



HAL
open science

Profil de dissolution et caractérisation d'implants biodégradables

Caroline Carrie

► **To cite this version:**

Caroline Carrie. Profil de dissolution et caractérisation d'implants biodégradables. Sciences du Vivant [q-bio]. 2021. dumas-03597347

HAL Id: dumas-03597347

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03597347>

Submitted on 4 Mar 2022

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.

UNIVERSITÉ CLERMONT AUVERGNE
UFR DE PHARMACIE

Année : 2020-2021

N° 21507320

THÈSE D'EXERCICE
pour le
DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement
le 20 Octobre 2021
par
Caroline CARRIE

PROFIL DE DISSOLUTION ET CARACTÉRISATION D'IMPLANTS BIODÉGRADABLES

Directeur de thèse : **Mme Marie-Josèphe GALMIER**

Jury

Président : Mme Marie-Josèphe GALMIER	Maître de conférences, UFR Pharmacie de Clermont-Ferrand
Membres : Mr Éric BEYSSAC	Professeur, UFR de Pharmacie, Clermont- Ferrand
Mr Bruno ALIES	Maître de conférences, UFR de Sciences Pharmaceutiques, Université de Bordeaux
Mr Philip CHENNEL	Maître de conférences, UFR de Pharmacie de Clermont-Ferrand
Mme Mercedes QUINTANA	Maître de conférences, UFR de Pharmacie de Clermont-Ferrand

UNIVERSITÉ CLERMONT AUVERGNE
UFR DE PHARMACIE

Année : 2020-2021

N° 21507320

THÈSE D'EXERCICE
pour le
DIPLOME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement
le 20 Octobre 2021
par
Caroline CARRIE

**PROFIL DE DISSOLUTION ET
CARACTÉRISATION D'IMPLANTS
BIODÉGRADABLES**

Directeur de thèse : **Mme Marie-Josèphe GALMIER**

Jury

Président : Mme Marie-Josèphe GALMIER	Maître de conférences, UFR Pharmacie de Clermont-Ferrand
Membres : Mr Éric BEYSSAC	Professeur, UFR de Pharmacie, Clermont- Ferrand
Mr Bruno ALIES	Maître de conférences, UFR de Sciences Pharmaceutiques, Université de Bordeaux
Mr Philip CHENNEL	Maître de conférences, UFR de Pharmacie de Clermont-Ferrand
Mme Mercedes QUINTANA	Maître de conférences, UFR de Pharmacie de Clermont-Ferrand

REMERCIEMENTS

En premier lieu, je souhaite remercier Mme Marie-Josèphe GALMIER, ma directrice de thèse pour son aide précieuse dans la rédaction de cette thèse.

Je remercie naturellement l'ensemble des professeurs et l'équipe pédagogique de l'UFR de Pharmacie de l'Université Clermont Auvergne m'ayant accompagné au long de ces six années.

Je souhaite également remercier les enseignants de Clermont-Ferrand ayant accepté d'être membres de mon jury de thèse, à savoir Mr Éric BEYSSAC, Mme Mercedes QUINTANA DA INES et Mr Philip CHENNELL. Je souhaite remercier plus particulièrement Mr CHENNELL, m'ayant encadré au cours de mon stage hospitalier au sein du laboratoire de contrôle et développement du CHU Gabriel-Montpied et pour la confiance qu'il m'a accordée en me confiant la rédaction d'un article scientifique.

Je remercie les enseignants du Master « Analytical chemistry for drugs and natural products » pour leur enseignement et en particulier Mr Bruno ALIES d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Pour leur accueil chaleureux et la formation qu'ils m'ont apportée lors de mon stage en entreprise chez Phast GmbH à Constance (Allemagne), je souhaite remercier Mr Martin KLEIN, mon superviseur, et Mme Andreea FLOROIU, PhD, m'ayant incluse dans son projet et pour son amitié.

Je remercie l'équipe de Sitec Pharmabio à Barcelone, Mme Hana DANAN, Mr Pierandrea ESPOSITO et Mr Jésus CARAMES pour m'avoir permis de travailler à leurs côtés, pour le savoir qu'ils m'ont transmis, pour leur amitié et pour leur proposition d'effectuer mon PhD au sein de leur équipe.

Je remercie Mr Roland BODMEIER pour m'avoir permis d'effectuer mon stage de fin d'études au sein de son groupe de recherche à l'Université Freie Universität Berlin, en Allemagne.

Je tiens à remercier Mr Johannes KRÄMER pour m'avoir soutenue et conseillée tout au long de mes études de pharmacie.

Je voudrais exprimer ma reconnaissance envers mes parents et mes frères qui m'ont apporté leur soutien tout au long de ma démarche.

Je remercie mon compagnon pour son soutien inconditionnel au cours des dernières étapes de mes études.

Un grand merci à mes camarades pour leur soutien et leur amitié.

SOMMAIRE

LISTE DES FIGURES.....	5
LISTE DES TABLEAUX	8
LISTE DES EQUATIONS	8
LISTE DES ABRREVIATIONS.....	9
1. INTRODUCTION.....	11
2. PARTIE 1 : Cadre théorique	12
2.1. Implants à base de polymère biodégradable.....	12
2.2. Intérêt thérapeutique des implants biodégradables.....	15
2.2.1. Implants de rispéridone.....	15
2.2.2. Implants de dexaméthasone.....	16
2.2.3. Implants de bimatoprost	17
2.3. Préparation d'implants.....	18
2.3.1. Méthode du « Solvent casting ».....	18
2.3.2. Extrusion par seringue	18
2.3.3. Extrusion à double vis	19
2.4. Libération du principe actif	20
2.5. Caractérisation de l'implant	22
2.5.1. Calorimétrie Différentielle à Balayage (DSC).....	22
2.5.2. Microscopie électronique à balayage.....	23
2.5.3. Résonance magnétique nucléaire (RMN).....	23
2.5.3.1. Concepts de base	23
2.5.3.2. Spectromètre de résonance magnétique nucléaire	29
2.5.3.3. Les spectres RMN.....	30
2.5.3.4. Expérience DOSY (Diffusion Ordered Spectroscopy)	33
2.5.4. Spectroscopie infrarouge (IR).....	35
2.5.4.1. Principes de base de la spectroscopie infrarouge.....	35
2.5.4.2. Spectromètre IR	36
2.5.4.3. Le spectre FTIR.....	38
2.5.5. Chromatographie liquide	39
2.5.5.1. Chromatographie d'exclusion stérique	40
2.5.5.2. Détecteurs utilisés pour l'analyse de polymères	41
3. OBJECTIFS DE L'ETUDE	44

4. PARTIE 2 : Section expérimentale	44
4.1. Matériels et méthodes	44
4.1.1. Matériels	44
4.1.2. Méthodes.....	45
4.1.2.1. Préparation des implants	45
4.1.2.2. Test de dissolution.....	46
4.1.2.3. Spectrométrie de résonnance magnétique nucléaire	47
4.1.2.4. Spectroscopie infrarouge.....	47
4.1.2.5. Statistiques	47
4.2. Résultats et discussion.....	48
4.2.1. Libération <i>in vitro</i> de principe actif.....	48
4.2.1.1. Bimatoprost.....	48
4.2.1.2. Dexaméthasone	51
4.2.1.3. Rispéridone	54
4.2.2. Études de caractérisation	57
4.2.2.1. RMN.....	57
4.2.2.2. FTIR	66
4.3. Conclusion et perspectives d'avenir	69
BIBLIOGRAPHIE	71
ANNEXE I : Courbe de calibration et du bimatoprost, dexaméthasone et rispéridone et validation statistique de la régression linéaire.....	75
ANNEXE II : Table des déplacements chimiques du ¹H en RMN (59).....	78
ANNEXE III : Table des déplacements chimiques du ¹³C en RMN (59)	80
SERMENT DE GALIEN.....	81
RÉSUMÉ.....	82

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Représentation graphique de la concentration en substance active après administration répétée (ligne fine) et après administration via système à libération contrôlée (ligne épaisse) (1)	12
Figure 2: Systèmes “réservoir” (A) et “matriciel” (B) d’administration de principe actif. Bleu clair : polymère ; Bleu foncé : principe actif.....	13
Figure 3: Structure moléculaire du Poly Lactic-co-Glycolique Acide (PLGA) (x représente le nombre d’unités d’acide lactique et y le nombre d’unités d’acide glycolique)	14
Figure 4: Dégradation de l'acide poly(lactique-co-glycolique) par hydrolyse.....	14
Figure 5: Profils de dégradation et d’érosion de polymères de types PLGA (courbe rouge) et PEG-PLGA (courbe bleue) (7).....	15
Figure 6: Structure moléculaire de la rispéridone	16
Figure 7: Structure moléculaire de la dexaméthasone	16
Figure 8: Représentation schématique de l’anatomie de l’oeil	17
Figure 9: Structure moléculaire du bimatoprost.....	18
Figure 10: Montage pour extrusion par seringue (21).....	19
Figure 11: Schéma du fonctionnement d'extrusion par double vis (2).....	20
Figure 12: Courbe typique de libération de principe actif à partir d’un implant de PLGA	21
Figure 13: Représentation schématique du spin nucléaire (35)	24
Figure 14: Niveaux énergétiques d'un noyau de spin 1/2 dans un champ magnétique extérieur B_0 (35).....	25
Figure 15: Précession d'un moment magnétique autour d'un champ magnétique B_0	25
Figure 16 : Effet de l’application d'un champ magnétique B_1 (impulsion) sur l’aimantaion totale d’équilibre M_0 (35)	26
Figure 17: Orientation des noyaux atomiques a) en l'absence de champ magnétique, b) en présence d'un champ magnétique B_0 (35)	27
Figure 18: Comportement du moment magnétique au cours du phénomène de RMN.....	27
Figure 19: Comportement du moment magnétique et phénomène de Free Induction Decay..	28
Figure 20: Coupe transversale d'un appareil de RMN (37).....	29
Figure 21: Exemple de spectre RMN du proton	30
Figure 22: Structure moléculaire du tétraméthylsilane	31
Figure 23: Spectre RMN du proton exprimé en fonction de l’intensité du gradient (39).....	33

Figure 24: Coubes des atténuation des signaux en fonction des paramètres expérimentaux (39)	34
.....	34
Figure 25: Spectre DOSY des signaux RMN en fonction du log du coefficient de diffusion (39)	34
.....	34
Figure 26: Modes de vibration des liaisons moléculaires interatomiques (43).....	36
Figure 27: Représentation schématique d'un spectromètre infrarouge (mesure en transmission) (44)	37
Figure 28: Représentation schématique d'un dispositif ATR (45)	38
Figure 29: Exemple de spectre infrarouge (46).....	39
Figure 30: Bandes d'absorption caractéristiques du spectre IR (44)	39
Figure 31: Schéma du principe de la chromatographie d'exclusion stérique (47)	41
Figure 32: Représentation schématique d'un détecteur MALS (51)	42
Figure 33: Photos des implants de bimatoprost dans leur milieu de dissolution du jour 1 au jour 31. De gauche à droite: PLGA 30% Bimatoprost, PLGA 50% Bimatoprost, PEG-PLGA 30% Bimatoprost, PEG-PLGA 50% Bimatoprost.....	48
Figure 34: Spectres UV des implants de bimatoprost de PLGA et PEG-PLGA aux concentrations en bimatoprost de 30 et 50%, au jour 1 du test de dissolution.....	49
Figure 35: Libération de bimatoprost au cours du temps. Carrés: PLGA (Resomer 503H); Losanges: PEG-PLGA (PEG-Resomer 503H); Symboles vides: 30% bimatoprost; Symboles pleins: 50% bimatoprost.....	50
Figure 36: Libération de bimatoprost de trois implants provenant du même lot. Carrés : implant provenant du début de processus d'extrusion, losanges : implant du milieu de processus, triangles : implant de la fin du processus d'extrusion.....	51
Figure 37: Photos de la libération de dexaméthasone à partir d'implants dans leur milieu de dissolution du jour 1 au jour 3, de PEG-PLGA 30% Dexaméthasone (gauche) et PEG-PLGA 50% Dexaméthasone (droite)	52
Figure 38: Spectres UV des implants de dexaméthasone de PEG-PLGA aux concentrations en dexamethasone de 30 et 50%, au jour 1 du test de dissolution	53
Figure 39: Libération de dexamethasone au cours du temps. Carrés : PLGA (Resomer 503H); Losanges: PEG-PLGA (PEG-Resomer 503H); Symboles vides: 30% dexamethasone; Symboles pleins: 50% dexamethasone	54
Figure 40: Photos de la libération de Rispéridone à partir d'implants dans leur milieu de dissolution du jour 1 au jour 31, de PEG-PLGA 30% Rispéridone (gauche) et PEG-PLGA 50% Rispéridone (droite).....	55

Figure 41: Spectres UV des implants de rispéridone de PEG-PLGA aux concentrations en rispéridone de 30 et 50%, au jour 1 du test de dissolution.....	56
Figure 42: Libération de la rispéridone des implants au cours du temps. Carrés vides: PLGA 502H 10% rispéridone; Losanges: PLGA 502H 50% rispéridone; Triangles: PEG-PLGA 503H; Triangle vide: 30% rispéridone; Triangle plein: 50% rispéridone.....	57
Figure 43: Spectres du proton du Resomer RG 502H dans a) le d6-DMSO, b) le CdCl ₃ et du carbone dans c) le d6-DMSO et d) le CdCl ₃	58
Figure 44: Spectre RMN protonique du polymère Resomer RG 503H. a) pic CH, b) pic CH ₂ , c) pic CH ₃	59
Figure 45: Spectre RMN du carbone du mélange 1:1 des polymères Resomer RG 503H et Resomer RG 752S.....	60
Figure 46: Spectres RMN protoniques de a) Resomer RG 502H et de b) Implant Resomer RG 502H 50% dexaméthasone.....	61
Figure 47: Structure moléculaire 2D de la dexaméthasone.....	62
Figure 48: Spectre RMN photonique des polymères a) Resomer 752S and b) Resomer 503H	63
Figure 49: Spectres RMN du carbone de a) Resomer RG 503H, b) Resomer RG 752S et c) Mélange 1:1 Resomer RG 503H et 752S.....	63
Figure 50: Spectre DOSY du mélange 1:1 Resomer RG 503H et 752S.....	64
Figure 51: Spectre DOSY transform du mélange 1:1 Resomer RG 503H/752S	65
Figure 52: Spectre FTIR du mélange 1:1 de PEG et PLGA	67
Figure 53: Spectre FTIR des microparticules d'Expansorb DLG 50-6	68
Figure 54: Courbe de calibration du bimatoprost (Tampon phosphate pH 7.2)	75
Figure 55: Courbe de calibration de la dexaméthasone (NaCl 0,9%).....	76
Figure 56: Courbe de calibration de la rispéridone (Tampon phosphate pH 7.4).....	77

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I: Détermination du nombre de spin d'un atome (34).....	24
Tableau II: Multiplicité des signaux de RMN ¹ H (34).....	32
Tableau III: Température de fusion des principes actifs de l'étude.....	45
Tableau IV: Propriétés physico-chimiques des polymères PLGA de la gamme Resomer	45
Tableau V : Formulations des implants.....	46
Tableau VI : Identification des pics du spectre RMN du carbone du mélange Resomer 503H/752S.....	60
Tableau VII: Identification des pics du spectre RMN du proton de l'implant Resomer RG 502H 50% Dexamethasone	61
Tableau VIII: Identification des pics en fonction du coefficient de diffusion	66

LISTE DES EQUATIONS

Équation 1: Formule mathématique du moment magnétique μ	24
Équation 2: Déplacement chimique (34).....	31
Équation 3: Loi de Hooke	35
Équation 4: Intensité de lumière diffusée par un échantillon de polymère en solution (54)....	43
Équation 5: Constante K pour un rayon laser vertical incident polarisé (54)	43
Équation 6: Calcul de pourcentage d'unité dans un échantillon à partir de son spectre RMN.	59

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ATR : Réflectance Totale Atténuée

BIM : Bimatoprost

CdCl₃ : Chloroforme deutéré

Cp: Capacité thermique

DEX: Dexaméthasone

DLS: Dynamic Light Scattering

D6-DMSO : Diméthylsulfoxyde deutéré

DOSY : Diffusion Ordered Spectroscopy

DSC: Differential Scanning Calorimetry

DV: Viscosity Detector

FDA: Food and Drug Administration

FID: Free Induction Decay

FT : Fourier Transform

HPLC : Chromatographie Liquide Haute Performance

IR: Infra-Rouge

MALS: Multi Angle Light Scattering

MEB : Microscope Electronique à Balayage

PEG : Poly-Éthylène-Glycol

PFG : Gradient de champ pulsé (Pulsed Field Gradient)

pH: Potentiel Hydrogène

PGA: Poly Glycolic Acid

PLA: Poly Lactic Acid

PLGA: Poly (lactic-*co*-glycolic) acid

Ppm : Parties par million

Rg : Rayon de giration

RID: Refractive Index Detector

RIS: Rispéridone

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

Rpm : Rotations par minute

SEC : Chromatographie d'Exclusion Stérique

STE : Echo stimulé (Stimulated Echo)

T_c : Température de cristallisation

T_g : Température de transition vitreuse

T_m : Température de fusion

TMS : Tétraméthylsilane

UV-VIS : UltraViolet-Visible

VEGF : Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

1. INTRODUCTION

Certaines pathologies nécessitent un traitement d'une durée de plusieurs jours, plusieurs semaines, voire de plusieurs mois. De manière classique, le traitement du patient peut être basé sur la prise quotidienne ou régulière de comprimés. Ce type de traitement peut être d'une part un poids pour le patient car celui-ci doit respecter le schéma de prise de ces comprimés mais ce traitement peut également présenter des risques concernant la toxicité du médicament ainsi que les effets indésirables. En effet, comme représenté par la ligne fine dans la figure 1, lors d'une administration répétée, la concentration plasmatique de substance active se trouve alternativement à des niveaux infra thérapeutiques, c'est-à-dire trop faibles pour obtenir un effet thérapeutique efficace, dans la fenêtre thérapeutique dans laquelle la substance active exerce son activité thérapeutique et au-delà de la concentration thérapeutique où la concentration plasmatique devient toxique pour le patient. Par conséquent, une solution pour améliorer l'effet thérapeutique du principe actif consiste à développer un système d'administration à libération prolongée. La prolongation de la libération du principe actif dans le temps peut permettre de maintenir une concentration constante de principe actif au niveau du site d'action, et donc d'obtenir un effet thérapeutique supérieur ou un rapport bénéfice/risque plus avantageux (1). En effet, en observant le profil de concentration plasmatique de principe actif libéré par un système à libération contrôlée présenté par la ligne épaisse de la figure 1, on peut voir que la concentration augmente afin d'obtenir un plateau où la concentration en substance active est constante et maintenue dans la fenêtre thérapeutique. Les systèmes d'administration de principe actif à libération prolongée peuvent être conçus pour faciliter le traitement du patient en réduisant les administrations. Les principes actifs peuvent être administrés par voie orale, parentérale et locale (1). Ce travail se concentre sur les implants, en particulier les implants fabriqués à partir de polymère biodégradable. Les systèmes d'administration de principe actif implantables facilitent l'observance du traitement par le patient car il s'agit d'une administration unique. Comme l'implant peut être injecté à proximité du site d'action ou directement dans la circulation systémique, les barrières biologiques peuvent être contournées, échappant ainsi à la dégradation du principe actif, améliorant ainsi l'administration du principe actif au niveau du site d'action à la concentration souhaitée (2). La libération contrôlée du principe actif permet de délivrer une quantité constante de principe actif au niveau du site d'action. Limiter ainsi la variation de concentration en principe actif au niveau du site d'action permet de réduire les effets secondaires et une potentielle toxicité.

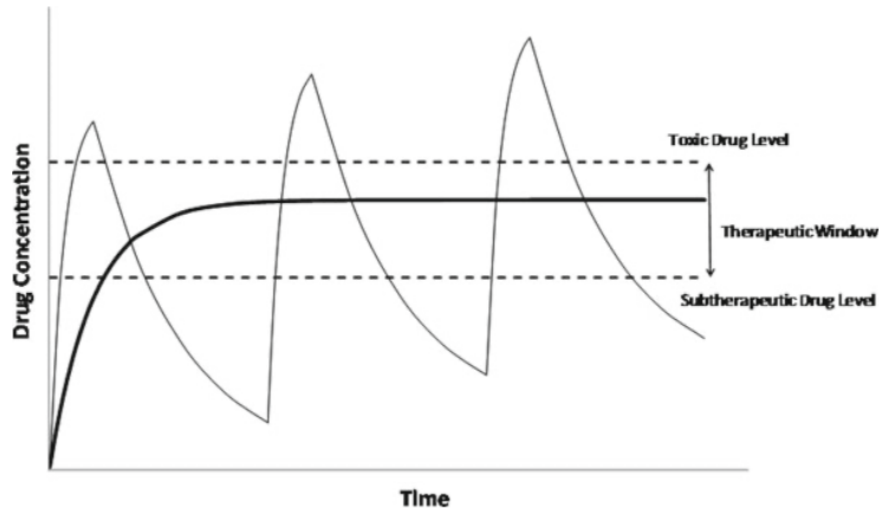


Figure 1: Représentation graphique de la concentration en substance active après administration répétée (ligne fine) et après administration via système à libération contrôlée (ligne épaisse) (1)

2. PARTIE 1 : Cadre théorique

2.1. Implants à base de polymère biodégradable

Les implants médicamenteux peuvent être de deux types distincts : les implants réservoirs et les implants matriciels (2). Dans les implants de type réservoir, le principe actif contenu dans le cœur de l'implant est recouvert d'une couche de polymère poreux dont le rôle est de contrôler la vitesse de libération de la substance active (Figure 2A). Dans les implants de type matriciel, au lieu d'être enfermé dans un réservoir, le principe actif est dispersé dans la matrice, composée de polymère (Figure 2B) (3). La vitesse de libération du principe actif dépend du type d'implant, de sa forme, de sa formulation et des propriétés physico-chimiques de la molécule active utilisée. Les polymères peuvent être non biodégradables ou biodégradables. Parmi les polymères biodégradables, on peut trouver des polymères d'origine naturelle et des polymères synthétiques, ces derniers étant un sujet d'intérêt dans la recherche sur l'administration des principes actifs sous la forme de produits pharmaceutiques biodégradables existant déjà sur le marché (3).

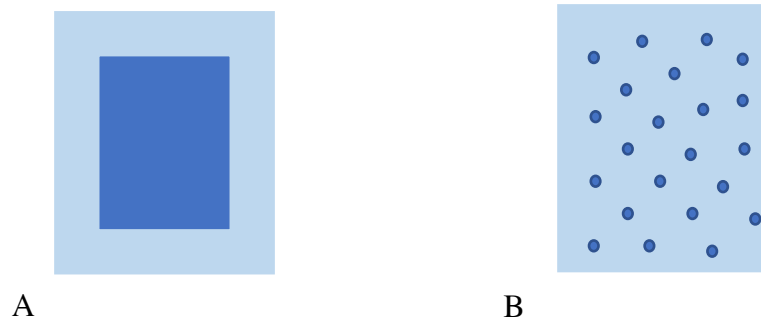


Figure 2: Systèmes “réservoir” (A) et “matriciel” (B) d’administration de principe actif. Bleu clair : polymère ; Bleu foncé : principe actif.

Le polymère synthétique biodégradable le plus populaire est l’acide poly(lactique-co-glycolique) (PLGA) (Figure 2). Le PLGA est un copolymère composé d’unités de polyacide lactique (PLA) et de polyacide glycolique (PGA) (Figure 3) (4). L’hydrolyse des liaisons ester se produit en contact de l’eau et dégrade le PLGA en acide lactique et en acide glycolique (4) (Figure 4). Les unités d’acide lactique et glycolique sont prises en charge par le cycle de Krebs et sont éliminées sous forme de CO₂ et d’eau dans les urines, fèces et par la respiration. La structure du copolymère lui-même est également un élément clé pour moduler la dégradation et donc la libération du principe actif. En effet, comme l’acide lactique contient un groupe latéral méthyle, cette unité est plus hydrophobe que l’unité d’acide glycolique. Par conséquent, le rapport entre les unités PLA et PGA influence l’hydrophobie du copolymère (4). Un PLGA riche en acide lactique sera moins hydrophile, absorbera moins d’eau et aura donc une dégradation plus lente. Un polymère de type PLGA 75:25 aura par conséquent une dégradation plus rapide qu’un polymère 85:15 de par sa plus grande proportion en acide glycolique. Des recherches antérieures ont établi que d’autres facteurs pouvaient avoir un impact sur la biodégradation du copolymère, comme la température, la taille du dispositif, la forme de sa surface et son poids moléculaire (4). Le pH du milieu de dissolution influe considérablement sur la dégradation du polymère. En effet, un milieu *in vitro* de pH fortement alcalin ou fortement acide tend à accélérer la dégradation du PLGA. L’érosion du polymère, dont la dégradation mène au relargage d’acide lactique et d’acide glycolique, permettrait donc de maintenir et d’accélérer cette dégradation en acidifiant le milieu de dissolution. De plus, les propriétés

chimiques du principe actif utilisé ainsi que sa concentration dans la matrice influencent fortement sur la dégradation du polymère.

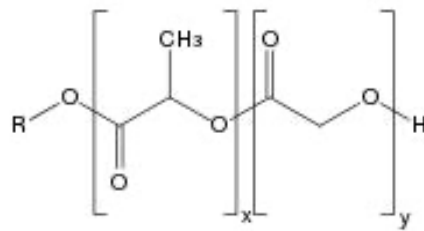


Figure 3: Structure moléculaire du Poly Lactic-co-Glycolique Acide (PLGA) (x représente le nombre d'unités d'acide lactique et y le nombre d'unités d'acide glycolique)

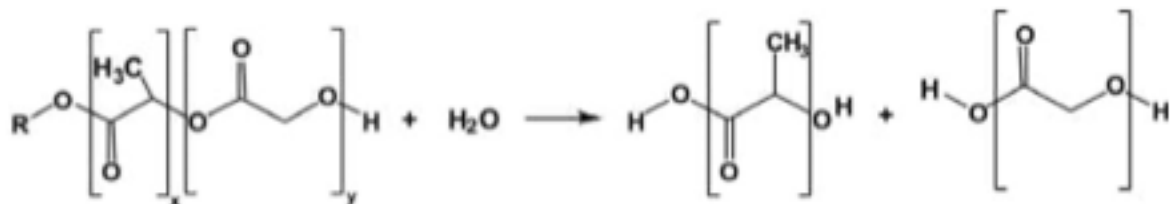


Figure 4: Dégradation de l'acide poly(lactique-co-glycolique) par hydrolyse

Les polymères de type PLGA sont classés en fonction du ratio PLA/PGA mais également en fonction du groupe terminal fonctionnel. Deux types de groupes terminaux peuvent être trouvés, les groupes terminaux acides et les groupes terminaux esters ; le groupe terminal ester confère une nature hydrophobe tandis que les groupes terminaux acides donnent un caractère plus hydrophile au polymère (5). L'augmentation de l'hydrophilie du PLGA peut être obtenue en utilisant du polyéthylène glycol (PEG) comme partie du polymère, formant un copolymère PEG-PLGA (6). La pégylation du PLGA influence donc la biodégradation de l'implant. Comme l'a montré K. Mäder (7), pour les polymères de la gamme RESOMER®, l'influence de la pégylation est visible sur la dégradation et l'érosion du polymère. La figure 5 montre que le copolymère PEG-PLGA semble avoir un taux de dégradation et d'érosion plus linéaire et plus lent que le polymère PLGA, cette caractéristique peut permettre à l'implant de libérer le principe actif de manière plus prolongée (7).

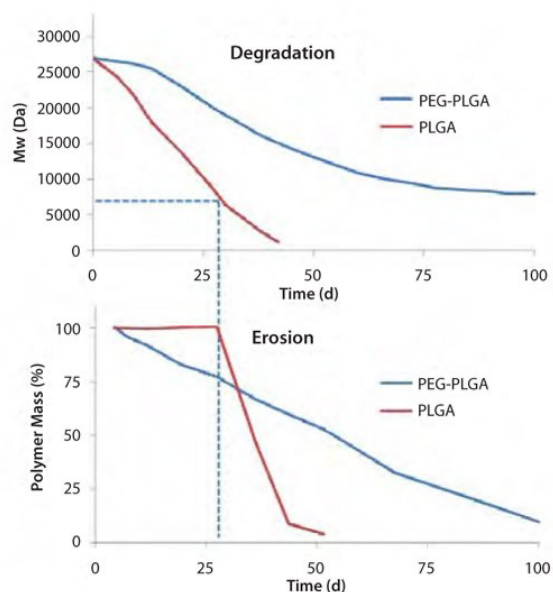


Figure 5: Profils de dégradation et d'érosion de polymères de types PLGA (courbe rouge) et PEG-PLGA (courbe bleue) (7)

2.2. Intérêt thérapeutique des implants biodégradables

Les polymères biodégradables sont utilisés en tant que systèmes d'administration de principe actif dans plusieurs domaines médicaux et notamment le copolymère PLGA, étant un excipient approuvé par la FDA (Food and Drug Administration). Dans cet écrit, l'accent sera placé sur les implants biodégradables à base de PLGA et PEG-PLGA pour le traitement oculaire. Deux principes actifs sont utilisés pour l'étude, le bimatoprost et la dexaméthasone étant les molécules actives des implants commercialisés DURYSTA® (8) et OZURDEX® (9), respectivement. En outre, la rispéridone est également ajoutée à l'étude pour étudier sa potentielle utilisation au sein d'implants biodégradables.

2.2.1. Implants de rispéridone

La rispéridone (Figure 6) est une molécule thérapeutique appartenant à la classe des pyridopyrimidines, de nature hydrophobe, de log P de 3,49 et pratiquement insoluble dans l'eau. Elle est utilisée en tant qu'antipsychotique atypique dans le traitement de la manie et de la schizophrénie (10). La rispéridone agit par antagonisme des récepteurs dopaminergiques D₂ et sérotoninergiques 5-HT₂ et se lie également aux récepteurs α₁ adrénergiques (11). Cette molécule thérapeutique est administrée par voie orale comme principe actif de première intention pour la schizophrénie, elle est connue pour être plus efficace que les antipsychotiques

typiques dans la prévention des rechutes (12). Les antipsychotiques injectables ont des effets secondaires lourds qui sont réduits dans l'utilisation du traitement oral et plus particulièrement avec les antipsychotiques atypiques. Cependant, un inconvénient de la médication orale est l'adhésion au traitement, en particulier pour les patients souffrant de manie et de schizophrénie, en plus des effets secondaires persistants liés à cette voie d'administration. Des implants de rispéridone à base de PLGA sont développés pour éviter les effets secondaires liés à l'administration orale et contourner le métabolisme hépatique, ce qui permettrait d'utiliser une plus faible teneur en principe actif et de réduire la toxicité (12). RISPERDALCONSTA® est une forme injectable de rispéridone à action prolongée indiquée dans le traitement de la schizophrénie ou dans le traitement du trouble bipolaire I en tant que monothérapie ou en association (13). Le produit pharmaceutique est basé sur la rispéridone encapsulée dans des microsphères de PLGA à libération prolongée qui sont injectées dans le muscle sous forme de suspension (13). La libération *in vitro* de la rispéridone des microsphères de PLGA présente une faible libération explosive au cours des premiers jours, suivie par une phase de plateau jusqu'au vingtième jour à partir duquel une libération très rapide de la rispéridone a lieu. Après le jour 35, la libération de rispéridone est presque complète et tend vers un plateau (14).

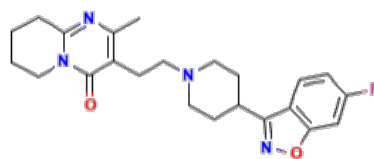


Figure 6: Structure moléculaire de la rispéridone

2.2.2. Implants de dexaméthasone

La dexaméthasone (Figure 7) est un puissant corticostéroïde synthétique utilisé comme agent anti-inflammatoire (15). Cette molécule thérapeutique possède une faible solubilité dans l'eau et un log P de 1,83 (16).

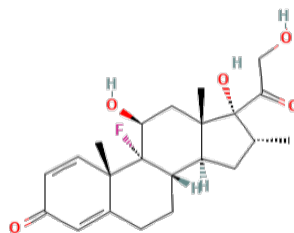


Figure 7: Structure moléculaire de la dexaméthasone

Dans le produit pharmaceutique OZURDEX[®], commercialisé par Allergan, la dexaméthasone est indiquée dans le traitement de l'œdème maculaire diabétique, de l'œdème maculaire consécutif à une occlusion de la veine rétinienne centrale ou ramifiée et de l'uvéïte non infectieuse du segment postérieur de l'œil (9). Elle agit donc en inhibant la formation de cytokines pro-inflammatoires, notamment le VEGF (facteur de croissance de l'endothélium vasculaire) et en réduisant l'inflammation par son activité anti-phospholipase A2 (17). Dans le produit pharmaceutique OZURDEX[®], la dexaméthasone est contenue dans la matrice PLGA formant l'implant qui sera injecté dans l'humeur vitrée, au fond de l'œil (Figure 8). L'implant OZURDEX[®] est injecté dans le corps vitré grâce à un applicateur spécifique à usage unique (18).

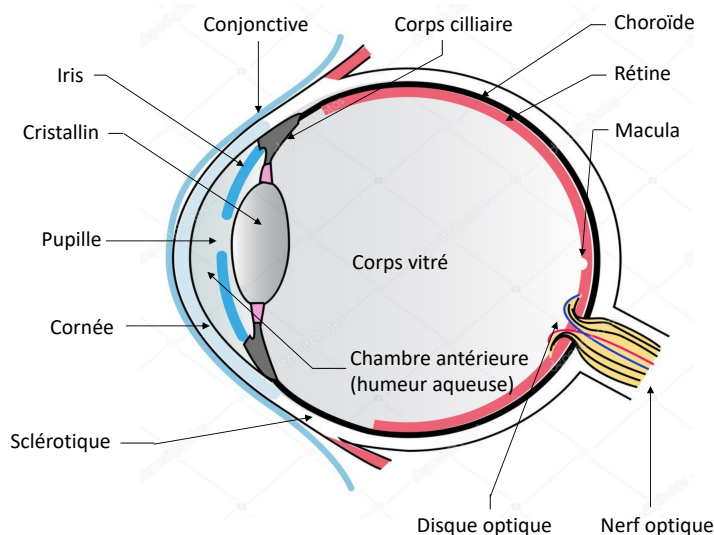


Figure 8: Représentation schématique de l'anatomie de l'œil

2.2.3. Implants de bimatoprost

Le bimatoprost (Figure 9) est un analogue synthétique de la prostaglandine qui possède des propriétés anti hypertensives et est utilisé spécifiquement en médecine oculaire (19). Il s'agit d'une molécule hydrophobe avec un log P de 3,2 et elle est peu soluble dans l'eau (19). Dans le produit pharmaceutique DURYSTA[®] commercialisé par Allergan, indiqué pour les patients souffrant de glaucome à angle ouvert ou d'hypertension oculaire, le bimatoprost agit en réduisant la pression intraoculaire (20). Celle-ci est réduite par l'augmentation de l'écoulement de l'humeur aqueuse (Figure 8) par deux voies différentes, permettant ainsi une diminution plus efficace de la pression intraoculaire. Il s'agit donc de la voie conventionnelle de circulation de l'humeur aqueuse, le réseau trabéculaire, ainsi que de la voie secondaire d'évacuation étant la

voie uvéosclérale. DURYSTA® est un implant composé de bimatoprost dispersé dans une matrice de copolymère de PLGA, PLA, PLA de groupe terminal acide et PEG. Cet implant cylindrique biodégradable est injecté dans la chambre antérieure de l'œil à l'aide d'un applicateur à usage unique (20) (Figure 8).

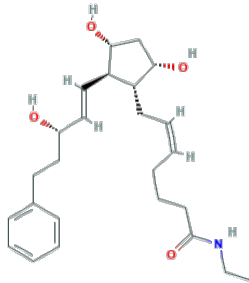


Figure 9: Structure moléculaire du bimatoprost

2.3. Préparation d'implants

2.3.1. Méthode du « Solvent casting »

La méthode de fabrication d'implants dite de « Solvent casting » consiste à mélanger le polymère et le principe actif dans les quantités requises pour la formulation choisie, à dissoudre ce mélange dans un solvant volatil permettant de solubiliser tous les composants de la formulation et finalement de laisser évaporer totalement ce dernier. Le produit obtenu est solide et poreux, il peut également être transformé dans la forme et la taille souhaitées en appliquant force et chaleur (21). Cette méthode est efficace pour produire des implants homogènes et permet d'obtenir des implants d'une grande variété de formes et de tailles. Cependant, le procédé, avec les nombreuses étapes, est chronophage et nécessite l'utilisation de grandes quantités de solvant organique qui peut persister dans le produit final sous forme de solvant résiduel. Compte tenu de ces paramètres, la méthode de « Solvent casting » pour la fabrication d'implants n'est pas adaptée à une production d'implants à plus grande échelle (21).

2.3.2. Extrusion par seringue

Cette méthode est une méthode à très petite échelle pour la fabrication d'implants car elle repose sur l'utilisation de seringues de 1 à 5 ml. Le montage nécessaire pour ce type d'extrusion est illustré dans la figure 10. Le mélange de polymère et de principe actif sous forme de mélange homogène de poudres est introduit dans la seringue. Celle-ci est ensuite introduite dans un four à 90-130°C selon la formulation jusqu'à l'obtention d'une matrice fondue. La fusion du mélange de poudres va dépendre de la température de transition vitreuse du ou des polymères utilisés et

de la température de fusion du principe actif. L'obtention d'une masse ductile est indispensable pour l'extrusion manuelle de celle-ci à travers l'embout cylindrique permettant de donner forme aux implants. Cet embout métallique de diamètre défini est fixé à l'extrémité de la seringue pour obtenir des matrices cylindriques qui peuvent être ensuite découpées en implants (17). L'utilisation d'embouts de diamètres différents et la découpe manuelle des implants permettent de contrôler facilement les dimensions souhaitées de l'implant. L'extrusion par seringue est généralement utilisée comme outil de criblage. Les formulations peuvent être optimisées avant d'être produites à plus grande échelle. L'extrusion par seringue nécessite moins de temps d'exécution que la méthode de « Solvent casting » et ne nécessite pas l'utilisation de solvants (21). Cependant, la température de chauffage peut avoir un impact sur la stabilité du principe actif utilisé. En outre, l'homogénéité du mélange entre le polymère et le principe actif dépend de la méthode de mélange et de la taille des particules et est sujette aux variations liées à l'équipement utilisé et au manipulateur.



Figure 10: Montage pour extrusion par seringue (21)

2.3.3. Extrusion à double vis

Le procédé repose sur les mêmes principes que l'extrusion par seringue. La figure 11 représente schématiquement le fonctionnement de l'extrudeuse à double vis. Le mélange de poudres de polymère et de principe actif est introduit dans l'extrudeuse au niveau de la chambre d'alimentation. Le mélange de poudres se retrouve ainsi entre les deux vis, dont la vitesse de rotation est modifiable. Simultanément, ce mélange de poudres va être chauffé à la température définie avant le processus d'extrusion afin d'obtenir une masse semi-solide. De manière identique à l'extrusion par seringue, cette masse doit être suffisamment ductile pour être extrudée à travers l'embout de diamètre défini. Cependant, la force pouvant être exercée par

l'appareil est supérieure à la force exercée par le manipulateur lors de l'extrusion par seringue. Cela permet donc d'abaisser la température d'extrusion. Une fine adaptation des paramètres de température et de vitesse permet donc d'obtenir des implants homogènes en un temps optimal. Le mélange est donc emporté le long des vis aidant ainsi à l'homogénéisation du mélange tout en maintenant une température élevée puis il est guidé par la force mécanique des vis à travers une filière où l'extrudat est obtenu. Comme dans l'extrusion par seringue, une fois refroidi et solidifié, l'extrudat peut être coupé pour obtenir des implants. L'extrusion à double-vis est un procédé continu qui permet d'obtenir des implants en peu de temps, sans utiliser de solvant. Les paramètres du procédé peuvent être contrôlés, ainsi que la longueur des implants. Cette technique peut donc être utilisée pour une production industrielle. De la même façon que pour l'extrusion par seringue, il est important de considérer qu'une température élevée peut dégrader le principe actif utilisé (22).

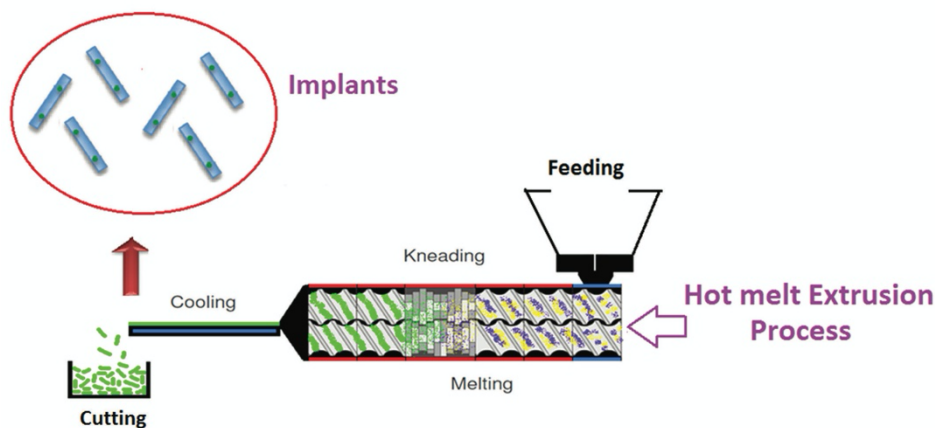


Figure 11: Schéma du fonctionnement d'extrusion par double vis (2)

2.4. Libération du principe actif

Les tests de libération de principe actif par les implants sont effectués pour étudier la concentration du principe actif dans le milieu de dissolution afin d'évaluer la biodisponibilité de la molécule active *in vivo* (23). Pour étudier la libération du principe actif à partir d'implants à base de matrice PLGA, il est crucial de connaître les étapes générales de la libération du principe actif (Figure 12). La toute première étape est la libération explosive qui correspond à la courte période de libération du principe actif à partir de la surface de l'implant. Après la libération explosive, la deuxième étape est un temps de latence pendant lequel la vitesse de libération du principe actif est très lente. La troisième étape correspond à une période plus longue de diffusion et de scission de la chaîne polymérique. Pendant cette période, le principe

actif diffuse de la matrice vers le milieu environnant. Simultanément, l'hydrolyse des chaînes polymériques se produit de manière aléatoire, donnant à la matrice une structure plus poreuse, permettant au principe actif de diffuser plus facilement. La dernière étape de la libération du principe actif est la phase de biodégradation et de perte de masse où la matrice de polymère se décompose progressivement jusqu'à la dégradation complète (24). Dans cette phase terminale, presque tout le principe actif a déjà été libéré, par conséquent le taux de libération du principe actif est très lent et tend vers un plateau.

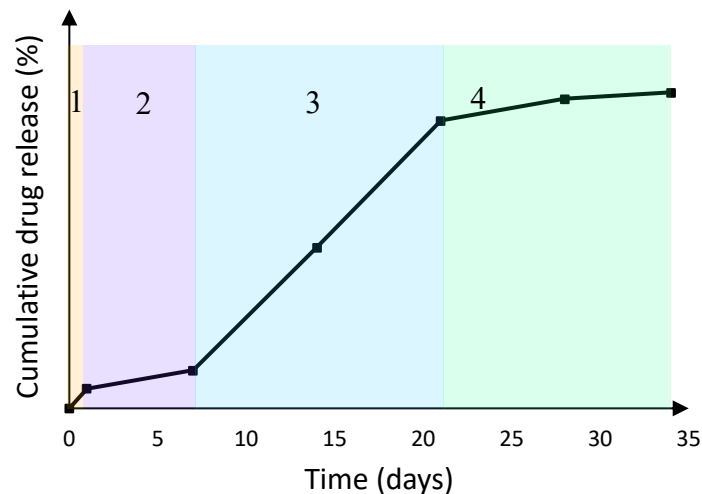


Figure 12: Courbe typique de libération de principe actif à partir d'un implant de PLGA

Pour simuler la libération du principe actif *in vivo*, des tests spécifiques de libération du principe actif *in vitro* doivent être réalisés. Les conditions seront choisies en fonction de la voie d'administration, de la solubilité du principe actif et de sa stabilité. Le volume du milieu de dissolution est calculé en fonction des conditions sink, ce qui signifie que le volume du milieu doit être au moins 3 fois supérieur au volume nécessaire pour solubiliser la quantité de principe actif contenue dans le produit. Les implants destinés à l'œil seront testés dans une solution tampon aqueuse de pH de 7,0 à 7,5, à 37°C (25). Les solutions tampon fréquemment utilisées sont les tampons phosphate au pH 7,2 ou 7,4, de force ionique de 0,2 et d'osmolarité 315 mOs (26), et le tampon NaCl 0,9% de force ionique de 1 et d'osmolarité de 240 mOs. Un échantillon du milieu de dissolution sera prélevé à des moments prédéfinis pour mesurer la concentration en principe actif. La concentration peut être mesurée par différentes techniques en fonction du principe actif, la plus utilisée étant la spectrophotométrie UV-Visible couplée ou non à un système de chromatographie liquide à haute performance (HPLC). L'établissement d'une courbe standard permettra de mesurer la concentration du principe actif dans l'échantillon, sur la base de la proportionnalité entre l'absorbance obtenue avec la molécule dans les longueurs

d'onde UV-visible et la concentration. La détection UV-Visible est la technique de quantification de premier choix pour la mesure des concentrations de bimatoprost, dexaméthasone et rispéridone tout au long des tests de libération du principe actif. En effet, ces principes actifs absorbent dans l'UV à 210 nm pour le bimatoprost (27), 242 nm pour la dexaméthasone (28) et 237 et 279 nm pour la rispéridone (29),

2.5. Caractérisation de l'implant

2.5.1. Calorimétrie Différentielle à Balayage (DSC)

La calorimétrie différentielle à balayage ou « differential scanning calorimetry » (DSC) en anglais, est une technique reposant sur la mesure du changement de température. Un appareil DSC est composé de deux plateaux, l'un pour l'échantillon à étudier et un second servant de référence (vide ou avec un matériau de référence). L'ordinateur assure une vitesse de chauffage constante. Les échantillons se trouvant sur chacun des plateaux étant différents, lorsqu'une même température est appliquée, le changement de température va varier en fonction de la nature des matériaux étudiés (30). C'est de cette manière que l'on peut comparer l'échantillon à analyser au matériau de référence. La DSC est largement utilisée pour l'étude des polymères et permet de déterminer la capacité thermique (C_p), la température de transition vitreuse (T_g), la température de cristallisation (T_c) et la température de fusion (T_m). La capacité thermique est la quantité de chaleur nécessaire pour élever la température de l'échantillon de 1°C (25). La température de transition vitreuse est le point de température auquel le polymère passe d'un état vitreux et rigide à un état caoutchouteux et ductile (31). Cette valeur est très importante pour la fabrication d'implants par extrusion puisque le procédé repose sur l'état physique du polymère. Une fois la température de transition vitreuse atteinte, les chaînes du polymère ont tendance à avoir une grande mobilité et les réarrangements de chaînes peuvent conduire à la cristallisation. Ce phénomène se produira à la température de cristallisation. Enfin, la température de fusion est la température à laquelle les arrangements de chaînes ne sont plus ordonnés et où le polymère se trouve à l'état fondu. Les températures de transitions sont différentes d'un polymère à l'autre et les transitions diffèrent également en fonction de la nature du polymère étudié (propriétés cristallines et amorphes) (30). Cette technique est très importante en tant qu'étape préalable à l'extrusion car elle permet d'obtenir les températures de transition d'états physiques du polymère et du principe actif et ainsi de maîtriser les paramètres d'extrusion et la formulation.

2.5.2. Microscopie électronique à balayage

La microscopie électronique à balayage (MEB) ou « scanning electron microscopy » (SEM) est un type de microscopie qui permet d'observer des objets à l'échelle nanométrique. Cette technologie utilise un faisceau d'électrons dirigés vers l'échantillon, qui interagissent avec ce dernier. Les électrons modifient alors leur trajectoire et créent, en atteignant le détecteur, un signal converti en images par l'ordinateur (32). Le MEB en tant que technique d'imagerie est utile pour observer la surface des échantillons grâce à sa haute résolution et aux images tridimensionnelles. Pour les implants biodégradables, le MEB peut être utile pour observer la surface de l'implant ainsi que la matrice. Cet outil peut permettre d'avoir des données supplémentaires sur l'homogénéité de la formulation, la porosité de la matrice et ainsi mieux comprendre la libération du principe actif et le processus de dégradation de l'implant biodégradable.

2.5.3. Résonance magnétique nucléaire (RMN)

La spectroscopie par résonance magnétique nucléaire est une technique utilisée principalement dans la recherche pour étudier la structure chimique d'un composé organique. Elle repose sur l'utilisation de champs magnétiques pour étudier leurs interactions avec les spins nucléaires des atomes de la molécule étudiée (33). Pour comprendre cette technique et son application à la caractérisation de polymères, il est important de revoir en détail les principes de base sur lesquels elle repose.

2.5.3.1. Concepts de base

Les noyaux étudiés en résonance magnétique nucléaire possèdent une charge, dans le cas de certains atomes, la charge nucléaire possède une distribution homogène sphérique qui tourne autour de l'axe nucléaire (Figure 13). Ce mouvement de charges possède un champ magnétique formant un dipôle magnétique. Lorsqu'il est placé dans un champ magnétique, ce dipôle correspond à un moment magnétique non nul nommé μ . La charge du noyau en rotation de moment magnétique μ possède également un moment angulaire qui est exprimé en tant que nombre quantique de spin I . Dans l'équation 1, le moment magnétique μ est proportionnel au nombre de spin I et au rapport gyromagnétique γ propre à chaque noyau (34).

Équation 1: Formule mathématique du moment magnétique μ .

$$\mu = \gamma \times I$$



Figure 13: Représentation schématique du spin nucléaire (35)

L'analyse par spectroscopie RMN est réalisée sur des atomes possédant un nombre quantique de spin I non nul et non entier, l'analyse des atomes de nombre de spin = $\frac{1}{2}$ permet l'obtention de meilleurs résultats. Les noyaux les plus observés sont : ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F et ^{31}P .

Tableau I: Détermination du nombre de spin d'un atome (34)

A	Z	I	Exemple de noyau
Pair	Pair	0	$^{12}_6\text{C}$, $^{16}_8\text{O}$
Pair	Impair	Entier (1, 2, ...)	^2_1H , $^{14}_7\text{N}$
Impair	Pair	Demi-entier (1/2, 3/2, ...)	$^{13}_6\text{C}$, $^{17}_8\text{O}$
Impair	Impair	Demi-entier (1/2, 3/2, ...)	^1_1H , $^{15}_7\text{N}$, $^{19}_9\text{F}$, $^{31}_{15}\text{P}$

En l'absence de champ magnétique extérieur, tous les états magnétiques du noyau sont dégénérés (ils ont la même énergie). Lors de l'application d'un puissant champ magnétique externe B_0 , cette dégénérescence est levée et les $(2I+1)$ états d'énergie sont alors régulièrement espacés d'une quantité $\Delta E = \gamma h B_0$. C'est sur cette différence d'énergie très faible que repose la spectroscopie de RMN. L'écart énergétique augmente proportionnellement au champ appliqué. On a donc intérêt à travailler avec un champ B_0 élevé si on veut l'accroître. Cela explique qu'on cherche à produire expérimentalement des champs magnétiques de plus en plus élevés. Les spins des noyaux magnétiques étant quantiques, ils ne peuvent prendre que des valeurs définies.

Pour un noyau pour lequel $I=1/2$, le spin ne peut prendre que deux orientations α ($m_I = +1/2$) et β ($m_I = -1/2$) (Figure 14).

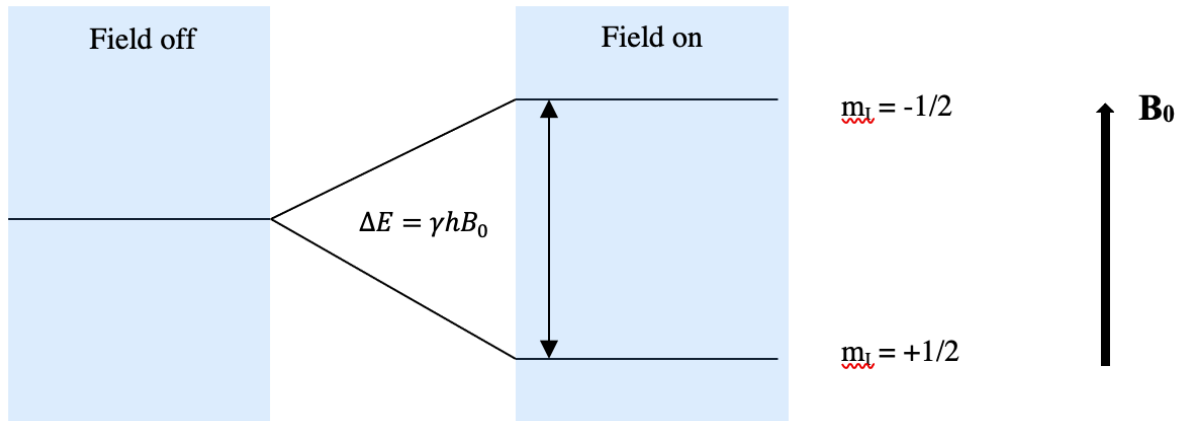


Figure 14: Niveaux énergétiques d'un noyau de spin 1/2 dans un champ magnétique extérieur B_0 (35)

Le mouvement du moment magnétique μ dessine alors un cône de révolution autour de B_0 (Figure 15). Ce mouvement est appelé précession de Larmor. Il se fait à une fréquence caractéristique d'un type de noyau qui appelée fréquence de résonance ou fréquence de Larmor: $\nu = \gamma B_0 / 2\pi$. Ainsi pour un noyau de spin $I = 1/2$, on aura 2 orientations : l'une parallèle à B_0 et l'autre antiparallèle à B_0 , ce qui entraînera 2 cônes de précession (Figure 15).

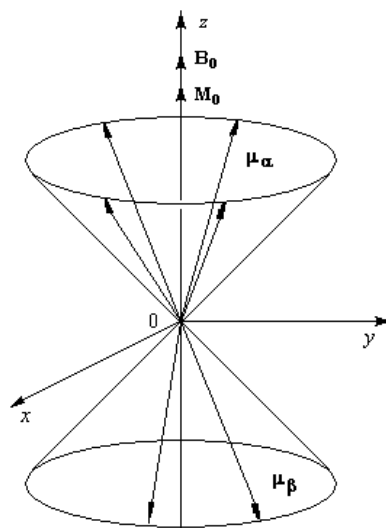


Figure 15: Précession d'un moment magnétique autour d'un champ magnétique B_0

Une modification de l'énergie d'interaction entre le moment magnétique μ et le champ magnétique \mathbf{B}_0 doit s'accompagner d'une variation de l'angle θ entre ces deux vecteurs. Pour y parvenir, on va faire appel à un champ magnétique supplémentaire \mathbf{B}_1 . En appliquant un second champ magnétique \mathbf{B}_1 de faible intensité, maintenu constant dans sa direction et magnitude et perpendiculaire à \mathbf{B}_0 , il influera sur le mouvement de précession en augmentant et diminuant alternativement l'angle θ . Afin de modifier l'angle θ , l'énergie est donc apportée par le champ magnétique \mathbf{B}_1 composé de radiofréquences. Au niveau macroscopique, tout se passe comme si le vecteur aimantation était soumis à un *couple* de la part du champ \mathbf{B}_1 . Ce couple va provoquer un basculement du vecteur aimantation total d'équilibre \mathbf{M}_0 dans un plan perpendiculaire à \mathbf{B}_1 (Figure 16).

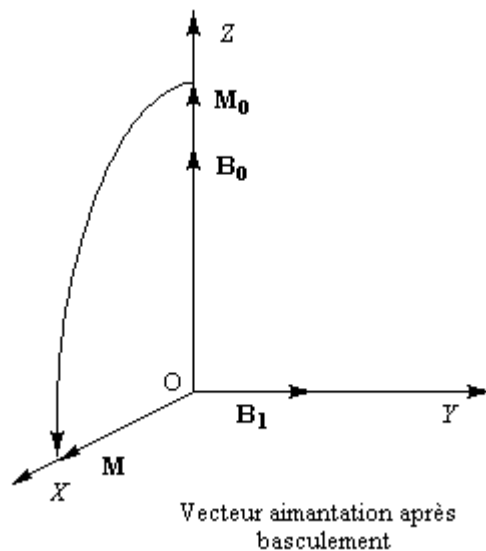


Figure 16 : Effet de l'application d'un champ magnétique \mathbf{B}_1 (impulsion) sur l'aimantaion totale d'équilibre \mathbf{M}_0 (35)

Dans un échantillon à analyser, on s'intéresse désormais à un très grand nombre de noyaux atomiques. Ces noyaux se comportent comme précédemment entre les deux niveaux énergétiques au sein d'un champ magnétique extérieur fort. Lors de l'application d'un champ magnétique extérieur intense, ces derniers s'orientent le long du champ magnétique \mathbf{B}_0 (Figure 17) (35).

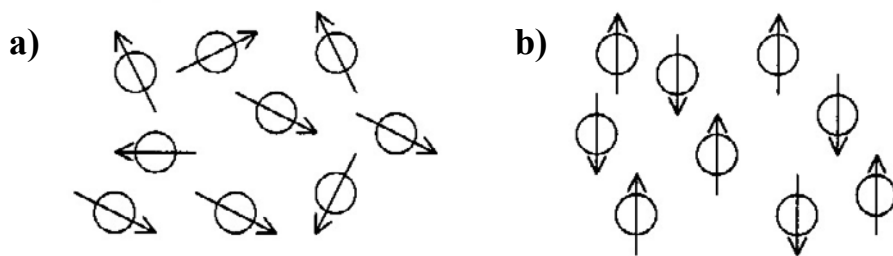


Figure 17: Orientation des noyaux atomiques a) en l'absence de champ magnétique, b) en présence d'un champ magnétique B_0 (35)

Dans la représentation du modèle vectoriel, l'application d'un champ magnétique B_1 perpendiculairement à B_0 (le long de l'axe x, par exemple) et correspondant à un angle de basculement de $\theta_x = 90^\circ$ permet d'égaliser les populations des niveaux α et β le long de l'axe z, ce qui rend l'aimantation nucléaire longitudinale M nulle le long de l'axe z et maximum dans le plan transversal (le long de l'axe y). L'aimantation est donc perpendiculaire à B_0 (Figure 18).

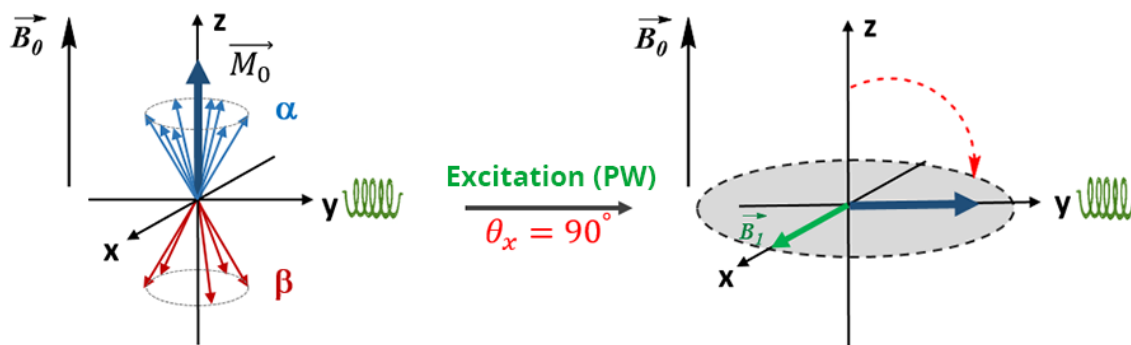


Figure 18: Comportement du moment magnétique au cours du phénomène de RMN

Après l'excitation, le champ B_1 n'est plus appliqué, l'aimantation qui a été basculée dans le plan transversal va évoluer pour revenir à son état d'équilibre, parallèle à B_0 . C'est le phénomène de relaxation dû aux différentes interactions auxquelles fait face chaque noyau (déplacement chimique et couplages). Les données RMN sont enregistrées pendant cette étape. Deux composantes indépendantes sont impliquées dans le phénomène de relaxation : la **relaxation longitudinale** (T_1) qui rend compte de l'évolution de l'aimantation le long de l'axe longitudinal z, et la **relaxation transversale** (T_2) qui rend compte de l'évolution de l'aimantation dans le plan transversal.

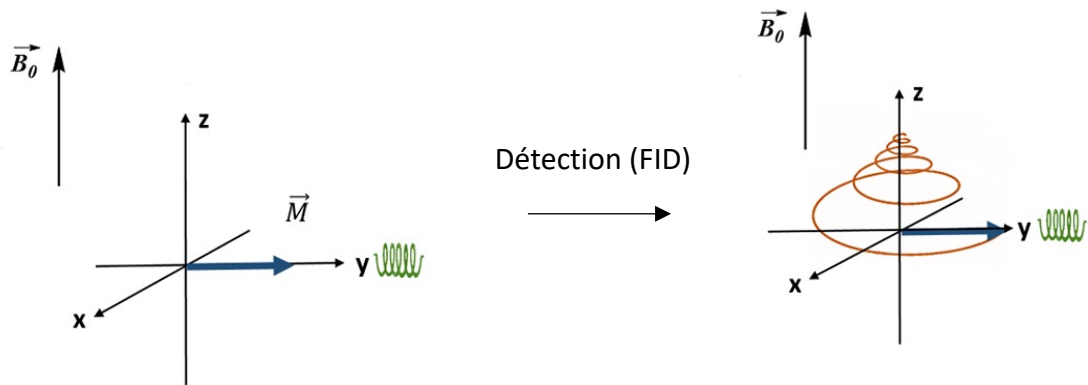


Figure 19: Comportement du moment magnétique et phénomène de Free Induction Decay

Le retour à l'équilibre du vecteur \vec{M} dessine une trajectoire en colimaçon (Figure 19). Le mouvement de \vec{M} sur l'axe y au fil du temps résulte en une variation rectiligne sinusoïdale décroissante qui est appelée Free Induction Decay (FID). C'est ce signal qui, après traitement par transformée de Fourier (FT) permet l'obtention d'un spectre RMN.

Le signal RMN, qui correspond à l'évolution au cours du temps de l'aimantation nucléaire après excitation, est réalisé dans le plan transversal (bobine de détection). A l'équilibre le signal RMN détecté est donc nul.

2.5.3.2. Spectromètre de résonance magnétique nucléaire

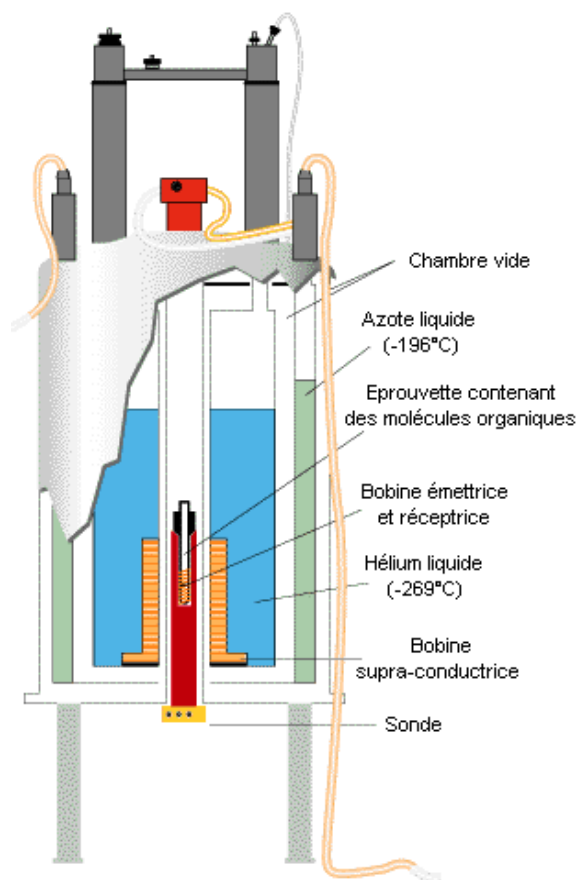


Figure 20: Coupe transversale d'un appareil de RMN (37)

Le spectromètre RMN (Figure 20) est composé de 4 composants principaux ; l'aimant, la sonde, la console et l'ordinateur. L'aimant est composé d'une bobine supraconductrice dans laquelle circule un courant électrique qui crée un champ magnétique intense et constant. Cette bobine est introduite dans de l'hélium liquide et contenu dans des matériaux supraconducteurs afin de maintenir la conductivité de manière constante et indéfinie. Le tout est maintenu dans un réservoir d'azote liquide afin d'éviter l'évaporation de l'hélium. L'échantillon est placé dans un tube de RMN qui lui-même est placé à l'intérieur de l'aimant. Le tube est placé dans la sonde cylindrique qui est elle-même introduite au cœur de la bobine supraconductrice. Cette sonde contient une bobine permettant l'excitation et la détection des signaux. Chaque sonde contient plusieurs canaux de détection et d'excitation permettant d'analyser plusieurs types de noyaux. Les signaux ayant été obtenus à partir de l'échantillon sont transmis à la console. Cette dernière permet de contrôler les paramètres d'excitation, de détection et d'amplification des signaux, de temps, de température, de pression et les paramètres de conversion analogie/numérique liés à la sonde. Enfin, l'ordinateur permet de transformer les données provenant de la sonde en spectre RMN interprétable à l'aide d'un logiciel prévu à cet effet. A partir des données de FID,

l'ordinateur effectue un traitement par transformée de Fourier, qui est composée d'équations mathématiques complexes permettant d'obtenir le spectre RMN (34).

Afin de pouvoir procéder à l'analyse de l'échantillon, celui-ci doit être solubilisé dans un solvant deutéré. Ce type de solvant est un solvant dont les atomes d'hydrogène ^1H (protons) sont remplacés par des atomes de deutérium ^2H . Le deutérium possède un nombre de spin $I = 1$ et sa fréquence de précession est différente de celle du proton. Si l'on utilisait des solvants classiques non deutérés pour l'analyse RMN, les signaux des ^1H présents en très grande quantité dans l'échantillon satureraient le détecteur, ne permettant ainsi pas l'identification des signaux protoniques de la molécule à analyser. L'échantillon est contenu dans un tube en verre borosilicaté de 3 à 10 mm de diamètre.

2.5.3.3. Les spectres RMN

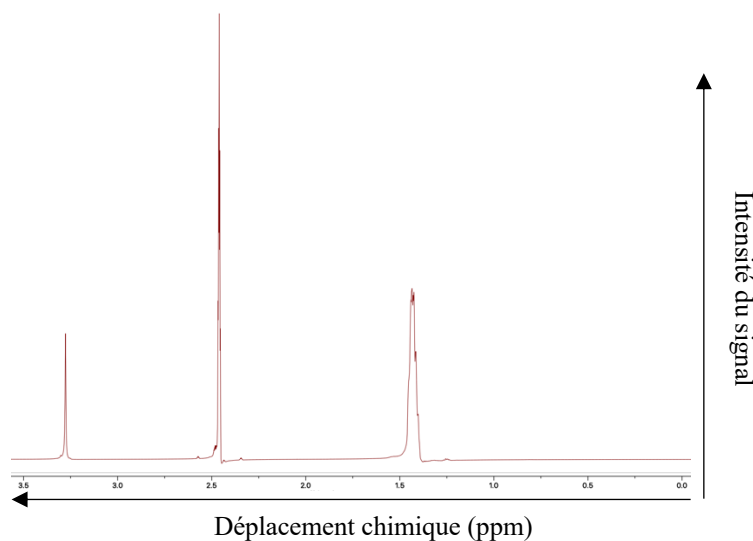


Figure 21: Exemple de spectre RMN du proton

La lecture d'un spectre RMN du proton ^1H tel qu'illustré sur la figure 21 se fait grâce aux valeurs de déplacement chimique, noté δ , des pics. Le déplacement chimique s'exprime en partie par million (ppm) et les signaux du spectre RMN du proton se trouvent entre 0 et 15 ppm (34). En général le noyau est entouré d'électrons qui, exposés au champ magnétique B_0 , forment un nouveau champ magnétique B' qui sera opposé à B_0 . Ce dernier est moins important que le champ magnétique initial ayant été appliqué au système. Le noyau va donc être déplacé d'une

quantité correspondant à σB_0 où σ représente la constante de blindage. La présence d'électrons rend le phénomène de résonance plus difficile et abaissera la fréquence à laquelle il se déroule.

Équation 2: Déplacement chimique (34)

$$\delta = \frac{\nu - \nu_{ref}}{\nu_{spectro}} \times 10^6$$

Dans l'équation 2, ν est la fréquence de résonance du noyau étudié, ν_{ref} est la fréquence du noyau de référence et $\nu_{spectro}$ est la fréquence du spectromètre RMN utilisé. Le noyau de référence classiquement utilisé est le tétraméthylsilane (TMS) (Figure 22). Dans cette molécule, les 12 protons sont équivalents et composent donc le même signal sur le spectre RMN, placé arbitrairement à 0 ppm (34).

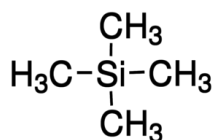


Figure 22: Structure moléculaire du tétraméthylsilane

Comme indiqué précédemment, le déplacement chimique peut être impacté par les électrons du noyau en question, il sera alors blindé ou déblindé. Un noyau positionné à proximité d'électrons possèdera un déplacement chimique plus faible, il sera donc dit blindé. Au contraire, dans un environnement plus pauvre en électrons, il sera dit déblindé donc son déplacement chimique sera plus fort. En d'autres termes, plus le noyau d'hydrogène concerné sera proche d'un élément électronégatif, plus son signal sera déblindé ($\delta \text{CH}_3\text{-H} < \delta \text{CH}_3\text{-OH} < \delta \text{CH}_3\text{-F}$). Le déplacement chimique est également influencé par l'hybridation des atomes de carbones, de sorte à ce que $\delta \text{CH}_3 < \delta \text{CH}_2 < \delta \text{CH}$ (34). La lecture du spectre se fait notamment grâce une table des déplacements chimiques en ppm des groupements chimiques observables par RMN du proton (ANNEXE II). De plus, à l'aide du logiciel de RMN, les pics d'intérêt peuvent être identifiés et intégrés. Cette intégration de pic dans un spectre RMN du proton permet de connaître le nombre relatif d'atomes d'hydrogène correspondant au pic en question. L'aire mesurée sous le pic est proportionnelle au nombre de protons et la comparaison de cette intégration entre les différents pics permet d'obtenir un rapport relatif entre les noyaux présents dans l'échantillon. Un signal est composé de pics ou de raies, le nombre de raies d'un même signal est appelé multiplicité. La multiplicité d'un signal témoigne du nombre de protons présents dans le

voisinage du groupe de protons du signal concerné. Le nombre de raies s'exprime sous la forme de $2nI + 1$, avec n nombre de voisins équivalents et I le nombre de spin. Lorsque $I = \frac{1}{2}$, les intensités relatives des raies suivent un modèle défini, nommé triangle de Pascal (Tableau II) (34).

Tableau II: Multiplicité des signaux de RMN ^1H (34)

Hydrogènes voisins	Nombre de raies et intensité relative	Multiplicité
0	1	Singlet
1	1 – 1	Doublet
2	1 – 2 – 1	Triplet
3	1 – 3 – 3 – 1	Quadruplet
4	1 – 4 – 6 – 4 – 1	Quintuplet

Dans un multiplet, les raies suivent la distribution d'intensités ci-dessus et la distance entre chacune d'elles est exprimée par la constante de couplage J . Cette distance s'exprime en Hertz et se note en prenant en compte le nombre de liaisons présentes entre les deux atomes. La constante de couplage entre deux hydrogènes donnés variera en fonction de la nature et de la configuration des atomes environnants.

Concernant le spectre du ^{13}C , les signaux sont retrouvés entre 0 et 220 ppm. Sa lecture s'effectue également à l'aide d'une table des déplacements chimiques (ANNEXE III). Par convention, le déplacement chimique du carbone suit l'ordre suivant : $\delta\text{C} > \delta\text{CH} > \delta\text{CH}_2 > \delta\text{CH}_3$. Contrairement au spectre du proton, la multiplicité n'est pas une donnée utilisée pour interpréter le spectre. En effet, dans un spectre du ^{13}C couplé au ^1H , les constantes de couplage entre le carbone et l'hydrogène sont très importantes, ce qui donne un spectre chargé en raies et provoque une superposition de signaux, et rend ainsi la lecture de ce spectre difficile. Afin d'obtenir un spectre plus aisément lisible, un spectre ^{13}C découplé ^1H est enregistré. Sur ce spectre apparaissent les signaux sous forme de singulets exclusivement. L'intégration dépendant du nombre d'hydrogènes portés par l'atome de carbone, l'intégration d'un signal de RMN du carbone va dépendre de l'hybridation de l'atome de carbone concerné et seuls les carbones de même hybridation peuvent être comparés (34).

2.5.3.4. Expérience DOSY (Diffusion Ordered Spectroscopy)

La RMN DOSY est une expérience de RMN à deux dimensions. Une dimension correspond classiquement aux déplacements chimiques RMN et l'autre dimension aux coefficients de diffusion. L'utilisation de la RMN pour mesurer les coefficients d'auto-diffusion (ou diffusion translationnelle) des molécules dans des solutions est basée sur un gradient de champ pulsé (PFG) et une expérience d'écho de spin stimulé (STE). Elle se base sur le spectre RMN ^1H et le coefficient de diffusion des analytes. Le coefficient de diffusion étant corrélé au rayon hydrodynamique de la molécule, l'analyse DOSY constitue une alternative pour l'obtention de la masse moléculaire, ayant notamment l'avantage d'utiliser une très faible quantité de solvant. Il s'agit également d'une technique permettant de suivre une réaction de polymérisation, l'agrégation de molécules ou encore de mesurer la concentration micellaire critique (38).

En règle générale, une série d'expériences à une dimension PFG-STE est acquise avec variations systématiques de l'amplitude des impulsions de gradient. La figure 23 représente un spectre RMN du proton exprimé en fonction de l'intensité du gradient. Sur ce type de spectre, on observe une atténuation des signaux qui, d'un signal à l'autre peuvent avoir une vitesse d'atténuation différente. Cette vitesse d'atténuation est proportionnelle au coefficient de diffusion qui est propre à chaque entité moléculaire (40).

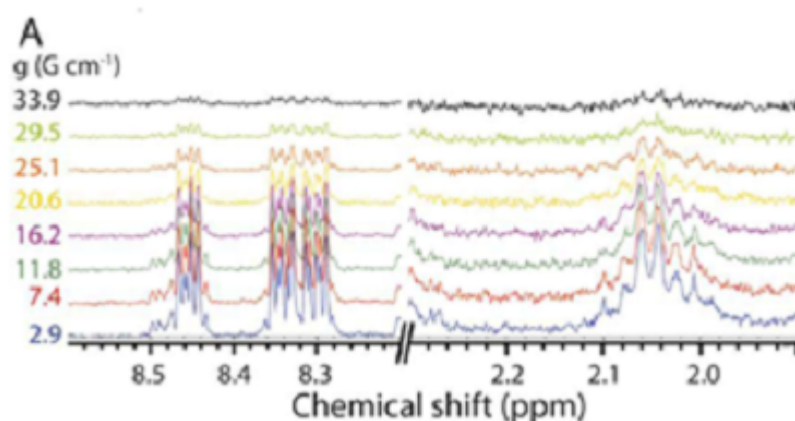


Figure 23: Spectre RMN du proton exprimé en fonction de l'intensité du gradient (39)

Le taux de décroissance du signal est directement lié au coefficient de diffusion D , qui dépend de la masse molaire et d'autres propriétés hydrodynamiques (taille, forme, charge) de l'analyte ainsi que de son environnement (température, état d'agrégation). Le coefficient de diffusion (D) peut donc être estimé par l'analyse de la décroissance exponentielle du signal. En traçant la

courbe des atténuations de chaque signal en fonction des paramètres expérimentaux (Figure 24), il est possible de calculer la pente de chaque courbe, correspondant au coefficient de diffusion. Ce coefficient de diffusion est inversement proportionnel à la masse moléculaire (41).

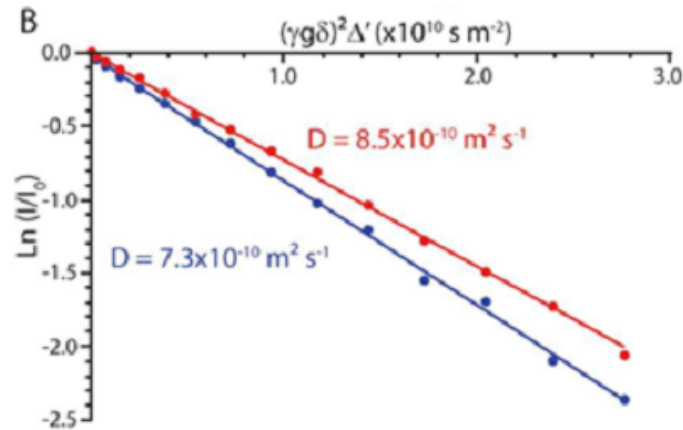


Figure 24: Courbes des atténuations des signaux en fonction des paramètres expérimentaux (39)

La transformée de Fourier du signal de RMN et la transformée de Laplace inverse de la décroissance des signaux conduisent au spectre DOSY sur lequel les déplacements chimiques (δ en ppm) sont situés sur l'axe horizontal tandis que les coefficients de diffusion sont sur l'axe vertical (D en $\mu\text{m}^2.\text{s}$) (39). Toutes les taches appartenant à la même espèce sont alignées et les coefficients de diffusion peuvent être mesurés.

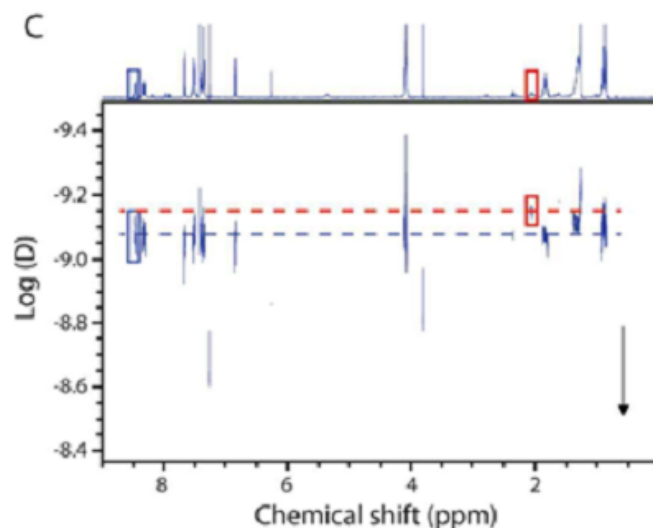


Figure 25: Spectre DOSY des signaux RMN en fonction du log du coefficient de diffusion (39)

2.5.4. Spectroscopie infrarouge (IR)

La spectroscopie infrarouge est utilisée pour identifier les fonctions chimiques dans une molécule. Cette technique est complémentaire à la spectroscopie RMN car elle donne des informations sur les groupes fonctionnels alors que la RMN permet de déterminer la structure du composé organique (34). La FTIR, spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier est un outil rapide pour l'analyse des molécules organiques et permet d'obtenir une haute résolution pour une quantité minimale d'échantillon (42).

2.5.4.1. Principes de base de la spectroscopie infrarouge

La spectroscopie IR se base sur l'utilisation de rayonnements infrarouges. Ces derniers se trouvent à des longueurs d'onde au-delà de 700 nm. Les liaisons présentes entre les atomes ne sont pas immobiles, elles possèdent un mouvement de vibration pouvant être assimilé à celui d'un ressort. La fréquence de vibration peut être définie par la formule $\lambda = c/\nu$ avec λ la longueur d'onde, c la célérité et ν la fréquence de vibration. Cependant, en spectroscopie IR, la longueur d'onde n'est pas la grandeur utilisée mais le nombre d'onde noté $\bar{\nu}$, correspondant à l'inverse de la longueur d'onde. La fréquence de vibration de la liaison est définie par la loi de Hooke présentée dans l'équation 3, avec $\bar{\nu}$ le nombre d'ondes en cm^{-1} , c la célérité égale à 3×10^{10} cm/s, k la constante du ressort en N/m ou kg/s^2 et μ la masse réduite correspondant, pour les atomes A et B à $\mu = m_A m_B / (m_A + m_B)$ (34).

Équation 3: Loi de Hooke

$$\bar{\nu} = \frac{1}{2\pi c} \sqrt{\frac{k}{\mu}}$$

Les vibrations des liaisons interatomiques peuvent être de différents types (Figure 26). Parmi elles, on distingue les vibrations d'élongation et de déformation. Il existe deux types de vibrations d'élongation, l'élongation symétrique dans laquelle les deux liaisons augmentent et diminuent de longueur en même temps et la vibration d'élongation asymétrique dans laquelle les longueurs des liaisons varient de façon asynchrone. Au cours d'une vibration de déformation, 4 sous-types de déformations sont possibles au cours desquelles la longueur des liaisons reste fixe mais ce sont les angles des liaisons qui varient. Dans un même plan, la déformation peut se faire par mouvement de rotation ou par cisaillement. Enfin, les vibrations

de déformation n'ayant pas lieu dans un même plan suivent un mouvement de balancement ou de torsion (34).

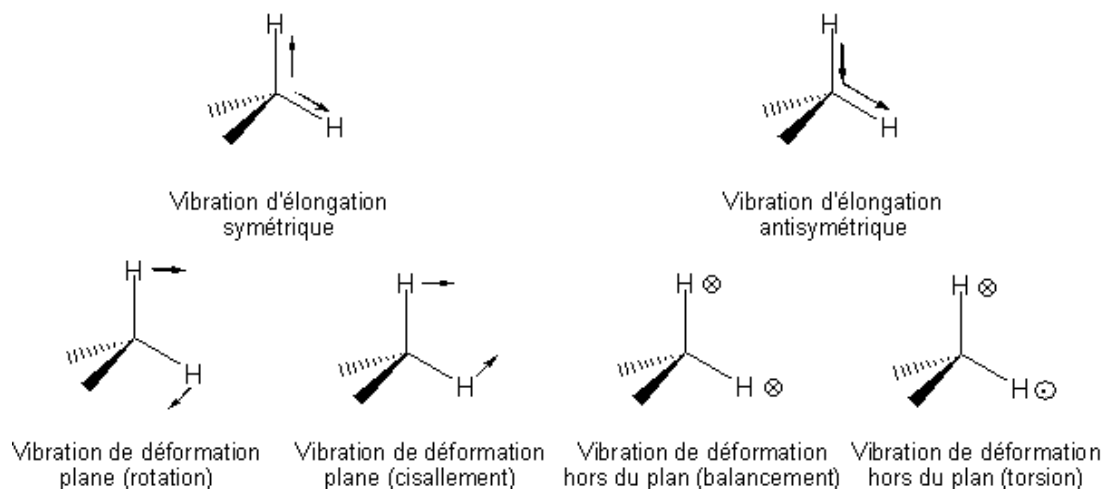


Figure 26: Modes de vibration des liaisons moléculaires interatomiques (43)

Au cours de l'analyse par infrarouges, un rayonnement infrarouge est émis en direction de l'échantillon. L'onde électromagnétique que compose ce rayonnement est partiellement absorbée par une liaison lorsque la fréquence de cette onde et la fréquence de vibration du dipôle électrique concerné sont identiques. Il s'agit du phénomène de résonance.

2.5.4.2. Spectromètre IR

Le spectromètre infrarouge représenté schématiquement dans la figure 27 est un spectromètre FTIR ou spectromètre IR à transformée de Fourier. Ce dernier consiste en une source de rayonnement infrarouge, un miroir fixe, un miroir mobile, un séparateur de rayons, ainsi qu'un laser. Le couple de miroirs forme ce que l'on appelle l'interféromètre. La source infrarouge émet un rayonnement infrarouge qui, en atteignant le séparateur de rayons est divisé en deux rayons équivalents. Le premier rayon sera envoyé en direction du miroir fixe et le second en direction du miroir mobile, et ces deux miroirs vont refléter le rayon infrarouge. Les deux rayons réfléchés vont être émis en direction de l'échantillon. Lorsque les deux miroirs sont situés à équidistance du séparateur de rayons, le rayon réfléchi sera une combinaison de ces deux rayons. Cependant, lorsque le miroir mobile se déplace, le chemin parcouru par le rayon infrarouge est différent, le rayon réfléchi sera donc différent à celui du miroir fixe et c'est ainsi que va se créer une interférence. Le laser additionnel mentionné précédemment, classiquement un laser hélium-néon est utilisé pour mesurer de manière précise la distance entre le séparateur

de rayons et le miroir mobile. Il permet également de constituer une référence pour la calibration de la longueur d'onde et pour le contrôle du temps d'acquisition. Ce laser permet donc d'obtenir des résultats plus précis dans une analyse FTIR. L'interférogramme est ainsi obtenu par la mesure de l'intensité lumineuse détectée après son passage à travers l'échantillon en fonction de la position du miroir mobile. L'interférogramme varie en fonction de l'absorption d'énergie par l'échantillon. Cependant il contient les données de transmission de toutes les longueurs d'ondes simultanément (44). Afin de dissocier ces longueurs d'onde, l'algorithme mathématique de la transformée de Fourier est utilisé. C'est ainsi qu'est obtenu le spectre IR classique présentant l'absorbance (ou la transmittance) en fonction du nombre d'onde. Grâce à la capacité d'analyse unique avec un source comportant l'ensemble du spectre infrarouge et aux avantages fournis par l'utilisation d'un laser de référence, la technique de FTIR est une technique de choix dans l'analyse infrarouge.

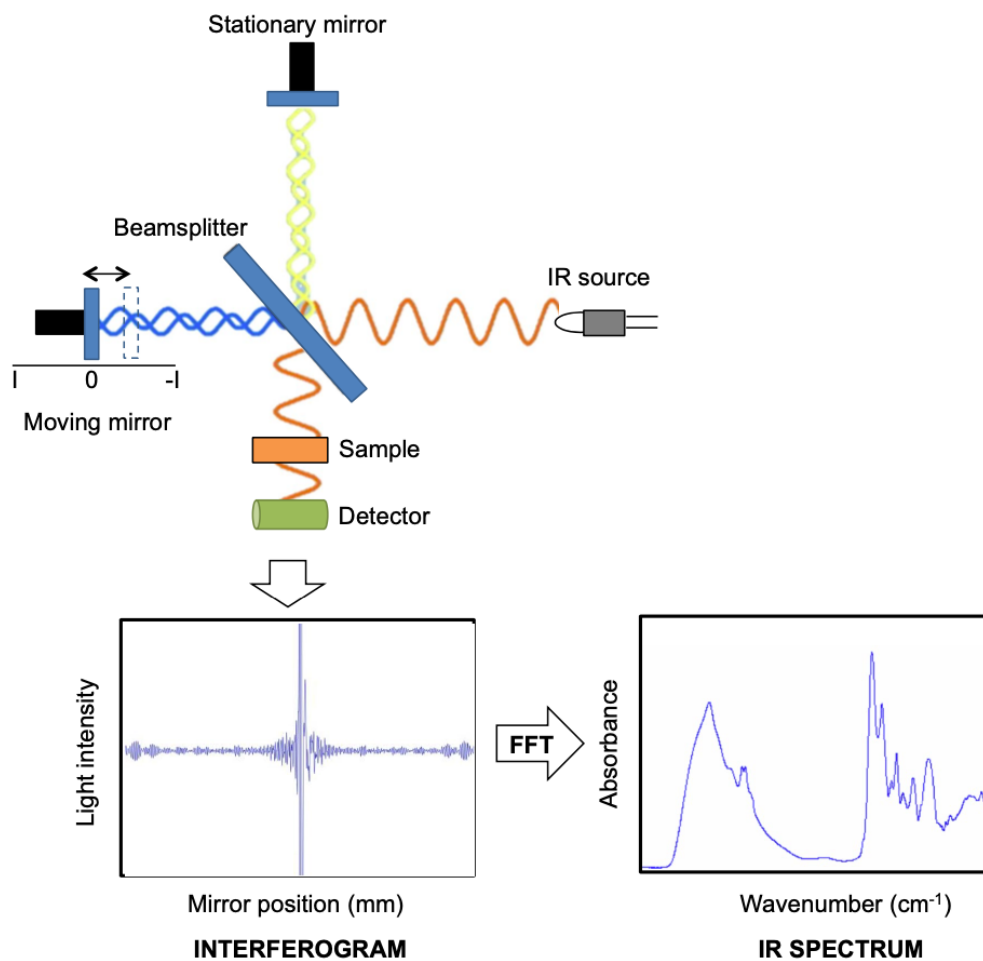


Figure 27: Représentation schématique d'un spectromètre infrarouge (mesure en transmission) (44)

Concernant la préparation d'échantillons, le composé peut être analysé sous forme solide ou liquide. Sur les spectromètres plus anciens, les échantillons liquides sont déposés sur une fenêtre de NaCl après dissolution dans un solvant volatile tel que le chloroforme. Ce solvant va alors s'évaporer et former un film d'échantillon sur la fenêtre de NaCl qui pourra ensuite être analysé par spectrométrie IR. Lorsqu'une analyse d'un échantillon solide est souhaitée ou que la solubilisation de celui-ci dans le chloroforme n'est pas possible, l'échantillon doit être réduit en poudre par broyage et mélangé de manière homogène avec une poudre de KBr. Ce mélange de poudres doit ensuite être comprimé pour former une pastille solide. Cependant, les appareils de spectroscopie IR plus récents possèdent un dispositif simplifiant la préparation des échantillons. Ce dispositif est appelé Réflectance Totale Atténuée (ATR) et permet de déposer directement l'échantillon sous forme liquide ou solide sur une fenêtre de lecture et de le mettre en contact avec le poinçon possédant un diamant (34). Dans ce dispositif schématisé dans la figure 28, le rayon infrarouge est dirigé en direction de la fenêtre de lecture composée du cristal ATR où il est réfléchi sur toute sa surface. Une partie de l'onde infrarouge entre en contact avec l'échantillon et est absorbée par celui-ci. Le détecteur situé à l'extrémité opposée du cristal détecte le rayon IR réfléchi par le cristal. Cette technique permet de simplifier la préparation d'échantillon et grâce à ce dispositif ATR, la mesure ne dépend pas de l'épaisseur de l'échantillon puisqu'elle ne varie pas (45).

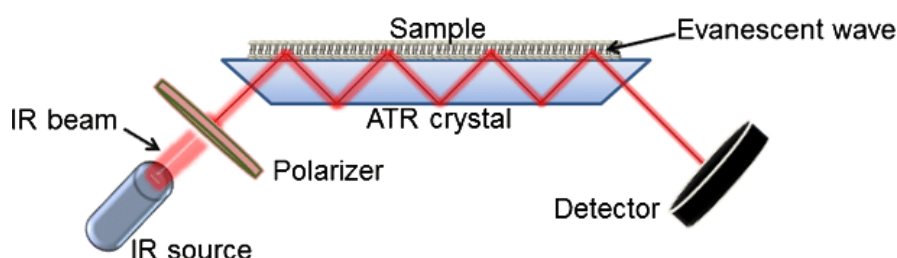


Figure 28: Représentation schématique d'un dispositif ATR (45)

2.5.4.3. Le spectre FTIR

Le spectre IR (Figure 29) présente des pics ou bandes d'absorption correspondant à l'absorption du rayonnement IR par la liaison correspondante. Chaque pic, observé à une fréquence ou nombre d'onde donné correspond à la vibration spécifique d'un groupement fonctionnel spécifique.

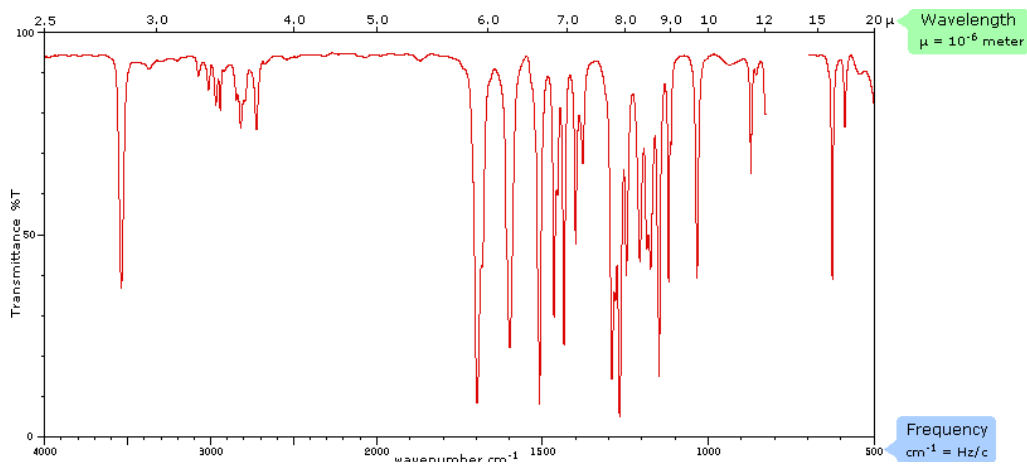


Figure 29: Exemple de spectre infrarouge (46)

Le spectre IR est exprimé en absorbance ou en transmittance en fonction du nombre d'onde exprimé en cm^{-1} . Le spectre infrarouge est lu de 400 à 4000 cm^{-1} et peut être séparé en deux zones, celle dite de « fingerprint » et la zone des bandes de valence (Figure 30). La zone fingerprint de 500 à 1600 cm^{-1} contient les pics correspondant à l'identité de la molécule, c'est grâce à cette zone qu'il est possible de comparer le spectre avec celui de spectres IR de référence. Quant à la zone après 1600 cm^{-1} , elle apporte des informations sur les fonctions chimiques présentes dans le composé analysé (34).

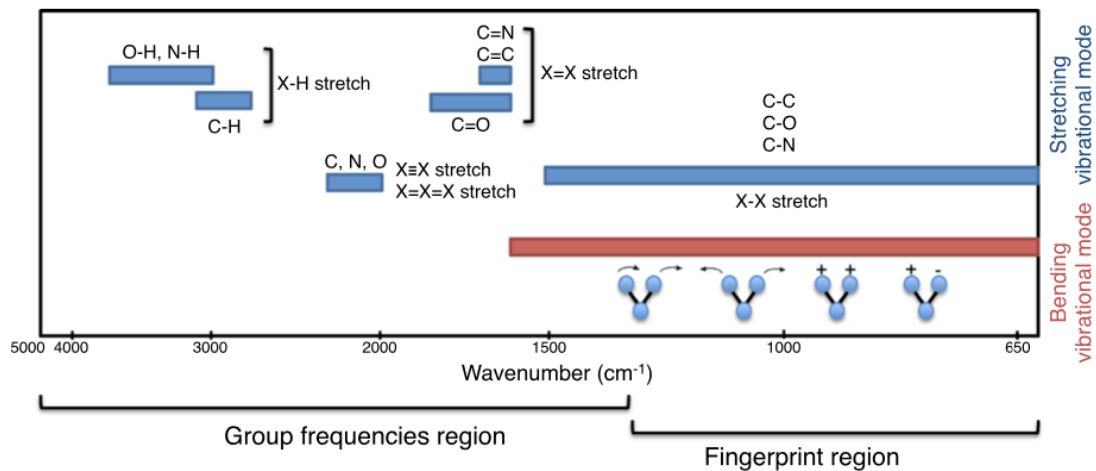


Figure 30: Bandes d'absorption caractéristiques du spectre IR (44)

2.5.5. Chromatographie liquide

Afin de caractériser le polymère et d'avoir plus d'informations sur les propriétés et le comportement de la matrice composant l'implant, des méthodes reposant sur l'utilisation de la

chromatographie liquide permettent de réaliser des études quantitatives et qualitatives. La chromatographie liquide permet de séparer en fonction de leur affinité avec la phase stationnaire, les composants d'un échantillon solubilisés dans un solvant adapté. En chromatographie liquide classique, la colonne chromatographique contient une phase stationnaire, le plus souvent une silice greffée avec des fonctions chimiques polaires ou apolaires. Selon l'affinité des molécules de l'échantillon avec la phase stationnaire, celles-ci vont être plus ou moins retenues. La phase mobile transporte l'échantillon à travers la colonne chromatographique et sa polarité est différente à celle de la phase stationnaire. Un système HPLC classique est composé de phase mobile liquide qui passe premièrement par le dégazeur, ayant pour rôle d'éliminer les bulles d'air puis par la pompe qui définit le débit auquel la phase mobile va circuler. Un injecteur va permettre d'injecter l'échantillon dans le circuit, où il va rejoindre la phase mobile pour passer dans la colonne. C'est dans la colonne que va se réaliser la séparation des molécules et à sa sortie est situé le détecteur permettant de mesurer l'intensité du signal qui sera analysé par l'ordinateur et représenté sous la forme d'un chromatogramme.

2.5.5.1. Chromatographie d'exclusion stérique

La chromatographie d'exclusion stérique (SEC) est un type de chromatographie liquide reposant sur la séparation de composés en fonction de leur taille. La séparation de composés ne dépendra plus de leur affinité avec la colonne mais de leur taille et de leur forme. Sur la figure 31, on peut voir une particule poreuse qui compose la phase stationnaire de la colonne de SEC. En supposant un échantillon composé de particules de grosse, moyenne et de petite taille, leur temps d'élution sera différent en fonction de leur diamètre. En effet, les particules de grosse taille (de couleur violette dans la figure 31) ne pénètrent pas les pores de la phase stationnaire et parcourent de ce fait un chemin plus court. Les particules les plus grosses seront celles qui sortiront en premier de la colonne, correspondant donc au premier pic chromatographique sur la figure. Les particules de taille moyenne pénètrent plus facilement dans les pores de la colonne, elles seront donc plus retenues que les grosses particules et sortiront de la colonne à la suite de ces dernières. Elles correspondent aux particules vertes et au second pic sur la figure 31. Enfin les particules de petite taille vont pouvoir pénétrer dans tous les pores de la phase stationnaire, elles vont par conséquent nécessiter d'un temps beaucoup plus long pour traverser la colonne. Ces particules, représentées en rouge, vont correspondre au dernier pic du chromatogramme en raison de leur temps de rétention plus long (34).

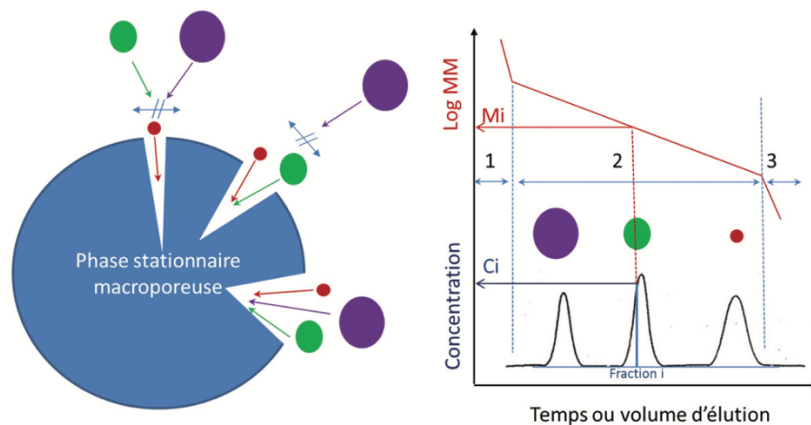


Figure 31: Schéma du principe de la chromatographie d'exclusion stérique (47)

Il est très important de bien choisir le type de phase stationnaire en fonction du solvant et de composé à analyser. Le cas échéant, les particules de l'échantillon de trop petite taille peuvent être éluées très tôt et apparaître dans la zone 1 du chromatogramme et au contraire, les particules de trop grosse taille peuvent sortir tardivement de la colonne et apparaître dans la zone 3 du chromatogramme. Or, dans ce cas de figure, la séparation des composés en fonction de leur taille devient difficile. Elle est idéale dans la zone 2 où le log de la masse molaire en fonction du temps ou du volume d'élution est représenté sous forme de variation linéaire. Il est donc possible grâce à la chromatographie d'exclusion stérique d'obtenir la masse molaire des composés d'un échantillon, à partir d'une courbe d'étalonnage établie avec un polymère de référence (47).

2.5.5.2. Détecteurs utilisés pour l'analyse de polymères

Après avoir choisi le type de colonne et de phase mobile en fonction de la nature de l'échantillon, le détecteur doit également être sélectionné. Compte tenu du fait que la majorité des polymères n'absorbent pas ou peu dans le domaine UV-Visible, les détecteurs de type UV-Visible ne sont pas adaptés. La spectrométrie de masse, malgré son utilisation fréquente en recherche, est un outil très complexe à appliquer à l'analyse de polymères, en particulier concernant les polymères de masse moléculaire élevée. Les détecteurs à index de réfraction (RID) reposent sur la mesure de l'index de réfraction de l'échantillon et la comparaison à l'index de réfraction de l'éluant. Les RID sont communément utilisés en chromatographie d'exclusion stérique (SEC) pour obtenir un profil de concentration (48). Ce détecteur peut être considéré comme universel et est relativement simple à utiliser. Cependant, il est indispensable de connaître la valeur de dn/dc du polymère à analyser. Cette valeur correspond à la différence

d'index réfractif entre la solution de polymère et l'éluant, en fonction de la concentration en polymère (49). De plus, ce détecteur peut être uniquement utilisé lorsque l'index de réfraction de l'analyte est différent de celui de l'éluant. Les RIDs peuvent également être utilisés combinés à d'autres détecteurs tels que le détecteur multi angle light scattering (MALS), dynamic light scattering (DLS) ou encore le détecteur viscosimétrique (DV). Un tel système chromatographique permet de déterminer la masse moléculaire ainsi que les liaisons au sein des chaînes polymériques (48). En chromatographie d'exclusion stérique, les polymères et monomères sont séparés en fonction de leur masse moléculaire. En connectant un détecteur UV ainsi qu'un détecteur RI au système chromatographique, il est ainsi possible d'obtenir des données concernant la distribution de la masse moléculaire et la concentration correspondant à chaque section du chromatogramme (49). Afin d'obtenir des données significatives, l'échantillon doit être préparé afin d'avoir des valeurs de dn/dc et d'absorbance UV suffisantes. L'élution du polymère et monomère à travers la colonne SEC dépend de sa masse moléculaire mais également de sa forme géométrique. Dans une configuration HPLC-UV-RI, la forme géométrique de l'analyte n'est pas prise en compte et celui-ci est considéré globulaire. Afin de passer outre ce biais, l'utilisation d'un détecteur MALS permet d'obtenir des résultats plus exacts (50). Le détecteur MALS utilise un laser pour mesurer la lumière réfractée par l'échantillon sous plusieurs angles. Le laser incident traverse la cuve contenant l'échantillon, les particules contenues dans l'échantillon vont alors réfléchir le rayon lumineux dans de nombreuses directions (Figure 32). La particularité de ce détecteur est qu'il est composé d'une multitude de détecteurs positionnés à différents angles autour de la cuve dans laquelle circule l'échantillon (51).

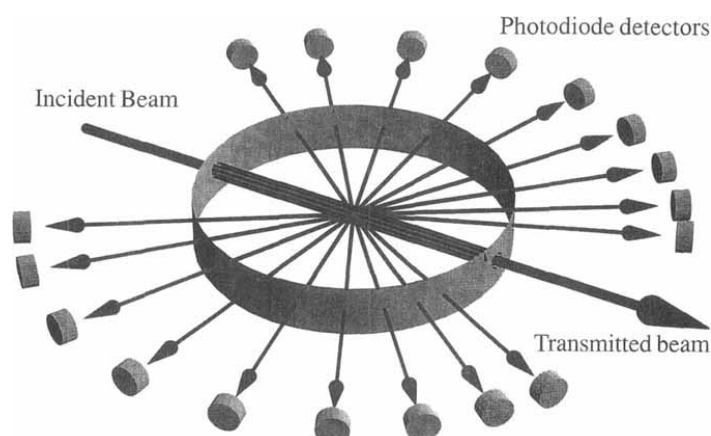


Figure 32: Représentation schématique d'un détecteur MALS (51)

Le regroupement des données issues des nombreux détecteurs permet d'obtenir la masse moléculaire ainsi que le rayon de giration (R_g) de l'analyte. Ce dernier permet de renseigner sur la localisation de la masse par rapport à la particule (52). L'utilisation d'un détecteur de concentration est essentielle dans une configuration SEC-MALS, les détecteurs UV et RI sont classiquement retrouvés (53). La masse moléculaire est calculée à partir de l'équation 4 dans laquelle R_θ représente l'excès de ratio entre la lumière diffusée et la lumière incidente, soit l'excès de ratio de Rayleigh ; c est la concentration en polymère, M sa masse moléculaire, $P(\theta)$ est la fonction angulaire dépendante de la diffraction et K est une constante définie par l'équation 5. Dans cette équation, n_0 est l'index réfractif du solvant, N_A est le nombre d'Avogadro, λ_0 est la longueur d'onde du faisceau laser utilisé dans un milieu sous vide et enfin, dn/dc est l'incrément d'indice de réfraction (54).

Équation 4: Intensité de lumière diffusée par un échantillon de polymère en solution (54)

$$\frac{R_\theta}{Kc} = MP(\theta)(1 - 2A_2cMP(\theta) + \dots)$$

Équation 5: Constante K pour un rayon laser vertical incident polarisé (54)

$$K = \frac{4\pi^2 n_0^2}{N_A \lambda_0^4} \left[\frac{dn}{dc} \right]^2$$

Le logiciel associé au détecteur MALS obtient un signal chromatographique grâce au détecteur de concentration (RI ou UV classiquement), et grâce au détecteur MALS et aux formules mathématiques ci-dessus, la masse moléculaire du composé analysé à chaque section du spectre.

3. OBJECTIFS DE L'ETUDE

Cette étude vise à identifier et comprendre les différences de comportement *in vitro* d'implants à base de PLGA et de PEG-PLGA. L'utilisation de trois principes actifs différents permet également d'étudier les différences liées au principe actif. Les tests de dissolution sont réalisés pour étudier la libération de principe actif au fil du temps. Ils permettent notamment de comparer les formulations entre elles et d'optimiser le processus de préparation des implants. Les propriétés physico-chimiques de la matrice de l'implant sont étudiées par spectrométrie RMN et FTIR. C'est en apprenant plus sur ces propriétés que nous pouvons avoir une connaissance plus complète du polymère. L'analyse RMN a pour objectif d'étudier la structure de la chaîne polymérique, et ainsi d'observer l'enchaînement d'unités et les groupements présents en fin de chaîne. L'analyse RMN a également pour objectif de distinguer deux polymères de masses moléculaires différentes dans un mélange. En complément, l'analyse par spectrométrie infra-rouge a pour objectif d'étudier les groupements chimiques caractéristiques d'une entité moléculaire.

4. PARTIE 2 : Section expérimentale

4.1. Matériels et méthodes

4.1.1. Matériels

Le bimatoprost et la rispéridone ont été achetés auprès de Cayman Chemical (Mi, USA), la dexaméthasone micronisée et le polyéthylène glycol Macrogol 6000 ont été achetés à Caelo (Caesar & Loretz GmbH, Hilden, Allemagne). RESOMER® RG 503H, RG 502H et RG 752S ont été achetés à Evonik (Tableau IV) et EXPANSORB DLG 50-6P a été offert par Seqens (Aramon, France). Le chlorure de sodium, chlorure de potassium, phosphate disodique et phosphate de monopotassium ont été achetés à Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Allemagne). L'eau ultrapurifiée a été obtenue par un appareil Milli-Q (Merck-Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Allemagne). Enfin, le d6-DMSO (diméthylsulfoxyde deutéré) a été acheté auprès de Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Allemagne).

Tableau III: Température de fusion des principes actifs de l'étude

Nom du principe actif	Température de fusion (°C)
Bimatoprost	63 - 67
Dexaméthasone	262 - 264
Rispéridone	170

Tableau IV: Propriétés physico-chimiques des polymères PLGA de la gamme Resomer

Nom du polymère	Ratio L/G	Groupement terminal	Masse moléculaire (g/mol)	Viscosité (dL/g)	Tg (°C)
Resomer RG 502H	50:50	Acide carboxylique	7000 – 17000	0,16 – 0,24	42 - 46
Resomer RG 503H	50:50	Acide carboxylique	24000 - 38000	0,32 – 0,44	44 - 48
Resomer RG 752S	75:25	Ester	13000	0,16 – 0,24	44 - 50

4.1.2. Méthodes

4.1.2.1. Préparation des implants

La fabrication des implants a été réalisée par extrusion par seringue. Les formulations composées du principe actif, PLGA et PEG (Tableau V) ont été mélangées manuellement dans un mortier et le mélange de poudre (~ 0,5 g) a été introduit dans une seringue en polypropylène de 1 mL (LUER LOK™, B-D®, Singapour). Un embout d'un diamètre de 1 à 1,1 mm a été fixé avec un Luer lock sur la seringue et le système a été chauffé dans un four à 90-130°C selon la formulation. La température d'extrusion est choisie en fonction de la température de transition vitreuse du polymère, au-delà de laquelle le composé devient visqueux. La température de transition vitreuse du Resomer RG 502H est de 42-46 °C et celle du Resomer RG 503H est de 44-48 °C. Afin d'obtenir une matrice polymérique suffisamment visqueuse pour être extrudée manuellement, une température d'extrusion d'environ 120 °C (près de 3 fois supérieure à la température de transition vitreuse) est choisie pour ces polymères purs. La température d'extrusion peut être ensuite adaptée à la thermo sensibilité des principes actifs utilisés. Notamment pour le bimatoprost, entrant en fusion à 63-67 °C, la température du four peut être diminuée afin d'éviter la dégradation des molécules actives. Cependant, la rispéridone et la dexaméthasone possèdent des températures de fusion de 170 et 260 °C, respectivement, ce qui

permet l'utilisation de températures élevées pour l'extrusion. Après l'extrusion, les filaments ont été collectés et coupés manuellement pour obtenir les implants. Les implants de bimatoprost et de rispéridone ont été pesés avec une balance analytique précise au millième de mg, pour obtenir des implants de ~ 5 mg et les implants de dexaméthasone ont été coupés pour peser ~ 1 mg.

Tableau V : Formulations des implants

Polymer matrix	PLA/PGA ratio	PLGA grade	API	Concentration (%)
PLGA	50/50	Resomer RG 503H	Bimatoprost	30
PLGA	50/50	Resomer RG 503H		50
PEG-PLGA	50/50	Resomer RG 503H		30
PEG-PLGA	50/50	Resomer RG 503H		50
PLGA	50/50	Resomer RG 503H	Dexamethasone	30
PLGA	50/50	Resomer RG 503H		50
PEG-PLGA	50/50	Resomer RG 503H		30
PEG-PLGA	50/50	Resomer RG 503H		50
PLGA	50/50	Resomer RG 502H	Rispéridone	10
PLGA	50/50	Resomer RG 502H		50
PEG-PLGA	50/50	Resomer RG 503H		30
PEG-PLGA	50/50	Resomer RG 503H		50

4.1.2.2. Test de dissolution

Les implants ont été placés dans un flacon en verre hermétiquement fermé, rempli de 25 ml de solution tampon phosphate à pH 7,2, de 25 ml de solution tampon phosphate à pH 7,4 contenant pour les deux valeurs de pH, 137 mM de NaCl, 2,7 mM de KCl, 10 mM de Na₂HPO₄ et 1,8 mM de KH₂PO₄ et de 30 ml de solution de chlorure de sodium 0,15 M à 0,9 % pour les implants contenant respectivement du bimatoprost, rispéridone et de la dexaméthasone (un implant par flacon, avec nombre de flacons, n=3). Les milieux de dissolution ont été choisis en fonction de la solubilité du principe actif et des données fournies par le fabricant. Le bimatoprost est soluble à 300 µg/ml dans une solution de tampon phosphate de pH 7,2 selon le fabricant, la rispéridone a une solubilité similaire dans une solution de tampon phosphate de pH 7,4 et enfin, la dexaméthasone ayant une solubilité très faible dans une solution de tampon phosphate, le milieu choisi pour sa dissolution est une solution de chlorure de sodium à 0,9%, dans laquelle sa solubilité est de 80 µg/ml. Les flacons ont été placés dans un agitateur horizontal à 80 rpm

(rotations par minute) et incubés à 37°C et (Gemeinschaft für Labortechnik, Burgwedel, Allemagne). Un volume de 2 mL de milieu de dissolution a été prélevé à intervalles de temps prédéfinis pour l'analyse et remplacé par 2 mL de milieu frais pour maintenir les conditions sink. La concentration en principe actif a été mesurée par spectroscopie UV-VIS (spectrophotomètre UV-VIS Agilent 8453) en utilisant des courbes standard préparées, mesurées à 208 nm, 242 nm et 276 nm pour respectivement le bimatoprost, la dexaméthasone et la rispéridone. Une correction de background a été réalisée à une longueur d'onde de 400 nm afin de diminuer la variance entre les résultats.

4.1.2.3. Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire

Les mesures ont été effectuées au centre de RMN situé dans l'institut de chimie et de biochimie de la Freie Universität Berlin. Les spectres RMN ont été obtenus avec un spectromètre multinucléaire JEOL ECA, équipé d'une cryosonde à azote liquide de 5 mm, mesurant à 600 MHz pour la RMN ¹H, et à 150 MHz pour la RMN ¹³C. Les données DOSY ont été obtenues avec un spectromètre JEOL Eclipse +500, utilisant une fréquence de 500 MHz. Les échantillons ont été préparés en dissolvant le polymère ou l'implant réduit en poudre dans du d6-DMSO afin d'obtenir une solution de concentration de 2-3%. Les spectres RMN ont été traités avec le logiciel MestReNova version 12.0.4-22023.

4.1.2.4. Spectroscopie infrarouge

Les spectres FTIR d'échantillons PEG-PLGA ont été obtenus avec un spectromètre FTIR Excalibur 3100 (Varian Inc, Palo Alto, USA). Les poudres de PEG-PLGA ont été placées directement sur un cristal de diamant horizontal à réflectance totale atténuée (ATR) (Pike Miracle, Pike Technologies, Madison, USA). Les spectres ont été recueillis entre 4000 et 600 cm⁻¹, avec 64 balayages à une résolution de 4. Les spectres ont été obtenus et analysés avec le logiciel Varian (Resolution Pro 4.0) et traités avec une fonction de lissage à 13 points.

4.1.2.5. Statistiques

Les données ont été exprimées sous forme de moyenne ± écart-type. La libération du principe actif a été calculée à partir des courbes de calibration validées via l'outil statistique de régression linéaire sous Excel (Annexe 1) à un niveau de confiance de 95%. Cette analyse est basée sur le

test de Student (55) visant à vérifier l'hypothèse que la pente de la droite est différente de 0, ce qui signifie que dans l'équation $y = ax + b$, la variable x influence la valeur y . La régression linéaire est validée lorsque les conditions, $t_a > t_0$, $t_b < t_0$ et $R^2 \geq 0,9990$ sont respectées, avec t_a , la valeur statistique t de la constante a , t_b la valeur statistique t de la variable b , t_0 la valeur statistique de la loi de Student au seuil de signification 0,05 et R^2 le coefficient de détermination. Cependant, compte tenu de la précision de l'appareil d'analyse de spectrométrie UV-visible, les valeurs de R^2 comprises entre 0,980 et 1,00 sont considérées comme valides.

4.2. Résultats et discussion

4.2.1. Libération *in vitro* de principe actif

4.2.1.1. Bimatoprost

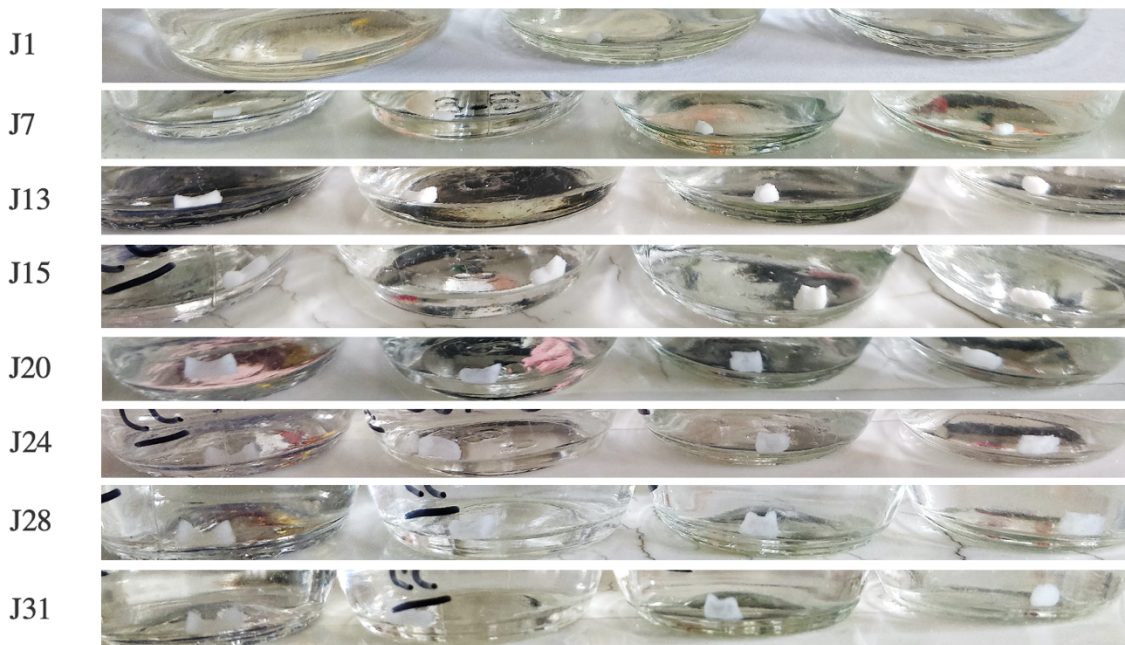


Figure 33: Photos des implants de bimatoprost dans leur milieu de dissolution du jour 1 au jour 31. De gauche à droite: PLGA 30% Bimatoprost, PLGA 50% Bimatoprost, PEG-PLGA 30% Bimatoprost, PEG-PLGA 50% Bimatoprost

Un test de libération du principe actif a été effectué sur les implants de PLGA et de PEG-PLGA contenant comme principe actif le bimatoprost sur une période d'un mois (Figure 33). Cette figure permet d'observer le comportement physique de l'implant au cours de l'essai de dissolution. Un début de gonflement est observable après 7 jours, et très clairement présent au treizième jour. Cette observation est liée au phénomène d'hydratation de l'implant qui, au contact de l'eau augmente de volume par gonflement. A partir du vingtième jour, l'érosion des implants est observable car ceux-ci deviennent progressivement translucides et perdent leur

forme cylindrique. Après 31 jours de dissolution à 37°C, l'implant est toujours entier, un temps plus important est nécessaire pour que l'implant soit entièrement dissout dans le milieu. Aucune différence majeure n'est observable entre les différentes formulations.

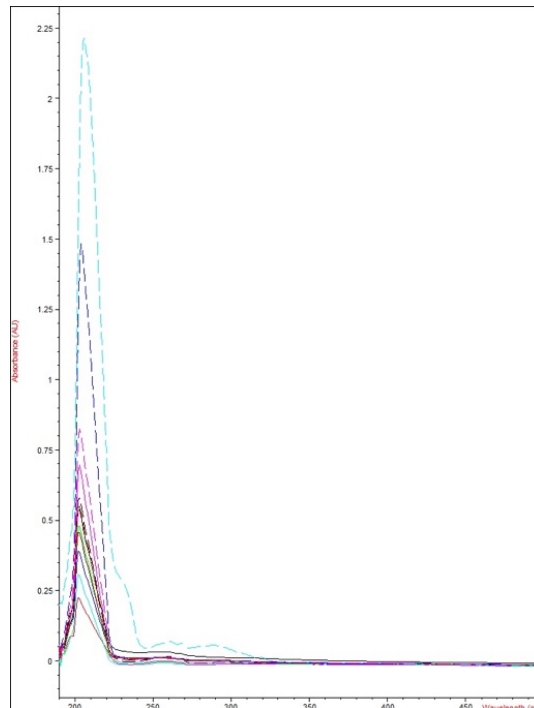


Figure 34: Spectres UV des implants de bimatoprost de PLGA et PEG-PLGA aux concentrations en bimatoprost de 30 et 50%, au jour 1 du test de dissolution

L'absorbance de la solution de bimatoprost dans le milieu de dissolution a été mesurée à 208 nm, correspondant à l'absorbance maximale de la solution standard mesurée par spectrophotométrie (Figure 34). La libération de bimatoprost de ces implants est représentée dans la figure 35. La libération du bimatoprost semble être similaire pour toutes les formulations, à l'exception du PEG-PLGA contenant 50 % de bimatoprost. Pour cette dernière, la libération du principe actif semble être beaucoup plus élevée que pour les autres formulations. Cependant, il est important de noter que les valeurs d'écart-type sont très élevées pour ce lot, par exemple de 26,8% au jour 1 et 37,2% au jour 31. Cette grande variance entre les échantillons de ce lot peut être causée par des erreurs expérimentales dans la mesure de l'absorbance ou dans la fabrication de l'implant. Le problème se situe probablement au niveau de la formulation et du processus d'extrusion. En effet, lors de l'extrusion par seringue, deux étapes ont pu être observées : la première où l'extrudat forme des gouttes semi-solides, proches du liquide, qui, laissées à température ambiante, ne se solidifient pas, et la seconde où l'extrudat forme une matrice cylindrique qui se solidifie à température ambiante. En ce qui concerne la nature des

gouttes d'extrudat, une première hypothèse est que ces gouttes sont principalement composées de bimatoprost fondu, car ce composé est sensible à la chaleur. En effet, d'après le tableau III, le bimatoprost possède une température de fusion inférieure à 70°C et la température adoptée pour l'extrusion est supérieure à 100°C. Une deuxième hypothèse a été établie, à savoir que les gouttes sont composées de PEG fondu qui n'aurait pas formé de liaison avec le polymère. Dans les deux cas, la conséquence est qu'il y aurait une forte variation de contenu entre les implants. Pour étudier la variation de la teneur en principe actif dans un même lot, un autre test de dissolution a été effectué sur trois implants représentant le début, le milieu et la fin du processus d'extrusion. Au jour 7, la libération du principe actif pour les 3 implants testés était respectivement de 14%, 62% et 75% (Figure 36). Ces résultats démontrent le manque d'homogénéité des implants. Pour éviter cette variation, l'utilisation d'une extrudeuse à double vis pourrait aider à homogénéiser le mélange avant l'extrusion. De plus, cette technique permettrait d'avoir un meilleur contrôle de la température d'extrusion. Une autre solution serait de diminuer la concentration de bimatoprost, car la variation observée pour la formulation PEG-PLGA 30% bimatoprost est beaucoup plus faible. Enfin, une analyse des gouttes issues de l'extrusion permettrait de déterminer leur nature et ainsi d'avoir un meilleur contrôle sur le processus d'extrusion étant particulièrement difficile pour les implants de bimatoprost.

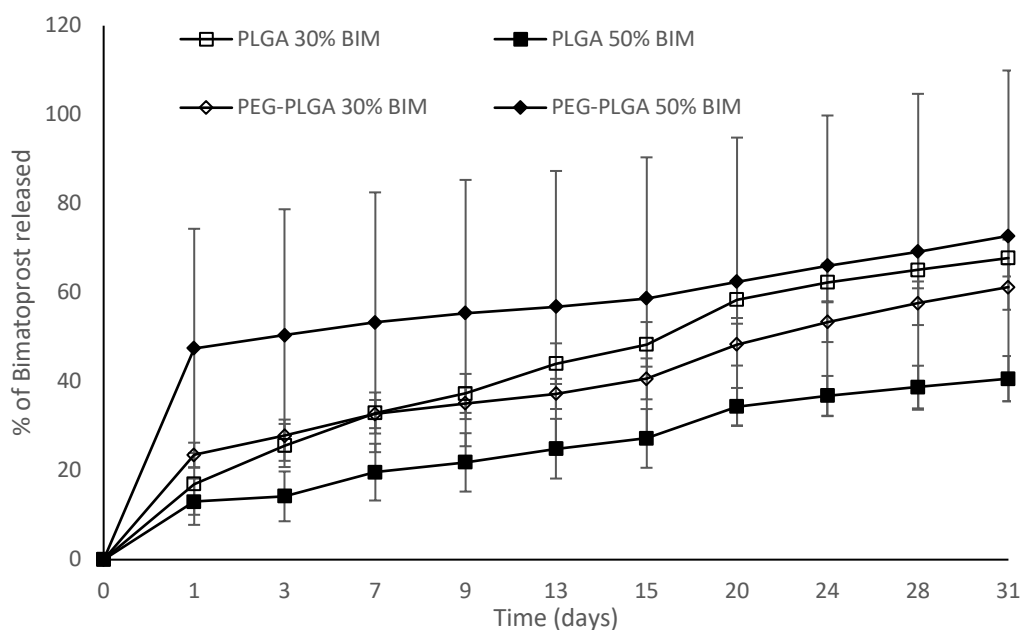


Figure 35: Libération de bimatoprost au cours du temps. Carrés: PLGA (Resomer 503H); Losanges: PEG-PLGA (PEG-Resomer 503H); Symboles vides: 30% bimatoprost; Symboles pleins: 50% bimatoprost

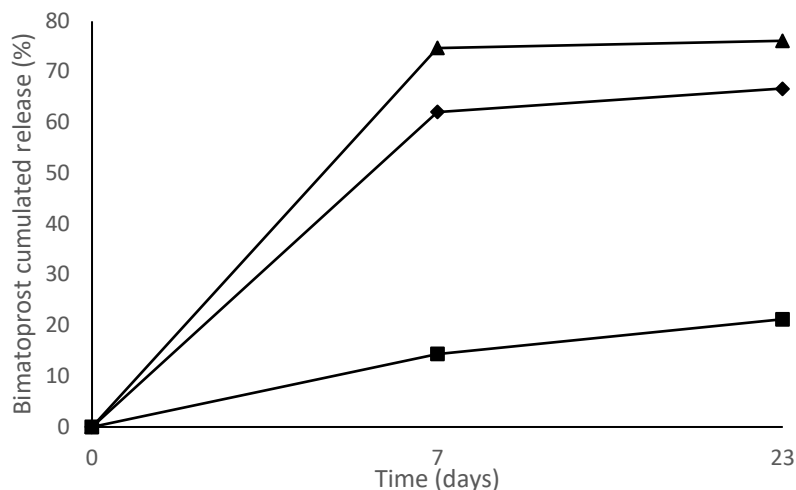


Figure 36: Libération de bimatoprost de trois implants provenant du même lot. Carrés : implant provenant du début de processus d'extrusion, losanges : implant du milieu de processus, triangles : implant de la fin du processus d'extrusion

Le bimatoprost est d'abord libéré sous la forme d'une libération explosive au cours du premier jour ou des premières heures, suivie d'une libération relativement linéaire. En raison des variations très élevées, aucune conclusion significative ne peut être faite sur la différence de bimatoprost à une concentration de 50% entre les matrices PLGA et PEG-PLGA. Cependant, il semble que la vitesse de libération du principe actif, à une concentration de 30 % de bimatoprost soit légèrement plus faible avec le PLGA pégylé avec 48% de principe actif libéré en moyenne au jour 20 pour les implants de PEG-PLGA contre 58% en moyenne pour les implants de PLGA. Des études supplémentaires doivent être réalisées sur des implants extrudés avec une extrudeuse à double vis et à des concentrations plus faibles en afin de tirer une conclusion significative sur l'influence de la pégylation du polymère sur le profil de libération du principe actif.

4.2.1.2. Dexaméthasone

La libération du principe actif a été réalisée sur des implants PEG-PLGA dexaméthasone, pour compléter l'étude de libération de la dexaméthasone avec des implants PLGA réalisés par Sebastian Märker, doctorant du laboratoire de technologie pharmaceutique. La figure 37 permet d'observer la dégradation physique des implants de PEG-PLGA et dexaméthasone dans le milieu de dissolution. Compte tenu de la longueur des implants (inférieurs à 2 mm pour un poids de 1 mg), il est difficile d'observer les différences de volume. Cependant, l'implant contenant 30% de dexaméthasone diminue de volume, et sa dégradation semble presque

complète au jour 31. L'érosion de l'implant semble donc être plus rapide à une concentration de 30% de dexaméthasone que de 50%.

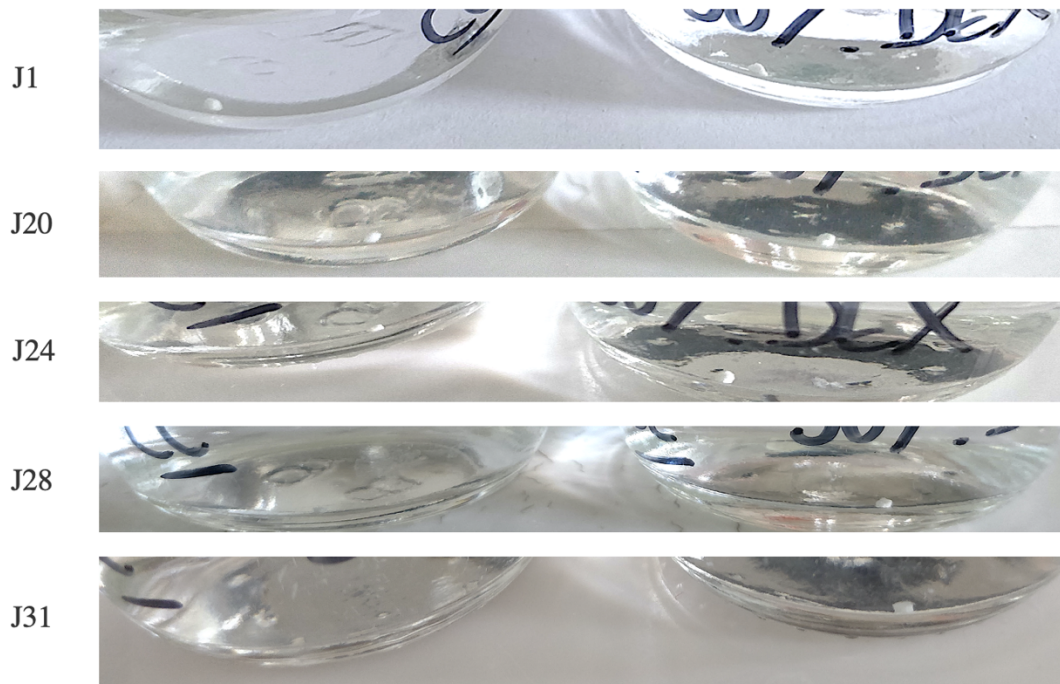


Figure 37: Photos de la libération de dexaméthasone à partir d'implants dans leur milieu de dissolution du jour 1 au jour 31, de PEG-PLGA 30% Dexaméthasone (gauche) et PEG-PLGA 50% Dexaméthasone (droite)

L'absorbance de la solution de dexaméthasone dans le milieu de dissolution a été mesurée à 242 nm, correspondant à l'absorbance maximale de la solution standard mesurée par spectrophotométrie (Figure 38). La libération de la dexaméthasone au cours du temps est présentée dans la figure 39. En comparant la libération du principe actif à une concentration de 30 % de dexaméthasone, la libération du principe actif semble être plus rapide dans les implants PEG-PLGA que pour les implants PLGA. Cependant, cette tendance n'est pas observée à une concentration de principe actif de 50 %, où la libération explosive est légèrement supérieure, ce qui implique une libération plus importante au cours des 14 premiers jours pour les implants PEG-PLGA, après quoi le taux de libération du principe actif des implants PLGA augmente de manière significative. On note une libération moyenne de dexaméthasone de 56% par les implants de PLGA au jour 19 contre 40% par les implants de PEG-PLGA au jour 20. Néanmoins, l'importance des variations entre les échantillons d'implants PEG-PLGA implique que des expériences supplémentaires doivent être réalisées pour pouvoir conclure sur la libération du principe actif après le 20ème jour. En effet, celles-ci atteignent, au jour 31, une valeur de 15,5% pour les implants de concentration 30% et de 33,1% pour les implants de

concentration 50%. Dans l'ensemble, la libération de la dexaméthasone par les implants PEG-PLGA semble suivre une tendance plus linéaire que celle des implants PLGA et la libération initiale explosive est également plus élevée pour les implants de PEG-PLGA.

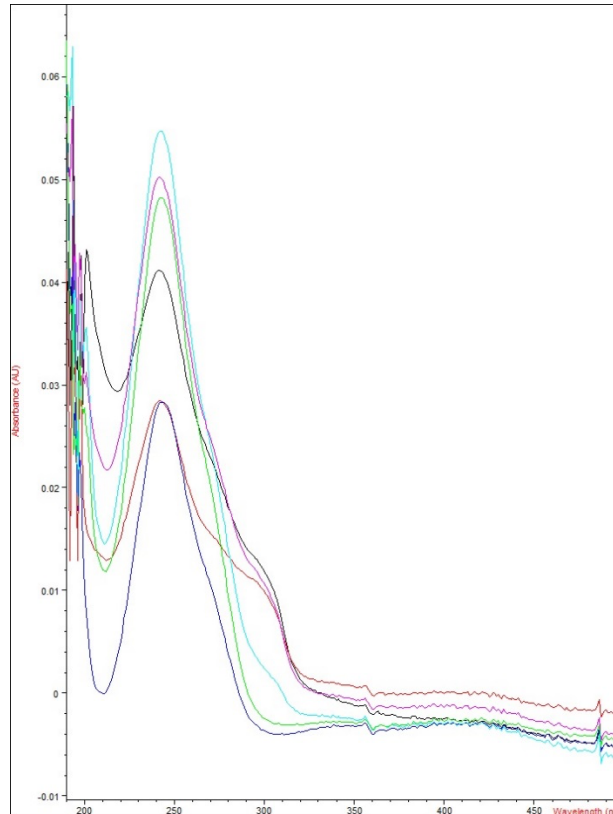


Figure 38: Spectres UV des implants de dexaméthasone de PEG-PLGA aux concentrations en dexaméthasone de 30 et 50%, au jour 1 du test de dissolution

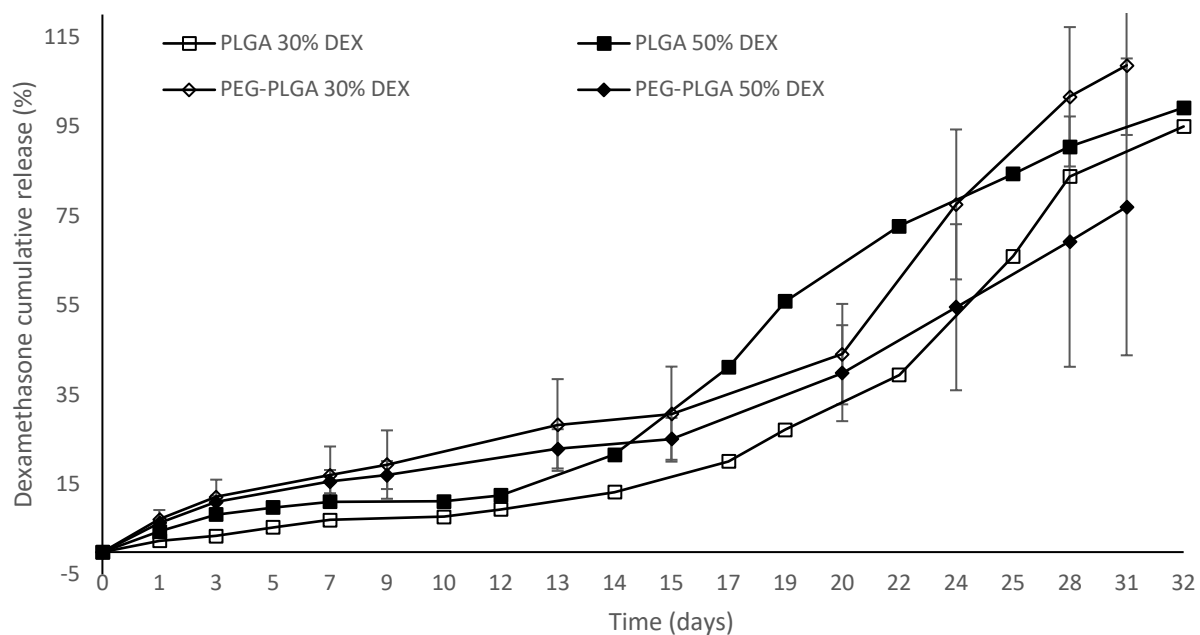


Figure 39: Libération de dexaméthasone au cours du temps. Carrés : PLGA (Resomer 503H); Losanges: PEG-PLGA (PEG-Resomer 503H); Symboles vides: 30% dexaméthasone; Symboles pleins: 50% dexaméthasone

4.2.1.3. Risperidone

La libération du principe actif a été réalisée sur des implants PEG-PLGA de rispéridone pour compléter l'étude de libération de la rispéridone avec des implants PLGA fabriqués par Friederike Bach, doctorante du laboratoire de technologie pharmaceutique. Sur la figure 40 sont présentés les stades de dégradation de l'implant du jour 1 au jour 31. Les implants au jour 1 sont dans leur état initial, après une semaine, on peut observer un gonflement de la surface de l'implant. Au jour 13, l'ensemble de l'implant a gonflé et son volume est bien supérieur. C'est à partir du vingtième jour que l'érosion de l'implant est clairement observable. L'implant perd progressivement sa forme cylindrique, la partie centrale s'affaissant. L'implant passe progressivement de sa couleur blanche, donnée par la rispéridone à une couleur translucide correspondant au polymère seul. Ce phénomène semble être plus rapide pour l'implant ayant une concentration de 30% de rispéridone. La libération de rispéridone pour ces derniers serait donc presque complète aux jours 28 et 31 et, en comparaison aux implants PEG-PLGA 50% rispéridone, elle semble être plus rapide après le jour 13.



Figure 40: Photos de la libération de Rispéridone à partir d'implants dans leur milieu de dissolution du jour 1 au jour 31, de PEG-PLGA 30% Rispéridone (gauche) et PEG-PLGA 50% Rispéridone (droite)

L'absorbance de la solution de rispéridone dans le milieu de dissolution a été mesurée à 276 nm (Figure 41). Il ne s'agit pas de l'absorbance maximale de la rispéridone, cependant la plus faible absorbance à cette longueur d'onde permet d'analyser des solutions plus concentrées et ainsi de performer les tests de dissolution dans un volume de milieu de dissolution inférieur.

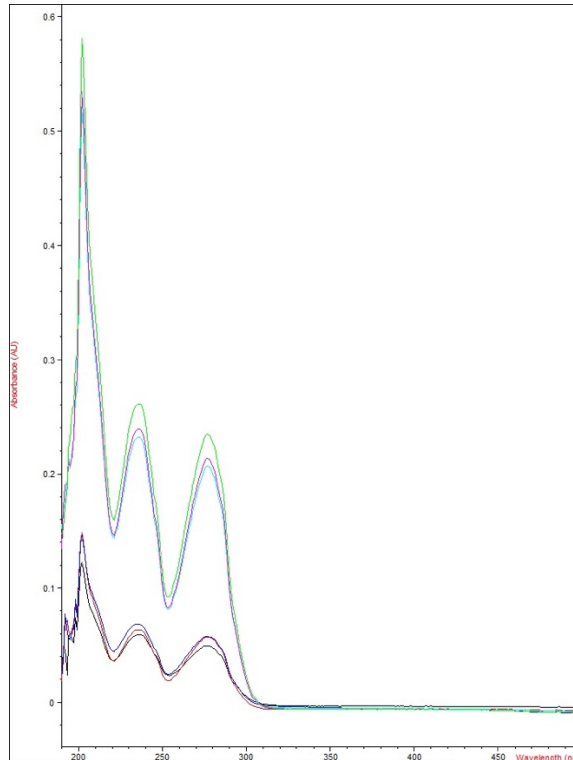


Figure 41: Spectres UV des implants de rispéridone de PEG-PLGA aux concentrations en rispéridone de 30 et 50%, au jour 1 du test de dissolution

Le profil de libération du principe actif de ces implants est présenté dans la figure 42. En comparant les profils de libération correspondant au PLGA 503H 50% rispéridone et au PEG-PLGA 50% rispéridone, un profil différent peut être observé. En ce qui concerne les implants à matrice PLGA, une première libération explosive ou un taux de libération élevé se produit pendant une première étape de libération, suivie d'une libération plus lente conduisant à une phase de plateau. D'autre part, la libération du principe actif des implants en PLGA pégylé dont la libération initiale explosive est plus importante que celle observée pour les implants PLGA semble suivre un taux de libération plus linéaire. En effet, en comparant les implants de concentration 50% au jour 3 du test de dissolution, les implants de PLGA ont libéré en moyenne 5,7% de rispéridone tandis que les implants de PEG-PLGA ont libéré 12,9% de rispéridone. La libération complète du principe actif semble être atteinte approximativement au même moment pour les implants en PLGA pégylé et non pégylé, mais le profil de libération complète du principe actif est significativement différent. L'hypothèse portée suite à l'observation de la dégradation des implants (Figure 40) n'est que partiellement vérifiée par la figure 42. En effet, la libération de la rispéridone aux jours 28 et 31 est complète. Cependant, l'hypothèse stipulant que « compte tenu de l'érosion plus rapide des implants de concentration 30%, la libération du principe actif serait plus rapide à 30% qu'à 50% » n'est pas vérifiée. La libération de rispéridone

à partir des implants de concentration 50% est plus élevée, jusqu'au jour 24 où elle rejoint celle des implants de concentration 30%.

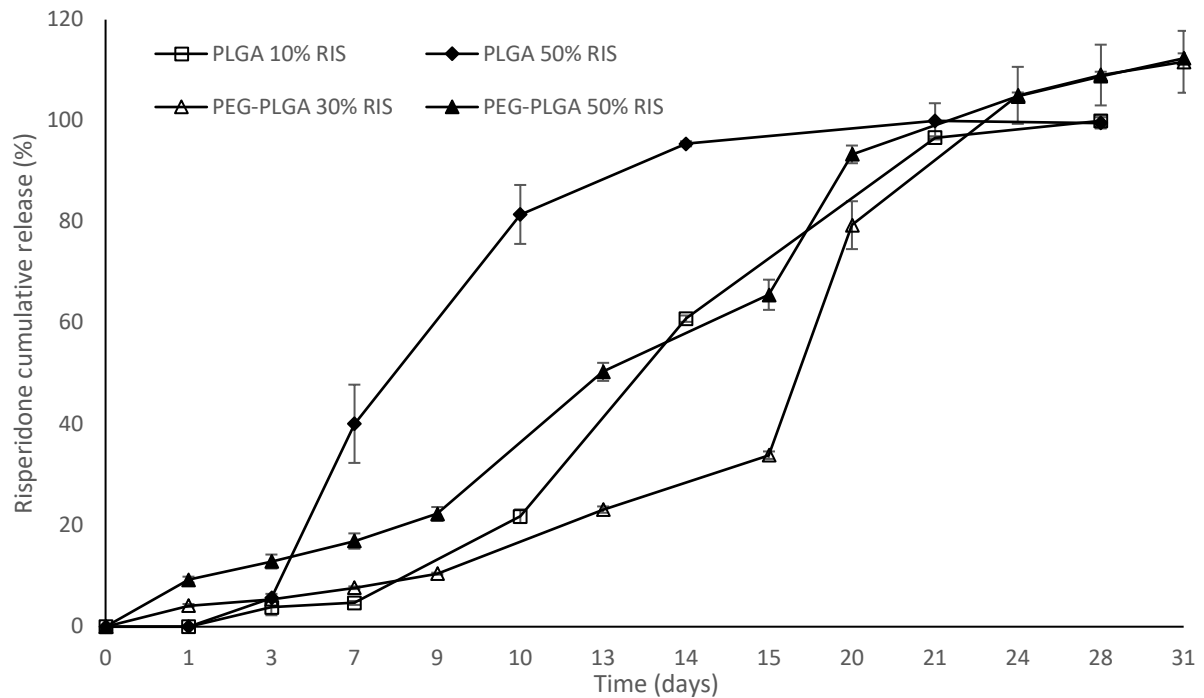


Figure 42: Libération de la risperidone des implants au cours du temps. Carrés vides: PLGA 502H 10% risperidone; Losanges: PLGA 502H 50% risperidone; Triangles: PEG-PLGA 503H; Triangle vide: 30% risperidone; Triangle plein: 50% risperidone

4.2.2. Études de caractérisation

4.2.2.1. RMN

Les analyses RMN ont initialement été réalisées avec deux solvants afin de sélectionner le plus approprié. Les polymères et formulations contenant du principe actif sont solubles à la fois dans le CdCl_3 et le $\text{d}_6\text{-DMSO}$, solvants classiquement utilisés pour l'analyse RMN. Les spectres du proton et du carbone du Resomer RG 502H dans le CdCl_3 et $\text{d}_6\text{-DMSO}$ ont été recueillis (Figure 43).

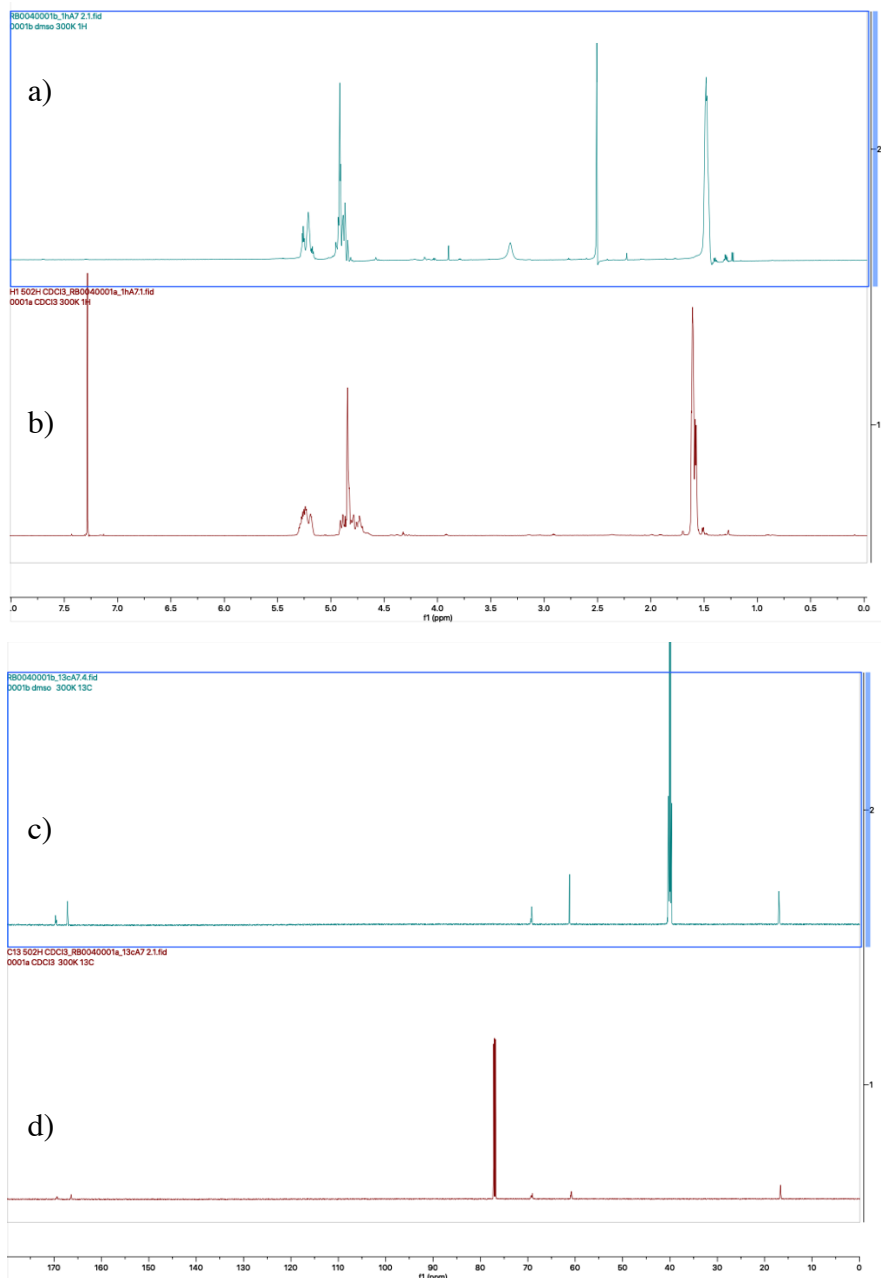


Figure 43: Spectres du proton du Resomer RG 502H dans a) le d6-DMSO, b) le CdCl₃ et du carbone dans c) le d6-DMSO et d) le CdCl₃

En observant les spectres a) et b) du proton du Resomer RG 503H, le signal des pics observés est légèrement plus élevé lors de l'utilisation du d6-DMSO comme solvant. Cette différence est également observée pour les spectres c) et d) du carbone du Resomer RG 502H pour lesquels la sensibilité est nettement supérieure lors de l'utilisation du d6-DMSO par rapport au CdCl₃. C'est donc pour cette raison que le solvant choisi pour les analyses est le d6-DMSO, permettant une dissolution rapide et complète de l'échantillon et d'effectuer des analyses sensibles.

Pour mieux comprendre les propriétés physicochimiques du polymère et de l'implant, le ratio PLA/PGA est un facteur très important. La spectrométrie RMN est un outil efficace pour déterminer le rapport des unités lactiques/glycoliques dans un échantillon de PLGA. Sur les spectres protoniques du polymère Resomer RG 503H (Figure 44), il est possible de corréler les pics à leur proton ou au groupe protonique de la chaîne d'acide poly lactique-co-glycolique. L'équation 6 permet de calculer le rapport PLA/PGA (56):

Équation 6: Calcul de pourcentage d'unité dans un échantillon à partir de son spectre RMN

$$\text{Unité 1} : \frac{\text{Intégrale 1}}{\text{Intégrale 1} + 2} \times 100 = \% \text{ d'unité 1 dans l'échantillon}$$

Dans le cas de l'étude, les unités 1 et 2 correspondent aux unités PLA et PGA. Les intégrales sont l'intégration d'un pic pour un proton. Dans ce spectre, le pic a) correspond aux protons du groupe CH du PLA, le pic b) correspond aux protons du CH₂ de l'unité PGA et enfin le pic c) correspond aux protons du CH₃ appartenant à l'unité PLA. En considérant que l'unité 1 représente le PLA, l'unité 2 le PGA, l'intégrale 1 = 2,96/3 = 0,987 et l'intégrale 2 = 1,91/2 = 0,955 ; Unité 1 = 50.2% and Unité 2 = 49.2. Ce calcul correspond bien au ratio 50/50 d'unités lactiques et glycoliques du polymère renseignées par le fabricant.

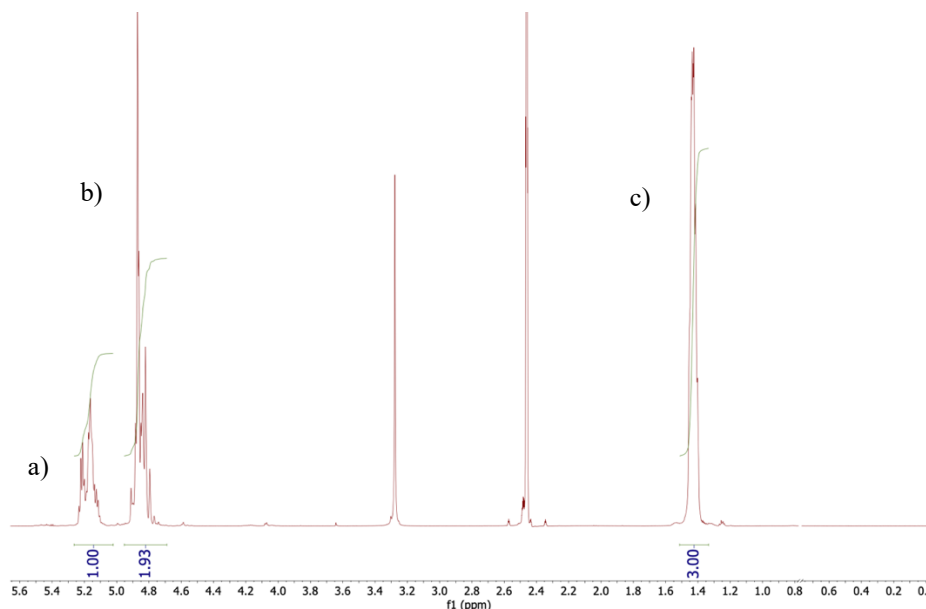


Figure 44: Spectre RMN protonique du polymère Resomer RG 503H. a) pic CH, b) pic CH₂, c) pic CH₃

Cette méthode peut également être appliquée aux spectres de ^{13}C , bien qu'il s'agisse d'une analyse moins sensible. Dans ce cas, la même formule est utilisée, cependant la valeur de l'intégrale d'un pic peut être utilisée directement car elle correspond à un atome de carbone. La figure 45 représente le spectre ^{13}C d'un mélange 1:1 des polymères Resomer RG 503H et Resomer RG 752S. Les pics du spectre ont été identifiés et renseignés dans le tableau VI.

Tableau VI : Identification des pics du spectre RMN du carbone du mélange Resomer 503H/752S

Type de carbone	Unité d'appartenance dans le PLGA	Déplacement chimique (ppm)	Intégrale
CH ₃	PLA	17,00	1,00
CH ₂	PGA	61,30	0,53
CH	PLA	69,40	0,96
Carboxylique	PGA	167,30	0,57
Carboxylique	PLA	169,60	1,00

A partir de ces valeurs, ont été sélectionnés les pics correspondant au carbone carboxylique de chaque unité et les paramètres de l'équation ont été définis : l'unité 1 représente le PLA, l'unité 2 le PGA, l'intégrale 1 = 1,00 et l'intégrale 2 = 0,57. Les pourcentages calculés sont 63,7% d'unité 1 et 36,3% d'unité 2. Le mélange à parts égales de Resomer 503H et 752S correspond à un ratio PLA/PGA de 62,5/37,5 qui coïncide avec le ratio calculé précédemment.

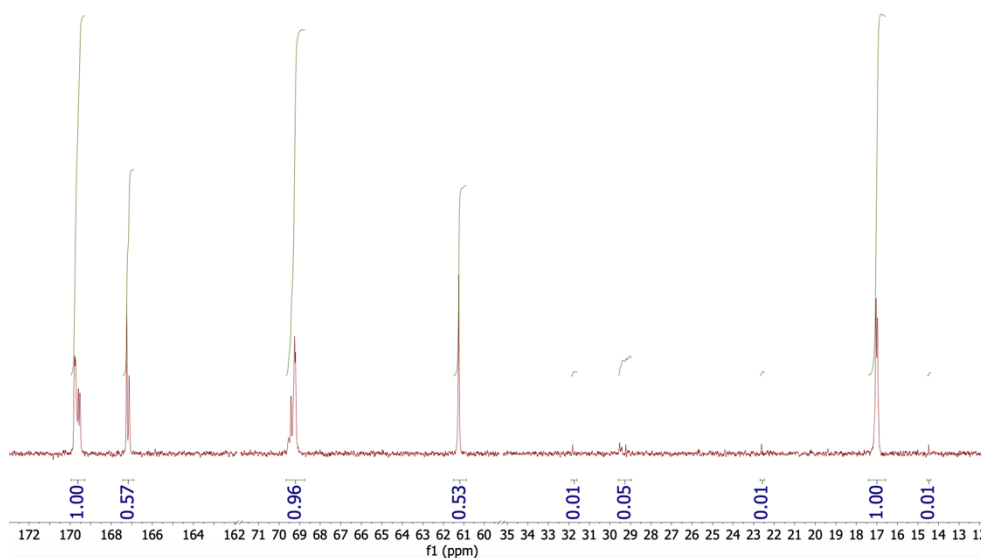


Figure 45: Spectre RMN du carbone du mélange 1:1 des polymères Resomer RG 503H et Resomer RG 752S

Cette méthode de calcul de ratios a également été appliquée au spectre d'un implant de composition PLGA 50% dexaméthasone (Figure 46) afin de déterminer le ratio

PLGA/dexaméthasone. Les principaux pics du spectre RMN protonique du polymère a) Resomer RG 502H sont identiques aux pics d'ores et déjà identifiés dans la figure 44 pour le polymère Resomer RG 503H. Les principaux pics du spectre b) de l'implant Resomer RG 502H 50% Dexaméthasone sont identifiés à partir des données existantes et de la figure 47 dans le tableau VII à l'aide des données spectrales du Chemical Book (57).

Tableau VII: Identification des pics du spectre RMN du proton de l'implant Resomer RG 502H 50% Dexaméthasone

Type d'hydrogène	Unité d'appartenance dans l'implant	Déplacement chimique (ppm)
(a)	Dexaméthasone	0,74
(b)	Dexaméthasone	0,83
CH ₃	PLA	1,44
D6-DMSO	Solvant	2,46
D6-DMSO-H ₂ O	Solvant	3,29
CH ₂	PGA	4,88
CH	PLA	5,16
(c)	Dexaméthasone	5,96
(d)	Dexaméthasone	6,18
(e)	Dexaméthasone	7,25

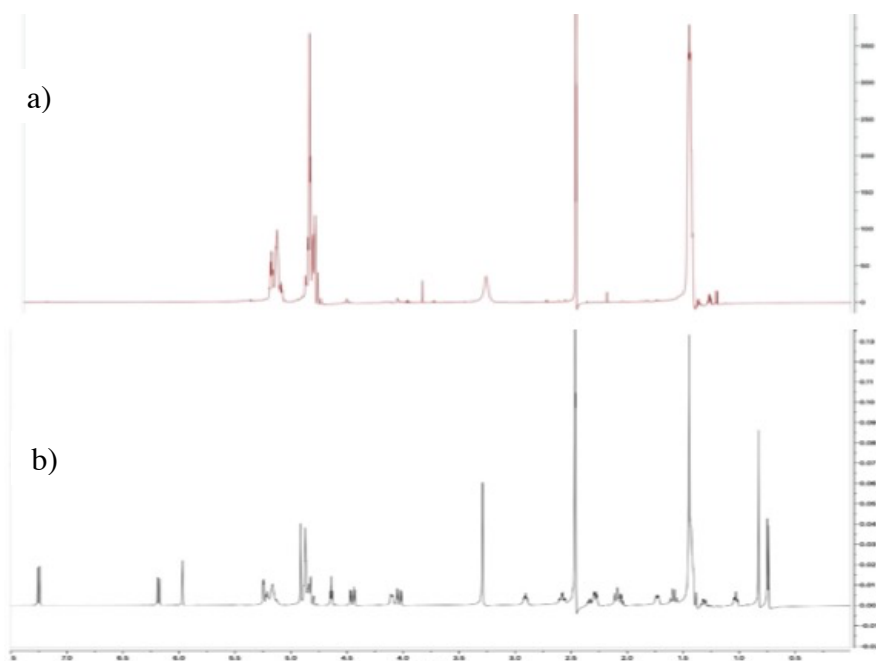


Figure 46: Spectres RMN protoniques de a) Resomer RG 502H et de b) Implant Resomer RG 502H 50% dexaméthasone

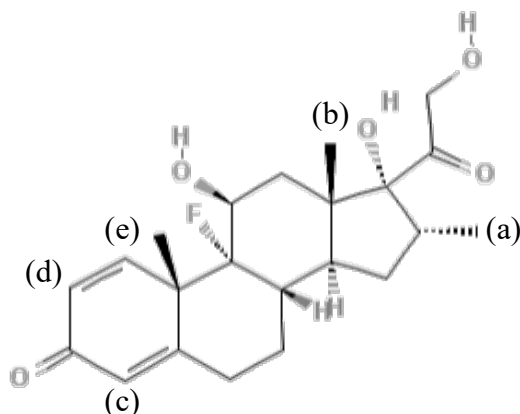


Figure 47: Structure moléculaire 2D de la dexaméthasone

Après identification des pics du spectre, l'équation 6 peut être appliquée au calcul du pourcentage de PLGA et de dexaméthasone dans l'implant analysé. Dans ce cas, les unités 1 et 2 correspondent donc au PLGA et à la dexaméthasone, respectivement. Le pic du proton (e) est choisi pour représenter la dexaméthasone et les pics du CH₃ de l'unité PLA et du CH₂ de l'unité PGA sont choisis pour représenter, une fois additionnés, le PLGA. Pour un hydrogène nous obtenons donc : intégrale 1 = 0,43 + 0,65 ; intégrale 2 = 1,00 et unité 1 = 51,9% et unité 2 = 48,1%. Ce calcul correspond donc approximativement au ratio de PLGA et de principe actif utilisé dans la formulation de l'implant.

La spectrométrie RMN permet également d'identifier le groupe terminal de la chaîne de polymère. En effet, lorsque l'on compare les spectres protoniques du PLGA Resomer RG 503H avec groupe terminal acide (spectre b) et Resomer RG 752S avec groupe terminal ester (Figure 48), un pic additionnel peut être observé à 0,8 ppm sur le spectre a), du polymère possédant des groupes terminaux ester. Ce pic est un triplet correspondant au groupe méthylène d'un groupe ester terminal.

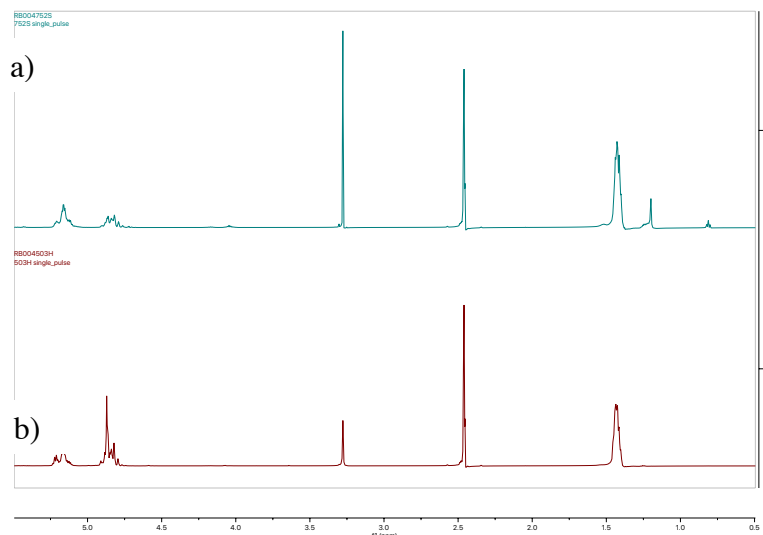


Figure 48: Spectre RMN photonique des polymères a) Resomer 752S and b) Resomer 503H

En observant les spectres individuels de deux PLGA de type différent ainsi que le spectre d'un mélange de ces derniers, les pics sont observés au même déplacement chimique. La figure 49 permet de comparer les spectres ^{13}C de Resomer RG 503H (Spectra a), du Resomer RG 752S (Spectre b) et le spectre du mélange 1:1 Resomer RG 503H/ Resomer RG 752S (Spectre c).

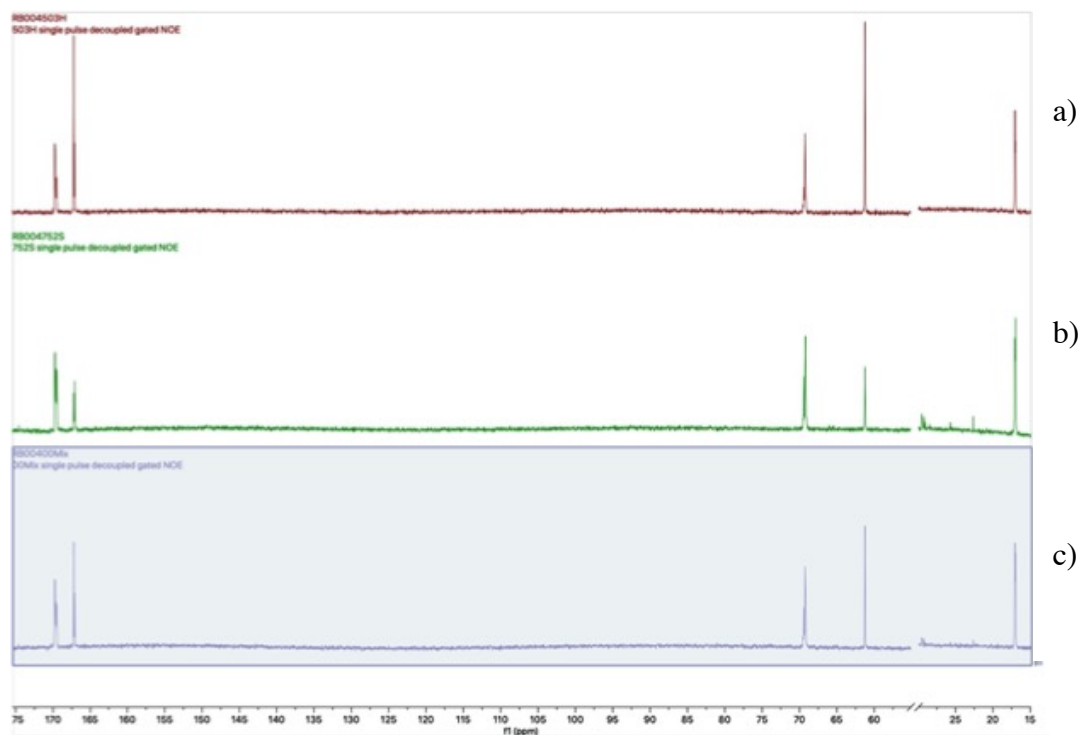


Figure 49: Spectres RMN du carbone de a) Resomer RG 503H, b) Resomer RG 752S et c) Mélange 1:1 Resomer RG 503H et 752S

Les pics identifiés dans ces trois spectres sont les mêmes pics que ceux listés dans le tableau VI. Cependant, on peut observer que l'intensité des pics varie d'un spectre à l'autre. En effet, nous pouvons observer que l'intensité du pic présent dans le spectre c) semble correspondre à la moyenne des intensités du pic correspondant des spectres a) et b). Cette observation permet de valider visuellement le calcul de ratio effectué auparavant à partir de la figure 45. Néanmoins, comme les pics apparaissent au même déplacement chimique, il n'est pas possible à travers ce type de spectre de distinguer chaque PLGA. Pour tenter d'atteindre cet objectif, la technique de DOSY (Diffusion Ordered Spectroscopy) a été utilisée. Elle permet de distinguer plusieurs composés en mélange en fonction de leur masse moléculaire, notamment.

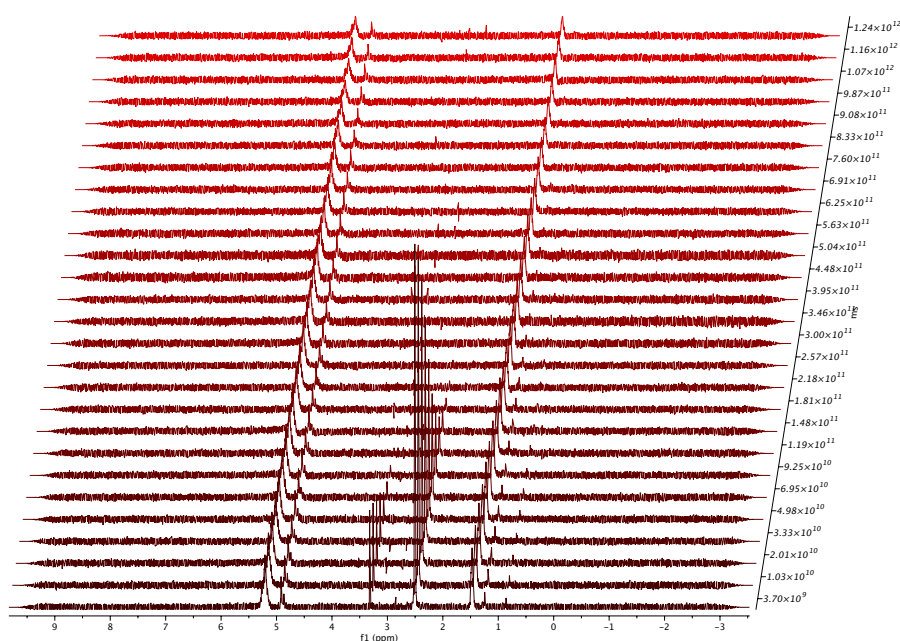


Figure 50: Spectre DOSY du mélange 1:1 Resomer RG 503H et 752S

Les pics identifiés visibles sur la figure 50 sont répertoriés dans le tableau VII, il s'agit donc, en lisant de droite à gauche, du groupe terminal méthylène, du CH_3 de l'unité PLA, du solvant puis du solvant hydraté, suivi par le pic CH_2 du PGA et enfin le dernier pic correspondant au CH du PLA. L'intensité des pics est exprimée en amplitude de gradient magnétique pulsé et la décroissance du signal est proportionnelle au coefficient de diffusion. De ce fait deux entités chimiques identiques posséderont un taux de décroissance identique. Sur la figure 50, la décroissance est identique pour les pics correspondant au PLA et au PGA, une décroissance différente est observée pour le premier pic correspondant au groupement méthylène terminal et enfin deux profils de décroissance différents sont observés pour le d_6 -DMSO et d_6 -DMSO hydraté. En excluant le solvant, nous avons donc deux entités moléculaires distinctes dans ce

spectre, l'une regroupant les pics CH₃, CH₂ et CH du PLGA et la seconde représentée par le pic du groupement méthylène terminal du PLGA. Nous pouvons formuler l'hypothèse que les deux polymères sont distinguables grâce au groupement terminal du Resomer RG 752S. Les pics correspondant aux unités PLA et PGA du Resomer RG 503H et RG 752S ne sont pas distinguables et sont vraisemblablement regroupés sous le même pic.



Figure 51: Spectre DOSY transform du mélange 1:1 Resomer RG 503H/752S

De la même manière que pour la lecture de la figure 50, on observe sur la figure 51 que l'axe des ordonnées représente le coefficient de diffusion et l'axe des abscisses représente le déplacement chimique. Celui-ci est identique pour une même entité moléculaire. Cinq coefficients de diffusion peuvent être identifiés, leur valeur ainsi que le pic correspondant et son unité d'appartenance sont renseignés dans le tableau VIII.

Tableau VIII: Identification des pics en fonction du coefficient de diffusion

Coefficient de diffusion (cm ² /sec)	Pic(s) correspondant(s)
1,72 x 10 ⁻¹²	1,25 ppm - Non identifié
	1,44 ppm – PLA
	4,88 ppm - PGA
	5,16 ppm - PLA
1,45 x 10 ⁻¹²	0,87 ppm – Méthylène du groupe terminal ester
9,57 x 10 ⁻¹³	1,44 ppm - PLA
	4,88 ppm - PGA
	5,16 ppm - PLA
5,99 x 10 ⁻¹³	1,44 ppm - PLA
	5,16 ppm - PLA
3,99 x 10 ⁻¹³	4,88 ppm - PGA

Il est important de savoir que le coefficient de diffusion est inversement proportionnel à la masse moléculaire. D’après le tableau IV, le Resomer RG 752S a une masse moléculaire inférieure au Resomer RG 503H, son coefficient de diffusion devrait donc être plus important. Par conséquent les pics de coefficient de diffusion 1,72 x 10⁻¹² correspondraient aux unités lactiques et glycoliques du polymère RG 752S. Cette hypothèse est consolidée par la présence du pic de l’ester terminal du polymère RG 752S à proximité, possédant un coefficient de diffusion d’une valeur de 1,45 x 10⁻¹². Les pics possédant un coefficient de diffusion de 9,57 x 10⁻¹³ semblent appartenir au Resomer RG 503H. Cependant, d’un mélange de deux polymères, nous obtenons quatre différents coefficients de diffusion (1,72 x 10⁻¹² et 1,45 x 10⁻¹² pouvant être considérés comme un même coefficient). Les deux premiers coefficients sont identifiés comme appartenant à la chaîne PLGA des Resomer RG 752S et 503H respectivement. Les entités supplémentaires semblent être des unités lactiques et glycolique s’étant dissociées du polymère. Cependant, il est difficile de déterminer à quel PLGA ces unités appartiennent.

4.2.2.2. FTIR

Un mélange de PLGA Resomer 503H et de Macroglol 6000 et des microparticules obtenues à partir du copolymère Expansorb DLG 50-6P ont été analysés par FTIR pour observer les différences spectrales entre ces deux produits. Sur le spectre FTIR du mélange PEG-PLGA (Figure 52), de multiples pics appartenant au copolymère peuvent être identifiés à l’aide de

l'article de Singh et al. (58) et de la table de correspondance en spectroscopie infrarouge (34). Le pic situé à 1097 cm^{-1} correspond à une élévation de la liaison C-O, le pic à 1753 cm^{-1} représente vraisemblablement une élévation C=O, enfin le pic situé à 2883 cm^{-1} correspond à une élévation C-H. Les fonctions chimiques du PLGA et du PEG étant de même nature, ce spectre n'est pas suffisant pour distinguer les deux éléments. La lecture du spectre du PEG-PLGA commercial (Figure 53) est difficile en raison d'une déviation de la ligne de base et d'un faible rapport signal/bruit. Le processus d'obtention de microparticules à partir du produit commercial nécessite de grands volumes de solvant. De ce fait, il est possible que le solvant résiduel contenu dans les particules soit responsable de la déviation de la ligne de base. Une quantification du solvant résiduel dans les particules via chromatographie gazeuse permettrait de renforcer cette hypothèse. Le procédé de production des particules pourrait ainsi être optimisé afin de réduire la quantité de solvant résiduel. Alternativement, des films de PEG-PLGA pourraient être préparés, permettant également de limiter la présence de solvant résiduel.

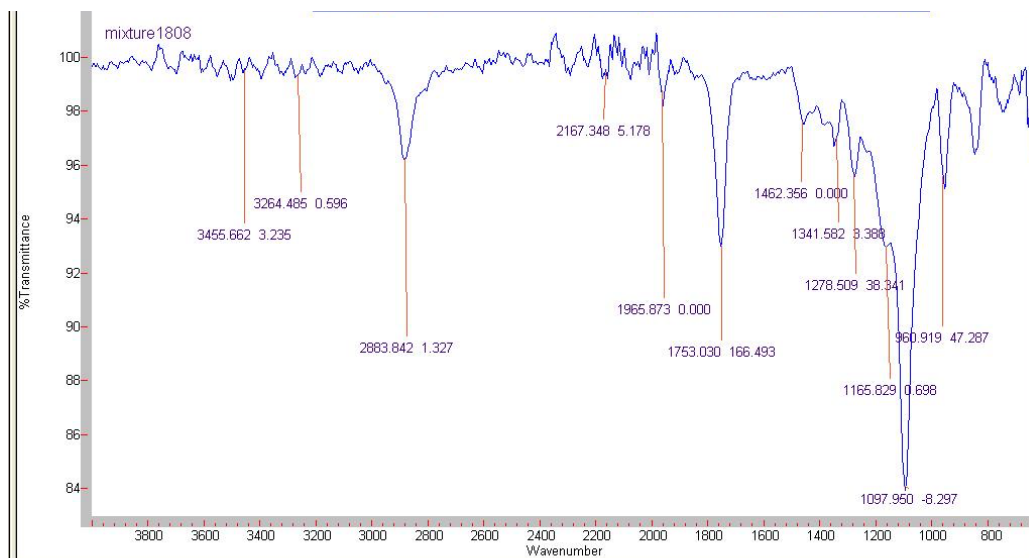


Figure 52: Spectre FTIR du mélange 1:1 de PEG et PLGA

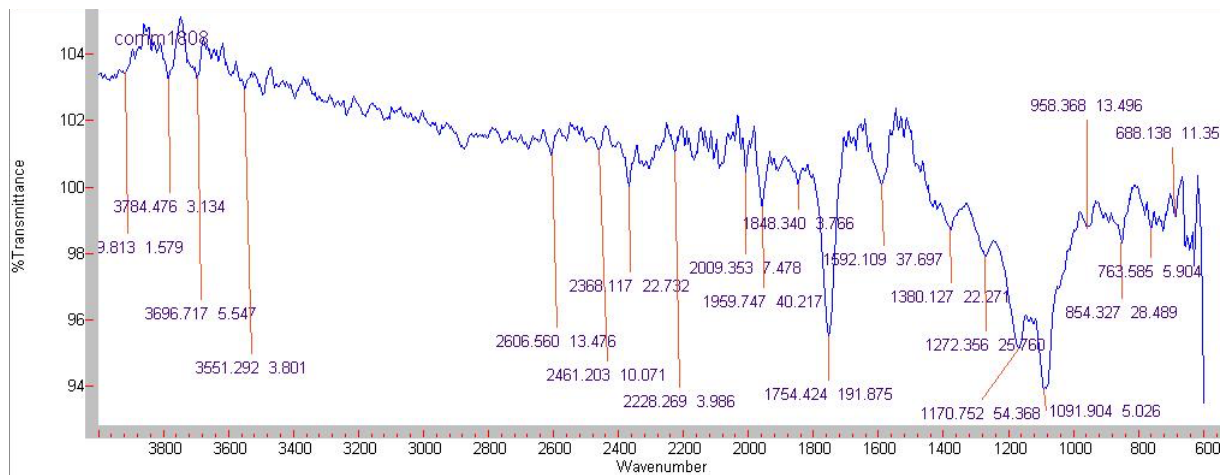


Figure 53: Spectre FTIR des microparticules d'Expansorb DLG 50-6

4.3. Conclusion et perspectives d'avenir

La dégradation des implants semble se diviser en plusieurs étapes. La première est l'hydratation de la couche superficielle de l'implant, un gonflement de la surface peut être observé. Puis a lieu un gonflement de l'ensemble de la matrice polymérique et l'implant augmente significativement de volume. Enfin l'érosion de l'implant est visible par la déformation de celui-ci et par le changement de couleur témoignant de la libération du principe actif jusqu'à l'obtention d'une matrice polymérique translucide. Les profils de libération des principes actifs sont considérablement différents d'un médicament à l'autre. La libération du bimatoprost par les implants concentrés à 30% semble être ralentie par la pégylation de la matrice PLGA. Pour les implants de dexaméthasone, la libération du principe actif pendant la phase de libération explosive et les 14 premiers jours est plus importante pour les matrices PEG-PLGA. Enfin, la libération explosive de la rispéridone est plus importante dans les implants PEG-PLGA que dans les implants PLGA. De manière plus générale, les implants de PEG-PLGA présentent un profil de libération de principe actif plus proche du profil triphasique. Elle consiste donc en une libération de principe actif plus importante que celle de la matrice de PLGA lors de la phase de libération explosive suivie par une libération linéaire. D'avantage d'essais de dissolution devraient être réalisés, sur un plus grand nombre d'implants afin de confirmer cette observation. Malgré le caractère chronophage de ces expériences, celles-ci sont essentielles à la compréhension du profil de libération de substances actives en temps réel. De plus, des expériences supplémentaires doivent être réalisées pour surmonter les problèmes de formulation et réduire les écarts entre les échantillons. L'extrusion des implants avec une extrudeuse à double vis peut permettre d'obtenir une matrice d'implant plus homogène. Dans le cas particulier du bimatoprost, une concentration inférieure pourrait être utilisée pour améliorer l'extrudabilité du mélange et l'utilisation d'un polymère ou copolymère possédant une température de transition vitreuse inférieure au Resomer RG 503H utilisé dans l'étude permettrait d'abaisser la température d'extrusion. Une étude très complète de la libération de principes actifs à partir d'implants de PLGA et PEG-PLGA pourrait être réalisée afin de construire un modèle permettant de prédire la libération de principe actif au cours du temps dans un milieu de dissolution donné, selon les propriétés physico-chimiques du principe actif. L'utilisation d'un système chromatographique équipé de détecteur UV à la place d'un spectrophotomètre UV permettrait l'automatisation des mesures et l'obtention de résultats plus précis.

La spectrométrie RMN peut être un outil quantitatif et qualitatif très utile dans le cadre de la caractérisation de polymères et d'implants. En effet, elle permet de calculer des ratios entre les unités composant le PLGA, au sein d'un seul polymère ou bien encore pour un mélange de deux entités moléculaires. Cette technique permet également de déterminer les groupes terminaux des chaînes de polymère, ce qui permet d'apporter plus d'informations sur les propriétés du polymère. La technique DOSY permet de mettre en relation les pics d'un spectre donné aux entités chimiques présentes dans l'échantillon. Ainsi, il est plus aisé d'identifier les entités moléculaires présentes dans un échantillon, qu'il s'agisse de polymère et de principe actif, de deux polymères différents mais aussi de monomères n'ayant pas été identifiés auparavant. La FTIR est complémentaire à la RMN puisque cette technique permet d'étudier spécifiquement les fonctions chimiques et le comportement des liaisons. Cependant, son application aux copolymères de type PEG-PLGA ne permet peut-être pas d'obtenir d'avantage d'information, car le PEG et le PLGA partagent les mêmes groupes fonctionnels. L'analyse RMN, en particulier la technique DOSY permettrait de différencier facilement les unités PEG et du PLGA par leur masse moléculaire.

L'étude des implants médicamenteux à base de PLGA permet par une augmentation des connaissances dans ce domaine de développer d'avantage d'implants biodégradables représentant une alternative aux médications classiques actuellement sur le marché.

Le doyen de l'UFR de Pharmacie,

Christiane FORESTIER

Le Président du Jury,

Marie-Josèphe GALMIER

BIBLIOGRAPHIE

1. Burgess DJ, Wright JC. An Introduction to Long Acting Injections and Implants. In: Wright JC, Burgess DJ, éditeurs. Long Acting Injections and Implants [Internet]. Boston, MA: Springer US; 2012 [cité 8 avr 2021]. p. 1-9. (Advances in Delivery Science and Technology). Disponible sur: https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0554-2_1
2. Maniruzzaman M, Nokhodchi A. Advanced Implantable Drug Delivery Systems via Continuous Manufacturing. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* 2016;33(6):569-89.
3. Yang W-W, Pierstorff E. Reservoir-Based Polymer Drug Delivery Systems. *J Lab Autom.* 1 févr 2012;17(1):50-8.
4. Makadia HK, Siegel SJ. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. *Polymers (Basel).* 1 sept 2011;3(3):1377-97.
5. Patel V, Akbari B, Deshmukh A, Goyani M, Patel A. A Review on PLGA Based Solvent Induced In-situ Forming Implant. *Research Journal of Pharmaceutical Dosage Forms and Technology.* 6 oct 2015;8:127.
6. Zhang K, Tang X, Zhang J, Lu W, Lin X, Zhang Y, et al. PEG–PLGA copolymers: Their structure and structure-influenced drug delivery applications. *Journal of Controlled Release.* 10 juin 2014;183:77-86.
7. Mäder K. RESOMER®—Biodegradable Polymers for Sutures, Medical Devices, Drug Delivery Systems and Tissue Engineering. *Medical Devices.* :5.
8. DURYSTA™ (bimatoprost implant) for Intracameral Administration | HCP Site [Internet]. [cité 8 août 2021]. Disponible sur: <http://www.durystahcp.com/>
9. Home Page [Internet]. [cité 8 août 2021]. Disponible sur: <https://www.ozurdex.com/>
10. PubChem. Risperidone [Internet]. [cité 8 août 2021]. Disponible sur: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5073>
11. Résumé des Caractéristiques du Produit [Internet]. [cité 13 sept 2021]. Disponible sur: <http://agence-prd.ansm.sante.fr/php/ecodex/rcp/R0230567.htm>
12. Ibrahim TM, El-Megrab NA, El-Nahas HM. Optimization of injectable PLGA in-situ forming implants of anti-psychotic risperidone via Box-Behnken Design. *Journal of Drug Delivery Science and Technology.* août 2020;58:101803.
13. FDA. Risperdal Consta label.pdf [Internet]. Disponible sur: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2010/021346_s31_s35_s38_s39lbl.pdf
14. (PDF) Long-acting injectable formulations of antipsychotic drugs for the treatment of schizophrenia. *ResearchGate* [Internet]. [cité 14 sept 2021]; Disponible sur: https://www.researchgate.net/publication/236094941_Long-acting_injectable_formulations_of_antipsychotic_drugs_for_the_treatment_of_schizophrenia
15. Whitcup SM, Robinson MR. Development of a dexamethasone intravitreal implant for the treatment of noninfectious posterior segment uveitis. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 2015;1358(1):1-12.
16. PubChem. Dexamethasone [Internet]. [cité 8 août 2021]. Disponible sur: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5743>
17. Dexaméthasone : substance active à effet thérapeutique [Internet]. VIDAL. [cité 14 sept

- 2021]. Disponible sur: <https://www.vidal.fr/medicaments/substances/dexamethasone-1201.html>
18. USP. Highlights of prescribing information OZURDEX [Internet]. Disponible sur: <https://media.allergan.com/actavis/actavis/media/allergan-pdf-documents/product-prescribing/20180515-OZURDEX-USPI-v1-0USPI3348.pdf>
 19. PubChem. Bimatoprost [Internet]. [cité 8 avr 2021]. Disponible sur: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5311027>
 20. Allergan. DURYSTA HIGHLIGHTS OF PRESCRIBING INFORMATION [Internet]. [cité 7 avr 2021]. Disponible sur: https://media.allergan.com/products/durysta_pi.pdf
 21. Ghalanbor Z, Körber M, Bodmeier R. Improved Lysozyme Stability and Release Properties of Poly(lactide-co-glycolide) Implants Prepared by Hot-Melt Extrusion. *Pharm Res.* 1 févr 2010;27(2):371-9.
 22. Malavia N, Kaiser PK. Overview of Sustained-Release Drug-Delivery Systems. :4.
 23. Dissolution Testing and Drug Release Tests | USP [Internet]. [cité 13 août 2021]. Disponible sur: <https://www.usp.org/chemical-medicines/dissolution>
 24. Lee SS, Hughes P, Ross AD, Robinson MR. Biodegradable Implants for Sustained Drug Release in the Eye. *Pharm Res.* 1 oct 2010;27(10):2043-53.
 25. Bode C, Kranz H, Fizez A, Siepmann F, Siepmann J. Often neglected: PLGA/PLA swelling orchestrates drug release: HME implants. *Journal of Controlled Release.* 28 juill 2019;306:97-107.
 26. Introduction aux techniques utilisées en biochimie [Internet]. [cité 1 oct 2021]. Disponible sur: http://www8.umoncton.ca/umcm-gauthier_didier/siitub/bassolphys.html
 27. Cayman. Product information 17-phenyl trino Prostaglandin F2a ethyl amide [Internet]. [cité 31 mai 2021]. Disponible sur: <https://www.caymanchem.com/pdfs/16820.pdf>
 28. Iwata M, Koide T, Maekawa K, Saito H, Tanimoto T, Okada S. [Dexamethasone Sodium Phosphate Reference Standard (Control 001) of National Institute of Health Sciences]. *Kokuritsu Iyakuhin Shokuhin Eisei Kenkyusho Hokoku.* 2001;(119):89-92.
 29. Cayman Chemical. Product information Ridperidone [Internet]. [cité 22 juill 2021]. Disponible sur: <https://www.caymanchem.com/pdfs/13629.pdf>
 30. HUMBOLDT UNIVERSITÄT ZU BERLIN ". Investigation of Polymers with Differential Scanning Calorimetry [Internet]. [cité 14 août 2021]. Disponible sur: <https://polymerscience.physik.hu-berlin.de/docs/manuals/DSC.pdf>
 31. Glass Transition Temperature - an overview | ScienceDirect Topics [Internet]. [cité 17 août 2021]. Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/topics/chemistry/glass-transition-temperature>
 32. SEM Principles | Principles of Scanning Electron Microscopy - DE [Internet]. [cité 17 août 2021]. Disponible sur: <https://www.thermofisher.com/de/de/home/materials-science/learning-center/applications/scanning-electron-microscope-sem-electron-column.html>
 33. NMR basic knowledge | Nuclear Magnetic Resonance Spectrometer (NMR) | Products | JEOL [Internet]. [cité 18 août 2021]. Disponible sur: <https://www.jeol.co.jp/en/products/nmr/basics.html>
 34. Aurélie Bourderieux, Mélanie Bourjot, Sonia Lordel-Madeleine, Ludivine Valois. *Mémo visuel de chimie analytique.* Dunod; 2020. 228 p.

35. Gerothanassis IP, Troganis A, Exarchou V, Barbarossou K. NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE (NMR) SPECTROSCOPY: BASIC PRINCIPLES AND PHENOMENA, AND THEIR APPLICATIONS TO CHEMISTRY, BIOLOGY AND MEDICINE. *Chem Educ Res Pract.* 2002;3(2):229-52.
36. Les origines de l'IRM: la résonance magnétique nucléaire (RMN) [Internet]. *CultureSciences-Chimie.* [cité 16 sept 2021]. Disponible sur: <https://culturesciences.chimie.ens.fr/thematiques/chimie-analytique/spectroscopies/les-origines-de-l-irm-la-resonance-magnetique>
37. Université de Brest. Résonance Magnétique Nucléaire – Résonance Paramagnétique Electronique (RMN-RPE) [Internet]. [cité 16 sept 2021]. Disponible sur: <https://www.univ-brest.fr/service-plateformes/menu/Nos-plateformes/Resonance-Magnetique-Nucleaire-Resonance-Paramagnetique-Electronique-RMN-RPE/Documents.cid209656>
38. Groves P. Diffusion Ordered Spectroscopy (DOSY) as applied to Polymers. *Polym Chem.* 2017;7(1):36-43.
39. Pagès G, Gilard V, Martino R, Malet-Martino M. Pulsed-field gradient nuclear magnetic resonance measurements (PFG NMR) for diffusion ordered spectroscopy (DOSY) mapping. *Analyst.* 2017;141(1):100-10.
40. Cobas C. NMR Analysis, Processing and Prediction: DOSY NMR [Internet]. *NMR Analysis, Processing and Prediction.* 2008 [cité 2 août 2021]. Disponible sur: <http://nmr-analysis.blogspot.com/2008/07/dosy-nmr.html>
41. JHU-NMR-DOSY.pdf [Internet]. [cité 13 août 2021]. Disponible sur: <http://nmr.chm.jhu.edu/Material/Notes/JHU-NMR-DOSY.pdf>
42. Guide to FT-IR Spectroscopy [Internet]. [cité 23 août 2021]. Disponible sur: <https://www.bruker.com/en/products-and-solutions/infrared-and-raman/ft-ir-routine-spectrometer/what-is-ft-ir-spectroscopy.html>
43. Introduction à la spectroscopie Infrarouge (I.R.) [Internet]. *CultureSciences-Chimie.* [cité 22 sept 2021]. Disponible sur: <https://culturesciences.chimie.ens.fr/thematiques/chimie-analytique/spectroscopies/introduction-a-la-spectroscopie-infrarouge-ir>
44. Campanella B, Palleschi V, Legnaioli S. Introduction to vibrational spectroscopies. *ChemTexts.* mars 2021;7(1):5.
45. Fig. 1. Schematic representation of an ATR-FTIR system. The infrared... [Internet]. *ResearchGate.* [cité 23 sept 2021]. Disponible sur: https://www.researchgate.net/figure/Schematic-representation-of-an-ATR-FTIR-system-The-infrared-beam-passes-through-the-ATR_fig1_275021699
46. Infrared Spectroscopy [Internet]. [cité 23 sept 2021]. Disponible sur: <https://www2.chemistry.msu.edu/faculty/reusch/virttxtjml/spectrpy/infrared/infrared.htm>
47. Picton L, Le Cerf D. Chromatographie d'exclusion stérique multi-détection Détermination des grandeurs macromoléculaires. *L'actualité chimique.* 2017;(422-423).
48. Knol WC, Pirok BWJ, Peters RAH. Detection challenges in quantitative polymer analysis by liquid chromatography. *Journal of Separation Science.* 2021;44(1):63-87.
49. Determination of dn/dc [Internet]. *Wyatt Technology.* 2019 [cité 21 août 2021]. Disponible sur: <https://www.wyatt.com/library/application-notes/determination-of-dn-dc.html>
50. Zhou Z, Janco M, Cong R, Lee D, Shan CLP, Boopalachandran P, et al. Simultaneous measurement of the molecular weight distribution and 5-ethylidene-2-norbornene content

across the molecular weight distribution of ethylene-propylene-diene terpolymer via a new size exclusion chromatography-ultraviolet-refractive index method. *J Appl Polym Sci* [Internet]. 10 oct 2016 [cité 2 juin 2021];133(38). Disponible sur: <http://doi.wiley.com/10.1002/app.43911>

51. Wyatt PJ. Multiangle Light Scattering: The Basic Tool for Macromolecular Characterization. *Instrumentation Science & Technology*. févr 1997;25(1):1-18.

52. Malvern Panalytical. Size Exclusion chromatography – when to use MALS or MALLS ? [Internet]. *Materials Talks*. 2014 [cité 21 août 2021]. Disponible sur: <https://www.materials-talks.com/blog/2014/05/27/size-exclusion-chromatography-when-to-use-mals/>

53. MALS | Multi Angle Light Scattering | SEC-MALS | Malvern Panalytical [Internet]. [cité 21 août 2021]. Disponible sur: <https://www.malvernpanalytical.com/fr/products/technology/light-scattering/multi-angle-light-scattering>

54. Yu Y, DesLauriers PJ, Rohlffing DC. SEC-MALS method for the determination of long-chain branching and long-chain branching distribution in polyethylene. *Polymer*. 27 juin 2005;46(14):5165-82.

55. Louis Houde. Régression linéaire simple [Internet]. 2014 [cité 4 oct 2021]. Disponible sur: <https://oraprdnt.uqtr.quebec.ca/Gscdepot/paf1010/19/M13.pdf>

56. 4.15: NMR in Lab- Composition of Mixtures [Internet]. *Chemistry LibreTexts*. 2019 [cité 27 août 2021]. Disponible sur: [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/General_Chemistry/Book%3A_Structure_and_Reactivity_in_Organic_Biological_and_Inorganic_Chemistry_\(Schaller\)/II%3A_Practical_Aspects_of_Structure_-_Purification_and_Spectroscopy/04%3A_Nuclear_Magnetic_Resonance_Spectroscopy/4.15%3A_NMR_in_Lab-Composition_of_Mixtures](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/General_Chemistry/Book%3A_Structure_and_Reactivity_in_Organic_Biological_and_Inorganic_Chemistry_(Schaller)/II%3A_Practical_Aspects_of_Structure_-_Purification_and_Spectroscopy/04%3A_Nuclear_Magnetic_Resonance_Spectroscopy/4.15%3A_NMR_in_Lab-Composition_of_Mixtures)

57. Dexamethasone(50-02-2) 1H NMR [Internet]. [cité 23 juill 2021]. Disponible sur: https://www.chemicalbook.com/SpectrumEN_50-02-2_1HNMR.htm

58. Singh G, Kaur T, Kaur R, Kaur A. Recent biomedical applications and patents on biodegradable polymer- PLGA. 2014;14.

59. NMR Spectroscopy :: 13C NMR Chemical Shifts [Internet]. [cité 20 sept 2021]. Disponible sur: https://organicchemistrydata.org/hansreich/resources/nmr/?index=nmr_index%2F13C_shift

ANNEXE I : Courbe de calibration et du bimatoprost, dexaméthasone et rispéridone et validation statistique de la régression linéaire

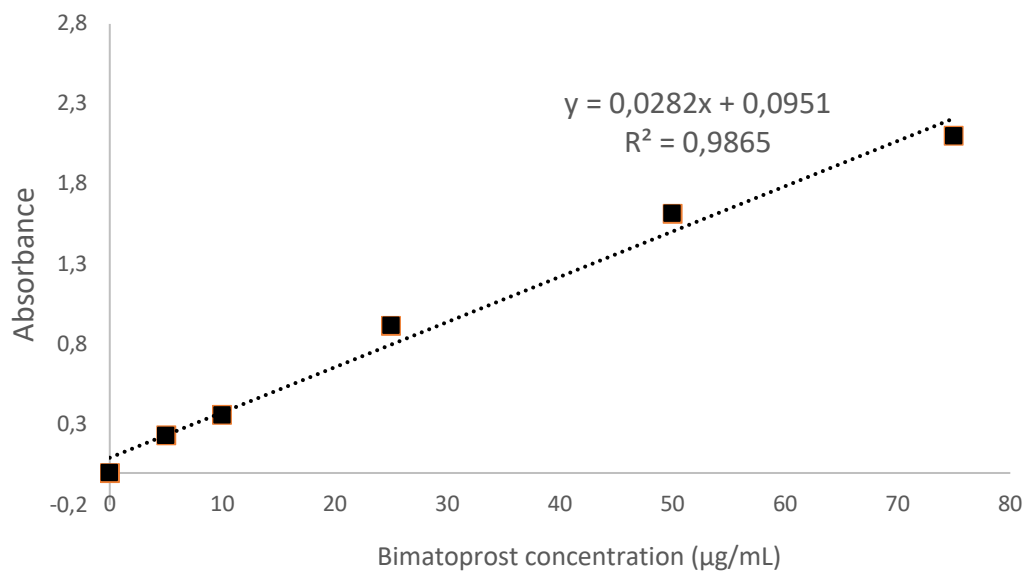


Figure 54: Courbe de calibration du bimatoprost (Tampon phosphate pH 7.2)

Table 1: Résultats du test statistique de régression linéaire pour la calibration du bimatoprost

Statistical parameter	t-values	Test conditions
t_0	2,570581836	-
t_a	17,09146352	Respected
t_b	1,498603659	Respected
R^2	0,986491877	Respected

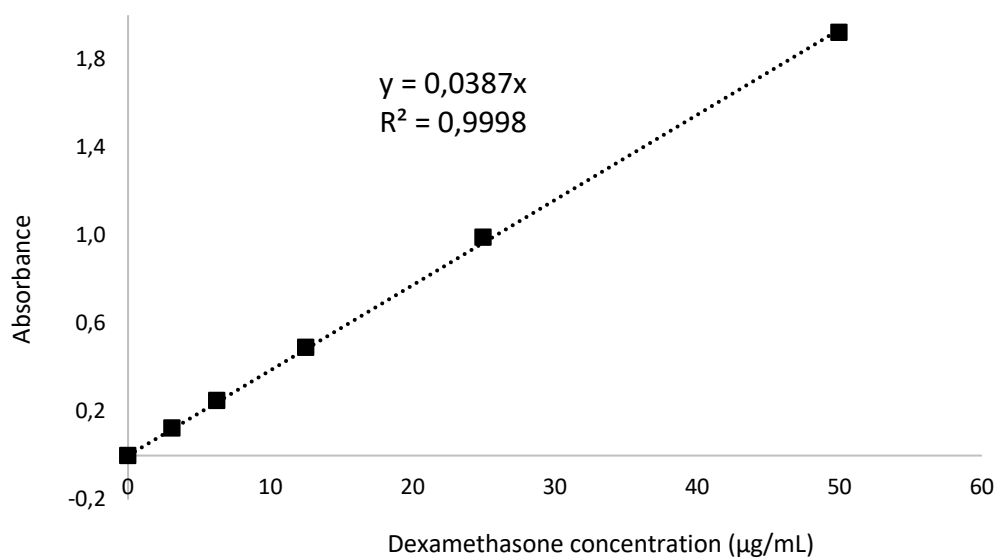


Figure 55: Courbe de calibration de la dexaméthasone (NaCl 0,9%)

Table 2: Résultats du test statistique de régression linéaire pour la calibration de la dexaméthasone

Statistical parameter	t-values	Test conditions
t_0	2,570581836	-
t_a	132,1799508	Respected
t_b	1,003568314	Respected
R^2	0,999771109	Respected

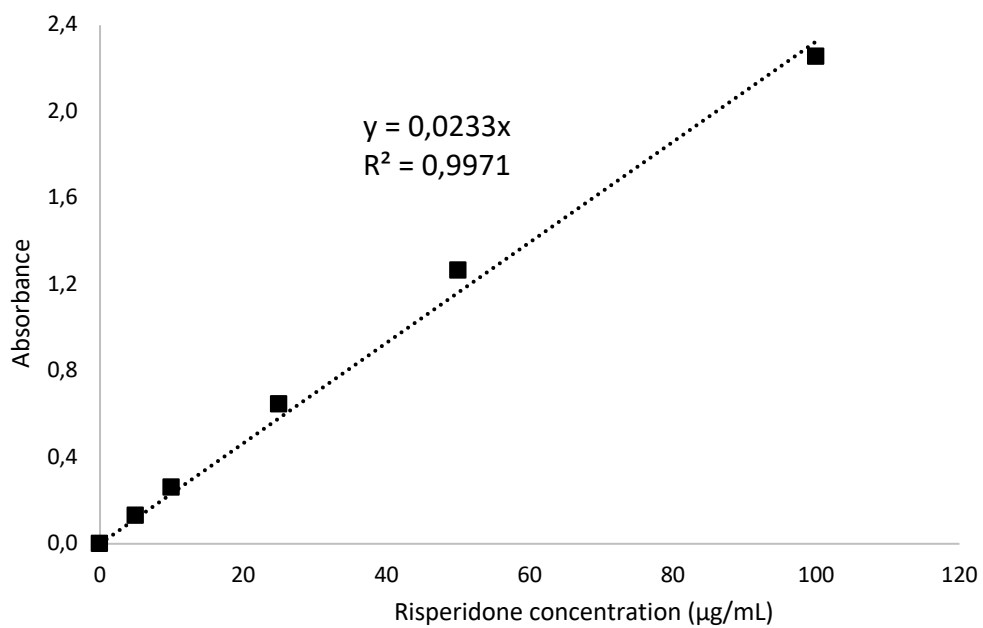
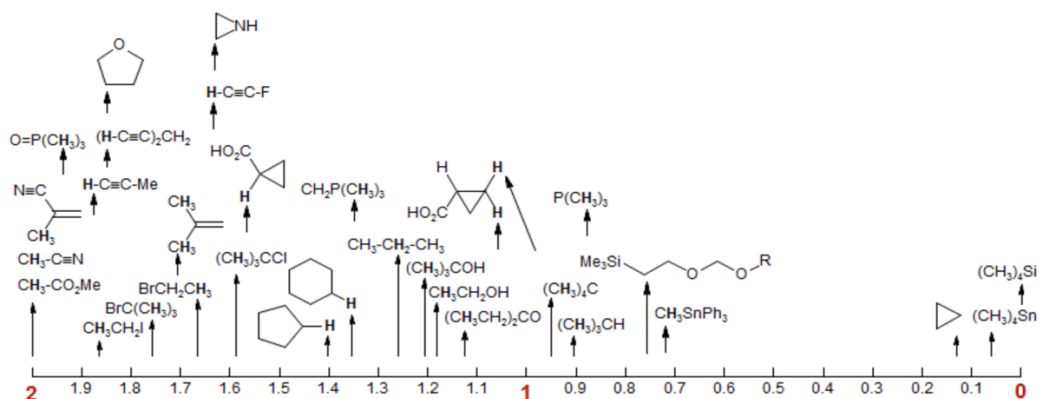


Figure 56: Courbe de calibration de la rispéridone (Tampon phosphate pH 7.4)

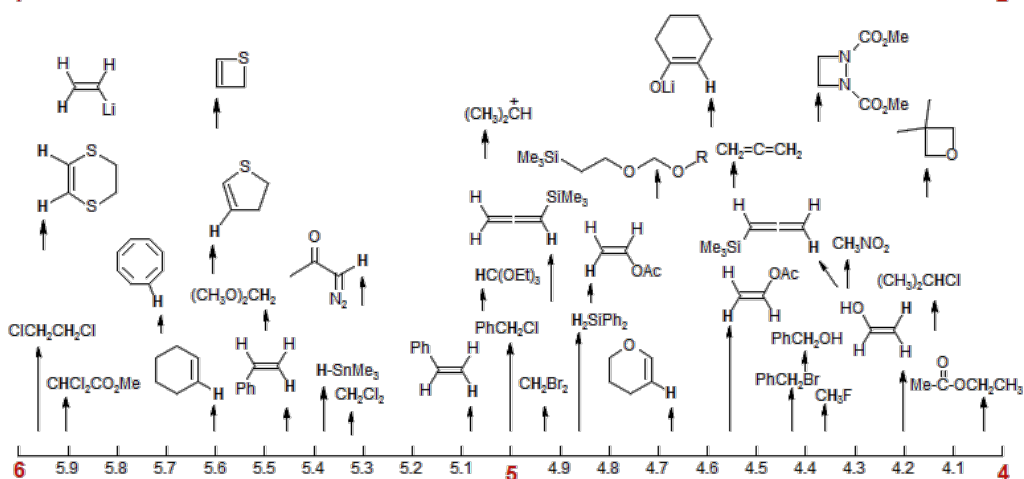
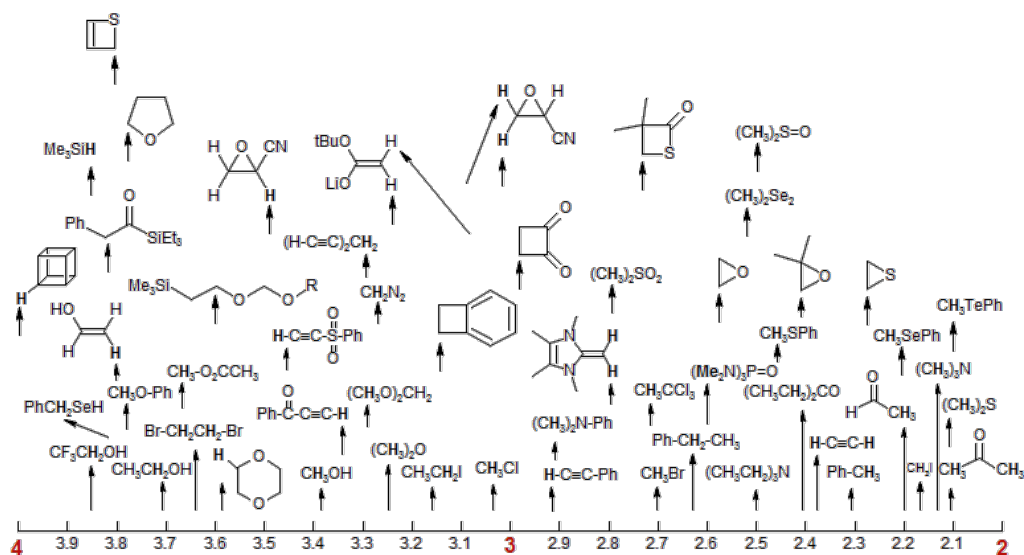
Table 3: Résultats du test statistique de régression linéaire pour la calibration de la rispéridone

Statistical parameter	t-values	Test conditions
t_0	2,776445105	-
t_a	27,25672452	Respected
t_b	1,46149718	Respected
R^2	0,99597817	Respected

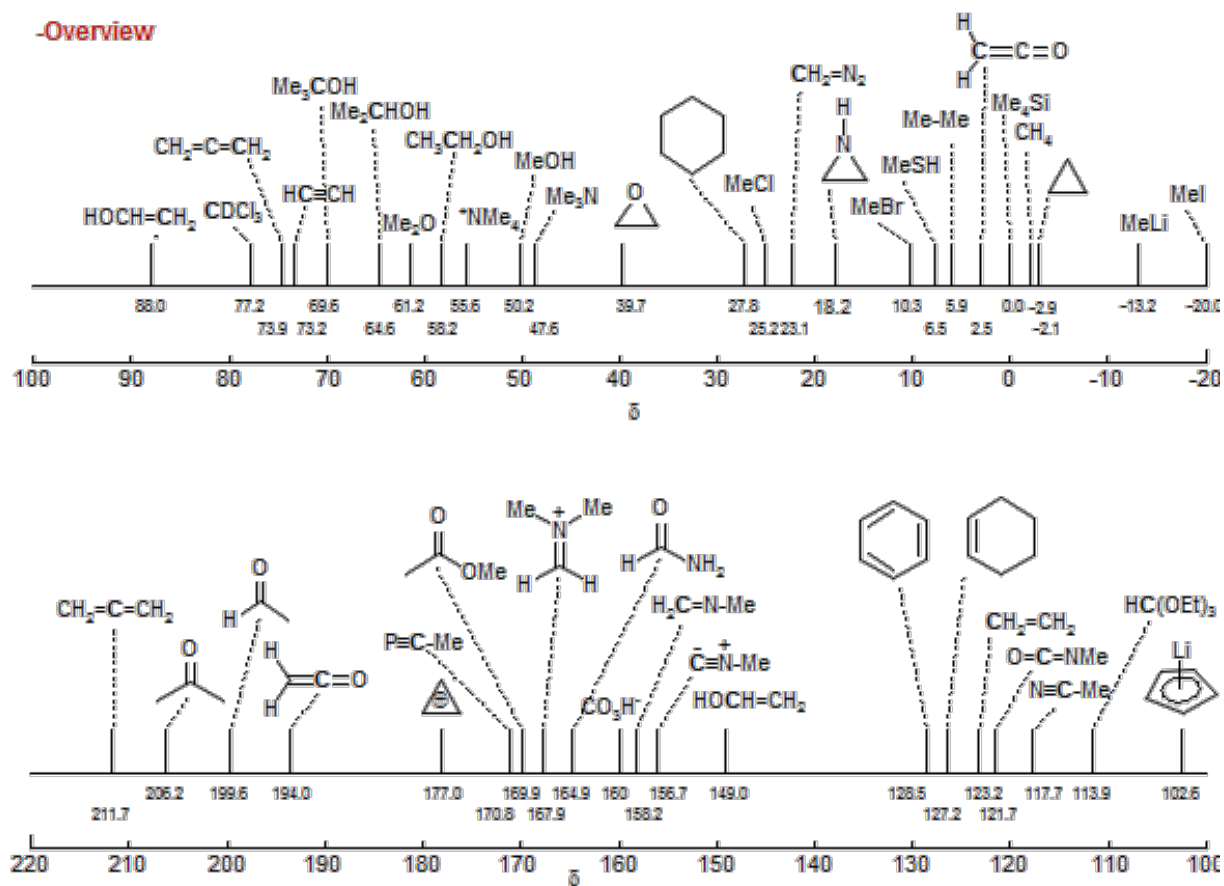
ANNEXE II : Table des déplacements chimiques du ^1H en RMN (59)



-Shift Table 2: δ 2 to 6



ANNEXE III : Table des déplacements chimiques du ^{13}C en RMN (59)



SERMENT DE GALIEN

Serment de Galien

En présence des maîtres de la faculté, des conseillers de l'Ordre des pharmaciens et de mes condisciples, je jure :

-D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;

-D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;

-De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.



RÉSUMÉ

Un traitement médicamenteux basé sur la prise répétée de comprimés peut conduire à des problèmes de toxicité ou d'effets indésirables. Afin d'améliorer le rapport bénéfice/risque du traitement ainsi que l'observance du patient, des traitements à action prolongée sont mis en place. Le PLGA est un polymère biodégradable utilisé en tant que système innovant d'administration de médicaments. L'utilisation d'implants biodégradables en tant que produit pharmaceutique permet une libération contrôlée de la molécule au niveau de son site d'action. Des implants à base de PLGA et PEG-PLGA ont été préparés avec 3 molécules thérapeutiques, le bimatoprost, la dexaméthasone et la rispéridone. Les tests de dissolution ont permis d'obtenir des profils de libération du médicament en fonction du type de polymère et de la concentration du médicament. Dans la plupart des cas, le PLGA pégylé a fourni une libération initiale plus intense, mais a semblé entraîner une vitesse de libération du médicament globalement plus lente. Les implants et les polymères ont été caractérisés par spectroscopie RMN et FTIR. L'étude montre la possibilité de déterminer, grâce à la RMN du carbone et du proton, le ratio entre les unités lactiques et glycoliques au sein du polymère, ainsi que le ratio entre le polymère et le médicament dans un implant. La RMN a également permis de discerner deux grades de PLGA en mélange et d'identifier le groupe terminal du polymère PLGA. La FTIR ne permet pas de différencier des polymères PLGA et PEG-PLGA, cependant, cette technique peut être appliquée aux implants médicamenteux. L'étude des profils de dissolution des implants de PEG-PLGA avec de nombreux principes actifs permettrait d'obtenir des modèles de prédiction du profil de libération de principe actif en fonction de la nature physico-chimique de ces derniers.

Mots-clés :

- PLGA
- PEG-PLGA
- RMN
- Implant
- Biodégradable