



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE ABOU-BEKR BELKAID - TLEMCCEN

MEMOIRE

Présenté à :

FACULTE DES SCIENCES – DEPARTEMENT DE CHIMIE

Pour l'obtention du diplôme de :

MASTER EN CHIMIE

Spécialité : Chimie pharmaceutique

Par :

Melle HADJ SAFI Ghoutia Imane

Sur le thème

Encapsulation du Fluconazole dans les niosomes et les liposomes

Soutenu publiquement le 25 juin 2019 à Tlemcen devant le jury composé de :

Mme DRICI Wassila	MCA	Université de Tlemcen	Présidente
Mme BENSMAIN Amel	MCA	Université de Tlemcen	Examinatrice
Mme CHOUKCHOU BRAHAM Esma	Professeure	Université de Tlemcen	Encadrante
Melle GUENDOOUZ Souhila	MAA	Université de Tlemcen	Co-Encadrante

*Laboratoire de toxicométrie
BP 119, 13000 Tlemcen - Algérie*

Dédicaces

Je dédie ce travail à mes très chers parents que j'affectionne de tous mon âme, qui m'ont donné beaucoup de volonté et beaucoup de courage.

A mon frère et mes sœurs.

A ma petite nièce.

Que j'adore énormément.

Et toute personne chère à mes yeux.

Remerciements

J'exprime en premier lieu mes sincères remerciements à Dieu le tout puissant, de m'avoir donné le courage, la patience et la volonté pour réaliser ce travail.

Mes vifs remerciements et ma reconnaissance vont à Madame **Professeure SEKKAL SAMIRA** Directrice du laboratoire Toxicomed pour m'avoir accueillie et avoir mis à ma disposition tous les moyens et matériels du laboratoire pour mener à bien mon travail.

Je désire exprimer ma très grande reconnaissance à mon encadrante **Professeure CHOUKCHOU BRAHAM ESMA** pour avoir bien voulu diriger ce travail, de m'avoir fait bénéficier de son expérience, et de m'avoir guidé avec patience et tout particulièrement pour sa grande qualité humaine.

Mes plus sincères remerciements à **Melle GUENDOUZ SOUHILA Maitre Assistante au département de pharmacie, université de Tlemcen** pour son soutien, ses conseils, son appui, sa présence, son aide ainsi que son rigueur scientifique et ainsi sa qualité humaine.

J'adresse mes sincères remerciements à Madame **DRICI WSSILA** pour l'honneur qu'elle m'a fait d'avoir acceptée de présider ce jury et Madame **BENSMAN AMEL** pour avoir accepté d'examiner ce mémoire.

Je tiens à adresser mes vifs remerciements au **Professeur KAJIMA MULLENGUI** pour son soutien au long de ces deux années de master, ses conseils qui m'ont aidé à reprendre confiance en moi et à me dépasser. Je remercie tous les enseignants qui ont contribué à la formation, Master Chimie, spécialité Chimie Pharmaceutique.

Je remercie l'ensemble des membres du laboratoire Toxicomed pour leur accueil, en particulier l'ingénieur de laboratoire Mr **TALEB ZOHEIR** pour son aide et sa disponibilité pour constante dans une ambiance amicale et toujours encourageante.

Un grand merci pour les doctorants **BELKHODJA ABDELMADJID** et **GHERRAZ ZHOR** pour leurs aides et leurs présences.

Les caractérisations IR et Zétasiser sont réalisés au laboratoire de Recherche sur les Macromolécules, je tiens à remercier son directeur Mr le professeur **BERRAYAH Abdelkader** et un grand remerciement à **SID AHMED** Ingénieur de laboratoire pour pouvoir passer nos échantillons à analyser.

Je remercie également tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire.

Sommaire

Introduction générale.....	1
Chapitre I : Etude bibliographique	3
I.1. Le Fluconazole	3
I.1.1. Le mécanisme d'action	4
I.1.2. Les indications et contre-indications de Fluconazole	4
I.2. L'encapsulation des médicaments.....	5
I.2.1. Les niosomes	5
I.2.2. Les liposomes.....	9
I.2.3. Les méthodes de préparation des niosomes et les liposomes.....	10
Chapitre II : Matériels et méthodes	13
II.1. Matières premières et appareillages	13
II.2. La méthode de préparation.....	13
II.2.1. Préparation de la solution tampon phosphate saline pH=7,4 (PBS).....	13
II.2.2. Préparation des niosomes de Fluconazole	13
II.2.3. Préparation des liposomes de Fluconazole	16
II.3. Caractérisation	17
II.3.1. Le taux d'encapsulation	17
II.3.2. Vérification de l'encapsulation par FTIR	20
II.3.3. Détermination de la taille moyenne des niosomes et liposomes	20
Chapitre III : Résultats et discussions	21
III.1. Détermination des taux d'encapsulation.....	21
III.1.1. Détermination de la longueur d'onde à partir de la solution saline.....	21
III.1.2. Courbe d'étalonnage du Fluconazole (linéarité)	22
III.1.3. Le taux d'encapsulation des niosomes	22
III.1.4. Le taux d'encapsulation des liposomes	25
III.2. Etude par FTIR	25
III.3. Détermination de la taille	29
Conclusion générale	31
Références bibliographiques	33

Liste des figures

Figure I.1. Structure chimique du Fluconazole.

Figure I.2. Structure des niosomes.

Figure I.3. Représentation schématique des vésicules multilamellaires.

Figure I.4. Représentation schématique des vésicules unilamellaires.

Figure I.5. Structure des tensioactifs.

Figure I.6. Structure chimique de Tween 80.

Figure I.7. Structure chimique de Span 20.

Figure I.8. Liposome unilamellaire.

Figure III.1. Le spectre de la longueur d'onde de Fluconazole solution saline.

Figure III.2. Courbe d'étalonnage de Fluconazole à $\lambda = 260$ nm.

Figure III.3. Spectre IR de Fluconazole poudre.

Figure III.4. Spectre IR de FLZ solution saline encapsulé dans les niosomes de Tween 80.

Figure III.5. Spectre IR de FLZ poudre encapsulé dans les niosomes de Span 20.

Figure III.6. Spectre IR de FLZ poudre encapsulé dans les liposomes.

Figure III.7. Le spectre de la distribution de la taille de niosomes de Span 20 chargés de FLZ.

Figure III.8. Le spectre de la distribution de la taille de niosome de Tween 80 chargés de FLZ.

Figure III.9. Le spectre de la distribution de la taille des liposomes chargés de FLZ.

Liste des tableaux

Tableau I.1. Les propriétés physicochimiques du Fluconazole

Tableau I.2. Les propriétés physicochimiques de Tween 80.

Tableau I.3. Les propriétés physicochimiques de Span 20.

Tableau II.1. Les différents rapports cholestérol/tensioactif utilisés pour préparer les niosomes.

Tableau II.2. Les différents rapports cholestérol/tensioactif utilisés pour préparer les niosomes sans médicament.

Tableau III.1. Le taux d'encapsulation de Fluconazole dans les niosomes.

Tableau III.2. Le taux d'encapsulation de Fluconazole dans les liposomes.

Tableau III.3. Le diamètre moyen des différentes formulations.

Liste des abréviations

DDL : Diffusion dynamique de lumière

FLZ : Fluconazole

FTIR : Infrarouge à transformée de Fourier

HLB : Balance hydrophile-lipophile

LCS : Liquide cérébo-spinal

LUV : *Large unilamellar vesicle*

MLV : *Multilamellar large vesicle*

MVV : *Multivesicular vesicle*

OLG : *Oligolamellar vesicle*

PBS : *Phosphate buffered saline*

SUV : *Small unilamellar vesicle*

UV/Vis : Ultraviolet/visible

VIH : Virus de l'immunodéficience humaine

Introduction générale

L'incidence des infections fongiques a augmenté au cours de ces dernières décennies.[1] Parmi les antifongiques utilisés, le Fluconazole (FLZ) qui est indiqué dans la prise en charge de candidoses systémiques et cryptococcoses neuroméningées. Cependant, il présente plusieurs effets secondaires et plusieurs résistances.[2]

L'encapsulation des médicaments est un sujet qui a fait l'objet de nombreuses recherches. Ces dernières ont toujours eu pour objectif de perfectionner les techniques d'encapsulation et d'obtenir les meilleurs résultats possibles en termes d'efficacité. [3, 4]

En vue d'améliorer l'efficacité et la spécificité, et diminuer les effets secondaires des traitements antifongiques, des molécules amphiphiles sont des candidates naturelles à l'encapsulation, d'où le développement des niosomes et les liposomes.

Les liposomes et les niosomes sont des vésicules sphériques nanométriques composés de molécules amphiphiles. Les niosomes sont formés de tensioactifs. Les liposomes sont formulés à base de phospholipides naturels ou synthétiques. Une petite quantité du cholestérol est ajoutée aux molécules amphiphiles dont le rôle est de stabiliser la paroi en diminuant la fluidité membranaire et la perméabilité.

Il existe plusieurs techniques pour la préparation des niosomes et les liposomes. La méthode de l'hydratation du film lipidique est la méthode la plus simple et la moins coûteuse. [5]

L'objectif de cette étude est l'encapsulation de FLZ dont le but est de diminuer la toxicité pour certains organes, en le protégeant depuis le site d'administration jusqu'au site d'action, et permettre également d'accroître la spécificité d'action par concentration sélective, efficace et régulière de FLZ au niveau de la cible.

L'encapsulation a été réalisée sur deux types de FLZ : le FLZ poudre, et le FLZ solution saline, dans des suspensions niosomales de deux types de tensioactifs non ioniques : Tween 80 et de Span 20, et dans des suspensions liposomales en utilisant un phospholipide: la lécithine du soja. L'encapsulation a été réalisée par la méthode classique de Bangham de l'hydratation d'un film lipidique, pour l'obtention des MLV (*multilamellar large vesicle*). La sonication a été utilisée pour obtenir les SUV/LUV (*Small unilamellar vesicle/large*

unilamellar vesicle). Plusieurs rapports cholestérol/tensioactifs ont été réalisés afin de déterminer le meilleur taux d'encapsulation.

Dans ce mémoire, nous présenterons dans le premier chapitre une revue bibliographique sur le FLZ et ces propriétés physico-chimiques, l'encapsulation des médicaments et quelques généralités sur les niosomes et les liposomes, et enfin les différentes méthodes de leurs préparation. Le deuxième chapitre est consacré à la préparation des niosomes et liposomes encapsulant l'antifongique FLZ poudre et le FLZ solution saline à des rapports différents en cholestérol/molécule amphiphile. Le troisième chapitre rassemble les résultats de pourcentage d'efficacité des différentes préparations déterminés par UV. La caractérisation a été réalisée par IR pour les préparations niosomales présentant les meilleurs taux d'encapsulation du FLZ poudre et FLZ solution saline et la préparation liposomale ayant donné la meilleure efficacité d'encapsulation. La taille des vésicules niosomales et liposomales de ces préparations a été déterminée par zetasiser. Nous terminerons par une conclusion générale résumant les différents résultats.

Chapitre I : Etude bibliographique

I.1. Le Fluconazole

Le Fluconazole est un dérivé bis-triazolé fongistatique, il est indiqué pour le traitement des infections sévères, tel la candidose cutanéomuqueuse qui est une mycose, due à une levure appelée *candida*, faisant partie de la flore normale (saprophyte ou commensale) du tube digestif et de la muqueuse vaginale. La cryptococcose neuroméningée qui est également une mycose, due à la levure encapsulée du genre *cryptococcus*, la localisation neuroméningée de l'infection est grave du fait de sa morbidité et sa mortalité élevées. [2]

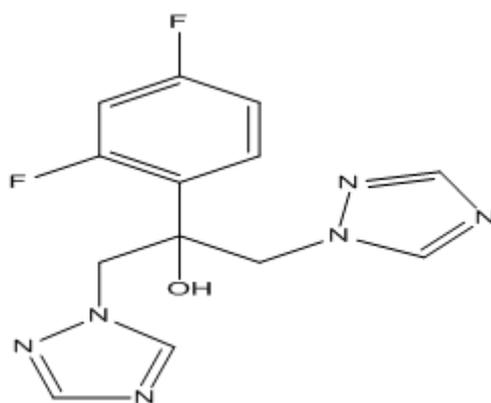


Figure I.1. Structure chimique du Fluconazole.

Tableau I.1. Les propriétés physicochimiques du Fluconazole.

Etat physique	Solide
Apparence	Poudre blanche cristalline, hygroscopique
Nom IUPAC	2-(2,4-difluorophényl)-1,3-bis(1,2,4-triazol-1-yl)propan-2-ol
Masse molaire	306,2708 g/mol
T° de fusion	138 à 140°C
Solubilité dans l'eau	1mg/L
Formule brute	C ₁₃ H ₁₂ F ₂ N ₆ O

I.1.1. Le mécanisme d'action

Les dérivés azolés sont des agents fongostatiques qui exercent leur activité antifongique par inhibition du cytochrome P450 fongique qui est un catalyseur de la synthèse de déméthylation de lanostérole en l'ergostérol (un constituant essentiel de la membrane fongique) dans la cellule du champignon.[6]

Cette inhibition diminue l'ergostérol qui va fragiliser la membrane fongique. Ensuite accumule lanostérole qui va diminuer la perméabilité membranaire. Ainsi que l'effet antifongique résulte, en empêchant la croissance des champignons.

Après l'administration intraveineuse du Fluconazole, les concentrations plasmatiques sont proportionnelles à la dose ingérée. Les concentrations maximales dans le sang sont atteintes entre 0,5 et 1,5 heure. Sa biodisponibilité absolue est de 90%, son absorption n'est pas modifiée par d'autre alimentation. Le Fluconazole pénètre dans tous les liquides corporels. Le taux dans LCS (liquide cérébro-spinal) est équivalent à 80% des taux sanguins, et la concentration salivaire et dans la sécrétion bronchique est voisine des concentrations plasmatiques.

Le Fluconazole est faiblement métabolisé au niveau du foie, sa demi-vie d'élimination est de 20 à 30 heures, il est éliminé par voie urinaire en majeure partie sous forme active. [7]

I.1.2. Les indications et contre-indications de Fluconazole

Le Fluconazole est indiqué pour le traitement des infections fongiques, tel :

- les candidoses invasives, les candidoses des muqueuses y compris les candidoses oesophagiennes, oropharyngées (chez les patient infecté par le VIH), et aussi les candidoses cutané-muqueuses chroniques, et les candidoses buccales atrophiques chroniques.
- La coccidioidomycose.
- La balanite candidosique.
- *Tinea unguinum* (onychomycose), *tinea pedis*, *tinea corporis*, *tinea cruris*, *tinea versicolor* et la méningite à cryptocoques. [8]

Le Fluconazole est contre indiqué dans les suivants :

- Grossesse, et allaitement.
- Enfant de moins de 6 ans.
- Hypersensibilité de Fluconazole, et de dérivés triazolés.
- Intolérance au galactose, Syndrome de malabsorption du glucose, et du galactose. [8]

I.2. L'encapsulation des médicaments

L'encapsulation est une science multidisciplinaire, signifie isolation d'un solide ou un liquide pour un temps déterminé dans un vecteur qui le protégerait des attaques extérieures.

En effet, dans le corps circulent des barrières naturelles, lors de l'administration d'un médicament, cette dernière peuvent dégrader partiellement le médicament avant qu'il arrive sur son lieu d'action et limiter son efficacité, c'est ainsi que de nombreuses molécules traversent les membranes cellulaires.

L'association d'un principe actif à un vecteur approprié a pour but de :

- Protéger le principe actif contre des interactions avec le milieu extérieur (l'air, l'humidité, ou autre).
- Améliorer le transport de principe actif jusqu'à certains sites difficiles à atteindre, et de leur pénétration dans les cellules visées.
- Augmenter potentiellement sa sélectivité et améliorer son efficacité thérapeutique.
- Diminuer la toxicité pour certains organes par modification de la distribution tissulaire des principes actifs.

I.2.1. Les niosomes

Le terme niosome est un mot composé de deux racines nios : "*non ionique surfactant* " et somes: "vésicules". Un niosome est une très petite vésicule sphérique, formée par des bicouches lipidiques concentriques. Emprisonnant entre elle des compartiments aqueux, ils sont obtenus à partir d'une grande variété de lipides amphiphiles, dont les plus utilisés sont les tensioactifs.

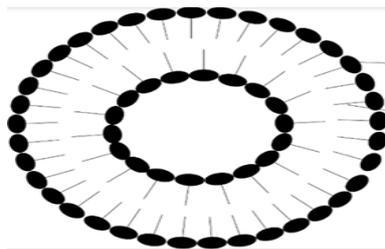


Figure I.2. Structure des niosomes. [9]

Les niosomes sont formés de tensioactif et une petite quantité du cholestérol, dont le rôle du cholestérol est de stabiliser la paroi en diminuant la fluidité membranaire et la perméabilité. Les tensioactifs sont des substances naturelles ou synthétiques formées de deux parties d'affinités opposées, une partie qui s'accroche à l'eau : la partie hydrophile ou lipophile, une partie qui s'accroche à la graisse : la partie lipophile ou hydrophobe. [9]

I.2.1.1. Morphologie et classification

En milieu aqueux, les lipides naturels forment spontanément des niosomes. La taille des niosomes est à l'échelle du nanomètre, avec un diamètre de 20 à 5000nm.

La formation de bicouche caractérise des molécules lipidiques avec un équilibre entre les têtes et les queues. Quand il y a une prévalence de tête il y a une formation des structures micellaires dans lesquelles les chaînes hydrocarbonées s'orientent vers l'intérieur et les têtes vers l'extérieur.

Il est possible de former des systèmes autres que les niosomes avec les molécules amphiphiles, qui sont les nano-émulsions constituées d'une monocouche limitant un espace interne huileux. [10]

Il existe différentes classes de niosomes, qui se distinguent selon leur taille mais aussi selon le nombre de la bicouche lipidique.

- **Les multi lamellaires** : qui regroupent les **MLV** (*multilamellar large vesicle*), les **OLV** (*oligo lamellar vesicle*) et les **MVV** (*multi vesicular vesicle*). Ils sont des vésicules qui comportent soit plusieurs bicouches concentriques séparées par des compartiments aqueux (d'où MLV sont environ 5 à 20 bicouches, et OLV environ 5 bicouches), soit plusieurs bicouches non concentriques tels les MVV. Leur diamètre total dépend de nombre des lamelles (entre 400 à 3500nm). Ils peuvent incorporer des principes actifs de petite et de grande taille, hydrophiles ou hydrophobes. [11]



Figure I.3. Représentation schématique des vésicules multilamellaires. [11]

- **Les Uni lamellaire** : qui regroupent les **LUV** (*large unilamellar vesicle*) avec un diamètre supérieure de 100nm, et les **SUV** (*Small unilamellar vesicle*) de petite taille dont leur diamètre est de 20 à 100nm (ils ne comportent qu'une seule paroi) [11]. Les **LUV** les **SUV** sont fabriqués par fragmentation des **MLV**. Ils permettent d'encapsuler des taux plus importants de principe actif et ils ne comportent qu'une seule paroi. [11]



Figure I.4. Représentation schématique des vésicules unilamellaires. [11]

I.2.1.2. Les tensioactifs

Les molécules tensioactifs sont aussi appelées les surfactants. Ce sont des molécules amphiphiles, de tête hydrophile et une queue hydrophobe, la tête hydrophile est chargée soit négativement (tensioactifs anioniques), soit positivement (tensioactifs cationiques), ou porte une charge positive et une charge négative (tensioactifs amphotères). Et grâce à cette propriété ils peuvent s'orienter aux interfaces, et en conséquence de faire chuter la tension interfaciale. [12]

Les tensioactifs peuvent être utilisés comme des agents moussants, détergents, agents mouillants, agents dispersants, agents émulsifiants, et ils sont utilisés dans une grande variété d'applications pharmaceutiques telles solubilisation des médicaments hydrophobes. [12] Pour l'administration parentérale seuls les tensioactifs non-ionique sont utilisés.

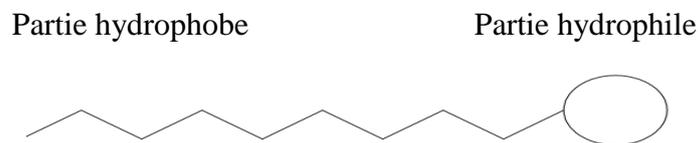


Figure I.5. Structure des tensioactifs.

I.2.1.2.1. Le tensioactif Tween 80

Le tensioactif Tween 80 ou le polysorbate 80 est un tensioactif non ionique. C'est un dérivé polyoxyéthylène et nanylphénol des tensioactifs Span. Il a un caractère hydrophile par la présence des groupements polaires dans sa molécule de polyéther, Le tensioactif Tween 80 est un solubilisant, mouillant, émulsionnant. [12]

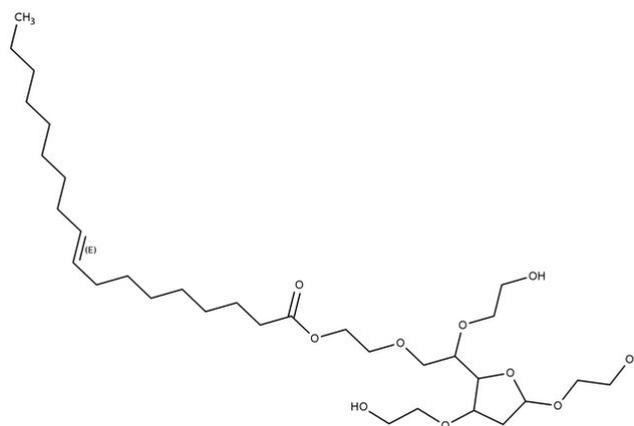


Figure I.6. Structure chimique de Tween 80.

Tableau I.2. Les propriétés physicochimiques de Tween 80.

Etat physique	Liquide
Apparence	Liquide visqueux de couleur ambre
Nom chimique	Monooléate de polyoxyéthylène sorbitan
Masse molaire	604,822 g /mol
T° d'ébullition	113 ° C
Solubilité dans l'eau	Très soluble
Formule brute	$C_{32}H_{60}O_{10}$

I.2.1.2.2. Le tensioactif Span 20

Le tensioactif Span 20 ou le monolaurate de sorbitan, est un tensioactif non-ionique, amphiphile dont la tête est hydrophile. Ce caractère hydrophile provient de la présence des groupements polaires dans sa molécule de type alcool, éther. Il est fabriqué à partir des acides gras comme l'acide laurique, l'acide oléique ou palmitique, ils ont un caractère hydrophobe (soluble dans l'huile).

Les tensioactifs Span en général sont très utilisés car ils possèdent une excellente propriété d'émulsification.[12]

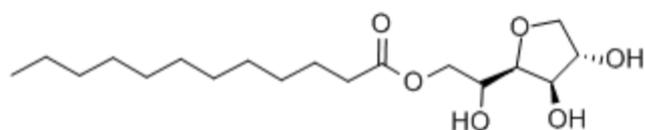


Figure I.7. Structure chimique de Span 20.

Tableau I.3. Les propriétés physicochimiques de Span 20.

Etat physique	Liquide
Apparence	Liquide visqueux de couleur ambre
Nom IUPAC	L'acide dodécanoïque [2-3,4-dihydroxy-2-tétrahydrofuranyle]-2-hydroxyéthyl] ester
Masse molaire	346,464 g/mol
T° d'ébullition	110 ° C
Solubilité dans l'eau	Insoluble
Formule brute	C ₁₈ H ₃₄ O ₆

I.2.2. Les liposomes

Le mot liposome est dérivé des mots grecs « lipos » qui signifie gros, et « soma » qui signifie corps.

Les liposomes ont été découverts en 1964 par « Alec Bangham » et son collègue « R.W.Thome », alors qu'il examinait la dispersion de phospholipide dans l'eau au microscope électronique [13]. Les liposomes sont utilisés comme des structures qui encapsulent et transportent des médicaments, des nutriments et des agents cosmétiques directement aux cellules et tissus, pour en améliorer l'administration et l'absorption.

Les liposomes ont la même taille et la même classification que les niosomes. Ils sont des petites vésicules sphériques amphiphiles, formées par des bicouches lipidiques concentriques, dont les plus utilisés sont des phospholipides. Les phospholipides possèdent une tête hydrophile (un groupe phosphates) et une queue hydrophobe (chaîne d'acide gras).

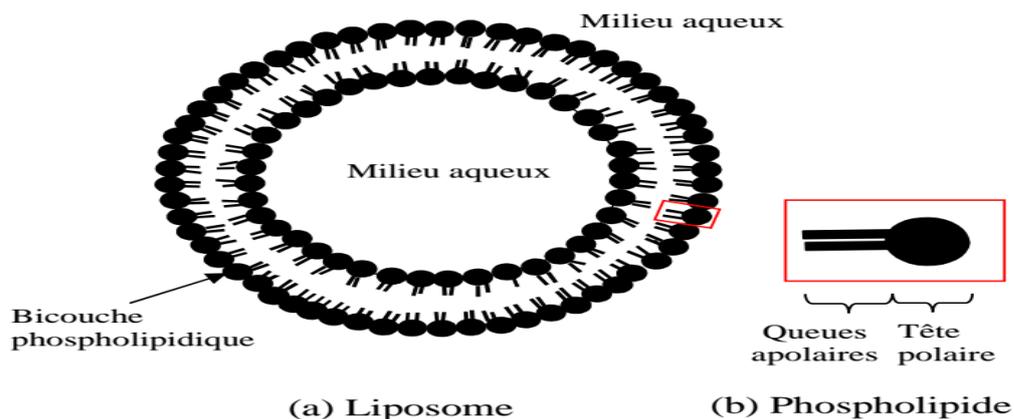


Figure I.8. Liposome unilamellaire.[14]

L'organisation la plus stable est une bicouche avec une tête polaire en contact avec l'eau, et les queues apolaires au centre de la bicouche. En plus des phospholipides, les liposomes sont formulés de cholestérol pour améliorer la stabilité des liposomes. Le cholestérol maintient la rigidité de la bicouche, pour empêcher la fuite du principe actif. Parfois d'autres adjuvants, tels les antioxydants qui sont utilisés pour réduire les phénomènes d'oxydation des liaisons insaturées des chaînes acylés des phospholipides.

I.2.2.1. La lécithine de soja

La lécithine de soja est formée par des acides gras, de phosphate (phospholipide), glycérol, et de la choline. Elles se produisent naturellement dans le soja comme un sous produit d'huile de soja. Elle est obtenue par pression, puis décantation de la graine de soja.

La lécithine de soja agit comme un très bon émulsifiant ou stabilisant, elle peut être utilisée comme complément alimentaire sous forme de gélule ou de poudre, et en dehors de l'industrie alimentaire. La lécithine de soja peut être utilisée dans divers domaines, elle peut être utilisée dans la fabrication de peinture et de plastique, dans le domaine cosmétique (pour adoucir la peau) et aussi dans l'industrie pharmaceutique.

I.2.3. Les méthodes de préparation des niosomes et les liposomes

Les méthodes de préparation des niosomes et les liposomes sont différentes, et le choix de la méthode dépend de différents paramètres.[14]

- Les propriétés physicochimiques de la molécule encapsulée.
- La toxicité et la concentration de la substance encapsulée.
- La polydispersité et la taille et la durée de vie des vésicules.
- La nature du milieu dans lequel les vésicules lipidiques seront dispersées.

D'après Rongen [11] Les méthodes de préparation des niosomes et des liposomes se regroupent en quatre groupes :

- Les méthodes de l'hydratation du film lipidique.
- Les méthodes basées sur l'élimination du détergent.
- Les méthodes basées sur l'élimination du solvant organique.
- Les méthodes utilisant des liposomes préformés.

I.2.3.1. La méthode d'hydratation du film lipidique

Cette méthode permet surtout de réaliser les niosomes et les liposomes MLV, elle consiste tout d'abord à dissoudre les lipides dans un solvant organique (Chloroforme : méthanol (1 :2) généralement le plus utilisée) en utilisant un évaporateur rotatif muni d'une pompe à vide. Comme les lipides possèdent un caractère hydrophile, ces derniers sont donc dissous dans le solvant organique. Le solvant est ensuite évaporé ce qui va provoquer la formation d'un film lipidique homogène mince sur la paroi du ballon. Enfin le film lipidique est hydraté en ajoutant une phase aqueuse, et donc la dispersion est ainsi formée et agitée par vortex pendant quelque minutes.

Et donc les lipides s'associent et forment des bicouches de différentes tailles, qui se renferment emprisonnant le solvant. Les bicouches de grande taille enferment d'autres bicouches de petite de taille, et ainsi se produisent les niosomes et les liposomes MLV.

Néanmoins, les suspensions MLV présentent quelques inconvénients. Cette classe de vésicule n'est pas utilisée dans l'encapsulation des principes actifs. Et cela revient à leur grande taille et leurs bicouches. Des étapes mécaniques sont alors nécessaire pour réduire le diamètre de ces suspensions, afin d'obtenir des suspensions SUV.[5]

I.2.3.2. La sonication

La sonication est une technique qui permet de réduire la taille des MLV en SUV. Elle consiste à appliquer de l'énergie sonore pour agiter les particules par l'utilisation d'un bain à ultrason ou d'une sonde à ultrason.

Pour la formation des SUV, la dispersion lipidique est soniquée doucement par le dispositif à ultrason portatif à une température inférieure à la température de transition de phase des lipides, ou un réacteur à ultrasons dans un bain de glace. La durée de ce traitement est environ 5 à 15 minutes, et donc les MLV subissent des dislocations successives par l'envoi d'ultrasons sur ces suspensions viennent les disloquer.

La sonication est une méthode très utilisée, elle est simple et rapide mais elle présente plusieurs inconvénients, car les vésicules formées ont tendance à encapsuler un petit volume (de l'ordre de 0,2 à 1,5 $\mu\text{l}/\mu\text{mol}$). En outre les niosomes et les liposomes peuvent être dégradés sous l'action des ultrasons, et dans ce cas l'efficacité d'encapsulation diminue. Et aussi, pendant la sonication les lipides risquent de s'oxyder et même de s'hydrolyser [15]. Mais pour éviter cette dégradation la sonication, doit être sous une atmosphère d'azote ou d'argon et durant un temps court [16]. Dans le cas de la sonication par sonde à ultrasons, le milieu peut être contaminé par le métal de la sonde.

Chapitre II : Matériels et méthodes

II.1. Matières premières et appareillages

Matières premières

- Span 20
- Tween 80
- Lécithine de soja
- Cholestérol
- Fluconazole solution saline 2mg/mL
- Fluconazole poudre
- Ethanol, chloroforme

Appareillages

- Balance analytique (PHAUS)
- Plaque chauffante agitatrice (Wisestir)
- Rotavapor (ISOLAB)
- Bain ultrasons (ISOLAB ; Laborgerate GmbH)
- Ultra-centrifugeuse réfrigérée (Sigma 3-30Ka)
- Spectrophotomètre Ultraviolet- visible (Optizen)
- FTIR (Agilent Technologies, Cary 600)
- Zetasizer (Malvern, nano série)

II.2. La méthode de préparation

II.2.1. Préparation de la solution tampon phosphate saline pH=7,4 (PBS)

Pour la préparation de 1000 mL de cette solution, nous avons mélangé 1,13g de phosphate monosodique (NaH_2PO_4), 3,87g de phosphate disodique (Na_2HPO_4) et 8,5g de chlorure de sodium (NaCl). Puis nous avons complété le volume à 1000 mL avec l'eau distillée.

II.2.2. Préparation des niosomes de Fluconazole

- **Préparation des niosomes par hydratation du film lipidique en utilisant le Fluconazole solution saline**

Pour préparer les niosomes multilamellaires, nous avons procédé comme suit :

- Dissoudre 200 mg de mélange cholestérol/tensioactif (Tableau II.1) dans 10 mL de mélange solvant chloroforme/ méthanol (2 : 1).

- Evaporer les solvants organiques sous vide à 60°C en utilisant un rotavapeur à une vitesse de 100 tours/ minute jusqu'à l'obtention d'un film lipidique mince.
- Hydrater le film lipidique avec 5 mL de solution saline tamponnée au phosphate de pH=7,4, contenant une quantité de 20 mg de FLZ solution saline.
- Mettre la préparation dans un bain-marie à température 58°C pendant 1 heure.
- Maintenir la suspension au réfrigérateur à 4°C pendant 24 heures pour la maturation des vésicules.

Pour la préparation des niosomes unilamellaires, nous avons rajouté une étape de sonication au bain ultrason pendant 20 minutes à 60°C avant de placer la suspension au réfrigérateur à 4°C pendant 24 heures pour la maturation des vésicules. Nous avons utilisé les mêmes rapports cholestérol/tensioactif (Tableau II.1).

➤ **Préparation des Niosomes par hydratation du film lipidique en utilisant le Fluconazole poudre**

Pour l'encapsulation du FLZ poudre dans des niosomes, nous avons procédé comme suit :

- Dissoudre 200 mg de mélange cholestérol/tensioactif (Tableau II.1) et 20mg FLZ dans 10 mL de mélange solvant chloroforme/ méthanol (2 :1).
- Evaporer les solvants organiques sous vide à 60°C en utilisant un rotavapeur à une vitesse de 100 tours/ minute jusqu'à l'obtention d'un film lipidique mince.
- Hydrater le film lipidique avec 5 mL de solution saline tamponnée au phosphate de pH=7,4.
- Mettre la préparation dans un bain-marie à température 58°C pendant 1 heure.
- Maintenir la suspension au réfrigérateur à 4°C pendant 24 heures pour la maturation des vésicules.

Pour l'obtention des niosomes unilamellaires, nous avons suivi toutes les étapes de la préparation des niosomes multilamellaires, la taille des vésicules est réduite par sonication en plaçant la suspension vésiculaire obtenue dans un bain à ultrason pendant 20 min à 60°C avant de la conserver au réfrigérateur à 4°C pendant 24 heures pour la maturation des vésicules. Les rapports cholestérol/tensioactif sont décrits dans le Tableau II.1.

Tableau II.1. Les différents rapports cholestérol/tensioactif utilisés pour préparer les niosomes.

N	Rapport cholestérol/tensioactif	Tensioactif	Type	Matière première
F1	1 / 3	Tween 80	MLV	FLZ poudre
F2	1 / 3	Tween 80	SUV/LUV	FLZ poudre
F3	1 / 4,5	Tween 80	MLV	FLZ poudre
F4	1 / 4,5	Tween 80	SUV/LUV	FLZ poudre
F5	1 / 6	Tween 80	MLV	FLZ poudre
F6	1 / 6	Tween 80	SUV/LUV	FLZ poudre
F7	1 / 3	Span 20	MLV	FLZ poudre
F8	1 / 3	Span 20	SUV/LUV	FLZ poudre
F9	1 / 4,5	Span 20	MLV	FLZ poudre
F10	1 / 4,5	Span 20	SUV/LUV	FLZ poudre
F11	1 / 6	Span 20	MLV	FLZ poudre
F12	1 / 6	Span 20	SUV/LUV	FLZ poudre
F13	1 / 3	Tween 80	MLV	FLZ solution saline
F14	1 / 3	Tween 80	SUV/LUV	FLZ solution saline
F15	1 / 4,5	Tween 80	MLV	FLZ solution saline
F16	1 / 4,5	Tween 80	SUV/LUV	FLZ solution saline
F17	1 / 6	Tween 80	MLV	FLZ solution saline
F18	1 / 6	Tween 80	SUV/LUV	FLZ solution saline
F19	1 / 3	Span 20	MLV	FLZ solution saline
F20	1 / 3	Span 20	SUV/LUV	FLZ solution saline
F21	1 / 4,5	Span 20	MLV	FLZ solution saline
F22	1 / 4,5	Span 20	SUV/LUV	FLZ solution saline
F23	1 / 6	Span 20	MLV	FLZ solution saline
F24	1 / 6	Span 20	SUV/LUV	FLZ solution saline

II.2.3. Préparation des liposomes de Fluconazole

➤ Préparation des liposomes par hydratation du film lipidique en utilisant le Fluconazole solution saline

Les liposomes sont préparés de la manière suivante :

- Peser 100 mg lécithine de soja et 5 mg de cholestérol, que l'on dissout dans un volume de 10 mL de chloroforme/ méthanol (2 : 1).
- Evaporer les solvants organiques sous vide à 60°C en utilisant un rota-vapeur à une vitesse de 100 tours/ minute jusqu'à l'obtention d'un film lipidique mince.
- Hydrater le film lipidique avec 10 mL d'eau distillée contenant une quantité de 10 mg de FLZ solution saline.
- Mettre la préparation dans un bain-marie à température 37°C pendant 2 heures.
- Maintenir la suspension au réfrigérateur à 4°C pendant 24 heures pour la maturation des vésicules.

Pour l'obtention des liposomes unilamellaires, nous avons suivi les mêmes étapes citées ci-dessus tout en rajoutant une étape de sonication au bain ultrason pendant 20min à 60°C avant d'introduire la préparation au réfrigérateur à 4°C pendant 24 heures.

➤ Préparation des liposomes par hydratation du film lipidique en utilisant le Fluconazole poudre

Les niosomes multilamellaires sont préparés de la manière suivante :

- Dissoudre 100 mg lécithine de soja, 5 mg de cholestérol et 10 mg de FLZ poudre dans un volume de 10 mL de chloroforme/ méthanol (2 : 1).
- Evaporer les solvants organiques sous vide à 60°C en utilisant un rotavapeur à une vitesse de 100 tours/ minute jusqu'à l'obtention d'un film lipidique mince.
- Hydrater le film lipidique avec 10 mL d'eau distillée.
- Mettre la préparation dans un bain-marie à température 37°C pendant 2 heures.
- Maintenir la suspension au réfrigérateur à 4°C pendant 24 heures pour la maturation des vésicules.

Pour l'obtention des liposomes unilamellaires, nous avons réduit la taille des vésicules obtenues par sonication au bain ultrason pendant 20min à 60°C.

II.3. Caractérisation

II.3.1. Le taux d'encapsulation

La détermination de taux d'encapsulation est réalisée par le dosage du Fluconazole dans les niosomes et les liposomes par spectroscopie ultraviolet-visible. La spectroscopie UV/Vis est une méthode quantitative, dont le domaine UV est de 100 à 400 nm, et le visible est de 400 à 750 nm. Il existe deux types de dosage dans UV/Vis, le dosage direct, lorsque la longueur d'onde est connue. Et le dosage indirect lorsque la longueur d'onde est inconnue. Le dosage direct consiste à mesurer l'absorbance, calculer la concentration, et à connaître le trajet optique et le coefficient d'absorption moléculaire.

En utilisant la loi de Beer Lambert nous pouvons déterminer la concentration du Fluconazole dans des suspensions niosomales et liposomales par l'absorbance.

La loi de Beer Lambert : $A = \epsilon \times l \times C$

A : L'absorbance

ϵ : Le coefficient d'absorption moléculaire (L/mol/cm ou cm²/mg)

l : Le trajet optique (cm)

C : La concentration de la substance dans l'échantillon (mg/mL)

Pour pouvoir doser le Fluconazole encapsulé, nous avons tout d'abord récupéré les niosomes et liposomes chargés de médicament et préparé notre blanc (niosome/liposome sans médicament).

II.3.1.1. Ultracentrifugation des niosomes et liposomes

Nous ne pouvons pas encapsuler la quantité totale de Fluconazole dans les niosomes et les liposomes. Donc la partie non encapsulée est présente dans la suspension sous forme libre. Afin de séparer cette dernière des niosomes ou liposomes chargés :

- Mettre les suspensions niosomales ou liposomales dans les tubes de la centrifugeuse, fermer l'appareil, et lancer la centrifugeuse en fixant les paramètres suivants :
 - o La température : 4°C.
 - o L'agitation : 15000 tours/min.
 - o Le temps : 20 minutes.
- Ajouter 2 mL d'éthanol au culot et le placer dans le bain à ultrason pendant 10 minutes.

II.3.1.2. Préparation des suspensions niosomales sans médicament

Une suspension niosomale sans médicament est utilisée comme blanc pour le dosage du Fluconazole dans le culot.

Pour la préparation des niosomes multilamellaires sans médicament, nous avons suivi les étapes suivantes :

- Dissoudre de 200 mg de mélange cholestérol/tensioactif (Tableau II.2) dans 10 mL de mélange solvant chloroforme/méthanol (2:1).
- Evaporer les solvants organiques sous vide à 60°C en utilisant un rotavapeur à une vitesse de 100 tours/ minute jusqu'à l'obtention d'un film lipidique mince.
- Hydrater le film lipidique avec 5 mL de solution saline tamponnée pH=7,4.
- Mettre la préparation dans un bain-marie à température 58°C pendant 1 heure.
- Maintenir la suspension au réfrigérateur à 4°C pendant 24 heures pour la maturation des vésicules.

Pour la préparation des niosomes unilamellaires, nous avons rajouté une étape de sonication au bain ultrason pendant 20 minutes à 60 °C avant de placer la suspension au réfrigérateur à 4°C pendant 24 heures pour la maturation des vésicules. Les rapports cholestérol/tensioactif utilisés sont décrits dans le tableau II.2.

Tableau II.2. Les différents rapports cholestérol/tensioactifs utilisés pour préparer les niosomes sans médicament

N	Rapport cholestérol/tensioactif	Tensioactif
B1	1 / 3	Tween 80
B2	1 / 4,5	
B3	1 / 6	
B4	1 / 3	Span 20
B5	1 / 4,5	
B6	1 / 6	

II.3.1.3. Préparation des suspensions liposomales sans médicament

Une suspension liposomale sans médicament est utilisée comme blanc pour le dosage du Fluconazole dans le culot.

Pour la préparation des liposomes multilamellaires sans médicament, nous avons procédé comme suit :

- Peser 100 mg lécithine de soja et 5 mg de cholestérol, que l'on dissout dans un volume de 10 mL de chloroforme/ méthanol (2 : 1).
- Evaporer les solvants organiques sous vide à 60°C en utilisant un rotavapeur à une vitesse de 100 tours/ minute jusqu'à l'obtention d'un film lipidique mince.
- Hydrater le film lipidique avec 10 mL d'eau distillée.
- Mettre la préparation dans un bain-marie à température 37°C pendant 2 heures.
- Maintenir la suspension au réfrigérateur à 4°C pendant 24 heures pour la maturation des vésicules.

Pour l'obtention des liposomes unilamellaires, nous avons suivi les mêmes étapes citées ci-dessus tout en rajoutant une étape de sonication au bain ultrason pendant 20min à 60°C avant d'introduire la préparation au réfrigérateur à 4°C pendant 24 heures.

II.3.1.4.Courbe d'étalonnage du Fluconazole (linéarité)

Avant d'étudier la linéarité de la courbe d'étalonnage, nous avons vérifié la longueur d'onde de Fluconazole, décrite dans la littérature, à partir d'une solution saline de concentration 2 mg/mL, en utilisant comme blanc le chlorure de sodium (NaCl).

Nous avons ensuite, préparé treize (13) concentrations différentes de Fluconazole solution saline dans le chlorure de sodium (NaCl). L'absorbance de chaque dilution est déterminée par spectrophotométrie UV/Vis à 260nm.

II.3.1.5.Dosage de Fluconazole dans les niosomes et les liposomes

Une méthode de dosage par UV/Vis est mise au point pour déterminer la quantité du Fluconazole encapsulé dans les niosomes ([La quantité du Fluconazole]_{encapsulé}). Nous connaissons déjà la concentration totale des constituants de Fluconazole ([La quantité du Fluconazole]_{totale}). Ensuite nous avons déterminé la concentration dans le culot obtenu par ultracentrifugation des suspensions niosomales ([La quantité du Fluconazole]_{encapsulé}).

Le dosage par UV/Vis du Fluconazole dans les niosomes et les liposomes a été effectué en suivant les conditions opératoires suivantes :

- La longueur d'onde : 260nm.
- Le blanc : suspension niosomale et liposomale sans médicament traitée dans les mêmes conditions.

- L'échantillon : le culot dilué dans l'éthanol.

Le taux d'encapsulation (EE%) a été calculé à l'aide de l'équation suivante :

$$EE\% = \frac{\text{La quantité du fluconazole encapsulé}}{\text{La quantité du fluconazole totale}} \times 100$$

II.3.2. Vérification de l'encapsulation par FTIR

Les spectres infrarouges ont été obtenus en utilisant un FTIR (*Agilent Technologies, Cary 600*), avec des balayages allant de 600 à 4000 cm^{-1} et à température ambiante. Nous avons analysé les préparations qui ont donné le meilleur taux d'encapsulation.

L'analyse FTIR a été réalisée sur les préparations niosomales ayant les meilleurs taux d'encapsulation à base de FLZ poudre et à base de FLZ solution saline et pour la préparation liposomale donnant le meilleur taux d'encapsulation.

II.3.3. Détermination de la taille moyenne des niosomes et liposomes

Les tailles moyennes des niosomes et des liposomes ont été déterminées par un zetasizer (nano série).

Les échantillons ont été dilués avec de l'eau ultra-purifiée pour affaiblir l'opalescence. L'essai a été réalisé à 25°C.

Les mesures sont en fonction de l'autocorrélation de l'intensité de la lumière diffusée, dans la diffusion dynamique de la lumière (DLS). Cette fonction est ensuite ajustée pour l'obtention de la taille des vésicules.

Cette détermination a été réalisée sur les mêmes échantillons pour lesquels les spectres IR ont été déterminés.

Chapitre III : Résultats et discussions

Les niosomes et liposomes ont été préparés par la méthode d'hydratation du film lipidique pour l'encapsulation de Fluconazole. Deux types de matières premières ont été utilisés le FLZ poudre et le FLZ solution saline. Le Span 20 et le Tween 80 sont les tensioactifs utilisés pour réaliser les niosomes. Leur pourcentage par rapport au cholestérol a été varié afin de choisir la meilleure formulation. Pour les liposomes nous avons choisi un phospholipide naturel la lécithine de soja.

III.1. Détermination des taux d'encapsulation

La courbe d'étalonnage utilisée pour les calculs des concentrations de Fluconazole dans le culot est déterminée après vérification de la longueur d'onde.

III.1.1. Détermination de la longueur d'onde à partir de la solution saline

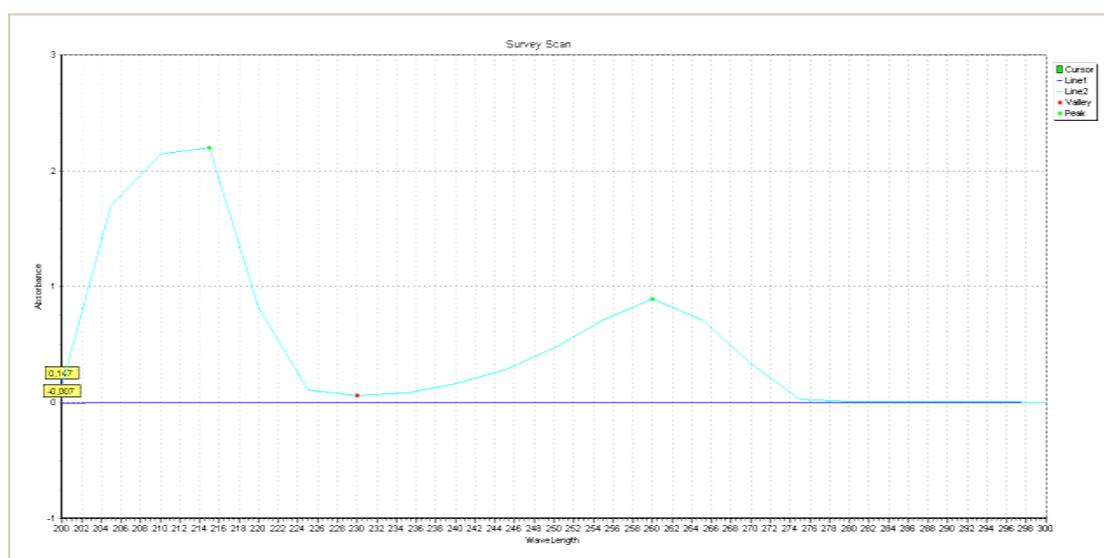


Figure III.1. Le spectre de la longueur d'onde de Fluconazole solution saline.

Dans la Figure III.1 nous observons deux pics, un pic à 215 nm qui correspond au NaCl, et le pic à 260 nm qui correspond au Fluconazole. Cette longueur d'onde correspond à la longueur d'onde décrite dans la littérature.

III.1.2. Courbe d'étalonnage du Fluconazole (linéarité)

La courbe obtenue lors de l'essai de la linéarité par UV/Vis est présentée dans la Figure III.2.

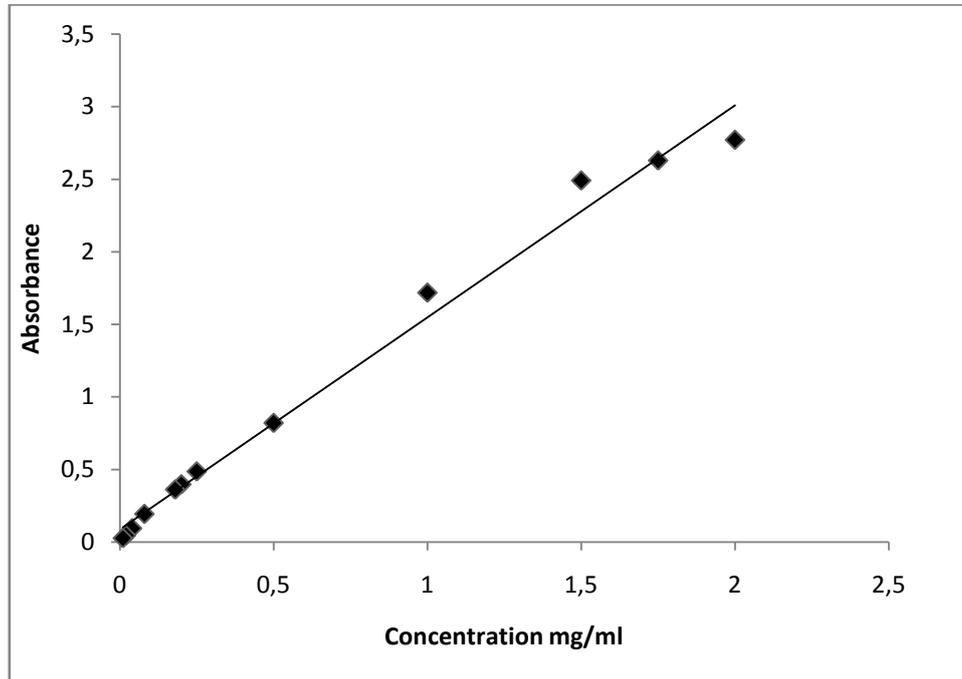


Figure III.2. Courbe d'étalonnage de Fluconazole à $\lambda = 260$ nm.

La courbe de l'Absorbance en fonction de la concentration du Fluconazole montre que la droite de régression passe par la majorité des points. Cette dernière est sous forme $y = a x$, dont le coefficient d'extinction $a = \epsilon = 1,46139 \text{ cm}^2/\text{mg}$, donc la linéarité est vérifiée.

III.1.3. Le taux d'encapsulation des niosomes

Les taux d'encapsulation calculés après dosage du Fluconazole dans le culot, sont présentés dans le tableau III.1.

Les résultats du tableau ci-dessous ont montré que les taux d'encapsulations élevés étaient de l'ordre de 74% et 73% ont été obtenus avec des niosomes MLV à base de Tween 80 avec un rapport cholestérol/Tween 80 : 1/6 et 1/3 en utilisant Fluconazole solution saline.

Tableau III.1. Les taux d'encapsulation de Fluconazole dans les niosomes.

N	Rapport cholestérol/tensioactif	Tensioactif	Type	Matière première	Taux d'encapsulation (%)
F1	1 / 3	Tween 80	MLV	FLZ poudre	7,5
F2	1 / 3	Tween 80	SUV/LUV	FLZ poudre	17,5
F3	1 / 4,5	Tween 80	MLV	FLZ poudre	20
F4	1 / 4,5	Tween 80	SUV/LUV	FLZ poudre	55
F5	1 / 6	Tween 80	MLV	FLZ poudre	10
F6	1 / 6	Tween 80	SUV/LUV	FLZ poudre	30
F7	1 / 3	Span 20	MLV	FLZ poudre	11
F8	1 / 3	Span 20	SUV/LUV	FLZ poudre	15
F9	1 / 4,5	Span 20	MLV	FLZ poudre	37,5
F10	1 / 4,5	Span 20	SUV/LUV	FLZ poudre	40
F11	1 / 6	Span 20	MLV	FLZ poudre	38
F12	1 / 6	Span 20	SUV/LUV	FLZ poudre	39,5
F13	1 / 3	Tween 80	MLV	FLZ solution saline	73
F14	1 / 3	Tween 80	SUV/LUV	FLZ solution saline	20
F15	1 / 4,5	Tween 80	MLV	FLZ solution saline	46,66
F16	1 / 4,5	Tween 80	SUV/LUV	FLZ solution saline	20,83
F17	1 / 6	Tween 80	MLV	FLZ solution saline	74
F18	1 / 6	Tween 80	SUV/LUV	FLZ solution saline	60
F19	1 / 3	Span 20	MLV	FLZ solution saline	Non défini
F20	1 / 3	Span 20	SUV/LUV	FLZ solution saline	Non défini
F21	1 / 4,5	Span 20	MLV	FLZ solution saline	Non défini
F22	1 / 4,5	Span 20	SUV/LUV	FLZ solution saline	Non défini
F23	1 / 6	Span 20	MLV	FLZ solution saline	Non défini
F24	1 / 6	Span 20	SUV/LUV	FLZ solution saline	Non défini

- L'encapsulation du Fluconazole poudre

Le meilleur taux d'encapsulation a été obtenu avec la formulation (F4) correspondant aux niosomes unilamellaires contenant un rapport cholestérol/tensioactifs 1/4,5. Il est de l'ordre de 55%.

Les niosomes unilamellaires (F2, F4, F6, F8, F10, F12) ont donné des taux d'encapsulation meilleurs que les niosomes multilamellaires (F1, F3, F5, F7, F9).

Les taux d'encapsulation du Fluconazole poudre dans les niosomes à base de Tween 80 (F1 à F6) varient de 7,5% (F1) à 55% (F4). Avec le Span 20 ces taux varient de 11% (F7) à 40% (F10).

Concernant l'utilisation du Tween 80, pour le même type de niosome le taux d'encapsulation est important pour le rapport 1/4,5, mais il est plus faible pour les rapports 1/6 et 1/3. Le taux d'encapsulation augmente avec le taux de Span 20 du rapport 1/3 au rapport 1/4,5 pour devenir stable.

Il n'y a pas une corrélation entre le taux d'encapsulation et le rapport cholestérol/tensioactif ceci s'explique par le fait qu'en augmentant la concentration de cholestérol le taux d'encapsulation diminue suite à une diminution de la taille des vésicules, mais en dessous d'une certaine concentration il y a fuite du médicament donc son taux dans les niosomes diminue.

- L'encapsulation du Fluconazole solution saline

Pour le Fluconazole solution saline, les taux d'encapsulation dans les niosomes à base de Tween 80 (F13 à F18) varient de 20% (F14) à 74% (F17).

Le dosage du Fluconazole dans les préparations niosomales de Span 20 n'a pas pu être réalisé à cause du caractère trouble de la solution formée après dissolution du culot dans l'éthanol. Ceci peut être expliqué par l'importance de la partie hydrophobe par rapport à la partie hydrophile dans la molécule du Span 20 (balance hydrophile lipophile : HLB 8,6) en comparant au rapport des deux parties dans la molécule du Tween 80 (HLB 15,5).

Les formules F13 et F17 correspondants respectivement aux rapports cholestérol/Tween 80 1/3 et 1/6 ont permis d'obtenir un maximum d'efficacité de 74%. Ces niosomes sont multilamellaires.

L'efficacité d'encapsulation est meilleure avec les niosomes multilamellaires (F13, F15, F17) que les niosomes unilamellaires (F14, F16, F18).

III.1.4. Le taux d'encapsulation des liposomes

Les résultats montrent que pour le même type de Fluconazole, il n'y a pas une différence significative de taux d'encapsulation entre les deux types de liposomes.

Par contre, nous observons que l'efficacité d'encapsulation de FLZ poudre est plus élevée que celle de FLZ solution saline. Ceci peut être expliqué par le fait que la partie lipophile du FLZ doit être logée presque complètement dans la bicouche lipidique [17].

Tableau III.2.Le taux d'encapsulation de Fluconazole dans les liposomes

N	Types	La matière première	Le taux d'encapsulation (%)
F25	MLV	FLZ poudre	80
F26	SUV/LUV	FLZ poudre	85
F27	MLV	FLZ solution saline	59,44
F28	SUV/LUV	FLZ solution saline	64,55

Par comparaison aux niosomes, les résultats ont révélé que les liposomes sont capables d'encapsuler plus de Fluconazole que les niosomes.

Une étude [18] réalisée pour l'encapsulation du Fluconazole dans les liposomes à base de lécithine de soja en utilisant le même rapport de cholestérol/lécithine : 1/20 avait donné un pourcentage d'efficacité de 70%.

Dans une autre étude [19], les liposomes préparés avec le rapport cholestérol/lécithine : 1/10 avaient donné un taux d'encapsulation de 47,66%.

III.2.Etude par FTIR

Afin de confirmer la compatibilité du Fluconazole avec les molécules amphiphiles utilisées pour la formulation des vésicules nous avons analysé les spectres FTIR du FLZ, les niosomes et les liposomes chargées de FLZ.

➤ Analyse IR du Fluconazole

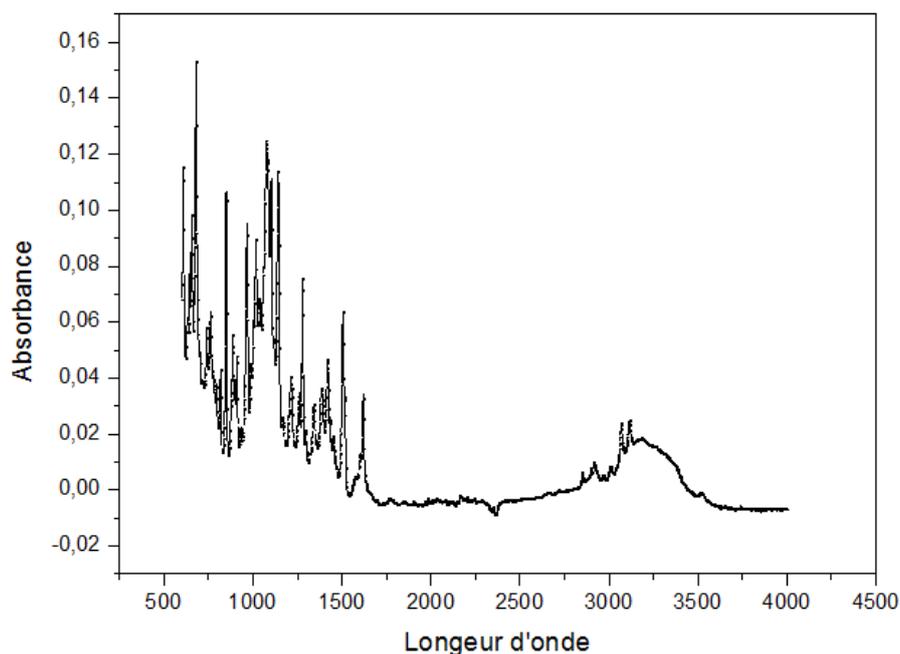


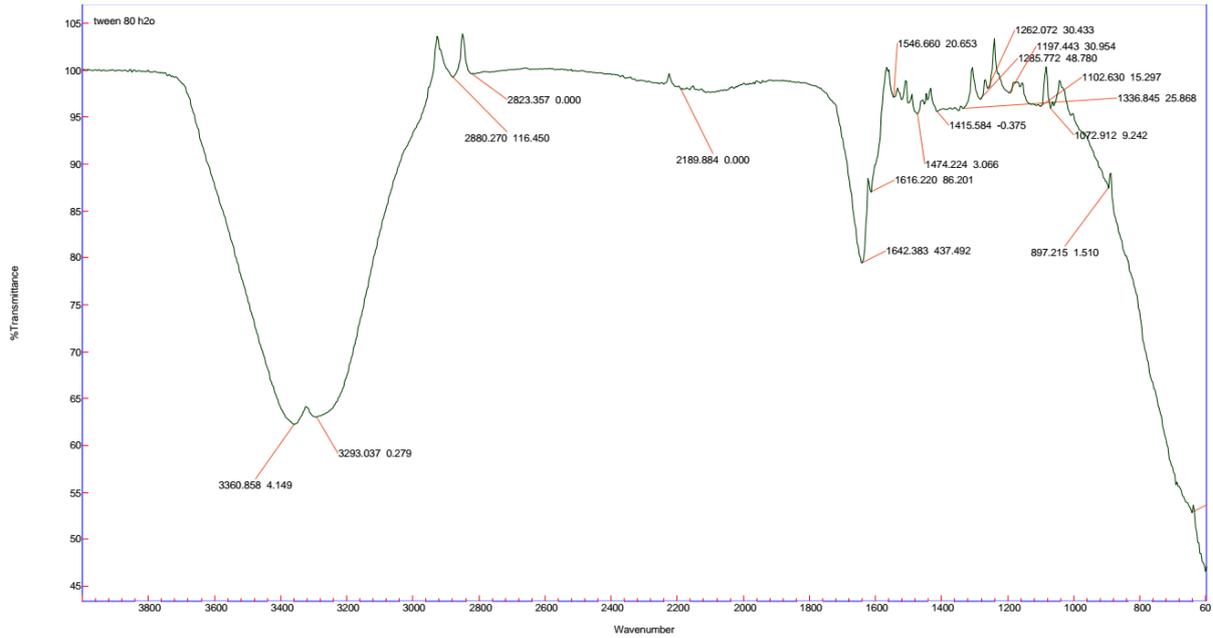
Figure III.3. Spectre IR de Fluconazole.

Le spectre IR du Fluconazole poudre pur est présenté dans la figure III.3 il permet de déterminer les bandes caractéristiques de cette molécule. On observe une bande large à 3200 cm^{-1} attribuée au groupement hydroxyle OH. Une bande fine à 3100 cm^{-1} qui correspond au (=C-H de cycle aromatique). Une bande intense à 1620 cm^{-1} caractéristique du groupement C=N. Une bande intense à 1550 cm^{-1} correspondant au C=C du cycle aromatique. Les bandes à 1260 cm^{-1} et 1200 cm^{-1} correspondent au C-F et enfin une bande située à 900 cm^{-1} caractéristique du cycle triazole.

Ce spectre est compatible avec les données de la littérature. [20-22].

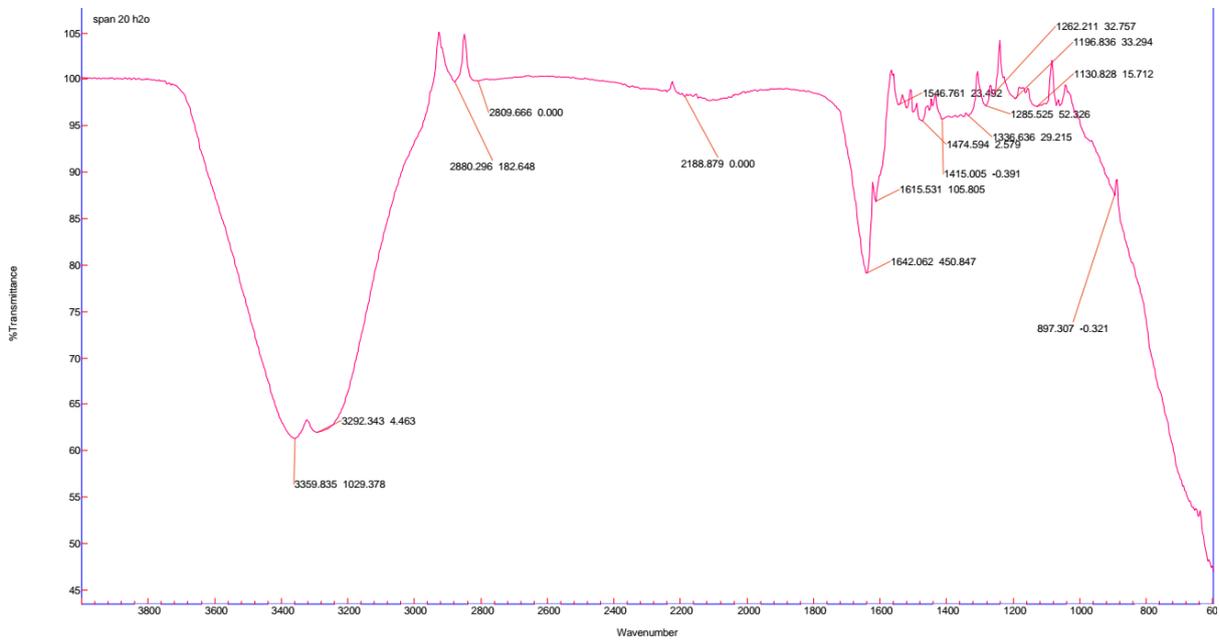
➤ Les spectres IR des niosomes et liposomes

Nous avons analysé les spectres des formulations F10 ce sont les niosomes unilamellaire de FLZ poudre en utilisant le rapport cholestérol/Span 20 : 1/4,5, F17 sont les niosomes multilamellaires de FLZ solution saline en utilisant le rapport cholestérol/Tween 80 : 1/6 et F26, les liposomes unilamellaires de FLZ poudre.



Nom
tween 80 h2o

Figure III.4. Spectre IR de FLZ solution saline encapsulé dans les niosomes de Tween 80.



Nom
span 20 h2o

Figure III.5. Spectre IR de FLZ poudre encapsulé dans les niosomes de Span 20.

En comparant les spectres FT-IR des niosomes à celui de FLZ poudre, nous remarquons l'apparition de toutes les bandes qui sont déjà apparues dans le spectre IR de FLZ poudre (Figure III.3). Donc il n'y a pas de modification de la structure de Fluconazole suite à une interaction.

Il y a apparition des bandes correspondantes aux tensioactifs situées à 3360cm^{-1} , 2880cm^{-1} et 1642cm^{-1} . [23]

Il y a également apparition des bandes correspondantes au cholestérol : 3359cm^{-1} , 2880cm^{-1} et 1415cm^{-1} . [23, 24].

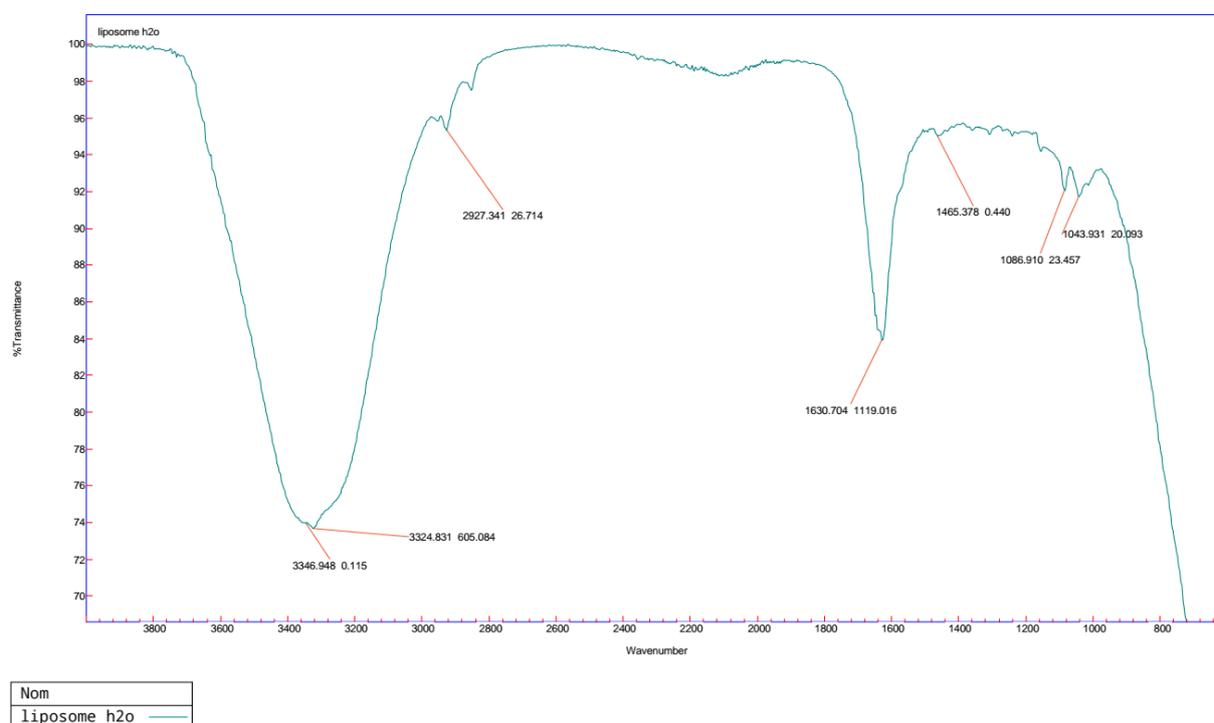


Figure III.6. Spectre IR de FLZ poudre encapsulé dans les liposomes.

Le spectre IR représenté en Figure III.6 montre les bandes caractéristiques de FLZ poudre encapsulé dans les liposomes, de type SUV/LUV.

Par comparaison du spectre IR de FLZ (Figure III.3) au spectre de FLZ encapsulé dans les liposomes (Figure III.6), nous constatons la disparition des bandes caractéristiques du Fluconazole. Ceci est expliqué par la fuite du médicament car cette analyse a été réalisée une semaine après la préparation. De plus la suspension liposomale n'a pas été conservée dans le réfrigérateur ce qui a accéléré sa déstabilisation.

III.3. Détermination de la taille

Nous avons effectué la détermination de la taille des niosomes sur les formulations F10, F17 et F26.

Tableau III.3. Le diamètre moyen des différentes formulations

N	Composition	Type	Matière première	Taille moyenne (nm)
F10	Cholestérol/Span 20 : 1/4,5	SUV/LUV	FLZ poudre	2986
F17	Cholestérol/Tween 80 : 1/6	MLV	FLZ solution saline	723,1
F26	Cholestérol/lécithine de soja : 1/20	SUV/LUV	FLZ poudre	195,4

La taille moyenne de niosomes Span 20 est largement supérieure que celle de niosome de Tween 80. La taille moyenne des liposomes est plus faible.

Nous avons analysé la distribution de la taille exprimée par le rapport de l'intensité du signal au volume de vésicules.

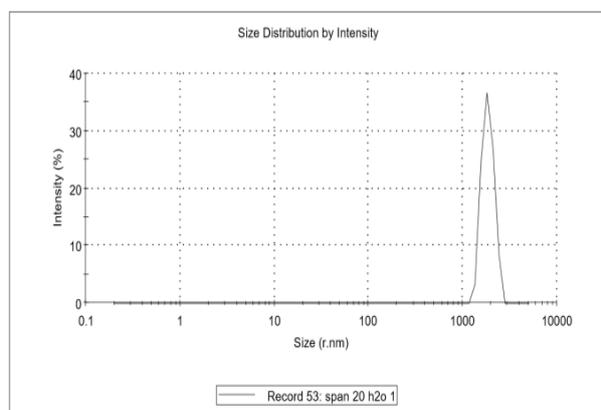


Figure III.7. Le spectre de la distribution de la taille des niosomes de Span 20 chargés de FLZ.

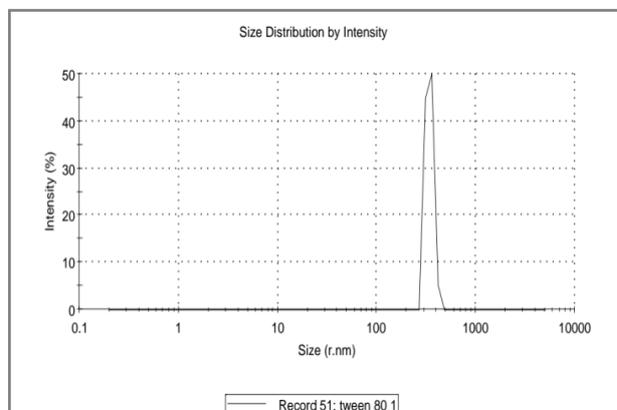


Figure III.8. Le spectre de la distribution de la taille de niosome de Tween 80 chargés de FLZ.

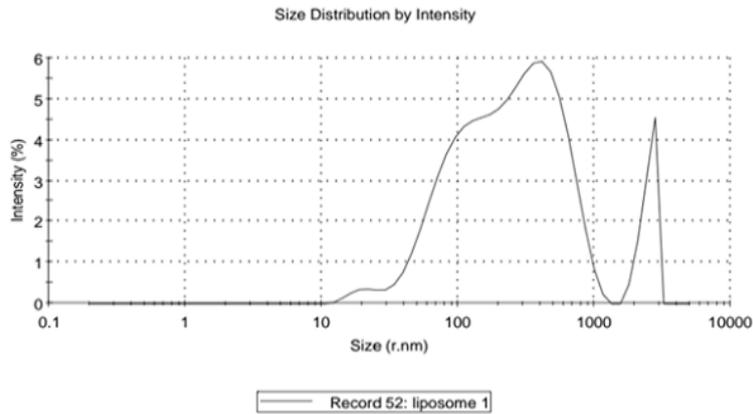


Figure III.9. Le spectre de la distribution de la taille de Liposome.

La figure III.7 correspondant aux niosomes de Span 20 (F10) chargés de FLZ poudre révèle la présence d'un seul pic très intense donc un seul type de niosomes. La taille moyenne de ces niosomes est de 2986 nm, donc il s'agit des LUV (Voir page 6).

A partir de la figure III.8 de l'analyse de la préparation des niosomes de Tween 80 (F17), nous constatons l'apparition d'un seul pic très intense donc un seul type de niosomes. La taille moyenne des vésicules est de 723 nm, il s'agit des MLV (Voir page 6).

Dans la figure III.9 de la distribution de la taille des liposomes (F26), nous observons 3 pics, le premier pic est un pic large, de 89% d'intensité, la taille des vésicules est de 297,2 nm. Le deuxième pic étroit d'intensité faible (9,6%) correspond aux liposomes de taille 2497nm. Et le troisième pic, caractérisé par une très faible intensité correspond au pic de la solution tampon PBS. Donc notre suspension est formée de deux tailles de liposomes d'où l'intérêt de rajouter une étape de purification par dialyse ou ultrafiltration pour les séparer.

Conclusion générale

En vue d'améliorer l'efficacité et la spécificité, et diminuer les effets secondaires des traitements antifongiques, des molécules amphiphiles sont des candidates naturelles à l'encapsulation, d'où les niosomes et les liposomes ont été utilisés.

Pour cela:

- L'encapsulation du Fluconazole poudre, et le FLZ solution saline, dans des suspensions amphiphiles a été réalisée.
- Pour les suspensions niosomales, deux tensioactifs non ioniques ont été utilisés Tween 80, et Span 20.
- Pour les suspensions liposomales, le phospholipide utilisé est la lécithine du soja.
- La technique d'encapsulation utilisée est Bangham de l'hydratation d'un film lipidique, et ceci pour l'obtention des MLV.
- La sonication a été effectuée pour obtenir les SUV et/ou LUV.
- Plusieurs rapports cholestérol/tensioactif ont été effectués afin de déterminer le meilleur taux d'encapsulation.
- Le rapport cholestérol/lécithine de soja: 1/20a été fixé afin de former les liposomes.
- La détermination des taux d'encapsulation pour les solutions niosomales et liposomales a été réalisée par UV/Vis.
- La détermination des tailles des niosomes et liposomes a été réalisée par Zetasizer.
- Le meilleur taux d'encapsulation de FLZ poudre est de 55 % obtenu avec le rapport 1/4,5: cholestérol/Tween 80.
- L'encapsulation de Fluconazole poudre en utilisant le Span 20 a permis d'obtenir un meilleur taux d'encapsulation de 40 % obtenu avec le rapport 1/4,5: cholestérol/Span 20. La taille moyenne de ces niosomes est 2986 nm de type LUV. Des taux très proches ont été obtenus avec le même rapport pour le type MLV et pour les deux types avec le rapport cholestérol/Span 1/6.
- Les meilleurs niosomes en terme de taux d'encapsulation de FLZ solution saline est de 74% pour des rapports 1/6 : cholestérol/Tween 80. Leur taille est de 723 nm sont de type MLV.

- Le caractère trouble dans les préparations niosomales de Span 20 à partir de la solution saline Fluconazole a empêché le dosage du Fluconazole. Ceci peut être expliqué par l'importance de la partie hydrophobe par rapport à la partie hydrophile dans la molécule du Span 20 (balance hydrophile lipophile : HLB 8,6) en comparant au rapport des deux parties dans la molécule du Tween 80 (HLB 15,5).
- Pas de corrélation entre le taux d'encapsulation et le rapport cholestérol/tensioactif.
- Pour les liposomes, l'efficacité d'encapsulation de Fluconazole poudre est plus élevée que celle de Fluconazole solution saline. Ceci peut être expliqué que la partie lipophile du Fluconazole doit être logée presque complètement dans la bicouche lipidique.
- Pas de différence significative de taux d'encapsulation entre les deux types de liposomes dans le même type de Fluconazole.
- Le zétasiser montre pour les particules de FLZ poudre encapsulés dans les liposomes, l'existence deux types de liposomes d'où l'intérêt de rajouter une étape de purification par dialyse ou ultrafiltration pour les séparer, cela justifie l'instabilité de cette préparation constaté lors de l'analyse par IR.

Références bibliographiques

1. Buxeraud, J. and S. Faure, Les nouveaux médicaments en infectiologie. *Actualités Pharmaceutiques*, 2017. 56(567): p. 22-26.
2. Carle, S., Les antifongiques dans le traitement des infections invasives. *Pharmactuel*, 2003. 36(1).
3. Plourde, K., Des aptamères pour améliorer l'encapsulation et la libération contrôlée des liposomes. 2016.
4. Ouellette, M., Synthèse de nanoparticules d'or pour l'optimisation de la médication contre le glaucome. 2017.
5. Trombino, S., S. Mellace, and R. Cassano, Solid lipid nanoparticles for antifungal drugs delivery for topical applications. *Therapeutic delivery*, 2016. 7(9): p. 639-647.
6. Datry, A. and E. Bart-Delabesse, La caspofungine: du mécanisme d'action aux applications thérapeutiques. *La revue de médecine interne*, 2006. 27(1): p. 32-39.
7. Buxeraud, J., S. Faure, and N. Picard, Les principales interactions médicamenteuses pharmacocinétiques. *Actualités Pharmaceutiques*, 2016. 55(554): p. 6-15.
8. Huette, P. and H. Dupont, Indication des traitements antifongiques (hors hématologie). *Anesthésie & Réanimation*, 2019.
9. Yeo, P.L., et al., Niosomes: a review of their structure, properties, methods of preparation, and medical applications. *Asian Biomedicine*, 2017. 11(4): p. 301-314.
10. Devoisselle, J.-M., et al. Fluorescence properties of indocyanin green: I. In-vitro study with micelles and liposomes. in *Advances in fluorescence sensing technology III*. 1997. International Society for Optics and Photonics.
11. Rongen, H., A. Bult, and W. Van Bennekom, Liposomes and immunoassays. *Journal of immunological methods*, 1997. 204(2): p. 105-133.
12. Milpied-Homsi, B., Le point sur les tensioactifs. *GERDA-Progrès en dermatologie-allergologie*, 2002. 8: p. 65-71.
13. Tompoš, T., Histokemija liposoma i njihova povezanost s krvno-moždanom barijerom. 2017, University of Zagreb. Faculty of Science. Department of Biology.
14. Dua, J., A. Rana, and A. Bhandari, Liposome: methods of preparation and applications. *Int J Pharm Stud Res*, 2012. 3(2): p. 14-20.
15. Barenholz, Y., et al., A simple method for the preparation of homogeneous phospholipid vesicles, *Biochemistry*, 1977. 16(12): p. 2806-2810.

16. Zorbas, V., et al., Preparation and characterization of individual peptide-wrapped single-walled carbon nanotubes. *Journal of the American Chemical Society*, 2004. 126(23): p. 7222-7227.
17. Sandeep, G., V. Reddy, and S.R. Devireddy, Formulation and evaluation of fluconazole pro-niosomal gel for topical administration. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 2014. 4(7): p. 98.
18. Devi, S., et al., Pelagia research library. *Der Chemica Sinica*, 2012. 3(6): p. 1337-1342.
19. Arun, P., et al., Design and Development of Liposome by Microencapsulation Vesicle Method and Vaginal Delivery System for Fluconazole Gel: In-Vitro Diffusion Study. 2010.
20. Fetih, G., Fluconazole-loaded niosomal gels as a topical ocular drug delivery system for corneal fungal infections. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 2016. 35: p. 8-15.
21. Caira, M.R., K.A. Alkhamis, and R.M. Obaidat, Preparation and crystal characterization of a polymorph, a monohydrate, and an ethyl acetate solvate of the antifungal fluconazole. *Journal of pharmaceutical sciences*, 2004. 93(3): p. 601-611.
22. Teleginski, L.K., et al., Fluconazole–excipient compatibility studies as the first step in the development of a formulation candidate for biowaiver. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 2015. 120(1): p. 771-781.
23. Khalid, M., et al., Screening study for formulation variables in preparation of diclofenac sodium niosomes using plackett–burman design. *Az. J. Pharm. Sci*, 2008. 38.
24. Gupta, U., et al., Spectroscopic studies of cholesterol: fourier transform infra-red and vibrational frequency analysis. *Materials Focus*, 2014. 3(3): p. 211-217.

Résumé :

L'encapsulation a été réalisée sur le Fluconazole dans des suspensions niosomales de deux types de tensioactifs non ioniques : Tween 80 et de Span 20, et dans des suspensions liposomales en utilisant un phospholipide: la lécithine du soja. La méthode classique de Bangham de l'hydratation d'un film lipidique a été utilisée pour l'obtention des vésicules multilamellaires. La sonication a été choisie pour obtenir des vésicules unilamellaires. Les rapports cholestérol/tensioactifs ont été variés afin de déterminer le meilleur taux d'encapsulation. Le taux d'encapsulation a été calculé suite à un dosage du Fluconazole par spectrophotométrie ultraviolet/visible. La détermination de la taille a été effectuée par un Zetasizer. La meilleure formulation niosomale en terme de taux d'encapsulation a été obtenue avec le Fluconazole solution saline en utilisant le rapport cholestérol/Tween 80 1/6. Le taux a atteint 74 % avec une taille moyenne 723 nm et de type multilamellaire. Les liposomes ont donné des taux d'encapsulation légèrement meilleurs que les niosomes.

Mots-clés : Encapsulation, Fluconazole, niosome et liposome.

Abstract :

Encapsulation was performed on Fluconazole in niosomal suspensions of two types of nonionic surfactants: Tween 80 and Span 20, and in liposomal suspensions using a phospholipid: soy lecithin. Bangham's classical method of moisturizing a lipid film was used to obtain multilamellar vesicles. Sonication was chosen to obtain unilamellar vesicles. Cholesterol/surfactant ratios have been varied to determine the best rate of encapsulation. The encapsulation rate was calculated following a Fluconazole assay by ultraviolet/visible spectrophotometry .size determination was performed by a zetasizer the best niosomal formulation in terms of encapsulation rate was obtained with Fluconazole saline using the cholesterol/Tween 80 1/6 ratio. The rate reached 74% with an average size of 723 nm and multilamellar type. Liposomes gave encapsulation rates slightly better than niosomes.

Keywords: Encapsulation, Fluconazole, niosomes and liposomes.

ملخص :

تم إجراء تغليف فلوكونازول في معلقات النيوزوم لنوعين من نشطة سطحيا الغير أيونية توين 80 و سبان 20، و في معلقات لليبوزومية باستخدام فسفوليبين ليسثين الصويا. ثم استخدام طريقة بنغام (Bengham) الكلاسيكية لترطيب فيلم شحمي للحصول على حويصلات متعددة الطبقات. ثم اختيار الصوتنة للحصول على حويصلات ذو طبقة واحدة. لقد تم استخدام نسب متعددة من الكولسترول و نشطة سطحية لتحديد افضل معدل للتغليف ثم حساب معدل التغليف بعد فحص فلوكونازول بواسطة الطيف الضوئي فوق البنفسجي/ المرئي. ثم تحديد الحجم بواسطة zetasizer. وتم الحصول على أفضل صيغة نيوزوم من حيث معدل التغليف باستخدام محلول فلوكونازول باستخدام نسبة كولسترول توين 80 1/6. وصلت النسبة إلى 74% بمتوسط حجم 327 نانومتر، من نوع متعدد الطبقة. أعطت الليبوزومات معدلات تغليف أفضل قليلا من النيوزومات.

الكلمات المفتاحية: تغليف الفلوكونازول، النيوزوم والليبوزوم.