin, les nanosphères permettent de prolonger la durée d'action antihypertensive de l'isradipine. Or, l'utilisation dans l'hypertension des antagonistes calciques à durée d'action courte est associée à un risque accru d'événements cardio-vasculaires, ce qui n'est pas observé avec les antagonistes calciques à durée d'action prolongée [ALDERMAN et coll., 1997].

CONCLUSION

CONCLUSION

Notre travail s'est attaché à évaluer l'intérêt thérapeutique de différentes nanosphères d'isradipine préparées à partir de polymères biodégradables (poly(caprolactone), copolymères de l'acide DL lactique-co-glycolique 50/50), et non biodégradables (Eudragit RL et RS).

Dans un premier temps, nous avons caractérisé les nanosphères du point de vue physico-chimique. La taille, le potentiel Zêta, le pourcentage d'incorporation de l'isradipine, les températures de fusion et de transition vitreuse ont été mesurés.

Il apparaît que la taille des nanosphères est supérieure à 100 nm pour les nanosphères de PLAGA et d'Eudragit et à 200 nm pour les nanosphères de PCL. La taille est très peu modifiée après incorporation de l'isradipine. Le potentiel de surface des vecteurs est négatif (nanosphères de PCL et de PLAGA) ou positif (nanosphères d'Eudragit) et en valeur absolue suffisamment élevé pour assurer une bonne stabilité des suspensions. Les pourcentages d'incorporation de l'isradipine sont élevés, compris entre 76 % et 97 % selon le type de nanosphères.

Les études de DSC ont permis de caractériser la structure des chaînes polymères et l'état de l'isradipine au sein des nanosphères. Les structures, semi-cristalline de la PCL et amorphe du PLAGA et des Eudragit, sont conservées lors de la formation des nanosphères. En revanche, l'isradipine passe de l'état cristallin à l'état amorphe dans les nanosphères, ce qui est favorable à une dissolution plus rapide et à une bonne diffusion de l'isradipine.

Les profils de libération *in vitro* de l'isradipine à partir des nanosphères sont ceux de formes à libération modifiée et ralentie. Dans le cas des nanosphères, il semblerait que la diffusion soit le phénomène limitant pour la libération de l'isradipine incorporée. La nature semi-cristalline de la PCL serait le principal facteur expliquant la libération ralentie à partir des nanosphères de PCL. Les interactions entre l'isradipine et les groupes nucléophiles du PLAGA joueraient un rôle non négligeable dans le ralentissement de la libération à partir des nanosphères. Le caractère vitreux des Eudragit, une prédisposition à un mécanisme de bioérosion et une formulation utilisant une quantité de polymère

plus importante expliqueraient que les nanosphères d'Eudragit libèrent plus lentement l'isradipine que les autres nanosphères.

L'administration orale des nanosphères d'isradipine à des rats SHR a conduit à une diminution efficace et prolongée de la pression artérielle jusqu'à la 10^{ème} heure. Cependant, aucune forme n'a permis de maintenir une pression artérielle diminuée jusqu'à la 24^{ème} heure. Une administration chronique des nanosphères pourrait peut-être parvenir à cet effet. Cependant, les rapports vallée sur pic calculés pour les nanosphères sont nettement supérieurs à celui obtenu pour la forme de référence, et même supérieurs au seuil optimal de 50 % défini par la FDA pour les nanosphères de PLAGA.

Par ailleurs, les nanosphères ont permis de réduire le pic hypotenseur post administration de façon significative par rapport à la forme de référence. En particulier, nous avons observé que les nanosphères de PLAGA ont entraîné une baisse progressive de la pression artérielle après leur administration, sans apparition d'un véritable pic hypotenseur.

Les études pharmacocinétiques plasmatiques ont montré que l'incorporation de l'isradipine dans les nanosphères permet d'améliorer significativement par rapport à la solution dans le PEG, la biodisponibilité relative, aussi bien après une administration intraveineuse (+20% pour la PCL, +31% pour le PLAGA et +87% pour les Eudragit) qu'après une administration orale des nanosphères (+100% environ pour les nanosphères de PCL ou PLAGA). La biodisponibilité absolue des nanosphères de PCL ($29,9 \pm 5,1$ %) et de PLAGA ($31,5 \pm 8,4$ %) est significativement augmentée par rapport à celle de la forme de référence ($17,4 \pm 6,5$ %).

Par ailleurs, nous avons montré que la demi-vie d'élimination de l'isradipine incorporée dans les nanosphères est augmentée par rapport à la solution dans le PEG. Après injection I.V. de la solution dans le PEG, la demi-vie d'élimination moyenne est de 19 min ; elle est égale respectivement à 229 min et 287 min pour les nanosphères de PCL et de PLAGA ; la demi-vie est encore plus longue pour les nanosphères d'Eudragit. Après administration orale, les demi-vies d'élimination sont également augmentées pour les nanosphères d'isradipine comparées à la forme solution.

Malgré des taux d'isradipine retrouvée dans la lymphe très faibles par rapport aux quantités administrée (<0,015%), l'augmentation des taux lymphatiques d'isradipine après administration des nanosphères est significative par rapport à la solution dans le PEG. Ces résultats sont en faveur d'un tropisme de cette forme pour le système lymphatique. Bien que le mécanisme d'absorption de cette forme soit difficile à élucider, l'absorption lymphatique

semble être favorisée par les nanosphères. De nombreux travaux de la littérature montrent la capture potentielle des nanosphères par les plaques de Peyer qui nous semble devoir également expliquer ce tropisme lymphatique.

En conclusion, les nanosphères présentent un intérêt comme forme à libération prolongée de l'isradipine. Elles ont pour avantage d'une part, de réduire le pic hypotenseur qui suit l'administration et qui est responsable des principaux effets secondaires de l'isradipine et d'autre part, de maintenir la réduction de la pression artérielle de façon prolongée. Les valeurs élevées des rapports vallée sur pic (en particulier, un rapport égal à $52,8 \pm 4,1\%$ pour les nanosphères de PLAGA), obtenus lors d'une prise unique prédisent un contrôle efficace de la pression artérielle sur l'ensemble du nycthémère, et *a fortiori*, lors d'une administration chronique des nanosphères d'isradipine.

Il est toutefois évident que la forme "suspension pharmaceutique" se prête mal à des traitements devant être suivis au long cours. Cette observation implique également le développement de formes pharmaceutiques pouvant inclure les nanosphères, sans doute à l'état solide, mais susceptibles de libérer ces nanosphères dans leur état d'origine *in vivo*. Par exemple, SCHMIDT et BODMEIER [1999] ont récemment montré qu'il était possible de fabriquer des comprimés et des pellets avec des nanoparticules de différents polymères. Il est intéressant de noter que les comprimés et les pellets fabriqués avec des nanosphères d'Eudragit RL permettent de retrouver ces nanosphères avec leur diamètre d'origine après désagrégation. Il serait aussi intéressant de poursuivre les recherches dans cet axe en incorporant les nanosphères d'isradipine dans des comprimés ou des gélules par exemple.

D'autres classes médicamenteuses que les antagonistes calciques pourraient bénéficier des propriétés des nanosphères. D'une part, leur tropisme lymphatique après administration orale pourrait être utilisé en cancérologie, dans le traitement par exemple, des lymphosarcomes, de la maladie de Hodgkin ou des affections lymphatiques malignes secondaires (cancers du pancréas, de l'estomac). D'autre part, la capture des nanosphères par les cellules M des plaques de Peyer où sont localisées également les cellules immuno-compétentes est actuellement exploitée pour concevoir des vaccins oraux. La recherche se focalise sur l'identification des récepteurs spécifiques des antigènes à la surface des cellules M afin d'optimiser le ciblage par les nanosphères.

Il semble donc évident que les nanoparticules présentent dans beaucoup de domaines un intérêt considérable. Cependant, aucune forme pharmaceutique utilisant ces vecteurs n'est aujourd'hui sur le marché. On peut penser qu'une forme administrable par voie I.V. pourrait éventuellement voir le jour dans le futur. Un effort majeur de formulation doit être maintenant entrepris si l'on

souhaite fabriquer des formes conventionnelles (comprimés ...) avec les nanoparticules.

REFERENCES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ABERNATHY JD,

The problem of non-compliance in long term antihypertensive therapy.
Drugs, 1976, 11, Suppl 1, 86-90.

ALDERMAN MH, COHEN H, ROQUE R, MADHAVAN S,

Effect of long-acting and short-acting calcium antagonists on cardiovascular outcomes in hypertensive patients.
Lancet, 1997, 349, 594-598.

AL KHOURI FN, ROBLOT-TREUPEL L, FESSI H, DEVISSAGUET JP, PUISIEUX F,
Development of a new process for the manufacture of poly
(isobutylcyanoacrylate) nanocapsules.

Int. J. Pharm., 1986, 28, 125-132.

ALLEMANN E, GURNY R, DOELKER E,

Drug-loaded nanoparticles-Preparation methods and drug targeting issues.
Eur. J. Biopharm., 1993, 39, 173-191.

ALLEN A,

Mucus-a protective secretion of complexity.
TIBS, 1983, 8, 169-173.

ALONSO MJ,

Microparticulate systems for the delivery of proteins and vaccins.

In: Drug and pharmaceutical sciences / ed. S Cohen et H Bernstein. 1996, p.
203-242.

ALPAR HO, FIELD WN, FIELD WN, HYDE R, LEWIS DA,

The transport of microspheres from the gastro-intestinal tract to
inflammatory air pouches in the rat.

J. Pharm. Pharmacol., 1989, 41, 194-196.

AMMOURY N, FESSI H, DEVISSAGUET JP, PUISIEUX F, BENITA S,

Physicochemical characterization of polymeric nanocapsules and *in vitro*
release evaluation of indomethacin as a drug model.

S. T. P. Pharma, 1989, 5, 647-651.

AMMOURY N, FESSI H, DEVISSAGUET JP, DUBRASQUET M, BENITA S,
Jejunal absorption, pharmacological activity, and pharmacokinetic evaluation
of indomethacin-loaded poly(d,l-lactide) and poly(isobutyl-cyanoacrylate)
nanocapsules.

Pharm. Res., 1991, 8, 101-104.

APRAHAMIAN M, HUMBERT C, BALBONI G, ANDRIEU V, DEVISSAGUET JP,
Les vecteurs colloïdaux polymériques (nanocapsules) franchissent-ils la
barrière intestinale ?

Proc. Int. Conf. Pharmacol. Technol., 1986, 175-182.

APRAHAMIAN M, MICHEL C, HUMBERT W, DEVISSAGUET JP, DAMGE C,
Transmucosal passage of polyalkylcyanoacrylate nanocapsules as a new drug
carrier in the small intestine.

Biol. Cell., 1987, 61, 69-76.

ARSHADY R,

Albumin microspheres and microcapsules : methodology of manufacturing
techniques.

J. Controlled Rel., 1990, 14, 111-131.

ASO Y, YOSHIOKA S, PO ALW, TERAQ T,

Effect of temperature on mechanisms of drug release and matrix degradation
of poly(D,L-lactide) microspheres.

J. Controlled Rel., 1994, 31, 33-39.

BARGONI A, CAVALLI R, CAPUTO O, FUNDARO A, GASCO MR, ZARA GP,

Solid lipid nanoparticles in lymph and plasma after duodenal administration to
rats.

Pharm. Res., 1998, 15, 745-750.

BARNWELL SG, LAUDANSKI T, STORY MJ, MALLINSON CB, HARRIS RJ, COLE SK,
KEATING M, ATTWOOD D,

Improved oral bioavailability of propranolol in healthy human volunteers using
a liver bypass drug delivery system containing oleic acid.

Int. J. Pharm., 1992, 88, 423-432.

BARRAT G, PUISIEUX F, YU WP, FOUCHER C, FESSI H, DEVISSAGUET JP,

Anti-metastatic activity of MDP-L-alanyl-cholesterol (MTP-chol) incorporated
into various types of nanocapsules.

Int. J. Immunopharmacol., 1994, 16, 457-461.

BECK P, SCHERER D, KREUTER J,

Separation of drug-loaded nanoparticles from free drug by gel filtration.

J. Microencapsulation, 1990, 7, 491-496.

- BENITA S, LEVY MY,
Submicron emulsion as colloidal drug carrier for intravenous administration: comprehensive physicochemical characterization.
J. Pharm. Sci., 1993, 82, 1069-1079.
- BENOIT JP, COUVREUR P, DEVISSAGUET JP, FESSI H, PUISIEUX F, ROBLOT-TREUPEL L,
Les formes "vectorisées" ou "à distribution modulée", nouveaux systèmes d'administration des médicaments.
J. Pharm. Belg., 1986, 41, 319-329.
- BERNARD J, LEVY JP, VARET B, CLAUVEL JP, RAIN JD, SULTAN Y,
Hématologie. Masson Ed, 8ème édition, 1996.
- BINDSCHAEFFER C, GURNY R, DOELKER R,
Process for preparing a powder of water insoluble polymer which can be redispersed in a liquid phase, the resulting powder and utilization thereof.
Brevet US, 1990, n° 4968350.
- BIRRENBACH G, SPEISER PP,
Polymerized micelles and their use as adjuvants in immunology.
J. Pharm. Sci., 1976, 65, 1763-1766.
- BLANCO MD, ALONSO MJ,
Development and characterization of protein-loaded poly(lactide-co-glycolide) nanospheres.
Eur. J. Pharm. Biopharm., 1997, 43, 287-294.
- BODMEIER R, CHEN H,
Preparation and characterization of microspheres containing the anti-inflammatory agents, indomethacin, ibuprofen, and ketoprofen.
J. Controlled Rel., 1989, 10, 167-175.
- BODMEIER R, CHEN H,
Evaluation of biodegradable poly(lactide) pellets prepared by direct compression.
J. Pharm. Sci., 1989, 78, 819-822.
- BODMEIER R, CHEN H,
Indomethacin polymeric nanosuspensions prepared by microfluidization.
J. Controlled Rel., 1990, 12, 223-233.
- BODMEIER R, PAERATAKUL O,
Constant potassium chloride release from microporous membrane-coated tablets prepared with aqueous colloidal polymer dispersion.
Pharm. Res., 1991, 8, 355-389.

- BODMEIER R, MAINCENT P,
Polymeric dispersions as drug carriers.
In: Pharmaceutical Dosage Forms : Dispersed Systems/ HA Lieberman, MM Rieger, GS Banker Eds, New York, Marcel Dekker Inc, 1998, p87-127.
- BODMER D, KISSEL T, TRACHSLIN E,
Factors influencing the release of peptides and proteins from biodegradable parenteral depot systems.
J. Controlled Rel., 1992, 21, 129-138.
- BOLLMAN JL, CAIN JC, GRINDLEY JH,
Techniques for the collection of lymph from the liver, small intestine, or thoracic duct lymph of the rat.
J. Lab. Clin. Med., 1948, 33, 1349-1352.
- BONDUELLE S, PIMIENTA C, BENOIT JP, LENAERTS V,
Body distribution in mice of intravenously injected radiolabelled cyclosporin associated with polyisohexylcyanoacrylate nanocapsules or nanospheres.
Eur. J. Biopharm., 1995, 41, 27-30.
- BOUTAGY J, RUMBLE F, DUNAGAN F,
Determination of isradipine and the oxidative pyridine metabolite in human plasma by high-performance liquid chromatography.
J. Chromatogr., 1989, 487, 483-488.
- BRODGEN RN, SORKIN EM,
Isradipine. An update of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy in the treatment of mild to moderate hypertension.
Drugs, 1995, 49, 618-649.
- BRUGERE H., LAURENT J., LE BAR D., MALHOUY G., MILHAUD C., SCHMITT S., WINTERGEST J.
Expérimentation animale: mode d'emploi.
Editions INSERM, Chimie et Ecologie, 1992.
- BUNAG D,
Validation in awake rats of tail-cuff method for measuring systolic pressure.
J. Appl. Physiol., 1973, 34, 279-282.
- CALVO P, REMUNAN-LOPEZ C, VILA-JATO JL, ALONSO MJ,
Chitosan and chitosan/ethylene oxide-propylene oxide block copolymer nanoparticles as novel carriers for proteins and vaccines.
Pharm. Res., 1997, 14, 1431-1436.

CARR KE, HAZZARD RA, REID S, HODGES GM,
The effect of size on uptake of orally administered latex microparticles in the small intestine and transport to mesenteric lymph nodes.
Pharm. Res., 1996, 13, 1205-1209.

CASLEY-SMITH JR,
An electron microscopic study of injured and abnormally permeable lymphatics.
Ann. NY Acad. Sci., 1964, 116, 803-830.

CELLIS H, STAESSEN J, FAGARD R, THIJS L, AMERY A,
Does isradipine modified release 5 mg once daily reduced blood pressure for 24 hours ?
J. Pharm. Pharmacol. 1993, 22, 300-304.

CHA Y, PITT CG,
The acceleration of degradation-controlled drug delivery from polyester microspheres.
J. Controlled Rel., 1989, 8, 259-65.

CHARMAN WNA, NOGUSHI T, STELLA VJ,
An experimental system designed to study the in situ intestinal lymphatic transport of lipophilic drugs in anaesthetized rats.
Int. J. Pharm., 1986, 33, 155-164.

CHARMAN WNA, NOGUSHI T, STELLA VJ,
Testing potential dosage form strategies for intestinal lymphatic drug transport: studies in the rat.
Int. J. Pharm., 1986, 33, 173-179.

CHARMAN WNA, STELLA VJ,
Transport of lipophilic molecules by the intestinal lymphatic system.
Adv. Drug Delivery Rev., 1991, 7, 1-14.

CHEN H, TORCHILLIN V, LANGER R,
Lectin bearing polymerized liposomes as potential oral vaccine carriers.
Pharm. Res., 1996, 13, 1378-1383.

CHIU LK, CHIU WJ, CHEN YL,
Effects of polymer degradation on drug release - a mechanism study of morphology and transport properties in 50:50 poly(dl-lactide-co-glycolide).
Int. J. Pharm., 1995, 126, 169-178.

CLEMENTI F, PALADE GE,
Intestinal capillaries in lymph formation.
Fed. Proc., 1969, 35, 1863-1871.

CORNES JS,
Number, size, and distribution of Peyer's patches in the human small intestine.
Gut, 1965, 6, 225-233.

COUVREUR P, KANTE B, ROLAND M, GUIOT P, BAUDING P, SPEISER P,
Polycyanoacrylate nanocapsules as potential lysosomotropic carriers :
Preparation, morphological and sorptive properties.
J. Pharm. Pharmacol., 1979, 31, 331-332.

COUVREUR P, ROLAND M, SPEISER P,
Biodegradable submicroscopic particles containing a biologicaly active
substance and compositions containing them.
Brevet US, 1982, n° 4329332.

COUVREUR P,
Vecteurs nanoparticulaires de médicaments.
In : Formes pharmaceutiques nouvelles. Aspects technologique,
biopharmaceutique et médical / ed. par BURI P, PUISIEUX F, DOELKER E,
BENOIT JP. Paris : Editions Tec & Doc Lavoisier, 1985, p 577-611.

DAMGE C, MICHEL C, APRAHAMIAN M, COUVREUR P,
New approach for oral administration of insulin with polyalkylcyanoacrylate
nanocapsules as drug carriers.
Diabetes, 1988, 37, 246-251.

DAMGE C, MICHEL C, APRAHAMIAN M, COUVREUR P, DEVISSAGUET JP,
Nanocapsules as carriers for oral peptide delivery.
J. Controlled Rel., 1990, 13, 233-239.

DAVIS SS,
Colloids and drug delivery systems.
Pharm. Technol., 1981, 5, 71-88.

DELIE F,
Evaluation of nano and microparticle uptake by the gastrointestinal tract.
Adv. Drug Delivery Rev., 1998, 34, 221-233.

DESAI M, LABHASETWAR V, AMIDON GL, LEVY RJ,
Gastrointestinal uptake of biodegradable microparticles: effect of particle
size.
Pharm. Res., 1996, 13, 1838-1845.

DITTGEN M, DURRANI M, LEHMAN K,
Acrylic polymers. A review of pharmaceutical applications.
S.T.P. Pharma Sci., 1997, 7, 403-437.

DOELKER E,
Propriétés des polymères et principes de préparation des systèmes
médicamenteux polymériques.
In : Formes pharmaceutiques nouvelles / ed. par PUISIEUX F, COUVREUR ,
DOELKER E, Paris : Lavoisier, 1985.

DOELKER E,
Proposition de classification des polymères biocompatibles pour les formes
médicamenteuses à libération contrôlée.
S. T. P. Pharma. Sci., 1987, 3, 207-215.

DOUGLAS SJ, ILLUM L, DAVIS SS,
Particle size and size distribution of poly(butyl2-cyanoacrylate) nanoparticles:
II: Influence of stabilizers.
J. Coll. Interf. Sci., 1985, 103, 154-163.

EBEL JP,
A method for quantifying particle absorption from the small intestine of the
mouse.
Pharm. Res., 1990, 7, 848-851.

ELDRIDGE JH, HAMMOND CJ, MEULBROEK JA, STAAS JK, GILLEY R, TICE TR,
Controlled vaccine release in the gut-associated lymphoid tissues. I. Orally
administered biodegradable microspheres target the Peyer's patches.
J. Controlled Rel., 1990, 11, 205-214.

ELKAYAM U, AMIN J, MEHRA A,
A prospective randomised double blind crossover study to compare the
efficacy and safety of chronic nifedipine therapy with that of isosorbide
dinitrate and their combination in the treatment of chronic congestive heart
failure.
Circulation, 1990, 82, 1954-1961.

EL-SAMALIGY MS, ROHDEWALD P, MAHMOOD HA,
Polyalkylcyanoacrylate nanocapsules.
J. Pharm. Pharmacol., 1986, 38, 216-220.

EYLES J, ALPAR HO, FIELD WN, LEWIS DA, KESWICK M,
The transfer of polystyrene microspheres from the gastrointestinal tract to
the circulation after oral administration in the rat.
J. Pharm. Pharmacol., 1995, 47, 561-565.

FESSI H, DEVISSAGUET JP, PUISIEUX F, THIES C,
Procédé de préparation de systèmes colloïdaux dispersibles d'une substance
sous forme de nanoparticules.
Brevet francais, 1986, n° 8618446.

FLORENCE AT, HILLERY AM, HUSSAIN N, JANI PU,
Nanoparticles as carriers for oral peptide absorption : studies on particle uptake and fate.
J. Controlled Rel., 1995, 36, 39-46.

FLORENCE AT,
The oral absorption of micro- and nanoparticulates; neither exceptional nor unusual.
Pharm. Res., 1997, 14, 259-266.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION,
Draft of the proposal guidelines for the clinical evaluation of antihypertensive drugs. Rockville, MD, USA : Division of Cardio-Renal Drug Products, US Department of Health and Human Services, 1988.

FROHLICH ED, MAC LOUGHLIN MJ, LOSEM CJ, KETELHUT R, MESSERLI FH,
Hemodynamic comparison of two nifedipine formulations in patients with essential hypertension.
Am. J. Cardiol., 1991, 68, 1346-1350.

FRUHLING J,
Lymph and lymphatic pathophysiology.
Progress Radiopharmacol., 1981, 2, 223-229.

FURBERG CD, PSATY BM, MEYER JV,
Nifedipine. Dose related increase in mortality in patients with coronary heart disease.
Circulation, 1995, 92, 1326-1331.

GIES JP,
Les canaux ioniques.
Paris : Ellipses, 1993.

GOMBOTZ WR, PETTIT DK,
Biodegradable polymers for protein and peptide drug delivery.
Bioconjugate Chem., 1995, 6, 332-351.

GRANGER DN, TAYLOR AE ,
Effects of solute-coupled transport on lymph flow and oncotic pressures in cat ileum.
Am. J. Physiol., 1978, 235, E429-436.

GRANGER DN, KVIETYS PR,
Intestinal microcirculation and transmucosal fluid transport.
Am. J. Physiol., 1981, 240, G343-349.

GUENARD H ,

Circulation lymphatique.

In : Physiologie humaine. Paris : Pradel, 1991, p. 136-138.

GURNY R, PEPPEES NA, HARRINGTON DD, BANKER GS,

Develpement of biodegradable and injectable lattices for controlled release of potent drugs.

Drug Dev. Ind. Pharm., 1981, 7, 1-25.

GUYTON AC, COLEMAN TG, NORMAN RA, LOHMEIER TE, BENGIS RG,

Combined volume loading and vasoconstrictor hypertension : the Goldblatt hypertensions.

In : Circulatory physiology III: arterial pressure and hypertension. Philadelphia, USA, ed SAUNERS, 1980, 403-421.

GUYTON AC,

Système lymphatique, dynamique des liquides interstitiels, oedème et dynamique des liquides pulmonaires.

In : Traité de physiologie médicale. Paris, 1989, p. 361-375.

HAUSBERGER AG, DE LUCA P,

Characterization of biodegradable poly(D,L-lactide-co-glycolide) polymers and microspheres.

J. Pharm. Biomed. Analysis, 1995, 13, 747-760.

HAUSS DJ, MEHTA SM, RADEBAUGH GW,

Targeted lymphatic transport and modified systemic distribution of CI-976 a lipophilic lipid-regulator drug, via a formulation approach.

Int. J. Pharm., 1994, 108, 85-93.

HAWLEY AE, DAVIS SS, ILLUM L,

Targeting of colloid to lymph nodes: influence of lymphatic physiology and colloidal characteristics.

Adv. Drug Delivery Rev., 1995, 17, 129-148.

HELLER J,

Controlled release of biologically active compounds from bioerodible polymers.

Biomaterials, 1980, 1, 51-57.

HENRY-MICHELLAND S, ALONSO MJ, ANDREMONT A, MAINCENT P, SAUZIERS J, COUVREUR P,

Attachment of antibiotics to nanoparticles: preparation, drug-release and antimicrobial activity in vitro.

Int. J. Pharm., 1987, 35, 121-127.

- HEYMAN MA, DUCROC R, DESJEUX JF, MORGART JL,
Horseradish peroxidase transport across adult rabbit jejunum *in vitro*.
Am. J. Physiol., 1982, 245, G558-564.
- HILLERY AM, JANI PU, FLORENCE AT,
Comparative, quantitative study of lymphoid and non-lymphoid uptake of 60 nm polystyrene particles.
J. Drug Targeting, 1994, 2, 151-156.
- HILLERY AM, FLORENCE AT,
The effect of adsorbed poloxamer 188 and 407 surfactants on the intestinal uptake of 60 nm polystyrene particles after oral administration in the rat.
Int. J. Pharm., 1996, 132, 123-130.
- HOF RP, SALZMANN R, SIEGL H,
Selective effects of PN 200-110 (isradipine) on the peripheral circulation and the heart.
Am. J. Cardiol., 1987, 59, 30B-36B.
- HOLGADO MA, FERNANDEZ-AREVAMO M, ALVAREZ-FUENTES J, CARABALLO I, LLERA JM, RABASCO AM,
Physical characterization of carteolol: Eudragit L binding interaction.
Int. J. Pharm., 1995, 114, 13-21.
- HOUIN G,
Pharmacocinétique.
Ellipses, 1990.
- HUBERT B, ATKINSON J, GUERET M, HOFFMAN M, DEVISSAGUET JP, MAINCENT,
The preparation and acute antihypertensive effects of a nanocapsular form of darodipine, a dihydropyridine calcium entry blocker.
Pharm. Res., 1991, 87, 237-246.
- HUSSEIN N, FLORENCE AT,
Utilizing bacterial mechanisms of epithelial cell entry: invasin induced oral uptake of latex nanoparticles.
Pharm. Res., 1998, 15, 153-156.
- ILLUM L, DAVIS SS,
Effect of polystyrene microspheres following intravenous administration.
J. Pharm. Sci., 1983, 72, 1086-1089.
- ILLUM L, HUNNEYBALL IM, DAVIS SS,
The effect of hydrophilic coatings on the uptake of colloidal particles by the liver and by peritoneal macrophages.
Int. J. Pharm., 1986, 29, 53-65.

ILLUM L, JACOBSEN L, MULLER RH, MAK E, DAVIS SS,
Surface characteristics and the interaction of colloidal particles with mouse
peritoneal macrophages.
Biomaterials, 1987, 8, 113-117.

ILLUM L, DAVIS SS, MULLER RH, MAK E, WEST P,
The organ distribution and circulation time of intravenously injected colloidal
carriers sterically stabilised with a block copolymer-Poloxamine 908.
Life Sci., 1987, 40, 367-374.

IRACHE JM, DURRER C, DUCHENE D, PONCHEL G,
Bioadhesion of lectin latex conjugates to rat intestinal mucosa.
Pharm. Res., 1996, 13, 1716-1719.

JANI PU, HALBERT GW, LANGRIDGE J, FLORENCE AT,
The uptake and translocation of latex nanospheres and microspheres after
oral administration to rats.
J. Pharm. Pharmacol., 1989, 41, 801-812.

JANI PU, HALBERT GW, LANGRIDGE J, FLORENCE AT,
Nanoparticle uptake by the rat gastrointestinal mucosa: quantitation and
particle size dependency.
J. Pharm. Pharmacol., 1990, 42, 821-826.

JANI PU, Mc CARTHY DE, FLORENCE AT,
Nanosphere and microsphere uptake via Peyer's patches: observation of the
rate of uptake in the rat after a single oral dose.
Int. J. Pharm., 1992, 56, 239-246.

JANI PU, FLORENCE AT, Mc CARTY DE,
Further histological evidence of the gastrointestinal absorption of polystyrene
nanospheres in the rat.
Int. J. Pharm., 1992, 84, 245-252.

JENKINS PG, HOWARD KA, BLACKHALL NW, THOMAS N, DAVIS S, O'HAGAN D,
The quantification of the absorption of microparticles into the intestinal lymph
of Wistar rats.
Int. J. Pharm., 1994, 102, 261-266.

JENQUIN MR, LIEBOWITZ SM, SARABIA RE, Mc GINITY JW,
Physical and chemical factors influencing the release of drugs from acrylic resin
films.
J. Pharm. Sci., 1990, 79, 811-816.

JEON SI, LEE JH, ANDRADE JD, DE GENNES PG,
Protein-surface interactions in the presence of polyethylene oxyde.
J. Colloid. Interf. Sci., 1991, 142, 159-166.

JEPSON MA, CLARK MA, FOSTER N, MASON CM, BENNETT MK, SIMMONS NL,
HIRST BH,
Targeting to intestinal M cells.
J. Anat., 1996, 189, 507-516.

KANO T,
Morphological study of microfold cells of intestinal lymphoid follicles in Peyer's
patches.
J. Immunol., 1984, 125, 2626-2631.

KEDZIEREWICZ F, THOUVENOT P, MONOT I, HOFFMAN M, MAINCENT P,
Influence of different physicochemical conditions on the release of indium oxine
from nanocapsules.
J. Biomed. Mater. Res., 1998, 588-593.

KELJO DJ, HAMILTON R,
Quantitative determination of macromolecular transport rate across intestinal
Peyer's patches.
Am. J. Physiol., 1983, 244, G637-G644.

KIM YI,
Mise au point et évaluation de formes à libération modifiée de nifédipine.
Thèse de Doctorat d'Université, Nancy I, 1996.

KIM YI, FLUCKIGER L, LARTAUD-IDJOUADIENNE I, HOFFMAN M, ATKINSON J,
MAINCENT P,
The antihypertensive effect of orally administered nifedipine-loaded
nanoparticles in spontaneously hypertensive rats.
Br. J. Pharmacol., 1997, 120, 399-404.

KLEINBLOESEM CH, VAN BRUMMELEN P, DANLOF M, FABER H, URQUHART J,
BREIMER DD,
Rate of increase in the plasma concentration of nifedipine as a major
determinant of its hemodynamic effects in humans.
Clin. Pharmacol. Ther., 1987, 41, 26-30.

KRAMER PA,
Albumin microspheres as vehicles for achieving specificity in drug delivery.
J. Pharm. Sci., 1974, 63, 1646-1647.

KRAUSE HJ, ROHDEWALD K,
Preparation of gelatin nanocapsules and their pharmaceutical
characterization.
Pharm. Res., 1987, 2, 239-243.

KREUTER J, SPEISER PP,
In vitro studies of poly(methyl methacrylate) adjuvants.
J. Pharm. Sci., 1976, 65, 1624-1627.

KREUTER J, MULLER U, MUNZ K,
Quantitative and microautoradiographic study on mouse intestinal distribution
of polycyanoacrylate nanoparticles.
Int. J. Pharm., 1989, 55, 39-45.

LANGER R,
Polymer-controlled drug delivery systems.
Acc. Chem. Res., 1993, 26, 537-542.

LEE JS,
Lymph flow during fluid absorption from rat jejunum.
Am. J. Physiol., 1981, 240, G312-316.

LEMOINE D, FRANCOIS C, KEDZIEREWICZ F, PREAT V, HOFFMAN M, MAINCENT P,
Stability study of nanoparticles of poly(epsilon-caprolactone), poly(D,L-lactide)
and poly(D,L-lactide-co-glycolide).
Biomaterials, 1996, 17, 2191-7.

LEROUEIL-LE VERGER M,
Mise au point de forme à libération modifiée d'isradipine. Caractérisation
physico-chimique et étude du devenir *in vivo*.
Thèse d'Université, Faculté de Pharmacie, Nancy I, 1997.

LEROUEIL-LE VERGER M, FLUCKIGER L, KIM YI, HOFFMAN M, MAINCENT P,
Preparation and characterization of nanoparticles containing an anti-
hypertensive agent.
Eur. J. Pharm. Biopharm., 1998, 46, 137-143.

LEROUX JC, COZENS R, ROESEL JL, GALLI B, KUBEL E, DOELKER E, GURNY R,
Pharmacokinetics of a novel HIV-1 protease inhibitor incorporated into
biodegradable or enteric nanoparticles following intravenous and oral
administration to mice.
J. Pharm. Sci., 1995, 84, 1387-1391.

LEUNG S-H, ROBINSON JR,
The contribution of anionic polymer structural feature to mucoadhesion.
J. Controlled Rel., 1988, 5, 223-231.

- LEVY MY, BENITA S,
Drug release from submicronized o/w emulsion: a new in vitro kinetic evaluation model.
Int. J. Pharm., 1990, 66, 29-37.
- LEYMARIOS J,
Physiologie et physiopathologie des lymphatiques mésentériques. Pathologie du mésentère.
Raven Press, 1973, 23, 2801-2811.
- LIN WJ, FLANAGAN DR, LINHARDT RJ,
Accelerated degradation of poly(ϵ -caprolactone) by organic amines.
Pharm. Res., 1994, 11, 1030-1034.
- LOWE PJ, TEMPLE CS,
Calcitonin and insulin in isobutylcyanoacrylate nanocapsules: protection against proteases and effect on intestinal absorption in rats.
J. Pharm. Pharmacol., 1994, 46, 547-552.
- LUSCHER TF, COSENTINO F,
The classification of calcium antagonists and their selection in the treatment of hypertension. A Reappraisal.
Drugs, 1998, 55, 509-517.
- MAGENHEIM B, BENITA S,
Nanoparticle characterization: a comprehensive physicochemical approach.
S. T. P. Pharma Sci., 1991, 1, 221-241.
- MAINCENT P, LEVERGE R, SADO P, COUVREUR P, DEVISSAGUET JP,
Disposition kinetics and oral bioavailability of vincamine-loaded polyalkyl cyanoacrylate nanoparticles.
J. Pharm. Sci., 1986, 75, 955-958.
- MAINCENT P,
Etude du devenir in vivo après administration par voies orale et intrapéritonéale de vecteurs colloïdaux polymériques matriciels (nanoparticules).
Thèse de doctorat d'état, Faculté de Pharmacie, Nancy I, 1989.
- MAINCENT P, THOUVENOT P, AMICABILLE C, HOFFMAN M, KREUTER J, COUVREUR P, DEVISSAGUET JP,
Lymphatic targeting of polymeric nanoparticles after intraperitoneal administration in rats.
Pharm. Res., 1992, 9, 1534-1539.

MALE D, CHAMPION B, COCHE A,
Circulation des lymphocytes et des CPAg.
In : Immunologie; Le système immunitaire et sa régulation. Ed Med/Sci GRAW-HILL, 1987, p. 14.1-14.10.

MARCHAL-HEUSSLER L,
Développement d'un nouveau collyre : les vecteurs colloïdaux polymériques biodégradables de nature matricielle et vésiculaire. Intérêt dans le traitement du glaucome par les β -bloquants.
Thèse d'Université, Faculté de Pharmacie, Nancy I, 1991.

MARCHAL-HEUSSLER L, THOUVENOT P, HOFFMAN M, MAINCENT P,
Biodistribution of gamma - labeled nanocapsules in mice.
J. Pharm. Sci., 1999, sous presse.

MARIEB EN,
Le système lymphatique.
In : Anatomie et physiologie humaines. Bruxelles : D. B. Université, 1993.

MATHIOWITZ E, JACOB JS, JONG YS, CARINO GP, CHIKERING DE, CHATURVEDI P, SANTOS CA, VIJAYARAGHAVAN K, MONTGOMERY S, BASSET M, MOREL C,
Biologically erodable microspheres as potential oral drug delivery systems.
Nature, 1997, 386, 410-414.

MAUDUIT J, VERT M,
Les polymères à base d'acides lactiques et glycoliques et la délivrance contrôlée des principes actifs.
S. T. P. Pharma. Sci., 1994, 3, 197-212.

MAULDING HV, TICE TR, COWSAR DR, FONG JW, PEARSON JE, NAZARENO JP,
Biodegradable microcapsules: acceleration of polymeric excipient hydrolytic rate by incorporation of a basic medicament.
J. Controlled Rel., 1986, 3, 103-117.

MEREDITH PA, ELLIOTT HL,
Antihypertensive treatment and trough:peak ratio: general considerations.
J. Hypertension, 1994, 12, suppl 8, S79-S83.

MILLER RA, BRADY JM, CUTGRIGHT DE,
Degradation rates of oral resorbable implants (polylactates and polyglycolates): Rate modification with changes in PLA/PGA copolymer ratios.
J. Biomed. Mater. Res., 1977, 11, 711.

MIURA S, SEKIZUKA E, NAGATA H, OSHIO C, MINAMITANI H, SUEMATSU M, SUZUKI M, HAMADA Y, KOBAYASHI K, ASAKURA H, TSUCHIYA M,
Increased lymphocyte transport by lipid absorption in rat mesenteric lymphatics.

Am. J. Physiol., 1987, 253, G596-G600.

MIYAJIMA M, KOSHIKA A, OKADA J, KUSAI A, IKEDA M,
The effects of drug physico-chemical properties on release from copoly(lactic/glycolic acid) matrix.

Int. J. Pharm., 1998, 169, 255-263.

MULLER RH,

Charge determinations.

In : Colloidal carriers for controlled drug delivery and targeting. Boca Raton, USA : CRC, 1991, p. 57-97.

MULLER BG, LEUENBERGER H, KISSEL T,

Albumin nanospheres as carriers for passive drug targeting : an optimized manufacturing technique.

Pharm. Res., 1996, 13, 32-37.

MULVANY MJH, HANSEN PK, AALKJAER C,

Direct evidence that greater contractility of resistance vessels in spontaneously hypertensive rats is associated with narrowed lumen, and an increased number of smooth muscle cell layers.

Circ. Res., 1978, 43, 854-864.

MURANISHI S, FUJITA T, MURAKAMI M, YAMAMOTO A,

Potential for lymphatic targeting of peptides.

J. Controlled Rel., 1997. 46, 157-164.

MYERS MG,

Dihydropyridine calcium antagonists and the trough/peak ratio : focus on adverse effects.

J. Hypertension, 1994, 12, suppl 8, S73-77.

NANKERVIS R, DAVIS SS, DAY NH, SHAW PN,

Effect of lipid vehicle on the intestinal lymphatic transport of isotretinoin in the rat.

Int. J. Pharm., 1995, 119, 173-181.

NOGUSHI T, CHARMAN WN, STELLA VJ,

The effect of drug lipophilicity and lipid vehicles on the lymphatic absorption of various testosterone esters.

Int. J. Pharm., 1985, 24, 173-184.

NORRIS DA, PURI N, SINKO PJ,
The effect of physical barriers and properties on the oral absorption of particulates.
Adv. Drug Delivery Rev., 1998, 34, 135-154.

OPPENHEIM C,
Nanoparticulate drug delivery systems based on gelatin and albumin.
In : Polymeric nanoparticles as drug carriers for antitumor agents / ed : P. GUIOT et P. COUVREUR. Boca Raton FL : CRC Press, 1986, p. 1-26.

PAPPO J, ERMAK TH,
Uptake and translocation of fluorescent latex particles by rabbit Peyer's patch follicle epithelium: a quantitative model for M cell uptake.
Clin. Exp. Immunol., 1989, 76, 144-148.

PEPPAS N, BURI PA,
Surface, interfacial and molecular aspects of polymer bioadhesion on soft tissues.
J. Controlled Rel., 1985, 2, 257-275.

PETRAK K,
Design and properties of particulate carriers systems for intravascular administration.
In: Pharmaceutical particulate carriers/ed. ROLLAND A New York, Marcel Dekker Inc, 1993.

PITT CG, HENDREN RW, SCHINDLER A,
The enzymatic surface erosion of aliphatic polyesters.
J. Controlled Rel., 1984, 1, 3-14.

PITT CG, GU Z,
Modification of the rates of chain cleavage of poly(epsilon-caprolactone) and related polyesters in the solid state.
J. Controlled Rel., 1987, 4, 283-292.

PORTER CJH, CHARMAN SA, CHARMAN WN,
Lymphatic transport of halofantrine in the triple cannulated anesthetized rat model: effect of lipid vehicle dispersion.
J. Pharm. Sci., 1996, 85, 351356.

PORTER CJH, CHARMAN WN,
Uptake of drugs into the intestinal lymphatics after oral administration.
Adv. Drug Deliv. Rev., 1997, 25, 71-89.

RAYAONARYVONY MJ, VAUTHIER C, COUARRAZE G, PUISIEUX F, COUVREUR P,
Development of a new drug carrier made from alginate.
J. Pharm. Sci., 1993, 82, 912-917.

ROBERT C, BURI P,
Le mucus et son rôle dans l'absorption des médicaments.
Pharm. Acta Helv., 1986 . 61, 210-214.

ROCCO MB, NADEL EG, SELVYN AP,
Circadian rhythms and artery coronary diseases.
Am. J. Cardiol., 1987, 69, 13-17.

ROLLOT JM, COUVREUR P, ROBLOT TREUPEL L, PUISIEUX F,
Physico-chemical and morphological characterization of poly (isobutyl-
cyanoacrylate) nanocapsules.
J. Pharm. Sci., 1986, 75, 361-364.

RUBAS W, GRASS GM,
Gastrointestinal lymphatic absorption of peptides and proteins.
Adv. Drug Delivery Rev., 1991, 7, 15-69.

RUZICKA M, LEENEN FHH,
Relevance of intermittent increases in sympathetic activity for adverse
outcome on short-acting calcium antagonists.
*In: Hypertension: Pathophysiology, diagnosis, and management/ed. Brenner BM,
Laragh JH. New York, Raven Press, 1995, p 2815-2825.*

SALVETTI A, VIRDIS A, TADDEI S,
Trough:peak ratio of nifedipine gastrointestinal therapeutic system and
nifedipine retard in essential hypertensive patients: an Italian multicentre study.
J. Hypertension, 1996, 14, 661-667.

SANDERS E, ASHWORTH CT,
A study of particulate intestinal absorption and hepatocellular uptake.
Exp. Cell. Res., 1961, 22, 137-145.

SCHERER D, MOOREN FC, KINNR RKH, KREUTER J,
In vitro permeability of PBCA nanoparticles through porcine small intestine.
J. Drug Targeting, 1993, 1, 21-27.

SCHMIDT C, BODMEIER R,
Incorporation of polymeric nanoparticles into solid dosage forms.
J. Controlled Rel. 1999, 57, 115-125.

SEIJO B, FATTAL E, ROBLOT-TREUPEL L, COUVREUR P,
Design of nanoparticles less than 50 nm diameter: preparation,
characterization and drug loadin.
Int. J. Pharm., 1990, 62, 1-7.

STELLA VJ, CHARMAN WNA, MYERS RA,
Targeting of orally administered lipophilic drugs to lymphatic system.
Proc. Int. Symp. Controlled Release Bioact. Mater., 1990.

SFSTP,
Méthodes chromatographiques de dosage dans les milieux biologiques :
stratégie de validation.
STP Pharma Pratiques, 1997, 7, 3, 169-194.

TABATA Y, YKADA Y,
Macrophage phagocytosis of biodegradable microspheres compared of L-
lactid acid/glycolic acid homo- and copolymers.
J. Biomed. Mater. Res., 1988, 22, 837-858.

TATCHUM TALOM R, NIEDERHOFFER N, AMIN F, MAKKI T, TANKOSIC P,
ATKINSON J,
Aortic stiffness and left ventricular mass in a rat model of isolated systolic
hypertension.
Hypertension, 1995, 6, 963-970.

TOYO-OKA T, NAYLER WG,
Third generation calcium entry blockers.
Blood Press., 1996, 5, 206-208.

TORTORA GJ, GRABOWSKI SR,
Le système lymphatique, les mécanismes de défense non-spécifiques et
l'immunité.
In: Principes d'anatomie et de physiologie / ed. D BOECK, Bruxelles, 1994.

TROESTER SD, MULLER U, KREUTER J,
Modification of the body distribution of poly(methylmethacrylate)
nanoparticles in rats by coating with surfactants.
Int. J. Pharm., 1990, 61, 85-100.

TSE F, JAFFE J,
Pharmacokinetics of PN 200-110 (isradipine), a new calcium antagonist after
oral administration in man.
Eur. J. Clin. Pharmacol., 1987, 32, 361-365.

TSO P, PITTS V, GRANGER DN,
The role of lymph flow in intestinal chylomicron transport.

Am. J. Physiol., 1985, 249, G21-G28.

VACHON MG, NAIRN JG,

The use of ^{13}C solid state NMR to elucidate physico-chemical association in Eudragit® RS100 to elucidate microencapsulated acyl esters of salicylic acid.
Eur. J. Pharm. Biopharm., 1998, 45, 9-21.

VIZCAINO M,

Granulométrie au Laser.

Parfums, cosmétiques, arômes, 1986, 69, 75-77.

WAEBER B, ERNE P, SAXEN HOFER H, HEYNEN G,

Use of drugs with more than a 24-hour duration of action.

J. Hypertension, 1994, 12, Suppl 8, 67-71.

WALTON T, SYMES R,

Felodipine and isradipine new calcium channel blocking agents for the treatment of hypertension.

Clin. Pharm., 1993, 12, 261-275.

WANDER AJ, SHERMAN JH, LUCIANO DS,

In : Physiologie humaine/ed. M GRAW-HILL, Montreal, Canada, 1977, p. 345-80

WARSHAW AL,

A simplified method of cannulating the intestinal lymphatic of the rat.

Gut, 1972, 13, 66-67.

WASHINGTON C,

Evaluation of non-sink dialysis methods for the measurement of drug release from colloids: effects of drug partition.

Int. J. Pharm., 1989, 56, 71-74.

WEEKS JR, JONES JA,

Routine direct measurement of arterial pressure in anesthetized rats.

Proc. Soc Exp. Biol. Med., 1960, 104, 646-648.

WENZEL RR, ALLEGGRANZA G, BINGGELI C, SHAW S, WEIDMANN P, LUSCHER TF, NOLL G,

Differential activation of cardiac and peripheral sympathetic nervous system by nifedipine: role of pharmacokinetics.

J. Am. Coll. Cardiol., 1997, 29, 1607-1614.

WHITE WB, DEY HM, SCHULMAN P,

Assessment of the daily blood pressure load as a determinant of cardiac function in patients with mild to moderate hypertension.

Am. Heart J., 1988, 118, 782-795.

WHITE DG, STORY MJ, BARNWELL SG,
An experimental animal model for studying the effects of a novel lymphatic
drug delivery system for propranolol.
Int. J. Pharm., 1991, 69, 169-174.

YANAGAWA A, IWAYAMA T, SAOTOME T, SHOJI Y, TAKANO K, OKA H,
NAGAKAWA T, MIZUSHIMA Y,
Selective transfer of cyclosporin to thoracic lymphatic systems by the
application of lipid microspheres.

J. Microencapsulation, 1989, 6, 161-164.

YEH PY, ELLENS H, SMITH PL,

Physiological considerations in the design of particulate dosage forms for oral
vaccine delivery.

Adv. Drug Deliv. Rev., 1998, 34, 123-133.

YOFFEY JL, COURTICE FC,

Lymphatics, lymph and the lympho-myeloid complex.

London-New York : A. Press, 1970.

YOSHIKAWA H, TAKADA K, MURANISHI S,

Molecular weight dependence of permselectivity to rat small intestinal blood-
lymph barrier for exogenous macromolecules absorbed from lumen.

J. Pharm. Dyn., 1984, 7, 1-6.

ZANNAD F, MATZINGER A, LARCHE J,

Trough:peak ratios of once daily angiotensin converting enzyme inhibitors and
calcium antagonists.

Am. J. Hypertension, 1996, 9, 633-643.

ANNEXES

Annexe 1 : Composition des milieux de libération utilisés pour les études de libération *in vitro* de l'isradipine incorporée dans les nanosphères.

- Solution tampon phosphate pH 6,8 (Pharmacopée, XX^{ème} Edition)

3,39 g KH_2PO_4

3,53 g Na_2HPO_4

qs 1000 ml H_2O

- Solution d'albumine bovine 1,5 %

0,9 g NaCl

1,5 g albumine bovine (Prolabo, Fontenay aux Bois, France)

4 mg amoxicilline (Sigma, Saint Quentin Fallavier France)

qs 100 ml H_2O

agitation 100 rpm, 37°C

Annexe 2 : Résultats de l'étude de validation de la méthode de dosage par CLHP de l'isradipine dans le plasma.

Il s'agit d'une étude qui a été réalisée par Martine LE VERGER dans le cadre de sa thèse d'université [1997] et qui a été menée parallèlement à ce travail.

Temps de rétention de l'isradipine et du butamben

Après addition de l'isradipine et de l'étalon interne (butamben) à du sérum vierge suivie de leur extraction, la méthode HPLC a permis de séparer ces 2 entités sans qu'il y ait de chevauchement des pics sur le chromatogramme.

Ainsi, le butamben présente un temps de rétention de $6,1 \pm 0,1$ min avec un pic qui, d'une part, se situe à distance des pics relatifs aux protéines et divers constituants du plasma, d'autre part, est bien différencié du pic de l'isradipine dont le temps de rétention est de $12,4 \pm 0,2$ min.

Aucun autre pic que celui de l'isradipine n'a été détecté, ce qui permet de conclure à la spécificité de la méthode.

Linéarité et droite d'étalonnage

L'étude de calibration a été réalisée sur cinq concentrations différentes d'isradipine (5 extractions étant réalisées pour chacune des concentrations étudiées). La droite d'étalonnage a été construite à partir des rapports des surfaces des pics de l'isradipine et du butamben en fonction des concentrations en isradipine respectives.

La linéarité de la méthode a été vérifiée pour une gamme de concentrations plasmatiques comprises entre 5 et 100 ng/ml.

Limite de détection et limite de quantification

La plus faible concentration en isradipine à la fois détectée et quantifiable est 5 ng/ml.

Reproductibilité et répétabilité

Le coefficient de reproductibilité déterminé sur 6 mesures pour la concentration 10 ng/ml est égal à 6,6 %.

Le coefficient de répétabilité déterminé sur 3 jours consécutifs est égal à 3,7 % pour la concentration de 10 ng/ml.

Annexe 3 : Evolution du rythme cardiaque chez le rat SHR

Tableau A : Evolution du rythme cardiaque (battements/min) après administration per os (5 ml/kg) d'eau et des nanosphères non chargées en isradipine à des rats SHR (n=8 par groupe).

Temps (h)	Eau osmosée	Nanosphères de PCL	Nanosphères de PLAGA	Nanosphères d'Eudragit
0	490 ± 14	474 ± 21	446 ± 16	412 ± 15
0,5	484 ± 21	449 ± 15	415 ± 20	425 ± 32
1	446 ± 18	445 ± 17	394 ± 33	433 ± 17
2	484 ± 32	473 ± 15	385 ± 18	448 ± 17
4	461 ± 23	438 ± 22	401 ± 12	410 ± 22
6	481 ± 17	471 ± 13	378 ± 15	380 ± 18
8	480 ± 15	435 ± 16	411 ± 30	404 ± 15
10	457 ± 20	447 ± 17	425 ± 14	426 ± 10
24	462 ± 15	444 ± 33	434 ± 17	444 ± 14

Les résultats sont exprimés en moyenne ± écart-type.

Tableau B : Evolution du rythme cardiaque (battements/min) après administration per os d'isradipine (1 mg/kg) sous forme de solution dans le PEG ou des nanosphères, à des rats SHR (n=8 par groupe).

Temps (h)	Solution dans le PEG	Nanosphères de PCL	Nanosphères de PLAGA	Nanosphères d'Eudragit
0	465 ± 21	438 ± 15	392 ± 12	451 ± 17
0,25	454 ± 12	453 ± 14	383 ± 15	437 ± 24
0,5	460 ± 17	484 ± 31	417 ± 18	446 ± 23
1	444 ± 13	410 ± 11	434 ± 32	389 ± 15
2	390 ± 15	423 ± 13	359 ± 15	421 ± 12
4	415 ± 12	444 ± 10	430 ± 17	445 ± 17
6	422 ± 16	412 ± 14	385 ± 15	389 ± 15
8	416 ± 14	434 ± 8	392 ± 11	423 ± 12
10	464 ± 23	465 ± 12	400 ± 15	449 ± 16
24	413 ± 14	457 ± 12	431 ± 18	412 ± 20

Les résultats sont exprimés en moyenne ± écart-type.

Tableau C : Evolution du rythme cardiaque (battements/min) après administration per os d'isradipine (2,5 mg/kg) sous forme de solution dans le PEG ou des nanosphères, à des rats SHR (n=8 par groupe).

Temps (h)	Solution dans le PEG	Nanosphères de PCL	Nanosphères de PLAGA	Nanosphères d'Eudragit
0	484 ± 15	456 ± 20	424 ± 11	395 ± 12
0,25	456 ± 20	421 ± 15	445 ± 24	361 ± 20
0,5	421 ± 12	435 ± 31	418 ± 12	358 ± 14
1	435 ± 29	414 ± 18	447 ± 18	425 ± 23
2	444 ± 14	387 ± 16	465 ± 22	447 ± 16
4	415 ± 16	374 ± 22	432 ± 30	402 ± 12
6	450 ± 17	402 ± 13	471 ± 15	441 ± 24
8	475 ± 22	419 ± 15	448 ± 21	457 ± 25
10	409 ± 18	431 ± 22	415 ± 18	428 ± 19
24	441 ± 14	448 ± 10	406 ± 15	412 ± 22



RESUME

L'isradipine, antagoniste calcique utilisé par voie orale dans le traitement de l'hypertension artérielle, est caractérisée par un métabolisme hépatique important qui limite sa biodisponibilité et une demi-vie brève qui oblige à multiplier les administrations.

L'objectif principal de cette thèse est l'étude de l'incorporation de l'isradipine, dans des vecteurs colloïdaux polymères, les nanosphères, afin de modifier les propriétés pharmacocinétiques et pharmacodynamiques de cette molécule.

Nous avons préparé trois types de nanosphères à partir soit de polymères biodégradables (la poly(ϵ -caprolactone) (PCL) et les copolymères de l'acide DL lactique-co-glycolique (50/50) (PLAGA), soit de polymères non biodégradables (les Eudragit™ RL et RS).

Les études *in vitro* ont permis de connaître les caractéristiques physico-chimiques des nanosphères. Le diamètre des nanosphères d'isradipine est supérieur à 100 nm pour celles de PLAGA et d'Eudragit et à 200 nm pour celles de PCL. Le potentiel de surface des vecteurs est négatif (pour la PCL et le PLAGA) ou positif (pour les Eudragit). Les pourcentages d'incorporation de l'isradipine sont élevés, compris entre 76% (Eudragit) et 97% (PLAGA) selon le type de nanosphères. Nous avons montré par analyse thermique différentielle que les structures, semi-cristalline de la PCL et amorphe du PLAGA et des Eudragit, sont conservées lors de la formation des nanosphères. En revanche, l'isradipine passe de l'état cristallin à l'état amorphe dans les nanosphères, ce qui est favorable à une dissolution rapide et une bonne diffusion de l'isradipine. Les profils de libération *in vitro* de l'isradipine à partir des nanosphères sont ceux de formes à libération modifiée et ralentie.

Les études *in vivo* ont nécessité de mettre au point le dosage par CLHP de l'isradipine dans les milieux biologiques. L'efficacité antihypertensive de l'isradipine incorporée dans les nanosphères a été comparée à celle d'une forme de référence (solution d'isradipine dans le PEG 400).

L'administration orale des nanosphères d'isradipine à des rats SHR a conduit d'une part, à une diminution efficace et prolongée de la pression artérielle jusqu'à la 10^{ème} heure, et d'autre part, à la réduction du pic hypotenseur post administration de façon significative par rapport à la forme de référence.

Les études pharmacocinétiques plasmatiques après injection intraveineuse et après administration orale des nanosphères ont montré que la biodisponibilité absolue des nanosphères de PCL ($29,9 \pm 5,1\%$) et de PLAGA ($31,5 \pm 8,4\%$) est significativement augmentée par rapport à celle de la forme de référence ($17,4 \pm 6,5\%$). De plus, la demi-vie d'élimination de l'isradipine est fortement augmentée après incorporation dans les nanosphères.

L'hypothèse d'une absorption lymphatique de l'isradipine incorporée aux nanosphères permettant d'éviter l'effet de premier passage hépatique a été étudiée après canulation du canal mésentérique chez le rat. Malgré des taux d'isradipine retrouvés dans la lymphe très faibles par rapport à la dose administrée par voie intragastrique ($<0,015\%$), l'augmentation des taux lymphatiques d'isradipine est significative après administration des nanosphères comparées à la solution dans le PEG.

En conclusion, les nanosphères présentent un intérêt comme forme à libération prolongée de l'isradipine. Elles ont pour avantage d'une part, de réduire le pic hypotenseur qui suit l'administration et qui est responsable des principaux effets secondaires de l'isradipine et d'autre part, de maintenir la réduction de la pression artérielle de façon prolongée. Les valeurs élevées des rapports vallée sur pic (en particulier, un rapport égal à $52,8 \pm 4,1\%$ pour les nanosphères de PLAGA), obtenus lors d'une prise unique prédisent un contrôle efficace de la pression artérielle sur l'ensemble du nyctémère, et a *fortiori*, lors d'une administration chronique des nanosphères d'isradipine.

MOTS CLES : Nanosphères - Isradipine - Libération Prolongée - Lymphe