



Université Salah Bounider-Constantine 3

Faculté de Génie des Procédés

Département de Génie Pharmaceutique

**DEVELOPPEMENT DES NANOPARTICULES
ET MICROPARTICULES POREUSES DE DICLOFENAC SODIQUE POUR UNE
LIBERATION PROLONGEE**

THESE

Présentée pour l'Obtention du Diplôme de Doctorat es-Sciences en Génie Pharmaceutique

Par

Fatima Zohra BADAOUI

Année Universitaire

2020-2021



Université Salah Bounider-Constantine 3

Faculté de Génie des Procédés

Département de Génie Pharmaceutique

N° de Série :

N° d'Ordre :

**DEVELOPPEMENT DES NANOPARTICULES ET MICROPARTICULES
POREUSES DE DICLOFENAC SODIQUE POUR UNE LIBERATION PROLONGEE**

THESE

Présentée pour l'Obtention du Diplôme de Doctorat es-Sciences en Génie Pharmaceutique

Par

Fatima Zohra BADAoui

Devant le Jury Composé de :

Rihab BOUSHABA	Président	Professeur	Université Constantine 3
Djallel BOUZID	Directeur	Professeur	ENPC
Meriem EL KOLLI	Examineur	Professeur	Université Sétif 1
Fouzia BELAIB	Examineur	MCA	Université Constantine 3
Lotfi BENMEKHBI	Examineur	MCA	Université Constantine 3
Ammar AZIOUNE	Examineur	MCA	CRBT

Année Universitaire

2020-2021

REMERCIEMENTS

Avant tout, je dois remercier Dieu le tout puissant qui m'a donné l'envie et la force pour mener à terme ce travail.

En premier lieu je tiens à remercier vivement mon directeur de thèse **Pr. BOUZID DJALLEL**, Professeur à l'Ecole nationale polytechnique de Constantine pour ses conseils avisés et pour la confiance qu'il m'a accordé tout au long de ma formation, ce fut un grand plaisir de travailler avec lui, qu'il trouve ici l'expression de ma plus profonde gratitude.

Je remercie évidemment **M^f. Hayoune** et **M^{elle}. Chetibi** ainsi que tous les ingénieurs de l'ENPC qui m'ont aidé dans la réalisation de la partie expérimentale en particulier : **M^{me}. Labeled hala**.

Je souhaite exprimer ici, le plaisir d'avoir travaillé avec **M^{me}. Faghmous naima**, merci pour tes conseils et ton amabilité et **Dr. Derouiche tahar**, merci pour ton aide et conseils.

Je ne peux pas passer sans remercier **M^{me}. Faatit souheila** pour sa générosité et son aide, mes amies **Dr. Boulekroune Nadjet** et **Dr. Larous Soumia** pour leur encouragement ainsi que les ingénieurs du laboratoire de la faculté de Génie des Procédés-Université Constantine 3 : **Daoud Hanane, chikhzouazi Chahra**.

Sans oublier de remercier mes chers parents **Mohamed nassereddine** et **Farida**, ma chère sœur **Kaouther**, mes chers frères **Mohamed Youcef** et **Mohamed Ibrahim**, mon cher époux **Redouane** et ma petite princesse **Zayneb Ritel**.

Je souhaite également remercier Mesdames et Messieurs les Membres du Jury qui me font l'honneur de juger ce travail.

À mon père

TABLE DES MATIERES

LISTE DES FIGURES.....	viii
LISTE DES TABLEAUX	xi
LISTE DES ABREVIATIONS.....	xiii
RESUME.....	xv
INTRODUCTION.....	1

CHAPITRE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1. Nanoparticules.....	3
1.1.1. Nanoscience et nanotechnologie.....	3
1.1.2. Nanomédecine.....	3
1.1.3. Histoire.....	4
1.1.4. Définition et applications des nanoparticules.....	7
1.1.5. Méthodes de préparation des nanoparticules.....	8
1.1.5.1. Méthode de précipitation.....	9
1.1.5.2. Méthode de broyage.....	10
1.1.5.3. Méthode de relargage.....	11
1.1.5.4. Méthode de dialyse.....	12
1.1.5.5. Méthode d'émulsion-évaporation du solvant.....	13
1.1.5.6. Méthode d'émulsion-diffusion du solvant.....	14
1.1.5.7. Méthode de coacervation ou de gélification ionique.....	15
1.1.5.8. Méthode des fluides supercritiques.....	16
1.1.5.9. Méthode de polymérisation.....	17
1.1.6. Caractérisation des nanoparticules.....	19
1.1.6.1. Taille et morphologie.....	20
1.1.6.2. Charge de surface.....	22
1.1.6.3. Compatibilité et interactions.....	22
1.1.6.4. Efficacité d'encapsulation.....	23
1.1.6.5. Libération du médicament <i>in vitro</i>	24
1.2. Microsponges.....	24
1.2.1. Microencapsulation.....	24
1.2.2. Microparticules.....	24
1.2.3. Définition et applications des microsponges.....	25
1.2.4. Méthodes de préparation des microsponges.....	26
1.2.4.1. Méthode de polymérisation en suspension liquide-liquide.....	26
1.2.4.2. Méthode de quasi émulsion-diffusion de solvant.....	26
1.2.5. Caractérisation des microsponges.....	27
1.2.5.1. Densité.....	28
1.2.5.2. Structure des pores.....	28
1.3. Systèmes de délivrance de médicaments à libération modifiée.....	28
1.4. Diclofenac sodium.....	30
1.4.1. Mécanisme d'action	30
1.4.2. Systèmes de délivrance de Diclofenac sodique à libération prolongée..	31
1.4.2.1. Vectorisation à travers les nanoparticules.....	31
1.4.2.2. Vectorisation à travers les microparticules.....	32

1.5. Stratégies d'optimisation par les plans d'expériences.....	33
1.5.1. Espace expérimental.....	34
1.5.2. Domaine du facteur.....	34
1.5.3. Points expérimentaux.....	35
1.5.4. Domaine d'étude.....	35
1.5.5. Surface de réponse.....	36
1.5.6. Modèles de criblage.....	36
1.5.7. Modèles de surface de réponse.....	37
1.5.8. Analyse statistique.....	37
1.5.9. Analyse graphique.....	39

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

2.1. Matériel.....	41
2.1.1. Produits.....	41
2.1.1.1. Diclofenac sodique.....	41
2.1.1.2. Ethylcellulose.....	41
2.1.1.3. Alcool polyvinylique.....	42
2.1.2. Appareillages.....	43
2.2. Méthodes.....	43
2.2.1. Validation de la méthode d'analyse UV-visible.....	43
2.2.1.1. Préparations de la solution mère.....	44
2.2.1.2. Spécificité.....	44
2.2.1.3. Linéarité.....	44
2.2.1.4. Précision.....	44
2.2.1.5. Limite de détection et de quantification.....	44
2.2.2. Nanoparticules polymériques de diclofenac sodique.....	45
2.2.2.1. Préparation.....	45
2.2.2.2. Criblage des facteurs influençant par un plan factoriel complet.....	45
2.2.2.3. Optimisation par un plan composite centré.....	47
2.2.2.4. Caractérisation.....	49
2.2.3. Microsponges de diclofenac sodique.....	52
2.2.3.1. Préparation.....	52
2.2.3.2. Criblage des facteurs influençant par un plan factoriel complet.....	53
2.2.3.3. Optimisation par un plan composite centré.....	54
2.2.3.4. Caractérisation.....	55

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

3.1. Validation de la méthode d'analyse du diclofenac sodique.....	57
3.1.1. Spécificité.....	57
3.1.2. Linéarité.....	57
3.1.3. Précision.....	58
3.1.4. Limite de détection et de quantification.....	58
3.2. Nanoparticules polymériques de diclofenac sodique.....	58
3.2.1. Criblage par un plan factoriel complet.....	58
3.2.1.1. Analyse graphique.....	59

3.2.1.2. Analyse statistique.....	62
3.2.1.3. Discussion.....	65
3.2.2. Optimisation par le plan composite centré.....	67
3.2.2.1. Analyse statistique.....	68
3.2.2.2. Analyse graphique.....	71
3.2.3. Détermination de la formulation optimale.....	77
3.2.4. Caractérisation des nanoparticules.....	78
3.2.4.1. Taille et forme des nanoparticules.....	78
3.2.4.2. FTIR.....	78
3.2.4.3. DSC.....	80
3.2.4.4. Dissolution <i>in vitro</i>	80
3.2.4.5. Test HET-CAM.....	83
3.3. Microsponges de diclofenac sodique.....	86
3.3.1. Criblage par un plan factoriel complet	86
3.3.1.1. Analyse graphique.....	86
3.3.1.2. Analyse statistique.....	89
3.3.1.3. Discussion.....	92
3.3.2. Optimisation par le plan composite centré.....	93
3.3.2.1. Analyse statistique.....	93
3.3.2.2. Analyse graphique.....	95
3.3.3. Détermination de la formulation optimale.....	98
3.3.4. Caractérisation des nanoparticules.....	99
3.3.4.1. Taille et forme des nanoparticules.....	99
3.3.4.2. FTIR.....	100
3.3.4.3. Dissolution <i>in vitro</i>	101
CONCLUSION	104
BIBLIOGRAPHIE.....	106
ANNEXE A	
ANNEXE B	
ANNEXE C	

LISTE DES FIGURES

Figure		Page
1.1	Méthode de nanoprécipitation pour la préparation des nanoparticules polymériques.....	10
1.2	Méthode de relargage pour la préparation des nanoparticules polymériques.....	12
1.3	Méthode de dialyse pour la préparation des nanoparticules polymériques.....	13
1.4	Méthode d'émulsion-évaporation du solvant pour la préparation des nanoparticules polymériques.....	14
1.5	Méthode d'émulsion-diffusion du solvant pour la préparation des nanoparticules polymériques.....	15
1.6	Méthode de coacervation pour la préparation des nanoparticules polymériques.....	16
1.7	Méthode de polymérisation pour la préparation des nanoparticules polymériques.....	18
1.8	Image des microsponges par microscope électronique à transmission.....	25
1.9	Méthode d'émulsion-diffusion du solvant pour la préparation des microsponges.....	27
1.10	Mécanismes de libération contrôlée à partir des nanoparticules.....	29
1.11	Espace expérimental.....	34
1.12	Domaine du facteur.....	35
1.13	Point expérimental.....	35
1.14	Domaine d'étude.....	36
1.15	Surface de réponse.....	36
1.16	Surface de réponse à trois dimensions.....	39
1.17	Courbe iso-réponse.....	40
2.1	Structure chimique du Diclofenac Sodique.....	41
2.2	Structure chimique de l'éthyl cellulose.....	42
2.3	Structure chimique de l'alcool polyvinylique.....	42
2.4	Schéma représentatif de la méthode de préparation des nanoparticules.....	45
2.5	Schéma représentatif de la méthode de préparation des nanoparticules.....	53
3.1	Spectre UV-visible du Diclofenac Sodique.....	57
3.2	Courbe de calibration du Diclofenac Sodique.....	57
3.3	Effets principaux du taux d'efficacité d'encapsulation des nanoparticules.....	60
3.4	Effets principaux de la taille des nanoparticules.....	60
3.5	Effets des interactions du taux d'efficacité d'encapsulation des nanoparticules.....	61
3.6	Effets des interactions de la taille des nanoparticules.....	62
3.7	Représentation tridimensionnelle des effets du ratio massique et concentration du PVA (A) ratio massique et vitesse	

	d'homogénéisation (B) concentration du PVA et vitesse d'homogénéisation (C) sur le taux d'efficacité d'encapsulation des nanoparticules.....	72
3.8	Représentation d'effets ratio massique et concentration du PVA (A) ratio massique et vitesse d'homogénéisation (B) concentration du PVA et vitesse d'homogénéisation (C) sur le taux d'efficacité d'encapsulation des nanoparticules par une courbe iso-réponse.....	73
3.9	Représentation tridimensionnelle des effets du ratio massique et concentration du PVA (A) ratio massique et vitesse d'homogénéisation (B) concentration du PVA et vitesse d'homogénéisation (C) sur la taille des nanoparticules.....	75
3.10	Représentation d'effets ratio massique et concentration du PVA (A) ratio massique et vitesse d'homogénéisation (B) concentration du PVA et vitesse d'homogénéisation (C) sur la taille des nanoparticules par une courbe iso-réponse.....	76
3.11	Niveaux optimaux des facteurs et réponses des nanoparticules.....	77
3.12	Image MEB de la poudre de la formulation optimale des nanoparticules du Diclofenac Sodique.....	78
3.13	Spectres FTIR des poudres de (A) Diclofenac Sodique, (B) ethylcellulose, (C) formulation optimale des nanoparticules de Diclofenac Sodique.....	79
3.14	Thermogrammes DSC des poudres de Diclofenac Sodique (A), Ethylcellulose (B), formulation optimale des nanoparticules de Diclofenac Sodique (C).....	80
3.15	Profil de dissolution du Diclofenac Sodique de la formulation optimale des nanoparticules dans un milieu PBS (pH =7.4) a 37 °C..	81
3.16	Cinétique de libération du diclofenac sodique à partir de la formulation optimale des nanoparticules.....	82
3.17	Résultats du test HET-CAM (A) nanoparticules polymériques de diclofenac sodique, (B) Dicloced [®] , (C) NaOH 0.1N, (D) NaCl 0.9%	85
3.18	Effets principaux du taux d'efficacité d'encapsulation des microsponges.....	87
3.19	Effets principaux du rendement de production des microsponges.....	87
3.20	Effets des interactions sur le taux d'efficacité d'encapsulation des microsponges.....	88
3.21	Effets des interactions sur le rendement de production des microsponges.....	89
3.22	Représentation tridimensionnelle des effets du ratio massique et concentration du PVA sur le taux d'efficacité d'encapsulation des microsponges.....	96
3.23	Représentation d'effets ratio massique et concentration du PVA sur le taux d'efficacité d'encapsulation des microsponges par une courbe iso-réponse.....	96
3.24	Représentation tridimensionnelle des effets du ratio massique et concentration du PVA sur le rendement de production des microsponges.....	97

3.25	Représentation d'effets ratio massique et concentration du PVA sur le rendement de production des microsponges par une courbe iso-réponse.....	98
3.26	Niveaux optimaux des facteurs et réponses des microsponges.....	99
3.27	Observation microscopique de la poudre de la formulation optimale des microsponges du Diclofenac Sodique.....	100
3.28	Spectres FTIR des poudres de (DC) Diclofenac Sodique, (EC) éthylcellulose, (MP) formulation optimale des microsponges de Diclofenac Sodique.....	101
3.29	Profil de dissolution du Diclofenac Sodique de la formulation optimale des microsponges dans un milieu PBS (pH =5.8) a 32 °C...	102
3.30	Cinétique de libération du diclofenac sodique à partir de la formulation optimale des microsponges.....	103

LISTE DES TABLEAUX

Tableau		Page
1.1	Produits commercialisés à base de nanoparticules.....	6
1.2	Méthodes de caractérisation des nanoparticules.....	19
1.3	Table d'ANOVA.....	38
2.1	Niveaux des facteurs du plan factoriel complet des nanoparticules...	45
2.2	Matrice d'expérience du plan factoriel complet des nanoparticules...	45
2.3	Niveaux des facteurs du plan composite centré des nanoparticules...	46
2.4	Matrice d'expérience du plan composite centré des nanoparticules...	46
2.5	Limites inférieures et supérieures de réponses des nanoparticules...	47
2.6	Scores des phénomènes observés pour le test HET-CAM.....	51
2.7	Classification des scores d'irritation pour le test HET-CAM.....	52
2.8	Niveaux des facteurs du plan factoriel complet des microsponges....	53
2.9	Matrice d'expérience du plan factoriel complet des microsponges....	54
2.10	Niveaux des facteurs du plan composite centré des microsponges....	54
2.11	Matrice d'expérience du plan composite centré des microsponges....	55
2.12	Limites inférieures et supérieures de réponses des microsponges....	55
3.1	Valeurs de la répétabilité et la fidélité (précision).....	58
3.2	Limite de détection et de quantification.....	58
3.3	Résultats du plan factoriel complet des nanoparticules.....	59
3.4	Table d'estimation des effets de criblage du taux d'efficacité d'encapsulation (avec interactions).....	62
3.5	Table d'estimation des effets de criblage du taux d'efficacité d'encapsulation des nanoparticules (sans interactions).....	63
3.6	Table d'ANOVA criblage du taux d'efficacité d'encapsulation des nanoparticules.....	64
3.7	Table d'estimation des effets de criblage de la taille des nanoparticules.....	64
3.8	Table d'ANOVA criblage de la taille des nanoparticules.....	65
3.9	Résultats du plan composite centré des nanoparticules.....	67
3.10	Table d'estimation des effets d'optimisation du taux d'efficacité d'encapsulation (avec interactions).....	68
3.11	Table d'estimation des effets d'optimisation du taux d'efficacité d'encapsulation des nanoparticules (sans interactions).....	69
3.12	Table d'ANOVA optimisation du taux d'efficacité d'encapsulation des nanoparticules.....	69
3.13	Table d'estimation des effets d'optimisation de la taille des nanoparticules (avec interactions).....	70
3.14	Table d'estimation des effets d'optimisation de la taille des nanoparticules (sans interactions).....	70
3.15	Table d'ANOVA optimisation de la taille des nanoparticules.....	71
3.16	Valeurs observées et prévues de la formulation optimale des nanoparticules de Diclofenac Sodique.....	77
3.17	Résultats des scores d'irritation des préparations testées par le test HET-CAM.....	83

3.18	Résultats du plan factoriel complet des microsponges.....	86
3.19	Table d'estimation des effets de criblage du taux d'efficacité d'encapsulation des microsponges (avec interactions).....	89
3.20	Table d'estimation des effets de criblage du taux d'efficacité d'encapsulation des microsponges (sans interactions).....	90
3.21	Table d'ANOVA criblage du taux d'efficacité d'encapsulation des microsponges.....	91
3.22	Table d'estimation des effets de criblage du rendement de production des microsponges.....	91
3.23	Table d'ANOVA criblage du rendement de production des microsponges.....	92
3.24	Résultats du plan composite centré des microsponges.....	93
3.25	Table d'estimation des effets d'optimisation du taux d'efficacité d'encapsulation des microsponges.....	94
3.26	Table d'ANOVA optimisation du taux d'efficacité d'encapsulation des microsponges.....	94
3.27	Table d'estimation des effets d'optimisation du rendement de production des microsponges.....	95
3.28	Table d'ANOVA optimisation du rendement de production des microsponges.....	95
3.29	Valeurs observées et prévues de l'optimum des microsponges.....	99

LISTE DES ABREVIATIONS

A : absorbance
 AFM : microscope à force atomique
 AINS : anti-inflammatoires non stéroïdiens
 ANOVA : analyse de variance
 C : concentration
 CAM : membrane chorioallantoïque
 CCD : plan composite centré
 CM : carré moyen
 CMM : carré moyen du modèle
 CMR : carré moyen des résidus
 CMT : carré moyen total
 CMC : carboxyméthylcellulose
 COX : cyclooxygénase
 DC : diclofenac sodique
 ddl : degré de liberté
 DLS : diffusion dynamique de la lumière
 DSC : calorimétrie différentielle à balayage
 EC : éthylcellulose
 EE : efficacité d'encapsulation
 E/H : eau/huile
 E/H/E : eau/huile/eau
 ESD : émulsion-diffusion du solvant
 F_{cri} : F critique
 F_{obs} : F observé
 FTIR : infra-rouge à transformée de fourier
 H/E/H : huile/eau/huile
 LOD : limite de détection
 LOQ : limite de quantification
 MEB : microscope électronique à balayage
 MP : microsporges
 NIH : institut national américain de la santé
 NP : nanoparticules
 PBS : tampon phosphate salin
 PCL : polycaprolactone
 PCS : spectroscopie à corrélation de photons
 PEX : plans d'expériences
 PG : prostaglandines
 PLA : acide polylactique
 PLGA : acide polylactique co-glycolique
 PVA : alcool polyvinylique
 RY : rendement de production
 R^2 : coefficient de régression
 R^2_{ajus} : coefficient de régression ajusté
 RSD : écart type résiduel
 S : pente (slope)

SC : somme des carrés des écarts
SCF : fluides supercritiques
SCT : somme des carrés totale
SCM : somme des carrés du modèle
SCR : somme des carrés des résidus
SE : erreur standard
 t_{crit} : t critique
TEM : microscope électronique à transmission
TXA2 : thromboxane A2

RESUME

Certaines formes pharmaceutiques conventionnelles présentent des limites thérapeutiques dues à une insuffisance pharmacocinétique, cela est particulièrement vérifiable pour le diclofenac sodique (DC), qui est un principe actif à courte demi-vie et donc nécessite une administration fréquente. Dans l'objectif d'une administration moins contraignante, une diminution des effets secondaires, une amélioration de l'efficacité, et une libération uniforme du principe actif, des formes à libération prolongée ont été développées. Le but de ce travail est de formuler à l'aide des plans d'expériences des nanoparticules polymériques et des microsponges de DC en utilisant l'éthylcellulose (EC) comme polymère dans l'objectif de prolonger sa libération. Les nanoparticules polymériques de DC ont été préparées par la méthode d'émulsion-évaporation du solvant. Les microsponges de DC ont été préparées par la méthode de quasi émulsion-diffusion du solvant (ESD). L'influence des facteurs qui sont: ratio massique EC/DC, concentration du PVA, vitesse d'homogénéisation, durée d'homogénéisation sur le taux d'efficacité d'encapsulation (EE), et la taille des nanoparticules a été étudié en utilisant un plan factoriel complet. Le plan composite centré (CCD) a été utilisé pour déterminer la zone de formulation optimale. Les mêmes plans ont été utilisés pour la formulation des microsponges. Le ratio massique EC/DC, la concentration du PVA, la vitesse d'agitation ont été les facteurs à étudier, le taux d'efficacité d'encapsulation (EE) et le rendement de production (RY) étaient les réponses ciblées. La forme, la taille, l'inertie du DC vis-à-vis du polymère encapsulant et la libération *in vitro* ont été caractérisées pour les deux formulations. Les nanoparticules optimisées présentent une taille moyenne de 226.83 nm, un EE de 49.09 % et une libération prolongée du DC par un mécanisme de diffusion fickienne régi par une cinétique de libération de Korsmeyer-Peppas à des niveaux de facteurs : ratio massique de 73.66%, concentration du PVA de 0.56% et vitesse de 9220 rpm. Les nanoparticules de DC formulées présentent une irritation modérée d'après le test HET-CAM. Elles présentent une forme sphérique et ne présentent aucune interaction entre l'EC et le DC. Les microsponges optimisées présentent un EE de 31.02 %, un RY de 66.44%, et une libération prolongée du DC suivant le modèle d'Higuchi à des niveaux de facteurs : ratio massique de 79.08%, et concentration du PVA de 0.47%. Les microsponges de DC présentent une forme sphérique avec une taille de $9.21 \pm 0.3 \mu\text{m}$.

Mots clés : Diclofenac sodique, nanoparticules polymériques, microsponges, libération prolongée, plans d'expériences.

ABSTRACT

Certain conventional pharmaceutical forms have therapeutic limits due to pharmacokinetic insufficiency, this is particularly verifiable for diclofenac sodium (DC), which is an active ingredient with a short half-life and therefore, requires its frequent administration. In order to obtain a best administration, to reduce side effects, to improve the efficiency, and to uniform the drug release, extended-release forms have been developed.

The aim of this work is to formulate, using experimental designs, polymeric nanoparticles and microsponges of DC using ethyl cellulose (EC) as a polymer to extend its release.

The polymeric DC nanoparticles were prepared by the solvent emulsion-evaporation method. DC microsponges were prepared by the quasi emulsion-diffusion solvent (ESD) method. The influence of the factors: EC/DC mass ratio, PVA concentration, homogenization rate, homogenization time on the responses: entrapment efficiency (EE), and nanoparticles size was studied using a full factorial design. The central composite design (CCD) was used to determine the optimal formulation area. The same designs were used for the microsponges. EC/DC mass ratio, PVA concentration, stirring speed was the factors to be studied, entrapment efficiency (EE) and production yield (RY) were the responses targeted. The shape, size, inertia of the DC with respect to the polymer and *in vitro* release were characterized for both formulations.

The optimized nanoparticles have an average size of 226.83 nm, an EE of 49.09% and an extended-release of DC by a fickian diffusion mechanism governed by Korsmeyer-Peppas release kinetics at factor levels: mass ratio of 73.66%, PVA concentration of 0.56% and speed of 9220 rpm. The formulated DC nanoparticles show a moderate irritation according to the HET-CAM test. They have a spherical shape and show no interaction between EC and DC. The optimized microsponges have an EE of 31.02%, a RY of 66.44%, and a sustained release of DC according to the Higuchi model at factor levels: mass ratio of 79.08%, and PVA concentration of 0.47%. DC microsponges have a spherical shape with a size of $9.21 \pm 0.3 \mu\text{m}$.

Keywords: Diclofenac sodium, polymeric nanoparticles, microsponges, extended-release, design of experiment.

الملخص

بعض الأشكال الصيدلانية المتداولة لها حدود علاجية بسبب قصور الحركية الدوائية، نخص بالذكر الديكلوفيناك صوديوم الذي يتميز بعمر نصفي، و الذي يتوجب أخذه عدة مرات باليوم. لتقليل الآثار الجانبية، تحسين الفعالية وتحرير المكون الفعال بطريقة منتظمة، وجب تطوير أشكال صيدلانية ذات تحرير طويل المدى.

الهدف من هذا العمل هو صياغة جسيمات نانوية وإسفنجات ميكروسكوبية للديكلوفيناك صوديوم باستعمال تصاميم التجارب من أجل تحرير طويل المدى.

الجسيمات النانوية تم تحضيرها بطريقة تبخر المذيب في المستحلب. و حضرت الاسفنجات الميكروسكوبية بطريقة انتشار المذيب على شبه المستحلب.

تم دراسة تأثير العوامل بالنسبة الكتلية بين الديكلوفيناك صوديوم والايثيلسيلولوز، تركيز الكحولالبوليفينيلي، معدل وزمان التجانس على نسبة التغليف، وحجم الجسيمات النانوية باستعمال التصميم العاملي الكامل.

التصميم المركب المركزي استعمل لتحديد المنطقة الأمثل للصياغة. بالنسبة للأسفنجات الميكروسكوبية استعملت نفس التصاميم. النسبة الكتلية بين الديكلوفيناك صوديوم و الايثيلسيلولوز، تركيز الكحول البوليفينيلي، وسرعة التحريك كانت هي العوامل المدروسة تأثيرها على نسبة التغليف و المردود. بالإضافة إلى دراسة الحجم والشكل والتوافق بينالديكلوفيناك صوديوم والايثيل سيلولوز بالنسبة للصياغتين.

أظهرت الجسيمات النانوية حجما متوسطا ذو 226.83 نانومتر ونسبة تغليف ذات 49.09% بالإضافة الى تحرير مطول للديكلوفيناك صوديوم باتباع الانتشار الفيكياني هاته النتائج ظهرت بتطبيق مستوى العوامل الآتي: النسبة الكتلية 73.66% تركيز الكحول البوليفينيلي 0.56% ومعدل التجانس 9920 دورة في الدقيقة

أظهرت الجسيمات النانوية للديكلوفيناك صوديوم تهيأً معتدلاً. شكل الجسيمات النانوية دائري ولا تظهر أي تفاعل بين الديكلوفيناك صوديوم والايثيلسيلولوز. بالنسبة للأسفنجات الميكروسكوبية نسبة التغليف قدرت ب 31.02% والمردود 66.44% بالإضافة الى التحرير المطول للديكلوفيناك صوديوم هذا بتطبيق مستوى العوامل: النسبة الكتلية 79.08%، تركيز الكحول البوليفينيلي 0.47%

أظهرت الملاحظة المجهرية أن الاسفنجات الميكروسكوبية ذات شكل دائري وحجم يقدر ب $9.21\mu\pm 0.3$

الكلمات المفتاحية:

ديكلوفيناك صوديوم، الجسيمات النانوية، الاسفنجات الميكروسكوبية، تحرير مطول، تصاميم التجارب

INTRODUCTION GENERALE

La plupart des préparations galéniques conventionnelles, comme les comprimés, les collyres, les crèmes, et les gels à libération immédiate, présentent un grand nombre de lacunes, telles qu'une faible biodisponibilité, des effets indésirables et une certaine toxicité des principes actifs. Ainsi, la technologie de libération modifiée des médicaments représente l'un des plus importants domaines des sciences pharmaceutiques, dans le but d'améliorer l'index thérapeutique en prolongeant la libération ou en orientant la distribution vers un site spécifique (**Junqueira et Bruschi ; 2018**).

Les formes à libération prolongée ont été mises au point pour améliorer l'index thérapeutique en maintenant une concentration plasmatique constante du principe actif. Les formulations à libération prolongée, à libération modifiée sont des termes utilisés pour identifier les processus de libération de médicaments qui sont conçus pour obtenir ou prolonger l'effet thérapeutique en libérant continuellement le médicament sur une période précise après l'administration d'une dose unique (**Batra et al ; 2015**).

Parmi les systèmes de délivrance de médicaments qui présentent une libération prolongée, les nanoparticules polymériques et les microsponges. Les nanoparticules sont des particules colloïdales solides constituées de substances macromoléculaires dont la taille varie de 10 nm à 1000 nm (**Martínez et al ; 2012**). Les microsponges sont des microsphères polymériques poreuses à un diamètre compris entre 5 et 300 µm (**Maiti et al ; 2011**). Elles contrôlent et prolongent la libération du principe actif en modifiant sa distribution et ainsi son élimination suite à la modification de sa pharmacocinétique, dans le but d'augmenter son efficacité thérapeutique et réduire certains de ses effets secondaires (**Mohanraj et Chen ; 2006**).

Le diclofénac sodique est un anti-inflammatoire non stéroïdien (AINS) qui a été utilisé dans le monde entier depuis son introduction au Japon en 1974. Il est actuellement le huitième médicament le plus vendu et le plus utilisé dans le monde. Le diclofénac, un dérivé de l'acide phénylacétique, est un puissant inhibiteur de l'activité enzymatique de la cyclo-oxygénase 2 (COX-2). Il possède des propriétés analgésiques puissantes. Le diclofenac sodique possède une demi-vie courte de 1.2-1.8 h, ce qui nécessite son administration plusieurs fois par jour, cela peut induire des effets indésirables ou une inefficacité. Le diclofenac sodique est alors un bon candidat pour les formulations à libération prolongée (**Skoutakis et a ; 1988**).

L'objectif de ce travail était de formuler des nanoparticules polymériques et des microsponges de diclofenac sodique à libération prolongée pour une action locale oculaire pour les nanoparticules et dermique pour les microsponges en utilisant les plans d'expériences. Les nanoparticules polymériques ont été préparées par la méthode d'émulsion-évaporation du solvant, les microsponges ont été préparées par la méthode de quasi émulsion-diffusion du solvant (ESD).

Ce travail se divise en trois chapitres essentiels:

- une revue bibliographique en premier chapitre où sont traités : les nanoparticules, leur histoire, méthodes de préparation et caractérisation, les microsponges, leurs procédés de préparation et caractérisation, les systèmes de délivrance de médicaments à libération modifiée, les plans d'expériences, le mécanisme d'action du diclofenac sodique, et les nanoparticules et microparticules de diclofenac sodique a libération prolongée
- Le deuxième chapitre concerne les méthodes et matériel utilisés dans cette étude : les méthodes de préparation des nanoparticules et microsponges du diclofenac sodique, les plans de criblage et d'optimisation, et la caractérisation de la formulation optimale.
- Le dernier chapitre est consacré aux résultats obtenus et leur analyse statistique et graphique par le logiciel MINITAB.
- Enfin, le travail s'achève par une conclusion et perspectives.

CHAPITRE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1. Nanoparticules

1.1.1. Nanoscience et nanotechnologie

Le terme « nano » est dérivé d'un mot grec signifiant nain ou extrêmement petit. La nanoscience est la science des phénomènes propres à la matière à l'échelle de un à plusieurs centaines de nanomètres (10^{-9} m). De nouvelles opportunités émergentes offertes par la nanoscience ont été l'un des domaines de recherche les plus importants du milieu du XX^e siècle à nos jours (santé, environnement, agriculture, électronique...) (Tibbals ; 2010). En d'autres termes, la nanoscience est la science des matériaux et des appareils dont les structures et les constituants démontrent des propriétés physiques et chimiques nouvelles et considérablement modifiées en raison de leur taille nanométrique. Ainsi, la nanotechnologie est définie comme la manipulation de la matière à l'échelle atomique, moléculaire et supramoléculaire impliquant la conception, la production, la caractérisation et l'application de différents matériaux à l'échelle nanométrique dans différents domaines potentiels fournissant de nouvelles avancées technologiques principalement dans le domaine de la médecine (Bathia ; 2016, Geetha *et al* ; 2016) .

1.1.2. Nanomédecine

Ces dernières années ont vu une croissance sans précédent de la recherche et des applications dans le domaine des nanosciences et des nanotechnologies, il y a un optimisme croissant que la nanotechnologie, appliquée à la médecine, apportera des avancées significatives dans le diagnostic et le traitement des maladies. Les applications prévues en médecine (immunologie, cardiologie, endocrinologie, ophtalmologie, oncologie...) comprennent la délivrance de médicaments (cerveau, tumeurs, génome humain), le diagnostic *in vitro* et *in vivo*, les nutraceutiques et la production de matériaux biocompatibles (Jong et Borm ; 2008), cette application de la nanotechnologie à la médecine est dénommée « nanomédecine » (Martínez *et al* ; 2012).

De nouvelles opportunités ont été réalisées dans une grande variété de domaines technologiques, allant des matériaux intelligents à l'échelle nanométrique, de l'électronique ou des nanomoteurs, à la médecine et à la biologie, où les premières applications des nanotechnologies ont démontré un énorme potentiel. Alors que la nanotechnologie médicale

améliore un large éventail de ressources et de pratiques médicales, le concept de nanomédecine prend forme. La nanomédecine a récemment été désignée par l'institut National de santé comme les applications de la nanotechnologie pour le traitement, le diagnostic, la surveillance et le contrôle des systèmes biologiques (**Moghimi *et al* ; 2005**).

La nanomédecine implique l'utilisation de la nanotechnologie au profit de la santé et du bien-être humain. La nanomédecine a été définie par la Fondation européenne de la science comme «la science et la technologie de diagnostic, de traitement et de prévention des maladies et traumatismes, de soulagement de la douleur, de prévention et d'amélioration de la santé humaine, en utilisant des outils moléculaires et des connaissances moléculaires du corps humain ». Cette définition a été révisée par le NIH américain comme suit: «la nanomédecine fait référence à une intervention médicale hautement spécifique à l'échelle moléculaire pour guérir des maladies ou réparer des tissus endommagés, tels que les os, les muscles ou les nerfs» (**Bhatia ; 2016**). Les nanoparticules sont l'un des outils les plus importants et les plus prometteurs utilisés en nanomédecine (**Martínez *et al* ; 2012**).

1.1.3. Histoire

Bien que la nanotechnologie soit considérée comme une science moderne, le concept a une histoire qui remonte au 5^{ème} siècle en Asie et au 9^{ème} siècle en Égypte. Des nanoparticules d'or et d'argent ont été utilisées par des artisans de la mésopotamie pour générer un effet scintillant sur les pots. Avec le développement de la science, la nanotechnologie s'est avérée avoir un plus large éventail d'applications dans tous les aspects des sciences de la vie. Cela comprend principalement les produits pharmaceutiques, les soins de santé, l'électronique, la construction, l'environnement, l'énergie, les technologies de l'information, le biomimétisme, l'agriculture, le transport, et la transformation des aliments (**Geetha *et al* ; 2016**).

En Inde, la nanotechnologie était utilisée dans les anciens systèmes de médecine en 5000 avant JC, sans la terminologie "nano". Certaines formulations et médicaments utilisés tels que les cendres de matériaux métalliques ou à base de plantes, naturels riches en carbone, en minéraux et ions métalliques étaient constitués de matériaux nanométriques. Des matériaux de taille nanométrique étaient également utilisés dans un ancien système de médecine originaire du sud de l'Inde. Certaines des formulations bien connues utilisées comprennent des produits actifs utilisés pour traiter la faiblesse musculaire, l'asthme, l'infertilité,... (**Geetha *et al* ; 2016**).

Historiquement, le terme nanotechnologie a été introduit dans le monde scientifique par le professeur de l'université des sciences de Tokyo "Norio Taniguchi" en 1974 pour décrire la fabrication de précision de matériaux avec une tolérance nanométrique. La nanotechnologie a été révolutionnée avec l'invention du microscope à effet tunnel (STM) et du microscope à force atomique (AFM) qui ont permis l'imagerie d'atomes ou de molécules individuelles (**Geetha et al ; 2016**). En 1985, l'équipe d'Harry Kroto, Richard Smalley et Robert Curl qui a remporté le prix Nobel de chimie a découvert le fullerène C₆₀. en 1986 (**Kroto ; 2010**), Drexler a publié un livre intitulé "moteurs de création: l'ère prochaine de la nanotechnologie" pour décrire la nanotechnologie moléculaire (**Drexler ; 1985**).

En 1991, Sumio Iijima a découvert des nanotubes de carbone (**Iijima ; 2002**) et en 2000, le gouvernement des États-Unis a lancé l'initiative nationale de nanotechnologie (NNI - un programme visionnaire fédéral de recherche et de développement pour les investissements basés sur les nanotechnologies à travers la coordination de 16 divers départements américains et agences indépendantes) (**Geetha et al ; 2016**).

L'un des pionniers dans le domaine de la nanomédecine a été le professeur Peter Paul Speiser à l'ETH (Institut fédéral suisse de technologie) à Zurich. La stratégie du professeur Speiser pour la libération retardée et contrôlée était un développement de systèmes de délivrance miniaturisés. Son groupe de recherche a d'abord étudié les billes polyacryliques pour l'administration orale, puis s'est concentré sur les microcapsules et à la fin des années 1960, il a développé les premières nanoparticules à des fins d'administration de médicaments et de vaccins. Bien que son objectif final soit la libération prolongée de médicaments à partir de nanocapsules qui pourraient circuler dans le sang après une injection intraveineuse, afin de tester la faisabilité d'une libération prolongée de ces capsules, Speiser s'est d'abord concentré sur le développement de nanoparticules à des fins de vaccination (**Kreuter ; 2007**).

Le premier exemple d'application pharmaceutique était le Danazol (médicament à effet anti-gonatotrophique, utilisé pour le traitement de l'endométriose) qui a été broyé à l'aide d'un broyeur à billes en une poudre pour obtenir une taille de particule médiane de 169 nm. La nanosuspension de Danazol a montré une biodisponibilité orale améliorée ($82.3 \pm 10.1\%$) par rapport à la suspension ordinaire ($5.1 \pm 1.9\%$) (**Liversidge et Cundy ; 1995**). Le premier produit basé sur la technologie des nanoparticules approuvé par la FDA en 1999 était le Rapamune[®] (Sirolimus), un immunosuppresseur développé par Wyeth Pharmaceuticals

(Pfizer). Le deuxième produit approuvé par la FDA en 2004 était le Tricor[®] du laboratoire Abbott, une formulation améliorée de fénofibrate (médicament utilisé pour l'hypercholestérolémie) incorporant des nanoparticules de médicament qui réduisait la variabilité de la vitesse d'alimentation, n'entraînant aucune restriction posologique permettant la co-administration avec d'autres médicaments utilisés pour traiter les troubles lipidiques (Nekkanti *et al* ; 2012). Un autre produit contenant les nanoparticules de fénofibrate est le Triglide[®]. Le produit a été développé par Skye Pharma en utilisant leur technologie IDD-P[®] breveté et commercialisé par Sciele Pharma Inc. (Atlanta, USA) (Nekkanti *et al* ; 2012, WO 2010/081623). Un médicament antiémétique, Emend[®] (Aprépitant) a été approuvé par la FDA en mars 2003 et lancé aux États-Unis par Merck en avril 2003. Emend[®] est une capsule contenant 80 ou 125 mg d'aprépitant formulé sous forme de nanoparticules de médicament utilisant la technologie Elan NanoCrystal[®]. Megace ES[®] est un autre produit contenant des nanoparticules de médicament qui a été développé par Par Pharmaceutical Inc. (USA). Il s'agit d'une suspension aqueuse d'acétate de Megestrol (progestatif synthétique, anti anorexique) à la dose de 625 mg / 5 mL. La nanosuspension du médicament a réduit la variabilité rapide et similaire à celle du Tricor[®]. Le produit en nanosuspension a démontré que la nanosuspension aqueuse peut être produite avec une stabilité physique adéquate à durée de conservation acceptable en utilisant cette technologie. Une liste de produits développés à l'aide de la technologie des nanoparticules actuellement disponibles sur le marché sont résumés dans le tableau 1.1 (Nekkanti *et al* ; 2012).

Tableau1.1 : Produits commercialisés à base de nanoparticules
(Nekkanti *et al* ; 2012)

Marque	Nom du générique	Indication	Société de distribution	Innovateur
Rapamune [®]	Rapamycin Sirolimus	immunosuppresseur	Elan Nanosystems	Wyeth
Emend [®]	aprepitant	Anti-émétique	Elan Nanosystems	Merck & Co.
Tricor [®]	Fenofibrate	hypercholestérolémie	Abbott Laboratoires	Abbott Laboratoires

Megace ES [®]	Megestrol	Anti-anoréxique	Elan Nanosystems	Par Pharmaceuticals
Triglide [®]	Fenofibrate	hypercholestérolémie	IDD-P Skyepharma	Sciele Pharma Inc.
Avinza [®]	Morphine Sulphate	Psychostimulant	Elan Nanosystems	King Pharmaceuticals
Focalin	Dexmethyl- Phenidate HCl	Manque d'attention Trouble d'hyperactivité	Elan Nanosystems	Novartis
Ritalin	Methyl Phenidate HCl	Stimulant du système nerveux central	Elan Nanosystems	Novartis
Zanaflex Capsules [™]	Tizanidine HCl	Myorelaxant	Elan Nanosystems	Acorda

1.1.4. Définition et applications des nanoparticules

Les nanoparticules sont des particules colloïdales solides constituées de substances macromoléculaires dont la taille varie de 10 nm à 1000 nm (**Martínez *et al* ; 2012**).

Ces dernières années, les nanoparticules polymériques de polymères naturels et synthétiques ont plusieurs applications dans les différentes sciences particulièrement le domaine biomédical en raison de leurs caractéristiques physico-chimiques et biologiques uniques. Les nanoparticules destinées pour la délivrance des médicaments peuvent résoudre les problèmes des formes conventionnelles en atteignant le site d'action spécifique au taux thérapeutique optimal par contrôle de la taille et modification facile de leurs surfaces (**Kumar *et al* ; 2017**). Le médicament est dissous, piégé, encapsulé ou attaché à une matrice de nanoparticules. Selon le mode de préparation, des nanosphères ou des nanocapsules peuvent être obtenues. Les nanocapsules sont des systèmes dans lesquels le médicament est encapsulé dans une cavité entourée d'une membrane polymérique unique, tandis que les nanosphères sont des systèmes matriciels dans lesquels le médicament est physiquement et uniformément dispersé (**Mohanraj et Chen ; 2006**).

Les avantages de l'utilisation des nanoparticules comme système d'administration de médicaments sont les suivants:

- La taille des particules et les caractéristiques de surface des nanoparticules peuvent être facilement manipulées pour atteindre un ciblage passif et actif du médicament après administration.
- Elles contrôlent et prolongent la libération du médicament pendant le transport vers le site d'action, modifiant la distribution du médicament dans les organes et son élimination afin d'augmenter son efficacité thérapeutique et réduire ses effets secondaires.
- Les caractéristiques de libération contrôlée et de dégradation des particules peuvent être facilement modulées par le choix des constituants de la matrice. Le taux du principe actif encapsulé est relativement élevé et les médicaments peuvent être incorporés dans les systèmes sans aucune réaction chimique
- Le ciblage spécifique au site peut être réalisé en fixant des ligands de ciblage à la surface des particules ou en utilisant un guidage magnétique.
- Le système peut être utilisé pour diverses voies d'administration : orale, nasale, parentérale, intra-oculaire, etc.

Malgré ces avantages, les nanoparticules ont des limites. Leur petite taille et leur grande surface peuvent entraîner une agrégation des particules, ce qui rend la manipulation physique des nanoparticules difficile sous forme liquide et sèche (**Mohanraj et Chen ; 2006**).

1.1.5. Méthodes de préparation des nanoparticules

Le choix de la méthode appropriée pour la préparation des nanoparticules dépend du caractère physicochimique du polymère et du principe actif à encapsuler. Les nanoparticules peuvent être préparées à partir d'une variété de matériaux tels que les protéines, les polysaccharides et les polymères synthétiques. La sélection des matériaux matriciels dépend de nombreux facteurs, notamment:

- Biocompatibilité et toxicité
- Degré de biodégradabilité
- Profil de libération du médicament souhaité
- Propriétés intrinsèques du médicament (solubilité et stabilité aqueuses)
- Taille des nanoparticules requise

- Caractéristiques de surface (charge et perméabilité) (**Bathia ; 2016**).

1.1.5.1. Méthode de précipitation

La nanoprécipitation est également appelée méthode de déplacement de solvant. Cette méthode est essentiellement applicable aux principes actifs lipophiles et ce n'est pas un moyen efficace pour encapsuler les principes actifs hydrosolubles. Cette méthode a été appliquée à divers matériaux polymères tels que PLGA, PLA, PCL et poly (méthylvinyléther-anhydride comaléique) (PVM / MA) (**Nagavarma et al ; 2012, Sharma et al ; 2015**).

Dans ce procédé, le polymère préformé est précipité dans une solution organique et le solvant organique est diffusé dans le milieu aqueux. La diffusion du solvant organique peut être réalisée en présence ou en l'absence de tensioactif. Un solvant miscible à l'eau semi-polaire tel que l'acétone ou l'éthanol peut être utilisé pour dissoudre les polymères, le principe actif et / ou le surfactant lipophile. Après leur dissolution complète, la solution est ajoutée à une solution aqueuse contenant un stabilisant sous agitation magnétique. Les nanosphères sont formées immédiatement par la diffusion rapide du solvant (figure 1.1). Cette étape est suivie par l'élimination du solvant de la suspension sous pression réduite en utilisant un évaporateur rotatif. La taille des particules dépend de l'étendue de l'addition de la phase organique dans la phase aqueuse. Il a également été constaté qu'une diminution de la taille des particules et du piégeage du principe actif se produit lorsque la vitesse de mélange des deux phases augmente. L'optimisation de divers paramètres peut contrôler efficacement la taille, la libération de médicament et le rendement des nanosphères. La régulation de la concentration de polymère dans la phase organique s'est avérée utile dans la production de nanosphères de plus petite taille. Cependant, la plage de taille est limitée à la plage minimale du rapport polymère / principe actif (**Bathia ; 2016, Pal et al ; 2011**).

La technique de nanoprécipitation permet la préparation des nanocapsules lorsqu'un petit volume d'huile non toxique est incorporé dans la phase organique. L'acétone et le dichlorométhane sont utilisés pour dissoudre et augmenter le piégeage de principe actif, le dichlorométhane augmente la taille moyenne des particules et est considéré comme toxique (**Nagavarma et al ; 2012, Sharma et al ; 2015**).

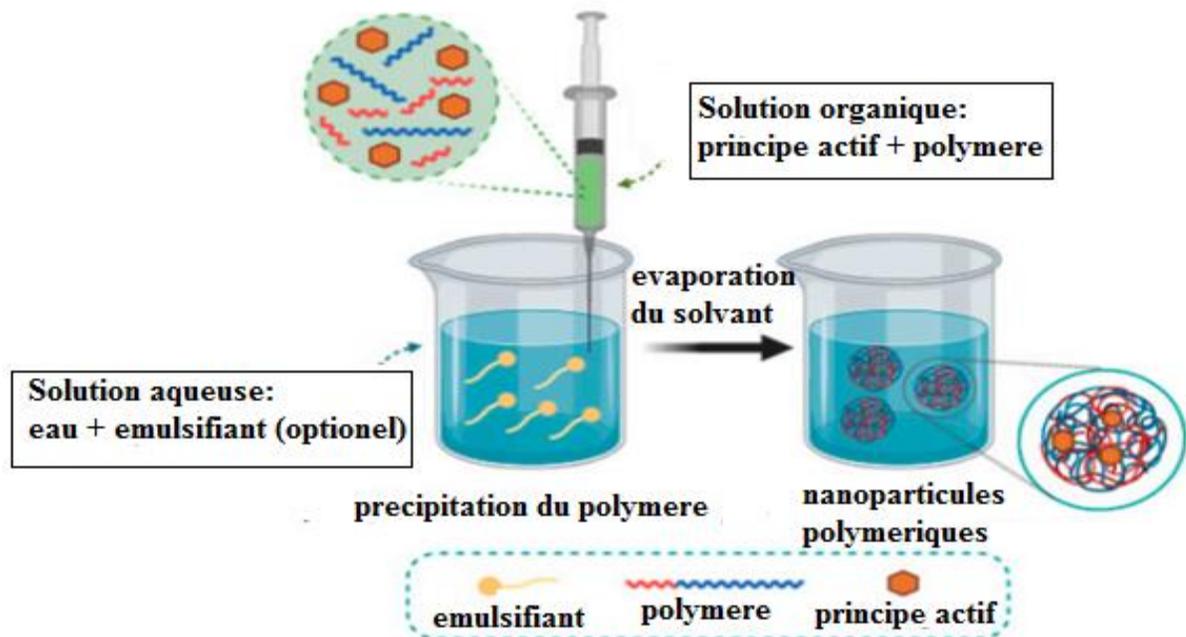


Figure 1.1 : Méthode de nanoprecipitation pour la préparation des nanoparticules polymériques (Zielinska *et al* ; 2020)

Certes la méthode de précipitation est simple mais elle a de nombreuses limites; il est très difficile de contrôler la nucléation et la croissance des cristaux pour obtenir une distribution de taille étroite. Il se forme souvent un solide métastable, généralement amorphe, qui est converti en forme cristalline plus stable. De plus, les solvants non aqueux utilisés dans le processus de précipitation doivent être réduits à des niveaux toxicologiquement acceptables dans le produit final (Nekkanti *et al* ; 2012).

1.1.5.2. Méthode de broyage

Les procédés de broyage et de précipitation conventionnels produisent généralement des particules supérieures à 1 μm . Les techniques de broyage ont ensuite été affinées pour permettre le broyage de particules solides de principe actif dans une plage inférieure au micron. Les broyeurs à boulets sont déjà connus depuis la première moitié du XX^e siècle pour la production de fines suspensions. Dans ce procédé, la suspension comprenant le principe actif et les stabilisants ainsi que les milieux de broyage est chargée dans la chambre de broyage. La réduction de la taille des particules se produit par des forces de cisaillement générées en raison de l'impaction des milieux de broyage. Il s'agit d'une technique à faible énergie. Des billes de différentes tailles peuvent être utilisées comme milieu de broyage ou

d'attrition. Les milieux de broyage sont constitués de billes en céramique, en acier inoxydable ou enduites en résine de polystyrène hautement réticulé. Le temps de broyage dépend de nombreux facteurs tels que la teneur en solides, la concentration de tensioactif, la dureté, la viscosité de la suspension, la température, l'apport d'énergie et la taille du milieu de broyage. Le temps de broyage peut être varié de quelques minutes à quelques heures ou quelques jours en fonction de la taille des particules souhaitée. Des stabilisants tels que des polymères et des tensioactifs sont utilisés pour faciliter la dispersion des particules. Pour une meilleure efficacité, les stabilisants doivent être capables de mouiller les particules de principe actif et de fournir des barrières stériques et ioniques. En l'absence de stabilisants appropriés, la haute énergie de surface des particules nanométriques entraînerait une agglomération ou une agrégation de cristaux (**Nekkanti *et al* ; 2012, Brahamdutt *et al* ; 2018, Sharma *et al* ; 2015**).

1.1.5.3. Méthode de relargage

La méthode implique la séparation d'un solvant miscible à l'eau d'une solution aqueuse via un effet de relargage. Au cours du processus initial, le polymère et le principe actif sont dissous dans un solvant tel que l'acétone qui est ensuite émulsifié en un gel aqueux contenant l'agent de relargage et un stabilisant colloïdal. Divers types d'agents de relargage (électrolytes, tels que le chlorure de magnésium et le chlorure de calcium, ou des non électrolytes tels que le saccharose) et stabilisant colloïdal (tels que la polyvinylpyrrolidone ou l'hydroxyéthylcellulose) sont utilisés. Cela conduit à la formation d'une émulsion H/E qui est ensuite diluée avec un volume suffisant d'eau ou de solution aqueuse pour améliorer la diffusion du solvant dans la phase aqueuse, induisant finalement la formation de nanosphères (figure 1.2) (**Bathia ; 2016, Nagavarma *et al* ; 2012**).

Le solvant et l'agent de relargage sont ensuite éliminés par filtration à courant transversal. Des paramètres tels que la vitesse d'agitation, le rapport des phases interne / externe, la concentration des polymères dans la phase organique, le type et la concentration d'électrolyte et le type de stabilisant dans la phase aqueuse peuvent varier dans ce processus. Elle ne nécessite pas l'augmentation de la température et peut donc être utile pour les principes actifs thermolabiles. Par contre, elle présente l'inconvénient d'avoir une application limitée au principe actif lipophile et avoir de nombreuses étapes de lavage des nanoparticules (**Bathia ; 2016, Nagavarma *et al* ; 2012**).

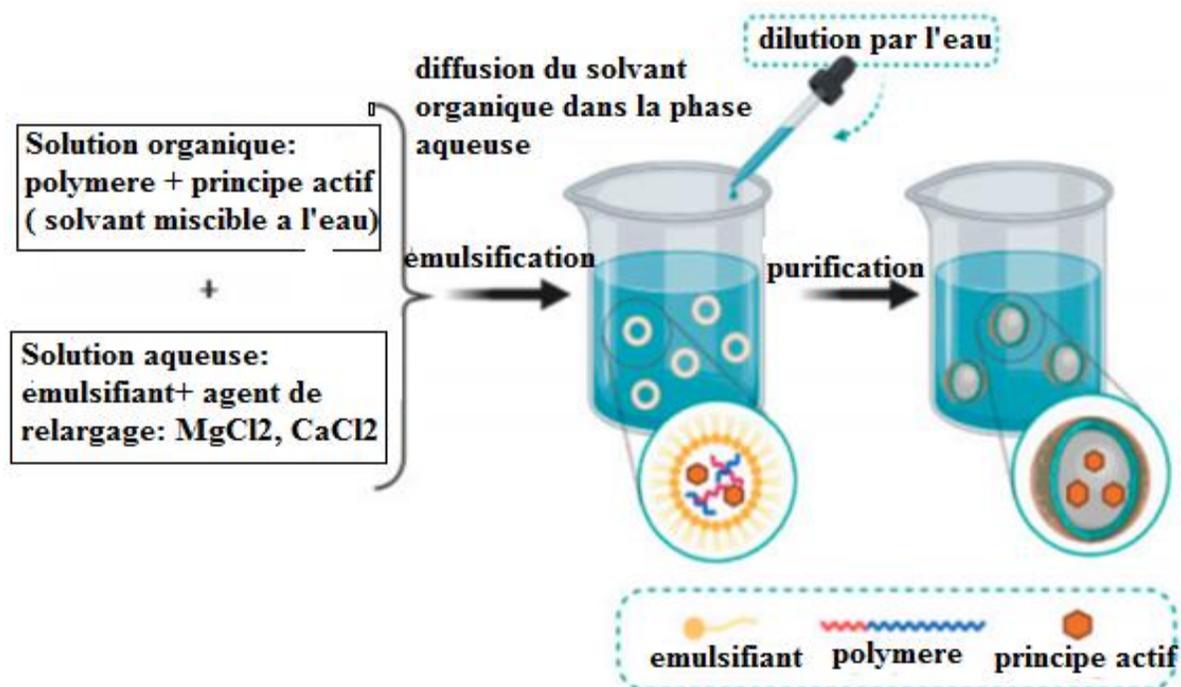


Figure 1.2: Méthode de relargage pour la préparation des nanoparticules polymériques (Zielinska *et al* ; 2020)

1.1.5.4. Méthode de dialyse

La dialyse offre une méthode simple et efficace pour la préparation de petites nanoparticules polymériques à distribution étroite. Le polymère est dissous dans un solvant organique et placé à l'intérieur d'un sac de dialyse avec un poids moléculaire adéquat. La dialyse est effectuée contre un non-solvant miscible avec le solvant organique (figure 1.3). Le déplacement du solvant à l'extérieur de la membrane est suivi par l'agrégation progressive du polymère due à une perte de la solubilité et à la formation de suspension homogène de nanoparticules (Nagavarma *et al* ; 2012, Tyagi et Pandey ; 2016).

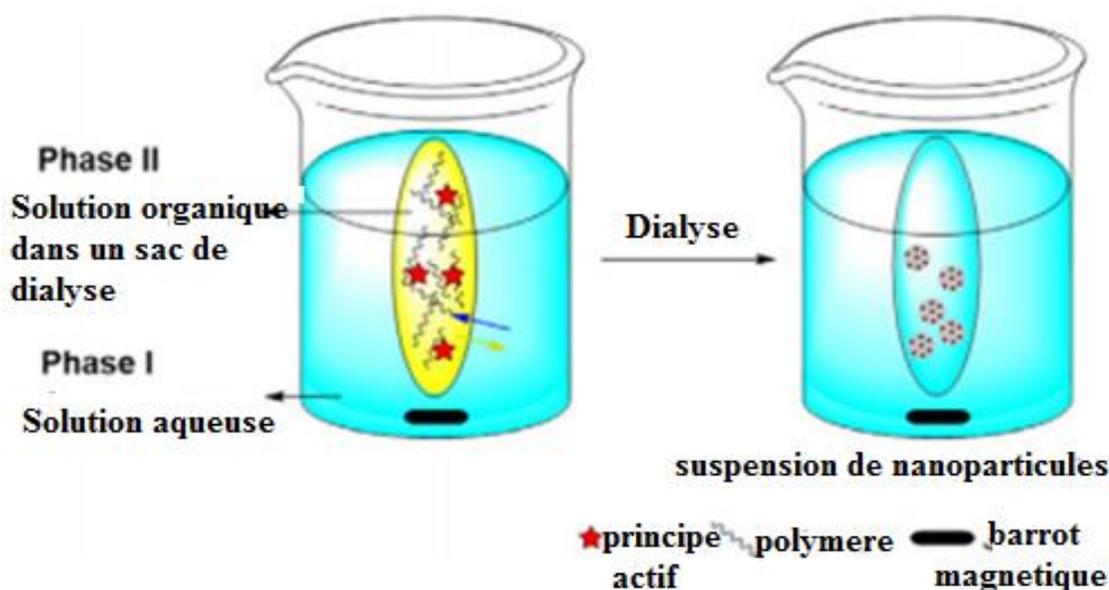


Figure 1.3 : Méthode de dialyse pour la préparation des nanoparticules polymériques (Crucho et Barros ; 2017)

1.1.5.5. Méthode d'émulsion-évaporation du solvant

L'émulsion-évaporation du solvant a été la première méthode mise au point pour préparer les nanoparticules polymériques, c'est la méthode la plus utilisée (Nagavarma *et al* ; 2012).

Cette méthode implique deux étapes : la première est l'émulsification de la solution de polymère dans une phase aqueuse et la seconde est l'évaporation du solvant de polymère, induisant la précipitation du polymère sous forme de nanosphères.

Le polymère et le principe actif hydrophobe sont dissous dans un solvant organique volatil (dichlorométhane, chloroforme ou acétate d'éthyle) puis émulsionné dans une solution aqueuse. Cette solution aqueuse contient un tensioactif ou un agent émulsifiant pour former une émulsion H / E. Une fois l'émulsion stable formée, le solvant organique est évaporé soit sous agitation magnétique continue à température ambiante, soit en réduisant la pression. La taille des nanoparticules s'est révélée être influencée par la concentration et le type de stabilisant, la concentration en polymère et la vitesse de l'homogénéisateur (figure 1.4). L'ultrasonication ou l'homogénéisation à grande vitesse sont souvent utilisées afin de réduire la taille de particules. Les nanoparticules sont collectées par ultracentrifugation et lavées avec de l'eau distillée pour éliminer les résidus de stabilisant ou tout principe actif libre et lyophilisées pour le stockage. La méthode de l'émulsion-évaporation du solvant souffre d'un

taux d'encapsulation médiocre des principes actifs hydrophiles (Bathia ; 2016, Pal *et al* ; 2011).

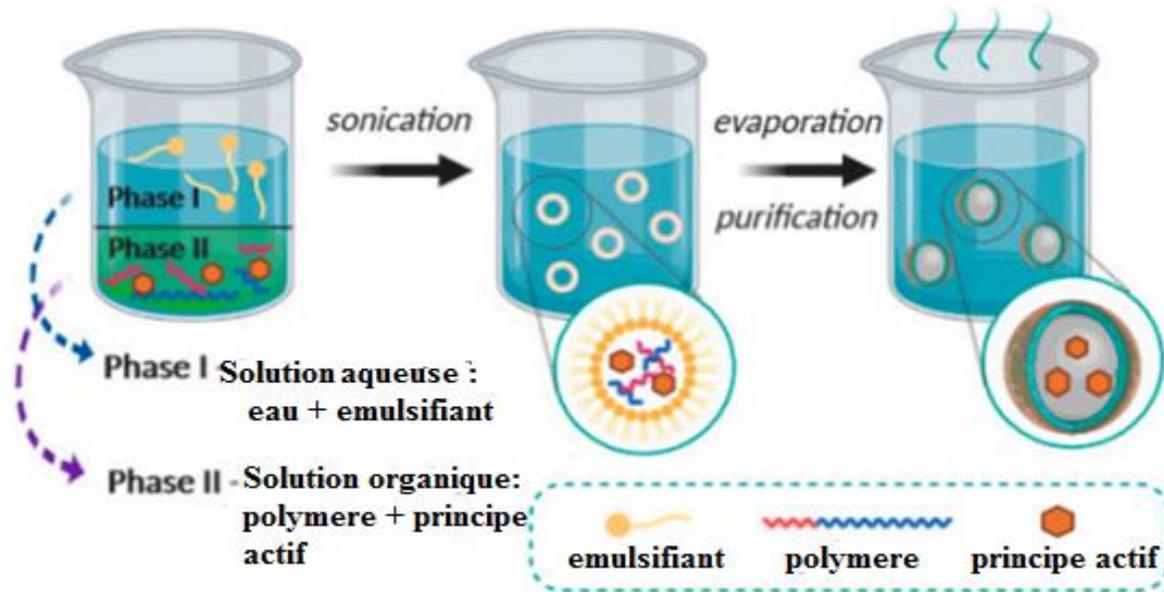


Figure 1.4 : Méthode d'émulsion-évaporation du solvant pour la préparation des nanoparticules polymériques (Zielinska *et al* ; 2020)

Par conséquent, pour encapsuler un principe actif hydrophile, la technique de la double émulsion est employée, qui implique l'addition d'une solution aqueuse de principe actif à la solution de polymère organique sous agitation vigoureuse pour former une émulsion E/H. Cette émulsion E/H est injectée dans une seconde phase aqueuse sous agitation continue pour former une émulsion E/H/E. L'émulsion est soumise ensuite à l'élimination du solvant par évaporation et les nanoparticules peuvent être isolées par ultracentrifugation (Bathia ; 2016, Pal *et al* ; 2011).

1.1.5.6. Méthode d'émulsion-diffusion de solvant (ESD)

Il s'agit d'une autre méthode largement utilisée pour préparer des nanoparticules. Le polymère d'encapsulation est dissous dans un solvant partiellement miscible à l'eau (tel que le carbonate de propylène, l'alcool benzylique), par la suite le solvant est saturé d'eau pour assurer l'équilibre thermodynamique initial des deux liquides. Par la suite, la phase saturée du solvant est émulsifiée dans une solution aqueuse contenant un stabilisant, conduisant à une diffusion du solvant vers la phase externe et à la formation de nanosphères ou nanocapsules, selon le

rapport huile / polymère. Enfin, le solvant est éliminé par évaporation, selon son point d'ébullition (figure 1.5) (Bathia ; 2016, Pal *et al* ; 2011).

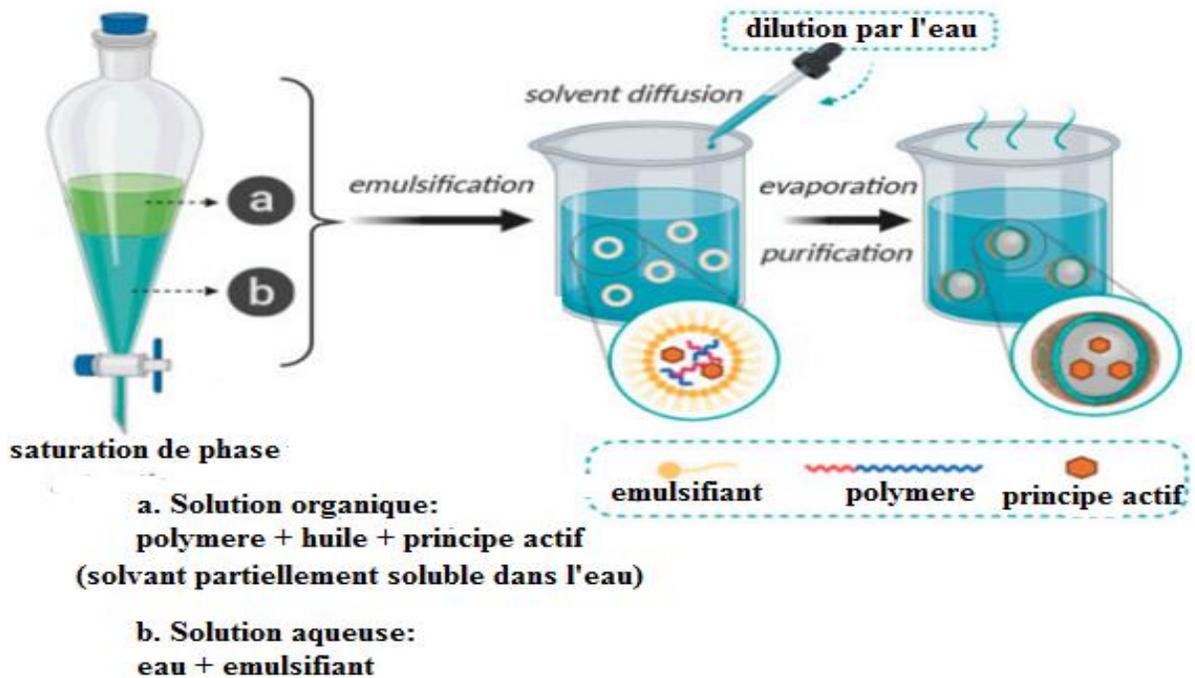


Figure 1.5 : Méthode d'émulsion-diffusion du solvant pour la préparation des nanoparticules polymériques (Zielinska *et al* ; 2020)

Cette technique présente plusieurs avantages, tels que un taux d'encapsulation élevé (> 70%), la non nécessité d'homogénéisation, une reproductibilité élevée d'un lot à l'autre, une facilité de mise à l'échelle. Les inconvénients de cette méthode sont le volume élevé d'eau à éliminer de la suspension et la fuite de principe actif hydrosoluble dans la phase externe aqueuse saturée pendant l'émulsification, réduisant ainsi l'efficacité d'encapsulation (Nagavarma *et al*; 2012).

1.1.5.7. Méthode de coacervation ou de gélification ionique

L'exploration récente de polymères biodégradables tels que la gélatine et l'alginate de sodium s'est concentrée maintenant sur la production de nanoparticules biodégradables ayant des caractéristiques telles que la biocompatibilité et la faible toxicité. Des méthodes telles que la gélification ionique peuvent être utilisées pour préparer des nanoparticules à base de polymère hydrophile. Calvo *et al* ont développé une méthode pour préparer des nanoparticules à base de chitosane par une méthode de gélification ionique. Dans ce procédé,

deux phases aqueuses différentes sont préparées, une pour le polymère [chitosane, un copolymère di-bloc oxyde d'éthylène ou oxyde de propylène (PEO-PPO)] et l'autre pour le tripolyphosphate de polyanion sodique (**Mohanraj et Chen ; 2006, Calvo *et al* ; 1997**).

Cette méthode est basée sur la forte interaction électrostatique entre un groupe amino chargé positivement de chitosane et un tripolyphosphate chargé négativement pour former des coacervats d'une taille de l'ordre du nanomètre (figure 1.6). L'existence d'une forte interaction électrostatique entre deux phases aqueuses conduit à la formation de coacervats. En revanche, la gélification ionique implique la transition du matériau du liquide au gel en raison des conditions d'interaction ionique à température ambiante (**Bathia ; 2016, Tyagi et Pandey ; 2016**).

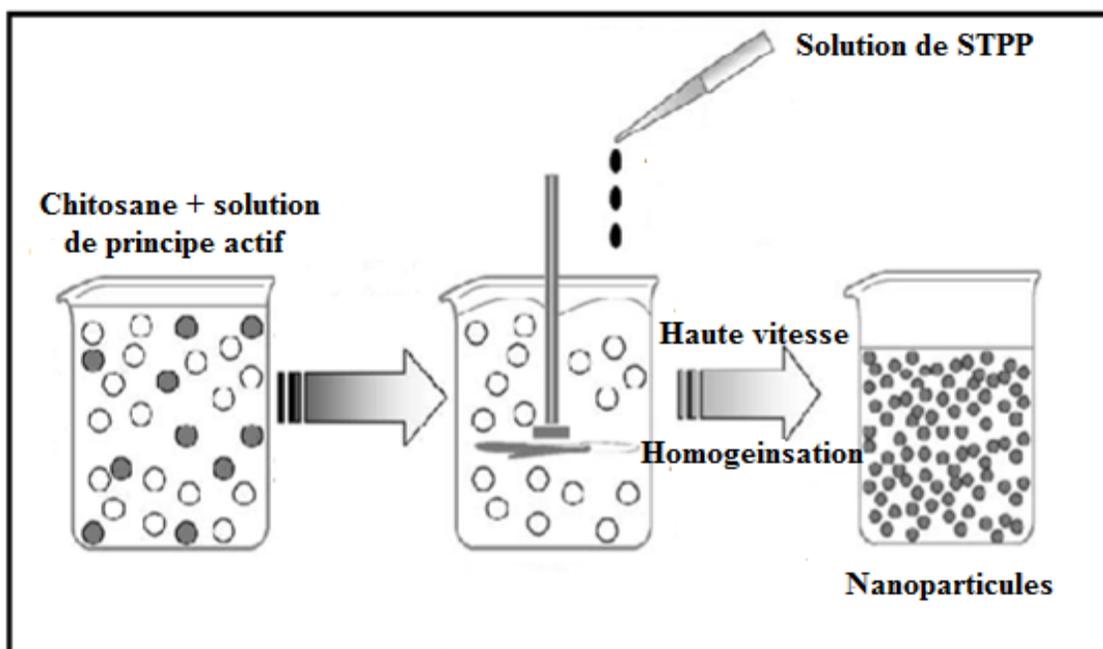


Figure 1.6 : Méthode de coacervation pour la préparation des nanoparticules polymériques (**Tyagi et Pandey ; 2016**)

1.1.5.8. Méthode des fluides supercritiques

La nécessité de développer des méthodes plus respectueuses de l'environnement pour la production de nanoparticules polymériques a motivé la recherche sur l'utilité des fluides supercritiques (SCF) en tant que solvants plus respectueux de l'environnement, avec le potentiel de produire des nanoparticules polymériques avec une grande pureté et sans aucune trace de solvant organique (**Nagavarma *et al* ; 2012**). La technique de la technologie des

fluides supercritiques, bien que respectueuse de l'environnement et adaptée à la production de masse, nécessite un équipement spécialement conçu et est plus coûteuse. Les fluides supercritiques sont des fluides qui au delà de leur point critique, ont la particularité de rester dans une seule phase indépendamment de la pression. Le CO₂ est le fluide supercritique le plus utilisé en raison de ses conditions critiques douces, de son ininflammabilité, de son faible prix et de son non toxicité (**Bathia ; 2016, Pal et al ; 2011**). L'anti-solvant supercritique (SAS), l'expansion rapide de la solution supercritique (RESS) et la précipitation avec un procédé anti-solvant comprimé (PCS) sont des méthodes couramment utilisées utilisant des fluides supercritiques. Dans la technique SAS, deux solvants complètement miscibles sont impliqués, l'un est un liquide supercritique et l'autre est un solvant fluide. Alors que les solutés sont insolubles dans un liquide supercritique, la formation de nanoparticules se produit en raison de la précipitation immédiate des solutés formés par extraction du solvant fluide par le fluide supercritique. Dans le cas de la technique RESS, les solutés se dissolvent dans le liquide supercritique entraînant une perte significative du pouvoir solvant, par conséquent les solutés sont précipités en raison de l'extension rapide des solutés via une petite buse dans la zone de pression réduite. Il s'agit de la différence fondamentale entre les techniques SAS et RESS. Bien qu'il n'y ait aucune exigence de solvants organiques dans la technique RESS pour la préparation de nanoparticules, mais cette technique présente un inconvénient majeur de donner un produit microscopique plutôt que nanométrique au stade primaire. Actuellement, une nouvelle technologie de fluide supercritique nommée RESOLV entre en action dans laquelle le solvant fluide supprime la croissance des particules dans la buse à jet d'expansion, conduisant à la formation de particules nanométriques à leur stade primaire (**Brahamdutt et al ; 2018**). La formulation de nanoparticules par la méthode de SCF présente l'avantage d'une bonne désagrégation des particules, une amélioration de la solubilité et de la vitesse de dissolution, une libération contrôlée et une amélioration de l'absorption des principes actifs. Cette méthode est la plus appropriée pour obtenir les propriétés souhaitées des nanoparticules, telles que la taille et la distribution de la taille, la morphologie, la structure du noyau interne et la concentration minimale de solvant résiduel (**Paliwal et al ; 2014**).

1.1.5.9. Méthode de polymérisation en émulsion

La polymérisation en émulsion est l'une des méthodes les plus rapides pour la préparation de nanoparticules et est facilement évolutive. La méthode est classée en deux catégories, basée

sur l'utilisation d'une phase continue organique ou aqueuse. La méthodologie de la phase organique continue implique la dispersion du monomère dans une émulsion ou une microémulsion inverse, ou dans un matériau dans lequel le monomère n'est pas soluble (non solvant). En tant que l'une des premières méthodes de production de nanoparticules, des tensioactifs ou des polymères solubles protecteurs ont été utilisés pour empêcher l'agrégation aux premiers stades de la polymérisation. Cette procédure est devenue moins importante, car elle nécessite des solvants organiques toxiques, des tensioactifs, des monomères et un initiateur. Dans la phase continue aqueuse, les monomères sont dissous dans une phase continue qui est généralement une solution aqueuse, les tensioactifs ou émulsifiants ne sont pas nécessaires. Le processus de polymérisation peut être initié par différents mécanismes. L'initiation se produit lorsqu'une molécule de monomère dissoute dans la phase continue entre en collision avec une molécule initiatrice qui pourrait être un ion ou un radical libre. Alternativement, la molécule de monomère peut être transformée en un radical initiateur par un rayonnement à haute énergie, y compris un rayonnement γ , ou les rayons UV. La croissance de la chaîne commence lorsque des ions monomères ou des radicaux monomères entrent en collision avec d'autres molécules de monomère (figure 1.7). La séparation de phase et la formation de particules solides peuvent avoir lieu avant ou après la fin de la réaction de polymérisation (Kumar *et al* ; 2013).

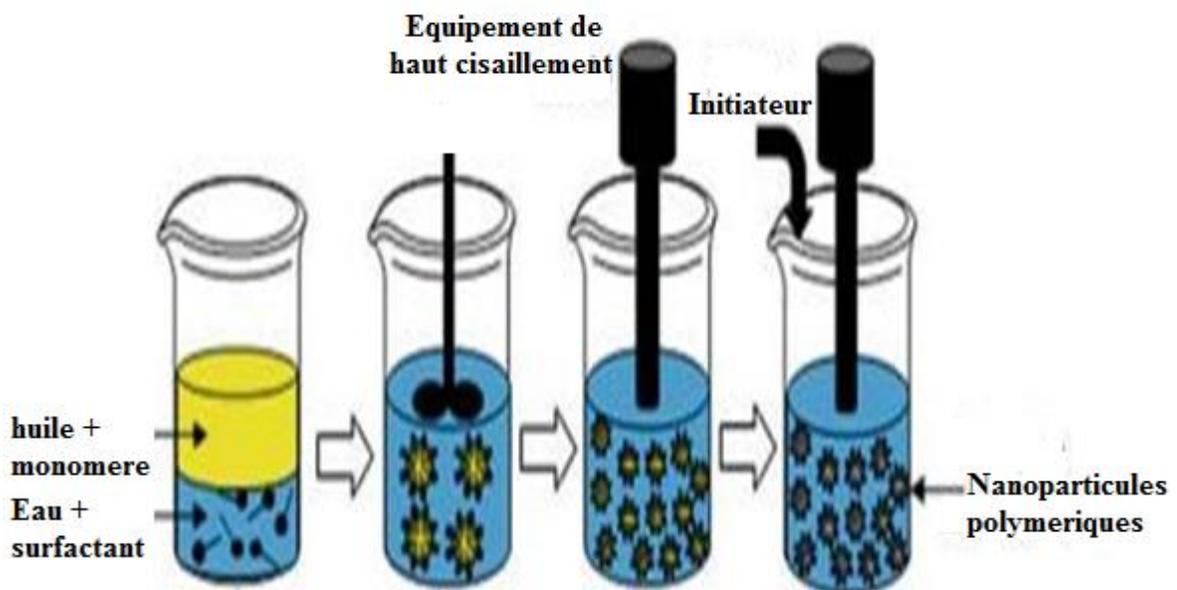


Figure 1.7 : Méthode de polymérisation pour la préparation des nanoparticules polymériques (Tyagi et Pandey ; 2016)

1.1.6. Caractérisation des nanoparticules

La nanométrie est la science des mesures à l'échelle nanométrique. La nanométrie comprend la longueur et / ou la taille et d'autres propriétés (**Thassu *et al* ; 2007**). Les qualités et les performances uniques des nanoparticules en tant que dispositifs d'administration de médicaments découlent directement de leurs propriétés physicochimiques. Par conséquent, la détermination de ces caractéristiques est essentielle pour parvenir à une compréhension mécaniste de leur comportement. Une bonne compréhension permet la prédiction des performances *in vivo* ainsi que la conception rationnelle des particules et le développement de la formulation (**Haskell ; 2006**).

Les nanoparticules sont généralement caractérisées par leur taille, leur morphologie et leur charge de surface, en utilisant des techniques microscopiques avancées telles que la microscopie électronique à balayage (MEB), la microscopie électronique à transmission (TEM) et la microscopie à force atomique (AFM). Le diamètre moyen des particules, leur distribution granulométrique et leur charge affectent la stabilité physique et la distribution *in vivo* des nanoparticules (**Bathia ; 2016, Pal *et al* ; 2011**).

Le tableau 1.2 récapitule la plupart des méthodes de caractérisation des nanoparticules polymériques, on cite ci-dessous quelques unes.

Tableau 1.2 : Méthodes de caractérisation des nanoparticules

Technique	Taille	Morpho- -logie	Potentiel Zeta	Interaction chimique	Stabilité physique -chimique	Libéra- -tion
Granulo- mètre laser	x	x				
Zeta-mètre	x		x			
MEB	x	x				
TEM	x	x				
DSC				x	x	
ATG				x	x	
DRX				x	x	
Dissolutest						x
FTIR				x	x	
RMN				x	x	

1.1.6.1. Taille et morphologie

Plusieurs propriétés des nanoparticules comme le devenir biologique, la distribution *in vivo* et la capacité de cibler dépendent de la taille des particules et de leur distribution. En outre, ils peuvent également influencer la libération de médicaments, la charge médicamenteuse et la stabilité des nanoparticules. Il a également été signalé que les nanoparticules peuvent également être utilisées pour administrer des agents thérapeutiques dans des maladies difficiles à traiter, telles que les tumeurs cérébrales, car elles peuvent traverser la barrière hémato-encéphalique. La libération de médicaments est affectée par la taille des particules. Les particules les plus petites ont une plus grande surface, par conséquent, un taux important du principe actif associé serait à la surface de la particule ou près de celle-ci, conduisant à une libération rapide du médicament. Alors que les particules de plus grande taille ont de grands noyaux qui permettent à une plus grande quantité de médicament d'être encapsulée et de se diffuser lentement. Il y a toujours un grand risque d'agrégation de particules plus petites de la dispersion des nanoparticules pendant le stockage et le transport (**Kumar et al ; 2017, Mohanraj et Chen ; 2006**). Plusieurs méthodes pour déterminer la taille et la morphologie des nanoparticules sont citées ci-dessous.

a. Diffusion dynamique de la lumière (DLS)

Actuellement, la méthode la plus rapide et la plus populaire pour déterminer la taille des particules est la spectroscopie à corrélation de photons (PCS) ou la diffusion dynamique de la lumière (DLS). La DLS est largement utilisée pour déterminer la taille des nanoparticules à mouvement brownien dans les suspensions colloïdales (**Pal et al ; 2011, Bathia ; 2016**). Le passage de la lumière monochromatique (laser) sur une suspension de particules sphériques en mouvement brownien provoque un décalage Doppler lorsque la lumière frappe la particule en mouvement, modifiant la longueur d'onde de la lumière entrante. Ce changement est lié à la taille de la particule. Il est possible d'extraire la distribution granulométrique et de décrire le mouvement des particules dans le milieu, en mesurant le coefficient de diffusion de la particule et en utilisant la fonction d'auto-corrélation (**Kumar et al ; 2013**). Les avantages de cette méthode sont la vitesse d'analyse, le manque d'étalonnage requis et la sensibilité aux particules sub-micrométriques. Les inconvénients incluent la nécessité d'une dilution importante pour éviter les artefacts, le besoin de propreté dans la préparation des échantillons (**Haskell ; 2006**).

b. Microscopie électronique à balayage

La microscopie électronique à balayage (MEB) permet un examen morphologique avec visualisation directe. Les techniques basées sur la microscopie électronique offrent plusieurs avantages en analyse morphologique et dimensionnelle; cependant, ils fournissent des informations limitées sur la distribution des tailles et la moyenne réelle de la population. Pour la caractérisation MEB, la suspension de nanoparticules doit d'abord être convertie en poudre sèche, qui est ensuite montée sur un porte-échantillon, puis recouverte d'un métal conducteur, tel que l'or, à l'aide d'une coucheuse. L'échantillon est ensuite scanné avec un fin faisceau d'électrons focalisé. Les caractéristiques de surface de l'échantillon sont obtenues à partir des électrons secondaires émis par la surface de l'échantillon. La taille moyenne obtenue par MEB est comparable aux résultats obtenus par diffusion dynamique de la lumière. Ces techniques prennent du temps et coûteuses (**Pal et al ; 2011, Thassu et al ; 2007, Kumar et al ; 2013**).

c. Microscopie électronique à transmission

La Microscopie électronique à transmission (TEM) fonctionne sur un principe différent du MEB, mais il apporte souvent le même type de données. La préparation des échantillons pour TEM est complexe et prend du temps en raison de son exigence d'être ultra mince pour la transmittance électronique. La dispersion de nanoparticules est déposée sur une grille ou un film support. Pour que les nanoparticules résistent au vide de l'instrument et facilitent leur manipulation, elles sont fixées à l'aide d'un matériau de coloration négatif, tel que l'acide phosphotungstique ou ses dérivés, l'acétate d'uranyle, etc, ou par enrobage plastique. Une autre méthode consiste à exposer l'échantillon à des températures d'azote liquide après enrobage dans de la glace vitreuse. Les caractéristiques de surface de l'échantillon sont obtenues lorsqu'un faisceau d'électrons est transmis à travers un échantillon ultra mince, interagissant avec l'échantillon lors de son passage (**Pal et al ; 2011, Thassu et al ; 2007 ; Kumar et al ; 2013**).

d. Microscopie à force atomique

La microscopie à force atomique (AFM) offre une résolution ultra-élevée dans la mesure de la taille des nanoparticules et est basée sur un balayage physique des échantillons au niveau submicronique à l'aide d'une pointe de sonde à l'échelle atomique. L'instrument fournit une carte topographique de l'échantillon basée sur les forces entre la pointe et la surface de

l'échantillon. Les échantillons sont généralement analysés en mode contact ou sans contact en fonction de leurs propriétés. En mode contact, la carte topographique est générée en tapant la sonde sur la surface à travers l'échantillon et la sonde plane sur la surface conductrice en mode sans contact. Le principal avantage de l'AFM est sa capacité à imager des échantillons non conducteurs sans aucun traitement spécifique, permettant ainsi l'imagerie de nanostructures. L'AFM fournit la description la plus précise de la taille et de la distribution des tailles (**Pal et al ; 2011**).

1.1.6.2. Charge de surface

La nature et l'intensité de la charge de surface des nanoparticules sont très importantes car elles déterminent leur interaction avec l'environnement biologique ainsi que leur interaction électrostatique avec les composés bioactifs. La stabilité colloïdale est analysée par le potentiel zêta des nanoparticules. Ce potentiel est une mesure indirecte de la charge de surface. La mesure du potentiel zêta permet de prédire la stabilité au stockage de la dispersion colloïdale. Des valeurs de potentiel zêta élevées, positives ou négatives, doivent être atteintes afin d'assurer la stabilité et d'éviter l'agrégation des particules (**Bathia ; 2016, Pal et al ; 2011**). Le potentiel zêta est souvent mesuré par un zeta-mètre en observant les oscillations du signal qui résultent de la lumière diffusée par des particules situées dans un champ électrique (**Haskell; 2006, Fahmy et al ; 2018**).

1.1.6.3. Compatibilité et interactions

a. Calorimétrie différentielle à balayage (DSC)

La DSC peut être utilisée pour déterminer la nature cristalline et le taux de cristallinité dans les nanoparticules grâce à la mesure des températures de transition vitreuse, de cristallisation et de fusion du polymère et du point de fusion de principe actif et de leurs enthalpies associées. Cette méthode est régulièrement utilisée pour déterminer dans quelle mesure plusieurs phases existent à l'intérieur ou dans lesquelles les différents constituants, dont le médicament, interagissent (**Haskell ; 2006, Wagh et Apar ; 2014**).

b. Diffraction des rayons X (RXD)

La RXD sur poudre est une technique analytique rapide principalement utilisée pour l'identification de phase du matériau cristallin. Les substances cristallines agissent comme des réseaux de diffraction tridimensionnels pour des longueurs d'onde de rayons X similaires à

l'espacement des plans dans un réseau cristallin. Récemment, les applications se sont étendues à de nouvelles études, notamment la détermination de la structure cristalline et l'extraction de propriétés microstructurales tridimensionnelles. Divers matériaux nanocristallins peuvent être caractérisés à partir de la RXD (**Kumar *et al* ; 2013, Peltonen *et al* ; 2004, Wagh et Apar ; 2014**).

c. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)

Cette technique est utilisée pour identifier les types de liaisons chimiques ou de groupes fonctionnels, la FTIR analyse la longueur d'onde de la lumière absorbée par l'échantillon à une longueur d'onde spécifique. En examinant le spectre d'absorption infrarouge, les liaisons chimiques dans une molécule peuvent être déterminées. Les analyses FTIR du composé pur sont si uniques qu'elles peuvent être décrites comme des «empreintes digitales moléculaires», chacune ne ressemblant à aucune autre. Pour les matériaux courants, le spectre d'un échantillon inconnu peut être déterminé par comparaison avec la bibliothèque de composés connus, mais pour identifier des échantillons moins courants, le FTIR est souvent combiné avec la RMN, la spectroscopie de masse, la spectroscopie d'émission, la diffraction des rayons X et / ou d'autres techniques (**Kumar *et al* ; 2013**). La spectroscopie FTIR est utilisée dans la caractérisation des nanoparticules polymériques pour révéler toute dégradation ou interaction chimique entre le polymère encapsulant le principe actif (**Eltayeb *et al* ; 2015**).

1.1.6.4. Efficacité d'encapsulation

L'efficacité d'encapsulation du principe actif dépend fortement de la solubilité du principe actif à l'état solide dans le matériau de la matrice ou le polymère (dissolution ou dispersion solide), qui est liée à la composition du polymère, au poids moléculaire, à l'interaction principe actif-polymère et à la présence de l'extrémité groupes fonctionnels. Le taux d'efficacité d'encapsulation des nanoparticules est généralement défini comme la quantité de principe actif liée par masse de nanoparticules il pourrait également être donné en pourcentage, il est défini après quantification du principe actif non encapsulé (méthode indirecte) ou encapsulé après dissolution des nanoparticules par un solvant approprié (méthode directe). La quantification se fait par des méthodes spectroscopiques ou chromatographiques(**Pal *et al*; 2011,Bathia; 2016**).

1.1.6.5. Libération du médicament *in vitro*

Pour développer un système porteur de nano-médicaments efficace, l'expulsion du médicament et la biodégradation du polymère sont importantes. La vitesse à laquelle le médicament est libéré dépend de la solubilité du médicament, de l'expulsion du médicament absorbé, de la diffusion du médicament à partir de la matrice des nanoparticules, de la dégradation de la matrice des nanoparticules et de la combinaison du processus de dégradation / diffusion (**Kumar *et al* ; 2017, Mohanraj et Chen ; 2006**). Il est important de comprendre la manière et l'étendue de la libération des molécules de principe actif à partir des nanoparticules polymériques. La quantification du principe actif libéré par unité de temps est effectuée avec la spectroscopie UV-vis ou HPLC après test de dissolution *in vitro* en utilisant un dissolutest (**Pal *et al* ; 2011, Bathia ; 2016**). Le dissolutest est un appareil constitué d'un bain thermostaté pour fixer la température voulue, de récipients cylindriques en verre pour contenir le milieu de dissolution et des agitateurs en palette ou en panier.

1.2. Microsponges

1.2.1. Microencapsulation

La microencapsulation est décrite comme un processus consistant à enfermer des particules de taille micrométrique de solides, de gouttelettes de liquides ou de gaz dans une enveloppe, qui à son tour les isole et les protège de l'environnement extérieur.

La microencapsulation peut être effectuée pour :

- Protéger les substances sensibles de l'environnement extérieur
- Masquer les propriétés organoleptiques comme la couleur, le goût, l'odeur de la substance à encapsuler
- obtenir une libération contrôlée ou ciblée du principe actif (**Jyothi *et al* ; 2010**).

1.2.2. Microparticules

Le terme « microparticule » est utilisé pour définir les particules sphériques dont le diamètre est de l'ordre du micromètre (1-1000 μm). Les microparticules polymériques sont formées par une matrice de polymère qui peut contenir un ou plusieurs principes actifs. On distingue deux catégories différentes de microparticules selon la distribution du principe actif: les microsphères et les microcapsules. Les microsphères sont des microparticules composées d'un mélange homogène de principe actif et de matériau encapsulant, tandis que les microcapsules

sont des microparticules qui présentent un noyau de principe actif délimité par le matériau d'encapsulation (**Campos *et al* ; 2013, Murtaza ; 2012**).

1.2.3. Définition et applications des microsponges

Les microsponges sont des microsphères polymériques poreuses (figure 1.8) et chaque particule est constituée d'un réseau de pores interconnectés au sein d'une structure non pliable. Elles ont généralement un diamètre compris entre 5 et 300 μm (**Maiti *et al* ; 2011**).

Le degré élevé de réticulation des polymères composant les microsponges donne des particules insolubles, inertes et suffisamment résistantes pour résister au cisaillement élevé couramment utilisé dans la fabrication des crèmes, des lotions et des poudres (**Kumar *et al* ; 2014**).

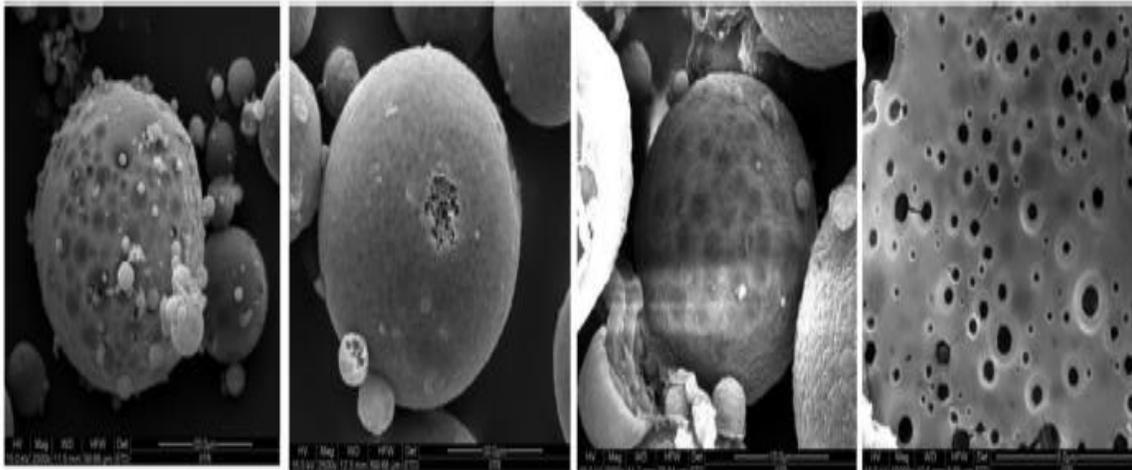


Figure 1.8 : Image des microsponges par microscope électronique à transmission
(**Mahant *et al* ; 2020**)

Les microsponges sont des systèmes modernes d'administration de médicaments capables de piéger une concentration plus élevée de médicaments grâce à l'interconnexion des pores. Malgré la taille microscopique des microsponges, elles ne sont pas assez petites pour pénétrer la peau et être absorbées par le corps de manière locale; ainsi, les microsponges sont des systèmes d'administration de médicaments considérés pour une utilisation locale. Les microsponges ne peuvent pas traverser la peau, elles s'accumulent dans les couches de la peau et libèrent lentement le médicament emprisonné en fonction des besoins.

Il est donc courant d'utiliser cette forme pour piéger des médicaments insolubles ou légèrement solubles, tels que les antifongiques, les antibactériens, les anti-inflammatoires non

stéroïdiens, les antihistaminiques, les inhibiteurs calciques, les antipsychotiques, les antidépresseurs, les hormones, les antiémétiques et les oxydants. Les microsporges sont principalement utilisées pour l'administration de crèmes, lotions, gels et émulsions. Récemment, elles ont été utilisées dans les produits oraux, tels que les comprimés, les capsules et les systèmes flottants (Junqueira et Bruschi ; 2018).

1.2.4. Méthodes de préparation des microsporges

1.2.4.1. Méthode de polymérisation en suspension liquide-liquide

En général, la solution est constituée de monomères et de principes actifs, non miscibles à l'eau. Cette phase est ensuite mise en suspension sous agitation dans une phase aqueuse, contenant généralement des additifs, tels que des tensioactifs et des dispersants, pour favoriser la suspension. Une fois que la suspension est établie avec des gouttelettes de la taille souhaitée, la polymérisation est effectuée en amorçant la polymérisation soit par catalyse, soit par augmentation de la température ou par irradiation. Au cours du processus de polymérisation, une structure sphérique est produite, contenant des milliers de microsporges regroupées comme des raisins, formant des réservoirs interconnectés. A la fin de la polymérisation, les particules solides qui résultent du processus sont récupérées de la suspension. Les particules sont ensuite lavées et traitées jusqu'à ce qu'elles soient prêtes à l'emploi (Shaha *et al* ; 2010, Sharma *et al* ; 2020, Tiwari *et al* ; 2016).

1.2.4.2. Méthode de quasi émulsion-diffusion de solvant

La méthode comprend deux étapes : dans la première étape, la phase interne est préparée en dissolvant le polymère encapsulant et le principe actif dans un solvant organique volatil (dichlorométhane, chloroforme, éthanol,..). Ensuite, la phase externe est préparée en dissolvant le tensioactif (en général le PVA) dans de l'eau distillée. La phase interne est versée par la suite dans la phase externe à température ambiante (figure 1.9). Après émulsification, le mélange est agité en continu ensuite filtré pour séparer les microsporges. Les microsporges récupérées sont séchées dans une étuve à 40°C pendant 24 heures (Mayur *et al* ; 2013, Jyothi *et al* ; 2019). En général, cette méthode est préférée, car de nombreux ingrédients cosmétiques et pharmaceutiques sont sensibles aux températures élevées de la polymérisation (Kaity *et al* ; 2013).

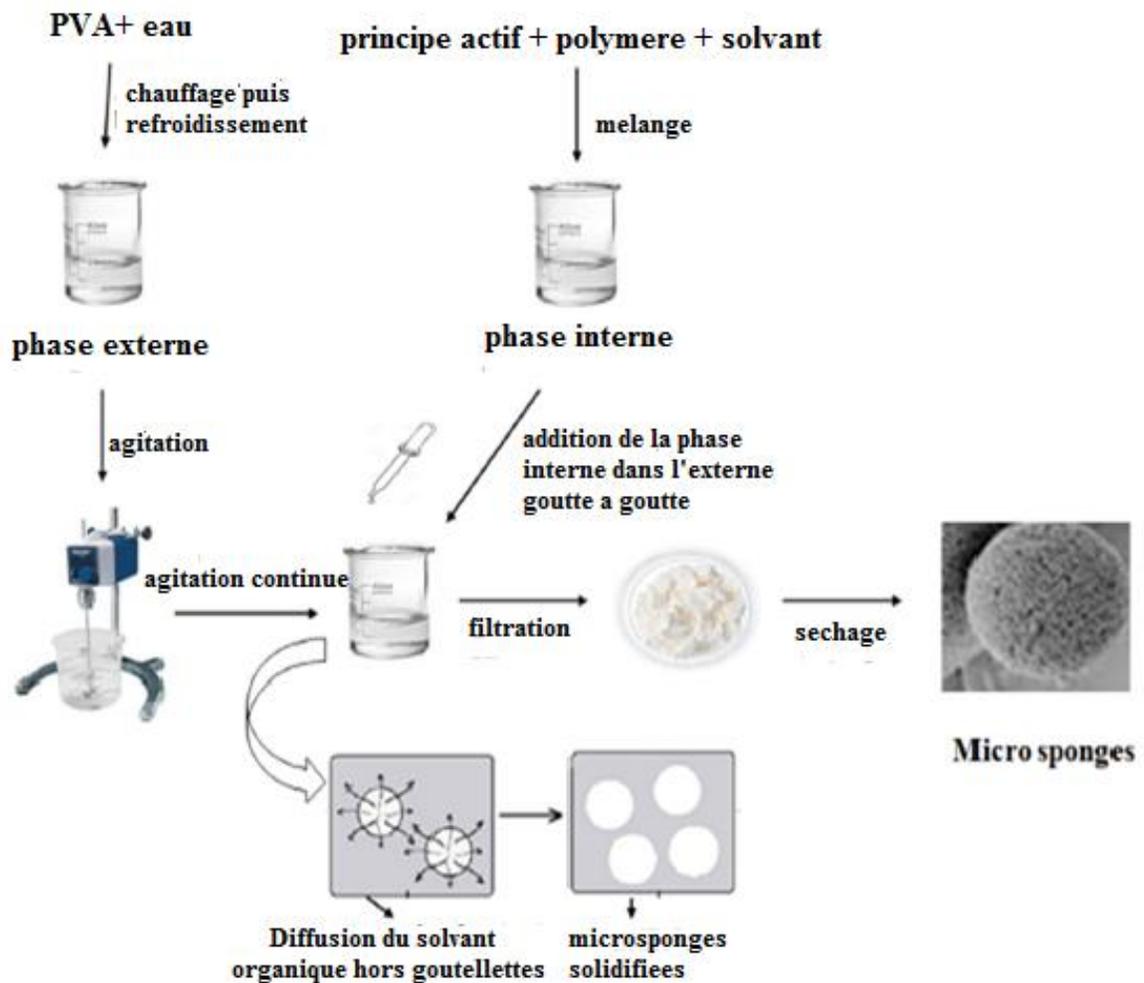


Figure 1.9 : Méthode d'émulsion-diffusion du solvant pour la préparation des microsponges
(Mahant *et al* ; 2020)

1.2.5. Caractérisation des microsponges

La caractérisation des microsponges ne diffère pas beaucoup des nanoparticules. La taille et la forme peuvent être déterminées par microscopie optique, elle permet un examen de la forme et la mesure de la taille à l'aide d'un logiciel de traitement d'image. Pour mieux visualiser les pores des microsponges, la microscopie électronique est nécessaire. Les autres critères peuvent être déterminés par les mêmes méthodes que les nanoparticules polymériques tels que : le taux d'efficacité d'encapsulation, la dissolution *in vitro*, compatibilité et interactions.

1.2.5.1.Densité

La densité des microsponges est mesurée à l'aide d'un ultra-pycnomètre sous hélium gazeux et est calculée à partir d'une moyenne de déterminations répétées (**Parikh et al ; 2010**).

1.2.5.2.Structure des pores

Le porosimètre par intrusion de mercure peut être utilisé pour étudier le diamètre et le volume des pores. Les paramètres de porosité tels que la distribution de la taille des pores, la surface totale des pores, les diamètres moyens des pores, la forme et la morphologie des pores, le volume et la densité apparente peuvent être déterminés (**Aldawsari et Badr-Eldin ; 2013**).

1.3. Systèmes de délivrance de médicaments à libération modifiée

L'objectif fondamental de la thérapie est d'atteindre un niveau sanguin à l'état d'équilibre qui est thérapeutiquement efficace et non toxique pendant une période de temps prolongée. La conception de schémas posologiques appropriés est un élément important pour atteindre cet objectif. Les formes posologiques conventionnelles ne permettent pas une bonne observance du patient, particulièrement pour un principe actif à courte demi-vie qui nécessite son administration fréquente, cela peut entraîner un surdosage ou un sous dosage. Un profil temporel typique de concentration plasmatique de pic-vallée est obtenu, ce qui rend difficile l'obtention d'un état stable (**Darandale et al ; 2017**).

Pour une meilleure utilisation du médicament, une diminution des effets secondaires, une amélioration de l'efficacité, et une libération uniforme du principe actif, des formes à libération prolongée ont été développées (**Lombardo et al ; 2019**). Des paramètres physicochimiques et biologiques doivent être mis en compte pour formuler un principe actif sous forme posologique à libération prolongée. Les paramètres physicochimiques comprennent principalement le poids moléculaire du principe actif, sa solubilité à différent pH et son coefficient de partage. Le temps de demi-vie du principe actif, sa clairance totale, sa biodisponibilité, l'effet de premier passage hépatique possible et les concentrations stables souhaitées représentent les caractères biologiques étudiés pour la formulation (**Alli et al ; 2016**). La libération du principe actif à partir de la formulation à base de nanoparticules et microparticules dépend de plusieurs facteurs, notamment le pH, la température, la solubilité du principe actif, la désorption du principe actif lié à la surface ou adsorbé, sa diffusion à travers la matrice de nanoparticules et microparticules, le gonflement et l'érosion de la matrice, et la

combinaison de processus d'érosion et de diffusion. Selon le type de nanoparticules et microparticules utilisées, la libération du médicament sera différente. Pour les nanosphères et les microsphères, qui sont un système matriciel où le principe actif est physiquement et uniformément dispersé, le principe actif est libéré par érosion de la matrice. Il y a une libération rapide de principe actif faiblement lié à la grande surface de la sphère suivie d'une libération prolongée du reste du médicament dispersé. D'un autre côté, la libération des nanocapsules et microcapsules est contrôlée par la diffusion du principe actif à travers la couche polymérique (Rizvi et Saleh ; 2018).

La diffusion, le solvant, la réaction chimique et la libération contrôlée après stimulation sont les mécanismes qui peuvent représenter la libération de médicaments à travers les nanoparticules (figure 1.10).

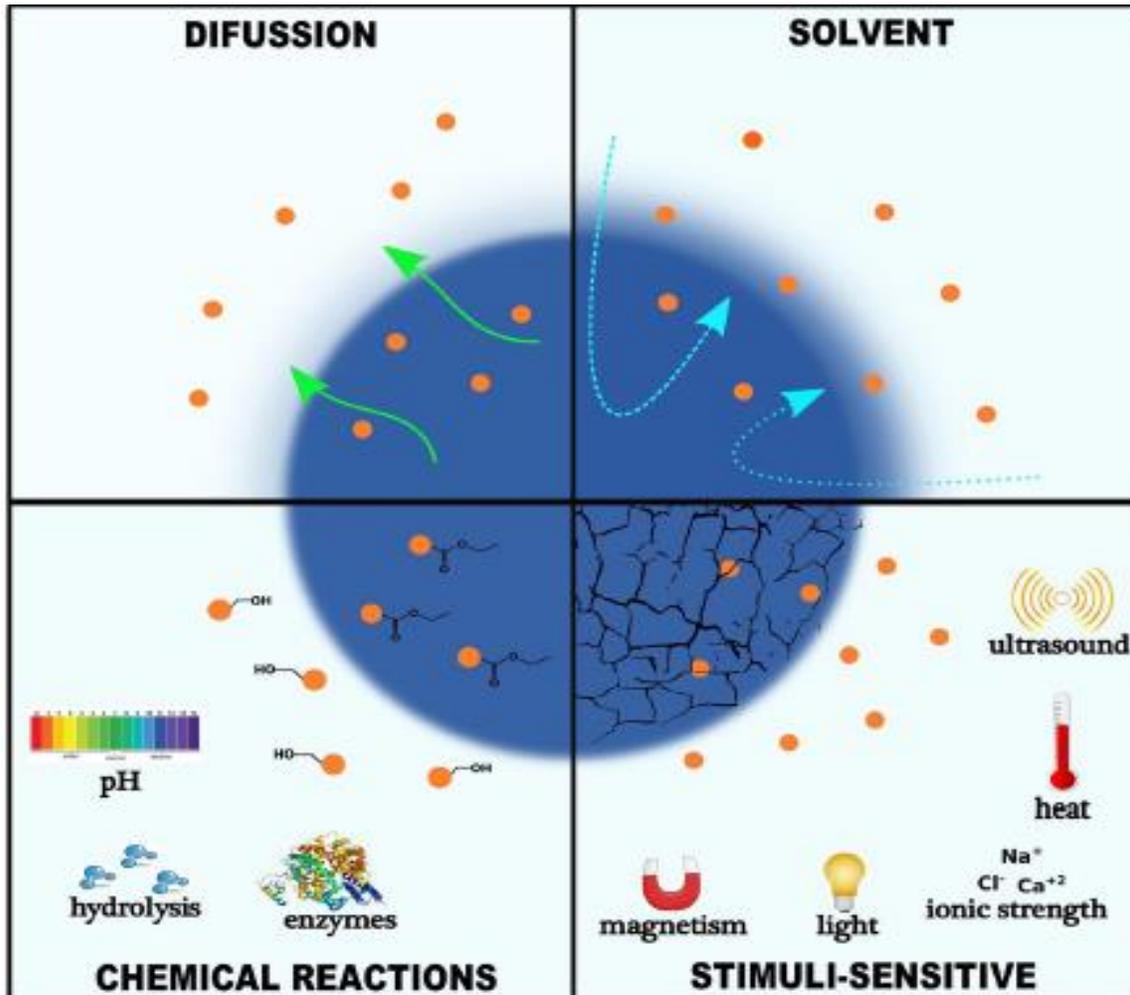


Figure 1.10: Mécanismes de libération contrôlée à partir des nanoparticules

(Patra *et al*, 2018)

D'autre part, les nanosupports sensibles aux stimuli ont montré la capacité de contrôler le profil de libération des médicaments (en tant que libération déclenchée) en utilisant des facteurs externes tels que les ultrasons, la chaleur, le champ magnétique, la lumière, le pH et la force ionique, ce qui peut améliorer le ciblage et permettre un meilleur contrôle du dosage (**Patra et al ; 2018**).

1.4. Diclofenac sodium

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) sont populaires en raison de leurs actions analgésiques, anti-inflammatoires, antipyrétiques et antiagrégants plaquettaires. Ces médicaments bloquent à la fois les systèmes enzymatiques intracellulaires de la cyclooxygénase et de la lipoxigénase, ce qui interfère avec la réponse inflammatoire normale et diminue la production de divers composés de la prostaglandine (**Babb ; 1992**). Le diclofenac sodique est un anti-inflammatoire non stéroïdien qui a une structure de l'acide phénylacétique. Il inhibe la cyclooxygénase -2 (COX-2) avec une puissance plus élevée sur la cyclooxygénase-1 (COX-1) (**Ulubay et al ; 2016**).

1.4.1. Mécanisme d'action

Dans le mécanisme de la COX et de la lipoxigénase, les phospholipides de la membrane sont hydrolysés et l'acide arachidonique est libéré dans le cytoplasme par activation de l'enzyme phospholipase A2. Alors que la voie COX induit la formation de certaines prostaglandines (PG) telles que PGI2, PGD2, PGE2 PGF2a et thromboxane A2 (TXA2), les leucotriènes et les lipoxines sont produites par la voie de la lipoxigénase. En particulier, les enzymes COX jouent un rôle clé dans l'homéostasie cardiovasculaire. La COX-1 induit la synthèse de TXA2 dans les plaquettes et entraîne une agrégation plaquettaire et une vasoconstriction. Tandis que, la COX-2 induit la synthèse de la prostacycline dans les cellules endothéliales et provoque la relaxation dans les cellules vasculaires lisses et la vasodilatation.

Plusieurs prostanoïdes tels que la PGE2 et la prostacycline protègent la muqueuse gastrique contre les effets érosifs de l'acide gastrique. De plus, les études ont démontré que la PGE2 et la PGI2 ont un rôle important dans la cardioprotection par une régulation positive de la COX-2. Les AINS présentent des effets anti-inflammatoires, analgésiques et antipyrétiques en bloquant la production de prostaglandines par l'inhibition non sélective des isozymes COX. Ils jouent un rôle fondamental dans le traitement pharmacologique des douleurs aiguës et

chroniques. COX-1 et COX-2 ont des effets biologiques différents. L'effet analgésique est principalement associé à l'inhibition de la COX-2, tandis que différents effets secondaires apparaissent suite à l'inhibition de la COX-1 et de la COX-2 (Ulubay *et al* ; 2016). Les effets secondaires gastro-intestinaux (douleur, ulcération, perforation, saignement...) sont les effets indésirables du diclofenac les plus fréquemment rapportés (Brogden *et al* ; 1980).

1.4.2. Systèmes de délivrance de Diclofenac sodique à libération prolongée

Le diclofenac sodique présente une courte durée de demi-vie (1.2-1.8 h) (Brogden *et al*; 1980) ce qui nécessite son administration plusieurs fois par jour, cela augmente le risque des effets indésirables. Une forme à libération prolongée est nécessaire pour éviter un sous-dosage et par conséquent une inefficacité ou un surdosage et par conséquent une toxicité. Plusieurs formes à libération prolongée ont été développées pour administration orale, parentérale, cutanée et ophthalmique. Les systèmes de délivrance de médicaments micrométriques et nanométriques prennent de plus en plus place dans la formulation pharmaceutique à fin d'améliorer l'index thérapeutique en diminuant le risque de toxicité et en augmentant l'efficacité par modulation de la libération ou la distribution. On citera ci-dessous quelques exemples de systèmes de délivrance de diclofenac sodique développés ces dernières années.

1.4.2.1. Vectorisation à travers les nanoparticules

Plusieurs travaux utilisaient les Eudragits comme polymère encapsulant pour retarder la libération du DC. Jajali *et al* ont fait une étude comparative entre 2 formulations distinctes de DC à base d'Eudragit RS 100, des nanoparticules polymériques par la méthode d'émulsion-diffusion du solvant et une dispersion solide par la méthode de co-évaporation. La libération *in vitro* dans un tampon phosphate salin PBS (pH=6.8) a démontré que les deux formulations présentent un profil de libération prolongée, avec une libération plus lente pour la dispersion solide par rapport aux nanoparticules (Barzegar-Jalali *et al* ; 2012). Une nanosuspension de DC à base d'Eudragit RS 100 a été préparée par la méthode d'émulsion-évaporation du solvant pour une administration ophthalmique, elle a présenté une libération prolongée (Swamy *et al* ; 2013). La méthode de nanopréciipitation a été employée pour préparer une nanosuspension d'Eudragit S 100. La libération *in vitro* montre une libération prolongée suivant le modèle d'Higuchi. Les résultats indiquent que le DC a été libéré suite à une combinaison de dissolution et diffusion (Ahuja *et al* ; 2011).

Des nanoparticules magnétiques de DC ont été développées par Arias *et al* avec un cœur magnétique et une enveloppe à base d'éthylcellulose pour administration parentérale. Elles ont été préparées par la technique d'émulsion-évaporation du solvant et ont montré un profil de libération biphasique, une libération précoce durant la première heure puis une libération lente durant les 24-48h (Arias *et al* ; 2009). D'autres nanoparticules à base d'éthylcellulose ont été le résultat d'une homogénéisation à haute pression d'une émulsion primaire E/H après évaporation du solvant organique. L'alginate était l'émulsifiant utilisé pour stabiliser l'émulsion primaire. Soixante six pourcent de DC ont été libérés durant les 12h (Patil *et al* ; 2013). L'administration ophtalmique de nanoparticules de DC à base de N-triméthyl chitosane préparées par la méthode de gélation ionique a présenté une libération biphasique suivant le modèle d'Higuchi à deux pH différents (PBS 6.8 et 7.4) (Asasutjarit *et al* ; 2015). Des nanofibres de carboxyméthylcellulose (CMC) associé au PVA à différents ratios ont été formulés par la méthode d'électrofilage et ont montrés une libération prolongée (El-Newehy *et al* ; 2016).

D'autres travaux ont porté intérêt aux nanoparticules lipidiques pour usage ophtalmique. Attama *et al* ont élaboré des nanoparticules lipidiques de DC par la méthode d'homogénéisation chaude après formulation d'une émulsion primaire, la présence de phospholipides génère une libération prolongée (Attama *et al* ; 2008). L'administration transdermique de nanoparticules lipidiques préparées par la méthode d'émulsion-évaporation du solvant montre une libération biphasique, immédiate de 67% durant les deux premières heures puis une libération lente durant les dix suivantes heures (Liu *et al* ; 2010).

1.4.2.2. Vectorisation à travers les microparticules

Les microparticules à base d'éthylcellulose préparées par la méthode d'émulsion-évaporation du solvant libèrent le DC lentement pendant 12 h à 16 h suivant une diffusion non-fickienne (Chowdary et Dana ; 2011). Par la même méthode, des microsphères de DC à base d'éthylcellulose et de polysorbate 80 ont été élaborées. Après 30h de test de dissolution *in vitro*, 70% de DC ont été libérés suivant l'ordre zéro et le premier ordre, cela peut être interprété par la diffusion du DC à travers la matrice des microsphères et d'autres processus comme l'érosion de la matrice (Baccarin *et al* ; 2006). Murthy *et al* ont étudié l'influence du solvant organique utilisé sur la libération du DC à partir des microparticules à base d'éthylcellulose. L'acétate d'éthyle présente la libération la plus rapide, par la suite le

dichlorométhane et enfin le chloroforme qui présente le profil de libération le plus étendu et la plus large taille des microparticules (**Murthy et Chowdary ; 2005**). Des microcapsules comprimées préparées par la technique de coacervation montrent une libération étendue sur 24h dans de l'eau triplement distillée suivant l'ordre zéro (**Sajeev et al ; 2002**).

L'huile de paraffine a été utilisée pour préparer des microparticules de DC par la méthode de la non aqueuse émulsion-évaporation du solvant, plus la phase huileuse externe est réduite plus la libération sera lente. La concentration du surfactant (span 80) a aussi une influence sur la libération, plus on augmente la concentration du span 80 plus le DC sera rapidement libéré. Un autre facteur influençant la libération est le type de polymère encapsulant, l'Eudragit RSPO retarde la libération du DC par apport à l'Eudragit RLPO (**Shah et al ; 2011**).

Un hydrogel thermosensible contenant des microsphères à base d'alginate préparées par la méthode d'émulsification et/ ou gélification à administration intra articulaire présente une libération prolongée pendant 120 h suivant le modèle Ritger-Peppas (**Qi et al ; 2016**).

Des microparticules poreuses ou microsponges à base d'éthylcellulose incorporées dans un gel de carbopol ont été préparées par la méthode de double émulsification, elles libèrent seulement 17% de DC après 24h pour un ratio DC : EC de 1 :10, tandis qu'elles libèrent 89% de DC pour un ratio de 1 :1 (**Hussain et al ; 2014**).

En comparant avec les comprimés commercialisés de DC, les microparticules bucco-adhésives préparées par la méthode de déshydratation de double -émulsion (H/E/H) en utilisant le CMC sodique, présentent une libération plus lente (**Jelvehgaril et al ; 2014**).

1.4. Stratégies d'optimisation par les plans d'expériences

Les plans d'expériences (PEX) peuvent être définis comme la stratégie de mise en place d'expériences de manière à ce que les informations requises soient obtenues aussi efficacement et précisément que possible. L'expérimentation est effectuée pour déterminer la relation entre les facteurs agissant sur le système et la réponse ou les propriétés du système (processus ou produit) (**Gareth et al ; 1999**). Les PEX éliminent la dissipation due à la méthode d'essai et d'erreur et permettent d'économiser du temps et de l'argent (**Trivedi et al ; 2015**).

Les plans d'expériences servent à mieux choisir les expériences à réaliser pour découvrir les règles d'évolution d'une grandeur d'intérêt en fonction de conditions opératoires. Le plus souvent, une formule mathématique peut traduire ces règles. Les formules trouvées sont essentiellement pratiques c'est-à-dire qu'elles donnent une présentation mathématique

approchée du phénomène dans une région limitée de l'espace expérimental (Anton ; 2003, Goupy ; 1990).

1.5.1. Espace expérimental

Comprendre les plans d'expériences nécessite de saisir le concept essentiel d'espace expérimental des variables dans l'étude. Pour illustrer graphiquement un espace expérimental, nous utilisons une zone bidimensionnelle. Cette représentation permet une extension facile aux espaces multidimensionnels. Un facteur peut être représenté par un axe dirigé et gradué. S'il existe un deuxième facteur, il est représenté par un axe similaire. Ce deuxième axe est tracé orthogonalement au premier. Mathématiquement, cela donne un plan cartésien qui définit un espace euclidien en deux dimensions. Cette zone est appelée l'espace expérimental (figure 1.11). L'espace expérimental est composé de tout les points du facteur 1 \times facteur 2 où chaque point représente un essai expérimental. S'il existe un troisième facteur, il est également représenté par un axe dirigé et gradué, positionné perpendiculairement aux deux premiers (Goupy et Creighton ; 2007).

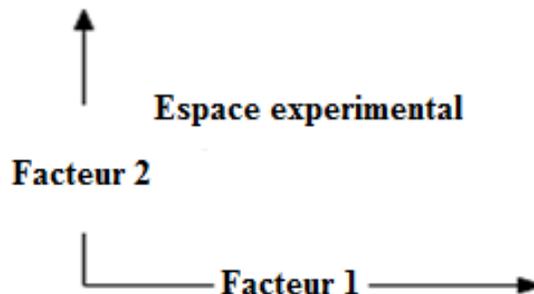


Figure 1.11: Espace expérimental (Goupy et Creighton ; 2007)

1.5.2. Domaine du facteur

La valeur donnée à un facteur lors de l'exécution d'un essai expérimental s'appelle un niveau. L'étude d'un effet d'un facteur, en général, limite sa variation entre deux limites. L'expérimentateur définit ces deux niveaux en fonction des spécificités de l'étude. La limite inférieure est le niveau bas. La limite supérieure est le niveau haut. L'ensemble contenant toutes les valeurs entre le niveau bas et le niveau haut que le facteur peut prendre est appelé domaine de variation du facteur (figure 1.12) ou domaine du facteur (Goupy et Creighton ; 2007).

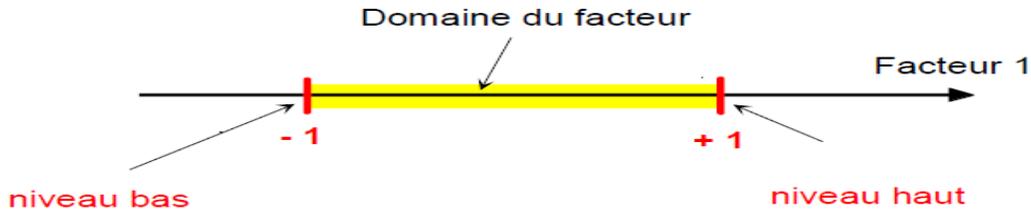


Figure 1.12 : Domaine du facteur (Goupy ; 2006)

1.5.3. Points expérimentaux

Le niveau x_1 du facteur 1 et le niveau x_2 du facteur 2 peuvent être considérés comme les coordonnées d'un point de l'espace expérimental (Figure 1.13). Une expérience donnée est alors représentée par un point dans ce système d'axes. Un plan d'expériences est représenté par un ensemble de points expérimentaux (Goupy ; 2006).

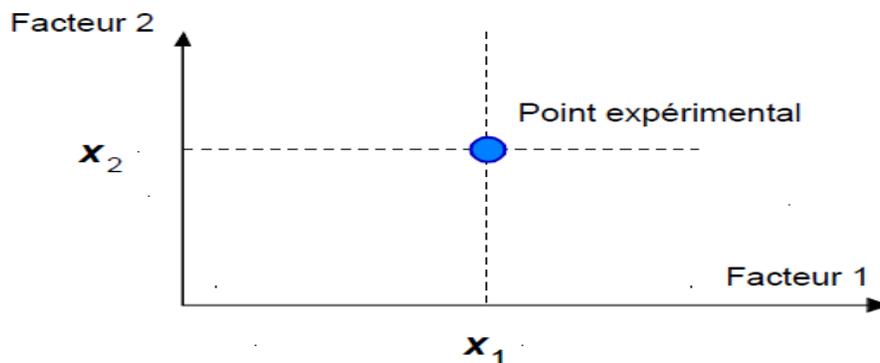


Figure 1.13 : Point expérimental (Goupy ; 2006)

1.5.4. Domaine d'étude

En pratique, l'expérimentateur choisit une partie de l'espace expérimental pour réaliser l'étude. Cette zone spéciale de l'espace expérimental est le domaine d'étude (figure 1.14). Ce domaine est défini par les niveaux élevés et faibles de tout les facteurs et éventuellement par les contraintes entre les facteurs. C'est l'ensemble de points expérimentaux (Goupy et Creighton ; 2007).

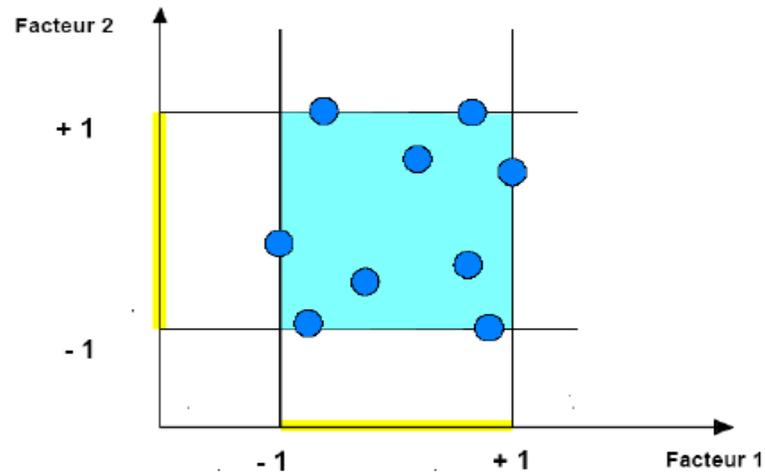


Figure 1.14 : Domaine d'étude (Goupy ; 2006)

1.5.5. Surface de réponse

Chaque point du domaine d'étude correspond à une réponse. Tous les points du domaine d'étude correspondent à un ensemble de réponses situées sur une surface. Cette surface est appelée surface de réponse (figure 1.15) (Goupy et Creighton ; 2007).

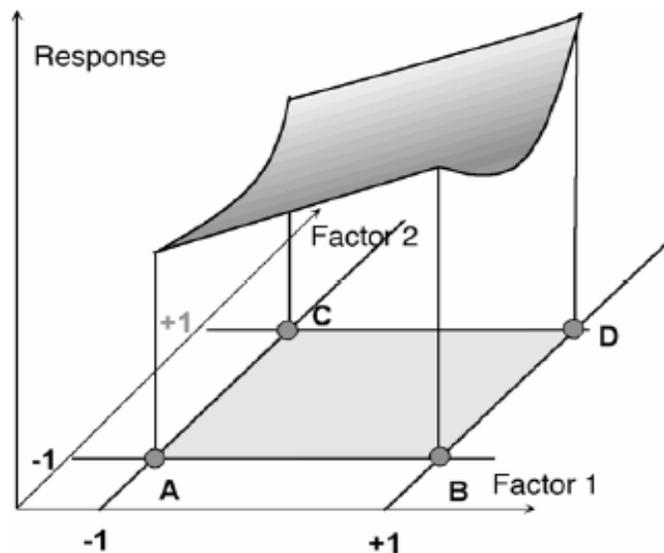


Figure 1.15 : Surface de réponse (Goupy et Creighton ; 2007)

1.5.6. Modèles de criblage

L'objectif de criblage est de filtrer les facteurs les plus importants parmi les moins importants (Trivedi *et al* ; 2015). Les plans factoriels complets, factoriels fractionnaires et Plackett-

Burman sont les plus largement utilisés dans l'étape de sélection des facteurs parce qu'ils sont économiques et efficaces (VeraCandiotti *et al* ; 2014).

Les plans factoriels peuvent être indiqués en utilisant la notation exponentielle 2^k , qui exprime de manière compacte que k facteurs avec 2 niveaux chacun sont croisés, résultant en 2^k conditions expérimentales (Collins *et al* ; 2009).

1.5.7. Modèles de surface de réponse

Lorsqu'il est nécessaire d'étudier l'interaction entre les facteurs, les effets quadratiques ou lorsque l'exigence implique le développement d'une idée en relation avec la forme de la surface de réponse, dans de telles situations, un plan de surface de réponse est utilisé (Trivedi *et al* ; 2015). Les plans les plus largement utilisés sont les plans composites centraux (CCD), Box – Behnken et Doehlert. Tous ces plans d'optimisation permettent d'obtenir des données expérimentales qui sont ensuite ajustées dans un modèle polynomial de régression linéaire multiple dans le but de caractériser une surface de réponse (Vera Candiotti *et al* ; 2014).

1.5.8. Analyse statistique

Une série de tests statistiques est essentielle pour juger la qualité du modèle obtenu après analyse des résultats expérimentaux : analyse du modèle, des coefficients du modèle et des résidus. Le but essentiel de l'analyse statistique est la définition de la qualité descriptive du modèle à l'aide du tableau d'analyse de variance (ANOVA). D'abord quelques grandeurs doivent être définies.

Soit SCT la somme des carrés totale, c'est-à-dire la somme des carrés des écarts entre les résultats d'essais (Y_{exp}) et leur moyenne (Y_{moy}):

$$SCT = \sum_{i=1}^N (Y_{exp} - Y_{moy})^2 \quad (1.1)$$

Cette quantité est composée de deux termes essentiels : SCM et SCR, elle est indépendante du modèle utilisé. La SCM représente la somme des carrés du modèle, c'est la variation des réponses calculées autour de leur moyenne (Y_{est} est la valeur estimée par le modèle):

$$SCM = \sum_{i=1}^N (Y_{est} - Y_{moy})^2 \quad (1.2)$$

Rappelant que la méthode des moindres carrés utilisée pour l'estimation des coefficients du modèle est calculée de la manière suivante :

$$Y_{moy} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N Y_{exp} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N Y_{est} \quad (1.3)$$

La SCR est la somme des carrés des résidus présentée comme suit :

$$SCR = \sum_{i=1}^N (Y_{exp} - Y_{est})^2 \quad (1.4)$$

La SCT est présentée par la relation ci-dessous, c'est une équation d'analyse de variance ou équation d'analyse de régression :

$$SCT = SCM + SCR \quad (1.5)$$

La construction d'un test statistique visant à affecter une probabilité à l'hypothèse nulle qui dit que le modèle ne permet pas de décrire la variation des résultats d'essais, est obligatoire pour l'analyse statistique du modèle. On parle alors du test de comparaison du rapport de deux variances à une valeur donnée, c'est le F_{obs} qui suit une loi de Fisher :

$$F_{obs} = \frac{SCM/(p-1)}{SCR/(n-p)} \quad (1.6)$$

Sachant que : n est le nombre d'expériences réalisées

p est le nombre de coefficients du modèle

Le test de F permet de comparer pour un risque fixé à l'avance le F_{obs} que l'on a calculé avec un $F_{critique}$ lu dans la table de Fisher-snedecor avec (p-1) et (n-p) degré de liberté.

La règle du test est :

Si : $F_{obs} < F_{crit}$, on rejette l'hypothèse de linéarité du modèle

Si : $F_{obs} > F_{crit}$, on accepte l'hypothèse de linéarité du modèle

Si la probabilité Prob (F_{obs}) ou p-value est faible (< 5 %) (Probabilité de rejeter l'hypothèse nulle), le modèle décrit alors la variation des résultats d'essais. Le tableau ANOVA (tableau 1.2) récapitule les résultats obtenus à partir de ces données.

Tableau 1.3: Table d'ANOVA

Variation due à	Sommes des carrés	ddl	Carré moyen	F
Liaison	SCM	p-1	SCM/p-1 = CMM	$F_{obs} =$ CMM/CMR
Résidus	SCR	n-p	SCR/n-p = CMR	
Totale	SCT	n-1	SCT/n-1 = CMT	

Le coefficient de détermination R^2 traduit la contribution du modèle dans la restitution de la variation de la réponse observée. Il doit être inclus dans l'intervalle $[0, 1]$. Pour mieux déterminer la qualité descriptive du modèle, on a recours au coefficient de détermination ajusté (R^2_{ajus}) :

$$R^2_{ajus} = 1 - \frac{\frac{SCR}{n-p}}{\frac{SCT}{n-1}} = 1 - CMR/CMT \quad (1.7)$$

Où : CMR : carré moyen des écarts des résidus

CMT : carré moyen des écarts expérimentaux

La qualité descriptive du modèle est satisfaisante si le R^2 et le R^2 ajusté sont proches de l'unité (Khoder ; 2011, Meghachou ; 2014).

1.5.9. Analyse graphique

Pour mieux interpréter l'équation du modèle empirique, la présentation graphique est nécessaire. Pour les plans utilisés pour l'optimisation, la présentation graphique se fait sous deux formes essentielles: les surfaces de réponses et les courbes iso-réponses.

1.5.9.1. Surface de réponses

Dans un espace à trois dimensions, une surface de réponse est représentée par un graphique matérialisant la surface de régression. Chaque réponse Y est représentée en fonction des facteurs $X1$ et $X2$.

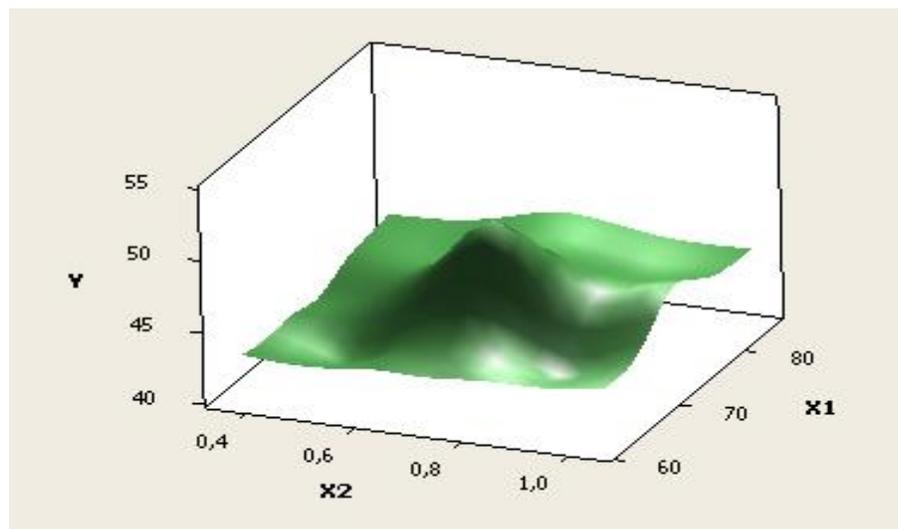


Figure 1.16 : Surface de réponse à trois dimensions

La surface de réponse représentée permet de visualiser les variations de la réponse étudiée et d'identifier la zone optimale. La figure 1.16 montre que la réponse Y présente son maximum à des taux moyens de X1 et X2.

1.5.9.2. Courbes iso-réponses

Pour mieux interpréter les surfaces de réponse, on les projette dans le plan horizontal à deux dimensions. La figure 1.17 représente une courbe iso-réponse d'une réponse Y en fonction des facteurs X1 et X2. La figure 1.17 est une projection de la surface de réponse (figure 1.16), la réponse Y présente son maximum en couleur verte foncée (Khoder ; 2011, Meghachou ; 2014).

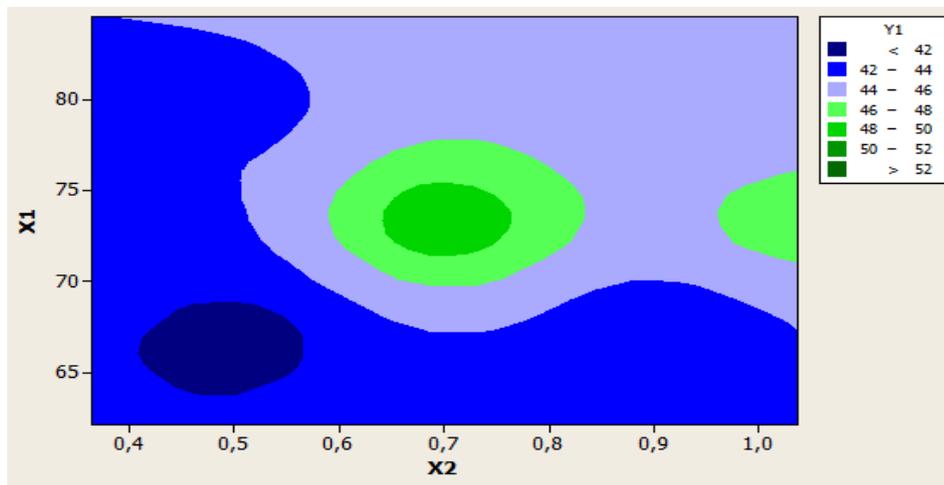


Figure 1.17: Courbe iso-réponse

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

2.1. Matériel

2.1.1. Produits

Le Diclofenac sodique (pureté de 99%) est procuré à partir du CAYMAN chemical company. L'Ethyl cellulose (viscosité 22cP, degré d'éthérisation à 48%), l'Alcool polyvinylique (degré d'hydrolyse : 87-90%, poids moléculaire : 30.000-70.000 g/mole) et les sacs de dialyse (cut-off 12 kDa) sont procurés à partir du Sigma Aldrich. L'acétate d'éthyle (VWR Chemicals), l'éthanol et le dichlorométhane sont de qualité analytique.

2.1.1.1. Diclofenac sodique

Le Diclofenac Sodique se présente sous forme de poudre faiblement hygroscopique, cristalline blanche, inodore, à goût amer qui fond à 278 °C avec une masse moléculaire de 318.1g/mole (Zhai *et al* ; 2013). La figure 2.1 représente sa formule développée.

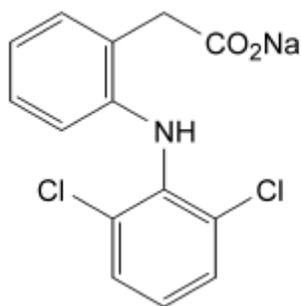


Figure 2.1 : Structure chimique du Diclofenac Sodique (**Pharmacopée Européenne 6**)

Le Diclofenac sodique est le [2-[(2,6-dichlorophényl)amino]phényl]acétate de sodium (C₁₄H₁₀Cl₂NNaO₂). Il est assez soluble dans l'eau (50 mg/ml), facilement soluble dans le méthanol, soluble dans l'éthanol et peu soluble dans l'acétone. Il présente un pKa de 4.15 (**Pharmacopée Européenne 6, Kaur et Datta ; 2014**).

2.1.1.2. Ethyl Cellulose

L'éthylcellulose (EC) est un polymère biocompatible et non biodégradable, il est l'un des matériaux d'encapsulation les plus étudiés pour la libération prolongée des produits pharmaceutiques (Kamel *et al* ; 2008). L'éthylcellulose étant un dérivé cellulosique a une structure similaire à celle de la cellulose et l'acétate de cellulose, mais certaines fonctions

hydroxyles (-OH) sont remplacées sur la cellulose par les groupements éthoxy (-O-CH₂-CH₃) (Prasertmanakit *et al* ; 2009, Davidovich-Pinhas *et al* ; 2014).

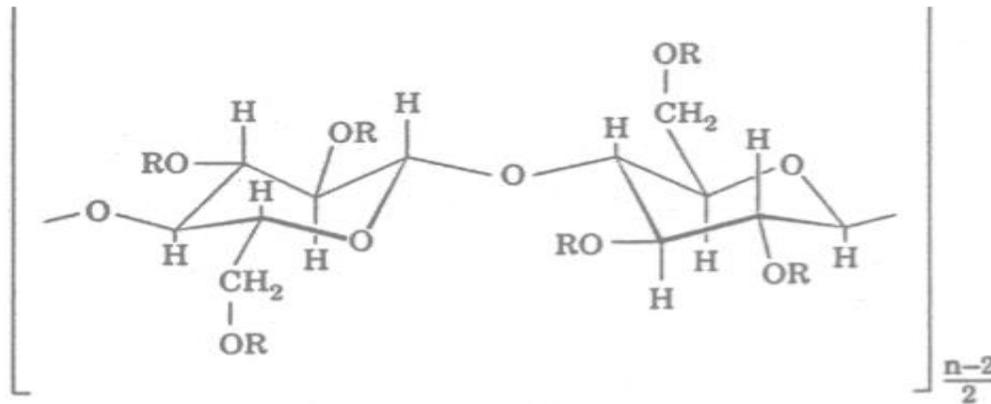


Figure 2.2 : Structure chimique de l'éthylcellulose (Roux ; 2013)

L'éthylcellulose est pratiquement insoluble dans l'eau, dans le glycérol et dans le propane-1,2-diol, mais soluble avec des proportions variables dans certains solvants organiques en fonction de la teneur en éthoxy. L'éthylcellulose contenant 46 à 48% ou plus de groupes éthoxylés est librement soluble dans l'éthanol, le méthanol, le toluène, le chloroforme, l'acétate d'éthyle et dans des mélanges d'éthanol hydrocarboné et aromatique. La structure chimique de l'éthylcellulose est illustrée dans la figure 2.2 (Rowe *et al* ; 2006, Prasertmanakit *et al* ; 2009).

2.1.1.3. Alcool polyvinylique

L'alcool polyvinylique (PVA) est un polymère synthétique(C₂H₄O)_n, biodégradable de couleur blanche, soluble dans l'eau et insoluble dans les solvants organiques, il provient de l'hydrolyse d'acétate de polyvinyle (Rowe *et al* ; 2006, Gaaz *et al* ; 2015). La structure chimique du PVA est illustrée dans la figure 2.3.

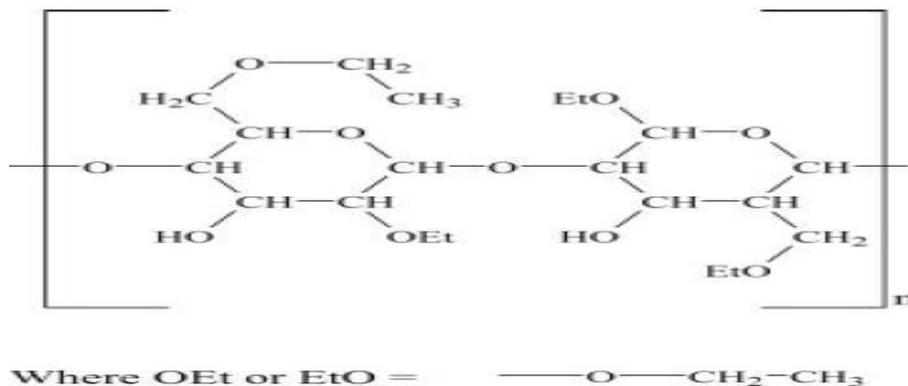


Figure 2.3 : Structure chimique de l'alcool polyvinylique (Prasertmanakit *et al* ; 2009)

Le degré de solubilité, la biodégradabilité ainsi que d'autres propriétés physiques peuvent être contrôlés en faisant varier le poids moléculaire (Mw) et le degré d'hydrolyse du polymère. L'alcool polyvinylique possède des propriétés émulsifiantes. Le caractère amphiphilique du PVA est dû à la présence de groupements acétate (partie hydrophobique) et des groupements hydroxyle (partie hydrophilique) dans les chaînes, ce qui signifie qu'il peut être adsorbé et orienté aux interfaces liquide-liquide pour réduire efficacement la tension interfaciale (Roohani *et al* ; 2008, Hassan et Peppas ; 2000).

2.1.2. Appareillages

- Balance analytique (KERN, ACS 220-4)
- Agitateur mécanique à hélice
- Agitateur magnétique chauffant (Stuart UC 152)
- Homogénéisateur (KINEMATICA, Polytron PT 2500 E)
- Etuve (Carbolite)
- pH mètre (Hanna)
- Zêta sizer (Horiba scientific, nano partica SZ-100)
- Microscope Electronique à Balayage MEB (JSM-7100F)
- UV-visible spectrophotomètre (Shimadzu, UV 1800)
- Centrifugeuse (Sigma 3-30 KS)
- Agitateur multipostes (POWER MS-M-S10)
- FT-IR spectrophotomètre (JASCO, FT/IR-6300)
- Calorimétrie différentielle à balayage (DSC 131, SETARAM instrumentation)
- Dissolutest (Distek 2500, Inc)
- Dispositif de filtration sous vide
- Microscope optique (Oxion-euromex)
- Verrerie de laboratoire.

2.2. Méthodes

2.2.1. Validation de la méthode d'analyse UV-visible

La validation d'une méthode d'analyse entraîne l'étude de plusieurs paramètres :

- ✓ Spécificité
- ✓ Linéarité
- ✓ Répétabilité et fidélité
- ✓ Limite de détection (LOD)
- ✓ Limite de quantification (LOQ)

2.2.1.1. Préparation de la solution mère

Dans une fiole de 100 ml, 10 mg de DC sont dissout par addition d'une quantité d'eau bi-distillée. Après agitation et dissolution totale du principe actif, de l'eau bi-distillée est rajoutée jusqu'à 100 ml, la concentration de la solution mère obtenue est 100 µg/ml.

2.2.1.2. Spécificité

La solution mère préparée a été analysée par spectrophotométrie UV-visible de 200 nm à 400 nm devant l'eau bi-distillée qui représente le blanc pour visualiser le pic d'absorption caractéristique de diclofenac sodique.

2.2.1.3. Linéarité

Des solutions à concentrations croissantes : 4, 10, 20, 30, 40 µg/ml ont été préparées à partir de la solution mère 100 µg/ml, puis analysées par spectrophotométrie UV-visible à $\lambda = 276\text{nm}$, cette longueur d'onde a été déterminée après balayage.

2.2.1.4. Précision

Les solutions à 20, 30, 40 µg/ml ont été analysées à 276 nm trois fois dans le même jour pour déterminer la répétabilité et sur trois jours successifs pour déterminer la fidélité (Mali *et al* ; 2015).

2.2.1.5. Limite de détection et de quantification

Les limites de détection et de quantification se calculent comme suit :

$$LOD = 3.3 \times \frac{SE}{S} \quad (2.1)$$

$$LOQ = 10 \times \frac{SE}{S} \quad (2.2)$$

Où: S: pente

SE: erreur standard de l'intercepte Y

2.2.2. Nanoparticules polymériques de diclofenac sodique

2.2.2.1. Préparation

Les nanoparticules de DC ont été préparées par la méthode d'émulsion-évaporation du solvant (figure 2.4). D'abord, 1mL d'une solution aqueuse de 10 mg de DC (phase aqueuse interne) est ajouté sous agitation magnétique rigoureuse à 5 ml de la solution organique de l'EC dans l'acétate d'éthyle. L'émulsion primaire (E/H) est ensuite diluée dans 10 ml de la solution aqueuse de PVA (phase aqueuse externe) tout en émulsifiant avec l'homogénéisateur pour obtenir une émulsion multiple E/H/E. La suspension de nanoparticules est obtenue après évaporation du solvant sous agitation magnétique à température ambiante. Les nanoparticules sont récupérées par centrifugation à 20.000 rpm pendant 20 min puis elles ont été lavées par l'eau bi-distillée et séchées à 45°C (El-Habashy *et al*; 2016).

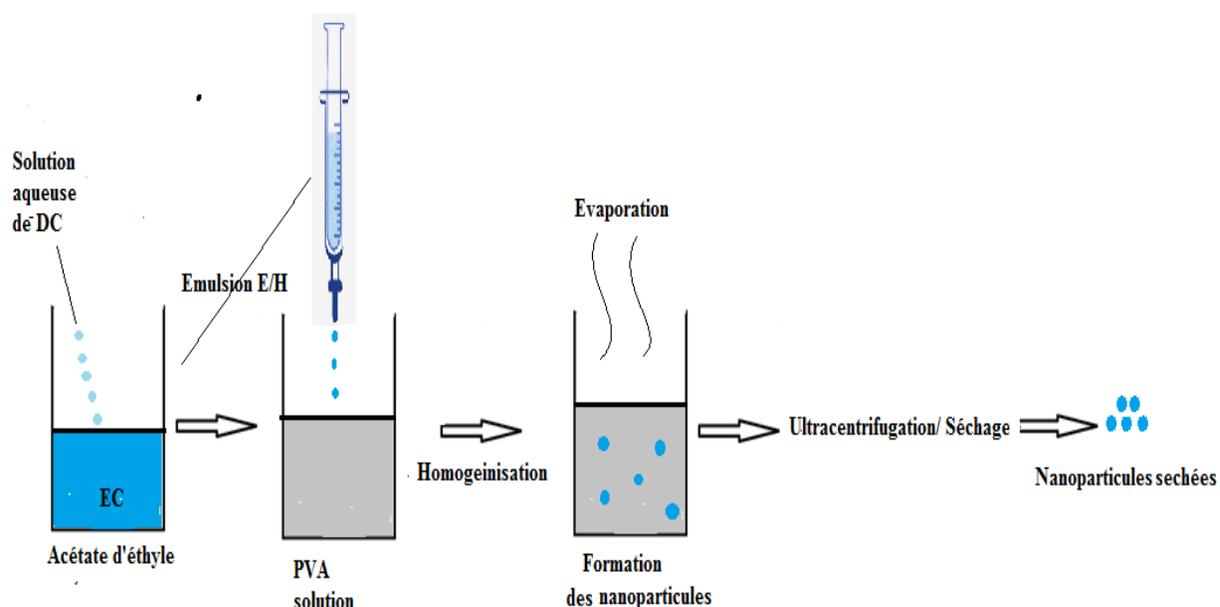


Figure 2.4 : Schéma représentatif de la méthode de préparation des nanoparticules de diclofenac sodique

2.2.2.2. Criblage des facteurs influençant par un plan factoriel complet

Les facteurs choisis qui peuvent avoir une influence sur les réponses étudiées sont :

- X1 : Ratio massique EC/DC (%) [$X_1: \frac{m_{EC}}{m_{DC} + m_{EC}} \times 100$]
- X2 : Concentration de PVA (w/v %)

- X3 : Vitesse d’homogénéisation (rpm)
- X4 : Temps d’homogénéisation (min)

Les réponses étudiées sont :

- Y1 : Taux d’efficacité d’encapsulation (EE%).
- Y2 : Taille des nanoparticules (nm)

Tableau 2.1 : Niveaux des facteurs du plan factoriel complet des nanoparticules

Facteur	Min (-1)	Max (+1)
X1 : Ratio massique EC/DC (%)	50	83.33
X2 : Concentration du PVA (m/v %)	0.1	2
X3 : Vitesse d’homogénéisation (rpm)	6000	15000
X4 : Temps d’homogénéisation (min)	3	15

Il s’agit d’un plan factoriel complet à 4 facteurs. La matrice est constituée alors de 16 expériences en total ($2^k=2^4=16$) où chaque expérience est répétée 3 fois pour la précision.

Tableau 2.2 : Matrice d’expérience du plan factoriel complet des nanoparticules

Expér- ience	X1		X2		X3		X4	
	Valeurs codées	Valeurs réelles	Valeurs codées	Valeurs réelles	Valeurs codées	Valeurs réelles	Valeurs codées	Valeurs réelles
1	-1	50	-1	0.1	-1	9000	-1	3
2	+1	83.33	-1	0.1	-1	9000	-1	3
3	-1	50	+1	2	-1	9000	-1	3
4	+1	83.33	+1	2	-1	9000	-1	3
5	-1	50	-1	0.1	+1	15000	-1	3
6	+1	83.33	-1	0.1	+1	15000	-1	3
7	-1	50	+1	2	+1	15000	-1	3
8	+1	83.33	+1	2	+1	15000	-1	3
9	-1	50	-1	0.1	-1	9000	+1	15
10	+1	83.33	-1	0.1	-1	9000	+1	15
11	-1	50	+1	2	-1	9000	+1	15

12	+1	83.33	+1	2	-1	9000	+1	15
13	-1	50	-1	0.1	+1	15000	+1	15
14	+1	83.33	-1	0.1	+1	15000	+1	15
15	-1	50	+1	2	+1	15000	+1	15
16	+1	83.33	+1	2	+1	15000	+1	15

2.2.2.3. Optimisation par un plan composite centré

L'étude de criblage a permis de sélectionner les facteurs ayant une influence significative sur les deux réponses étudiées, ces facteurs sont : X1, X2 et X3.

Tableau 2.3:Niveaux des facteurs du plan composite centré des nanoparticules

Facteur	-α	-1	0	+1	+α
X1 : Ratio massique EC/DC (%)	62.12	66.66	73.33	80	84.5
X2 : Concentration du PVA (m/v %)	0.36	0.5	0.7	0.9	1.03
X3 : Vitesse d'homogénéisation (rpm)	7318.2	8000	9000	10000	10681.8

Le nombre d'expériences total (NT) à réaliser est composé des essais du plan factoriel (NF), auquel on ajoute six points supplémentaires au centre (N0) pour évaluer la reproductibilité des mesures et l'erreur expérimentale, et deux points « axiaux » pour chaque facteur (N α).

$$N_T = N_F + N_0 + N_\alpha = 2^k + 6 + 2 \times K = 20 \quad (2.3)$$

avec : $\alpha = (2^k)^{1/4} = 1.68$

Tableau 2.4:Matrice d'expérience du plan composite centré des nanoparticules

expérience	X1		X2		X3	
	Valeurs codées	Valeurs réelles	Valeurs codées	Valeurs réelles	Valeurs codées	Valeurs réelles
1	-1	66.66	-1	0.5	-1	8000
2	+1	80	-1	0.5	-1	8000
3	-1	66.66	+1	0.9	-1	8000
4	+1	80	+1	0.9	-1	8000

5	-1	66.66	-1	0.5	+1	10000
6	+1	80	-1	0.5	+1	10000
7	-1	66.66	+1	0.9	+1	10000
8	+1	80	+1	0.9	+1	10000
9	-1.68	62.12	0	0.7	0	9000
10	+1.68	84.5	0	0.7	0	9000
11	0	73.33	-1.68	0.36	0	9000
12	0	73.33	+1.68	1.03	0	9000
13	0	73.33	0	0.7	-1.68	7318.2
14	0	73.33	0	0.7	+1.68	10681.8
15	0	73.33	0	0.7	0	9000
16	0	73.33	0	0.7	0	9000
17	0	73.33	0	0.7	0	9000
18	0	73.33	0	0.7	0	9000
19	0	73.33	0	0.7	0	9000
20	0	73.33	0	0.7	0	9000

Pour déterminer la formulation optimale à partir des deux réponses on a recours à la méthode de D-optimalité. Pour cela les deux réponses doivent être maximisées ou minimisées selon le but recherché (tableau 2.5).

Tableau 2.5 : Limites inférieures est supérieures de réponses des nanoparticules

Réponses	Limites
Y1: EE (%)	Maximiser (20-100)
Y2: taille (nm)	Minimiser (100-400)

Pour déterminer la formulation optimale, on doit calculer la D-composite des 2 réponses. La D-composite est calculée selon la formule suivante :

$$D = \sqrt{d1 \times d2} \tag{2.4}$$

Avec :

$$d1, d2 = \frac{Yi - Ymin}{Ymax - Ymin} \tag{2.5}$$

Yi : réponse expérimentale de chaque essai

Y_{min}, Y_{max} : réponses minimales et maximales supposées pour chaque réponse

2.2.2.4. Caractérisation

a. Taux d'efficacité d'encapsulation

La méthode indirecte pour déterminer le taux d'efficacité d'encapsulation a été utilisée. Après centrifugation de la suspension des nanoparticules, le surnageant a été prélevé et dilué par l'eau bi-distillée puis examiné par spectroscopie UV-visible à 276 nm pour quantifier le DC non encapsulé. Le taux d'efficacité d'encapsulation est calculé de la façon suivante :

$$\text{Efficacité d'encapsulation} = \frac{\text{masse initiale du DC} - \text{masse du DC non encapsulé}}{\text{masse initiale du DC}} \times 100 \quad (2.6)$$

b. Taille et forme

La taille des nanoparticules est mesurée par la technique de diffusion dynamique de la lumière à 25°C en utilisant un Zetasizer. Chaque échantillon est mesuré trois fois pour la précision, une moyenne est alors calculée.

La morphologie de la formulation optimale des nanoparticules est observée par un microscope électronique à balayage (MEB). D'abord la poudre des nanoparticules issue du séchage du culot après centrifugation est déposée sur une lame métallique et fixée par un ruban adhésif. Puis la lame est recouverte du charbon noir conducteur. Enfin la morphologie des nanoparticules est observée par diffraction d'électrons secondaires.

c. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)

Les poudres de DC, EC et la formulation optimale des nanoparticules polymériques de DC sont analysées par spectrophotométrie FTIR à température ambiante entre 400 et 4000 cm⁻¹ pour révéler tout type de dégradation ou interaction chimique possible entre le polymère et le principe actif après formulation.

d. Calorimétrie différentielle à balayage (DSC)

Les thermogrammes de DC, EC et la formulation optimale des nanoparticules polymériques de DC sont déterminés par calorimétrie différentielle à balayage. Deux à trois milligrammes de chaque échantillon sont déposés dans un creuset en aluminium fermé puis analysés sous argon de 20 à 300°C avec une vitesse de chauffe 10°C /min. L'intérêt d'analyser le DC pur et

l'EC est d'identifier le point de fusion du principe actif et la température de transition vitreuse du polymère (Tg), respectivement. La formulation optimale des NP est analysée par DSC pour observer une modification du possible point de fusion du DC.

e. Dissolution *in vitro*

L'étude de la dissolution *in vitro* est élaborée dans un dissolutest USP type II (Palette) à 50 rpm et à température de 37 °C ± 0.5. Dans des sacs de dialyse de cellulose, une quantité de la poudre de la formulation optimale des nanoparticules qui contient 4.6 mg du DC a été diluée par la solution saline du tampon phosphate (PBS, pH=7.4), puis immergée dans les flacons de pyrex contenant 500 ml de PBS (pH=7.4) qui constitue le milieu de dissolution utilisé dans cette étude. Trois millimètres du milieu de dissolution sont prélevés à chaque intervalle de temps et analysés par spectrophotométrie UV-visible après avoir été filtrés (0.45 µm) et dilués pour quantifier le DC libéré. Le test de dissolution *in vitro* a été répété trois fois, la moyenne est utilisée pour tracer la courbe de dissolution *in vitro* et identifier la cinétique de libération.

Les résultats de l'essai de dissolution *in vitro* sont analysés selon plusieurs modèles. Le choix du modèle convenable est basé sur le coefficient de régression de pearson R². Les différents modèles : ordre zéro, premier ordre, Higuchi et Korsemeyer-peppas sont représentés par les équations ci-dessous respectivement.

$$Q_t = K_0 t \tag{2.7}$$

$$\ln Q_t = \ln Q_0 - K_1 t \tag{2.8}$$

$$Q_t = K_h t^{1/2} \tag{2.9}$$

$$\frac{Q_t}{Q_\infty} = K_p t^n \tag{2.10}$$

Où :

- Q_t : pourcentage du principe actif libéré a temps t
- Q_0 : quantité initiale du principe actif présentée dans la formulation étudiée
- K_0, K_1, K_h et K_p : constantes
- Q_t/Q_∞ : fraction du principe actif libérée a temps t
- n : exposant de diffusion qui caractérise le mécanisme de transport.

Le coefficient de régression est déterminé à partir des graphes déterminés comme suit :

- taux cumulé du principe actif vs. temps (ordre Zéro)
- Log du taux cumulé du principe actif vs. temps (premier ordre)

- taux cumulé du principe actif vs racine au carrée du temps (modèle d'Higuchi)
- Log du taux cumulé du principe actif vs. Log temps (modèle de Korsmeyer-Peppas).

Pour le modèle de Korsmeyer-Peppas, les premiers 60% du principe actif libérés sont ajustés pour calculer l'exposant "n" qui indique le mécanisme de libération du principe actif. Selon la théorie de Korsmeyer, si $n < 0.45$ la libération du principe actif suit le mécanisme de diffusion fickienne, si $0.45 < n < 0.89$ la libération suit une diffusion anormale (non-Fickienne), si $n > 0.89$ la libération est du type Super Case II (Lokhande *et al* ; 2013).

f. Test d'irritation HET-CAM

Le test HET-CAM ou test sur la membrane chorioallantoïque (CAM) de l'œuf de poule a pour intérêt d'évaluer la tolérance oculaire par rapport à une formulation développée. La CAM est un organe respiratoire pour l'embryon de poule, c'est une membrane vivante richement vascularisée qui permet l'étude d'une réaction inflammatoire possible (Bagley *et al* ; 1994).

Des œufs de poule fécondés ont été incubés à 37 ± 0.5 ° C et tournés toutes les 12 h pendant dix jours. Les œufs ont été testés avec une torche le dixième jour pour visualiser la chambre d'air. A l'aide d'une pince, les coquilles des œufs ont été grattées autour de la chambre d'air. En faisant attention aux vaisseaux sanguins sous-jacents, quelques gouttes de l'eau distillée ont été utilisées pour humidifier la membrane interne afin d'exposer la CAM.

Tableau 2.6 : Résultats des phénomènes observés pour le test HET-CAM (Derouiche et Abdenour ; 2017)

Effet	Résultats		
	0.5 min	2 min	5 min
Hyperémie	5	3	1
Hémorragie	7	5	3
Coagulation	9	7	5

Un volume bien déterminé (300 µl) de Dicloce[®](collyre de DC commercialisé) et des nanoparticules polymériques de DC a été instillé sur la surface CAM. Des solutions de NaOH 0.1 N (témoin positif) et de NaCl à 0.9% (témoin négatif) ont été instillées sur la surface CAM. Pour chaque test, l'essai est répété quatre fois pour déterminer la moyenne. Après 30 secondes, 2 min et 5min, des signes d'atteinte vasculaire tels que l'hyperémie, l'hémorragie et

la coagulation ont été examinés pour pouvoir calculer le résultat d'irritation (SI) selon le tableau 2.6 (Zhao *et al* ; 2017, Derouiche et Abdenour ; 2017).

Le tableau 2.7 indique la classification de l'irritation selon les valeurs d'SI.

Tableau 2.7: Intervalle des résultats d'irritation pour le test HET-CAM
(Derouiche et Abdenour, 2017)

Résultat d'irritation (SI)	Evaluation d'irritation
0-0.9	Pas d'irritation
1-4.9	Irritation légère
5-8.9	Irritation modérée
9-21	Irritation sévère

2.2.3. Microsponges de diclofenac sodique

2.2.3.1. Préparation

Les microsponges de DC ont été préparées par la méthode quasi émulsion-diffusion du solvant (ESD) (figure 2.5). D'abord, 1mL d'une solution aqueuse de 10 mg DC (phase aqueuse interne) est ajouté sous agitation magnétique rigoureuse à 5 ml d'une solution organique de l'EC dans un mélange d'éthanol et dichlorométhane (v:v ; 1 :1). L'émulsion primaire formée (E/H) est ensuite diluée dans 50 ml de la solution aqueuse de PVA (phase aqueuse externe) tout en émulsifiant avec un agitateur mécanique à hélice pour obtenir une émulsion multiple E/H/E. La suspension de microsponges est obtenue après évaporation du solvant sous agitation mécanique à température ambiante pendant 2 heures. Les microsponges sont récupérées par filtration sous vide (0.45µm) et rinçage par l'eau distillée (Ratnaparakhi *et al* ; 2015).

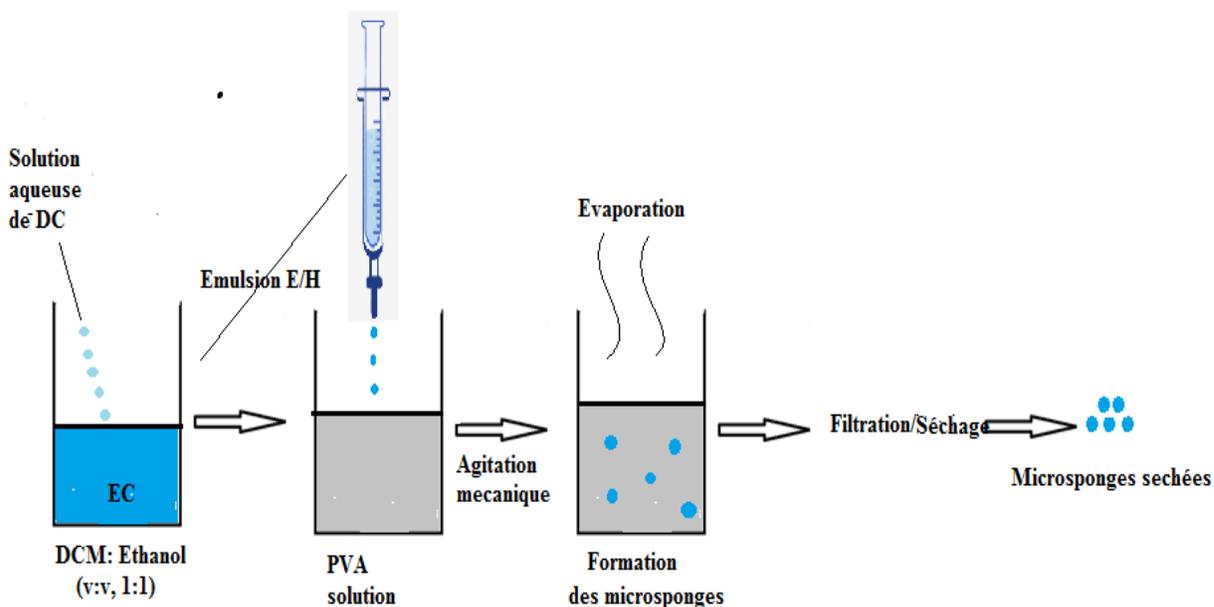


Figure 2.5 : Schéma représentatif de la méthode de préparation des microsponges de diclofenac sodique

2.2.3.2. Criblage des facteurs influençant par un plan factoriel complet

Les facteurs qui peuvent avoir une influence sur les réponses étudiées sont :

- X1 : Ratio massique EC/DC (%) $[X_1: \frac{m_{EC}}{m_{DC} + m_{EC}} \times 100]$
- X2 : Concentration de PVA (w/v %)
- X3 : Vitesse d'agitation (rpm)

Les réponses sont :

- Y1 : Taux d'efficacité d'encapsulation (EE%).
- Y2 : Rendement de production des microsponges (RY%)

Tableau 2.8 : Niveaux des facteurs du plan factoriel complet des microsponges

Facteur	Min (-1)	Max (+1)
X1 : Ratio massique EC/DC (%)	50	80
X2 : Concentration du PVA (m/v %)	0.1	1
X3 : Vitesse d'agitation (rpm)	400	1200

Il s'agit d'un plan factoriel complet à 3 facteurs. La matrice est constituée alors de 8 expériences en total ($2^k=2^3=8$) où chaque expérience est répétée 3 fois pour la précision.

Tableau 2.9 : Matrice d'expérience du plan factoriel complet des microsponges

Expérience	X1		X2		X3	
	Valeurs codées	Valeurs réelles	Valeurs codées	Valeurs réelles	Valeurs codées	Valeurs réelles
1	-1	50	-1	0.1	-1	400
2	+1	80	-1	0.1	-1	400
3	-1	50	+1	1	-1	400
4	+1	80	+1	1	-1	400
5	-1	50	-1	0.1	+1	1200
6	+1	80	-1	0.1	+1	1200
7	-1	50	+1	1	+1	1200
8	+1	80	+1	1	+1	1200

2.2.3.3. Optimisation par un plan composite centré

L'étude de criblage a permis de sélectionner les facteurs ayant une influence significative sur les deux réponses étudiées, ces facteurs sont : X1 et X2.

Tableau 2.10: Niveaux des facteurs du plan composite centré des microsponges

Facteur	- α	-1	0	+1	+ α
X1 : Ratio massique EC/DC (%)	70.10	71.42	74.59	77.77	79.08
X2 : Concentration du PVA (m/v %)	0.23	0.30	0.45	0.60	0.66

Le nombre d'expériences total (NT) à réaliser est de 13 avec 5 points centraux (K=2).

$$N_T = N_F + N_0 + N_\alpha = 2^k + 5 + 2 \times K = 13 \quad (2.11)$$

$$\alpha = (2^k)^{1/4} = 1.41$$

Tableau 2.11:Matrice d'expérience du plan composite centré des microsponges

expérience	X1		X2	
	Valeurs codées	Valeurs réelles	Valeurs codées	Valeurs réelles
1	-1	71.42	-1	0.30
2	+1	77.77	-1	0.30
3	-1	71.42	+1	0.60
4	+1	77.77	+1	0.60
5	-1.41	70.10	0	0.45
6	+1.41	79.08	0	0.45
7	0	74.59	-1.41	0.23
8	0	74.59	+1.41	0.66
9	0	74.59	0	0.45
10	0	74.59	0	0.45
11	0	74.59	0	0.45
12	0	74.59	0	0.45
13	0	74.59	0	0.45

Pour déterminer la formulation optimale, on doit calculer la D-composite des 2 réponses par la même méthode employée pour les nanoparticules polymériques citée ci-dessus. Pour cela les deux réponses doivent être maximisées (tableau 2.12).

Tableau 2.12: Limites inférieures est supérieures de réponses des microsponges

Réponses	Limites
Y1: EE (%)	Maximiser (10-60)
Y2: RY (%)	Maximiser (30-80)

2.2.3.4. Caractérisation

a. Taux d'efficacité d'encapsulation

La méthode indirecte pour déterminer le taux d'efficacité d'encapsulation est utilisée ; le filtrat de la suspension des microsponges est dilué par l'eau bi-distillée puis examiné par

spectroscopie UV-visible à 276 nm pour quantifier le DC non encapsulé. Le taux d'efficacité d'encapsulation est calculé par la même méthode des nanoparticules citée ci-dessus.

b. Rendement de production

Le rendement de production est déterminé après pesée des microsponges séchées à 45°C par la méthode suivante :

$$\text{Rendement} = \frac{\text{masse des microsponges}}{\text{masse initiale(DC+EC)}} \times 100 \quad (2.12)$$

c. Taille et forme

La taille et la morphologie de la formulation optimale des microsponges sont observées par un microscope optique menu d'une camera pour capture des images et détermination de la taille. La poudre des microsponges issue du séchage après filtration est déposée sur une lame en verre et recouverte par une lamelle. La morphologie est observée et la taille moyenne de 100 particules est déterminée.

d. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)

Les poudres de DC, EC et la formulation optimale des microsponges sont analysées par FTIR spectrophotométrie à température ambiante entre 400 et 4000 cm^{-1} pour révéler tout type de dégradation ou interaction chimique possible entre le polymère et le principe actif après formulation.

e. Dissolution *In vitro*

L'étude de la dissolution *in vitro* est élaborée dans un dissolutest USP type II (Palette) avec 50 rpm comme vitesse d'agitation et à température de 32 °C \pm 0.5. Dans des sacs de dialyse de cellulose, la poudre de la formulation optimale des microsponges qui contient 3.16 mg du DC sont dilués par la solution saline du tampon phosphate (PBS, pH=5.8), puis immergés dans les flacons de pyrex contenant 500 ml de PBS (pH=5.8) qui constitue le milieu de dissolution utilisé dans cette étude. Trois millimètres du milieu de dissolution sont prélevés à chaque intervalle de temps et analysés par spectrophotométrie UV-visible après avoir été filtrés (0.45 μm) et dilués pour quantifier le DC libéré. Le test de dissolution *in vitro* est réalisé en trois exemplaires, la moyenne est utilisée pour tracer la courbe de dissolution *in vitro* et identifier la cinétique de libération. Les résultats de l'essai de dissolution *in vitro* sont analysés selon plusieurs modèles. Le choix du modèle convenable est basé sur le coefficient de régression R^2 .

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

3.1. Validation de la méthode d'analyse du diclofenac sodique

3.1.1. Spécificité

Le spectre du diclofenac sodique obtenu de l'analyse de la solution mère par UV-visible montre un pic unique à $\lambda=276$ nm. Ce ci confirme la spécificité de cette méthode.

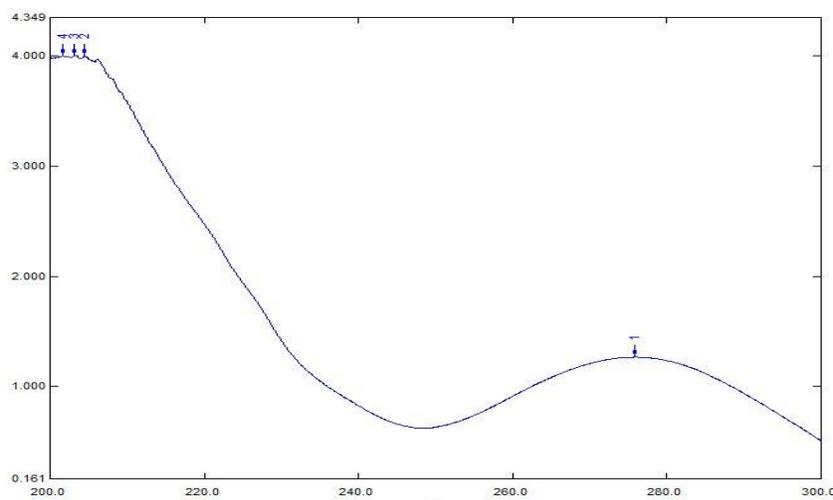


Figure 3.1 : Spectre UV-visible du Diclofenac Sodique

3.1.2. Linéarité

La méthode étant linéaire dans l'intervalle 4 à 40 $\mu\text{g} / \text{ml}$. Le coefficient de régression (R^2) pour la courbe standard est égal à 1, et la droite d'étalonnage a comme équation: $A= 0.031C-0.002$

Où : A : absorbance, C : concentration

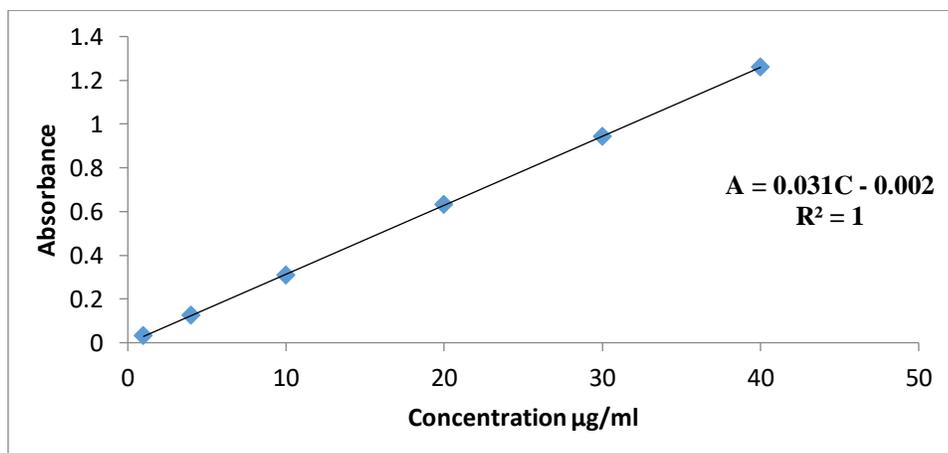


Figure 3.2 : Courbe de calibration du Diclofenac Sodique

3.1.3. Précision

Le tableau 3.1 montre les résultats de la répétabilité et la fidélité. L'écart type résiduel calculé pour les deux variations est faible et est inférieur à 10%, donc la méthode est précise (Desquilbet ; 2021).

Tableau 3.1: Valeurs de la répétabilité et lafidélité (précision)

C (µg/ml)	Répétabilité			Fidélité		
	Moyenne (µg/ml)	Ecart type (SD, µg/ml)	Ecart type résiduel (RSD) %	Moyenne (µg/ml)	Ecart type (SD, µg/ml)	Ecart type résiduel (RSD) %
40	40.63	0.421	1.036	40.67	0.096	0.237
30	30.33	0.493	1.627	30.49	0.018	0.061
20	18.93	0.547	2.891	19.77	0.958	4.844

3.1.4. Limite de détection et limite de quantification

Tableau 3.2 : Limite de détection et de quantification

S	SE	LOD	LOQ
0.031	0.002 µg/ml	0.225 µg/ml	0.683 µg/ml

3.2. Nanoparticules polymériques du diclofenac sodique

Les nanoparticules du Diclofenac sodique, un médicament anti-inflammatoire, ont été formulées et préparées avec succès par un procédé d'émulsion-évaporation du solvant. Les nanoparticules ont été formées suite a la succession de plusieurs étapes, en premier lieu des gouttelettes de l'émulsion ont été formées où l'éthylcellulose est dissous dans la phase organique. Par la suite, l'éthylcellulose précipite autour du diclofenac sodique et forme les nanoparticules après diffusion de la phase organique (acétate d'éthyle) dans la phase aqueuse externe et évaporation progressive du solvant en cours de l'agitation. La diffusion du solvant organique dans la phase aqueuse entraîne une diminution de la solubilité de l'éthylcellulose dans les gouttelettes ce qui favorise son précipitation et la formation des particules sphériques encapsulant le DC ; c'est les nanoparticules.

3.2.1. Criblage par le plan factoriel complet

Le logiciel Minitab® a été utilisé pour analyser les résultats de l'étude de criblage, le tableau 3.3 résume les résultats du plan de criblage.

Tableau 3.3 : Résultats du plan factoriel complet des nanoparticules

Expérience	X1(%)	X2(m/v %)	X3(rpm)	X4(min)	Y1(%)	Y2 (nm)
1	50	0.1	9000	3	45.63	179.00
2	83.33	0.1	9000	3	46.06	291/00
3	50	2	9000	3	46.27	384.70
4	83.33	2	9000	3	50.26	382.63
5	50	0.1	15000	3	32.60	134.60
6	83.33	0.1	15000	3	44.85	153.06
7	50	2	15000	3	37.55	273.40
8	83.33	2	15000	3	42.20	271.56
9	50	0.1	9000	15	41.03	184.60
10	83.33	0.1	9000	15	49.65	216.66
11	50	2	9000	15	45.66	339.20
12	83.33	2	9000	15	50.05	418.70
13	50	0.1	15000	15	36.15	234.50
14	83.33	0.1	15000	15	37.95	186.75
15	50	2	15000	15	36.30	367.50
16	83.33	2	15000	15	44.30	237.15

On déduit les coefficients et le modèle complet des deux réponses Y1 et Y2 :

$$\begin{aligned}
 Y1 = & 42.90 + 2.75X_1 + 1.16X_2 - 3.91X_3 - 0.27X_4 - 0.12X_1X_2 + 0.57X_1X_3 + 0.09X_1X_4 \\
 & - 0.06X_2X_3 + 0.27X_2X_4 - 0.04X_3X_4 - 2.81X_1X_2X_3 - 2.39X_1X_2X_4 \\
 & - 3.74X_1X_3X_4 - 2.51X_2X_3X_4 - 1.41X_1X_2X_3X_4 \quad (3.1)
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 Y2 = & 265.94 + 3.75X_1 + 68.42X_2 - 33.62X_3 + 7.19X_4 - 10.60X_1X_2 - 23.94X_1X_3 - \\
 & 12.07X_1X_4 - 13.33X_2X_3 - 0.91X_2X_4 + 16.97X_3X_4 - 2.26X_1X_2X_3 + 6.20X_1X_2X_4 - \\
 & 12.27X_1X_3X_4 - 8.32X_2X_3X_4 - 19.53X_1X_2X_3X_4 \quad (3.2)
 \end{aligned}$$

3.2.1.1. Analyse graphique des résultats

a. Effets principaux

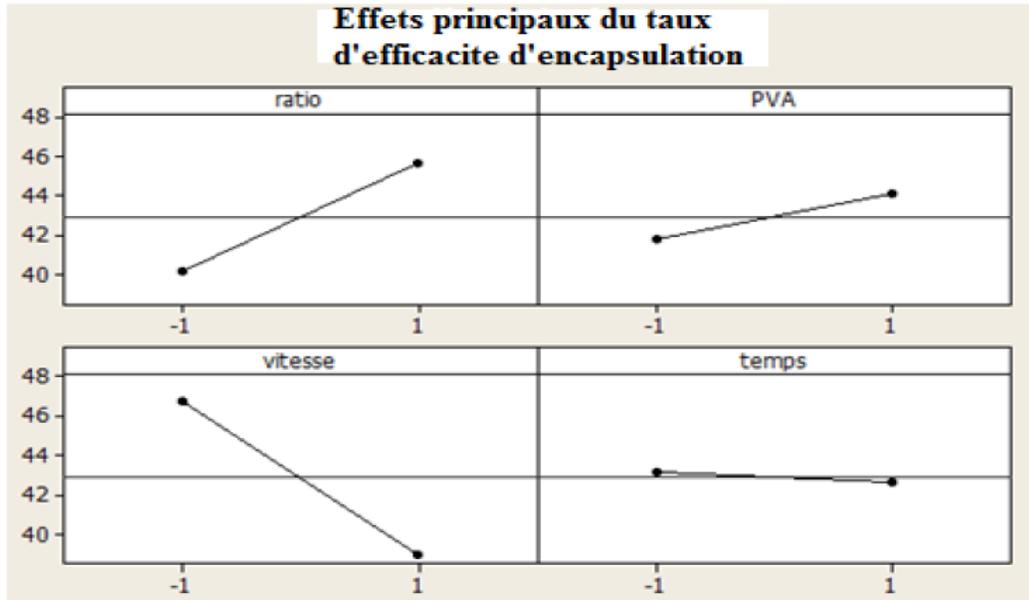


Figure 3.3 : Effets principaux du taux d'efficacité d'encapsulation des nanoparticules

Les facteurs : ratio massique DC/EC (X1), et concentration de PVA (X2) ont un effet proportionnel sur la réponse Y1 (taux d'efficacité d'encapsulation). Par contre, la vitesse d'homogénéisation (X3) a un effet inversement proportionnel sur la réponse Y1. Quant au temps d'homogénéisation (X4), l'effet sur la réponse Y1 est négligeable (figure 3.3).

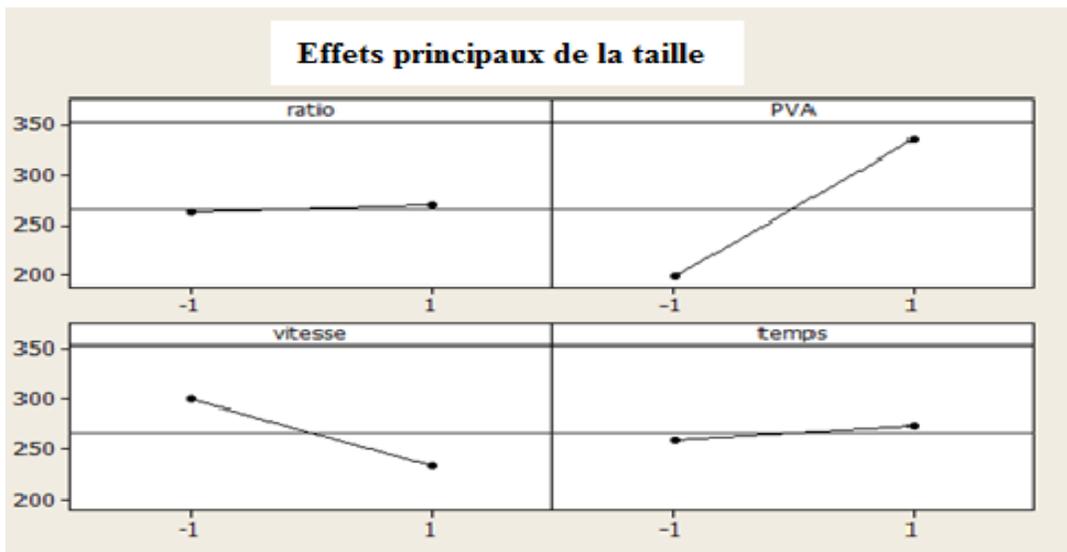


Figure 3.4 : Effets principaux de la taille des nanoparticules

La concentration du PVA (X2) présente un effet proportionnel sur la réponse Y2, (taille des nanoparticules), contrairement à la vitesse d'homogénéisation (X3) qui présente un effet inversement proportionnel. les deux facteurs ratio massique DC/EC (X1) et le temps d'homogénéisation (X4) n'ont presque aucun effet sur la réponse Y2 (figure 3.4).

b. Effets des interactions

L'interaction entre les différents facteurs est presque nulle, elles n'ont aucune influence sur la réponse Y1 (taux d'efficacité d'encapsulation) (figure 3.5).

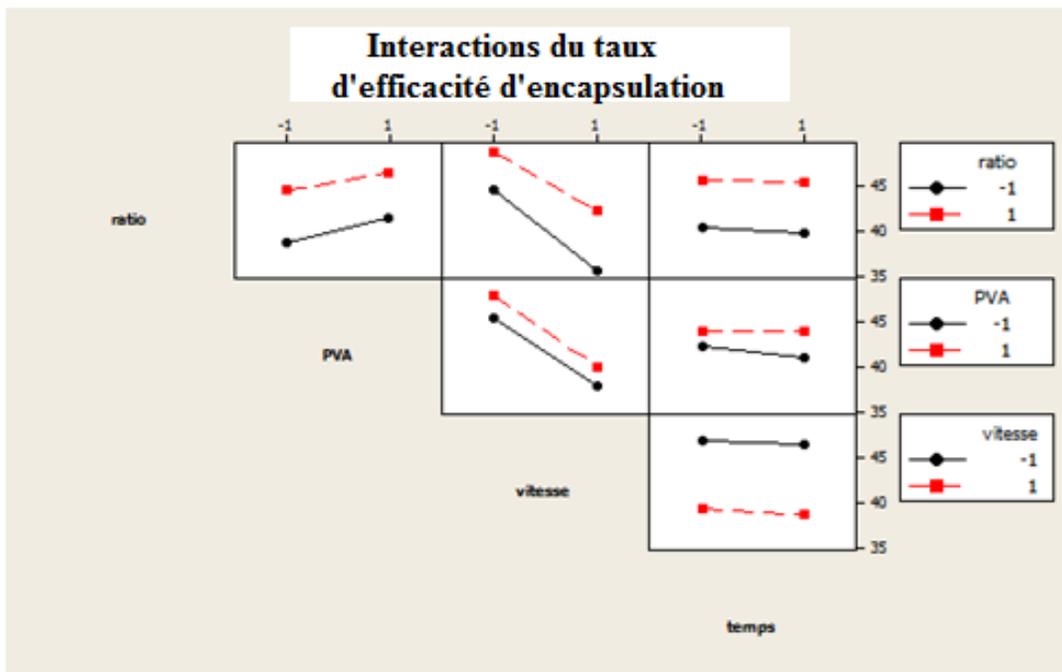


Figure 3.5: Effets des interactions sur le taux d'efficacité d'encapsulation des nanoparticules

L'interaction du ratio massique DC/EC (X1) avec les trois autres facteurs : concentration du PVA (X2), vitesse (X3) et temps d'homogénéisation (X4) a une grande influence sur la taille des nanoparticules (Y2), l'interaction de la concentration du PVA avec la vitesse et le temps d'homogénéisation est très faible ce qui signifie qu'elle n'a aucune influence sur la réponse Y2. l'interaction du temps d'homogénéisation avec la vitesse d'homogénéisation est remarquable et a un impact sur la réponse Y2 (figure 3.6).

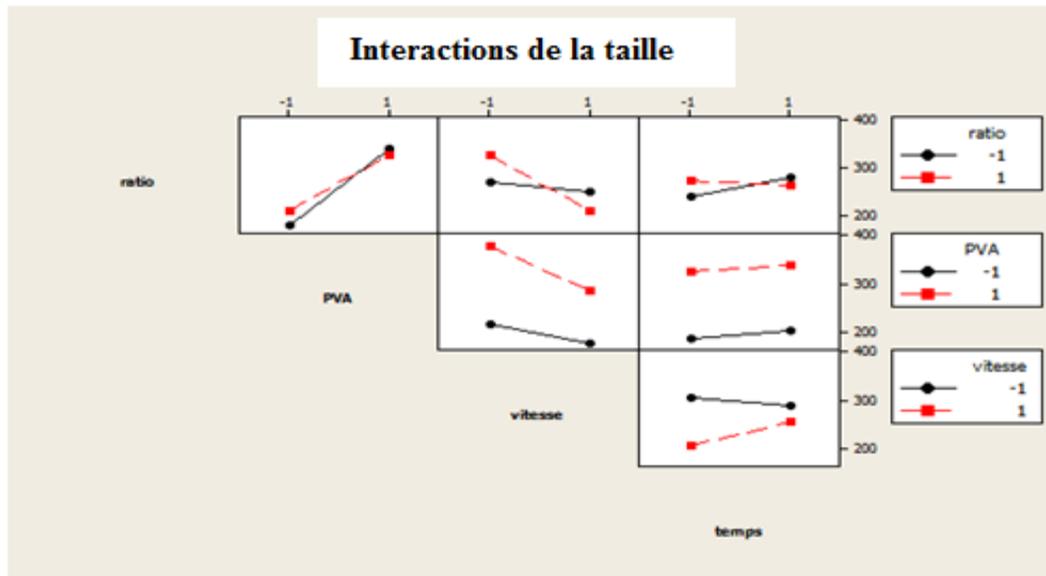


Figure 3.6 : Effets des interactions sur la taille des nanoparticules

3.2.1.2. Analyse statistique des résultats

a. Taux d'efficacité d'encapsulation Y1

En éliminant les interactions du troisième et quatrième degré $X_1X_2X_3$, $X_1X_2X_4$, $X_1X_3X_4$, $X_2X_3X_4$, $X_1X_2X_3X_4$ le modèle sera :

$$EE = 42.90 + 2.75 \text{ Ratio} + 1.16\text{PVA} - 3.91\text{Vitesse} - 0.27\text{Temps} - 0.12\text{Ratio.PVA} + 0.57\text{Ratio.Vitesse} + 0.09\text{Ratio.Temps} - 0.06\text{PVA.Vitesse} + 0.27\text{PVA.Temps} - 0.04\text{Vitesse.Temps} \quad (3.3)$$

Le tableau 3.4 montre les résultats du modèle linéaire avec interactions de Y1

Tableau 3.4: Table d'estimation des effets de criblage du taux d'efficacité d'encapsulation des nanoparticules (Avec interactions entre X1, X2, X3, X4, p-value < 0.05, $t_{crit} = 2.57$)

	Coefficient	Poids	t_i	p-value	Effet
a_0	Constante	42.907	55.50	0.000	Significatif
a_1	Ratio	2.758	3.57	0.016	Significatif
a_2	PVA	1.167	1.51	0.192	Non significatif
a_3	Vitesse	-3.919	5.06	0.004	Significatif
a_4	Temps	-0.271	0.35	0.741	Non significatif
a_{12}	Ratio×PVA	-0.129	0.17	0.874	Non significatif
a_{13}	Ratio×Vitesse	0.579	0.75	0.487	Non significatif

a ₁₄	Ratio×Temps	0.093	0.12	0.909	Non significatif
a ₂₃	PVA×Vitesse	-0.067	0.09	0.934	Non significatif
a ₂₄	PVA×Temps	0.274	0.35	0.737	Non significatif
a ₃₄	Vitesse×Temps	-0.042	0.05	0.959	Non significatif

D’après les résultats observés, on peut conclure que le modèle linéaire avec interactions n’est pas valable ($R^2= 0.89$, $R^2_{ajus}=0.67$). Pour améliorer la qualité du modèle et identifier les facteurs influençant, les interactions ayant un $p\text{-value} > 5\%$, ou un $t_i < t_{crit}$ ($t_{crit}=2.57$) sont éliminées.

Après élimination des interactions Ratio× PVA, Ratio×Vitesse, Ratio×Temps, PVA×Vitesse, PVA×Temps, Vitesse×Temps le modèle devient :

$$EE = 42.90 + 2.75 \text{ Ratio} + 1.16PVA - 3.91Vitesse - 0.27Temps \quad (3.4)$$

Avec le nouveau $t_{crit}=2.20$

Le tableau 3.5 montre les résultats du nouveau modèle de la réponse Y1.

Tableau 3.5: Table d’estimation des effets de criblage du taux d’efficacité d’encapsulation des nanoparticules (sans interactions entre X1, X2, X3, X4, $p\text{-value} < 0.05$, $t_{crit} = 2.20$)

	Coefficient	Poids	t_i	p-value	Effet
a ₀	Constante	42.907	76.83	0.000	Significatif
a ₁	Ratio	2.758	4.94	0.000	Significatif
a ₂	PVA	1.167	2.09	0.061	Non significatif
a ₃	Vitesse	-3.919	7.02	0.000	Significatif
a ₄	Temps	-0.271	0.48	0.637	Non significatif

Les facteurs : ratio massique DC/EC et vitesse d’homogénéisation ont un effet significatif sur l’efficacité d’encapsulation ($p\text{-value} < 5\%$, $t_i > t_{crit}$). Les facteurs : concentration du PVA et temps d’homogénéisation présentent une valeur de $p > 5\%$ ($t_i < t_{crit}$) ce qui signifie leur non influence sur la réponse Y1.

Le tableau d’ANOVA ci-dessous montre que le modèle statistique choisi est valide car on a : $p\text{-value} = 0.000 < 0.05$, $R^2=0.87$ et $R^2_{ajus} = 0.83$.

De la table de Fisher : $F_{cri}=3.36$, $F_{obs} > F_{cri}$, on accepte alors l’hypothèse de linéarité du modèle.

Tableau 3.6 : Table d’ANOVA criblage du taux d’efficacité d’encapsulation des nanoparticules

Source de variance	SCE	ddl	CM	F _{obs}	p-value	R ²	R ² _{ajus}
Liaison	390.457	4	97.614	19.56	0.000	0.87	0.83
Résiduel	54.896	11	4.991				
Total	445.354	15					

b. Taille des nanoparticules Y2

En éliminant les interactions du troisième et quatrième degré X1X2X3, X1X2X4, X1X3X4, X2X3X4, X1X2X3X4 le modèle sera :

$$\begin{aligned} \text{Taille} = & 265.94 + 3.75 \text{ Ratio} + 68.42\text{PVA} - 33.6\text{Vitesse} + 7.19\text{Temps} - \\ & 10.60\text{Ratio.PVA} - 23.94\text{Ratio.Vitesse} - 12.07\text{Ratio.Temps} - 13.33\text{PVA.Vitesse} - \\ & 0.91\text{PVA.Temps} + 16.97\text{Vitesse.Temps} \end{aligned}$$

(3.5)

Le tableau 3.6 montre les résultats du modèle linéaire avec interactions de Y2.

Tableau 3.7 : Table d’estimation des effets de criblage de la taille des nanoparticules (p-value < 0.05, t_{crit} = 2.57)

Coefficient		Poids	t _i	p-value	Effet
a ₀	constante	265.94	27.75	0.000	Significatif
a ₁	Ratio	3.75	0.39	0.712	Non significatif
a ₂	PVA	68.42	7.14	0.001	Significatif
a ₃	Vitesse	-33.62	3.51	0.017	Significatif
a ₄	Temps	7.19	0.75	0.487	Non significatif
a ₁₂	Ratio×PVA	-10.60	1.11	0.319	Non significatif
a ₁₃	Ratio×Vitesse	-23.94	2.50	0.055	Non significatif
a ₁₄	Ratio×Temps	-12.07	1.26	0.264	Non significatif
a ₂₃	PVA×Vitesse	-13.33	1.39	0.223	Non significatif
a ₂₄	PVA×Temps	-0.91	0.10	0.928	Non significatif
a ₃₄	Vitesse×Temps	16.97	1.77	0.137	Non significatif

Les facteurs : concentration du PVA et vitesse d'homogénéisation ont un effet significatif (p -value < 5%, $t_i > t_{crit}$, $t_{crit} = 2.57$) sur la taille des nanoparticules. Aucun effet n'est constaté pour le ratio massique DC/EC, temps d'homogénéisation et les interactions entre les facteurs ($p < 5\%$, $t_i > t_{crit}$).

Le tableau d'ANOVA ci-dessous montre que le modèle statistique choisi est valide car on a : p -value = 0.005 < 0,05, $R^2 = 0.93$ et $R^2_{ajus} = 0.81$.

De la table de Fisher : $F_{cri} = 3.36$, $F_{obs} > F_{cri}$, on accepte alors l'hypothèse de linéarité du modèle.

Tableau 3.8 : Table d'ANOVA criblage de la taille des nanoparticules

Source de variance	SCE	ddl	CM	F _{obs}	p-value	R ²	R ² _{ajus}
Liaison	94035	4	23508.0	16.00	0.005	0.93	0.81
Résiduel	7347	5	1469.3				
Total	122137	15					

3.2.1.3. Discussion

Des études préliminaires ont été élaborées pour augmenter le taux d'efficacité d'encapsulation par acidification de la solution aqueuse externe du PVA ($pH < pK_a$ du DC) afin de rendre le DC à l'état non ionique et donc hydrophobe, cela augmente son piégeage par l'EC. Après avoir rendu la solution acide ($pH = 2 < pK_a = 4.15$), le EE a été amélioré jusqu'à 96.6%, tandis que la taille a remarquablement augmenté jusqu'à 986 nm avec un indice de polydispersité de 0.945. Le but recherché est l'optimisation des 2 réponses : EE et taille des nanoparticules, on remarque une amélioration du EE en dépit de la taille, cela peut engendrer un problème de stabilité et de libération. Pour avoir un EE et une taille convenable, on n'a pas intérêt à acidifier la phase aqueuse externe. Pour cela, tous les essais du criblage et optimisation ont été formulés sans diminution du pH de la solution aqueuse du PVA.

Selon cette étude, il a été observé que l'efficacité d'encapsulation augmentait avec le ratio massique, cela peut être dû à une augmentation de la viscosité de la phase interne par augmentation de la concentration de l'éthylcellulose, entraînant ainsi une diminution de la diffusion de principe actif vers la phase externe au cours de la formulation par épaissement de la paroi des nanoparticules (Swathi et Krishna Sailaja ; 2014, Ghaderi *et al* ; 2014,

Lokhande et al ; 2013).

L'augmentation du taux d'efficacité d'encapsulation en fonction de la concentration du PVA peut être expliquée par la stabilité des gouttelettes de l'émulsion suite à la quantité importante du surfactant (**Ghaderi et al ; 2014**). Sarkar *et al* (**2019**) expliquent l'amélioration du taux d'efficacité d'encapsulation avec l'augmentation de la concentration du PVA par la réduction de la tension interfaciale de l'émulsion primaire qui permet la diffusion du principe actif dans le cœur des particules, contrairement à **Fang et al (2014)** qui supposent que l'augmentation de la viscosité réduit la diffusion du principe actif à partir de l'émulsion primaire E/H. Une autre supposition par **Budhian et al (2007)** qui indiquent que le taux d'efficacité d'encapsulation augmente suite à l'augmentation de la taille des nanoparticules.

L'élévation de la vitesse d'homogénéisation entraîne la formation de petites gouttelettes ce qui augmente la surface spécifique et par conséquent favorise la diffusion du DC à partir de la phase aqueuse interne vers la phase aqueuse externe et la diminution du taux d'efficacité d'encapsulation (**Jain et al ; 2012**).

L'influence du ratio massique sur la taille des nanoparticules est faiblement proportionnelle, cela peut être dû à l'augmentation de la viscosité de l'émulsion qui rend la diffusion du solvant organique vers la phase aqueuse externe difficile et engendre des particules de taille plus importante (**Fahmy et al ; 2018, Tefas et al ; 2015, Lokhande et al ; 2013**).

La concentration du PVA augmente la viscosité de la phase aqueuse externe ce qui diminue le taux de cisaillement et favorise la coalescence, en effet la taille des nanoparticules est plus importante, (**Guhagarkar et al ; 2009, Tefas et al ; 2015, Budhian et al ; 2007**). Sharma *et al* (**2015**) pensent que le PVA se gélifie à l'interface H/E grâce aux liaisons hydrogènes fortes inter et intra moléculaire, où une partie du principe actif diffuse vers la phase aqueuse externe et se solubilise en micelles à l'aide de surfactant PVA qui diminue sa concentration et augmente par conséquent la taille des nanoparticules formées.

La taille des nanoparticules est aussi influencée par la vitesse d'homogénéisation, plus la vitesse est élevée plus le taux de cisaillement est important et plus la taille des gouttelettes de l'émulsion est faible, en plus de l'énergie libérée qui aide à la dispersion rapide du solvant de la phase organique ce qui permet la formation des nanoparticules de faible taille (**Jain et al ; 2012, Sarkar et al ; 2019, Kheradmandnia et al ; 2010, Sharma et al ; 2015**)

3.2.2. Optimisation par le plan composite centré

Après avoir réalisé les 20 expériences, on a obtenu les résultats suivants (tableau 3.9).

Tableau 3.9 : Résultats du plan composite centré des nanoparticules

Expérience	Facteurs			Réponses		D
	X ₁ (%)	X ₂ (w/v %)	X ₃ (rpm)	Y1 (%)	Y2 (nm)	
1	66.66	0.5	8000	41.50	224.06	0.393
2	80	0.5	8000	44.30	236.66	0.409
3	66.66	0.9	8000	43.36	271.73	0.351
4	80	0.9	8000	45.40	275.30	0.347
5	66.66	0.5	10000	40.73	215.00	0.407
6	80	0.5	10000	42.50	209.70	0.421
7	66.66	0.9	10000	40.70	241.30	0.366
8	80	0,9	10000	43.25	264.50	0.364
9	62.11	0.7	9000	42.80	252.70	0.373
10	84.54	0.7	9000	45.75	265.10	0.384
11	73.33	0.36	9000	42.25	199.60	0.427
12	73.33	1.03	9000	46.75	303.10	0.343
13	73.33	0.7	7318	46.70	275.30	0.382
14	73.33	0.7	10681	43.50	227.40	0.406
15	73.33	0.7	9000	53.43	241.60	0.446
16	73.33	0.7	9000	49.06	247.30	0.446
17	73.33	0.7	9000	48.70	241.30	0.446
18	73.33	0.7	9000	51.25	237.50	0.446
19	73.33	0.7	9000	52.81	268.30	0.446
20	73.33	0.7	9000	50.90	237.60	0.446

$$Y_1 = 51.07 + 1.03X_1 + 0.82X_2 - 0.93X_3 - 2.7 X_1^2 - 2.62X_2^2 - 2.41 X_3^2 + 0.002X_1X_2 - 0.06X_1X_3 - 0.28X_2X_3 \quad (3.6)$$

$$Y_2 = 245.99 + 4.02X_1 + 25X_2 - 11.55X_3 + 2.15 X_1^2 - 0.51X_2^2 - 0.51 X_3^2 + 2.43X_1X_2 + 0.21X_1X_3 - 0.65X_2X_3 \quad (3.7)$$

3.2.2.1. Analyse statistique des résultats

a. Taux d'efficacité d'encapsulation Y1

D'après les résultats présentés dans le tableau 3.10, il est évident que le modèle secondaire avec interactions n'est pas valable ($R^2= 0.90$, $R^2_{ajus}=0.82$). Pour améliorer la qualité du modèle, les interactions entre les 3 facteurs peuvent être supprimées ($p\text{-value} > 5\%$, $t_i < t_{crit}$, $t_{crit}=2.22$).

Tableau 3.10 : Table d'estimation des effets d'optimisation du taux d'efficacité d'encapsulation des nanoparticules (avec interactions entre X1, X2, X3, $p\text{-value} < 0.05$, $t_{crit}= 2.22$)

Coefficient		Poids	t_i	p-value	Effet
a ₀	Constante	51.074	73.835	0.000	Significatif
a ₁	Ratio	1.034	2.235	0.048	Significatif
a ₂	PVA	0.823	1.795	0.103	Non significatif
a ₃	Vitesse	-0.934	2.036	0.069	Non significatif
a ₁₁	Ratio×Ratio	-2.707	6.059	0.000	Significatif
a ₂₂	PVA×PVA	-2.627	5.881	0.000	Significatif
a ₃₃	Vitesse×Vitesse	-2.415	5.406	0.000	Significatif
a ₁₂	Ratio×PVA	0.002	0.004	0.997	Non significatif
a ₁₃	Ratio×Vitesse	-0.065	0.108	0.916	Non significatif
a ₂₃	PVA×Vitesse	-0.280	0.467	0.651	Non significatif

Après élimination des interactions Ratio× PVA, Ratio×Vitesse, PVA×Vitesse, le modèle devient :

$$EE = 51.07 + 1.03 \text{ Ratio} + 0.82\text{PVA} - 0.93\text{Vitesse} - 2.7\text{Ratio}^2 - 2.62\text{PVA}^2 - 2.41\text{Vitesse}^2 \quad (3.8)$$

D'après les valeurs des coefficients des facteurs obtenus dans cette étude (tableau 3.11) et leur p-value, on déduit que les facteurs ratio massique DC/EC et vitesse d'homogénéisation

ainsi que les interactions : Ratio×Ratio, PVA×PVA, Vitesse×Vitesse sont statistiquement significatives car elles présentent une p-value < 5% et $t_i > t_{crit}$ ($t_{crit}=2.16$), le facteur concentration du PVA n'a aucune influence sur le taux d'efficacité d'encapsulation (p-value > 5%, $t_i < t_{crit}$).

Tableau 3.11 : Table d'estimation des effets d'optimisation du taux d'efficacité d'encapsulation des nanoparticules (sans interactions ; p-value < 0.05, $t_{crit} = 2.16$)

Coefficient		Poids	t_i	p-value	Effet
a ₀	Constante	51.074	83.234	0.000	Significatif
a ₁	Ratio	1.034	2.540	0.025	Significatif
a ₂	PVA	0.823	2.023	0.064	Non significatif
a ₃	Vitesse	-0.934	2.295	0.039	Significatif
a ₁₁	Ratio×Ratio	-2.707	6.831	0.000	Significatif
a ₂₂	PVA×PVA	-2.627	6.630	0.000	Significatif
a ₃₃	Vitesse×Vitesse	-2.415	6.095	0.000	Significatif

Le tableau d'ANOVA ci-dessous montre que le modèle statistique choisi est valide car on a : p-value = 0.000 < 0.05, $R^2=0.90$ et $R^2_{ajus} = 0.85$.

De la table de Fisher : $F_{cri}=2.92$, $F_{obs} > F_{cri}$, on accepte alors l'hypothèse de linéarité du modèle.

Tableau 3.12 : Table d'ANOVA optimisation du taux d'efficacité d'encapsulation des nanoparticules

Source de variance	SCE	ddl	CM	F _{obs}	P-value	R ²	R ² aj
Liaison	277.242	6	46.207	20.41	0.000	0.90	0.85
Résiduel	29.427	13	2.264				
Total	306.669	19					

b. Taille des nanoparticules

D'après les résultats présentés dans le tableau 3.13, le modèle secondaire avec interactions n'est pas valable ($R^2= 0.86$, $R^2_{ajus}=0.73$). Il est donc nécessaire d'éliminer les interactions entre les 3 facteurs (p-value > 5%, $t_i < t_{crit}$, $t_{crit}=2.22$).

Tableau 3.13 : Table d'estimation des effets d'optimisation de la taille des nanoparticules (avec interactions entre X1, X2, X3 ; p-value < 0.05, t_{crit} = 2.22)

Coefficient		Poids	t _i	p-value	Effet
a ₀	Constante	245.990	46.032	0.000	Significatif
a ₁	Ratio	4.022	1.143	0.238	Non significatif
a ₂	PVA	25.004	7.052	0.000	Significatif
a ₃	Vitesse	-11.555	3.259	0.009	Significatif
a ₁₁	Ratio×Ratio	2.152	0.623	0.547	Non significatif
a ₂₂	PVA×PVA	-0.518	0.150	0.884	Non significatif
a ₃₃	Vitesse×Vitesse	-0.518	0.150	0.884	Non significatif
a ₁₂	Ratio×PVA	2.434	0.525	0.611	Non significatif
a ₁₃	Ratio×Vitesse	0.216	0.047	0.964	Non significatif
a ₂₃	PVA×Vitesse	-0.651	0.141	0.891	Non significatif

Après élimination des interactions Ratio× PVA, Ratio×Vitesse, PVA×Vitesse, le modèle devient :

$$\text{Taille} = 245.99 + 4.02 \text{ Ratio} + 25\text{PVA} - 11.55\text{Vitesse} + 2.15\text{Ratio}^2 - 0.51\text{PVA}^2 - 0.51\text{Vitesse}^2 \quad (3.9)$$

D'après les valeurs des coefficients des facteurs obtenus dans cette étude (tableau 3.14) et leur p-value, on déduit que seuls les facteurs concentration du PVA et vitesse d'homogénéisation sont significatives avec une p-value < 5% et t_i > t_{crit} (t_{crit}=2.16), le facteur ratio massique DC/EC et les interactions : ratio*ratio, PVA*PVA, Vitesse*Vitesse sont non significatives, ils n'ont aucune influence sur la réponse Y2 (p-value > 5%, t_i < t_{crit}).

Tableau 3.14 : Table d'estimation des effets d'optimisation de la taille des nanoparticules (sans interactions entre X1, X2, X3 ; p-value < 0.05, t_{crit} = 2.16)

Coefficient		Poids	t _i	p-value	Effet
a ₀	Constante	245.990	51.720	0.000	Significatif
a ₁	Ratio	4.022	1.274	0.225	Non significatif
a ₂	PVA	25.004	7.924	0.000	Significatif
a ₃	Vitesse	-11.555	3.662	0.003	Significatif

a ₁₁	Ratio×Ratio	2.152	0.700	0.496	Non significatif
a ₂₂	PVA×PVA	-0.518	0.169	0.869	Non significatif
a ₃₃	Vitesse×Vitesse	-0.518	0.169	0.869	Non significatif

Le tableau d’ANOVA ci-dessous montre que le modèle statistique choisi est valide car on a: $p\text{-value} = 0.000 < 0.05$, $R^2=0.87$ et $R^2_{\text{ajus}}=0.79$.

De la table de Fisher : $F_{\text{cri}}=2.92$, $F_{\text{obs}} > F_{\text{cri}}$, on accepte alors l’hypothèse de linéarité du modèle.

Tableau 3.15 : Table d’ANOVA optimisation de la taille des nanoparticules

Source de variance	SCE	ddl	CM	F _{obs}	P-value	R ²	R ² aj
Liaison	10663.6	6	1777.27	13.07	0.000	0.85	0.79
Résiduel	1768.0	13	136.00				
Total	12431.6	19					

3.2.2.2. Analyse graphique des résultats

a. Taux d’efficacité d’encapsulation Y1

La figure 3.7 montre une surface de réponse qui récapitule la variation de la réponse Y1 (taux d’efficacité d’encapsulation) en fonction des trois facteurs: ratio massique DC/EC (X1), concentration du PVA (X2) et vitesse d’homogénéisation (X3) dans l’espace à 3 dimensions. Dans ce graphique, la réponse passe par un maximum dans les 3 cas. Pour mieux visualiser la région de ce maximum, la surface 3D est projetée sur un plan bidimensionnel [OX1X2] comme la montre la figure 3.8.

Les lignes du contour représentent la réponse constante qui correspond aux valeurs de 42, 44, 46, 48, 50, 52%. Les points en noir représentent les valeurs expérimentales obtenues. Le contour comportant la couleur verte foncée dans le centre représente le taux d’efficacité d’encapsulation le plus élevé. Le taux d’efficacité d’encapsulation diminue lorsqu’on se déplace des extrémités vers le centre.

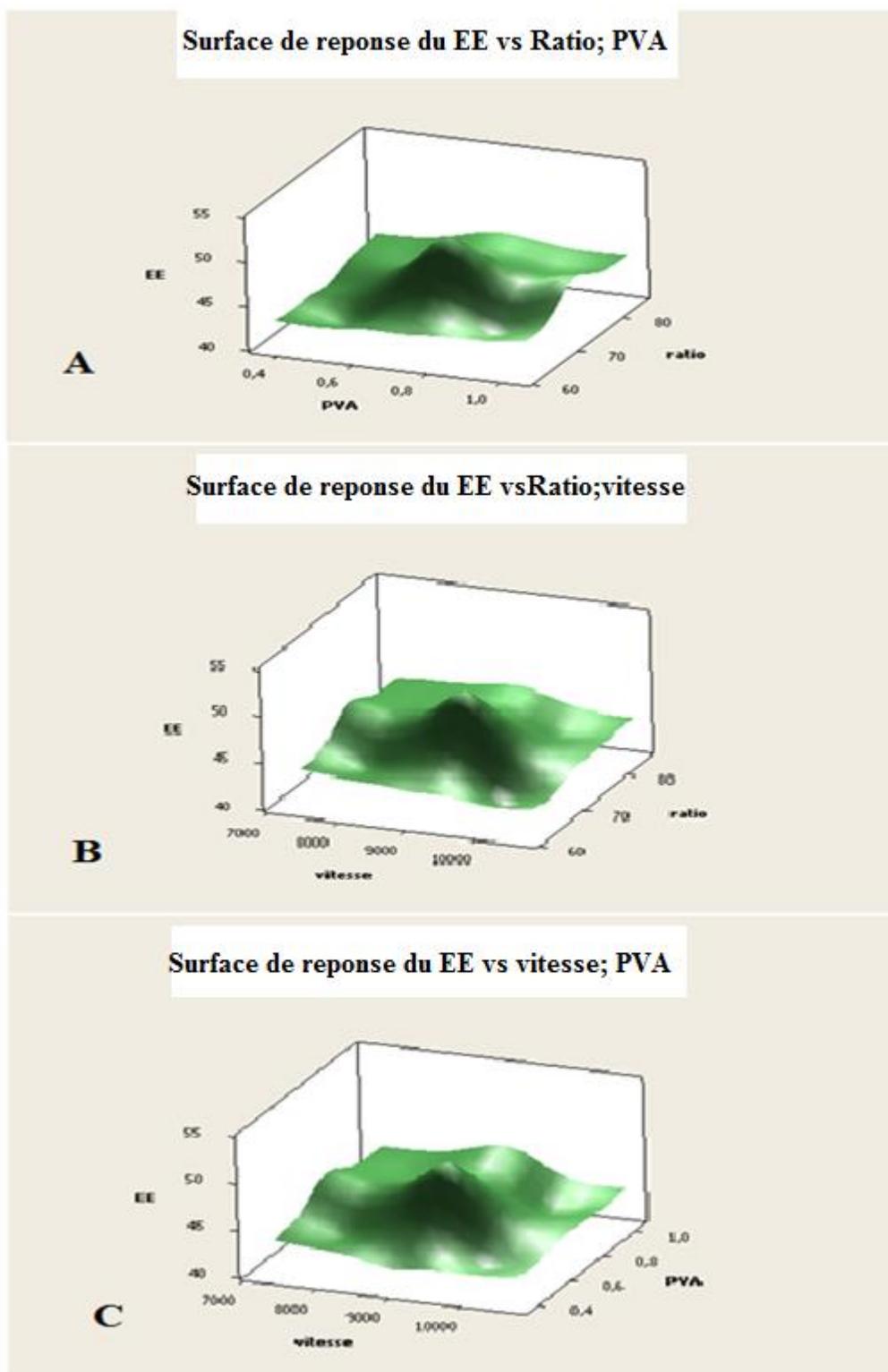


Figure 3.7 : Représentation tridimensionnelle des effets du ratio massique et concentration du PVA (A) ratio massique et vitesse d’homogénéisation (B) concentration du PVA et vitesse d’homogénéisation (C) sur le taux d’efficacité d’encapsulation des nanoparticules

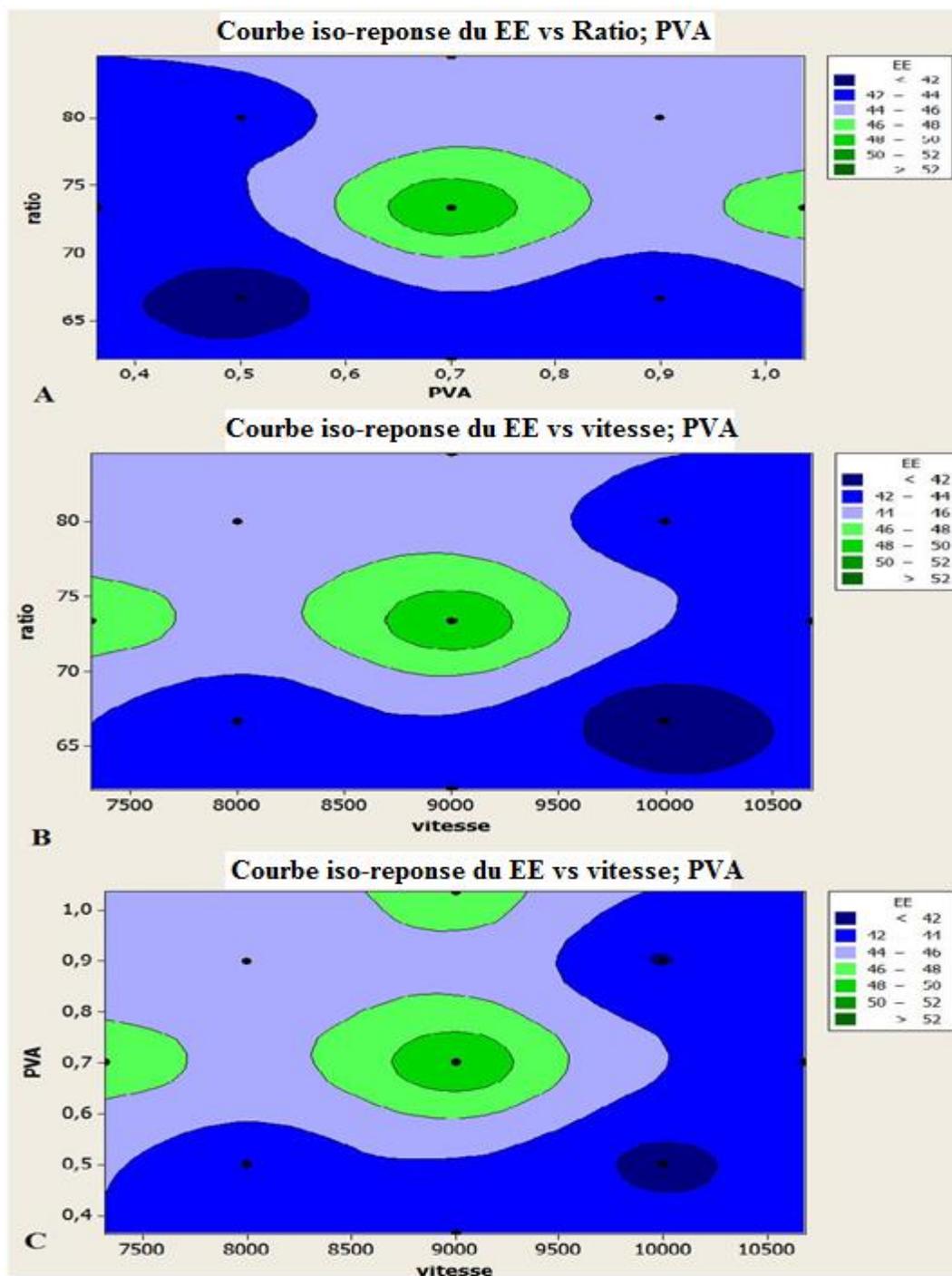


Figure 3.8 : Représentation d’effets ratio massique et concentration du PVA (A) ratio massique et vitesse d’homogénéisation (B) concentration du PVA et vitesse d’homogénéisation (C) sur le taux d’efficacité d’encapsulation des nanoparticules par une courbe iso-réponse

b. Taille des nanoparticules Y2

La figure 3.9 montre une surface de réponse de la réponse Y2 (taille des nanoparticules) en fonction des trois facteurs: ratio massique DC/EC (X1), concentration du PVA (X2) et vitesse d'homogénéisation (X3) dans l'espace à 3 dimensions. Dans ce graphique, la forme est irrégulière, la réponse présente des hauts et des bas sur les intervalles choisis des facteurs.

Pour mieux visualiser la région de ce maximum, la surface 3D est projetée sur un plan bidimensionnel [OX1X2] comme la montre la figure 3.10

Les lignes du contour représentent la réponse constante qui correspond aux valeurs de 200, 220, 240, 260, 280, 300 nm. Les points en noir représentent les valeurs expérimentales obtenues. Le contour comportant la couleur bleue au niveau des extrémités représente la taille la plus petite. La taille diminue lorsqu'on se déplace vers les extrémités en augmentant la vitesse et diminuant la concentration du PVA.

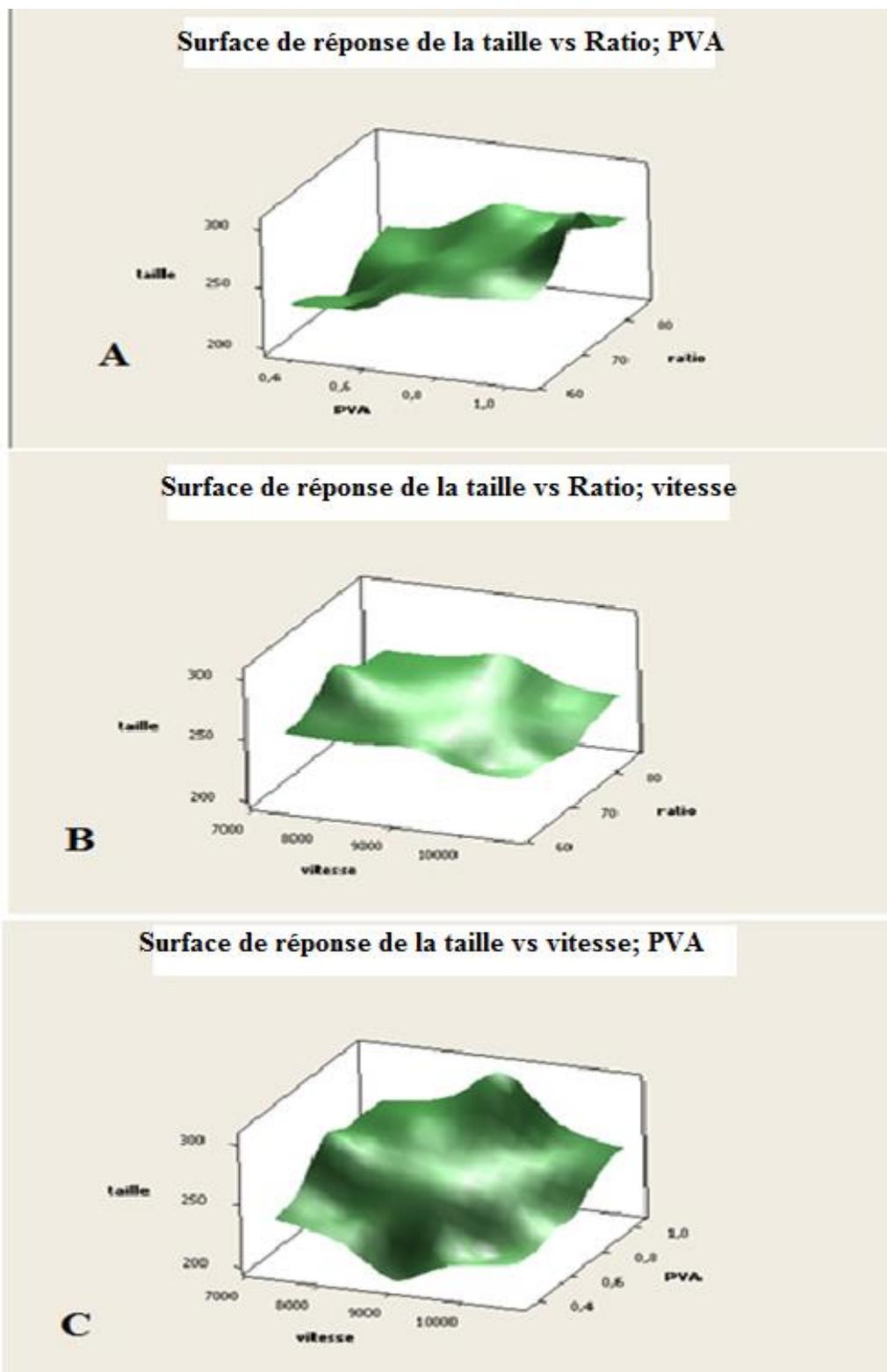


Figure 3.9 : Représentation tridimensionnelle des effets du ratio massique et concentration du PVA (A) ratio massique et vitesse d’homogénéisation (B) concentration du PVA et vitesse d’homogénéisation (C) sur la taille des nanoparticules

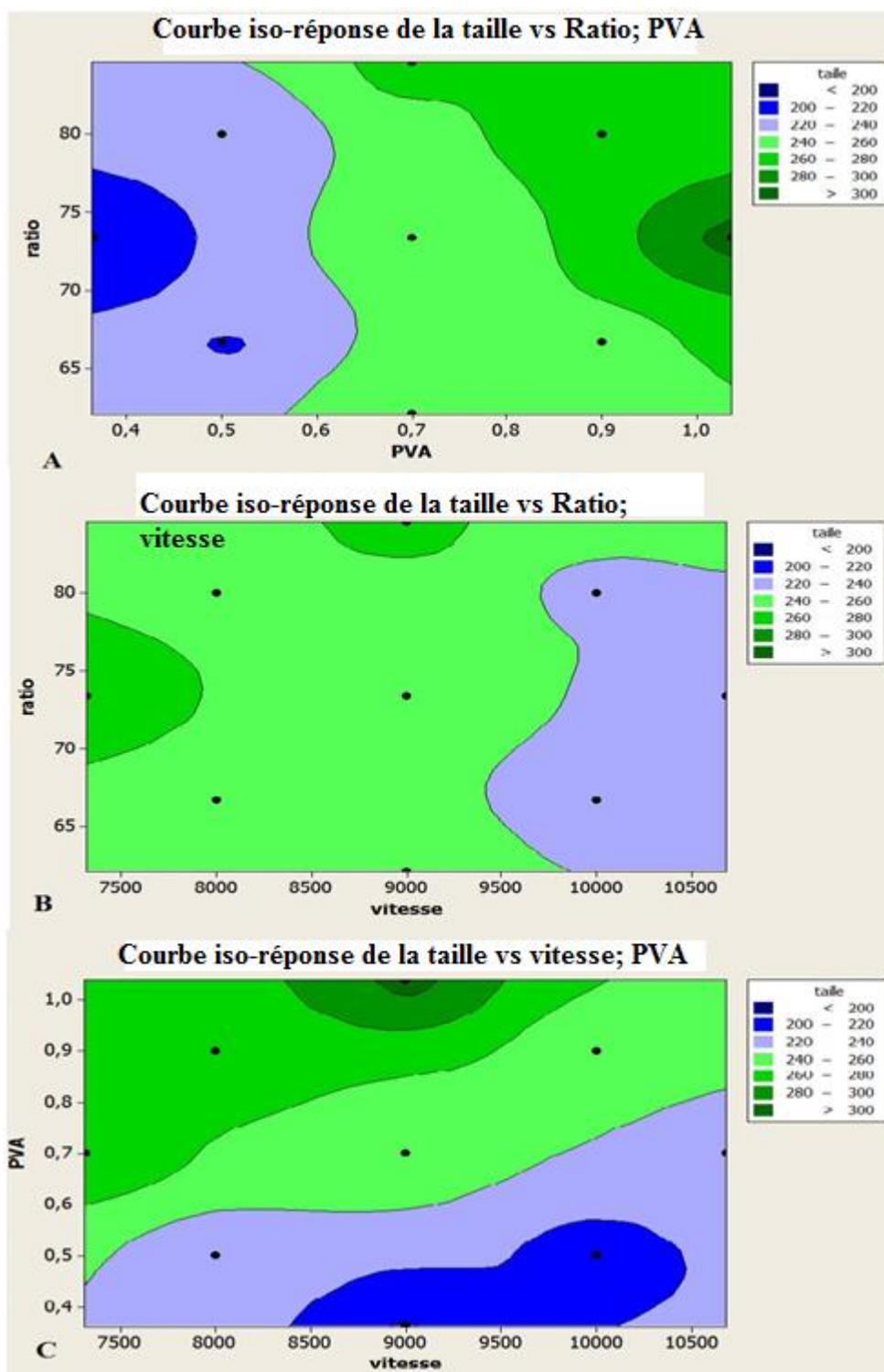


Figure 3.10 : Représentation d’effets ratio massique et concentration du PVA (A) ratio massique et vitesse d’homogénéisation (B) concentration du PVA et vitesse d’homogénéisation (C) sur la taille des nanoparticules par une courbe iso-réponse

3.2.3. Détermination de la formulation optimale

La figure 3.11 montre la D-composite optimale (D= 0.45) avec : d1= 0.36 et d2=0.57. Pour la formulation optimale le taux d'efficacité d'encapsulation est de Y1=49.09%, et la taille est de Y2=226.83 nm, à des niveaux des facteurs : ratio massique=73.66%, concentration du PVA=0.56% et vitesse = 9220 rpm.

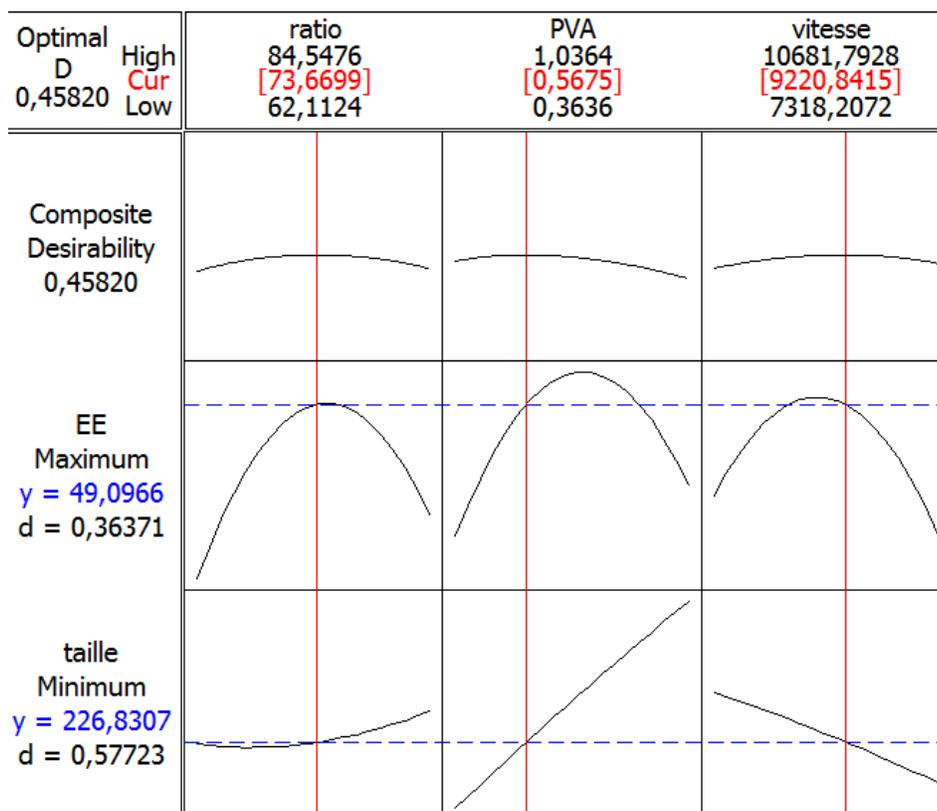


Figure 3.11 : Niveaux optimaux des facteurs et réponses des nanoparticules

Des essais à ces niveaux optimaux ont été réalisés (n = 6) pour une meilleure confirmation. le tableau 3.16 montre les écarts entre les valeurs observées et prévues.

Tableau 3.16 : Valeurs observées et prévues de la formulation optimale des nanoparticules

Réponse	Valeurs observées	Valeurs prévues	écarts	Erreur(%)
EE (%)	46.32	49.09	2.77	5.64
Taille (nm)	224.16	226.83	2.67	1.17

3.2.4. Caractérisation des nanoparticules

3.2.4.1. Taille et morphologie des nanoparticules

L'image du microscope électronique à balayage (figure 3.12) montre une forme uniforme sphérique de la formulation optimale des nanoparticules, avec une taille de 224.16 nm (indice de polydispersité de 0.271) déterminée par zetasizer. Le potentiel zeta est de -24.6 mV.

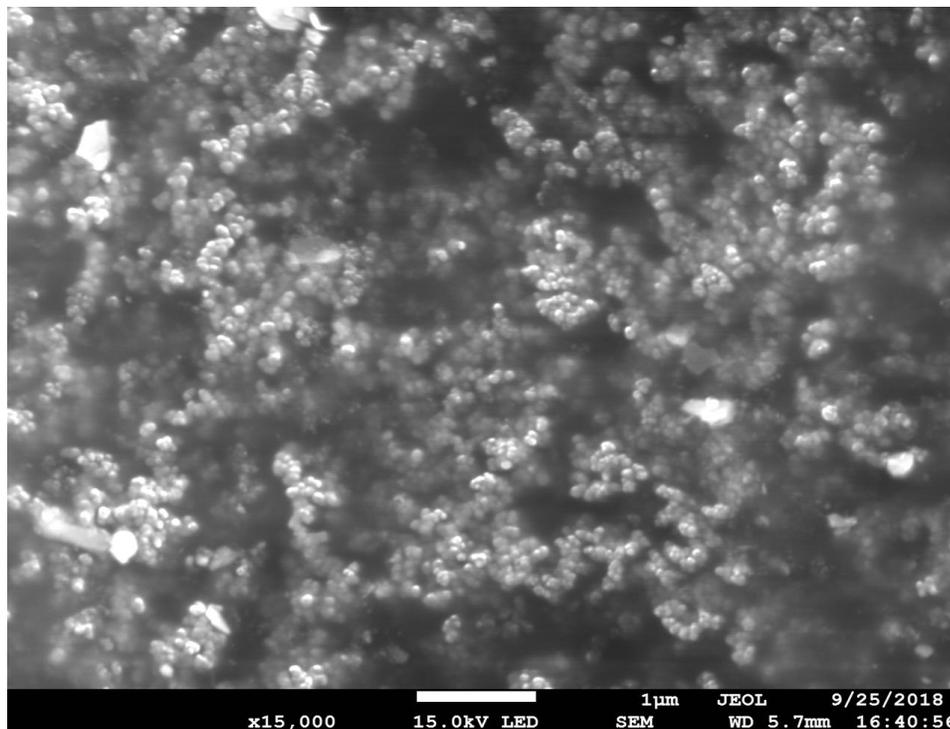


Figure 3.12: Image MEB de la poudre de la formulation optimale des nanoparticules du Diclofenac Sodique

3.2.4.2. FTIR

Aucune interaction entre le DC et le polymère n'était révélée par les spectres FTIR (spectre C). Les pics d'absorption caractéristiques du DC (spectre A) sont présentés par les bandes suivantes: 3384.46 cm^{-1} (N-H élongation d'amine secondaire), 1570.74 cm^{-1} (-C=O élongation d'ion carboxyle), 1554.34 cm^{-1} (C=C élongation du cycle aromatique) et 741.49 cm^{-1} (C-Cl élongation) (**Kebebe et al ; 2010**).

Les pics d'absorption du spectre B de l'éthylcellulose sont obtenus à 1051.01 cm^{-1} (C-O-C élongation), 2969.84 cm^{-1} et (C-H élongation) (**Madni et al ; 2014**).

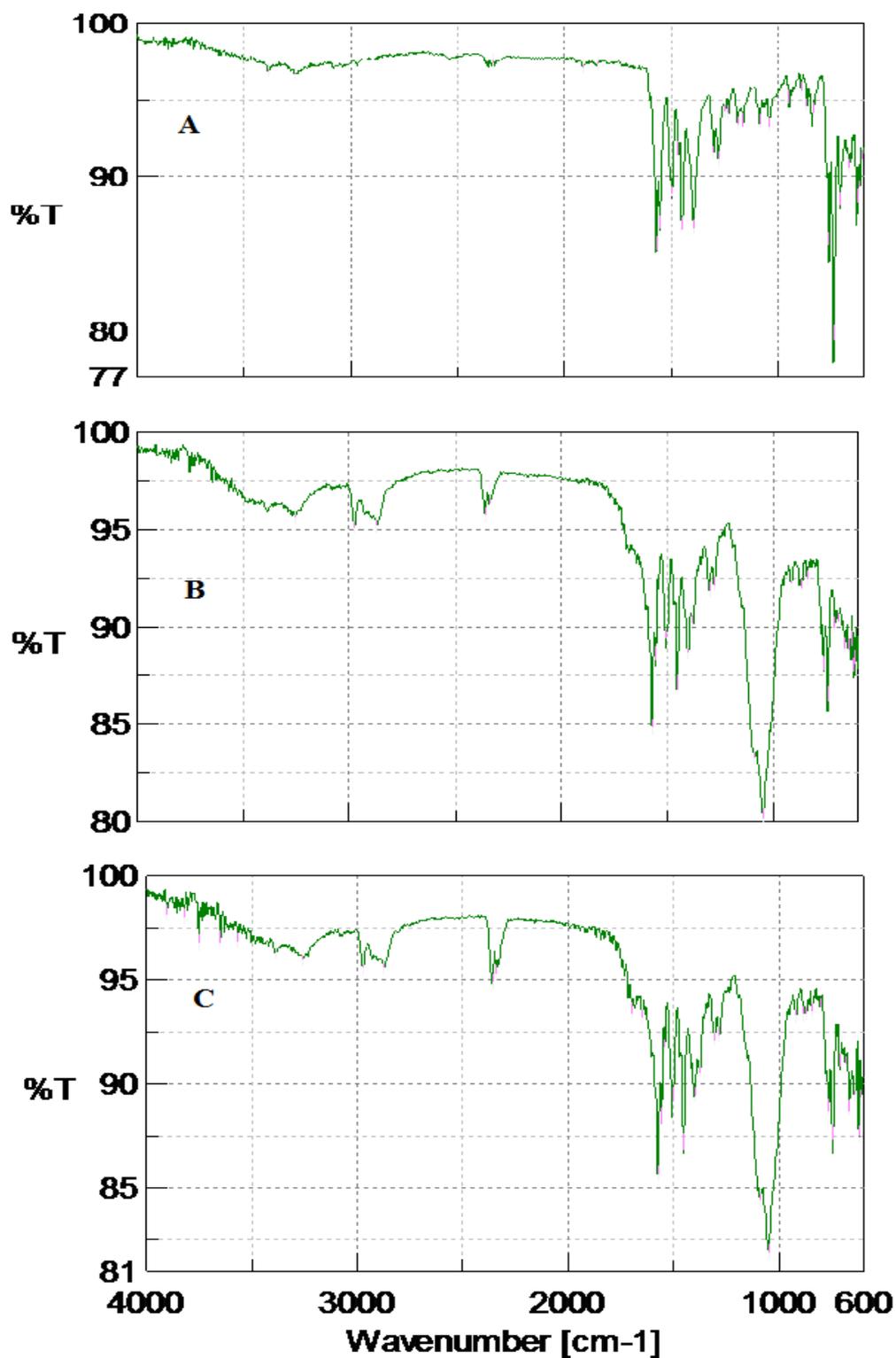


Figure 3.13 : Spectres FTIR des poudres de (A) Diclofenac Sodique, (B) éthylcellulose, (C) formulation optimale des nanoparticules de Diclofenac Sodique

Le spectre C de la formulation optimale des nanoparticules révèle les pics correspondants au DC: NH élongation d'amine secondaire (3387.35 cm^{-1}), C-Cl élongation (743.42 cm^{-1}) qui restent encore présents, par contre les bandes correspondantes a C=O élongation d'ion carboxyle et C = C élongation du cycle aromatique disparaissent ou peuvent être cachées par les pics d'EC qui indique l'encapsulation du principe actif par le polymère et l'absence d'interaction chimique entre eux (figure 3.13).

3.2.4.3. DSC

L'analyse thermique peut être utilisée comme outil support pour déterminer la dispersion du principe actif dans la matrice polymérique des nanoparticules. Les thermogrammes DSC du DC, EC et la formulation optimale des nanoparticules sont présentés dans la figure 3.13. Le DC pur présente un pic endothermique qui indique son point de fusion de 280°C . Le pic disparaît dans la formulation optimale des nanoparticules indiquant clairement que le DC encapsulé reste principalement à l'état amorphe et est dispersé de manière homogène dans les nanoparticules (Osmani *et al* ; 2015, Küçüktürkmen *et al* ; 2017).

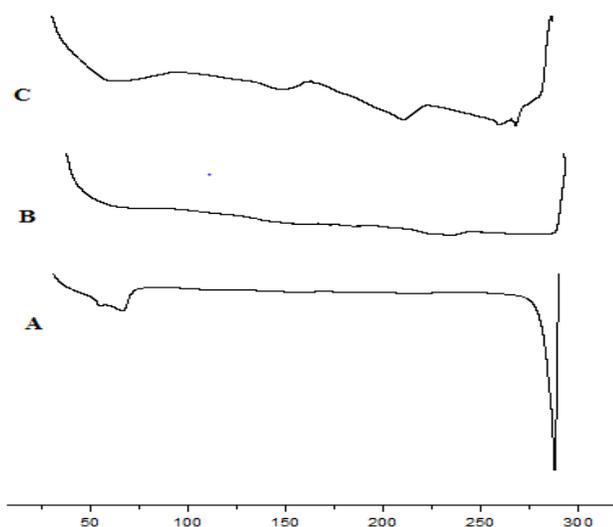


Figure 3.14 : Thermogrammes DSC des poudres de Diclofenac Sodique (A), Ethylcellulose (B), formulation optimale des nanoparticules de Diclofenac Sodique (C)

3.2.4.4. Dissolution *in vitro*

La dissolution *in vitro* a été réalisée à l'aide d'un dissolutest à 37°C dans un milieu de dissolution PBS (pH=7.4), ces conditions représentent la température et le pH du globe

oculaire. Les nanoparticules de DC ont été formulées pour une libération ophtalmique prolongée.

Le profil de dissolution présenté dans la figure 3.14 montre une libération prolongée de DC à partir des nanoparticules formulées, 53.98% du DC ont été libérés pendant 24 heures.

Le profil de dissolution présente un comportement biphasique, une libération rapide puis un début d'un plateau, cela peut être dû à la libération du DC encapsulé proche de la surface des nanoparticules en premier lieu avant la libération du DC encapsulé à l'intérieur des nanoparticules (Deshmukh et Poddar ; 2012).

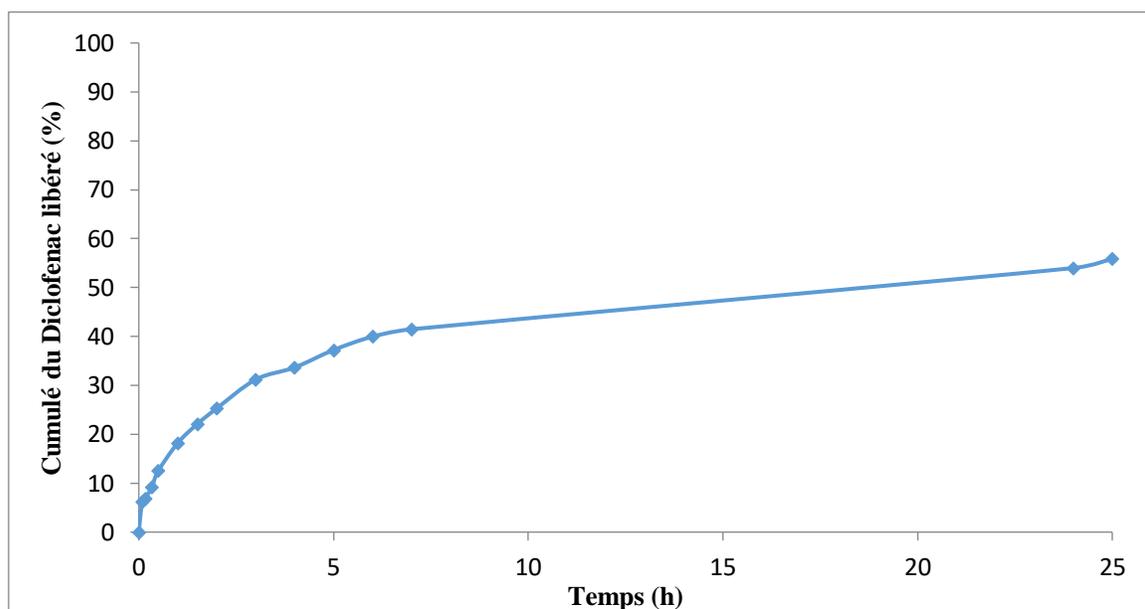


Figure 3.15 : Profil de dissolution du Diclofenac Sodique de la formulation optimale des nanoparticules dans un milieu PBS (pH= 7.4) à 37 °C

Pour déterminer la cinétique de libération du DC à partir de la formule optimale des nanoparticules, les données de dissolution *in vitro* ont été ajustées selon différents modèles: ordre zéro, premier ordre, Higuchi, et Korsmeyer-Peppas, les droites ont été tracées et le coefficient de régression R^2 a été déterminé pour comparer les modèles et en choisir le modèle convenable. Les résultats présentés dans la figure 3.16 montrent des R^2 qui diffèrent d'un modèle à un autre, le R^2 le plus élevé et proche de l'unité qui valide la linéarité du modèle est celui du modèle Korsmeyer-Peppas avec $n = 0.42 < 0.45$ qui indique que la libération suit une diffusion fickienne (Obiedallah *et al* ; 2018).

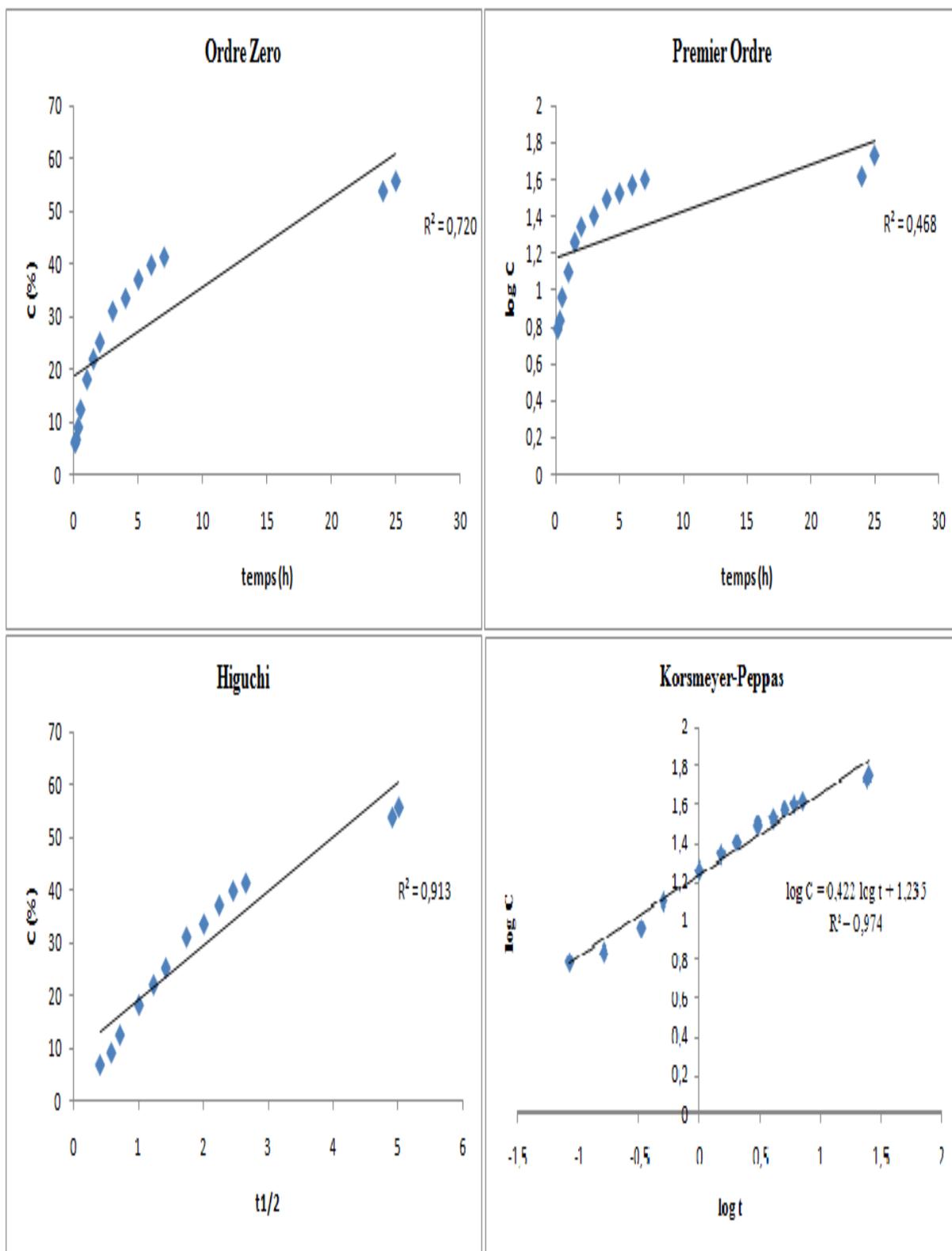


Figure 3.16 : Cinétique de libération du diclofenac sodique à partir de la formulation optimale des nanoparticules

Le modèle de Korsmeyer-Peppas est utile pour l'étude de la libération des principes actifs à partir de systèmes polymériques lorsque le mécanisme de libération n'est pas connu ou lorsque plusieurs types de phénomènes de libération de médicaments sont impliqués.

Dans la diffusion Fickienne, le taux de transport ou la diffusion du solvant est beaucoup plus important que le processus de relaxation de la chaîne polymérique. La diffusion fickienne se produit généralement dans les matrices polymériques dans lesquelles la température de transition vitreuse du polymère (Tg) est inférieure à la température ambiante. Lorsque le polymère est à l'état caoutchouteux, les chaînes polymériques ont une grande mobilité, ce qui permet une pénétration facile des solvants. Cependant, la diffusion Fickienne est caractérisée par une vitesse élevée de diffusion du solvant à l'intérieur de la matrice et une faible vitesse de relaxation du polymère. Ce comportement induit la formation d'un gradient de pénétration des solvants. La concentration en solvant diminue de manière exponentielle de la région totalement gonflée vers le centre de la matrice. La distance de diffusion est proportionnelle à la racine carrée du temps (**Bruschi ; 2015**).

3.2.4.5. Test HET-CAM

Le test HET-CAM est utilisé pour identifier les matières potentielles non irritantes ou légèrement irritantes. Bien que le test HET-CAM soit considéré comme un test établi et fiable à des fins de dépistage, il ne peut pas remplacer complètement le test de Draize. Le test HET-CAM peut être considéré comme référence pour comparer le potentiel d'irritation oculaire relative et la tolérance locale de la formulation optimale par rapport à un produit commercialisé bien connu (**Derouiche et Abdenour ; 2017**).

Figure 3.17 : Résultats d'irritation des préparations testées par le test HET-CAM

Préparation testée	SI
DC-nanoparticules	5.5
Diclofed [®]	5
NaOH 0.1 N	20.5
NaCl 0.9%	00

Les résultats d'irritation obtenus avec le témoin négatif (0.9% NaCl) et le témoin positif (NaOH 0.1) sont de 00 et 20.5 respectivement (tableau 3.17), ce qui satisfait les critères pour

un test acceptable. Le résultat d'irritation (SI) pour la formulation optimale des nanoparticules de DC n'est pas loin de la formulation commercialisée sous forme de collyre, les deux formulations présentent un résultat d'irritation de 5.5 et 5 respectivement, elles sont modérément irritantes. Les résultats montrent que la formulation optimale du DC est tolérée pour un usage ophtalmique.

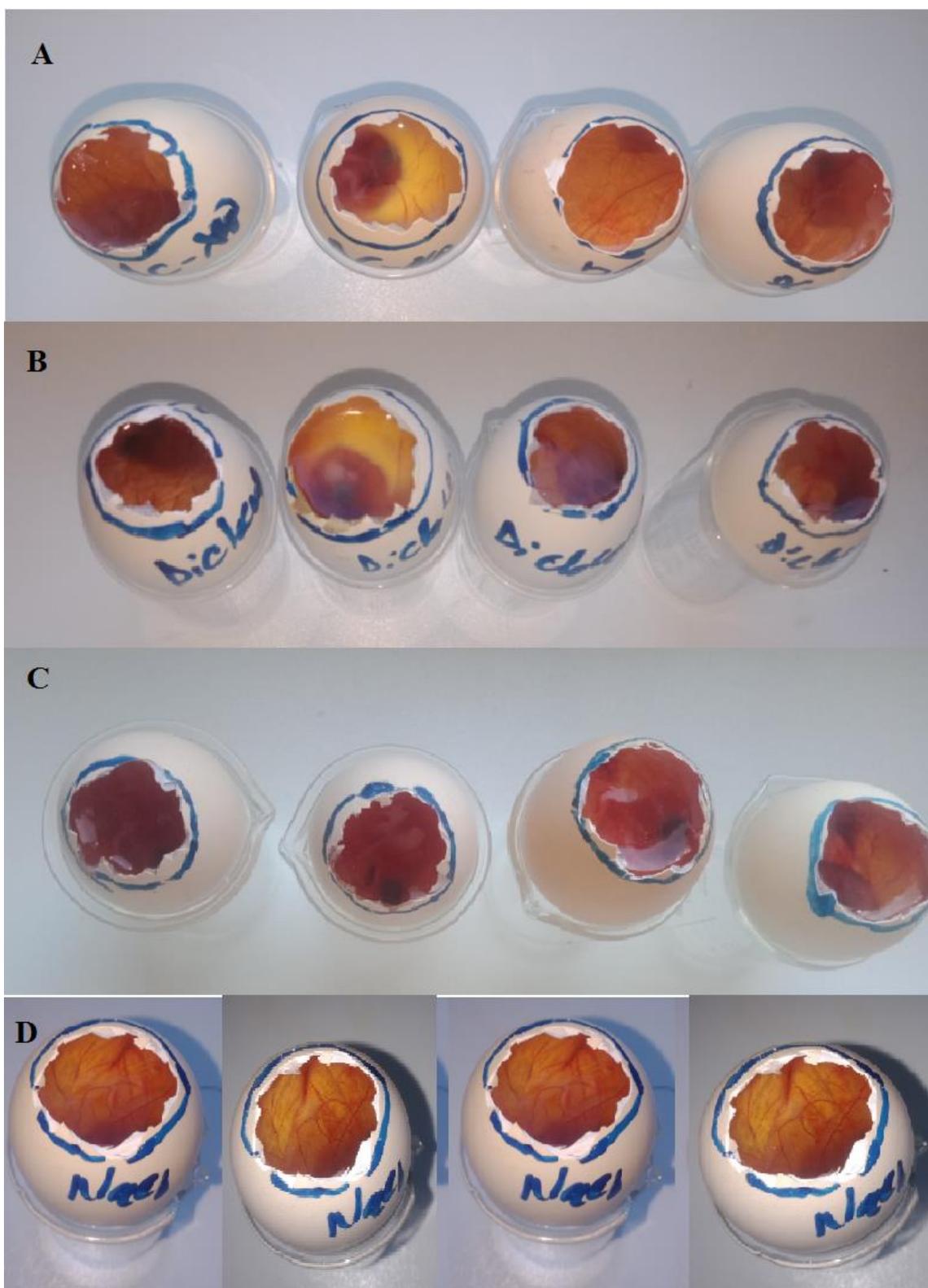


Figure 3.17 : Résultats du test HET-CAM (A) nanoparticules polymériques de diclofenac sodique, (B) Diclofed[®], (C) NaOH 0.1N, (D) NaCl 0.9%

3.3. Microsponges de diclofenac sodique

3.3.1. Criblage par un plan factoriel complet

Le logiciel Minitab® a été utilisé pour analyser les résultats de l'étude de criblage, le tableau 3.18 résume les résultats du plan de criblage.

Tableau 3.18 : Résultats du plan factoriel complet des microsponges

Expérience	X1(%)	X2(m/v %)	X3(rpm)	Y1(%)	Y2 (%)
1	50	0.1	400	18.12	45.50
2	80	0.1	400	19.28	58.10
3	50	1	400	22.81	35.50
4	80	1	400	35.57	39.20
5	50	0.1	1200	18.79	20.50
6	80	0.1	1200	25.21	57.80
7	50	1	1200	33.96	35.00
8	80	1	1200	43.74	63.10

On déduit les coefficients et le modèle complet des deux réponses Y1 et Y2 :

$$Y1 = 27.18 + 3.76X_1 + 6.83X_2 + 3.24X_3 + 1.87X_1X_2 + 0.28X_1X_3 + 1.59X_2X_3 - 1.03X_1X_2X_3 \quad (3.10)$$

$$Y2 = 44.33 + 10.21X_1 - 1.13X_2 - 0.23X_3 - 2.26X_1X_2 + 6.13X_1X_3 + 6.08X_2X_3 - 0.03X_1X_2X_3 \quad (3.11)$$

3.3.1.1. Analyse graphique des résultats

a. Effets principaux

Les facteurs : ratio massique DC/EC (X1), concentration du PVA (X2) et vitesse d'agitation (X3) ont un effet proportionnel sur la réponse Y1 (taux d'efficacité d'encapsulation) (figure 3.18).

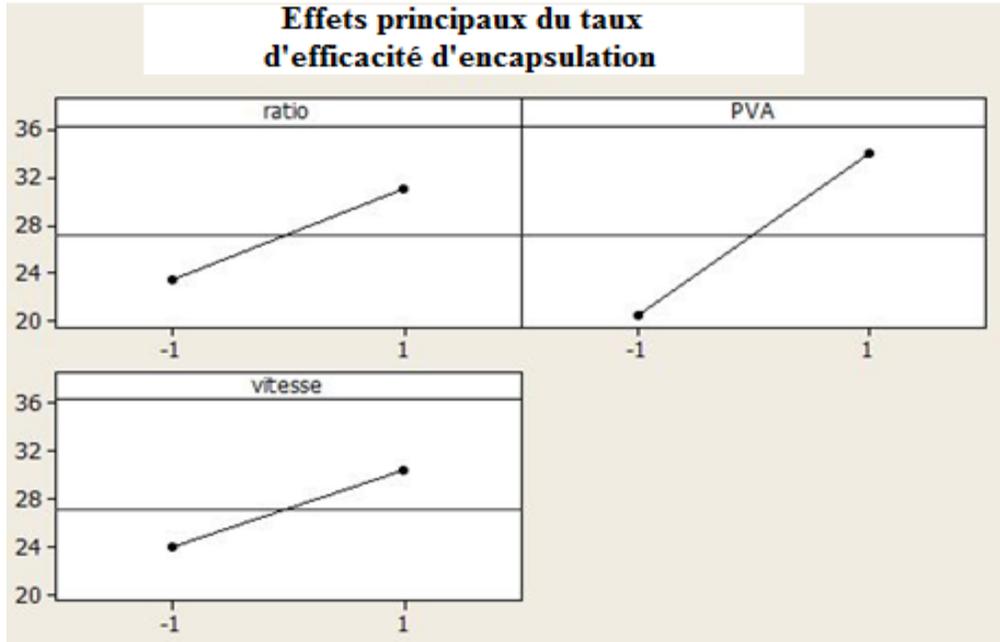


Figure 3.18 : Effets principaux du taux d'efficacité d'encapsulation des microsponges

Le facteur de vitesse d'agitation (X3) a un effet négligeable sur la réponse Y2 (rendement de production). Le facteur ratio massique DC/EC (X1) est proportionnellement influençant sur la réponse Y2. Par contre, la concentration de PVA (X2) est inversement proportionnelle sur le rendement de production (figure 3.19).

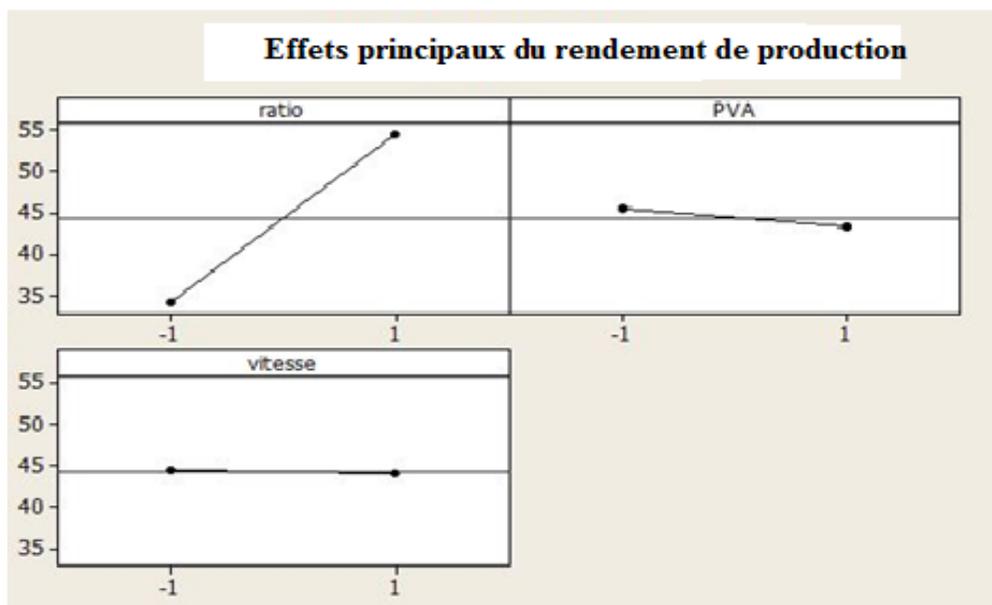


Figure 3.19 : Effets principaux du rendement de production des microsponges

b. Effets des interactions

L'interaction des facteurs vitesse d'agitation (X3) et ratio massique (X1) a un effet négligeable sur la réponse Y1 (taux d'efficacité d'encapsulation). L'interaction de la concentration de PVA (X2) et vitesse d'agitation (X3) est plus faible. L'interaction entre la concentration de PVA (X2) et le ratio massique (X1) a plus d'influence sur la réponse Y1. (Figure 3.20)

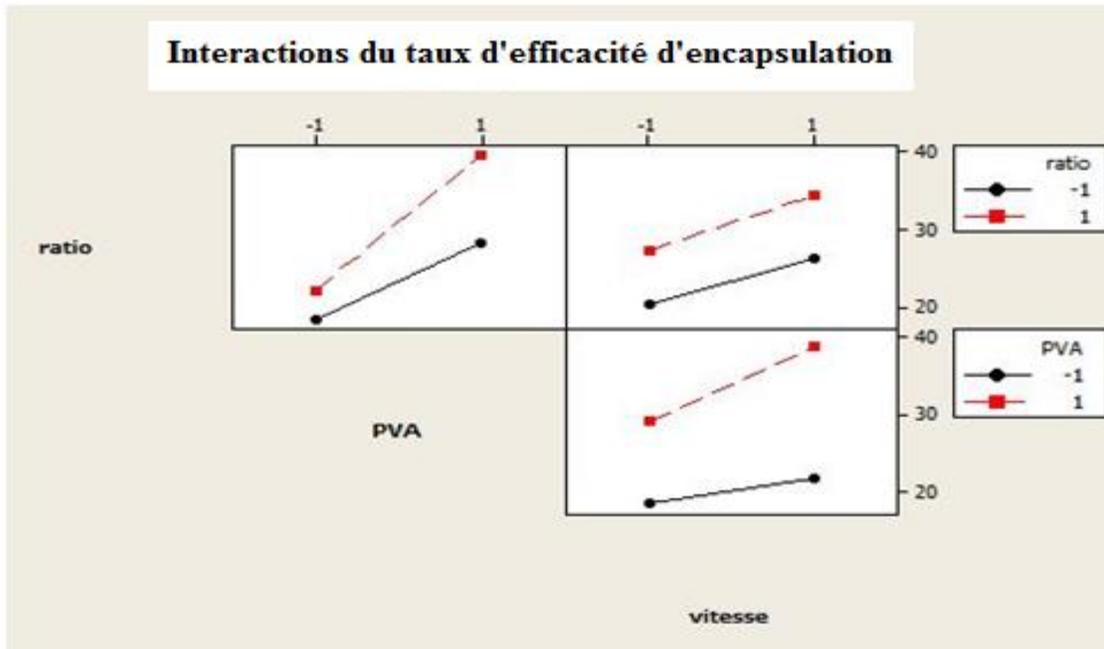


Figure 3.20: Effets des interactions sur le taux d'efficacité d'encapsulation des microsponges

L'interaction de la concentration du PVA (X2) avec la vitesse d'agitation (X3) a une grande influence sur la réponse Y2 (rendement de production), l'influence est plus importante que celle de l'interaction entre la vitesse d'agitation (X3) et ratio massique (X1). Par contre, l'interaction ratio massique (X1) et concentration du PVA (X2) a une faible influence sur le rendement de production (Figure 3.21).

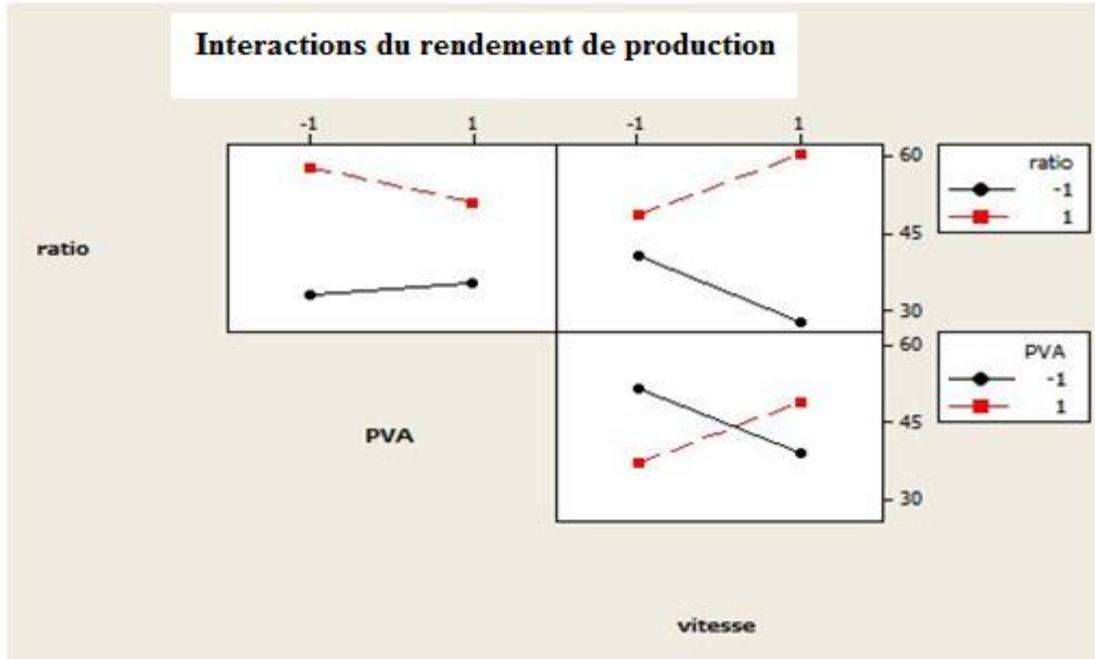


Figure 3.21 : Effets des interactions sur le rendement de production des microsponges

3.3.1.2. Analyse statistique

a. Taux d'efficacité d'encapsulation Y1

En éliminant les interactions du troisième degré X1X2X3, le modèle sera :

$$EE = 27.18 + 3.76 \text{ Ratio} + 6.83PVA + 3.241Vitesse + 1.87Ratio.PVA + 0.28Ratio.Vitesse + 1.59PVA.Vitesse \quad (3.12)$$

Le tableau 3.19 montre les résultats du modèle linéaire avec interactions de Y1

Tableau 3.19: Table d'estimation des effets de criblage du taux d'efficacité d'encapsulation des microsponges (Avec interactions entre X1, X2, X3 ; p-value < 0.05, t_{crit} = 12.70)

	Coefficient	Poids	t _i	p-value	Effet
a0	Constante	27.18	26.39	0.024	Significatif
a1	Ratio	3.76	3.66	0.170	Non significatif
a2	PVA	6.83	6.64	0.095	Non significatif
a3	Vitesse	3.24	3.15	0.196	Non significatif
a12	Ratio×PVA	1.87	1.82	0.321	Non significatif
a13	Ratio×Vitesse	0.28	0.28	0.828	Non significatif
a23	PVA×Vitesse	1.59	1.54	0.366	Non significatif

D'après les résultats observés, on peut conclure que le modèle linéaire avec interactions n'est pas valable ($R^2= 0.98$, $R^2_{ajus}=0.90$). Pour améliorer la qualité du modèle et identifier les facteurs influençant, les interactions ayant un p-value > 5%, ou un $t_i < t_{crit}$ ($t_{crit}=12.706$) sont éliminés.

Après élimination de l'interaction Ratio× Vitesse ($X1 \times X3$), le modèle linéaire devient :

$$EE = 27.18 + 3.76 \text{ Ratio} + 6.83 \text{ PVA} + 3.24 \text{ Vitesse} + 1.87 \text{ Ratio.PVA} + 1.59 \text{ PVA.Vitesse} \quad (3.13)$$

Avec le nouveau $t_{crit}=4.30$

Le tableau 3.20 montre les résultats du nouveau modèle de la réponse Y1.

Le facteur de vitesse d'agitation ($X3$) et les interactions $X1 \times X2$, $X2 \times X3$ n'ont pas un effet significatif sur l'efficacité d'encapsulation. Les facteurs ratio massique ($X1$) et concentration du PVA ($X2$) présentent une valeur de $p < 5\%$ ce qui confirme leur influence sur la réponse Y1.

Tableau 3.20: Table d'estimation des effets de criblage du taux d'efficacité d'encapsulation des microsponges (sans interaction entre $X1$ et $X3$; p-value < 0.05, $t_{crit} = 4.30$)

Coefficient		Poids	t_i	p-value	Effet
a0	Constante	27.18	35.97	0.001	Significatif
a1	Ratio	3.76	4.98	0.038	Significatif
a2	PVA	6.83	9.04	0.012	Significatif
a3	Vitesse	3.24	4.29	0.050	Non significatif
a12	Ratio×PVA	1.87	2.47	0.132	Non significatif
a23	PVA×Vitesse	1.59	2.10	0.170	Non significatif

Le tableau d'ANOVA ci-dessous montre que le modèle statistique choisi est valide car on a : $p\text{-value} = 0.024 < 0.05$, $R^2=0.98$ et $R^2_{ajus} = 0.94$.

De la table de Fisher : $F_{cri} = 6.59$, $F_{obs} > F_{cri}$, on accepte alors l'hypothèse de linéarité du modèle.

Tableau 3.21: Table d’ANOVA criblage du taux d’efficacité d’encapsulation des microsponges

Source de variance	SCE	ddl	CM	F _{obs}	p-value	R ²	R ² _{ajus}
Liaison	571.120	3	190.070	41.67	0.026	0.98	0.94
Résiduel	9.137	2	4.569				
Total	628.457	7					

b. Rendement de production Y2

En éliminant les interactions du troisième degré X1X2X3, le modèle sera :

$$RY = 44.33 + 10.21 \text{ Ratio} - 1.13PVA - 0.23Vitesse - 2.26\text{Ratio.PVA} + 6.13\text{Ratio.Vitesse} + 6.08 PVA.Vitesse \quad (3.14)$$

Le tableau 3.22 montre les résultats du modèle linéaire avec interactions de Y2.

D’après les résultats observés, on peut conclure que le modèle linéaire avec interactions est valable. Les facteurs ratio massique (X1), concentration du PVA (X2), en plus des interactions X1×X2, X1×X3, X2×X3 ont un effet significatif sur le rendement de production des microsponges avec une valeur de p < 5% et un t_i > t_{crit} (t_{crit}=12.706), la vitesse d’agitation (X3) n’a pas d’influence sur la réponse Y2 (t_i< t_{crit}, p > 5%).

Tableau 3.22 : Table d’estimation des effets de criblage du rendement de production des microsponges (avec interactions entre X1, X2, X3 ; p-value < 0.05, t_{crit} = 12.70)

Coefficient		Poids	t _i	p-value	Effet
a0	Constante	44.33	1182.33	0.001	Significatif
a1	Ratio	10.21	272.33	0.002	Significatif
a2	PVA	-1.13	30.33	0.021	Significatif
a3	Vitesse	-0.23	6.33	0.100	Non significatif
a12	Ratio×PVA	- 2.26	60.33	0.011	Significatif
a13	Ratio× Vitesse	6.13	163.67	0.004	Significatif
a23	PVA×Vitesse	6.08	162.33	0.004	significatif

Le tableau d’ANOVA ci-dessous montre que le modèle statistique choisi est valide car on a:

p-value = 0.005 < 0.05, $R^2=1$ et $R^2_{ajus}=0.99$.

De la table de Fisher : $F_{cri}=6.59$, $F_{obs} > F_{cri}$, on accepte alors l'hypothèse de linéarité du modèle.

Tableau 3.23 : Table d'ANOVA criblage du rendement de production des microsponges

Source de variance	SCE	ddl	CM	F_{obs}	P-value	R^2	R^2_{ajus}
Liaison	845.16	3	281.721	25041.89	0.005	1	0.99
Résiduel	0.01	1	0.011				
Total	1483.94	7					

3.3.1.3. Discussion

Les microsponges du Diclofenac sodique ont été formulées et préparées avec succès par un procédé de quasi-émulsion diffusion du solvant.

Il a été observé que l'efficacité d'encapsulation augmentait avec le ratio massique, cela peut être dû à une augmentation de la viscosité de la phase interne par augmentation de la concentration de l'éthylcellulose, entraînant ainsi une diminution de la perte de médicament au cours de la formulation (**Ratnaparakhi et al ; 2015, Rajab et Jawad ; 2016**).

Le rendement de production des huit formulations variait de 20,83% à 61%. Le ratio massique s'est avérée avoir un effet significatif sur le rendement de production. Le ratio massique élevé induit une concentration élevée en éthylcellulose, cela réduit le taux de diffusion du dichlorométhane et éthanol à partir de la solution d'éthylcellulose visqueuse vers la phase aqueuse, ce qui laisse plus de temps pour la formation de gouttelettes et améliore ainsi le rendement (**Osmani et al ; 2015, Rajab et Jawad ; 2016, Gulati et al ; 2016**). **Shahzed et al** proposent qu'après augmentation de la concentration du PVA, les molécules de ce dernier s'arrangent en couches entourant les gouttelettes formées, ce qui peut engendrer une élévation de la viscosité de la phase interne. Cette conformation peut par la suite réduire la fuite du principe actif jusqu'à ce que les gouttelettes se transforment en microsponges (**Shahzed et al ; 2017**).

La concentration du PVA a effet négatif sur le rendement de production, cela est peut-être dû à la nature de l'émulsifiant utilisé, le PVA est un émulsifiant non ionique. Les molécules du PVA peuvent s'associer loin de l'interface huile-eau à des concentrations plus élevées.

Une telle région hydrophobe alternative peut dissoudre certaines portions de DC entraînant une réduction du rendement de production dans la formulation de microsponges (Sonali *et al* ; 2014, Nokhodchi *et al* ; 2007 ; Jain *et al* ; 2010).

3.3.2. Optimisation par le plan composite centré

Après avoir réalisé les 13 expériences, on a obtenu les résultats suivants (tableau 3.24).

Tableau 3.24 : Résultats du plan composite centré des microsponges

Expérience	Facteurs		Réponses		D
	X ₁ (%)	X ₂ (w/v %)	Y1 (%)	Y2 (%)	
1	71.42	0.30	14.02	45.71	0.140
2	77.77	0.30	28.87	62.44	0.463
3	71.42	0.60	18.96	46.00	0.223
4	77.77	0.60	31.69	63.33	0.487
5	70.10	0.45	12.84	46.45	0.142
6	79.08	0.45	28.13	65.26	0.552
7	74.59	0.23	15.73	58.07	0.284
8	74.59	0.66	24.83	44.97	0.340
9	74.59	0.45	23.31	58.75	0.366
10	74.59	0.45	20.27	60.07	0.366
11	74.59	0.45	21.51	59.91	0.366
12	74.59	0.45	21.36	57.94	0.366
13	74.59	0.45	22.74	54.85	0.366

$$Y_1 = 21.83 + 6.15X_1 + 2.57X_2 + 0.07 X_1^2 - 0.02 X_2^2 - 0.53X_1X_2 \quad (3.15)$$

$$Y_2 = 58.30 + 7.58X_1 - 2.16X_2 - 1.05 X_1^2 - 3.22X_2^2 + 0.15X_1X_2 \quad (3.16)$$

3.3.2.1. Analyse statistique des résultats

a. Taux d'efficacité d'encapsulation Y1

D'après les résultats présentés dans le tableau 3.25, les interactions : Ratio× Ratio, PVA×PVA, Ratio× PVA ne sont pas statistiquement significatives car elles présentent une

p-value >5% et $t_i < t_{crit}$ ($t_{crit}=2.36$), les facteurs principaux ratio massique et concentration du PVA ont une grande influence sur l'efficacité d'encapsulation ($p < 1\%$).

Tableau 3.25 : Table d'estimation des effets d'optimisation du taux d'efficacité d'encapsulation des microsponges (p-value < 0.05, $t_{crit} = 2.36$)

Coefficient		Poids	t_i	p-value	Effet
a0	Constante	21.83	23.018	0.000	Significatif
a1	Ratio	6.15	8.200	0.000	Significatif
a2	PVA	2.57	3.438	0.011	Significatif
a11	Ratio×Ratio	0.07	0.092	0.929	Non significatif
a22	PVA×PVA	-0.02	0.035	0.973	Non significatif
a12	Ratio×PVA	-0.53	0.500	0.633	Non significatif

Le tableau d'ANOVA ci-dessous montre que le modèle statistique choisi est valide car on a : p-value = 0.001 < 0.05, $R^2=0.91$ et $R^2_{ajus}=0.86$.

De la table de Fisher : $F_{crit}=3.97$, $F_{obs} > F_{crit}$, on accepte alors l'hypothèse de linéarité du modèle.

Tableau 3.26: Table d'ANOVA optimisation du taux d'efficacité d'encapsulation des microsponges

Source de variance	SCE	ddl	CM	F_{obs}	P-value	R^2	R^2_{aj}
Liaison	356.989	5	71.398	15.86	0.001	0.91	0.86
Résiduel	31.504	7	4.501				
Total	388.493	12					

b. Rendement de production Y2

D'après les résultats présentés dans le tableau 3.27, il est évident que le ratio massique a une influence positive sur le rendement de production, il présente une p-value < 5% et $t_i > t_{crit}$ ($t_{crit}= 2.36$).

Tableau 3.27 : Table d'estimation des effets d'optimisation du rendement de production des microsponges (p-value < 0.05, $t_{crit} = 2.36$)

Coefficient		Poids	t_i	p-value	Effet
a0	Constante	58.30	39.988	0.000	Significatif
a1	Ratio	7.58	6.578	0.000	Significatif
a2	PVA	-2.16	1.881	0.102	Non significatif
a11	Ratio×Ratio	-1.05	0.853	0.433	Non significatif
a22	PVA×PVA	-3.22	2.607	0.035	Significatif
a12	Ratio×PVA	0.15	0.092	0.929	Non significatif

Le tableau d'ANOVA ci-dessous montre que le modèle statistique choisi est valide car on a: p-value = 0.003 < 0.05, $R^2=0.88$ et $R^2_{ajus}=0.80$.

De la table de Fisher : $F_{cri}=3.97$, $F_{obs} > F_{cri}$, on accepte alors l'hypothèse de linéarité du modèle..

Tableau 3.28 : Table d'ANOVA optimisation du rendement de production des microsponges

Source de variance	SCE	ddl	CM	F_{obs}	p-value	R^2	R^2_{aj}
Liaison	572.747	5	114.549	10.78	0.003	0.88	0.80
Résiduel	74.411	7	10.630				
Total	647.159	12					

3.3.2.2. Analyse graphique

a. Taux d'efficacité d'encapsulation Y1

La figure 3.22 montre une surface de réponse qui récapitule la variation de la réponse Y1 en fonction des facteurs: ratio massique DC/EC (X1), et concentration du PVA (X2) dans l'espace à 3 dimensions.

La réponse présente son maximum a des taux de ratio massique élevés. Pour mieux visualiser la région de ce maximum, la surface 3D est projetée sur un plan bidimensionnel [OX1X2] comme la montre la figure 3.23.

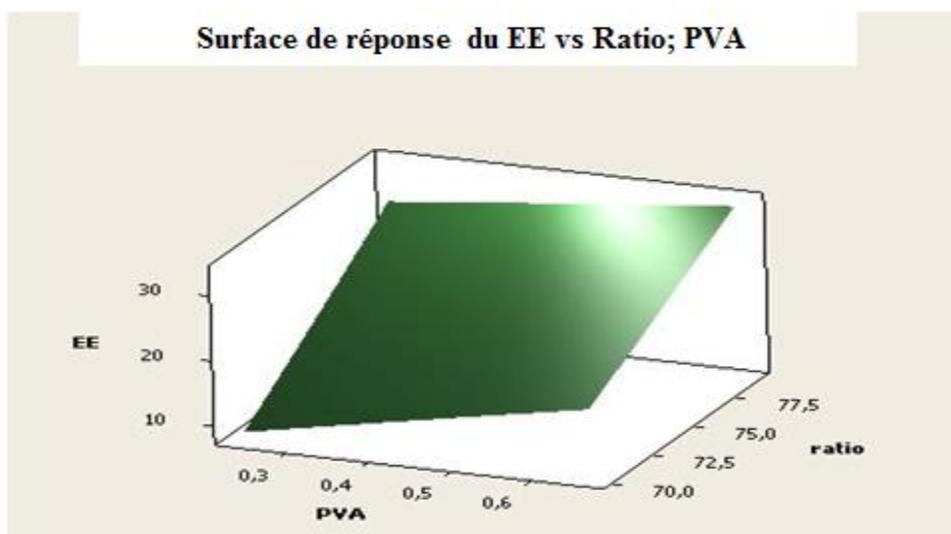


Figure 3.22 : Représentation tridimensionnelle des effets du ratio massique et concentration du PVA sur le taux d'efficacité d'encapsulation des microsponges

Les lignes du contour représentent la réponse constante qui correspond aux valeurs de 10, 15, 20, 25, 30%. Les points en noir représentent les valeurs expérimentales obtenues. Le contour comportant la couleur verte foncée en haut représente le taux d'efficacité d'encapsulation le plus élevé. Le taux d'efficacité d'encapsulation diminue lorsqu'on se déplace vers le bas à des ratios et concentration du PVA faibles.

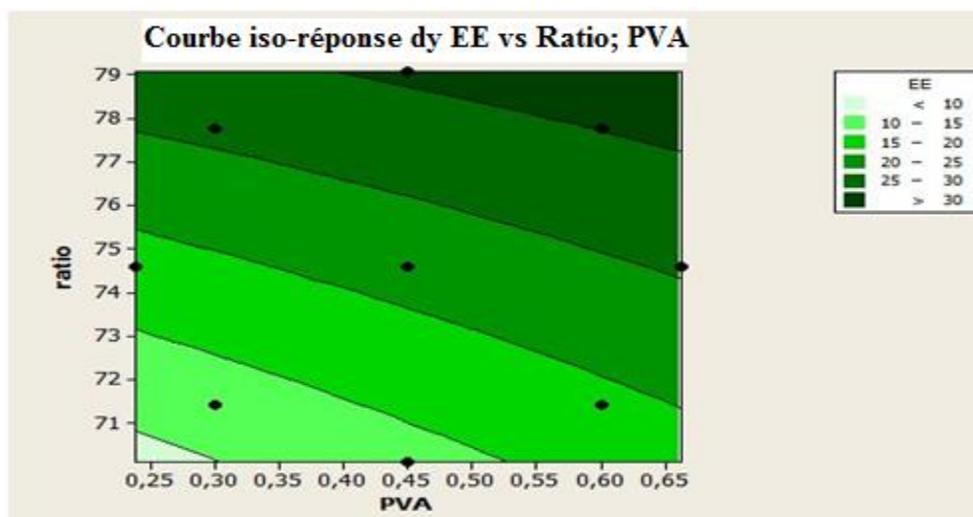


Figure 3.23 : Représentation d'effets ratio massique et concentration du PVA sur le taux d'efficacité d'encapsulation des microsponges par une courbe iso-réponse

b. Rendement de production Y2

La figure 3.24 présente une surface de réponse de la réponse Y2 en fonction des facteurs: ratio massique DC/EC (X1), et concentration du PVA (X2) dans l'espace à 3 dimensions. Dans ce graphique, la réponse présente une courbure.

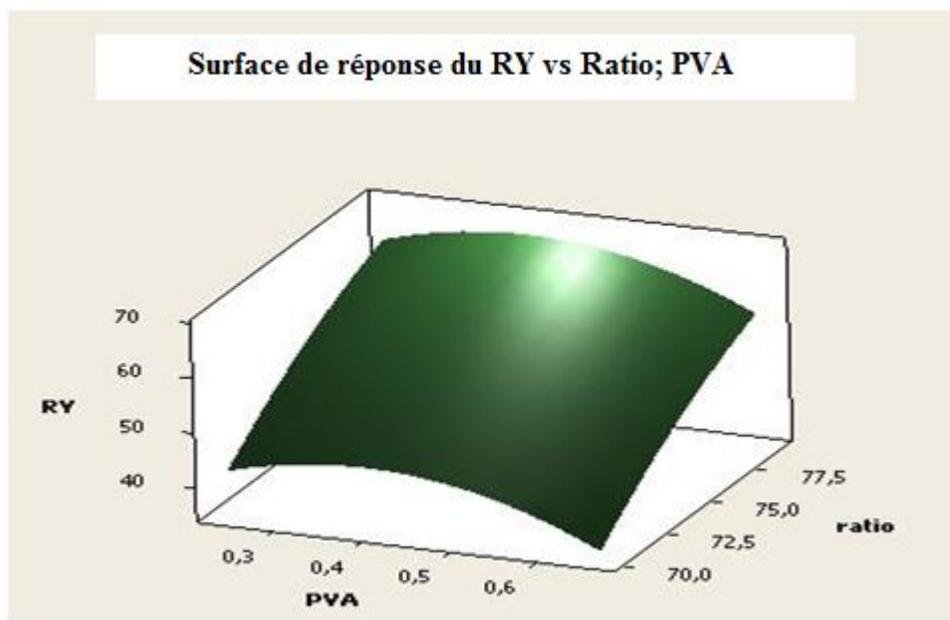


Figure 3.24 : Représentation tridimensionnelle des effets du ratio massique et concentration du PVA sur le rendement de production des microsponges

Pour mieux visualiser la région des maximums, la surface 3D est projetée sur un plan bidimensionnel [OX1X2] comme la montre la figure 3.25.

Les lignes du contour représentent la réponse constante qui correspond aux valeurs de 40, 45, 50, 55, 60, 65%. Les points en noir représentent les valeurs expérimentales obtenues. Le contour comportant la verte foncée en haut à haut ratio représente le rendement le plus important. Le rendement de production diminue lorsqu'on se déplace vers le bas à des ratios faibles.

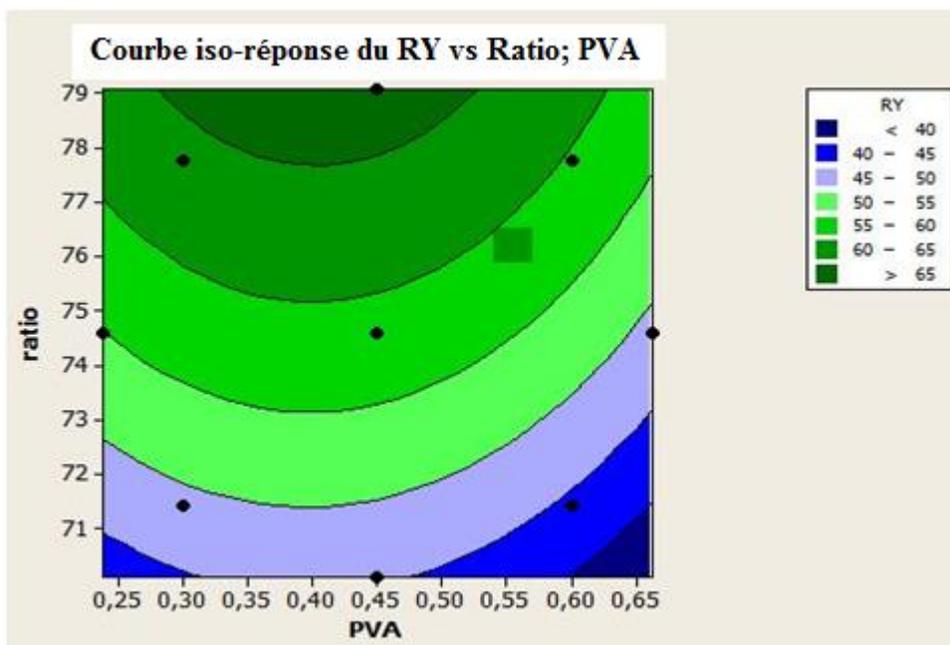


Figure 3.25 : Représentation d'effets ratio massique et concentration du PVA sur le rendement de production des microsponges par une courbe iso-réponse

3.3.3. Détermination de la formulation optimale

La figure 3.26 montre la D-composite optimale ($D= 0.55$) avec : $d1= 0.42$ et $d2=0.72$. Pour la formulation optimale le taux d'efficacité d'encapsulation est de $Y1=31.02\%$, et le rendement de production est de $Y2=66.44\%$, à des niveaux des facteurs : ratio massique= 79.08% , et concentration du PVA= 0.47% .

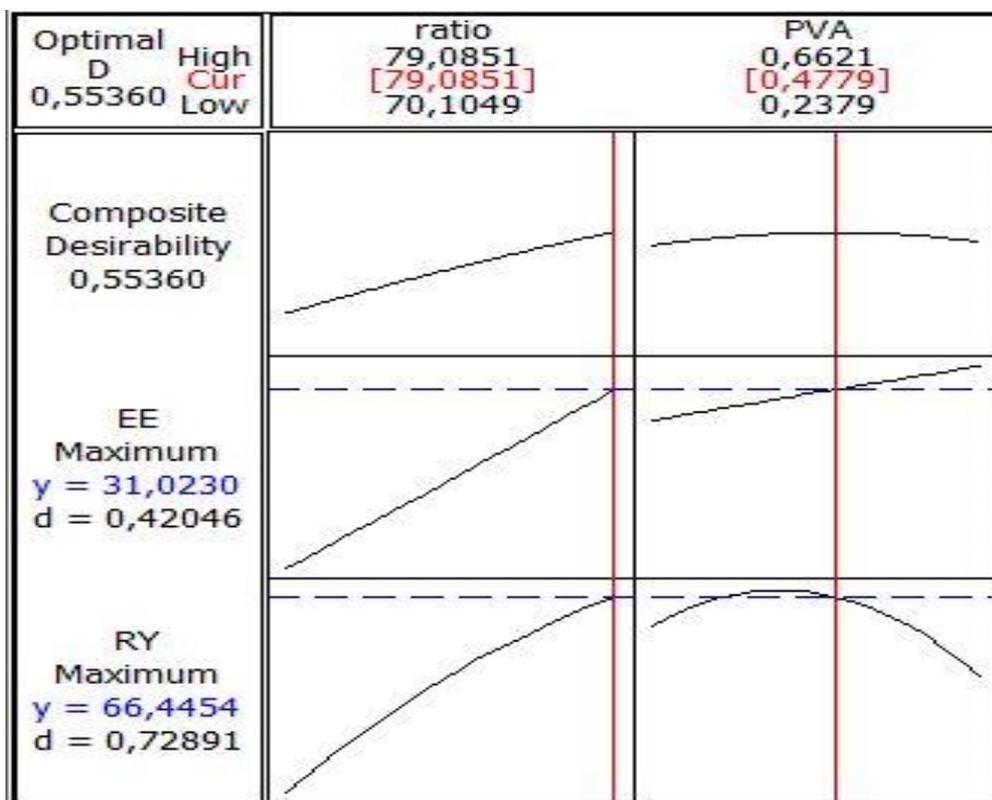


Figure 3.26 : Niveaux optimaux des facteurs et réponses des microsponges

Des essais à ces niveaux optimaux ont été réalisés (n = 5) pour une meilleure confirmation. le tableau 3.29 montre les écarts entre les valeurs observées et prévues.

Tableau 3.29 : Valeurs observées et prévues de la formulation optimale des microsponges

Réponse	Valeurs observées	Valeurs prévues	Résidus	Erreur(%)
EE (%)	30.96	31.02	0.06	0.19
RY (%)	63.69	66.44	2.75	4.13

3.3.4. Caractérisation des microsponges

3.2.4.1. Taille et morphologie des microsponges

La figure 3.27 montre que la formule optimale des microsponges présente une forme sphérique avec une taille moyenne de $9.21 \pm 0.3 \mu\text{m}$.

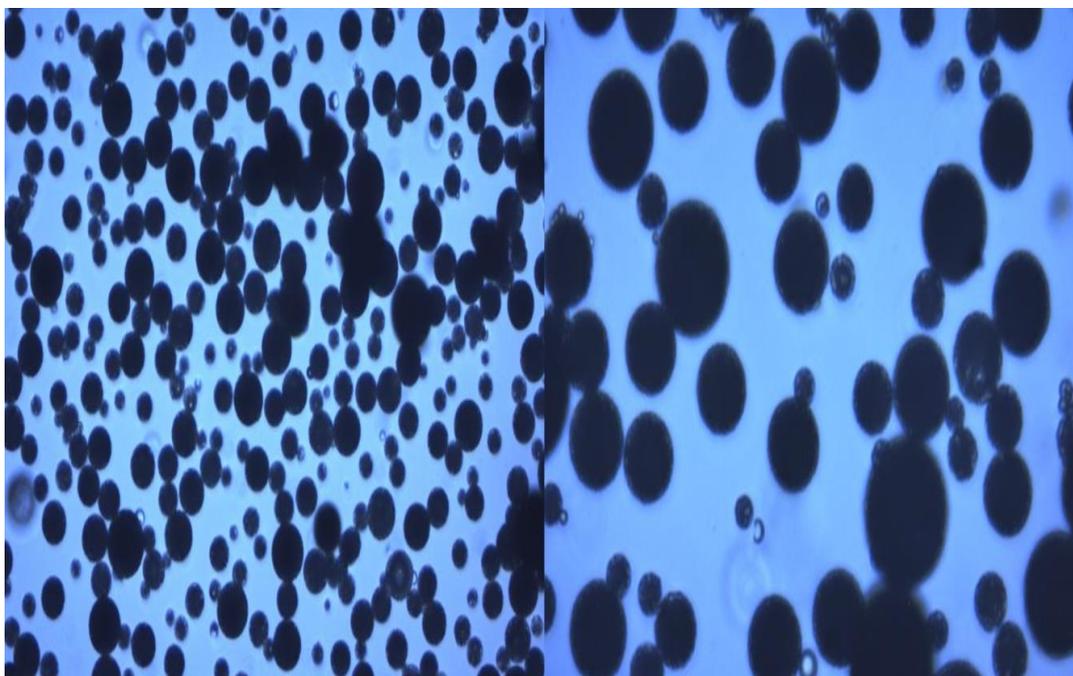


Figure 3.27: Observation microscopique de la poudre de la formulation optimale des microsponges du Diclofenac Sodique

3.3.4.2. FTIR

Aucune interaction entre le DC et le polymère n'était révélée par les spectres FTIR. Les pics d'absorption caractéristiques du DC sont présentés par les bandes suivantes: 1573.91 cm^{-1} (-C=O élongation d'ion carboxyle), 1558.48 cm^{-1} (C=C élongation du cycle aromatique) et 748.38 cm^{-1} (C-Cl élongation) (Kebebe *et al* ; 2010).

Les pics d'absorption du spectre de l'éthylcellulose sont obtenus a 1049.27 cm^{-1} (C-O-C élongation), 2970.38 cm^{-1} et (C-H élongation) (Madni *et al* ; 2014).

le spectre IR de la formulation optimale des microsponges (MP) ne révèle pas les pics correspondants au DC, ils disparaissent ou peuvent être cachées par les pics d'EC qui indique l'encapsulation du principe actif par le polymère et l'absence d'interaction chimique entre eux (figure 3.28).

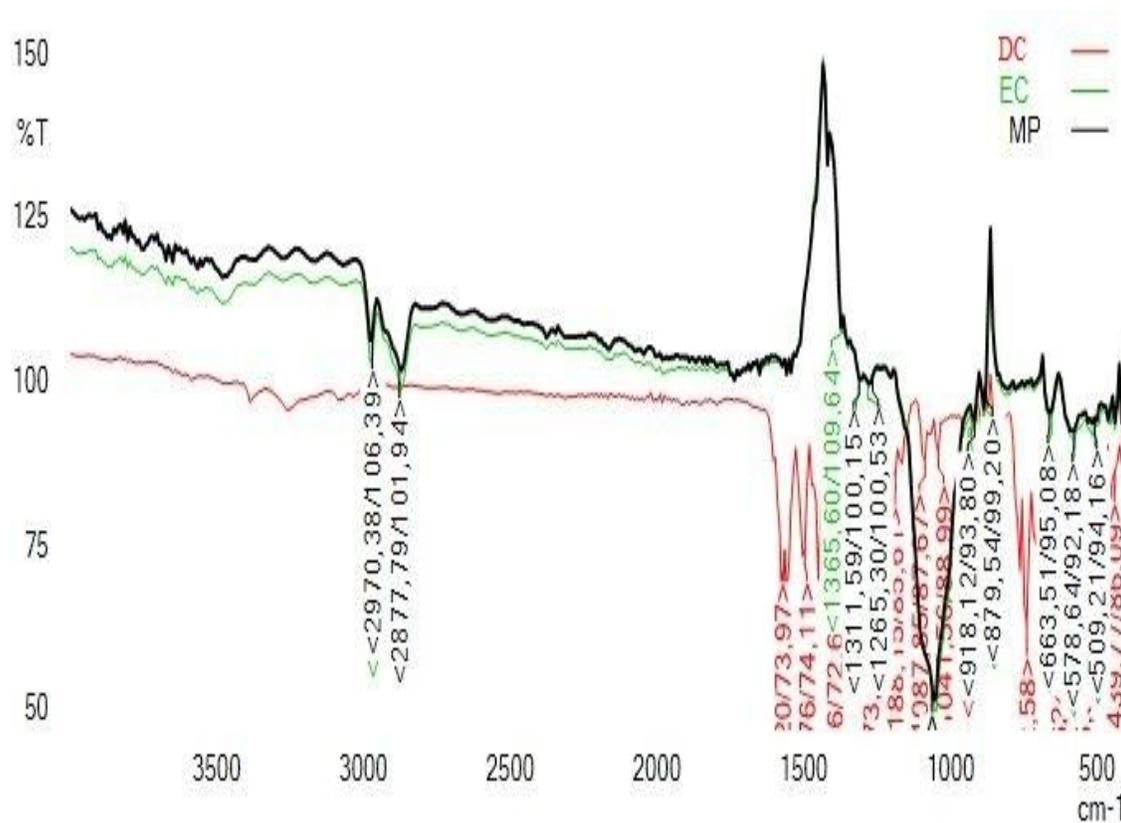


Figure 3.28 : Spectres FTIR des poudres de (DC) Diclofenac Sodique, (EC) éthylcellulose, (MP) formulation optimale des microsponges de Diclofenac Sodique

3.3.4.3. Dissolution *in vitro*

La dissolution *in vitro* a été réalisée à l'aide d'un dissolutest à 32°C dans un milieu de dissolution PBS (pH=5.8), ces conditions représentent la température et le pH de la peau. Les microsponges de DC ont été formulées dans l'objectif d'une libération dermique prolongée.

Le profil de dissolution présenté dans la figure 3.29 montre une libération prolongée de DC à partir des microsponges formulées, seuls 51.89% du DC ont été libérés pendant 24 heures. Le profil de dissolution présente un comportement biphasique, une libération rapide de 18.94% au bout d'une heure puis un début d'un plateau, cela peut être dû à la libération du DC encapsulé présent à la surface des microsponges en premier lieu avant la libération du DC encapsulé à l'intérieur des microsponges (**Deshmukh et Poddar; 2012**).

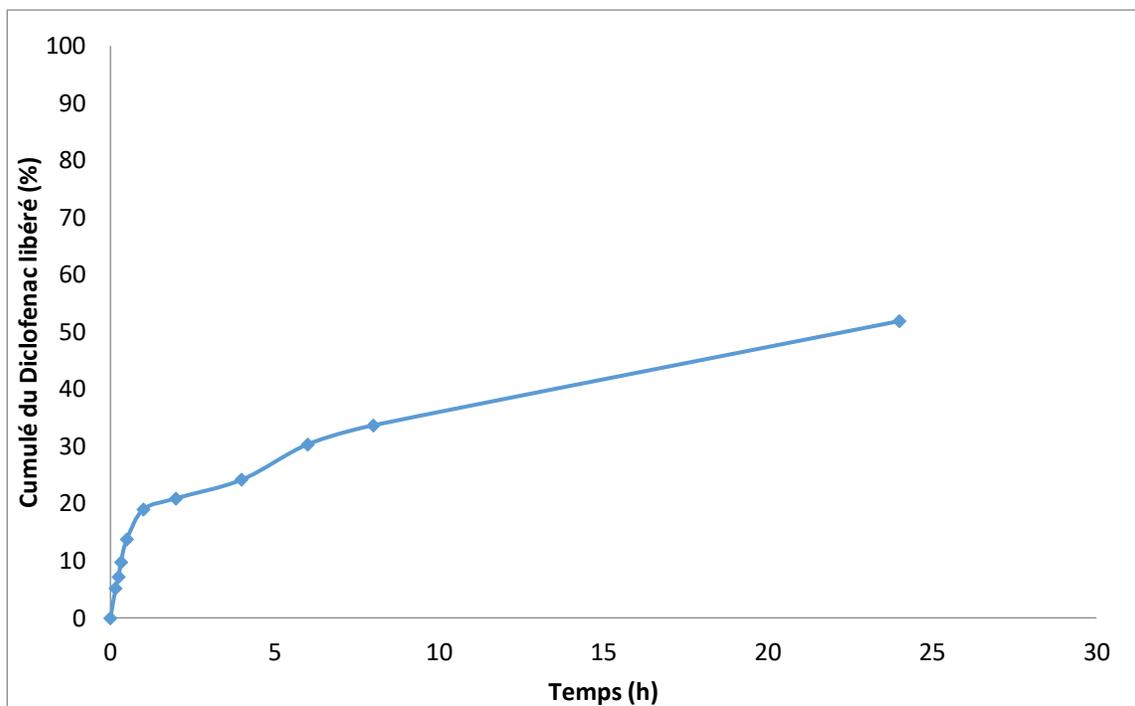


Figure 3.29 : Profil de dissolution du Diclofenac Sodique de la formulation optimale des microsponges dans un milieu PBS (pH = 5.8) à 32°C

Pour déterminer la cinétique de libération du DC à partir de la formule optimale des microsponges, les données de dissolution *in vitro* ont été ajustées selon différents modèles: ordre zéro, premier ordre, Higuchi, et Korsmeyer-Peppas, les droites ont été tracées et le coefficient de régression R^2 a été déterminé pour une comparaison et choix du modèle convenable. Les résultats présentés dans la figure 3.30 montrent des R^2 qui diffèrent d'un modèle à un autre, le R^2 le plus élevé et proche de l'unité qui valide la linéarité du modèle est celui du modèle Higuchi (**Obiedallah et al ; 2018**).

Le modèle Higuchi est utile pour étudier la dissolution à partir d'un système matriciel hétérogène, où la concentration du principe actif dans la matrice est inférieure à sa solubilité et/ou la libération se fait par un système poreux comme le cas des microsponges (**Gouda et al ; 2017**).

Ce modèle tenant compte de la constante de diffusivité du principe actif n'est valable que dans le cas de polymères qui ne gonflent pas de manière significative en contact avec l'eau (l'éthylcellulose) (**Bruschia ; 2015**).

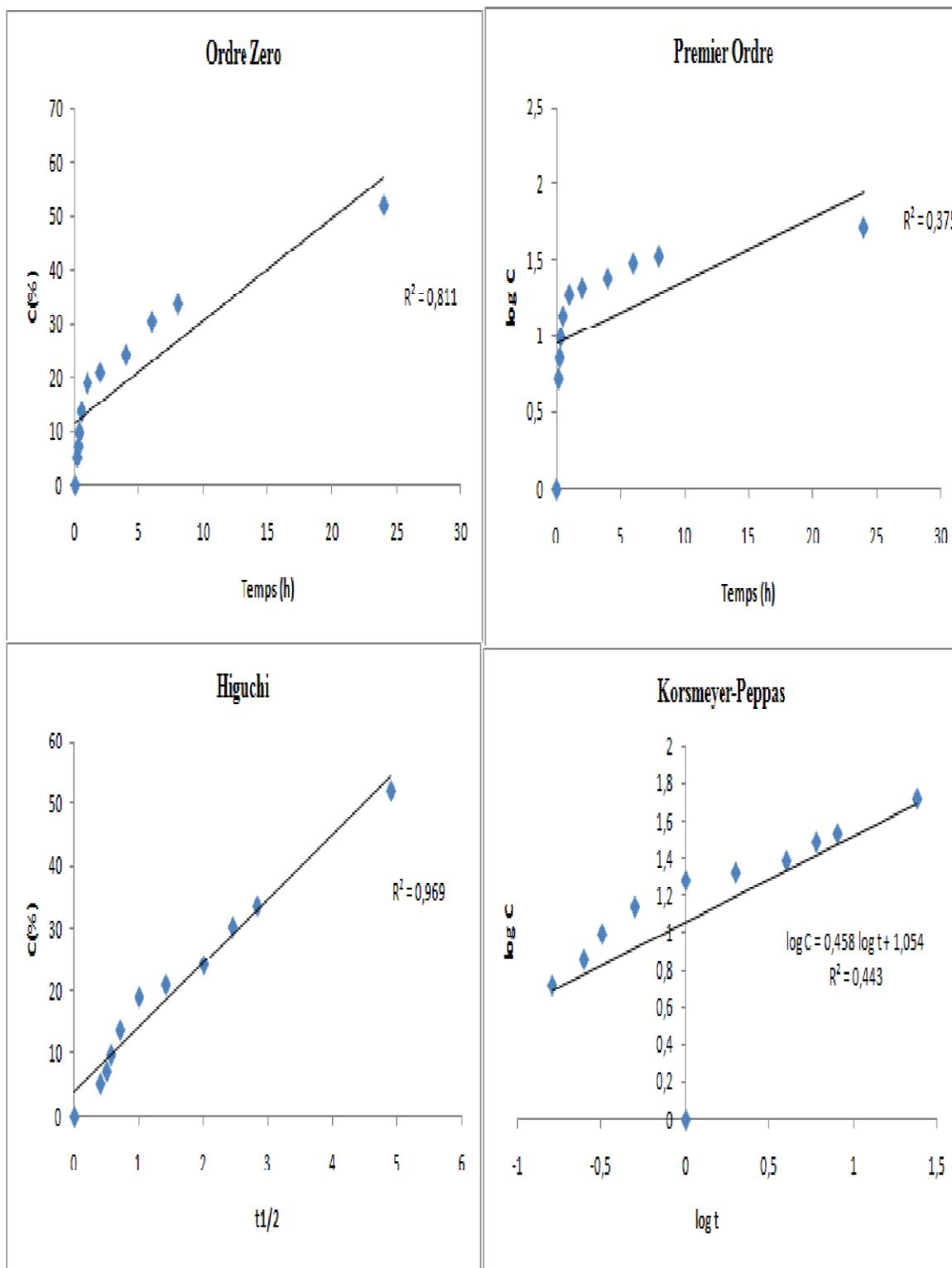


Figure 3.30 : Cinétique de libération du diclofenac sodique à partir de la formulation optimale des microsponges

CONCLUSION GENERALE

L'objectif de ce travail est de formuler des nanoparticules polymériques et microsponges de diclofenac sodique en utilisant l'éthylcellulose comme polymère pour prolonger sa libération pour une action locale ophtalmique pour les nanoparticules polymériques et cutanée pour les microsponges.

Les formulations ont été planifiées en utilisant la méthodologie des plans d'expériences, dans le but d'optimiser les conditions opératoires et le nombre de manipulations. Le plan factoriel complet est un plan de criblage qui a permis d'étudier l'influence des facteurs choisis sur les réponses mesurées et de déterminer leurs poids dans la formulation. Le plan composite centré est un plan d'optimisation qui a défini la zone de formulation optimale en utilisant la surface de réponse. L'utilisation des plans d'expériences a permis d'obtenir des modèles de régression qui évaluent la relation entre les facteurs et la réponse, puis ces modèles sont validés par une analyse de variance (ANOVA). Les modèles validés peuvent être utilisés pour le calcul des réponses d'une valeur donnée dans les plages choisies de chaque facteur.

Les nanoparticules polymériques de diclofenac sodique ont été préparées par la méthode d'émulsion-évaporation du solvant. L'influence de 4 facteurs : ratio massique EC/DC, concentration du PVA, vitesse d'homogénéisation, et durée d'homogénéisation sur 2 réponses : le taux d'efficacité d'encapsulation, et la taille des nanoparticules a été étudié en utilisant un plan factoriel complet. Pour le taux d'efficacité d'encapsulation, le facteur ratio massique DC/EC a un effet positif, tandis que la vitesse d'homogénéisation a un effet négatif et le temps d'homogénéisation et la concentration du PVA ont un effet négligeable.

La concentration du PVA présente un effet positif sur la taille des nanoparticules, contrairement à la vitesse d'homogénéisation qui présente un effet négatif. Les deux facteurs ratio massique DC/EC et la durée d'homogénéisation n'ont aucun effet.

Les nanoparticules optimisées obtenues en utilisant un plan composite centré présentent une taille moyenne de 226.83 nm avec un indice de polydispersité de 0.271, un taux d'efficacité d'encapsulation de 49.09 % et une libération prolongée du diclofenac sodique sur une période de 24 heures par un mécanisme de diffusion fickienne régi par une cinétique de libération de Korsmeyer-Peppas à des niveaux de facteurs : ratio massique de 73.66%, concentration du PVA de 0.56% et vitesse de 9220 rpm. Le test HET-CAM a donné une bonne tolérance, où les nanoparticules de diclofenac sodique formulées présentent une irritation modérée.

Elles peuvent être d'une grande utilité pratique pour un usage ophtalmique. Une étude de : perméabilité *ex-vivo* (absorption transcornéale), et pharmacocinétique oculaire restent à accomplir au futur.

Les microsponges de diclofenac sodique ont été préparées par la méthode de quasi émulsion-diffusion du solvant (ESD). Le plan de criblage a défini les facteurs les plus influant sur les deux réponses. Pour le taux d'efficacité d'encapsulation, la concentration du PVA, le ratio massique ont un effet positif sur la réponse contrairement à la vitesse d'agitation qui ne présente aucun effet significatif sur le taux d'efficacité d'encapsulation. Pour le rendement de production, la vitesse d'agitation a un effet négligeable sur la réponse, le ratio massique a un effet positif tandis que la concentration du PVA a un effet négatif.

Les microsponges optimisées obtenues en utilisant un plan composite centré présentent un taux d'efficacité d'encapsulation de 31.02 %, un rendement de production de 66.44%, et une libération prolongée du diclofenac sodique sur une période de 24 heures suivant le modèle d'Higuchi à des niveaux de facteurs : ratio massique de 79.08%, et concentration du PVA de 0.47%.

Les microsponges formulées du diclofenac sodique peuvent être incorporées dans une formulation à usage topique pour application cutanée: gel, pommade, ect et doit être évaluée par des essais *in vivo* pour confirmer les résultats de la dissolution *in vitro* et assurer son efficacité pour une libération prolongée du diclofenac sodique.

BIBLIOGRAPHIE

1. Ahuja.M, Dhake.A.S, Sharma.S.K, Majumdar.D.K. Diclofenac-loaded Eudragit S100 nanosuspension for ophthalmic delivery. *Journal of Microencapsulation*, (2011); 28(1): 37–45.
2. Ahuja.M, Dhake.A.S, Sharma.S.K, Majumdar.D.K. Topical Ocular Delivery of NSAIDs. *The AAPS Journal* (2008); 10(2): 229-241.
3. Aldawsari.H, Badr-Eldin.S.M. Microsponges as promising vehicle for drug delivery and targeting: Preparation, characterization and applications. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* (2013); 7(17):873-881.
4. Alli.P.R, Bargaje.B.P, Mhaske.N.S. Sustained release drug delivery systems: a modern formulation approach. *Asian Journal of Pharmaceutical Technology and Innovation* (2016); 4(17):108-118.
5. Anton.J. *Design of Experiments for Engineers and Scientists* (2003); Elsevier Science & Technology Books, 6-8.
6. Arias.J.L, López-Viota.M, López-Viota.J, Delgado.A.V. Development of iron/ethylcellulose (core/shell) nanoparticles loaded with diclofenac sodium for arthritis treatment. *International Journal of Pharmaceutics* (2009); 382: 270–276.
7. Asasutjarit.R, Theerachayanan.T, Kewsuwan.P, Veeranodha.S, Fuongfuchat.A, Ritthidej.G.C. Development and Evaluation of Diclofenac Sodium Loaded-N-Trimethyl Chitosan Nanoparticles for Ophthalmic Use. *AAPS Pharm Sci Tech* (2015); 16(5): 1013-1024.
8. Attama.A, Reichl.S, Müller-Goymann.C.C. Diclofenac sodium delivery to the eye: *In vitro* evaluation of novel solid lipid nanoparticle formulation using human cornea construct. *International Journal of Pharmaceutics* (2008); 355: 307–313.
9. Babb.R. Gastrointestinal complications of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *The Western Journal of Medicine* (1992); 157:444-447.
10. Baccarin.M.A, Evangelista.R.C, Lucinda-Silva.R.M. Ethylcellulose Microspheres containing Sodium Diclofenac: Development and Characterization. *Acta Farm. Bonaerense* (2006); 25 (3): 401-4.
11. Bagley.D.M, Waters,D, Kong.B.M. Development of a 10-day chorioallantoic membrane vascular assay as an alternative to the Draize rabbit eye irritation test. *Food Chem. Toxicol* (1994); 32(12):1155-1160.
12. Barzegar-Jalali.M , Alaei-Beirami.M , Javadzadeh.Y , Mohammadi.G , Hamidi.A , Andalib.S , Adibkia.K. Comparison of physicochemical characteristics and drug release of diclofenac sodium–eudragit® RS100 nanoparticles and solid dispersions. *Powder Technology* (2012); 219: 211–216.
13. Batra.S, Karatia.M.K, Bilandi.A. A Review on Sustained Release Matrix Tablets of Pioglitazone. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Letters* (2015); 5 (1):509-511.
14. Bhatia.S. Nanoparticles Types, Classification, Characterization, Fabrication Methods and Drug Delivery Applications. *Natural Polymer Drug Delivery Systems*(2016); Springer International Publishing Switzerland, 33-93.
15. Brahmduitt.B, Kumar Kamboj.V, Kumar.A, Hooda.M.S, Sangwan.P. Nanotechnology: Various methods used for preparation of Nanomaterials. *Asian Journal of Pharmacy and Pharmacology* (2018); 4(4): 386-393.

16. Brogden.R.N, Heel.R.C, Pakes.G.E, Speight.T.M , Avery.G.S. Diclofenac Sodium: A Review of its Pharmacological Properties and Therapeutic Use in Rheumatic Diseases and Pain of Varying Origin. *Drugs* (1980); 20(1): 24-48.
17. Bruschi.M.L. Mathematical models of drug release. *Strategies to Modify the Drug Release from Pharmaceutical Systems* (2015); Elsevier Ltd. 63-86.
18. Budhian.A, Siegel.S.J, Winey.K.I. Haloperidol-loaded PLGA nanoparticles: Systematic study of particle size and drug content. *International Journal of Pharmaceutics* (2007); 336:367–375.
19. Chowdary.K.P.R, Dana.S.B. Preparation and evaluation of ethylcellulose coated microcapsules for controlled release of Diclofenac. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences* (2011); 2 (1): 608-615.
20. Calvo.P, Remunan-Lopez,C, Vila-Jato.J.L, Alonso.M.J. Novel Hydrophilic Chitosan–Polyethylene Oxide Nanoparticles as Protein Carriers. *Journal of Applied Polymer Science* (1997) ; 63 : 125–132.
21. Collins.L.M, Dziak.J.J, Li.R. Design of Experiments with Multiple Independent Variables: A Resource Management Perspective on Complete and Reduced Factorial Designs. *Psychol Methods* (2009); 14(3): 202–224.
22. Campos.E, Branquinho.J, Carreira.A.S, Carvalho.A, Coimbra.P, Ferreira.P, Gil.M.H. Designing polymeric microparticles for biomedical and industrial applications. *European Polymer Journal* (2013) ; 49 :2005–2021.
23. Crucho.C.I.C, Barros.M.T. Polymeric nanoparticles: A study on the preparation variables and characterization methods. *Materials Science and Engineering C* (2017); 80: 771–784.
24. Darandale A.S, Ghule. P.J, Aher. A.A, Narwate B.M. Sustained release dosage form: a concise review. *International Journal of Pharmaceutics & Drug Analysis* (2017); 5(4): 153-160.
25. Davidovich-Pinhas.M, Barbut.S, Marangoni,A.G. Physical structure and thermal behavior of ethylcellulose. *Cellulose* (2014); 21:3243–3255.
26. De Jong.W, Borm.P. Drug delivery and nanoparticles: applications and hazards. *International Journal of Nanomedicine* (2008); 3(2): 133-149.
27. Derouiche M.T, Abdenour.S. HET-CAM test. Application to shampoos in developing countries. *Toxicology in Vitro* (2017) ; 45: 393–396.
28. Deshmukh.K, Poddar.S.S. Tyrosinase inhibitor-loaded microspoon drug delivery system: new approach for hyper pigmentation disorders. *Journal of Microencapsulation* (2012); 29(6): 559–568.
29. Desquilbet. L. Guide pratique de validation statistique de méthodes de mesure : répétabilité, reproductibilité, et concordance . Version 12.9 ; (2021).
30. Dhillon S, Gill K. Basic pharmacokinetics. *Clinical Pharmacokinetics* (2006); 1-44. Edité par Soraya Dhillon, Andrzej Kostrzewski. Pharmaceutical Press Chicago, USA.
31. Drexler.E. Engines of Creation: The Coming Era of Nanotechnology (1987).
32. El-Habashy.S.E, Allam.A.N, El-Kamel.A.H. Ethyl cellulose nanoparticles as a platform to decrease ulcerogenic potential of piroxicam: formulation and in vitro/in vivo evaluation. *International Journal of Nanomedicine* (2016); 11: 2369–2380.
33. El-Newehy. M. H., El-Naggar. M.E.; Alotaiby.S; El-Hamshary.H; Moydeen.M; Al-Deyab.S. Preparation of biocompatible system based on electrospun CMC/PVA nanofibers as controlled release carrier of diclofenac sodium. *Journal of Macromolecular Science, Part A: Pure and Applied Chemistry* (2016), 53(9): 566-573.

34. Eltayeb.M, Stride.E, Edirisinghe.M. Preparation, characterization and release kinetics of ethylcellulose nanoparticles encapsulating ethylvanillin as a model functional component. *Journal of Functional Foods* (2015); 14: 726–735.
35. Fahmy U. A., El-Ghamry H. A., El-Sisi A., Aldawsari H., Ahmed O. A. A. Polymeric Nanoparticulate Formulation To Improve Bioavailability Of Metformin In Rats. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures* (2018); 13(4):1223-1229.
36. Fang.D, Chen.Y, Xu.B, Ren.K,He.Z , He.L ,Lei.Y , Fan.C ,Song.X. Development of Lipid-Shell and Polymer Core Nanoparticles with Water-Soluble Solidoside for Anti-Cancer Therapy. *Internatinal Journal of Molecular Sciences* (2014); 15:3373-3388.
37. Gaaz.T.S, Sulong.A.B, Akhtar.M.N, Kadhum.A.H, Mohamad.A.B., Al-Amiery.A.A. Properties and Applications of Polyvinyl Alcohol, Halloysite Nanotubes and Their Nanocomposites. *Molecules* (2015); 20: 22833–22847.
38. Gareth. A. L, Didier.M. Roger.P. *Pharmaceutical Experimental Design* (1999); Head quarters Marcel Dekker, Inc. 270 Madison Avenue, New York, NY 10016.
39. Geetha.M, Murthy.K, Basavaraj.B, Ahalya.N. *Pharmaceutical Nanotechnology: past, present and future*. *International journal of pharmaceutical sciences and nanotechnology* (2016); 9(1): 3061-3072.
40. Ghaderi.S, Ghanbarzadeh.S, Mohammadhassani.Z, Hamishehkar.H. Formulation of Gammaoryzanol-Loaded Nanoparticles for Potential Application in Fortifying Food Products. *Advanced Pharmaceutical Bulletin* (2014); 4(2): 549-554.
41. Gouda.R, Baishya.H, Qing.Z. Application of Mathematical Models in Drug Release Kinetics of Carbidopa and Levodopa ER Tablets. *Journal of Developing Drugs* (2017); 6(2): 1-8.
42. Goupy.J. Étude Comparative De Divers Plans D'expériences. *Revue De Statistique Appliquée* (1990) ; 38(4) :5-44.
43. Goupy.J, *Les Plans D'expériences*, Revue Modulad (2006) ; 74-116.
44. Goupy.J, Creighton.L. *Introduction to Design of Experiments with JMP® Examples* (2007); 3^{ème} Edition, SAS institute Inc., Cary, NC, USA.
45. Guhagarkar.S.A, Malshe.V.C, Devarajan.P.V. Nanoparticles of Polyethylene Sebacate: A New Biodegradable Polymer. *AAPS PharmSciTech* (2009); 10(3): 935-942.
46. Gulati. N, Tomar. N, Nagaich. U. Miconazole Microsponges based topical delivery system for diaper dermatitis. *Ars Pharm* (2016); 57(2): 77-87.
47. Haskell.R.J. *Physical Characterization of Nanoparticles*. In Gupta.R.B, Kompella.U.B (ed) *Nanoparticle Technology for Drug Delivery* (2006); 103-130, 1^{ère} edition. Taylor & Francis Group, 270 Madison Avenue New York, NY 10016.
48. Hassan.C.M, Peppas.N.A. Structure and applications of poly(vinyl)alcohol hydrogels produced by conventional crosslinking or by freezing/thawing methods. In Dusek.K. *Advances in polymer science* (2000); 153: 37-65.
49. Hussain.H, Dhyani.A, Juyal.D, Bahuguna.A. Formulation and evaluation of gel-loaded microsponges of diclofenac sodium for topical delivery. *The Pharma Innovation Journal* (2014); 3(10): 58-63.
50. Jain.V, Jain.D, Singh.R. Factors Effecting the Morphology of Eudragit S-100 Based Microsponges Bearing Dicyclomine for Colonic Delivery. *Journal of Pharmaceutical Sciences* (2011); 100(4):1545-1552.
51. Jain.S, Rathil.V.V, Jain.A.K, Das.M, Godugu.C. Folate-decorated PLGA nanoparticles as a rationally designed vehicle for the oral delivery of insulin. *Nanomedicine* (2012); 7(9): 1311–1337.

52. Jelvehgari.M, Valizadeh.H, Motlagh.R.J, Montazam.H. Formulation and Physicochemical Characterization of Buccoadhesive Microspheres Containing Diclofenac Sodium. *Advanced Pharmaceutical Bulletin* (2014); 4(3): 295-3.
53. Junqueira.M.V, Bruschi.M.L. A Review About the Drug Delivery from Microsponges. *AAPS PharmSciTech* (2018);19(4):1501-1511.
54. Jyothi.K,N, Kumar.P.D, Arshad.P, Karthik.M, Panneerselvam.T. Microsponges: A Promising Novel Drug Delivery System. *Journal of Drug Delivery & Therapeutics* (2019); 9(5-s):188-194.
55. Kaity.S, Maiti.S, Ghosh.A.K, Pal.D, Ghosh.A,Banerjee.S. Microsponges: A novel strategy for drug delivery system. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research* (2010); 1(3): 283-290.
56. Kamel.S, Ali.N, Jahangir.K, Shah.S.M, El-Gendy.A.A. Pharmaceutical significance of cellulose: A review. *eXPRESS Polymer Letters* (2008); 2(11): 758–778.
57. Kaur.M, Datta.M. Diclofenac Sodium Adsorption onto Montmorillonite: Adsorption Equilibrium Studies and Drug Release Kinetics. *Adsorption Science & Technology* (2014); 32(5): 365-387.
58. Kebebe D, Belete A, Gebre-Mariam T. Evaluation of Two Olibanum Resins as Rate Controlling Matrix Forming Excipients in Oral Sustained Release Tablets. *Ethiopian Pharmaceutical Journal* (2010); 28(2):95-109.
59. Kheradmandnia.S; Vasheghani-Farahani, Ebrahim; Nosrati, Mohsen. The Effect of Process Variables on the Properties of Ketoprofen Loaded Solid Lipid Nanoparticles of Beeswax and Carnauba Wax. *Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering* (2010); 29(4): 181-187.
60. Khoder.A. Optimisation de composants hyperfréquences par la technique des plans à surfaces de réponses. Thèse doctorat, Université de Limoges (2011) ; 27-33.
61. Kreuter.J. Nanoparticles—a historical perspective. *International Journal of Pharmaceutics* (2007) ; 331 : 1–10.
62. Kroto H. The 2009 Lindau Nobel Laureate Meeting: Sir Harold Kroto, Chemistry 1996. *JoVE* (2010); 38.
63. Küçüktürkmen.B, Öz.U.C, Bozkir.A. In Situ Hydrogel Formulation for Intra-Articular Application of Diclofenac Sodium-Loaded Polymeric Nanoparticles. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences* (2017); 14(1):56-64.
64. Kumar.A, Saienni.A, Dixit.N. Synthesis and Characterization of Nanoencapsulated Drugs. In Kumar.A, Mansour.H.M Friedman.A, Blough.E.R (ed). *Nanomedicine in Drug Delivery* (2013); 23-42.Taylor & Francis Group, LLC, CRC Press, Broken Sound Parkway NW, Suite 300Boca Raton, FL 33487-2742.
65. Kumar.B, Jalodia.K, Kumar.P, Gautam.H, Recent advances in nanoparticle-mediated drug delivery. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* (2017); 41: 260-268.
66. Kumar.R, Sharma.S.K, Jaimini.M, Alam.N. Microsponge Drug Delivery Systems for Novel Topical Drug Delivery. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Letters* (2014); 4 (3):384-390.
67. Lombardo.D, Kiselev.M.A, Caccamo.M.T. Smart Nanoparticles for Drug Delivery Application: Development of Versatile Nanocarrier Platforms in Biotechnology and Nanomedicine. *Journal of Nanomaterials*(2019); 1-26.
68. Liu.D, Ge.Y, Tang.Y, Yuan.Y, Zhang.Q, Li.R, Xu.Q.Solid lipid nanoparticles for transdermal delivery of diclofenac sodium: preparation, characterization and in vitro studies. *Journal of Microencapsulation* (2010); 27(8): 726–734.

69. Liversidge.G.G, Cundy.K.C. Particle size reduction for improvement of oral bioavailability of hydrophobic drugs: I. Absolute oral bioavailability of nanocrystalline danazol in beagle dogs. *International Journal of Pharmaceutics* (1995); 125: 91-97.
70. Lokhande A.B, Mishra S, Kulkarni R.D, Naik J.B. Preparation and characterization of repaglinide loaded ethylcellulose nanoparticles by solvent diffusion technique using high pressure homogenizer. *Journal of Pharmacy Research* (2013); 7(5):421-426.
71. Madni A, Ekwali M, Ahmad S, Din I, Hussain Z, Khan N, Akhlaq M, Mahmood M and Zafar H. FTIR Drug-Polymer Interactions Studies of Perindopril Erbumine. *Journal of the Chemical Society of Pakistan* (2014); 36(6):1064-1070.
72. Mahant.S, Kumar.S, Nanda.S, Rao.R. Microsponges for dermatological applications: Perspectives and challenges. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* (2020); 15: 273–291.
73. Maiti. S, Kaity.S, Ray.S, Sa.B. Development and evaluation of xanthan gum-facilitated ethylcellulose microsponges for controlled percutaneous delivery of diclofenac sodium. *Acta Pharm* (2011) ; 61:257–270.
74. Mali.A, Jadhav.S, Mane.P, Tamboli.A. Development and Validation of UV Spectrophotometric estimation of Diclofenac Sodium Bulk and Tablet Dosage form using Area under Curve Method. *PharmaTutor* (2015); 3(4): 21-25.
75. Martínez. A, Fernández.A, Pérez. E, Benito. M, Teijón. J.M, Blanco. M.D. Polysaccharide-Based Nanoparticles for Controlled Release Formulations. In Hashim.A.A (ed). *The Delivery of Nanoparticles* (2012); 185-213. Intech, Janeza Trdine 9, 51000 Rijeka, Croatia.
76. Mayur.K, Ramesh.K, Nitin.J, Prashant.P, Rajendra.G, Jeevan.N. Ethyl cellulose based microsphere delivery system for anti-fungal vaginal gels of tioconazole. *Journal of Drug Delivery & Therapeutics* (2013); 3(6): 14-20.
77. Mohanraj.V.J, Chen. Y. Nanoparticles – A Review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* (2006); 5 (1): 561-573.
78. Murtaza.G. Ethylcellulose microparticles: a review. *Acta Poloniae Pharmaceutica-Drug Research*(2012); 69 (1):11-22.
79. Murthy. T.E.G.K., Chowdary. K.P.R. Formulation and evaluation of ethylcellulose coated diclofenac sodium microcapsules: influence of solvents. *Indian journal of pharmaceutical sciences* (2005); 67(2):216-219.
80. Nagavarma.B.V.N, Hemant.K.S.Y, Ayaz A, Vasudha L.S, Shivakumar H.G. Different Techniques for Preparation of Polymeric Nanoparticles- A Review. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research. Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research* (2012); 5(3):16-23.
81. Meghachou.W. Approche méthodologique a la modélisation par les plans d'expériences pour l'élaboration d'un yaourt. Thèse magister, Université d'Oran (2014) : 28-31.
82. Nekkanti. V, Vabalaboina.V , Pillai.R.. Drug Nanoparticles – An Overview. In Hashim.A.A (ed). *The Delivery of Nanoparticles* (2012); 111-129. Intech, Janeza Trdine 9, 51000 Rijeka, Croatia.
83. Nokhodchi.A, Jelvehgari.M, Siahi.M.R, Mozafari.M.R. Factors affecting the morphology of benzoyl peroxide microsponges. *Micron* (2007) ; 38 : 834–840.
84. Obiedallah.M.M, Abdel-Mageed.A.M, Elfaham.T.H. Ocular Administration of Acetazolamide Microsponges In situ Gel Formulations. *Saudi Pharmaceutical Journal* (2018); 26(7): 909-920.

85. Osmani R.M, Aloorkar.N.H, Thaware.B.U, Kulkarni.P.K, Moin.A, Hani.U, Srivastava.U, Bhosale.R.R. Microsponges based drug delivery system for augmented gastroparesis therapy: Formulation development and evaluation. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* (2015); 10(5): 442-451.
86. Pal.S.L, Jana.U, Manna.P.K, Mohanta.G.P, Manavalan.R. Nanoparticle: An overview of preparation and characterization. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* (2011); 1 (6): 228-234.
87. Paliwal. R, Babu. R.J, Palakurthi.S. Nanomedicine Scale-up Technologies: Feasibilities and Challenges. *AAPS PharmSciTech* 2014 ; 15(6) : 1527-1534.
88. Parikh.B.N, Gothi.G.D, Patel.T.D, Chavda.H.V, Patel.C.N. micro sponge as novel topical drug delivery system. *Journal of Global Pharma Technology* (2010); 2(1): 17-29.
89. Patil.J.S, Yadav.S.K, mokale.V.J, Naik.J.B. Development of surfactant free nanoparticles by a single emulsion high pressure homogenization technique and effect of formulation parameters on the drug entrapment and release. *International Journal of Pharmacy* (2013); 3(4): 843-852.
90. Patra.J.K, Das.G, Fraceto.L, Campos E.V.R, Rodriguez-Torres.M.P, Acosta-Torres.L.S, Diaz-Torres.L.A, Grillo.R, Swamy.M.K, Sharma.S, Habtemariam.S, Shin.H. Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. *Journal of Nanobiotechnology* (2018); 16:71.
91. Peltonen.L, Aitta.J, Hyvönen.S, Karjalainen.M, Hirvonen.J. Improved entrapment efficiency of hydrophilic drug substance during nanoprecipitation of poly(l)lactide nanoparticles. *AAPS PharmSciTech* (2004); 5 (1): 1-6.
92. *Pharmacopée Européenne* 6 : 661
93. Prasertmanakit.S, Praphairaksit.N, Chiangthong.W, Muangsin.N. Ethyl Cellulose Microcapsules for Protecting and Controlled Release of Folic Acid. *AAPS Pharm Sci Tech* (2009) ; 10(4): 1104-1112.
94. Qi.X, Qin.X, Yang.R, Qin.J , Li.W ,Luan.K , Wu.Z , Song.L. Intra-articular Administration of Chitosan Thermosensitive In Situ Hydrogels Combined With Diclofenac Sodium Loaded Alginate Microspheres. *Journal of Pharmaceutical Sciences* (2016); 105: 122-130.
95. Rajab.N.A, Jawad.N.S. Formulation and *in vitro* evaluation of piroxicam micro sponge as a tablet. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* (2016); 8(2): 104-114.
96. Ratnaparakhi. D. U, Patil. S.S, Patil. S.V. Formulation and evaluation of micro sponge of benzyol peroxide by quasi emulsion solvent diffusion method. *International Journal of Pharmaceutical Research* (2015); 7 (2): 38-43.
97. Riegel.M, Ellis.P.P. High-performance liquid chromatographic assay for antiinflammatory agents diclofenac and flurbiprofen in ocular fluids. *Journal of Chromatography B* (1994); 654: 140-145.
98. Rizvi.S.A.A, Saleh.A.M. Applications of nanoparticle systems in drug delivery technology. *Saudi Pharmaceutical Journal* (2018); 26: 64–70.
99. Roohani.M, Habibi. Y, Belgacem.N.M, Ebrahim.G, Karimi.A.N, Dufresne.A. Cellulose whiskers reinforced polyvinyl alcohol copolymers nanocomposites. *European Polymer Journal* (2008); 44(8): 2489-2498.

100. Roux. R. Élaboration d'assemblages colloïdaux à partir de nanoparticules de poly(acide lactique) et de chitosane, Thèse de Doctorat de l'Université de Lyon (2013).
101. Rowe.R.S, Sheskey.P.J, Owen.S.C. Handbook of Pharmaceutical Excipients (2006); 5th edition. Pharmaceutical Press, Publication Division of the Royal Pharmaceutical Society of Great Britain.
102. Sajeev.C, Vinay.G, Archana.R, Saha.RN. Oral controlled release formulation of diclofenac sodium by microencapsulation with ethyl cellulose. Journal of Microencapsulation (2002); 19(6): 753-760.
103. Sarkar P, Bhattacharya S, Pal TK. Application of statistical design to evaluate critical process parameters and optimize formulation technique of polymeric nanoparticles. Royal Society open sciences (2019); 6: 190896.
104. Shah.M.P, Patel.P.K, Lin.S, Madan.P.L. Formulation variables affecting release of diclofenac sodium from eudragit-loaded microparticles. Asian Journal of Pharmaceutical Sciences (2011); 6 (6): 241-250.
105. Shaha.V, Jain.H, Krishna.J, Patel.P. Microsponge drug delivery: A Review. International journal of research pharmaceutical sciences (2010); 1(2): 212-218.
106. Shahzad.Y, Saeed.S, Ghorri.M.U, Mahmood.T, Yousaf.A.M, Jamshaid.M, Sheikh.R, Rizvi.S.A. Influence of polymer ratio and surfactants on controlled drug release from cellulosic microsponges. International Journal of Biological Macromolecules (2017) ; S0141-8130(17)33903-X.
107. Sharma.N, Madan.P, Lin.S. Effect of process and formulation variables on the preparation of parenteral paclitaxel-loaded biodegradable polymeric nanoparticles: A co-surfactant study. Asian Journal of Pharmaceutical Sciences(2015).
108. Sharma.R, Jain.S, Tiwari.R . Nanoparticle Technology: Formulating Poorly Water-Soluble Compounds: A Review. International journal of pharmaceutical sciences and research, (2015); 6(1): 57-71.
109. Sharma.S, Sharma.A,Kaur.C. Microsponges: as a topical drug delivery system. International journal of pharmaceutical sciences and research (2020); 11(2): 524-534.
110. Skoutakis.V.A, Carter.C.A, Mickle.T.R, Smith.V.H, Arkin.C.R, Alissandratos.J, el E. Petty.D. Review of diclofenac and evaluation of its place in therapy as a nonsteroidal antiinflammatory agent. Drug intelligence and Clinical Pharmacy (1988) ; 22 : 850-858.
111. Sonali, Singh.R.P, Prajapati.S.K. Formulation and evaluation of prednisolone loaded microsponges for colon drug delivery: *in-vitro* and pharmacokinetic study. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research (2014); 5(5): 1994-2005.
112. Sumio Iijima. Carbon nanotubes: past, present, and future. Physica B (2002); 323: 1–5.
113. Swamy N.G.N, Zaheer .A, Santosh K.I.H. Eudragit RS 100 nanosuspensions for the controlled ophthalmic delivery of diclofenac sodium. Thai Journal of Pharmaceutical Sciences (2013); 37: 157-170.
114. Swathi.P, Krishna Sailaja.A, Formulation of Ibuprofen Loaded Ethyl Cellulose Nanoparticles by Nanoprecipitation Technique. Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research (2014); 7(3): 44-48.
115. Tefas.L.R, Tomuța.I, Achim.M, Vlase.L. Development and Optimization Of Quercetin-Loaded PIGA Nanoparticles by Experimental Design. Clujul Medical (2015); 88 (2): 214-223.

116. Thassu.D, Pathak.Y, Deleers.M. Nanoparticulate Drug-Delivery Systems: An Overview. Nanoparticulate Drug Delivery Systems (2007); Informa Healthcare USA, Inc. USA,Inc. 270 Madison Avenue New York, NY10016. 1-24.
117. Tibbals.H.F. Medical nanotechnology and nanomedicine (2010); Publisher: Taylor and Francis CRC Press. 1stedition.
118. Tiwari.A, Mishra.M.K, Shukla.A, Yadav.S.K. Microsponge: An augmented drug delivery system. American Journal of Pharm Tech Research (2016); 6(6): 79-95.
119. Trivedi.D, Karri.V, Spandana.A, Kuppusamy.G. Design of Experiments: Optimization and Applications in Pharmaceutical Nanotechnology. Chemical Science Review and Letters (2015); 4(13):109 – 120.
120. Tyagi.S, Kumar Pandey.V. Nanoparticles: An Overview of Preparation. Research and Reviews: Journal of Pharmaceutics and Nanotechnology (2016); 4 (2): Special Reviews on Pharmaceutics and Nanotechnology.
121. Ulubay.M, Yurt.K, Kaplan.A, Atilla.M. The use of diclofenac sodium in urological practice: A structural and neurochemical based review. Journal of Chemical Neuroanatomy (2018) ; 87 :32-36.
122. Vera Candioti.L, DeZan.M.M, Cámara.M.S, Goicoechea.H.C. Experimental design and multiple response optimization using the desirability function in analytical methods development. Talanta (2014); 124:123–138.
123. Wagh.V.D, Apar.D.U. Cyclosporine A Loaded PLGA Nanoparticles for Dry Eye Disease: *In Vitro* Characterization Studies. Journal of Nanotechnology (2014); 10.
124. WO 2010/081623. Pharmaceutical formulation of nanonised fenofibrate (22.07.2010).
125. Zhai.X.J, Yu. Y, Chen.F, Lu Y.N. Comparative Bioavailability and Tolerability of Single and Multiple Doses of 2 Diclofenac Sodium Sustained-Release Tablet Formulations in Fasting, Healthy Chinese Male Volunteers .Current Therapeutic Research (2013); 7: 53-58.
126. Zhao.R, Li.J, Wang.J, Yin.Z, Zhu.Y, and Liu.W. Development of Timolol-Loaded Galactosylated Chitosan Nanoparticles and Evaluation of Their Potential for Ocular Drug Delivery. AAPS PharmSciTech (2017).
127. Zielinska.A, Carreiró.F, Oliveira.A.M, Neves.A, Pires.B, Venkatesh.D.N, Durazzo.A , Lucarini.M, Eder.P, Silva.A.M, Santini .A, Souto.E.B. Polymeric Nanoparticles: Production, Characterization, Toxicology and Ecotoxicology. Molecules (2020); 25:3731.

Annexe 1 : Table de distribution de t-Student

<i>d.d.l</i>	α								
	0,9	0,5	0,3	0,2	0,1	0,05	0,02	0,01	0,001
1	0,158	1,000	1,963	3,078	6,314	12,706	31,821	63,656	636,619
2	0,142	0,816	1,386	1,886	2,920	4,303	6,965	9,925	31,598
3	0,137	0,765	1,250	1,638	2,353	3,182	4,541	5,841	12,924
4	0,134	0,741	1,190	1,533	2,132	2,776	3,747	4,604	8,610
5	0,132	0,727	1,156	1,476	2,015	2,571	3,365	4,032	6,869
6	0,131	0,718	1,134	1,440	1,943	2,447	3,143	3,707	5,959
7	0,130	0,711	1,119	1,415	1,895	2,365	2,998	3,499	5,408
8	0,130	0,706	1,108	1,397	1,860	2,306	2,896	3,355	5,041
9	0,129	0,703	1,100	1,383	1,833	2,262	2,821	3,250	4,781
10	0,129	0,700	1,093	1,372	1,812	2,228	2,764	3,169	4,587
11	0,129	0,697	1,088	1,363	1,796	2,201	2,718	3,106	4,437
12	0,128	0,695	1,083	1,356	1,782	2,179	2,681	3,055	4,318
13	0,128	0,694	1,079	1,350	1,771	2,160	2,650	3,012	4,221
14	0,128	0,692	1,076	1,345	1,761	2,145	2,624	2,977	4,140
15	0,128	0,691	1,074	1,341	1,753	2,131	2,602	2,947	4,073
16	0,128	0,690	1,071	1,337	1,746	2,120	2,583	2,921	4,015
17	0,128	0,689	1,069	1,333	1,740	2,110	2,567	2,898	3,965
18	0,127	0,688	1,067	1,330	1,734	2,101	2,552	2,878	3,922
19	0,127	0,688	1,066	1,328	1,729	2,093	2,539	2,861	3,883
20	0,127	0,687	1,064	1,325	1,725	2,086	2,528	2,845	3,850
21	0,127	0,686	1,063	1,323	1,721	2,080	2,518	2,831	3,819
22	0,127	0,686	1,061	1,321	1,717	2,074	2,508	2,819	3,792
23	0,127	0,685	1,060	1,319	1,714	2,069	2,500	2,807	3,768
24	0,127	0,685	1,059	1,318	1,711	2,064	2,492	2,797	3,745
25	0,127	0,684	1,058	1,316	1,708	2,060	2,485	2,787	3,725
26	0,127	0,684	1,058	1,315	1,706	2,056	2,479	2,779	3,707
27	0,127	0,684	1,057	1,314	1,703	2,052	2,473	2,771	3,689
28	0,127	0,683	1,056	1,313	1,701	2,048	2,467	2,763	3,674
29	0,127	0,683	1,055	1,311	1,699	2,045	2,462	2,756	3,660
30	0,127	0,683	1,055	1,310	1,697	2,042	2,457	2,750	3,646
$+\infty$	0,126	0,674	1,036	1,282	1,645	1,960	2,326	2,576	3,291

Annexe 2 : Table de Fisher à 5% de risque

$l_B \backslash l_A$	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	161,45	199,5	215,71	224,58	230,16	233,99	236,77	238,88	240,54
2	18,51	19,00	19,16	19,25	19,30	19,33	19,35	19,37	19,38
3	10,13	9,55	9,28	9,12	9,01	8,94	8,89	8,85	8,81
4	7,71	6,94	6,59	6,39	6,26	6,16	6,09	6,04	6,00
5	6,61	5,79	5,41	5,19	5,05	4,95	4,88	4,82	4,77
6	5,99	5,14	4,76	4,53	4,39	4,28	4,21	4,15	4,10
7	5,59	4,74	4,35	4,12	3,97	3,87	3,79	3,73	3,68
8	5,32	4,46	4,07	3,84	3,69	3,58	3,50	3,44	3,39
9	5,12	4,26	3,86	3,63	3,48	3,37	3,29	3,23	3,18
10	4,96	4,10	3,71	3,48	3,33	3,22	3,14	3,07	3,02
11	4,84	3,98	3,59	3,36	3,20	3,09	3,01	2,95	2,90
12	4,75	3,89	3,49	3,26	3,11	3,00	2,91	2,85	2,80
13	4,67	3,81	3,41	3,18	3,03	2,92	2,83	2,77	2,71
14	4,60	3,74	3,34	3,11	2,96	2,85	2,76	2,70	2,65
15	4,54	3,68	3,29	3,06	2,90	2,79	2,71	2,64	2,59
16	4,49	3,63	3,24	3,01	2,85	2,74	2,66	2,59	2,54
17	4,45	3,59	3,20	2,96	2,81	2,70	2,61	2,55	2,49
18	4,41	3,55	3,16	2,93	2,77	2,66	2,58	2,51	2,46
19	4,38	3,52	3,13	2,90	2,74	2,63	2,54	2,48	2,42
20	4,35	3,49	3,10	2,87	2,71	2,60	2,51	2,45	2,39
21	4,32	3,47	3,07	2,84	2,68	2,57	2,49	2,42	2,37
22	4,30	3,44	3,05	2,82	2,66	2,55	2,46	2,40	2,34
23	4,28	3,42	3,03	2,80	2,64	2,53	2,44	2,37	2,32
24	4,26	3,40	3,01	2,78	2,62	2,51	2,42	2,36	2,30
25	4,24	3,39	2,99	2,76	2,60	2,49	2,40	2,34	2,28
26	4,23	3,37	2,98	2,74	2,59	2,47	2,39	2,32	2,27
27	4,21	3,35	2,96	2,73	2,57	2,46	2,37	2,31	2,25
28	4,20	3,34	2,95	2,71	2,56	2,45	2,36	2,29	2,24
29	4,18	3,33	2,93	2,70	2,55	2,43	2,35	2,28	2,22
30	4,17	3,32	2,92	2,69	2,53	2,42	2,33	2,27	2,21
40	4,08	3,23	2,84	2,61	2,45	2,34	2,25	2,18	2,12
60	4,00	3,15	2,76	2,53	2,37	2,25	2,17	2,10	2,04
120	3,92	3,07	2,68	2,45	2,29	2,18	2,09	2,02	1,96
$+\infty$	3,84	3,00	2,60	2,37	2,21	2,10	2,01	1,94	1,88

$l_B \backslash l_A$	10	12	15	20	24	30	40	60	120	$+\infty$
1	241,88	243,9	245,95	248,02	249,05	250,1	251,14	252,2	253,25	254,31
2	19,4	19,41	19,43	19,45	19,45	19,46	19,47	19,48	19,49	19,50
3	8,79	8,74	8,70	8,66	8,64	8,62	8,59	8,57	8,55	8,53
4	5,96	5,91	5,86	5,80	5,77	5,75	5,72	5,69	5,66	5,63
5	4,74	4,68	4,62	4,56	4,53	4,50	4,46	4,43	4,40	4,36
6	4,06	4,00	3,94	3,87	3,84	3,81	3,77	3,74	3,70	3,67
7	3,64	3,57	3,51	3,44	3,41	3,38	3,34	3,30	3,27	3,23
8	3,35	3,28	3,22	3,15	3,12	3,08	3,04	3,01	2,97	2,93
9	3,14	3,07	3,01	2,94	2,90	2,86	2,83	2,79	2,75	2,71
10	2,98	2,91	2,85	2,77	2,74	2,70	2,66	2,62	2,58	2,54
11	2,85	2,79	2,72	2,65	2,61	2,57	2,53	2,49	2,45	2,40
12	2,75	2,69	2,62	2,54	2,51	2,47	2,43	2,38	2,34	2,30
13	2,67	2,60	2,53	2,46	2,42	2,38	2,34	2,30	2,25	2,21
14	2,60	2,53	2,46	2,39	2,35	2,31	2,27	2,22	2,18	2,13
15	2,54	2,48	2,40	2,33	2,29	2,25	2,20	2,16	2,11	2,07
16	2,49	2,42	2,35	2,28	2,24	2,19	2,15	2,11	2,06	2,01
17	2,45	2,38	2,31	2,23	2,19	2,15	2,10	2,06	2,01	1,96
18	2,41	2,34	2,27	2,19	2,15	2,11	2,06	2,02	1,97	1,92
19	2,38	2,31	2,23	2,16	2,11	2,07	2,03	1,98	1,93	1,88
20	2,35	2,28	2,20	2,12	2,08	2,04	1,99	1,95	1,90	1,84
21	2,32	2,25	2,18	2,10	2,05	2,01	1,96	1,92	1,87	1,81
22	2,30	2,23	2,15	2,07	2,03	1,98	1,94	1,89	1,84	1,78
23	2,27	2,20	2,13	2,05	2,01	1,96	1,91	1,86	1,81	1,76
24	2,25	2,18	2,11	2,03	1,98	1,94	1,89	1,84	1,79	1,73
25	2,24	2,16	2,09	2,01	1,96	1,92	1,87	1,82	1,77	1,71
26	2,22	2,15	2,07	1,99	1,95	1,90	1,85	1,80	1,75	1,69
27	2,20	2,13	2,06	1,97	1,93	1,88	1,84	1,79	1,73	1,67
28	2,19	2,12	2,04	1,96	1,91	1,87	1,82	1,77	1,71	1,65
29	2,18	2,10	2,03	1,94	1,90	1,85	1,81	1,75	1,70	1,64
30	2,16	2,09	2,01	1,93	1,89	1,84	1,79	1,74	1,68	1,62
40	2,08	2,00	1,92	1,84	1,79	1,74	1,69	1,64	1,58	1,51
60	1,99	1,92	1,84	1,75	1,70	1,65	1,59	1,53	1,47	1,39
120	1,91	1,83	1,75	1,66	1,61	1,55	1,50	1,43	1,35	1,25
$+\infty$	1,83	1,75	1,67	1,57	1,52	1,46	1,39	1,32	1,22	1,00

**Annexe 3: Article accepté pour publication dans le journal: Brazilian Journal of
Pharmaceutical Sciences
FORMULATION AND OPTIMIZATION OF DICLOFENAC SODIUM LOADED
ETHYLCELLULOSE NANOPARTICLES**

Fatima Zohra BADAOU^{1,3*}, Djallel BOUZID^{2,3}

¹Department of Pharmaceutical Engineering, Faculty of Processes Engineering, Salah Boubnider University, Constantine 25000, Algeria, ²National Polytechnic School of Constantine 25000, Algeria, ³Process Engineering Laboratory for Sustainable Development and Health Products, Constantine, Algeria

***Correspondence:**

F. Z. Badaoui

Department of Pharmaceutical Engineering

Faculty of Processes Engineering

Salah Boubnider University

Constantine 25000, Algeria.

E-mail: fatimazohra.badaoui@univ-constantine3.dz

Address: Department of Chemical Engineering, Faculty of Process Engineering,
Salah Boubnider-Constantine 3University, Constantine 25000, Algeria

Process Engineering Laboratory for Sustainable Development and Health Products
Constantine, Algeria

Address: National Polytechnic School of Constantine, Constantine 25000, Algeria

ABSTRACT:

Design of experiment (DoE) is a useful time and cost-effective tool for analyzing the effect of independent variables on the formulation characteristics. The aim of this study is to evaluate the effect of the process variables on the characteristics involved in the preparation of Diclofenac Sodium (DC) loaded ethylcellulose (EC) nanoparticles (NP) using Central Composite Design (CCD). NP were prepared by W/O/W emulsion solvent evaporation method. Three factors were investigated (i. e; DC/EC mass ratio, PVA concentration, homogenization speed) in order to optimize the entrapment efficiency (EE) and the particle size of NP. The optimal formulation was characterized by Fourier Transform Infrared (FTIR), Scanning Electron Microscopy (SEM), Differential Scanning Calorimetry (DSC), and *in vitro* release. Optimized formulation showed an EE of 49.09 % and an average particle size of 226.83 nm with a polydispersity index of 0.271. No drug-polymer interaction was observed in FTIR and DSC analysis. SEM images showed that the particles are spherical and uniform. The *in vitro* release study showed that 53.98 % of the encapsulated drug has been released over 24 hours period. This study demonstrated that statistical experimental design methodology can optimize the formulation and the process variables to achieve favorable responses.

Keywords: Design of experiment, Nanoparticles, Diclofenac Sodium, Sustained release.

INTRODUCTION

Nanoparticles are one of the promising drug delivery systems for controlling particle size, surface properties and release of therapeutic ingredients in order to reach the target at the therapeutic desirable proportion and rate regimen (Mohanraj, Chen, 2006).

Biocompatible, biodegradable and non-biodegradable polymers as Chitosan derivatives, PLA, PLGA, EC, are used for the preparation of polymeric nanoparticles by dissolution, entrapment, encapsulation or attachment of a drug to a nanoparticle matrix (Nagavarma *et al.*, 2012). NP matrix carriers can improve the encapsulation efficiency and stability of the drugs inside the NPs and provide effective drug levels over longer periods of time compared to traditional therapy (Cooper, Harirforoosh, 2014). Different methods are used for the preparation of nanoparticles. One of the most used is the solvent evaporation method. Uniform concentration of drug at the site of absorption, maintaining of stable plasma concentration and reducing toxic effects can be achieved by developing controlled-release drug delivery systems (Barzegar-Jalali *et al.*, 2012).

Diclofenac sodium (DC) is a non-steroidal anti-inflammatory drug used for treatment of inflammatory diseases. DC has a short half-life of 1-2h and should be administered frequently at a high dose, which leads to severe undesirable effects and rises the possibility for missing a dose (Arias *et al.*, 2009). The development of sustained dosage release forms was needed to avoid these inconveniences (Krishna Sailaja, Nandini, 2016).

The design of experiment (DoE) is a valuable tool used for optimization. It allows the finding of the optimal conditions for the best responses of experiments and understand the relationship between the dependent and independent variables in the formulation or process development (Vera Candioti *et al.*, 2014). The response surface methodology (RSM) is the combination of statistical and mathematical techniques based on the recapitulation of experimental data from experimental design (Trivedi *et al.*, 2015). One of the promising RMS used in DoE is central composite design (Yang *et al.*, 2014).

The objective of this study was to formulate and characterize DC-loaded EC-NP with the aim to evaluate the effect of the process variables on the characteristics involved using Central Composite Design.

MATERIAL AND METHODS

Materials

Diclofenac sodium was purchased from CAYMAN chemical company. Ethylcellulose (viscosity 22cP, 48% ethoxyl), Polyvinylalcohol (87-90% hydrolyzed, average mol wt. 30.000-70.000) and dialysis bags (cut-off 12 kDa) were procured from Sigma Aldrich USA. All other solvents and ingredients used were of analytical grade.

Methods

Preparation of nanoparticles

DC loaded EC nanoparticles were prepared by the W/O/W emulsion solvent evaporation method. First, 1mL of a DC aqueous solution (the internal aqueous phase) was emulsified by vigorous magnetic stirring into a 5mL of EC organic solution (ethyl acetate). Then this primary emulsion (W/O) was diluted in 10 mL of PVA aqueous solution (the external aqueous phase) while stirring using a homogenizer (KINEMATICA, Polytron PT 2500 E) in order to create the W/O/W emulsion. The NP suspension was obtained after solvent evaporation under magnetic stirring at room temperature. NP were separated by centrifugation (Sigma 3-30 KS, Germany) at 20.000 rpm for 20 min. The supernatant was kept for drug assay as described later.

Characterization of nanoparticles

Entrapment efficiency (EE)

For measuring drug entrapment efficiency in the NPs, the supernatant part of the centrifuged NPs sample was carefully removed and examined to determine the amount of non-encapsulated drug after dilution with purified water and analysis by UV-visible spectroscopy (Shimadzu, UV 1800, Japan) at 276 nm. Entrapment efficiency (EE) was calculated as follows:

$$EE = \frac{\text{Initial weight of feeding drug} - \text{Weight of not encapsulated drug in supernatant}}{\text{Initial weight of feeding drug}} \times 100 \quad (1)$$

Average particle size

The particle size of nanoparticles was determined using dynamic light scattering technique at 25°C using a Zetasizer (Horiba scientific, nano partica SZ-100). All measurements were performed in triplicate.

Fourier Transform Infrared spectroscopy (FTIR)

FT-IR spectra for DC, EC and the optimized nanoparticles were generated by means of FT-IR spectrophotometer (JASCO, FT/IR-6300, United States). This was used to investigate whether there was any degradation or chemical interaction between the polymer and the active component after formulation. Spectra were recorded from the powder in the range of 400–4000 cm⁻¹, at room temperature.

Differential scanning calorimetry (DSC)

DSC thermograms of DC, EC, and the optimized NPs were determined by a differential scanning calorimeter (DSC 131, SETARAM instrumentation, France). Each sample, 2 to 3 mg, was accurately weighed into a close aluminum solid pan. The scanning rate was run at 10°C/min from 20 to 300°C under argon purge. DSC analysis of pure DC and EC was performed to identify the drug melting point peak and polymer glass transition temperature (T_g), respectively. The optimized NPs of DC–EC were also analyzed to observe the change of the melting endotherm of DC.

SEM

Morphological observation of optimized NPs was carried out using Scanning Electron Microscopy (JSM-7100F). NPs powder was mounted onto metal stubs using double-sided adhesive tape. The stubs were then coated with conductive carbon black. The morphology of the particles was then examined.

In vitro dissolution

In vitro dissolution studies were performed using USP Type II dissolution test apparatus (Paddle) (Distek 2500, Inc., USA) at 50 rpm and a temperature of 37 °C ± 0.5. In a dialysis bag, 18.7 mg of the optimized NPs containing 4.6 mg of DC was diluted by Phosphate buffered saline (solution?) (PBS, pH=7.4), then was immersed into a Pyrex flask that contains 500 mL of PBS (pH=7.4). At predetermined intervals, 3mL of aliquots were withdrawn and replaced by the same volume of PBS (pH= 7.4). Then the aliquots were filtered using a 0.45 μm membrane filter, diluted suitably, and analyzed by a UV spectrophotometer at 276 nm. The dissolution study was carried out in triplicate and their average was used for determining the release kinetics.

Kinetics of drug release

The *in vitro* drug release data was analyzed according to zero order, first order and Higuchi and Korsmeyer-peppas model. The selection of the most suitable model was based on the regression coefficient.

Experimental design

The effects of formulation factors on the NPs characteristics and the optimization procedure were examined by employing a CCD. The design and statistical analysis were performed by Minitab 18[®] Software for design of experiments (DOE).

TABLE I: Variables in CCD.

Independent variables (Factors)	Level used, real and coded values		
	Low (-1)	Intermediate (0)	High (+1)
X ₁ : Mass Ratio of DC / EC (%)	66.66	73.33	80
X ₂ : PVA concentration (%)	0.5	0.7	0.9
X ₃ : Homogenization speed (rpm)	8000	9000	10000
Dependent variables (responses)	Constraints		
Y1: Entrapment Efficiency (EE)	Maximize (20-100)		
Y2: Particle size (nm)	Minimize (100-400)		

Experimental factors and their levels were determined in preliminary studies using full factorial design (data not shown). The factors evaluated in this investigation, were the mass ratio of DC/ EC (X₁: $\frac{m_{EC}}{m_{DC}+m_{EC}} \times 100$), the PVA concentration (X₂: w/v %) and the homogenization speed (X₃: rpm) with different levels for each factor as described in Table I (coded and real values). The evaluated responses were the entrapment efficiency (Y1) and the average particle size (Y2).

TABLE II: Observed responses in CCD for DC nanoparticles.

Batch	Dependent variables			Independent variables		D
	X ₁ (%)	X ₂ (w/v %)	X ₃ (rpm)	Y1 (%)	Y2 (nm)	
1	66.66	0.5	8000	41.50	224.06	0.393
2	80	0.5	8000	44.30	236.66	0.409
3	66.66	0.9	8000	43.36	271.73	0.351
4	80	0.9	8000	45.40	275.30	0.347
5	66.66	0.5	10000	40.73	215.00	0.407
6	80	0.5	10000	42.50	209.70	0.421
7	66.66	0.9	10000	40.70	241.30	0.366
8	80	0.9	10000	43.25	264.50	0.364

9	62.11	0.7	9000	42.80	252.70	0.373
10	84.54	0.7	9000	45.75	265.10	0.384
11	73.33	0.36	9000	42.25	199.60	0.427
12	73.33	1.03	9000	46.75	303.10	0.343
13	73.33	0.7	7318	46.70	275.30	0.382
14	73.33	0.7	10681	43.50	227.40	0.406
15	73.33	0.7	9000	53.43	241.60	0.446
16	73.33	0.7	9000	49.06	247.30	0.446
17	73.33	0.7	9000	48.70	241.30	0.446
18	73.33	0.7	9000	51.25	237.50	0.446
19	73.33	0.7	9000	52.81	268.30	0.446
20	73.33	0.7	9000	50.90	237.60	0.446

The CCD design and the data obtained are summarized in Table II. The quadratic non-linear model generated by the design is in the following form:

$$Y = A_0 + A_1X_1 + A_2X_2 + A_3X_3 + A_{12}X_1X_2 + A_{23}X_2X_3 + A_{13}X_1X_3 + A_{11}X_1^2 + A_{22}X_2^2 + A_{33}X_3^2 \quad (2)$$

Where Y is the measured response associated with each factor level combination; A_0 is an intercept, A_1 , A_2 , A_3 are the linear regression coefficients, A_{12} , A_{13} , A_{23} are the interactive regression coefficients, and A_{11} , A_{22} , A_{33} are the quadratic regression coefficients; X_1 , X_2 and X_3 are the studied factors; X_1^2 , X_2^2 , X_3^2 are the quadratic effects, X_1X_2 , X_2X_3 , X_1X_3 represent the interaction between the variables (Vera Candiotiet *al*, 2014). An analysis of variance (ANOVA) was performed to establish the optimum conditions.

The desirable optimum region was selected by the desirability function method, wherein the constraints for choosing an optimum formulation were further narrowed as shown in Table I. First, the responses Y1 and Y2 are transformed into individual desirability function d1 and d2 that vary over the range $0 \leq (d1, d2) \leq 1$ (Fitrianto, Midi, 2012). For the first response, the desirability function d1 should be maximized as follow:

$$d1 = \left(\frac{Y1-L}{T-L} \right) \quad (3)$$

For the second response, the desirability function d2 should be minimized as follow:

$$d2 = \left(\frac{Y2-U}{T-U} \right) \quad (4)$$

Where, T is the target value desired, U, L are the upper and lower acceptable values of response. The overall desirability value (D) is calculated by the following equation

$$D = \sqrt{d1 \times d2} \quad (5)$$

The validation of the derived polynomial equations and the optimized formulation selected was carried out by the preparation of four optimum checkpoint formulations based on their predicted values for the response variables. The error prediction was calculated by comparing experimental values of the responses with the predicted values (Motwani *et al*, 2008).

RESULTS AND DISCUSSION

Experimental design

The results were assessed for R^2 , adjusted R^2 , p -values (model and lack of fit) as quality indicators for the model. Comparing the second order model and full quadratic model, the second order model had the highest R^2 values, highly significant model p -value ($p < 0.001$), and insignificant lack of fit p -value ($p > 0.10$) as listed in Table III.

For the fitted model, the experimental response might be represented by the following regression equation for both responses Y1 and Y2:

$$Y = A_0 + A_1X_1 + A_2X_2 + A_3X_3 + A_{11}X_1^2 + A_{22}X_2^2 + A_{33}X_3^2 \quad (6)$$

TABLE III: Regression analysis of the studied responses.

	model	Adjusted R^2	R^2	p -value		Observation
				model	Lack of fit	
Y1	Second order	0.859	0.904	<0.001***	0.892	Suggested
	Full Quadratic	0.828	0.906	<0.001***	0.723	-
Y2	Second order	0.792	0.857	<0.001***	0.528	Suggested
	Full Quadratic	0.737	0.861	<0.001***	0.329	-

The followings are the regression equations of the fitted model with statistically significant terms:

$$Y_1 = 51.07 + 1.03X_1 + 0.82X_2 - 0.93X_3 - 2.7X_1^2 - 2.62X_2^2 - 2.41X_3^2$$

$$Y_2 = 245.99 + 4.02X_1 + 25X_2 - 11.55X_3 + 2.15X_1^2 - 0.51X_2^2 - 0.51X_3^2$$

ANOVA was carried out to evaluate the significance of the fitted models on the responses and their quantitative effects. The effects of the model terms (intercept and coefficient) and associated p -values for the two responses are listed in Table IV. The value and sign of the quantitative effect correspond to the extent and the trend of the terms influence on the response, respectively. The term with a positive value in the regression equation show synergistic effect, whereas a negative value shows an antagonistic effect between the factor and the response.

TABLE IV: The coefficients of responses in the CCD design.

	Term	Responses	
		Y1	Y2
X ₁	Coefficient	1.034	4.022
	p -value	0.025*	0.225
X ₂	Coefficient	0.823	25.004
	p -value	0.064	< 0.001***
X ₃	Coefficient	-0.934	-11.555

	<i>p</i> -value	< 0.001***	0.003**
X_1^2	Coefficient	-2.707	2.152
	<i>p</i> -value	< 0.001***	0.496
X_2^2	Coefficient	-2.627	-0.518
	<i>p</i> -value	< 0.001***	0.869
X_3^2	Coefficient	-2.415	-0.518
	<i>p</i> -value	< 0.001***	0.869
Intercept	Coefficient	51.074	245.990
	<i>p</i> -value	< 0.001***	< 0.001***

For the optimized formulation, the observed value of drug loading (DL) is DL = 24.59%, the predicted maximum values of the responses are EE= 49.09% and particle size = 226.83 nm along with an individual desirability of 0.36 and 0.57, respectively. The overall desirability has a value of 0.458 with factors setting at 73.66% for the mass ratio, 0.56% for the PVA concentration and 9220.84 rpm for the speed of homogenization (Figure 1).

For the four checkpoint formulations, the results of the evaluation for EE and particle size were found to be within acceptable limits as listed in Table V. The validity of the generated regression equations was evaluated by determination of the error prediction.

TABLE V: Observed and predicted values and error prediction for the optimized formulation

Response variable	Observed value	Predicted value	Residual	Error prediction (%)
EE	46.32	49.09	2.77	5.64
Particle Size	224.16	226.83	2.67	1.17

Fourier Transform Infrared

The FTIR spectra revealed that there was no interaction between DC and the polymer. The characteristic absorption peaks of Diclofenac Sodium were obtained at wave numbers of 3384.46 cm^{-1} (NH stretching of the secondary amine), 1570.74 cm^{-1} ($\text{C}=\text{O}$ stretching of the carboxyl ion), 1554.34 cm^{-1} ($\text{C}=\text{C}$ ring stretching) and at 741.49 cm^{-1} ($\text{C}-\text{Cl}$ stretching) (Kebebe, Belete, Gebre-Mariam, 2010). The absorption peaks of EC were obtained at 1051.01 cm^{-1} ($\text{C}-\text{O}-\text{C}$ stretching), 2969.84 cm^{-1} ($\text{C}-\text{H}$ stretching) (Madniet *al*, 2014). In the IR spectrum of NPs, peaks corresponding to DC, NH stretching of the secondary amine (3387.35 cm^{-1}), $\text{C}-\text{Cl}$ stretching (743.42 cm^{-1}) still present, in contrary to $\text{C}=\text{O}$ stretching of the carboxyl ion and $\text{C}=\text{C}$ ring stretching which disappear or are buried in the peaks of EC indicating drug entrapment and the absence of chemical interaction between polymer and drug in nanoparticles as shown in Figure 2.

DSC

Thermal analysis is a supportive tool for determining the dispersion of the drug in polymeric materials. DSC thermograms of the DC, EC and optimized NPs are represented in Figure 3. The pure drug showed a high endothermic peak indicating its melting point at around 280°C which was absent in NPs.

SEM

The SEM micrographs showed that uniform NPs were successfully prepared using the solvent evaporation method. The optimized nanoparticles have a spherical shape and a smooth surface as shown in Figure 4.

In vitro release kinetic evaluation

In vitro drug release studies were performed to determine the sustained release nature of the formulation. In EC Formulation the drug release was slow and the spread extended. In fact, over a time period of 24 hours only 53.98% of the drug has been released from the EC Formulation (Figure 5).

The dissolution data were fitted to various kinetic equations and mechanism of drug release investigated. Equations (7-10) below are Zero order, First order, Higuchi and Korsmeyer-Peppas model, respectively.

$$Q_t = K_0 t \quad (7)$$

$$\ln Q_t = \ln Q_0 - K_1 t \quad (8)$$

$$Q_t = K_h t^{1/2} \quad (9)$$

$$\frac{Q_t}{Q_\infty} = K_p t^n \quad (10)$$

Where, Q_t is the percentage of drug released at time t , Q_0 is the initial amount of drug present in the formulation, K_0 , K_1 , K_h and K_p are the constants, Q_t/Q_∞ is the fractional drug release at time t and n is the diffusional exponent characterizing the transport mechanism. The criteria for selecting the most appropriate model were based on the regression coefficient (R^2) which was determined from the slope of the following plots: Cumulative percent drug release vs. Time (Zero order kinetic model), Log cumulative of percent drug remaining vs. Time (First order kinetic model), Cumulative percent of drug release vs Square root of Time (Higuchi model), Log cumulative percent drug release vs. Log time (Korsmeyer-Peppas model). In Korsmeyer-Peppas model, first 60% of drug release was fitted and the release exponent “ n ” was calculated which is indicative of drug release mechanism. According to Korsmeyer theory, if $n < 0.45$ then the drug release follows Fickian diffusion mechanism, for $0.45 < n < 0.89$ it follows Anomalous (non-Fickian) diffusion and $n > 0.89$ for Super Case II release mechanism (Lokhande *et al*, 2013).

TABLE VI: Release kinetics data for optimized nanoparticles.

Model	Zero order	First order	Higuchi	Korsmeyer-Peppas
R^2	0.72	0.47	0.91	0.97 $n = 0.42$

The results of Table VI show that the optimized nanoparticles follow a Korsmeyer-Peppas release model ($R^2=0.97$). The n value (0.42) is lower than 0.45 indicating that the release follows a Fickian diffusion mechanism.

CONCLUSIONS

The application of CCD is a useful tool for optimizing DC-loaded EC nanoparticles prepared by the emulsion solvent evaporation technique. The optimized nanoparticles obtained displayed an average particle size of 226.83 nm with a narrow polydispersity index (0.271), an EE of 49.09 % and a slow and prolonged drug release over a period of 24 hours by Fickian diffusion mechanism governed by a Korsmeyer-Peppas release kinetic type. Ethylcellulose nanoparticles of Diclofenac sodium can be of significant practical use for a sustaining drug release and decreasing side effects.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to DGRSDT-Algerian Ministry of Higher Education and Scientific Research for its financial support.

REFERENCES

- Arias JL, López-Viota M, López-Viota J, Delgado AV.; Development of Iron/ Ethyl cellulose (core/shell) Nanoparticles Loaded with Diclofenac Sodium for Arthritis Treatment. *Int. J. Pharm.* (2009); 382(1-2):270–276.
- Barzegar-Jalali M, Alaei-Beirami M, Javadzadeh Y, Mohammadi G, Hamidi A, Andalib S, Adibkia K. Comparison of physicochemical characteristics and drug release of diclofenac sodium–eudragit® RS100 nanoparticles and solid dispersions. *Powder Technology.* 2012; 219:211–216.
- Cooper D.L, Harirforoosh S. Design and Optimization of PLGA-Based Diclofenac Loaded Nanoparticles. *Plos One.* 2014;9(1):1-10.
- Fitrianto A, Midi H. Multi-Response Optimization via Desirability Function for the Black Liquor DATA. *Journal of Science and Technology.* 2012;4(1):91-101.
- Kebebe D, Belete A, Gebre-Mariam T. Evaluation of Two Olibanum Resins as Rate Controlling Matrix Forming Excipients in Oral Sustained Release Tablets. *Ethiop Pharm J.* 2010;28(2):95-109.
- Krishna Sailaja A, Nandini M. Preparation of diclofenac nanoparticles by desolvation technique using acetone as desolvating agent. *Indian Journal of Novel Drug Delivery.* 2016;8(1):42-45.
- Lokhande A.B, Mishra S, Kulkarni R.D, Naik J.B. Preparation and characterization of repaglinide loaded ethylcellulose nanoparticles by solvent diffusion technique using high pressure homogenizer. *Journal of Pharmacy Research.* 2013;7(5):421-426.
- Madni A, Ekwal M, Ahmad S, Din I, Hussain Z, Khan N, Akhlaq M, Mahmood M and Zafar H. FTIR Drug-Polymer Interactions Studies of Perindopril Erbumine. *J Chem Soc Pak.* 2014;36(6):1064-1070.
- Mohanraj V.J, Chen Y. Nanoparticles – A Review. *Trop J Pharm Res.* 2006;5(1):561-573.
- Motwani S.K, Chopra S, Talegaonkar S, Kohli K, Ahmad F.J, Khar R.K. Chitosan–sodium alginate nanoparticles as submicroscopic reservoirs for ocular delivery: Formulation, optimization and in vitro characterisation. *Eur J Pharm Biopharm.* 2008;68(3):513-525.

Nagavarma B.V.N.,Yadav H.K.S, Ayaz A, Vasudha L.S, Shivakumar H.G. Different techniques for preparation of polymeric nanoparticles- a review. Asian J Pharm Clin Res.2012;5:16-23.

Trivedi D, Reddy Karri VVS, Asha Spandana K M, Kuppusamy G. Design of Experiments: Optimization and Applications in Pharmaceutical Nanotechnology. Chem Sci Rev Lett. 2015;4(13):109-120.

Vera Candiotti L, De Zan M.M, Cámara M.S, Goicoechea H.C. Experimental design and multiple response optimization using the desirability function in analytical methods development. Talanta.2014;124:123-138.

Yang X.Y, Patel S, Sheng Y, Pal D, Mitral A.K. Statistical Design for Formulation Optimization of Hydrocortisone Butyrate-Loaded PLGA Nanoparticles. AAPS Pharm Sci Tech. 2014;15(3):569-587.

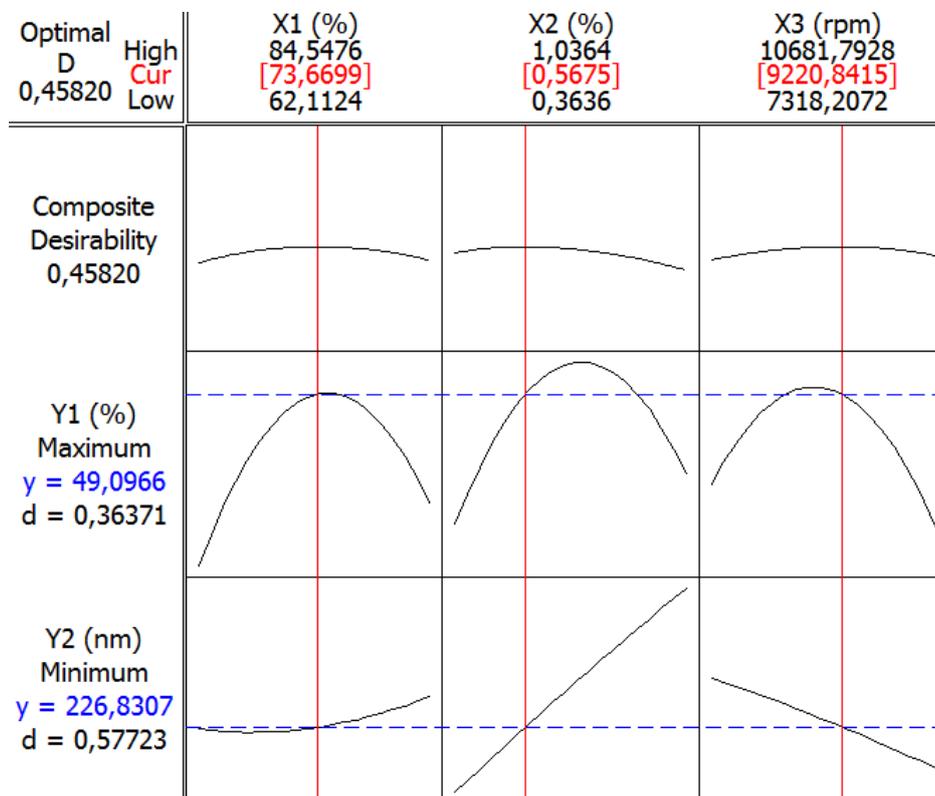


FIGURE 1-Optimum levels of factors and responses

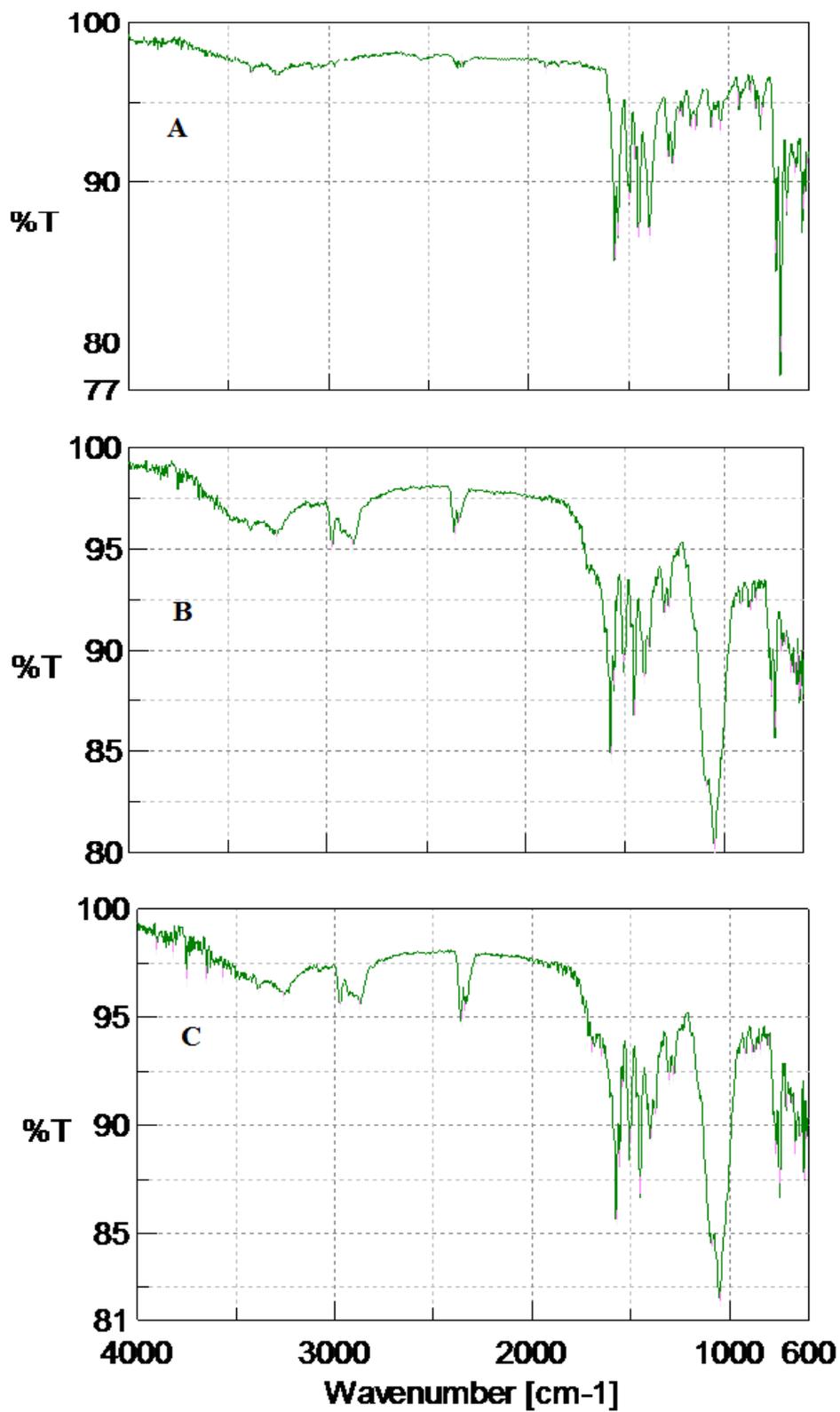


FIGURE 2-FTIRspectra of (A) Diclofenac sodium, (B) ethylcellulose, (C) diclofenac sodium loaded ethylcellulose nanoparticles

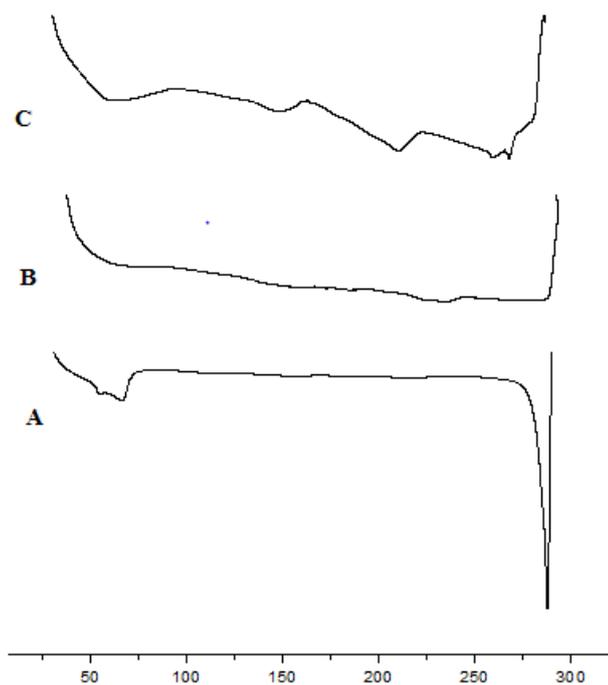


FIGURE 3- DSC thermograms of DC (A), EC (B), optimized NPs (C)

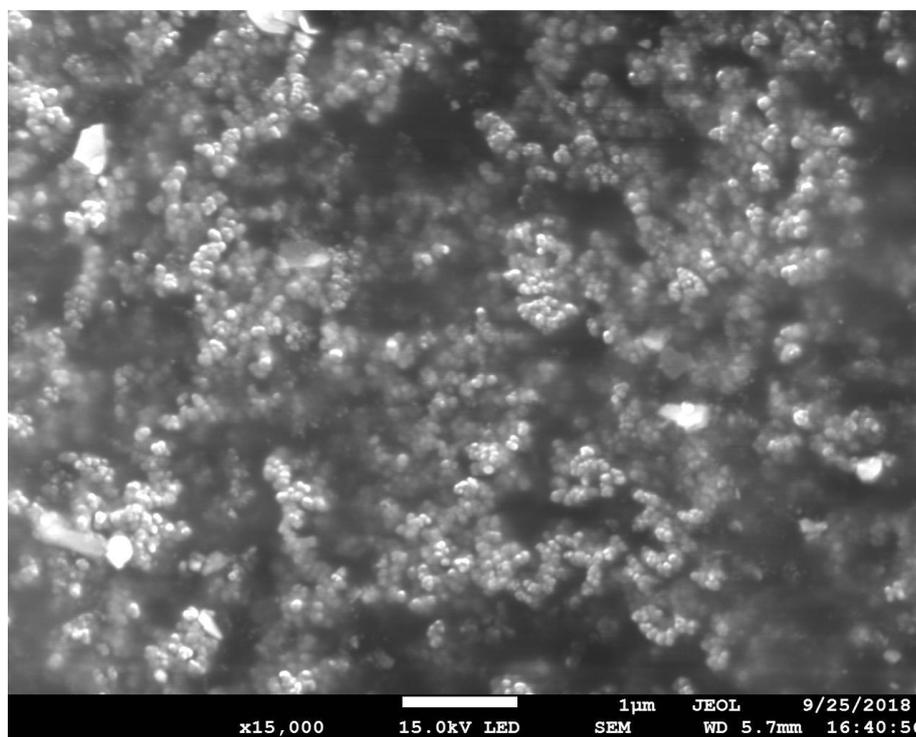


FIGURE 4-SEM micrographs of the optimized Diclofenac Sodium nanoparticles

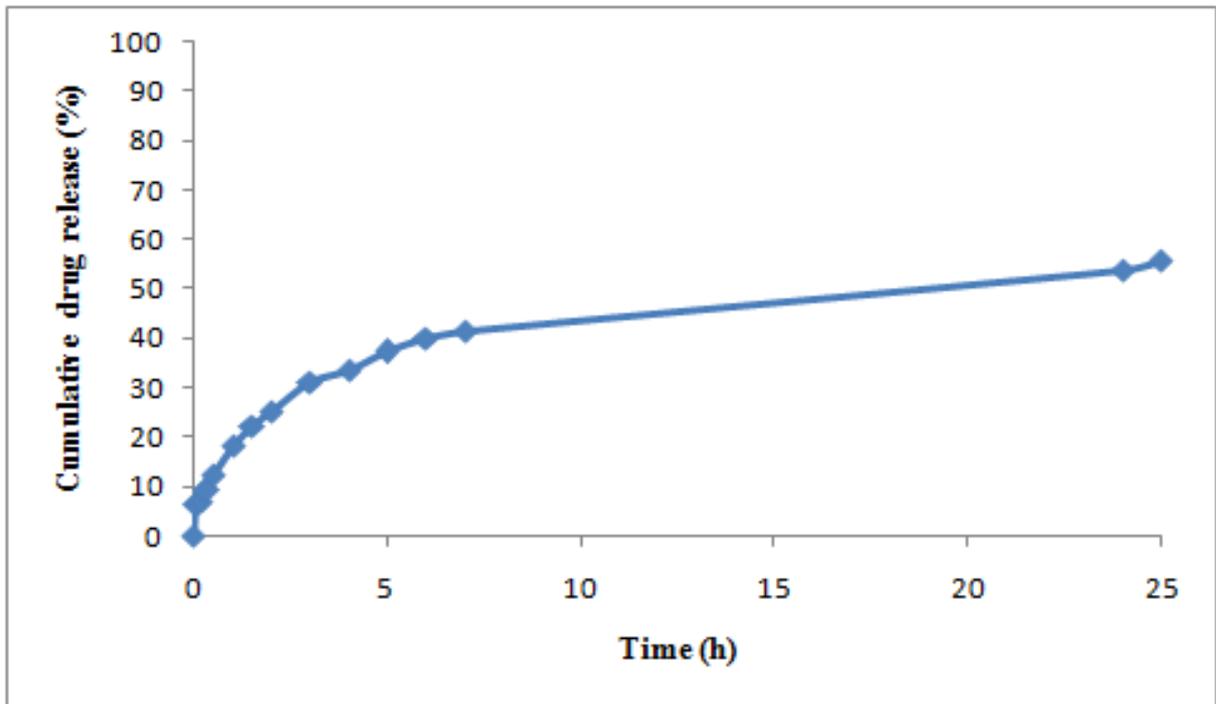


FIGURE 5- *In vitro* release profile of optimized formulation

Nom et Prénom: Fatima Zohra BADAoui

Titre : Formulation et Optimisation des Nanoparticules et Microparticules poreuses de Diclofenac Sodique

Pour une Libération Prolongée



Thèse en vue de l'Obtention du Diplôme de Doctorat es-Sciences en Génie Pharmaceutique

Résumé

Certaines formes pharmaceutiques conventionnelles présentent des limites thérapeutiques dues à une insuffisance pharmacocinétique, cela est particulièrement vérifiable pour le diclofenac sodique (DC), qui est un principe actif à courte demi-vie et donc nécessite une administration fréquente. Dans l'objectif d'une administration moins contraignante, une diminution des effets secondaires, une amélioration de l'efficacité, et une libération uniforme du principe actif, des formes à libération prolongée ont été développées.

Le but de ce travail est de formuler à l'aide des plans d'expériences des nanoparticules polymériques et des microsponges de DC en utilisant l'éthylcellulose (EC) comme polymère dans l'objectif de prolonger sa libération.

Les nanoparticules polymériques de DC ont été préparées par la méthode d'émulsion-évaporation du solvant. Les microsponges de DC ont été préparées par la méthode de quasi émulsion-diffusion du solvant (ESD). L'influence des facteurs qui sont: ratio massique EC/DC, concentration du PVA, vitesse d'homogénéisation, durée d'homogénéisation sur le taux d'efficacité d'encapsulation (EE), et la taille des nanoparticules a été étudié en utilisant un plan factoriel complet. Le plan composite centré (CCD) a été utilisé pour déterminer la zone de formulation optimale. Les mêmes plans ont été utilisés pour la formulation des microsponges. Le ratio massique EC/DC, la concentration du PVA, la vitesse d'agitation ont été les facteurs à étudier, le taux d'efficacité d'encapsulation (EE) et le rendement de production (RY) étaient les réponses ciblées. La forme, la taille, l'inertie du DC vis-à-vis du polymère encapsulant et la libération *in vitro* ont été caractérisées pour les deux formulations.

Les nanoparticules optimisées présentent une taille moyenne de 226.83 nm, un EE de 49.09 % et une libération prolongée du DC par un mécanisme de diffusion fickienne régi par une cinétique de libération de Korsmeyer-Peppas à des niveaux de facteurs : ratio massique de 73.66%, concentration du PVA de 0.56% et vitesse de 9220 rpm. Les nanoparticules de DC formulées présentent une irritation modérée d'après le test HET-CAM. Elles présentent une forme sphérique et ne présentent aucune interaction entre l'EC et le DC. Les microsponges optimisées présentent un EE de 31.02 %, un RY de 66.44%, et une libération prolongée du DC suivant le modèle d'Higuchi à des niveaux de facteurs : ratio massique de 79.08%, et concentration du PVA de 0.47%. Les microsponges de DC présentent une forme sphérique avec une taille de $9.21 \pm 0.3 \mu\text{m}$.

Mots clés : Diclofenac sodique, nanoparticules polymériques, microsponges, libération prolongée, plans d'expériences.

Directeur de thèse : Pr. Djallel BOUZID-Ecole Nationale Polytechnique-Constantine

Année Universitaire : 2020-2021

