
Dépôt Institutionnel de l'Université libre de Bruxelles /
Université libre de Bruxelles Institutional Repository
Thèse de doctorat/ PhD Thesis

Citation APA:

Gaignaux, A. (2013). *Développement et évaluation de nouvelles formulations à libération prolongée à base de microparticules de PLGA en vue d'une administration intra-articulaire dans le traitement de pathologies inflammatoires* (Unpublished doctoral dissertation). Université libre de Bruxelles, Faculté de Pharmacie, Bruxelles.

Disponible à / Available at permalink : <https://dipot.ulb.ac.be/dspace/bitstream/2013/209388/4/1af66de9-3e36-4c2f-b284-59847ad15f36.txt>

(English version below)

Cette thèse de doctorat a été numérisée par l'Université libre de Bruxelles. L'auteur qui s'opposerait à sa mise en ligne dans DI-fusion est invité à prendre contact avec l'Université (di-fusion@ulb.be).

Dans le cas où une version électronique native de la thèse existe, l'Université ne peut garantir que la présente version numérisée soit identique à la version électronique native, ni qu'elle soit la version officielle définitive de la thèse.

DI-fusion, le Dépôt Institutionnel de l'Université libre de Bruxelles, recueille la production scientifique de l'Université, mise à disposition en libre accès autant que possible. Les œuvres accessibles dans DI-fusion sont protégées par la législation belge relative aux droits d'auteur et aux droits voisins. Toute personne peut, sans avoir à demander l'autorisation de l'auteur ou de l'ayant-droit, à des fins d'usage privé ou à des fins d'illustration de l'enseignement ou de recherche scientifique, dans la mesure justifiée par le but non lucratif poursuivi, lire, télécharger ou reproduire sur papier ou sur tout autre support, les articles ou des fragments d'autres œuvres, disponibles dans DI-fusion, pour autant que :

- Le nom des auteurs, le titre et la référence bibliographique complète soient cités;
- L'identifiant unique attribué aux métadonnées dans DI-fusion (permalink) soit indiqué;
- Le contenu ne soit pas modifié.

L'œuvre ne peut être stockée dans une autre base de données dans le but d'y donner accès ; l'identifiant unique (permalink) indiqué ci-dessus doit toujours être utilisé pour donner accès à l'œuvre. Toute autre utilisation non mentionnée ci-dessus nécessite l'autorisation de l'auteur de l'œuvre ou de l'ayant droit.

----- **English Version** -----

This Ph.D. thesis has been digitized by Université libre de Bruxelles. The author who would disagree on its online availability in DI-fusion is invited to contact the University (di-fusion@ulb.be).

If a native electronic version of the thesis exists, the University can guarantee neither that the present digitized version is identical to the native electronic version, nor that it is the definitive official version of the thesis.

DI-fusion is the Institutional Repository of Université libre de Bruxelles; it collects the research output of the University, available on open access as much as possible. The works included in DI-fusion are protected by the Belgian legislation relating to authors' rights and neighbouring rights. Any user may, without prior permission from the authors or copyright owners, for private usage or for educational or scientific research purposes, to the extent justified by the non-profit activity, read, download or reproduce on paper or on any other media, the articles or fragments of other works, available in DI-fusion, provided:

- The authors, title and full bibliographic details are credited in any copy;
- The unique identifier (permalink) for the original metadata page in DI-fusion is indicated;
- The content is not changed in any way.

It is not permitted to store the work in another database in order to provide access to it; the unique identifier (permalink) indicated above must always be used to provide access to the work. Any other use not mentioned above requires the authors' or copyright owners' permission.

ULB

UNIVERSITÉ LIBRE DE BRUXELLES,
UNIVERSITÉ D'EUROPE

BioWin

THE HEALTH CLUSTER OF WALLONIA



Wallonie



SPW
Service public
de Wallonie

Avec le soutien de la DGOB
Département d'Innovation et de Développement
Technologique



Faculté de Pharmacie

Ecole Doctorale en Sciences Biomédicales et Pharmaceutiques

**Développement et évaluation de nouvelles formulations à libération
prolongée à base de microparticules de PLGA en vue d'une administration
intra-articulaire dans le traitement de pathologies inflammatoires**

Amélie GAINAUX

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur en Sciences
Biomédicales et Pharmaceutiques

Promoteur et co-promoteurs :

Prof. Karim AMIGHI (Laboratoire de Pharmacie Galénique et de Biopharmacie)
Prof. Carine DE VRIESE (Laboratoire de Pharmacie Galénique et de Biopharmacie)
Prof. Ass. Jonathan GOOLE (Laboratoire de Pharmacie Galénique et de Biopharmacie)

Composition du jury :

Prof. Jean NEVE (Président)
Prof. Bieke DEJAEGHER
Prof. Jacques DUBOIS
Prof. Ass. Pierre VAN ANTWERPEN
Dr Géraldine PIEL (ULg, Laboratoire de Technologie Pharmaceutique et Biopharmacie)
Dr Anne PERETZ (CHU-Brugmann, Rhumatologie)

Universite Libre de Bruxelles



003320871

académique 2013 - 2014



UNIVERSITÉ LIBRE DE BRUXELLES,
UNIVERSITÉ D'EUROPE

BioWin
THE HEALTH CLUSTER OF WALLONIA



Avec le soutien de la DGOB
Département du Développement
Technologique



Faculté de Pharmacie

Ecole Doctorale en Sciences Biomédicales et Pharmaceutiques

Développement et évaluation de nouvelles formulations à libération prolongée à base de microparticules de PLGA en vue d'une administration intra-articulaire dans le traitement de pathologies inflammatoires

Amélie GAIGNAUX

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur en Sciences
Biomédicales et Pharmaceutiques

Promoteur et co-promoteurs :

Prof. Karim AMIGHI (Laboratoire de Pharmacie Galénique et de Biopharmacie)
Prof. Carine DE VRIESE (Laboratoire de Pharmacie Galénique et de Biopharmacie)
Prof. Ass. Jonathan GOOLE (Laboratoire de Pharmacie Galénique et de Biopharmacie)

Composition du jury :

Prof. Jean NEVE (Président)
Prof. Bieke DEJAEGHER
Prof. Jacques DUBOIS
Prof. Ass. Pierre VAN ANTWERPEN
Dr Géraldine PIEL (ULg, Laboratoire de Technologie Pharmaceutique et Biopharmacie)
Dr Anne PERETZ (CHU-Brugmann, Rhumatologie)

Année académique 2013 - 2014

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier Monsieur le Professeur Karim Amighi de m'avoir offert l'opportunité de poursuivre mon apprentissage et de débiter mon expérience dans le domaine de la recherche au sein du Laboratoire de Pharmacie Galénique et Biopharmacie. Au cours de ces quatre années, Monsieur Amighi a toujours fait preuve d'énormément de disponibilité et de compréhension, ainsi que de conseils extrêmement avisés lors de la relecture de mes manuscrits. Sa capacité à adroitement motiver et remettre sur les rails ses chercheurs est un atout pour lequel je le remercie. Je remercie finalement Monsieur Amighi pour les moyens mis en œuvre pour l'aboutissement de ce travail.

Je suis également profondément reconnaissante du soutien financier octroyé par le pôle de compétitivité santé de la Région Wallonne, qui m'a permis de réaliser ce travail dans le cadre du projet BLOWION Join T-AIC.

Mes plus sincères remerciements s'adressent à Carine De Vriese, sans qui ce travail ne serait pas ce qu'il est aujourd'hui. Bien que parfois un peu mise à l'épreuve par cette discipline qui n'est pas son domaine d'expertise, ses énormes qualités d'écoute, de conseil, d'implication, de rigueur scientifique, de compréhension et de motivation l'ont rendue indispensable à l'aboutissement de cette recherche. Je remercie aussi Carine pour l'opportunité qu'elle m'a ouverte dans le domaine de la biologie moléculaire, expérience très riche en enseignements qui m'a permis de correctement finaliser ce travail. Humainement, j'ai pu découvrir une personne à l'écoute et gentille à l'extrême, qui m'a entourée et avec qui j'ai passé de très bons moments.

Je remercie Jonathan Goole pour son écoute, sa disponibilité et sa diligence, ainsi que pour toutes les relectures et corrections effectuées. De plus, sa compagnie a toujours été synonyme de franches rigolades.

Je tiens ensuite à remercier les membres de mon comité d'accompagnement, Monsieur le Professeur Jean Nève et le Docteur Anne Peretz (CHU-Brugmann), qui ont pris le temps chaque année d'évaluer ma recherche. De plus, ils ont également accepté de juger mon travail pour cette dernière épreuve. J'en profite également pour remercier les Professeurs Jacques Dubois et Bieke Dejaegher, ainsi que Pierre Van Antwerpen et Géraldine Piel (ULg) ayant pris le temps d'examiner mon travail.

Ayant passé une année de ma thèse dans le Laboratoire de Biochimie physiopathologique et de la Nutrition de Madame le Professeur Christine Delporte, je souhaite la remercier pour le

temps qu'elle m'a accordé ainsi que pour son implication, son intérêt et ses connaissances scientifiques. Je remercie également toute l'équipe du laboratoire pour leur disponibilité et les connaissances qu'ils m'ont transmises. Je remercie plus particulièrement Jason Perret, Françoise Grégoire et Nargis Bolaky pour toutes les heures d'apprentissage passées à leur côté et ce, toujours dans une atmosphère conviviale.

Je souhaite aussi remercier les personnes ayant activement contribué à l'élaboration de ce travail, par le biais de la réalisation de certaines manipulations. Je pense à Monsieur et Madame les Professeurs Juergen et Florence Siepmann de l'Université de Lille, à toute l'équipe du CORD de l'ULg et plus particulièrement à Thierry Franck et à Jennifer Romainville, à Patrizio Madau et à Titiana Segato.

Je remercie enfin toute l'équipe du Laboratoire de Pharmacie Galénique et Biopharmacie, avec qui j'ai passé de bons moments. J'ai beaucoup apprécié la bonne humeur constante et les aides multiples apportées par Nancy, Véronique et Maxime.

Tout au long de cette période, j'ai rencontré des personnes formidables, aux qualités nombreuses et variées, qui m'ont apporté un soutien inestimable, beaucoup de joie et de bonne humeur tant au travail qu'en dehors et qui sont devenues des amis indispensables aujourd'hui. Ces remerciements sont également destinés à mes amis de plus longue date, qui ont suivi l'évolution de ce travail et m'ont toujours encouragée.

Je terminerai cette longue liste en remerciant mon Papa pour son extrême patience et son soutien inébranlable. Une pensée toute particulière va à ma Maman, que j'aurais aimé avoir auprès de moi en ce jour important, comme dans tant d'autres épreuves et joies. Enfin, je remercie Arnaud du fond du cœur pour tout ce qu'il m'apporte, ce qu'il me pousse à accomplir, sa patience, son écoute, ses encouragements, et tout le reste...

Table des matières

Abréviations	5
Résumé	8
A. Introduction	10
I. L'articulation	10
II. Les pathologies articulaires	18
1. Généralités	18
2. Arthrose.....	18
3. Arthrite rhumatoïde.....	22
III. L'articulation en conditions inflammatoires/pathologiques	27
1. Généralités	27
2. Principaux facteurs inflammatoires impliqués.....	30
IV. Les traitements des pathologies articulaires	37
1. Généralités et problématique des traitements	37
2. Intérêts de la voie articulaire.....	45
3. Intérêts de la libération prolongée en intra-articulaire	46
4. Types de formulations à délivrance intra-articulaire	46
V. L'encapsulation de molécules actives	47
1. Émulsion – évaporation/extraction de solvant.....	47
2. Coacervation	48
3. Atomisation.....	49
VI. Les polymères.....	50
1. Structures et propriétés des polymères biodégradables	50
2. Mécanismes de dégradation/érosion des polymères	59
VII. Les molécules encapsulées	63
1. Clonidine (chlorhydrate).....	63
2. Bétaméthasone (dipropionate)	67

B. But général du travail	69
C. Matériel et méthodes général	70
I. Matériel	70
II. Méthodes générales	71
1. Encapsulation de principes actifs.....	71
2. Caractérisation physico-chimique des formulations.....	72
D. Partie expérimentale.....	84
Optimisation de l'encapsulation de principes actifs dans les microsphères de PLGA et caractérisation des particules.	84
I. But.....	84
II. Méthodes spécifiques	85
1. Étude de la libération du principe actif.....	85
2. Modèle mathématique.....	87
3. Dessiccation des microparticules.....	88
III. Résultats et discussion	91
1. Microsphères de PLGA chargées en clonidine.....	91
2. Microsphères de PLGA chargées en dipropionate de bétaméthasone.....	105
IV. Conclusion.....	110
Caractérisation de la dégradation du polymère.	111
I. But.....	111
II. Méthodes spécifiques	112
1. Suivi de la dégradation des microparticules contenant la clonidine.....	112
2. Chromatographie par perméation de gel.....	112
3. Suivi de la perte de poids et de la prise en eau des microparticules.....	117
4. Suivi du gonflement des microparticules.....	118
5. Mesure du pH en cours de dégradation.....	118
III. Résultats et discussion.....	120

1.	Influence des conditions de fabrication des microparticules sur la dégradation .	122
2.	Étude du phénomène de dégradation du polymère	123
3.	Étude du phénomène d'érosion du polymère.....	132
4.	Évolution du pH au cours de la dégradation du polymère.....	137
IV.	Conclusion.....	141
	Étude de la cytotoxicité et de l'efficacité des microsphères de clonidine ou de bétaméthasone sur des modèles cellulaires.	142
I.	But	142
II.	Matériel.....	144
III.	Méthodes spécifiques	145
1.	Stérilisation	145
2.	Culture cellulaire et conditions de traitement	146
3.	Extraction d'ARN	149
4.	Contrôle de la qualité et de la quantité de l'ARN.....	150
5.	Transcription inverse des ARN.....	152
6.	Polymérisation en chaîne quantitative	152
7.	Dosage ELISA multiplex	158
8.	Cytométrie de flux	160
9.	Chimiluminescence.....	162
10.	Analyse statistique	165
IV.	Résultats et discussion	166
1.	Formulations et véhicule.....	166
2.	Réponse des chondrocytes en présence des formulations.....	167
3.	Réponse des synoviocytes en présence des formulations	171
4.	Réponse des PBMC en présence des formulations.....	174
5.	Évaluation de l'apoptose et de la nécrose	179
6.	Évaluation de la chimiluminescence.....	182

V. Conclusion.....	187
E. Conclusion générale.....	188
F. Perspectives.....	190
G. Bibliographie.....	191
H. Annexes.....	216

Abréviations

Δ PM	Pourcentage de variation du poids moléculaire moyen
A	Amorce antisens = reverse primer
ACR	American college of rheumatology
ADNc	ADN complémentaire
AINS	Anti-inflammatoire non-stéroïdien
AR	Arthrite rhumatoïde
ATCC	American type culture collection
AV	Annexine V – FITC
BMP	Bone morphogenic protein = protéine morphogénique osseuse
CCP	Cyclic citrullinated peptide = peptide cyclique citrulliné
CL	Chimiluminescence
COX	Cyclo-oxygénase
CYS	Cystéine
D	Coefficient apparent de diffusion
DAD	Diode array detector = détecteur à barrette de diodes
DEPC	Diethyl pyrocarbonate
DMARD	Disease-modifying antirheumatic drug
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DSC	Differential scanning calorimetry = calorimétrie différentielle à balayage
ECM	Extracellular matrix = matrice extracellulaire
EE	Encapsulation efficiency = efficacité d'encapsulation
E/H/E	Double émulsion eau/huile/eau
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EULAR	European league against rheumatism
FACS	Fluorescence-activated cell sorter
FBS	Fetal bovine serum = sérum de veau fœtal
FDA	Food and drug administration
FGF	Fibroblasts growth factor = facteur de croissance des fibroblastes
FID	Flame ionization detector = détecteur à ionisation de flamme
FR	Facteur rhumatoïde
GC	Gas chromatography = chromatographie gazeuse
GLY	Glycine
GPC	Gel permeation chromatography = chromatographie par perméation de gel
HA	Hyaluronic acid = acide hyaluronique
HBSS	Hank's balanced saline solution
H/E	Émulsion huile/eau
HPLC	High-performance liquid chromatography = chromatographie liquide haute performance
IA	Intra-articulaire
IGF	Insulin-like growth factor = facteur de croissance analogue à l'insuline
IL	Interleukine
ILE	Isoleucine

IM	Intra-musculaire
IV	Intraveineux
<i>k</i>	Constante de vitesse de dégradation du polymère
LEU	Leucine
LPS	Lipopolysaccharide
MMP	Matrix metalloproteinase = métalloproté(in)ase de matrice, matricielle
Mn	Number-average molecular weight = masse moléculaire moyenne en nombre
Mw	Weight-average molecular weight = masse moléculaire moyenne en poids
Mz	Z-average molecular weight
NAS	Niveau d'assurance de stérilité
NICE	National institute for health and care excellence
NO	Nitric oxide = oxyde nitrique
OA	Osteoarthritis = arthrose
OARSI	Osteoarthritis research society international
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell = cellule mononucléée du sang périphérique
PBS	Phosphate buffered saline
PCL	Poly(ϵ -caprolactones)
PDLLA	Poly(D,L-lactide) / acide poly(D,L-lactique)
PE	Prise en eau
PG	Prostaglandine
PGA	Polyglycolide / acide polyglycolique
PI	Iodure de propidium
PLA	Poly lactide / acide polylactique
PLGA	Poly(D,L-lactide- <i>co</i> -glycolide) / acide poly(D,L-lactique- <i>co</i> -glycolique)
PLLA	Poly(L-lactide) / acide poly(L-lactique)
PM	Poids moléculaire
PMA	Phorbol myristate acetate – phorbol 12-myristate 13-acétate
PMN	Leucocyte polymorphonucléaire
POE	Poly(ortho)ester
PP	Perte de poids
PVA	Polyvinyl alcohol = alcool polyvinylique
PXRD	Powder X-ray diffraction = diffraction des rayons X sur poudre
qPCR	quantitative polymerase chain reaction
R	Rendement de formulation
RANKL	Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand
RF	RNAse free
RID	Refractive index detector = détecteur à indice de réfraction
RIN	RNA integrity number
ROS	Reactive oxygen species = espèces réactives de l'oxygène
RPMI	Roswell park memorial institute
S	Amorce sens = forward primer
SA-PE	Streptavidine-phycoérythrine
SC	Sous-cutané
SEM	Scanning electron microscopy

SOP	Standard operating procedure = procédure opératoire standard
SPE	Solid-phase extraction
Tg	Température de transition vitreuse
TGA	Thermogravimetric analysis = analyse thermogravimétrique
TGF	Transforming growth factor = facteur de croissance transformant
THF	Tétrahydrofurane
TIMP	Tissue inhibitor of metalloproteinase = inhibiteur tissulaire de métalloprotéase
TLR	Toll-like receptor
TNF	Tumor necrosis factor = facteur de nécrose tumorale
w ₁	Phase aqueuse interne de la double émulsion
w ₂	Phase aqueuse externe de la double émulsion

Résumé

L'arthrose et l'arthrite rhumatoïde sont deux pathologies articulaires caractérisées par la dégradation du cartilage articulaire, subséquente à la production de divers médiateurs inflammatoires. Le traitement de ces pathologies se limite généralement à soulager le patient des épisodes douloureux et inflammatoires et à améliorer sa qualité de vie. Dans le cas de l'arthrose, peu de traitements permettent d'enrayer significativement l'évolution de la dégradation du cartilage et donc de la maladie. Par contre, l'arthrite rhumatoïde peut être efficacement ralentie grâce à l'administration de certaines molécules. Néanmoins, ces traitements n'ont généralement montré qu'une efficacité à court-terme, requérant une administration fréquente. L'objectif de ce travail repose donc sur l'élaboration de nouvelles options thérapeutiques permettant de réduire la fréquence d'administration ainsi que les effets indésirables des traitements actuels. La délivrance de molécules en intra-articulaire associée à une libération prolongée offre l'avantage d'exposer les sites directement impliqués dans l'évolution de la maladie à une ou plusieurs molécules efficaces contre l'inflammation et la douleur, et aidant à la régénération du cartilage, durant plusieurs semaines, voire des mois.

Des microparticules de PLGA chargées en clonidine ou en bétaméthasone ont donc été optimisées afin d'obtenir des efficacités d'encapsulation appréciables (clonidine HCl : EE \approx 20% ; dipropionate de bétaméthasone : EE \approx 70%), une taille adaptée à l'administration intra-articulaire (12 – 38 μ m) et une libération de la molécule s'échelonnant sur 5 à 8 semaines. La libération prolongée de la clonidine implique des mécanismes de diffusion de la molécule ainsi que de dégradation/érosion du polymère. Au vu de l'absence de réaction inflammatoire, les microparticules développées sont correctement tolérées par les chondrocytes, synoviocytes, PBMC et neutrophiles, principales cellules impliquées dans les mécanismes inflammatoires de l'arthrose et de l'arthrite rhumatoïde. L'évaluation de l'efficacité anti-inflammatoire des microparticules vides et chargées en clonidine ou en bétaméthasone via l'étude de l'expression et de la sécrétion de différents médiateurs de l'inflammation a permis d'aboutir à plusieurs conclusions : (i) les microparticules vides sont associées à un effet anti-inflammatoire, (ii) les microparticules chargées en clonidine n'ont pas montré d'activité anti-inflammatoire propre pouvant être attribuée à la clonidine, et (iii) les microparticules de bétaméthasone ont confirmé l'effet anti-inflammatoire de la bétaméthasone. Enfin, l'étude de la toxicité des principes actifs et microparticules vides ou chargées a montré une toxicité significative de la clonidine sur les synoviocytes. Néanmoins, l'encapsulation des principes actifs dans les microparticules de PLGA a permis d'éliminer cette toxicité, protégeant donc efficacement les cellules articulaires.

Les microparticules développées permettent alors d'envisager l'encapsulation d'autres molécules anti-inflammatoires ou une combinaison de molécules ayant des effets complémentaires (anti-inflammatoire et antidouleur). L'utilisation de la clonidine dans ces indications devra être réévaluée en étudiant de façon approfondie son efficacité dans la douleur.

Summary

Both osteoarthritis and rheumatoid arthritis are articular diseases characterized by the degeneration of the joint cartilage, resulting from the production of various inflammatory mediators. The current treatment of these diseases is restricted to alleviate the painful and inflammatory episodes of the patients and to improve its quality of life. In osteoarthritic patients, few treatments allow to significantly stop the evolution of the degradation of the cartilage and, consequently, the disease. In rheumatoid arthritis, the evolution can be slowed down following the administration of some drugs. Nevertheless, these treatments are often associated to a short-term efficacy. The objective of this work is to develop new therapeutic options that allow to reduce the frequency of administration and the side effects of the current treatments. The intraarticular delivery combined to controlled-release presents the advantage to expose the sites directly involved in the evolution of the disease to one or more molecules effective to relieve the pain, inflammation and to help the regeneration of the cartilage.

Clonidine or betamethasone-loaded PLGA microparticles were optimized to reach suitable encapsulation efficiencies (clonidine HCl: EE \approx 20%; betamethasone dipropionate: EE \approx 70%), an appropriate size for an intraarticular delivery (12 – 38 μ m) and a controlled-release of the molecule over 5 to 8 weeks. The release of clonidine implies mechanisms of diffusion and degradation/erosion of the polymer. Given the absence of an inflammatory reaction, the developed microparticles were properly tolerated by the chondrocytes, synoviocytes, PMBC and neutrophils, which are the main cells involved in the inflammatory reaction of osteoarthritis and rheumatoid arthritis. The assessment of the anti-inflammatory efficacy of the drug-free and drug-loaded microparticles through the evaluation of the expression and the secretion of various inflammatory mediators allowed to draw several conclusions: (i) drug-free microparticles were associated to an anti-inflammatory effect, (ii) clonidine-loaded microparticles did not show any anti-inflammatory activity that could be attributed to clonidine, and (iii) betamethasone-loaded microparticles confirmed the anti-inflammatory effect of betamethasone. Finally, the evaluation of the toxicity of the drugs and microparticles showed a significant toxicity of clonidine against synoviocytes. Nevertheless, the encapsulation of the drugs in PLGA microparticles induced the suppression of this toxicity, protecting in this way the articular cells. Entrapping other anti-inflammatory molecules or a combination of molecules with complementary effects (anti-inflammatory and anti-nociceptive drugs) in the PLGA microparticles developed has to be considered. Moreover, the use of clonidine in these indications has to be reassessed by a thorough study of its anti-nociceptive potential.

A. Introduction

I. L'articulation

Les articulations jouent deux rôles primordiaux : elles confèrent de la mobilité au squelette et constituent le point de contact entre les os. Pour certaines d'entre elles, un rôle de protection peut également être reconnu comme dans le cas du crâne ou de la cage thoracique. Bien que les articulations restent les zones les plus faibles de notre squelette, leur structure est adaptée pour résister à diverses contraintes qui pourraient les délocaliser de leur position initiale, telles que l'écrasement ou le déchirement [Marieb, 2005].

La classification des diverses articulations peut être structurale ou fonctionnelle (Tableau 1). Dans la *classification structurale*, l'importance est donnée aux matériaux unissant les os ainsi qu'à la présence/absence d'une cavité articulaire. Les articulations sont dites fibreuses, cartilagineuses ou synoviales. Les articulations fibreuses ne contiennent pas de cavité articulaire, ni de cartilage. Les os sont connectés par du tissu conjonctif dense. Dans les articulations cartilagineuses, les os sont reliés par du cartilage mais ne présentent pas de cavité articulaire. Enfin, dans les articulations synoviales, les os sont reliés par une cavité articulaire remplie de liquide synovial conférant à l'articulation une grande mobilité. La majorité des articulations du corps humain entre dans cette dernière catégorie [Chevalier et Richette, 2005 ; Marieb, 2005].

Tableau 1 : Classification des articulations [Adapté de Marieb, 2005].

Classe structurale	Caractéristiques structurales	Mobilité
Fibreuse	Extrémités ou parties d'os réunies par des fibres collagènes	Généralement immobiles
Cartilagineuse	Extrémités ou parties d'os réunies par du cartilage	Immobilés / Semi-mobiles
Synoviale	Extrémités ou parties d'os recouvertes de cartilage articulaire et abritées dans une capsule articulaire tapissée d'une membrane synoviale	Entièrement mobiles

La *classification fonctionnelle* se base sur la mobilité, le degré de mouvement consenti par l'articulation. Y sont classées les articulations immobiles (synarthroses), semi-mobiles (amphiarthroses) et mobiles (diarthroses). Les articulations immobiles et semi-mobiles se

situent presque exclusivement au niveau du squelette axial (côtes, colonne vertébrale, sternum, crâne, larynx) alors que les articulations mobiles se retrouvent dans les membres supérieurs et inférieurs [Chevalier et Richette, 2005 ; Marieb, 2005].

Le but principal de ce travail étant d'élaborer une formulation à libération prolongée en vue d'une administration au niveau de la cavité articulaire, les articulations synoviales seront développées plus en détail.

Les articulations synoviales présentent cinq particularités distinctives : un cartilage articulaire, une capsule articulaire (capsule fibreuse et membrane synoviale), une cavité articulaire, du liquide synovial et des ligaments (Figure 1).

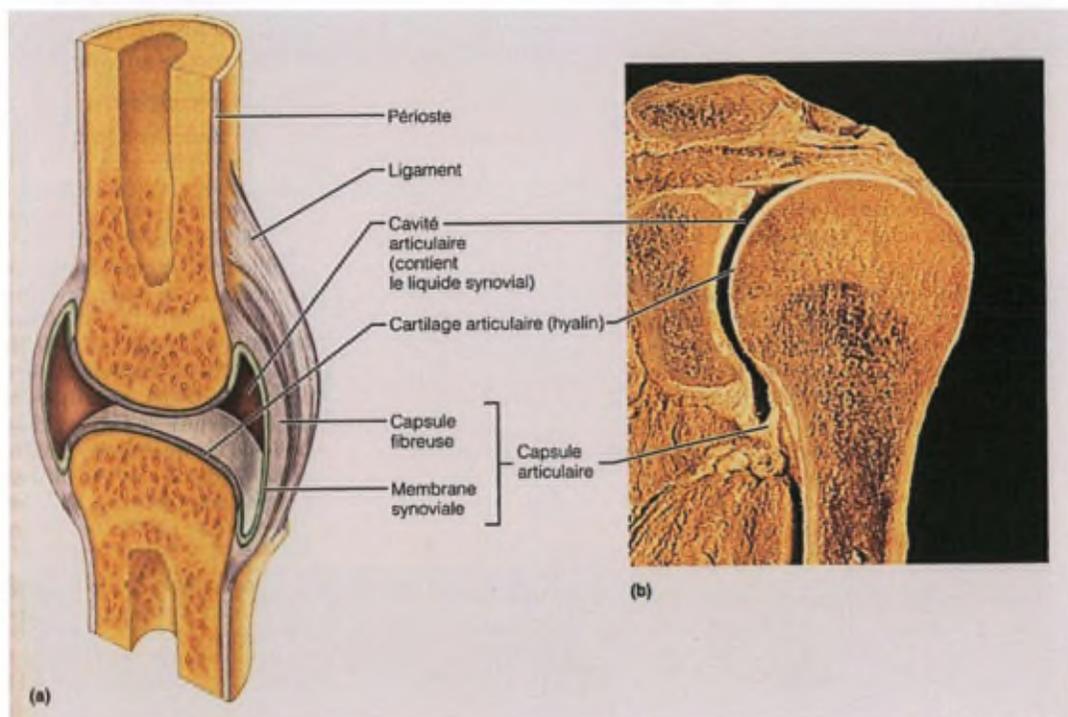


Figure 1 : Articulation synoviale typique caractérisée par les ligaments, la cavité articulaire contenant le liquide synovial, le cartilage articulaire et la capsule articulaire [Marieb, 2005].

Le *cartilage hyalin articulaire* recouvre la surface des os composant les articulations synoviales. Il n'est ni innervé, ni vascularisé, ni parcouru par un réseau lymphatique [Lorenz et Richter, 2006 ; Hendren et Beeson, 2009]. Ce cartilage n'est composé que d'un type cellulaire, les chondrocytes (1-5% du volume), entourés de la matrice extracellulaire (ECM). Les chondrocytes sont des cellules sphériques ou ovoïdes d'un diamètre de 30 à 40 μm et contenant un noyau, des mitochondries et des vacuoles lysosomiales (Figure 2). Le métabolisme de ces cellules est principalement anaérobie. Les chondrocytes de surface

peuvent toutefois en partie fonctionner en aérobie, grâce à la circulation de l'oxygène présent dans le liquide synovial. En effet, elles présentent un gradient d'oxygène allant de 10% dans les zones superficielles à 1% dans les zones profondes du cartilage. Le principal substrat énergétique des chondrocytes est le glucose. La nutrition des chondrocytes est assurée à la fois par la membrane synoviale et le liquide synovial, mais se produit également par l'intermédiaire de l'os sous-chondral. Dans un cartilage sain, les chondrocytes ne présentent pas de contacts intercellulaires, ne migrent pas et ne se divisent pas [Chevalier et Richette, 2005 ; Goldring, 2006 ; Castaneda et coll., 2012].

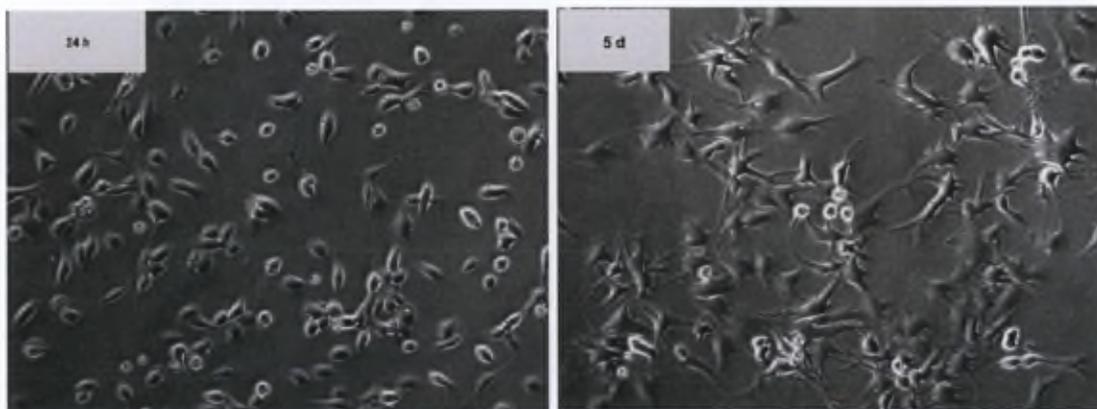


Figure 2 : Morphologie d'une lignée primaire de chondrocytes articulaires humains en culture monocouche. La morphologie des chondrocytes évolue nettement entre le premier et le cinquième jour de culture. Les chondrocytes adoptent progressivement une structure plus proche des fibroblastes alors que leur forme sphérique est encore clairement visible après 24 heures de culture [Schulze-Tanzil, 2009].

L'ECM est composée de macromolécules telles que le collagène (10-20% du cartilage, au moins 90-95% se trouve sous forme de collagène de type II), les protéoglycanes (10-20% du cartilage) et autres protéines non-collagéniques. Les protéoglycanes (Figure 3), sous forme de monomères ou d'agrégats, sont liés à des chaînes centrales d'acide hyaluronique. Un monomère de protéoglycane est constitué d'une structure principale protéique à laquelle sont attachés de nombreux glycosaminoglycanes sulfatés [Newman, 1998 ; Bhosale et Richardson, 2008 ; Crema et coll., 2011]. Les protéoglycanes sont différenciés en deux classes, selon leur capacité d'agrégation de l'acide hyaluronique : les macrotéoglycanes de poids moléculaire (PM) élevé (principalement l'agrécan) et les protéoglycanes de faible PM (décorine, fibromoduline) [Chevalier et Richette, 2005].

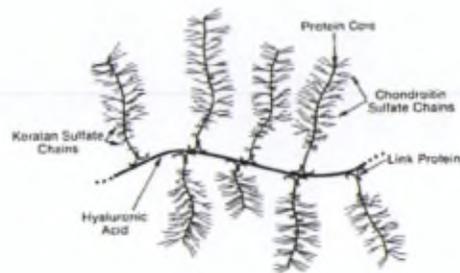


Figure 3 : Structure d'un agrégat de protéoglycane, fixé sur une chaîne d'acide hyaluronique [Newman, 1998].

L'acide hyaluronique (HA) présent dans le cartilage articulaire participe à la formation d'agrégats de protéoglycanes. Le HA nouvellement synthétisé par le cartilage articulaire sain présente un haut PM ($2 \cdot 10^6 - 10 \cdot 10^6$ Da) quel que soit l'âge ; néanmoins, ce PM diminue avec l'âge ($3 \cdot 10^5 - 6 \cdot 10^5$ Da) bien que la concentration en HA dans le cartilage augmente (0,5 µg/mg à 2,5 ans – 2,5 µg/mg à 86 ans). Le HA serait donc dégradé dans des conditions homéostatiques par les hyaluronidases et avec l'âge par les radicaux libres de l'oxygène [Holmes et coll., 1988 ; Kirwan et Rankin, 1997 ; Ghosh et Guidolin, 2002 ; Stern et coll., 2006 ; Bastow et coll., 2008].

Le collagène confère une résistance à l'étirement au cartilage hyalin alors que les protéoglycanes lui confèrent une résistance à la compression [Bhosale et Richardson, 2008]. Par ailleurs, ces molécules y maintiennent une certaine quantité d'eau. Le cartilage articulaire contient en effet 60 à 80% d'eau qui diffuse en partie librement de l'intérieur vers l'extérieur du cartilage et inversement. Ceci confère au cartilage hyalin des propriétés mécaniques uniques, lubrifie l'articulation et participe à la nutrition des chondrocytes. L'ECM permet aux articulations de supporter, durant une vie entière, d'intensifs et répétitifs stress physiques pour autant que le cartilage ne s'endommage pas [Newman, 1998].

Les chondrocytes et l'ECM sont en relation symbiotique car les chondrocytes assurent la synthèse et le renouvellement de l'ECM tandis que l'état de l'ECM a un effet direct sur les fonctions des chondrocytes. Ils produisent également les enzymes nécessaires à la dégradation de l'ECM [Nesic et coll., 2006 ; Bhosale et Richardson, 2008 ; Goldring et Marcu, 2009].

La structure et la composition du cartilage articulaire varient en fonction de la distance par rapport à la surface (Figure 4).

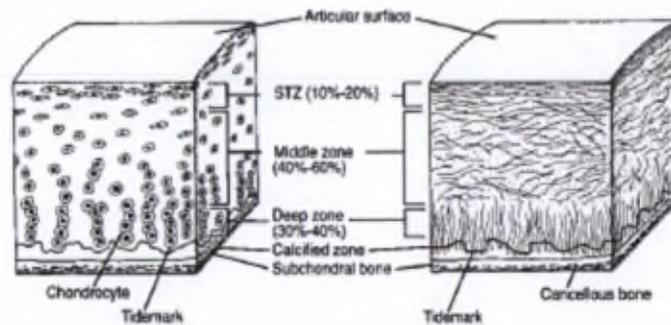


Figure 4 : Structure du cartilage articulaire, décrivant la disposition et la forme des chondrocytes (à gauche) et des fibres de collagène (à droite) au niveau de la zone superficielle (*STZ*) (10 à 20% de la hauteur du cartilage), de la zone intermédiaire (*Middle zone*) (40 à 45% de la hauteur du cartilage), de la zone profonde (*Deep zone*) (30 à 40% de la hauteur du cartilage) et de la zone de cartilage calcifié (*Calcified zone*) (5 à 10% de la hauteur du cartilage) [Newman, 1998].

À la surface du cartilage articulaire se trouve une région acellulaire, dite *lamina splendata*, laquelle est recouverte notamment de HA et permet l'attachement de macromolécules présentes dans le liquide synovial. Elle revêt en outre un rôle de protection du cartilage, principalement contre les radicaux libres [Chevalier et Richette, 2005]. Quatre zones peuvent ensuite être distinguées, les chondrocytes y différant de par leur taille, forme et métabolisation (Figure 4). Située sous la *lamina splendata*, la très fine zone superficielle est composée de fibrilles de collagène placées parallèlement par rapport à la surface et de chondrocytes de forme allongée. La structure du réseau de collagène permet à cette zone de résister aux forces de tension. La zone intermédiaire, plus épaisse, contient des chondrocytes plus sphériques et des fibrilles de collagène plus grandes, placées de façon aléatoire. Dans la zone profonde, les chondrocytes sphériques sont disposés en colonnes et les fibres de collagène sont alignées parallèlement mais de façon perpendiculaire par rapport à la surface. Enfin, la zone de cartilage calcifié est composée de fibrilles de collagène enchâssées dans le cartilage calcifié, formant une transition mécanique et une fixation entre le cartilage et l'os [Salter, 1998 ; Burr, 2004 ; Chevalier et Richette, 2005].

La *capsule articulaire* entoure la cavité articulaire et est composée de deux couches de tissu (Figure 1). La capsule fibreuse, qui est le tissu externe, est un tissu conjonctif dense, irrégulier et fixé au périoste des os attenants. En renforçant l'articulation, la capsule fibreuse empêche les os de se désolidariser lors d'une traction trop importante. En effet, des sites d'attachement composés de faisceaux de fibres de collagène lient fermement la capsule fibreuse aux os [Ralphs et Benjamin, 1994 ; Sutton et coll., 2009]. La seconde couche de tissu, la membrane synoviale, est un tissu conjonctif lâche qui recouvre la face interne de la capsule fibreuse. La

membrane synoviale et le cartilage articulaire délimitent la cavité articulaire [Sutton et coll., 2009].

L'épaisseur et l'orientation des cellules composant la capsule articulaire dépendent des contraintes subies par celle-ci. Il s'agit d'un tissu innervé et vascularisé, contrairement au cartilage. Au sein de la capsule articulaire, le tissu composant la capsule fibreuse est généralement plus innervé que le tissu synovial [Ralphs et Benjamin, 1994].

La membrane synoviale est constituée de deux couches : l'intima synoviale (20 – 40 μm d'épaisseur), directement au contact de la cavité articulaire, est composée d'une à trois couches de cellules de surface spécialisées, appelées synoviocytes. La seconde couche, dite tissu sub-synovial, est en contact avec la capsule fibreuse [Sutton et coll., 2009]. La membrane synoviale contient deux types de cellules appelées synoviocytes macrophages-like (type A) et synoviocytes fibroblastes-like (Type B) [Jones et coll., 2008]. Elle contient donc d'une part des cellules ayant une fonction de synthèse protéique et d'autre part des cellules ayant une fonction phagocytaire (microorganismes et débris cellulaires se trouvant dans la cavité articulaire) [Marieb, 2005]. Les synoviocytes de type B synthétisent et sécrètent notamment le collagène, la fibronectine, la lubriline et les dérivés de HA dans le liquide synovial. Ils permettent ainsi d'en réguler le volume et participent à l'équilibre de la capsule articulaire [Mor et coll., 2005 ; Nozawa-Inoue, 2006]. La membrane synoviale est parcourue d'un vaste réseau vasculaire dont les capillaires de surface facilitent les échanges d'eau et de solutés et agissent activement dans ses activités physiologiques [Mombberger et coll., 2005 ; Courtney et Doherty, 2009 ; Sutton et coll., 2009]. La première source de nutriments et de facteurs de signalisation pour le cartilage articulaire étant la membrane synoviale, celle-ci est primordiale dans le maintien de la santé de l'articulation [Jones et coll., 2008].

La cavité articulaire de l'articulation du genou n'est que partiellement recouverte par une capsule articulaire relativement mince au niveau des faces latérales et postérieures du genou. Elle contient des paquets adipeux intracapsulaires mais extrasynoviaux, c'est-à-dire situés entre la capsule articulaire du côté externe et la cavité articulaire délimitée par la membrane synoviale du côté interne (Figure 5) [Marieb, 2005 ; Shahabpour et coll., 2005].

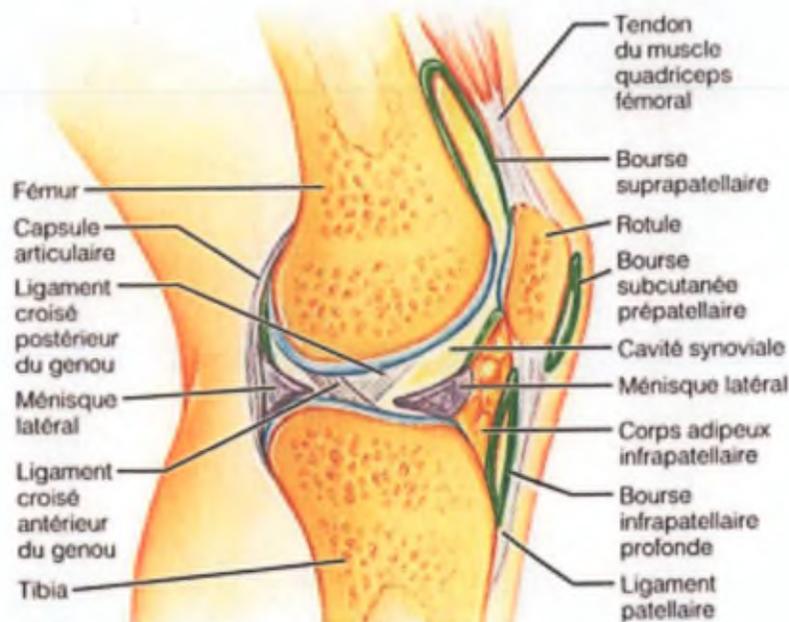


Figure 5 : L'articulation du genou est la plus volumineuse et la plus complexe du corps humain [Marieb, 2005].

La *cavité articulaire* des articulations synoviales contient une petite quantité de liquide synovial ($\pm 0,5 - 2$ ml) (Figure 6).



Figure 6 : Volume de liquide synovial aspiré d'une articulation de genou normale. Par aspiration, il est possible de retirer environ 0,5 ml de liquide synovial. Le liquide est clair, légèrement jaune et hautement visqueux [Courtney et Doherty, 2009].

Le *liquide synovial* ou synovie est produit par la membrane synoviale par filtration du plasma sanguin à partir du réseau de capillaires des synoviocytes ; ce liquide diffuse ensuite vers la cavité articulaire [Courtney et Doherty, 2009]. La viscosité caractéristique du liquide synovial

est causée par la présence de HA et de glycoprotéines synthétisés localement, notamment par les fibroblastes synoviaux [Bastow et coll., 2008]. Étant le principal composant non-protéique possédant un large volume hydraté lui conférant des propriétés viscoélastiques uniques, le HA de haut PM et hautement concentré dans le liquide synovial (1400 – 3600 µg/ml) permet de réduire les frictions entre les os, les chocs subis par l'articulation et par conséquent, son usure. De plus, grâce à sa large taille et son hydrophilie, le HA retient le liquide au niveau de la cavité articulaire. Enfin, il facilite les échanges entre les capillaires de la membrane synoviale et le cartilage articulaire tout en limitant le passage vers le liquide synovial de protéines de haut PM provenant du plasma ou des cellules. Le renouvellement du HA du liquide synovial est très rapide ($t_{1/2} = 12$ heures) [Volpi et coll., 2009].

Les fonctions générales de la membrane synoviale et de la synovie sont donc de transporter les nutriments vers le cartilage articulaire avasculaire, de lubrifier et nettoyer l'articulation par la clairance continue du liquide (élimination de microorganismes, etc.) [Marieb, 2005 ; Courtney et Doherty, 2009]. Dans le cartilage articulaire, le liquide synovial réduit les frictions [Marieb, 2005].

Enfin, les *ligaments* renforcent les articulations synoviales. Ces ligaments peuvent constituer un épaississement de la capsule fibreuse (ligaments intrinsèques ou capsulaires) ou être indépendants et se trouver soit à l'extérieur (ligaments externes ou extracapsulaires), soit à l'intérieur (ligaments internes ou intracapsulaires) de la capsule fibreuse [Ralphs et Benjamin, 1994 ; Marieb, 2005].

II. Les pathologies articulaires

1. Généralités

Les pathologies articulaires peuvent être différenciées en pathologies inflammatoires (arthrite rhumatoïde, spondylarthrite ankylosante, etc.) et pathologies non-inflammatoires (arthrose) selon l'évolution des symptômes [Bonnet et Walsh, 2005]. Malgré cette classification, il est essentiel de retenir que l'inflammation joue un rôle primordial dans les symptômes et la progression de l'arthrose. Une autre classification peut également être établie selon que les maladies soient d'origine auto-immune (arthrite rhumatoïde, lupus érythémateux, syndrome de Sjögren), microcristalline (goutte) ou non-inflammatoire (arthrose).

L'arthrose et l'arthrite rhumatoïde seront étudiées plus en détail ultérieurement. En effet, elles font intervenir plusieurs facteurs inflammatoires identiques bien que leur étiologie soit totalement différente. La résultante de l'action de ces divers facteurs est une large destruction du cartilage, ce qui affaiblit considérablement l'articulation. Ces deux pathologies diffèrent également de par les sites où l'homéostasie de l'articulation est modifiée.

2. Arthrose

L'arthrose (osteoarthritis, OA) est une maladie articulaire dégénérative se caractérisant par des lésions du cartilage articulaire mais également de l'os sous-chondral (formation d'excroissances osseuses extra-articulaires, appelées ostéophytes), de la membrane synoviale et des tissus conjonctifs environnants [Lorenz et Richter, 2006 ; Allen et coll., 2010].

La prévalence de l'OA, la forme la plus courante de l'arthrite, varie en fonction du site touché [Bijlsma et coll., 2011]. Une caractéristique de l'OA est qu'elle n'affecte en général qu'une seule ou peu d'articulations [Gerwin et coll., 2006]. Les sites les plus fréquemment atteints sont les mains, les hanches, la colonne vertébrale et les genoux [Goldring et Goldring, 2007 ; Bijlsma et coll., 2011]. L'OA devient plus courante avec l'âge et, à partir de 50 ans, est plus souvent diagnostiquée chez les femmes. L'OA montre une prévalence mondiale d'environ 60% chez les hommes et 70% chez les femmes après 65 ans. L'OA est retrouvée chez toutes les populations [Sarzi-Puttini et coll., 2005 ; Walker et Edwards, 2005 ; Symmons et coll., 2006a].

Vu la population vieillissante et l'accroissement continu des facteurs de risque tels que l'obésité et la sédentarité, il est à prévoir que les cas d'OA diagnostiqués augmentent d'année

en année [Gerwin et coll., 2006]. Le diagnostic de l'OA se base principalement sur des signes cliniques et radiologiques. Néanmoins, la moitié des patients présentant des signes radiologiques ne développent pas de symptômes ou, à l'inverse, montrent des symptômes sans pouvoir détecter de signes radiologiques [Zhang et coll., 2010a ; Bijlsma et coll., 2011].

L'OA présente une étiologie multifactorielle car elle peut être engendrée et favorisée par plusieurs paramètres systémiques tels que l'âge, le sexe et l'origine ethnique, ainsi que par des facteurs mécaniques tels que l'affaiblissement de l'articulation, la faiblesse musculaire, l'obésité, l'apparition de cristaux intra-articulaires, la densité osseuse et les neuropathies périphériques [Benito et coll., 2005 ; Goldring et Goldring, 2007]. L'OA est également la conséquence de nombreuses années de contraintes mécaniques imposées au cartilage articulaire [Vincenti et Brinckerhoff, 2002 ; Nestic et coll., 2006].

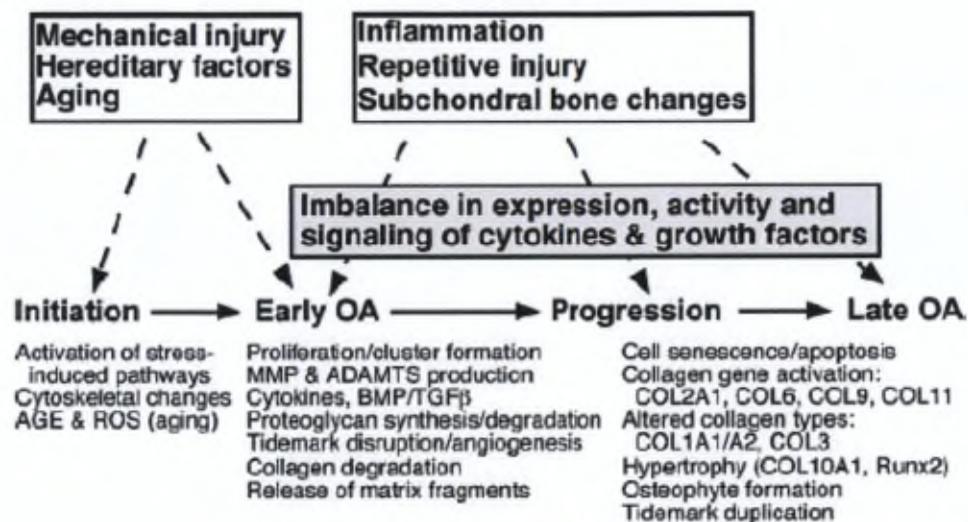


Figure 7 : Principaux facteurs impliqués dans l'apparition et la progression de l'arthrose [Goldring et Goldring, 2007]. Réparation initiale : prolifération de chondrocytes synthétisant l'ECM. Stade précoce : activité des protéases supérieure à celle des chondrocytes, menant à la destruction de l'ECM. Progression : nette diminution de la synthèse de l'ECM par les chondrocytes, accompagnée d'une large augmentation de sa destruction. Stade avancé : destruction (pratiquement) totale du cartilage articulaire [Walker et Edwards, 2005].

L'hérédité, les facteurs mécaniques et l'âge constituent les trois principaux facteurs favorisant la progression de cette pathologie (Figure 7). Les mécanismes impliqués dans son développement reposent soit sur une charge trop importante sur des chondrocytes normaux, soit sur une charge ordinaire sur des chondrocytes anormaux. Le premier mécanisme avancé est lié à l'âge tandis que le second est lié à des facteurs génétiques. L'âge reste néanmoins le premier facteur favorisant l'apparition de l'OA. En effet, les modifications de la composition

et de la structure du cartilage articulaire sont inévitables : il s'affaiblit, sa résistance à l'étirement diminue et l'ECM devient plus dense. Ces observations résultent de la diminution du PM et du contenu des polymères composant l'ECM. De plus, la capacité de régénération des chondrocytes diminue avec l'âge. Cependant, un cartilage âgé ne devient pas nécessairement un cartilage arthrosé [Nesic et coll., 2006 ; Goldring et Goldring, 2007].

Bien que l'OA soit rarement considérée comme inflammatoire en raison de l'absence de neutrophiles au niveau du liquide synovial (< 2000 leucocytes/mm³) et du fait qu'elle ne provoque pas d'inflammation systémique, cette pathologie présente localement tous les signes de l'inflammation (gonflement, douleur, raideur) et provoque également des troubles fonctionnels importants (raideurs, perte de mobilité) [Barron et Rubin, 2007 ; Zhang et coll., 2010a]. De plus, l'OA implique une inflammation de la membrane synoviale et la production de médiateurs pro-inflammatoires ; ces deux phénomènes contribuent largement à la dérégulation des chondrocytes articulaires, ainsi qu'à la dégradation de l'ECM [Goldring et Goldring, 2007 ; Hunter, 2011 ; Berenbaum, 2013 ; Lafeber et Van Spil, 2013].

La pathologie de l'OA s'accompagne principalement de douleurs localisées au niveau du site arthrosé ; le cartilage articulaire n'étant pas innervé, ces douleurs sont probablement provoquées par la lésion de tissus environnants [Barron et Rubin, 2007]. L'atteinte importante de l'os sous-chondral et la formation d'ostéophytes sont associées à ces épisodes douloureux. Lors de l'OA, le métabolisme de l'os sous-chondral est fortement modifié, conduisant à une augmentation de la densité osseuse, à une sclérose progressive de la matrice osseuse et à la formation d'ostéophytes, en raison de l'activité exacerbée des ostéoblastes. Ceux-ci participent activement à l'érosion du cartilage par la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires tels que l'IL6, la prostaglandine PGE2 et les métalloprotéases de matrice (MMP) [Ghosh et Cheras, 2001 ; Karsdal et coll., 2008 ; Kwan Tat et coll., 2010 ; Kapoor et coll., 2011]. De plus, les modifications encourues par l'os réduisent considérablement ses propriétés élastiques ainsi que sa capacité à absorber les chocs, ce qui contribue à la dégénérescence du cartilage [Castaneda et coll., 2012]. Les chondrocytes, en contrepartie, accentuent également ce phénomène de formation osseuse en libérant des facteurs impliqués dans le renouvellement de la matrice osseuse (facteurs de croissance de type TGF ou BMP) [Akesson, 2006 ; Fortier et coll., 2011].

Les chondrocytes jouent un rôle majeur dans la pathogenèse de l'OA, en raison du déséquilibre existant entre leurs activités cataboliques et anaboliques (Figure 8) [Chevalier, 2000 ; Goldring et Goldring, 2007 ; Alcaraz et coll., 2010].

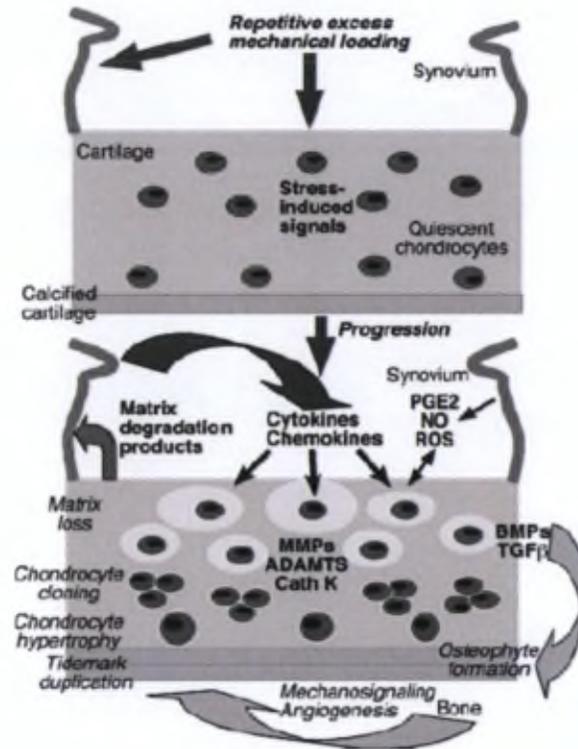


Figure 8 : Facteurs et modifications cellulaires impliqués dans la destruction du cartilage se produisant lors de l'OA. La destruction du cartilage est un phénomène prédominant de l'OA principalement médié par les chondrocytes. En effet, sous l'influence de charges mécaniques importantes et répétées, les chondrocytes libèrent des médiateurs pro-inflammatoires tels que des cytokines, des prostaglandines et autres facteurs dégradant l'ECM [Goldring et Goldring, 2007].

La sécrétion de facteurs de croissance (TGF, IGF, FGF) est largement reconnue dans la pathogenèse de l'OA comme ayant un effet anabolique sur les chondrocytes. Cependant, en réponse à une lésion traumatique, la synthèse de facteurs pro-inflammatoires (prostaglandines, oxyde nitrique, radicaux libres de l'oxygène, interleukine IL1 β , facteur de nécrose tumorale TNF α , métalloprotéases de matrice MMP) par les chondrocytes, synoviocytes et cellules mononucléées est accrue, ce qui augmente leur concentration dans le tissu articulaire et le liquide synovial. En contrepartie, la capacité des chondrocytes à régénérer l'ECM diminue. Les chondrocytes synthétisent également les enzymes responsables de la dégradation de l'ECM sous l'induction de l'IL1 β . D'autres interleukines sont également produites par stimulation de l'IL1 β , telles que l'IL6, l'IL8, l'IL17, l'IL18. L'IL1 β a donc un rôle central

fortement prépondérant dans le mécanisme inflammatoire de l'OA [Chevalier, 2007 ; Goldring et Goldring, 2007 ; Alcaraz et coll., 2010].

3. Arthrite rhumatoïde

L'arthrite rhumatoïde (AR), contrairement à l'OA d'origine principalement mécanique, est une maladie causée par un dysfonctionnement immunitaire et présentant une inflammation chronique [Vincenti et Brinckerhoff, 2002].

L'AR touche 0,5 à 1% de la population adulte mondiale avec un rapport femme/homme de 2/1. Bien qu'elle puisse s'initier à tout âge, l'AR se déclenche avec un risque accru entre 40 et 70 ans. La prévalence devient la plus élevée chez les femmes de plus de 50 ans, ce qui laisse penser que des facteurs hormonaux seraient impliqués dans sa physiopathologie [Symmons, 2002 ; Alamanos et Drosos, 2005 ; Walker et Edwards, 2005 ; Symmons et coll., 2006b ; Scott et coll., 2010 ; Tobon et coll., 2010 ; Longo et coll., 2013]. Bien que mondiale, la prévalence de l'AR est plus faible dans les pays en développement tels que l'Afrique rurale (0,1%) et plus élevée en Amérique du Nord et en Europe du Nord (3%) [Lee et Weinblatt, 2001 ; Walker et Edwards, 2005 ; Carmona et coll., 2010 ; Scott et coll., 2010]. Dans les pays développés, l'incidence de l'AR s'échelonne entre 5 et 50 nouveaux cas par an pour 100.000 adultes [Scott et coll., 2010].

Comme l'OA, l'AR est d'étiologie multifactorielle. Les causes sous-jacentes de cette pathologie restent toutefois encore peu comprises. A l'heure actuelle, les causes identifiées sont génétiques, hormonales et environnementales, ainsi qu'une implication possible de toxines, infections ou médicaments [Khurana et Berney, 2005 ; Walker et Edwards, 2005 ; Joseph et coll., 2010]. Dans 50% des cas, l'AR est déclenchée par des facteurs génétiques. Les gènes impliqués ne sont pas encore totalement identifiés mais il semblerait que plusieurs gènes soient en cause. La prévention de facteurs environnementaux responsables, tels que la cigarette (en fonction de la durée et de la consommation), permettrait de réduire le développement de cette maladie [Carmona et coll., 2010 ; Scott et coll., 2010].

L'AR touche uniquement les articulations synoviales. Les sites les plus fréquemment atteints sont les genoux, les épaules, les chevilles et les pieds, les hanches et la colonne vertébrale. Le début de la maladie est généralement discret et le patient éprouve des douleurs au niveau de l'articulation touchée et ressent un gonflement et des raideurs en début de journée. Ces symptômes s'aggravent au fil des semaines et l'inflammation progressive s'accompagne

d'une fatigue et d'un malaise généralisé ; s'instaure finalement une évolution par poussées et rémissions. Dans les stades plus avancés, l'inflammation engendre une destruction du cartilage articulaire provoquant des déformations menant à des troubles fonctionnels plus ou moins sévères. L'AR s'accompagne également souvent de complications extra-articulaires (ex. : nodules, vascularites, complications pulmonaires, rénales et cardiaques) [Walker et Edwards, 2005 ; Combe, 2009 ; Joseph et coll., 2010 ; Peters et coll., 2010].

La pathogenèse de la destruction du cartilage (Figure 9) comprend la déposition du complexe antigène-anticorps dans la membrane synoviale, l'infiltration de neutrophiles, l'angiogenèse, l'activation des cellules T et l'activation de macrophages provoquant la libération de médiateurs pro-inflammatoires. La membrane synoviale s'épaissit alors progressivement de façon à former le pannus, composé de cellules synoviales et envahissant le cartilage et l'os adjacents. Enfin, l'invasion importante du pannus conduit à une destruction massive et profonde du cartilage, de l'os sous-chondral et même des ligaments. La formation progressive d'un réseau sanguin à l'interface du cartilage et du pannus permet la migration de cellules inflammatoires [Lee et Weinblatt, 2001 ; Goldring et Goldring, 2006 ; Joseph et coll., 2010 ; McInnes et Schett, 2011 ; Shiozawa et coll., 2011]. Suite à l'action de certaines cytokines (IL1 β , TNF α , IL6 et IL17), le nombre et la différenciation des précurseurs des ostéoclastes sont accrus dans l'AR, conduisant à une résorption osseuse exacerbée. Les cellules T et les cellules constituant le pannus sécrètent en parallèle un activateur de la différenciation des ostéoclastes, le RANKL (receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand) [Le Goff et coll., 2013 ; Longo et coll., 2013]. L'érosion osseuse participe au maintien, voire à l'augmentation, du phénomène inflammatoire caractéristique de l'AR. En effet, les zones érodées de l'os forment progressivement des creux que les cellules synoviales du pannus peuvent combler, créant de cette façon des zones concentrées en médiateurs inflammatoires [McInnes et Schett, 2011].

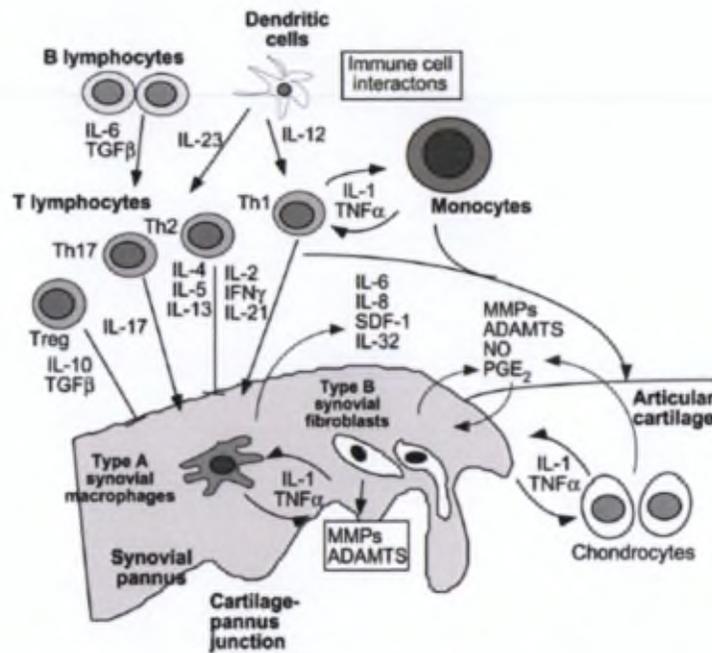


Figure 9 : Processus cellulaires impliqués dans la destruction du cartilage caractérisant l'arthrite rhumatoïde. Cette figure représente le pannus synovial invasif associé à la destruction du cartilage articulaire. Les cellules immunitaires de type lymphocytes B et T ainsi que les monocytes/macrophages interagissent pour sécréter des cytokines dans le liquide synovial. L'action de ces cytokines engendre la production de cytokines pro-inflammatoires par la membrane synoviale et les chondrocytes, conduisant enfin à la sécrétion de protéases dégradant l'ECM dans les régions environnant le pannus [adapté de Goldring et Marcu, 2009].

L'AR découle de plusieurs cascades inflammatoires, menant toutes à l'atteinte du cartilage et de l'os sous-chondral ainsi qu'à l'inflammation de la membrane synoviale [Scott et coll., 2010]. En raison de la surstimulation et de la surproduction de médiateurs inflammatoires (IL1, IL6, IL12, IL15, IL17, IL18, IL23 et TNF α), l'AR répond correctement aux traitements anti-inflammatoires et immunosuppresseifs [Joseph et coll., 2010] (voir *A.IV.1. Généralités et problématique des traitements*).

Le rôle des médiateurs pro-inflammatoires (ex. : cytokines, chimiokines, MMP) dans l'évolution de l'AR n'est pas encore clairement identifié mais ceux-ci participent au recrutement et à l'interaction avec les cellules immunitaires menant à la formation du pannus [Sweeney et Firestein, 2004 ; Khurana et Berney, 2005]. Plus précisément, la voie inflammatoire principale implique la surexpression et la surproduction de TNF, résultant de l'interaction de lymphocytes T et B et de macrophages (Figure 9). Ceci conduit à la production de cytokines pro-inflammatoires, provoquant la destruction du cartilage et l'instauration de l'inflammation chronique [Scott et coll., 2010]. De plus, le TNF α induit l'infiltration de leucocytes dans le compartiment synovial suite à l'expression de molécules

d'adhésion, stimule le phénomène d'angiogenèse et induit l'ostéoclastogenèse [Longo et coll., 2013]. Les cytokines retrouvées en concentration accrue dans le liquide synovial et au niveau de la membrane synoviale des patients atteints d'AR sont majoritairement le TNF α et l'IL1 β . D'autre part, des chimiokines (IL8) y sont également actives mais leur rôle dans l'activation et le recrutement des leucocytes reste méconnu [Lee et Weinblatt, 2001].

Les patients atteints d'AR présentent des auto-anticorps; il reste toutefois encore à déterminer si ceux-ci sont pathogènes. Chez 2/3 des patients, il est possible de détecter le facteur rhumatoïde (FR), un anticorps IgM polyclonal dirigé contre le fragment Fc de l'anticorps IgG. Le FR se lie aux complexes antigène-anticorps contenant une IgG et augmente de cette façon la réaction inflammatoire. Un autre anticorps détecté chez 60% des patients est l'anticorps dirigé contre les peptides cycliques citrullinés (CCP). Cet anticorps anti-CPP est un outil de diagnostic de l'AR plus spécifique et fiable que le FR. Il est surprenant de détecter ces deux anticorps de nombreuses années avant le début des symptômes cliniques, ceci signifiant que le processus d'évolution de la maladie commence bien avant l'apparition des signes cliniques. Le développement de cette pathologie est donc très insidieux [Joseph et coll., 2010].

Le diagnostic de l'AR se révèle dès lors compliqué vu que les premiers symptômes cliniques n'apparaissent pas dès l'initiation de la pathologie. Un diagnostic précoce est par conséquent souvent impossible. Il existe néanmoins des guidelines basées sur la détection des anticorps FR et anti-CPP [Joseph et coll., 2010 ; Smolen et coll., 2010]. Les examens radiographiques et autres tests inflammatoires non-spécifiques sont également utilisés en pratique.

En conclusion, une différence importante entre l'OA et l'AR se situe dans l'importance et la localisation de l'inflammation. En effet, l'OA est caractérisée par une inflammation limitée et localisée au niveau de l'articulation, et plus précisément au niveau du cartilage, composé de chondrocytes dont les fonctions sont modifiées. Le liquide synovial de patients atteints d'OA contient d'ailleurs peu de cellules inflammatoires (< 2 000 leucocytes/ μ l). L'AR est caractérisée par une inflammation importante et systémique, marquée par l'infiltration considérable de cellules de l'inflammation telles que les lymphocytes, associés à l'initiation de la pathologie, et les neutrophiles, associés à l'entretien du processus inflammatoire. Le nombre de cellules inflammatoires contenues dans le liquide synovial des patients atteints d'AR s'échelonne d'ailleurs entre 5 000 et 15 000/ μ l.

De plus, les concentrations en différentes cytokines (IL1, IL8, TNF, IL17, IL18 et autres) sont généralement largement supérieures dans le liquide synovial des patients souffrant d'AR par

rapport aux patients souffrant d'OA [Paquet et coll., 2012 ; Hampel et coll., 2013]. Il n'en reste pas moins que le liquide synovial et le plasma de patients atteints d'OA présentent des concentrations supérieures en cytokines par rapport à un patient sain [Berenbaum, 2013].

Les traitements par agents biologiques (voir *A.IV.1.4 Les agents biologiques*) n'ont montré une efficacité satisfaisante que dans l'AR, en raison de l'action prédominante du TNF α dans l'initiation et l'évolution du phénomène inflammatoire caractéristique de cette pathologie. Étant d'origine auto-immune et liée à une suractivation des lymphocytes T, l'AR répond correctement aux molécules biologiques inhibant (i) l'action du TNF α , (ii) l'activation des lymphocytes T ou (iii) les cellules présentatrices de l'antigène.

Le phénomène inflammatoire n'étant pas la cause sous-jacente de l'initiation de l'OA mais constituant plutôt un effet collatéral du comportement anormal des chondrocytes [Lafeber et Van Spil, 2013], ces agents biologiques ne sont pas actifs dans le traitement de l'OA. De plus, l'amplitude de l'inflammation est largement inférieure à celle observée dans l'AR, les cibles de ces traitements étant donc présentes en moindre quantité.

III. L'articulation en conditions inflammatoires/pathologiques

1. Généralités

En cas de pathologie articulaire, la destruction du cartilage s'accompagne d'une activation du processus inflammatoire marqué par la présence de nombreux médiateurs inflammatoires dans le liquide synovial, qu'ils soient sécrétés par les synoviocytes ou les chondrocytes [Jones et coll., 2008]. Le lent et constant renouvellement de l'ECM du cartilage assuré par les chondrocytes est perturbé, dans le sens où la destruction du collagène et des protéoglycanes de l'ECM devient plus rapide que leur synthèse [Martel-Pelletier et coll., 2008]. Les chondrocytes réagissent aux effets de lésions mécaniques, d'une instabilité articulaire liée à des facteurs génétiques mais également à des stimuli biologiques comme les cytokines et les facteurs de croissance. Dans la pathologie de l'OA, les chondrocytes réagissent aux signaux moléculaires en divers endroits du cartilage en fonction du stade de la maladie. Par contre, dans l'AR, la membrane synoviale est le site principal de sécrétion de cytokines et autres protéases dégradant l'ECM dans les régions entourant le pannus [Goldring et Marcu, 2009]. Ces pathologies s'accompagnent de taux élevés de MMP dans le liquide synovial. La dégradation et l'élimination des protéoglycanes est un phénomène précoce et réversible, suivi de la dégradation de collagène. Les triples hélices de collagène sont dégradées par l'action des collagénases (MMP). D'autres protéases, de type stromélysine (MMP3), peuvent également cliver le collagène en ses régions non-hélicoïdales. Ceci affaiblit les fibrilles de collagène et rend plus accessible les hélices pour leur clivage subséquent par les collagénases [Jones et coll., 2008]. Dans les stades précoces, une réduction du collagène de type II est constatée dans l'AR alors que les zones profondes du cartilage articulaire arthrosique réagissent en augmentant leur production de collagène de type II. Dans l'OA, la perte en protéoglycanes et le clivage du collagène s'opèrent particulièrement à la surface du cartilage articulaire alors que, dans l'AR, cela se produit à la jonction du pannus et du cartilage, ainsi que dans des zones plus profondes du cartilage [Goldring et Marcu, 2009].

Du point de vue fonctionnel, les pathologies telles que l'AR ou l'OA s'accompagnent d'une érosion du cartilage articulaire conduisant à la détérioration graduelle de l'articulation. L'apoptose des chondrocytes liée à ce phénomène empêche la réparation du cartilage [Lotz et coll., 1999]. De plus, la stimulation des chondrocytes par des facteurs de l'inflammation tels que l'IL1 ou le TNF entraîne la production de grandes quantités d'oxyde nitrique (NO), induisant leur apoptose [Lotz et coll., 1999]. Étant donné que le cartilage ne possède pas de cellules phagocytaires, les débris de chondrocytes morts demeurent au niveau de la matrice

cartilagineuse, altérant sa structure et les fonctions des chondrocytes vivants. De plus, vu la présence de l'ECM autour de chaque chondrocyte et l'absence de cellules souches mésenchymateuses dans le cartilage, la repopulation en chondrocytes a lieu lentement [Lotz et coll., 1999].

L'OA et l'AR s'accompagnent également d'une inflammation de la membrane synoviale, associée à une augmentation de sa vascularisation et de la présence de mastocytes [Lee et Weinblatt, 2001]. Les mastocytes, normalement présents au niveau des cellules sous-jacentes de la membrane synoviale, s'y trouvent sous forme activée dans des conditions pathologiques. Alors que l'expression de MMP par la membrane synoviale et leur concentration dans le liquide synovial sont déjà accrues, les mastocytes libèrent également des protéases qui participeront activement à la dégradation de l'ECM par activation des formes latentes des MMP [Jones et coll., 2008]. De plus, la perméabilité des vaisseaux constituant le réseau sanguin de la membrane synoviale est augmentée en conditions inflammatoires et pathologiques. Un afflux important de protéines et de liquide peut alors se produire à partir du plasma, se traduisant par l'apparition d'un épanchement synovial [Janeway et coll., 2003].

En conditions pathologiques, les caractéristiques et la composition du liquide synovial sont largement modifiées (Tableau 2). Tout d'abord, le volume du liquide synovial est augmenté suite à la dilatation des capillaires adjacents à l'articulation (jusqu'à 100 ml chez les patients atteints d'AR). Plus l'inflammation sera avancée, plus le volume du liquide synovial sera augmenté, plus il contiendra de cellules (exemples : leucocytes, érythrocytes) et plus sa viscosité sera diminuée. Chez les patients atteints d'AR, les concentrations en protéines dans le liquide synovial peuvent être triplées par rapport à la composition normale [Gerwin, 2006 ; Courtney et coll., 2009].

Tableau 2 : Comparaison des compositions du plasma en conditions normales et du liquide synovial en conditions normales et arthrosiques [Adapté de Gerwin et coll., 2006 ; Calop et coll., 2008 ; Perlemuter et Perlemuter, 2010].

Paramètre	Liquide synovial		Plasma
	Normal	Arthrose	Normal
<i>Paramètres physiques</i>			
Volume (ml/genou FS, ml/kg poids corporel P)	0,5 – 2	3,5	39 - 44
Viscosité (mPa s)	> 300	< 300	1,4
Osmolarité (mOsm/l)	≈ 296	Inchangé	295 - 310
pH	7,4	Inchangé	7,35 – 7,45
<i>Composants cellulaires</i>			
Erythrocytes (cellules*10 ⁹ /l)	< 2	Inchangé	4900 ^b
Leucocytes (cellules*10 ⁹ /l)	< 0,2	< 3	7 - 10 ^b
Monocytes/macrophages (% de leucocytes)	≈ 60	? ^a	3 - 8 ^b
Lymphocytes (% de leucocytes)	≈ 30	? ^a	25 - 40 ^b
Neutrophiles (% de leucocytes)	≈ 10 (<25)	< 25	52 - 68 ^b
<i>Paramètres biochimiques</i>			
Protéines totales (g/100ml)	1,0 – 3,0	1,5 – 3,5	6,5 – 8,0
Albumine (g/100ml)	0,8 – 1,3	Inchangé	3,5 – 4,5
Immunoglobulines (% de la conc. plasmatique)	≈ 50	Inchangé	100
α2-macroglobuline (mg/100ml)	31	? ^a	270
Acide hyaluronique (g/100ml)	0,35	< 0,22	4,2 * 10 ⁻⁶
Lubricine (g/100ml)	0,005	? ^a	? ^a
Glucose (mg/100ml)	66	Inchangé	91
Urée (g/l)	0,15 – 0,45	Inchangé	0,15 – 0,45
Lactate (mg/100ml)	9 – 16,2	< 37,8	9 – 16
Calcium (mg/100ml)	4,8 – 9,6	Inchangé	10
Chlorure (mM)	107,4	Inchangé	95 - 105
Sodium (mM)	145	Inchangé	135 - 145
Potassium (mM)	4,0	Inchangé	3,5 – 4,5
Fer (μM)	5,19	? ^a	9 - 30
Zinc (μM)	2,69	Inchangé	16 - 20
Cuivre (μM)	4,33	Inchangé	12 - 24

^a Pas de données disponibles - ^b Dans le sang

Enfin, une diminution de la concentration et du PM du HA est observée dans l'ECM et le liquide synovial. Ces variations peuvent s'expliquer par la dilution du HA résultant de l'augmentation du volume du liquide synovial, mais également par sa dégradation, une altération de sa synthèse suite à l'augmentation de HA synthèses produisant des HA plus courts avec une vitesse d'élongation plus lente, ou une combinaison de ces effets. En outre, une augmentation des ARNm des hyaluronidases est détectée au niveau de la membrane synoviale alors qu'une diminution des ARNm des HA synthèses est observée dans ces mêmes conditions [Bastow et coll., 2008]. La diminution de la viscosité du liquide synovial réduit l'efficacité de la lubrification et provoque l'apparition de frictions plus importantes, occasionnant des dommages cartilagineux [Bastow et coll., 2008]. La viscosupplémentation par injection de HA de haut PM permet donc de prévenir la douleur provoquée par l'inflammation des articulations [Kogan et coll., 2007].

2. Principaux facteurs inflammatoires impliqués

De nombreux facteurs anaboliques et cataboliques sont impliqués dans la modification de l'homéostasie et les phénomènes inflammatoires liés à l'OA ou à l'AR. Des médiateurs tels que les cytokines, les prostaglandines, les facteurs de croissance, les radicaux libres de l'oxygène, le NO et les MMP participent donc au phénomène de dégradation du cartilage [Holland et Mikos, 2003 ; Afonso et coll., 2007 ; Lee et coll., 2013]. La description de ces facteurs sera limitée à ceux analysés dans les études réalisées au cours de ce travail. Y figurent des cytokines (pro- et anti-inflammatoires), des facteurs de croissance et des MMP.

2.1 Cytokines

En réponse à un signal, certaines cellules de l'organisme libèrent les cytokines, de petites protéines d'environ 25 kDa. Celles-ci agissent en se liant à des récepteurs spécifiques de façon à induire une réponse. En fonction de leur demi-vie et de leur capacité à rejoindre le flux sanguin, les cytokines agissent de façon autocrine, paracrine ou endocrine [Janeway et coll., 2003].

Certaines cytokines, dites chimiokines, sont pourvues de chimiotactisme : elles sont capables d'induire la migration des cellules portant les récepteurs spécifiques leur correspondant vers leur source de production [Janeway et coll., 2003].

L'*interleukine 1 β* (IL1 β) est un monomère de 153 acides aminés [Janeway et coll., 2003]. Initialement synthétisée sous la forme d'un précurseur de 31 kDa, le pro-IL1 β , l'IL1 β est libérée sous sa forme active (17,5 kDa), notamment au niveau de la membrane synoviale, du liquide synovial et du cartilage [Martel-Pelletier et coll., 1999]. Sécrétée sous forme soluble, contrairement à l'IL1 α , protéine membranaire, l'IL1 β a un domaine d'action beaucoup plus étendu [Holland et Mikos, 2003]. Elle est produite par de nombreuses cellules telles que les macrophages, les monocytes et les cellules sous-jacentes de la membrane synoviale. Elle induit de multiples effets cataboliques en stimulant les cellules synoviales, les cellules endothéliales, les lymphocytes et les macrophages, qui sécrètent alors différents facteurs inflammatoires (IL1, IL6, IL8, TNF α et COX-2). Ces facteurs provoquent une infiltration de cellules inflammatoires au niveau du site d'inflammation, une augmentation de la perméabilité des vaisseaux et de la fièvre.

L'IL1 provoque la croissance des cellules synoviales et les active, ainsi que les ostéoclastes, à produire des MMP qui causeront l'érosion du cartilage [Iwakura, 2002 ; Janeway et coll., 2003]. Elle peut également directement inhiber la synthèse de constituants de l'ECM et stimuler la sécrétion de prostaglandines. La combinaison de ces multiples actions résulte en une dégradation majeure des tissus articulaires [Martel-Pelletier et coll., 1999 ; Martel-Pelletier et coll., 2008]. Il existe cependant des mécanismes régulant l'activation de cette cytokine afin d'éviter la dégradation massive de tissus. Un mécanisme physiologique prépondérant repose sur l'antagoniste du récepteur de l'IL1, l'IL1-Ra [Martel-Pelletier et coll., 2008].

Le *facteur de nécrose tumorale α* , tumor necrosis factor (TNF α), est un trimère de 157 acides aminés. Le TNF α est synthétisé sous forme de précurseur dont l'extrémité inactive est clivée avant la sécrétion. Cette protéine de 17 kDa produite par les macrophages, les cellules NK et les cellules T provoque une inflammation locale et une activation endothéliale [Martel-Pelletier et coll., 1999 ; Holland et Mikos, 2003 ; Janeway et coll., 2003]. Non exprimé dans le cartilage articulaire sain, le TNF α intervient dans la réponse inflammatoire des stades sévères de l'OA [Holland et Mikos, 2003 ; Martel-Pelletier et coll., 2008]. Moins actif que l'IL1 β , le TNF α partage certaines de ses actions telles que l'inhibition de la synthèse des protéoglycanes et la stimulation de la dégradation de l'ECM via la dégradation du collagène et la production de MMP [Holland et Mikos, 2003].

L'*interleukine 6* (IL6) est un monomère de 184 acides aminés produit par les cellules T, les macrophages et les cellules endothéliales. L'IL6 induit la croissance et la différenciation des

cellules B et T et la production de protéines inflammatoires [Janeway et coll., 2003]. Elle agit à la fois en favorisant les réactions auto-immunes, en amplifiant l'inflammation aiguë et en facilitant l'évolution d'un état aigu à un état chronique. L'IL6 intervient considérablement dans le processus de développement de l'OA (i) en accroissant le nombre de cellules inflammatoires dans le tissu synovial, (ii) en favorisant la prolifération des chondrocytes et (iii) en exacerbant les effets de l'IL1 sur la production de MMP et l'inhibition de la synthèse de protéoglycanes. En revanche, l'IL6 favorise la sécrétion d'inhibiteurs tissulaires de MMP (TIMP), ce qui contrebalance l'effet de la dégradation du cartilage [Martel-Pelletier et coll., 1999]. Dans des conditions normales, les chondrocytes ne produisent que de faibles quantités d'IL6 alors qu'en cas d'OA, certains facteurs tels que l'IL1 β ou le TNF α stimulent largement sa production [Fonseca et coll., 2009 ; Kapoor et coll., 2011].

L'*interleukine 10* (IL10), ou inhibiteur de la synthèse des cytokines, est un homodimère de 37 kDa, composé de 160 acides aminés. Elle est sécrétée par les cellules T et les macrophages. L'IL10 se révèle être un puissant inhibiteur des fonctions des macrophages et donc de l'immunité innée et acquise [Janeway et coll., 2003 ; Heo et coll., 2010]. L'IL10 régule l'homéostasie du cartilage articulaire et exerce donc un effet protecteur du cartilage et de l'os sous-chondral en cas d'inflammation. Cette cytokine anti-inflammatoire est présente en concentration importante dans le tissu articulaire des patients atteints d'arthrose, où elle inhibe les effets de l'IL1 β , du TNF α et des MMP. Pour appuyer cet effet, l'IL10 augmente la sécrétion des TIMP ainsi que de l'IL1-Ra [Schulze-Tanzil et coll., 2009 ; Kapoor et coll., 2011].

L'*interleukine 8* (IL8) est une chimiokine attirant les neutrophiles, les basophiles et les cellules T [Janeway et coll., 2003]. Elle est synthétisée par les monocytes et macrophages, les chondrocytes et les fibroblastes. L'IL8 joue un rôle important dans l'inflammation aiguë. Elle se trouve en concentration élevée dans le liquide synovial de patients atteints d'OA ou d'AR [Mukaida et coll., 1998 ; Martel-Pelletier et coll., 1999].

2.2 Facteurs de croissance

Les facteurs de croissance sont des polypeptides impliqués dans la prolifération et la différenciation cellulaire ainsi que dans le processus de cicatrisation [Holland et Mikos, 2003 ; Fortier et coll., 2011]. En entretenant l'homéostasie du cartilage et en stimulant sa réparation, ces facteurs participent au maintien d'une surface articulaire fonctionnelle durable. En effet, ils sont nécessaires à la synthèse et au renouvellement de l'ECM, protégeant

l'articulation de dégâts occasionnés par des mouvements répétés, une blessure ou de l'inflammation. Dans un cartilage articulaire adulte sain, la concentration des facteurs de croissance est basse [Martel-Pelletier et coll., 2008].

Le *facteur de croissance transformant β* , transforming growth factor (TGF β), est un homo- ou hétérodimère de 112 acides aminés. Cette protéine de 25 kDa composée de deux polypeptides reliés par des ponts disulfures est d'abord synthétisée et sécrétée comme précurseur de 100 kDa, avant d'être dissociée d'une sous-unité de 75 kDa inactive afin de pouvoir se lier à son récepteur [Holland et Mikos, 2003 ; Janeway et coll., 2003 ; Gaissmaier et coll., 2008].

Le TGF β 1 est produit par les chondrocytes, les monocytes et les cellules T. Ce facteur de croissance multifonctionnel inhibe la prolifération cellulaire, exerce une action anti-inflammatoire et régule la synthèse de l'ECM [Janeway et coll., 2003 ; Martel-Pelletier et coll., 2008 ; Plaas et coll., 2011]. Bien que le TGF β 1 soit majoritairement stocké sous forme latente dans le cartilage articulaire adulte normal, une faible proportion s'y trouve sous forme active. Le cartilage arthrosique contient des quantités plus élevées de TGF β 1. En plus d'activer la synthèse de l'ECM, ce facteur agit également en court-circuitant l'action de destruction de l'ECM induite par l'IL1 β [Mueller et Tuan, 2011].

L'effet protecteur du TGF β peut être contradictoire quant à ses actions sur les protéases. En inhibant les MMP1 et MMP9, le TGF β apparaît comme protecteur vis-à-vis de la destruction de l'ECM. En revanche, le TGF β induit également la sécrétion de MMP13 et d'agrécane par les chondrocytes, deux protéases qui, bien qu'impliquées dans le renouvellement de la matrice dans des conditions normales, provoquent sa destruction dans des conditions arthrosiques [Martel-Pelletier et coll., 2008]. Enfin, il apparaît que l'effet protecteur de ce facteur sur les tissus articulaires diminue avec l'âge [Mueller et Tuan, 2011].

La *protéine morphogénique osseuse 2*, bone morphogenic protein 2 (BMP2), fait partie de la famille des TGF β . Les BMP induisent la formation osseuse et cartilagineuse, la synthèse de l'ECM et la croissance des chondrocytes. Tout comme le TGF β , les BMP sont présentes en faibles quantités dans le cartilage articulaire adulte sain. On y retrouve plusieurs types de BMP (BMP2, BMP4, BMP6, BMP7, BMP9 et BMP13) ayant un rôle dans le maintien de l'intégrité articulaire et dans sa réparation/renouvellement. Elles y agissent en augmentant la synthèse de collagène de type II et d'agrécane. Néanmoins, seule la BMP2 a été étudiée car, bien que présente en faible quantité dans un cartilage sain, il s'agit du seul facteur de croissance de type BMP retrouvé avec certitude en concentration plus élevée dans un cartilage arthrosique. L'effet stimulant de la BMP2 sur la synthèse de protéoglycanes est supprimé en

présence d'IL1 [Martel-Pelletier et coll., 2008 ; Fortier et coll., 2011 ; Mueller et Tuan, 2011]. Des études comparatives démontrent en effet que les BMP ne seraient pas aussi puissantes que le TGF β 1 pour ce qui est de la synthèse des protéoglycanes et de court-circuiter les effets de l'IL1 [Holland et Mikos, 2003].

2.3 Métalloprotéases de matrice

Les métalloprotéases de matrice (MMP) ou matrixines constituent une vaste famille d'endopeptidases métal-dépendantes caractérisées par des séquences de protéines homologues comportant des domaines conservés et des domaines spécifiques à leur substrat. Les MMP sont des enzymes protéolytiques participant à la dégradation de composants de l'ECM et des membranes basales des cellules [Amalinei et coll., 2010]. Les MMP interviennent dans plusieurs mécanismes cellulaires essentiels tels que la prolifération cellulaire, la migration et l'adhésion mais également dans des processus de remodelage tissulaire comme l'angiogenèse, le développement osseux ou la guérison de plaies [Fanjul-Fernandez et coll., 2010]. Les modifications de l'ECM adviennent donc tant en conditions physiologiques que pathologiques (inflammation, arthrite, cancer) [Murphy et Nagase, 2008].

Plusieurs familles de MMP peuvent être distinguées en fonction de leurs substrats spécifiques. Les MMP d'une même famille comportent des similarités structurales et fonctionnelles. Il existe principalement les collagénases, les gélatinases, les matrilysines et les stromélysines [Zitka et coll., 2010].

La structure des MMP se décrit sur une base de cinq domaines, certains étant ajoutés, d'autres supprimés en fonction de la protéase. Le premier domaine est un peptide signal de 17 à 29 résidus hydrophobes qui adresse la protéine à un compartiment spécifique (sécrétion ou insertion dans la membrane cellulaire). Un propeptide comportant 77 à 87 résidus constitue le second domaine. Se trouve ensuite le domaine catalytique proprement-dit, contenant 170 acides aminés et un site de liaison comportant du zinc. Le site catalytique contient en outre une méthionine avec laquelle le zinc forme une liaison (methionine loop) et trois atomes de calcium servent à la stabiliser. Une région de 5 à 50 résidus riche en proline forme ensuite la transition entre le domaine catalytique et la région C-terminale d'environ 200 résidus de type hémopexine-like ou vitronectine-like (domaine hémopexine). Ce dernier domaine semble jouer un rôle dans la détermination des spécificités de substrats [Birkedal-Hansen et coll., 1993 ; Zitka et coll., 2010]. Les deux noyaux Zn²⁺ constituent le site actif tout en agissant

dans le maintien de la forme latente des MMP suite à leur liaison avec les résidus CYS du propeptide [Zitka et coll., 2010].

Les MMP sont généralement sécrétées dans l'espace extracellulaire sous forme inactive dite proMMP ou zymogène. Par la déstabilisation du lien CYS-Zn, le clivage du propeptide entraîne l'activation de la MMP [Murphy et Nagase, 2011]. Certaines MMP sont toutefois activées au niveau intracellulaire et sécrétées dans l'ECM sous forme activée [Vincenti et Brinckerhoff, 2002].

L'expression et l'activité des MMP sont régulées à divers niveaux comme la transcription des gènes, l'activation de la forme zymogène et par des inhibiteurs endogènes (TIMP) [Chakraborti et coll., 2003 ; Fanjul-Fernandez et coll., 2010]. L'expression des gènes des MMP ne s'opère que lorsque le tissu est remodelé, en conditions physiologiques ou pathologiques [Zitka et coll., 2010]. Les processus de dégradation accomplis par les MMP peuvent être déclenchés/supprimés par certaines interleukines ou facteurs de croissance mais également par des facteurs physiques (modification de la forme de la cellule) [Birkedal-Hansen et coll., 1993].

La *métalloprotéase de matrice de type 1* (MMP1, collagénase-1) fait partie de la famille des collagénases. Les collagénases clivent principalement les collagènes de type I, II et III qui présentent un site sensible à leur action. À pH neutre, ces protéases clivent uniquement les hélices α de la triple hélice de collagène en deux endroits spécifiques, c'est-à-dire au niveau des liens GLY-LEU ou GLY-ILE [Birkedal-Hansen et coll., 1993 ; Arakaki et coll., 2009 ; Zitka et coll., 2010]. Ceci dénature les fibrilles de collagène en dérivés de gélatine non-hélicoïdaux, dès lors susceptibles de subir une dégradation supplémentaire par la collagénase ou par d'autres MMP [Billinghurst et coll., 1997 ; Vincenti et Brinckerhoff, 2002].

Suite à la stimulation par des cytokines ou des facteurs de croissance, la MMP1 est produite et sécrétée par des fibroblastes de différents tissus (peau, membrane synoviale, cornée, etc.), des kératinocytes, des cellules endothéliales, des monocytes et macrophages, des chondrocytes et des ostéoblastes [Birkedal-Hansen et coll., 1993]. En conditions normales, la MMP1 se trouve à des concentrations extrêmement basses dans les tissus en raison de sa faible expression constitutive [Arakaki et coll., 2009]. Comme elle n'est pas stockée, à l'inverse de certaines MMP, un délai de 6 à 12 heures est nécessaire avant de pouvoir la détecter. De plus, son activité protéolytique est étroitement contrôlée par les TIMP ou par certains activateurs [Pardo et Selman, 2005].

La MMP1, fortement exprimée et sécrétée dans des pathologies telles que l'AR et l'OA, est impliquée dans la destruction de l'ECM en raison de la présence importante de collagène et protéoglycanes au niveau du cartilage. La MMP1 se détecte majoritairement dans les zones superficielles du cartilage et serait impliquée dans la phase inflammatoire [Martel-Pelletier et coll., 2008].

IV. Les traitements des pathologies articulaires

1. Généralités et problématique des traitements

Le traitement de pathologies telles que l'OA et l'AR comprend plusieurs niveaux. En effet, celui-ci doit agir d'une part sur les effets directs des pathologies, c'est-à-dire l'inflammation et la dégradation du cartilage, mais il doit également agir sur les symptômes réduisant fortement la qualité de vie du patient tels que la douleur et la perte de mobilité [Hochberg et coll., 2012]. Les recommandations actuelles émises par l'EULAR (European League Against Rheumatism), l'OARSI (Osteoarthritis Research Society International), l'ACR (American College of Rheumatology) et NICE (National Institute for Health and Care Excellence) favorisent la combinaison des traitements pharmacologiques et non-pharmacologiques (Figure 10 et Figure 11) [Smolen et coll., 2010 ; Kraus et coll., 2011 ; Sites Internet EULAR, OARSI et ACR].

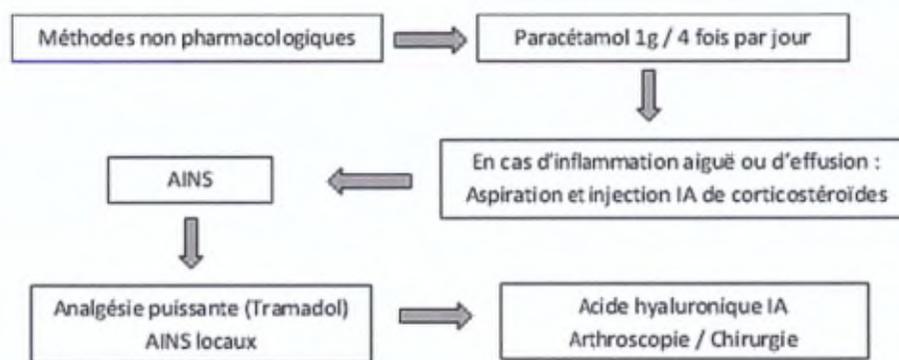


Figure 10 : Schéma thérapeutique habituel de l'arthrose [adapté de Walker et Edwards, 2005].

S'agissant d'une pathologie dégénérative, les traitements de l'OA ont pour but principal de limiter la dégénérescence de l'articulation et la dégradation du cartilage, tout en réduisant la douleur et l'incapacité du patient à se déplacer en raison des raideurs et perte de mobilité [Walker et Edwards, 2005, Zhang et coll., 2008a ; Zhang et coll., 2010b ; Madry et coll., 2011]. Les traitements de l'AR visent notamment à enrayer l'inflammation, à prévenir la destruction graduelle de l'articulation, à soulager la douleur du patient et à améliorer/maintenir sa qualité de vie [Walker et Edwards, 2005].

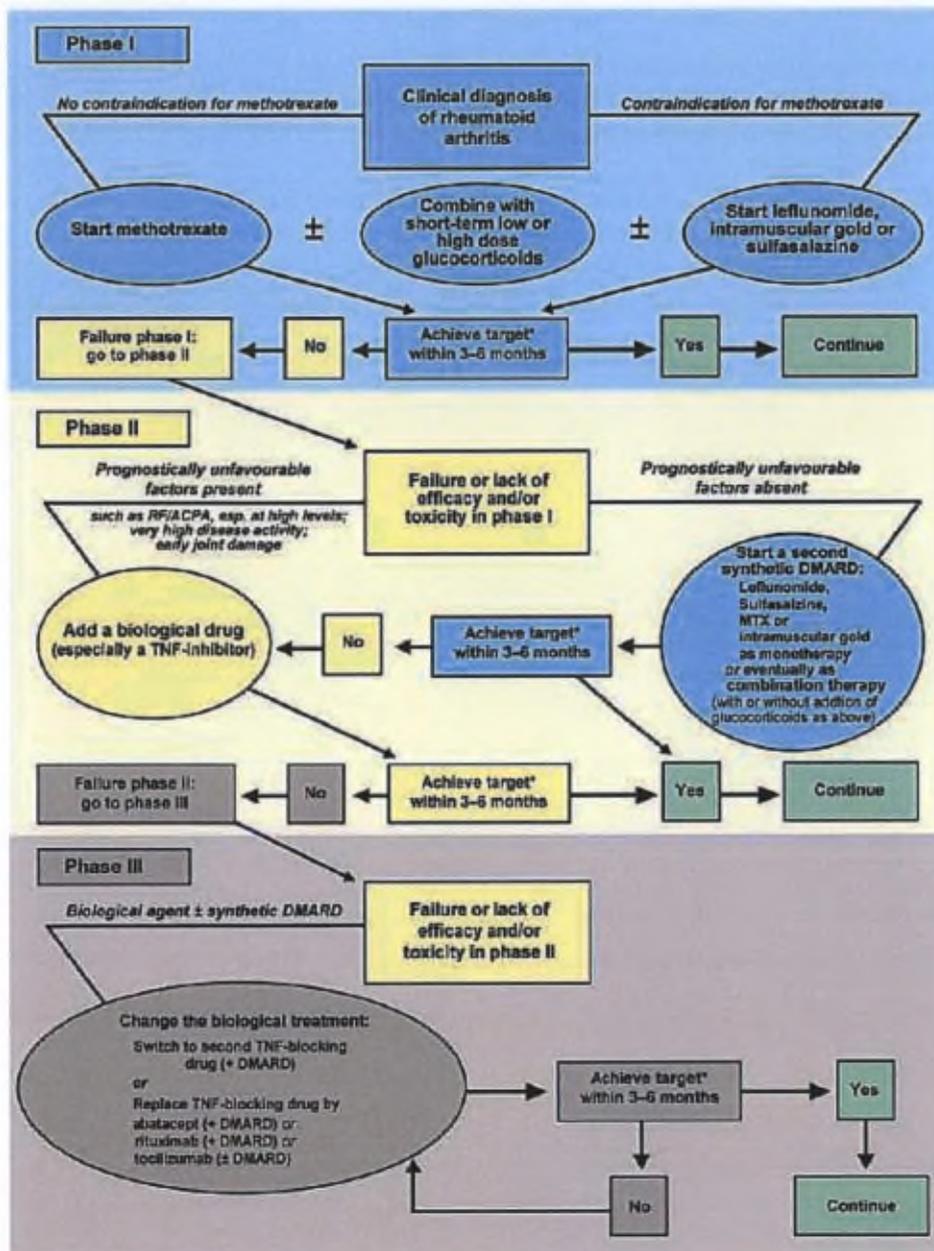


Figure 11 : Schéma thérapeutique habituel de l'arthrite rhumatoïde, issu des recommandations établies par l'EULAR [Smolen et coll., 2010].

Bien souvent, les traitements actuels doivent combiner plusieurs médicaments afin de couvrir l'ensemble des effets poursuivis. De cette façon, il n'est pas rare que les patients doivent associer un analgésique ou un anti-inflammatoire non-stéroïdien (AINS) pour le traitement de la douleur, avec un glucocorticoïde et/ou un DMARD (disease-modifying anti-rheumatic drugs, médicament susceptible de modifier l'évolution de la maladie) pour le traitement de l'inflammation et de la dégradation de l'articulation. Le HA, administré par voie intra-articulaire (IA), est parfois associé afin d'améliorer la mobilité de l'articulation (voir de IV.1.1 Analgésiques à IV.1.7 Traitements non-médicamenteux). La toxicité et la haute fréquence

d'administration de ces traitements les rend impossibles à utiliser à long terme. En effet, les médicaments administrés par IA sont rapidement éliminés de la cavité articulaire, nécessitant une administration fréquente. Enfin, les traitements actuels permettent généralement uniquement de soulager le patient de ses symptômes et d'améliorer sa qualité de vie mais n'agissent que trop peu sur l'évolution de la maladie. Une simplification de ces traitements serait donc appréciable et même nécessaire, tant pour la compliance du patient que pour les praticiens.

Les traitements actuels sont passés en revue afin de comprendre la stratégie thérapeutique des rhumatologues, ainsi que les principaux avantages et inconvénients de ces traitements et formes d'administration.

1.1 Analgésiques

Le paracétamol est généralement utilisé chez les patients présentant de l'OA. Néanmoins, lors d'une utilisation fréquente, ce médicament peut engendrer de l'hépatotoxicité et des dommages rénaux [Sarzi-Puttini et coll., 2005].

1.2 Les anti-inflammatoires non-stéroïdiens

Les anti-inflammatoires non-stéroïdiens (AINS) sont largement utilisés dans le traitement de l'OA dans le but de réduire la douleur mais également l'inflammation. Le celecoxib (*Celebrex*[®]) et l'étoricoxib (*Arcoxia*[®]) présentent des effets secondaires gastro-intestinaux, rénaux, cardiaques et allergiques non-négligeables. Ces molécules sont néanmoins toujours fréquemment utilisées chez les patients souffrant d'OA [Sarzi-Puttini et coll., 2005 ; CBIP Folia Pharmaceutica, 2001]. De plus, l'administration topique d'AINS permet d'obtenir un certain soulagement de la douleur et de l'inflammation, sans être associée aux nombreux effets secondaires des AINS oraux [Zhang et coll., 2010b].

Les AINS sont des traitements régulièrement utilisés en combinaison avec les autres traitements afin de diminuer les douleurs et l'inflammation liées à l'AR. Vu qu'ils favorisent les risques cardio-vasculaires, les AINS doivent être utilisés parcimonieusement et avec attention en raison des maladies cardio-vasculaires déjà associées à l'AR [Sarzi-Puttini et coll., 2005].

1.3 Les glucocorticoïdes

Les phases aiguës de douleur causées par l'OA peuvent être traitées par des injections IA de glucocorticostéroïdes. Ces injections sont bénéfiques pour les patients présentant une inflammation importante et un épanchement du liquide synovial [Sarzi-Puttini et coll., 2005].

Le traitement des symptômes de l'AR comprend également l'administration orale de certains glucocorticoïdes en faible dose (ex. : prednisone, dose ≤ 10 mg) [Joseph et coll., 2010]. Ils sont généralement utilisés en combinaison avec les DMARD, ou lors de l'initiation de la thérapie aux DMARD (voir *IV.1.5 Les médicaments susceptibles de modifier l'évolution de la maladie*). Il faut cependant veiller à utiliser les plus faibles doses efficaces. Si la maladie est fortement active, les doses peuvent être augmentées ponctuellement mais en règle générale, les patients prennent les glucocorticoïdes de façon chronique et en faible dose. Des injections IA de glucocorticoïdes peuvent être envisagées pour agir localement. Enfin, des traitements plus importants par intraveineuse sont également possibles durant un ou plusieurs jours pour traiter certaines complications de l'AR ou pour provoquer la rémission d'une phase active [Spies et coll., 2010]. Ces traitements sont donc choisis pour améliorer la qualité de vie de patients dont les activités sont fortement entravées par la maladie et également dans la période pendant laquelle les DMARD à durée d'action lente ne sont pas encore efficaces [Joseph et coll., 2010]. Néanmoins, le rapport bénéfices/risques des glucocorticoïdes reste défavorable car ceux-ci traitent l'inflammation dans les phases aiguës mais causent de nombreux effets secondaires sur le long terme [Scott et coll., 2010].

En cas d'administration orale prolongée et/ou de hautes doses de glucocorticostéroïdes, l'observation d'effets indésirables tels que des effets cardiovasculaires, des infections, des problèmes gastro-intestinaux, endocriniens, métaboliques, dermatologiques, musculo-squelettiques ou ophtalmiques est à prévoir [Spies et coll., 2010]. L'administration prolongée en IA de corticostéroïdes entraîne également une dégénérescence du cartilage articulaire, une atrophie de la peau, un risque accru d'infections et une ostéonécrose [Gossec et Dougados, 2006 ; Aly, 2008].

1.4 Les agents biologiques

Des agents liant spécifiquement le TNF α et diminuant sa biodisponibilité sont aujourd'hui couramment utilisés dans le traitement de l'AR. Cette classe comprend la protéine de fusion (etanercept), les anticorps monoclonaux (infliximab, adalimumab et golimumab) et la protéine

de fusion pégylée se liant au récepteur au TNF α (certolizumab pegol). Il existe également un antagoniste au récepteur de l'IL1 (anakinra, non commercialisé en Belgique) et un anticorps monoclonal au récepteur de l'IL6 (tocilizumab) [Lee et Weinblatt, 2001 ; Joseph et coll., 2010 ; CBIP, 2013]. D'autres traitements font également partie des recommandations pour la prise en charge de l'AR, tels qu'un anticorps monoclonal anti-lymphocytes B (rituximab) et une protéine de fusion agissant sur les cellules présentatrices de l'antigène (abatacept) [Nogid et Pham, 2006 ; Kaine, 2007 ; Caporali et coll., 2009 ; Isvy et coll., 2012].

Les anti-TNF peuvent provoquer des infections liées à l'injection et sont associés à un risque accru de développer la tuberculose [Scott et coll., 2010]. D'autres effets indésirables des anti-TNF sont des infections mineures des voies respiratoires supérieures, des céphalées et vertiges et des troubles gastro-intestinaux [Seymour et coll., 2000].

Les principaux inconvénients de ces anti-TNF, bien qu'ils constituent une voie novatrice dans la stratégie thérapeutique de l'AR, sont que leur efficacité et leur innocuité à long terme demeurent encore peu connues et doivent être investiguées. De plus, ces biomolécules sont extrêmement coûteuses et sont donc pour l'instant réservées aux formes les plus sévères et avancées d'AR. Les patients qui peuvent bénéficier de ces immunosuppresseurs sont ceux ayant déjà subi au moins deux échecs avec des DMARD, dont le méthotrexate [Seymour et coll., 2000].

1.5 Les médicaments susceptibles de modifier l'évolution de la maladie

Délivrés aux patients atteints d'AR, les « disease-modifying anti-rheumatic drugs » (DMARD) agissent en diminuant l'activité de cellules cibles (ex. : lymphocytes) ou directement en ciblant les voies des cytokines, ce qui réduit l'inflammation contrôlée par le système immunitaire [Joseph et coll., 2010]. Ils permettraient donc de soulager les patients de leurs symptômes inflammatoires et de ralentir la destruction de l'articulation touchée [Lee et Weinblatt, 2001]. Les DMARD fréquemment utilisés reprennent des médicaments de classes différentes tels que le méthotrexate à faible dose, le léflunomide, la sulfasalazine, l'hydroxychloroquine, l'azathioprine, la ciclosporine et le cyclophosphamide. Traitement initial de l'AR, les sels d'or, tels que l'aurothiopropanol sulfonate sodique et l'auranofine, ne sont actuellement plus utilisés sur le marché belge en raison de leurs nombreux effets indésirables (protéinurie, affections cutanées et hématologiques). L'utilisation appropriée de DMARD dans l'AR doit débuter dans les 3 mois après diagnostic de la maladie. De façon à améliorer l'efficacité du traitement de patients dont le médicament seul ne suffit plus à

contrôler la maladie, une combinaison des DMARD (et autres classes de médicaments) est envisageable. Un suivi de la progression de l'AR et de la toxicité médicamenteuse reste nécessaire [Joseph et coll., 2010 ; CBIP, 2013].

En dépit de leur utilisation fréquente, les DMARD ne se révèlent souvent que partiellement efficaces. En effet, les études cliniques démontrent que ces traitements diminuent bien les marqueurs inflammatoires de l'AR et le gonflement de l'articulation, mais sa destruction continue à progresser chez la majorité des patients. Ils ne peuvent être utilisés dans des thérapies à long terme, ce que requiert pourtant une maladie chronique telle que l'AR. Les facteurs limitant leur utilisation à long terme sont variés mais les plus courants restent leur faible tolérance, leur début d'action retardé, leur efficacité relativement faible, leurs effets secondaires importants et le monitoring essentiel du patient. Ces paramètres diminuent considérablement la compliance du patient sur une longue période [Lee et Weinblatt, 2001]. Concernant les effets secondaires de ces molécules, il a été montré dans des études comparatives que le léflunomide provoque entre autres des nausées et diarrhées, une élévation de la tension artérielle et des enzymes hépatiques, des troubles hématologiques [Site Internet CBIP, 2012].

1.6 L'acide hyaluronique

Le HA, principal composant du cartilage articulaire et du liquide synovial, est régulièrement utilisé pour la viscosupplémentation dans le traitement de l'OA. Ces injections IA visent à modifier le comportement du liquide synovial. En effet, en conditions d'OA, le liquide synovial perd de ses propriétés lubrifiantes et de sa capacité d'absorption des chocs qu'il confère normalement à l'articulation en raison de la réduction du PM et de la concentration du HA le composant. Dès lors, injecter du HA dans l'articulation permet de stimuler la synthèse de HA endogène, d'augmenter la viscoélasticité du liquide synovial, d'inhiber certains médiateurs pro-inflammatoires, de réduire la dégradation du cartilage et de favoriser la synthèse de l'ECM [Volpi et coll., 2009 ; Gigante et Callegari, 2011]. Comparé à un placebo, le HA réduit la douleur et améliore la fonction articulaire [Sarzi-Puttini et coll., 2005 ; Madry et coll., 2011]. Il faut également savoir que les injections de HA montrent une durée d'action plus longue que le temps de résidence de celui-ci dans l'articulation, appuyant l'hypothèse qu'il favorise la synthèse de HA endogène. De plus, l'action de ces injections est également plus longue que celle des glucocorticoïdes, bien que leur début d'action soit retardé [Volpi et coll., 2009]. Les effets biologiques du HA injecté dépendent toutefois de son PM et de sa

concentration. Les études restent encore contradictoires du point de vue de l'impact du PM du HA sur son activité. D'une part, le HA agirait au niveau de récepteurs membranaires (cluster déterminant CD44, receptor for hyaluronate-mediated motility RHAMM) présents sur les chondrocytes, les synoviocytes et les cellules inflammatoires associées à l'OA et induirait de cette façon une série de réactions intracellulaires modifiant la sécrétion des médiateurs inflammatoires ainsi que la synthèse de HA endogène par les synoviocytes de type B. Le PM du HA déterminerait les effets pro- ou anti-inflammatoires en fonction de l'inhibition ou de la stimulation de certains médiateurs (cytokines, prostaglandines). D'autre part, le HA possède aussi une action mécanique de par ses effets lubrifiants et viscosifiants [Hochberg, 2000 ; Ghosh et Guidolin, 2002 ; Sarzi-Puttini et coll., 2005 ; Campo et coll., 2010 ; Madry et coll., 2011].

1.7 Les traitements non-médicamenteux

Il existe également plusieurs stratégies non-médicamenteuses pouvant améliorer la qualité de vie des patients ou également traiter en partie leur pathologie. Évidemment, ces traitements ne sont généralement que des possibilités à associer aux médicaments et ils ne montrent souvent que peu d'efficacité. Ils n'en restent pas moins indispensables.

Ces interventions non-pharmacologiques comprennent entre autres la chirurgie réparatrice et la pose éventuelle de prothèses, l'exercice, la perte de poids, la kinésithérapie et l'ergothérapie. L'éducation du patient sur l'évolution de sa maladie, l'utilisation précise de ses médicaments et autres conseils diététiques et de prévention articulaire participe également au contrôle de la pathologie [Sarzi-Puttini et coll., 2005 ; Joseph et coll., 2010 ; Madry et coll., 2011].

1.8 Récapitulatif des traitements actuellement administrés

Le Tableau 3 reprend les types de traitements et les spécialités principales administrées lors de la prise en charge des patients souffrant d'OA ou d'AR.

Tableau 3 : Options thérapeutiques actuellement envisagées lors de la prise en charge de l'arthrose (OA) ou de l'arthrite rhumatoïde (AR). Les spécialités belges, la voie d'administration et la posologie sont répertoriées. IV = intraveineux, IM = intramusculaire, SC = sous-cutané, IA = intra-articulaire [Calop et coll., 2008 ; Perlemuter et Perlemuter, 2010 ; CBIP, 2013].

Effet thérapeutique	Molécule	Spécialités	Voie d'administration	Posologie usuelle
Analgésiques	Paracétamol	Dafalgan [®] , Dolprone [®] , Panadol [®] , etc.	Orale	4*500 mg à 1 g/j
			Parentérale	4*1 g/j
	Morphine	MS Contin [®] , Oramorph [®] , etc.	Orale	30 à 60 mg/j
			Parentérale (IM., SC)	10 mg toutes les 4 heures
	Fentanyl	Durogesic [®]	Patch transdermique	1 patch / 72 heures
Tramadol	Contramal [®] , Dolzam [®] , Tradonal [®] , etc.	Orale	100 à 400 mg/j	
AINS	Diclofénac	Cataflam [®] , Voltaren [®] , Arthrotec [®] , etc.	Orale	75 à 150 mg/j
			Topique	2 à 4 applications/j
	Ibuprofène	Brufen [®] , Nurofen [®] , etc.	Orale	1200 à 2400 mg/j
	Naproxène	Aleve [®] , Apranax [®] , etc.	Orale	500 à 1000 mg/j
	Kétoprofène	Fastum [®]	Topique	2 applications/j
	Etofénamate	Flexium [®]	Topique	
	Meloxicam	Mobic [®]	Orale	7,5 à 15 mg/j
	Piroxicam	Brexine [®] , Feldene [®] , etc.	Orale	10 à 20 mg/j
	Etoricoxib	Arcoxia [®]	Orale	OA : 60 mg/j AR : 90 mg/j
	Celecoxib	Celebrex [®]	Orale	OA : 200 mg/j AR : 200 à 400 mg/j
Glucocorticoïdes	Prednisone	Lodotra [®]	Orale	Variable
	Méthylprednisolone	Médrol [®]	Orale	4 mg
		Dépo-médrol [®]	Parentérale (IA)	4 à 80 mg toutes les 2 semaines
		Solumédrol [®]	Parentérale (IV)	4 mg
	Bétaméthasone	Betnesol [®] , Celestone [®] , Diprophos [®]	Orale	0,75 mg/j
			Parentérale (IA)	0,25 à 1 ml tous les 3 à 21 jours (4 mg/ml)
		Parentérale (IV)	0,75 mg	

Visco-supplémentation	Hyaluronate de sodium (PM = 0,5 à 2,7 MDa)	Hyalgan [®] , Ostenil [®] , etc.	IA	3 injections à 1 semaine d'intervalle
	Hylane (PM = 6 MDa)	Synvisc [®]	IA	
	HA stabilisé non animal (NASHA)	Durolane [®]	IA	
Agents biologiques	Etanercept	Enbrel [®]	Parentérale (SC)	AR : 25 mg * 2/ semaine
	Adalimumab	Humira [®]	Parentérale (SC)	40 mg/2 semaines
	Infliximab	Remicade [®]	Parentérale (IV)	AR : 3 mg/kg
	Abatacept	Orencia [®]	Parentérale (perfusion)	500 à 1000 mg
	Rituximab	Mabthera [®]	Parentérale (perfusion)	AR : 1000mg * 2,2 semaines d'intervalle
DMARD	Léflunomide	Arava [®]	Orale	100 mg/j (3 jours) puis 10 à 20 mg/j
	Méthotrexate	Metoject [®] , Emthexate [®] , Ledertrexate [®] , etc.	Orale	7,5 à 15 mg / semaine
			Parentérale (IV, IM, SC, perfusion)	
	Hydroxychloroquine	Plaquenil [®]	Orale	AR : 400 à 600 mg/j
	Sulfasalazine	Salazopyrine [®]	Orale	AR : 2 g/j
	Azathioprine	Imuran [®]	Orale	1 à 3 mg/kg de poids corporel/j
			Parentérale (IV)	
Ciclosporine	Sandimmun [®]	Parentérale	3 mg/kg de poids corporel/j	
Cyclophosphamide	Endoxan [®]	Orale	2,5 à 5 mg/kg de poids corporel/j	
		Parentérale (IV)		

2. Intérêts de la voie articulaire

Bien que certains agents (ex. : facteurs de croissance) soient dotés d'une action systémique leur conférant une action plus large, il serait intéressant de localiser les thérapies au niveau des sites touchés par l'inflammation et les pathologies étudiées (OA et AR). La voie IA présente de plus en plus d'intérêt car elle est associée à de nombreux avantages. En effet, une administration localisée permet (i) d'atteindre de hautes concentrations en principe actif au niveau de l'articulation tout en limitant les effets secondaires systémiques, (ii) la possibilité d'administrer de plus faibles doses du principe actif, (iii) la réduction de l'exposition de sites non-ciblés, (iv) l'administration de molécules présentant une faible biodisponibilité par voie orale et (v) l'administration chez des patients incapables de prendre un traitement par voie orale [Thakkar et coll., 2004 ; Abramson, 2006 ; Aly, 2008].

La localisation de ces thérapies au niveau articulaire rend essentielle l'obtention de formulations hautement efficaces, ayant de préférence une libération contrôlée.

3. Intérêts de la libération prolongée en intra-articulaire

La libération prolongée d'agents actifs à partir de systèmes polymériques localisée au niveau IA est une approche très intéressante. En effet, la clairance rapide du principe actif au niveau articulaire en réduit fortement le temps de résidence. Cet inconvénient majeur de l'administration IA est généralement évité en ayant recours à des systèmes à libération prolongée [Jain et coll., 2005 ; Liang et coll., 2005 ; Mitragotri et Lahann, 2012 ; Vilar et coll., 2012]. Le polymère choisi doit remplir certaines conditions pour être utilisable dans ces applications. Celui-ci ne doit pas provoquer de réaction inflammatoire ou toxique et doit se dégrader en produits non-toxiques et de préférence de petite taille de façon à être facilement éliminés ou métabolisés par le corps. De plus, le polymère choisi doit être facilement stérilisable pour une application parentérale comme l'administration IA et présenter un temps de libération contrôlée de la molécule satisfaisant et modulable selon l'application [Heller, 1980 ; Middleton et Tipton, 2000].

L'inconvénient des injections fréquentes et multiples est également limité. En effet, la libération prolongée permet de réduire la fréquence d'administration et d'augmenter la compliance du patient [Abramson, 2006 ; Gerwin et coll., 2006 ; Butoescu et coll., 2009].

4. Types de formulations à délivrance intra-articulaire

Les types de formulations à délivrance IA sont cités ci-dessous afin de présenter les différentes stratégies existant actuellement.

Les pathologies articulaires peuvent être traitées par injections de [Abramson, 2006 ; Aly, 2008] :

- solutions de HA en vue d'une viscosupplémentation ;
- micro/nano-particules contenant un principe actif ;
- hydrogels en vue d'une viscosupplémentation ou contenant un principe actif ;
- formulations basées sur des lipides (liposomes, solutions/suspensions huileuses) ;
- systèmes thermoréversibles contenant un principe actif.

Au cours de ce travail, le choix du système de délivrance s'est porté sur les microparticules. Seul ce système sera donc expliqué plus en détail ci-après.

V. L'encapsulation de molécules actives

L'encapsulation de molécules actives dans des microsphères peut s'effectuer grâce à de nombreuses techniques selon les caractéristiques physico-chimiques de la molécule (hydrophilie – lipophilie, taille). Les méthodes décrites ci-après sont celles utilisées le plus couramment, bien qu'il soit possible d'en utiliser d'autres (ex. : émulsion S/H/E, fluides supercritiques, microparticules formées in situ).

1. Émulsion – évaporation/extraction de solvant

1.1 Émulsion H/E

L'émulsion H/E est généralement utilisée pour encapsuler des molécules faiblement solubles dans l'eau. Cette méthode d'encapsulation repose sur l'émulsification d'une solution organique contenant le polymère dans une phase continue aqueuse en présence d'un surfactant. Le principe actif se trouve sous forme dispersée ou dissoute dans la phase polymérique. Dans ce cas-ci, le solvant organique choisi doit être non-miscible à l'eau et volatil. Son point d'ébullition doit donc être inférieur à celui du second solvant formant l'émulsion (eau) [Lassalle et Ferreira, 2007]. Le solvant organique est éliminé du système soit par évaporation, soit par extraction grâce à un plus grand volume d'eau. Suite à l'évaporation ou à l'extraction du solvant, le polymère précipite au contact de la phase aqueuse, provoquant de cette façon l'encapsulation de la molécule active [O'Donnell et McGinity, 1997 ; Jain, 2000]. Les microsphères sont récupérées par filtration ou centrifugation et séchées sous vide ou par lyophilisation.

L'encapsulation de molécules hydrosolubles par cette méthode produit généralement des microparticules avec de faibles efficacités d'encapsulation. Ceci est dû à l'efflux du principe actif hydrophile vers la phase aqueuse continue. En remplaçant celle-ci par une phase huileuse (ex. : huile de sésame, huile de graines de coton) (émulsion H/H), il est possible d'utiliser cette méthode pour encapsuler des molécules solubles dans l'eau. En effet, dans ces conditions, la molécule est insoluble dans la phase continue et perd sa tendance à diffuser vers celle-ci [O'Donnell et McGinity, 1997 ; Wischke et Schwendeman, 2008]. L'huile est dans ce cas-ci extraite par un solvant organique (ex. : hexane).

La méthode de co-solvants, basée sur l'émulsion H/E, peut également être utilisée si la molécule doit être solubilisée. Un mélange de solvants organiques est alors utilisé : l'un solubilisera le polymère, l'autre, la molécule. Le mélange de co-solvants le plus fréquemment

utilisé est le mélange dichlorométhane/alcool (éthanol ou méthanol) [Lassalle et Ferreira, 2007].

1.2 Émulsion E/H/E

La double émulsion E/H/E est plus appropriée que l'émulsion H/E pour l'encapsulation de molécules solubles dans l'eau comme les protéines et les peptides. Cette méthode est reconnue pour produire des microparticules présentant de hautes efficacités d'encapsulation de molécules hydrosolubles [Wischke et Schwendeman, 2008]. Comme l'émulsion H/E, la méthode de double émulsion permet de produire des microparticules de taille très variable en modifiant les conditions et vitesses d'agitation utilisées durant leur fabrication:

Une solution aqueuse contenant le principe actif est émulsifiée dans la phase organique contenant le polymère. Après addition lente, cette première émulsion E/H est à nouveau émulsionnée dans une seconde phase aqueuse plus importante et contenant un surfactant pour produire la double émulsion E/H/E [Jain, 2000 ; Vasir et coll., 2003]. Les exigences relatives aux propriétés du solvant utilisé pour la double émulsion E/H/E restent identiques à celles de la simple émulsion H/E.

2. Coacervation

Dans cette méthode d'encapsulation, le polymère est dissous dans un solvant organique. Un principe actif hydrosoluble sera solubilisé dans une phase aqueuse qui sera dispersée dans la solution organique (émulsion E/H). Par contre, un principe actif hydrophobe sera directement solubilisé/dispersé dans la phase organique. Un non-solvant organique est ajouté au système afin d'extraire le solvant organique de la phase polymérique. Une séparation de phase a lieu, se traduisant par la formation de gouttelettes de coacervat qui encapsulent le principe actif. La membrane de gouttelettes est finalement durcie par ajout d'un second non-solvant organique, ce qui forme les microsphères contenant la molécule active [Jain, 2000]. Cette méthode est donc basée sur une diminution de la solubilité du polymère provoquée par l'addition d'un non-solvant. Lors de la séparation de phase, deux phases liquides sont présentes : l'une contient les gouttelettes de coacervat formées par le polymère, l'autre est épuisée en polymère [Jain, 2000 ; Tamber et coll, 2005].

Dans cette méthode, le solvant utilisé pour solubiliser le polymère ne doit pas être non-miscible à l'eau et son point d'ébullition peut être supérieur à celui de l'eau. Les non-solvants utilisés ne doivent dissoudre ni le polymère ni le principe actif. Ils doivent également être

miscibles au solvant organique utilisé pour solubiliser le polymère en début de procédure. Le premier non-solvant utilisé peut être l'huile de silicone ou la paraffine. Le second non-solvant (hexane, heptane) doit être assez volatil ainsi qu'être capable de séparer le premier non-solvant relativement visqueux [Jain, 2000].

La méthode de coacervation ou séparation de phase comprend certains inconvénients du fait qu'elle tend à produire des particules agglomérées. De plus, la phase de rinçage et d'élimination de l'huile se révèle souvent longue et fastidieuse [Wischke et Schwendeman, 2008].

3. Atomisation

L'atomisation est une méthode rapide, se déroulant en une étape et facilement transposable à l'échelle industrielle. Cette méthode est envisageable pour des principes actifs solubles ou non dans l'eau, ce qui explique son intérêt.

L'encapsulation est réalisable par atomisation à partir d'une dispersion d'un principe actif hydrosoluble dans une solution organique du polymère ou à partir d'une solution d'un principe actif hydrophobe dans une solution organique du polymère [Jain, 2000 ; Tamber et coll., 2005]. La solution ou suspension du principe actif est atomisée en fines gouttelettes. Au contact de relativement hautes températures, ces fines gouttelettes sont séchées. Le solvant organique est rapidement évaporé, formant des microparticules solides. La séparation des microparticules formées et de l'air a finalement lieu au niveau du cyclone et les microparticules peuvent être récupérées dans un collecteur [Tamber et coll., 2005].

Le principal désavantage de cette méthode d'encapsulation est qu'elle produit des particules de taille non-uniforme [Lassalle et Ferreira, 2007]. De plus, elle induit la perte d'une quantité importante de produit par l'adhésion des particules aux parois de la chambre de séchage ou du cyclone, ce qui se révèle inadapté à l'utilisation de principes actifs et polymères coûteux. Enfin, de larges agglomérats peuvent aussi être observés en raison du collage des particules rencontré avant évaporation complète du solvant [Park et coll., 2005].

VI. Les polymères

Depuis de nombreuses années, les polymères sont utilisés dans les domaines pharmaceutique et médical. L'utilisation de polymères reste l'approche la plus simple pour délivrer directement la molécule dans un compartiment ou au niveau d'un site spécifique du corps. Ces polymères servent de « vecteurs » pour la délivrance contrôlée et localisée de molécules. Le polymère peut jouer un rôle fonctionnel (vectorisation, amélioration de la biocompatibilité) et/ou structurel. La vitesse de libération de la molécule dépend de plusieurs facteurs tels que la cinétique de dégradation du polymère, les propriétés physico-chimiques du polymère et de la molécule encapsulée, la compatibilité polymère-molécule et la morphologie et la structure de la forme [Park et coll., 2005].

L'utilisation de ces polymères doit mettre en balance certains facteurs tels que la toxicité du polymère lui-même et de ses éventuels produits de dégradation, le coût, la libération du principe actif (burst effect, contrôle plus ou moins efficace de la libération en fonction du polymère utilisé) et le confort du patient [Jain et coll., 2005].

Les polymères peuvent être différenciés entre polymères biodégradables et polymères non-biodégradables. Le terme « biodégradable » désigne les polymères dont la dégradation est, au moins en partie, régie par un système biologique (enzymatique, chimique, microbienne ou simple hydrolyse). L'aspect biodégradable est un avantage important car, suite à leur administration, ces polymères ne nécessitent aucun retrait, contrairement aux implants composés de polymères non dégradables (copolymères de polyéthylène et d'acétate de vinyle, polyméthacrylates, polysiloxanes) [Hacker et Mikos, 2011].

1. Structures et propriétés des polymères biodégradables

Un certain nombre de polymères synthétiques ont été développés pour des applications médicales et pharmaceutiques. Il existe toutefois des polymères naturels utilisables pour ces mêmes applications.

1.1 Polymères naturels

L'abondance de ces polymères dans la nature et leur biocompatibilité les rendent intéressants. De plus, dans le but d'étendre leurs propriétés, ils peuvent facilement être modifiés par hémisynthèse. Les polymères naturels présentent encore de nombreux avantages tels que leur bioactivité, leur capacité de constituer un ligand reconnu par un récepteur cellulaire et leur

capacité à déclencher une dégradation protéolytique dans certaines cellules. Leur purification complexe, leur faible stabilité, leur rejet par le système immunitaire et la transmission possible de maladies associée à ces polymères constituent des inconvénients non négligeables [Nair et Laurencin, 2007 ; Puppi et coll., 2010].

La délivrance de molécules a déjà été effectuée par l'intermédiaire de protéines (albumine) mais celles-ci présentent pour inconvénients d'être onéreuses, de provoquer une possible réponse antigénique et montrent de faibles propriétés mécaniques et élastiques [Park et coll., 2005]. C'est pourquoi, dans la classe des polymères naturels, il est aujourd'hui plus évident de se tourner vers les polysaccharides qui sont peu coûteux, facilement modifiables par hémisynthèse et présentent une large gamme de propriétés physico-chimiques [Park et coll., 2005].

1.1.1 Chitosan

Le chitosan (Figure 12) est un polysaccharide composé d'unités de D-glucosamine (2-amino-2-deoxy- β -D-glucose) et de N-acétylglucosamine (2-acetamido-2-deoxy-D-glucose) obtenu par désacétylation partielle de la chitine. La chitine, second polysaccharide le plus abondant dans la nature, se retrouve au niveau de la carapace des crustacés. La glucosamine, composé principal du chitosan, est une substance produite naturellement par le corps à partir du glucose ; elle entre aussi dans la production des glycosaminoglycanes, composants du cartilage. La glucosamine est également présente au niveau des tendons et ligaments [Dash et coll., 2011].

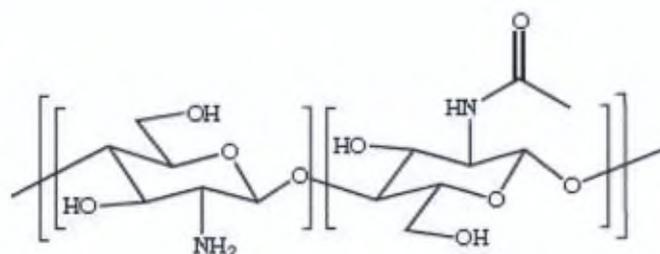


Figure 12 : Structure d'une unité composant le chitosan [Croisier et Jérôme, 2013].

Le terme « chitosan » englobe des polymères de PM allant de 50 à 2000 kDa, de viscosité et de niveau de désacétylation variables (de 40 à 98%) [Illum, 1998].

Le chitosan est insoluble aux valeurs de pH neutres et alcalines. Il peut se trouver sous forme de sels avec l'acide acétique, l'acide lactique, l'acide chlorhydrique et le glutamate, les deux derniers étant les plus utilisés [Illum, 1998]. Le chitosan peut également être mis en présence

de polyanions comme le sulfate, le citrate ou le tripolyphosphate [Park et coll., 2005]. En cours de dissolution, le chitosan devient chargé positivement au contact des fluides biologiques en raison de la présence d'amines primaires qui se protonnent au niveau de sa structure principale [Park et coll., 2005 ; Dash et coll., 2011].

Le chitosan est un polysaccharide reconnu comme biocompatible et biodégradable [Jain et Banerjee, 2008]. À l'heure actuelle, en dépit de son intérêt potentiel, le chitosan n'entre dans la composition d'aucune formulation commercialisée, excepté en tant que complément alimentaire. Le chitosan est en phase d'étude pour son utilisation dans des formes pharmaceutiques telles que des formes muco-adhésives, des formes à libération immédiate ou à libération prolongée, des formes coloniques et des formes impliquant la libération d'un peptide ou d'un gène [Banerjee et coll., 2002 ; Baldrick, 2010].

1.1.2 Acide hyaluronique

De haut PM ($10^3 - 10^7$ Da), le HA fait partie de la famille des glycosaminoglycanes, regroupant les polysaccharides linéaires qui alternent des disaccharides d'acide α -1,4-D-glucuronique et de β -1,3-N-acétyl-D-glucosamine (Figure 13).

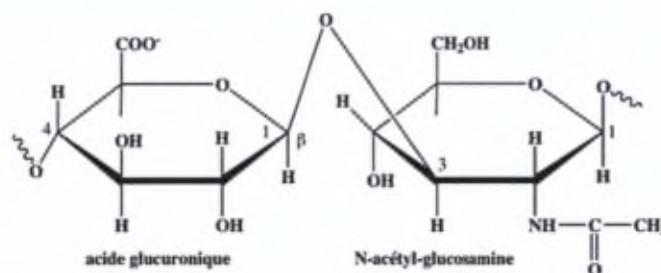


Figure 13 : Structure de l'acide hyaluronique.

Le HA se trouvant dans les formes commercialisées peut être extrait du cordon ombilical, de l'humeur vitreuse, du liquide synovial, des crêtes de coq ou encore être obtenu par un phénomène de fermentation bactérienne [Liu et coll., 2011].

Composant principal de l'ECM de nombreux tissus conjonctifs ainsi que du liquide synovial et de l'humeur vitreuse, le HA est un polymère biocompatible possédant des qualités viscoélastiques uniques, évitant l'apparition de réactions immunitaires lors de son administration et dont la longueur des chaînes est aisément modulable. En raison de ses nombreux avantages, il a été extensivement étudié ces dernières années dans le cadre d'applications biomédicales telles que les systèmes de délivrance de molécules,

l'encapsulation de cellules ou encore en génie tissulaire. En contrepartie, son utilisation en tant que biopolymère reste limitée en raison de sa solubilité dans l'eau et sa résorption rapide résultant en un temps de résidence dans le tissu assez court [Puppi et coll., 2010]. Afin d'augmenter la stabilité à long-terme et les propriétés mécaniques du HA, des dérivés estérifiés ont été synthétisés (éthyl et benzyl esters, HYAFF®). Ces dérivés subissent une dégradation hydrolytique prévisible par le clivage de leurs liens esters, s'étalant jusqu'à 2 mois [Nair et Laurencin, 2007 ; Puppi et coll., 2010].

1.2 Polymères synthétiques

Les polymères synthétiques, contrairement aux polymères naturels, ont des propriétés plus prévisibles et uniformes de lot en lot. De plus, ils peuvent avoir des propriétés particulières parfaitement modulables et contrôlées pour des applications spécifiques, telles que leur hydrophilie, leur vitesse de dégradation et la délivrance ciblée [Nair et Laurencin, 2007 ; Tian et coll., 2012].

1.2.1 Poly(anhydrides)

Les poly(anhydrides) sont des polymères résultant de l'association entre une chaîne hydrophobe et des liaisons anhydrides (Figure 14). Ces liaisons anhydrides étant extrêmement sensibles, leur hydrolyse rapide en monomères diacides empêche d'utiliser ces polymères pour la libération prolongée de molécules *in vivo*. Cependant, leur vitesse de dégradation peut être modulée en modifiant leur composition [Katti et coll., 2002]. De cette façon, des centaines de dérivés de poly(anhydrides) ont été synthétisés (ex. : aliphatique, aromatique, insaturé, branché) et atteignent des temps de dégradation allant de 1 semaine à plusieurs années [Kumar et coll., 2002 ; Jain et coll., 2005].

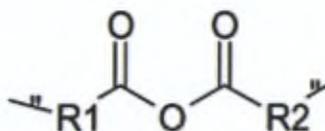


Figure 14 : Structure générale des poly(anhydrides) et plus particulièrement de leur liaison labile typique.

Les poly(anhydrides) ne provoquent pas de réactions inflammatoires *in vivo* et leurs produits de dégradation ne sont pas cytotoxiques, ce qui leur confère un certain intérêt [Kumar et coll., 2002 ; Park et coll., 2005]. Les poly(anhydrides) doivent être conservés sous forme congelée

et dans des conditions anhydres en raison de leur instabilité [Park et coll., 2005]. Ils subissent de plus une dépolymérisation spontanée en polymères de faible PM une fois mis en solution organique ou lors d'un stockage à température ambiante ou supérieure [Kumar et coll., 2002].

La recherche pharmaceutique actuelle se concentre sur les poly(anhydrides) basés sur les dérivés d'acide sébacique (acide décanedioïque), de dimères d'acide gras (acide érucique) et de 1,3-bis(*p*-carboxyphenoxy)propane. La Food and Drug Administration (FDA) n'a approuvé qu'un dérivé de poly(anhydride) à ce jour, le poly(anhydride) poly(acide sébacique - *co*-1,3-bis(*p*-carboxyphenoxy)propane). Les poly(anhydrides) sont actuellement des candidats potentiels pour la délivrance contrôlée de molécules variées (affections oculaires, anesthésiques locaux, anticancéreux), la délivrance orale d'insuline et la délivrance localisée d'antibiotiques (ostéomyélite) [Kumar et coll., 2002].

1.2.2 Poly(ortho)esters

La famille des poly(ortho)esters (POE) peut se scinder en quatre classes différentes (Figure 15). Chaque classe a été développée pour pallier aux désavantages des précédentes. Les POE I forment un produit de dégradation acide, l'acide γ -hydroxybutyrique. Les liaisons esters du POE étant sensibles aux acides, ce produit de dégradation a un effet autocatalytique, ce qui accélère la suite de la dégradation. Cet effet doit donc être neutralisé par l'addition d'une molécule basique telle que le carbonate de sodium. Les POE II remédient à cet effet car leur dégradation produit initialement des molécules neutres. Leur vitesse de dégradation doit néanmoins être modulée par l'ajout d'excipients acides. Enfin, ces polymères présentent une extrême hydrophobie qui limite l'accès de l'eau aux liaisons hydrolysables et rend ces polymères très stables en milieu aqueux. Les POE III forment une structure semi-solide à température ambiante en raison de la grande flexibilité de leurs chaînes. L'incorporation de molécules dans ces polymères se fait aisément, à température ambiante et sous agitation et ne requiert aucune addition de solvant. Néanmoins, la synthèse du POE III est faiblement reproductible. Les POE IV sont issus d'une modification des POE II de façon à ce que la vitesse de dégradation du polymère ne nécessite plus l'ajout d'un catalyseur acide. Les POE IV contiennent dans leur structure des fractions contenant des acides lactique et glycolique, acides qui seront libérés par hydrolyse aqueuse et catalyseront la dégradation ultérieure du POE [Heller et coll., 2002 ; Heller et Barr, 2004 ; Heller, 2005].

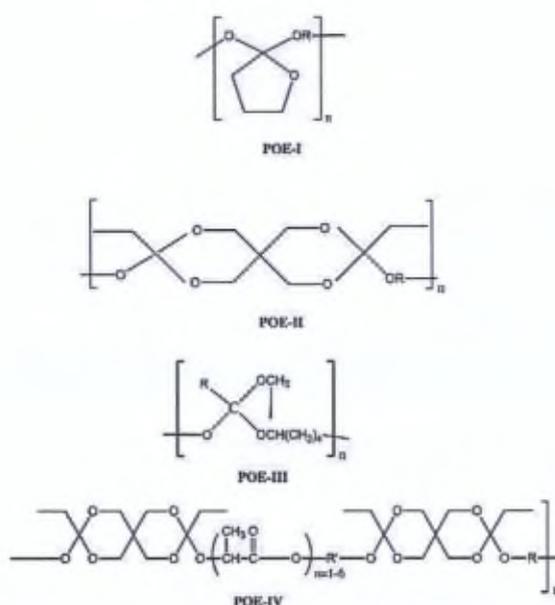


Figure 15 : Structure des différentes classes de poly(ortho)esters [Nair et Laurencin, 2007].

Les POE sont actuellement investigués pour des applications telles que l'administration prolongée de molécules au niveau oculaire [Heller, 2005], le traitement de maladies parodontales ou encore la délivrance de peptides et protéines [Einmahl et coll., 2001].

1.2.3 Polyesters aliphatiques

Les polyesters aliphatiques constituent une large famille de polymères comprenant entre autres les poly(α -hydroxy-acides). Parmi ces derniers, se retrouvent les acides polyglycoliques, polylactiques, copolymères d'acides (poly-lactique-*co*-glycolique) et les poly(ϵ -caprolactones). Les polyesters contiennent des liaisons esters formées par un acide carboxylique et un groupe hydroxyle, fonctions caractéristiques de chacun de leurs monomères [Hacker et Mikos, 2011].

a) Polymères et copolymères d'acide lactique et glycolique

L'acide polyglycolique (PGA) (Figure 16) a été le premier polymère biodégradable synthétique étudié afin d'être utilisé à des fins biomédicales. Le PGA est un polymère hautement cristallin (cristallinité entre 45 – 55 %) qui présente une faible solubilité dans les solvants organiques. La plage de température de transition vitreuse (T_g) du PGA est comprise entre 35 et 40°C tandis que sa température de fusion est supérieure à 200°C [Gunatillake et Adhikari, 2003 ; Nair et Laurencin, 2007].

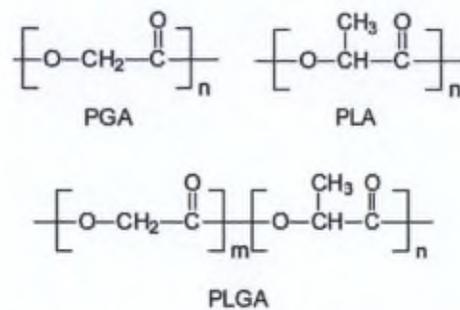


Figure 16 : Structure de divers polyesters aliphatiques : acide polyglycolique (PGA), acide polylactique (PLA) et copolymère d'acide glycolique et lactique (PLGA).

En raison de ses propriétés fibrogènes, le PGA a depuis lors été utilisé pour la fabrication de fils de suture ou comme tissu de régénération [Nair et Laurencin, 2007].

Dans le corps, le PGA est rapidement dégradé en produits non-toxiques tels que la glycine, excrétée par les urines, ou encore en dioxyde de carbone et en eau via le cycle de Krebs. Sa faible solubilité dans les solvants organiques, sa dégradation rapide ainsi que la formation de produits de dégradation acides poussent dès lors à l'utilisation d'alternatives [Nair et Laurencin, 2007].

L'*acide polylactique* (PLA) (Figure 16) est une molécule qui contient un atome de carbone chiral. La formation de polyesters à partir de l'acide lactique est obtenue par polycondensation. Néanmoins, la réaction de polycondensation produit une molécule d'eau à chaque étape. Cette molécule provoque la dégradation du polymère jusqu'alors formé. Dès lors, afin d'obtenir des polymères de haut PM, il est nécessaire de débiter la réaction à partir du dimère cyclique d'acide lactique, le lactide. La réaction de polymérisation se fait alors par ouverture de cycle en présence d'un catalyseur. Cette réaction s'applique également à l'acide glycolique [Nampoothiri et coll., 2010 ; Pang et coll. 2010]. Comme le dimère cyclique contient deux atomes de carbone chiraux, il peut exister sous trois formes stéréochimiques différentes : le D-lactide, le L-lactide et le méso-lactide. Il peut également exister sous forme de mélange racémique D,L-lactide (mélange 50 : 50 des isomères D-lactide et L-lactide) [Pang et coll. 2010].

Le poly(L-lactide) (PLLA), l'isomère naturellement produit, est un polymère cristallin (cristallinité aux alentours de 37% selon le PM et les paramètres de fabrication). Sa T_g est comprise entre 60 et 65°C et sa température de fusion est d'environ 175°C [Middleton et Tipton, 2000 ; Gunatillake et Adhikari, 2003]. Contrairement au PGA, le PLLA est plus

hydrophobe, ce qui explique sa dégradation plus lente. Le degré de cristallinité du PLLA ainsi que sa porosité définiront sa vitesse de dégradation [Middleton et Tipton, 2000].

Le poly(D,L-lactide) (PDLLA) est amorphe en raison de la répartition aléatoire de D-lactide et L-lactide qu'il contient. Sa Tg est comprise entre 55 et 60°C [Middleton et Tipton, 2000 ; Pang et coll. 2010]. Le PDLLA montre une vitesse de dégradation plus rapide que le PLLA. Grâce à ses propriétés, ce polymère est un candidat intéressant pour la délivrance de molécules.

Suite à leur érosion, les PLA forment de l'acide lactique, naturellement métabolisé en dioxyde de carbone et eau via le cycle de Krebs [Nair et Laurencin, 2007].

Les copolymères d'acide glycolique et lactique (PLGA) (Figure 16) sont produits aussi bien à partir d'acide poly(L-lactide) que d'acide poly(D,L-lactide). La dégradation du PLGA dépend premièrement du ratio de ses monomères : le D,L-PLGA 50/50 se dégrade en 1 à 2 mois, le 75/25 en 4 à 5 mois et le 85/25 en 5 à 6 mois.

Les PLGA sont des polymères d'intérêt grandissant en raison de leur admission par la FDA pour l'usage humain. De plus, il est aisé d'adapter leur PM et le ratio en acides glycolique et lactique, ce qui permet de modifier leur vitesse de dégradation selon l'application désirée. Les PLGA sont actuellement utilisés pour le transport de molécules sous forme de micro/nanosphères, micro/nanocapsules ou nanofibres délivrant le principe actif de façon contrôlée (Figure 17). Ces polymères, grâce à leurs propriétés d'adhésion et de prolifération cellulaire, sont également utilisés dans des applications de génie tissulaire [Nair et Laurencin, 2007 ; Armentano et coll., 2010].

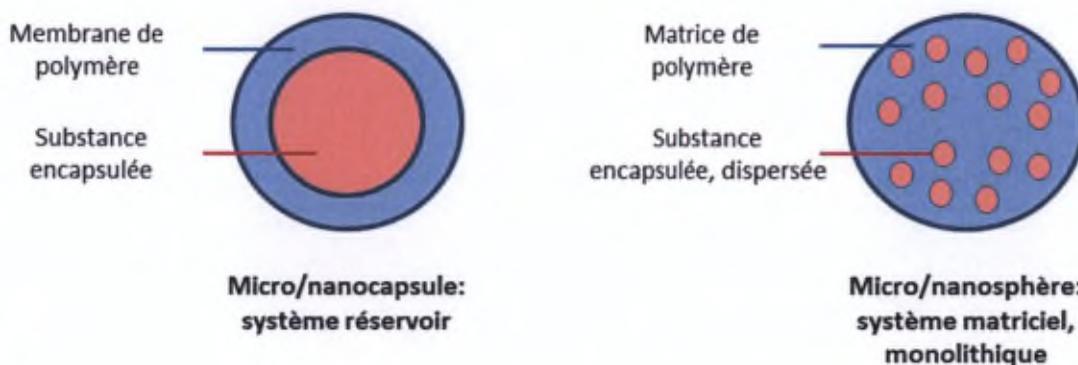


Figure 17 : Systèmes particuliers sphériques : les micro/nanocapsules sont des systèmes réservoirs où le principe actif est entouré d'une membrane de polymère alors que les micro/nanosphères sont des systèmes matriciels caractérisés par la présence du principe actif dispersé de façon hétérogène ou dissous sous forme de dispersion moléculaire dans une matrice de polymère [Nordstierna et coll., 2010].

Bien que la dégradation des polymères soit analysée en détail ultérieurement (voir *A.VI.2 Mécanismes de dégradation/érosion des polymères*), il est important de noter à ce stade que la dégradation hydrolytique des PLGA est influencée par plusieurs paramètres : (i) la composition et le PM du polymère, dans le sens où la proportion en glycolide accélère la dégradation en raison de son hydrophilie importante ; (ii) la présence de molécules acides accélère la dégradation par le phénomène d'autocatalyse acide alors que la présence de molécules basiques peut soit accélérer la dégradation, soit neutraliser les produits de dégradation acides par une réaction acide-base ; (iii) la taille des microparticules, selon que les particules soient petites (dégradation lente) ou grandes (dégradation accélérée par l'autocatalyse) ; (iv) le pH, vu qu'un environnement acide accélère la dégradation en favorisant l'autocatalyse ; (v) la stérilisation par radiations [Li, 1999].

Selon les auteurs, la nomenclature des polymères et copolymères d'acides lactique et glycolique varie. En effet, certains auteurs se basent sur la dénomination des monomères de départ pour nommer les polymères issus de la polycondensation (acide polyglycolique, acide poly(D,L-lactique), acide poly(D,L-lactique-co-glycolique), etc.) alors que d'autres se basent sur celle des dimères cycliques pour nommer les polymères issus de la polymérisation par ouverture de cycle (polyglycolide, poly(D,L-lactide), poly(D,L-lactide-co-glycolide), etc.). Néanmoins, les abréviations utilisées pour les différentes dénominations rencontrées restent identiques (PLA, PGA, PDLLA, PLGA, etc.) [Gupta et Kumar, 2007]. Pour plus d'harmonie, nous nous baserons uniquement sur la dénomination issue des dimères tout au long de ce travail.

b) Poly(ϵ -caprolactones)

Les poly(ϵ -caprolactones) (PCL) (Figure 18) sont des polyesters semi-cristallins résultant de la polymérisation par ouverture de cycle de l' ϵ -caprolactone. Les PCL présentent une solubilité dans une large gamme de solvants, sont miscibles à d'autres polymères, présentent une plage de température de fusion basse (55 – 65°C) et une Tg de -60°C [Sinha et coll., 2004 ; Nair et Laurencin, 2007].

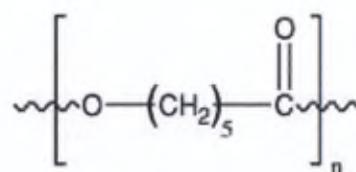


Figure 18 : Structure d'un autre type de polyester aliphatique : poly(ϵ -caprolactone).

Eu égard à leur dégradation lente (2 – 3 ans), à leur non-toxicité et à leur haute perméabilité à de nombreuses molécules, les PCL ont été investigués pour l'administration prolongée de diverses molécules dont les vaccins [Sinha et coll., 2004 ; Wang et coll., 2009 ; Armentano et coll., 2010].

2. Mécanismes de dégradation/érosion des polymères

Avant de débiter l'analyse des mécanismes de dégradation/érosion des polymères, il est essentiel de définir certains termes souvent rencontrés avec des significations variables au fil de la littérature. Au cours de ce travail, ces termes seront toujours utilisés de façon à exprimer les concepts décrits ci-après. Ainsi, la « dégradation » du polymère représentera le phénomène de clivage des chaînes contenues dans le polymère, processus qui mène à la formation d'oligomères et de monomères solubles dans l'eau. L'« érosion » décrira la perte de poids réelle du polymère engendrée par la solubilisation des monomères, oligomères ou autres acides à chaîne courte produits au cours du processus de dégradation. Le terme « biodégradable », comme déjà expliqué précédemment, désigne les polymères dont la dégradation est, au moins en partie, régie par un système biologique de type enzymatique, chimique, microbien ou simplement par une hydrolyse. Le terme « bioérodible » désigne le même type de dégradation 'biologique' pour un polymère [Göpferich, 1996 ; Siepmann et Göpferich, 2001].

La libération de molécules à partir d'un système polymérique de type microsphères se fait par solubilisation progressive de la matrice polymérique au contact de l'environnement aqueux. Ces systèmes permettent la libération de la molécule encapsulée suite à leur dégradation/érosion progressive (erosion-controlled systems) ainsi que par le transport de la molécule à l'intérieur de la matrice polymérique [Versypt et coll., 2012]. Les phénomènes impliqués dans l'érosion d'un polymère étant relativement complexes, la description de la libération d'une molécule à partir d'une matrice polymérique débutera par ce phénomène.

Le phénomène d'érosion peut se distinguer en 3 mécanismes différents (Figure 19). *L'érosion de type I* s'applique aux polymères solubles dans l'eau, rendus insolubles par la présence de liens chimiques et physiques entre leurs chaînes. La matrice résultante est donc très hydrophile et fortement perméable à l'eau (hydrogel érodible à base de polymères vinyliques ou d'acrylamide), ce qui provoque la libération rapide des molécules solubles dans l'eau. Ces polymères ne sont généralement utilisés que pour les principes actifs très peu solubles dans

l'eau ou si le principe actif est une macromolécule dont la libération nécessite une forte érosion de la matrice polymérique. *L'érosion de type II* se produit dans des polymères à la base insolubles dans l'eau et qui sont solubilisés par hydrolyse (copolymères de monomères vinyliques et d'anhydride maléique), ionisation (polymères utilisés dans l'enrobage entérique tels que l'acétophtalate ou l'acétosuccinate de cellulose, les copolymères d'acrylate) ou protonation (aminoacétate de cellulose) d'un groupement. Il n'y a ici aucun clivage au niveau de la structure principale du polymère ; dès lors, aucune diminution du PM du polymère ne peut être mesurée au cours de la dégradation. Enfin, *l'érosion de type III* est le processus se déroulant chez les polymères hydrophobes ou hydrophiles, insolubles dans l'eau, qui sont progressivement convertis en petites fractions solubles dans l'eau par clivage de la structure principale du polymère [Heller, 1980]. L'érosion de type III est le processus se déroulant dans les polymères biodégradables étudiés précédemment.

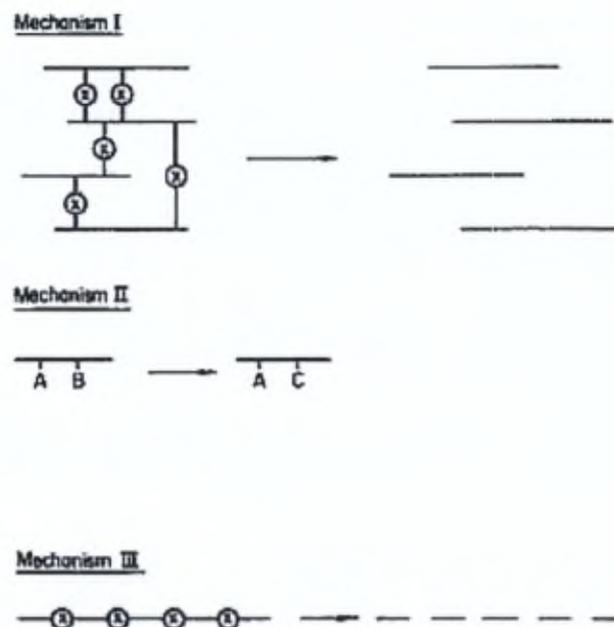


Figure 19 : Mécanismes d'érosion : x représente un lien instable à l'hydrolyse, A représente un substituant hydrophobe de fin de chaîne et le remplacement de B par C représente l'hydrolyse, l'ionisation ou la protonation d'un groupement. Ces 3 mécanismes permettent la solubilisation du polymère [Heller, 1980].

Une seconde distinction importante au niveau de l'érosion de type III des polymères est à opérer selon qu'elle se produise de façon homogène ou hétérogène. Ceci dépend essentiellement de l'hydrophobicité, de l'épaisseur et de la réactivité des liaisons que les polymères contiennent [Heller, 1980; Sackett et Narasimhan, 2010]. *L'érosion homogène*, ou érosion dans la masse (bulk-eroding systems), se réfère aux polymères pour lesquels la

pénétration de l'eau dans la matrice est plus rapide que la dégradation en elle-même. L'érosion se produit alors dans l'entièreté de la matrice, celle-ci étant complètement imbibée d'eau, facteur permettant la scission des liens dans la totalité de la masse. *L'érosion hétérogène*, ou érosion de surface (surface-eroding systems), s'applique quant à elle aux polymères dont le clivage des liaisons est plus rapide que la pénétration de l'eau dans le système. La perte de fractions polymériques se produit uniquement à partir de la surface. Il est logique que l'érosion homogène concerne les polymères plutôt hydrophiles et dont les liaisons sont les moins réactives (PGA, PLA et PLGA, PCL) alors que l'érosion hétérogène concerne les polymères plutôt hydrophobes et contenant les liaisons les plus réactives ou étant les moins perméables à l'eau (polyanhydrides, POE) [Göpferich, 1996; Siepmann et Göpferich, 2001 ; Katti et coll., 2002].

L'érosion de type III est donc directement dépendante du phénomène de dégradation. L'érosion dépend également du gonflement, de la dissolution et de la diffusion des fractions polymériques produites et des changements morphologiques permettant la diffusion des fractions de petite taille. Pour que la dégradation du polymère se produise, l'eau du milieu environnant imbibe de façon plus ou moins importante le polymère, ce qui déclenche le clivage des chaînes à partir de la structure principale. Ceci engendre la formation d'oligomères et de monomères qui seront libérés dans le milieu environnant, après modification progressive de la structure de la matrice, ce qui cause alors la perte de poids de la matrice, c'est-à-dire l'érosion [Göpferich, 1996]. La scission des liens du polymère peut se faire soit passivement par hydrolyse, soit activement par des enzymes. La dégradation enzymatique s'observe le plus souvent dans le cas des polymères naturels [Nair et Laurencin, 2007].

La vitesse de la dégradation dépend de la nature chimique des liaisons incriminées, du pH du milieu environnant, de la composition du copolymère (par exemple du ratio en lactide/glycolide dans le PLGA), du PM final, de la forme et de la structure du polymère et de la captation en eau [Göpferich, 1996].

Il est également important de noter que la dégradation de certains polymères est un phénomène provoquant la libération de molécules acides (PLA, PLGA). Ces acides à chaîne courte causent une diminution du pH dans la matrice, avant tout relargage possible dans le milieu environnant. En effet, l'érosion du polymère doit déjà être avancée afin d'atteindre une porosité suffisante que pour permettre la libération de ces acides. Cette diminution de pH à l'intérieur de la matrice polymérique cause une accélération de la dégradation du polymère,

celle-ci étant catalysée par les acides et les bases. Ce phénomène est connu sous le nom d'autocatalyse [Li et coll., 1990a ; Li et coll., 1990b ; Li et coll., 1990c ; Siepmann et Göpferich, 2001]. Ces acides à chaîne courte peuvent progressivement diffuser vers le milieu de dissolution, duquel ils diminueront le pH dans les stades avancés de la dégradation lorsqu'ils ne sont plus neutralisés par les ions hydroxydes du milieu. Enfin, le milieu de dissolution peut également diffuser vers l'intérieur des microparticules afin d'y neutraliser les acides. L'autocatalyse peut être limitée voire même supprimée si la vitesse de diffusion des acides est suffisamment élevée par rapport à leur vitesse de production [Siepmann et Göpferich, 2001].

VII. Les molécules encapsulées

La présente recherche s'inscrit dans le cadre du projet Joint-AIC, financé par le pôle de compétitivité santé BioWin de la Région Wallonne. Ce projet a combiné l'expertise de laboratoires publics (Pharmacie Galénique et Biopharmacie, Rhumatologie) et privés (Bone Therapeutics) afin de développer de nouvelles stratégies de formulation à libération prolongée dans l'optique de faciliter le traitement de pathologies telles que l'OA ou l'AR. Le choix de la première molécule à encapsuler, la clonidine HCl, s'est basé sur les observations réalisées par l'un des partenaires de ce projet, lui attribuant des effets anti-inflammatoires [WO2009/101210, 2009].

Deux classes de molécules ont donc été envisagées dans le cadre du traitement de l'OA et de l'AR. Les agonistes des récepteurs α_2 -adrénergiques présentent un intérêt potentiel pour ces indications. Initialement, ces molécules sont reconnues pour leurs effets sympatholytiques, analgésiques, sédatifs et anxiolytiques [Talke, 2000]. Néanmoins, lors de ces dernières années, l'étude de l'activité de ces molécules a montré une efficacité non-négligeable lors d'épisodes douloureux et même, inflammatoires. Parmi les molécules α_2 -agonistes, la clonidine a été choisie afin d'être encapsulée dans les microparticules. La dexmédétomidine est un second agoniste α_2 -adrénergique qui mériterait d'être considéré.

De par leur potentiel à supprimer les réponses immunitaires et inflammatoires, les glucocorticostéroïdes sont fréquemment utilisés dans le traitement de l'OA et de l'AR (voir *IV.1.3 Les glucocorticoïdes*). Leurs nombreux effets secondaires limitent pourtant leur utilisation sur le long terme. De nouvelles formulations de ces corticostéroïdes doivent être considérées afin de limiter leur toxicité et leurs effets indésirables. Parmi cette large classe de molécules, le dipropionate de bétaméthasone a été choisi afin d'être encapsulé dans les microparticules de PLGA.

1. Clonidine (chlorhydrate)

Tout au long de ce travail, le chlorhydrate de clonidine a été utilisé comme modèle de molécule hydrosoluble à encapsuler. Ses caractéristiques physico-chimiques particulières l'ont rendue intéressante pour ce travail. En effet, de petite taille et hydrophile, la clonidine est à l'opposé des molécules généralement encapsulées dans les microsphères de PLGA (molécules de grande taille, type protéines ou hydrophobe, type ibuprofène) [Yang et coll., 2001 ; Zhang et coll., 2008b].

1.1 Aspect physico-chimique

Le chlorhydrate de clonidine, $C_9H_{10}Cl_3N_3$, est un dérivé imidazolique de faible PM (PM = 266,6 g/mol) (Figure 20).

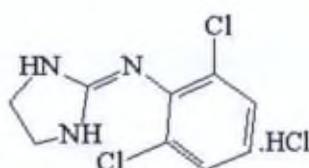


Figure 20 : Structure du chlorhydrate de clonidine.

La clonidine HCl est soluble dans l'eau et l'éthanol. Le pH d'une solution aqueuse de clonidine HCl est compris entre 4,0 et 5,0 [Pharmacopée Européenne 7^{ème} édition, 2012]. Le pKa de la clonidine HCl est égal à 8,05 [Cody et DeTitta, 1979]. La solubilité aqueuse de la clonidine HCl à pH 7,0 est égale à environ 85 mg/ml. La clonidine HCl présente un profil de solubilité pH-dépendant.

1.2 Aspect pharmacologique

Initialement synthétisée par Boehringer Ingelheim en 1965, la clonidine ne voit son mécanisme d'action élucidé qu'au début des années 1970 [Cunningham et coll., 1994 ; Giovannoni et coll., 2009]. Agoniste adrénergique, elle agit à la fois au niveau des récepteurs α_2 et α_1 -adrénergiques et possède une action tant centrale que périphérique [Kamibayashi, 2000 ; Brkovic et coll., 2008 ; Giovannoni et coll., 2009]. Les récepteurs α_2 -adrénergiques sont les uniques récepteurs α à être situés au niveau pré-synaptique ; ils se retrouvent également au niveau post-synaptique, au côté des α_1 -adrénergiques [Schorderet et coll., 1998]. La clonidine présente une action double : elle agit premièrement au niveau des récepteurs α_1 -adrénergiques périphériques où elle induit une vasoconstriction, avant d'agir au niveau des α_2 -adrénergiques centraux pour inhiber l'action sympathique et provoquer une vasodilatation [Lavhale et coll., 2010]. L'action prédominante de la clonidine au niveau des récepteurs α_2 -adrénergiques pré-synaptiques engendre une réduction de la libération de la noradrénaline, provoquant la réduction de la fréquence et du débit cardiaque, de la résistance vasculaire et de la pression sanguine systémique [Cunningham et coll., 1994 ; Slim et coll., 2011].

La clonidine agirait également via des composés cellulaires liant spécifiquement des molécules possédant un cycle imidazol(idin)e ou guanidine. Ces sites de liaison, appelés 'sites de liaison imidazole non-adrénergiques', sont distingués en sites I₁ et I₂. La clonidine n'exercerait son action hypotensive qu'en se liant majoritairement aux I₁ [Guyenet, 1997 ; Khan et coll., 1999 ; Brunton et coll., 2011].

Tableau 4 : Données pharmacocinétiques de la clonidine suite à une administration orale [adapté de Schorderet et coll., 1998 ; Brunton et coll., 2011].

Donnée pharmacocinétique	Valeur pharmacocinétique
Biodisponibilité	70 – 80%
Concentration plasmatique maximale	1 – 4 heures
Temps de demi-vie plasmatique	6 – 24 heures (moyenne ≈ 12 heures)
Métabolisation	50 % métabolisé par le foie (métabolites inactifs)
Volume de distribution	1,7 – 2,5 l/kg
Liaison aux protéines plasmatiques	30 % (albumine)
Excrétion	Excrétion urinaire : 90 % (clonidine + métabolites) Excrétion dans les selles : 10 %
Clairance	1,9 – 4,3 ml/min.kg

1.3 Aspect thérapeutique

Le chlorhydrate de clonidine est actuellement le principe actif de deux spécialités sur le marché belge. La première, le *Catapressan*[®], se trouve sous forme de comprimés (0,15 mg de clonidine HCl) ou d'ampoules injectables en intramusculaire, sous-cutané ou intraveineux (0,15 mg de clonidine HCl/ 1 ml). Le *Catapressan*[®] est indiqué dans les cas d'hypertension ne répondant pas suffisamment à d'autres médicaments. La seconde, le *Dixarit*[®], se trouve également sous forme de comprimés (0,25 µg de clonidine HCl). Ce dernier est indiqué dans le traitement prophylactique de la migraine [CBIP, 2013]. La clonidine présente plusieurs effets secondaires majoritairement présents et potentiellement dangereux si le patient prend son traitement antihypertenseur de façon discontinue. En effet, la clonidine rend le patient sujet à l'hypertension rebond en cas d'arrêt brutal, même passager, de son traitement, provoquant de l'hypertension, des maux de tête, des suees et de la tachycardie [Slim et coll., 2011].

À l'action anti-hypertensive de la clonidine connue depuis ses débuts, se sont progressivement ajoutées d'autres indications intéressantes telles que l'anesthésie, l'analgésie et le traitement des symptômes du sevrage aux opioïdes. D'autres indications moins reconnues existent également telles que le traitement du trouble d'hyperactivité avec déficit de l'attention chez l'enfant ou de l'alcoolisme. Néanmoins, la clonidine entraîne plusieurs effets indésirables lors du traitement antihypertenseur ou de la douleur chronique tels que de la sédation, de la bradycardie, de l'anxiolyse, de la sécheresse buccale et de la constipation [Schorderet et coll., 1998 ; Kamibayashi, 2000 ; Giovannoni et coll., 2009 ; de Goede et coll., 2012]. Après injection intrathécale de clonidine en conditions peropératoires, l'effet analgésique recherché est bien présent, contrairement aux effets indésirables de type hypotension et bradycardie [Cunningham et coll., 1994 ; Iqbal et coll., 2000 ; Giovannoni et coll., 2009].

La clonidine a également été injectée en IA et y a démontré à plusieurs reprises son potentiel analgésique. En effet, une dose IA de 150 µg de clonidine permet de réduire la douleur aussi efficacement qu'une injection de 2 mg de morphine. Seule ou en combinaison, la clonidine est donc reconnue comme ayant de puissants effets analgésiques dose-dépendants, que ce soit après une administration systémique ou locale [Eisenach et coll., 1996 ; Buerkle, 2000 ; Joshi et coll., 2000 ; Gupta, 2003]. De plus, la clonidine a montré une amélioration de l'effet analgésique post-opératoire des opioïdes (morphine) ainsi qu'un prolongement de l'action analgésique des anesthésiques locaux grâce à son action synergique au niveau des fibres de la douleur [Gupta, 2003].

L'effet analgésique de la clonidine est obtenu suite à son interaction avec les terminaisons nerveuses périphériques nociceptives (nocicepteurs) ainsi qu'à sa liaison aux récepteurs α_2 -adrénergiques présents dans le système nerveux central. Cette action entraîne la réduction de la libération des substances associées aux signaux douloureux telles que la substance P et le glutamate [Buerkle et coll., 2000 ; Giovannoni et coll., 2009].

En plus de ses effets positifs dans les douleurs neuropathiques, la clonidine présente des qualités analgésiques intéressantes pour les pathologies inflammatoires associées à des épisodes douloureux, tels que l'OA et l'AR. Dans pareilles conditions inflammatoires, l'effet anti-nociceptif de la clonidine semble être exacerbé suite à une modification du nombre et de l'affinité de ses récepteurs [Gray et Ferrell, 1992 ; Buerkle et coll., 1999 ; Pertovaara, 2006 ; Stein et coll., 2009].

Parallèlement à ses effets anti-nociceptifs accrus dans les pathologies inflammatoires, la clonidine posséderait également une activité anti-inflammatoire par la diminution de la

concentration de cytokines pro-inflammatoires (IL1 β et TNF α) et l'augmentation de la concentration de médiateurs à caractère anti-inflammatoire (TGF β) [WO2009/101210, 2009]. Ces deux actions combinées confèrent donc à la clonidine un intérêt potentiel dans le traitement de l'OA et l'AR.

2. Bétaméthasone (dipropionate)

Le dipropionate de bétaméthasone est une molécule hydrophobe présentant des caractéristiques anti-inflammatoires largement reconnues. Cette seconde molécule, dont les propriétés physico-chimiques diffèrent de celles de la clonidine, a été encapsulée dans les microsphères de PLGA.

2.1 Aspect physico-chimique

Le dipropionate de bétaméthasone, C₂₈H₃₇FO₇, est un glucocorticoïde d'un PM de 504,6 g/mol (Figure 21).

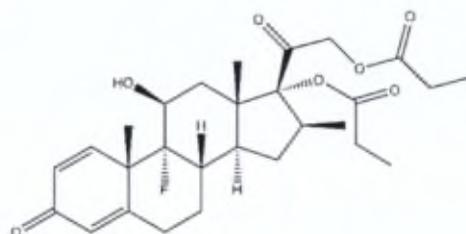


Figure 21 : Structure du dipropionate de bétaméthasone.

Cette molécule est pratiquement insoluble dans l'eau, facilement soluble dans l'acétone et le dichlorométhane et assez soluble dans l'éthanol [Pharmacopée Européenne 7^{ème} édition, 2012]. La solubilité du dipropionate de bétaméthasone dans l'eau est extrêmement faible (≈ 1 μ g/ml).

2.2 Aspect pharmacologique

Le dipropionate de bétaméthasone exerce son action anti-inflammatoire en se liant aux récepteurs aux glucocorticoïdes cytoplasmiques après avoir traversé la membrane cellulaire. Après liaison à un glucocorticoïde, le récepteur transloque dans le noyau cellulaire où la régulation de l'expression de gènes cibles a lieu. L'action finale du corticostéroïde provoque la production de protéines anti-inflammatoires (IL10, IL1-Ra, annexine 1) mais également la

suppression de la production de protéines pro-inflammatoires (IL1 β , IL2, IL3, IL4, IL5, IL6, IL8, IL17, IL18, TNF α , enzymes inductibles) [Adcock, 2004 ; Barnes, 2006].

2.3 Aspect thérapeutique

Étant lipophile en raison de la présence du double ester, le dipropionate de bétaméthasone est majoritairement utilisé pour des applications topiques. Sa lipophilie lui permet de pénétrer aisément la peau, où cette pro-drogue libère un simple ester actif [Hammer et coll., 2003].

Le dipropionate de bétaméthasone se retrouve sous forme de crème (*Diprolène*[®] et *Diprosone*[®], 0,5 mg/g), de solution ou de pommade (*Diprosone*[®], 0,5 mg/g) délivrées en cas d'affections cutanées inflammatoires importantes telles que l'eczéma ou le psoriasis. Pour le traitement spécifique du psoriasis, le dipropionate de bétaméthasone peut se trouver en combinaison avec l'acide salicylique (*Diprosalic*[®]) ou le calcipotriol (*Dovobet*[®], *Xamiol*[®]). Le dipropionate de bétaméthasone se retrouve enfin en combinaison avec le phosphate sodique de bétaméthasone dans le *Diprophos*[®] (5 mg/ml + 2 mg/ml, respectivement), préparation dépôt injectée en tant que traitement additionnel lors d'affections rhumatologiques (OA, AR), dermatologiques ou allergiques [CBIP, 2013].

Le dipropionate de bétaméthasone, administré localement, est associé à de nombreux effets secondaires tels que des réactions allergiques, une atrophie cutanée, des vergetures, un risque d'infection, une cicatrisation retardée et une hypertrichose. En IA, il peut accentuer la dégradation du cartilage et provoquer de l'ostéonécrose [Gossec et Dougados, 2006 ; CBIP, 2013]. Dès lors, la libération prolongée et donc progressive du dipropionate de bétaméthasone obtenue grâce aux microparticules permettrait d'en réduire les effets secondaires tout en agissant localement sur les médiateurs libérés par les synoviocytes, chondrocytes et autres cellules de l'inflammation.

B. But général du travail

À l'heure actuelle, le traitement des pathologies articulaires manque fortement de possibilités avantageuses du point de vue de l'enrayement de l'inflammation, du soulagement de la douleur et de la viscosupplémentation. Les options thérapeutiques courantes sont également accompagnées d'une méconnaissance des effets à long terme ou des effets indésirables inévitables apparaissant suite à leur utilisation chronique. Le développement de nouvelles options thérapeutiques est donc essentiel, afin de rendre ce traitement plus efficace et supportable et d'augmenter la compliance du patient. Le but des formulations développées dans ce travail est donc de combiner les effets anti-inflammatoires et régénératifs du cartilage tout en réduisant au maximum la fréquence d'administration et par conséquent les effets secondaires. Une combinaison de ces formulations avec des traitements non-pharmacologiques et/ou avec des agents biologiques pourrait alors être envisagée.

L'utilisation d'un système de délivrance à libération prolongée et localisée permet de remplir ces attentes. La connaissance étendue de la biocompatibilité et de la biodégradation des polymères de PLGA a largement contribué à leur sélection. L'encapsulation d'un principe actif dans des microsphères de PLGA permet sa libération lente et modulable.

La clonidine a été utilisée en tant que principe actif modèle afin d'optimiser les efficacités d'encapsulation des microparticules de PLGA. La petite taille et l'hydrophilie de cette molécule sont effectivement deux caractéristiques influençant fortement la capacité d'encapsulation. Le dipropionate de bétaméthasone, anti-inflammatoire connu, a ensuite été utilisé comme molécule hydrophobe, dont les efficacités d'encapsulation ont rapidement été satisfaisantes.

La libération de ces deux molécules a été déterminée et optimisée afin d'obtenir un délai de libération de minimum 4 à 6 semaines, durée appropriée pour le traitement prolongé des affections articulaires étudiées et l'augmentation de la compliance du patient. Les mécanismes impliqués dans la libération (diffusion, dégradation et érosion) ont aussi été étudiés afin d'approfondir la compréhension de la libération prolongée des molécules.

Enfin, la toxicité et l'efficacité des formulations optimisées ont été déterminées sur différents modèles cellulaires (chondrocytes, synoviocytes et les cellules mononuclées du sang périphérique (peripheral blood mononuclear cell, PBMC)). Un effet anti-inflammatoire de la clonidine était initialement supposé et a donc été vérifié, en utilisant la bétaméthasone comme contrôle positif.

C. Matériel et méthodes général

I. Matériel

Les différents produits chimiques utilisés au cours de ce travail sont repris dans le Tableau 5.

Tableau 5 : Fournisseurs et provenance des produits chimiques utilisés.

Nom du produit	Pureté	Fournisseur	Provenance
Acétone, Envisolv [®]	≥ 99,9%	Sigma-Aldrich	Munich, Allemagne
Acétonitrile, E Chromasolv [®]	≥ 99,9%	Merck	Darmstadt, Allemagne
Acide chlorhydrique 0,1 N, Titripur [®]		Merck	Darmstadt, Allemagne
Acide phosphorique 85%	Ph.Eur.	Riedel de Haën	Seelze, Allemagne
Alcool polyvinylique (87-90% hydrolyzed)		Sigma-Aldrich	Munich, Allemagne
Azide de sodium, Reagent Plus [®]	≥ 99,5%	Sigma-Aldrich	Munich, Allemagne
Béclométhasone, dipropionate	≥ 99%	Sigma-Aldrich	Munich, Allemagne
Bétaméthasone, dipropionate	Ph.Eur.	Fagron	Waregem, Belgique
Citrate de sodium	Ph.Eur.	Merck	Darmstadt, Allemagne
Clonidine HCl		Chemicals International Group	Holte, Danemark
D(+)-Glucose monohydraté	Ph.Eur.	Merck	Darmstadt, Allemagne
Dichlorométhane, Emsure [®]	Ph.Eur.	Merck	Darmstadt, Allemagne
Hyaluronate de sodium		European Technologies Inc	Dolni Dobrouc, République Tchèque
Hydroxyde de sodium	Ph.Eur.	Merck	Darmstadt, Allemagne
Méta-Xylène	≥ 99,0%	Sigma-Aldrich	Munich, Allemagne
Méthanol, Chromasolv [®]	≥ 99,9%	Sigma-Aldrich	Munich, Allemagne
Octanesulfonate de sodium monohydraté	≥ 99,9%	Sigma-Aldrich	Munich, Allemagne
Oxyde d'aluminium anhydre		Merck	Darmstadt, Allemagne
Phosphate buffer saline (PBS), pH 7,4		GIBCO, Invitrogen	Paisley, Angleterre
Phosphate disodique	Ph.Eur.	Merck	Darmstadt, Allemagne
Phosphate monopotassique	Ph.Eur.	Merck	Darmstadt, Allemagne
PLGA 34 000 Da, Resomer RG 503		Boehringer Ingelheim	Ingelheim, Allemagne
PLGA 48 000 Da, Resomer RG 504		Boehringer Ingelheim	Ingelheim, Allemagne
PLGA 96 000 Da, Resomer RG 505		Boehringer Ingelheim	Ingelheim, Allemagne
Tétrahydrofurane	≥ 99,9%	Sigma-Aldrich	Munich, Allemagne
Tizanidine HCl		Sigma-Aldrich	Munich, Allemagne
Polysorbate 80, Tween 80		Sigma-Aldrich	Munich, Allemagne

II. Méthodes générales

Dans ce paragraphe seront décrites les méthodes communes à toutes les parties expérimentales. Les méthodes spécifiques seront détaillées dans les parties expérimentales correspondantes.

1. Encapsulation de principes actifs

1.1 Composition des émulsions

L'encapsulation de la clonidine dans les microparticules a été réalisée selon une double émulsion E/H/E. La formulation optimale des microparticules de clonidine est basée sur la composition suivante : PLGA 96 000 Da : 1 g, phase organique (dichlorométhane) : 7,5 ml, clonidine HCl : 10 mg, w_1 (pH 3) : 1 ml, PVA : 100 mg, w_2 (pH 8) : 100 ml.

L'encapsulation du dipropionate de bétaméthasone a été réalisée à l'aide d'une simple émulsion H/E. La formulation optimale des microparticules de bétaméthasone est basée sur la composition suivante : PLGA 96 000 Da : 1 g, phase organique (dichlorométhane) : 7,5 ml, dipropionate de bétaméthasone : 10 mg, PVA : 100 mg, w : 100 ml.

1.2 Production de l'émulsion

Les émulsions H/E et E/H/E ont été obtenues à l'aide d'homogénéisateurs haute vitesse (Ultra-Turrax[®]). L'émulsion est progressivement aspirée dans la tête de dispersion grâce à la haute vitesse du rotor pour être comprimée à travers les fentes de la tige choisie. Les gouttelettes de l'émulsion sont soumises à d'importantes forces de cisaillement et de poussées ainsi qu'à une haute turbulence [Site Internet Imlab, 2012]. En plus d'assurer le mélange de l'émulsion, cette méthode réduit la taille des gouttelettes de l'émulsion (Figure 22).

Deux types d'homogénéisateurs haute vitesse ont été utilisés en fonction des volumes de travail. La première émulsion E/H (1 à 10 ml) a été réalisée à 30 000 rpm durant 2 minutes à l'aide de l'Ultra-Turrax[®] T10-basic muni d'une tige S10N5G (Ika-Werke, Staufen, Allemagne). La seconde émulsification E/H/E et l'émulsion H/E (100 à 300 ml) ont été effectuées à 8 000 rpm durant 2 minutes en utilisant le modèle T25 muni d'une tige S25N18G (Ika-Werke, Staufen, Allemagne).

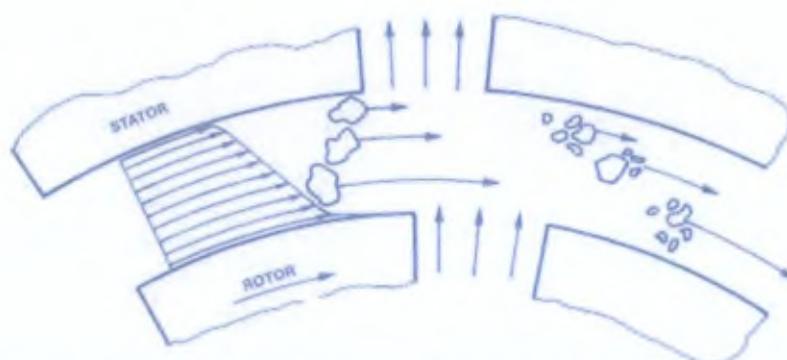


Figure 22 : Principe de fonctionnement de l'Ultra-Turrax®. L'homogénéisation (le mélange ou la réduction de taille) est basée sur le frottement de particules solides (suspensions) ou de gouttelettes (émulsions) dans le gradient de vitesse généré par les interstices des tiges mobiles (rotor) et fixes (stator) [Adapté du Site Internet Imlab, 2012].

1.3 Formation et récupération des microparticules

Les microparticules sont formées suite à l'évaporation progressive du solvant organique qui s'est déroulée sous hotte, à température ambiante et à pression atmosphérique. Le système d'agitation choisi pour favoriser l'évaporation a été un agitateur de type moteur électrique RW47D muni d'une hélice à 4 pales (Ika-Werke, Staufen, Allemagne). Ce type d'agitateur à hélice permet une agitation contrôlée et dont la vitesse est reproductible. L'évaporation du solvant (volume total de l'émulsion de 100 à 300 ml) a été réalisée à 200 rpm durant 3 heures. Les microparticules formées après ce délai ont été récoltées soit par filtration sur filtres en papier Grade 50 : 2,7 μm (Whatman, Leuven, Belgique) facilitant leur récupération par grattage, suivie d'un séchage sous vide durant 48 heures, soit par centrifugation à 3000 x g pendant 10 minutes, suivie de leur lyophilisation (voir *Partie expérimentale - Encapsulation, II.4 Dessiccation des microparticules*).

2. Caractérisation physico-chimique des formulations

2.1 Quantification de la teneur en principe actif

La teneur en principe actif des microparticules a été déterminée par chromatographie liquide haute performance (HPLC). Il s'agit d'une chromatographie de partage qui utilise une phase mobile liquide et une phase stationnaire greffée très finement divisée. La méthode utilisée est dite à phase inversée car la phase mobile est un solvant relativement polaire alors que la phase stationnaire est de type non polaire. De cette façon, plus le composé est polaire, plus vite il sera élué de la colonne [Skoog et coll, 2002].

L'appareil HPLC utilisé était une HP 1200 series (Agilent Technologies, Diegem, Belgique), composée d'un dégazeur, d'une pompe quaternaire, d'un injecteur automatique, d'un four maintenant la température de la colonne à 25°C et d'un détecteur à barrette de diodes (diode array detector, DAD). Les résultats ont été collectés et analysés grâce au logiciel ChemStation Rev.B03.01-SR1 (Agilent Technologies, Diegem, Belgique).

2.1.1 Dosage de la clonidine

La méthode de dosage de la clonidine contenue dans les microparticules a été adaptée et validée à partir de la monographie du chlorhydrate de clonidine de la Pharmacopée américaine [USP, 21^{ème} édition].

Les conditions utilisées pour la méthode HPLC de dosage de la clonidine sont les suivantes : colonne analytique : Agilent® Zorbax Eclipse Plus C8 4,6 x 150 mm (3,5 µm) ; débit : 1,0 ml/min ; volume d'injection : 5 µl ; longueur d'onde de détection : 210 nm ; temps de rétention ≈ 7 minutes ; temps d'analyse : 10 minutes.

La phase mobile est composée d'un mélange eau : méthanol 50 : 50 (v/v). Elle contient un contre-ion, l'octanesulfonate de sodium, à raison de $5,086 \cdot 10^{-3}$ mol/l. Pour l'obtention d'1 litre de phase mobile, 1 ml d'acide phosphorique 85% est ajouté et le pH est ajusté à 3 à l'aide d'une solution d'hydroxyde de sodium 1N.

2.1.2 Dosage du dipropionate de bétaméthasone

La méthode de dosage du dipropionate de bétaméthasone contenu dans les microparticules provient de la Pharmacopée Européenne [Pharmacopée Européenne 7^{ème} édition, 2012].

Les conditions utilisées pour la méthode HPLC de dosage de la bétaméthasone sont les suivantes : colonne analytique : Agilent® Zorbax Eclipse XDB C18 4,6 x 150 mm (5 µm) ; débit : 1,0 ml/min ; volume d'injection : 100 µl ; longueur d'onde de détection : 254 nm ; temps de rétention ≈ 7 minutes ; temps d'analyse : 15 minutes.

La phase mobile est composée d'un mélange eau : acétonitrile 40 : 60 (v/v).

2.1.3 Validation analytique

Les différentes méthodes de dosage réalisées par HPLC ont été validées du point de vue de leur linéarité, exactitude, fidélité, et seuils de détection et quantification [Caporal-Gautier et coll., 1992]. Les résultats de ces validations sont joints en annexe (Annexe 1 et Annexe 2). Il faut cependant savoir que d'autres guides de validation existent, tels que les guides énoncés

par l'ICH et la FDA [ICH, 1994 ; FDA, 1995 ; FDA, 1996]. La corrélation entre la concentration « x » en principe actif et l'aire sous la courbe « y », de la série de N observations, a également été évaluée à l'aide d'un test de Student bilatéral sur le coefficient de corrélation « r » préalablement déterminé. Ce test est le suivant :

$$t = \frac{r}{\sqrt{(1-r^2)*(N-2)}} > t_{(0,05; N-2)} \quad (\text{Eq. 1})$$

Si t est significatif, une corrélation entre les variables « x » et « y » peut être statistiquement établie.

2.2 Extraction des principes actifs

Afin d'éviter l'injection du polymère dans le système chromatographique, une méthode d'extraction spécifique pour chaque principe actif a été mise au point et validée. Les méthodes développées se basent sur la solubilisation du polymère de PLGA dans un solvant organique, suivie de l'extraction du principe actif dans un second solvant non miscible au premier et qui induit la précipitation du polymère.

2.2.1 Extraction de la clonidine

Une quantité d'environ 10,0 mg de microsphères contenant la clonidine est pesée exactement dans un matras jaugé de 25,0 ml. Un volume de 2 ml de dichlorométhane est ajouté et laissé en contact avec les microsphères pendant environ 15 minutes, à température ambiante et sous hotte, afin de permettre la solubilisation du polymère. Après dissolution complète, le volume est complété à 25,0 ml par un mélange eau : méthanol 50 : 50 (v/v). Le matras est alors agité par inversion afin d'induire la précipitation du polymère et de permettre l'extraction de la clonidine vers la phase eau : méthanol. Après transfert de la totalité dans un tube à centrifuger de 50 ml (Sarstedt, Nümbrecht, Allemagne), l'échantillon est centrifugé pendant 30 minutes à 3 000 x g. Un petit volume du surnageant est filtré à l'aide d'un filtre Millex de porosité 0,22 µm (membrane fluoropore PTFE) (Millipore, Billerica, États-Unis). La quantité de clonidine présente dans l'aliquote est finalement déterminée par la méthode HPLC décrite précédemment. Le recouvrement, évalué à l'aide de tizanidine faisant office de standard interne, atteint 97 ± 4%.

2.2.2 Extraction du dipropionate de bétaméthasone

Une quantité d'environ 10,0 mg de microsphères contenant la bétaméthasone est pesée exactement dans un matras jaugé de 25,0 ml. Un volume de 2 ml de dichlorométhane est ajouté et laissé en contact avec les microsphères pendant environ 15 minutes, à température ambiante et sous hotte, afin de permettre la solubilisation du polymère. Après dissolution complète, le volume est complété à 25,0 ml par du méthanol. Le matras est alors agité par inversion afin d'induire la précipitation du polymère et de permettre l'extraction de la bétaméthasone vers le méthanol. Après transfert de la totalité dans un tube à centrifuger de 50 ml (Sarstedt, Nümbrecht, Allemagne), l'échantillon est centrifugé pendant 30 minutes à 3 000 x g. Un petit volume du surnageant est filtré à l'aide d'un filtre Millex de porosité 0,22 µm (membrane fluoropore PTFE) (Millipore, Billerica, États-Unis). La quantité de bétaméthasone présente dans l'aliquote est finalement déterminée par la méthode HPLC décrite précédemment. Le recouvrement, évalué à l'aide de dipropionate de bécloéthasone en tant que standard interne, atteint 99 ± 6%.

2.3 Expression de l'encapsulation du principe actif

L'encapsulation de principes actifs dans des microsphères s'exprime par l'*efficacité d'encapsulation* (EE). Ce paramètre se calcule de la façon suivante :

$$EE (\%) = \frac{\text{Charge réelle en principe actif}}{\text{Charge théorique en principe actif}} * 100 \quad (\text{Eq. 2})$$

avec,

$$\text{Charge théorique en principe actif} = \frac{\text{Principe actif}_i}{[\text{Principe actif}_i + \text{Polymère}_i]} \quad (\text{Eq. 3})$$

et,

$$\text{Charge réelle en principe actif} = \frac{\text{Principe actif}_{encaps}}{[\text{Principe actif}_i + \text{Polymère}_i]} \quad (\text{Eq. 4})$$

où les valeurs de Principe actif_i et Polymère_i sont égales aux quantités initiales de principe actif et polymère ajoutées à la formulation. La valeur du Principe actif_{encaps} est égale à la valeur déterminée par HPLC et équivaut à la quantité de principe actif réellement encapsulée dans les microparticules. L'EE a été déterminée en triplicat sur chaque formulation.

Il est aussi essentiel d'évaluer l'efficacité du procédé de fabrication des microparticules et ainsi, d'évaluer l'importance des pertes en matières premières, dues tant à l'opérateur qu'à la

fabrication, afin d'optimiser au mieux ce processus. Le *rendement de formulation* (R, %) permet d'évaluer la qualité du procédé :

$$R (\%) = \frac{\text{Microsphères}_t}{\sum m_{\text{composants}}} * 100 \quad (\text{Eq. 5})$$

où le paramètre Microsphères_t équivaut à la quantité totale de microsphères produites, récupérées et pesées.

2.4 Détermination de la distribution de taille des microsphères

La détermination de la distribution de taille par diffraction laser se base sur l'analyse de la diffraction de la lumière provoquée par les particules exposées à un rayonnement lumineux monochromatique [Pharmacopée Européenne 7^{ème} édition, 2012]. La technique de diffraction laser admet la théorie de la sphère équivalente, c'est-à-dire qu'elle suppose la sphéricité de toutes les particules de l'échantillon afin de pouvoir décrire chaque particule grâce à une dimension unique [Pharmacopée Européenne 7^{ème} édition, 2012].

La mesure de taille par diffraction laser repose sur le principe que les particules passant par le rayon laser dévient celui-ci avec une intensité et un angle directement liés à leur taille. L'angle de diffraction est inversement proportionnel à la taille de la particule alors que l'intensité de la diffraction lui est directement proportionnelle. De cette façon, plus les particules sont grandes, plus l'angle de diffraction sera petit mais plus l'intensité sera importante.

L'appareil de diffraction laser utilisé se base sur la théorie de Mie pour déterminer la distribution de taille des particules. Cette théorie requiert de connaître l'indice de réfraction des particules et du milieu ainsi que l'indice d'absorption des particules. La théorie de Mie permet d'obtenir des résultats de taille précis dans une large gamme (0,02 – 2000 μm) [Site Internet Malvern Instruments, 2012].

Un appareil de mesure de taille des particules par diffraction laser se compose d'une source lumineuse à une longueur d'onde fixe (He-Ne, $\lambda = 0,63 \mu\text{m}$), une lentille, un système de présentation de l'échantillon, un système de détection et un système d'acquisition des données (Figure 23).

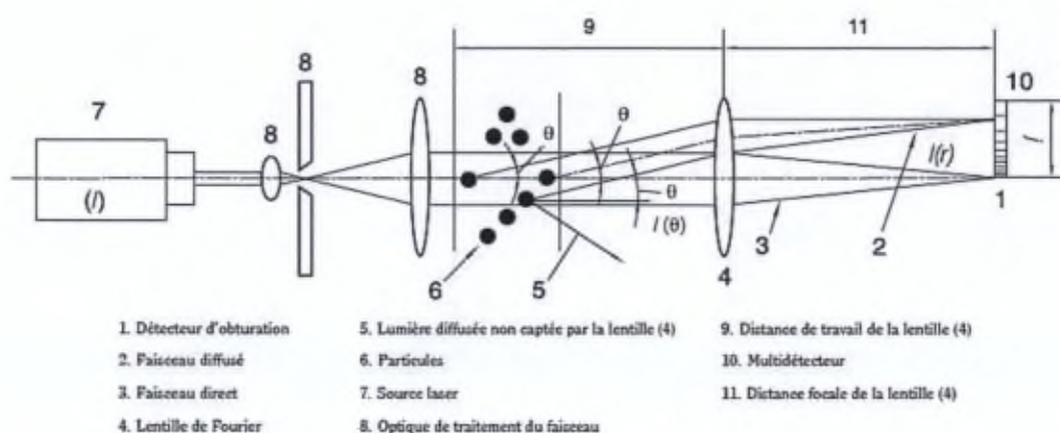


Figure 23 : Composition d'un système de diffraction laser [Pharmacopée Européenne 7ème édition, 2012].

La mesure de la distribution de taille des microparticules a été réalisée à l'aide d'un Mastersizer 2000[®] (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, Angleterre) équipé d'un système d'échantillonnage par voie humide (Hydro 2000 S[®]).

La taille des microsphères a été mesurée à deux temps différents : d'une part, suite à l'évaporation du solvant organique, c'est-à-dire qu'une fois les particules formées, un échantillon a été prélevé avant filtration/centrifugation pour la mesure de taille ; d'autre part, une fois séchées, les microsphères ont été remises en suspension dans un volume d'eau et mesurées à nouveau afin de s'assurer la constance de leur taille.

La procédure opératoire standard (SOP) suivante a été utilisée pour chaque mesure :

- Milieu dispersant : eau
- Indice de réfraction de l'eau : 1,33
- Indice de réfraction des microparticules (PLGA) : 1,55
- Indice d'absorption : 0
- Vitesse d'agitation : 1750 rpm
- Obscurité : environ 5%

Pour chaque échantillon, 5 mesures ont été réalisées et une moyenne a automatiquement été établie sur ces 5 mesures. Trois mesures indépendantes ont alors été exécutées (impliquant chacune 5 mesures) et les valeurs finales des différents diamètres découlent de la moyenne de ces 3 mesures indépendantes.

Les différents diamètres suivants caractérisent la distribution de taille :

- Le diamètre $D(0,1)$ est le diamètre en-dessous duquel se retrouvent 10% des particules.
- Le diamètre $D(0,5)$ est le diamètre en-dessous duquel se retrouvent 50% des

particules. Ce diamètre sépare exactement la distribution en deux parties égales. Il est également dénommé le diamètre médian.

- Le diamètre $D(0,9)$ est le diamètre en-dessous duquel se retrouvent 90% des particules.
- Le diamètre $D[4,3]$ est le diamètre moyen par volume. Ce diamètre est le plus représentatif des variations apparaissant au sein d'une distribution ; en effet, une variation dans une classe de valeurs de taille se fait directement sentir sur ce diamètre. Il est le plus sensible aux variations de taille des particules et notamment à la présence d'agglomérats.

2.5 Détermination de la morphologie des microsphères

La microscopie électronique à balayage (Scanning Electron Microscopy, SEM) permet de visualiser la morphologie et la microstructure des microparticules formées.

L'appareil SEM est composé d'un système optique électronique permettant de générer les électrons, un plateau où placer l'échantillon, un détecteur pour collecter les électrons secondaires, un système d'acquisition de l'image et une console permettant de faire varier différents paramètres (Figure 24) [Site Internet Jeol, 2012]. Le système optique électronique contient le canon à électrons qui génère des électrons à partir d'un filament de tungstène (cathode) chauffé à très haute température. Ces électrons sont concentrés ensemble pour former un faisceau et s'écoulent par une plaque métallique (anode) sur laquelle un voltage positif est appliqué. L'irradiation de l'échantillon par le faisceau d'électrons provoque la réémission d'électrons secondaires par la surface de l'échantillon. Les électrons secondaires sont finalement amplifiés en signal électrique par le détecteur et transmis au système d'acquisition de l'image (Figure 24) [Briggman et Bock, 2012 ; Site Internet Jeol, 2012].

Une fois que les électrons ont pénétré dans l'échantillon, ils perdent leur énergie et sont absorbés. Si un échantillon est conducteur, les électrons sont capables de le traverser ; si l'échantillon n'est pas conducteur, les électrons s'arrêtent dans l'échantillon et les électrons secondaires ne sont pas réémis. Afin de rendre les échantillons conducteurs, une fine couche de métal très conducteur (Au, Pt) est appliquée sur l'échantillon avant l'analyse [Site Internet Jeol, 2012].

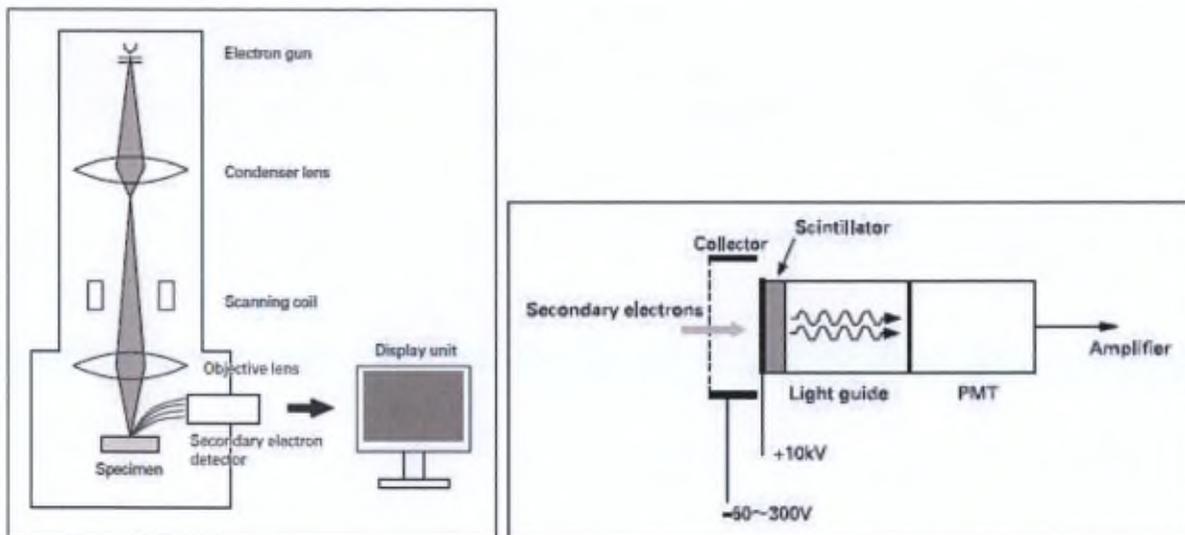


Figure 24 : Composition basique d'un microscope électronique à balayage (gauche) et du détecteur à électrons secondaires (droite). Le système optique électronique est composé d'un canon à électrons, de lentilles servant à produire le fin faisceau d'électrons et d'une bobine de balayage permettant de balayer l'échantillon complet avec le faisceau d'électrons [Site Internet Jeol, 2012].

La morphologie et la microstructure des microparticules ont été observées à l'aide d'un microscope électronique à balayage JSM-610 (Jeol, Tokyo, Japon). Les échantillons ont été déposés sur une lame de carbone et recouverts d'une fine couche d'or afin de les rendre conducteurs. Le marquage métallique a été effectué à l'aide du Balzers SCD 030 (Balzers Union Ltd., Liechtenstein).

2.6 Détermination de l'état physique des principes actifs et microsphères

La diffraction des rayons X sur poudre (PXRD) produit, à partir de chaque fraction cristalline contenue dans une substance, une image. Ce diffractogramme procure trois informations [Pharmacopée Européenne 7^{ème} édition, 2012] :

- La position angulaire des raies de diffraction, dépendante de la géométrie et de la taille du réseau cristallin.
- L'intensité des raies de diffraction, dépendante notamment de la position et de l'arrangement des atomes ainsi que de l'orientation des particules dans l'échantillon analysé.
- La forme des raies de diffraction, dépendante de la résolution de l'appareil de diffraction, de la taille de la fraction cristalline et de l'épaisseur de l'échantillon.

Les parties cristallines de la substance produisent des raies de diffraction alors que les fractions amorphes n'en génèrent pas. L'identification des phases cristallines ainsi qu'une

estimation des fractions amorphes et cristallines contenues dans une substance peuvent être réalisées à partir de l'étude de la position et de l'intensité des raies de diffraction [Pharmacopée Européenne 7^{ème} édition, 2012].

Les analyses PXRD ont été réalisées à l'aide d'un diffractomètre Bruker D5000 (Siemens, Munich, Allemagne) équipé d'une anode cuivrique ($\lambda=1,5406 \text{ \AA}$ – 40 kV, 40 mA), d'un monochromateur graphite et d'un détecteur à scintillation (2 θ : 2°-70°, largeur des variations : 0,02°).

2.7 Analyse thermique

2.7.1 Thermogravimétrie

L'analyse thermogravimétrique (TGA) permet de suivre l'évolution de la masse d'un échantillon en fonction de la température [Pharmacopée Européenne 7^{ème} édition, 2012]. L'échantillon subit une modification de température contrôlée et sa masse est enregistrée tout au long du processus.

L'appareil de TGA est composé d'un système permettant de refroidir ou chauffer l'échantillon sur base du protocole déterminé préalablement, un porte-échantillon, un contrepoids, une balance permettant la tare initiale et la pesée de l'échantillon durant l'analyse et un système d'acquisition des données [Pharmacopée Européenne 7^{ème} édition, 2012].

La température de dégradation de chaque constituant de la formulation a été déterminée par TGA (TGA Q500, TA Instruments, Zellik, Belgique). Cette étape est nécessaire et préalable aux analyses DSC (voir *C.II.2.7.2 Calorimétrie différentielle à balayage*). Pour ce faire, 10 mg de chaque composé (clonidine HCl, dipropionate de bétaméthasone, PLGA et PVA) ont été chauffés dans une gamme de température allant de 25 à 400°C, en utilisant une vitesse de chauffe de 10°C/min.

La TGA a également été utilisée pour déterminer la présence et la quantité de solvant résiduel dans les formulations finies. Cette valeur est en effet importante car limitée pour certains solvants (dichlorométhane) mais également influente sur la qualité du stockage à long terme (voir *C.II.2.8 Quantification des solvants résiduels*). Pour ce faire, 10 mg de microsphères ont été chauffés de 25 à 200°C, en utilisant une vitesse de chauffe de 10°C/min. L'élimination éventuelle du dichlorométhane se produira aux alentours de 40°C alors que l'eau s'évaporerait aux alentours de 100°C.

2.7.2 Calorimétrie différentielle à balayage

La calorimétrie différentielle à balayage (DSC) détermine les modifications des propriétés physiques d'un échantillon au cours du temps en fonction de la température, tout en permettant de connaître la température à laquelle le phénomène se produit ainsi que le flux de chaleur engagé dans la transition. Le phénomène thermique peut libérer (phénomène exothermique) ou emmagasiner (phénomène endothermique) de la chaleur [Pharmacopée Européenne 7^{ème} édition, 2012 ; Gil et coll., 2010].

L'appareil de DSC est composé d'un four contenant le porte-échantillon, une cellule de référence et une cellule échantillon, un/plusieurs détecteur(s) thermique(s) et un système d'acquisition des données. Au cours de la procédure déterminée, une différence de température survient entre la cellule de référence et la cellule échantillon, différence qui est transposée en valeur de flux de chaleur par le système d'acquisition [Pharmacopée Européenne 7^{ème} édition, 2012 ; Gil et coll., 2010].

La DSC (DSC Q2000, TA Instruments, Zellik, Belgique) a été principalement utilisée pour déterminer la température de transition vitreuse (T_g) du polymère de PLGA. Les échantillons ont toujours été analysés suivant un mode chauffe/refroidissement/chauffe. Il est en effet essentiel pour les microsphères polymériques de préalablement effacer leur passé thermique. Le vieillissement physique des PLGA se produit lors du stockage, c'est-à-dire lorsque les conditions présentent une température inférieure à la T_g du polymère. Dans ces conditions, les chaînes du polymère amorphe (PLGA) entrent dans un état de 'relaxation', de réarrangement moléculaire impliquant les chaînes latérales et non la structure principale. Ceci s'associe à une augmentation de la stabilité du polymère et de sa densité générant parfois des systèmes plus cassants et plus durs. Le vieillissement physique du PLGA est observable en DSC par la superposition des premier et deuxième cycles de chauffe [Cortes et Montserrat, 1994 ; Rouse et coll., 2007]. Il faut cependant veiller à ne pas confondre le phénomène endothermique observé durant le premier cycle avec la T_g du polymère car il s'agit de l'expression du vieillissement. Le mode chauffe/refroidissement/chauffe est donc nécessaire afin de dépasser la T_g du polymère, ce qui permet d'effacer son historique thermique.

Des échantillons entre 1 et 3 mg ont été pesés dans des cupules Tzero en aluminium, scellées avec un capuchon en aluminium (TA Instruments, Zellik, Belgique). Les échantillons ont été chauffés de $-30,0^{\circ}\text{C}$ à $+200,0^{\circ}\text{C}$ à une vitesse de chauffe de $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$, puis refroidis jusque $-30,0^{\circ}\text{C}$ à $20^{\circ}\text{C}/\text{min}$ et à nouveau chauffés jusque $+200,0^{\circ}\text{C}$ à $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Toutes les analyses

ont été effectuées sous un flux d'azote de 50 ml/min. La Tg du polymère a été déterminée durant le second cycle de chauffe.

La DSC a également été utilisée au cours de ce travail afin d'évaluer la compatibilité des produits incriminés. Un mode opératoire identique a été utilisé.

2.8 Quantification des solvants résiduels

L'utilisation de dichlorométhane durant le procédé de fabrication des microsphères impose sa quantification afin d'en connaître les résidus dans le produit fini. En effet, les solvants résiduels présentent non seulement un risque de toxicité non négligeable pour l'humain, mais également un risque d'altération physico-chimique du produit pharmaceutique fini [Witschi et Doelker, 1997]. Des guidelines ont été développées afin de définir les limites autorisées pour les solvants résiduels dans les produits pharmaceutiques. Le dichlorométhane fait partie de la classe II, englobant « les solvants dont l'utilisation est soumise à limitation tels que les carcinogènes animaux non-génotoxiques ou éventuels agents causals d'autres effets toxiques irréversibles tels que la neurotoxicité ou la tératogénicité ». La limite autorisée pour le dichlorométhane est égale à 600 ppm [ICH, 2011 ; Pharmacopée Européenne 7^{ème} édition, 2012].

La teneur en dichlorométhane résiduel a été quantifiée par chromatographie gazeuse (GC). La GC se base sur la séparation et la quantification de composés à l'état gazeux ; les composés doivent donc pouvoir être transformés à l'état de vapeur par chauffage et être thermostables et suffisamment volatils [Rouessac et Rouessac, 2004].

Les résidus en dichlorométhane ont été quantifiés par GC à l'aide d'un Auto/HRGC/MS (Carlo Erba Instruments, Wigan, Royaume-Uni). Les échantillons ont été injectés à l'aide d'une seringue de 5 µl munie d'une aiguille de 7 cm (Grace, Lokeren, Belgique). Les conditions utilisées sont les suivantes : colonne capillaire Chrompack wcot fused silica 25m x 0,32 mm (polydiméthylsiloxane) (Chrompack, Belgique) ; gaz vecteur He, 35 kPa ; température de l'injecteur : 200°C ; température du détecteur à ionisation de flamme (FID) : 150°C ; température de la colonne : 30°C pendant 10 minutes ensuite augmentation jusqu'à 130°C à 40°C/minute, 130°C pendant 10 minutes ; volume d'injection : 1,5 µl.

Le standard interne utilisé est le méta-xylène, préparé à raison de 0,1% (v/v) dans l'acétone. Les temps de rétention du dichlorométhane et du méta-xylène sont d'environ 5,50 minutes et 17 minutes, respectivement. Une droite d'étalonnage du dichlorométhane dans une solution

d'acétone contenant 0,1% (v/v) de méta-xylène a été réalisée entre 0,025% (v/v) et 0,5% (v/v). Pour chaque formulation, 3 pesées indépendantes ont été effectuées. Sur chaque pesée indépendante de microsphères, 3 injections ont été réalisées.

2.9 Détermination de la viscosité du polymère et du véhicule

La viscosité du polymère et du véhicule permettant la remise en suspension des microparticules a été déterminée à l'aide du viscosimètre Brookfield LVDV-II+ (Brookfield Engineering Laboratories, Massachusetts, États-Unis) équipé d'un adaptateur et d'une broche S18 et couplé à un échangeur thermique.

La viscosité du polymère est mesurée à 25°C, en utilisant une vitesse de rotation de 20 rpm. Les solutions de polymère (RG503, RG504 et RG505) sont préparées en dissolvant une quantité de polymère dans 20 ml de dichlorométhane, de façon à obtenir des concentrations de 5, 10 et 15% (m/v).

La viscosité du véhicule a été déterminée à 25°C, en utilisant une vitesse de rotation de 100 rpm.

D. Partie expérimentale

Optimisation de l'encapsulation de principes actifs dans les microsphères de PLGA et caractérisation des particules.

I. But

La première partie de ce travail a consisté en la production de microsphères contenant de la clonidine présentant les efficacités d'encapsulation les plus élevées. En plus d'être très hydrophile, la clonidine est caractérisée par un faible PM, ce qui représente deux particularités défavorables à son encapsulation dans des microsphères de PLGA. Ce premier travail d'optimisation était donc primordial avant d'aborder la suite du projet. Le processus de double émulsion sur lequel est basée la fabrication des microparticules se caractérise par de nombreux paramètres pouvant être modulés afin d'augmenter l'efficacité de l'encapsulation. La taille moyenne des microparticules a également dû être optimisée de façon à atteindre un intervalle de taille compris entre 10 et 30 μm , taille souhaitée pour l'administration intra-articulaire.

La caractérisation ultérieure des microparticules de clonidine a contribué au travail d'optimisation. L'efficacité d'encapsulation, la taille, la morphologie, la cristallinité et la teneur en solvants résiduels des microparticules ont été déterminées. Enfin, la libération prolongée de la clonidine a été évaluée. L'objectif initial était de garantir une libération perdurant sur minimum 4 à 6 semaines. Un modèle mathématique appliqué aux différentes études de dissolution *in vitro* a été développé afin de mieux comprendre les différents phénomènes régissant la libération.

Parallèlement, nous avons comparé l'encapsulation d'une petite molécule hydrophile avec l'encapsulation d'une molécule hydrophobe, le dipropionate de bétaméthasone. Son choix s'est basé sur ses propriétés anti-inflammatoires et son appartenance à la famille des corticostéroïdes. En effet, l'application de ce travail étant notamment de limiter l'usage et les effets secondaires des corticostéroïdes dans le traitement des affections de type arthrite rhumatoïde et arthrose, il nous a semblé intéressant de la sélectionner en tant que molécule comparative.

II. Méthodes spécifiques

1. Étude de la libération du principe actif

Les études de libération ont été réalisées sur des quantités de microsphères déterminées en fonction de l'encapsulation du principe actif. La quantité finale de principe actif à libérer a été fixée à 450 µg pour la clonidine et 5 mg pour la bétaméthasone. Ces doses ont été choisies en fonction des spécialités actuellement sur le marché (respectivement le *Catapressan*[®] et le *Diprophos*[®]).

Les études de libération ont été réalisées en adaptant les volumes de milieu de dissolution en fonction du principe actif étudié de façon à respecter les conditions sink, c'est-à-dire que le volume de liquide choisi permet d'éviter l'influence de la fraction de la molécule dissoute sur la vitesse de dissolution de la fraction de la molécule non-dissoute. Basées sur la solubilité de la molécule seule, les conditions sink sont remplies en s'assurant que la molécule ne soit pas présente dans le milieu de dissolution à plus de 15% par rapport à sa concentration à saturation.

1.1 Étude de la libération de la clonidine

Les pesées de microsphères déterminées sur base des EE et de la quantité à libérer finalement (450 µg) sont mises dans des erlenmeyers de 100 ml à bouchons vissés, remplis de 75 ml de PBS (pH 7,4 ± 0,05) contenant 0,02% (m/v) d'azide de sodium. Les erlenmeyers sont placés dans un bain-marie à 37,0 ± 0,1°C et agités horizontalement à 85 cycles/min (agitateur bain-marie GFL 1086, GFL, Burgwedel, Allemagne). À des intervalles de temps déterminés (t = 2h, 4h, 6h, 24h, 72h, 168h, 264h, 336h, 432h, 504h, 600h, 672h, 768h et 840h), l'agitation est arrêtée durant 15 minutes de façon à permettre la sédimentation de la majorité des microsphères. À l'aide d'une seringue de 5 ml (BD Discardit II, VWR, Leuven, Belgique), environ 1 ml du milieu de dissolution est prélevé de chaque erlenmeyer et centrifugé à 15 000 x g pendant 5 minutes dans des microtubes à centrifugation. 250 µl sont alors prélevés du surnageant et dilués dans 750 µl d'une solution contenant 62,5% de méthanol (v/v), 37,5% d'eau déionisée (v/v) et 6,37*10⁻³ mol/l d'octanesulfonate de sodium. L'excès du milieu de dissolution est reversé dans les erlenmeyers respectifs après dispersion des microparticules restant dans le fond du microtube à centrifugation. Enfin, 250 µl de milieu de dissolution frais sont ajoutés à chaque erlenmeyer afin de maintenir un volume constant.

La concentration de clonidine dans l'échantillon est déterminée par HPLC. La méthode HPLC utilisée est similaire à celle décrite précédemment (voir *Matériel et méthodes général, II.2.1.1 Dosage de la clonidine*) mis à part que le volume d'injection a été augmenté à 50 μ l afin d'améliorer la sensibilité de la méthode, les quantités de clonidine progressivement libérées étant faibles. Cette méthode de dosage a également été validée du point de vue de sa linéarité, exactitude, fidélité, et seuils de détection et quantification [Caporal-Gautier et coll., 1992]. Les résultats de cette validation sont joints en annexe (Annexe 3).

Pour chaque formulation, la détermination *in vitro* de la libération de la molécule a été réalisée en triplicat.

1.2 Étude de la libération de la bétaméthasone

La bétaméthasone présentant une très faible solubilité dans l'eau ($\approx 1 \mu\text{g/ml}$), les paramètres ont été ajustés afin de respecter les conditions sink mais également de pouvoir travailler dans des volumes raisonnables : (i) un surfactant a été ajouté dans le milieu de dissolution afin d'améliorer la solubilisation de la molécule progressivement libérée, (ii) les volumes de milieu de dissolution ont été augmentés jusqu'à 800 ml et (iii) la quantité totale de principe actif à libérer a été divisée par 10 (500 μg).

Les pesées de microsphères déterminées sur base des EE et de la quantité à libérer (500 μg) sont mises dans des erlenmeyers de 1000 ml à bouchons vissés, remplis de 800 ml de PBS (pH $7,4 \pm 0,05$) contenant 0,1% (m/v) de polysorbate 80 et 0,02% (m/v) d'azide de sodium. Les erlenmeyers sont placés dans un bain-marie à $37,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ et agités horizontalement à 85 cycles/min (agitateur bain-marie GFL 1086, GFL, Burgwedel, Allemagne). À des intervalles de temps déterminés ($t = 2\text{h}, 4\text{h}, 6\text{h}, 24\text{h}, 72\text{h}, 168\text{h}, 264\text{h}, 336\text{h}, 432\text{h}, 504\text{h}, 600\text{h}, 672\text{h}, 768\text{h}$ et 840h), l'agitation est arrêtée durant 15 minutes de façon à permettre la sédimentation de la majorité des microsphères. Un volume d'environ 5 ml du milieu de dissolution est alors prélevé de chaque erlenmeyer et centrifugé à $15\ 000 \times g$ pendant 5 minutes dans un tube à centrifuger de 15 ml (Sarstedt, Nümbrecht, Allemagne). Les microparticules restant éventuellement dans le fond du tube à centrifugation sont remises en suspension dans 5 ml de milieu de dissolution frais et ajoutées à l'erlenmeyer correspondant afin de maintenir un volume constant.

La bétaméthasone est extraite de cet échantillon à l'aide de colonnes SPE (solid-phase extraction) de type Oasis MCX (Mixed-mode : Cation-eXchange and reverse-phase) (Waters, Zellik, Belgique). Ces colonnes permettent l'isolation d'un composé en fonction de ses

propriétés physico-chimiques (polarité, ionisation) et grâce à des phénomènes d'adsorption avec la phase stationnaire polymérique. L'éluat contenant la bétaméthasone est évaporé à sec et solubilisé dans un volume déterminé de phase mobile (acétonitrile:eau 60:40 (v/v)). La concentration de bétaméthasone dans l'échantillon est déterminée par HPLC. La méthode HPLC utilisée dans le cadre de la libération a été décrite préalablement (voir *Matériel et méthodes général, II.2.1.2 Dosage du dipropionate de bétaméthasone*). Pour chaque formulation, la détermination *in vitro* de la libération de la molécule a été réalisée en triplicat.

2. Modèle mathématique

L'application d'un modèle mathématique à la libération du principe actif déterminée expérimentalement permet d'approfondir la compréhension des mécanismes régissant la libération [Siepmann et Siepmann, 2008].

Les modèles mathématiques mécanistes, contrairement aux modèles (semi-)empiriques, sont basés sur les phénomènes réellement impliqués dans la libération tels que la diffusion, le gonflement du polymère, la dégradation ou l'érosion, ce qui les rend plus réalistes [Siepmann et Siepmann, 2008; Fredenberg et coll., 2011]. Ce type de modèle montre l'importance relative de chaque processus impliqué dans la libération, en plus de permettre une évaluation quantitative des effets de la composition et du procédé de fabrication de la formulation sur la vitesse de libération [Siepmann et Siepmann, 2008 ; Siepmann et Siepmann, 2012]. Afin de pouvoir résoudre les équations décrivant les procédés impliqués dans la libération sur lesquelles se basent les modèles mécanistes, certaines conditions, initiales et limites, doivent être connues et respectées telles que la distribution de la molécule dans le système et le maintien des conditions sink durant toute l'étude de dissolution [Siepmann et Siepmann, 2008].

Un modèle mathématique appliqué à la libération de la clonidine à partir des microsphères de PLGA a été développé afin d'évaluer les effets de la composition de la formulation sur le coefficient apparent de diffusion (D) de la clonidine dans les microparticules. Ce modèle mathématique découle de la seconde loi de Fick, qui considère que la libération du principe actif est contrôlée principalement par le phénomène de diffusion. Les conditions initiales et limites considérées pour ce modèle sont que la molécule se trouve sous forme de dispersion moléculaire dans les microparticules (solution monolithique) et que les conditions sink ont bien été respectées durant toute l'étude de libération [Siepmann et Siepmann, 2008]. De plus, la dégradation du polymère est considérée comme n'influençant pas la libération ; c'est

pourquoi le modèle mathématique n'a été appliqué qu'aux premières phases de la libération (entre les jours 0 à 7 ou 0 à 18 selon les formulations). En effet, après cela, la dégradation du polymère devient trop importante et doit être prise en compte.

Le modèle mathématique a été établi à l'aide du logiciel Mathematica 8.0.4 (Wolfram, Oxfordshire, Royaume-Uni).

3. Dessiccation des microparticules

La lyophilisation permet de retirer l'eau d'un produit congelé (solide, solution ou dispersion), en ayant recours au phénomène de sublimation. La glace passe directement de l'état solide à l'état gazeux, sans passer par un état intermédiaire liquide. Après sublimation de plus de 99% de l'eau contenue dans le produit initial, le produit final est anhydre ou pratiquement anhydre [Franks, 1998 ; Abdelwahed et coll., 2006]. La sublimation du produit congelé a lieu sous vide, en veillant à maintenir des conditions de vide et de température qui empêchent la décongélation de l'échantillon. Le processus de lyophilisation n'est possible qu'en travaillant à des températures et des pressions définies, de façon à se situer en dessous du point triple (Figure 25).

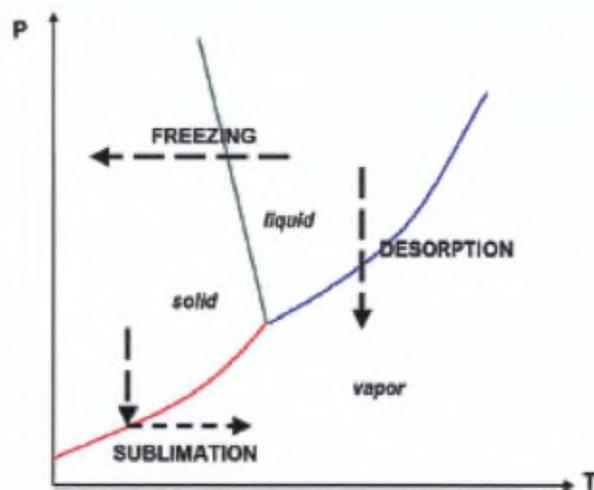


Figure 25 : Diagramme de phase de l'eau reprenant les différents phénomènes se produisant au cours du processus de lyophilisation [Lopez-Quiroga et coll., 2012].

La lyophilisation se décompose en quatre étapes successives (Figure 26). Les échantillons sont congelés directement sur les plateaux refroidis ou plus rapidement dans l'azote liquide (étape 1). La glace contenue dans les échantillons est ensuite sublimée grâce à la chaleur des plateaux. Cette étape de séchage des échantillons se déroule généralement sous une pression

réduite (étape 2). Une faible proportion d'eau non congelée pouvant subsister dans l'échantillon, une seconde étape de séchage, appelée généralement désorption, peut être effectuée en augmentant la température des plateaux (étape 3, absente du procédé de lyophilisation des microparticules développées). Enfin, la glace, condensée dans le condensateur, est éliminée du lyophilisateur par une augmentation de la température du condensateur (étape 4) [Franks, 1998 ; Abdelwahed et coll., 2006].

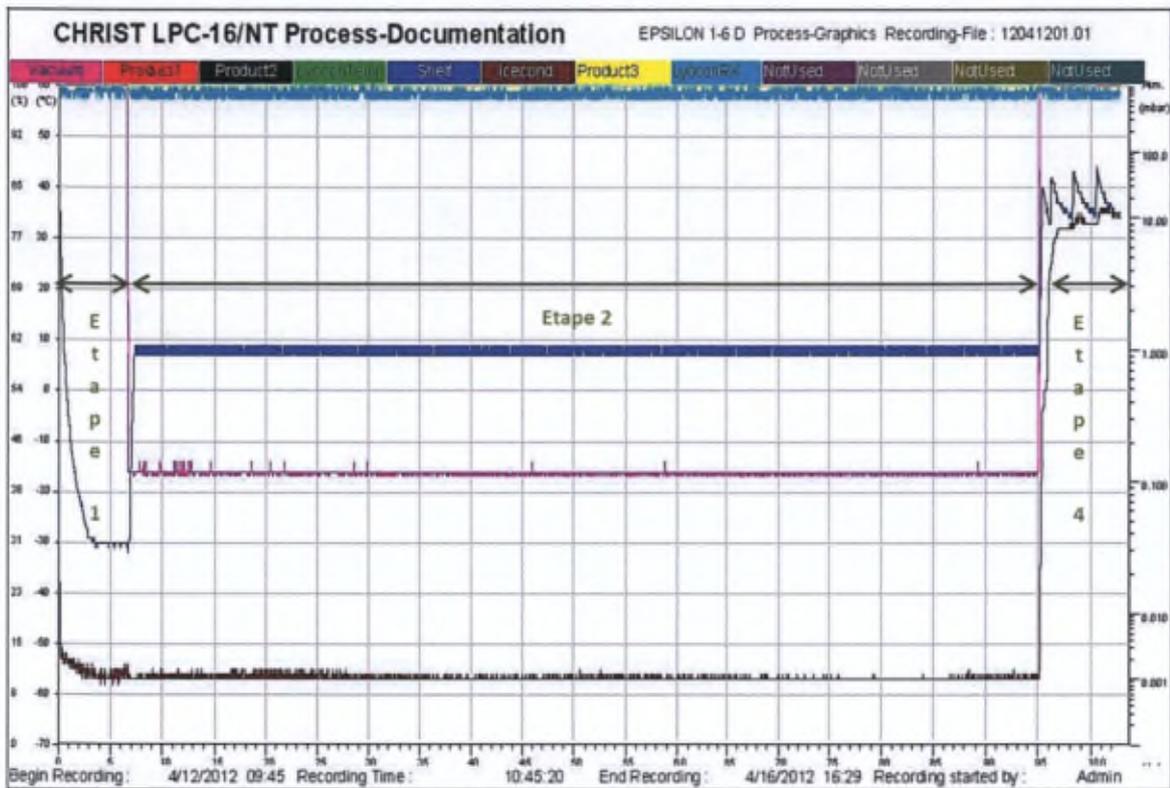


Figure 26 : Processus de lyophilisation utilisé pour les microparticules développées. La *courbe rose* représente le vide appliqué dans la chambre de séchage ; celui-ci est diminué lors de la sublimation des échantillons (0,120 bar). Le vide augmente de nouveau lors de la décongélation de la glace condensée. La *courbe bleue* représente la température des plateaux ; celle-ci est d'abord diminuée à -30°C pour la congélation des échantillons, ensuite elle est augmentée à 8°C pour la sublimation. Enfin, la *courbe brune* donne la température du condensateur, maintenue à environ -57°C pendant tout le processus ; sa température est augmentée uniquement pour décongeler la glace condensée.

Le lyophilisateur se compose d'une chambre de séchage, une pompe à vide (extrait l'air de la chambre de séchage), un condensateur (extrait la vapeur d'eau provenant de la sublimation), des plateaux et un système de fermeture des vials.

La lyophilisation des microparticules chargées en clonidine ou en bétaméthasone a été réalisée à l'aide du lyophilisateur Christ Epsilon 1-6 (Christ, Osterode am Harz, Allemagne),

associé au logiciel Martin Christ LPC-16NT (Christ, Osterode am Harz, Allemagne). Les paramètres utilisés pour la lyophilisation sont les suivants : congélation rapide des vials dans l'azote liquide ; température de congélation = - 30°C ; température des plateaux = 8°C ; vide correspondant à -40°C (= 0,120 bar) ; vide de sécurité correspondant à -35°C (= 0,220 bar). La durée de la lyophilisation s'étale entre 20 et 24 heures. Le glucose est ajouté à la formulation avant lyophilisation en tant que cryoprotectant, à raison de 0,1% (m/v).

III. Résultats et discussion

1. Microsphères de PLGA chargées en clonidine

Gaignaux A., Réeff J., Siepmann F., Siepmann J., De Vriese C., Goole J., Amighi K., Development and evaluation of sustained-release clonidine-loaded PLGA microparticles, *Int J Pharm* 437 (2012) 20-28 (Annexe 4).

1.1 Paramètres variés et effets sur l'encapsulation

La modulation des nombreux paramètres de la double émulsion permet de modifier l'EE d'une molécule, en modifiant entre autres le PM du polymère utilisé, la viscosité de la phase organique, le volume des phases aqueuses interne (w_1) et externe (w_2) et la charge théorique en principe actif [Ito et coll., 2007]. Grâce à l'évaluation progressive de l'influence de chaque paramètre du processus sur l'EE et le diamètre moyen $D[4,3]$ des microparticules, les paramètres de formulation ont été adaptés afin d'aboutir aux formulations présentant les EE les plus satisfaisantes.

1.1.1 Influence du poids moléculaire du polymère et de la viscosité de la phase organique

L'utilisation de PLGA de haut PM (96 000 Da) permet d'obtenir des microparticules avec une EE plus élevée (EE F3 = $10,8 \pm 0,1$ % ; EE F5 = 19 ± 3 %) (Tableau 6), en raison de la plus faible solubilité des PLGA de haut PM dans le dichlorométhane [Ito et coll., 2007].

Tableau 6 : Influence du PM et de la concentration du polymère sur l'EE et le diamètre moyen des microparticules de clonidine (Paramètres non modifiés : clonidine: 10 mg; PVA: 100 mg; w_1 : 0,5 ml; w_2 : 100 ml). pH w_1 = 4,0 – 5,0 ; pH w_2 = 5,0-7,0. Le $D[4,3]$ et l'EE sont exprimés en moyenne \pm écart-type (n = 3).

Paramètres	Formulations				
	1	2	3	4	5
PM PLGA (Da)	34 000	48 000	96 000	96 000	96 000
Polymère (g)	1	1	1	0,5	1,5
Phase organique (ml)	7,5	7,5	7,5	10	10
D[4,3] μm	34 ± 2	50 ± 3	53 ± 13	14 ± 4	254 ± 24
EE (%)	5 ± 1	$5,9 \pm 0,5$	$10,8 \pm 0,1$	$0,89 \pm 0,06$	19 ± 3

Leur précipitation et leur solidification plus rapides permettent d'encapsuler de plus grandes quantités de principe actif. Néanmoins, cela conduit également à des microsphères de diamètre plus élevé ($D[4,3] F5 = 254 \pm 24 \mu\text{m}$) [Yang et coll., 2001 ; Yeo et Park, 2004].

Une augmentation de la viscosité de la phase organique est observée en augmentant la concentration du polymère ou son PM (Tableau 7) [Wischke et Schwendeman, 2008]. En augmentant la viscosité de la phase organique, de meilleures EE sont obtenues. En effet, les viscosités des formulations 4, 3 et 5 sont respectivement de 14, 32 et 85 mPaS (concentrations en PLGA de 5, 10 et 15% (m/v)) et les valeurs d'EE, de $0,89 \pm 0,06$, $10,8 \pm 0,1$ et $19 \pm 3 \%$. Une viscosité plus importante de la phase organique constitue une barrière plus efficace contre l'efflux de la clonidine vers w_2 , phase dans laquelle elle est la plus soluble. Néanmoins, l'augmentation de la viscosité entraîne la formation de microparticules de taille plus importante. En effet, l'utilisation de forces de cisaillement supplémentaires serait nécessaire à la formation de plus petites particules [Yang et coll., 2000 ; Freitas et coll., 2005].

Tableau 7 : Viscosité de différentes solutions de PLGA, de PM variable, mesurée à 20 rpm et à 25°C (n = 1).

PLGA	Concentration (%)	Viscosité (mPaS)
PLGA 34 000 Da	5	6
	10	9
	15	15
PLGA 48 000 Da	5	6
	10	10
	15	19
PLGA 96 000 Da	5	14
	10	32
	15	85

1.1.2 Influence du volume de w_1 et de la charge théorique en principe actif

L'augmentation du volume de w_1 tend à diminuer les résultats d'EE obtenus (Tableau 8). De plus, des volumes excessifs de w_1 provoqueraient la formation de larges pores durant la précipitation du polymère et durant la phase de séchage des microsphères. Lors de l'évaporation du dichlorométhane, les gouttelettes de la première émulsion se contractent et l'eau diffuse progressivement à l'intérieur des particules. Durant la phase de séchage, l'eau maintenue à l'intérieur des microsphères crée des canaux interconnectés [Sun et coll., 2009].

De plus, il a été montré que la présence de pores internes associée à l'utilisation de larges volumes de w_1 accélère la libération du principe actif encapsulé [Mao et coll., 2007].

Tableau 8 : Influence du volume de la phase aqueuse interne et de la charge théorique en principe actif sur l'EE et le diamètre moyen des microparticules de clonidine (Paramètres non modifiés : PM PLGA: 96 000 Da; polymère: 1 g; phase organique: 7,5 ml; PVA: 100 mg; w_2 : 100 ml). pH $w_1 = 4,0 - 5,0$; pH $w_2 = 5,0-7,0$. Le D[4,3] et l'EE sont exprimés en moyenne \pm écart-type ($n = 3$).

Paramètres	Formulations						
	6	7	8	9 = 7	10	11	12
Clonidine (mg)	10	10	10	10	40	100	200
w_1 (ml)	0,5	1	2	1	1	1,5 ^(a)	3 ^(a)
D[4,3] μm	284 \pm 35	93 \pm 7	44 \pm 4	93 \pm 7	31 \pm 2	42 \pm 2	346 \pm 4
EE (%)	10,7 \pm 0,1	6 \pm 1	2,7 \pm 0,3	6 \pm 1	3,52 \pm 0,04	1,52 \pm 0,04	1,13 \pm 0,09

^(a) Adaptation du volume de w_1 à la solubilité de la clonidine

Les formulations produites montrent qu'augmenter la charge théorique en principe actif induit une diminution de l'EE. En effet, accroître progressivement la charge de 1 à 18 % (m/m) pour les formulations 9 à 12 provoque une réduction graduelle de l'EE de 6 \pm 1 à 1,13 \pm 0,09 % (Tableau 8). L'apparition d'un gradient de concentration dans les gouttelettes de la première émulsion E/H, dû à l'augmentation progressive de la concentration en clonidine, conduit à des pertes de principe actif vers w_2 [Yang et coll., 2001 ; Mao et coll., 2007].

1.1.3 Influence du volume de w_2 et de la concentration en surfactant

L'augmentation du volume de w_2 de 50 ml à 100 ml dans les formulations 13 et 14 provoque deux effets : d'une part, cela augmente l'EE et d'autre part, cela produit des microparticules avec un diamètre moyen plus important (Tableau 9). Le premier effet s'explique par une extraction du solvant organique plus efficace dans un volume plus large, induisant une précipitation plus rapide du polymère et donc une meilleure encapsulation du principe actif [Yeo et Park, 2004]. Le deuxième effet observé s'explique par l'efficacité réduite des forces de cisaillement et d'agitation une fois le volume augmenté, menant à la formation de particules plus grosses [Chaisri et coll., 2009].

Tableau 9 : Influence du volume de la phase aqueuse externe et de la concentration du surfactant sur l'EE et le diamètre moyen des microparticules de clonidine (Paramètres non modifiés : PM PLGA: 96 000 Da; polymère: 1 g; phase organique: 7,5 ml; clonidine: 10 mg; w_1 : 1 ml). pH w_1 = 4,0 – 5,0 ; pH w_2 = 5,0-7,0. Le D[4,3] et l'EE sont exprimés en moyenne \pm écart-type ($n = 3$).

Paramètres	Formulations					
	13	14 = 7	15 = 7	16	17	18
PVA (mg)	100	100	100	1 000	3 000	5 000
w_2 (ml)	50	100	100	100	100	100
D[4,3] μm	26 \pm 3	93 \pm 7	93 \pm 7	76 \pm 1	64 \pm 1	46 \pm 3
EE (%)	2,79 \pm 0,03	6 \pm 1	6 \pm 1	8 \pm 4	8 \pm 2	1,8 \pm 0,6

L'alcool polyvinylique (PVA) a été utilisé en tant que surfactant dans w_2 (Tableau 9). Son rôle est d'empêcher la coalescence des gouttelettes durant la deuxième émulsification et de favoriser la formation de fines gouttelettes [Mainardes et Evangelista, 2005 ; Chaisri et coll., 2009]. Le PVA exerce effectivement ce rôle dans les formulations 15 à 18 dans lesquelles sa concentration augmente de 0,1% à 5% (m/v) ; la réduction de la taille moyenne des microparticules est bien observée. Cependant, le surfactant n'améliore pas l'EE de ces formulations ; une concentration trop élevée en surfactant devient même délétère pour l'encapsulation (F18 : concentration PVA 5% (m/v), EE 1,8 \pm 0,6 %). À ces concentrations, la présence du PVA dans les couches aqueuses englobant les microparticules tend à réduire l'encapsulation du principe actif [Ito et coll., 2007].

1.1.4 Influence du pH des phases aqueuses

L'EE de la clonidine est fortement influencée par les modifications du pH des phases aqueuses de la double émulsion (w_1 et w_2). La clonidine contient deux atomes d'azote pouvant être protonés. Étant donné l'unique valeur de pKa de la clonidine HCl (pKa = 8,05), un seul atome d'azote peut être protonné à la fois. À une valeur de pH proche du pKa, un des atomes d'azote porte une paire d'électrons libres augmentant les interactions électrophiles existant entre la clonidine et les PLGA, telles que les ponts hydrogènes ou les interactions acides-bases. Par contre, à une valeur de pH éloignée du pKa, les paires d'électrons ne sont pas disponibles pour participer à ces interactions. Une fois w_1 tamponnée à pH 3 (formulation 19), des valeurs d'EE extrêmement faibles sont obtenues, probablement en raison de l'absence d'interactions entre la clonidine et le polymère et de la solubilisation importante de la clonidine dans w_2 (Tableau 10). Par contre, une fois w_2 tamponnée à pH 8 (formulations 23

à 26), l'EE est améliorée grâce à la disponibilité des paires d'électrons et à la présence d'interactions entre la clonidine et le polymère et à la solubilité moindre de la clonidine dans les phases aqueuses.

Tableau 10 : Influence du pH des phases aqueuses w_1 et w_2 sur l'EE et le diamètre moyen des microparticules de clonidine (Paramètres non modifiés : PM PLGA: 96 000 Da; polymère: 1 g; phase organique: 7,5 ml; clonidine: 10 mg; w_1 : 1 ml; PVA: 100 mg; w_2 : 100 ml). Le D[4,3] et l'EE sont exprimés en moyenne \pm écart-type ($n = 3$).

Paramètres	Formulations							
	19	20	21	22	23	24	25	26
w_1 : pH - Tampon	3 - Citr.	7 - Phos.	8 - Bor.	10-Bor.	3 - Citr.	7 - Phos.	8 - Phos.	10-Bor.
w_2 : pH - Tampon	-	-	-	-	8 - Phos.	8 - Phos.	8 - Phos.	8 - Phos.
D[4,3] μm	86 ± 2	42 ± 2	104 ± 3	115 ± 2	140 ± 17	23 ± 6	26 ± 5	40 ± 8
EE (%)	$0,79 \pm 0,03$	$3,86 \pm 0,08$	$13 \pm 0,4$	$17,9 \pm 0,6$	$20,2 \pm 0,3$	$21,3 \pm 0,5$	$16,6 \pm 0,6$	$9,3 \pm 0,2$

Citr. = Tampon citrate, Bor. = Tampon borate, Phos. = Tampon phosphate

Les meilleurs résultats d'encapsulation de la clonidine ont été atteints grâce à l'utilisation du tampon borate (EE comprises entre 13 et 32% ; toutes les compositions de formulations et résultats d'encapsulation ne sont pas détaillés). Néanmoins, en raison de la toxicité parentérale de ce tampon, ces formulations n'ont pas été sélectionnées pour la suite des caractérisations [Site Internet de la FDA, 2012]. Par contre, les formulations contenant des tampons citrate et phosphate ont été caractérisées.

1.1.5 Influence des paramètres d'agitation

L'agitation est un paramètre important définissant en partie la stabilité d'une émulsion. En effet, des conditions d'agitation adaptées fournissent au système l'énergie nécessaire pour réduire la taille des gouttelettes de la phase dispersée.

Au cours de ce travail, la distribution de taille des microparticules visée est comprise entre 10 et 30 μm , taille adaptée à l'administration IA. Le diamètre moyen des microsphères a donc dû être réduit. De plus, les paramètres d'agitation (vitesse, durée et dispositif) ont été optimisés afin de produire des microparticules de taille reproductible (Tableau 11).

Tableau 11 : Influence des paramètres d'agitation (vitesse, durée et dispositif) sur l'EE et le diamètre moyen des microparticules de clonidine (Formulation évaluée : PLGA 96 000 Da: 1 g; phase organique : 7,5 ml; clonidine: 10 mg; w_1 : 1 ml; PVA: 100 mg; w_2 : 100 ml). Le D[4,3] et l'EE sont exprimés en moyenne \pm écart-type ($n = 3$).

Paramètres	A	B	C
<u>Première émulsion</u>			
Vitesse d'agitation (rpm)	24 000	24 000	30 000
Durée d'agitation (sec)	120	300	120
<u>Seconde émulsion</u>			
Vitesse d'agitation (rpm)	17 500	17 500	8 000
Durée d'agitation (sec)	120	120	120
<u>Évaporation</u>			
Dispositif d'agitation	Agitation magnétique	Agitation magnétique	Agitateur à hélice
Vitesse d'agitation (rpm)	200	200	200
Durée d'agitation (heures)	3	3	3
D[4,3] μm	93 ± 7	125 ± 35	20 ± 2
EE (%)	6 ± 1	$9,2 \pm 0,1$	12 ± 2

Pour la même formulation (PLGA 96 000 Da: 1 g; phase organique : 7,5 ml; clonidine: 10 mg; w_1 : 1 ml; PVA: 100 mg; w_2 : 100 ml), la procédure d'agitation C permet d'obtenir les plus petites microparticules. Accroître la vitesse d'agitation durant la première émulsification augmente l'énergie introduite dans le système et améliore la dispersion de w_1 en fines gouttelettes bien définies. La vitesse d'agitation utilisée au cours de la seconde émulsification se révèle être un facteur moins déterminant ; en effet, elle n'est présente que pour disperser l'émulsion E/H dans la phase aqueuse externe (w_2). La vitesse d'agitation durant cette étape doit néanmoins être relativement faible afin d'éviter la rupture des gouttelettes formées au cours de la première étape de l'émulsion [Pal, 2011].

Plusieurs formulations décrites durant l'optimisation ont été formulées à nouveau suivant la procédure C. Les distributions de taille obtenues pour ces microparticules sont comprises entre environ 12 et 36 μm , ce qui correspond tout à fait au domaine de taille requis pour une administration IA.

1.1.6 Récapitulatif de l'influence des différents paramètres évalués sur les microparticules

Le Tableau 12 reprend l'influence des différentes conditions évaluées sur l'EE et le D[4,3] des microparticules produites.

Tableau 12 : Influence des conditions évaluées sur l'EE et le D[4,3] des microsphères. L'effet positif (augmentation de l'EE ou réduction du D[4,3]) ou négatif (diminution de l'EE ou augmentation du D[4,3]) sur ces paramètres est quantifié par +, ++, +++ et -, --, ---.

Paramètres	EE	D[4,3]
↑ PM du PLGA	++	--
↑ concentration PLGA	+++	---
↑ volume w_1	--	+++
↑ charge théorique en clonidine	--	--
↑ volume w_2	++	---
↑ concentration surfactant	---	+++
↓ pH w_1	---	+
↑ pH w_1	+++	---
↑ pH w_2	+++	++
↑ durée d'émulsification	++	--
↑ vitesse d'agitation	+++	+

L'optimisation de ces paramètres a permis de mettre en évidence la composition de la formulation conduisant aux meilleures EE, ainsi qu'à une taille adaptée. Celle-ci est composée de PLGA 96 000 Da 1 g, phase organique (dichlorométhane) 7,5 ml, clonidine HCl 10 mg, w_1 (pH 3) 1 ml, PVA 100 mg, w_2 (pH 8) 100 ml.

Les microparticules obtenues constituent un système matriciel où la clonidine est répartie dans la matrice de PLGA.

La composition des formulations sélectionnées pour les étapes de caractérisation ultérieures est reprise dans les tableaux précédents (Tableau 6, Tableau 8 et Tableau 10) sous les numéros 1, 2, 3, 7, 12 et 23. Ces microparticules ont un diamètre moyen D[4,3] optimisé suite à l'application de la procédure d'agitation la plus efficace. De plus, elles présentent une remise en suspension adaptée et une taille similaire avant et après dispersion.

Ces formulations ont permis l'étude de l'influence du PM du PLGA, de la charge théorique en clonidine et de la présence de tampons sur la morphologie et l'état cristallin des microparticules, ainsi que sur la teneur en solvants résiduels et la libération de la clonidine. La

plupart de ces évaluations ont également été menées sur des microparticules vides de clonidine.

1.2 Caractérisation des microsphères contenant la clonidine

La Tg du polymère brut a été déterminée par DSC. Simultanément, la Tg de microsphères vides de clonidine (PLGA 96 000 Da: 1 g; phase organique: 7,5 ml; w₁: 1 ml; PVA: 100 mg; w₂: 100 ml) et de microsphères chargées en clonidine produites avec ou sans tampons (PLGA 96 000 Da: 1 g; phase organique: 7,5 ml; clonidine: 200 mg; w₁: 1 ml; tampon citrate pH 3; PVA: 100 mg; w₂: 100 ml; tampon phosphate pH 8) a également été déterminée (Figure 27).

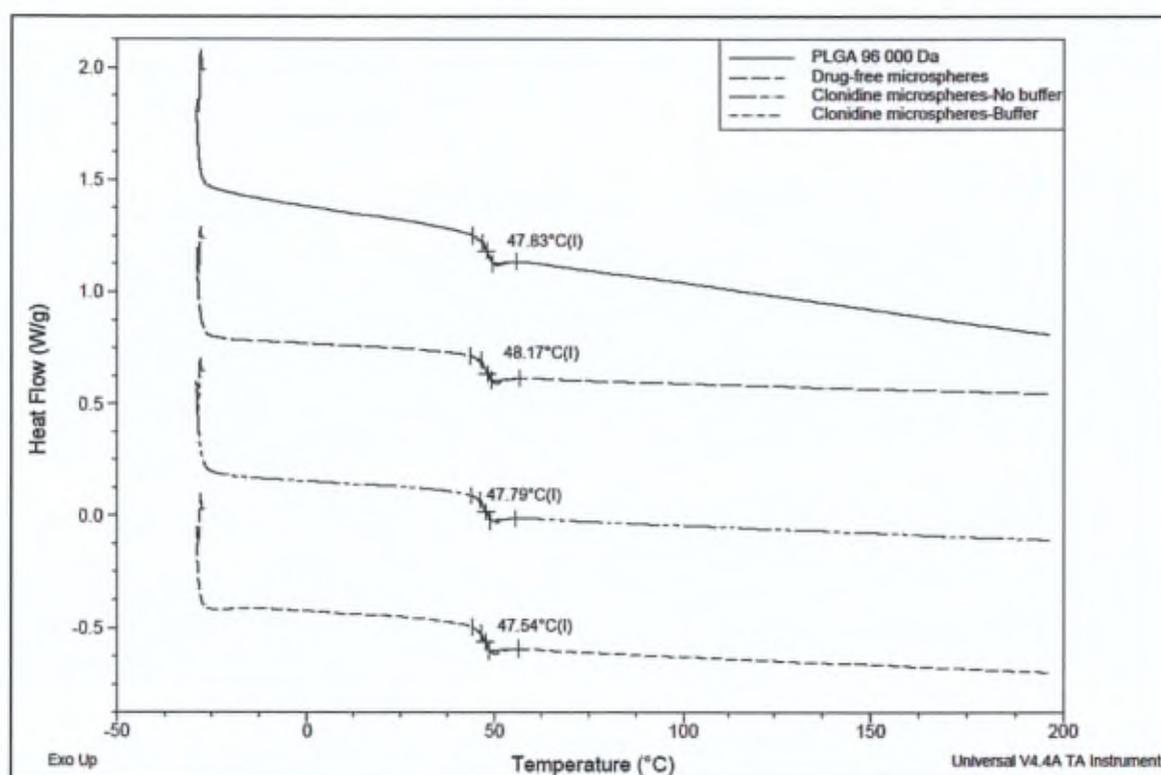


Figure 27 : Analyse DSC (mode chauffe/refroidissement/chauffe) du PLGA 96 000 Da brut, des microsphères vides et des microsphères chargées en clonidine formulées avec ou sans tampons. La Tg du polymère est déterminée au cours du second cycle de chauffe, après effacement de son historique thermique (Graphe du second cycle de chauffe ; premier cycle de chauffe et cycle de refroidissement cachés).

La Tg du polymère brut n'est pas modifiée significativement par le processus de fabrication des microparticules, que ce soit en présence ou en absence de substances tampons. De plus, ni fusion (phénomène endothermique), ni cristallisation (phénomène exothermique) n'ont pu être observées ; le polymère initialement amorphe ne subit donc aucune cristallisation au cours du procédé de formulation (Figure 27).

Aucun cristal n'a été visuellement détecté à la surface des microsphères sur les images SEM (Figure 28). De même, aucun phénomène endothermique n'a pu être détecté durant les premier et second cycles de chauffe des analyses DSC. La clonidine se retrouverait donc sous forme amorphe et/ou dissoute dans la matrice polymérique [Klose et coll., 2006].

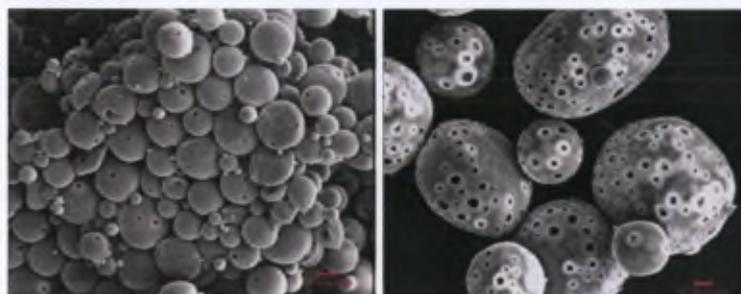
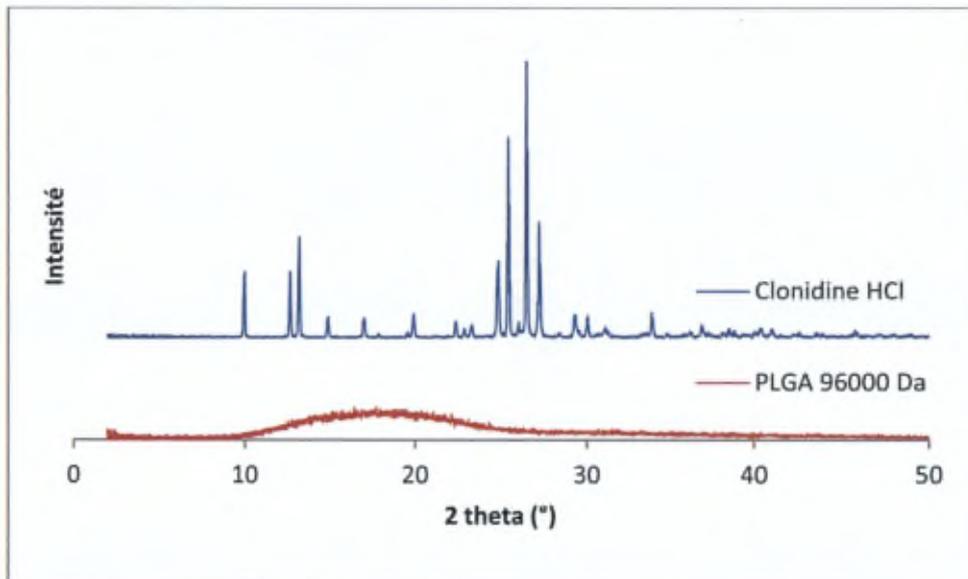


Figure 28 : Images SEM des formulations 9 (gauche) et 12 (droite) à un grossissement de 500 x (échelle = 10 µm). La formulation 12 présente une porosité importante en raison du volume de w_1 plus important utilisé pour solubiliser la clonidine. Au cours de la phase de séchage, ce large volume d'eau crée des canaux interconnectés, ce qui peut également accélérer la libération du principe actif.

Les analyses réalisées par PXRD permettent de confirmer cette hypothèse. En effet, l'absence de pics sur le diffractogramme démontre le côté amorphe d'une substance (Figure 29 (a) et (b)). Il faut néanmoins évaluer ces résultats avec précaution en raison de la faible teneur en clonidine dans les microparticules (charge réelle < 1%). En effet, une faible proportion de clonidine cristalline pourrait facilement être masquée par la haute teneur en polymère amorphe.

Enfin, la teneur en solvants résiduels a été évaluée dans les microparticules produites par une double émulsion E/H/E, selon les conditions optimales. L'influence de la présence de clonidine sur la teneur en solvants résiduels a été déterminée à l'aide de microsphères vides (PLGA 96 000 Da: 1 g; phase organique: 7,5 ml; w_1 : 1 ml; PVA: 100 mg; w_2 : 100 ml) et de microsphères chargées en clonidine (PLGA 96 000 Da: 1 g; phase organique: 7,5 ml; clonidine: 200 mg; w_1 : 1 ml; tampon citrate pH 3; PVA: 100 mg; w_2 : 100 ml; tampon phosphate pH 8). Ces microsphères ont été fabriquées juste avant la détermination de la teneur en solvants résiduels par GC afin d'évaluer l'efficacité de la phase d'évaporation du dichlorométhane. La teneur résiduelle en dichlorométhane est de 338 ± 26 ppm pour les microparticules vides et de 494 ± 45 ppm pour les microparticules chargées en clonidine. Ces valeurs sont bien inférieures aux normes en vigueur pour le dichlorométhane, qui sont de 600 ppm [ICH, 2011 ; Pharmacopée Européenne 7^{ème} édition, 2012] et vont encore décroître au cours du stockage des microparticules.

(a)



(b)

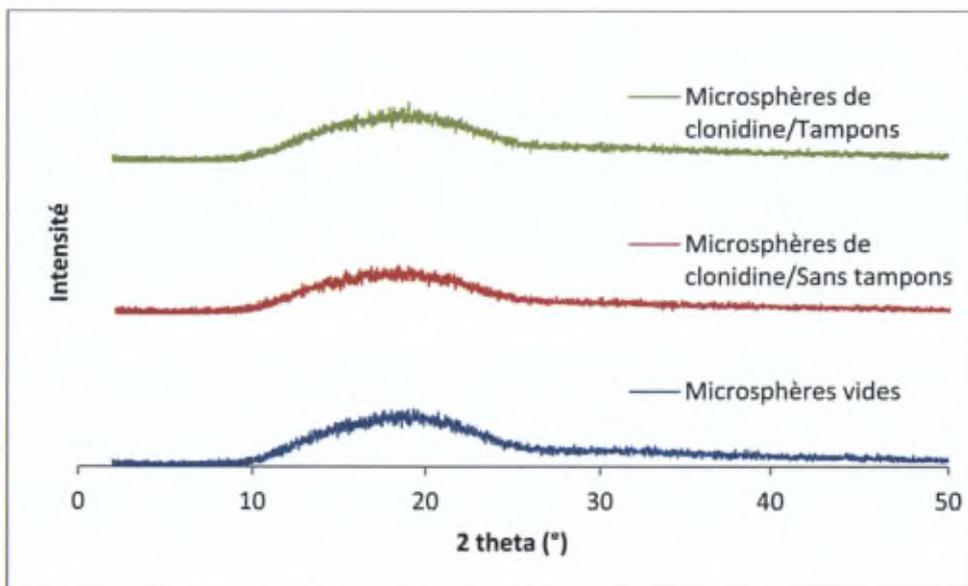


Figure 29 : Diffractogrammes obtenus pour (a) le PLGA 96 000 Da et la clonidine HCl bruts et (b) les microsphères vides (PLGA 96 000 Da: 1 g; phase organique: 7,5 ml; w_1 : 1 ml; PVA: 100 mg; w_2 : 100 ml) et les microsphères chargées en clonidine formulées avec ou sans tampons (PLGA 96 000 Da: 1 g; phase organique: 7,5 ml; clonidine: 200 mg; w_1 : 1 ml; tampon citrate pH 3; PVA: 100 mg; w_2 : 100 ml; tampon phosphate pH 8).

1.3 Étude de la libération de la clonidine à partir des microsphères et modèle mathématique appliqué à sa libération

La libération de la clonidine durant la première phase de la dissolution peut être décrite grâce au modèle mathématique suivant, basé sur la seconde loi de diffusion de Fick :

$$\frac{M_{\infty} - M_t}{M_{\infty}} = \frac{6}{\pi^2} \cdot \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n^2} \cdot \exp\left(-\frac{n^2 \cdot \pi^2}{R^2} \cdot D \cdot t\right) \quad (\text{Eq. 6})$$

où M_{∞} et M_t représentent les quantités cumulées, en valeur absolue, de clonidine libérée à la fin de la phase initiale de la libération et au temps t , respectivement ; R représente le rayon des microparticules et D est le coefficient apparent de diffusion de la molécule dans le système.

Le modèle mathématique reste une appréciation simplifiée des phénomènes se produisant réellement dans le système de libération et n'est applicable qu'à certains systèmes de délivrance particuliers. Dans ce cas-ci, les microsphères représentent une solution monolithique, c'est-à-dire que la concentration de la clonidine dans les microsphères est inférieure à sa solubilité à saturation et qu'elle s'y retrouve sous forme individualisée ou solubilisée. En effet, aucun cristal ou agglomérat n'a pu être observé par SEM (Figure 28). Grâce à ces observations et en acceptant que la géométrie du système influence la libération de la clonidine mais que le système ne subira pas d'importantes modifications (érosion, augmentation de la porosité), le modèle défini par l'Eq. 6, applicable aux formes sphériques, est le plus adapté. Ce modèle, utilisé pour évaluer l'implication de divers phénomènes (diffusion, dégradation, érosion, gonflement) dans la libération de la clonidine, ne prend en compte que le phénomène principal régissant la libération. D'autres modèles mathématiques, plus complexes, tiennent compte des phénomènes de dégradation et d'érosion du polymère. Enfin, ce modèle a été choisi afin que la concordance entre la libération théorique et la libération déterminée expérimentalement soit la plus adéquate. Pour ce faire, plusieurs paramètres du modèle ont été optimisés tour à tour afin de réduire la différence entre la théorie et les résultats expérimentaux [Siepmann et Siepmann, 2008 ; Siepmann et Peppas, 2011 ; Siepmann et Siepmann, 2012].

La vitesse de libération de la clonidine diminue nettement avec l'augmentation du PM du PLGA (Figure 30). L'augmentation du PM s'accompagne d'un plus haut degré d'enchevêtrement du polymère, formant des réseaux plus denses, ce qui résulte en une mobilité réduite de la molécule encapsulée. De plus, en augmentant le PM du PLGA, les microparticules voient leur diamètre moyen augmenter, ce qui allonge les distances à

parcourir par la clonidine et diminue la surface d'échange des microsphères avec le milieu de dissolution. Enfin, la structure des microparticules est vraisemblablement différente à cause des différentes vitesses de précipitation du polymère. En effet, la plus faible solubilité des PLGA de haut PM dans le dichlorométhane s'accompagne d'une précipitation et d'une solidification plus rapide lors de l'évaporation du solvant. En conclusion, la quantité de clonidine disponible pour la phase de libération rapide est variable et augmente lorsque le PM du polymère est le plus faible.

L'adaptation du modèle mathématique aux données de la libération déterminées expérimentalement démontre un bon accord entre la théorie et l'expérience (coefficient de détermination, r^2 , compris entre 0,89 et 0,99). La diffusion semble donc jouer un rôle prépondérant dans le contrôle de la libération de la clonidine durant la phase initiale (= burst release). La dégradation du polymère devenant influente sur la libération de la clonidine après cette phase initiale, le modèle mathématique ne pouvait être établi pour les phases ultérieures. En effet, ce modèle admet, en tant que condition initiale et limite, que la dégradation du polymère n'intervient aucunement dans la libération du principe actif.

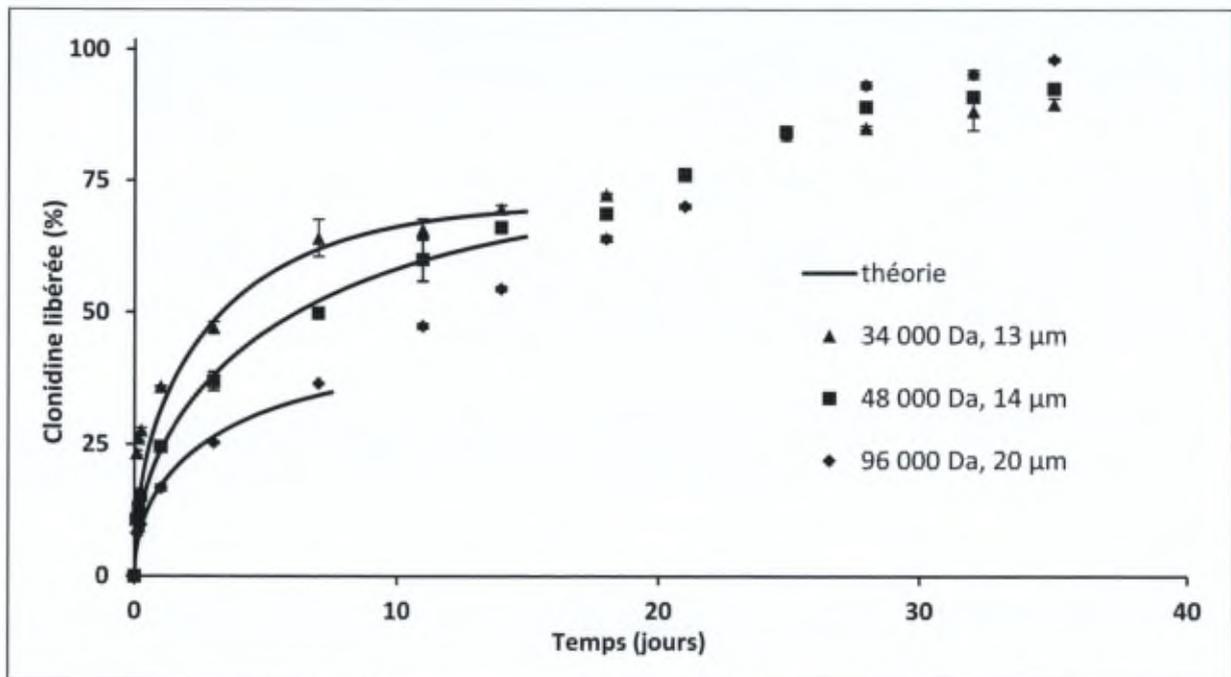


Figure 30 : Libération *in vitro* de la clonidine à partir des microparticules incubées dans un tampon PBS (pH 7,4) à 37°C, en fonction du PM du PLGA et de la taille des microsphères (moyenne \pm écart-type, $n=3$) (Paramètres de formulation constants : PLGA: 1 g; phase organique: 7,5 ml; clonidine: 10 mg; w_1 : 1 ml; PVA: 100 mg; w_2 : 100 ml). Les symboles représentent la cinétique de libération de la clonidine déterminée expérimentalement alors que la courbe en trait plein représente la libération théorique (Eq. 6).

Le coefficient apparent de diffusion D peut aisément être déterminé pour chaque formulation étudiée (Tableau 13). Le coefficient D est, de façon intéressante, plus élevé pour la formulation contenant le PLGA 96 000 Da, intermédiaire pour celle contenant le PLGA 34 000 Da et plus faible pour les microparticules à base de PLGA 48 000 Da. La combinaison de deux phénomènes, ayant un effet inverse sur la mobilité de la molécule encapsulée, peut aider à expliquer ces observations : (i) l'augmentation du PM du polymère s'accompagne d'une augmentation de l'enchevêtrement du polymère et donc, d'une réduction de la mobilité de la molécule encapsulée ; (ii) l'augmentation du PM du polymère s'accompagne également d'une augmentation de la vitesse de précipitation du polymère au cours de la fabrication des microparticules (due à une moindre solubilité dans le solvant organique) et donc d'une augmentation de la porosité des microparticules ; la mobilité de la molécule est ici favorisée.

Tableau 13 : Coefficient apparent de diffusion de la clonidine (déterminé en adaptant l'Eq. 6 aux points obtenus expérimentalement) et diamètre moyen des microparticules étudiées (Paramètres constants : PLGA: 1 g; phase organique: 7,5 ml; w_1 : 1 ml; PVA: 100 mg; w_2 : 100 ml) ($n=3$).

Formulation	D, 10^{-13} cm ² /s		D[4,3] μ m
	Moyenne	Écart-type	
PLGA 34 000 Da	1,1	0,04	13,0
PLGA 48 000 Da	0,7	0,02	14,4
PLGA 96 000 Da = Clo: 10 mg	2,5	0,1	20,2
Clo: 200 mg	2,5	0,01	19,5
w_1 : pH 3/Clo: 10 mg	1,1	0,1	17,5
w_1 : pH 3/Clo: 200 mg	0,7	0,02	15,6

La Figure 31 montre l'effet de la charge théorique de clonidine (10 ou 200 mg) et de l'utilisation éventuelle de tampons dans les phases aqueuses ($w_1 = \text{pH } 3$, $w_2 = \text{pH } 8$) sur la libération de la clonidine à partir de microparticules de PLGA 96 000 Da. La quantité de clonidine initialement impliquée dans les formulations n'affecte pas de manière significative sa vitesse de libération, et ce, que les phases aqueuses soient tamponnées ou non. Cela peut s'expliquer par la faible charge réelle en clonidine retrouvée dans les microparticules (< 1%). Lorsque les phases aqueuses sont tamponnées, la vitesse de libération du principe actif est accélérée de manière significative. La diminution de la taille des microparticules (16/18 μ m contre 20 μ m) et/ou une altération de la structure des microparticules (augmentation de la

porosité interne par exemple) pourraient expliquer cette accélération. La diffusion est également le phénomène prédominant dans le contrôle de la libération du principe actif, comme le démontre la bonne corrélation entre la théorie et l'expérience (Figure 31). À nouveau, les coefficients apparents de diffusion ont été déterminés (Tableau 13).

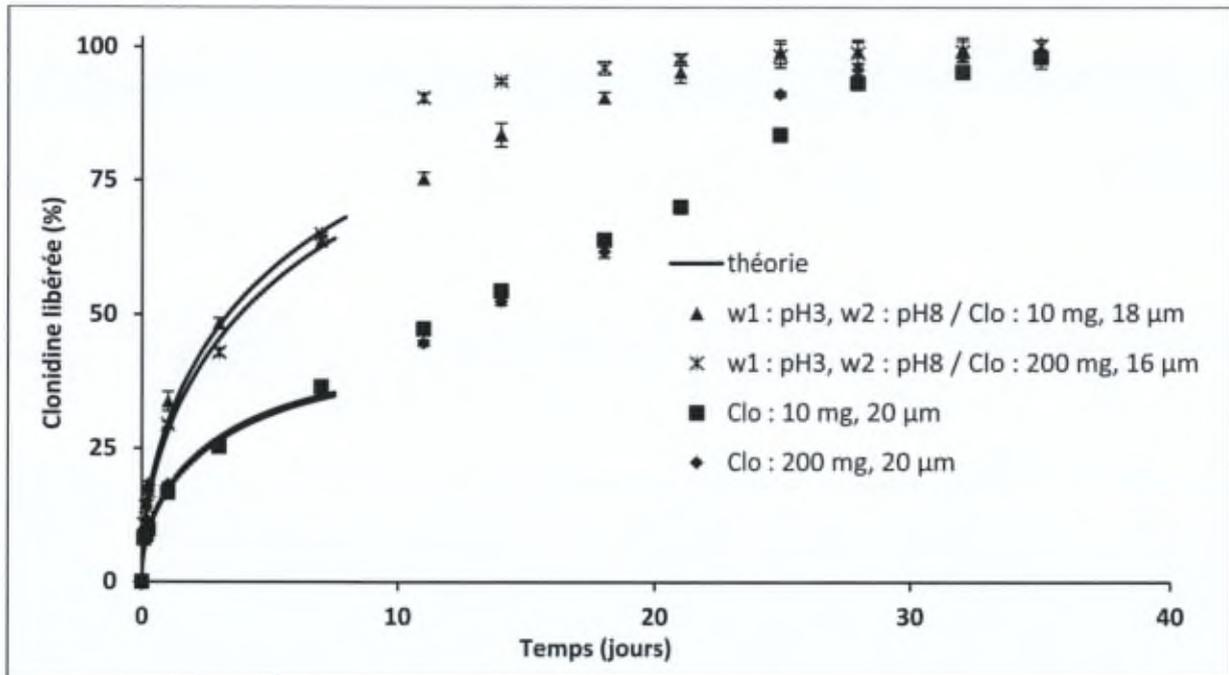


Figure 31 : Libération *in vitro* de la clonidine à partir des microparticules incubées dans un tampon PBS (pH 7,4) à 37°C, en fonction de la charge théorique de clonidine et de l'utilisation de tampons (moyenne \pm écart-type, $n=3$) (Paramètres de formulation constants : PLGA: 1 g; phase organique: 7,5 ml; clonidine: 10 mg; w_1 : 1 ml; PVA: 100 mg; w_2 : 100 ml). Les symboles représentent la cinétique de libération de la clonidine déterminée expérimentalement alors que la courbe en trait plein représente la libération théorique (Eq. 6).

Il n'en reste pas moins que la libération de la clonidine devra être évaluée *in vivo* en raison des modifications rencontrées en présence de l'environnement biologique. Effectivement, la libération prolongée d'une molécule *in vivo* subit l'influence de facteurs dépendants ou indépendants du système de délivrance. Les facteurs dépendants sont spécifiques du type de système de libération et reprennent (i) la dégradation du polymère, (ii) l'adsorption de protéines, (iii) la phagocytose des particules et (iv) la réaction inflammatoire associée à l'injection du système de délivrance. Les paramètres indépendants incluent (i) le ralentissement de la diffusion de la molécule dû à l'effet barrière associé à la viscosité du milieu, (ii) la répartition de la molécule dans les cellules et tissus environnants, (iii) le volume de liquide disponible au lieu d'injection et (iv) le mouvement de l'articulation [Zolnik et Burgess, 2008]. Ces nombreux paramètres modulant la libération d'une molécule à partir d'un

Le système de délivrance à administration parentérale rendent l'établissement d'une corrélation entre la libération *in vitro* et *in vivo* complexe [Schliecker et coll., 2004].

En règle générale, la libération des molécules se produit plus rapidement *in vivo* qu'*in vitro* en raison de la probable influence d'enzymes sur la dégradation du polymère, de l'effet de la composition du liquide environnant (ex. : lipides, ROS) et du pH local. La réaction inflammatoire transitoire associée à l'injection de microparticules, représentant un corps étranger pour le système immunitaire bien que produites à partir d'un polymère biocompatible, peut également être responsable de l'accélération de la libération de la molécule *in vivo*. En effet, l'afflux de macrophages instaure un climat acide environnant les microparticules, favorisant leur dégradation et donc, la libération de la molécule [Zolnik et Burgess, 2008 ; Anderson et Shive, 2012].

2. Microsphères de PLGA chargées en dipropionate de bétaméthasone

2.1 Paramètres variés et effets sur l'encapsulation

L'optimisation de l'encapsulation du dipropionate de bétaméthasone dans les microsphères de PLGA a été plus rapide vu les hautes EE obtenues. La fabrication des microparticules de bétaméthasone n'étant basée que sur une simple émulsion H/E vu la nature hydrophobe du principe actif, le nombre de paramètres à faire varier en était réduit. Les paramètres d'agitation optimisés précédemment (Tableau 11) ont été utilisés directement dans le processus de fabrication des microsphères de bétaméthasone, ce qui explique que les valeurs de D[4,3] soient plus faibles pour les microparticules de bétaméthasone que pour les microparticules de clonidine en cours d'optimisation.

2.1.1 Influence du poids moléculaire du polymère et de la viscosité de la phase organique

Tout comme pour les microsphères chargées en clonidine, l'augmentation du PM du PLGA entraîne une amélioration de l'EE de la bétaméthasone, en raison de sa précipitation plus rapide (Tableau 14). L'augmentation de l'encapsulation de la bétaméthasone accompagnant l'augmentation du PM (EE augmentée de 2,7 fois) est plus importante que pour les microsphères de clonidine (EE augmentée de 2 fois). En effet, la faible solubilité du dipropionate de bétaméthasone dans l'eau ($\approx 1 \mu\text{g/ml}$) et sa plus grande lipophilie réduisent fortement le partage entre les deux phases de l'émulsion, la molécule ayant dès lors tendance à rester dans la phase organique [Wischke et Schwendeman, 2008].

L'augmentation de la viscosité de la phase organique provoque une augmentation de l'EE de la bétaméthasone, comme précédemment observé dans le cas de la clonidine. En effet, la diffusion déjà faible du principe actif est encore réduite par l'augmentation de la viscosité. Le diamètre moyen des microparticules augmente parallèlement [Su et coll., 2009] (Formulation 5, Tableau 14).

Tableau 14 : Influence du PM et de la concentration du polymère sur l'EE et le diamètre moyen des microparticules de bétaméthasone (Paramètres non modifiés : dipropionate de bétaméthasone: 10 mg; PVA: 100 mg; w: 100 ml). Le D[4,3] et l'EE sont exprimés en moyenne \pm écart-type (n = 3).

Paramètres	Formulations				
	1	2	3	4	5
PM PLGA (Da)	34 000	48 000	96 000	96 000	96 000
Polymère (g)	1	1	1	0,5	2
Phase organique (ml)	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5
D[4,3] μm	16 \pm 5	19 \pm 4	16 \pm 2	17 \pm 8	37 \pm 13
EE (%)	25 \pm 1	53 \pm 2	67 \pm 2	26,5 \pm 0,2	71 \pm 2

2.1.2 Influence de la charge théorique en principe actif

L'augmentation progressive de la charge théorique en bétaméthasone induit une augmentation graduelle du diamètre moyen des microparticules formées. Une faible charge théorique de 1% (m/m) en bétaméthasone fournit l'EE la plus élevée (Tableau 15).

Tableau 15 : Influence de la charge théorique en principe actif sur l'EE et le diamètre moyen des microparticules de bétaméthasone (Paramètres non modifiés : PM PLGA: 96 000 Da; polymère: 1 g; phase organique: 7,5 ml; PVA: 100 mg; w: 100 ml). Le D[4,3] et l'EE sont exprimés en moyenne \pm écart-type (n = 3).

Paramètre	Formulations			
	3	6	7	8
Bétaméthasone (mg)	10	20	100	500
D[4,3] μm	16 \pm 2	19 \pm 1	20 \pm 4	36 \pm 14
EE (%)	67 \pm 2	48 \pm 1	51 \pm 1	56 \pm 3

En effet, au-delà d'une charge théorique de bétaméthasone de 1 %, les microparticules sont caractérisées par une EE plus faible (2% : EE = 48 \pm 1% ; 10% : EE = 51 \pm 1% ; 45% : EE =

56 ± 3%). Ce phénomène a également été observé lors de l'optimisation des microparticules de clonidine et s'explique par la perte du principe actif vers la phase continue consécutive à la création progressive d'un gradient de concentration entre les différentes phases de l'émulsion.

2.2 Caractérisation des microsphères contenant la bétaméthasone

Le dipropionate de bétaméthasone brut et les microparticules de bétaméthasone (PLGA 96 000 Da : 1 g, phase organique: 7,5 ml; bétaméthasone : 10 ou 100 mg, w: 100 ml; PVA: 100 mg) ont été caractérisées par DSC, SEM et PXRD.

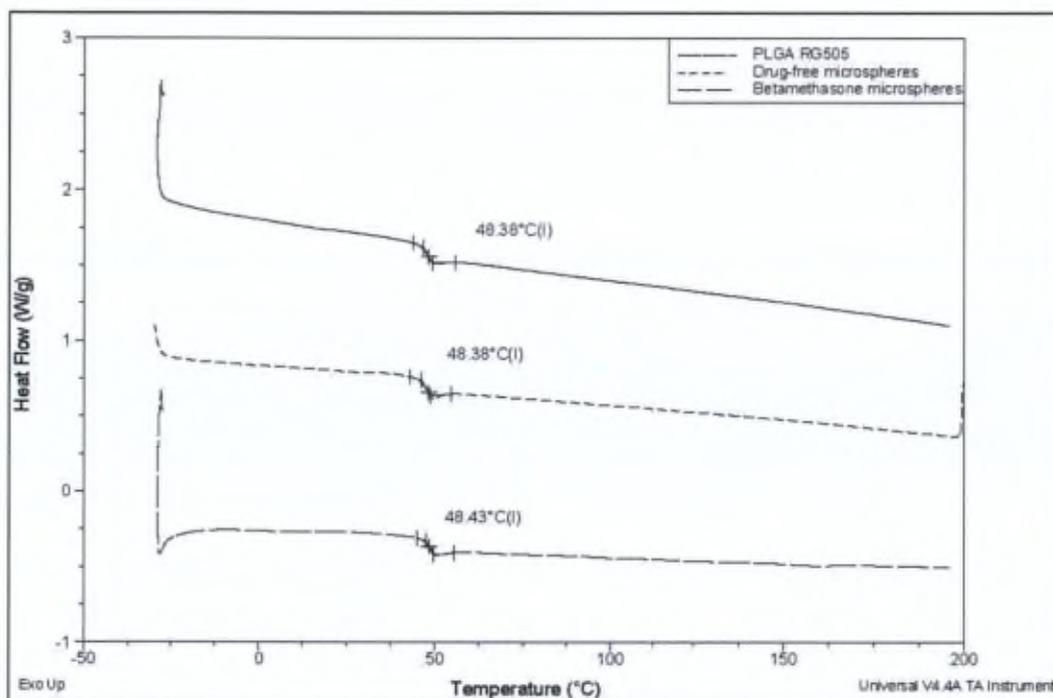


Figure 32 : Analyse DSC (mode chauffe/refroidissement/chauffe) du PLGA 96 000 Da brut, des microsphères vides et des microsphères chargées en bétaméthasone. La Tg du polymère est déterminée au cours du second cycle de chauffe, après effacement de son passé thermique (Graphe du second cycle de chauffe ; premier cycle de chauffe et cycle de refroidissement cachés).

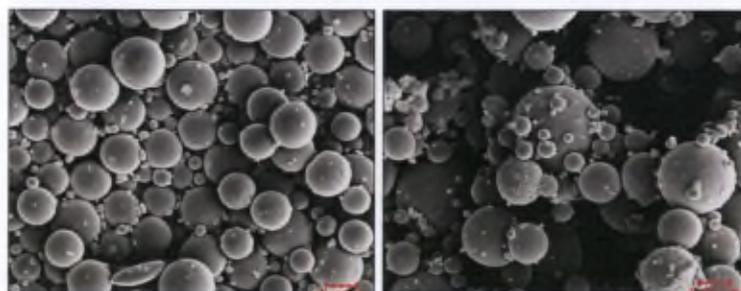
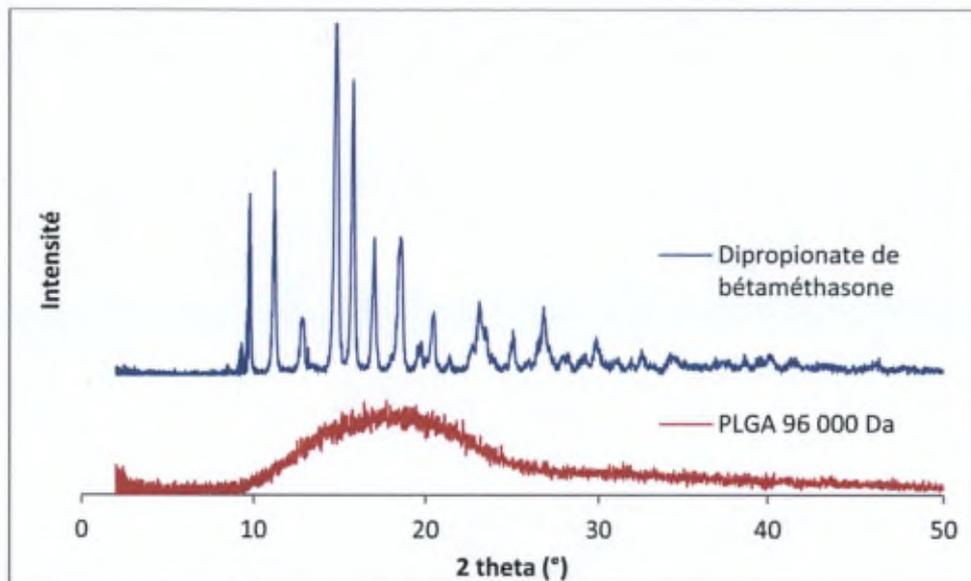


Figure 33 : Images SEM des formulations 3 (gauche) et 7 (droite) à un grossissement de 1000 x (échelle = 10 µm).

(a)



(b)

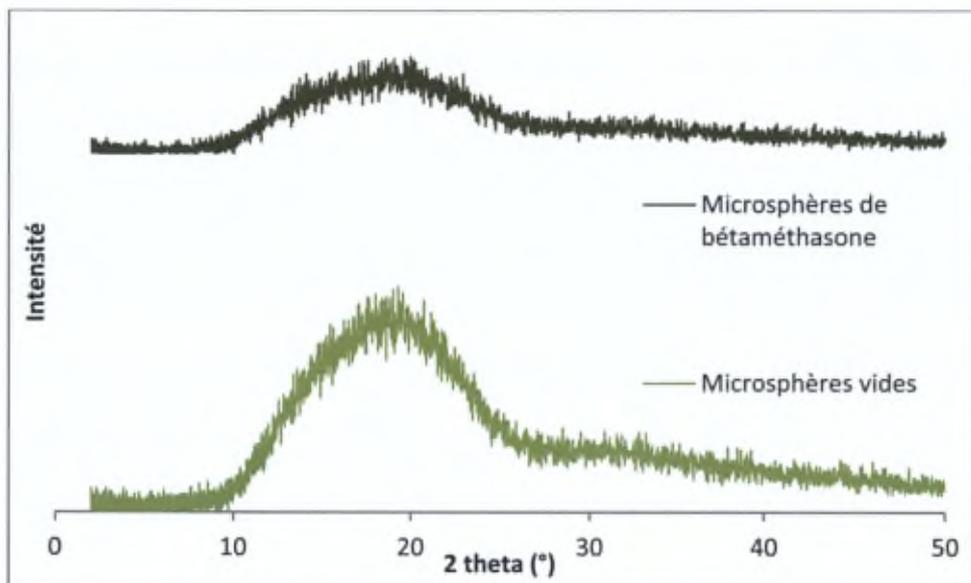


Figure 34 : Diffractogrammes obtenus pour (a) le PLGA 96 000 Da et le dipropionate de bétaméthasone bruts et (b) les microsphères vides et les microsphères chargées en bétaméthasone (PLGA 96 000 Da : 1 g, phase organique: 7,5 ml; bétaméthasone : 100 mg, w: 100 ml; PVA: 100 mg).

Tout comme pour les microparticules chargées en clonidine, la bétaméthasone est probablement présente sous forme amorphe/dissoute dans le polymère. En effet, l'absence de phénomènes endo- et exothermiques observée pour les microparticules chargées en bétaméthasone (Figure 32), ainsi que l'absence de cristaux à la surface des microparticules (Figure 33) et l'absence de pics observée dans les analyses PXRD (Figure 34) montrent le probable caractère amorphe du principe actif encapsulé.

2.3 Étude de la libération de la bétaméthasone à partir des microsphères

La libération de la bétaméthasone (Figure 35) à partir des microparticules présente un burst effect plus faible que celui observé lors de la libération de la clonidine. En effet, seuls 15% de la charge en bétaméthasone sont libérés endéans 24 heures alors que 20 à 35% de la charge en clonidine sont libérés au cours de la même période. La bétaméthasone étant hydrophobe, sa libération s'opère plus lentement, probablement car cette molécule ne participe pas favorablement à la création de pores et canaux internes, contrairement à la clonidine, hydrophile.

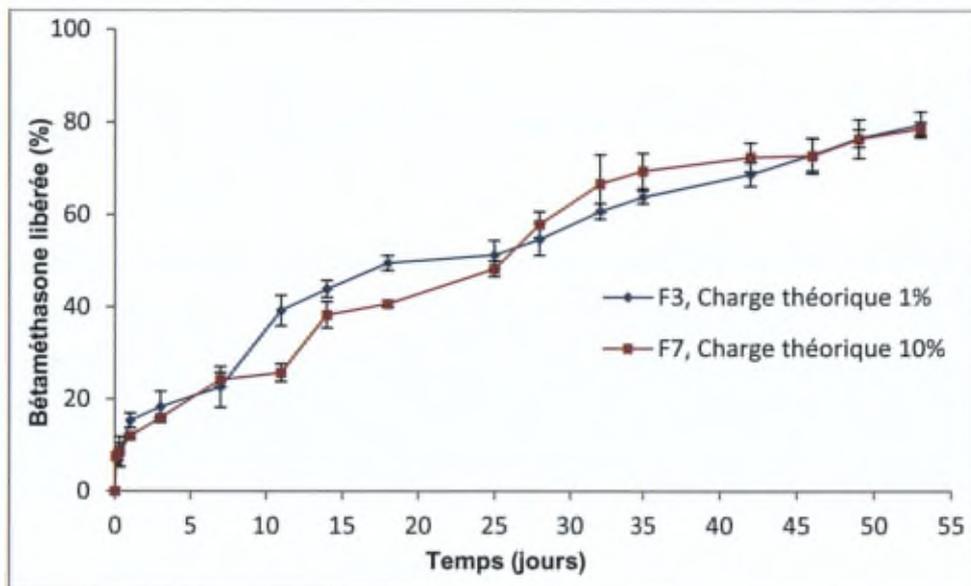


Figure 35 : Libération *in vitro* de la bétaméthasone à partir des microparticules incubées dans un tampon PBS (pH 7,4) à 37°C, contenant 0,1% de polysorbate 80, en fonction de la charge en bétaméthasone (moyenne \pm écart-type, $n=3$) (Paramètres de formulation constants : PLGA: 1 g; phase organique: 7,5 ml; w: 100 ml; PVA: 100 mg).

De ce fait, la libération de la bétaméthasone s'échelonne sur plus de 7 semaines, sans atteindre encore la libération de la totalité de la molécule. Dans la Figure 35, l'absence de différence entre la libération en fonction de la charge en bétaméthasone est clairement présente.

IV. Conclusion

L'influence des paramètres de fabrication sur l'EE, le diamètre moyen des microparticules et la libération *in vitro* de la molécule a été évaluée sur une petite molécule hydrophile, la clonidine, et sur une molécule hydrophobe, le dipropionate de bétaméthasone. La littérature est abondante concernant l'encapsulation de molécules hydrophiles de haut PM (protéines, polysaccharides) ou de petites molécules hydrophobes (ibuprofène, dexaméthasone) dans des microsphères de PLGA exposant des EE élevées.

La clonidine étant une molécule hydrophile de faible PM, son encapsulation dans les microparticules de PLGA à l'aide d'une double émulsion E/H/E a constitué un véritable challenge. Sa tendance à diffuser vers w_2 (phase aqueuse externe), environnement plus propice que la phase organique, réduit largement l'EE de cette molécule. Vu ses caractéristiques préjudiciables à une encapsulation dans des microparticules de PLGA, les microsphères de clonidine conduisent à des EE faibles (EE allant de 0,79 à 21%). Le travail d'optimisation ayant été réalisé a néanmoins mené à des EE appréciables pour ce type de molécule ; une fois w_1 (phase aqueuse interne) tamponnée à pH 3 ou 7 et w_2 tamponnée à pH 8, l'EE atteint $\approx 20\%$, probablement grâce à l'augmentation des interactions entre la clonidine et le polymère.

La bétaméthasone, molécule plus appropriée à une encapsulation dans ce type d'environnement sur base d'une simple émulsion H/E, a rapidement produit des microparticules avec des EE élevées (EE allant de 25 à 71%).

Les paramètres d'agitation ont également été optimisés afin d'obtenir des microparticules de taille moyenne comprise entre 10 et 30 μm , taille adaptée à une administration IA. Les tailles optimales sont obtenues en utilisant une vitesse d'agitation élevée durant la première émulsification et une vitesse plus basse durant la seconde émulsification.

Un modèle mathématique appliqué aux études *in vitro* de dissolution des microsphères chargées en clonidine a permis de déduire que la diffusion est le phénomène principal régissant la libération de la clonidine au cours de la phase initiale.

Caractérisation de la dégradation du polymère.

Gaignaux A., Réeff J., De Vriese C., Goole J., Amighi K., Evaluation of the degradation of clonidine-loaded PLGA microspheres, J Microencapsulation (2013) DOI: 10.3109/02652048.2013.778905 (Annexe 5).

I. But

La seconde partie de ce travail a eu pour but d'étudier les phénomènes gouvernant la libération du principe actif du point de vue de la dégradation du polymère. Parallèlement au modèle mathématique et aux cinétiques de libération préalablement établies, l'étude de la dégradation du polymère constituant les microparticules chargées en clonidine a donc contribué à la caractérisation de sa libération.

Plusieurs manipulations ont été réalisées afin d'estimer l'importance des différents mécanismes impliqués dans la dégradation du polymère (scission des mono-/oligomères et libération de ces petites molécules). Pour cela, la diminution du PM du polymère a été suivie lors de l'incubation des microsphères, ainsi que leur perte de poids, leur prise en eau, leur gonflement, leurs modifications morphologiques et l'évolution du pH.

L'ensemble de ces données nous a permis d'analyser la dégradation et l'érosion du polymère en fonction de la composition de la formulation. De plus, ces divers résultats nous ont permis de compléter notre étude de la libération de la clonidine.

II. Méthodes spécifiques

1. Suivi de la dégradation des microparticules contenant la clonidine

Le suivi de la dégradation du polymère formant les microsphères contenant la clonidine a été réalisé à $37 \pm 0,1^\circ\text{C}$ dans un tampon PBS (pH $7,4 \pm 0,05$) contenant 0,02% (m/v) d'azide de sodium en tant que conservateur. Un tube de 50 ml (Sarstedt, Nümbrecht, Allemagne) contenant la pesée déterminée de microsphères et un volume adéquat de PBS est agité horizontalement à 85 cycles/minute (agitateur bain-marie GFL 1086, GFL, Burgwedel, Allemagne). À des intervalles de temps définis (0 jour, 1 jour, 7 jours, 14 jours, 21 jours, 28 jours et 35 jours), les microsphères ont été filtrées sur une membrane en ester de cellulose de porosité $0,45 \mu\text{m}$ (Millipore, Billerica, États-Unis) et séchées sous vide pendant 24 heures. La dégradation du polymère, marquée par la diminution de son PM, a ensuite été évaluée par chromatographie par perméation de gel. La dégradation des microsphères a été étudiée en triplicat pour chaque formulation.

Il faut souligner qu'afin de réaliser les études de dégradation dans les mêmes conditions que les études *in vitro* de libération du principe actif, les quantités de microsphères et volumes de PBS ont été proportionnellement conservés. Dès lors, les quantités initiales de microsphères placées dans les tubes n'étaient pas identiques et les concentrations en microsphères dans le milieu de dissolution varient entre les formulations (Concentrations (mg/ml): F1 = 2, F2 = 4, F3 = 6, F4 = 2, and F5 = 1).

2. Chromatographie par perméation de gel

La chromatographie par perméation de gel (GPC) est une technique de séparation basée sur la taille différente des molécules en solution. La séparation est obtenue grâce à la différence des volumes hydrodynamiques des molécules présentes dans la solution [Rögner, 1999].

L'échantillon à fractionner est élué par une phase mobile organique sur une phase stationnaire composée de particules d'un solide poreux. La séparation progressive des molécules s'obtient en fonction de leur degré de pénétration dans les pores de la phase stationnaire (Figure 36) [Rouessac et Rouessac, 2004 ; Pharmacopée Européenne 7^{ème} édition, 2012].

Plus les molécules sont petites par rapport au réseau poreux, plus elles iront se piéger dans les pores et plus elles seront éluées tard. Les plus petites molécules seront d'ailleurs éluées au *volume de perméation total* (V_t ou V_m). Les molécules présentant une taille plus importante que la taille des pores en sont exclues et ne circulent donc qu'au niveau interstitiel ; elles sont

éluées directement au *volume d'exclusion* (V_0 ou V_i). Les molécules de taille intermédiaire contenues dans l'échantillon sont séparées entre le V_0 et le V_i , selon un coefficient de diffusion K , coefficient exprimant la pénétration de la molécule dissoute au niveau des pores (Figure 36, Figure 37) [Rögner, 1999 ; Rouessac et Rouessac, 2004 ; Pharmacopée Européenne 7^{ème} édition, 2012].

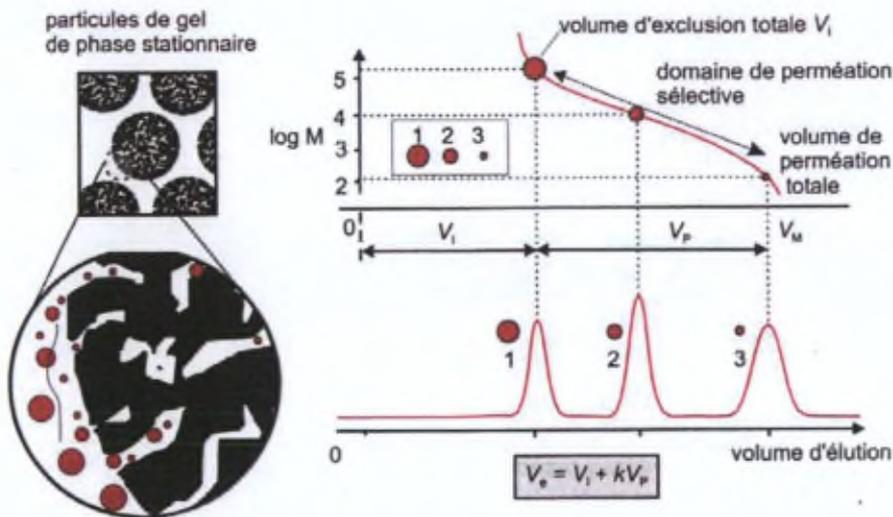


Figure 36 : Élué des molécules par la phase mobile sur la phase stationnaire composée d'un solide poreux [Rouessac et Rouessac, 2004].

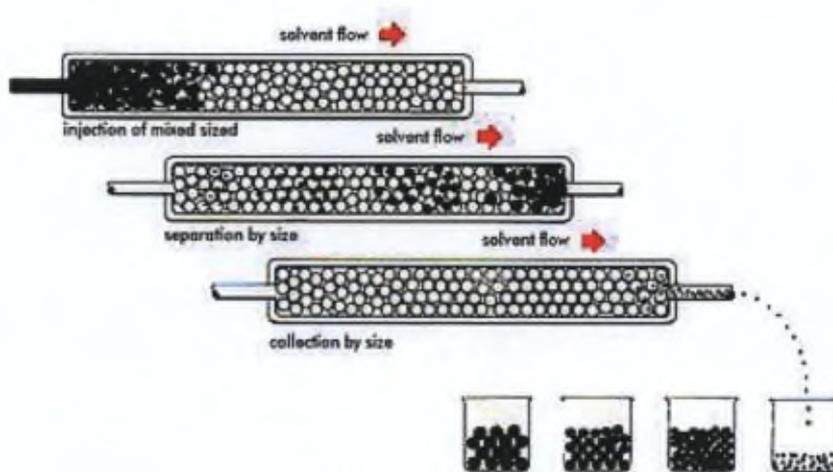


Figure 37 : Fractionnement d'un échantillon contenant des molécules de taille différente [Site Internet Waters, 2012].

Les chromatogrammes de GPC peuvent être caractérisés par différents paramètres. Premièrement, trois masses moléculaires moyennes peuvent être déduites des données

obtenues à partir du chromatogramme et permettent de caractériser une distribution de masses moléculaires.

La *masse moléculaire moyenne en nombre* (number-average molecular weight), M_n , est obtenue par la moyenne arithmétique des masses moléculaires de toutes les molécules présentes dans le milieu analysé. Elle est déterminée par la formule suivante :

$$M_n = \frac{\sum n_i M_i}{\sum n_i} \quad (\text{Eq. 7})$$

La *masse moléculaire moyenne en poids* (weight-average molecular weight), M_w , est le paramètre utilisé dans ce travail pour caractériser les polymères. Elle est obtenue par la formule suivante :

$$M_w = \frac{\sum n_i M_i^2}{\sum n_i M_i} \quad (\text{Eq. 8})$$

Le *Z-average molecular weight*, M_z , est obtenu par la formule suivante :

$$M_z = \frac{\sum n_i M_i^3}{\sum n_i M_i^2} \quad (\text{Eq. 9})$$

où M_i représente la masse M d'une molécule i et n_i , le nombre de molécules de masse M_i dans l'échantillon.

L'*indice de polydispersité*, δ , est un autre paramètre caractérisant une distribution de masses moléculaires et permettant d'évaluer l'étendue de cette distribution. L'indice δ est égal à 1 pour les polymères monodispersés et supérieur à 1 pour les polymères polydispersés. Il est déterminé par la formule suivante :

$$\delta = \frac{M_w}{M_n} \quad (\text{Eq. 10})$$

Le *pourcentage de variation du poids moléculaire moyen* (percentage variation of weight-average molecular weight), ΔPM , permet d'apprécier de manière quantitative la différence entre la réduction du PM des diverses formulations à la fin de l'étude de dégradation. Le ΔPM a été déterminé de la façon suivante [Dorati et coll., 2007] :

$$\Delta PM (\%) = \frac{(PM_0 - PM_t)}{PM_0} * 100 \quad (\text{Eq. 11})$$

où PM_0 et PM_t sont le PM moyen des microparticules avant leur incubation et au temps d'incubation t , respectivement.

La diminution du PM du polymère a donc été suivie par GPC afin d'en évaluer la dégradation progressive. Le système GPC est composé d'une HPLC HP 1200 series (Agilent Technologies, Diegem, Belgique) constituée d'une pompe binaire, un injecteur automatique, un four maintenant les colonnes à 40°C et un détecteur à indice de réfraction (RID). Les conditions suivantes ont été utilisées : colonne analytique : 2 PLgel 5 µm Mixed-C 300 7,5 mm placées en série (Range de PM : 200–2 000 000 g/mol) (Varian, Agilent Technologies, Diegem, Belgique) ; débit : 1,0 ml/min ; température des colonnes : 40°C ; volume d'injection : 20 µl ; durée d'un run : 30 minutes.

La phase mobile se compose de tétrahydrofurane (THF), préalablement filtré sur de l'oxyde d'aluminium anhydre afin d'en éliminer les peroxydes.

Tableau 16 : Poids moléculaire et polydispersité des standards de polystyrène utilisés pour réaliser la calibration de base.

Standards	Mw (g/mol)	Mn (g/mol)	δ (Mw/mn)	Mp (g/mol)
Rouge	363600	349300	1,04	371100
	46030	45000	1,03	46500
	4900	4760	1,03	4910
	815	740	1,10	780
Jaune	236600	232300	1,02	238700
	25070	24400	1,03	24600
	2590	2480	1,04	2590
	495	445	1,11	370
Vert	90250	88500	1,02	91800
	10190	9950	1,02	10110
	1520	1450	1,05	1570
	-	-	1,00	162

La calibration à partir de laquelle seront déterminés les résultats est réalisée à l'aide de standards de polystyrène de PM connus (standards EasiVial PS-M Varian, Agilent Technologies, Diegem, Belgique) (Tableau 16, Figure 38). Les standards sont dilués dans 1,0 ml de THF afin d'atteindre une concentration adéquate de chaque polymère. La dilution des standards est effectuée au moins 1 heure avant injection afin de s'assurer de l'entière dissolution des polymères. Chaque vial contenant 4 polymères de PM différent est ensuite injecté dans le système GPC, suivant les conditions décrites ci-dessus.

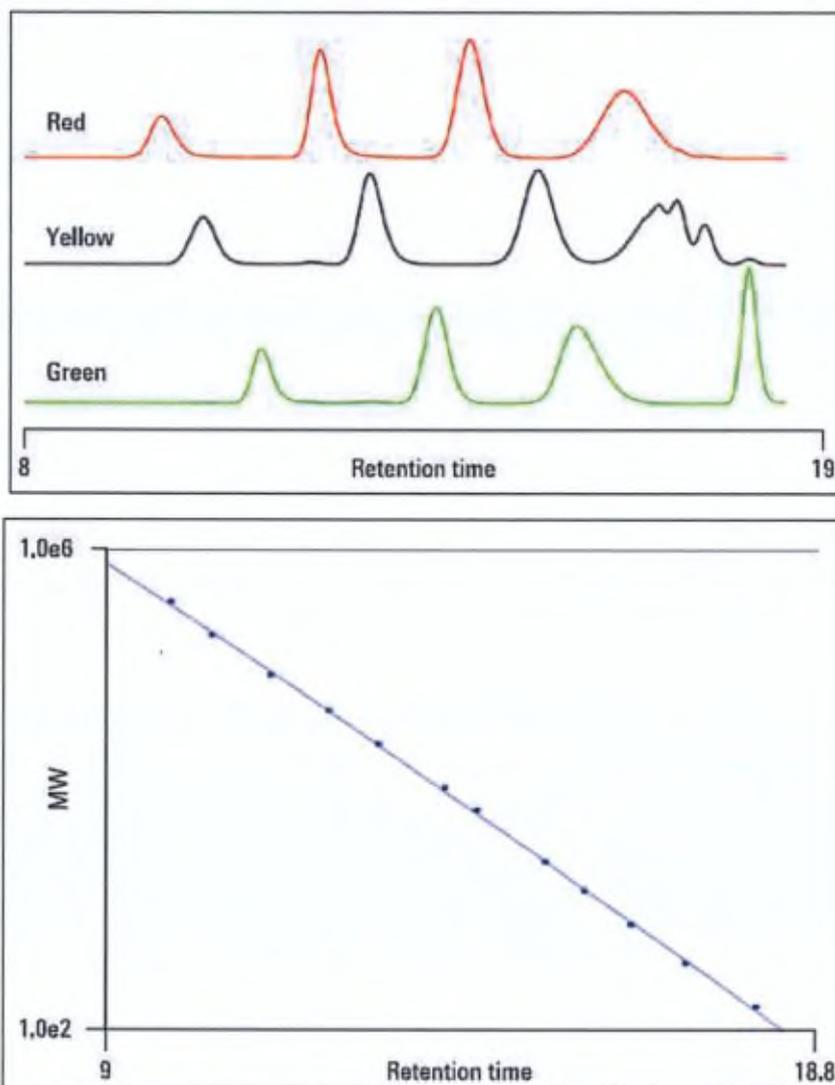


Figure 38 : Chromatogrammes et courbe de calibration typiques obtenus avec les standards Easi-Vial PS-M de polystyrène. Cette courbe de calibration permet de déterminer le PM du polymère des échantillons injectés.

Les échantillons séchés obtenus lors de l'étude de la dégradation des microsphères (voir *Partie expérimentale – Dégradation, II.1 Suivi de la dégradation des microparticules contenant la clonidine*) ont été solubilisés dans le THF pour obtenir une concentration finale de 1 mg/ml. Afin d'assurer la dissolution complète du polymère, les échantillons ont été laissés au repos durant 24 heures, avant d'être filtrés sur une membrane en PTFE de porosité 0,45 μm (Millex[®], Millipore, Billerica, États-Unis) et finalement injectés dans le système GPC.

La calibration à l'aide des standards ainsi que les résultats de PM des échantillons ont été collectés et analysés grâce au logiciel ChemStation GPC Data Analysis Software Rev. B.01.01 (Agilent Technologies, Diegem, Belgique).

3. Suivi de la perte de poids et de la prise en eau des microparticules

La perte de poids qu'encourent les microparticules permet de définir l'importance du phénomène d'érosion subi par les particules. Par contre, la prise en eau progressive des microparticules sera corrélée avec la dégradation graduelle du polymère. Ces deux manipulations ont été réalisées simultanément.

Une pesée d'environ 30 mg de microsphères a été réalisée exactement dans un tube de 50 ml (VWR, Leuven, Belgique) et dispersée dans 25 ml de PBS (pH $7,4 \pm 0,05$) contenant 0,02% (m/v) d'azide de sodium. Le tube a été agité horizontalement à 85 cycles/minute (agitateur bain-marie GFL 1086, GFL, Burgwedel, Allemagne) et maintenu à une température de $37 \pm 0,1^\circ\text{C}$. À des intervalles de temps définis (1 jour, 7 jours, 14 jours, 21 jours, 28 jours et 35 jours), les microparticules ont été filtrées sur une membrane en ester de cellulose de porosité $0,45 \mu\text{m}$ (Millipore, Billerica, États-Unis).

Les microsphères mouillées ont été pesées pour la détermination de la prise en eau, avant d'être séchées sous vide durant 48 heures. Après ce temps de séchage, elles ont à nouveau été pesées pour la détermination de la perte de poids.

La perte de poids (PP) des microparticules a été déterminée de la façon suivante [Dorati et coll., 2007]:

$$\text{PP (\%)} = \frac{(W_0 - W_d)}{W_0} * 100 \quad (\text{Eq. 12})$$

La prise en eau (PE) des microsphères a été déterminée de la façon suivante [Matsumoto et coll., 2005; Dorati et coll., 2007]:

$$\text{PE (\%)} = \frac{(W_t - W_0)}{W_t} * 100 \quad (\text{Eq. 13})$$

où W_0 est le poids initial des microparticules avant incubation, W_d est le poids des microsphères séchées pendant 48h au temps de prélèvement t et W_t est le poids des microsphères mouillées au temps de prélèvement t .

Comme les microparticules présentent une perte de poids croissante à chaque intervalle de temps en raison de l'érosion de fractions de polymère, il est essentiel de corriger W_0 dans le calcul de la prise en eau par cette perte de poids. W_0 se voit donc soustraire de la fraction du polymère érodé au temps de prélèvement identique, déterminée par la perte de poids.

La PP et la PE ont été déterminées en triplicat. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart-type.

4. Suivi du gonflement des microparticules

Le gonflement des microsphères a été suivi au cours du temps. Dans un microtube, 3 mg de microsphères ont été pesés et incubés dans 1 ml de PBS (pH $7,4 \pm 0,05$) contenant 0,02% (m/v) d'azide de sodium. À des intervalles de temps déterminés (0 jour, 1 jour, 4 jours, 8 jours, 12 jours, 15 jours et 22 jours), une goutte a été prélevée, déposée sur une lame de microscope et observée à l'aide d'un microscope optique Olympus BX60 (Olympus, Aartselaar, Belgique) combiné à une caméra digitale JVC TK-C1381.

Le diamètre de 200 particules a été mesuré grâce au logiciel Analysis Docu Olympus Software Version 5.1 (Olympus, Aartselaar, Belgique). Le diamètre moyen (μm) est obtenu en divisant la somme des valeurs individuelles de diamètre par le nombre total de microparticules mesurées. La microscopie optique nous donne ainsi une distribution en nombre et non en volume comme la diffraction laser.

Le gonflement des particules est exprimé de la façon suivante :

$$\text{Gonflement (\%)} = \frac{\text{Diamètre moyen}_t}{\text{Diamètre moyen}_i} * 100 \quad (\text{Eq. 14})$$

où Diamètre moyen_t et Diamètre moyen_i sont les diamètres moyens des microsphères déterminés au temps de prélèvement t et avant incubation, respectivement.

Le gonflement a été déterminé en triplicat. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart-type.

5. Mesure du pH en cours de dégradation

Le suivi du pH du milieu de dissolution et à l'intérieur des microparticules a été réalisé au cours du suivi de la dégradation des microsphères (voir *Partie expérimentale – Dégradation, II.1 Suivi de la dégradation des microparticules contenant la clonidine*).

5.1 Mesure du pH du milieu de dissolution

À des intervalles de temps déterminés (0 jour, 1 jour, 7 jours, 14 jours, 21 jours, 28 jours et 35 jours), le pH du milieu de dissolution a été mesuré à l'aide d'un pH-mètre (Mettler Toledo,

Zaventem, Belgique) équipé d'une microélectrode Inlab Micro Pro (Mettler Toledo, Zaventem, Belgique).

Trois mesures indépendantes ont été effectuées par formulation, la valeur exprimée dans les résultats étant la moyenne \pm écart-type de ces trois mesures.

5.2 Mesure du pH interne des microparticules

Après la détermination de la perte de poids, 10 mg de microsphères ont été pesés et solubilisés dans 800 μ l d'acétonitrile afin de procéder à la mesure du pH interne des microparticules. Après dissolution complète des microsphères, 200 μ l d'eau Ultrapure (pH 7) ont été ajoutés [Shenderova et coll., 1999 ; Fu et coll., 2000] et le pH a été mesuré directement (pH-mètre et microélectrode Mettler Toledo, Zaventem, Belgique).

Trois mesures indépendantes ont été effectuées par formulation, la valeur exprimée dans les résultats étant la moyenne \pm écart-type de ces trois mesures.

III. Résultats et discussion

Les formulations sélectionnées permettent d'évaluer l'influence de charges théoriques en clonidine différentes (1% et 6%), ainsi que de l'absence ou de la présence de tampons sur la dégradation du polymère (Tableau 17). Ces formulations présentent en outre des profils de dissolution bien distincts, d'où l'intérêt d'étudier l'implication de la dégradation du polymère sur la libération de la clonidine.

Les évaluations ont été systématiquement réalisées en parallèle sur des microparticules vides de tout principe actif (F1).

Les formulations évaluées ont été préparées selon les conditions optimales de composition et d'agitation, définies lors de l'optimisation de l'encapsulation (voir *Partie Expérimentale - Optimisation de l'encapsulation de principes actifs dans les microsphères de PLGA et caractérisation des particules*). Les microparticules ont donc été fabriquées à l'aide d'une double émulsion E/H/E (E/H : 30 000 rpm, 2 minutes ; E/H/E : 8 000 rpm, 2 minutes ; évaporation : agitateur à hélice, 200 rpm, 3 heures).

Tableau 17 : Composition et caractéristiques des microsphères de clonidine évaluées dans l'étude de dégradation (Paramètres non modifiés: PM PLGA: 96 000 Da; polymère: 3 g; phase organique: 22,5 ml; PVA: 300 mg). EE et D[4,3] exprimés en moyenne \pm écart-type, n=3.

Paramètres	Formulations				
	1	2	3	4	5
m clonidine (mg)	-	30	200	30	200
w ₁ (ml) (pH - Tampon) ^(a)	3	3	3	3 (3 - Citr.)	3 (3 - Citr.)
w ₂ (ml) (pH - Tampon) ^(a)	300	300	300	300 (8 - Phos.)	300 (8 - Phos.)
D[4,3] μm	29 \pm 2	38 \pm 3	32 \pm 7	17,2 \pm 0,1	26 \pm 7
EE (%)	-	2,24 \pm 0,09	1,31 \pm 0,02	24,2 \pm 0,5	7,6 \pm 0,2

^(a)Citr. = Tampon citrate / Phos. = Tampon phosphate

Le profil de dégradation des formulations basées sur des polymères de PM différent (34 000 et 48 000 Da) n'a pas été déterminé en raison de la littérature abondante existant sur l'influence du PM et montrant qu'un polymère de faible PM se dégrade plus rapidement qu'un polymère de haut PM [Park, 1994 ; Li, 1999 ; Blanco et coll., 2006 ; Vey et coll., 2011]. De plus, il a été montré que le PLGA de PM le plus élevé (96 000 Da) permet d'obtenir la libération la plus lente du principe actif [Gaignaux et coll., 2012]. Dès lors, les études de dégradation ont été ciblées uniquement sur les microsphères chargées en clonidine,

produites à partir du PLGA 96 000 Da. Enfin, l'influence du diamètre moyen des microsphères sur la dégradation n'a pas non plus été envisagée, sachant que l'augmentation du diamètre des microparticules s'accompagne d'une accélération de la vitesse de dégradation du polymère [Klose et coll., 2006].

L'étude précédente de l'influence de divers paramètres sur la libération de la clonidine, ainsi que la détermination et l'application d'un modèle mathématique à la cinétique de libération définie expérimentalement nous a permis de conclure à l'implication certaine et prédominante du phénomène de diffusion en début de libération (Figure 39). Dans les phases ultérieures, la dégradation du polymère devient trop importante et nécessite sa prise en compte dans l'interprétation des résultats [Gaignaux et coll., 2012]. Dès lors, l'influence de divers paramètres (charge théorique en clonidine et utilisation de tampons) sur la dégradation et, par extension, sur la libération de la clonidine, a été évaluée.

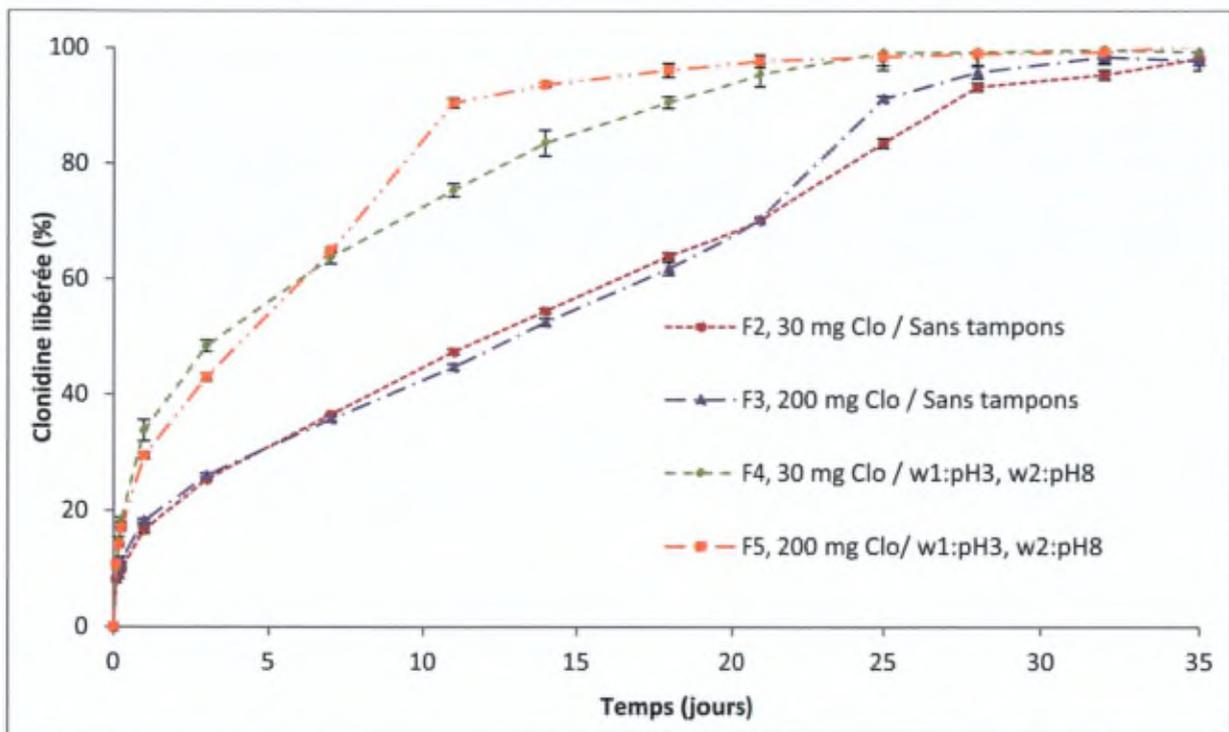


Figure 39 : Influence de la charge théorique en clonidine (F2 et F4 : 30 mg de clonidine, 1% ; F3 et F5 : 200 mg de clonidine, 6%) et de la présence de tampons (F4 et F5 ; $w_1 = \text{pH } 3$; $w_2 = \text{pH } 8$) (moyenne \pm écart-type, $n=3$) sur les profils de libération de la clonidine.

Les premières conclusions sur la libération de la clonidine à partir des microparticules ont montré que la charge théorique en clonidine n'influence pas sa vitesse de libération, que les phases aqueuses soient tamponnées ou non, probablement en raison de la charge réelle similaire dans les microparticules ($< 1\%$). En effet, la préparation de microparticules chargées

avec 200 mg de clonidine (charge théorique = 6%) (F3 et F5) mène à une charge réelle semblable à celle des microparticules chargées avec 30 mg de clonidine (charge théorique = 1%) (F2 et F4). La perte de la clonidine vers w_2 permet d'expliquer l'absence de différence entre les charges réelles, bien que la charge théorique soit 6 fois plus élevée. Enfin, en présence de tampons (F4 et F5), la vitesse de libération de la clonidine est accélérée, probablement en raison de la diminution de taille observée ($D[4,3]$ F4 = $17,2 \pm 0,1 \mu\text{m}$; $D[4,3]$ F5 = $26 \pm 7 \mu\text{m}$) par rapport aux formulations non tamponnées ($D[4,3]$ F1 = $29 \pm 2 \mu\text{m}$; $D[4,3]$ F2 = $38 \pm 3 \mu\text{m}$; $D[4,3]$ F3 = $32 \pm 7 \mu\text{m}$). Ceci augmente la surface de contact des microparticules avec le milieu de dissolution et réduit la longueur du parcours à effectuer par la clonidine, ces deux facteurs accélérant la libération.

1. Influence des conditions de fabrication des microparticules sur la dégradation

Il apparaît que les conditions de fabrication des microparticules altèrent le PLGA 96 000 Da, vu la diminution de son PM, en fonction de la composition de la formulation (Tableau 18). La formulation de microsphères de PLGA vides de clonidine (F1) provoque une diminution du PM du polymère brut de 93 000 à 81 500 Da. La procédure de fabrication semble donc mener à la production d'une faible proportion d'oligomères de faible PM, vraisemblablement situés au niveau de la surface des microparticules [Dunne et coll., 2000 ; Blanco et coll., 2006]. Le contact des microsphères avec une phase aqueuse durant l'évaporation du solvant (3 heures), les phases de filtration, de rinçage et de séchage sous vide (48 heures) peut expliquer l'initiation de la dégradation du polymère durant l'étape de fabrication.

L'addition de clonidine provoque une hydrolyse supplémentaire du polymère (F2 à F5, Tableau 18). En effet, la clonidine étant initialement ajoutée dans la formulation sous forme de chlorhydrate, elle est sujette à une hydrolyse acide lors de sa solubilisation en milieu aqueux (pH solution aqueuse de clonidine HCl = 4,0 – 5,0). Cet environnement acide se traduit par une diminution du PM du PLGA, la dégradation des polyesters aliphatiques de ce type étant accélérée en conditions acides. La dégradation du PLGA se voit aussi accélérée par des molécules basiques, en raison du phénomène d'hydrolyse catalysée par les amines [Fitzgerald et Corrigan, 1996; Dunne et coll., 2000].

Enfin, l'utilisation de tampons durant la fabrication des microparticules (F4 - F5) provoque la diminution la plus drastique du PM du polymère, principalement lorsque la charge en clonidine est la plus haute (F5 – PM \approx 61 000 Da). Le pH acide choisi pour w_1 (pH 3) pourrait

être responsable de cette diminution conséquente du PM en favorisant l'hydrolyse acide du polymère.

Tableau 18 : Valeurs de PM du PLGA 96 000 Da brut et des formulations étudiées, avant incubation dans le milieu de dissolution et après l'étude de dégradation. Le pourcentage de variation du PM, Δ PM, exprime le pourcentage de variation du PM moyen des différentes formulations étudiées après 35 jours.

Échantillon	PM initial (g/mol)	PM final (g/mol)	Δ PM (%) après 35 jours
PLGA RG505	93 040	-	-
F1	81 522	7 337	91
F2	75 890	6 089	92
F3	73 491	4 368	94
F4	70 841	10 536	85
F5	60 810	12 427	80

2. Étude du phénomène de dégradation du polymère

La dégradation proprement dite, c'est-à-dire le phénomène de scission des oligo- et monomères constitutifs du polymère, a été étudiée via la diminution du PM, la prise en eau des microparticules et l'évolution des propriétés thermiques du polymère.

2.1 Suivi de la diminution du poids moléculaire du polymère

La diminution du PM du polymère peut s'observer immédiatement après incubation des microparticules dans le milieu de dissolution (PBS, pH $7,4 \pm 0,05$) (Figure 40).

L'examen des résultats de Δ PM montre de façon évidente la différence existant entre les formulations avec et sans tampons (Tableau 18). En effet, F4 et F5 présentent une dégradation initiale plus importante mais en fin de processus, le PM du polymère demeure plus élevé, attestant d'un ralentissement de la dégradation. L'initiation rapide de la dégradation observée pour ces formulations peut être due à la w_1 acide (pH 3), menant à la formation de pores tamponnés à pH 3 suite à la phase de séchage. Cet environnement interne acide promeut la dégradation du polymère en début de processus. Le ralentissement de la dégradation observé en fin d'étude et traduit par de plus faibles valeurs de Δ PM (Tableau 18) peut s'expliquer par les différentes concentrations en microparticules dans le milieu de dissolution (Concentrations (mg/ml): F1 = 2, F2 = 4, F3 = 6, F4 = 2, and F5 = 1) (voir *Partie expérimentale – Dégradation, II.1 Suivi de la dégradation des microparticules contenant la clonidine*). Les effets autocatalytiques présents au début sont atténués par la faible concentration en

microparticules de ces formulations et par l'efficace neutralisation/dilution des produits de dégradation acides par le milieu de dissolution. En effet, le plus faible PM du polymère, observé après fabrication des microparticules, est associé à une libération plus rapide des produits de dégradation acides, ce qui réduit les phénomènes d'autocatalyse à l'intérieur des particules.

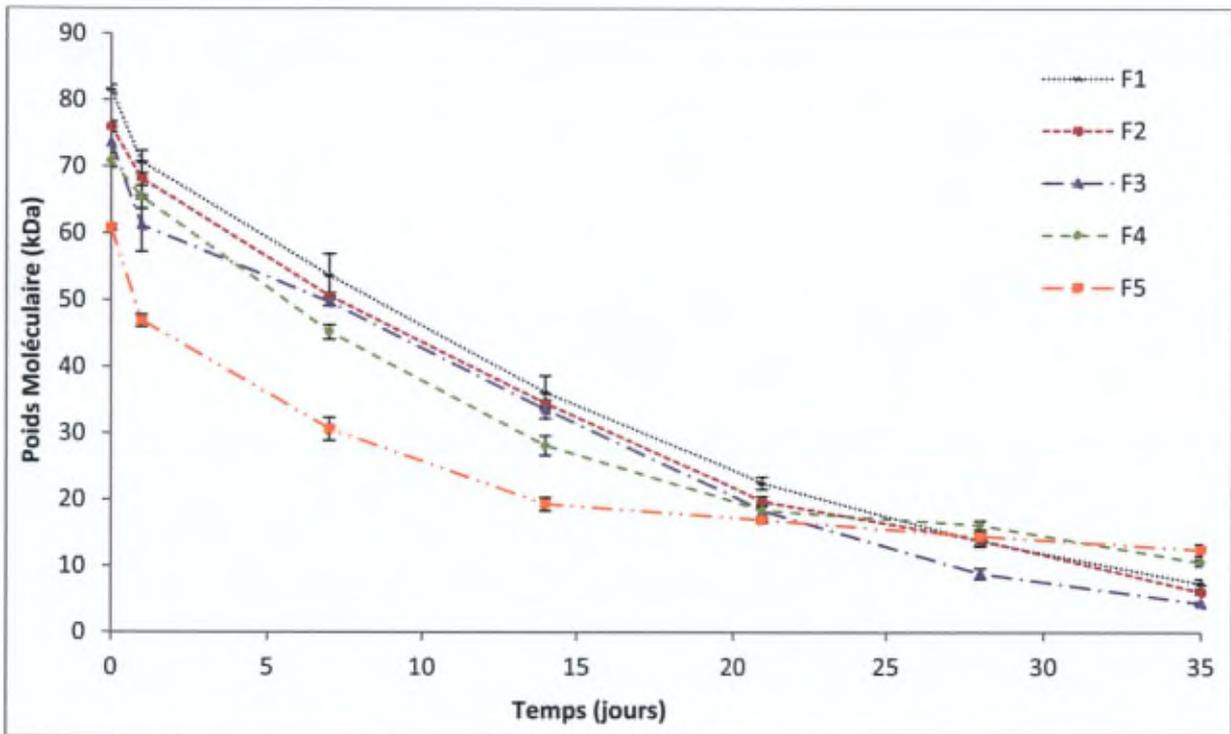


Figure 40 : Évolution de la masse moléculaire moyenne en poids, M_w , du PLGA RG505 (M_w théorique = 96 000 Da) sur une période de 35 jours. Incubation des microparticules dans du PBS (pH $7,4 \pm 0,05$) à 37°C (moyenne \pm écart-type, $n=3$).

Pour les formulations ne contenant pas de tampons (F1 à F3), la dégradation se déroule de façon tout à fait opposée : le début est plus lent mais le phénomène de dégradation est constant au cours des 35 jours d'étude jusqu'à atteindre une diminution importante du PM ($\Delta\text{PM} > 90\%$).

Toutes les formulations étudiées présentent cependant une dégradation conséquente exprimée par la réduction majeure du PM du polymère (ΔPM compris entre 80 et 94%). Cette dégradation, initiée dès l'incubation des microparticules, peut être attribuée à la large proportion d'acide glycolique contenue dans le polymère (PLGA 50:50, ratio lactide:glycolide). Les unités glycolides étant plus hydrophiles que les unités lactides, le clivage hydrolytique cible en premier lieu les liens esters des acides glycoliques, expliquant leur hydrolyse plus rapide [Witschi et Doelker, 1998; Panyam et coll., 2003; Giteau et coll.,

2008]. De plus, comme le PLGA 50:50 96 000 Da est un polymère amorphe, sa dégradation peut être favorisée par une plus large capacité à emmagasiner l'eau que les polymères cristallins [Li et coll., 1990a; Lao et coll., 2011].

La dégradation du polymère, s'opérant de façon importante dès le contact des microparticules avec le milieu de dissolution, est donc visiblement impliquée dans la libération de la clonidine (Figure 39 et Figure 40), en complément des phénomènes de diffusion établis par le modèle mathématique (Eq. 6). Le modèle théorique développé pour la libération de la clonidine ne s'accorde plus avec les points expérimentaux après 7 à 10 jours selon les formulations, démontrant l'implication supplémentaire de la dégradation du polymère dans la dissolution (Eq. 6, Figure 31) [Gaignaux et coll., 2012]. À ce stade, la libération de la clonidine est accélérée, phénomène attribuable à la dégradation du polymère. En effet, à ce point de la dissolution, le PM du polymère a atteint une valeur critique ($\approx 30\%$ du polymère est dégradé) permettant à la clonidine d'être libérée par diffusion via les pores et canaux remplis d'eau, partiellement créés par la dégradation du polymère. De plus, il est généralement admis que la libération d'une molécule à partir d'un système constitué de PLGA de haut PM a lieu grâce à la combinaison des phénomènes de diffusion et de dégradation [Zolnik et Burgess, 2007].

Les formulations F4 et F5 présentent une libération plus rapide de la clonidine en raison de la dégradation initiale du PLGA plus importante dès leur incubation (Figure 39 et Figure 40). Le PM plus faible du polymère permet une libération rapide de la clonidine. Au vu des coefficients de diffusion D préalablement déterminés (Tableau 13), il peut cependant être supposé que la clonidine initialement libérée se situe principalement en surface des microparticules. Les valeurs de D pour F4 et F5 étant relativement faibles, elles peuvent s'expliquer par une dégradation encore insuffisante du polymère et donc à un nombre de canaux et de pores insuffisants. De plus, l'agencement des chaînes de polymère, bien que de PM plus faible, peut être tel que la diffusion de la molécule à partir du centre des particules s'en retrouve entravée. Les formulations F2 et F3 présentent par contre une libération plus lente et progressive en début de profil, et une accélération de celle-ci en fin d'étude, ce qui corrobore les profils de dégradation du polymère.

Les chromatogrammes obtenus par GPC sont caractérisés par une distribution monomodale jusqu'au 21^{ème} jour (Figure 41). Les chromatogrammes deviennent ensuite bimodaux, indiquant le contenu progressivement plus élevé des échantillons en oligomères de faible PM, produits de la dégradation. La bimodalité des chromatogrammes est typique d'une dégradation hétérogène ; des effets autocatalytiques dus à la dégradation acide du polymère

seraient donc présents et accélèreraient la dégradation à l'intérieur des microparticules [Li et coll., 1996].

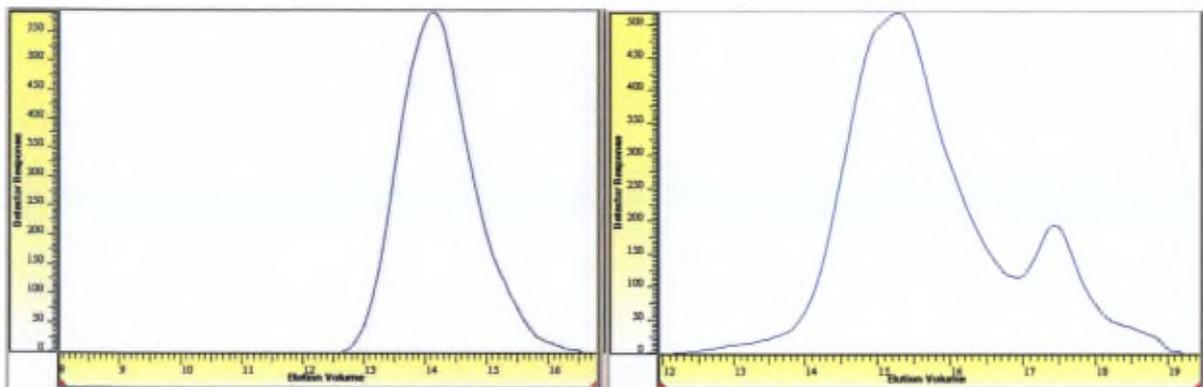


Figure 41 : Chromatogrammes obtenus par GPC pour la formulation F2 après 1 jour (gauche) et 21 jours (droite) d'incubation. Ces chromatogrammes montrent l'apparition de la bimodalité, signe de la formation progressive d'oligo- et monomères à l'intérieur des microparticules.

La régression linéaire obtenue via le graphique semi-logarithmique à partir des résultats de l'évolution du PM du PLGA en fonction du temps est (relativement) correcte pour toutes les formulations ($r^2 \geq 0,91$), supposant une cinétique d'ordre 1 pour la dégradation du polymère (Figure 42, Tableau 19). Les effets autocatalytiques ne sont probablement pas prédominants dans le contrôle du phénomène de dégradation. En effet, dans un tel cas, une augmentation progressive de la constante de vitesse de dégradation k aurait été observée, en raison de l'accentuation de la dégradation [Faisant et coll., 2002]. La dégradation du polymère semble avoir lieu principalement à la suite d'une hydrolyse aléatoire du polymère. L'autocatalyse, clivage des liens esters par les produits acides, participe à la dégradation (chromatogrammes bimodaux) mais ne constitue pas le procédé unique et prépondérant [Samadi et coll., 2013]. Elle apparaît être efficacement contrôlée, neutralisée par la diffusion des acides à chaîne courte dans le milieu de dissolution et/ou la diffusion du milieu de dissolution à l'intérieur des microparticules.

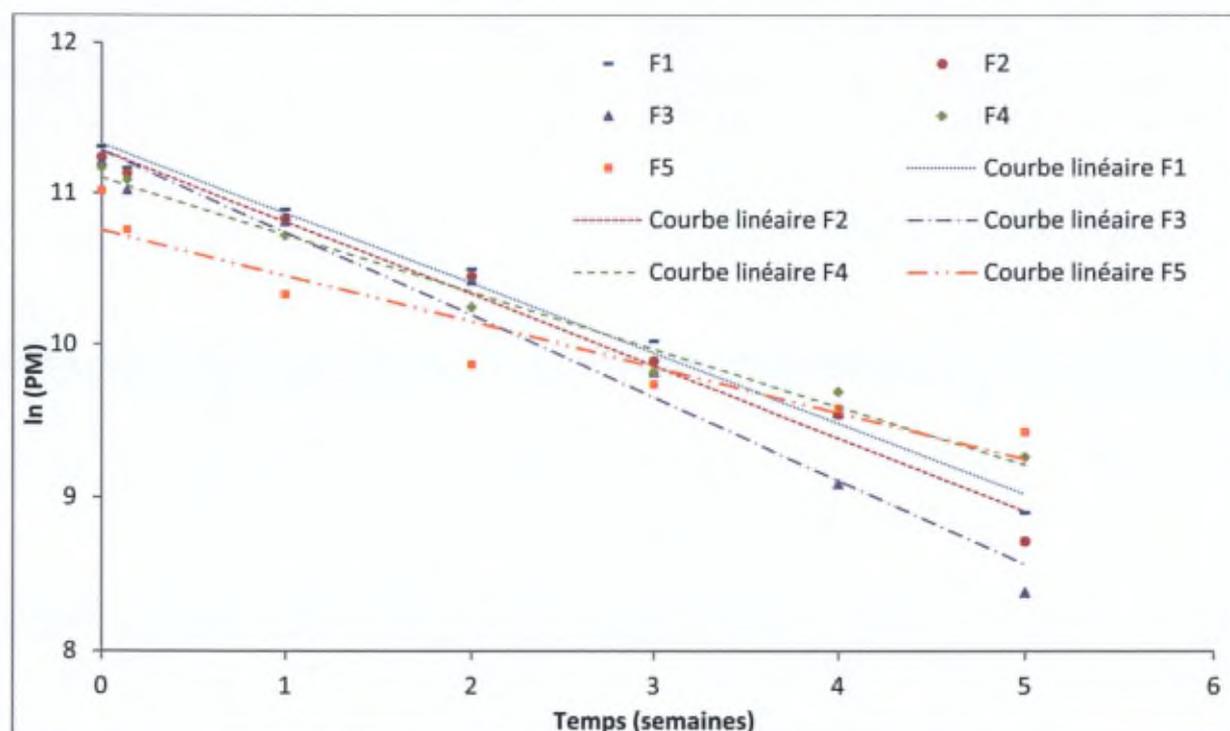


Figure 42 : Graphique semi-logarithmique du PM du PLGA 96 000 Da, sur une période de 35 jours, pour les formulations incubées dans le PBS (pH $7,4 \pm 0,05$) à 37°C . Les courbes ont été établies à partir des moyennes des valeurs de Mw ($n=3$).

Grâce aux pentes des courbes $\ln(\text{PM}) = f(t)$, les constantes de vitesse de dégradation k ont pu être déterminées (Tableau 19) [Kenley et coll., 1987; Charlier et coll., 2000].

Tableau 19 : Constante de vitesse de dégradation k des formulations étudiées et coefficient de détermination, r^2 . Les valeurs de k ont été obtenues à partir des pentes des courbes de $\ln(\text{PM}) = f(t)$.

Formulation	k (semaine ⁻¹)	r^2
F1	0,4614	0,99
F2	0,475	0,98
F3	0,5434	0,98
F4	0,475	0,98
F5	0,3008	0,91

La valeur de k observée pour F3 est la plus élevée, ce qui soutient la dégradation la plus rapide préalablement présentée. Les différentes concentrations de microparticules impliquées dans le milieu de dissolution permettent d'expliquer partiellement les différences entre les valeurs de k (Concentrations (mg/ml): F1 = 2, F2 = 4, F3 = 6, F4 = 2 et F5 = 1). La formation de plus grandes quantités d'acides à chaîne courte liée à la plus haute concentration en

microparticules dans le milieu de dissolution pour F3 explique la dégradation accélérée et importante (valeurs de k et de ΔPM). À l'inverse, dans le cas de F5, la concentration en microparticules utilisée est la plus faible, ce qui résulte en une production réduite d'acides à chaîne courte et en une dégradation plus lente, comme confirmé par les valeurs de k et de ΔPM (Tableau 18 et Tableau 19).

D'un autre point de vue, en acceptant que la concentration en microparticules dans le milieu de dissolution influence la valeur de k , la vitesse de dégradation ne semble pas être affectée par la charge en clonidine ou par la présence de tampons. Effectivement, les valeurs de k observées pour F1 et F4 (concentration en microparticules de 2 mg/ml pour ces deux formulations) sont similaires malgré l'utilisation supplémentaire de clonidine et de tampons dans F4.

Dans les conditions *in vivo*, la diminution progressive de la concentration en microparticules et l'élimination simultanée d'au moins une fraction des produits de dégradation acides, associée au renouvellement constant du liquide synovial, pourraient limiter la vitesse de dégradation. En contrepartie, la dégradation du polymère serait probablement accélérée par d'autres facteurs tels que la présence de composants biologiques (lipides en conditions pathologiques) agissant comme plastifiants mais également, en réponse à la production de radicaux libres secondaire à la reconnaissance des microparticules en tant que corps étranger à l'organisme. De plus, alors que les microparticules s'agglomèrent *in vitro* après quelques jours d'analyse, ce phénomène peut avoir lieu plus rapidement *in vivo*, menant à l'accumulation des produits de dégradation à l'intérieur des agglomérats et favorisant alors la dégradation des microsphères [Ali et coll., 1994 ; Tracy et coll., 1999 ; Wischke et Schwendeman, 2008].

2.2 Suivi de la prise en eau des microparticules

La dégradation du polymère, c'est-à-dire l'hydrolyse de ses liens esters, est directement liée à la captation en eau des microsphères (Figure 43). La prise en eau est l'étape indispensable afin d'amorcer la dégradation des microparticules incubées et la libération de la molécule encapsulée [Dunne et coll., 2000].

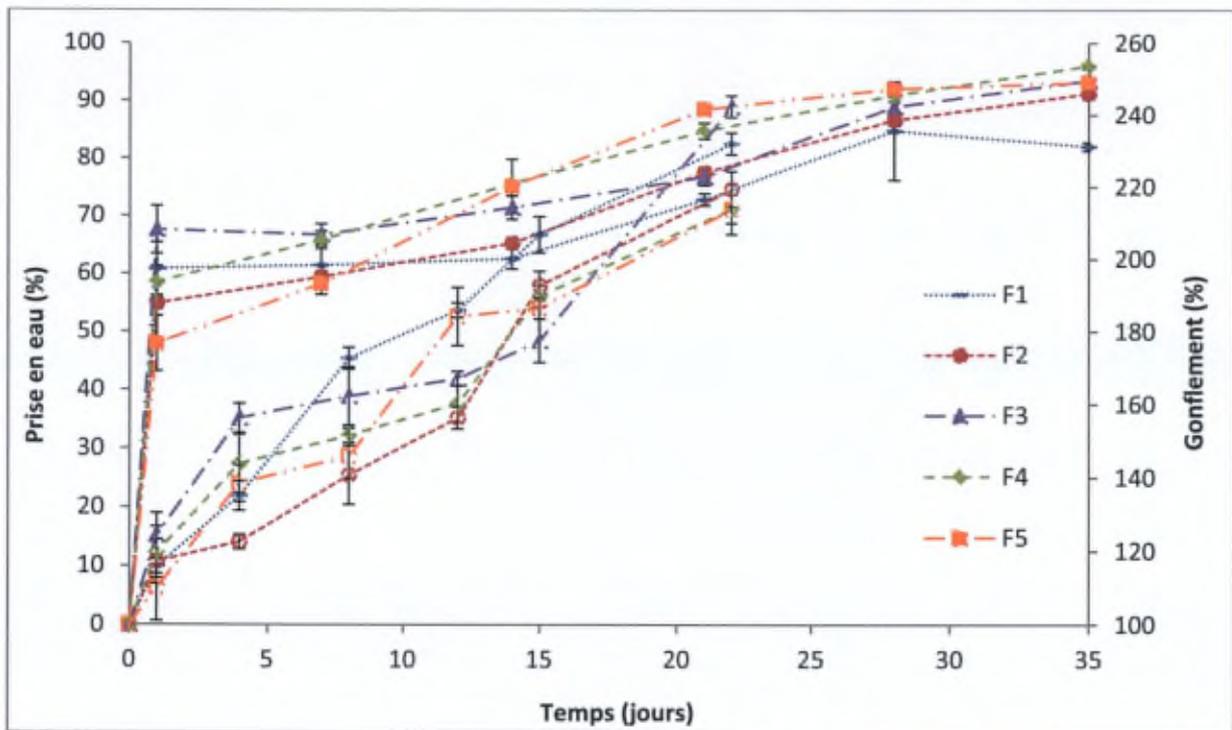


Figure 43 : Évolution de la prise en eau (symboles remplis) et du gonflement (symboles vides) des microparticules incubées dans le PBS (pH $7,4 \pm 0,05$) à 37°C durant 35 et 22 jours, respectivement (moyenne \pm écart-type, $n=3$).

Selon la formulation, le polymère a subi une diminution de son PM allant de 5 000 à 15 000 Da par rapport à la valeur initiale au cours du premier jour de l'étude (Figure 40). Parallèlement, le poids des formulations étudiées augmente d'environ 50% au cours du premier jour en raison de l'eau captée par les microparticules (Figure 43). La captation rapide et importante du milieu de dissolution par les microparticules peut s'expliquer en partie par le caractère hydrophile de la clonidine ; l'eau interagit premièrement avec la clonidine partiellement située en surface des microsphères, avant d'humidifier la matrice polymérique. Le gradient existant entre le milieu de dissolution et l'intérieur des microparticules facilite alors la diffusion de l'eau jusqu'au centre des particules. De plus, la présence d'oligo- et de monomères hydrophiles, issus de la dégradation du PLGA au cours de la production des microparticules, ainsi que pendant le premier jour d'incubation (Tableau 18 et Figure 40), participe également à la captation d'eau par les microparticules. Il est également normal, en tant que polymère assez hydrophile s'érodant de façon homogène, que la prise en eau se produise plus rapidement que la dégradation. Enfin, l'absence d'agglomération durant le premier jour d'incubation est associée à une grande surface de contact des microparticules avec le milieu de dissolution, augmentant dès lors la captation possible en eau. Ce phénomène

ralentit d'ailleurs dans les jours suivants, période pendant laquelle l'agglomération des microparticules augmente progressivement.

La libération de petites molécules hydrophiles insolubles dans les PLGA, comme la clonidine, peut être affectée par divers facteurs tels que la captation en eau, la dégradation/érosion du polymère et la formation de pores remplis d'eau permettant la diffusion [Zhang et coll., 1997; Fredenberg et coll., 2011]. Suite à l'incubation dans le milieu de dissolution, la rapidité de la pénétration de l'eau se déroule partiellement en fonction des pores existant à l'intérieur des microparticules [Batycky et coll., 1997]. La pénétration d'eau à l'intérieur des microparticules forme progressivement des pores internes additionnels dont la taille et le nombre doivent être suffisants pour permettre la libération de la molécule. La captation en eau a généralement lieu plus rapidement que la libération de la molécule encapsulée. Le mécanisme contrôlant la vitesse de libération de la clonidine est donc la création de pores suite à l'hydrolyse du polymère et à la captation en eau [Fredenberget et coll., 2011].

La captation en eau et la dégradation du polymère peuvent être modulées par le choix du PM du polymère, la présence de groupements carboxyliques terminaux libres (augmentant l'hydrophilie du polymère) et la proportion lactide/glycolide contenue dans le polymère [Wischke et Schwendeman, 2008].

En conséquence de la prise en eau, de la dégradation du polymère et de la libération de la clonidine, la perméabilité des microparticules augmente progressivement. Ceci facilite d'autant plus la pénétration du milieu de dissolution dans les microparticules et le gonflement en découlant. Le gonflement, corrélé à la prise en eau, permet de caractériser le processus d'érosion du polymère (voir *Partie expérimentale – Dégradation, III.3.1 Suivi du gonflement des microparticules*).

2.3 Suivi des propriétés thermiques et cristallines du polymère au cours de sa dégradation

La variation de la Tg du polymère tout au long de sa dégradation a été déterminée sur les microparticules préalablement séchées. En général, une diminution de la Tg est attendue lorsqu'un polymère se dégrade en raison de la diminution de son PM. En effet, les polymères de plus faible PM sont associés à des valeurs de Tg plus basses [Siepmann et coll., 2005]. Cependant, durant cette étude, la diminution de la Tg est faible (F1 = 3,3°C, F2 = 1,7°C, F3 = 1,3°C, F4 = 1,1°C et F5 = 1,5°C) une fois comparée aux valeurs initiales ($\approx 48,2^\circ\text{C}$ pour toutes les formulations) (Figure 44).

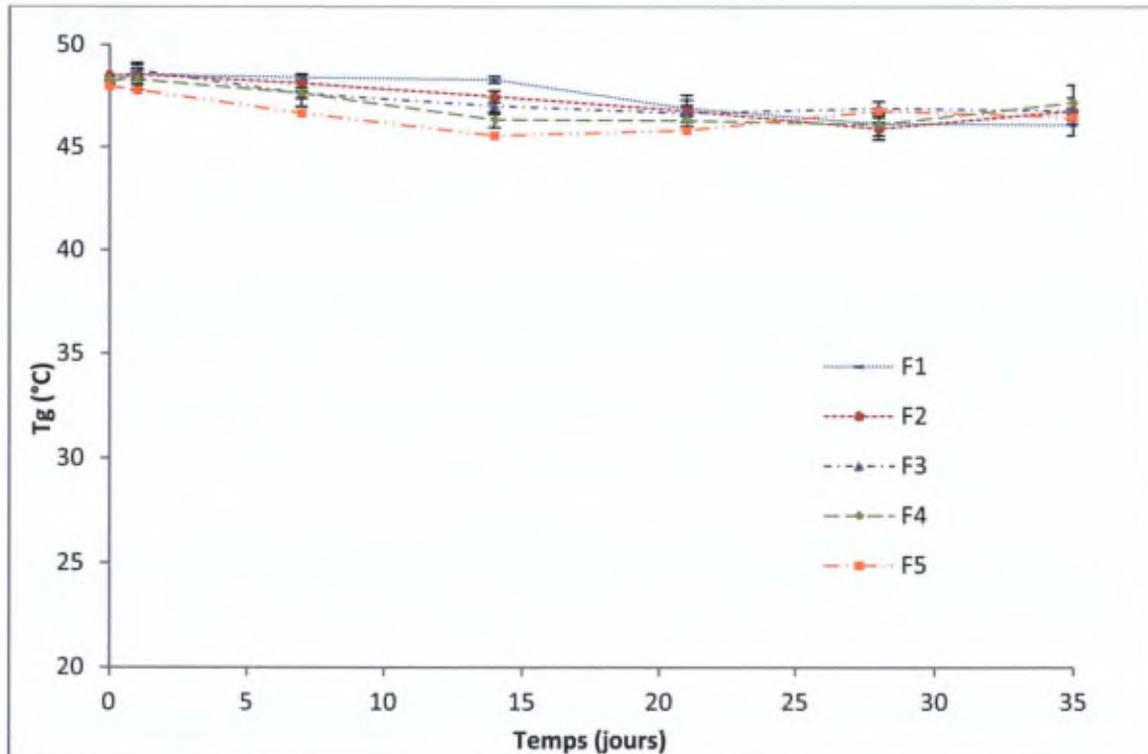
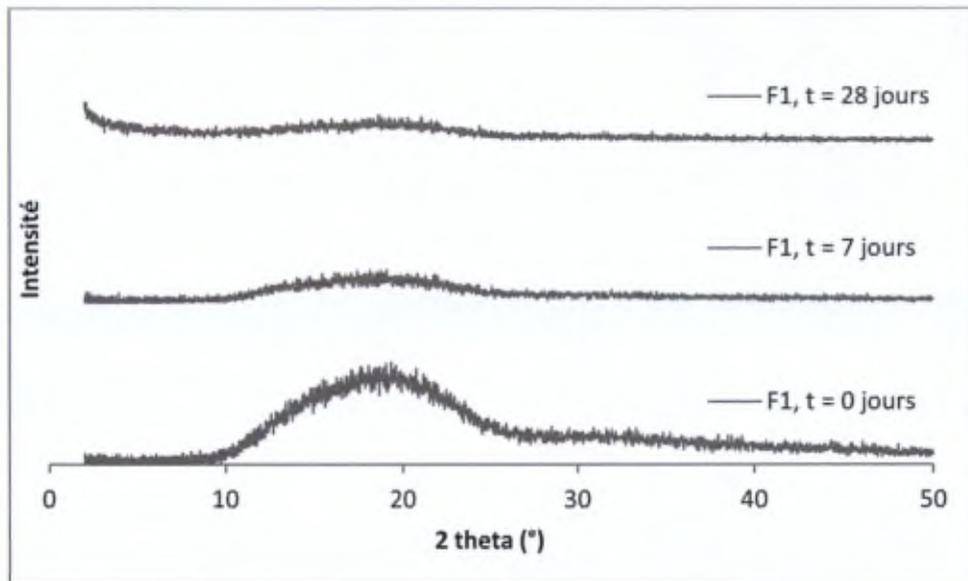


Figure 44 : Évolution de la Tg du polymère durant l'incubation des microsphères dans le milieu de dissolution (PBS pH $7,4 \pm 0,05$, 37°C), durant 35 jours (moyenne \pm écart-type, $n=3$).

Tout au long de l'étude de dégradation, la Tg du polymère composant chaque formulation demeure au-dessus de la température du milieu de dissolution (37°C). Dès lors, l'état physique des microparticules n'est pas altéré. En effet, elles n'accèdent pas à un état caoutchouteux, comme confirmé par les images SEM (Figure 47). Cet état aurait contribué au phénomène de dégradation et diminué la valeur de Tg [Blanco et coll., 2006].

L'évolution de la cristallinité des formulations a également été suivie au cours de la dégradation du polymère. Les analyses PXRD réalisées sur toutes les formulations ne présentent aucun pic, ce qui montre le caractère amorphe de celles-ci (Figure 45). Aucune fraction du polymère n'a donc cristallisé durant sa dégradation, ce qui aurait prolongé le processus. Effectivement, les zones amorphes se dégradent plus rapidement grâce à leur tendance à attirer plus facilement l'eau que les zones cristallines [Kim et Park, 2004].

(a)



(b)

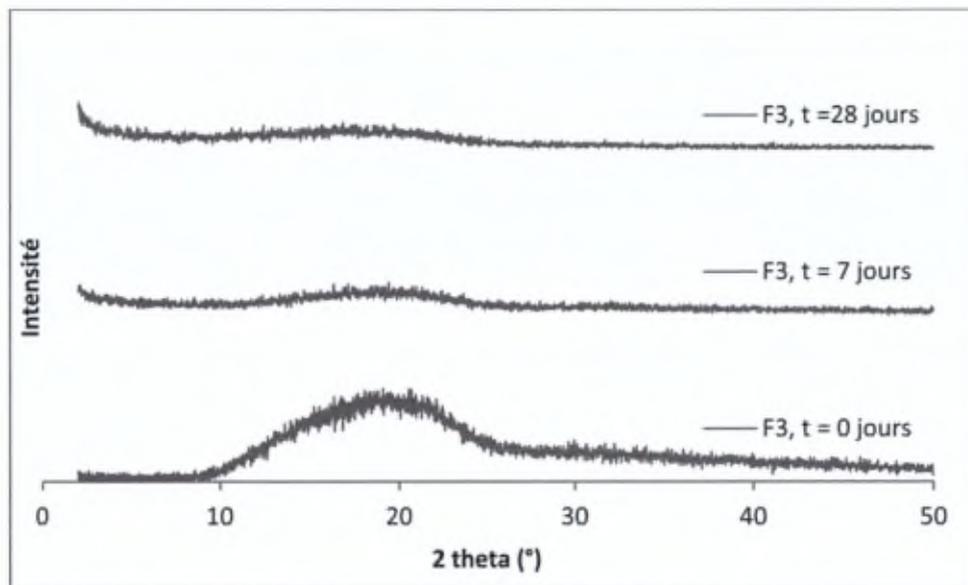


Figure 45 : Évolution de l'état physique du polymère durant la dégradation des microsphères incubées dans le milieu de dissolution (PBS pH $7,4 \pm 0,05$, 37°C) durant 35 jours. Analyse PXRD de la formulation (a) F1 vide de clonidine et (b) F3 contenant 200 mg de clonidine, avant incubation et après 7 jours et 28 jours d'incubation.

3. Étude du phénomène d'érosion du polymère

3.1 Suivi du gonflement des microparticules

L'évaluation du gonflement des microparticules montre une augmentation progressive de leur diamètre moyen suite à leur incubation dans le milieu de dissolution (Figure 43). Après 22 jours, le diamètre moyen a doublé (accroissement du diamètre compris entre 2,13 et 2,42 fois selon les formulations). L'étude du gonflement a porté sur 22 et non 35 jours comme les

autres études car la dégradation et l'érosion progressives du polymère conduisent généralement à une réduction de la taille des microparticules. La progressive perte d'intégrité des microparticules et l'apparition de fragments de polymère de petite taille ont d'ailleurs pu être observées par SEM, principalement à partir du 28^{ème} jour (Figure 47).

Le gonflement s'explique par l'infiltration d'eau dans les microparticules et est d'ailleurs corrélé à la prise en eau des microsphères (Figure 43). Le gonflement est dû à un réarrangement des chaînes du polymère résultant de l'augmentation de pression à l'intérieur des microparticules survenant secondairement à la captation d'eau [Fredenberg et coll., 2011].

Alors que les microsphères captent rapidement une grande quantité de milieu de dissolution (environ 50% en un jour), le gonflement a lieu de façon plus progressive, vu que le diamètre moyen des microparticules n'augmente que de maximum 25% durant le premier jour de l'étude. La présence de pores à l'intérieur des microparticules pourrait expliquer cette différence existant entre les deux phénomènes. En effet, une grande quantité d'eau est rapidement captée mais les microparticules ne semblent pas gonfler en conséquence, probablement en raison des canaux qui captent l'eau en premier lieu, ne provoquant pas d'augmentation de la pression interne. De plus, malgré les résultats de dégradation et de captation en eau, il semblerait que la vitesse de dégradation des polyesters de haut PM devienne indépendante de la concentration en eau à l'intérieur des microparticules, ce facteur n'étant alors plus limitant [Wiggins et coll., 2006]. Après le premier jour, les deux phénomènes deviennent tous deux progressifs et d'évolution constante.

3.2 Suivi de la perte de poids des microparticules

Les particules s'érodant de façon homogène (bulk-eroding systems) présentent généralement un délai avant l'apparition de la perte de poids, contrairement aux particules s'érodant de façon hétérogène (surface-eroding systems), dont la perte de poids débute immédiatement à la suite du contact avec le milieu de dissolution [Lao et coll., 2011]. Les microparticules s'érodant dans la masse sont sujettes à une perte de poids débutant assez longtemps après l'initiation de la dégradation du polymère, c'est-à-dire une fois qu'elles deviennent suffisamment poreuses pour permettre la libération des produits de dégradation solubles dans l'eau (oligo- et monomères) accumulés à l'intérieur [Dunne et coll., 2000]. L'érosion débute à des moments variables selon le PM et la conformation du polymère : après quelques jours pour les polymères de faible PM, après quelques semaines pour les polymères de haut PM et après des mois pour les polymères de type PLA [Göpferich, 1997]. Une perte de poids

significative pour le PLGA 50:50 n'est observée qu'après 21 jours [Dunne et coll., 2000] ou même 35 jours [Blanco et coll., 2006].

Au cours de ce travail, la perte de poids constatée reste comprise entre 10 et 30%, du 7^{ème} jour jusqu'à la fin de l'étude pour F1, F2, F3 et F5. La production d'oligomères de faible PM durant la fabrication des microparticules, progressivement libérés au contact du milieu de dissolution, peut expliquer la perte de poids observée (Tableau 18, Figure 46).

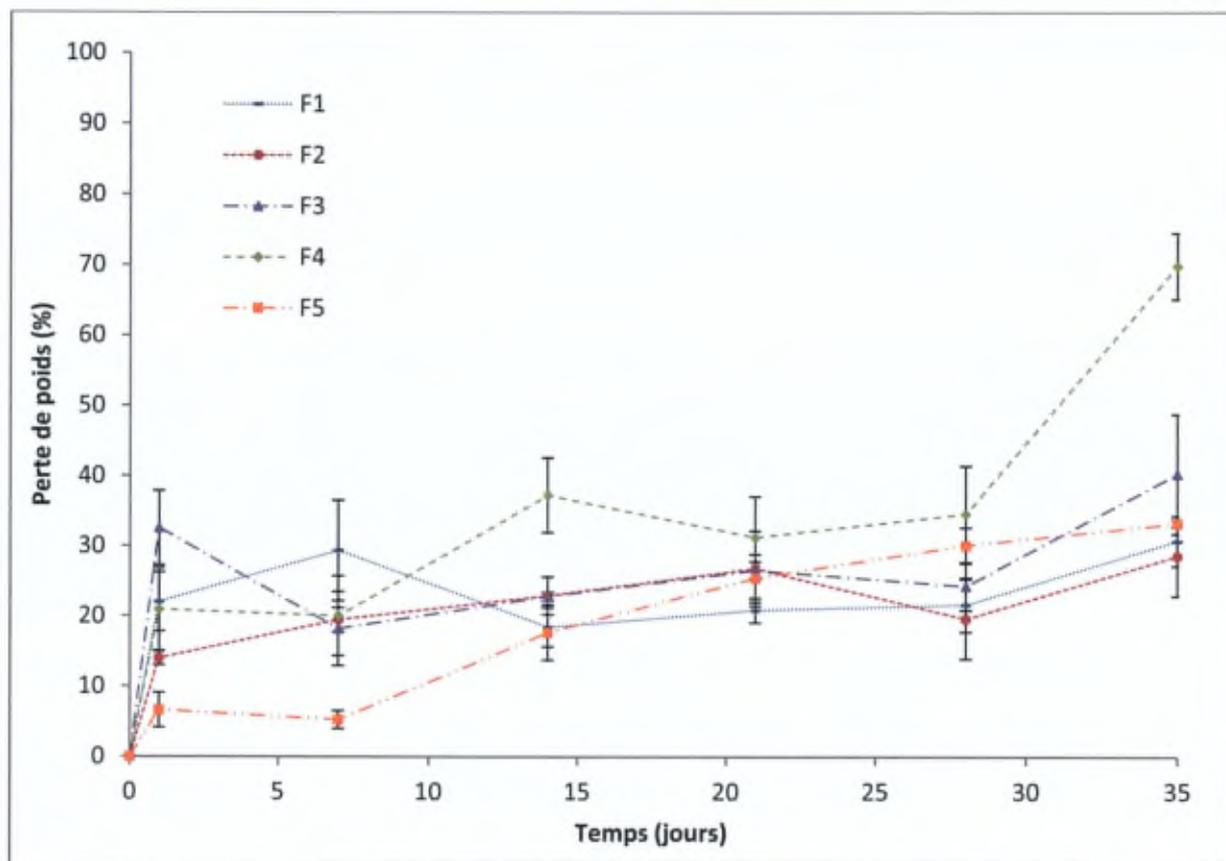


Figure 46 : Évolution de la perte de poids des microparticules incubées dans le PBS (pH 7,4 ± 0,05) à 37°C durant 35 jours (moyenne ± écart-type, n=3).

De plus, les produits de dégradation solubles situés en surface des microparticules sont rapidement libérés dans le milieu (augmentation de la rugosité des microparticules après 7 jours d'incubation), ce phénomène ne nécessitant pas d'augmentation importante de la porosité des microparticules (Figure 47). Au regard de la diminution du PM du polymère (Figure 40), la majorité des produits de dégradation semblent s'accumuler à l'intérieur des microparticules et ne pas être libérés en masse (faible perte de poids observée). La perte de poids observée peut également s'expliquer par la libération de la clonidine localisée en partie en surface des microparticules. Enfin, la captation en eau et le gonflement des microparticules

les rendent moins denses, ce qui facilite la perte de fractions de polymère et donc favorise la perte de poids [Grizzi et coll., 1995 ; Göpferich, 1997]. Celle-ci reste néanmoins relativement faible, en conséquence du gonflement limité des microparticules.

La perte de poids de F5 débute plus progressivement que les autres formulations. Ceci est corrélé avec la dégradation initialement plus lente, ainsi qu'avec les faibles valeurs de k et de ΔPM (Tableau 18, Tableau 19 et Figure 40). F5 libère plus lentement ses produits de dégradation, ce qui conduit à la perte de poids plus faible.

À l'opposé, F4 montre une augmentation surprenante de la perte de poids entre le 28^{ème} et le 35^{ème} jour (environ 70%). Néanmoins, l'entièreté de la clonidine étant déjà libérée, l'accélération de cette perte de poids n'en affectera pas la libération.

Si l'érosion avait été fortement impliquée dans la libération de la clonidine, les profils de dissolution et de perte de poids auraient été similaires [Fredenberg et coll., 2011]. Dans le cas présent, la captation d'eau a lieu plus rapidement que l'érosion du polymère. Comme déjà supposé, la libération de la clonidine se produit vraisemblablement par les pores/canaux remplis d'eau, formés suite à la captation d'eau et à la dégradation du polymère.

3.3 Évolution de la morphologie des microparticules

La morphologie des microparticules incubées dans le milieu de dissolution a été observée après chaque temps de prélèvement. La Figure 47 présente la morphologie initiale des microparticules ainsi qu'après les temps de dégradation 7 jours, 21 jours et 28 jours.

Initialement, les microparticules étudiées sont sphériques et lisses. Après 7 jours d'incubation, leur apparence est faiblement modifiée, comme observé par l'apparition de rugosités sur la surface des microparticules. Cependant, après 21 jours d'immersion, toutes les formulations présentent des modifications morphologiques plus importantes, en raison de la dégradation du polymère se produisant d'abord en surface. F1 et F2 montrent ainsi une modification de leur surface, tout en restant sphériques. L'irrégularité de la surface de F3 s'est intensifiée alors que F4 voit sa porosité augmenter de façon significative, ce qui peut expliquer la libération plus rapide de la clonidine observée préalablement à partir de cette formulation [Gaignaux et coll., 2012]. De plus, la perte de poids plus conséquente déterminée pour F4 peut aussi s'expliquer par la libération plus aisée de produits de dégradation solubles dans l'eau accumulés dans les microparticules jusqu'à ce moment. Enfin, après 21 jours d'incubation, F5 présente une dégradation déjà fortement avancée, ce qui permet d'expliquer la libération plus rapide de la clonidine à partir de cette formulation [Gaignaux et coll., 2012]. Néanmoins, de façon

contradictoire, le Δ PM déterminé après 35 jours est plus faible pour F4 et F5 alors que, sur les images SEM, leur dégradation semble plus importante que pour les autres formulations. La présence de tampons dans ces formulations peut augmenter la captation du milieu de dissolution au niveau des pores aqueux de ces formulations (PE après 35 jours : F4 = 94%, F5 = 96%). L'hydrolyse du polymère n'en semble donc pas affectée, contrairement à la libération de la clonidine qui s'en trouve accélérée.

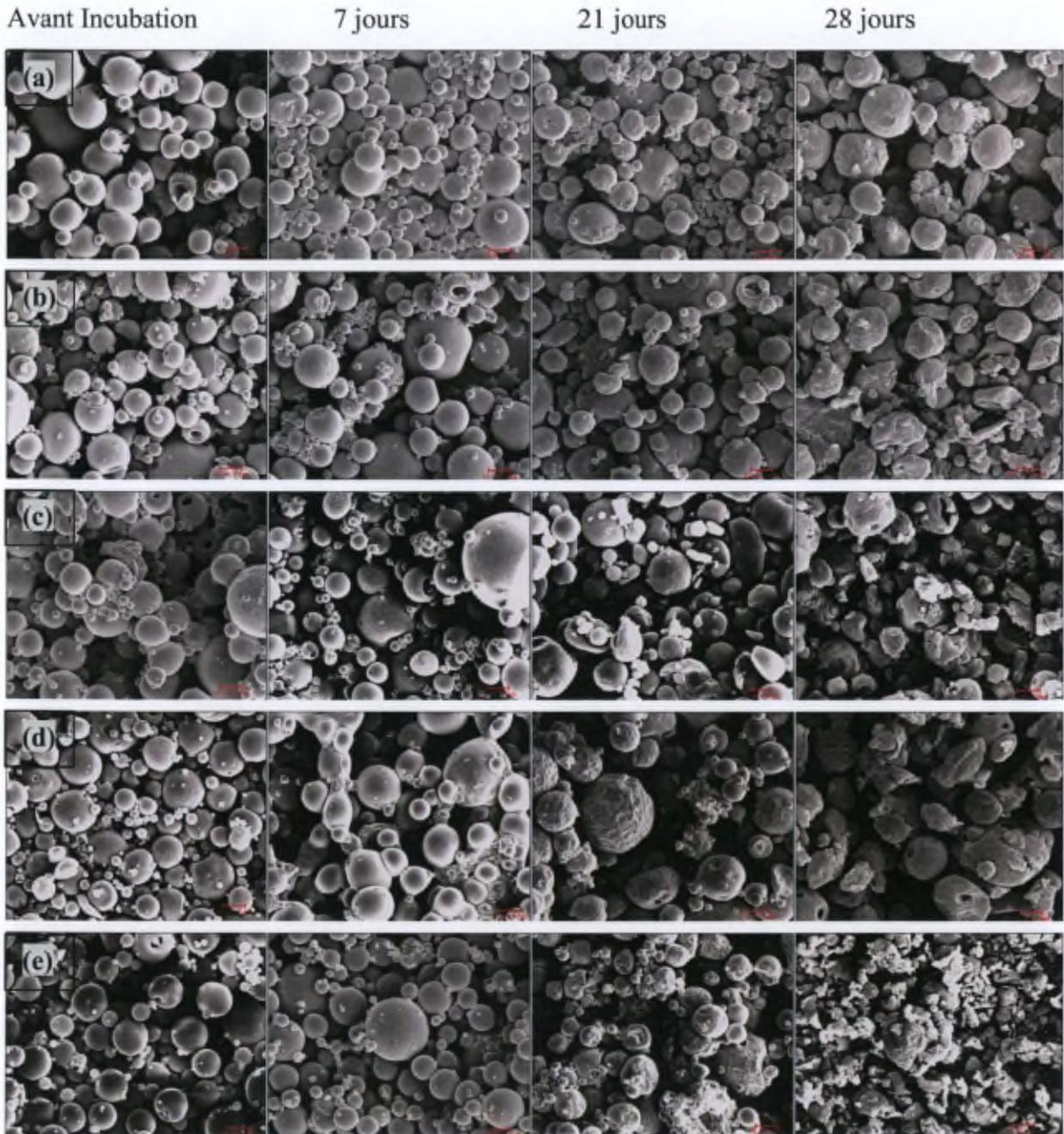


Figure 47 : Images SEM des formulations (a) 1, (b) 2, (c) 3, (d) 4 et (e) 5 avant incubation et après 7, 21 et 28 jours de dégradation, à un grossissement de 1000 x (échelle = 10 μ m).

Après 28 jours d'incubation dans le milieu de dissolution, les formulations étudiées sont érodées : elles ont perdu leur forme sphérique et leur apparence lisse et leur porosité a augmenté. La formulation F1 ne présente pas toutes ces modifications morphologiques, excepté la rugosité de la surface, bien que la captation en eau et le PM de cette formulation évoluent similairement aux autres.

Les observations morphologiques peuvent être corrélées avec les études précédentes telles que la dégradation, caractérisée par la diminution du PM du polymère et visualisée sur les images SEM par la progressive apparition de la rugosité, de l'irrégularité de la surface des microparticules. La pénétration de l'eau à l'intérieur des microsphères débute par la surface, suite à l'attraction par la clonidine. L'eau interagit ensuite avec la matrice polymérique pour initier le clivage des liens esters.

La perte de poids des microparticules est liée à leur progressive érosion ; sur les images SEM, l'érosion est détectable uniquement à partir du 21^{ème} ou 28^{ème} jour par la présence de fragments de polymère et par l'avancement apparent de l'érosion.

4. Évolution du pH au cours de la dégradation du polymère

Comme le PLGA subit une dégradation acide, il est intéressant de suivre l'évolution du pH à la fois dans le milieu de dissolution et à l'intérieur des microparticules.

4.1 Suivi du pH du milieu de dissolution

Entre les jours 0 et 21, le pH du milieu de dissolution diminue lentement. Après le 21^{ème} jour, la diminution du pH s'accroît (Figure 48). La dégradation du polymère en acides à chaîne courte, progressivement libérés dans le milieu de dissolution, engendre une diminution du pH [Klose et coll., 2010]. La diminution observée reste relativement faible, vraisemblablement en raison de la neutralisation/dilution des produits de dégradation par le milieu de dissolution (PBS). La diminution observée après 21 jours montre probablement l'initiation du phénomène d'érosion.

La diminution du pH n'est pas identique pour toutes les formulations étudiées ($F3 > F2 > F1 \approx F4 > F5$), ce qui résulte des différentes concentrations en microparticules présentes dans le milieu de dissolution (Concentrations (mg/ml): $F1 = 2$, $F2 = 4$, $F3 = 6$, $F4 = 2$, $F5 = 1$). La capacité tampon du milieu de dissolution reste identique quelle que soit la quantité de microparticules et donc d'acides à chaîne courte produits, ce qui mène à une diminution plus importante du pH dans le cas des milieux contenant de plus hautes concentrations de

microparticules [Klose et coll., 2010; Vey et coll., 2012]. Par exemple, F3 produit la plus large quantité d'acides à chaîne courte et induit la plus importante réduction du pH du milieu de dissolution (Figure 48). Pareillement, F3 est associé aux plus hautes valeurs de k et de ΔPM (Tableau 18 et Tableau 19), ce qui montre la dégradation rapide et conséquente du polymère et l'importante diminution du pH du milieu de dissolution. La forte chute du pH observée pour F2 et F3 après le 21^{ème} jour peut être corrélée à l'accélération de la libération de la clonidine se produisant simultanément. L'hydrolyse progressive du PLGA provoque une augmentation de la mobilité des chaînes polymériques et de la vitesse de libération de la clonidine [Klose et coll., 2010].

À l'opposé, F5 contient la plus faible concentration de microparticules et montre aussi les plus faibles valeurs de k et de ΔPM (Tableau 18 et Tableau 19). Les quantités d'acides à chaîne courte produits sont les plus faibles, ce qui est confirmé par la plus faible baisse du pH du milieu de dissolution observée durant 35 jours (Figure 48).

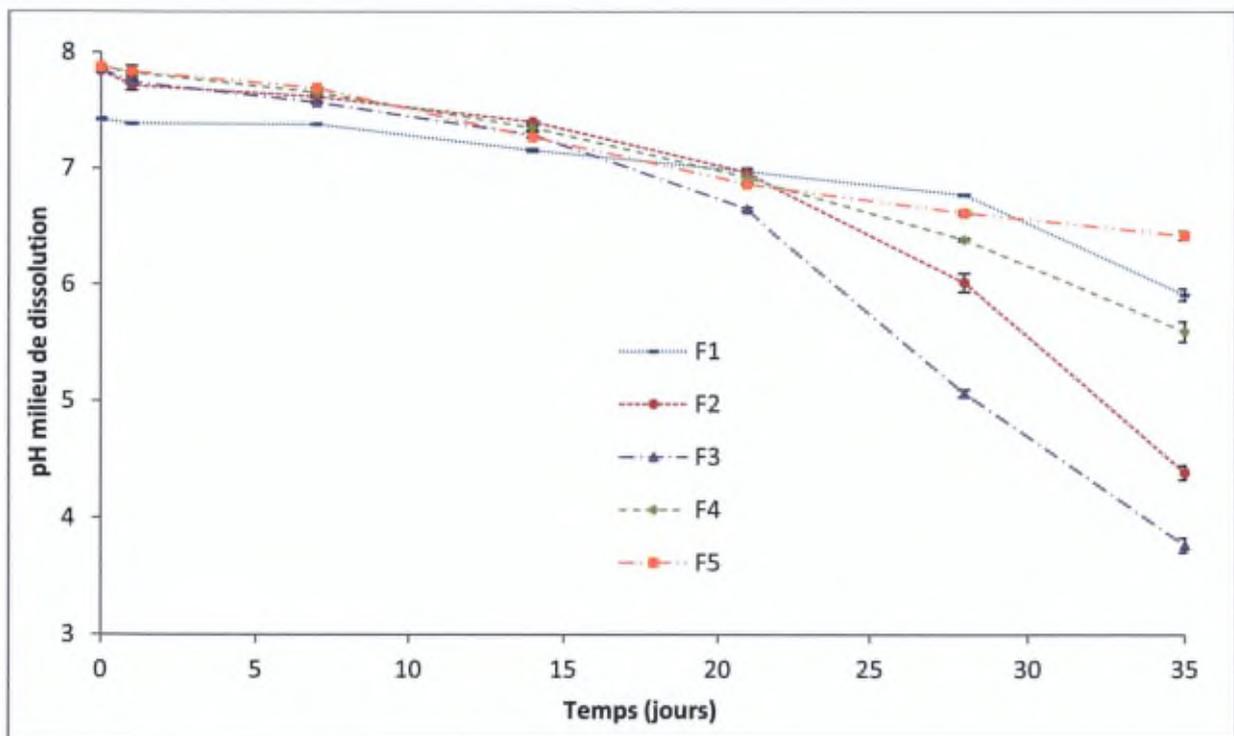


Figure 48 : Évolution du pH du milieu de dissolution (PBS, pH 7,4 ± 0,05, 37°C) contenant les microsphères, durant 35 jours (moyenne ± écart-type, n=3).

La circulation et le renouvellement rapides du liquide synovial s'opérant *in vivo* dans l'articulation laissent penser que les acides à chaîne courte produits lors de la dégradation des microparticules seront efficacement éliminés de l'articulation avant d'être métabolisés en dioxyde de carbone et en eau. En effet, la circulation des produits de dégradation n'est pas

prise en compte lors des évaluations *in vitro* et, restant au contact des microparticules, ils favorisent la dégradation subséquente du polymère. L'élimination de ces produits de dégradation acides se produisant *in vivo* permettra sans doute de limiter l'accélération de la dégradation des microparticules, s'associant dès lors à une libération plus lente de la clonidine. Néanmoins, l'évaluation *in vivo* reste essentielle car une agglomération importante des microparticules peut se produire, piégeant les produits de dégradation acides à l'intérieur des agglomérats et accélérant dès lors le phénomène de dégradation par autocatalyse.

Le pH du liquide synovial restant inchangé en conditions inflammatoires telles que l'OA ou l'AR (pH = 7,4), il n'aura aucune incidence sur la dégradation des microparticules. Enfin, l'élimination progressive et constante des produits de dégradation acides de l'articulation évitera probablement l'apparition de phénomènes irritants et inflammatoires pouvant être associés à l'acidification de l'environnement local.

4.2 Suivi du pH à l'intérieur des microparticules

La dégradation du PLGA, se produisant par hydrolyse des liens esters suite à la captation d'eau, conduit à la production de molécules acides, de type acide lactique et acide glycolique. Ces molécules tendent à s'accumuler à l'intérieur des particules, influant alors sur la dégradation ultérieure du polymère. La formation progressive de ces molécules acides contribue à la création d'un microclimat interne acide, en raison de la libération limitée de ces produits de dégradation tant que les particules ne sont pas suffisamment poreuses et de leur solubilité limitée. En effet, seuls les oligomères de faible PM sont assez solubles que pour diffuser dans le milieu externe [Fu et coll., 2000 ; de Jong et coll., 2001 ; Ding et Schwendeman, 2003 ; Li et Schwendeman, 2005 ; Zolnik et Burgess, 2007 ; Liu et coll., 2012].

En début de dégradation, le pH interne mesuré pour F4 et F5 est plus élevé en raison de la présence de tampons dans ces formulations. La diminution initiale du pH interne des microparticules est plus importante pour F4 et F5 que pour le reste des formulations (Figure 49). Après 14 jours, le pH interne commence à augmenter, contrairement à ce qui était attendu. Les produits de dégradation acides ont probablement été efficacement neutralisés/dilués par le milieu de dissolution qui diffuse vers le centre des microparticules grâce au gradient de concentration [Klose et coll., 2006]. La grande quantité de milieu capté par les microparticules (Figure 43) peut agir en neutralisant/diluant ces acides à chaîne courte et ainsi retarder la diminution du pH interne. Enfin, la diffusion des produits de dégradation

acides vers le milieu de dissolution, est probablement un mécanisme efficace [Faisant et coll., 2002], au vu de la réduction limitée du pH interne des microparticules et de la diminution du pH du milieu de dissolution observée. L'importante diminution du pH interne de F3 peut s'expliquer par sa dégradation rapide (k , ΔPM) liée aux effets autocatalytiques engendrés par les produits de dégradation acides non neutralisés.

Le pH interne des microparticules (compris entre 4,4 et 7,2) étant inférieur au pH mesuré dans le milieu de dissolution (compris entre 7,4 et 7,9), il est peu probable que la mesure du pH interne ait été influencée par la valeur de pH du milieu de dissolution (Figure 48 et Figure 49) [Fu et coll., 2000].

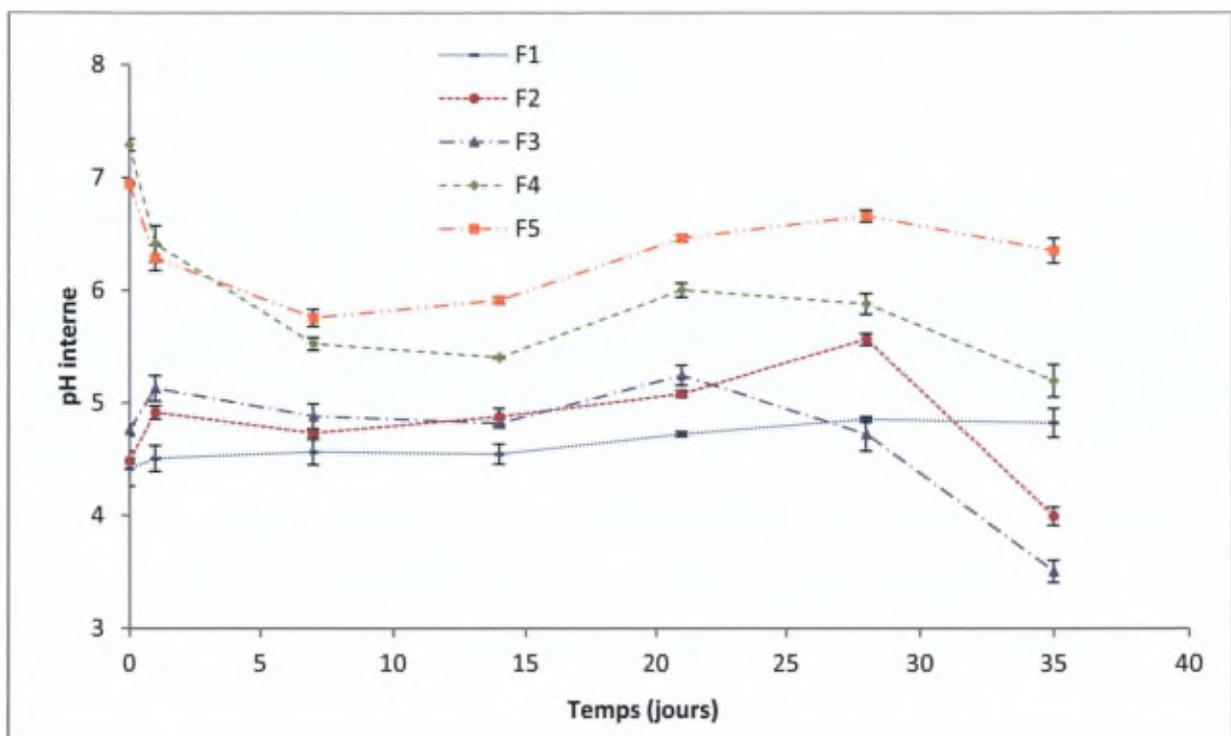


Figure 49 : Évolution du pH interne des microparticules incubées durant 35 jours dans le milieu de dissolution (PBS, pH $7,4 \pm 0,05$, 37°C) (moyenne \pm écart-type, $n=3$).

IV. Conclusion

Le processus de dégradation des microparticules de PLGA contenant la clonidine et fabriquées avec ou sans tampons peut être décrit de la façon suivante : (i) une fois les microparticules incubées dans le milieu de dissolution, leur PM commence immédiatement à diminuer en raison de la grande quantité de milieu de dissolution qu'elles captent, provoquant la rupture des liaisons esters ; (ii) les oligomères de faible PM provenant du procédé de formulation des microparticules et situés en partie en surface sont rapidement et aisément libérés dans le milieu ; ceci explique la perte de poids partielle observée pour les formulations étudiées ($\approx 30\%$) ; (iii) le processus d'érosion en lui-même ne dépasse pas 30% après 35 jours d'étude ; cependant, l'érosion débute généralement avec un délai par rapport à la dégradation, celle-ci étant l'étape contrôlant l'érosion par la production d'oligo- et monomères solubles dans l'eau pouvant être libérés dans le milieu.

Les concentrations variables en microparticules présentes dans le milieu de dissolution affectent vraisemblablement les vitesses de dégradation déterminées. En effet, une constante de vitesse de dégradation k plus élevée est observée pour les formulations présentant les concentrations en microparticules les plus importantes, suite à la production plus importante de produits de dégradation acides.

Finalement, la dégradation du polymère est effectivement impliquée dans la libération de la clonidine. Les profils de dissolution de la clonidine se décomposent en un 'burst effect', une phase de latence plus ou moins marquée et une accélération de la libération résultant de la dégradation du polymère. Vu l'érosion insignifiante et tardive observée, la libération de la clonidine se produit vraisemblablement via des pores/canaux remplis d'eau créés par la captation en eau et par la dégradation progressive du polymère.

Alors que la clonidine facilite la pénétration d'eau et l'hydratation du polymère grâce à sa nature hydrophile, il est probable que la dégradation du polymère formant les microparticules chargées en bétaméthasone soit plus lente en raison du caractère hydrophobe de la molécule. Une dégradation plus lente des microparticules de bétaméthasone par rapport aux microparticules de clonidine est également supposée sur base des profils de dissolution, la libération de la bétaméthasone étant plus lente que celle de la clonidine. Une étude comparative de la dégradation des microparticules chargées en bétaméthasone serait donc intéressante à effectuer.

Étude de la cytotoxicité et de l'efficacité des microsphères de clonidine ou de bétaméthasone sur des modèles cellulaires.

Travail réalisé majoritairement dans le Laboratoire de biochimie physiopathologique et de la nutrition du Professeur Christine Delporte, Hôpital Erasme, ULB.

I. But

Les microsphères de clonidine ou de bétaméthasone optimisées constituent un système matriciel dans lequel le principe actif se trouve sous forme solubilisée dans une matrice de PLGA. Celles-ci ont été réalisées à l'aide d'une simple (bétaméthasone) ou d'une double (clonidine) émulsion ayant respectivement permis d'atteindre des EE d'environ 70% ou 20%. La libération du principe actif à partir de ces microparticules atteint 5 (clonidine) à 8 semaines (bétaméthasone). L'éventuelle cytotoxicité et/ou efficacité des formulations de clonidine et de bétaméthasone sur les cellules composant l'articulation (chondrocytes et synoviocytes) ainsi que sur des cellules directement impliquées dans la cascade inflammatoire (PBMC et neutrophiles) a été évaluée.

Quatre modèles cellulaires ont été sélectionnés dans le but d'obtenir une vue globale des phénomènes se produisant dans une articulation en conditions inflammatoires. Comme le développement de l'OA et de l'AR est différent, les sources de production des cytokines peuvent varier. Les cytokines peuvent en effet être synthétisées tant par des cellules d'origine externe à l'articulation (PBMC, neutrophiles) que par des cellules composant l'articulation (chondrocytes, synoviocytes). Dans l'OA, il semble que le processus inflammatoire soit initié par les chondrocytes et les synoviocytes macrophages-like qui libèrent les cytokines inflammatoires (dont IL1 β , IL6, IL8 et TNF α) dans le liquide synovial. Ces facteurs stimulent ensuite les chondrocytes et synoviocytes à libérer les cytokines qui provoquent la dégradation progressive de l'articulation par la stimulation de la production de protéases (MMP). Dans l'AR, la libération de cytokines inflammatoires (dont IL1 β , IL6, IL8 et TNF α) est assurée à la fois par les chondrocytes et les synoviocytes suite à l'invasion du pannus dans le cartilage. L'infiltration importante de neutrophiles et PBMC participe ici activement à l'initiation et au maintien de l'inflammation par la sécrétion de nombreuses cytokines.

Cette étude a donc été effectuée via l'analyse de l'expression (polymérisation en chaîne quantitative, qPCR) et de la production (enzyme-linked immunosorbent assay, dosage ELISA) de divers médiateurs inflammatoires. L'enrayement de la production d'espèces

radicalaires (ROS) a aussi été déterminé sur un dernier modèle cellulaire, les neutrophiles. En effet, la production de ROS est amplement reconnue comme contribuant au phénomène inflammatoire de l'OA et de l'AR.

Finalement, la tolérance des chondrocytes, synoviocytes et PBMC par rapport aux principes actifs bruts et aux formulations a été évaluée par la détermination de l'apoptose et de la nécrose des cellules (fluorescence-activated cell sorter, FACS).

II. Matériel

Les produits spécifiquement utilisés au cours des manipulations *in vitro* sur cellules ont été repris dans le Tableau 20.

Tableau 20 : Fournisseurs et provenance des produits utilisés au cours des études *in vitro* sur cellules.

Nom du produit	Fournisseur	Provenance
Annexine V – FITC	BD Biosciences	Erembodegem, Belgique
Chloroforme Analar Normapur RF (RNase Free)	VWR	Leuven, Belgique
Chlorure de Calcium	Merck	Darmstadt, Allemagne
Diméthylsulfoxyde	Merck	Darmstadt, Allemagne
Dulbecco's Modified Eagle Medium	Gibco [®] , Invitrogen	Gand, Belgique
Eau stérile, grade PCR	Sigma-Aldrich	Munich, Allemagne
Eau stérile, traitée au DEPC	Sigma-Aldrich	Munich, Allemagne
Éthanol Analar Normapur RF	VWR	Leuven, Belgique
Fetal Bovine Serum	Lonza	Braine l'Alleud, Belgique
Généticine (G418)	Lonza	Braine l'Alleud, Belgique
Hank's Balanced Saline Solution	Gibco [®] , Invitrogen	Gand, Belgique
Histopaque-1077 (densité 1,077 g/ml)	Sigma-Aldrich	Munich, Allemagne
Iodure de propidium	BD Biosciences	Erembodegem, Belgique
L-Glutamine (200 mM)	Lonza	Braine l'Alleud, Belgique
Lipopolysaccharide d' <i>Escherichia coli</i> 0111:B4	Sigma-Aldrich	Munich, Allemagne
Lucigénine	Sigma-Aldrich	Munich, Allemagne
Pénicilline/Streptomycine 10 000 U	Lonza	Braine l'Alleud, Belgique
Phorbol 12-Myristate 13-Acétate	Sigma-Aldrich	Munich, Allemagne
Roswell Park Memorial Institute 1640	Gibco [®] , Invitrogen	Gand, Belgique
SyberGreen Master Mix	Eurogentec	Seraing, Belgique
Trypsine/EDTA (170 000 U/200 mg/l)	Lonza	Braine l'Alleud, Belgique

III. Méthodes spécifiques

1. Stérilisation

Les principes actifs bruts, les microsphères (vides ou chargées en clonidine ou en bétaméthasone) mais également le véhicule dans lequel les microsphères sont remises en suspension doivent être stérilisés avant de procéder aux différentes évaluations *in vitro*.

De plus, la formulation finale étant destinée à un usage parentéral, une méthode de stérilisation appropriée devait être envisagée afin que la formulation soit garantie d'atteindre un niveau d'assurance de stérilité (NAS) de 10^{-6} , ce qui correspond à la probabilité de retrouver moins de 1 micro-organisme viable sur $1 \cdot 10^6$ unités stérilisées [Pharmacopée Européenne 7^{ème} édition 2012].

Une stérilisation terminale ionisante ou par la vapeur sera choisie en fonction des molécules/solutions.

Les PLGA ne peuvent être stérilisés par autoclave ou par chaleur sèche en raison de leur instabilité thermique et nécessitent dès lors d'être traités en conditions aseptiques ou d'être soumis à une stérilisation terminale [Williams et coll., 2006]. Au vu du processus de fabrication des microsphères (émulsion suivie d'une lyophilisation), la stérilisation terminale par stérilisation ionisante a été sélectionnée. La préparation aseptique est généralement laborieuse et coûteuse et entraîne de plus hauts risques de contamination de la formulation finie. De plus, la γ -radiation est largement reconnue à l'heure actuelle pour stériliser les produits thermolabiles ; une des applications courantes de ce type de stérilisation est d'ailleurs la stérilisation de PLGA à usage parentéral [Hausberger et coll., 1995 ; Montanari et coll., 2001].

Au contraire, le véhicule contenant du HA ne peut être traité par des rayonnements γ qui détruiraient le HA. La stérilisation par autoclave a donc été choisie.

1.1 Stérilisation par γ -radiation

Le rayonnement γ est une onde électromagnétique de haute énergie générée par des radio-isotopes tels que le cobalt 60. L'exposition du produit à ce rayonnement ionisant engendre une interaction des électrons libres créés par l'ionisation des atomes avec l'ADN des micro-organismes, provoquant leur mort [Friess et Schlapp, 2006].

La dose de référence absorbée par le produit est de 25 kiloGray (kGy). Le rayonnement absorbé est contrôlé tout au long du processus par des méthodes dosimétriques afin de

connaître la dose réellement reçue par le produit. Néanmoins, les dosimètres sont étalonnés pour une installation, un processus, des conditions d'irradiation et une source étalon donnés. De ce fait, si l'une des conditions d'irradiation change, la dose reçue par le produit ne pourra pas être certifiée. Les conditions choisies pour la stérilisation γ doivent répondre aux normes de stérilité [Pharmacopée Européenne 7^{ème} édition, 2012].

La stérilisation γ offre de multiples avantages tels qu'une bonne pénétration dans l'échantillon, de faibles résidus après stérilisation, une faible réactivité chimique avec les composés, une faible augmentation de la température au cours du processus et peu de variables à modifier pour le processus [Martinez-Sancho et coll., 2004].

La stérilisation des microsphères de PLGA contenant la clonidine, des microsphères de PLGA contenant la bétaméthasone ainsi que des produits bruts (PLGA et principes actifs) a été réalisée par stérilisation gamma ionisante. Les conditions suivantes ont été utilisées : source d'irradiation : ^{60}Co ; dose d'irradiation : 25 kGy ; température : -80°C (stérilisation réalisée sur carboglace).

La stérilisation des différents produits par γ -radiation a été effectuée par la société Sterigenics (Fleurus, Belgique).

1.2 Stérilisation par autoclave

La stérilisation du véhicule ainsi que des solutions aqueuses de clonidine a été réalisée par stérilisation terminale à la vapeur. Ces stérilisations ont été réalisées à l'aide d'un autoclave Systec D-65 (QLab, Vilvoorde, Belgique) selon les conditions suivantes : température : 121°C ; pression : 2,1 bar ; durée : 15 minutes.

2. Culture cellulaire et conditions de traitement

2.1 Les chondrocytes

La lignée continue de chondrocytes humains immortalisés CRL-2847TM (insertion du gène hTert possédant la capacité d'allonger les télomères et donc de rendre les cellules immortelles) (CHON-002, Origine : Cartilage et os long d'un fœtus fille de 18 semaines, American Type Culture Collection (ATCC), Virginie, États-Unis) a été mise en culture dans des flasques de 75 cm^2 (Greiner Bio One, Wommel, Belgique) dans 20 ml de Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplémenté de sérum de veau fœtal (10%, v/v) (fetal bovine serum, FBS), de L-glutamine (2 mM), de pénicilline/streptomycine (100 U/ml, 100

$\mu\text{g/ml}$) et de G418 (généticine, 0,1 mg/ml). Les cellules sont incubées à 37°C dans un environnement saturé en humidité et contenant 5% de CO_2 .

Lors de l'analyse de l'expression des médiateurs pro- et anti-inflammatoires, les chondrocytes ont été mis en culture dans des boîtes de Pétri (\varnothing 10 cm) (Greiner Bio One, Wemmel, Belgique) à raison de $5 \cdot 10^4$ cellules/ml. À 80% de confluence, les cellules ont été stimulées durant 24 heures en présence de lipopolysaccharide (LPS) (2 $\mu\text{g/ml}$), avant d'être incubées durant 4 heures avec les formulations. Chaque évaluation a été réalisée en triplicat.

Les chondrocytes sont des cellules adhérentes cultivées en monocouche. Le passage des chondrocytes est réalisé deux fois par semaine, lorsque les cellules sont à confluence. Le milieu de culture est éliminé et les cellules sont incubées à 37°C durant 5 minutes en présence de 3 ml de trypsine/EDTA (0,05% / 0,02%) afin de les décoller. La trypsine est une enzyme digestive clivant les protéines membranaires d'adhésion et utilisée pour détacher les cellules adhérentes en culture cellulaire. L'EDTA augmente l'efficacité de la trypsine en chélatant les ions Ca^{2+} nécessaires aux molécules d'adhésion pour favoriser les interactions entre cellules ou avec une surface [Wilson et Walker, 2010]. Suite à l'ajout d'un volume égal de milieu de culture complet, la trypsine est inactivée grâce au FBS. Après centrifugation à 180 x g durant 5 minutes, le culot de cellules est récolté et remis en culture dans 20 ml de milieu frais dans de nouvelles flasques de 75 cm^2 .

2.2 Les synoviocytes

La lignée de synoviocytes humains HTB-93™ (SW-982, ATCC, Virginie, États-Unis) provenant d'un sarcome synovial, a été mise en culture dans des flasques de 75 cm^2 (Greiner Bio One, Wemmel, Belgique) dans 20 ml de DMEM supplémenté de FBS (5%, v/v), de L-glutamine (2 mM) et de pénicilline/streptomycine (100 U/ml, 100 $\mu\text{g/ml}$). Les cellules sont incubées à 37°C dans un environnement saturé en humidité et contenant 5% de CO_2 .

Lors de l'analyse de l'expression des facteurs pro- et anti-inflammatoires, les synoviocytes ont été mis en culture dans des plaques 6-puits CellStar (Greiner Bio One, Wemmel, Belgique) à raison de $5 \cdot 10^4$ cellules/ml. À 80% de confluence, les cellules ont été stimulées durant 24 heures en présence de LPS (2 $\mu\text{g/ml}$), avant d'être incubées durant 4 heures avec les formulations. Chaque évaluation a été réalisée en triplicat.

Les synoviocytes sont également des cellules adhérentes cultivées en monocouche. Le passage des synoviocytes s'effectue trois fois par semaine quand ils sont à confluence, en suivant la procédure préalablement décrite.

2.3 Les cellules mononucléées du sang périphérique

Une culture de globules blancs a également été réalisée en parallèle (peripheral blood mononuclear cells, PBMC). Les PBMC ont été isolés à partir de sang humain prélevé de volontaires sains ayant donné leur consentement éclairé. Les prélèvements réalisés dans le cadre de cette étude ont été, au préalable, approuvés par le Comité Éthique de l'Hôpital Erasme (Référence P2012/266 / B406201215030) (Annexe 6).

2.3.1 Isolation des PBMC

Le sang total des volontaires sains est collecté sur des tubes Vacutainers Li-héparinés de 10 ml (BD Biosciences, Erembodegem, Belgique). Les échantillons sont traités à température ambiante et sous conditions stériles, immédiatement après les prélèvements. Avant d'en isoler les PBMC par gradient de densité, le sang héparinisé (9 ml) est dilué par 25 ml d'une solution saline isotonique (Hank's Balanced Saline Solution, HBSS) dans un tube à centrifuger de 50 ml (Greiner Bio One, Wommel, Belgique). L'Histopaque-1077 (densité 1,077 g/ml) (15 ml) est ensuite précautionneusement déposé en-dessous du sang dilué, en évitant le mélange des deux phases. Les tubes sont centrifugés pendant 20 minutes à 900 x g, sans frein afin d'éviter la déstabilisation du gradient [Pertoft, 2000 ; Gahan et coll., 2001 ; Nieto et coll., 2012].

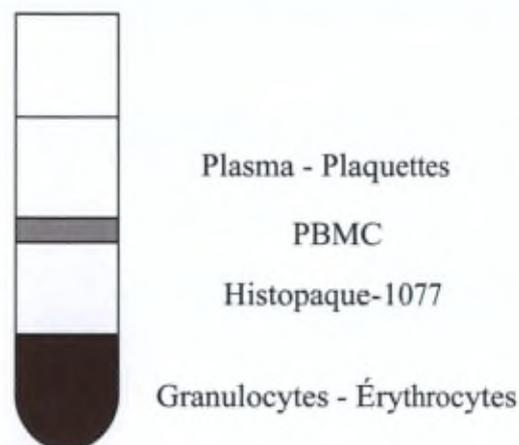


Figure 50 : Disposition et composition des différentes couches obtenues par différence de densité, après centrifugation du sang héparinisé sur Histopaque-1077.

En fonction des différences de densité, les globules blancs, globules rouges et autres composants sanguins sont séparés en diverses couches (Figure 50).

L'anneau contenant les PBMC est transféré dans un tube à centrifuger de 50 ml (Greiner Bio One, Wommel, Belgique). Les cellules sont lavées une première fois en complétant à 50 ml par la solution HBSS et en centrifugeant à 860 x g pendant 10 minutes. Un second lavage est réalisé sur le culot de cellules, en complétant à 50 ml avec la solution d'HBSS et en centrifugeant à 690 x g pendant 10 minutes. Enfin, les cellules sont lavées une dernière fois en complétant à 50 ml par la solution HBSS et en centrifugeant à 220 x g pendant 10 minutes. Les PBMC isolés sont ensuite remis en suspension dans 5 ml de milieu de culture.

2.3.2 Évaluation du nombre et de la viabilité des PBMC isolés

Le nombre de PBMC isolés (cellules/ml) est évalué à l'aide d'un compteur de cellules automatique TC10™ (Bio-rad, Nazareth Eke, Belgique). Le nombre de PBMC isolés avoisine $3 \cdot 10^5$ cellules/ml de sang.

La viabilité des PBMC isolés a été évaluée à l'aide du compteur automatique TC10™ (Bio-rad, Nazareth Eke, Belgique) par un comptage réalisé sur 10 μ l d'un mélange 1:1 de suspension cellulaire et de bleu de trypan. La viabilité des PBMC isolés se situe entre 37 et 43% selon les volontaires.

2.3.3 Mise en culture des PBMC

Les PBMC ont été mis en culture dans des boîtes 6-puits Cellstar (Greiner Bio One, Wommel, Belgique) à raison de $2 \cdot 10^6$ cellules/ml, dans du milieu de culture Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640, supplémenté de FBS (10%, v/v), de L-glutamine (2 mM), de pénicilline/streptomycine (100 U/ml, 100 μ g/ml).

Lors de l'analyse de l'expression des médiateurs pro- et anti-inflammatoires, les PBMC ont été stimulés durant 24 heures en présence de LPS (2 μ g/ml ou 100 ng/ml), avant d'être incubés durant 4 heures avec les formulations. Chaque évaluation a été réalisée en triplicat.

3. Extraction d'ARN

L'extraction des ARN totaux des différents modèles cellulaires a été réalisée à l'aide d'un kit standard Aurum Total RNA Fatty and Fibrous Tissue Kit (Bio-rad, Nazareth Eke, Belgique). Les cellules sont récoltées dans 1 ml de Purezol (phénol 35 - 50 % (v/v) et thyocyanate de guanidium 20 - 35 % (v/v)), agent permettant de lyser les membranes plasmiques et de libérer

les acides nucléiques contenus dans l'échantillon. L'addition de 400 μl de chloroforme RF permet ensuite d'obtenir trois phases : une phase aqueuse contenant les ARN, un anneau formant l'interface et la phase organique, ces deux dernières phases contenant les protéines, résidus gras et ADN. La phase aqueuse est récupérée précautionneusement et mélangée avec un volume équivalent d'éthanol 70% avant d'être filtrée sur une membrane de silice, liant les acides nucléiques. Divers lavages sont effectués avec des solutions de lavage contenues dans le kit afin d'éliminer tout débris cellulaire et autres protéines. De plus, une élution avec 100 μl d'une solution de DNase I est nécessaire afin de garantir l'élimination complète de l'ADN génomique de l'échantillon. Les ARN sont finalement élués avec 30 μl d'une solution d'élution RF préalablement chauffée à 70°C.

4. Contrôle de la qualité et de la quantité de l'ARN

L'ARN extrait est analysé avant d'être impliqué dans la réaction de transcription inverse. La quantité, la pureté et l'intégrité de l'ARN produit sont des facteurs importants pouvant sévèrement influencer la détermination de l'expression de gènes. Suite à l'extraction, l'ARN ne peut donc pas être contaminé (protéines, solvants organiques, ADN génomique), dégradé ou contenir de nucléases [Fleige et Pfaffl, 2006 ; Bustin et coll., 2009]. Dès lors, plusieurs vérifications sont effectuées avant toute manipulation engageant l'ARN. La concentration de l'ARN extrait a été déterminée, ainsi que son éventuelle contamination par des protéines ou des solvants organiques. Son intégrité et sa contamination potentielle en ADN génomique ont été vérifiées.

4.1 Dosage spectrophotométrique : NanoDrop™

La concentration des ARN extraits ainsi que leur intégrité ont été évaluées par un dosage spectrophotométrique à l'aide du NanoDrop™ ND-1000 (Thermo Scientific, Bruxelles, Belgique). Le NanoDrop™ permet de mesurer des échantillons de 1 μl avec une haute précision et reproductibilité. La mesure s'effectue à une longueur d'onde λ de 260 nm. Le volume de l'échantillon déposé au niveau de la fibre optique est de 2 μl . Le contact direct de l'échantillon et de la fibre optique réduit les contaminations et les variations que pourrait entraîner l'usage de cuvettes [Fleige et Pfaffl, 2006].

Le NanoDrop™ permet d'obtenir d'une part la concentration en ng/ μl des ARN produits ainsi qu'une première indication de leur pureté. En effet, les rapports des densités optiques déterminées à différentes longueurs d'onde (260/280 et 260/230) doivent être supérieurs ou

égaux à 2 pour indiquer la pureté de l'ARN. Ces rapports donnent un premier aperçu d'une éventuelle contamination par les protéines ou les solvants organiques [Becker et coll., 2010].

4.2 Électrophorèse capillaire sur puce : Experion™

L'électrophorèse capillaire sur puce est une méthode sensible, reproductible et spécifique permettant de contrôler de façon standardisée l'intégrité des ARN extraits [Fleige et Pfaffl, 2006 ; Becker et coll., 2010]. Séparés par électrophorèse sur puce, les échantillons d'ARN sont détectés suite à l'action d'un fluorophore intercalant. La position et la taille des bandes obtenues pour l'échantillon sont comparées à une échelle de poids d'un ARN standard. L'intégrité de l'ARN est déterminée par l'observation des bandes 18S et 28S, correspondant à l'ARN ribosomal. Un ARN intact fournit deux pics importants correspondant aux bandes 18S et 28S, ainsi qu'un pic plus faible correspondant à la bande 5S. Un ARN dégradé montre une ligne de base instable, un déplacement des pics vers de plus petites valeurs (petits fragments d'ARN), une diminution du rapport 28S:18S (supposé être proche de 2) ainsi qu'un affaiblissement du signal de fluorescence [Fleige et Pfaffl, 2006 ; Becker et coll., 2010]. Enfin, la valeur RIN (RNA Integrity Number) calculée par le logiciel est proche de 10 pour les ARN intacts et proche de 1 pour les ARN dégradés [Becker et coll., 2010].

L'intégrité des ARN extraits a été évaluée grâce à l'Experion™, combiné à un vortex Experion ainsi qu'à une base d'amorçage des puces Experion (Bio-rad, Nazareth Eke, Belgique). Les résultats ont été acquis et traités par le logiciel Experion™ Version 3.20 (Bio-rad, Nazareth Eke, Belgique). Les résultats de l'intégrité des ARN extraits au cours de ce travail sont présentés en annexe (Annexe 7).

4.3 Polymérisation en chaîne quantitative

La qualité de l'ARN produit par l'extraction est enfin évaluée par une réaction quantitative en chaîne par polymérase (qPCR) (voir *Partie expérimentale – Efficacité, III.6 Polymérisation en chaîne quantitative*). La contamination à l'ADN génomique est recherchée en utilisant deux paires d'amorces qui amplifient ou non l'ADN génomique. Les amorces amplifiant l'ADN génomique dans tous les cas correspondent au gène *hs-Ywhaz* et les amorces n'amplifiant pas l'ADN génomique correspondent au gène *hs-ATP5-b*.

Cette évaluation est réalisée directement sur l'ARN extrait, et non sur l'ADN complémentaire, en engageant 10 ng d'ARN par puits de qPCR.

Les échantillons d'ARN ne doivent présenter d'amplification avec aucun des couples d'amorces. Seuls les ARN présentant une amplification nulle seront considérés comme valables pour les analyses qPCR suivantes.

5. Transcription inverse des ARN

À partir de l'ARN extrait, un simple brin d'ADN complémentaire (ADNc) est synthétisé par une réaction de transcription inverse. Pour cette réaction, le kit High Capacity RNA-to-cDNA (Applied Biosystems, Carlsbad, Californie, États-Unis) a été utilisé selon les recommandations du fournisseur. Pour réaliser cette réaction, un volume correspondant à 1 µg d'ARN est engagé ; celui-ci est complété à 9 µl par de l'eau exempte de nucléases, protéases et phosphatases (eau stérile, traitée au diéthyl dicarbonate (DEPC)). Le tampon de réaction est ensuite ajouté (10 µl), avant d'ajouter l'enzyme, la transcriptase inverse (1 µl). Le volume total du milieu réactionnel est de 20 µl. La réaction de transcription inverse a été exécutée dans un thermocycleur MyCycler (Bio-rad, Nazareth Eke, Belgique). L'échantillon a d'abord été maintenu à 37°C pendant 60 minutes afin que la transcription inverse se produise ; ensuite, la température a été augmentée à 95°C pendant 5 minutes afin de dénaturer les ARN éventuellement résiduels, avant de redescendre la température à 4°C. Les ADNc ont été conservés à -20°C jusqu'à analyse.

6. Polymérisation en chaîne quantitative

La polymérisation en chaîne (PCR) génère de nouveaux brins d'ADN complémentaires à partir des brins présents dans l'échantillon. Cette méthode permet la production d'une grande quantité d'ADN en partant d'un échantillon limité. La PCR est donc utilisée pour amplifier un fragment précis de l'ADN, ce qui requiert une certaine connaissance de la séquence jouxtant le fragment à amplifier. Deux oligonucléotides, ou amorces, sont conçus et synthétisés chimiquement en fonction de cette séquence ; chacun d'eux sera complémentaire d'un brin de l'ADN, à partir de son extrémité 3' [Wilson et Walker, 2010].

La PCR se déroule selon 3 étapes distinctes, formant un cycle : la dénaturation, l'hybridation et la polymérisation (Figure 51). Durant la première étape d'un cycle, l'ADN double-brin est dénaturé suite à la hausse de température jusqu'à 90°C. Ceci permet d'exposer les régions contenant le produit d'amplification. La température est ensuite diminuée. Présentes en excès, les amorces peuvent s'hybrider au niveau de leurs sites complémentaires bordant l'amplicon. La synthèse d'ADN peut débuter à partir de ces amorces, grâce à l'extrémité 3' libre qu'elles

fournissent pour la polymérase. La polymérisation en elle-même se produit par l'enzyme thermostable *Taq* (*Thermus aquaticus*) ADN polymérase. À chaque nouveau cycle, la polymérisation se base sur les deux brins d'ADN originaux et sur les nouveaux brins formés (produit d'amplification, amplicon) ; en effet, chaque nouveau brin présente une extrémité 3' complémentaire avec l'autre amorce. La réaction de polymérisation et donc, la production d'ADN, sont exponentielles [Evans, 2009 ; Wilson et Walker, 2010].

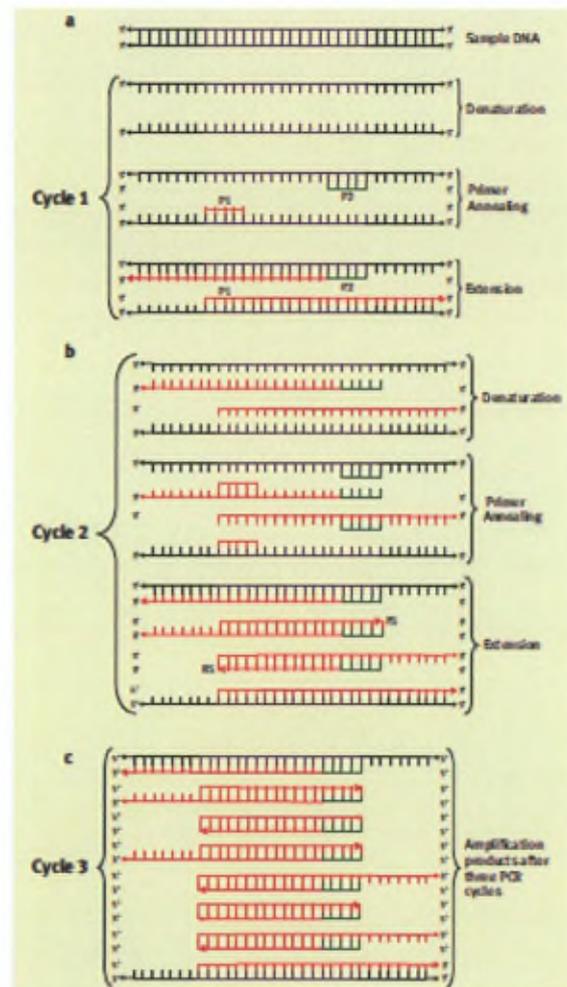


Figure 51 : Amplification se produisant dans la réaction de polymérisation. Chaque cycle comprend les étapes de dénaturation, d'hybridation et de polymérisation [Evans, 2009].

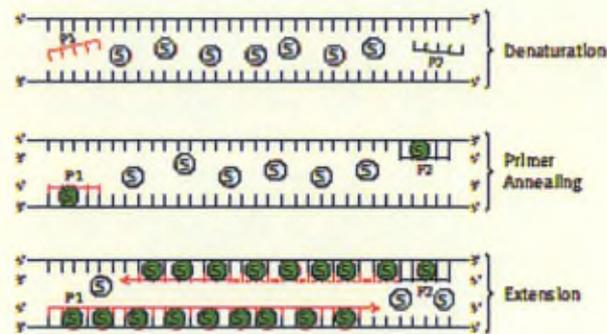


Figure 52 : Action du SYBRGreen, fluorophore intercalant utilisé en qPCR. Le SYBRGreen s'intercale dans l'ADN double-brin et émet à une longueur d'onde de 522 nm, après excitation à une longueur d'onde de 498 nm.

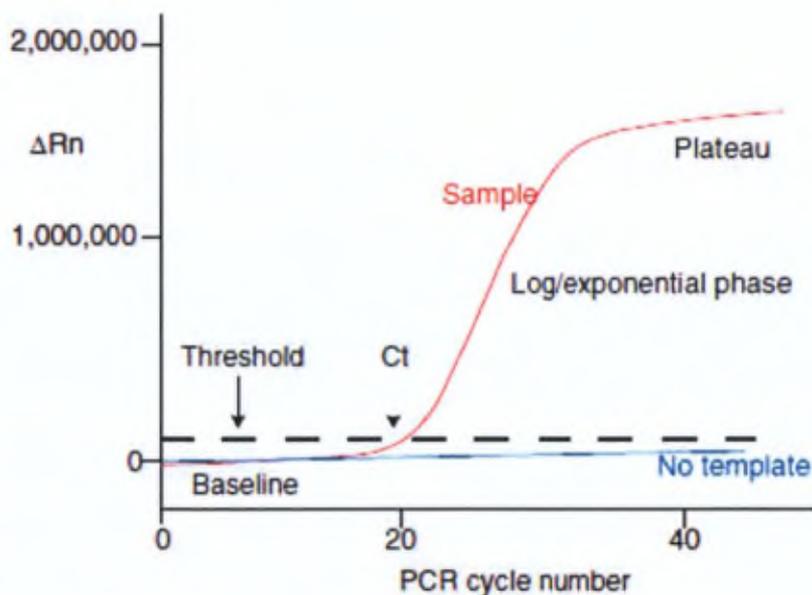


Figure 53 : Type de graphique d'amplification résultant d'une qPCR. *Baseline* : la ligne de base correspond aux cycles pendant lesquels la fluorescence accumulée et enregistrée est trop faible pour être détectée par le thermocycleur. ΔRn : cette valeur équivaut à la fluorescence émise par les produits générés au cours de l'amplification, dont la fluorescence correspondant à la ligne de base a été soustraite. Le ΔRn est porté en ordonnée et le nombre de cycles en abscisse sur un graphique de qPCR. *Threshold* : un seuil arbitraire est choisi en fonction de la variation de la ligne de base, seuil à partir duquel la fluorescence détectée sera considérée comme émise par les produits générés et faisant partie de l'amplification. *Ct* : cette valeur, cycles to threshold, correspond au nombre de cycles nécessaires pour produire une fluorescence supérieure au seuil arbitrairement choisi. Dès lors, plus l'échantillon initial contient de l'ADNc à amplifier, plus cette valeur sera faible [Arya et coll., 2005].

La PCR quantitative (qPCR) permet de suivre en temps réel les ADN générés au cours de chaque cycle et de relier cette information à la concentration initiale d'ADNc présente dans l'échantillon. Cette détermination se fera pendant la phase exponentielle de l'amplification,

phase durant laquelle l'extrapolation est la plus fiable car l'efficacité de la réaction est admise comme approchant 100%. L'utilisation d'un fluorophore intercalant (SYBRGreen) permet de suivre l'évolution de la fluorescence tout au long de l'amplification (Figure 52). Au fur et à mesure des cycles, la fluorescence devient graduellement plus importante en fonction des produits générés, l'intensité de la fluorescence étant directement dépendante de la quantité d'ADN double-brin présent dans le puits. Ceci permet de suivre l'accumulation des produits d'amplification (Figure 53) [Arya et coll., 2005 ; Evans, 2009].

6.1 Conception des amorces

La conception des amorces a été réalisée grâce aux bases de données du NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) (Gene et Ensembl). Les informations recueillies dans ces bases de données ont été transférées dans le logiciel de conception d'amorces, PrimerBlast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi>). Les amorces ont ensuite été synthétisées chimiquement (Eurogentec, Seraing, Belgique).

Les cellules étudiées étant d'origine humaine, toutes les amorces ont été conçues à partir des gènes humains (Tableau 21).

Tableau 21 : Séquence et caractéristiques des amorces sens (S) et antisens (A) utilisées pour les qPCR.

Gène	Séquence des amorces (5' → 3')	Tm (°C)	% GC	Amplicon (bp)
IL1β NM_000576	S: AAA-AAG-CTT-GGT-GAT-GTC-TGG-T A: CAA-GGC-CAC-AGG-TAT-TTT-GTC-A	46 48	41 46	136
TNFα NM_000594	S: GGC-CCG-ACT-ATC-TCG-ACT-TT A: GTG-TCT-GAA-GGA-GGG-GGT-AA	62 62	55 55	134
IL6 NM_000600	S: GAG-CTG-TGC-AGA-TGA-GTA-CAA-A A: CTG-GCA-TTT-GTG-GTT-GGG-TC	48 62	46 55	100
TGFβ NM_000660	S: ACT-CGC-CAG-AGT-GGT-TAT-CTT A: GAT-GTC-CAC-TTG-CAG-TGT-GT	47 60	48 50	137
BMP2 NM_001200	S: CGC-AGC-TTC-CAC-CAT-GAA-G A: CTC-CTC-CGT-GGG-GAT-AGA-AC	60 64	58 60	102
IL8 NM_000584	S: TGA-AGG-TGC-AGT-TTT-GCC-AAG A: TAA-TTT-CTG-TGT-TGG-CGC-AGT	47 45	48 43	140
IL10 NM_000572	S: GGC-GCT-GTC-ATC-GAT-TTC-TT A: CAC-CCT-GAT-GTC-TCA-GTT-TCG	60 49	50 52	179
MMP1 NM_001145938	S: CAA-CTG-CCA-AAT-GGG-CTT-GA A: GAT-GTC-CTT-GGG-GTA-TCC-GT	60 62	50 55	126

Ces oligonucléotides confèrent la spécificité à la réaction ; certains critères sont donc imposés afin de garantir une polymérisation de l'ADN optimale ainsi qu'une spécificité de l'amplification. La conception des amorces doit éviter l'hybridation intra- et inter-amorces, ce qui empêcherait la réaction d'amplification de se produire. Idéalement, le contenu de nucléotides GC doit être compris entre 30 et 70% et la température d'hybridation des amorces doit se situer entre 59 et 63°C, avec une différence de 2°C maximum entre les amorces sens (S) et antisens (A). La longueur des amorces simples brins construites est comprise entre 18 et 25 nucléotides. Enfin, la longueur du fragment à amplifier est fixée comme devant être comprise entre 100 et 150 paires de bases. Dans les cas idéaux, celui-ci doit également contenir au moins un intron, afin d'éviter l'amplification de l'éventuel ADN génomique contaminant subsistant après extraction de l'ARN.

6.2 Conditions de qPCR

Les plaques de qPCR utilisées sont des plaques 96-puits MicroAmp® Fast 96-Well Reaction Plate 0,1 ml (Applied Biosystems, Carlsbad, Californie, États-Unis). Le volume réactionnel final engagé dans un puits était de 20 µl. Ce volume peut être décomposé de la façon suivante : 10 µl de SyberGreen Master Mix (Woube Mesa Blue qPCR Master Mix PL.SYBR Low Rox) contenant un fluorophore intercalant, l'enzyme *Taq* ADN polymérase, du magnésium et des déoxyribonucléosides triphosphates (dNTP), 5 µl du mélange d'amorces sens et antisens (concentration finale dans le puits pour une amorce : 250 nM) et enfin, 5 µl de l'ADN complémentaire à amplifier. Pour faire office de contrôle négatif, l'échantillon d'ADNc est remplacé par de l'eau exempte de nucléases (eau stérile, grade PCR) dans certains puits.

Les amplifications ont été réalisées à l'aide d'un thermocycleur StepOne Plus (Applied Biosystems, Carlsbad, Californie, États-Unis). Une première étape à 95°C pendant 5 minutes permet d'activer l'enzyme, la *Taq* ADN polymérase. Ensuite, 40 cycles ont été effectués pour générer l'amplification : dénaturation de l'ADN (95°C pendant 15 secondes), hybridation des amorces (60°C pendant 10 secondes) et synthèse du brin complémentaire (72°C pendant 20 secondes). La réaction a été clôturée par l'établissement des courbes de fusion (melt-curve) fournissant les valeurs de T_m (melting temperature), c'est-à-dire la température à laquelle 50% de l'ADN est sous forme double-brin et 50% est sous forme simple-brin [Evans, 2009]. Lors des différentes évaluations, les échantillons d'ADNc ont été amplifiés en triplicat.

6.3 Évaluation de l'efficacité de la réaction de qPCR

De façon optimale, chaque cycle de qPCR permet de doubler la quantité de copies de molécules d'ADN. Après les 40 cycles d'amplification, la théorie voudrait donc que la réaction ait produit 2^{40} molécules d'ADN. Néanmoins, une réaction exponentielle, efficace à 100%, ne peut se produire en pratique qu'à un moment donné de l'amplification, c'est-à-dire dans la zone linéaire. En effet, avant cette phase, l'efficacité de la réaction dépend de la facilité des amorces à s'hybrider aux molécules à amplifier. Vient ensuite la phase linéaire, phase théoriquement exponentielle de la réaction. Celle-ci ne peut être indéfinie en raison de la quantité limitée d'amorces et de *Taq* polymérase, et du feed-back négatif induit par les produits d'amplification sur la réaction d'amplification en elle-même [Hellemans et coll., 2007 ; Evans, 2009].

Il est important d'évaluer l'efficacité de la réaction de qPCR afin d'approcher au maximum 100%, ce qui permet d'atteindre la phase exponentielle d'amplification. L'efficacité de la réaction est établie à l'aide de courbes de calibration, fournissant une détermination simple et reproductible de l'efficacité moyenne de la réaction. Plus précisément, l'efficacité de l'amplification est obtenue grâce à la pente de la courbe de calibration (Efficacité = $10^{-1/\text{pente}} - 1$) [Bustin et coll., 2009].

Pratiquement, une série de dilutions d'ADNc de tissu de référence (2 ng/ μ l, 0,5 ng/ μ l, 0,125 ng/ μ l, 0,031 ng/ μ l et $7,75 \cdot 10^{-3}$ ng/ μ l) a été réalisée. Ces dilutions ont été testées dans les conditions de qPCR décrites ci-dessus sur chaque couple d'amorces conçu afin d'obtenir une courbe de calibration et la valeur de l'efficacité.

6.4 Normalisation des résultats

Afin de minimiser les variabilités résultant de la qualité/quantité de l'ARN, de la transcription inverse de l'ARN en ADNc ou encore de l'efficacité d'amplification variable ainsi que la variabilité inter-échantillons, des gènes de référence sont utilisés pour normaliser les résultats. Ces gènes de référence doivent idéalement être exprimés de manière constante dans toutes les cellules et ne pas voir leur comportement influencé par une quelconque condition expérimentale [Vandesompele et coll., 2002 ; Hellemans et coll., 2007]. Les différents gènes de référence utilisés pour normaliser les résultats de qPCR sont décrits dans le Tableau 22.

Tableau 22 : Séquence des gènes de référence utilisés pour l'analyse des résultats obtenus pour les chondrocytes, synoviocytes et PBMC.

Gène	Séquence des amorces (5' → 3')	Tm (°C)	% GC	Amplicon (bp)
YWHAZ NM_001135699	S: ACA-AAA-GAC-GGA-AGG-TGC-TG A: TCT-GCT-TGT-GAA-GCA-TTG-GG	59 59	50 50	141
HPRT1 NM_000194	S: TGG-CGT-CGT-GAT-TAG-TGA-TG A: CTC-GAG-CAA-GAC-GTT-CAG-TC	58 59	50 55	137
ATP5B NM_001686	S: AGA-GGT-CCC-ATC-AAA-ACC-AAA-C A: AAA-AGC-CCA-ATT-TTG-CCA-CC	59 58	45 45	152

La stabilité des gènes de référence dans les conditions expérimentales présentes a été évaluée grâce à l'algorithme de normalisation GeNorm utilisé par le logiciel qbase⁺ (Biogazelle, Gand, Belgique). À partir des gènes de référence les plus stables dans les cellules dans les conditions expérimentales utilisées, GeNorm fournit un facteur de normalisation issu de la moyenne géométrique de plusieurs gènes de référence. Ce facteur doit prendre en compte au moins trois gènes de référence stables pour permettre une normalisation plus précise et plus fiable de l'expression des gènes d'intérêt, que lorsque la normalisation n'était basée que sur un seul gène de référence [Vandesompele et coll., 2002 ; Hellemans et coll., 2007]. Toutes les procédures utilisées pour les réactions de qPCR sont conformes aux guidelines MIQE [Bustin, 2002 ; Bustin et coll., 2009 ; Bustin, 2010].

7. Dosage ELISA multiplex

La production des médiateurs inflammatoires par les différentes lignées cellulaires (chondrocytes, synoviocytes et PBMC) a été évaluée par un dosage ELISA multiplex. Basé sur le principe du traditionnel dosage ELISA en sandwich, ce dosage permet de quantifier simultanément plusieurs médiateurs présents dans un échantillon (Figure 54). La détection utilise les techniques de chimiluminescence, d'électrochimiluminescence ou de cytométrie de flux. Le dosage multiplex par cytométrie de flux, aussi appelé dosage multiplex à billes (bead-based multiplex assay), est le plus répandu. Chaque jeu de billes de polystyrène est enrobé d'un anticorps spécifique. Ces billes contiennent de plus un colorant rouge qui permet de les différencier lors de la lecture. Le complexe antigène (cytokine) – anticorps est alors reconnu par un anticorps secondaire fluorescent (molécule rapporteuse). Cette molécule (streptavidine-phycoérythrine) est requise pour les applications nécessitant des détections multiples et une haute sensibilité. La concentration du médiateur dans l'échantillon est directement

proportionnelle à la fluorescence émise par le second anticorps [Whiteside, 2002 ; Leng et coll., 2008 ; Malekzadeh et coll., 2012].

Cette technique présente de nombreux avantages par rapport au dosage ELISA classique tels que (i) la possibilité de quantifier jusqu'à 100 médiateurs simultanément, (ii) le faible volume d'échantillon requis (25 - 50 μ l), (iii) la réduction du temps ainsi que du coût des manipulations, (iv) une large plage de concentrations standards dans laquelle les dosages sont fiables [Whiteside, 2002 ; Leng et coll., 2008].

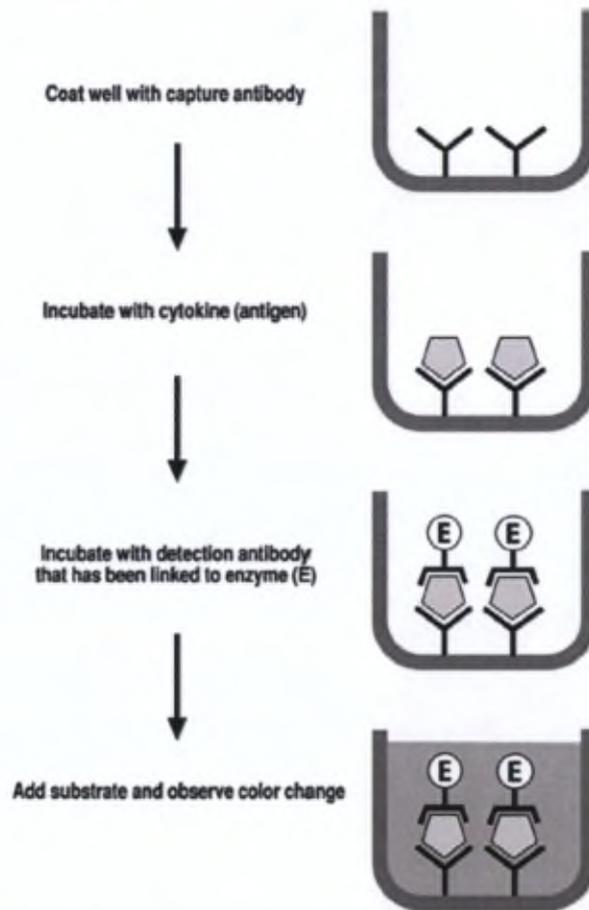


Figure 54 : Principe du dosage ELISA en sandwich et du dosage ELISA multiplex à billes. Les anticorps recouvrant la surface du puits permettent la liaison à l'antigène de façon spécifique. Un second anticorps lié à une enzyme se lie ensuite au complexe antigène – anticorps préalablement formé. Cette seconde liaison augmente la spécificité de la réaction et permet la détection [Leng et coll., 2008].

Le dosage des médiateurs IL1 β , IL6, IL8, IL10 et TNF α a été réalisé à l'aide du kit Human High Sensitivity Cytokine (Millipore, Billerica, États-Unis) alors que le médiateur MMP1 a été dosé avec le kit Human MMP2 (Millipore, Billerica, États-Unis), selon les recommandations du fournisseur. Les billes correspondant aux médiateurs étudiés ont été ajoutées à la plaque 96-puits ainsi que les standards, contrôles et échantillons (Tableau 23). La

plaque a été incubée durant 2 heures à température ambiante ou 16 à 18 heures à 4°C en fonction du kit. Après deux lavages, l'anticorps de détection biotinylé a été ajouté à la plaque qui a été incubée durant 1 heure à température ambiante. Enfin, la streptavidine-phycoérythrine (SA-PE) a été ajoutée avant une incubation de 30 minutes à température ambiante. La lecture des résultats a été réalisée à l'aide du système Bio-Plex 200 (Bio-rad, Nazareth Eke, Belgique) et ils ont été traités avec le logiciel Bio-Plex Manager Version 4.0 (Bio-rad, Nazareth Eke, Belgique). Les dosages ELISA multiplex ont été réalisés en triplicat sur chaque échantillon, chaque échantillon ayant préalablement été obtenu de trois cultures distinctes.

Tableau 23 : Concentration (pg/ml) des 7 standards utilisés pour chaque kit.

	Kit Human High Sensitivity Cytokine	Kit Human MMP2
Standard 7	2000	20000
Standard 6	400	5000
Standard 5	80	1250
Standard 4	16	313
Standard 3	3,2	78
Standard 2	0,64	20
Standard 1	0,13	5,0

8. Cytométrie de flux

L'évaluation de l'apoptose et de la nécrose des chondrocytes, synoviocytes et PBMC en présence des différents principes actifs bruts et des formulations a été réalisée par une analyse FACS. Cette méthode de cytométrie de flux permet de détecter et compter toutes les cellules préalablement marquées passant dans un flux liquide parcouru par un faisceau laser. Les cellules diffractent le rayon laser, ce qui fournit une indication de leur taille et de leur structure (granularité, présence de structures intra-cellulaires). La diffraction de cellules en apoptose ou en nécrose varie et fournit des indications sur les modifications morphologiques (gonflement/rétrécissement, rupture de la membrane cytoplasmique, fragmentation du noyau) [Darzynkiewicz et coll., 1997].

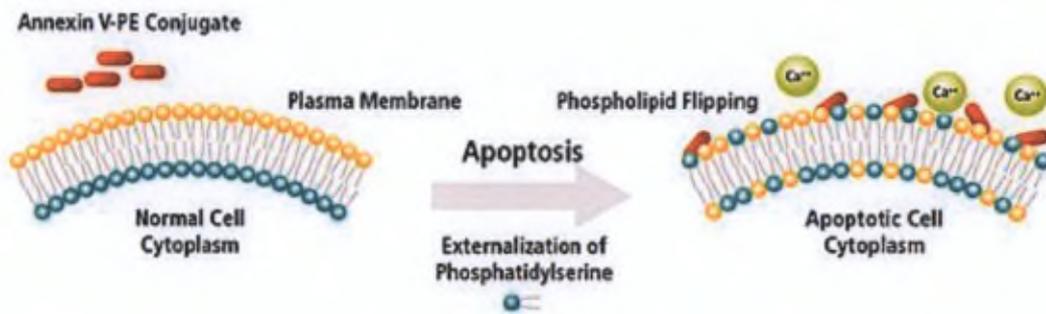


Figure 55 : Mécanisme de liaison de l'annexine V-FITC aux membranes cellulaires en cas d'apoptose. En cas d'apoptose de la cellule, la membrane se modifie, les groupements phosphatidylsérines transloquent vers la surface externe et permettent la liaison à l'annexine-V [Site Internet BD Biosciences, 2013].

Les cellules doivent être identifiables et sont marquées par un anticorps monoclonal fluorescent (annexine V-FITC) se liant à un phospholipide membranaire de la cellule (phosphatidylsérine) [Kim et Kirsch, 2008], ainsi qu'à un fluorophore se liant aux acides nucléiques (iodure de propidium) (Figure 55 et Figure 56) [Riccardi et Nicoletti, 2006].

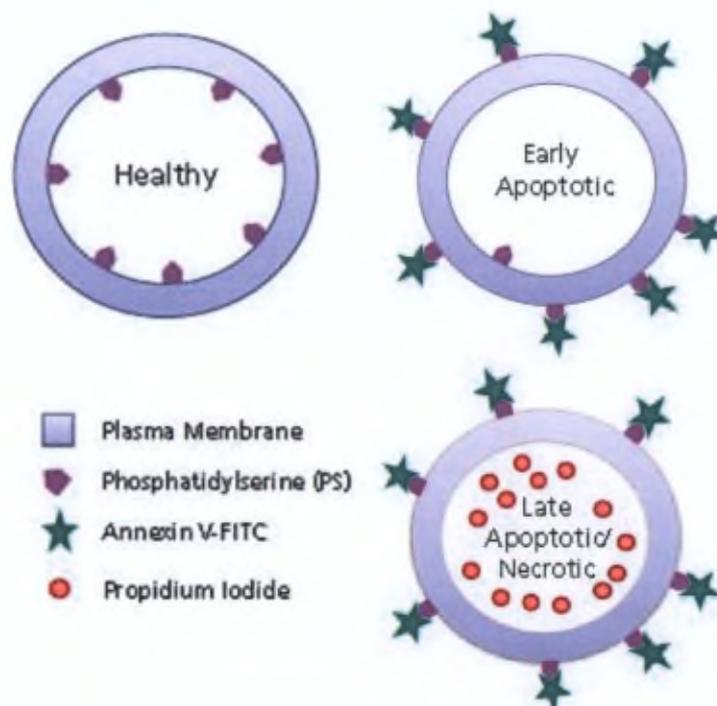


Figure 56 : Présence des marqueurs utilisés pour la détection des cellules saines, apoptotiques et nécrotiques [Adapté du site Internet BD Biosciences, 2013].

L'apoptose et la nécrose des chondrocytes, synoviocytes et PBMC ont donc été évaluées par une analyse FACS. Dans des plaques 6-puits CellStar (Greiner Bio One, Wemmel, Belgique), les chondrocytes et synoviocytes ont été cultivés à raison de $5 \cdot 10^4$ cellules/ml alors que les PBMC ont été cultivés à raison de $2 \cdot 10^6$ cellules/ml. Les cellules sont incubées durant 24 heures en présence de clonidine HCl (225 $\mu\text{g/ml}$), de dipropionate de bétaméthasone (850 $\mu\text{g/ml}$), de microparticules vides (80 mg/ml), de microparticules chargées en clonidine (80 mg/ml) ou de microparticules chargées en bétaméthasone (250 mg/ml). Le paclitaxel (50 $\mu\text{g/ml}$) a été utilisé comme contrôle positif de l'apoptose des chondrocytes, synoviocytes et PBMC. Les chondrocytes et synoviocytes ont ensuite été trypsinisés et les PBMC centrifugés durant 5 minutes à 220 x g avant d'être lavés deux fois avec du PBS 10 mM dans des tubes en polystyrène (BD Falcon, BD Biosciences, Erembodegem, Belgique). Les cellules ont été incubées avec de l'annexine V-FITC (AV) (0,5 μl dans 50 μl de tampon HEPES 10 mM, NaOH pH 7,4) et de l'iodure de propidium (PI) (50 $\mu\text{g/ml}$) pendant 15 minutes à température ambiante. Les cellules ont été lavées avec du PBS et re-suspendues dans 500 μl de PBS avant l'analyse. Quatre contrôles sont nécessaires à la mise au point des conditions de mesure et à l'interprétation des résultats : AV-/PI- (cellules viables), AV+/PI- (cellules en apoptose précoce), AV-/PI+ (cellules en nécrose précoce) et AV+/PI+ (cellules en apoptose et nécrose tardives) (Figure 56) [Farkas et coll., 2010].

Les analyses FACS ont été réalisées à l'aide d'un FACSCalibur (BD Biosciences, Erembodegem, Belgique). Les résultats ont été traités et analysés grâce au logiciel BD FACStation – CellQuest Pro (BD Biosciences, Erembodegem, Belgique).

9. Chimiluminescence

La capacité des différents principes actifs (clonidine HCl et dipropionate de bétaméthasone) et formulations (microparticules vides et chargées en clonidine ou en bétaméthasone) à enrayer ou induire la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) a été déterminée par chimiluminescence (CL). Cette technique est basée sur l'émission de radiations électromagnétiques dans le domaine de la lumière visible, et plus particulièrement sur la relaxation d'électrons excités vers leur état initial, par la libération de photons à partir d'une molécule instable. L'excitation des électrons a lieu grâce à une réaction chimique produisant une molécule luminescente [Faulkner et Fridovich, 1993 ; Wilson et Walker, 2010]. L'intensité de la CL produite par les cellules ou tissus est généralement trop faible pour être détectée. Dès lors, des amplificateurs de CL sont utilisés afin d'obtenir un signal suffisant.

Les amplificateurs de chimiluminescence libèrent un photon une fois en présence d'espèces radicalaires. Ces composés ayant la capacité de diffuser dans les cellules, ils permettent de détecter les espèces radicalaires extra- et intracellulaires. Dès lors, la lumière produite suite à cette réaction est directement proportionnelle à la quantité de ROS produite [Rost et coll., 1998 ; Vladimorov et coll., 2007 ; Vladimorov et Proskurnina, 2009]. La lucigénine est largement utilisée en tant que sonde chimiluminescente en raison de sa spécificité à l'encontre de l'anion superoxyde, $O_2^{\bullet -}$ (Figure 57) [Münzel et coll., 2002 ; Vladimorov et coll., 2007].

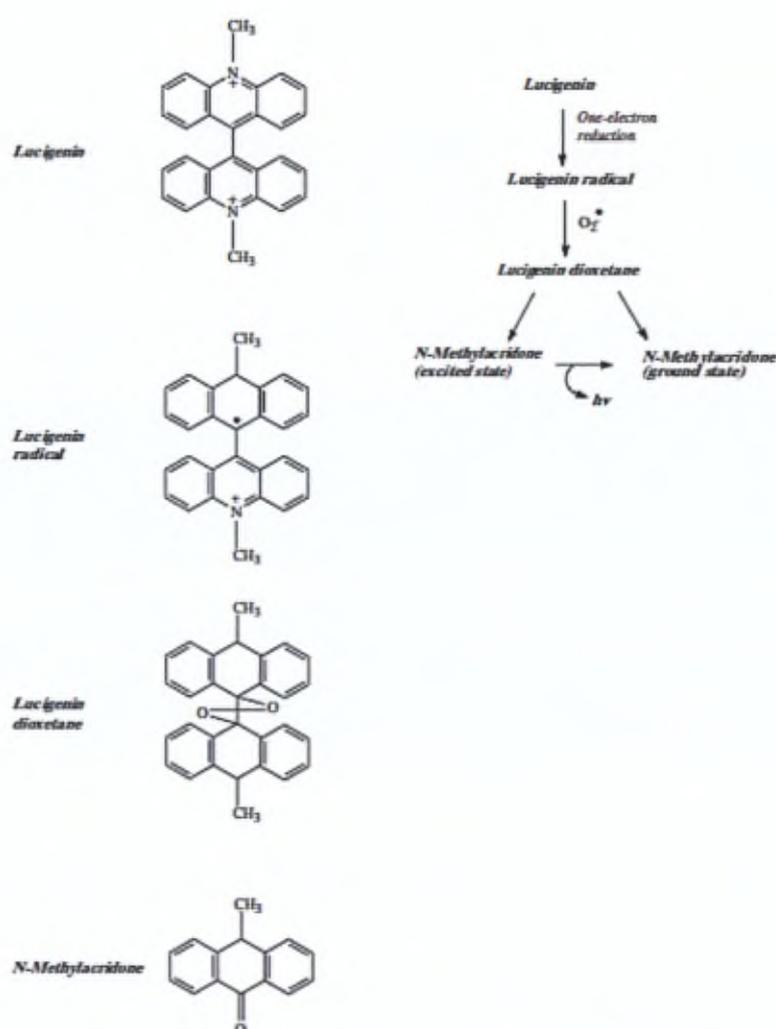


Figure 57 : Mécanisme d'action de la lucigénine : l' $O_2^{\bullet -}$ réduit la lucigénine LC^{2+} pour former son cation radicalaire $LC^{\bullet +}$. Ce cation réagit avec une seconde molécule d' $O_2^{\bullet -}$, ce qui génère la molécule riche en énergie, le dioxétane LCO_2^{\bullet} . Cette molécule libère alors un photon ($h\nu$) et forme finalement le N-méthylacridone [Münzel et coll., 2002 ; Bartosz, 2006].

La libération de ROS enrayée ou induite par les principes actifs et les microsphères a été étudiée par CL sur des leucocytes polynucléaires (PMN, neutrophiles) équins. Les

neutrophiles équins ont été isolés à l'aide d'un gradient de densité Percoll, rincés et suspendus dans du PBS (5×10^6 cellules/ml PBS). Les neutrophiles ont été stimulés en présence de phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA), dont une solution stock a initialement été préparée dans du diméthylsulfoxyde (DMSO). Cette solution a été diluée extemporanément dans de l'eau ($1,6 \times 10^{-5}$ M). Des volumes adéquats de cette solution diluée ont été ajoutés aux PMN afin d'obtenir une concentration finale de PMA égale à 8×10^{-7} M.

Les différents échantillons (principes actifs et microparticules) ont préalablement été dissous/mis en suspension dans du DMSO et de l'eau. Des volumes adéquats de ces solutions/suspensions ont alors été ajoutés aux PMN afin d'obtenir une concentration par puits allant de 10^{-7} à 10^{-4} M pour la clonidine HCl brute et le dipropionate de bétaméthasone brute et 3 mg/ml pour les microparticules. La concentration en DMSO n'excède jamais 1% par puits.

Les cellules ont été incubées pendant 1 heure avec les différents échantillons. Les microparticules chargées ont été pré-incubées pendant 24 heures dans du PBS afin que la libération de la molécule encapsulée soit amorcée avant tout contact avec les PMN. Les PMN ont ensuite été mis en présence soit de la suspension de microparticules, soit du surnageant duquel les microparticules ont été centrifugées. Des conditions contrôles ont été évaluées en parallèle : cellules (non-)stimulées dans du PBS seul ou en présence des différents diluants utilisés (eau, DMSO).

La production des ROS a été évaluée par la mesure de la CL induite par la lucigénine. Pour ce faire, 200 μ l de la suspension de PMN ont été distribués dans chaque puits d'une plaque 96-puits (10^6 cellules/puits) (White Combiplate 8, Thermo Scientific, Zelik, Belgique) et incubés pendant 10 minutes à 37°C. Ensuite, 25 μ l de CaCl_2 (7,5 μ M), 2 μ l de lucigénine (5 μ M) et la concentration choisie de principe actif/microparticules ont été ajoutés à chaque puits. La CL a été mesurée durant 30 minutes à l'aide d'un Fluoroskan Ascent FL (Thermo Scientific, Zelik, Belgique). La réponse des PMN en CL est exprimée comme la valeur intégrale de l'émission totale de CL [Franck et coll., 2009].

Parallèlement, la viabilité des PMN incubés en présence des principes actifs et des microparticules vides ou chargées en clonidine ou en bétaméthasone a également été évaluée à l'aide de bleu trypan.

10. Analyse statistique

L'analyse statistique de la modulation de l'expression et de la sécrétion des médiateurs inflammatoires par les différents principes actifs/formulations a été réalisée à l'aide du logiciel Graph Pad Prism 3.0 (Graph Pad Software, Californie, États-Unis). La distribution gaussienne des valeurs a été vérifiée par un test de Shapiro-Wilk. Ensuite, des analyses ANOVA one-way sur des valeurs pairées ont été effectuées et suivies de tests post-hoc de Bonferroni. Une valeur de $p < 0,05$ est considérée comme statistiquement significative.

Les différences significatives ont été présentées sur les graphiques uniquement si elles sont pertinentes pour l'étude actuelle. D'une part, la stimulation significative des cellules contrôles par le LPS a été établie. D'autre part, les effets significatifs des différentes formulations par rapport au contrôle stimulé ainsi que par rapport à la formulation vide de principe actif sur les cellules stimulées ont été représentés.

IV. Résultats et discussion

1. Formulations et véhicule

Trois formulations différentes ont été évaluées du point de vue de leur efficacité et de leur toxicité cellulaire sur les chondrocytes, synoviocytes, PBMC et neutrophiles. Les effets de la clonidine (F2) et de la bétaméthasone (F3) par rapport aux microparticules vides (F1) ont été étudiés (Tableau 24). Selon le principe actif, les formulations ont été produites à l'aide d'une simple émulsion H/E (F3 ; H/E : 8 000 rpm, 2 minutes ; évaporation : agitateur à hélice, 200 rpm, 3 heures) ou d'une double émulsion E/H/E (F1 et F2 ; E/H : 30 000 rpm, 2 minutes ; E/H/E : 8 000 rpm, 2 minutes ; évaporation : agitateur à hélice, 200 rpm, 3 heures).

Tableau 24 : Composition et caractéristiques de taille et d'encapsulation des différentes formulations étudiées. Les microsphères ont été réalisées à l'aide de PLGA 96 000 Da. Dans les formulations optimisées, le pH des phases aqueuses de F2 a été ajusté ; w_1 pH 3 (tampon citrate) ; w_2 pH 8 (tampon phosphate). Le D[4,3] et l'EE sont exprimés en moyenne \pm écart-type ($n = 3$).

Paramètres	Formulations		
	1	2	3
Polymère (g)	3	3	3
m clonidine (mg)	-	30	-
m bétaméthasone (mg)	-	-	30
Phase organique (ml)	22,5	22,5	22,5
Phase aqueuse (w_1) (pH) (ml)	3	3 (pH 3)	-
Solution 0.1% PVA (m/v) (w_2) (pH) (ml)	300	300 (pH 8)	300
D[4,3] μm	29 ± 2	17 ± 2	16 ± 2
EE (%)	-	$23,3 \pm 0,6$	67 ± 2

Ces formulations ont été stérilisées par rayonnements γ et l'effet de ce processus sur le PM du polymère ainsi que sur la libération des molécules a été évalué. Comme supposé, le PM du PLGA a été sensiblement diminué suite à la stérilisation [Friess et Schlapp, 2006], bien que celle-ci ait été réalisée expressément à une température de -80°C . Malgré l'augmentation de la présence d'oligomères suite à la stérilisation, le polymère conserve ses propriétés de biocompatibilité. Néanmoins, la libération des principes actifs ne s'en est pas retrouvée

fortement affectée, les profils de dissolution étant similaires à ceux de microparticules non-stérilisées.

Le véhicule utilisé pour la dispersion des microparticules a été produit par la solubilisation d'hyaluronate de sodium (PM = 1,9 MDa) dans du PBS (1 mg/ml, viscosité 5 mPaS). Sur base de la loi de Raoult, l'isotonie de la solution a été ajustée à l'aide de D(+)-glucose monohydraté.

2. Réponse des chondrocytes en présence des formulations

Le temps de contact des microparticules avec les cellules a été fixé à 4 heures suite à l'observation de la diminution des taux d'ARNm des différents médiateurs après l'arrêt de la stimulation au LPS. En effet, 24 heures après l'arrêt de la stimulation au LPS, les taux d'ARNm de certains médiateurs étaient pratiquement indétectables. Le temps d'incubation a donc été choisi car il présentait les taux d'ARNm des médiateurs les plus élevés.

Les différentes formulations (F1, F2 et F3) n'induisent pas de réaction inflammatoire sur les chondrocytes, vu l'absence d'augmentation des taux d'ARNm des médiateurs dans les cellules non stimulées au LPS (Figure 58).

Dans les conditions contrôles, la stimulation des chondrocytes par le LPS provoque une augmentation significative des taux d'ARNm des médiateurs inflammatoires étudiés (IL1 β , IL6, IL8, MMP1 et BMP2) par rapport aux cellules non stimulées. Bien que les études *in vitro* sur les chondrocytes et synoviocytes aient été effectuées sur des cellules saines et non arthritiques, l'induction de la libération de médiateurs par le LPS permet d'obtenir un profil inflammatoire fortement similaire à celui existant dans l'OA ou l'AR. En effet, de nombreuses cytokines hautement exprimées dans ces maladies sont également libérées sous l'influence du LPS. Dès lors, l'effet des microparticules développées peut être évalué de façon satisfaisante [Ko et coll., 2013].

L'addition des microparticules vides de principe actif (F1) sur les chondrocytes stimulés au LPS permet de diminuer de façon significative les taux d'ARNm de l'IL6. Les microparticules chargées en clonidine (F2) n'induisent pas de diminution significative des taux d'ARNm des médiateurs étudiés par rapport au contrôle stimulé, excepté pour le BMP2 et l'IL6. Néanmoins, l'effet observé pour F2 sur ces médiateurs est identique à l'effet causé par les microparticules vides (F1) (aucune diminution significative par rapport à F1).

L'expression des différents médiateurs par les chondrocytes stimulés est significativement diminuée en présence des microparticules chargées en bétaméthasone (F3), excepté pour la

MMP1. Néanmoins, l'effet de F3 n'est pas significativement différent de l'effet de F1, excepté pour l'IL6 et l'IL8.

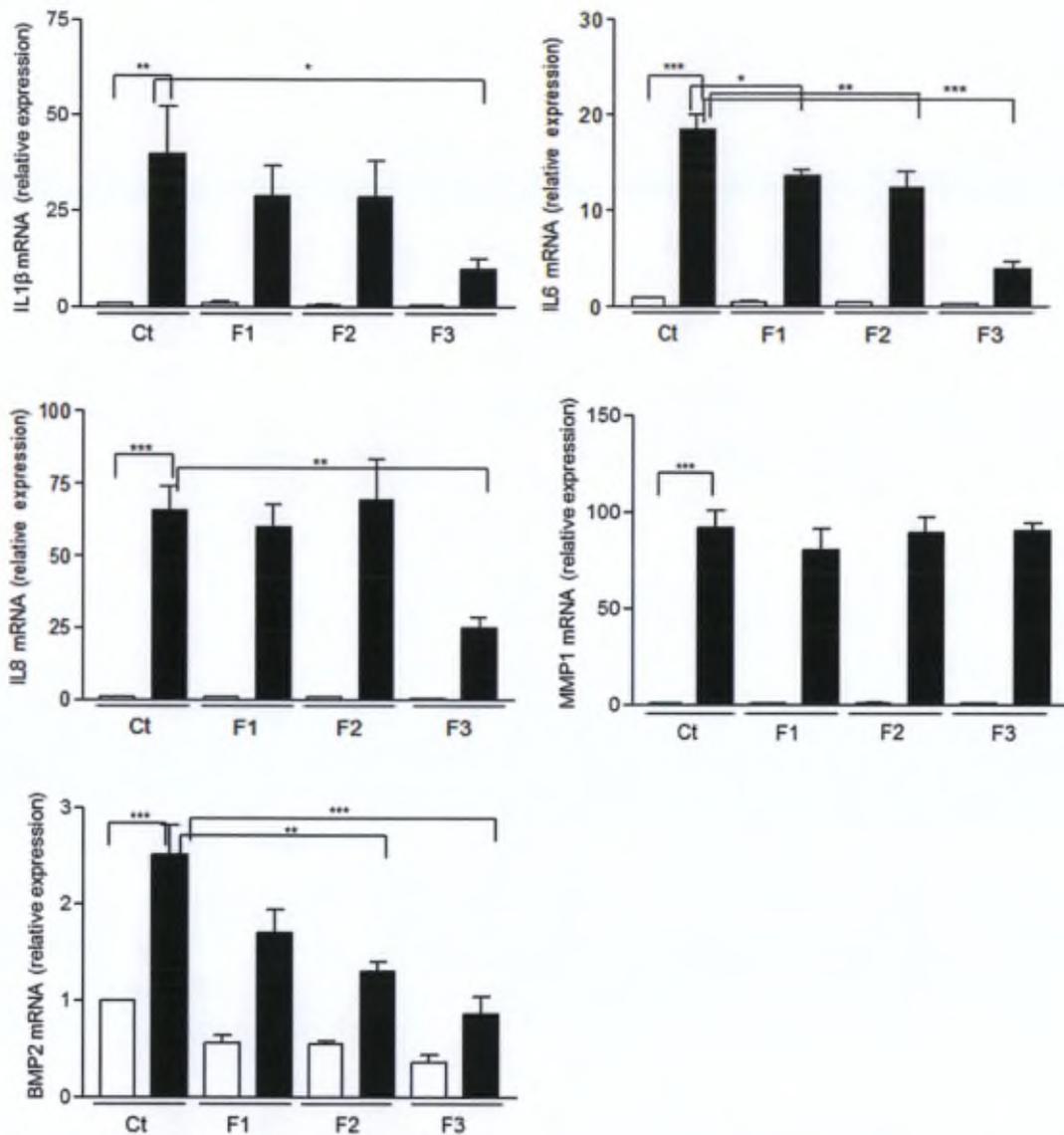


Figure 58 : Évaluation des taux d'ARNm de médiateurs inflammatoires par qPCR après incubation des chondrocytes durant 4 heures en présence de milieu de culture (Ct), de microparticules vides (F1, 8 mg/ml), chargées en clonidine (F2, 8 mg/ml) ou en bétaméthasone (F3, 25 mg/ml) (moyenne \pm S.E.M., n=3). Les barres vides représentent les résultats obtenus pour les cellules non stimulées au LPS. Les barres pleines représentent les résultats obtenus pour les cellules stimulées au LPS (2 μ g/ml). * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$.

Bien que le taux d'ARNm de la MMP1 soit augmenté suite à la stimulation des chondrocytes par le LPS, les différentes formulations (F1, F2 et F3) n'ont pas d'effet sur son expression. Dans le mécanisme inflammatoire, les formulations développées n'agissent probablement pas directement sur l'expression de la MMP1 par les chondrocytes mais par l'intermédiaire des

médiateurs favorisant sa sécrétion (IL1 β). En effet, capable d'induire l'activation de la MMP1, une diminution de l'expression d'IL1 β entraînera une diminution de ce phénomène, réduisant la destruction du cartilage.

Au vu de ces différentes observations, il semblerait que F1 ait un effet anti-inflammatoire en limitant l'expression de médiateurs inflammatoires par les chondrocytes. L'absence de différence significative entre F2 et F1 montre que la clonidine, à une concentration d'environ 34 $\mu\text{g/ml}$ après 4 heures d'incubation, n'a pas d'effet supplémentaire sur l'expression des médiateurs étudiés et qu'elle ne présente pas d'effet anti-inflammatoire sur les chondrocytes. De plus, les taux d'ARNm des différents médiateurs n'ont pas été significativement diminués suite à l'incubation des chondrocytes avec la clonidine brute (450 $\mu\text{g/ml}$) durant des temps de 2, 4 et 24 heures (données non présentées).

Par contre, la différence significative existant entre F3 et F1 pour l'IL6 et l'IL8 montre que la bétaméthasone a un effet supplémentaire sur ces cytokines par rapport aux microparticules vides. Cet effet observé confirme les propriétés anti-inflammatoires connues de la bétaméthasone.

Un effet significativement différent de F3 par rapport à F1 peut probablement être obtenu pour les autres cytokines étudiées en pré-incubant les microparticules de bétaméthasone durant 20 heures dans du milieu de culture avant leur incubation de 4 heures au contact des cellules, et ce, afin d'amorcer la libération de la molécule. De cette façon, environ 375 $\mu\text{g/ml}$ de bétaméthasone seraient libérés après 24 heures d'incubation contre environ 185 $\mu\text{g/ml}$ après 4 heures. Au vu de la tendance des résultats actuels de l'expression de l'IL1 β et du BMP2, une quantité doublée de bétaméthasone en présence des cellules pourrait supposément induire une diminution significative de l'expression de ces médiateurs par rapport à F1.

La production des protéines par les chondrocytes a ensuite été évaluée par dosage ELISA multiplex (Figure 59). Lors de ces dosages, les quantités détectées d'IL1 β , d'IL10 et de TNF α étaient inférieures à la courbe standard, laissant supposer qu'elles ne sont pas sécrétées par les chondrocytes dans ces conditions, bien que l'expression de leur gène ait pu être modifiée (IL1 β). Cela montre que l'expression d'un gène ne s'accompagne pas toujours de la synthèse et de la sécrétion de la protéine correspondante ou que le temps d'incubation choisi n'est pas idéal.

Les cellules non stimulées mises en présence des formulations (F1, F2 et F3) ne présentent pas d'augmentation de la sécrétion des médiateurs étudiés par rapport au contrôle non stimulé ; les formulations sont donc bien tolérées par les chondrocytes.

Une augmentation significative de la concentration de la MMP1, de l'IL6 et de l'IL8 a été observée suite à la stimulation des chondrocytes par le LPS (Figure 59), ce qui corrobore les résultats obtenus par qPCR. Cependant, les formulations ne semblent pas diminuer la quantité de cytokines détectées. Dans le cas de la MMP1, F1 et F3 provoquent une augmentation de la quantité sécrétée par rapport aux chondrocytes contrôles stimulés au LPS. Ceci n'a pas été détecté par qPCR, indiquant probablement des temps d'incubation inappropriés pour ces cytokines lors de l'évaluation par qPCR. En effet, la modulation maximale des taux d'ARNm ainsi que l'importance de la réponse varie dans le temps en fonction des cytokines étudiées [Mendes et coll., 2011].

L'action anti-inflammatoire de F1 et F3 observée par qPCR sur l'IL6 et l'IL8 n'apparaît pas lors de l'étude de la sécrétion des protéines. La modification transcriptionnelle de ces gènes ne semble pas s'accompagner d'une modification de la sécrétion de la protéine correspondante.

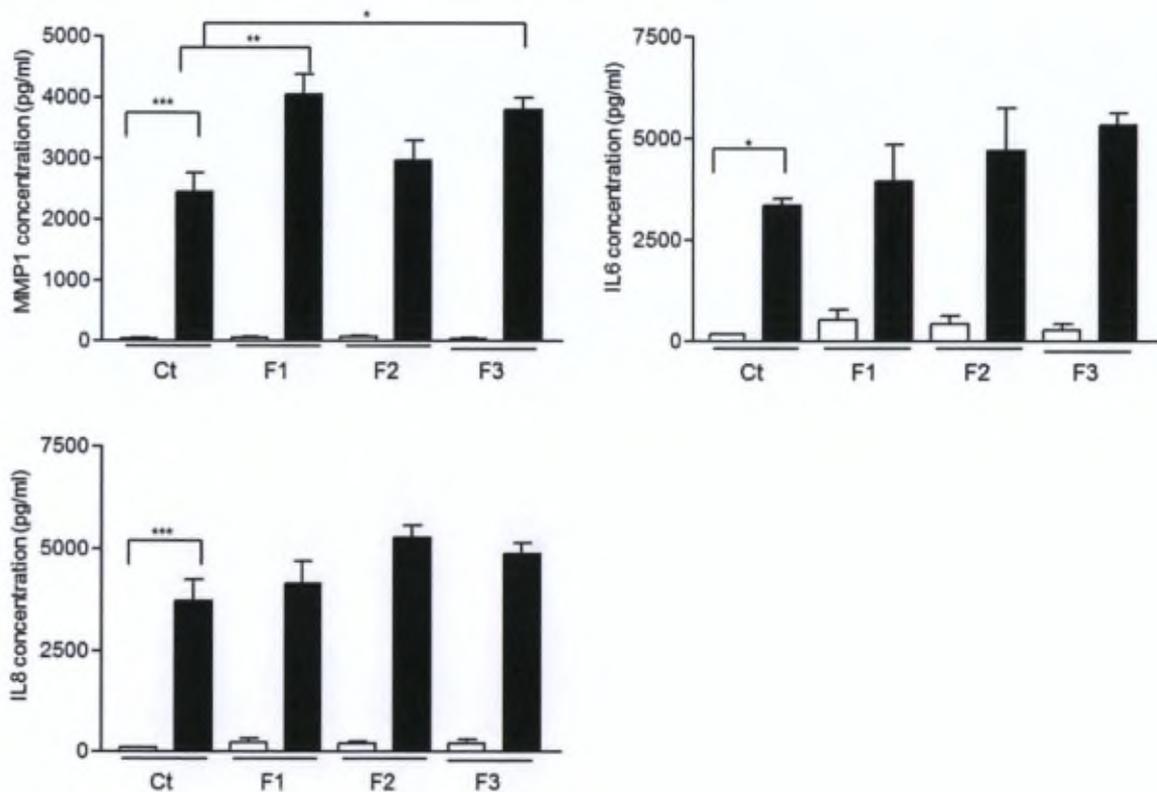


Figure 59 : Concentrations (pg/ml) de MMP1, IL6 et IL8 quantifiées par dosage ELISA multiplex à partir des surnageants des cultures de chondrocytes (moyenne \pm S.E.M., n=3). Les barres vides représentent les résultats obtenus pour les cellules non stimulées au LPS. Les barres pleines représentent les résultats obtenus pour les cellules stimulées au LPS (2 μ g/ml). * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$.

3. Réponse des synoviocytes en présence des formulations

Les synoviocytes non stimulés au LPS et mis en présence des formulations ne montrent aucune augmentation significative des taux d'ARNm des médiateurs étudiés, montrant leur bonne tolérance vis-à-vis des formulations (Figure 60).

La stimulation des synoviocytes par le LPS induit une augmentation significative des taux d'ARNm des facteurs inflammatoires étudiés (IL1 β , IL6, MMP1 et BMP2). Les taux d'ARNm du TNF α et de l'IL8 n'augmentent pas de façon significative et le taux d'ARNm du TGF β reste inchangé après stimulation des synoviocytes par le LPS (Figure 60). L'addition de TGF β exogène dans la culture de cellules stimulées par le LPS semble nécessaire à la modification de son expression et de sa sécrétion [McAler et Vella, 2008].

En comparaison aux synoviocytes contrôles stimulés, F1 induit une diminution significative du taux d'ARNm de l'IL1 β (Figure 60). La formulation F2 induit également une diminution significative du taux d'ARNm de l'IL1 β , mais celle-ci n'est pas significativement différente par rapport à F1. À une concentration d'environ 34 μ g/ml après 4 heures de libération, la clonidine ne présente pas d'effet anti-inflammatoire au niveau des synoviocytes, comme observé sur les chondrocytes. L'effet déterminé sur l'IL1 β en présence de F2 n'étant pas supérieur à l'effet de F1, il peut être attribué aux microparticules vides et non à la présence de clonidine. Enfin, F3 provoque une diminution significative des taux d'ARNm des médiateurs dont l'expression est modifiée suite à la stimulation au LPS (IL1 β , IL6 et BMP2). Ces effets ne sont néanmoins pas significativement différents de ceux observés pour F1. Une pré-incubation des microparticules pendant 20 heures pourrait également renforcer les effets de la bétaméthasone.

Bien que le taux d'ARNm de la MMP1 soit significativement augmenté suite à la stimulation des synoviocytes par le LPS, les différentes formulations n'ont pas d'effet sur la MMP1, agissant également par l'intermédiaire de l'IL1 β .

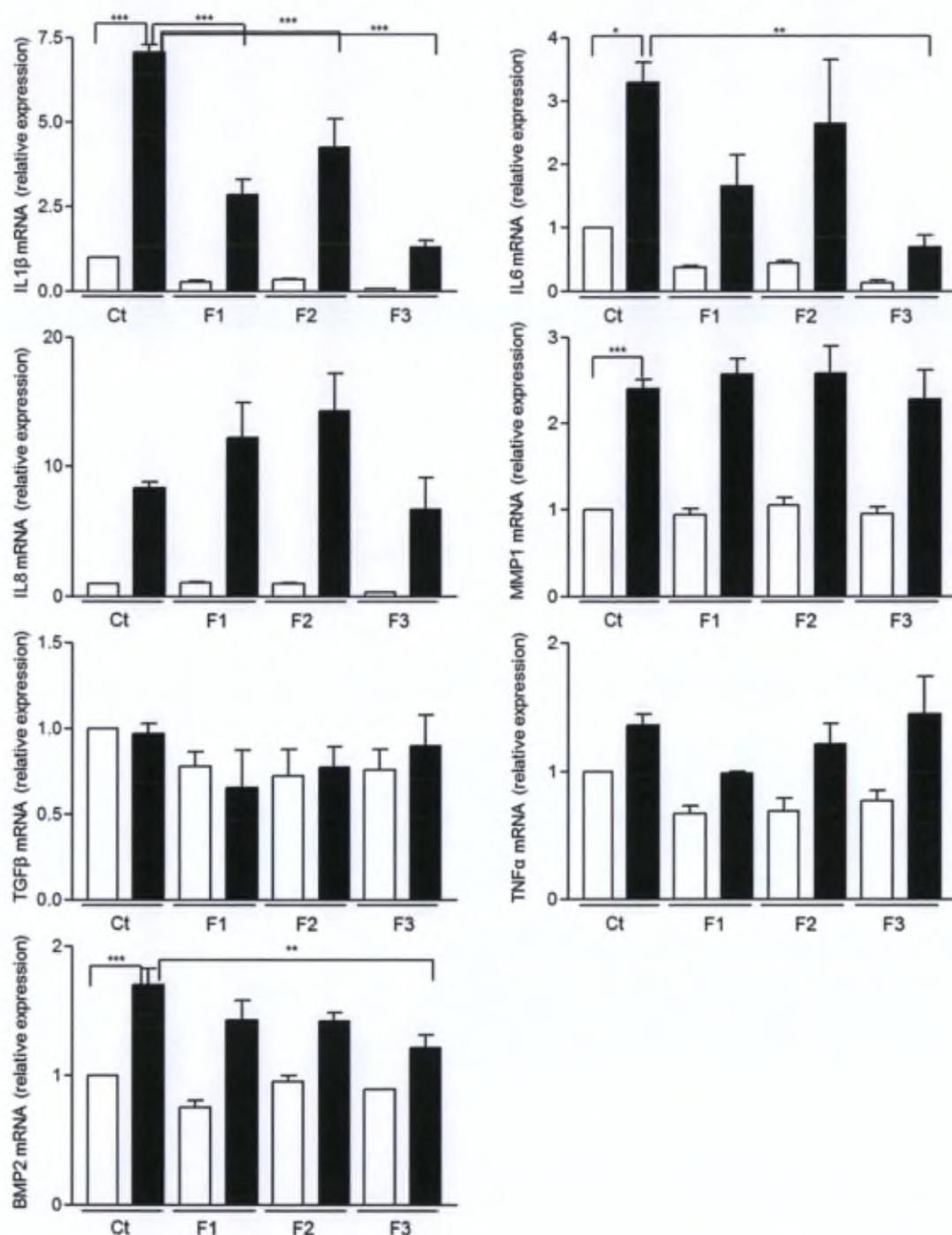


Figure 60 : Évaluation des taux d'ARNm de médiateurs inflammatoires par qPCR après incubation des synoviocytes durant 4 heures en présence de milieu de culture (Ct), de microparticules vides (F1, 8 mg/ml), chargées en clonidine (F2, 8 mg/ml) ou en bétaméthasone (F3, 25 mg/ml) (moyenne ± S.E.M., n=3). Les barres vides représentent les résultats obtenus pour les cellules non stimulées au LPS. Les barres pleines représentent les résultats obtenus pour les cellules préalablement stimulées au LPS (2 μg/ml). * : p < 0,05 ; ** : p < 0,01 ; *** : p < 0,001.

Comme observé dans le cas des chondrocytes, les concentrations détectées des cytokines IL1β et IL10 étaient inférieures à la courbe standard lors du dosage ELISA multiplex, malgré la

modulation des taux d'ARNm de l'IL1 β observée par qPCR. L'expression du gène codant pour l'IL10 n'a pas été modifiée de façon significative suite à la stimulation des synoviocytes par le LPS et leur traitement subséquent. Cependant, il était intéressant de vérifier la sécrétion de la protéine par les cellules car l'expression de son gène pouvait être revenue à son niveau basal au temps d'arrêt des cultures.

La concentration des différents médiateurs inflammatoires présente dans le surnageant des synoviocytes non stimulés au LPS et mis en présence des formulations ne varie pas significativement par rapport à la condition contrôle (Figure 61). Les synoviocytes tolèrent bien les formulations.

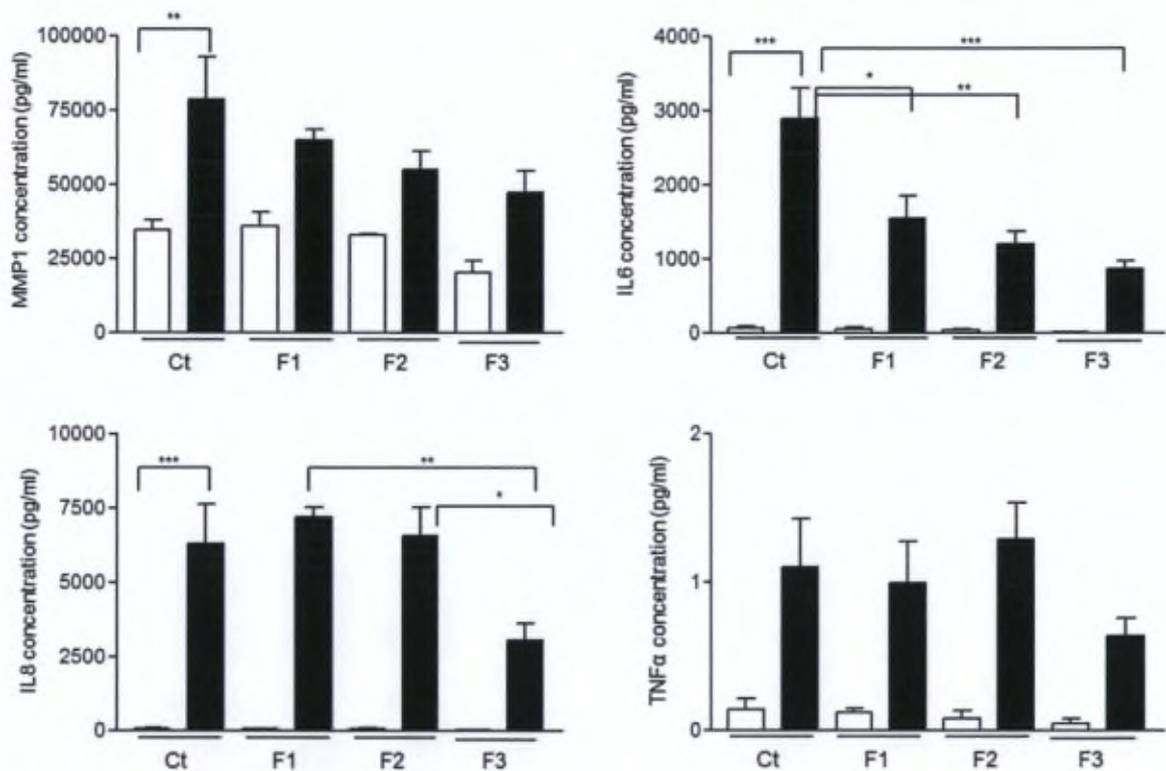


Figure 61 : Concentrations (pg/ml) de MMP1, IL6, IL8 et TNF α quantifiées par dosage ELISA multiplex à partir des surnageants des cultures de synoviocytes (moyenne \pm S.E.M., n=3). Les barres vides représentent les résultats obtenus pour les cellules non stimulées au LPS. Les barres pleines représentent les résultats obtenus pour les cellules stimulées au LPS (2 μ g/ml). * : p < 0,05 ; ** : p < 0,01 ; *** : p < 0,001.

La concentration des médiateurs MMP1, IL6, IL8 et TNF α détectés dans le surnageant des synoviocytes est augmentée suite à la stimulation des cellules par le LPS (Figure 61). Les synoviocytes sécrètent peu les cytokines IL6, IL8 et TNF α en conditions basales (contrôle -

concentration déterminée < 100 pg/ml), mais ils sécrètent la MMP1 de façon constitutive (contrôle - concentration déterminée \approx 35 000 pg/ml).

Par rapport aux synoviocytes contrôles stimulés au LPS, F1 et F2 réduisent de façon significative la concentration d'IL6 retrouvée dans le surnageant. Néanmoins, F2 ne montre pas d'effet significativement plus important sur cette concentration que F1. L'effet observé peut à nouveau être attribué aux microparticules vides et non à la clonidine.

L'incubation des synoviocytes stimulés au LPS avec F3 permet de réduire la concentration des cytokines détectées dans le surnageant (IL6 et IL8). La diminution de la concentration de l'IL8 est significativement différente par rapport à l'effet de F1 et F2, contrairement à l'effet observé sur l'IL6. Dans ce cas-ci, l'effet anti-inflammatoire observé est dû à la bétaméthasone. La clonidine ne présente à nouveau aucun effet de réduction de la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires et donc aucune action anti-inflammatoire.

La concentration de la MMP1 semble diminuer en présence des formulations, bien que la diminution soit non significative. Vu cette tendance, une pré-incubation des microparticules durant 20 heures avant la mise en contact avec les cellules aurait probablement accentué l'effet de la bétaméthasone et conduit à une diminution de la concentration de la MMP1 significativement différente par rapport à F1.

4. Réponse des PBMC en présence des formulations

Les PBMC ont été traités par deux concentrations différentes de LPS (2 μ g/ml et 100 ng/ml) (Figure 62 et Figure 63). Vu l'absence de résultats significatifs intéressants pour la clonidine dans les évaluations précédentes, F2 n'a pas été étudiée sur les PBMC stimulés par 100 ng/ml de LPS.

Globalement, les PBMC non stimulés au LPS et mis en présence des formulations F1 et F3 présentent une augmentation significative des taux d'ARNm de certains médiateurs étudiés (IL1 β , IL6, IL8, BMP2, TGF β et TNF α) (Figure 62 et Figure 63), montrant l'apparition d'une réponse inflammatoire induite par le polymère et le principe actif. En effet, sur certains médiateurs, l'effet de F3 sur les taux d'ARNm est significativement plus important que l'effet de F1 (IL6, BMP2, TGF β et TNF α). De plus, les cellules non-viables n'ayant pas été séparées avant la mise en culture des PBMC (viabilité comprise entre 37 et 43% en fonction du volontaire), la réponse observée peut également être influencée par ces débris cellulaires, ceux-ci initiant rapidement une réponse inflammatoire en vue de leur élimination.

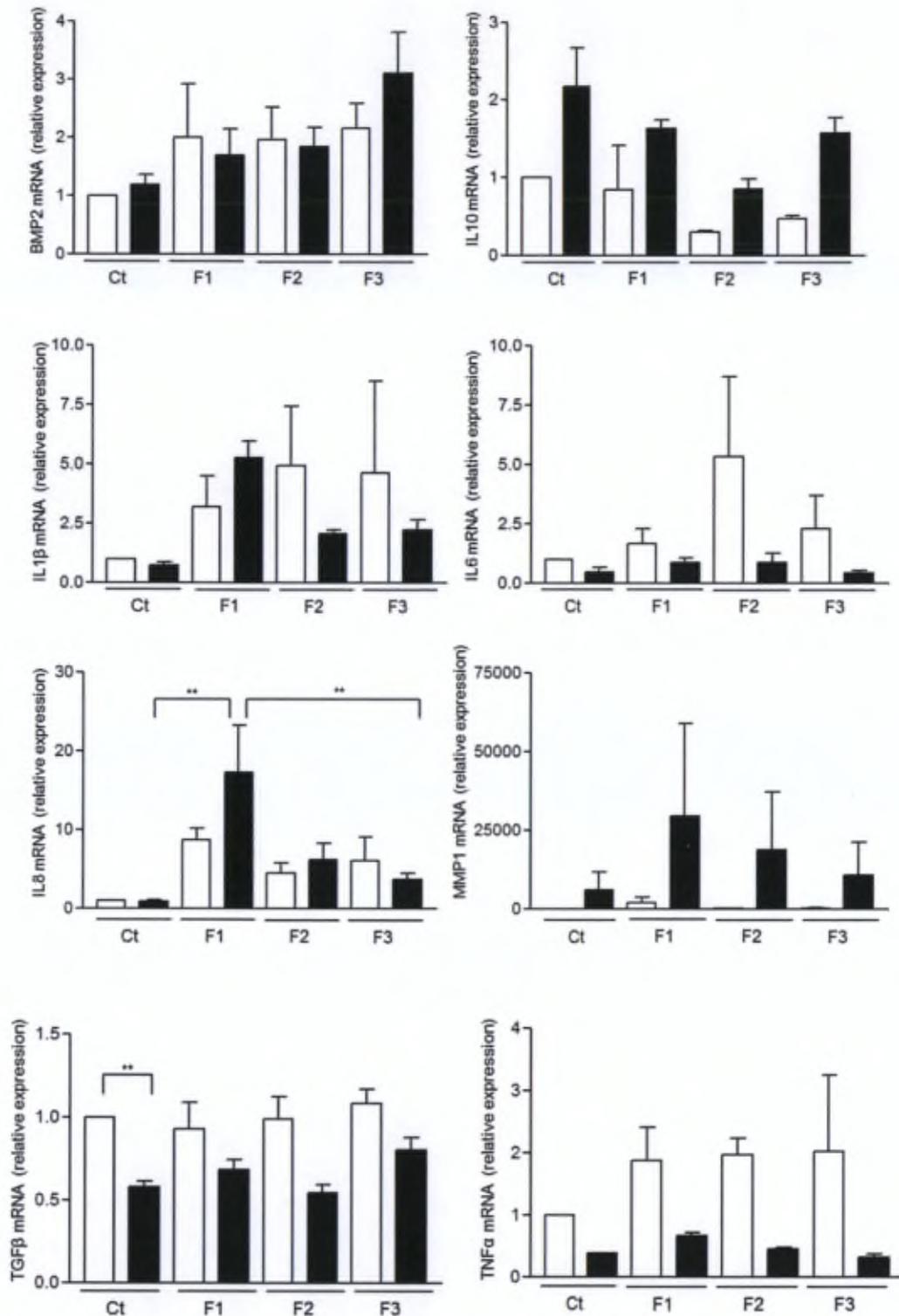


Figure 62 : Évaluation des taux d'ARNm de médiateurs inflammatoires par qPCR après incubation des PBMC durant 4 heures en présence de milieu de culture (Ct), de microparticules vides (F1, 8 mg/ml), chargées en clonidine (F2, 8 mg/ml) ou en bétaméthasone (F3, 25 mg/ml) (moyenne ± S.E.M., n=3). Les barres vides représentent les résultats obtenus pour les cellules non stimulées au LPS. Les barres pleines représentent les résultats obtenus pour les cellules préalablement stimulées au LPS (2 μg/ml). * : p < 0,05 ; ** : p < 0,01 ; * : p < 0,001.**

L'induction du mécanisme inflammatoire des PBMC par le LPS n'a pas pu être observée par qPCR. En effet, la stimulation des PBMC par le LPS (2 µg/ml ou 100 ng/ml) n'induit aucune augmentation significative des taux d'ARNm des facteurs inflammatoires étudiés (IL1β, IL6, IL8, IL10, TNFα, TGFβ, MMP1 et BMP2) (Figure 62 et Figure 63). L'action du LPS se produit au niveau de récepteurs de type « Toll-like receptors » (TLR), le TLR4 reconnaissant le LPS de manière sélective, induisant alors l'activation physiologique de plusieurs processus inflammatoires. Cette liaison requiert néanmoins l'action d'une protéine favorisant la liaison du LPS à son récepteur (LPS binding protein) [Peri et Piazza, 2012]. Alors que cette protéine a été identifiée dans des cultures de chondrocytes [Haglund et coll., 2008] et de synoviocytes [Kolka et coll., 2005], il semble que celle-ci soit présente en faibles quantités, voire absente, des PBMC isolés, expliquant dès lors la faible et lente activation de l'inflammation.

La variabilité biologique inter-volontaire explique les variations importantes observées dans les taux d'ARNm. Les tendances d'évolution des taux d'ARNm après traitement étaient néanmoins identiques entre chaque volontaire.

En comparaison aux PBMC contrôles stimulés par le LPS, les formulations n'entraînent aucune réduction des taux d'ARNm des médiateurs (Figure 62 et Figure 63). Au contraire, F1 induit une augmentation des taux d'ARNm de l'IL1β, de l'IL8, de la MMP1 et du TNFα. En présence d'une concentration d'environ 185 µg/ml de bétaméthasone (F3), l'augmentation de ces taux est significativement ramenée aux valeurs basales, montrant ici le caractère anti-inflammatoire par rapport aux microparticules seules. Des concentrations plus élevées en bétaméthasone, obtenues par une pré-incubation de F3, auraient probablement conduit à un effet anti-inflammatoire plus important.

Enfin, alors que l'IL10 n'avait pas pu être efficacement détectée par qPCR dans le cas des chondrocytes et des synoviocytes, le taux d'ARNm de cette interleukine est significativement augmenté en présence de F3 par rapport aux PBMC contrôles stimulés par le LPS. Cette cytokine anti-inflammatoire permet de réduire les taux des cytokines pro-inflammatoires de type IL1β, TNFα ou IL6 ainsi que les taux de certaines MMP (MMP1, MMP3 et MMP13) [Antoniv et Ivashkiv, 2011 ; Hemdan et coll., 2012 ; McDonald, 2012].

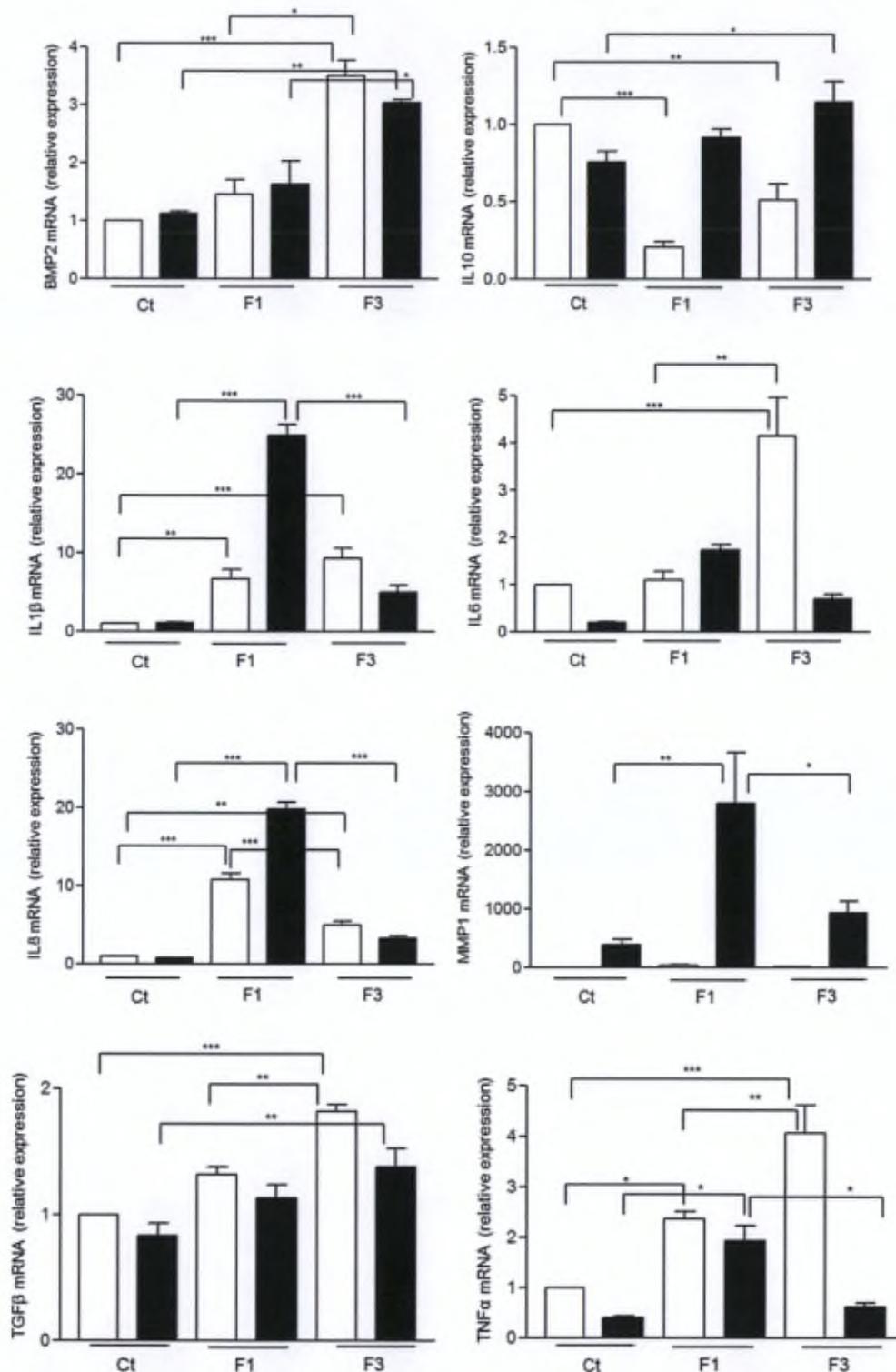


Figure 63 : Évaluation des taux d'ARNm de médiateurs inflammatoires par qPCR après incubation des PBMC durant 4 heures en présence de milieu de culture (Ct), de microparticules vides (F1, 8 mg/ml) ou chargées en bétaméthasone (F3, 25 mg/ml) (moyenne \pm S.E.M., n=3). Les barres vides représentent les résultats obtenus pour les cellules non stimulées au LPS. Les barres pleines représentent les résultats obtenus pour les cellules préalablement stimulées au LPS (100 ng/ml). * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; * : $p < 0,001$.**

Dans le cas des PBMC, les six médiateurs inflammatoires ont pu être détectés dans les surnageants lors du dosage ELISA multiplex (Figure 64).

Les PBMC semblent moins bien tolérer les microparticules de PLGA vu l'augmentation significative de la concentration de l'IL8 et du TNF α observée lorsque les PBMC non stimulés ont été mis en présence de F1. Ces observations confirment l'augmentation des taux d'ARNm déterminée par qPCR. L'IL1 β ne voit pas sa concentration modifiée alors qu'une variation significative de son taux d'ARNm avait été détectée par qPCR. Ces résultats montrent à nouveau qu'une modification transcriptionnelle induite par un agent ne s'accompagne pas toujours d'une modification traductionnelle.

Alors que cet effet n'a pas pu être observé par qPCR, le dosage ELISA multiplex a permis d'observer l'effet du LPS grâce à l'augmentation significative des concentrations des différents médiateurs par rapport aux PBMC non stimulés (MMP1, IL6, IL8 et IL10).

La concentration de la MMP1 ne varie pas suite à l'ajout des formulations aux PBMC contrôles stimulés au LPS. À nouveau, la modification de l'expression du gène correspondant montrée par qPCR en présence de F1 ne résulte pas en une augmentation de la sécrétion de la MMP1. Le temps d'incubation choisi pour ces évaluations (4 heures en présence des formulations) ne paraît pas convenir à la détection de la production de la MMP1. Un temps d'incubation plus long aurait probablement été nécessaire afin de permettre la production de cette protéine. De même, aucune modification des concentrations de l'IL1 β , de l'IL6 et du TNF α n'a été observée à la suite du traitement des PBMC stimulés au LPS par les formulations. Par contre, F1 et F3 augmentent significativement les concentrations de l'IL8 et de l'IL10 par rapport aux PBMC contrôles stimulés au LPS. Ces résultats se corrélaient avec les observations établies par qPCR.

La réaction inflammatoire provoquée par F1 sur les PBMC pouvait être attendue étant donné que les microparticules sont reconnues comme corps étranger par les PBMC. L'addition de bétaméthasone permet de tempérer cette réaction, en limitant l'expression et la production des médiateurs inflammatoires.

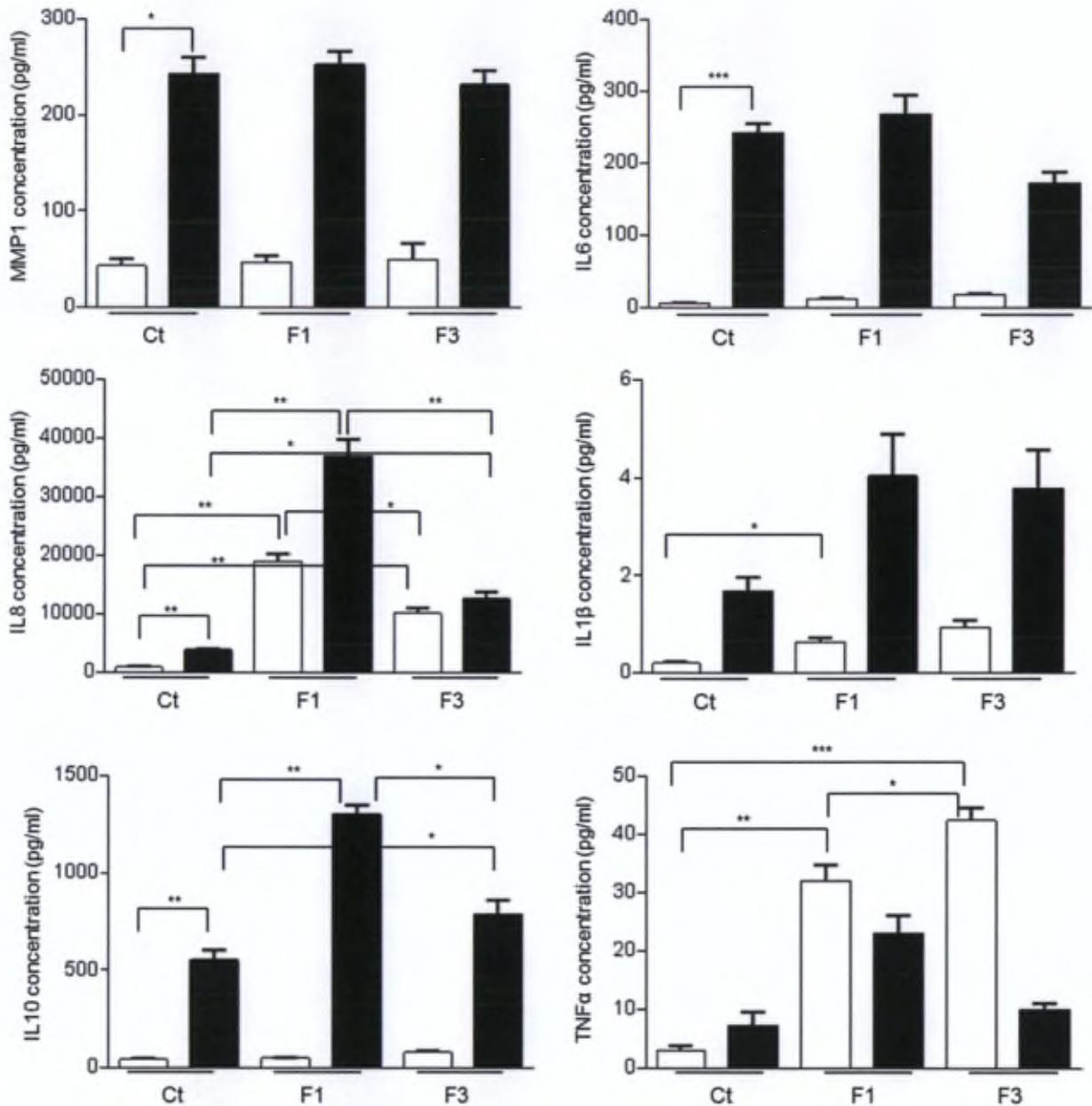


Figure 64 : Concentrations (pg/ml) de MMP1, IL6, IL8, IL1 β , IL10 et TNF α quantifiées par dosage ELISA multiplex à partir des surnageants des cultures de PBMC (moyenne \pm S.E.M., n=4). Les barres vides représentent les résultats obtenus pour les cellules non stimulées au LPS. Les barres pleines représentent les résultats obtenus pour les cellules stimulées au LPS (100 ng/ml). * : p < 0,05 ; ** : p < 0,01 ; * : p < 0,001.**

5. Évaluation de l'apoptose et de la nécrose

Les résultats bruts obtenus pour l'évaluation de l'apoptose et de la nécrose sont joints en annexe (Annexe 8). Afin d'interpréter correctement les résultats, il est nécessaire de tenir compte du pourcentage de cellules mortes observé dans le contrôle marqué à l'AV et au PI (Ct A+PI+) (de 8 à 15% pour les chondrocytes, synoviocytes et PBMC) (Figure 65).

Le contrôle positif de l'apoptose, le paclitaxel, induit nettement la mort des chondrocytes, synoviocytes et PBMC. En effet, de 80 à 98% des cellules se trouvent en mort cellulaire (pour les trois types cellulaires $p < 0,001$).

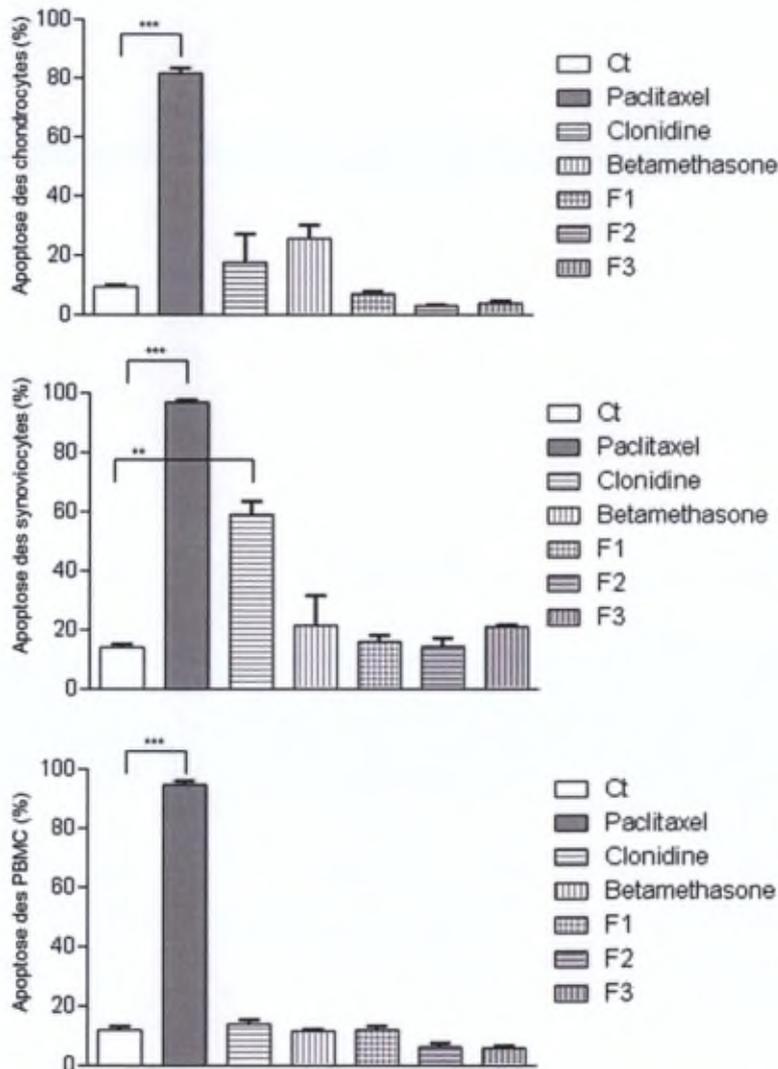


Figure 65 : Détermination par FACS de la mort cellulaire des chondrocytes, synoviocytes et PBMC, mis en présence des principes actifs bruts (clonidine HCl, 225 $\mu\text{g/ml}$; dipropionate de bétaméthasone, 850 $\mu\text{g/ml}$) et des différentes formulations (F1 et F2, 80 mg/ml ; F3, 250 mg/ml). Le paclitaxel a été utilisé comme contrôle positif de l'apoptose (50 $\mu\text{g/ml}$) (moyenne \pm S.E.M., $n=3$). * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$.

Après 24 heures d'incubation, le dipropionate de bétaméthasone induit de 20 à 25 % de mort cellulaire sur les chondrocytes et les synoviocytes. Malgré la différence non significative avec les contrôles marqués, le dipropionate de bétaméthasone est vraisemblablement toxique pour les chondrocytes et synoviocytes suite à un temps d'incubation assez court et à une dose (850 $\mu\text{g/ml}$) largement inférieure à la dose qui serait administrée *in vivo* (2,5 mg/ml). Une augmentation significative de la mort cellulaire induite par la bétaméthasone seule est donc à

prévoir aux doses envisagées. De plus, certains corticostéroïdes (bétaméthasone, prednisolone, acétonide de triamcinolone), administrés seuls ou en combinaison avec des anesthésiques locaux (lidocaïne, bupivacaïne, ropivacaïne), ont récemment montré une chondrotoxicité, par induction de l'apoptose des chondrocytes [Nakazawa et coll., 2002 ; Farkas et coll., 2010 ; Braun et coll., 2012 ; Dragoo et coll., 2012]. Dans ces études, la chondrotoxicité a été observée pour la bétaméthasone brute en solution et non formulée dans des microparticules. La dose de bétaméthasone évaluée (850 µg/ml) correspond à la dose qui serait libérée à partir des microparticules après une dizaine de jours. La toxicité observée pour cette dose serait donc peu probablement observée *in vivo* lors de l'utilisation de la bétaméthasone encapsulée dans les microparticules de PLGA. En effet, la libération contrôlée de la molécule combinée à son élimination progressive de l'articulation permet de ne jamais atteindre les doses qui sont potentiellement toxiques pour les cellules.

La bétaméthasone n'induit aucune mort cellulaire significative par rapport au contrôle marqué sur les PBMC.

La clonidine brute provoque environ 20% de mort cellulaire sur les chondrocytes, environ 60% sur les synoviocytes et environ 15% sur les PBMC. La clonidine se révèle donc fortement toxique sur les synoviocytes ($p < 0,01$ par rapport au contrôle marqué). Dans ce cas-ci, la dose évaluée correspond à la dose totale qui serait administrée *in vivo*. Malgré l'encapsulation de la clonidine dans les microparticules, la toxicité observée sur les synoviocytes induit à la prudence quant à son utilisation. En effet, une rapide décharge du principe actif ne peut être exclue *in vivo*, conduisant à une concentration excessive et non contrôlée du principe actif. Des évaluations *in vivo* de la libération de la clonidine à partir des microparticules semblent ici nécessaires.

Les formulations F1 à F3 ne montrent pas de toxicité importante sur les chondrocytes (3 à 7%), les synoviocytes (15 à 20%) et les PBMC (6 à 12%). La formulation F1 montre que le PLGA est bien toléré par les cellules articulaires. Durant les 24 heures d'incubation, les molécules sont libérées progressivement et induisent peu de toxicité. L'avantage de l'encapsulation est ici clairement montré par la protection que les microparticules confèrent aux cellules articulaires vis-à-vis des principes actifs. En effet, les formulations n'entraînent aucune mort cellulaire significative, par rapport aux toxicités observées sur les molécules brutes. Grâce à la libération contrôlée, les doses progressivement en contact avec les cellules sont trop faibles que pour induire une toxicité, tout en étant suffisantes pour être efficaces dans le cas de la bétaméthasone.

6. Évaluation de la chimiluminescence

La production de ROS par les PMN mis en présence des principes actifs et des microparticules a été évaluée par CL (Figure 66). Les PMN ont été incubés avec la clonidine HCl, le dipropionate de bétaméthasone et les microparticules vides ou chargées en principe actif, d'une part sans activation préalable par la PMA et d'autre part, suite à leur activation par la PMA. Ces deux protocoles permettent de mettre en évidence une augmentation ou une diminution de la quantité de ROS présente dans le milieu des PMN, en conditions inflammatoires ou non. Les effets observés sur les ROS peuvent être dus à une modification cellulaire de la production des ROS, c'est-à-dire à une inhibition ou une activation de leur mécanisme de production, ou à une interaction directe avec les ROS et donc à un effet antioxydant proprement dit, c'est-à-dire que l'ajout d'une petite quantité de principe actif ou de formulation pourrait protéger le tissu contre le stress oxydatif. Afin de déterminer le mécanisme sous-jacent à l'effet observé, une évaluation de la quantité de ROS libres ou liées par les principes actifs ou les formulations serait nécessaire.

Le traitement des PMN par la PMA entraîne une augmentation de la production des ROS (Ct avec et sans PMA) (Figure 66). Suite à cette activation, la clonidine montre une réduction significative mais faible de la production des ROS à partir d'une concentration de 10^{-6} M. Le dipropionate de bétaméthasone induit également une réduction significative mais importante de la production des ROS dès la concentration de 10^{-7} M, qui est largement inférieure à la dose totale de bétaméthasone qui serait injectée *in vivo* (2,5 mg/ml), ainsi qu'à la dose qui serait libérée après 1 heure (environ 125 µg/ml) (Figure 66). L'activité anti-inflammatoire du dipropionate de bétaméthasone est à nouveau confirmée, contrairement à celle de la clonidine.

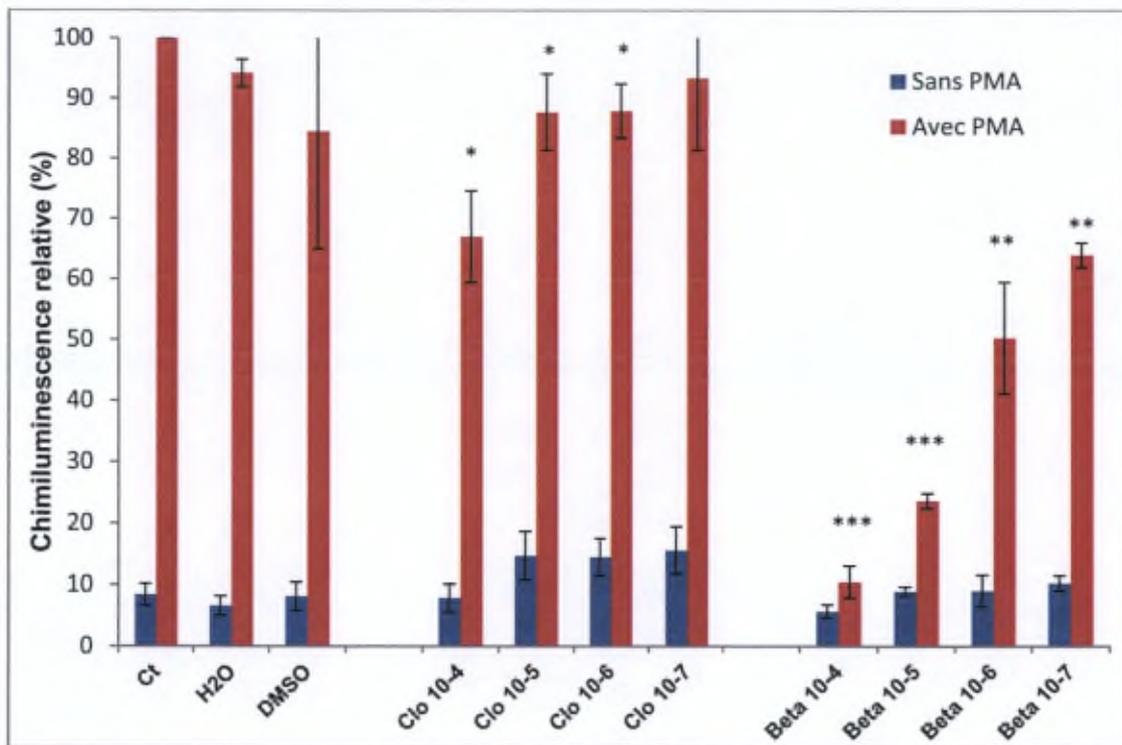


Figure 66 : Evaluation de la production de ROS induite par la clonidine HCl (Clo) et le dipropionate de bétaméthasone (Beta) dans une gamme de concentration allant de 10^{-7} à 10^{-4} M, suite à une incubation de 1 heure. Les barres bleues représentent la production de ROS par les PMN non activés par la PMA. Les barres rouges représentent la production de ROS par les PMN activés par la PMA. Le Ct représente les PMN seuls dans du PBS ; le Ct activé par la PMA représente le 100% à partir duquel les pourcentages relatifs et les statistiques ont été déterminés (moyenne \pm écart-type, n=3). * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$.

La viabilité des cellules mises en présence des surnageants des microparticules a été évaluée et est supérieure à 95%. Les surnageants ne présentent donc aucune toxicité pour les PMN.

L'incubation des PMN activés par la PMA en présence des surnageants récoltés à partir des suspensions de microparticules pré-incubées montre une augmentation significative de la production des ROS, détectée par CL (Figure 67). Dans ce cas, l'effet pro-oxydant étonnant des surnageants pourrait partiellement s'expliquer par la libération de composés pouvant interférer au niveau du mécanisme d'action de la PMA, en exacerbant ses effets.

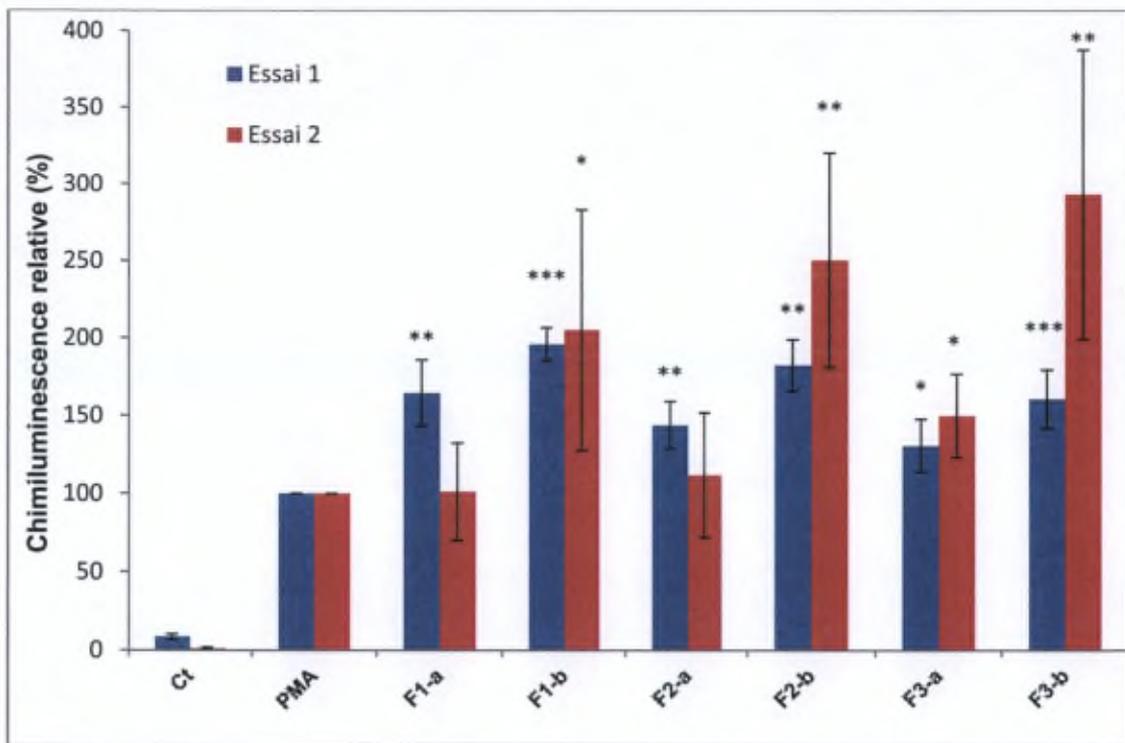


Figure 67 : Evaluation de la production de ROS par les PMN activés à la PMA, induite par les surnageants seuls de deux lots différents (a et b) des formulations de microparticules F1, F2 et F3, suite à une incubation de 1 heure. Les microparticules (3 mg/ml) ont été incubées durant 24 heures à 37°C puis centrifugées à 14 000 x g afin de collecter le surnageant, directement mis en contact avec les cellules. L'essai a été reproduit sur deux lots différents de PMN (Essai 1 et Essai 2). Le Ct activé par la PMA représente le 100% à partir duquel les pourcentages relatifs et les statistiques ont été déterminés (moyenne ± écart-type, n=4). * : p < 0,05 ; ** : p < 0,01 ; * : p < 0,001.**

Cette observation est d'autant plus surprenante que l'incubation des PMN non activés avec les surnageants obtenus de façon identique est associée à une réduction significative de la production des ROS (Figure 68). Cet effet est plus important pour F3, contenant la bétaméthasone (450 ng/ml après 24 heures de pré-incubation). Toutefois, les surnageants, contenant ou non un principe actif, exercent un effet inhibiteur sur la production des ROS par les PMN non activés. En effet, les surnageants récoltés des suspensions de microparticules de F1 et F2 présentent aussi cette activité alors que, d'une part, F1 ne renferme aucun principe actif et, d'autre part, la clonidine contenue dans F2 n'est associée à aucun potentiel anti-inflammatoire important. De plus, les principes actifs bruts n'ont pas démontré cette même activité sur les PMN non activés (Figure 66). Ceci laisse donc penser que la dégradation progressive des microparticules libère des composés capables d'enrayer la production de ROS par les PMN non activés.

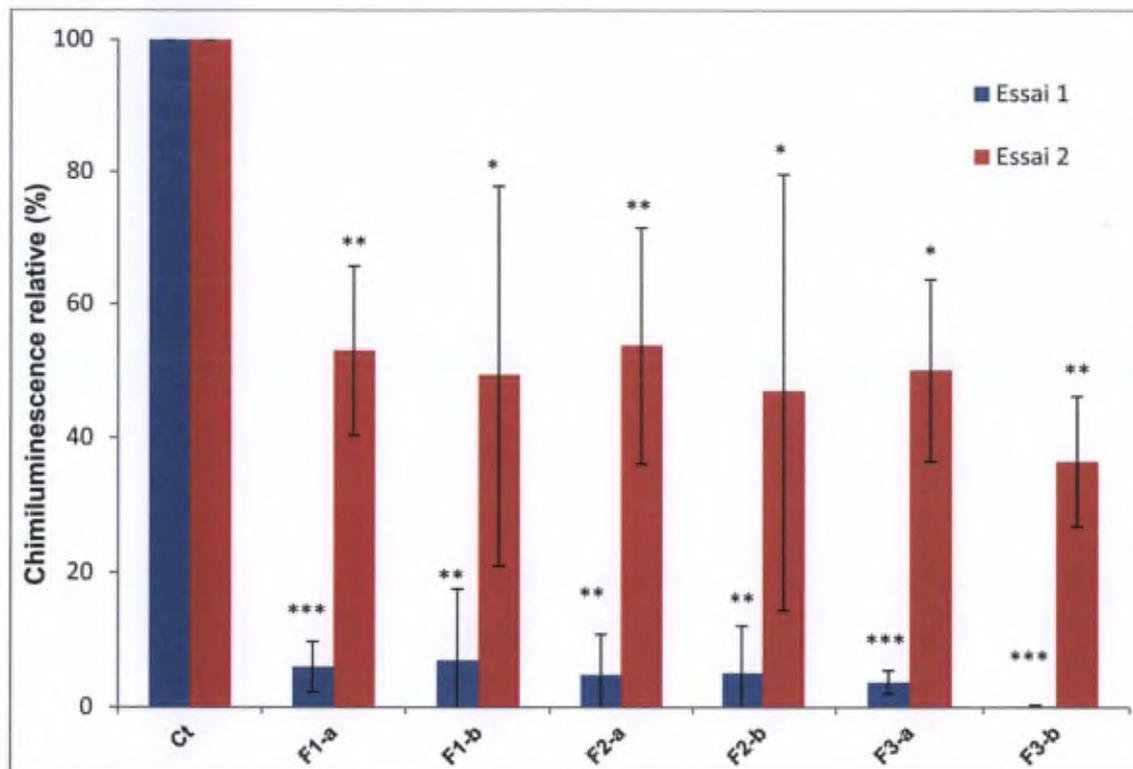


Figure 68 : Evaluation de la production de ROS par les PMN non-activés, induite par les surnageants seuls de deux lots différents (a et b) des formulations de microparticules F1, F2 et F3, suite à une incubation de 1 heure. Les microparticules (3 mg/ml) ont été incubées durant 24 heures à 37°C puis centrifugées à 14 000 x g afin de collecter le surnageant, directement mis en contact avec les cellules. L'essai a été reproduit sur deux lots différents de PMN (Essai 1 et Essai 2). Le Ct non-activé par la PMA représente le 100% à partir duquel les pourcentages relatifs et les statistiques ont été déterminés (moyenne \pm écart-type, n=4). * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$.

Une réduction significative de la production de ROS s'observe également lors de l'incubation des suspensions de microparticules totales en présence des PMN non-activés et activés par la PMA (Figure 69). Cet effet antioxydant est plus marqué en raison de la combinaison des effets des surnageants et d'une capture partielle de la lumière par les microparticules.

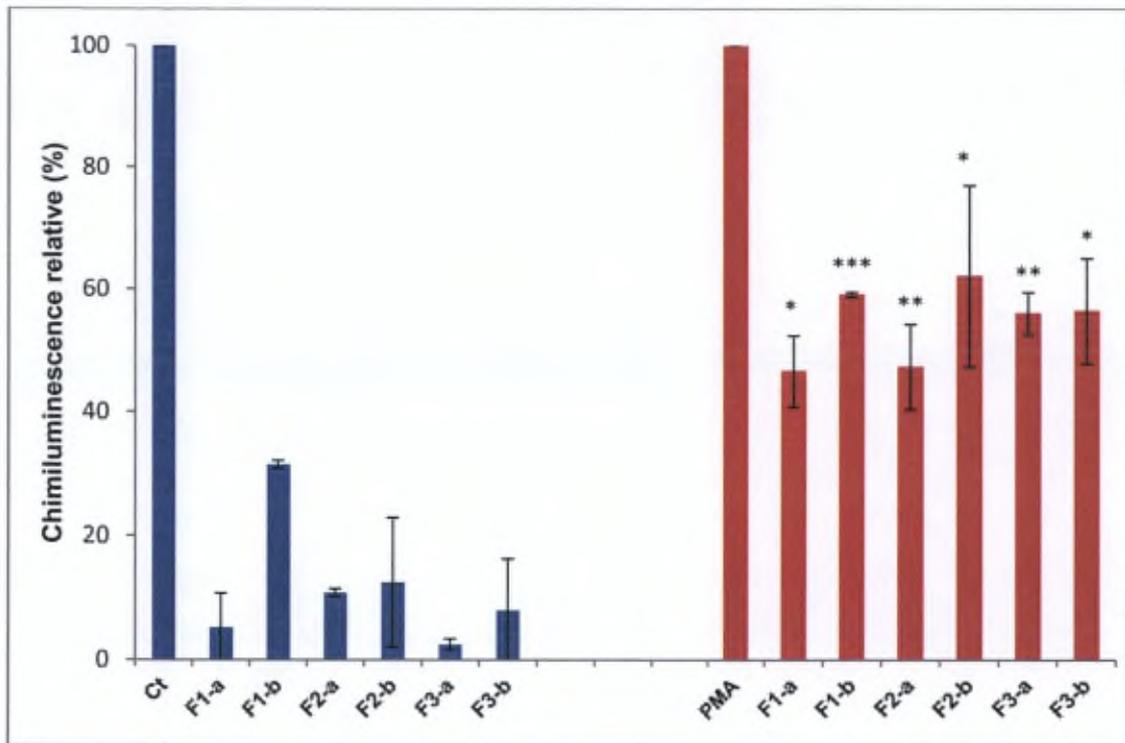


Figure 69 : Evaluation de la production de ROS par les PMN non-activés (série bleue) ou activés (série rouge) à la PMA, induite par les suspensions de microparticules de deux lots différents (a et b) de F1, F2 et F3, suite à une incubation de 1 heure. Les microparticules (3 mg/ml) ont été incubées durant 24 heures à 37°C puis directement mises en contact avec les cellules. Les pourcentages relatifs et les statistiques ont été déterminés à partir des contrôles respectifs (Ct non activé et Ct activé) (moyenne \pm écart-type, n=2 série bleue, n=3 série rouge). * : p < 0,05 ; ** : p < 0,01 ; *** : p < 0,001.

V. Conclusion

Les différentes évaluations *in vitro* réalisées sur les chondrocytes, synoviocytes, PBMC et PMN ont permis d'aboutir à plusieurs conclusions.

D'une part, la clonidine n'a démontré aucune activité anti-inflammatoire notable sur les quatre modèles cellulaires étudiés, que ce soit seule ou encapsulée dans les microparticules. Inactive dans les mécanismes inflammatoires caractéristiques de l'OA ou de l'AR et toxique pour les synoviocytes, elle présente peu d'intérêt à être administrée en IA. Une évaluation *in vivo* de l'effet antidouleur de la clonidine pourrait néanmoins être envisagée afin de déterminer une potentielle utilité de cette molécule dans de telles pathologies.

D'autre part, la bétaméthasone seule montre une certaine chondrotoxicité (non significative dans notre cas). Une fois encapsulée, la molécule est correctement tolérée par les cellules articulaires et induit la diminution de l'expression et de la sécrétion de plusieurs marqueurs inflammatoires. Elle a également montré un effet antioxydant significatif sur les PMN, à partir de doses très faibles (10^{-7} M). Malgré ses effets secondaires à long terme, la quantité de bétaméthasone libérée paraît suffisante pour exercer une action anti-inflammatoire mais trop faible que pour entraîner la mort des cellules, ce qui permettrait de réduire ces effets indésirables.

De plus, les microparticules vides ou chargées en clonidine ou en bétaméthasone présentent des effets antioxydants sur les PMN activés ou non à la PMA, probablement expliqués par la libération de composés de dégradation intervenant dans la production des ROS.

Enfin, les microparticules vides constituent un véhicule qui ne provoque aucune inflammation sur les cellules non stimulées au LPS mais induit au contraire la diminution significative des taux d'ARNm de certains médiateurs inflammatoires ainsi que leurs concentrations sécrétées une fois les cellules stimulées au LPS. Lorsque les principes actifs sont présents dans les microparticules, les chondrocytes et synoviocytes tolèrent toujours correctement la formulation, vu l'absence d'augmentation des taux d'ARNm des différents marqueurs dans les cellules non stimulées au LPS. De plus, l'encapsulation des principes actifs a permis d'en réduire la toxicité vis-à-vis des cellules articulaires. Le véhicule, possédant un potentiel anti-inflammatoire observé sur la plupart des cellules envisagées, pourra donc servir à l'encapsulation de nombreuses molécules, les deux modèles développés dans ce travail permettant l'encapsulation de molécules aux propriétés physico-chimiques opposées.

E. Conclusion générale

Ce travail a permis d'obtenir des microparticules de PLGA encapsulant des molécules aux caractéristiques physico-chimiques opposées et présentant des efficacités d'encapsulation très satisfaisantes, suite à leur production basée sur une simple (H/E) ou une double (E/H/E) émulsion. En effet, les procédés et paramètres de formulation optimisés ont conduit à l'encapsulation efficace d'une petite molécule hydrophile (clonidine HCl, E/H/E, meilleure EE \approx 20%) et d'une molécule hydrophobe (dipropionate de bétaméthasone, H/E, meilleure EE \approx 70%). Les microparticules sphériques et lisses obtenues sont caractérisées par une taille comprise entre 12 et 38 μm , adaptée à une administration intra-articulaire. Enfin, le polymère formant les microparticules reste sous forme amorphe suite aux étapes de fabrication.

La libération prolongée souhaitée initialement pour ces systèmes de délivrance était de minimum 4 à 6 semaines. Les microparticules chargées en clonidine ou en bétaméthasone remplissent pleinement cette attente, la majorité de la quantité du principe actif ayant été libérée suite à une période de 35 jours (clonidine, 100%) ou 53 jours (bétaméthasone, 80%). La fréquence d'administration intra-articulaire peut donc être efficacement réduite, tout en limitant l'apparition d'effets secondaires et en augmentant la compliance du patient. L'étude approfondie des mécanismes régissant la libération de la clonidine a montré l'implication des phénomènes de diffusion en début de processus, s'accompagnant ensuite de la dégradation progressive du polymère.

Ayant pour but final une délivrance en intra-articulaire dans le cadre de pathologies inflammatoires, l'efficacité des formulations développées et leur tolérance vis-à-vis des chondrocytes, synoviocytes et PBMC ont été déterminées. La clonidine n'a montré aucun effet anti-inflammatoire sur les cellules et l'évaluation de la mort cellulaire induite par la clonidine a montré une toxicité importante sur les synoviocytes. La clonidine ne présente donc que peu d'intérêt à être utilisée en intra-articulaire pour cette indication. Son effet antidouleur mérite en outre d'être étudié. S'il se révèle avéré, la clonidine pourrait être associée à une molécule anti-inflammatoire. Par contre, la bétaméthasone a confirmé ses effets anti-inflammatoires bien connus. Enfin, les microparticules vides développées ont montré un certain potentiel anti-inflammatoire, d'autant plus intéressant lorsqu'il se complémente aux effets d'une molécule anti-inflammatoire telle que la bétaméthasone.

Pour conclure, ce travail a permis de développer des microparticules capables d'encapsuler de nombreuses molécules différentes et ne provoquant aucune inflammation mais induisant au contraire la réduction de l'expression et de la sécrétion de certains médiateurs inflammatoires.

Les microparticules permettent également de réduire la toxicité observée pour les principes actifs seuls, conférant une protection des cellules articulaires. Ce véhicule pourrait donc être avantageusement utilisé dans les pathologies inflammatoires articulaires.

F. Perspectives

- Évaluation de la stabilité des formulations de microparticules développées. Selon les recommandations ICH concernant l'évaluation de la stabilité de nouveaux produits ou formulations, la caractérisation des propriétés physico-chimiques des microparticules ainsi que de la libération du principe actif encapsulé doivent être évaluées après 6 mois (conditions accélérées, $25 \pm 2^\circ\text{C}$, RH $60 \pm 5\%$) et après 12 mois (conditions longues, $5 \pm 3^\circ\text{C}$), les formulations étant destinées à une conservation à 4°C .
- Évaluation de la transposition de la production des formulations à l'échelle industrielle : la méthode de production par simple ou double émulsion devrait être facilement transposable, ainsi que la lyophilisation et la stérilisation des microparticules.
- Élargissement des classes de principes actifs à encapsuler dans les microparticules développées. Les méthodes de formulation optimisées permettent d'encapsuler des principes actifs tant hydrophiles (émulsion E/H/E) que lipophiles (émulsion H/E).
- Étude de la libération du principe actif et de la dégradation du polymère au contact de fluides physiologiques, tels que du liquide synovial en conditions normales et inflammatoires. L'évaluation de la libération *in vitro* pourrait être réalisée au contact d'un milieu simulant le liquide synovial (PBS + HA + enzymes) ainsi qu'*ex vivo*, dans du liquide synovial prélevé chez des patients présentant un large épanchement synovial.
- Évaluation *in vivo* de la libération des principes actifs par dosage dans le liquide synovial. Un dosage plasmatique par spectrométrie de masse permettrait d'évaluer les (faibles) quantités de principe actif passant dans la circulation systémique et pouvant entraîner des effets indésirables.
- Étude de la dégradation des microparticules chargées en bétaméthasone.
- Étude de la présence/absence de phagocytose des microparticules par les macrophages articulaires.
- Approfondissement de l'étude sur les PMN afin de comprendre l'induction de la production de ROS par les surnageants des microparticules : utilisation d'un autre inducteur de l'inflammation que la PMA.
- Développement d'un modèle *in vivo* sur le lapin et étude *in vivo* de l'efficacité des formulations : analyses histologiques de coupes de l'articulation, dosage plasmatique de marqueurs de l'inflammation (PGE2, CRP).
- Évaluation *in vivo* de l'effet de la clonidine sur la douleur.

G. Bibliographie

Abdelwahed W., Degobert G., Stainmesse S., Fessi H., Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations, *Adv Drug Deliv Rev* 58 (2006) 1688-1713.

Abramson S., Drug delivery in degenerative joint disease: where we are and where to go?, *Adv Drug Deliv Rev* 58 (2006) 125-127.

Adcock I.M., Corticosteroids: limitations and future prospects for treatment of severe inflammatory disease, *Drug Discov Today Ther Strateg* 1 (2004) 321-328.

Afonso V., Champy r., Mitrovic D., Collin P., Lomri A., Reactive oxygen species and superoxide dismutases: role in joint diseases, *Joint Bone Spine* 74 (2007) 324-329.

Akesson K., Chapter 52: Osteoarthritis and degenerative spine pathologies, in *Dynamics of bone and cartilage metabolism, Principles and clinical applications*, 2nd edition, Academic Press Inc, Salt Lake City, 2006.

Alamanos Y., Drosos A.A., Epidemiology of adult rheumatoid arthritis, *Autoimmun Rev* 4 (2005) 130-136.

Alcaraz M.J., Megias J., Garcia-Arnandis I., Clérigues V., Guillén M.I., New molecular targets for the treatment of osteoarthritis, *Biochem Pharmacol* 80 (2010) 13-21.

Ali S.A.M., Doherty P.J., Williams D.F., Molecular biointeractions of biomedical polymers with extracellular exudate and inflammatory cells and their effects on the biocompatibility, *in vivo*, *Biomaterials* 15 (1994) 779-785.

Allen K. D., Adams S.B., Setton L.A., Evaluating Intra-Articular Drug Delivery for the Treatment of Osteoarthritis in a Rat Model, *Tissue Eng: Part B*, 16 (2010) 81-92.

Aly M.N.S., Intra-articular drug delivery: a fast growing approach, *Recent Pat Drug Deliv Formul* 2 (2008) 231-237.

Amalinei C., Caruntu I.-D., Giusca S.E., Balan R.A., Matrix metalloproteinases involvement in pathologic conditions, *Rom J Morphol Embryol* 51 (2010) 215-228.

Anderson J.M., Shive M.S., Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres, *Adv Drug Deliv Rev* 64 (2012) 72-82.

Antoniv T.T., Ivashkiv L.B., Interleukin-10-induced gene expression and suppressive function are selectively modulated by the PI3K-Akt-GSK3 pathway, *Immunology* 132 (2011) 567-577.

Arakaki P.A., Marques M.R., Santos M.C.L.G., MMP-1 polymorphism and its relationship to pathological conditions, *J Biosci* 34 (2009) 313-320.

Armentano I., Dottori M., Fortunati E., Mattioli S., Kenny J.M., Biodegradable polymer matrix nanocomposites for tissue engineering: a review, *Polym Degrad Stab* 95 (2010) 2126-2146.

Arya M., Shergill I.S., Williamson M., Gommersall L., Arya N., Patel H.R.H., Basic principles of real-time quantitative PCR, *Expert Rev. Mol. Diagn.* 5 (2005) 1-11.

Baldrick P., The safety of chitosan as a pharmaceutical excipient, *Regul Toxicol Pharmacol* 56 (2010) 290-299.

Banerjee T., Mitra S., Singh A.K., Sharma R.K., Maitra A., Preparation, characterization and biodistribution of ultrafine chitosan nanoparticles, *Int J Pharm* 243 (2002) 93-105.

Barnes P.J., Corticosteroids: the drugs to beat, *Eur J Pharmacol* 533 (2006) 2-14.

Barron M.C., Rubin B.R., Managing Osteoarthritic Knee Pain, *J Am Osteopath Assoc* 107 (2007) 21-27.

Bartosz G., Use of spectroscopic probes for detection of reactive oxygen species, *Clin Chim Acta* 368 (2006) 53-76.

Bastow E.R., Byers S., Golub S.B., Clarkin C.E., Pitsillides A.A., Fosang A.J., Hyaluronan synthesis and degradation in cartilage and bone, *Cell Mol Life Sci* 65 (2008) 395-413.

Batycky R.P., Hanes J., Langer R., Edwards D.A., A theoretical model of erosion and macromolecular drug release from biodegrading microspheres, *J Pharm Sci* 86 (1997) 1464-1477.

Becker C., Hammerle-Fickinger A., Riedmaier I., Pfaffl M.W., mRNA and microRNA quality control for RT-qPCR analysis, *Methods* 50 (2010) 237-243.

Benito M.J., Veale D.J., Fitzgerald O., Van den Berg W.B., Bresnihan B., Synovial tissue inflammation in early and late osteoarthritis, *Ann Rheum Dis* 64 (2005) 1263-1267.

Berenbaum F., Osteoarthritis as an inflammatory disease (osteoarthritis is not osteoarthrosis!), *Osteoarthritis Cartilage* 21 (2013) 16-21.

Bhosale A.M., Richardson J.B., Articular cartilage: structure, injuries and review of management, *Br Med Bull* 87 (2008) 77-95.

- Billinghamurst R.C.**, Dahlberg L., Ionescu M., Reiner A., Bourne R., Rorabeck C., Mitchell P., Hambor J., Diekmann O., Tschesche H., Chen J., Van Wart H., Poole A.R., Enhanced cleavage of type II collagen by collagenases in osteoarthritic articular cartilage, *J Clin Invest* 99 (1997) 1534-1545.
- Birkedal-Hansen H.**, Moore W.G.I., Bodden M.K., Windsor L.J., Birkedal-Hansen B., DeCarlo A., Engler J.A., Matrix metalloproteinases : a review, *Crit Rev Oral Biol Med* 4 (1993) 197-250.
- Bijlsma J.W.J.**, Berenbaum F., Lafeber F.P.J.G., Osteoarthritis: an update with relevance for clinical practice, *Lancet* 377 (2011) 2115–2126.
- Blanco M.D.**, Sastre R.L., Teijón C., Olmo R., Teijón J.M., Degradation behaviour of microspheres prepared by spray-drying poly(D,L-lactide) and poly(D,L-lactide-co-glycolide) polymers, *Int J Pharm* 326 (2006) 139-147.
- Bonnet C.S.**, Walsh D.A., Osteoarthritis, angiogenesis and inflammation, *Rheumatology* 44 (2005) 7-16.
- Braun H.J.**, Wilcox-Fogel N., Kim H.J., Pouliot M.A., Harris A.H.S., Dragoo J.L., The effect of local anesthetic and corticosteroid combinations on chondrocyte viability, *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 20 (2012) 1689-1695.
- Briggman K.L.**, Bock D.D., Volume electron microscopy for neuronal circuit reconstruction, *Curr Opin Neurobiol* 22 (2012) 154-161.
- Brkovic B.**, Gardasevic M., Roganovic J., Jovic N., Todorovic L., Stojic D., Lidocaine + clonidine for maxillary infiltration anaesthesia: parameters of anaesthesia and vascular effects, *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 37 (2008) 149–155.
- Brunton L.L.**, Chabner B.A., Knollmann B.C., *Goodman & Gilman's - The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 12^{ème} édition, McGrawHill Medical, Chine, 2011.
- Buerkle H.**, Schäpsmeier M., Bantel C., Marcus M.A.E., Wüsten R., Van Aken H., Thermal and mechanical antinociceptive action of spinal vs peripherally administered clonidine in the rat inflamed knee joint model, *Br J Anaesth* 83 (1999) 436-441.
- Buerkle H.**, Peripheral anti-nociceptive action of alpha2-adrenoceptor agonists, *Baillieres Clin Anaesthesiol* 14 (2000) 411-418.
- Burr D.B.**, Anatomy and physiology of the mineralized tissues: Role in the pathogenesis of osteoarthrosis, *Osteoarthritis Cartilage* 12 (2004) 20-30.

Bustin S. A., Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems, *J Mol Endocrinol* 29 (2002) 23-39.

Bustin S.A., Benes V., Garson J.A., Hellemans J., Huggett J., Kubista M., Mueller R., Nolan T., Pfaffl M.W., Shipley G.L., Vandesompele J., Wittwer C.T., The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments, *Clin Chem* 55 (2009) 611-622.

Bustin S.A., Why the need for qPCR publication guidelines? The case for MIQE, *Methods* 50 (2010) 217-226.

Butoescu N., Jordan O., Doelker E., Intra-articular drug delivery systems for the treatment of rheumatic diseases: a review of the factors influencing their performance, *Eur J Pharm Biopharm* 73 (2009) 205-218.

Calop J., Limat S., Fernandez C., *Pharmacie clinique et thérapeutique*, 3^{ème} édition, Elsevier Masson, Paris, 2008.

Campo G.M., Avenoso A., Campo S., D'Ascola A., Nastasi G., Calatroni A., Molecular size hyaluronan differently modulates toll-like receptor-4 in LPS-induced inflammation in mouse chondrocytes, *Biochimie* 92 (2010) 204-215.

Caporal-Gautier J., Nivet J.M., Algranti P., Guilloteau M., Histe M., Lallier M., N'Guyen-Huu J.J., Russotto R., Guide de validation analytique, Rapport d'une commission SFSTP, I. Méthodologie, *S.T.P. Pharma Pratiques* 2 (1992) 205-226.

Caporali R., Caprioli M., Bobbio-Pallavicini F., Bugatti S., Montecucco C., Long term treatment of rheumatoid arthritis with rituximab, *Autoimmun Rev* 8 (2009) 591-594.

Carmona L., Cross M., Williams B., Lassere M., March L., Rheumatoid arthritis, *Best Pract Res Clin Rheumatol* 24 (2010) 733-745.

Castaneda S., Roman-Blas J.A., Largo R., Herrero-Beaumont G., Subchondral bone as a key target for osteoarthritis treatment, *Biochemical Pharmacology* 83 (2012) 315-323.

CBIP : Répertoire Commenté des Médicaments 2013, Centre Belge d'Information Pharmacothérapeutique.

Chaisri W., Hennink W.E., Okonogi S., Preparation and characterization of cephalexin loaded PLGA microspheres, *Curr Drug Deliv* 6 (2009) 69-75.

Chakraborti S., Mandal M., Das S., Mandal A., Chakraborti T., Regulation of matrix metalloproteinases: an overview, *Mol Cell Biochem* 253 (2003) 269-285.

- Charlier A.**, Leclerc B., Couarraze G., Release of mifepristone from biodegradable matrices : experimental and theoretical evaluations, *Int J Pharm* 200 (2000) 115-120.
- Chevalier X.**, La thérapie cellulaire des lésions du cartilage : mise au point et applicabilité à l'arthrose, *Rev Rhum* 67 (2000) 688-95.
- Chevalier X.**, Richette P., Normal joint cartilage: anatomy, physiology, metabolism, ageing, *EMC – Rhumatologie Orthopédie* 2 (2005) 41-58.
- Chevalier X.**, Progrès dans l'arthrose, *Rev Rhum Ed Fr* 74 (2007) 59-64.
- Cody V.**, DeTitta G.T., The molecular conformation of clonidine hydrochloride, an α -adrenergic agonist, *Journal of Crystal and Molecular Structure* 9 (1979) 33-43.
- Combe B.**, Progression in early rheumatoid arthritis, *Best Pract Res Clin Rheumatol* 23 (2009) 59-69.
- Cortes P.**, Montserrat S., Physical aging of amorphous linear polyesters, *J Non Cryst Solids* 172-174 (1994) 622-627.
- Courtney P.**, Doherty M., Joint aspiration and injection and synovial fluid analysis, *Best Pract Res Clin Rheumatol* 23 (2009) 161-192.
- Crema M.D.**, Roemer F.W., Marra M.D., Burstein D., Gold G.E., Eckstein F., Baum T., Mosher T.J., Carrino J.A., Guermazi A., Articular cartilage in the knee : current MR imaging techniques and applications in clinical practice and research, *Radiographics* 31 (2011) 37-62.
- Croisier F.**, Jérôme C., Chitosan-based biomaterials for tissue engineering, *Eur Polym J* 49 (2013) 780-792.
- Cunningham F.E.**, Baughman V.L., Peters J., Laurito C.E., Comparative pharmacokinetics of oral *versus* sublingual clonidine, *J Clin Anesth* 6 (1994) 430-433.
- Darzynkiewicz Z.**, Juan G., Li X., Gorczyca W., Murakami T., Traganos F., Cytometry in Cell Necrobiology: Analysis of Apoptosis and Accidental Cell Death (Necrosis), *Cytometry* 27 (1997) 1-20.
- Dash M.**, Chiellini F., Ottenbrite R.M., Chiellini E., Chitosan – a versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications, *Prog Polym Sci* 36 (2011) 981-1014.
- de Goede A.L.**, Boedhram R.R., Eckhardt M., Hanff L.M., Koch B.C.P., Vermaat C.H., Vermes A., Development and validation of a paediatric oral formulation of clonidine hydrochloride, *Int J Pharm* 433 (2012) 119-120.

de Jong S.J., Arias E.R., Rijkers D.T.S., van Nostrum C.F., Kettenes-van den Bosch J.J., Hennink W.E., New insights into the hydrolytic degradation of poly(lactic acid): participation of the alcohol terminus, *Polymer* 42 (2001) 2795-2802.

Ding A.G., Schwendeman S.P., Determination of water-soluble acid distribution in poly(lactide-co-glycolide), *J Pharm Sci* 93 (2004) 322-331.

Dorati R., Genta I., Colonna C., Modena T., Pavanetto F., Perugini P., Conti B., Investigation of the degradation behaviour of poly(ethylene glycol-co-D,L-lactide) copolymer, *Polym Degrad Stab* 92 (2007) 1660-1668.

Dragoo J.L., Danial C.M., Braun H.J., Pouliot M.A., Kim H.J., The chondrotoxicity of single-dose corticosteroids, *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 20 (2012) 1809-1814.

Dunne M., Corrigan O.I., Ramtoola Z., Influence of particle size and dissolution conditions on the degradation properties of polylactide-co-glycolide particles, *Biomaterials* 21 (2000) 1659-1668.

Einmahl S., Capancioni S., Schwach-Abdellaoui K., Moeller M., Behar-Cohen F., Gurny R., Therapeutic applications of viscous and injectable poly(ortho esters), *Adv Drug Deliv Rev* 53 (2001) 45-73.

Eisenach J.C., De Kock M., Klimscha W., Alpha₂-adrenergic agonists for regional anesthesia: A clinical review of clonidine (1984-1995), *Anesthesiology* 85 (1996) 655-674.

Evans M.F., The polymerase chain reaction and pathology practice, *Diagn Pathol* 15 (2009) 344-356.

Food and Drug Administration (FDA), Guideline for industry text on validation of analytical procedures Q2A (1995).

Food and Drug Administration (FDA), Guidance for Industry Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology Q2B (1996).

Faisant N., Siepmann J., Benoit J.P., PLGA-based microparticles : elucidation of mechanisms and a new, simple mathematical model quantifying drug release, *Eur J Pharm Sci* 15 (2002) 355-366.

Fanjul-Fernandez M., Folgueras A.R., Cabrera S., Lopez-Otin C., Matrix metalloproteinases : Evolution, gene regulation and functional analysis in mouse models, *Biochim Biophys Acta* 1803 (2010) 3-19.

Farkas B., Kvell K., Czömpöly T., Illés T., Bardos T., Increased chondrocyte death after steroid and local anesthetic combination, *Clin Orthop Relat Res* 468 (2010) 3112-3120.

- Faulkner K.**, Fridovich I., Luminol and lucigenin as detectors for $O_2^{\cdot-}$, *Free Radic Biol Med* 15 (1993) 447-451.
- Fitzgerald J.F.**, Corrigan O.I., Investigation of the mechanisms governing the release of levamisole from poly-lactide-co-glycolide delivery systems, *J Control Release* 42 (1996) 125-132.
- Fleige S.**, Pfaffl M.W., RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance, *Mol Aspects Med* 27 (2006) 126-139.
- Fonseca J.E.**, Santos M.J., Canhao H., Choy E., Interleukin-6 as a key player in systemic inflammation and joint destruction, *Autoimmun Rev* 8 (2009) 538-542.
- Fortier L.A.**, Barker J.U., Strauss E.J., McCarrel T.M., Cole B.J., The role of growth factors in cartilage repair, *Clin Orthop Relat Res* 469 (2011) 2706-2715.
- Frank T.**, Kohnen S., de la Rebière G., Deby-Dupont G., Deby C., Niesten A., Serteyn D., Activation of equine neutrophils by phorbol myristate acetate or N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine induces a different response in reactive oxygen species production and release of active myeloperoxidase, *Vet Immunol Immunopathol* 130 (2009) 243-250.
- Franks F.**, Freeze-drying of bioproducts: putting principles into practice, *Eur J Pharm Biopharm* 45 (1998) 221-229.
- Fredenberg S.**, Wahlgren M., Reslow M., Axelsson A., The mechanisms of drug release in poly(lactic-co-glycolic acid)-based drug delivery systems – A review, *Int J Pharm* 415 (2011) 34-52.
- Freitas S.**, Merkle H.P., Gander B., Microencapsulation by solvent extraction/evaporation: reviewing the state of the art of microsphere preparation process technology, *J Control Release* 102 (2005) 313-332.
- Friess W.**, Schlapp M., Sterilization of gentamicin containing collagen/PLGA microparticle composites, *Eur J Pharm Biopharm* 63 (2006) 176-187.
- Fu K.**, Pack D. W., Klibanov A. M., Langer R., Visual evidence of acidic environment within degrading Poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) microspheres, *Pharm Res* 17 (2000) 100-106.
- Gahan M.E.**, Miller F., Lewin S.R., Cherry C.L., Hoy J.F., Mijch A., Rosenfeldt F., Wesselingh S.L., Quantification of mitochondrial DNA in peripheral blood mononuclear cells and subcutaneous fat using real-time polymerase chain reaction, *J Clin Virol* 22 (2001) 241-247.

- Gaignaux A.**, Réeff J., Siepmann F., Siepmann J., De Vriese C., Goole J., Amighi K., Development and evaluation of sustained-release clonidine-loaded PLGA microparticles, *Int J Pharm* 437 (2012) 20-28.
- Gaissmaier C.**, Koh J.L., Weise K., Growth and differentiation factors for cartilage healing and repair, *Int J Care Injured* 3951 (2008) 588-596.
- Gerwin N.**, Hops C., Lucke A., Intraarticular drug delivery in osteoarthritis, *Adv Drug Deliv Rev* 58 (2006) 226– 242.
- Ghosh P.**, Cheras P.A., Vascular mechanisms in osteoarthritis, *Best Pract Res Clin Rheumatol* 15 (2001) 693-710.
- Ghosh P.**, Guidolin D., Potential mechanism of action of intra-articular hyaluronan therapy in osteoarthritis: are the effects molecular weight dependent?, *Semin Arthritis Rheum* 32 (2002) 10-37.
- Gigante A.**, Callegari L., The role of intra-articular hyaluronan (Sinovial®) in the treatment of osteoarthritis, *Rheumatol Int* 31 (2011) 427-444.
- Gil P.**, Moghadam T.T., Ranjbar B., Differential Scanning Calorimetry Techniques: Applications in Biology and Nanoscience, *J Biomol Tech* 21 (2010) 167-193.
- Giovannoni M.P.**, Ghelardini C., Vergelli C., Dal Piaz V., α 2-agonists as analgesic agents, *Med Res Rev* 29 (2009) 339-368.
- Giteau A.**, Venier-Julienne M.C., Aubert-Pouëssel A., Benoit J.P., How to achieve sustained and complete protein release from PLGA-based microparticles ? *Int J Pharm* 350 (2008) 14-26.
- Goldring M.B.**, Update on the biology of the chondrocyte and new approaches to treating cartilage diseases, *Best Pract Res Clin Rheumatol* 20 (2006) 1003-1025.
- Goldring M.B.**, Goldring S.R., Osteoarthritis, *J. Cell. Physiol.* 213 (2007) 626–634.
- Goldring M.B.**, Marcu K.B., Cartilage homeostasis in health and rheumatic diseases, *Arthritis Res Ther* 11 (2009) 1-16.
- Goldring S.R.**, Goldring M.B., Rheumatoid arthritis and other inflammatory joint pathologies, Chapter 51 in *Dynamics of Bone and Cartilage Metabolism* (2006) 843-869.
- Göpferich A.**, Mechanisms of polymer degradation and erosion, *Biomaterials* 17 (1996) 103-114.

- Göpferich A.**, Polymer bulk erosion, *Macromolecules* 30 (1997) 2598-2604.
- Gossec L., Dougados M.**, Do intra-articular therapies work and who will benefit most?, *Best Pract Res Clin Rheumatol* 20 (2006) 131-144.
- Gray E., Ferrell W.R.**, Acute joint inflammation alters the adrenoceptor profile of synovial blood vessels in the knee joints of rabbits, *Ann Rheum Dis* 51 (1992) 1129-1133.
- Grizzi I., Garreau H., Li S., Vert M.**, Hydrolytic degradation of devices based on poly(DL-lactic acid) size dependence, *Biomaterials* 16 (1995) 305-311.
- Gunatillake P.A., Adhikari R.**, Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering, *Eur Cell Mater* 5 (2003) 1-16.
- Gupta A.**, Update on intra-articular analgesia, *Tech Reg Anesth Pain Manag* 7 (2003) 155-160.
- Gupta A.P., Kumar V.**, New emerging trends in synthetic biodegradable polymers – Polylactide: A critique, *Eur Polym J* 43 (2007) 4053-4074.
- Guyenet P.G.**, Is the hypotensive effect of clonidine and related drugs due to imidazoline binding sites?, *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 273(1997) 1580-1584.
- Hacker M.C., Mikos A.G.**, Synthetic polymers, dans *Principles of Regenerative Medicine*, Academic Press, Londres 2011.
- Haglund L., Bernier S.M., Önnérjörd P., Recklies A.D.**, Proteomic analysis of the LPS-induced stress response in rat chondrocytes reveals induction of innate immune response components in articular cartilage, *Matrix Biology* 27 (2008) 107-118.
- Hammer S., Spika I., Sippl W., Jessen G., Kleuser B., Höltje H.-D., Schäfer-Korting M.**, Glucocorticoid receptor interactions with glucocorticoids: evaluation by molecular modeling and functional analysis of glucocorticoid receptor mutant, *Steroids* 68 (2003) 329-339.
- Hampel U., Sesselmann S., Iserovich P., Sel S., Paulsen F. Sack R.**, Chemokine and cytokine levels in osteoarthritis and rheumatoid arthritis synovial fluid, *J Immunol Methods* 396 (2013) 134-139.
- Hausberger A.G., Kenley R.A., DeLuca P.P.**, Gamma irradiation effects on molecular weight and *in vitro* degradation of poly(D,L-lactide-CO-glycolide) microparticles, *Pharm Res* 12 (1995) 851-856.

Hellemans J., Mortier G., De Paepe A., Speleman F., Vandesompele J., qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data, *Genome Biol* 8 (2007) 1-14.

Heller J., Controlled release of biologically active compounds from bioerodible polymers, *Biomaterials* 1 (1980) 51-57.

Heller J., Barr J., Ng S.Y., Abdellauoi K.S., Gurny R., Poly(ortho esters) : synthesis, characterization, properties and uses, *Adv Drug Deliv Rev* 54 (2002) 1015-1039.

Heller J., Barr J., Poly(ortho esters) – From concept to reality, *Biomacromolecules* 5 (2004) 1625-1632.

Heller J., Ocular delivery using poly(ortho esters), *Adv Drug Deliv Rev* 57 (2005) 2053-2062.

Hemdan N.Y.A., Birkenmeier G., Wichmann G., Key molecules in the differentiation and commitment program of T helper 17 (Th17) cells up-to-date, *Immunol Lett* 148 (2012) 97-109.

Hendren L., Beeson P., A review of the differences between normal and osteoarthritis articular cartilage in human knee and ankle joints, *Foot* 19 (2009) 171-176.

Hochberg M.C., Role of intra-articular hyaluronic acid preparations in medical management of osteoarthritis of the knee, *Semin Arthritis Rheum* 30 (2000) 2-10.

Hochberg M.C., Altman R.D., April K.T., Benkhalti M., Guyatt G., McGowan J., Towheed T., Welch V., Wells G., Tugwell P., American College of Rheumatology 2012 Recommendations for the Use of Nonpharmacologic and Pharmacologic Therapies in Osteoarthritis of the Hand, Hip, and Knee, *Arthritis Care Res* 64 (2012) 465-474.

Holland T.A., Mikos A.G., Advances in drug delivery for articular cartilage, *J Control Release* 86 (2003) 1-14.

Holmes M.W.A., Bayliss M.T., Muir H., Hyaluronic acid in human articular cartilage: Age-related changes in content and size, *Biochem J* 250 (1988) 435-441.

Hunter D.J., Osteoarthritis, *Best Pract Res Clin Rheumatol* 25 (2011) 801-814.

ICH Harmonised Tripartite Guideline, Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1), International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use (1996).

ICH Harmonised Tripartite Guideline, Impurities: Guideline for residual solvents Q3C(R5), International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use (2011).

Illum L., Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient, *Pharm Res* 15 (1998) 1326-1331.

Iqbal J., Wig J., Bhardwaj N., Dhillon M.S., Intra-articular clonidine vs. morphine for post-operative analgesia following arthroscopic knee surgery (a comparative evaluation), *Knee* 7 (2000) 109-113.

Isvy A., Meunier M., Gobeaux-Chenevier C., Maury E., Wipff J., Job-Deslandre C., Kahan A., Allanore Y., Safety of rituximab in rheumatoid arthritis: a long-term prospective single-center study of gammaglobulin concentrations and infections, *Joint Bone Spine* 79 (2012) 365-359.

Ito F., Fujimori H., Makino K., Incorporation of water-soluble drugs in PLGA microspheres, *Colloids Surf B Biointerfaces* 54 (2007) 173-178.

Iwakura Y., Roles of IL-1 in the development of rheumatoid arthritis: consideration from mouse models, *Cytokine Growth Factor Rev* 13 (2002) 341-355.

Jain D., Banerjee R., Comparison of ciprofloxacin hydrochloride-loaded protein, lipid, and chitosan nanoparticles for drug delivery, *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 86 (2008) 105-112.

Jain J.P., Modi S., Domb A.J., Kumar N., Role of Polyanhydrides as localized drug carriers, *J Control Release* 103 (2005) 541-563.

Jain R.A., The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices, *Biomaterials* 21 (2000) 2475-2490.

Janeway C.A., Travers P., Walport M., Shlomchik M.J., *Immunobiologie : le système immunitaire fondamental et pathologique*, Adaptation française de la 5^{ème} édition américaine, De Boeck, Paris 2003.

Jones G.C., Riley G.P., Buttle D.J., The role of proteases in pathologies of the synovial joint, *Int J Biochem Cell Biol* 40 (2008) 1199-1218.

Joseph A., Brasington R., Kahl L., Ranganathan P., Cheng T.P., Atkinson J., Immunologic rheumatic disorders, *J Allergy Clin Immunol* 125 (2010) 204-215.

Joshi W., Reuben S.S., Kilaru P.R., Sklar J., Maciolek H., Postoperative analgesia for outpatient arthroscopic knee surgery with intraarticular clonidine and/or morphine, *Anesth Analg* 90 (2000) 1102-1106.

Kaine J.L., Abatacept for the treatment of rheumatoid arthritis: a review, *Current Therapeutic Research* 68 (2007) 379-399.

Kamibayashi T., Clinical uses of α_2 -adrenergic agonists, *Anesthesiology* 93 (2000) 1345-1349.

Kapoor M., Martel-Pelletier J., Lajeunesse D., Pelletier J.-P., Fahmi H., Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis, *Nat Rev Rheumatol* 7 (2011) 33-42.

Karsdal M.A., Leeming D.J., Dam E.B., Henriksen K., Alexandersen P., Pastoureau P., Altman R.D., Christiansen C., Should subchondral bone turnover be targeted when treating osteoarthritis?, *Osteoarthritis Cartilage* 16 (2008) 638-646.

Katti D.S., Lakshmi S., Langer R., Laurencin C.T., Toxicity, biodegradation and elimination of polyanhydrides, *Adv Drug Deliv Rev* 54 (2002) 933-961.

Kenley R.A., Lee M.O., Mahoney T.R., Sanders L.M., Poly(lactide-co-glycolide) decomposition kinetics in vivo and in vitro, *Macromolecules* 20 (1987) 2398-2403.

Khan Z.P., Ferguson C. N., Jones R. M., Alpha-2 and imidazoline receptor agonists : their pharmacology and therapeutic role, *Anaesthesia* 54 (1999) 146-165.

Khurana R., Berney S.M., Clinical aspects of rheumatoid arthritis, *Pathophysiology* 12 (2005) 153-165.

Kim H.K., Park T.G., Comparative study on sustained release of human growth hormone from semi-crystalline poly(L-lactic acid) and amorphous poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) microspheres: morphological effect on protein release, *J Control Release* 98 (2004) 115-125.

Kim H.J., Kirsch T., Collagen/annexin V interactions regulate chondrocyte mineralization, *J Biol Chem.* 283 (2008) 10310-10317.

Kirwan J.R., Rankin E., Intra-articular therapy in osteoarthritis, *Baillière's Clinical Rheumatology* 11 (1997) 769-794.

Klose D., Siepmann F., Elkharraz K., Krenzlin S., Siepmann J., How porosity and size affect the drug release mechanisms from PLGA-based microparticles, *Int J Pharm* 314 (2006) 198-206.

- Klose D.**, Siepmann F., Willart J.F., Descamps M., Siepmann J., Drug release from PLGA-based microparticles: Effects of the "microparticles:bulk fluid" ratio, *Int J Pharm* 383 (2010) 123-131.
- Ko J.Y.**, Choi Y.J., Jeong G.J., Im G.I., Sulfuraphane-PLGA microspheres for the intra-articular treatment of osteoarthritis, *Biomaterials* 34 (2013) 5359-368.
- Kogan G.**, Soltés L., Stern R., Gemeiner P., Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications, *Biotechnol Lett* 29 (2007) 17-25.
- Kolka J.A.**, Vreede A.P., Roessler B.J., Lipopolysaccharide recognition protein, MD-2, facilitates cellular uptake of E. coli-derived plasmid DNA in synovium, *J Gene Med* 7 (2005) 956-964.
- Kraus V.B.**, Burnett B., Coindreau J., Cottrell S., Eyre D., Gendreau M., Gardiner J., Garnero P., Hardin J., Henrotin Y., Heinegård D., Ko A., Lohmander L.S., Matthews G., Menetski J., Moskowitz R., Persiani S., Poole A.R., Rousseau J.-C., Todman M., OARSI FDA Osteoarthritis Biomarkers Working Group, Application of biomarkers in the development of drugs intended for the treatment of osteoarthritis, *Osteoarthritis Cartilage* 19 (2011) 515-542.
- Kumar N.**, Langer R.S., Domb A.J., Polyamides : an overview, *Adv Drug Deliv Rev* 54 (2002) 889-910.
- Kwan Tat S.**, Lajeunesse D., Pelletier J.-P., Martel-Pelletier J., Targeting subchondral bone for treating osteoarthritis: what is the evidence?, *Best Pract Res Clin Rheumatol* 24 (2010) 51-70.
- Lafeber F.P.J.G.**, van Spil W.E., Osteoarthritis year 2013 in review: biomarkers; reflecting before moving forward, one step at a time, *Osteoarthritis Cartilage* 21 (2013) 1452-1464.
- Lao L.L.**, Peppas N.A., Boey F.Y.C., Venkatraman S.S., Modeling of drug release from bulk-degrading polymers, *Int J Pharm* 418 (2011) 28-41.
- Lassalle V.**, Ferreira M.L., PLA Nano- and microparticles for drug delivery: an overview of the methods of preparation, *Macromol Biosci* 7 (2007) 767-783.
- Lavhale M.S.**, Briyal S., Parikh N., Gulati A., Endothelin modulates the cardiovascular effects of clonidine in the rat, *Pharmacol Res* 62 (2010) 489-499.
- Le Goff B.**, Berthelot J.-M., Maugars Y., Heymann D., Osteoclasts in RA: diverse origins and functions, *Joint Bone Spine* (2013) doi:10.1016/j.jbspin.2013.04.002.
- Lee D.M.**, Weinblatt M.E., Rheumatoid arthritis, *Lancet* 358 (2001) 903-911.

Lee A., Ellman M.B., Yan D., Kroin J.S., Cole B.J., van Wijnen A.J., Im H.-J., A current review of molecular mechanisms regarding osteoarthritis and pain, *Gene* (2013) doi: 10.1016/j.gene.2013.05.069.

Leng S.X., McElhaney J.E., Walston J.D., Xie D., Fedarko N.S., Kuchel G.A., Elisa and multiplex technologies for cytokine measurement in inflammation and aging research, *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 63 (2008) 879-884.

Li S.M., Garreau H., Vert M., Structure-property relationships in the case of the degradation of massive aliphatic poly-(α -hydroxy acids) in aqueous media, *Part 1 : Poly(DL-lactic acid)*, *J Mater Sci Mater Med* 1 (1990) (a) 123-130.

Li S.M., Garreau H., Vert M., Structure-property relationships in the case of the degradation of massive aliphatic poly-(α -hydroxy acids) in aqueous media, *Part 2 : Degradation of lactide-glycolide polymers:PLA37.5GA25 and PLA75GA25*, *J Mater Sci Mater Med* 1 (1990) (b) 131-139.

Li S.M., Garreau H., Vert M., Structure-property relationships in the case of the degradation of massive aliphatic poly-(α -hydroxy acids) in aqueous media, *Part 3 : Influence of the morphology of poly(L-lactic-acid)*, *J Mater Sci Mater Med* 1 (1990) (c) 198-206.

Li S., Girod-Holland S., Vert M., Hydrolytic degradation of poly(DL-lactic acid) in the presence of caffeine base, *J Control Release* 40 (1996) 41-53.

Li S., Hydrolytic degradation characteristics of aliphatic polyesters derived from lactic and glycolic acids, *J Biomed Mater Res* 48 (1999) 342-353.

Li L., Schwendeman S.P., Mapping neutral microclimate pH in PLGA microspheres, *J Control Release* 101 (2005) 163-173.

Liang L.S. Wong W., Burt H.M., Pharmacokinetic study of methotrexate following intra-articular injection of methotrexate loaded poly(L-lactic acid) microspheres in rabbits, *J Pharm Sci*, 94 (2005) 1204-1215.

Liu L., Liu Y., Li J., Du G., Chen J., Microbial production of hyaluronic acid: current state, challenges, and perspectives, *Microb Cell Fact* 10 (2011) 1-9.

Liu Y., Ghassemi A.H., Hennink W.E., Schwendeman S.P., The microclimate pH in poly(D,L-lactide-co-hydroxymethyl glycolide) microspheres during biodegradation, *Biomaterials* 33 (2012) 7584-7593.

Longo D.L., Fauci A.S., Kasper D.L., Hauser S.L., Jameson J.L., Loscalzo J., *Harrison Principles de médecine interne*, 18^{ème} édition, Lavoisier, Paris, 2013.

- Lopez-Quiroga E.**, Antelo L.T., Alonso A.A., Time-scale modeling and optimal control of freeze-drying, *J Food Eng* 111 (2012) 655-666.
- Lorenz H.**, Richter W., Osteoarthritis: Cellular and molecular changes in degenerating cartilage, *Prog Histochem Cytochem* 40 (2006) 135-163.
- Lotz M.**, Hashimoto S., Kühn K., Mechanisms of chondrocytes apoptosis, *Osteoarthritis Cartilage* 7 (1999) 389-391.
- Madry H.**, Grün U.W., Knutsen G., Cartilage repair and joint preservation: Medical and surgical treatment options, *Dtsch Arztebl Int* 108 (2011) 669-677.
- Mainardes R.M.**, Evangelista R.C., PLGA nanoparticles containing praziquantel: effect of formulation variables on size distribution, *Int J Pharm* 290 (2005) 137-144.
- Malekzadeh A.**, de Groot V., Beckerman H., van Oosten B.W., Blankenstein M.A., Teunissen C., Challenges in multi-plex and mono-plex platforms for the discovery of inflammatory profiles in neurodegenerative diseases, *Methods* 56 (2012) 508-513.
- Mao S.**, Xu J., Cai C., Germershaus O., Schaper A., Kissel T., Effect of WOW process parameters on morphology and burst release of FITC-dextran loaded PLGA microspheres, *Int J Pharm* 334 (2007) 137-148.
- Marieb E.N.**, *Anatomie et physiologie humaines*, Adaptation de la 6ème édition américaine, Pearson Education, Paris, 2005.
- Martel-Pelletier J.**, Alaaeddine N., Pelletier J.-P., Cytokines and their role in the pathophysiology of osteoarthritis, *Front Biosci* 4 (1999) 694-703.
- Martel-Pelletier J.**, Boileau C., Pelletier J.-P., Roughley P.J., Cartilage in normal and osteoarthritis conditions, *Best Pract Res Clin Rheumatol* 22 (2008) 351-384.
- Martinez-Sancho C.**, Herrero-Vanrell R., Negro S., Study of gamma-irradiation effects on acyclovir poly(D,L-lactic-co-glycolic) acid microspheres for intravitreal administration, *J Control Release* 99 (2004) 41-52.
- Matsumoto A.**, Matsukawa Y., Suzuki T., Yoshino H., Drug release characteristics of multi-reservoir type microspheres with poly(dl-lactide-co-glycolide) and poly(dl-lactide), *J Control Release* 106 (2005) 172-180.
- McAleer J.P.**, Vella A.T., Understanding how lipopolysaccharide impacts CD4 T cell immunity, *Crit Rev Immunol* 28 (2008) 281-299.

- McDonald** D.R., T_H17 deficiency in human disease, *J Allergy Clin Immunol* 129 (2012) 1429-1435.
- McInnes** I.B., Schett G., The pathogenesis of rheumatoid arthritis, *New England Journal Medicine* 365 (2011) 2205-2219.
- Mendes** M.E., Baggio-Zappia G.L., Brunialti M.L.C., da Luz Fernandes M., Rapozo M.M., Salomao R., Differential expression of toll-like receptor signaling cascades in LPS-tolerant human peripheral blood mononuclear cells, *Immunobiology* 216 (2011) 285-295.
- Middleton** J.C., Titpon A.J., Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices, *Biomaterials* 21 (2000) 2335-2346.
- Mitragotri** S., Lahann J., Materials for drug delivery: innovative solutions to address complex biological hurdles, *Adv Mater* 24 (2012) 3717-3723.
- Momberger** T.S., Levick J.R., Mason R.M., Hyaluronan secretion by synoviocytes is mechanosensitive, *Matrix Biology* 24 (2005) 510 - 519.
- Montanari** I., Cilurzo F., Valvob L., Faucitanoc A., Buttafavac A., Groppod A., Genta I., Conti B., Gamma irradiation effects on stability of poly(lactide-co-glycolide) microspheres containing clonazepam, *J Control Release* 75 (2001) 317-330.
- Mor** A., Abramson S.B., Pillinger M.H., The fibroblast-like synovial cell in rheumatoid arthritis: a key player in inflammation and joint destruction, *Clin Immunol* 115 (2005) 118-128.
- Mueller** M.B., Tuan R.S., Anabolic/catabolic balance in pathogenesis of osteoarthritis: identifying molecular targets, *Arch Phys Med Rehabil* 3 (2011) 3-11.
- Mukaida** N., Harada A., Matsushima K., Interleukin-8 (IL-8) and monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1), chemokines essentially involved in inflammatory and immune reactions, *Cytokine Growth Factor Rev* 9 (1998) 9-23.
- Münzel** T., Afanas'ev I.B., Kleschyov A.L., Harrison D.G., Detection of Superoxide in Vascular Tissue, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22 (2002) 1761-1768.
- Murphy** G., Nagase H., Progress in matrix metalloproteinase research, *Mol Aspects Med* 29 (2008) 290-308.
- Murphy** G., Nagase H., Localising matrix metalloproteinase activities in the pericellular environment, *FEBS J* 278 (2011) 2-15.

Nair L.S., Laurencin C.T., Biodegradable polymers as biomaterials, *Prog Polym Sci* 32 (2007) 762-798.

Nakazawa F., Matsuno H., Yudoh K., Watanabe Y., Katayama R., Kimura T., Corticosteroid treatment induces chondrocyte apoptosis in an experimental arthritis model and in chondrocyte cultures, *Clin Exp Rheumatol* 20 (2002) 773-781.

Nampoothiri K.M., Nair N.R., John R.J., An overview of the recent developments in polylactide (PLA) research, *Bioresour Technol* 101 (2010) 8493-8501.

Nesic D., Whiteside R., Brittberg M., Wendt D., Martin I., Mainil-Varlet P., Cartilage tissue engineering for degenerative joint disease, *Adv Drug Deliv Rev* 58 (2006) 300-322.

Newman A.P., Articular cartilage repair, *Am J Sports Med* 26 (1998) 309-324.

Nieto J.C., Canto E., Zamora C., Ortiz M.A., Juarez C., Vidal S., Selective loss of chemokine receptor expression on leukocytes after cell isolation, *PlosOne* 7 (2012) 1-8.

Nogid A., Pham D.Q., Role of abatacept in the management of rheumatoid arthritis, *Clinical Therapeutics* 28 (2006) 1764-1778.

Nordstierna L., Abdalla A.A., Nordin M., Nydén M., Comparison of release behaviour from microcapsules and microspheres, *Progress in Organic Coatings* 69 (2010) 49-51.

Nozawa-Inoue K., Synovial lining cells in the temporomandibular joint, *J Oral Biosci* 48 (2006) 198-209.

O'Donnell P.B., McGinity J.W., Preparation of microspheres by the solvent evaporation technique, *Adv Drug Deliv Rev* 28 (1997) 25-42.

Pal R., Rheology of simple and multiple emulsions, *Curr Opin Colloid Interface Sci* 16 (2011) 41-60.

Panyam J., Dali M.M., Sahoo S.K., Ma W., Chakravarthi S.S., Amidon G.L., Levy R.J., Labhasetwar V., Polymer degradation and in vitro release of a model of protein from poly(D,L-lactide-co-glycolide) nano- and microparticles, *J Control Release* 92 (2003) 173-187.

Pang X., Zhuang X., Tang Z., Chen X., Polylactic acid (PLA) : research, development and industrialization, *Biotechnol J* 5 (2010) 1125-1136.

Paquet J., Goebel J.-C., Delaunay C., Pinzano A., Grossin L., Cournil-Henrionnet C., Gillet P., Netter P., Jouzeau J.-Y., Moulin D., Cytokines profiling by multiplex analysis in

experimental arthritis: which pathophysiological relevance for articular versus systemic mediators?, *Arthritis Res Ther* 14 (2012) 1-15.

Pardo A., Selman M., MMP-1 : the elder of the family, *Int J Biochem Cell Biol* 37 (2005) 283-288.

Park T.G., Degradation of poly(d,l-lactic acid) microspheres: effect of molecular weight, *J Control Release* 30 (1994) 161-173.

Park J.H., Ye M., Park K., Biodegradable polymers for microencapsulation of drugs, *Molecules* 10 (2005) 146-161.

Peri F., Piazza M., Therapeutic targeting of innate immunity with Toll-like receptor 4 (TLR4) antagonists, *Biotechnology Advances* 30 (2012) 251-260.

Perlemuter L., Perlemuter G., *Guide de thérapeutique*, 6^{ème} édition, Elsevier Masson, Paris, 2010.

Pertoft H., Fractionation of cells and subcellular particles with Percoll, *J. Biochem. Biophys. Methods* 44 (2000) 1-30.

Pertovaara A., Noradrenergic pain modulation, *Prog Neurobiol* 80 (2006) 53-83.

Peters M.J.L., Symmons D.P.M., McCarey D., Dijkmans B.A.C., Nicola P., Kvien T.K., McInnes I.B., Haentzschel H., Gonzalez-Gay M.A., Provan S., Semb A., Sidiropoulos P., Kitas G., Smulders Y.M., Soubrier M., Szekanecz Z., Sattar N., Nurmohamed M.T., EULAR evidence-based recommendations for cardiovascular risk management in patients with rheumatoid arthritis and other forms of inflammatory arthritis, *Ann Rheum Dis* 69 (2010) 325-331.

Pharmacopée Européenne 7^{ème} édition (2012).

Plaas A., Velasco J., Gorski D.J., Li J., Cole A., Christopherson K., Sandy J.D., The relationship between fibrogenic TGF β 1 signaling in the joint and cartilage degradation in post-injury osteoarthritis, *Osteoarthritis Cartilage* 19 (2011) 1081-1090.

Puppi D., Chiellini F., Piras A.M., Chiellini E., Polymeric materials for bone and cartilage repair, *Prog Polym Sci* 35 (2010) 403-440.

Ralphs J.R., Benjamin M., The joint capsule: structure, composition, ageing and disease, *J Anat* 184 (1994) 503-509.

Riccardi C., Nicoletti I., Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry, *Nat Protoc* 1 (2006) 1458-1461.

- Rögner M.**, Size exclusion chromatography, *Journal of chromatography library* 61 (1999) 89-145.
- Rost M.**, Karge E., Klinger W., What do we measure with luminol-, lucigenin- and penicillin-amplified chemiluminescence? Investigations with hydrogen peroxide and sodium hypochlorite, *J Biolumin Chemilumin* 13 (1998) 355-363.
- Rouessac F.**, Rouessac A., *Analyse Chimique : Méthodes et techniques instrumentales modernes*, 6^{ème} édition, Dunod, Paris, 2004.
- Rouse J.J.**, Mohamed F., Van der Walle C.F., Physical ageing and thermal analysis of PLGA microspheres encapsulating protein or DNA, *Int J Pharm* 339 (2007) 112-120.
- Sackett C.K.**, Narasimhan B., Mathematical modeling of polymer erosion : consequences for drug delivery, *Int J Pharm* 418 (2010) 104-114.
- Salter D.M.**, Cartilage, *Curr Orthop* 12 (1998) 251-257.
- Samadi N.**, Abbadessa A., Di Stefano A., van Nostrum C.F., Vermonden T., Rahimian S., Teunissen E.A., van Steenberg M.J., Amidi M., Hennink W.E., The effect of lauryl capping group on protein release and degradation of poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) particles, *J Control Release* (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.05.034>.
- Sarzi-Puttini P.**, Cimmino M.A., Scarpa R., Caporali R., Parazzini F., Zaninelli A., Atzeni F., Canesi B., Osteoarthritis: an overview of the disease and its treatment strategies, *Semin Arthritis Rheum* 35 (2005) 1-10.
- Schliecker G.**, Schmidt C., Fuchs S., Ehinger A., Sandow J., Kissel T., In vitro and in vivo correlation of busserelin release from biodegradable implants using statistical moment analysis, *J Control Release* 94 (2004) 25-37.
- Schorderet M.** et collaborateurs, *Pharmacologie, Des concepts fondamentaux aux applications thérapeutiques*, 3^{ème} édition, Éditions Frison-Roche Slatkine, Genève, 1998.
- Schulze-Tanzil G.**, Activation and dedifferentiation of chondrocytes: Implications in cartilage injury and repair, *Ann Anat* 191 (2009) 325-338.
- Schulze-Tanzil G.**, Zreiqat H., Sabat R., Kohl B., Halder A., Müllr R.D., John T., Interleukin-10 and articular cartilage: experimental therapeutical approaches in cartilage disorders, *Curr Gene Ther* 9 (2009) 306-315.
- Scott D.L.**, Wolfe F., Huizinga T.W., Rheumatoid arthritis, *Lancet* 376 (2010) 1094-1108.

Seymour H.E., Worsley A., Smith J.M., Thomas S.H.L., Anti-TNF agents for rheumatoid arthritis, *J Clin Pharmacol* 51 (2000) 201-208.

Shahabpour M., Demeyere N., Demaeseneer M., David P., Deridder F., Stadnik T., Anatomie normale du genou en imagerie par résonance magnétique, *EMC-Radiologie 2* (2005) 165-182.

Shenderova A., Burke T.G., Schwendeman S.P., The acidic microclimate in poly(lactide-co-glycolide) microspheres stabilizes camptothecins, *Pharm Res* 16 (1999) 241-248.

Shiozawa S., Tsumiyama K., Yoshida K., Hashiramoto A., Pathogenesis of joint destruction in rheumatoid arthritis, *Arch Immunol Ther Exp* 59 (2011) 89-95.

Siepmann J., Göpferich A., Mathematical modeling of bioerodible, polymeric drug delivery systems, *Adv Drug Deliv Rev* 48 (2001) 229-247.

Siepmann J., Elkharraz K., Siepmann F., Klose D., How autocatalysis accelerates drug release from PLGA-based microparticles: a quantitative treatment, *Biomacromolecules* 6 (2005) 2312-2319.

Siepmann J., Siepmann F., Mathematical modeling of drug delivery, *Int J Pharm* 364 (2008) 328-343.

Siepmann J., Peppas N.A., Higuchi equation: derivation, applications, use and misuse, *Int J Pharm* 418 (2011) 6-12.

Siepmann J., Siepmann F., Modeling of diffusion controlled drug delivery, *J Control Release* 161 (2012) 351-362.

Sinha V.R., Bansal K., Kaushik R., Kumria R., Trehan A., Poly- ϵ -caprolactone microspheres and nanosphères : an overview, *Int J Pharm* 278 (2004) 1-23.

Site Internet American College of Rheumatology (ACR) : <http://www.rheumatology.org/>.

Site Internet BD Biosciences : <http://www.bdbiosciences.com/eu/resources/apoptosis/>, Documentation sur l'apoptose et ses mesures, Consulté en mars 2013.

Site Internet CBIP : <http://www.cbip.be/Folia/index.cfm?FoliaWelk=F28F09B&keyword=antitnf>, *Folia Pharmacotherapeutica* Septembre 2001 : « Nouveautés dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde », Consulté en Juin 2012.

Site Internet The European League Against Rheumatism (EULAR) : <http://www.eular.org/>.

Site Internet Food and Drug Administration (FDA) : <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/iig/index.cfm>, Inactive Ingredient Search for Approved Drug Products Database, Consulté en août 2012.

Site Internet Imlab : <http://www.imlab.com/ika/fhomog.htm>, Principe de l'Ultra-Turrax, Consulté en Juin 2012.

Site Internet Jeol : <http://www.jeol.com/Default.aspx?tabid=36>, Document « Scanning electron microscopy A to Z, Basic knowledge for using the SEM », Consulté en août 2012.

Site Internet Malvern Instruments : <http://www.malverninstruments.fr/malvern/kbase.nsf/allbyno/KB000021>, Document « Basic principles of particle size analysis », Rawle A., Consulté en août 2012.

Site Internet National Institute for Health and Care Excellence (NICE) : <http://www.nice.org.uk/>, Consulté en septembre 2013.

Site Internet Osteoarthritis Research Society International (OARSI) : <http://www.oarsi.org/>, Consulté en août 2012.

Site Internet Waters : http://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=10167568&locale=fr_BE, Consulté en août 2012.

Skoog D., West D.M., Holler F.J., *Chimie analytique*, Traduction et révision scientifique de la 7^{ème} édition américaine, de Boeck, Bruxelles, **2002**.

Slim H.B., Black H.R., Thompson P.D., Older Blood Pressure Medications—Do They Still Have a Place?, *Am J Cardiol* 108 (2011) 308-316.

Smolen J.S., Landewé R., Breedveld F.C., Dougados M., Emery P., Gaujoux-Viala C., Gorter S., Knevel R., Nam J., Schoels M., Aletaha D., Buch M., Gossec L., Huizinga T., Bijlsma J.W., Burmester G., Combe B., Cutolo M., Gabay C., Gomez-Reino J., Kouloumas M., Kvien T.K., Martin-Mola E., McInnes I, Pavelka K., van Riel P., Scholte M., Scott D.L., Sokka T., Valesini G., van Vollenhoven R., Winthrop K.L., Wong J., Zink A., van der Heijde D., EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs, *Ann Rheum Dis* (2010) 1-12.

Spies C.M., Bijlsma J.W.J., Burmester G.-R., Buttgerit F., Pharmacology of glucocorticoids in rheumatoid arthritis, *Curr Opin Pharmacol* 10 (2010) 302-307.

Stein C., Clark J.D., Oh U., Vasko M.R., Wilcox G.L., Overland A.C., Vanderah T.W., Spencer R.H., Peripheral mechanisms of pain and analgesia, *Brain Res Rev* 60 (2009) 90-113.

Stern R., Asari A.A., Sugahara K.N., Hyaluronan fragments: an information-rich system, *Eur J Cell Biol* 85 (2006) 699-715.

Su Z., Sun F., Shi Y., Jiang C., Meng Q., Teng L., Li Y., Effects of formulation parameters on encapsulation efficiency and release behavior of risperidone poly(D,L-lactide-co-glycolide) microsphere, *Chem Pharm Bull* 57 (2009) 1251-1256.

Sun L., Zhou S., Wang W., Li X., Wang J., Weng J., Preparation and characterization of porous biodegradable microspheres used for controlled protein delivery, *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp* 345 (2009) 173-181.

Sutton S., Clutterbuck A., Harris P., Gent T., Freeman S., Foster N., Barrett-Jolley R., Mobasher A., The contribution of the synovium, synovial derived inflammatory cytokines and neuropeptides to the pathogenesis of osteoarthritis, *Vet J* 179 (2009) 10-24.

Sweeney S.E., Firestein G.S., Rheumatoid arthritis: regulation of synovial inflammation, *Int J Biochem Cell Biol* 36 (2004) 372-378.

Symmons D. P., Epidemiology of rheumatoid arthritis: determinants of onset, persistence and outcome, *Best Pract Res Clin Rheumatol* 16 (2002) 707-722.

Symmons D., Mathers C., Pflieger B., Global burden of osteoarthritis in the year 2000 (2006, a) Site Internet OMS, <http://www.who.int/en/>, consulté en avril 2013.

Symmons D., Mathers C., Pflieger B., Global burden of rheumatoid arthritis in the year 2000 (2006, b) Site Internet OMS, <http://www.who.int/en/>, consulté en octobre 2013.

Talke P., Pharmacodynamics of alpha₂-adrenoceptor agonists, *Baillière's Clinical Rheumatology* 14 (2000) 271-283.

Tamber H., Johansen P., Merkle H.P., Gander B., Formulation aspects of biodegradable polymeric microspheres for antigen delivery, *Adv Drug Deliv Rev* 57 (2005) 357-376.

Thakkar H., Sharma R.K., Mishra A.K., Chuttani K., Murthy R.S.R., Efficacy of chitosan microspheres for controlled intra-articular delivery of celecoxib in inflamed joints, *J Pharm Pharmacol* 56 (2004) 1091-1099.

Tian H., Tang Z., Zhuang X., Chen X., Jing X., Biodegradable synthetic polymers: Preparation, functionalization and biomedical application, *Prog Polym Sci* 37 (2012) 237-280.

Tobon G.J., Youinou P., Saraux A., The environment, geo-epidemiology, and autoimmune disease: rheumatoid arthritis, *J Autoimmun* 35 (2010) 10-14.

Tracy M.A., Ward K.L., Firouzabadian L., Wang Y., Dong N., Qian R., Zhang Y., Factors affecting the degradation rate of poly(lactide-co-glycolide) microspheres *in vivo* and *in vitro*, *Biomaterials* 20 (1999) 1057-1062.

United States Pharmacopeia (USP), 21^{ème} édition.

Vandesompele J., De Preter K., Pattyn F., Poppe B., Van Roy N., De Paepe A., Speleman F., Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes, *Genome Biol* 7 (2002) 1-12.

Vasir J.K., Tambwekar K., Garg S., Bioadhesive microspheres as a controlled drug delivery system, *Int J Pharm* 255 (2003) 13-32.

Versypt A.N.F., Pack D.W., Braatz R.D., Mathematical modeling of drug delivery from autocatalytically degradable PLGA microspheres — A review, *J Control Release* 165 (2012) 29-37.

Vey E., Rodger C., Booth J., Claybourn M., Miller A.F., Saiani A., Degradation kinetics of poly(lactic-co-glycolic) acid block copolymer cast films in phosphate buffer solution as revealed by infrared and Raman spectroscopies, *Polym Degrad Stab* 96 (2011) 1882-1889.

Vey E., Rodger C., Meehan L., Booth J., Claybourn M., Miller A.F., Saiani A., The impact of chemical composition on the degradation kinetics of poly(lactic-co-glycolic) acid copolymers cast films in phosphate buffer solutions, *Polym Degrad Stab* 97 (2012) 358-365.

Vilar G., Tulla-Puche J., Albericio F., Polymers and drug delivery systems, *Curr Drug Deliv* 9 (2012) 367-394.

Vincenti M.P., Brinckerhoff C.E., Transcriptional regulation of collagenase (MMP-1, MMP-13) genes in arthritis: integration of complex signaling pathways for recruitment of gene-specific transcription factors, *Arthritis Res* 4 (2002) 157-164.

Vladimorov Y.A., Proskurnina E.V., Izmailov D. Y., Chemiluminescence as a method for detection and study of free radicals in biological systems, *Bull Exp Biol Med* 144 (2007) 390-396.

Vladimorov Y.A., Proskurnina E.V., Free Radicals and Cell Chemiluminescence, *Biochemistry* 54 (2009) 1545-1566.

Volpi N., Schiller J., Stern R., Soltés L., Role, metabolism, chemical modifications and applications of hyaluronan, *Curr Med Chem* 16 (2009) 1718-1745.

(WO2009/101210) Pharmaceutical composition for use in the treatment or prevention of osteoarticular diseases (<http://www.wipo.int/>).

Walker R., Edwards C., *Clinical Pharmacy and Therapeutics*, 3^{ème} édition, Churchill Livingstone Elsevier Limited, Espagne, **2005**.

Wang X., Wang Y., Wei K., Zhao N., Zhang S., Chen J., Drug distribution within poly(ϵ -caprolactone) microspheres and in vitro release, *J Mater Process Technol* 209 (**2009**) 348-354.

Whiteside T.L., Cytokine assays, *Biotechniques* 33 (**2002**) 4-15.

Wiggins J.S., Hassan M.K., Mauritz K.A., Storey R.F., Hydrolytic degradation of poly(D,L-lactide) as a function of end group: carboxylic acid vs. hydroxyl, *Polymer* 47 (**2006**) 1960-1969.

Williams H.E., Huxley J., Claybourn M., Booth J., Hobbs M., Meehan E., Clark B., The effect of g-irradiation and polymer composition on the stability of PLG polymer and microspheres, *Polym Degrad Stab* 91 (**2006**) 2171-2181.

Wilson K., Walker J., *Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology*, 7^{ème} édition, Cambridge University Press, New-York, **2010**.

Wischke C., Schwendeman S.P., Principles of encapsulation hydrophobic drugs in PLA/PLGA microparticles, *Int J Pharm* 364 (**2008**) 298-327.

Witschi C., Doelker E., Residual solvents in pharmaceutical products-acceptable limits-influences on physicochemical properties-analytical methods and documented values, *Eur J Pharm Biopharm* 43 (**1997**) 215-242.

Witschi C., Doelker E., Influence of the microencapsulation method and peptide loading on poly(lactic acid) and poly(lactic-co-glycolic acid) degradation during in vitro testing, *J Control Release* 51 (**1998**) 327-341.

Yang Y.Y., Chung T.S., Bai X.L., Chan W.K., Effect of preparation conditions on morphology and release profiles of biodegradable polymeric microspheres containing protein fabricated by double-emulsion method, *Chem Eng Sci* 55 (**2000**) 2223-2236.

Yang Y.Y., Chung T.S., Ng N.P., Morphology, drug distribution, and in vitro release profiles of biodegradable polymeric microspheres containing protein fabricated by double-emulsion solvent extraction/evaporation method, *Biomaterials* 22 (**2001**) 231-241.

Yeo Y., Park K., Control of encapsulation efficiency and initial burst in polymeric microparticle systems, *Arch Pharm Res* 27 (**2004**) 1-12.

Zhang Y., Zale S., Sawyer L., Bernstein H., Effects of metal salts on poly(DL-lactide-co-glycolide) polymer hydrolysis, *J Biomed Mater Res* 34 (**1997**) 531-538.

Zhang W., Moskowitz R.W., Nuki G., Abramson S., Altman R.D., Arden N., Bierma-Zeinstra S., Brandt K.D., Croft P., Doherty M., Dougados M., Hochberg M., Hunter D.J., Kwoh K., Lohmander L.S., Tugwell P., OARSI recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis, Part II: OARSI evidence-based, expert consensus guidelines, *Osteoarthritis Cartilage* 16 (2008, a) 137-162.

Zhang L., Liu L., Qian Y., Chen Y., The effects of cryoprotectants on the freeze-drying of ibuprofen-loaded solid lipid microparticles (SLM), *Eur J Pharm Sci* 69 (2008, b) 750-759.

Zhang W., Doherty M., Peat G., Bierma-Zeinstra S.M.A., Arden N.K., Bresnihan B., Herrero-Beaumont G., Kirschner S., Leeb B.F., Lohmander L.S., Mazières B., Pavelka K., Punzi L., So A.K., Tuncer T., Watt I., Bijlsma J.W., EULAR evidence-based recommendations for the diagnosis of knee osteoarthritis, *Ann Rheum Dis* 69 (2010, a) 483-489.

Zhang W., Nuki G., Moskowitz R.W., Abramson S., Altman R.D., Arden N., Bierma-Zeinstra S., Brandt K.D., Croft P., Doherty M., Dougados M., Hochberg M., Hunter D.J., Kwoh K., Lohmander L.S., Tugwell P., OARSI recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis, Part III: changes in evidence following systematic cumulative update of research published through January 2009, *Osteoarthritis Cartilage* 1 (2010, b) 476-499.

Zitka O., Kukacka J., Krizkova S., Huska D., Adam V., Masarik M., Prusa R., Kizek R., Matrix metalloproteinases, *Curr Med Chem* 17 (2010), 3751-3768.

Zolnik B.S., Burgess D.J., Effect of acidic pH on PLGA microsphere degradation and release, *J Control Release* 122 (2007) 338-344.

Zolnik B.S., Burgess D.J., Evaluation of *in vitro* -*in vivo* release of dexamethasone from PLGA microspheres, *J Control Release* 127 (2008) 137-145.

H. Annexes

Annexe 1 : Validation de la méthode de dosage de la clonidine dans les microsphères de PLGA par HPLC.

Annexe 2 : Validation de la méthode de dosage de la bétaméthasone dans les microsphères de PLGA par HPLC.

Annexe 3 : Validation de la méthode de dosage de la clonidine dans les microsphères de PLGA par HPLC, utilisée lors des études de dissolution.

Annexe 4 : Gaignaux A., Réeff J., Siepmann F., Siepmann J., De Vriese C., Goole J., Amighi K., Development and evaluation of sustained-release clonidine-loaded PLGA microparticles, *Int J Pharm* 437 (2012) 20-28.

Annexe 5 : Gaignaux A., Réeff J., De Vriese C., Goole J., Amighi K., Evaluation of the degradation of clonidine-loaded PLGA microspheres, *J Microencapsulation* (2013) DOI: 10.3109/02652048.2013.778905.

Annexe 6 : Acceptation du dossier éthique par le Comité Éthique de l'Hôpital Erasme dans le cadre des prélèvements sanguins effectués afin d'isoler les PBMC.

Annexe 7 : Intégrité des ARN extraits déterminée par électrophorèse capillaire sur puce (Experion™).

Annexe 8 : Résultats des analyses FACS réalisées sur les chondrocytes, synoviocytes et PBMC. Ces analyses ont été effectuées sur la clonidine HCl brute, le dipropionate de bétaméthasone brut, les microparticules vides (F50), les microparticules chargées en clonidine (F47) et les microparticules chargées en bétaméthasone (F3B). Le paclitaxel a été utilisé comme contrôle positif de l'apoptose.

Annexe 9 : Réeff J., Gaignaux A., Goole J., De Vriese C., Amighi K., New sustained-release intraarticular gel formulations based on monolein for local treatment of arthritic diseases, *Drug Dev Ind Pharm* 39 (2012) 1731-1741.

Annexe 10 : Réeff J., Gaignaux A., Goole J., Siepmann J., Siepmann F., Jerome C., Thomassin J.M., De Vriese C., Amighi K., Characterization and optimization of GMO-based gels with long term release for intraarticular administration, *Int J Pharm* 451 (2013) 95-103.

Linéarité**Droite étalon 1**x = conc en clonidine HCl ($\mu\text{g/ml}$)y = aire sous la courbe en (μA)

Pesée Std

5,04

N	x ($\mu\text{g/ml}$)	y (μA)	x^2	y^2	xy
1	0,63	16,0511	0,4	257,6	10,1
2	2,52	72,3284	6,4	5231,4	182,3
3	5,04	147,186	25,4	21663,7	741,8
4	10,08	297,904	101,6	88746,8	3002,9
5	15,12	444,419	228,6	197508,2	6719,6
6	20,16	595,167	406,4	354223,8	11998,6

Somme	6	53,5	1573,1	768,8	667631,6	22655,2
Moyenne		8,9	262,2	128,1		

Sxx	290,9	Pente b	29,6205666	r	0,999991974
Syy	255214,3	Ordonnée a	-2,18266406	r²	0,999983948
Sxy	8616,0				
S²xy	1,024188405		S²r	1,0241884	
SE b	0,059338189		S²a	0,6218547	
			S²b	0,003521	

Test unilatéral sur la pente

F	29,621		
ddl num.	4	F(0,05;1;4) 7,71	Significatif
ddl dénom.	4		

→ Existence d'une pente

Test bilatéral sur r

t	499,182		
ddl	4	t(0,05;4) 2,776	Significatif

→ Existence d'une corrélation entre x et y

Test bilatéral de comparaison de l'ordonnée à l'origine avec 0

t	2,7678		
ddl	4	t(0,05;4) 2,776	Non-significatif

→ Ordonnée à l'origine différente de 0

Signification Symboles

N	Nombre d'observations
k	Nombre de groupes
Sxx	Ecart-type de la variable x
Syy	Ecart-type de la variable y
Sxy	Covariance des variables x et y
S ² xy	Variance de régression, Variance résiduelle
SE b	Erreur sur la pente
a	Ordonnée à l'origine de la droite de régression
b	Pente de la droite de régression
r	Coefficient de corrélation
r ²	Coefficient de détermination
S ² r	Variance du coefficient de corrélation
S ² a	Variance de l'ordonnée
S ² b	Variance de la pente
F	Test de Fisher
t	t de Student
ddl	Degrés de liberté

Droite étalon 2

x = conc en clonidine HCl ($\mu\text{g/ml}$)
 y = aire sous la courbe en (μA)

Pesée Std
5,04

N	x ($\mu\text{g/ml}$)	y (μA)	x^2	y^2	xy
1	0,63	16,09	0,4	258,9	10,1
2	2,52	72,8514	6,4	5307,3	183,6
3	5,04	145,882	25,4	21281,6	735,2
4	10,08	298,093	101,6	88859,4	3004,8
5	15,12	447,903	228,6	200617,1	6772,3
6	20,16	596,096	406,4	355330,4	12017,3

Somme	6	53,5	1576,9	768,8	671654,7	22723,3
Moyenne		8,9	262,8	128,1		

Sxx	290,8782736	Pente b	29,7361928	r	0,999991236
Syy	257211,0513	Ordonnée a	-2,57129179	r^2	0,999982472
Sxy	8649,612426				
S²xy	1,127128864		S²r	1,1271289	
SE b	0,062248823		S²a	0,8722117	
			S²b	0,0038749	

Test unilatéral sur la pente

F	29,736		
ddl num.	4	F(0,05;1;4) 7,71	Significatif
ddl dénom.	4		

→ Existence d'une pente

Test bilatéral sur r

t	477,699		
ddl	4	t(0,05;4) 2,776	Significatif

→ Existence d'une corrélation entre x et y

Test bilatéral de comparaison de l'ordonnée à l'origine avec 0

t	2,7532		
ddl	4	t(0,05;4) 2,776	Non-significatif

→ Ordonnée à l'origine différente de 0

Droite étalon 3

x = conc en clonidine HCl ($\mu\text{g/ml}$)
 y = aire sous la courbe en (μA)

Pesée Std
5,08

N	x ($\mu\text{g/ml}$)	y (μA)	x^2	y^2	xy
1	0,63	16,8503	0,4	283,9	10,7
2	2,54	73,2401	6,5	5364,1	186,0
3	5,08	146,796	25,8	21549,1	745,7
4	10,16	302,938	103,2	91771,4	3077,9
5	15,24	444,231	232,3	197341,2	6770,1
6	20,32	600,024	412,9	360028,8	12192,5

Somme	6	54,0	1584,1	781,0	676338,5	22982,9
Moyenne		9,0	264,0	130,2		

Sxx	295,5137109	Pente b	29,5519572	r	0,999916496
Syy	258120,6	Ordonnée a	-1,82624376	r²	0,999832999
Sxy	8733,008523				
S ² xy	10,77657969		S ² r	10,77658	
SE b	0,190964067		S ² a	6,543197	
			S ² b	0,0364673	

Test unilatéral sur la pente

F	29,552		
ddl num.	4	F(0,05;1;4) 7,71	Significatif
ddl dénom.	4		

→ Existence d'une pente

Test bilatéral sur r

t	154,751		
ddl	4	t(0,05;4) 2,776	Significatif

→ Existence d'une corrélation entre x et y

Test bilatéral de comparaison de l'ordonnée à l'origine avec 0

t	0,7139		
ddl	4	t(0,05;4) 2,776	Non-significatif

→ Ordonnée à l'origine différente de 0

Comparaison de la pente entre les droites

J1/J2		
t	1,344496433	Non-significatif
t (0,05;8)	2,306	
J1/J3		
t	0,343097481	Non-significatif
t (0,05;8)	2,306	
J2/J3		
t	0,917263137	Non-significatif
t (0,05;8)	2,306	

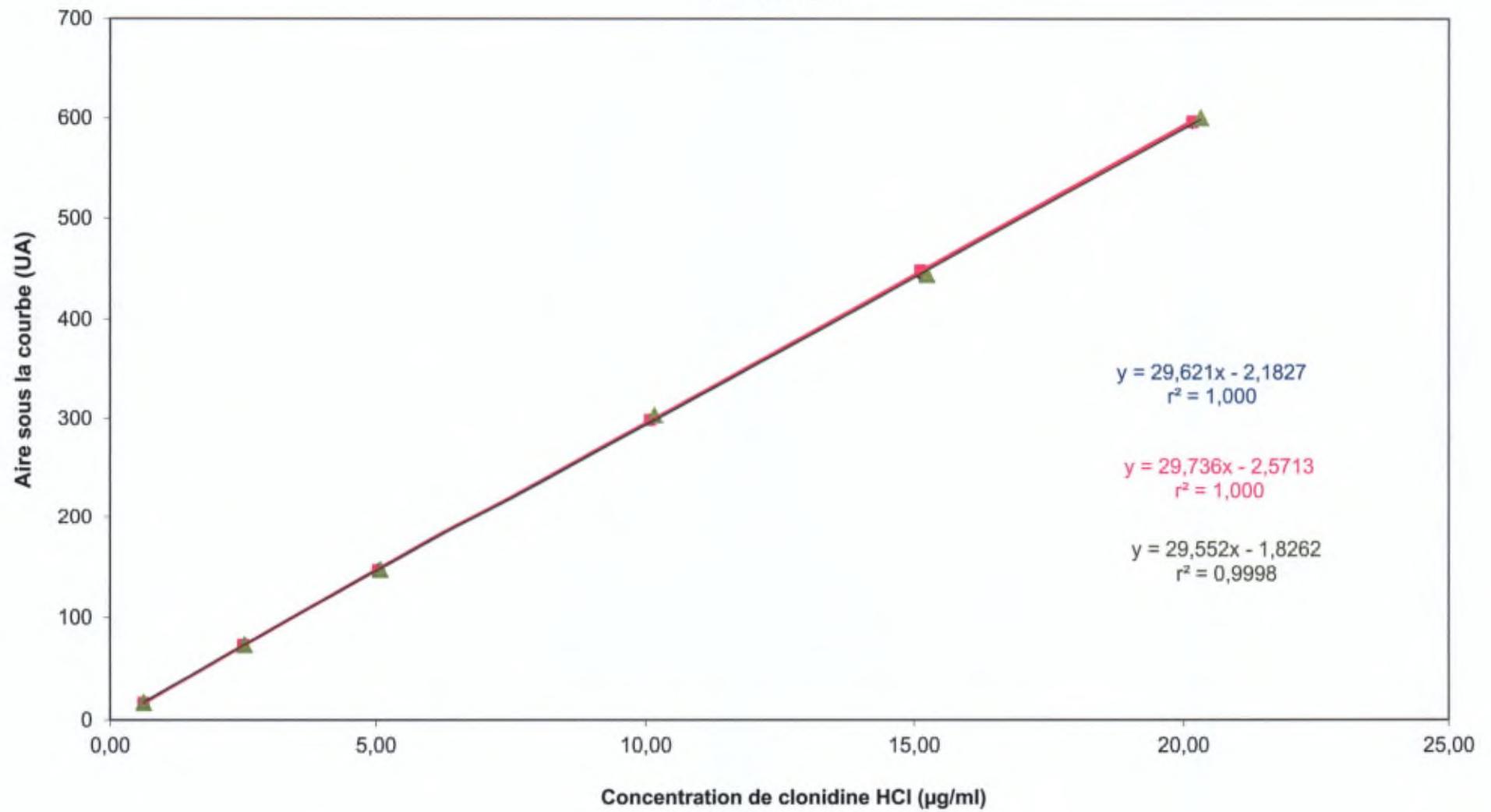
Les pentes des trois droites ne sont pas significativement différentes

Comparaison de l'ordonnée à l'origine des droites

J1/J2		
t	0,317942684	Non-significatif
t (0,05;8)	2,306	
J1/J3		
t	0,133153558	Non-significatif
t (0,05;8)	2,306	
J2/J3		
t	0,273600398	Non-significatif
t (0,05;8)	2,306	

Les ordonnées à l'origine des trois droites ne sont pas significativement différentes

Linéarité



Exactitude

J1	Pente b	29,621
	Ordonnée a	-2,1827
J2	Pente b	29,736
	Ordonnée a	-2,5713
J3	Pente b	29,552
	Ordonnée a	-1,8262

N	x ($\mu\text{g/ml}$)	y (μA)
1	0,63	16,05
2	2,52	72,33
3	5,04	147,19
4	10,08	297,90
5	15,12	444,42
6	20,16	595,17

 x = conc en clonidine HCl ($\mu\text{g/ml}$)
 y = aire sous la courbe en (μA)

N	x ($\mu\text{g/ml}$)	y (μA)
1	0,63	16,09
2	2,52	72,85
3	5,04	145,88
4	10,08	298,09
5	15,12	447,90
6	20,16	596,10

N	x ($\mu\text{g/ml}$)	y (μA)
1	0,63	16,85
2	2,54	73,24
3	5,08	146,80
4	10,16	302,94
5	15,24	444,23
6	20,32	600,02

		y (uA)	x (µg/ml)	x régression	Rec (%)
0,6	J1	16,05	0,63	0,62	97,9
	J2	16,09	0,63	0,63	99,8
	J3	16,85	0,63	0,63	99,7
2,5	J1	72,33	2,52	2,52	99,8
	J2	72,85	2,52	2,54	100,7
	J3	73,24	2,54	2,54	100,0
5	J1	147,19	5,04	5,04	100,1
	J2	145,88	5,04	4,99	99,1
	J3	146,80	5,08	5,03	99,0
10	J1	297,90	10,08	10,13	100,5
	J2	298,09	10,08	10,11	100,3
	J3	302,94	10,16	10,31	101,5
15	J1	444,42	15,12	15,02	99,3
	J2	447,90	15,12	15,15	100,2
	J3	444,23	15,24	15,09	99,0
20	J1	595,17	20,16	20,17	100,0
	J2	596,10	20,16	20,13	99,9
	J3	600,02	20,32	20,37	100,2
			Moyenne (%)		99,8
N	18		Somme (%)		1796,9
k	6		Ecart-type (%)		0,790114251

Variance (% ²)	Moyenne (%)	yi-Yi	(yi-Yi) ²	yi-Yi//	(yi-Yi//) ²
1,159	99,108	-1,242	1,543	-1,962	3,851
		0,665	0,442	-0,055	0,003
		0,577	0,333	-0,143	0,021
0,190	100,159	-0,338	0,115	-0,008	0,000
		0,492	0,242	0,823	0,677
		-0,154	0,024	0,177	0,031
0,351	99,369	0,684	0,467	0,224	0,050
		-0,314	0,099	-0,774	0,598
		-0,370	0,137	-0,829	0,687
0,411	100,773	-0,268	0,072	0,676	0,457
		-0,464	0,215	0,480	0,231
		0,732	0,535	1,675	2,807
0,358	99,522	-0,191	0,036	-0,497	0,247
		0,671	0,450	0,364	0,133
		-0,480	0,230	-0,787	0,619
0,033	100,041	-0,009	0,000	0,203	0,041
		-0,176	0,031	0,036	0,001
		0,185	0,034	0,397	0,157
Somme	2,502	0	5,005	0	10,613

Test d'homogénéité des variances intra-groupes

Test de Cochran

C
C(0,05;6;2) 0,4632
0,7808

C < C(0,05;6;2)
→ variances des groupes homogènes

Test de validité des moyennes

Variation	ddl	Somme des carrés	Variance (% ²)	Ecart-type (%)	CV (%)	F	
variation totale	17	10,6					
variation intra-groupe	12	5,0	0,4170	0,6458	0,6469	F	2,69
variation inter-groupes	5	5,6	1,1216	1,0591	1,0609	p	0,07
						F (0,05;5;12)	3,11

F < F(0,05;5;12) → les variations des observations entre les groupes sont dues à des erreurs expérimentales

Estimation du recouvrement moyen

Recouvrement moyen (%) 99,8
Ecart-type S (%) 0,8
N 18
t (0,05;17) 2,1098
t*S/v(N) (%) 0,3929
Intervalle de confiance (%) 99,4357 à 100,2215

L'intervalle de confiance a 95% de chances de contenir la valeur vraie du recouvrement moyen

Fidélité

Signification Symboles

Y_{ij}	Recouvrement (%)
X_{ij}	Quantités retrouvées ($\mu\text{g/ml}$)
m_j	Moyenne des répétitions du groupe j
S	Ecart-type
S^2	Variance
S_j^2	Variance des répétitions
NDL	Nombre de degré de liberté ($N_j - 1$)
S_r^2	Variance de répétabilité
S_g^2	Variance inter-groupes
S_R^2	Variance de reproductibilité
CV_r	Erreur de répétabilité
CV_R	Erreur de reproductibilité

		Groupes		
		J1	J2	J3
R é p é t i t i o n s	2,5 µg/ml	73,33	76,44	76,24
		71,32	73,85	77,11
		72,10	75,59	77,58
		71,83	74,62	75,21
	5 µg/ml	145,19	149,39	146,80
		142,73	145,88	148,39
		144,23	149,55	147,58
		143,71	146,63	149,63
	10 µg/ml	297,90	305,67	302,94
		298,85	298,09	302,78
		297,86	303,09	302,16
		298,64	303,51	301,87
	15 µg/ml	444,42	447,18	444,23
		443,81	447,90	448,61
		446,92	449,65	447,08
		447,24	444,86	447,18

N 16
k 3

J1	Pente b	29,621
	Ordonnée a	-2,1827
J2	Pente b	29,736
	Ordonnée a	-2,5713
J3	Pente b	29,552
	Ordonnée a	-1,8262

x = conc en clonidine HCl (µg/ml)
y = aire sous la courbe en (uA)

Transformation des données brutes en pourcentage de recouvrement

		Quantités retrouvées, X_{ij} ($\mu\text{g/ml}$)			Recouvrement, Y_{ij} (%)		
		J1	J2	J3	J1	J2	J3
R é p é t i t i o n s	2,5 $\mu\text{g/ml}$	2,55	2,66	2,64	101,97	106,28	105,67
		2,48	2,57	2,67	99,26	102,80	106,84
		2,51	2,63	2,69	100,32	105,13	107,48
		2,50	2,60	2,61	99,95	103,83	104,27
	5 $\mu\text{g/ml}$	4,98	5,11	5,03	99,50	102,21	100,58
		4,89	4,99	5,08	97,85	99,85	101,66
		4,94	5,12	5,06	98,86	102,32	101,12
		4,93	5,02	5,13	98,51	100,35	102,50
	10 $\mu\text{g/ml}$	10,13	10,37	10,31	101,31	103,66	103,13
		10,16	10,11	10,31	101,63	101,11	103,07
		10,13	10,28	10,29	101,29	102,79	102,86
		10,16	10,29	10,28	101,56	102,93	102,77
	15 $\mu\text{g/ml}$	15,08	15,12	15,09	100,51	100,83	100,63
		15,06	15,15	15,24	100,38	100,99	101,61
		15,16	15,21	15,19	101,08	101,39	101,27
		15,17	15,05	15,19	101,15	100,31	101,29
Moyenne m_j (%)				100,32	102,30	102,92	

Dispersion à l'intérieur des groupes k de mesures et variance de répétabilité

		(Recouvrement Y_{ij} - Moyenne m_j) ²		
		J1	J2	J3
R é p é t i t i o n s	2,5 µg/ml	2,72	15,86	7,53
		1,13	0,25	15,33
		0,00	8,04	20,80
	5 µg/ml	0,14	2,35	1,82
		0,67	0,01	5,47
		6,11	6,01	1,59
		2,14	0,00	3,26
	10 µg/ml	3,28	3,80	0,18
		0,98	1,85	0,04
		1,71	1,41	0,02
	15 µg/ml	0,95	0,24	0,00
		1,53	0,40	0,02
0,04		2,15	5,27	
0,00		1,70	1,71	
		0,57	0,83	2,73
		0,69	3,95	2,66

Moyenne (%)	1,42	3,05	4,28
Somme (%)	22,68	48,87	68,44
Variance des répétitions, S_j^2 (% ²)	1,51	3,26	4,56
Ecart-type, S_j (%)	1,23	1,81	2,14
Variance de répétabilité, S_r^2 (% ²)	3,11		
Moyenne m_j (%)	101,85		
(Moyenne m_j - Moyenne m) ² (%)	2,33	0,20	1,16

Tableau récapitulatif des moyennes et des variances

	Groupes		
	J1	J2	J3
Moyenne m_j (%)	100,32	102,30	102,92
N	16	16	16
S_j^2 (%²)	1,51	3,26	4,56
Sj (%)	1,23	1,81	2,14
NDL	15	15	15
Sr^2 (%²)	3,11		
Moyenne m/ (%)	101,85		
Sg^2 (%²)	9,50		
SR^2 (%²)	12,61		
CV_r (%)	3,05		
CVr (%)	12,39		

Seuil de détection (SD) - Seuil de quantification (SQ)

N	Hauteur max. (Blanc = Phase mobile)
1	0,06
2	0,059
3	0,058
4	0,062
5	0,066
6	0,071
Moyenne	0,063
Ecart-type	0,005

LOD (µg/ml)	0,056
LOQ (µg/ml)	0,185

R	0,296
---	-------

		Calcul du rapport conc/hauteur, R		
		Concentration (µg/ml)	Hauteur signal	Rapport conc/hauteur
Jour 1	Pesée Std	0,63	2,1	0,300
	5,04	2,52	8,2	0,307
		5,04	16,4	0,307
		10,08	32,8	0,307
		15,12	51,4	0,294
		20,16	69,3	0,291
Jour 2	Pesée Std	0,63	2,2	0,286
	5,07	2,52	8,5	0,296
		5,04	16,9	0,298
		10,08	34,8	0,290
		15,12	51,5	0,294
		20,16	69,8	0,289
Jour 3	Pesée Std	0,63	2,1	0,302
	5,08	2,54	8,8	0,289
		5,08	16,9	0,301
		10,16	34,9	0,291
		15,24	52,6	0,290
		20,32	69,8	0,291
Moyenne				0,296

Linéarité**Droite étalon 1**x = conc en bétaméthasone ($\mu\text{g/ml}$)y = aire sous la courbe en (μA)

Pesée Std

2,58

N	x ($\mu\text{g/ml}$)	y (μA)	x^2	y^2	xy
1	0,10	12,2384	0,011	149,8	1,3
2	0,21	25,4206	0,043	646,2	5,2
3	0,41	52,1789	0,170	2722,6	21,5
4	0,62	76,8428	0,383	5904,8	47,6
5	0,83	103,586	0,682	10730,1	85,5
6	1,03	132,205	1,065	17478,2	136,4

Somme	6	3,2	402,5	2,4	37631,7	297,6
Moyenne		0,5	67,1	0,4		

Sxx	0,6	Pente b	128,090615	r	0,999795105
Syy	10634,4	Ordonnée a	-1,21929945	r²	0,999590253
Sxy	83,0				
S²xy	1,089356153		S²r	1,0893562	
SE b	1,296684863		S²a	0,8411421	
			S²b	1,6813916	

Test unilatéral sur la pente

F	128,091		
ddl num.	4	F(0,05;1;4) 7,71	Significatif
ddl dénom.	4		

→ Existence d'une pente

Test bilatéral sur r

t	98,783		
ddl	4	t(0,05;4) 2,776	Significatif

→ Existence d'une corrélation entre x et y

Test bilatéral de comparaison de l'ordonnée à l'origine avec 0

t	1,3295		
ddl	4	t(0,05;4) 2,776	Non-significatif

→ Ordonnée à l'origine différente de 0

Signification Symboles

N	Nombre d'observations
k	Nombre de groupes
Sxx	Ecart-type de la variable x
Syy	Ecart-type de la variable y
Sxy	Covariance des variables x et y
S ² xy	Variance de régression, Variance résiduelle
SE b	Erreur sur la pente
a	Ordonnée à l'origine de la droite de régression
b	Pente de la droite de régression
r	Coefficient de corrélation
r ²	Coefficient de détermination
S ² r	Variance du coefficient de corrélation
S ² a	Variance de l'ordonnée
S ² b	Variance de la pente
F	Test de Fisher
t	t de Student
ddl	Degrés de liberté

Droite étalon 2

x = conc en bétaméthasone (µg/ml)
y = aire sous la courbe en (uA)

Pesée Std
2,54

N	x (µg/ml)	y (uA)	x ²	y ²	xy
1	0,10	12,4741	0,010	155,6	1,3
2	0,20	25,5819	0,041	654,4	5,2
3	0,41	51,2273	0,165	2624,2	20,8
4	0,61	77,744	0,372	6044,1	47,4
5	0,81	101,239	0,661	10249,3	82,3
6	1,02	129,683	1,032	16817,7	131,8

Somme	6	3,1	397,9	2,3	36545,4	288,7
Moyenne		0,5	66,3	0,4		

Sxx	0,627955733	Pente b	127,119251 r		0,999795588
Syy	10151,47729	Ordonnée a	-0,40424877 r^2		0,999591219
Sxy	79,82526241				
S²xy	1,037433639		S²r	1,0374336	
SE b	1,285332971		S²a	0,973956	
			S²b	1,6520808	

 Test unilatéral sur la pente

F	127,12				
ddl num.	4	F(0,05;1;4) 7,71			Significatif
ddl dénom.	4				

→ Existence d'une pente

 Test bilatéral sur r

t	98,89986				
ddl	4	t(0,05;4) 2,776			Significatif

→ Existence d'une corrélation entre x et y

 Test bilatéral de comparaison de l'ordonnée à l'origine avec 0

t	0,4096				
ddl	4	t(0,05;4) 2,776			Non-significatif

→ Ordonnée à l'origine différente de 0

Droite étalon 3

x = conc en bétaméthasone ($\mu\text{g/ml}$)
 y = aire sous la courbe en (uA)

Pesée Std
2,47

N	x ($\mu\text{g/ml}$)	y (uA)	x^2	y^2	xy
1	0,10	13,008	0,010	169,2	1,3
2	0,20	25,5734	0,039	654,0	5,1
3	0,40	49,4016	0,156	2440,5	19,5
4	0,59	75,8516	0,351	5753,5	45,0
5	0,79	100,485	0,625	10097,2	79,4
6	0,99	123,444	0,976	15238,4	122,0

Somme	6	3,1	387,8	2,2	34352,8	272,2
Moyenne		0,5	64,6	0,4		

Sxx	0,593820933	<u>Pente b</u>	125,075514	<u>r</u>	0,999834322
Syy	9292,744937	<u>Ordonnée a</u>	0,78038575	<u>r²</u>	0,99966867
Sxy	74,27245869				
S ² xy	0,769740159		S ² r	0,7697402	
SE b	1,138529586		S ² a	0,5943519	
			S ² b	1,2962496	

 Test unilatéral sur la pente

F	125,075514				
ddl num.	4	F(0,05;1;4) 7,71		Significatif	
ddl dénom.	4				

→ Existence d'une pente

 Test bilatéral sur r

t	109,857061				
ddl	4	t(0,05;4) 2,776		Significatif	

→ Existence d'une corrélation entre x et y

 Test bilatéral de comparaison de l'ordonnée à l'origine avec 0

t	1,01224937				
ddl	4	t(0,05;4) 2,776		Non-significatif	

→ Ordonnée à l'origine différente de 0

Comparaison de la pente entre les droites

J1/J2		
t	0,532027136	Non-significatif
t (0,05;8)	2,306	
J1/J3		
t	1,747292755	Non-significatif
t (0,05;8)	2,306	
J2/J3		
t	1,190246247	Non-significatif
t (0,05;8)	2,306	

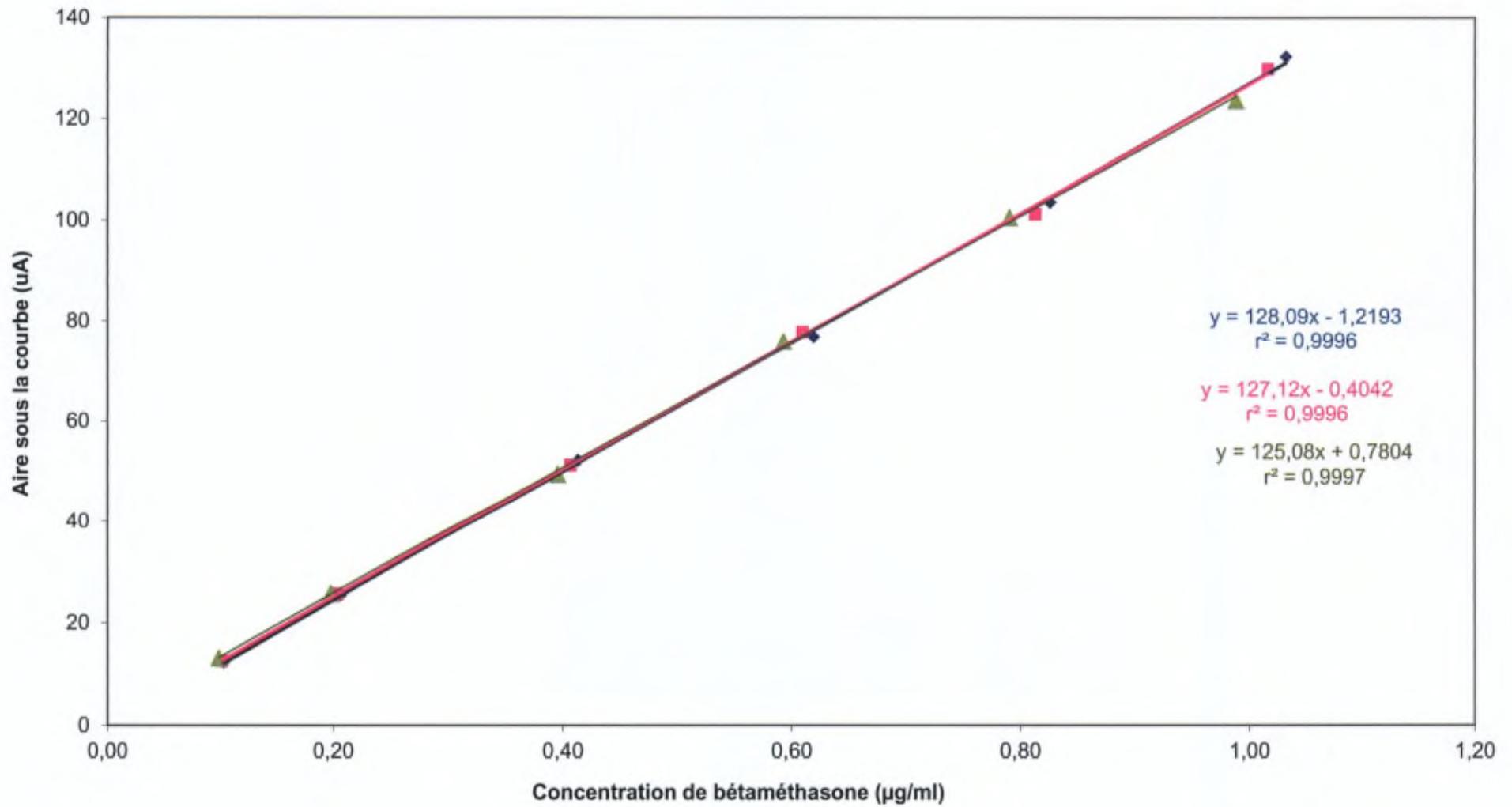
Les pentes des trois droites ne sont pas significativement différentes

Comparaison de l'ordonnée à l'origine des droites

J1/J2		
t	0,604971014	Non-significatif
t (0,05;8)	2,306	
J1/J3		
t	1,6690177	Non-significatif
t (0,05;8)	2,306	
J2/J3		
t	0,945951188	Non-significatif
t (0,05;8)	2,306	

Les ordonnées à l'origine des trois droites ne sont pas significativement différentes

Linéarité



Exactitude

J1	Pente b	128,09
	Ordonnée a	-1,2193
J2	Pente b	127,12
	Ordonnée a	-0,4042
J3	Pente b	125,08
	Ordonnée a	0,7804

N	x ($\mu\text{g/ml}$)	y (μA)
1	0,10	12,24
2	0,21	25,42
3	0,41	52,18
4	0,62	76,84
5	0,83	103,59
6	1,03	132,21

 x = conc en bétaméthasone ($\mu\text{g/ml}$)
 y = aire sous la courbe en (μA)

N	x ($\mu\text{g/ml}$)	y (μA)
1	0,10	12,47
2	0,20	25,58
3	0,41	51,23
4	0,61	77,74
5	0,81	101,24
6	1,02	129,68

N	x ($\mu\text{g/ml}$)	y (μA)
1	0,10	13,01
2	0,20	25,57
3	0,40	49,40
4	0,59	75,85
5	0,79	100,49
6	0,99	123,44

		y (uA)	x (µg/ml)	x régression	Rec (%)
0,1	J1	12,24	0,10	0,11	101,8
	J2	12,47	0,10	0,10	99,7
	J3	13,01	0,10	0,10	98,9
0,2	J1	25,42	0,21	0,21	100,8
	J2	25,58	0,20	0,20	100,6
	J3	25,57	0,20	0,20	100,3
0,4	J1	52,18	0,41	0,42	101,0
	J2	51,23	0,41	0,41	99,9
	J3	49,40	0,40	0,39	98,4
0,6	J1	76,84	0,62	0,61	98,4
	J2	77,74	0,61	0,61	100,8
	J3	75,65	0,59	0,60	101,2
0,8	J1	103,59	0,83	0,82	99,9
	J2	101,24	0,81	0,80	98,4
	J3	100,49	0,79	0,80	100,9
1	J1	132,21	1,03	1,04	100,9
	J2	129,68	1,02	1,02	100,7
	J3	123,44	0,99	0,98	99,3
				Moyenne (%)	100,1
N		18		Somme (%)	1802,0
k		6		Ecart-type (%)	1,0584883

Variance (% ²)	Moyenne (%)	yi-Y/	(yi-Y/) ²	yi-Y//	(yi-Y//) ²
2,193	100,155	1,652	2,728	1,698	2,884
		-0,442	0,196	-0,396	0,157
		-1,209	1,463	-1,163	1,352
0,052	100,559	0,205	0,042	0,656	0,430
		0,042	0,002	0,493	0,243
		-0,247	0,061	0,204	0,042
1,750	99,764	1,225	1,500	0,880	0,774
		0,178	0,032	-0,167	0,028
		-1,403	1,969	-1,748	3,055
2,334	100,172	-1,749	3,059	-1,686	2,843
		0,675	0,455	0,738	0,544
		1,074	1,154	1,137	1,294
1,555	99,696	0,166	0,028	-0,247	0,061
		-1,322	1,747	-1,734	3,008
		1,155	1,335	0,743	0,551
0,832	100,305	0,629	0,396	0,826	0,683
		0,417	0,174	0,614	0,377
		-1,046	1,095	-0,849	0,721
Somme	8,717	600,651	0,000	17,434	0,000

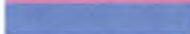
Fidélité

Signification Symboles

Y_{ij}	Recouvrement (%)
X_{ij}	Quantités retrouvées ($\mu\text{g/ml}$)
m_j	Moyenne des répétitions du groupe j
S	Ecart-type
S^2	Variance
S_j^2	Variance des répétitions
NDL	Nombre de degré de liberté ($N_j - 1$)
S_r^2	Variance de répétabilité
S_g^2	Variance inter-groupes
S_R^2	Variance de reproductibilité
CV_r	Erreur de répétabilité
CV_R	Erreur de reproductibilité

		Groupes		
		J1	J2	J3
R é p é t i t i o n s	0,1 µg/ml	12,23	12,47	13,01
		12,21	12,63	13,19
		12,54	12,38	13,38
		12,17	12,51	12,84
	0,2 µg/ml	25,42	25,58	25,57
		25,98	25,90	25,80
		25,92	25,66	25,84
		25,52	25,97	25,44
	0,6 µg/ml	76,84	77,74	75,85
		77,30	76,21	76,15
		77,39	76,99	75,57
		77,61	77,00	76,62
	0,8 µg/ml	103,59	101,24	100,49
		104,65	101,49	100,17
		104,25	101,63	100,88
		104,11	101,37	100,71
N	16			
k	3			

J1	Pente b	128,09
	Ordonnée a	-1,2193
J2	Pente b	127,12
	Ordonnée a	-0,4042
J3	Pente b	125,08
	Ordonnée a	0,7804

 x = conc en bétaméthasone (µg/ml)
 y = aire sous la courbe en (uA)

Transformation des données brutes en pourcentage de recouvrement

		Quantités retrouvées, X_{ij} ($\mu\text{g/ml}$)			Recouvrement, Y_{ij} (%)		
		J1	J2	J3	J1	J2	J3
R é p é t i t i o n s	0,1 $\mu\text{g/ml}$	0,11	0,10	0,10	105,03	101,31	97,76
		0,10	0,10	0,10	104,85	102,54	99,19
		0,11	0,10	0,10	107,45	100,59	100,76
		0,10	0,10	0,10	104,56	101,62	96,38
	0,2 $\mu\text{g/ml}$	0,21	0,20	0,20	103,99	102,21	99,11
		0,21	0,21	0,20	106,19	103,46	100,01
		0,21	0,21	0,20	105,96	102,52	100,19
		0,21	0,21	0,20	104,37	103,72	98,58
	0,6 $\mu\text{g/ml}$	0,61	0,61	0,60	101,57	102,46	100,03
		0,61	0,60	0,60	102,17	100,45	100,43
		0,61	0,61	0,60	102,29	101,47	99,65
		0,62	0,61	0,61	102,57	101,49	101,05
	0,8 $\mu\text{g/ml}$	0,82	0,80	0,80	102,28	99,95	99,64
		0,83	0,80	0,79	103,31	100,19	99,32
		0,82	0,80	0,80	102,93	100,33	100,03
		0,82	0,80	0,80	102,78	100,08	99,86
Moyenne m_j (%)					103,89	101,52	99,50

Dispersion à l'intérieur des groupes k de mesures et variance de répétabilité

		(Recouvrement Y_{ij} - Moyenne m_j) ²		
		J1	J2	J3
R é p é t i t i o n s	0,1 µg/ml	1,28	0,05	3,03
		0,91	1,02	0,09
		12,63	0,87	1,58
		0,44	0,01	9,75
	0,2 µg/ml	0,01	0,47	0,15
		5,27	3,75	0,26
		4,26	0,99	0,48
		0,23	4,81	0,85
	0,6 µg/ml	5,39	0,87	0,28
		2,97	1,16	0,86
		2,58	0,00	0,02
		1,74	0,00	2,41
	0,8 µg/ml	2,61	2,49	0,02
		0,33	1,77	0,03
		0,93	1,42	0,29
		1,23	2,10	0,13

Moyenne (%)	2,68	1,36	1,27
Somme (%)	42,80	21,78	20,25
Variance des répétitions, S_j^2 (% ²)	2,85	1,45	1,35
Ecart-type, S_j (%)	1,69	1,20	1,16
Variance de répétabilité, S_r^2 (% ²)	1,89		
Moyenne m_j (%)	101,64		
(Moyenne m_j - Moyenne m) ² (%)	2,33	0,20	1,16

Tableau récapitulatif des moyennes et des variances

	Groupes		
	J1	J2	J3
Moyenne m_j (%)	103,89	101,52	99,50
N	16	16	16
S_j^2 (%²)	2,85	1,45	1,35
S_j (%)	1,69	1,20	1,16
NDL	15	15	15
S_r^2 (%²)	1,89		
Moyenne m_l (%)	101,64		
S_g^2 (%²)	15,68		
SR^2 (%²)	17,57		
CV_r (%)	1,85		
CVr (%)	17,28		

Seuil de détection (SD) - Seuil de quantification (SQ)

N	Hauteur max. (Blanc = Phase mobile)
1	0,014
2	0,015
3	0,013
4	0,014
5	0,014
6	0,015
Moyenne	0,014
Ecart-type	0,001

LOD (µg/ml)	0,00406
LOQ (µg/ml)	0,01354

R	0,09556
---	---------

		Calcul du rapport conc/hauteur, R		
		Concentration (µg/ml)	Hauteur signal	Rapport conc/hauteur
Jour 1	Pesée Std	0,10	1,2	0,086
		2,58	2,3	0,090
		0,41	4,6	0,090
		0,62	6,9	0,090
		0,83	9,2	0,090
		1,03	11,7	0,088
Jour 2	Pesée Std	0,10	1,1	0,092
		2,54	2,1	0,097
		0,41	4,1	0,099
		0,61	6,2	0,098
		0,81	8,2	0,099
		1,02	11	0,092
Jour 3	Pesée Std	0,10	1	0,099
		2,47	2	0,099
		0,40	3,9	0,101
		0,59	5,7	0,104
		0,79	7,6	0,104
		0,99	9,7	0,102
		Moyenne		0,096

Linéarité**Droite étalon 1**

x = conc en clonidine HCl ($\mu\text{g/ml}$)
 y = aire sous la courbe en (uA)

Pesée Std
5,04

N	x ($\mu\text{g/ml}$)	y (uA)	x^2	y^2	xy
1	0,06	17,6907	0,004	313,0	1,1
2	0,25	74,2747	0,064	5516,7	18,7
3	0,50	150,308	0,254	22592,5	75,8
4	0,76	227,056	0,572	51554,4	171,7
5	1,01	301,967	1,016	91184,1	304,4
6	1,51	460,895	2,286	212427,0	696,9

Somme 6 4,1 1232,2 4,2 383587,6 1268,5
Moyenne 0,7 205,4 0,7

Sxx 1,4 **Pente b** 305,291713 r 0,999938562
Syy 130537,1 **Ordonnée a** -2,99586051 r^2 0,999877128
Sxy 427,5
 S^2_{xy} 4,009842117 S^2_r 4,0098421
SE b 1,69214776 S^2_a 2,6703869
 S^2_b 2,863364

Test unilatéral sur la pente

F 305,292
ddl num. 4 F(0,05;1;4) 7,71 Significatif
ddl dénom. 4

→ Existence d'une pente

Test bilatéral sur r

t 180,417
ddl 4 t(0,05;4) 2,776 Significatif

→ Existence d'une corrélation entre x et y

Test bilatéral de comparaison de l'ordonnée à l'origine avec 0

t 1,833
ddl 4 t(0,05;4) 2,776 Non-significatif

→ Ordonnée à l'origine différente de 0

Signification Symboles

N Nombre d'observations
k Nombre de groupes
Sxx Ecart-type de la variable x
Syy Ecart-type de la variable y
Sxy Covariance des variables x et y
 S^2_{xy} Variance de régression, Variance résiduelle
SE b Erreur sur la pente
a Ordonnée à l'origine de la droite de régression
b Pente de la droite de régression
r Coefficient de corrélation
 r^2 Coefficient de détermination
 S^2_r Variance du coefficient de corrélation
 S^2_a Variance de l'ordonnée
 S^2_b Variance de la pente
F Test de Fisher
t t de Student
ddl Degrés de liberté

Droite étalon 2

x = conc en clonidine HCl ($\mu\text{g/ml}$)
 y = aire sous la courbe en (μA)

Pesée Std
5,07

N	x ($\mu\text{g/ml}$)	y (μA)	x^2	y^2	xy
1	0,06	18,8819	0,004	356,5	1,2
2	0,25	77,1427	0,064	5951,0	19,6
3	0,51	152,003	0,257	23104,9	77,1
4	0,76	231,768	0,578	53716,4	176,3
5	1,01	310,356	1,028	96320,8	314,7
6	1,52	461,948	2,313	213396,0	702,6

Somme	6	4,1	1252,1	4,2	392845,6	1291,4
Moyenne		0,7	208,7	0,7		

Sxx	1,417116492	Pente b	304,672666	r	0,999965968
Syy	131553,4069	Ordonnée a	-0,49356084	r^2	0,999931937
Sxy	431,7566602				
S^2_{xy}	2,238491133		S^2_r	2,2384911	
SE b	1,256825296		S^2_a	1,8638232	
			S^2_b	1,5796098	

Test unilatéral sur la pente

F	304,67		
ddl num.	4	F(0,05;1;4) 7,71	Significatif
ddl dénom.	4		

→ Existence d'une pente

Test bilatéral sur r

t	242,41		
ddl	4	t(0,05;4) 2,776	Significatif

→ Existence d'une corrélation entre x et y

Test bilatéral de comparaison de l'ordonnée à l'origine avec 0

t	0,362		
ddl	4	t(0,05;4) 2,776	Non-significatif

→ Ordonnée à l'origine différente de 0

Droite étalon 3

x = conc en clonidine HCl ($\mu\text{g/ml}$)
 y = aire sous la courbe en (μA)

Pesée Std
 5,08

N	x ($\mu\text{g/ml}$)	y (μA)	x^2	y^2	xy
1	0,06	18,6907	0,0	349,3	1,2
2	0,25	76,2747	0,1	5817,8	19,4
3	0,51	151,308	0,3	22894,1	76,9
4	0,76	227,056	0,6	51554,4	173,0
5	1,02	301,967	1,0	91184,1	306,8
6	1,52	458,898	2,3	210587,4	699,4

Somme 6 4,1 1234,2 4,3 382387,2 1276,6
 Moyenne 0,7 205,7 0,7

Sxx 1,422712208 **Pente b** 300,537166 r 0,99995538
 Syy 128514,5175 **Ordonnée a** -1,045459 r^2 0,999910762
 Sxy 427,5778956
 S^2_{xy} 2,86708352 S^2_r 2,8670835
 SE b 1,419585789 S^2_a 1,9093575
 S^2_b 2,0152238

Test unilatéral sur la pente

F 300,54
 ddl num. 4 F(0,05;1;4) 7,71 Significatif
 ddl dénom. 4
 → Existence d'une pente

Test bilatéral sur r

t 211,71
 ddl 4 t(0,05;4) 2,776 Significatif
 → Existence d'une corrélation entre x et y

Test bilatéral de comparaison de l'ordonnée à l'origine avec 0

t 0,757
 ddl 4 t(0,05;4) 2,776 Non-significatif
 → Ordonnée à l'origine différente de 0

Comparaison de la pente entre les droites

J1/J2		
t	0,293687995	Non-significatif
t (0,05;8)	2,306	
J1/J3		
t	2,152593444	Non-significatif
t (0,05;8)	2,306	
J2/J3		
t	2,181165564	Non-significatif
t (0,05;8)	2,306	

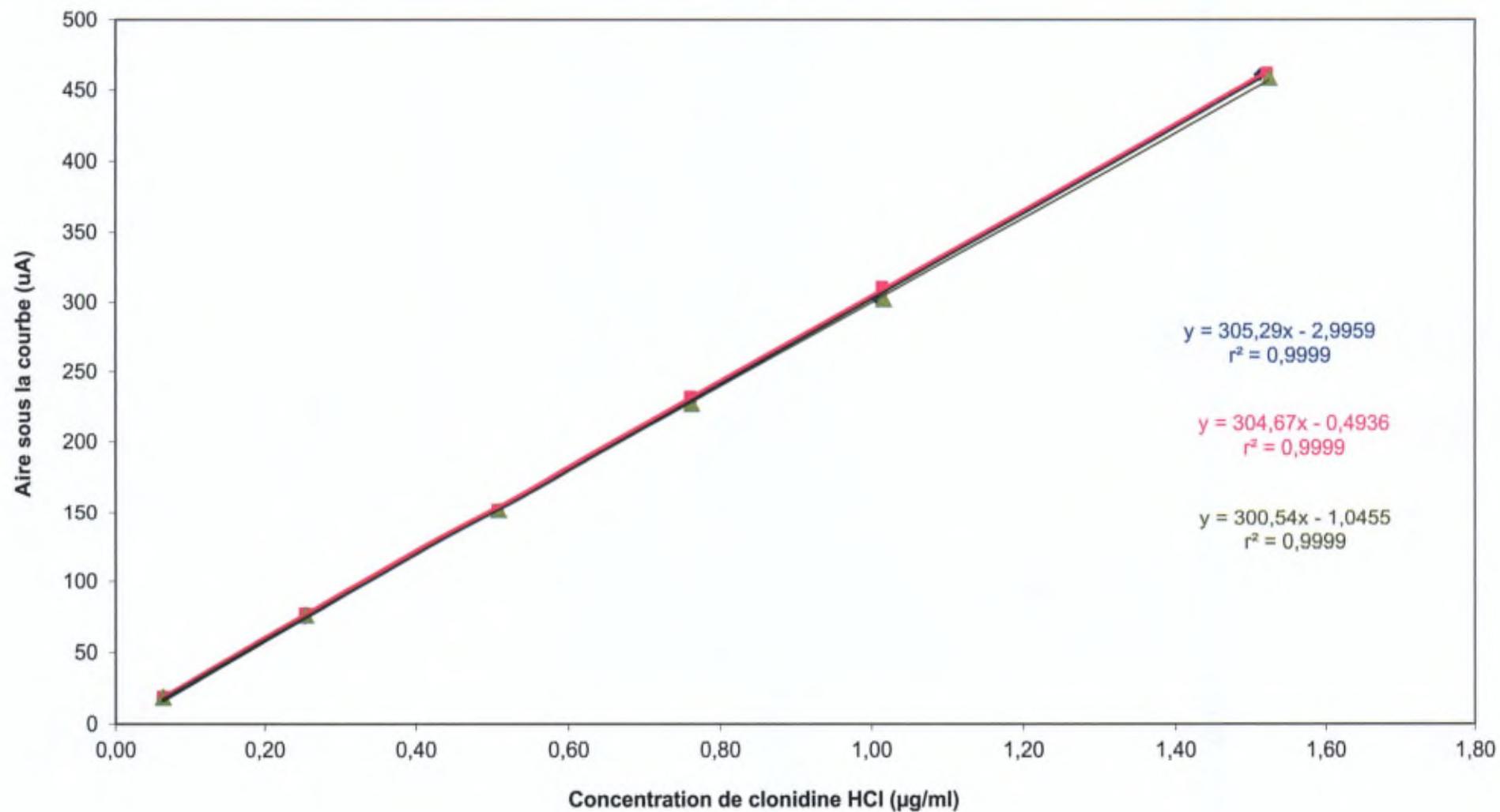
Les pentes des trois droites ne sont pas significativement différentes

Comparaison de l'ordonnée à l'origine des droites

J1/J2		
t	1,175136995	Non-significatif
t (0,05;8)	2,306	
J1/J3		
t	0,911388202	Non-significatif
t (0,05;8)	2,306	
J2/J3		
t	0,284122181	Non-significatif
t (0,05;8)	2,306	

Les ordonnées à l'origine des trois droites ne sont pas significativement différentes

Linéarité



Exactitude

J1	Pente b	305,29
	Ordonnée a	-2,9959
J2	Pente b	304,67
	Ordonnée a	-0,4936
J3	Pente b	300,54
	Ordonnée a	-1,0455

N	x ($\mu\text{g/ml}$)	y (μA)
1	0,063	17,691
2	0,252	74,275
3	0,504	150,308
4	0,756	227,056
5	1,008	301,967
6	1,512	460,898

 x = conc en clonidine HCl ($\mu\text{g/ml}$)
 y = aire sous la courbe en (μA)

N	x ($\mu\text{g/ml}$)	y (μA)
1	0,063	18,882
2	0,254	77,143
3	0,507	152,003
4	0,761	231,768
5	1,014	310,356
6	1,521	461,948

N	x ($\mu\text{g/ml}$)	y (μA)
1	0,064	18,691
2	0,254	76,275
3	0,508	151,308
4	0,762	227,056
5	1,016	301,967
6	1,524	458,898

		y (uA)	x (µg/ml)	x régression	Rec (%)
0,062	J1	17,69	0,06	0,07	107,6
	J2	18,88	0,06	0,06	100,3
	J3	18,69	0,06	0,07	103,4
0,250	J1	74,27	0,25	0,25	100,4
	J2	77,14	0,25	0,25	100,5
	J3	76,27	0,25	0,26	101,3
0,500	J1	150,31	0,50	0,50	99,6
	J2	152,00	0,51	0,50	98,7
	J3	151,31	0,51	0,51	99,8
0,750	J1	227,06	0,76	0,75	99,7
	J2	231,77	0,76	0,76	100,2
	J3	227,06	0,76	0,76	99,6
1,000	J1	301,97	1,01	1,00	99,3
	J2	310,36	1,01	1,02	100,6
	J3	301,97	1,02	1,01	99,2
1,500	J1	460,90	1,51	1,52	100,5
	J2	461,95	1,52	1,52	99,8
	J3	458,90	1,52	1,53	100,4
				Moyenne (%)	100,0
N		15		Somme (%)	1499,8
k		5		Ecart-type (%)	0,66382742

Variance (% ²)	Moyenne (%)	yi-Yi	(yi-Yi) ²	yi-Yi//	(yi-Yi//) ²
13,089	103,773	3,783	14,312	7,571	57,318
		-3,426	11,737	0,362	0,131
		-0,357	0,128	3,430	11,768
0,219	100,749	-0,310	0,096	0,453	0,205
		-0,228	0,052	0,536	0,287
		0,539	0,290	1,302	1,696
0,332	99,383	0,252	0,063	-0,351	0,123
		-0,659	0,434	-1,262	1,591
		0,407	0,166	-0,196	0,038
0,122	99,840	-0,164	0,027	-0,309	0,096
		0,402	0,161	0,256	0,066
		-0,238	0,056	-0,383	0,147
0,610	99,719	-0,417	0,174	-0,684	0,467
		0,901	0,812	0,634	0,402
		-0,484	0,234	-0,751	0,563
0,149	100,236	0,261	0,068	0,512	0,262
		-0,444	0,197	-0,193	0,037
		0,183	0,033	0,434	0,188
Somme	1,432	499,927	0,000	2,864	0,000

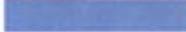
Fidélité

Signification Symboles

Y_{ij}	Recouvrement (%)
X_{ij}	Quantités retrouvées ($\mu\text{g/ml}$)
m_j	Moyenne des répétitions du groupe j
S	Ecart-type
S^2	Variance
S_j^2	Variance des répétitions
NDL	Nombre de degré de liberté ($N_j - 1$)
S_r^2	Variance de répétabilité
S_g^2	Variance inter-groupes
S_R^2	Variance de reproductibilité
CV_r	Erreur de répétabilité
CV_R	Erreur de reproductibilité

		Groupes		
		J1	J2	J3
R é p é t i t i o n s	0,25 µg/ml	74,27	77,14	76,27
		77,21	78,14	76,18
		76,02	77,18	76,85
		77,63	78,44	76,18
	0,50 µg/ml	149,09	152,00	151,31
		150,31	155,01	150,52
		148,02	155,00	150,48
		150,23	154,82	150,54
	0,75 µg/ml	227,06	231,77	227,06
		227,43	231,94	229,19
		229,40	231,97	226,67
		229,51	234,01	227,85
	1 µg/ml	301,97	310,36	301,97
		303,53	314,17	303,60
		304,00	309,18	302,46
		303,31	314,18	302,13
N	16			
k	3			

J1	Pente b	305,29
	Ordonnée a	-2,9959
J2	Pente b	304,67
	Ordonnée a	-0,4936
J3	Pente b	300,54
	Ordonnée a	-1,0455

 x = conc en clonidine HCl (µg/ml)
 y = aire sous la courbe en (uA)

Transformation des données brutes en pourcentage de recouvrement

		Quantités retrouvées, X_{ij} ($\mu\text{g/ml}$)			Recouvrement, Y_{ij} (%)		
		J1	J2	J3	J1	J2	J3
R é p é t i o n s	0,25 $\mu\text{g/ml}$	0,25	0,25	0,26	101,24	101,93	102,91
		0,26	0,26	0,26	105,09	103,23	102,78
		0,26	0,25	0,26	103,53	101,97	103,68
		0,26	0,26	0,26	105,64	103,63	102,78
	0,50 $\mu\text{g/ml}$	0,50	0,50	0,51	99,63	100,11	101,39
		0,50	0,51	0,50	100,43	102,08	100,86
		0,49	0,51	0,50	98,93	102,07	100,83
		0,50	0,51	0,50	100,38	101,95	100,87
	0,75 $\mu\text{g/ml}$	0,75	0,76	0,76	100,47	101,65	101,20
		0,75	0,76	0,77	100,64	101,72	102,14
		0,76	0,76	0,76	101,50	101,73	101,02
		0,76	0,77	0,76	101,54	102,62	101,55
	1 $\mu\text{g/ml}$	1,00	1,02	1,01	99,89	102,03	100,82
		1,00	1,03	1,01	100,41	103,28	101,37
		1,01	1,02	1,01	100,56	101,64	100,99
		1,00	1,03	1,01	100,33	103,28	100,88
Moyenne m_j (%)					101,26	102,18	101,63

Dispersion à l'intérieur des groupes k de mesures et variance de répétabilité

		(Recouvrement Y_{ij} - Moyenne m_j) ²		
		J1	J2	J3
R é p é t i t i o n s	0,25 µg/ml	0,00	0,07	1,64
		14,62	1,10	1,32
		5,14	0,04	4,19
		19,19	2,09	1,34
	0,50 µg/ml	2,67	4,32	0,06
		0,69	0,01	0,59
		5,44	0,01	0,63
		0,78	0,05	0,57
	0,75 µg/ml	0,63	0,29	0,19
		0,40	0,21	0,26
		0,06	0,20	0,37
		0,08	0,19	0,01
1 µg/ml	1,88	0,02	0,65	
	0,74	1,20	0,07	
	0,50	0,29	0,41	
	0,87	1,21	0,57	

Moyenne (%)	3,35	0,71	0,80
Somme (%)	53,66	11,33	12,86
Variance des répétitions, S_j^2 (% ²)	3,58	0,76	0,86
Ecart-type, S_j (%)	1,89	0,87	0,93
Variance de répétabilité, S_r^2 (% ²)	1,73		
Moyenne m_j (%)	101,69		
(Moyenne m_j - Moyenne m_l) ² (%)	2,33	0,20	1,16

Tableau récapitulatif des moyennes et des variances

	Groupes		
	J1	J2	J3
Moyenne m_j (%)	101,26	102,18	101,63
N	16	16	16
S_j^2 (%²)	3,58	0,76	0,86
S_j (%)	1,89	0,87	0,93
NDL	15	15	15
S_r^2 (%²)	1,73		
Moyenne m_l (%)	101,69		
S_g^2 (%²)	17,09		
SR^2 (%²)	18,82		
CV_r (%)	1,70		
CVr (%)	18,51		

Seuil de détection (SD) - Seuil de quantification (SQ)

N	Hauteur max. (Blanc = Phase mobile)
1	0,34
2	0,32
3	0,34
4	0,33
5	0,35
6	0,33
Moyenne	0,335
Ecart-type	0,010

LOD (µg/ml)	0,033
LOQ (µg/ml)	0,111

R	0,033
---	-------

		Calcul du rapport conc/hauteur, R		
		Concentration (µg/ml)	Hauteur signal	Rapport conc/hauteur
Jour 1	Pesée Std	0,06	1,8	0,035
	5,04	0,25	7,7	0,033
		0,50	14,8	0,034
		0,76	22,8	0,033
		1,01	29,8	0,034
		1,51	45,9	0,033
Jour 2	Pesée Std	0,06	2,2	0,029
	5,07	0,25	7,9	0,032
		0,51	15,7	0,032
		0,76	24	0,032
		1,01	32,5	0,031
		1,52	46,7	0,033
Jour 3	Pesée Std	0,06	1,8	0,035
	5,08	0,25	7,4	0,034
		0,51	14	0,036
		0,76	22,5	0,034
		1,02	29,7	0,034
		1,52	45,1	0,034
Moyenne				0,033

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

International Journal of Pharmaceutics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijpharm

Personalised Medicine

Development and evaluation of sustained-release clonidine-loaded PLGA microparticles

Amélie Gaignaux^{a,*}, Jonathan Réeff^a, Florence Siepmann^b, Juergen Siepmann^b, Carine De Vriese^a, Jonathan Goole^a, Karim Amighi^a^a Laboratory of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, Université Libre de Bruxelles, Belgium^b College of Pharmacy, Université Lille Nord de France, Inserm U 1008, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 May 2012

Received in revised form 20 July 2012

Accepted 2 August 2012

Available online xxx

Keywords:

Poly(D,L-lactide-co-glycolide acid) (PLGA)

Microparticles

Clonidine

Encapsulation efficiency

Controlled release

Double emulsion

ABSTRACT

This work describes the encapsulation of a small, hydrophilic molecule (clonidine) into a PLGA matrix to provide sustained release over more than one month after intra-articular administration. The microparticles were prepared using a double emulsion ($w_1/o/w_2$) method followed by evaporation of the organic solvent. To optimize the efficiency of encapsulation and the mean size of the microparticles, which was targeted around 30 μm , the following parameters were modulated: the viscosity and the volume of the organic phase, the molecular weight of the polymer, the volume of the internal and external aqueous phases, the drug loading, the concentration of surfactant, and the stirring parameters. Blends of polymers characterized by different molecular weights (34 000–96 000 Da) as well as copolymers of PLGA-PEG were used to enhance the entrapment of the drug. The pH of the aqueous phases was adjusted to obtain suitable encapsulation efficiency. Characterization was made of the physico-chemical properties of the microparticles, such as their crystallinity (DSC and PXRD) and microstructure (SEM). When performing *in vitro* dissolution studies, controlled release for up to approximately 30 days was achieved with several of the formulations developed. Diffusion was found to be the dominant drug release mechanism at early time points.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The parenteral route of administration commonly leads to systemic and fast therapeutic action. However, local and sustained activity may be also obtained. More particularly, intra-articular preparations allow local diseases to be treated by delivering high concentrations of drugs directly into the joint while keeping concentrations low in other tissues. In this way, systemic side effects are minimized (Thakkar et al., 2004). However, the persistence time of the drug inside the cavity is generally short due to its rapid clearance from the articular fluid. This drawback can be circumvented by means of sustained release (Liang et al., 2005). Sustained release may be obtained by entrapping the drug in microparticles of poly(D,L-lactide-co-glycolide acid) (PLGA) (Anderson and Shive, 1997; Matsumoto et al., 2005). The widespread use of this polymer can be explained by its biocompatibility and biodegradation properties. Indeed, humans can easily metabolize its degradation products (lactic acid and glycolic acid) (Jain, 2000;

Tamber et al., 2005). The molecules entrapped in the microspheres can be released according to different mechanisms, depending on the structure and composition of the polymer as well as on the dimensions, composition, and preparation technique of the delivery systems (Faisant et al., 2002; Hickey et al., 2002). Upon contact with aqueous body fluids, water penetrates into the microparticles, dissolves the drug, and causes polymer chain cleavage. Once dissolved, the drug starts to diffuse out into the surrounding bulk fluid through the degrading polymer network and/or water-filled pores.

Depending on the hydrophilicity or hydrophobicity of the molecule, different effective encapsulating techniques can be applied (Li et al., 2008). For water-soluble drugs, frequently a water-in-oil-in-water ($w/o/w$) double emulsion-solvent evaporation/extraction technique is useful (Vasir et al., 2003).

In this work, clonidine was chosen as a small, hydrophilic model drug to be entrapped in PLGA microspheres to achieve a controlled release over a period of 4–6 weeks. Moreover, researchers have shown that clonidine has some anti-inflammatory effects by reducing the content of pro-inflammatory cytokines IL-1 β and TNF α in tissues and increasing the anti-inflammatory cytokine TGF β (WO2009/101210). The challenge of this study was to achieve high levels of encapsulation, taking into account the characteristics of the model drug chosen. The encapsulation of clonidine is not straightforward: the hydrophobic environment formed by

* Corresponding author at: ULB, Laboratory of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, CP 207 - Bâtiment BC, niveau 6, local 221, Bd du Triomphe accès 2, B-1050 Bruxelles, Belgium. Tel.: +32 2 650 52 54; fax: +32 2 650 52 69.

E-mail address: agaignau@ulb.ac.be (A. Gaignaux).

the polymer is not favourable for encapsulating such small and hydrophilic molecules. Moreover, large aqueous phases are used to form the second w/o/w emulsion, providing a convenient environment for clonidine, which tends to leach out. Most of the previous studies using w/o/w encapsulating methods address high M_w molecules (e.g. proteins such as BSA or polysaccharides such as FITC-dextran) (Mao et al., 2007; Yang et al., 2001) or hydrophobic molecules (e.g. dexamethasone, ibuprofen) (Zhang et al., 2008; Zolnik and Burgess, 2007), both of which are more favourable for being encapsulated in PLGA-based microspheres. In contrast, encapsulating molecules presenting similar characteristics to clonidine (lidocaine HCl) led to an encapsulation efficiency of 27% in the best case (Chen et al., 2004). It has to be pointed out that so far, only limited information is available in the literature concerning the encapsulation of small, hydrophilic compounds.

As intra-articular delivery was targeted, the size of the developed microspheres was reduced to reach a size distribution ranging between 10 and 30 μm . Indeed, smaller particles (0.1–10 μm) tend to be phagocytosed by macrophages (Haerdi-Landerer et al., 2008), whereas larger particles (up to 60 μm) tend to remain dispersed in the joint (Liang et al., 2004). Interestingly, a fraction of particles sized around 10 μm can be internalized in the macrophages, thereby delaying their clearance from the inflamed cavity as well as increasing their concentration directly in the inflammatory cells (Butoescu et al., 2009). In terms of inflammatory response to the injection of PLGA-based microspheres, it had previously been demonstrated that greater inflammation appeared with smaller particles (Liggins et al., 2004). However, other studies showed that particles with a size distribution ranging between 0.1 and 26.5 μm were well-tolerated by the synovial membrane (Horisawa et al., 2002). Nevertheless, this inflammatory reaction should be assessed through both *in vitro* and *in vivo* tests, performed with clonidine-loaded PLGA microspheres.

Various parameters of the w/o/w double emulsion were modified to enhance the encapsulation of clonidine. In addition, agitation parameters were modulated to achieve a suitable size for intra-articular administration. Once the appropriate size was reached, the physico-chemical properties of the clonidine-loaded microspheres, such as the particle size distribution, crystallinity, and morphology were characterized. The release profiles of clonidine from the formulations developed were also determined.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Clonidine HCl was purchased from Chemicals International Group (Holte, Denmark). PLGA 50:50 (RG503, RG504, RG505) and poly[(D,L-lactide-co-glycolide)-co-PEG] diblock (RGPd5055, RGPd50105, RGPd50155) were purchased from Boehringer (Ingelheim, Germany). Poly(vinyl) alcohol (PVA, 87–90% hydrolysed), sodium azide, and sodium octanesulfonate were purchased from Sigma–Aldrich (Munich, Germany). Methylene chloride was supplied from Merck (Darmstadt, Germany) in high performance liquid chromatography (HPLC) grade. Phosphate Buffered Saline (PBS) was purchased from Invitrogen® (Merelbeke, Belgium). Ultrapure water was used during the manufacturing of the microspheres and was obtained from an Elga Purelab Ultra-genetic® water system (Analisis®, Namur, Belgium).

All other chemicals used were of analytical grade.

2.2. Methods

2.2.1. Microsphere preparation

PLGA microspheres containing clonidine were prepared using a double emulsion water-in-oil-in-water ($w_1/o/w_2$) solvent evaporation technique. Briefly, 10 mg of clonidine HCl was dissolved in 1 ml of deionized water (w_1) and 1 g of PLGA was dissolved in 7.5 ml of methylene chloride (o-phase). After pouring w_1 into the o-phase, emulsification was performed for 2 min at 30 000 rpm using an Ultra-Turrax® (model T10-basic, S10N5G, Ika-Werke Staufen, Germany). This first w_1/o emulsion was progressively dispersed into 100 ml of a 0.1% (w/v) aqueous solution of PVA (w_2) using a 20 ml syringe (Terumo, Leuven, Belgium) and a 21 needle (Terumo, Leuven, Belgium). During the addition, emulsification was performed for 2 min at 8000 rpm using an Ultra-Turrax (model T25, S25N18G, Ika-Werke, Staufen, Germany). Afterward, this $w_1/o/w_2$ double emulsion was maintained under agitation using a 4-bladed propeller stirrer (model RW20, R1345, Ika-Werke Staufen, Germany) at 200 rpm for 3 h to allow complete solvent evaporation and microsphere hardening.

The solid microspheres were recovered by filtration through paper filter (Grade 50: 2.7 μm , Whatman, Dassel, Germany) and washed 3 times with distilled water to remove residual PVA and non-encapsulated clonidine. Microspheres were dried under vacuum for 48 h.

To assess the impact of different manufacturing parameters on the encapsulation of the active drug, the basic protocol was modulated step-by-step. To this end, several parameters, such as the M_w of PLGA, polymer type, and initial amount of clonidine HCl were varied.

2.2.2. Drug encapsulation efficiency

The amount of clonidine encapsulated in the PLGA microspheres was determined by dissolving 10 mg of microspheres in 2 ml of methylene chloride. After complete dissolution of the polymer, the flask was filled up to 25 ml with a mixture of water:methyl alcohol (50:50, v/v) to induce precipitation of the polymer. After centrifugation at 5000 rpm for 30 min, an aliquot was filtrated through 0.45 μm PTFE membrane (Millex®, Millipore, Billerica, USA). The filtrated aliquot was injected into a high performance liquid chromatography (HPLC) system, which consisted of an HP 1200 series (Agilent Technologies, Diegem, Belgium) equipped with a quaternary pump, an autosampler, an oven maintaining the temperature at 25 °C, and a diode array detector. The absorption wavelength was set at 210 nm. Separation was achieved using a reverse phase column (Zorbax Eclipse Plus C8, 4.6 mm \times 150 mm, 3.5 μm , Agilent Technologies, Diegem, Belgium). The mobile phase contained a ratio of 50:50 (v/v) water:methyl alcohol, completed by 5.086 $\times 10^{-3}$ mol/l of sodium octanesulfonate and 1 ml of phosphoric acid 85%, and adjusted to pH 3.0 by the addition of sodium hydroxide 1 N. The flow rate was fixed at 1 ml/min.

The encapsulation efficiency (EE) was determined as follows:

$$\text{Encapsulation efficiency (\%)} = \frac{\text{actual clonidine loading}}{\text{theoretical clonidine loading}} \times 100$$

$$\text{Theoretical clonidine loading} = \frac{\text{clonidine}_i}{\text{clonidine}_i + \text{polymer}_i}$$

where clonidine_i and polymer_i were the initial amount of clonidine and of polymer in the formulation.

$$\text{Actual clonidine loading} = \frac{\text{clonidine}_{\text{encaps}}}{\text{clonidine}_i + \text{polymer}_i}$$

where $\text{clonidine}_{\text{encaps}}$ was the amount of clonidine actually encapsulated in the microspheres.

The clonidine content was determined in triplicate for each formulation. The results of encapsulation are expressed as a mean \pm standard deviation. The theoretical drug loadings of the formulations were in the range of 1–17% (w/w). The actual drug loadings of the formulations produced ranged between 0.02 and 0.49% (w/w).

2.2.3. Viscosity of the polymer

The viscosity of the solutions of the polymer was evaluated by means of a Brookfield LVDV-II+ viscometer (Brookfield Engineering Laboratories, USA) equipped with a small adapter and a S18 spindle. The viscosity was measured at 20 rpm and 25 °C. The solutions of polymers were prepared by dissolving a specific amount of PLGA RG505 in 20 ml of methylene chloride to reach concentrations of 5, 10, and 15% (w/v).

2.2.4. Microsphere size analysis

The particle size distribution of the clonidine-loaded microspheres was determined using a Mastersizer Hydro 2000 S laser diffraction method, equipped with a liquid sampling unit (Malvern Instruments Ltd, Worcestershire, UK). Samples were collected after complete solvent evaporation and particle size distribution was measured in water (refractive index = 1.33). The refractive index of the PLGA-based microspheres was set at 1.50, the absorption index was set at 0 and the stirring speed was fixed at 1750 rpm.

The particle size distribution was characterized by the volume median diameter $d(0,5)$ and the $d(0,1)$ and $d(0,9)$, which are the diameters below which remain 10% and 90% of the particles, respectively. The volume mean diameter $D[(4,3)]$ of the particles was also evaluated. The results are hereafter expressed as a mean \pm standard deviation.

2.2.5. Differential scanning calorimetry (DSC) analysis

The glass transition temperature (T_g) of drug-free microspheres and clonidine-loaded microspheres was determined by DSC (DSC Q2000, TA Instruments, Zellik, Belgium). Samples of between 1 and 3 mg were weighed in a Tzero aluminum pan sealed with an aluminium lid (TA Instruments, Zellik, Belgium). The samples were analysed using a heat/cool/heat mode to erase their thermal history. To that purpose, they were heated from -30.0 °C to $+200.0$ °C using a heating rate of 10.0 °C/min, then rapidly cooled down to -30.0 °C at 20.0 °C/min, and then heated again up to $+200.0$ °C at 10.0 °C/min. All experiments were run under a nitrogen flow set at 50 ml/min. The T_g of the polymer was determined during the second heating cycle.

2.2.6. Powder X-ray diffraction (PXRD)

A characteristic X-ray pattern may be obtained for each crystalline phase present in a substance.

The PXRD analyses performed on raw materials and clonidine-loaded PLGA microspheres were made using a Bruker D5000 diffractometer (Siemens, Munich, Germany), equipped with a Cu anode ($\lambda = 1.5406$ Å – 40 kV, 40 mA), a graphite monochromator, and a scintillation detector (2θ : 2–70°, step width: 0.02°).

2.2.7. Scanning electron microscopy (SEM)

The morphology and the microstructure of the particles produced were analysed by SEM, using a JSM-610 Scanning Electron Microscope (Jeol, Tokyo, Japan). The samples were placed on a carbon tape then covered with a thin layer of a conductive material (gold). The metal marking was achieved using a Balzers SCD 030 (Balzers Union Ltd., Liechtenstein).

2.2.8. In vitro drug release studies

Dissolution studies were performed on an appropriate quantity of microspheres to allow 450 μ g of clonidine to be released.

Table 1

Influence of the M_w and the concentration of the PLGA on the characteristics of the clonidine-loaded microspheres (clonidine: 10 mg; PVA: 100 mg; w_1 : 0.5 ml; w_2 : 100 ml).

Parameters	Formulations				
	1	2	3	4	5
PLGA M_w (Da)	34 000	48 000	96 000	96 000	96 000
Polymer (g)	1	1	1	0.5	1.5
o-Phase (ml)	7.5	7.5	7.5	10	10
$D[(4,3)]$ (μ m)	34 ± 2	50 ± 3	53 ± 13	14 ± 4	254 ± 24
EE (%)	5 ± 1	5.9 ± 0.5	10.8 ± 0.1	0.89 ± 0.06	19 ± 3

The microparticles were placed into 100 ml screw cap flasks filled with 75 ml of PBS (pH 7.40 ± 0.05) containing 0.02% (w/v) of sodium azide. The flasks were then horizontally shaken at 85 cycles/min (37.0 ± 0.1 °C). At fixed time intervals ($t = 2$ h, 4 h, 6 h, 24 h, 72 h, 168 h, 264 h, 336 h, 432 h, 504 h, 600 h, 672 h, 768 h, and 840 h), the agitation was stopped for 15 min to allow sedimentation of the particles. One ml of dissolution medium was then withdrawn from each flask by means of a 5 ml syringe (BD Discardit II, VWR, Leuven, Belgium) and transferred into a microcentrifuge tube for centrifugation at 12 000 rpm for 5 min. 250 μ l was then removed from the supernatant and completed with 750 μ l of a dilution phase containing 62.5% (v/v) methyl alcohol, 37.5% (v/v) deionized water, and 6.37×10^{-3} mol/l sodium octanesulfonate. The excess dissolution medium was poured into the dissolution flask after redispersion of the particles remaining at the bottom of the microcentrifuge tube. Finally, 250 μ l of fresh medium was added to maintain a constant volume.

Clonidine concentration was then measured by injecting the samples into the HPLC system described above. For each formulation, the *in vitro* dissolution study was performed in triplicate.

3. Results and discussion

In order to enhance the encapsulation of clonidine in the PLGA-based microspheres, several manufacturing parameters were modified. The EE of a molecule can be altered when varying the M_w of the polymer used, the viscosity of the o-phase, the volume of the aqueous phases (w_1 and w_2), the theoretical drug loading, etc. (Ito et al., 2007). The manufacturing parameters were progressively chosen to obtain ultimately the formulations providing the best results of EE. The influence of the manufacturing parameters on both the EE and the mean size of the particles produced was studied. Indeed, clonidine-loaded PLGA microspheres with optimized EE and a suitable size for intra-articular delivery (10–30 μ m) were targeted.

3.1. Influence of polymer molecular weight and the viscosity of the organic phase

The influence of the M_w of the polymer and of the resulting viscosity of the o-phase on the encapsulation of the drug into the microspheres and on the mean size of the particles is presented in Table 1. High M_w PLGAs are less soluble in methylene chloride than low M_w PLGAs (Ito et al., 2007). For this reason, PLGA 96 000 Da hardened more rapidly and provided higher EE compared to lower M_w polymers (Table 1). Also, the more rapid hardening of the 96 000 Da polymer resulted in larger microspheres, which is consistent with reports in the literature (Yang et al., 2001; Yeo and Park, 2004).

Moreover, the viscosity of the o-phase is increased when higher concentrations of polymer or polymers of higher M_w are introduced into the o-phase (Table 2) (Wischke and Schwendeman, 2008). The EE of formulations 4, 3, and 5 increased with

Table 2

Viscosity of different solutions of PLGA 34 000, 48 000 and 96 000 Da, measured at 20 rpm and 25 °C ($n = 1$).

PLGA	Concentration (%)	Viscosity (mPa S)
PLGA 34 000 Da	5	6
	10	9
	15	15
PLGA 48 000 Da	5	6
	10	10
	15	19
PLGA 96 000 Da	5	14
	10	32
	15	85

increasing viscosity of the o-phase (EE and viscosity values of 0.89, 10.8 and 19%, and 14, 32 and 85 mPa S, respectively). In these formulations, the concentration of the polymer in the o-phase was 5, 10, and 15% (w/v), respectively. A higher viscosity of the o-phase resulting from a higher concentration of polymer formed a more effective barrier against the clonidine leaching into w_2 . However, highly viscous o-phases produced larger particles due to the higher shear forces required to break the droplets (Freitas et al., 2005; Yang et al., 2000). Indeed, in a more viscous solution, the necessary stirring forces are greater, therefore the emulsion droplets produced are less fine, resulting in larger microspheres (Wischke and Schwendeman, 2008).

3.1.1. Influence of blends of polymers and the use of copolymers

Mixing low and high M_w PLGAs can allow for controlled drug release for up to several weeks. In these cases, the low M_w polymer degrades faster and allows the release of the active ingredient during the first few days. The high M_w polymer then progressively degrades (Wischke and Schwendeman, 2008). Some authors have succeeded in increasing the EE by using mixtures of polymers characterized by different M_w (Blanco-Prieto et al., 2004; Graves et al., 2004). In formulations 6–10, PLGA of low (34 000 Da) and high (96 000 Da) M_w were mixed in variable proportions in the o-phase (Table 3). However, in the case of clonidine-loaded microspheres, mixing PLGA of different M_w did not improve the EE compared to formulations in which only one polymer was used (Table 1). Indeed, EE of 10.8% was obtained for the formulation based on only PLGA 96 000 Da whereas EE of 10.6% was obtained when mixing the PLGAs 34 000 and 96 000 Da.

Using copolymers of PLGA and polyethylene glycol (PEG) in formulations 11–13 was intended to increase the hydrophilicity of the microspheres and to offer a more favourable environment for clonidine retention (which is a water-soluble drug) in the polymer solution and ultimately to improve the EE. However, this approach did not appear to be suitable for a small molecule such as clonidine HCl ($M_w = 266.6$ g/mol), because the molecule could easily leach through the hydrophilic parts of the copolymers (Ng et al., 2010). As the hydrophilicity of the copolymers proportionally increased with the percentage of PEG, this led to a gradual decrease in the EE (Table 3). Moreover, SEM pictures showed particles characterized by a very high porosity (PLGA-PEG 5%), which would accelerate the release of the drug (Fig. 1a). The microparticles based on the other copolymers of PLGA-PEG (PEG 10% and PEG 15%) showed the same porosity (data not shown).

3.2. Influence of the volume of w_1 and the theoretical drug loading

The influence of the volume of w_1 and the theoretical drug loading on the EE and the mean size of the particles is shown in Table 4. The EE and mean diameter of the particles decreased when the

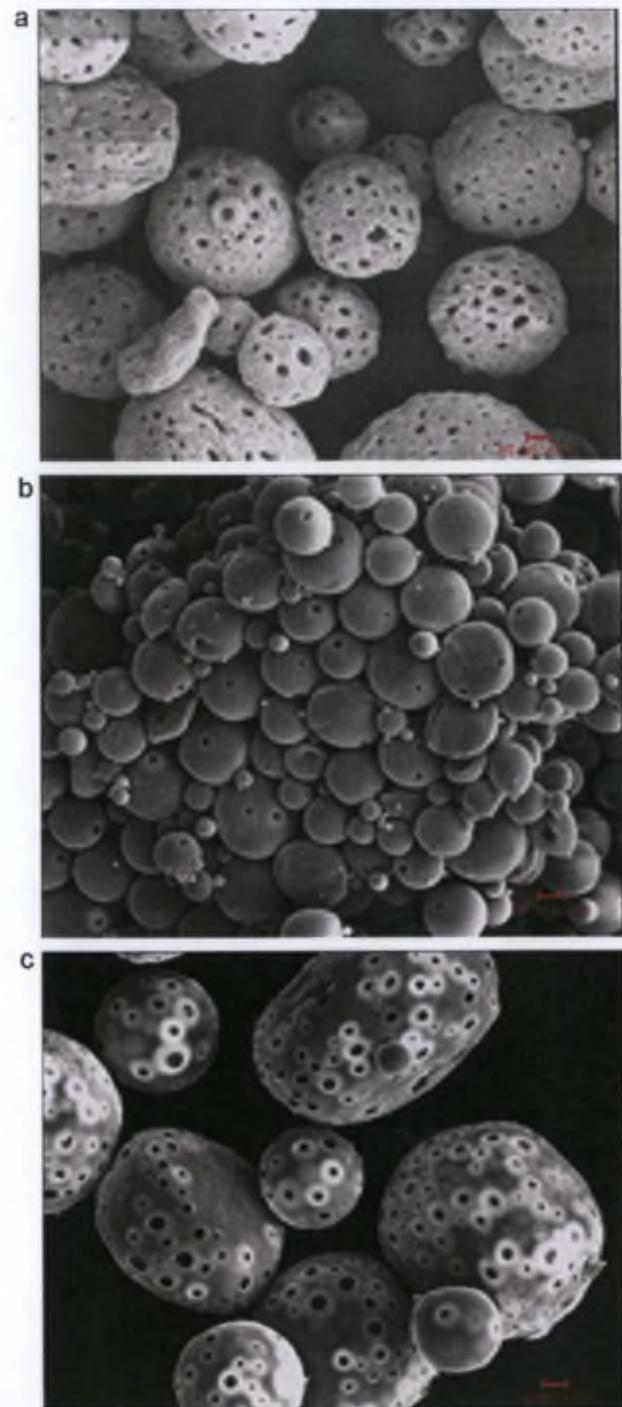


Fig. 1. SEM pictures of (a) formulation 11, (b) formulation 17, and (c) formulation 20 at magnification 500 \times (scale = 10 μ m).

volume of w_1 was increased (Table 4). The volume of w_1 was fixed at 1 ml to allow a substantial reduction in the mean diameter of the particles as well as an enhancement of the EE by modulating other parameters such as the theoretical drug loading or the pH of the aqueous phases. Moreover, an excessive volume of water used to solubilize the drug tended to produce large pores in the microspheres during the hardening of the polymer and the drying stage of the process. Indeed, once the methylene chloride was evaporated, a contraction of the droplets of the first emulsion as well as diffusion of the water into these droplets was observed. Therefore a partitioning between a phase rich in polymer and a phase rich in droplets occurred. During the drying of the microparticles, water

Table 3

Influence of the use of blends of PLGA and the use of copolymers PEG–PLGA on the characteristics of the clonidine-loaded microspheres (o-phase: 7.5 ml; clonidine: 10 mg; PVA: 100 mg; w_1 : 1 ml; w_2 : 100 ml).

Parameters	Formulations								
	6	7	8	9	10	11	12	13	
Polymer type	PLGA	PLGA	PLGA	PLGA	PLGA	PLGA–PEG	PLGA–PEG	PLGA–PEG	
Polymer M_w (kDa)	34–96	34–96	34–96	34–96	34–96	% PEG = 5	% PEG = 10	% PEG = 15	
Polymer (g)	0.5–0.5	0.3–0.7	0.7–0.3	0.1–0.9	0.9–0.1	1	1	1	
$D[4,3]$ (μm)	59 ± 3	44 ± 6	46 ± 10	28 ± 2	44 ± 15	125 ± 15	163 ± 20	107 ± 11	
EE (%)	10.60 ± 0.05	4.5 ± 0.1	5.8 ± 0.3	5.6 ± 0.2	4.3 ± 0.2	13 ± 1	12.1 ± 0.4	11 ± 1	

Table 4

Influence of the volume of the internal aqueous phase and the theoretical drug loading on the characteristics of the clonidine-loaded microspheres (PLGA M_w : 96 000 Da; polymer: 1 g; o-phase: 7.5 ml; PVA: 100 mg; w_2 : 100 ml).

Parameters	Formulations							
	14	15	16	17 = 15	18	19	20	
Clonidine (mg)	10	10	10	10	40	100	200	
w_1 (ml)	0.5	1	2	1	1	1.5 ^a	3 ^a	
$D[4,3]$ (μm)	284 ± 35	93 ± 7	44 ± 4	93 ± 7	31 ± 2	42 ± 2	346 ± 4	
EE (%)	10.7 ± 0.1	6 ± 1	2.7 ± 0.3	6 ± 1	3.52 ± 0.04	1.52 ± 0.04	1.13 ± 0.09	

^a Adaptation of w_1 volume in function of the solubility of clonidine HCl (≈ 80 mg/ml in water).

left the inside of the microparticles created interconnecting channels (Sun et al., 2009). Obviously, the bigger the initial volume of w_1 , the bigger were the pores. Moreover, this could lead to a faster release of the entrapped molecule.

The gradual increase of the theoretical drug loading from 1% to 17% (w/w) (10–200 mg) in formulations 17–20 led to a decrease in the EE (for the formulations 17–20, EE = 6%, 3.52%, 1.52% and 1.13%, respectively) (Table 4). The progressive increase in the concentration gradient caused by the increase in the drug concentration in the droplets of the w/o emulsion led to increasing losses of clonidine into the external aqueous phase (Mao et al., 2007; Yang et al., 2001). Formulation 20 presented a higher porosity due to the larger w_1 used to solubilize the entire amount of clonidine (200 mg/3 ml). The dispersed phase created interconnected channels during the evaporation of the solvent and drying step of the produced microparticles (Fig. 1c). Formulation 17 contained a lower number of pores, probably due to the smaller volume of w_1 (10 mg/1 ml) (Fig. 1b).

3.3. Influence of the volume of w_2 and the concentration of surfactant in w_2

The influence of the volume of w_2 and the concentration of surfactant in w_2 on the EE and the mean size of the particles is shown in Table 5. Using a volume of 100 ml for w_2 in formulation 22 instead of the 50 ml in formulation 21 led to an increase of the mean diameter of the microspheres (for formulations 22 and 21, $D[4,3]$ = 96 μm and 23 μm , respectively), probably due to the less effective agitation and shearing forces involved in breaking up the droplets, thereby forming larger particles (Chaisri et al., 2009). Nevertheless, the EE

Table 5

Influence of the volume of the external aqueous phase and the concentration of surfactant on the characteristics of the clonidine-loaded microspheres (PLGA M_w : 96 000 Da; polymer: 1 g; o-phase: 7.5 ml; clonidine: 10 mg; w_1 : 1 ml).

Parameters	Formulations						
	21	22 = 15	23 = 15	24	25	26	
PVA (mg)	100	100	100	1000	3000	5000	
w_2 (ml)	50	100	100	100	100	100	
$D[4,3]$ (μm)	26 ± 3	93 ± 7	93 ± 7	76 ± 1	64 ± 1	46 ± 3	
EE (%)	2.79 ± 0.03	6 ± 1	6 ± 1	8 ± 4	8 ± 2	1.8 ± 0.6	

was improved by increasing the volume of w_2 (for formulations 22 and 21, EE = 6% and 2.79%, respectively), probably due to the larger aqueous volume available for the extraction of the organic solvent, which occurred faster and resulted in accelerated polymer hardening and the formation of larger particles that entrapped larger quantities of drug (Yeo and Park, 2004).

According to the abundant data available in literature, poly(vinyl) alcohol (PVA) was incorporated as a surfactant in w_2 (Table 5). The concentration of PVA did not notably influence the EE up to a threshold of 5% (m/v) in formulation 26. Indeed, the EE of hydrophilic drug-loaded microspheres seemed to be influenced only by excessive PVA concentrations. In these cases high contents of PVA remained in water surface layers surrounding the microspheres, which seemed to lower the EE (Ito et al., 2007). However, increasing the concentration of PVA did affect the mean size of the microspheres produced. Indeed, high concentrations of surfactant in w_2 led to smaller microspheres (for formulations 23–26, $D[4,3]$ = 93 μm , 76 μm , 64 μm and 46 μm , respectively). The surfactant prevents the coalescence of the droplets during the second emulsification step and facilitates the creation of smaller droplets (due to reduced surface tensions). In addition, the surfactant increases the viscosity of the external aqueous phase, resulting in higher shear forces and the creation of smaller droplets (Chaisri et al., 2009; Mainardes and Evangelista, 2005).

3.4. Influence of the pH of the aqueous phases

As clonidine has pH-dependent solubility, the influence of four different pH values on the characteristics of microspheres was evaluated using several buffers (Table 6). The pK_a of clonidine is 8.05.

The pH of both w_1 and w_2 markedly influenced the EE of clonidine. Indeed, this molecule contains two atoms of nitrogen that can be protonated. At a pH value close to the pK_a , each hydrogen atom carries a lone pair of electrons. These pairs of electrons can increase the electrophile interactions existing between clonidine and PLGA, such as hydrogen bonds, or acid–base interactions. The EE was effectively increased at pH values close to the pK_a of clonidine (Table 6) (for formulations 31–33, EE = 20.2%, 21.3% and 16.6%, respectively).

At a pH value of 3, the pairs of electrons were not available to create those interactions. Indeed, at this pH value distant from the pK_a , clonidine cannot interact with the polymer by electrophile

Table 6

Influence of the pH of the aqueous phases on the characteristics of the clonidine-loaded microspheres (PLGA M_w : 96 000 Da; polymer: 1 g; o-phase: 7.5 ml; clonidine: 10 mg; w_1 : 1 ml; PVA: 100 mg; w_2 : 100 ml).

Parameters	Formulations							
	27	28	29	30	31	32	33	34
w_1 : pH – buffer	3 – Citr.	7 – Phos.	8 – Bor.	10 – Bor.	3 – Citr.	7 – Phos.	8 – Phos.	10 – Bor.
w_2 : pH – buffer	–	–	–	–	8 – Phos.	8 – Phos.	8 – Phos.	8 – Phos.
$D[4,3]$ (μm)	86 ± 2	42 ± 2	104 ± 3	115 ± 2	140 ± 17	23 ± 6	26 ± 5	40 ± 8
EE (%)	0.79 ± 0.03	3.86 ± 0.08	13 ± 0.4	17.9 ± 0.6	20.2 ± 0.3	21.3 ± 0.5	16.6 ± 0.6	9.3 ± 0.2

Citr. = citrate buffer, Bor. = borate buffer, and Phos. = phosphate buffer.

interactions. The EE was extremely low when w_1 was buffered at pH 3 (Table 6). In contrast, the EE was increased when w_2 was buffered at pH 8 in formulations 31–34 (Table 6), probably due to the availability of the pairs of electrons. It should be noted that the highest EE results were obtained with a borate buffer. Indeed, when w_1 and w_2 were buffered with different buffers that had the same pH value, the results of EE obtained with the borate buffer were always higher. They were comprised between 13 and 32% (not all data are shown). The highest EE of 32% was obtained by buffering w_1 at pH 3 using a citrate buffer and w_2 at pH 8 using a borate buffer. Nevertheless, this buffer is not accepted for parenteral use by the Food and Drug Administration (FDA) (www.fda.gov, 2011). Therefore, formulations 29, 30, and 34 were not selected for further experimentation. The optimized formulations providing the best results of EE were the formulations 31 and 32.

3.5. Influence of the stirring parameters

It is commonly recognized that the degree of agitation influences the stability of the emulsion. Suitable agitation provides the required energy to the system to break up the droplets of the dispersed phase. As the size distribution of the developed microspheres was targeted between 10 and 30 μm , the mean diameter of the microspheres had to be reduced. Suitable stirring parameters (i.e. rate, time, and equipment), had to be selected to obtain reproducible size distributions (Table 7).

The stirring parameters included in procedure C provided the smallest particles. Increasing the stirring rate during the first emulsification step increased the energy introduced into the system and improved the dispersion of w_1 into smaller, well-defined droplets.

Moreover, even if the stirring rate used in the second emulsion was lower than that in the other procedures (A and B), the final mean diameter of the microspheres was smaller, indicating that the determining step was the first emulsification. Indeed, during the second emulsification, agitation was applied to disperse the o/ w_1 emulsion within w_2 , but this had to be sufficiently low to avoid breaking up the preformed o/ w_1 droplets (Pal, 2011). Finally, although the stirring rate applied during the evaporation step was similar regardless of the method used, the agitation appliances were not identical, neither were the shearing forces produced by them.

Several formulations described previously were manufactured again using parameters C. The resulting size distributions of the particles were comprised between 12 and 36 μm (data not shown) which corresponded to the mean size required for intra-articular delivery.

3.6. Physico-chemical characterization of the developed microspheres

The glass transition temperature (T_g) of the raw material PLGA 96 000 Da was determined by DSC. In parallel, the T_g of a formulation free of clonidine [PLGA 96 000 Da: 1 g; o-phase: 7.5 ml; w_1 : 1 ml; PVA: 100 mg; w_2 : 100 ml], a formulation made without buffering the aqueous phases [PLGA 96 000 Da: 1 g; o-phase: 7.5 ml; clonidine: 200 mg; w_1 : 1 ml; PVA: 100 mg; w_2 : 100 ml], and a formulation made with buffering of the aqueous phases [PLGA 96 000 Da: 1 g; o-phase: 7.5 ml; clonidine: 200 mg; w_1 : 1 ml (pH 3–citrate); PVA: 100 mg; w_2 : 100 ml (pH 8–phosphate)] were also determined (Fig. 2).

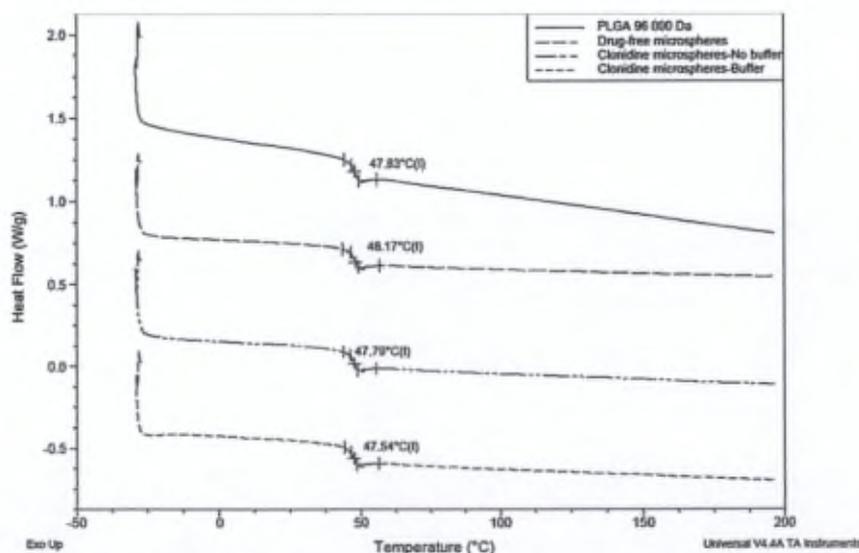


Fig. 2. DSC analysis (heat/cool/heat mode) of raw PLGA, drug-free microspheres, and clonidine-loaded microspheres manufactured with and without buffers. T_g of the polymer determined during the second heating cycle (second heating cycle plot; first heating and cooling cycles not shown).

Table 7

Influence of the stirring parameters (rate, time and device) on the characteristics of clonidine-loaded microspheres (PLGA 96 000 Da; 1 g; o-phase: 7.5 ml; clonidine: 10 mg; w₁: 1 ml; PVA: 100 mg; w₂: 100 ml).

Parameters	A	B	C
First emulsion			
Stirring rate (rpm)	24 000	24 000	30 000
Stirring time (s)	120	300	120
Second emulsion			
Stirring rate (rpm)	17 500	17 500	8000
Stirring time (s)	120	120	120
Evaporation			
Stirring equipment	Magnetic stirring	Magnetic stirring	4-Bladed propeller stirrer
Stirring rate (rpm)	200	200	200
Stirring time (h)	3	3	3
D[4,3] (μm)	93 ± 7	125 ± 35	20 ± 2
EE (%)	6 ± 1	9.2 ± 0.1	12 ± 2

It seemed that clonidine was present in an amorphous state and/or dissolved in the polymeric matrix because no drug crystals were detected at the surface of the particles (Fig. 1), nor was any endothermic reaction observed during the first heating cycle of the DSC scans. Also, no crystallization phenomenon was observed during the second heating cycle (data not shown) (Klose et al., 2006). This hypothesis was confirmed by PXRD analysis (Fig. 3). As can be seen in Fig. 2, the T_g of the raw PLGA 96 000 Da was not significantly altered by the preparation of drug-free and clonidine-loaded microspheres, in the presence and absence of buffer. Moreover, no melting (endothermic reaction) or crystallization phenomenon (exothermic reaction) was observed. The polymer forming the microspheres was not subjected to crystallization during the manufacturing process.

The PXRD patterns of the raw material clonidine HCl exhibited sharp peaks and indicated its crystalline state. In contrast, the absence of peaks in the PXRD patterns of the raw material PLGA confirmed its expected amorphous state (Fig. 3a) (Hacker and Mikos, 2008). The drug-free microspheres and clonidine-loaded microspheres manufactured with and without phosphate buffer showed

no XRD peaks, indicating that the process did not alter the physical state of the polymer and confirming that clonidine was present in an amorphous state and/or dissolved in the polymeric matrices (Fig. 3b). For instance, the incorporation of ibuprofen in PLGA-based microparticles also led to an amorphous state of the drug (Fernandez-Carballido et al., 2004). In contrast, acyclovir was in the crystalline state when encapsulated in PLGA-based microspheres (Martinez-Sancho et al., 2004).

However, due to the low content of clonidine in the microspheres, the results of the PXRD and DSC studies should be considered with caution (even if the analysed formulations exhibited the more elevated drug contents in this study). Indeed, low amounts of crystalline clonidine might be hidden by the large amounts of amorphous polymer.

3.7. *In vitro* drug release and mathematical modelling

Mechanistically realistic mathematical models can help to better understand the importance of the mass transport phenomena involved in biodegradable microparticles, such as diffusion, dissolution, erosion, etc. (Fredenberg et al., 2011; Siepmann and Siepmann, 2008). Moreover, *in silico* simulations can allow for quantitative predictions of the effects of formulation and manufacturing parameters on the resulting drug release kinetics, facilitating device optimization (Siepmann and Siepmann, 2011).

In this work, the following analytical solution of Fick's second law of diffusion was used to describe clonidine release from PLGA-based microparticles at early time points:

$$\frac{M_{\infty} - M_t}{M_{\infty}} = \frac{6}{\pi^2} \cdot \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n^2} \cdot \exp\left(-\frac{n^2 \cdot \pi^2}{R^2} \cdot D \cdot t\right) \quad (1)$$

where M_{∞} and M_t denote the absolute cumulative amounts of clonidine released at the end of the initial release phase and at time t , respectively; R represents the radius of the microparticles; and D is the apparent diffusion coefficient of the drug within the system.

The model considers that the microparticles were spherical in shape, that perfect sink conditions were maintained throughout the experiments, that diffusional mass transport is release rate limiting, and that the mobility of the drug in the polymeric system does not significantly vary during the early phase of drug release. In fact, the model does not consider polymer degradation and was, thus, only applied to the early phase of drug release. At later stages, the degradation of the polymer becomes significant, leading to increased drug mobility. For a quantitative description of these later phases, more comprehensive mathematical theories based on more detailed experimental data are required, including the decrease in M_w and microparticle size (Faisant et al., 2002).

The symbols in Fig. 4 show the experimentally determined release kinetics of clonidine from microparticles based on PLGA

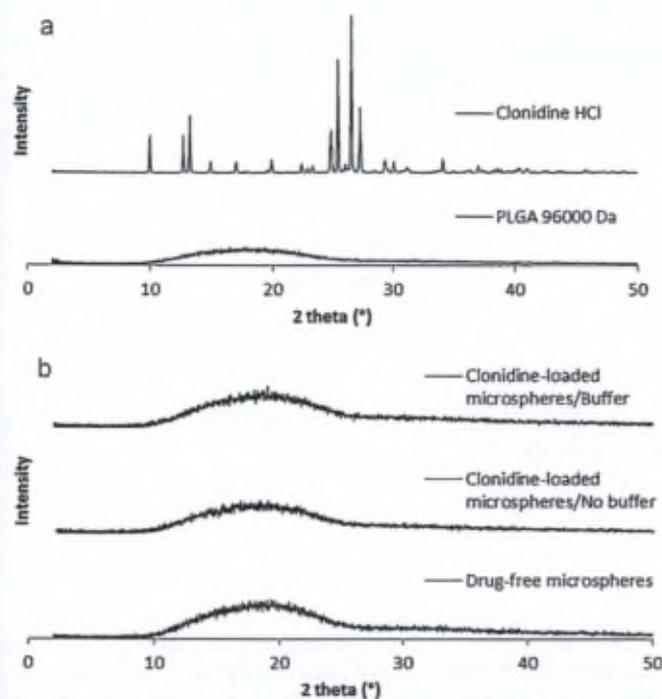


Fig. 3. PXRD patterns of (a) raw PLGA and raw clonidine HCl, and (b) drug-free microspheres and clonidine-loaded microspheres manufactured with and without phosphate buffer.

Table 8

Apparent diffusion coefficient of clonidine (determined by fitting Eq. (1) to experimentally determined drug release at early time points) and volume mean diameter in the investigated microparticles (PLGA: 1 g; o-phase: 7.5 ml; clonidine: 10 mg; w_1 : 1 ml; PVA: 100 mg; w_2 : 100 ml). The initial formulations previously presented were manufactured following the stirring parameters of the procedure C, which provided suitable mean particle size.

Formulation	Corresponding initial formulation	D , 10^{-13} cm ² /s		$D[4,3]$ (μ m)
		Mean	SD	
PLGA 34 000 Da	1	1.1	0.0	13.0
PLGA 48 000 Da	2	0.7	0.0	14.4
PLGA 96 000 Da = Clo: 10 mg	3	2.5	0.1	20.2
Clo: 200 mg	20	2.5	0.0	19.5
w_1 : pH 3/Clo: 10 mg	31	1.1	0.1	17.5
w_1 : pH 3/Clo: 200 mg	-	0.7	0.0	15.6

34 000, 48 000, and 96 000 Da. Clearly, the relative release rate decreased with increasing polymer M_w . This might at least partially be attributed to an increased degree of polymer-polymer entanglement at increased M_w , resulting in denser networks and reduced drug mobility. In addition, the mean particle size increased from 13 to 20 μ m when increasing the M_w from 34 000 to 96 000 Da (as discussed above). Thus, the distances to be overcome by the incorporated drug molecules increased. Furthermore, the microparticle structure is likely to be different, due to the altered polymer precipitation rate mentioned above. Consequently, the amount of drug available for rapid release at early time points is different. Fitting Eq. (1) to the experimentally measured clonidine release at early time points resulted in good agreement between theory and experiments (curves and symbols in Fig. 4, coefficient of determination R^2 comprised between 0.89 and 0.99). Thus, diffusion is likely to play a major role in the control of drug release during the burst phase. Based on these calculations, the apparent diffusion coefficients given in Table 8 could be determined. Interestingly, the apparent diffusivity of the drug was highest in the case of 96 000 Da PLGA-based microparticles, intermediate for 34 000 Da PLGA-based microparticles and lowest for 48 000 Da PLGA-based microparticles. This might at least partially be attributable to the superposition of the following two phenomena, with inverse effects on drug mobility: (i) with increasing polymer M_w the degree of PLGA entanglement increases and, thus, macromolecular mobility decreases (and, hence, drug mobility), (ii) with increasing polymer M_w the PLGA precipitation rate during microparticle preparation increases, resulting in increased system porosity and, thus, increased drug mobility.

Fig. 5 shows the impact of the amount of clonidine used for microparticle preparation (10 or 200 mg) and of potential buffering of the aqueous phases ($w_1 = \text{pH } 3$, $w_2 = \text{pH } 8$) on drug release from microparticles based on 96 000 Da PLGA. The symbols

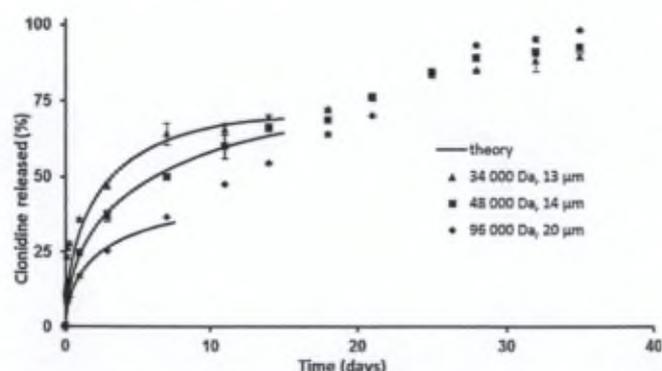


Fig. 4. *In vitro* release of clonidine from microparticles at 37 °C in PBS buffer (pH 7.4) as a function of the M_w of PLGA and mean particle size ($n = 3$, mean \pm s.d.) (constant manufacturing parameters: PLGA: 1 g; o-phase: 7.5 ml; clonidine: 10 mg; w_1 : 1 ml; PVA: 100 mg; w_2 : 100 ml). The symbols represent the experimentally measured drug release kinetics, the curves the fitted theory (Eq. (1)).

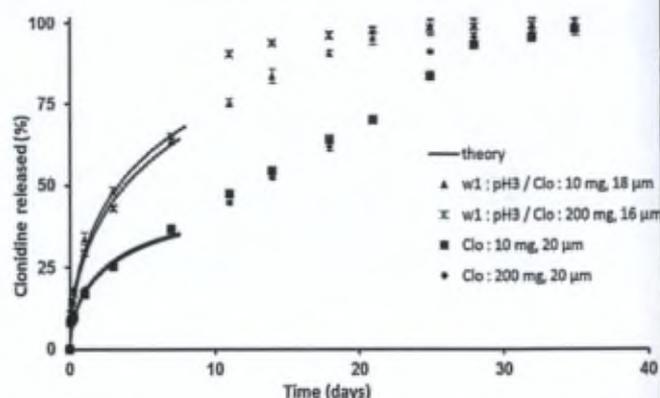


Fig. 5. *In vitro* release of clonidine from microparticles at 37 °C in PBS buffer (pH 7.4) as a function of the amount of drug used and potential buffering of the inner aqueous phase to pH 3 ($n = 3$, mean \pm s.d.) (constant manufacturing parameters: PLGA: 1 g; o-phase: 7.5 ml; w_1 : 1 ml; PVA: 100 mg; w_2 : 100 ml). The symbols represent the experimentally measured drug release kinetics, the curves the fitted theory (Eq. (1)).

represent the experimental results, the curves the fitted theory (Eq. (1)). Clearly, the amount of clonidine used for microparticle preparation did not significantly affect the resulting drug release kinetics, whether the aqueous phases were buffered or not. This might at least partially be explained by the relatively low practical drug loadings of these systems (<1%). Furthermore, it can be seen that buffering the w_1 phase significantly accelerated the drug release. This might be explained by the decrease in particle size (16/18 μ m versus 20 μ m) and/or alterations in the microparticle structure. Interestingly, again diffusion is likely to be the dominant mass transport mechanisms at early time points, as indicated by the good agreement between theory (curves) and experiment (symbols) in all cases (Fig. 5) (coefficient of determination R^2 comprised between 0.97 and 0.99). Based on these calculations, the apparent clonidine diffusivities given in Table 8 could be determined.

4. Conclusion

The influence of the manufacturing parameters on the EE, the mean diameter of the microspheres produced by a w/o/w emulsion, and the *in vitro* release of drug was assessed by the use of a small, hydrophilic model drug, clonidine. Such type of molecule was a challenge to encapsulate in PLGA-based microparticles due to its particular physico-chemical characteristics (low M_w , water solubility). Indeed, clonidine had a tendency to leach out of the organic phase containing the hydrophobic polymer towards w_2 which offered a much more favourable environment. The literature is abundant concerning the encapsulation of large hydrophilic or small hydrophobic molecules in PLGA-based microparticles with high EE. Clonidine presented all the detrimental characteristics that lead to poor encapsulation. Therefore, a work of optimization was performed. Each parameters of the double emulsion was

modulated. The highest EE were obtained when w_1 was adjusted to a pH value of 3 or 7 and w_2 was adjusted to a pH of 8, probably due to the increase in the interactions between clonidine and PLGA. The optimization work provided suitable EE that reached $\approx 20\%$. These formulations will be used for further experiments, such as the evaluation of the polymer degradation and the evaluation of the cytotoxicity of the formulations on an *in vitro* model.

The stirring parameters were also optimized to achieve a suitable mean size of microparticles for intra-articular delivery (10–30 μm). The best sizes of microparticles were obtained with a high stirring speed during the first emulsification and a lower speed during the second emulsification.

An appropriate mathematical model was used to quantify drug release at early time points. It could be shown that diffusional mass transport is likely to be dominant and the apparent diffusion coefficient D of clonidine within the different types of microparticles could be determined.

Acknowledgement

This work was part of the JOINT-AIC research project, supported by the BIOWIN Health Cluster of the Walloon Region.

References

- Anderson, J.M., Shive, M.S., 1997. Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 28, 5–24.
- Blanco-Prieto, M.J., Campanero, M.A., Besseghir, K., Heimigatner, F., Gander, B., 2004. Importance of single or blended polymer types for controlled *in vitro* release and plasma levels of a somatostatin analogue entrapped in PLA/PLGA microspheres. *J. Control. Release* 96, 437–448.
- Butoescu, N., Jordan, O., Doelker, E., 2009. Intra-articular drug delivery systems for the treatment of rheumatic diseases: a review of the factors influencing their performance. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 73, 205–218.
- Chaisri, W., Hennink, W.E., Okonogi, S., 2009. Preparation and characterization of cephalexin loaded PLGA microspheres. *Curr. Drug Deliv.* 6, 69–75.
- Chen, P.-C., Park, Y.J., Chang, L.-C., Kohane, D.S., Bartlett, R.H., Langer, R., Yang, V.C., 2004. Injectable microparticle-gel system for prolonged and localized lidocaine release. I. *In vitro* characterization. *J. Biomed. Mater. Res.* 70, 412–419.
- Faisant, N., Siepmann, J., Benoit, J.P., 2002. PLGA-based microparticles: elucidation of mechanisms and a new, simple mathematical model quantifying drug release. *Eur. J. Pharm. Sci.* 15, 355–366.
- Fernandez-Carballido, A., Herrero-Vanrell, R., Molina-Martinez, L.T., Pastoriza, P., 2004. Biodegradable ibuprofen-loaded PLGA microspheres for intraarticular administration: effect of Labrafil addition on release *in vitro*. *Int. J. Pharm.* 279, 33–41.
- Food and Drug Administration (FDA) website, 2011. Inactive Ingredient Search for Approved Drug Products Database. <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/iig/index.cfm>, consulted in April 2011.
- Fredenberg, S., Wahlgren, M., Reslow, M., Axelsson, A., 2011. The mechanisms of drug release in poly(lactic-co-glycolic acid)-based drug delivery systems – a review. *Int. J. Pharm.* 415, 34–52.
- Freitas, S., Merkle, H.P., Gander, B., 2005. Microencapsulation by solvent extraction/evaporation: reviewing the state of the art of microsphere preparation process technology. *J. Control. Release* 102, 313–332.
- Graves, R.A., Pamujula, S., Moiseyev, R., Freeman, T., Bostanian, L.A., Mandal, T.K., 2004. Effect of different ratios of high and low molecular weight PLGA blend on the characteristics of pentamidine microcapsules. *Int. J. Pharm.* 270, 251–262.
- Hacker, M.C., Mikos, A.G., 2008. Synthetic polymers. *Regen. Med.* 35, 604–635.
- Haerdi-Landerer, M.C., Suter, M.M., Steiner, A., Wittenbrink, M.M., Pickl, A., Gander, B.A., 2008. *In vitro* cell compatibility and antibacterial activity of microencapsulated doxycycline designed for improved localized therapy of septic arthritis. *J. Antimicrob. Chemother.* 61, 332–340.
- Hickey, T., Kreutzer, D., Burgess, D.J., Moussy, F., 2002. Dexamethasone/PLGA microspheres for continuous delivery of an anti-inflammatory drug for implantable medical devices. *Biomaterials* 23, 1649–1656.
- Horisawa, E., Kubota, K., Tuboi, I., Sato, K., Yamamoto, H., Takeuchi, H., Kawashima, Y., 2002. Size-dependency of DL-lactide/glycolide copolymer particulates for intra-articular delivery system on phagocytosis in rat synovium. *Pharm. Res.* 19, 132–139.
- Ito, F., Fujimori, H., Makino, K., 2007. Incorporation of water-soluble drugs in PLGA microspheres. *Colloids Surf. B: Biointerfaces* 54, 173–178.
- Jain, R.A., 2000. The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. *Biomaterials* 21, 2475–2490.
- Klose, D., Siepmann, F., Elkharrak, K., Krenzlin, S., Siepmann, J., 2006. How porosity and size affect the drug release mechanisms from PLGA-based microparticles. *Int. J. Pharm.* 314, 198–206.
- Li, M., Rouaud, O., Poncelet, D., 2008. Microencapsulation by solvent evaporation: state of the art for process engineering approaches. *Int. J. Pharm.* 363, 26–39.
- Liang, L.S., Jackson, J., Min, W., Risovic, V., Wasan, K.M., Burt, H.M., 2004. Methotrexate loaded poly(L-lactic acid) microspheres for intra-articular delivery of methotrexate to the joint. *J. Pharm. Sci.* 93, 943–956.
- Liang, L.S., Wong, W., Burt, H.M., 2005. Pharmacokinetic study of methotrexate following intra-articular injection of methotrexate loaded poly(L-lactic acid) microspheres in rabbits. *J. Pharm. Sci.* 94, 1204–1215.
- Liggins, R.T., Cruz, T., Min, W., Liang, L., Hunter, W.L., Burt, H.M., 2004. Intra-articular treatment of arthritis with microsphere formulations of paclitaxel: biocompatibility and efficacy determinations in rabbits. *Inflamm. Res.* 53, 363–372.
- Mainardes, R.M., Evangelista, R.C., 2005. PLGA nanoparticles containing praziquantel: effect of formulation variables on size distribution. *Int. J. Pharm.* 290, 137–144.
- Mao, S., Xu, J., Cai, C., Germershaus, O., Schaper, A., Kissel, T., 2007. Effect of WOW process parameters on morphology and burst release of FITC-dextran loaded PLGA microspheres. *Int. J. Pharm.* 334, 137–148.
- Martinez-Sancho, C., Herrero-Vanrell, R., Negro, S., 2004. Study of gamma-irradiation effects on acyclovir poly(D,L-lactide-co-glycolic) acid microspheres for intravitreal administration. *J. Control. Release* 99, 41–52.
- Matsumoto, A., Matsukawa, Y., Suzuki, T., Yoshino, H., 2005. Drug release characteristics of multi-reservoir type microspheres with poly(DL-lactide-co-glycolide) and poly(DL-lactide). *J. Control. Release* 106, 172–180.
- Ng, S.M., Choi, J.Y., Han, H.S., Huh, J.S., Lim, J.O., 2010. Novel microencapsulation of potential drugs with low molecular weight and high hydrophilicity: hydrogen peroxide as candidate compound. *Int. J. Pharm.* 384, 120–127.
- Pal, R., 2011. Rheology of simple and multiple emulsions. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 16, 41–60.
- Siepmann, J., Siepmann, F., 2008. Mathematical modeling of drug delivery. *Int. J. Pharm.* 364, 328–343.
- Siepmann, J., Siepmann, F., 2011. Modeling of diffusion controlled drug delivery. *J. Control. Release*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.10.006>
- Sun, L., Zhou, S., Wang, W., Li, X., Wang, J., Weng, J., 2009. Preparation and characterization of porous biodegradable microspheres used for controlled protein delivery. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* 345, 173–181.
- Tamber, H., Johansen, P., Merkle, H.P., Gander, B., 2005. Formulation aspects of biodegradable polymeric microspheres for antigen delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57, 357–376.
- Thakkar, H., Sharma, R.K., Mishra, A.K., Chuttani, K., Murthy, R.S.R., 2004. Efficacy of chitosan microspheres for controlled intra-articular delivery of celecoxib in inflamed joints. *J. Pharm. Pharmacol.* 56, 1091–1099.
- Vasir, J., Tambewkar, K., Garg, S., 2003. Bioadhesive microspheres as a controlled drug delivery system. *Int. J. Pharm.* 255, 13–32.
- (WO2009/101210) Pharmaceutical composition for use in the treatment or prevention of osteoarticular diseases. <http://www.wipo.int/>
- Wischke, C., Schwendeman, S.P., 2008. Principles of encapsulating hydrophobic drugs in PLA/PLGA microparticles. *Int. J. Pharm.* 364, 298–327.
- Yang, Y.Y., Chung, T.S., Bai, X.L., Chan, W.K., 2000. Effect of preparation conditions on morphology and release profiles of biodegradable polymeric microspheres containing protein fabricated by double-emulsion method. *Chem. Eng. Sci.* 55, 2223–2236.
- Yang, Y.Y., Chung, T.S., Ng, N.P., 2001. Morphology, drug distribution, and *in vitro* release profiles of biodegradable polymeric microspheres containing protein fabricated by double-emulsion solvent extraction/evaporation method. *Biomaterials* 22, 231–241.
- Yeo, Y., Park, K., 2004. Control of encapsulation efficiency and initial burst in polymeric microparticle systems. *Arch. Pharm. Res.* 27, 1–12.
- Zhang, L., Liu, L., Qian, Y., Chen, Y., 2008. The effects of cryoprotectants on the freeze-drying of ibuprofen-loaded solid lipid microparticles (SLM). *Eur. J. Pharm. Sci.* 69, 750–759.
- Zolnik, B.S., Burgess, D.J., 2007. Effect of acidic pH on PLGA microsphere degradation and release. *J. Control. Release* 122, 338–344.

RESEARCH ARTICLE

Evaluation of the degradation of clonidine-loaded PLGA microspheres

Amélie Gaignaux, Jonathan Réeff, Carine De Vriese, Jonathan Goole, and Karim Amighi

Laboratory of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, Université Libre de Bruxelles, City of Brussels, Belgium

Abstract

Context: The release of an encapsulated drug is dependent on diffusion and/or degradation/erosion processes.

Objective: This work aimed to better understand the degradation mechanism of clonidine-loaded microparticles.

Methods: Gel permeation chromatography was used to evaluate the degradation of the polymer. The water-uptake and the weight loss were determined gravimetrically. The swelling behaviour and the morphological changes of the formulations were observed by microscopy. The glass transition temperature and the crystallinity were also determined by differential scanning calorimetry and X-ray diffraction, respectively. The pH of the medium and inside the microspheres was assessed.

Results: The microspheres captured a large amount of water, allowing a decrease in the molecular weight of the polymer. The pH of the medium decreased after release of the degradation products and the pH inside the microparticles remained constant due to the neutralization of these acidic products.

Conclusion: Clonidine and buffers both had an action on the degradation.

Keywords

Acidic degradation, controlled release, erosion, microparticles, poly(D,L-lactide-co-glycolide acid)

History

Received 17 July 2012
Revised 12 February 2013
Accepted 18 February 2013
Published online 28 March 2013

Introduction

For years, bioerodible polymers such as aliphatic polyesters (e.g. poly(lactide) acid (PLA) and poly(lactide-co-glycolide) acid (PLGA)) have been used in medical and pharmaceutical fields (Wang et al., 1990; von Burkersroda et al., 2002; Pollauf et al., 2005). These polymers are commonly used in parenteral drug delivery formulations to achieve a controlled release of a drug in a targeted environment (e.g. as implants or microparticles). The drug encapsulated in microspheres can be released according to diffusion and/or erosion processes (Blanco et al., 2006). The degradation rate of the polymer controls both of these release mechanisms.

Consequently to the infiltration of water or physiological fluids into the microspheres, the degradation process of a polymer usually occurs by hydrolysis of the ester bonds building the backbone of the polymer (Li, 1999). This mechanism leads to the formation of carboxyl and hydroxyl end groups such as oligomers and, ultimately, monomers (lactic and glycolic acids) that are biocompatible (Körber, 2010). Indeed, these short chain acids are metabolized via the Krebs cycle and eliminated from the human body as carbon dioxide and water (Dunne et al., 2000). As acidic conditions are favourable to the degradation of PLGA, this phenomenon generally promotes its degradation by autocatalysis (Klose et al., 2008). Indeed, the diffusion of dissolution medium and/or short chain acids generally occurs more slowly than the production of the acidic degradation products. The internal pH of the microspheres as well as the pH of the dissolution medium is therefore inclined to drop (Siepmann et al., 2005).

Microparticles that contain degradable polymers can erode heterogeneously (surface erosion) or homogeneously (bulk erosion), depending on their hydrophobicity, thickness and the reactivity of their functional groups (Heller, 1980; Sackett and Narasimhan, 2010). In the surface eroding polymers (e.g. polyanhydrides), the degradation phenomenon occurs more quickly than the imbibition of water into the microparticles, which leads to the loss of polymer fractions only at the surface. In the bulk eroding polymers (e.g. polyesters), water infiltration into the microparticles happens faster than the degradation of the polymer itself. Therefore, the erosion process occurs in the bulk of the microspheres due to a complete wetting of the system, allowing ester linkages to be cleaved throughout the entire particle (Göpferich, 1996; Siepmann and Göpferich, 2001).

Many factors influence or are linked to the degradation and erosion phenomena. For instance, the degradation rate is influenced by the type of chemical bond present in the polymer, the pH and temperature of the external environment, the copolymer composition (e.g. lactide/glycolide ratio in PLGA), and the water-uptake (WU) capacity of the microspheres (Göpferich, 1996; Blanco et al., 2006). Furthermore, the progressive decrease in the molecular weight (Mw) is an important factor that can be correlated with the degradation process. The erosion process is immediately dependent on the degradation step; indeed, the degradation controls the erosion by producing water-soluble oligomers and monomers that are released in the dissolution medium. The determination of the weight loss (WL) encountered by the microparticles is thereby directly linked to the erosion process. Other parameters, such as swelling, release of the degradation products in the dissolution medium and morphological changes, are also characteristic of the erosion process (Göpferich, 1996; Sackett and Narasimhan, 2010).

The literature concerning the degradation/erosion processes is 59 abundant when studying the influence of the Mw of the polymer.

Address for correspondence: Amélie Gaignaux, ULB, Laboratory of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, CP 207 – Bâtiment BC, Bld du Triomphe Accès 2, Niveau 6 Local 221, Brussels, B-1050, Belgium. Tel: +3226505254. Fax: +3226505269. E-mail: agaignau@ulb.ac.be

the kind of polymer or the size of microparticles (Panyam et al., 2003; Pollauf et al., 2005; Blanco et al., 2006). Nevertheless, examining the degradation/erosion processes involved in the release mechanisms of clonidine was essential given its small size and its water-soluble properties as well as its initial structure of hydrochloride salt.

Specific analysis has therefore been performed to characterize the degradation of the intra-articular clonidine-loaded PLGA microspheres and to correlate this with the release profiles of clonidine previously observed (Gaignaux et al., 2012). The degradation was characterized using gel permeation chromatography (GPC), which allows evaluation of the decrease in the Mw of the polymer over time. The degradation process was also characterized using the WU capacity of the formulations. The WU was linked to the swelling of the formulations. These two experiments also helped to better understand the erosion process occurring in the formulations. The erosion itself was characterized using the WL and the morphological changes of the microparticles.

Materials and methods

Materials

Clonidine HCl (Chemicals International Group, Holte, Denmark) was used as a model drug. PLGA 50:50 (RG505) was purchased from Boehringer (Ingelheim, Germany). Poly(vinyl alcohol (PVA, 87–90% hydrolysed), sodium azide and sodium octanesulphonate were purchased from Sigma-Aldrich (Munich, Germany). Phosphate buffered saline (PBS) was purchased from Invitrogen® (Merelbeke, Belgium). Ultrapure water was used during the manufacturing of the microspheres and was obtained from an Elga Purelab Ultra-genetic® Ultrapure water system (Analisis®, Namur, Belgium). All other chemicals used were of analytical grade.

Methods

Microsphere preparation

Clonidine-loaded PLGA microspheres were prepared using a double emulsion water-in-oil-in-water ($w_1/o/w_2$) technique followed by the evaporation of the solvent (Gaignaux et al., 2012). Briefly, internal aqueous phase (w_1) (30 mg clonidine HCl in 1 ml water) and organic phase (o-phase) (3 g PLGA in 22.5 ml methylene chloride) were emulsified for 2 min at 30 000 rpm using an Ultra-Turrax® (model T10-basic, S10N5G, Ika-Werke, Staufen, Germany). By progressively dispersing the w_1/o emulsion in 300 ml of a 0.1% (w/v) aqueous solution of PVA (w_2), the second emulsification was performed for 2 min at 8000 rpm using an Ultra-Turrax® (model T25, S25N18G, Ika-Werke, Staufen, Germany). The double emulsion $w_1/o/w_2$ was finally maintained under agitation with a four-bladed propeller stirrer (model RW20, R1345, Ika-Werke, Staufen, Germany) at 200 rpm for 3 h to allow the complete evaporation of the organic solvent and the consequent hardening of the microspheres. The solid microspheres were recovered by filtration through a paper filter (Grade 50: 2.7 µm, Whatman, Dassel, Germany) and washed three times with distilled water. The microspheres were dried under vacuum for 48 h.

Drug encapsulation efficiency

The encapsulated amount of clonidine in the PLGA microspheres was determined after extraction (Gaignaux et al., 2012). Briefly, clonidine was extracted in 23.0 ml of a water:methyl alcohol (50:50 v/v) mixture after dissolution of the polymer in 2.0 ml of methylene chloride during 15 min. After centrifugation at 5000 rpm during 30 min, an aliquot was filtrated through a 60

0.45 µm PTFE membrane (Millex®, Millipore, Billerica, MA) and injected into a high-performance liquid chromatography (HPLC) system. The HPLC method was identical to the previously detailed method (Gaignaux et al., 2012).

The encapsulation efficiency (EE) was determined as follows:

$$\text{Encapsulation efficiency (\%)} = \frac{\text{(Actual clonidine loading)}}{\text{(theoretical clonidine loading)}} \times 100 \quad (1)$$

$$\text{Theoretical clonidine loading} = \frac{\text{clonidine}_i}{\text{clonidine}_i + \text{polymer}_i} \quad (2)$$

where clonidine_i and polymer_i are the initial amounts of, respectively, clonidine and polymer in the formulation.

$$\text{Actual clonidine loading} = \frac{\text{clonidine}_{\text{encaps}}}{\text{clonidine}_i + \text{polymer}_i} \quad (3)$$

where $\text{clonidine}_{\text{encaps}}$ is the amount of clonidine actually encapsulated in the microspheres.

The clonidine content was determined in triplicate for each formulation. The results of encapsulation are expressed as a mean ± standard deviation.

In vitro degradation study

The degradation process of the developed clonidine-loaded PLGA microspheres was evaluated at $37^\circ\text{C} \pm 0.1^\circ\text{C}$ in PBS (pH 7.4 ± 0.05) containing 0.02% (w/v) sodium azide. The degradation study was performed in similar conditions than those used in the dissolution study (Gaignaux et al., 2012). Briefly, the dissolution studies were performed by weighing quantities of microspheres required to release approximately 450 µg of clonidine at the end of the test. Therefore, the initial weights of microspheres in the dissolution studies were quite different, leading to various concentrations of microparticles in the medium. For the degradation study, microspheres were placed in a 50 ml tube (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) containing an adapted volume of PBS and horizontally shaken at 85 cycles/min. At each interval of time (0 day, 1 day, 7 days, 14 days, 21 days, 28 days, and 35 days), microspheres were filtrated through a 0.45 µm cellulose ester membrane (Millipore, Billerica, MA) and dried under vacuum for 24 h ($n = 3$). The Mw of the microspheres was analysed by GPC at each sampling time.

Gel permeation chromatography

The decrease in the Mw of the polymer occurring during its degradation was assessed by GPC. The system consisted of an HP 1200 series (Agilent Technologies, Diegem, Belgium) equipped with a binary pump, an autosampler, an oven maintaining the temperature at 40°C , and a refractive index detector. Separation was achieved using two PLgel 5 µm Mixed-C 300 7.5 mm columns placed in series (linear Mw operating range: 200–2 000 000 g/mol) (Varian, Agilent Technologies, Diegem, Belgium). The mobile phase was tetrahydrofuran (THF) previously filtered on anhydrous aluminium oxide (Merck, Darmstadt, Germany) to remove the peroxides. The flow rate was fixed at 1 ml/min. Calibration was performed with polystyrene narrow Mw standards (Mw (g/mol) from the EasiVial PS-M standards: 363 000, 236 600, 90 250, 46 030, 25 070, 10 190, 4900, 2590, 1520, 815, 495 and 160) (Varian, Agilent Technologies, Diegem, Belgium). Data were analysed with ChemStation GPC Data Analysis Software Rev. B.01.01 (Agilent Technologies, Diegem, Belgium).

The vacuum-dried samples obtained during the *in vitro* degradation study were dissolved in THF at a concentration of 1 mg/ml. After 24 h, the samples were filtered through a 0.45 µm PTFE membrane (Millex[®], Millipore, Billerica, MA) and were injected into the GPC system. The weight-average molecular weights determined, named M_w , are hereafter expressed as a mean ± standard deviation.

The percentage variation of weight-average molecular weight, ΔM_w (%), was determined as follows (Dorati et al., 2007):

$$\Delta M_w(\%) = (M_{w_0} - M_{w_t})/M_{w_0} \times 100 \quad (4)$$

where M_{w_0} is the weight-average molecular weight of the microspheres determined before their incubation and M_{w_t} is the weight-average molecular weight of the microspheres determined at sampling time t .

WL and WU of the microspheres determination

The WL and the WU of the microparticles were determined by exactly weighing about 30 mg of microspheres in a 50 ml centrifuge tube (VWR, Leuven, Belgium) and dispersing the particles in 25 ml of PBS (pH 7.4 ± 0.05) containing 0.02% (w/v) sodium azide. The tubes were horizontally shaken at 85 cycles/min and maintained at a temperature of 37 °C ± 0.1 °C. At fixed intervals of time (1 day, 7 days, 14 days, 21 days, 28 days and 35 days), three tubes were removed and filtered through a 0.45 µm cellulose ester membrane (Millipore, Billerica, MA). After having weighed the wet microspheres for the WU determination, the cellulose ester membranes were dried under vacuum for 48 h and weighed for the WL determination.

The WL of the microparticles was determined as follows (Dorati et al., 2007):

$$WL(\%) = (W_0 - W_d)/W_0 \times 100 \quad (5)$$

where W_0 is the initial weight of the microspheres, i.e. the weight of the microspheres before incubation, and W_d is the weight of the dry microspheres at the sampling time, after the drying step.

The WU was determined as follows (Matsumoto et al., 2005; Dorati et al., 2007):

$$WU(\%) = (W_t - W_0)/W_t \times 100 \quad (6)$$

where W_t was the weight of the wet microspheres at the sampling time and W_0 was the initial weight of the microspheres. W_0 was modified to take into account the WL results obtained at each sampling time. Indeed, the loss of fractions of polymer due to its erosion had to be considered in the determination of the WU.

Swelling of the microspheres

The swelling of microspheres incubated in PBS was determined over time. To this end, 3 mg of microspheres were weighed in a microcentrifuge tube and incubated in 1 ml of PBS. At fixed time intervals (0 day, 1 day, 4 days, 8 days, 12 days, 15 days and 22 days), one drop of each tube was deposited on a microscope slide and observed through an Olympus BX60 optical microscope (Olympus, Aartselaar, Belgium) equipped with a JVC TK-C1381 digital camera. The diameter of 200 particles was measured using Analysis Docu Olympus Software, Version 5.1 (Olympus, Aartselaar, Belgium). The mean diameter (µm) was obtained by dividing the sum of the individual values of size by the total number of particles observed (200 microparticles). The optical microscopy analysis provides a number distribution and not a mass/volume distribution as obtained by laser diffraction.

The swelling was expressed as follows:

$$\text{Swelling } (\%) = (\text{mean diameter}_t / \text{mean diameter}_i) \times 100 \quad (7)$$

where mean diameter_t and mean diameter_i are the mean diameter of the microspheres determined, respectively, at sampling time t and before incubation.

Determination of the pH

At determined intervals of time, the pH of the dissolution medium was measured using a pH meter (Mettler Toledo, Zaventem, Belgium) equipped with an Inlab Micro Pro electrode (Mettler Toledo, Zaventem, Belgium). During this measurement, the microspheres remained in suspension in the medium. The microspheres were not removed.

The evolution of the pH inside the microspheres was also evaluated. The internal pH (pHmeter Mettler Toledo, Zaventem, Belgium) was determined by dissolving 10 mg of PLGA microspheres in 800 µl of acetonitrile. After complete dissolution of the microspheres, 200 µl of Ultrapure water (pH 7) was added (Shenderova et al., 1999; Fu et al., 2000). The internal pH was directly determined.

X-ray diffraction

The X-ray diffraction analyses performed on the dry formulations before incubation as well as after 7 and 28 days' incubation were achieved using a Bruker D5000 diffractometer (Siemens, Munich, Germany) equipped with a Cu anode ($\lambda = 1.5406 \text{ \AA} - 40 \text{ kV}$, 40 mA), a graphite monochromator, and a scintillation detector (2θ: 2°–70°, step width: 0.02°).

Scanning electron microscopy

The evolution of the morphology of the microparticles occurring during their progressive degradation was visualized by scanning electron microscopy (SEM) using a JSM-610 Scanning Electron Microscope (Jeol, Tokyo, Japan). The vacuum-dried samples were placed on a carbon tape and covered with a thin layer of a conductive material (gold) (Balzers SCD 030, Balzers Union Ltd., Liechtenstein).

Differential scanning calorimetry

The glass transition temperature (T_g) of the polymer was determined on dried microparticles using differential scanning calorimetry (DSC Q2000, TA Instruments, Zellik, Belgium) at fixed intervals of time during the degradation (0 day, 1 day, 7 days, 14 days, 21 days, 28 days and 35 days). To this end, vacuum-dried samples of between 1 and 3 mg were weighed in a Tzero aluminium pan sealed with an aluminium lid (TA Instruments, Zellik, Belgium). The samples were heated from -30.0 °C to +200.0 °C using a scan rate of 10.0 °C/min, then rapidly cooled down to -30.0 °C at 20.0 °C/min and heated again up to +200.0 °C at 10.0 °C/min. All the experiments were run under a nitrogen flow set at 50 ml/min. The T_g of the polymer was determined during the second heating cycle.

Results and discussion

The influence of the loading in clonidine and of the use of buffers on the degradation of the polymer was studied (Table 1). The degradation profile of formulations containing PLGA of different M_w (34 000 Da and 48 000 Da) was not determined since the effects of the M_w of the polymer on the degradation rate had already been studied extensively (Li, 1999; Blanco et al., 2006; Vey et al., 2011). Moreover, the dissolution of the clonidine-loaded PLGA microspheres showed the slowest release of the drug with the PLGA 96 000 Da (data not shown). Therefore, the degradation studies were focused on the microspheres based on PLGA characterized by a M_w of 96 000 Da. In addition,

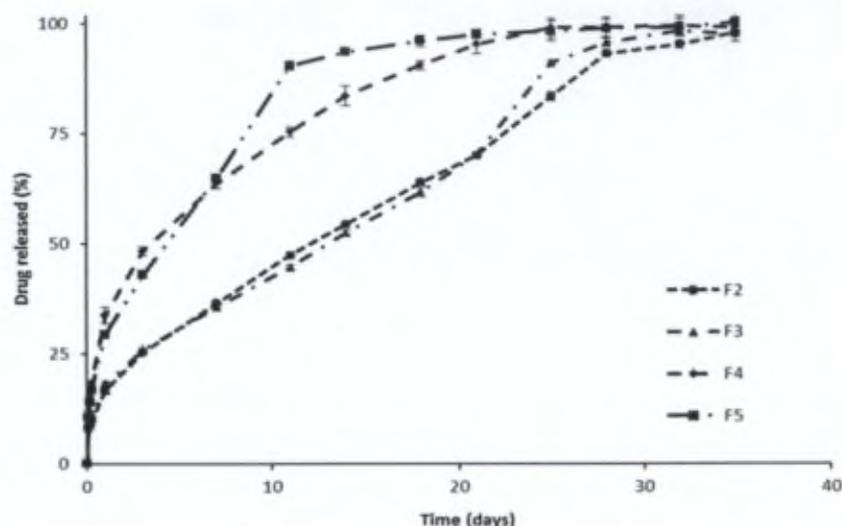
Table 1. Composition of the clonidine-loaded microspheres evaluated in the degradation studies. (constant parameters: PLGA Mw, 96 000 Da; polymer, 3 g; o-phase, 22.5 ml; PVA, 300 mg).

Parameters	Formulations				
	1	2	3	4	5
Clonidine (mg)	–	30	200	30	200
w ₁ (ml) (pH – buffer)*	3	3	3	3 (3 – citr.)	3 (3 – citr.)
w ₂ (ml) (pH – buffer)*	300	300	300	300 (8 – phos.)	300 (8 – phos.)
D[4,3] μm†	29 ± 2	38 ± 3	32 ± 7	17.2 ± 0.1	26 ± 7
EE (%)	–	2.24 ± 0.09	1.31 ± 0.02	24.2 ± 0.5	7.6 ± 0.2

*Citr. = citrate buffer 0.1 M, phos = phosphate buffer 1/15°M.

†Volume mean diameter (mean ± sd, n = 3).

Figure 1. *In vitro* release of clonidine from microparticles at 37 °C in PBS buffer (pH 7.4) as a function of the amount of drug used (F2 and F4 = 30 mg clonidine; F3 and F5 = 200 mg clonidine) and potential buffering of the aqueous phases (w₁ = pH 3, w₂ = pH 8 in F4 and F5) (n = 3, mean ± sd) (Gaignaux et al., 2012).



all studies were performed on microspheres characterized by a similar mean diameter ($D[4,3] \approx 30 \mu\text{m}$) as the influence of the size of the microparticles on the degradation of the polymer had also already been described (Klose et al., 2006). A previous detailed study of the influence of the composition and manufacturing parameters of the formulations on the release kinetics had been conducted showing a faster release for Formulations 4 and 5 (clonidine 30 mg and 200 mg, respectively/buffers) than for Formulations 2 and 3 (clonidine 30 mg and 200 mg, respectively/no buffers) (Figure 1). Both diffusion and degradation processes were involved in the release of clonidine (Gaignaux et al., 2012), making the interpretation of the release uncertain without the degradation evaluation. The increase in the drug loading in Formulations 3 and 5 did not accelerate the release compared to Formulations 2 and 4, respectively. For Formulations 2 and 3, it was probably due to the large losses of clonidine towards the external aqueous phase that occur during the manufacturing process and resulted in similar actual drug loadings (F2 = 0.12%, F3 = 0.09%), even with the different initial amounts of clonidine involved. The release of clonidine from the PLGA microparticles was completed after approximately 31 days for every formulation studied (Gaignaux et al., 2012). The degradation of these microparticles was therefore determined to better understand the release of clonidine.

Influence of the manufacturing conditions on the polymer molecular weight

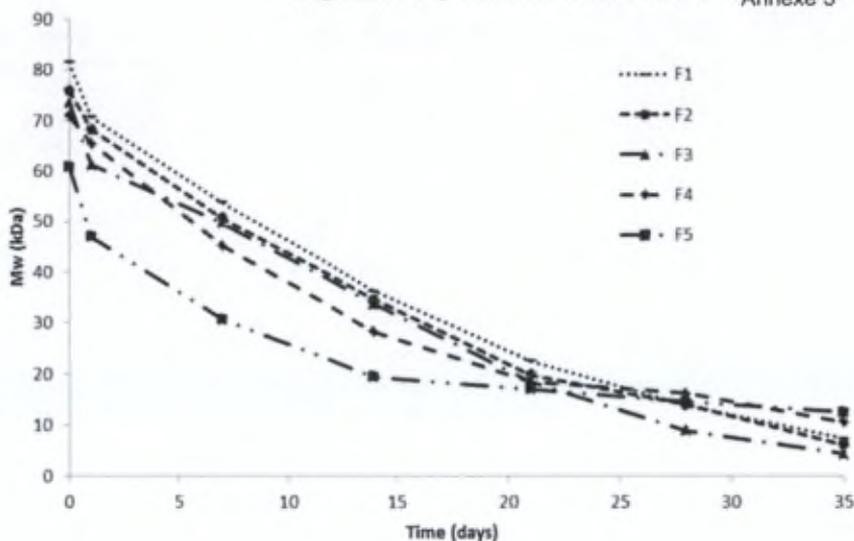
It appeared that the manufacturing conditions altered the initial Mw of the PLGA RG505, depending on the composition of the formulations. Indeed, as can be seen in Table 2, the Mw of raw PLGA RG505 decreased from about 93 000 Da to 81 500 Da when processed to obtain F1 (drug-free microparticles), suggesting that

Table 2. Values of the Mw of the raw PLGA RG505 and of the formulations studied, before incubation in the dissolution medium and at the end of the degradation study (after 35 days). Percentage variation of weight-average Mw (ΔMw) of the formulations after 35 days.

Sample	Initial Mw (g/mol)	Final Mw (g/mol)	ΔMw (%) after 35 days
PLGA RG505	93 040	–	–
F1	81 522	7337	91
F2	75 890	6089	92
F3	73 491	4368	94
F4	70 841	10 536	85
F5	60 810	12 427	80

the manufacturing procedure led to the production of a small proportion of low Mw oligomers (Dunne et al., 2000; Blanco et al., 2006). This might be induced by the almost 3 h' contact with aqueous phases during the progressive hardening of the polymer forming the microspheres. Moreover, the additional hydrolysis of the polymer induced by the addition of clonidine can be explained by the acid hydrolysis of the hydroxide salt of clonidine once in aqueous media. Since the degradation of PLGA can be accelerated in an acidic environment, the likely decrease in the pH occurring during the dissolution of clonidine HCl could explain the decrease in the observed Mw (presence of clonidine HCl in F2, F3, F4 and F5, Table 2). The degradation of PLGA is also accelerated by basic molecules due to the amine-catalysed hydrolysis (Fitzgerald and Corrigan, 1996; Dunne et al., 2000). As the Mw decreased to 73 500 Da for F3, it can be assumed that the drug loading influenced the degree of the hydrolysis occurring during the manufacturing process (Fitzgerald and Corrigan, 1996; Li et al., 1996). Finally, the use of buffers had the most dramatic

Figure 2. Evolution of the molecular weight of the PLGA RG505 over a period of 35 days for the formulations studied, incubated in PBS (pH 7.4 ± 0.05) at 37°C (mean \pm sd, $n=3$).



effect on the Mw of the polymer, especially when the drug loading was increased (F5 (clonidine 200 mg/buffers) – Mw \approx 61 000 Da). This was probably mostly due to the acidic pH value chosen for the internal phase (pH 3), which could enhance the degradation of the polymer.

Evaluation of the *in vitro* degradation of the polymer

Molecular weight of the polymer

Concerning the degradation process, the decrease in the Mw of the PLGA assessed by GPC started immediately after exposure to PBS (pH 7.4 ± 0.05) (Figure 2). The ΔMw (%) after 35 days showed the percentage variation of weight-average Mw, i.e. the percentage of reduction in the weight-average Mw of the different formulations studied (Table 2). This parameter allowed the differences in the reduction in the Mw to be compared quantitatively (Dorati et al., 2007). ΔMw (%) showed most obviously the difference between the formulations with and those without buffers. Indeed, the degradation of F4 and F5 (clonidine 30 mg and 200 mg, respectively/buffers) was greater at the beginning but their Mw remained higher at the end of the degradation, compared to the formulations without buffers (F1, F2 and F3 (drug-free, clonidine 30 mg and 200 mg, respectively)). In the latter stages of the degradation, the reduction of the Mw slowed down, leading to the lowest ΔMw values observed (Table 2). It could probably be explained by the different concentrations of microparticles in the dissolution medium used during the experiment. Indeed, the concentrations of microparticles in the dissolution medium were not comparable for all formulations studied (concentrations (mg/ml): F1 = 2, F2 = 4, F3 = 6, F4 = 2 and F5 = 1). The slowing down in the degradation of the polymer was probably affected by the low concentration of F4 and F5 microparticles. Nevertheless, as the internal buffered aqueous phase (pH 3) led to buffering the internal pores of the microparticles, the degradation was probably firstly enhanced due to this acidic internal environment, which was observed by the fast onset of the degradation (following the manufacturing of the microparticles, Table 2). Autocatalytic effects were subsequently likely reduced given the low concentration of microparticles and efficient neutralization/dilution of the acidic degradation products by the dissolution medium.

The degradation phenomenon observed for the formulations without buffers began more slowly but seemed to proceed constantly over time until greatly decreasing the Mw of the polymer ($\Delta\text{Mw} > 90\%$).

The considerable and early degradation of the polymer (ΔMw comprised between 80% and 94%) may partially be explained by the large glycolide acid content of the polymer (PLGA 50:50 lactide:glycolide ratio). As described in the literature, the glycolide units being more hydrophilic than the lactide ones, the hydrolytic cleavage firstly targets the ester bonds linking the glycolide acids (Witschi and Doelker, 1998; Panyam et al., 2003; Giteau et al., 2008). Moreover, since the PLGA is an amorphous polymer, its degradation may be increased due to a higher WU compared to the crystalline form (Li et al., 1990; Lao et al., 2011).

It can be assumed that the high and fast degradation observed for all formulations was involved in the drug release mechanism (Figures 1 and 2). The drug was not only released through diffusion mechanisms. The drug release curves (Figure 1) presented an inflexion point, showing that the release was accelerated and probably implied the degradation of the polymer. At this inflexion point, the Mw of the polymer had reached a critical value ($\approx 30\%$ of the polymer was degraded), allowing the drug to be released by diffusion through the water-filled pores, partly created by the degradation of the polymer. Moreover, the mathematical modelling previously developed did not fit the experimental points after this point, showing that the release was also affected by the degradation of the polymer (Gaignaux et al., 2012).

F4 and F5 provided a faster release of clonidine that could partially be explained by their larger degradation immediately after incubation. These formulations rapidly presented a slower release of the drug until reaching a steady state. F2 and F3 showed a slower release at the beginning and a rather progressive release of clonidine throughout the experiment.

The chromatograms obtained by GPC were characterized by a monomodal distribution until 21 days (data not shown). The bimodal chromatograms observed after 21 days demonstrated the progressively higher content of low Mw oligomers in the samples, resulting in the gradual degradation of the polymer. As bimodality is characteristic of a heterogeneous degradation, autocatalytic effects would be present and would accelerate the degradation inside the microparticles providing the bimodal peaks after 21 days (Li et al., 1996). Autocatalytic effects observed in clonidine-loaded PLGA microspheres might be explained by the typical and well-documented acidic degradation of PLGA.

As the semi-logarithmic plot of the Mw of the PLGA showed a (relatively) good linear regression for all formulations ($R^2 \geq 0.91$), the degradation of the polymer probably followed a first-order kinetic reaction. The regression coefficient R^2 demonstrated the

degree of good fit (Table 3). Autocatalytic effects were probably not the prevailing degradation mechanism for the formulations evaluated (Figure 3, Table 3). Indeed, marked autocatalytic effects would have increased the degradation rate constant over time (Faisant et al., 2002). Nevertheless, minor autocatalytic effects were present, given the bimodal chromatograms observed after 21 days, but they were probably effectively controlled, mainly by the diffusion of the dissolution medium into the microparticles and/or the progressive diffusion of the short chain acids towards the dissolution medium.

The slopes of the $\ln(M_w) = f(t)$ plots provided the degradation rate constant, k (Kenley et al., 1987; Charlier et al., 2000). The highest degradation rate constant observed for F3 (clonidine 200 mg/no buffers), resulting in a faster degradation, could be explained by the different concentrations of microparticles in the dissolution medium used during the experiment. By producing a higher amount of short chain acids due to the higher concentration of microparticles present in the dissolution medium, F3 presented a faster degradation. Moreover, F3 also presented the highest ΔM_w , which agreed with the high k and the likely high production of short chain acids, partially promoting the degradation process. On the contrary, the concentration of microparticles used for F5 (clonidine 200 mg/buffers) was the lowest (1 mg/ml), resulting in the lowest amount of degradation products and a slower degradation, as observed with the values of k and ΔM_w (Table 3 and Table 2).

Assuming that the concentration of microparticles influenced the k value, the degradation rate of the polymer was affected neither by the drug loading nor by the use of buffer in the formulations. Indeed, the k values observed in F1 (drug-free microparticles) and F4 (clonidine 30 mg/buffers) (concentration of microparticles in the dissolution medium equal to 2 mg/ml)

were similar despite the presence of buffering agents and clonidine in F4. Therefore, although clonidine seemed to be characterized by a catalytic behaviour during the manufacturing process, it did not appear to accelerate the degradation of the PLGA under the dissolution conditions.

Water-uptake

The degradation of the polymer is directly correlated with the WU attained by the microparticles. The WU is the first step necessary to initiate the degradation of immersed microparticles and the release of an entrapped molecule (Figure 4) (Dunne et al., 2000). During the first day and depending on the formulation, the M_w of the polymer had already decreased in an amount ranging from 5000 to 15 000 Da compared to their initial value (Figure 2). Simultaneously, after 1 day, all formulations studied weighed about 50% more compared to their initial weight, due to the uptake of dissolution medium. The WU then progressively increased whereas the M_w of the polymer progressively decreased (Figures 2 and 4). The fast and high WU observed during the first day might be explained by the hydrophilicity of the entrapped molecule; water firstly interacts with surface-located clonidine before wetting the polymeric matrix. Moreover, after incubation in the dissolution medium, the infiltration of water into the core of the microparticles occurs very quickly, depending on the number of the remaining internal pores (Batycky et al., 1997). The WU often proceeds quicker than the release of the entrapped drug. Indeed, the imbibition of water progressively creates additional internal pores but their size and number have to be sufficient to allow the release of the drug (Fredenberg et al., 2011). The rate-controlling mechanisms of the release of clonidine were therefore the creation of pores by the gradual hydrolysis of the polymer and by the WU (Zhang et al., 1997; Fredenberg et al., 2011).

Formulations F4 and F5 (clonidine 30 mg and 200 mg, respectively/buffers) presented a greater WU capacity after 35 days, probably due to the increase in the captured water by the aqueous pores of the microparticles containing buffers. Moreover, the WU was eventually larger for F3 and F5, containing larger amounts of clonidine (200 mg), which could enhance the attraction of water (Figure 4).

As a result of the WU, the degradation of the polymer and the progressive release of clonidine, the permeability of the microparticles was increased. This gradual increase enhanced the additional penetration of water and the resulting swelling. The swelling allows to characterize the erosion phenomenon although it is correlated with the WU.

Table 3. Degradation rate constant, k , of the formulations studied and regression coefficient. The k values were obtained from the slopes of $\ln(M_w) = f(t)$ plots, determined from the mean values of weight-average molecular weight.

Formulation	k (weeks ⁻¹)	R^2
F1	0.4614	0.99
F2	0.475	0.98
F3	0.5434	0.98
F4	0.475	0.98
F5	0.3008	0.91

Figure 3. Semi-logarithmic plots of the molecular weight of the PLGA RG505 over a period of 35 days for the formulations studied, incubated in PBS (pH 7.4 ± 0.05) at 37 °C. $\ln(M_w) = f(t)$ plots obtained from the mean values of weight-average molecular weight ($M_w = f(t)$ plots based on $n = 3$).

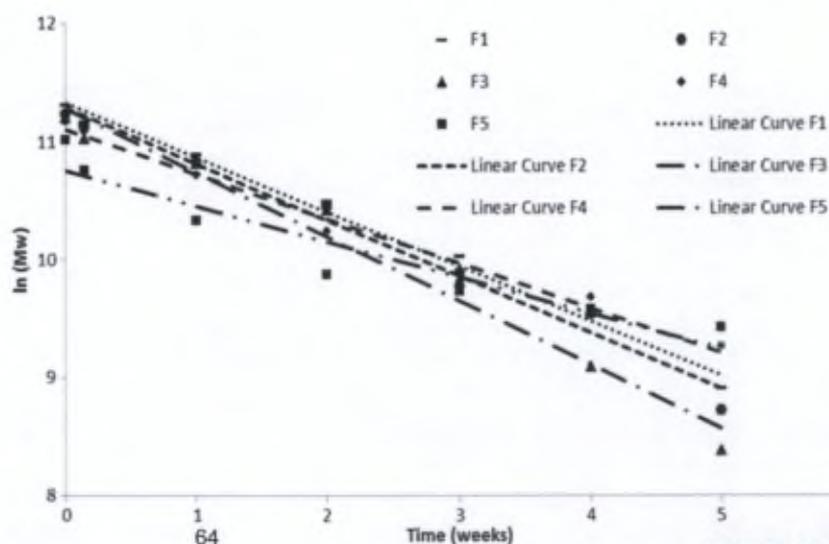


Figure 4. Evolution of the WU (filled symbols) and the swelling (empty symbols) of the microspheres over a period of 35 or 22 days for the formulations studied, incubated in PBS (pH 7.4 ± 0.05) at 37°C (mean \pm sd, $n = 3$). The swelling was determined by optical microscopy.

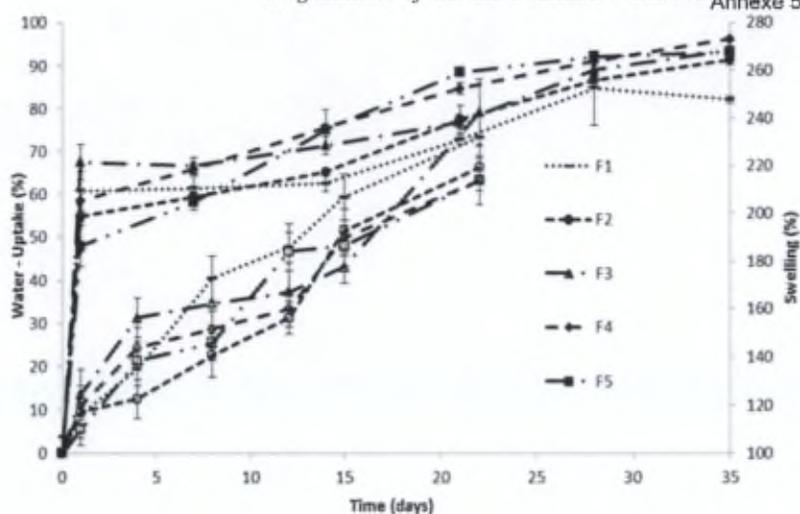
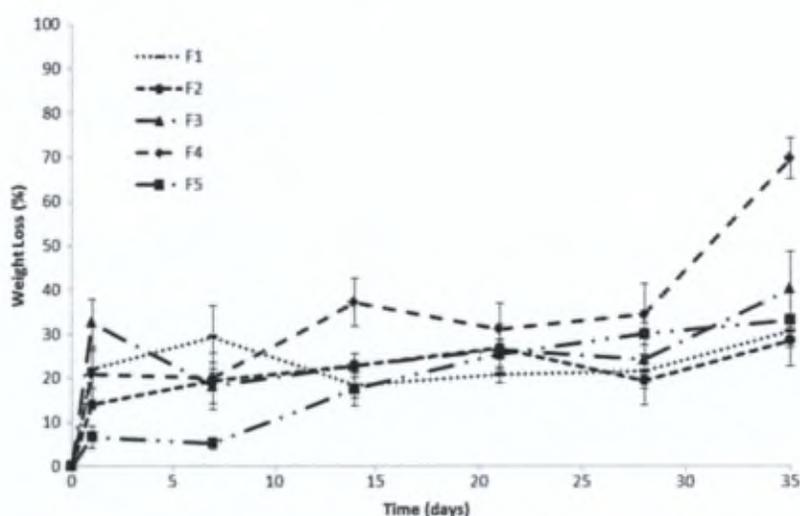


Figure 5. Evolution of the WL of the microspheres over a period of 35 days for the formulations studied, incubated in PBS (pH 7.4 ± 0.05) at 37°C (mean \pm sd, $n = 3$).



Thermal and crystalline properties of the polymer

The decrease in the T_g of the polymer determined throughout its degradation was very slight (data not shown, initial value $\approx 48.2^\circ\text{C}$; decrease: F1 = 3.3°C , F2 = 1.7°C , F3 = 1.3°C , F4 = 1.1°C and F5 = 1.5°C) while a significant decrease is usually expected when a polymer is degraded due to the progressive decrease of its Mw. In fact, lower Mw polymers give lower T_g values (Siepmann et al., 2005). Moreover, the T_g values of all formulations remained above the temperature of the dissolution medium during all the experiment. Therefore, the physical state was not affected. Indeed, they were not in a rubbery state, as confirmed by SEM pictures (Figure 6). This rubbery state would have facilitated the degradation process and lowered the T_g values (Blanco et al., 2006).

The crystallinity of the formulations studied was determined over the degradation test to assess a possible evolution of the crystallinity of the polymer. Powder X-ray diffraction analyses did not show any peaks, which proved the amorphous state of all formulations (data not shown). It meant that no part of the polymer crystallized during the degradation, which would have extended the duration of the degradation.

Evaluation of the erosion of the polymer

Swelling properties

Swelling evaluation (Figure 4) showed a gradual increase in the mean diameter of the microparticles after immersion in the

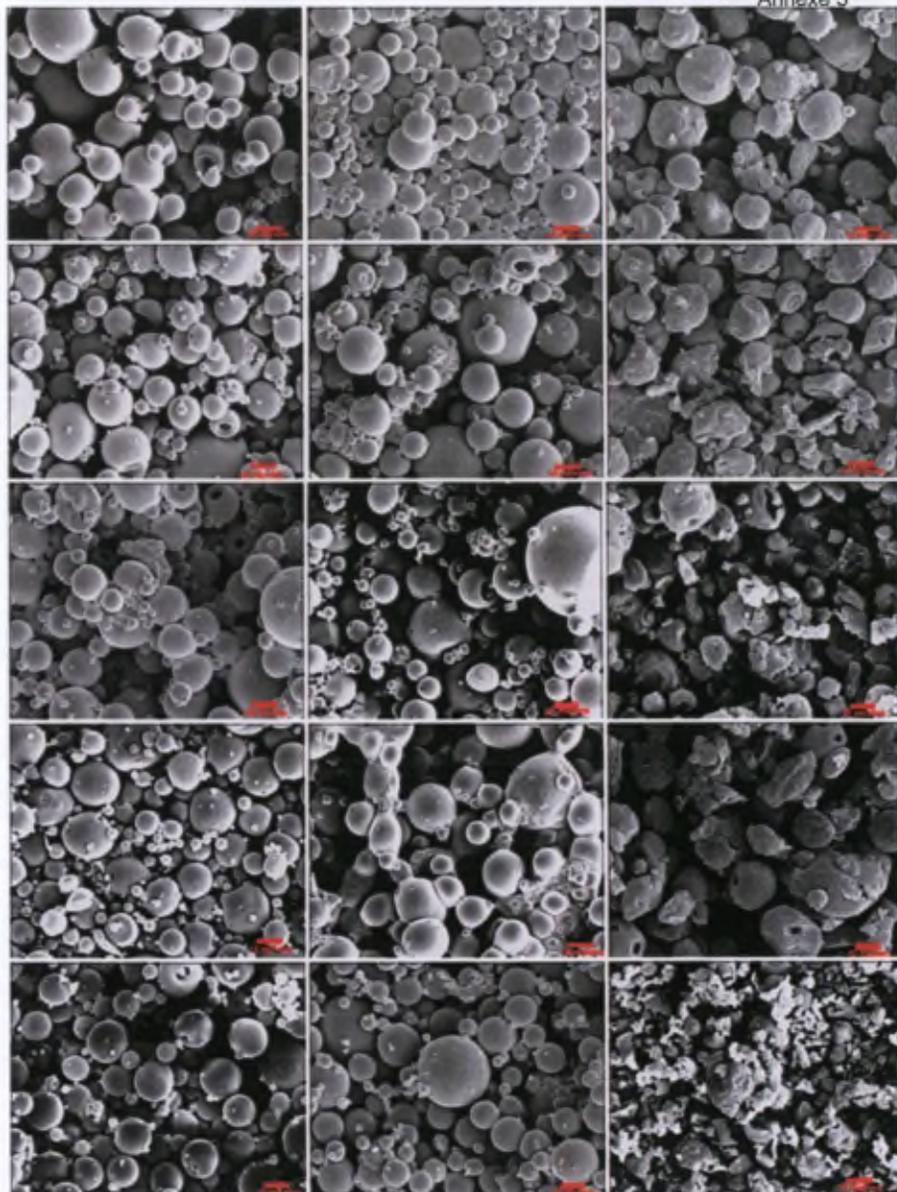
dissolution medium. After 22 days, their diameter was doubled. The swelling was due to the imbibition of water into the microspheres and could therefore be correlated with the WU of the microspheres (Figure 4). Whereas the microparticles rapidly captured a large amount of water (around 50% within 1 day), the swelling occurred more progressively (increase between 10% and 25% during the first day). The swelling resulted from a rearrangement of the polymer chains in response to the increase in pressure inside the microparticles following the WU (Fredenberg et al., 2011). After the first day, both swelling and WU became gradual and constant.

The swelling of the microparticles was studied for only 22 days because this phenomenon generally led to a final decrease in the microparticles' size due to their degradation and progressive erosion. The progressive loss of integrity of all formulations and apparition of a smaller fraction of microparticles were observed on SEM pictures (Figure 6).

Evaluation of the WL

The WL of the microspheres was determined to characterize the erosion phenomenon (Figure 5). Bulk-eroding systems usually demonstrate a delay in WL compared to surface-eroding systems, which present WL as soon as they are in contact with the dissolution medium (Lao et al., 2011). Bulk-eroding PLGA-based microparticles are subject to WL for quite a long time after the beginning of the degradation of the polymer, i.e. when they become porous enough to allow the

Figure 6. SEM pictures of formulations (a) 1, (b) 2, (c) 3, (d) 4 and (e) 5 before incubation and at degradation times 7 days and 28 days, at 1000 \times (scale = 10 μ m).



release of the water-soluble degradation products (monomers and oligomers) accumulated inside (Dunne et al., 2000). Erosion starts at different times, depending on the polymer studied (e.g. Mw, conformation): after a few days for low Mw polymers, after weeks for polymers characterized by high Mw, and after months for PLA (Göppferich, 1997). The significant WL encountered with PLGA 50:50 was described as only beginning after 21 days (Dunne et al., 2000) or 35 days (Blanco et al., 2006). In this work, the WL remained comprised between 10% and 30% from the 7th day and the 35th day for F1, F2, F3 (drug-free, clonidine 30 mg and 200 mg, respectively/no buffers) and F5 (clonidine 200 mg/buffers) (Figure 5). This could probably be attributed to the progressive release of the low Mw oligomers produced during the manufacturing process and the gradual degradation (Table 2). Moreover, the soluble degradation products that were located at or close to the particles' surface were rapidly released in the medium, even though the porosity of the microparticles had not yet increased (Figure 6) and the Mw was still high (Figure 2). Compared to the degradation profiles (Figure 2), it was assumed that the degradation products were always contained in the microparticles and were therefore not implied in the WL. The WL observed could also be partially explained by the release of the

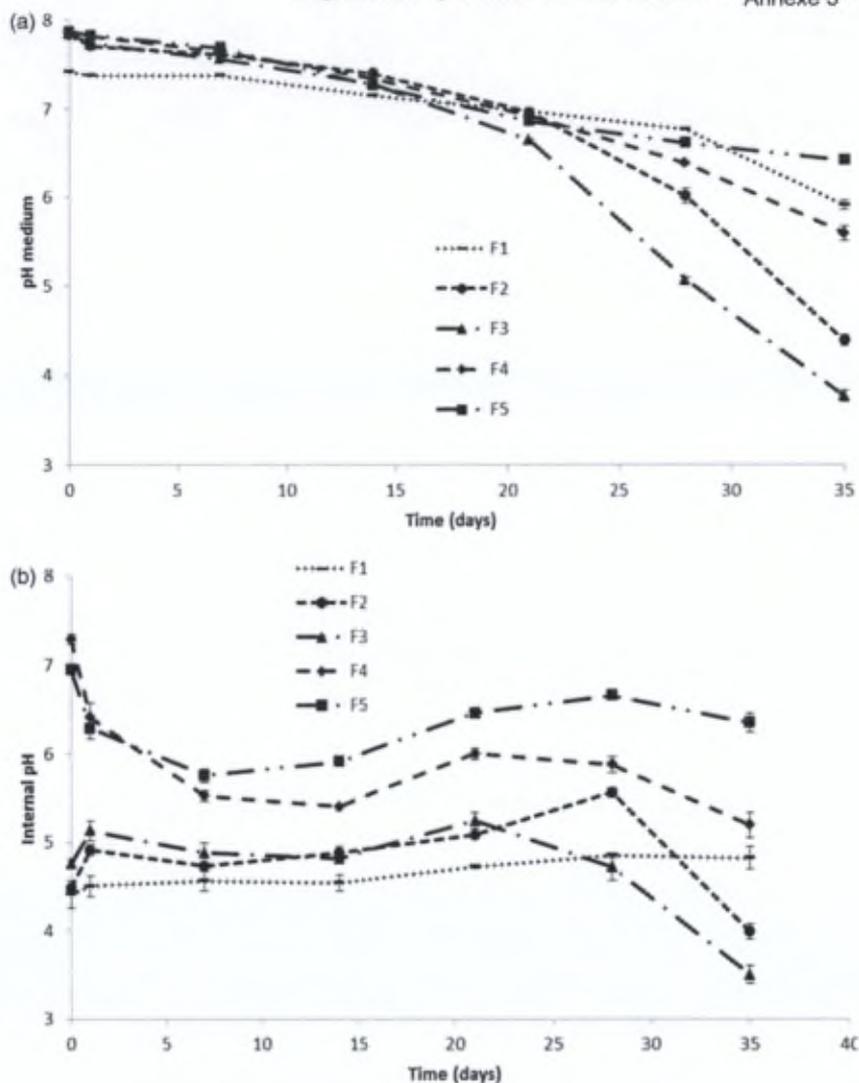
hydrophilic clonidine located at the surface of the microspheres. Finally, the WU and the swelling achieved by the microparticles (Figure 4) made them looser, which usually facilitates the loss of fractions of polymer and therefore accelerates WL (Göppferich, 1997).

The WL of F5 began more slowly than for the other formulations; it is correlated with its slower degradation, as well with its lower values of k and Δ Mw (Tables 2 and 3). F5 therefore showed a slower release of the products of degradation, probably leading to its low WL.

The Formulation F4 (clonidine 30 mg/buffers) showed a surprisingly high increase in WL between days 28 and 35 (around 70%). Nevertheless, it probably did not influence the release profile of the incorporated molecule, as the entire amount of the entrapped clonidine was released after 31 days.

The release of clonidine likely occurred through the water-filled pores resulting from the large WU reached by the microparticles. Indeed, the imbibition of water generally occurs quicker than the erosion of PLGA, which facilitates the release of hydrophilic drugs through newly created water-filled pores. On the contrary, if erosion was involved in the release of clonidine, the release and erosion profiles would have been similar (Fredenberg et al., 2011).

Figure 7. Evolution of the pH measured (a) in the dissolution medium and (b) inside of the microspheres over a period of 35 days for the formulations studied (mean \pm sd, $n = 3$).



Morphological properties of the microparticles

The morphology of the microparticles was observed after 7 days, 21 days and 28 days of incubation and compared to their initial morphology (Figure 6, $t =$ before incubation, 7 days and 28 days). Initially, the microparticles evaluated (F1–F5) were spherical and smooth. After seven days of incubation, the appearance of the microspheres did not change except for F3 and F4, which surfaces became irregular. However, after 21 days of incubation, all formulations were subject to morphological changes. F1 and F2 showed only surface modifications (increase in the roughness) but remained spherical. The roughness observed on the surface of F3 was intensified. More significantly, the porosity of F4 was highly increased and F5 microparticles were seriously degraded. After 28 days of immersion, the formulations studied were eroded. They had lost their spherical shape and smooth appearance and their porosity had increased. F1 did not show all these morphological changes after 28 days, except that its surface became a little rougher.

The additional increase in the porosity of F4 (clonidine 30 mg/buffers) observed from the 21st day of incubation could probably explain the faster release of clonidine that had been previously observed. The advanced degradation of F5 (clonidine 200 mg/buffers) after 21 days of incubation could also explain the faster release of clonidine from these microparticles (Gaignaux et al., 2012). Surprisingly, the Δ MW after 35 days was lower for F4 and F5 than for the other formulations. Nevertheless, the release of clonidine from formulations F4 and F5 occurred faster.

The buffering agents of these formulations probably increased their WU (Figure 4) (WU after 35 days, F4 = 94%, F5 = 96%). It had therefore no/little influence on the hydrolysis of the polymer but had an influence on the release of clonidine.

The morphological observations could be related to those of previous experiments, such as the degradation determined by the decrease in the Mw that was probably characterized in SEM pictures by the progressive apparition of roughness at the surface. The penetration of water into the microparticles started at the surface due to its attraction by clonidine located at the surface. Subsequently, the water infiltrated the polymer and began the cleavage of the ester linkages.

Evolution of the pH

As PLGA follows an acidic degradation, it was interesting to evaluate the evolution of the pH values over the degradation of the polymer.

pH of the dissolution medium

From days 0 to 21, the pH of the dissolution medium slowly decreased. After 21 days, it decreased faster, as can be seen in Figure 7(a). It can be explained by the degradation of the polymer into short chain acids that were progressively released into the dissolution medium, decreasing its pH value (Klose et al., 2010). Nevertheless, the decrease was quite slight, probably due to the neutralization/dilution of the degradation products by the

dissolution medium (PBS) and the low concentration of microparticles in the medium. After 21 days, the pH of the dissolution medium dropped considerably for all formulations studied, showing that the erosion process had probably been initiated. The decrease in the pH value of the dissolution medium ($F3 > F2 > F1 \approx F4 > F5$) throughout the experiment seemed to be correlated with the various concentrations of microparticles (concentrations (mg/ml): $F1 = 2$, $F2 = 4$, $F3 = 6$, $F4 = 2$, $F5 = 1$). The buffer capacity of the dissolution medium remained similar regardless of the quantity of microparticles and short chain acids, which led to a higher decrease in the pH with a higher concentration of particles (Klose et al., 2010; Vey et al., 2012). For example, F3 (clonidine 200 mg/no buffers) produced a larger amount of short chain acids, which led to a higher decrease in the pH value of the medium (Figure 7a). F3 also presented the highest values of k and ΔMw (Tables 2 and 3), showing the faster and larger degradation of the polymer in F3 and the understandable decrease in the pH. The drop of the pH observed for F3 and F2 after 21 days could be linked to the acceleration of the drug release also observed after 21 days. Indeed, the progressive hydrolysis of PLGA led to an increase in the chains mobility and to an increase in the release rate of the drug (Klose et al., 2010). On the contrary, F5 (clonidine 200 mg/buffers) contained the lower concentration of microparticles and showed the lowest values of k and ΔMw , due to the lower amount of short chain acids produced, which was confirmed by the slight decrease in the pH (Figure 7a).

Internal pH of the microparticles

The internal pH was higher in F4 (clonidine 30 mg/buffers) and F5 (clonidine 200 mg/buffers) from the onset of the degradation, given the buffering agents. The internal pH value of the microspheres evaluated decreased at the beginning of the degradation for F4 and F5 but remained more constant for the other formulations (Figure 7b). After 14 days, the internal pH slightly increased to eventually remain constant, contrary to initial expectation. The degradation products were probably efficiently neutralized by the dissolution medium that diffused into the microparticles due to the gradient of concentration (Klose et al., 2006) and partially neutralized/diluted the short chain acids. Moreover, the diffusion of the acidic degradation products towards the dissolution medium was probably also effective (Faisant et al., 2002), given the limited decrease in the internal pH of the microspheres and the decrease observed in the pH of the dissolution medium.

The large decrease in the internal pH of F3 could also explain the faster degradation (k , ΔMw) due to autocatalytic effects caused by the acidic products that were not neutralized.

As the inner pH was far lower than the pH measured in the dissolution medium (Figure 7a and b), it can be assumed that the pH measured inside the microspheres was not influenced by the pH of the dissolution medium (Fu et al., 2000).

Conclusion

The degradation process of the clonidine-loaded PLGA microparticles with or without buffering agents could be described as follows: (i) once the microspheres were incubated in the dissolution medium, their Mw immediately began to decrease owing to the significant amount of water they captured, leading to the cleavage of the ester bonds; (ii) the low Mw oligomers resulting from the manufacturing process and located at and/or near the surface of the microspheres were quickly released into the dissolution medium; this phenomenon could probably explain the partial WL observed for the formulations studied ($\approx 30\%$); (iii) the erosion process itself did not continue until more than 68

30% had been lost after 35 days (except F4); erosion usually proceeds long after the degradation, which is the step that produces water-soluble oligomers and monomers that can be released in the dissolution medium. Indeed, erosion appeared to be truly initiated only after 35 days regarding the pH drop.

The various concentrations of microparticles contained in the dissolution medium probably affected the observed degradation rate. Indeed, a higher value for the degradation rate constant k was obtained for the formulation studied, with the higher concentration due to the higher production of short chain acids, promoting degradation.

Finally, the degradation of the polymer was effectively involved in the release of clonidine. Release profiles of clonidine showed a burst effect, a more or less short lag-phase and a quicker phase due to the degradation of the polymer. As the erosion was quite insignificant throughout the release of clonidine, it was assumed that the hydrophilic drug was released through the pores progressively formed by the imbibition of water and gradual hydrolysis of the polymer chains.

Declaration of interest

This work was part of the JOINT-AIC research project, supported by the BLOWIN health cluster of the Walloon region.

The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the article.

References

- Batycky RP, Hanes J, Langer R, Edwards DA. A theoretical model of erosion and macromolecular drug release from biodegrading microspheres. *J Pharm Sci*, 1997;86:1464–77.
- Blanco MD, Sastre RL, Teijón C, Olmo R, Teijón JM. Degradation behaviour of microspheres prepared by spray-drying poly(D,L-lactide) and poly(D,L-lactide-co-glycolide) polymers. *Int J Pharm*, 2006;326:139–47.
- Charlier A, Leclerc B, Couarraze G. Release of mifepristone from biodegradable matrices: Experimental and theoretical evaluations. *Int J Pharm*, 2000;200:115–20.
- Dorati R, Genta I, Colonna C, Modena T, Pavanetto F, Perugini P, Conti B. Investigation of the degradation behaviour of poly(ethylene glycol-co-D,L-lactide) copolymer. *Polym Degrad Stab*, 2007;92:1660–8.
- Dunne M, Corrigan OI, Ramtoola Z. Influence of particle size and dissolution conditions on the degradation properties of polylactide-co-glycolide particles. *Biomaterials*, 2000;21:1659–68.
- Faisant N, Siepmann J, Benoit JP. PLGA-based microparticles: Elucidation of mechanisms and a new, simple mathematical model quantifying drug release. *Eur J Pharm Sci*, 2002;15:355–66.
- Fitzgerald JF, Corrigan OI. Investigation of the mechanisms governing the release of levamisole from poly-lactide-co-glycolide delivery systems. *J Control Release*, 1996;42:125–32.
- Fredenberg S, Wahlgren M, Reslow M, Axelsson A. The mechanisms of drug release in poly(lactide-co-glycolic acid)-based drug delivery systems – A review. *Int J Pharm*, 2011;415:34–52.
- Fu K, Pack DW, Klibanov AM, Langer R. Visual evidence of acidic environment within degrading poly(lactide-co-glycolic acid) (PLGA) microspheres. *Pharm Res*, 2000;17:100–6.
- Gaignaux A, Réeff J, Siepmann F, Siepmann J, De Vriese C, Goole J, Amighi K. Development and evaluation of sustained-release clonidine-loaded PLGA microparticles. *Int J Pharm*, 2012;437:20–8.
- Giteau A, Venier-Julienne MC, Aubert-Pouëssel A, Benoit JP. How to achieve sustained and complete protein release from PLGA-based microparticles? *Int J Pharm*, 2008;350:14–26.
- Göpferich A. Mechanisms of polymer degradation and erosion. *Biomaterials*, 1996;17:103–14.
- Göpferich A. Polymer bulk erosion. *Macromolecules*, 1997;30:2598–604.
- Heller J. Controlled release of biologically active compounds from bioerodible polymers. *Biomaterials*, 1980;1:51–7.
- Kenley RA, Lee MO, Mahoney TR, Sanders LM. Poly(lactide-co-glycolide) decomposition kinetics *in vivo* and *in vitro*. *Macromolecules*, 1987;20:2398–403.

- Klose D, Siepmann F, Elkharraz K, Krenzlin S, Siepmann J. How porosity and size affect the drug release mechanisms from PLGA-based microparticles. *Int J Pharm*, 2006;314:198–206.
- Klose D, Siepmann F, Elkharraz K, Siepmann J. PLGA-based drug delivery systems: Importance of the type of drug and device geometry. *Int J Pharm*, 2008;354:95–103.
- Klose D, Siepmann F, Willart JF, Descamps M, Siepmann J. Drug release from PLGA-based microparticles: Effects of the "microparticles:bulk fluid" ratio. *Int J Pharm*, 2010;383:123–31.
- Körber M. PLGA erosion: Solubility- or diffusion-controlled? *Pharm Res*, 2010;27:2414–20.
- Lao LL, Peppas NA, Boey FYC, Venkatraman SS. Modeling of drug release from bulk-degrading polymers. *Int J Pharm*, 2011;418:28–41.
- Li S. Hydrolytic degradation characteristics of aliphatic polyesters derived from lactic and glycolic acids. *J Biomed Mater Res*, 1999;48:342–53.
- Li S, Girod-Holland S, Vert M. Hydrolytic degradation of poly(DL-lactic acid) in the presence of caffeine base. *J Control Release*, 1996;40:41–53.
- Li SM, Garreau H, Vert M. Structure-property relationships in the case of the degradation of massive aliphatic poly-(α -hydroxy acids) in aqueous media, *Part 1: Poly(DL-lactic acid)*. *J Mater Sci Mater Med*, 1990;1: 123–30.
- Matsumoto A, Matsukawa Y, Suzuki T, Yoshino H. Drug release characteristics of multi-reservoir type microspheres with poly(DL-lactide-co-glycolide) and poly(DL-lactide). *J Control Release*, 2005;106:172–80.
- Panyam J, Dali MM, Sahoo SK, Ma W, Chakravarthi SS, Amidon GL, Levy RJ, Labhasetwar V. Polymer degradation and *in vitro* release of a model of protein from poly(D,L-lactide-co-glycolide) nano- and microparticles. *J Control Release*, 2003;92:173–87.
- Pollauf EJ, Berkland C, Kim KK, Pack DW. *In vitro* degradation of polyanhydride/polyester core-shell double-wall microspheres. *Int J Pharm*, 2005;301:294–303.
- Sackett CK, Narasimhan B. Mathematical modeling of polymer erosion: Consequences for drug delivery. *Int J Pharm*, 2010;418:104–14.
- Shenderova A, Burke TG, Schwendeman SP. The acidic microclimate in poly(lactide-co-glycolide) microspheres stabilizes camptothecin. *Pharm Res*, 1999;16:241–8.
- Siepmann J, Elkharraz K, Siepmann F, Klose D. How autocatalysis accelerates drug release from PLGA-based microparticles: A quantitative treatment. *Biomacromolecules*, 2005;6:2312–19.
- Siepmann J, Göpferich A. Mathematical modeling of bioerodible, polymeric drug delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev*, 2001;48: 229–47.
- Vey E, Rodger C, Booth J, Claybourn M, Miller AF, Saiani A. Degradation kinetics of poly(lactic-co-glycolic) acid block copolymer cast films in phosphate buffer solution as revealed by infrared and Raman spectroscopies. *Polym Degrad Stab*, 2011;96:1882–9.
- Vey E, Rodger C, Meehan L, Booth J, Claybourn M, Miller AF, Saiani A. The impact of chemical composition on the degradation kinetics of poly(lactic-co-glycolic) acid copolymers cast films in phosphate buffer solutions. *Polym Degrad Stab*, 2012;97:358–65.
- von Burkersroda F, Schedl L, Göpferich A. Why biodegradable polymers undergo surface erosion or bulk erosion. *Biomaterials*, 2002;23: 4221–31.
- Wang HT, Palmer H, Linhardt RJ, Flanagan DR, Schmitt E. Degradation of poly(ester) microspheres. *Biomaterials*, 1990;11:679–85.
- Witschi C, Doelker E. Influence of the microencapsulation method and peptide loading on poly(lactic acid) and poly(lactic-co-glycolic acid) degradation during *in vitro* testing. *J Control Release*, 1998;51: 327–41.
- Zhang Y, Zale S, Sawyer L, Bernstein H, Schmitt E. Effects of metal salts on poly(DL-lactide-co-glycolide) polymer hydrolysis. *J Biomed Mater Res*, 1997;34:531–8.

Cliniques universitaires de Bruxelles
Route de Lennik 808
B-1070 Bruxelles
T +32 (0)2 555 31 11
M webmaster@erasme.ulb.ac.be
S www.erasme.ulb.ac.be

Hôpital
Erasme



Mme Amélie GAINAUX
Laboratoire de Galénique et Biopharmacie
Faculté de Pharmacie
CP 611

Brussels, October 10, 2012.

Comité d'Ethique
hospitalo-facultaire
Erasme - ULB
(021 / 406)

Secrétariat
T 02 555 37 07
02 555 37 11
F 02 555 46 20

etariat.ethique@erasme.ulb.ac.be
comite.ethique@erasme.ulb.ac.be
www.erasme.ulb.ac.be/ethique

Dear Mme GAINAUX,

Please find further on the answer of the Ethics Committee concerning the below mentioned study.

ETHICS COMMITTEE APPROVAL

We, undersigned,
Chairman & Secretary of

Pr C. MELOT & Mr G. NISSET
Ethics Committee Erasme Hospital
808, route de Lennik
B-1070 Brussels, Belgium
N° of agreement by "Ordre des Médecins": OM021

confirm that the documents submitted for approval were initially examined during the meeting held on 02/10/2012 (dd/mm/yyyy).

After examination of the answers to the comments and of the new version of the information sheet and consent form received the 09/10/2012, the Ethics Committee gave its agreement on 09/10/2012 to the following documents:

- > Protocol (Our Ref.: P2012/266; CCB: B406201215030) entitled: "*Etude in vitro du phénomène inflammatoire engendré par des formulations de clonidine ou bétaméthasone sur des globules blancs humains.*" (Protocol Version undefined)
- > French Patient Information Leaflet: Version 2, dated October 3rd, 2012, and Informed Consent Form: Version 2, dated October 3rd, 2012
- > Dutch Patient Information Leaflet: Undelivered, and Informed Consent Form: Undelivered

Following document, included in the submission file, have been also reviewed:

- > Ethics Committees Application form signed the 17/09/2012
- > Investigator's Curriculum Vitae
- > Certificate of Insurance: Ethias Insurance - Policy Nr 45.127.563 covering period from November 05, 2012 to May 05, 2013
- > Health questionnaire survey
- > Poster's Recruitment (in French).

We also confirm the suitability of the local investigator and his team and the quality of local facilities.

This agreement is valid from 10/9/2012 till 05/2013.

The list of the names and qualifications of the members of the Ethics Committee present at the meeting is added in appendix.

The Committee reminds the investigator of his personal responsibility for this project. We consider your responsibility, in accordance with the recommendations of ICH GCP, that annual trial status and end trial results will be transmitted to the Committee.

If Dutch speaking volunteers have to be recruited for this study, it is your responsibility to submit to the Ethics Committee a Dutch version of the information sheet and consent form.

We hereby confirm that this Ethics Committee is organized and operates according to ICH GCP and the applicable law and regulations.

MR G. NISSET
Secretary

Pr C. MELOT
Chairman



Cliniques universitaires de Bruxelles
Route de Lennik 808
B-1070 Bruxelles
T +32 (0)2 555 31 11
M webmaster@erasme.ulb.ac.be
S www.erasme.ulb.ac.be

Hôpital
Erasme



List of Members present at the meeting of 02/10/2012 (dd/mm/yyyy)

Comité d'Ethique
hospitalo-facultaire
Erasme - ULB
(021 / 406)

Secrétariat

T 02 555 37 07

02 555 37 11

F 02 555 46 20

secretariat.ethique@erasme.ulb.ac.be

M comite.ethique@erasme.ulb.ac.be

www.erasme.ulb.ac.be/ethique

Président :

Pr C. MELOT

Vice-Présidents :

Pr S. GOLDMAN

Pr M. REMMELINK

Pr M. MANTO

Dr J.L. VACHIERY

Secrétaire :

Mr G. NISSET

Past President:

Pr A. HERCHUELZ

■ = present

□ = absent

E = excused

- Pr C. MELOT, Emergency doctor, MD, PhD, Male, Scientist, Affiliated
- Pr S. GOLDMAN, Neurologist, MD, PhD, Male, Scientist, Affiliated
- Pr M. REMMELINK, Pathologist, MD, PhD, Female, Scientist, Affiliated
- Pr M. MANTO, Neurologist, MD, PhD, Male, Scientist, Affiliated
- E Dr J.-L. VACHIERY, Cardiologist, MD, Male, Scientist, Affiliated
- Mr G. NISSET, Ethics Committee Secretary, BSc, PhD, Male, Scientist, Affiliated
- Pr A. HERCHUELZ, Pharmacologist, MD, PhD, Male, Scientist, Affiliated
- Pr S. ALEXANDER, Gynecologist, MD, PhD, Female, Scientist, Affiliated
- Dr J. BERRE, Intensivist, MD, Male, Scientist, Affiliated
- Dr J.-C. BIER, Neurologist, MD, Male, Scientist, Affiliated
- E Pr J.-M. BOEYNAEMS, Biologist, MD, PhD, Male, Scientist, Affiliated
- E Dr S. DE BREUCKER, Geriatriest, MD, Female, Scientist, Affiliated
- Dr E. DEMANET, General Practitioner, MD, Male, Scientist, Affiliated
- Dr P. DEMETTER, Pathologist, MD, PhD, Male, Scientist, Affiliated
- Dr F. FELGUEROSO-BUENO, General Practitioner, MD, Male, Scientist, Affiliated
- Mr P. FISCHBACH, Psychologist, BSc, Male, Scientist, Affiliated
- E Pr V. FONTAINE, Microbiologist, PhD, Female, Scientist, Affiliated
- Me B. FONTEYN, Lawyer, Male, Non Scientist, Non Affiliated
- Mme. N. GAMMAR, Assistant Nursing Director, Nurse, Female, Scientist, Affiliated
- E Dr R. IMBERT, Gynecologist, MD, Male, Scientist, Affiliated
- E Me A. KAHN, Lawyer, Female, Non Scientist, Non Affiliated
- Pr H. LOUIS, Gastroenterologist, MD, PhD, Male, Scientist, Affiliated
- Pr M. MBIYANGANDU KADIATA, Chemist, PhD, Male, Scientist, Affiliated
- E Mr M. MAYER, Moral Counsel, BSc, PhD, Male, Non Scientist, Affiliated
- Dr J. ROUBY, General Practitioner, MD, Male, Scientist, Non Affiliated
- E Mme C. SAUVAGE, Physiotherapist, BSc, Female, Scientist, Affiliated

Notification of conflict of interest for some clinical research projects evaluated during the present meeting: none. This(ose) member(s) didn't participate neither to the discussion, nor to the Ethic's Committee decision for this(ose) clinical research project(s).

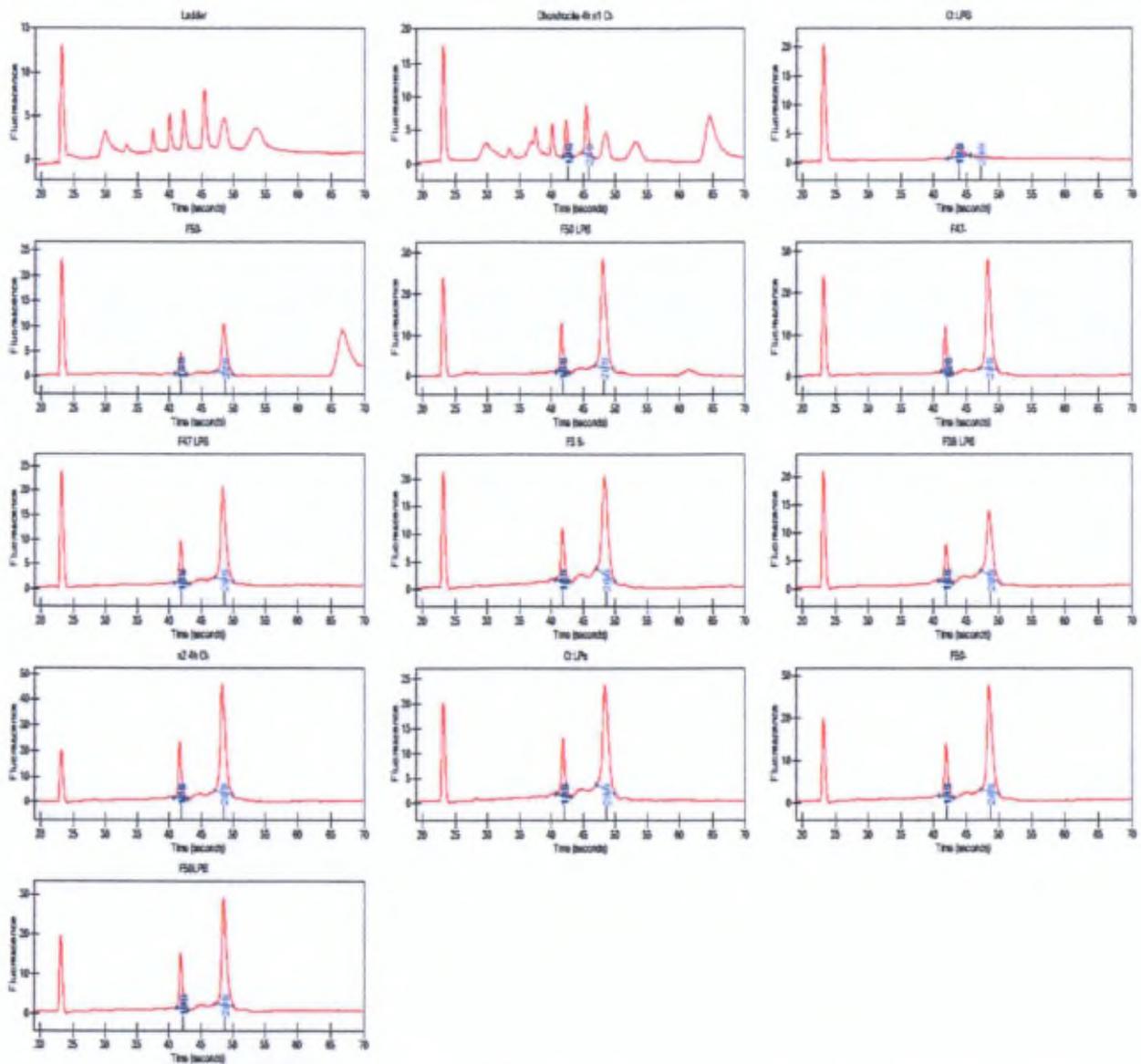
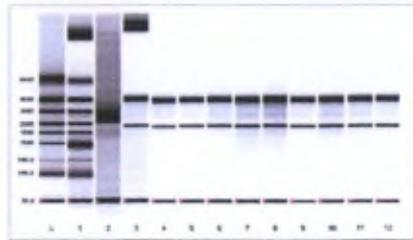
Edited October 02, 2012



Run Overview Report

Project: anapath
Assay: Eukaryote Total RNA StdSens
Run: Run_1-29-2013_11-19-45 AM
Run Version: N/A

Acq. Analyst: DefaultUser
Acq. Time: 1/29/2013 11:19:46 AM
Signature: N/A



Run Summary Report

Page 2 of 2

Project: anapath
 Assay: Eukaryote Total RNA StdSens
 Run: Run_1-29-2013_11-19-45 AM
 Run Version: N/A

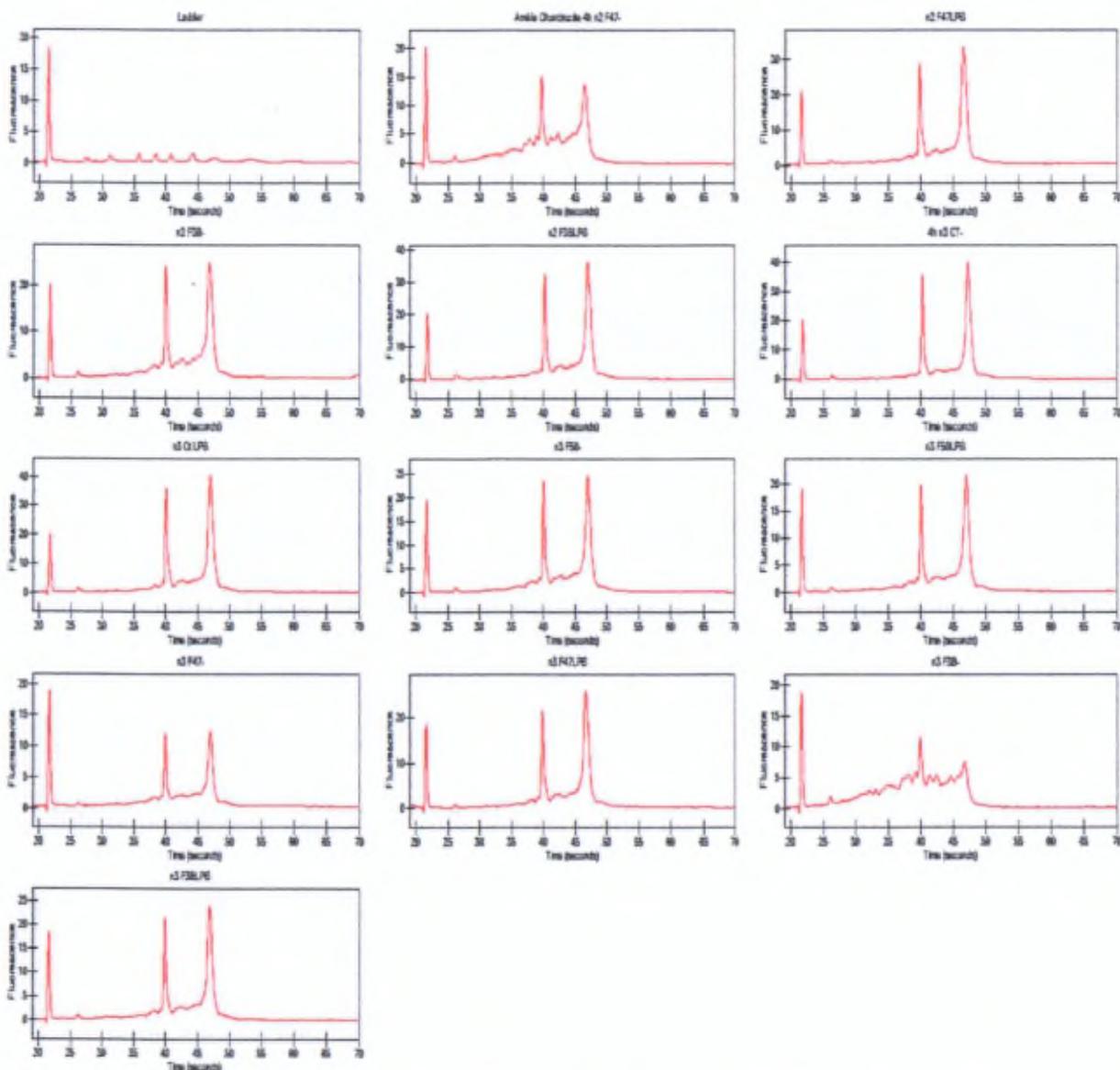
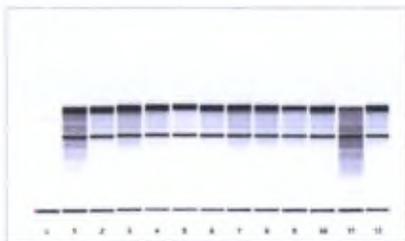
Acq. Analyst: DefaultUser
 Acq. Time: 1/29/2013 11:19:46 AM
 Signature: N/A

Well ID	Sample Name	RNA Area	RNA Concentration (ng/μl)	Ratio [28S:18S]	RQI	RQI Classification	RQI Alert
L	Ladder	137.45	160.00				
1	Chondrocyte 4h n1 Ct-	111.39	129.66	1.35	7.5	■	
2	Ct LPS	34.87	40.59	0.01	6.1	■	
3	F50-	32.11	37.38	3.35	8.1	■	
4	F50 LPS	137.55	160.12	3.24	9.1	■	
5	F47-	99.06	115.32	3.39	8.8	■	
6	F47 LPS	95.55	111.23	3.22	8.5	■	
7	F3 B-	111.85	130.20	2.66	8.6	■	
8	F3B LPS	73.86	85.98	2.52	8.8	■	
9	n2 4h Ct-	193.28	224.99	2.72	9.2	■	
10	Ct LPs	126.97	147.80	2.65	8.8	■	
11	F50-	113.64	132.29	2.82	8.8	■	
12	F50LPS	108.03	125.75	2.66	8.8	■	

Run Overview Report

Project: anapath
Assay: Eukaryote Total RNA StdSens
Run: Run_1-29-2013_12-10-56 PM
Run Version: N/A

Acq. Analyst: DefaultUser
Acq. Time: 1/29/2013 12:10:57 PM
Signature: N/A



Run Summary Report

Page 2 of 2

Project: anapath
 Assay: Eukaryote Total RNA StdSens
 Run: Run_1-29-2013_12-10-56 PM
 Run Version: N/A

Acq. Analyst: DefaultUser
 Acq. Time: 1/29/2013 12:10:57 PM
 Signature: N/A

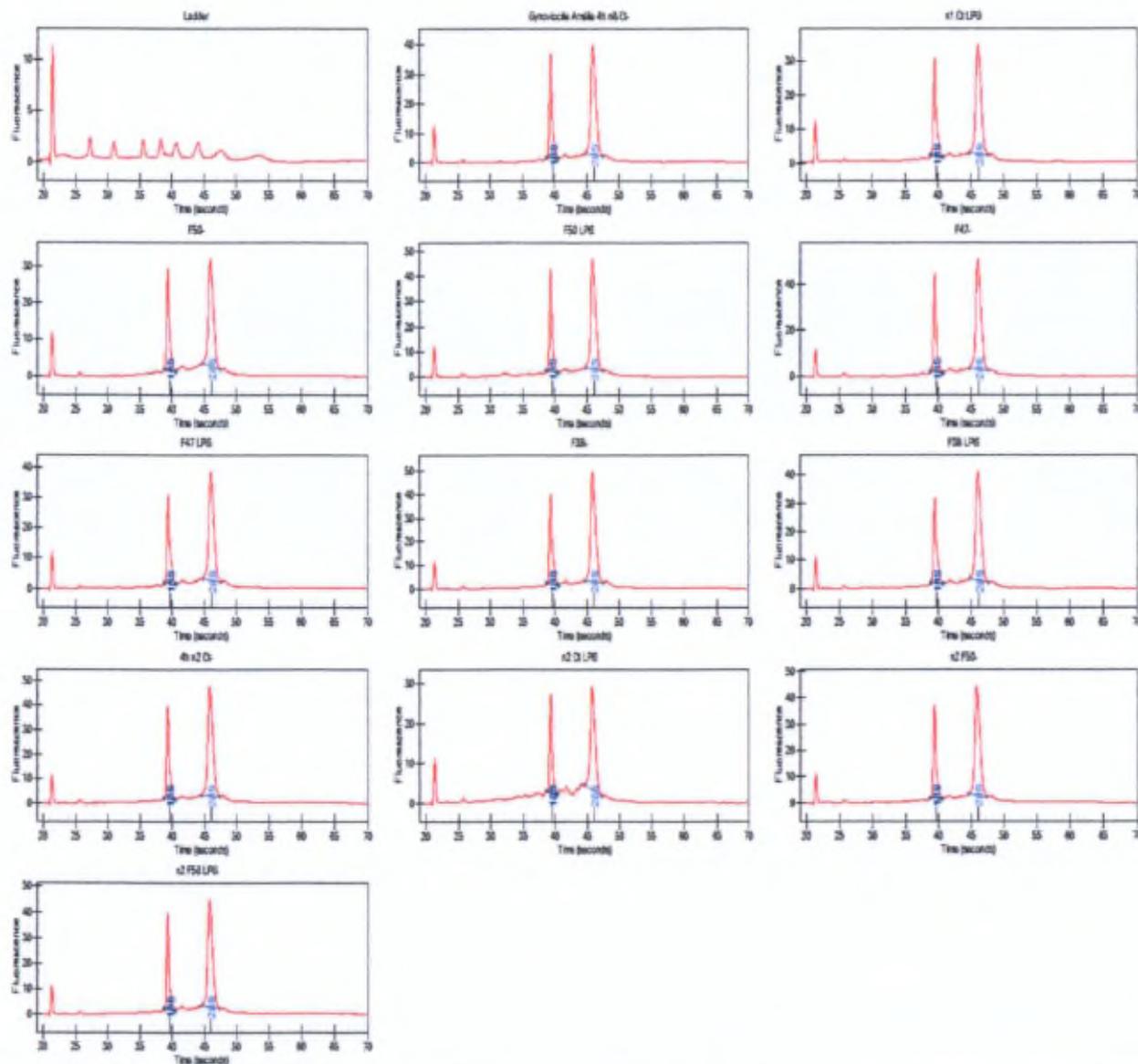
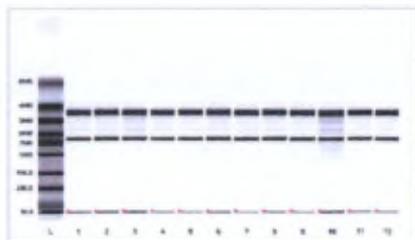
Well ID	Sample Name	RNA Area	RNA Concentration (ng/µl)	Ratio [28S:18S]	RQI	RQI Classification	RQI Alert
L	Ladder	0.00	0.00				
1	Amélie Chondroците 4h n2 F47-	0.00	0.00	0.00	0.0		
2	n2 F47LPS	0.00	0.00	0.00	0.0		
3	n2 F3B-	0.00	0.00	0.00	0.0		
4	n2 F3BLPS	0.00	0.00	0.00	0.0		
5	4h n3 CT-	0.00	0.00	0.00	0.0		
6	n3 Ct LPS	0.00	0.00	0.00	0.0		
7	n3 F50-	0.00	0.00	0.00	0.0		
8	n3 F50LPS	0.00	0.00	0.00	0.0		
9	n3 F47-	0.00	0.00	0.00	0.0		
10	n3 F47LPS	0.00	0.00	0.00	0.0		
11	n3 F3B-	0.00	0.00	0.00	0.0		
12	n3 F3BLPS	0.00	0.00	0.00	0.0		

Printed: Tuesday, January 29, 2013 2:28:33 PM

Run Overview Report

Project: anapath
Assay: Eukaryote Total RNA StdSens
Run: Run_1-29-2013_3-39-48 PM
Run Version: N/A

Acq. Analyst: DefaultUser
Acq. Time: 1/29/2013 3:39:50 PM
Signature: N/A



Run Summary Report

Page 2 of 2

Project: anapath
 Assay: Eukaryote Total RNA StdSens
 Run: Run_1-29-2013_3-39-48 PM
 Run Version: N/A

Acq. Analyst: DefaultUser
 Acq. Time: 1/29/2013 3:39:50 PM
 Signature: N/A

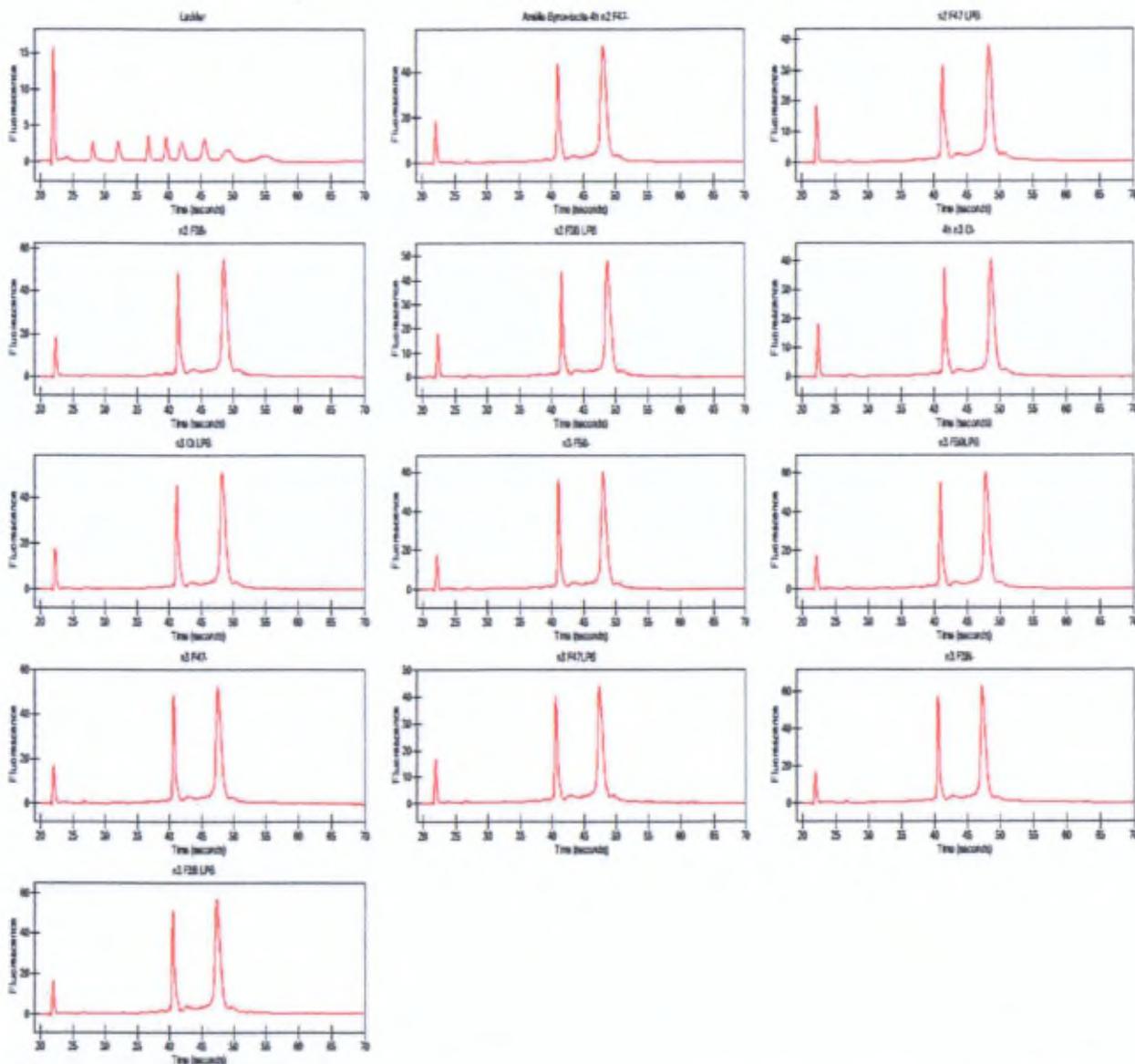
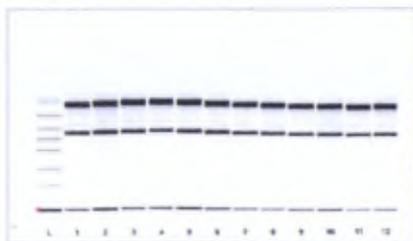
Well ID	Sample Name	RNA Area	RNA Concentration (ng/ μ l)	Ratio [28S:18S]	RQI	RQI Classification	RQI Alert
L	Ladder	44.29	160.00				
1	Synoviocyte Amélie 4h n& Ct-	184.58	666.79	1.76	10.0	■	
2	n1 Ct LPS	175.16	632.77	1.76	10.0	■	
3	F50-	166.43	601.24	1.67	9.9	■	
4	F50 LPS	221.09	798.69	1.83	9.9	■	
5	F47-	226.58	818.54	1.84	10.0	■	
6	F47 LPS	198.51	717.11	1.83	10.0	■	
7	F3B-	231.89	837.69	1.89	10.0	■	
8	F3B LPS	197.09	712.01	1.90	10.0	■	
9	4h n2 Ct-	229.37	828.59	1.82	10.0	■	
10	n2 Ct LPS	199.37	720.24	1.80	9.2	■	
11	n2 F50-	204.79	739.80	1.84	10.0	■	
12	n2 F50 LPS	208.40	752.86	1.82	10.0	■	

Printed: Tuesday, January 29, 2013 4:08:44 PM

Run Overview Report

Project: anapath
Assay: Eukaryote Total RNA StdSens
Run: Run_1-29-2013_4-23-34 PM
Run Version: N/A

Acq. Analyst: DefaultUser
Acq. Time: 1/29/2013 4:23:36 PM
Signature: N/A



Run Summary Report

Page 2 of 2

Project: anapath
 Assay: Eukaryote Total RNA StdSens
 Run: Run_1-29-2013_4-23-34 PM
 Run Version: N/A

Acq. Analyst: DefaultUser
 Acq. Time: 1/29/2013 4:23:36 PM
 Signature: N/A

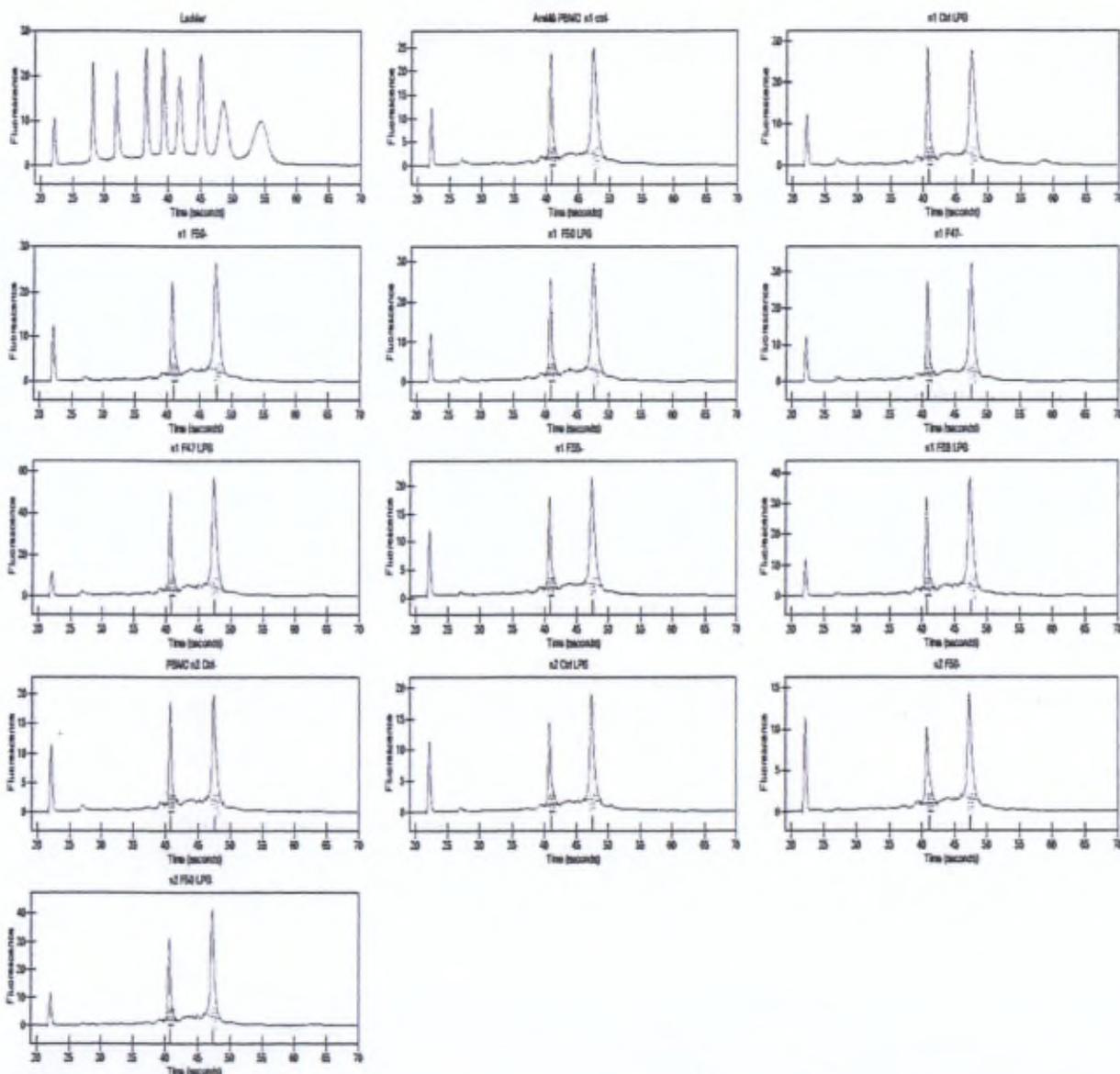
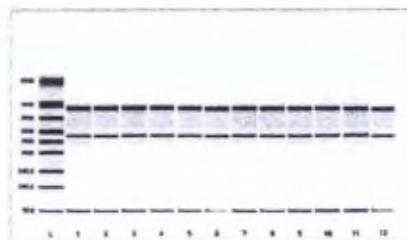
Well ID	Sample Name	RNA Area	RNA Concentration (ng/μl)	Ratio [28S:18S]	RQI	RQI Classification	RQI Alert
L	Ladder	0.00	0.00				
1	Amélie Synoviocyte 4h n2 F47-	0.00	0.00	0.00	0.0		
2	n2 F47 LPS	0.00	0.00	0.00	0.0		
3	n2 F3B-	0.00	0.00	0.00	0.0		
4	n2 F3B LPS	0.00	0.00	0.00	0.0		
5	4h n3 Ct-	0.00	0.00	0.00	0.0		
6	n3 Ct LPS	0.00	0.00	0.00	0.0		
7	n3 F50-	0.00	0.00	0.00	0.0		
8	n3 F50LPS	0.00	0.00	0.00	0.0		
9	n3 F47-	0.00	0.00	0.00	0.0		
10	n3 F47LPS	0.00	0.00	0.00	0.0		
11	n3 F3B-	0.00	0.00	0.00	0.0		
12	n3 F3B LPS	0.00	0.00	0.00	0.0		

Printed: Tuesday, January 29, 2013 4:55:06 PM

Run Overview Report

Project: anapath
 Assay: Eukaryote Total RNA StdSens
 Run: Run_3-8-2013_1-30-54 PM
 Run Version: N/A

Acq. Analyst: DefaultUser
 Acq. Time: 3/8/2013 1:30:55 PM
 Signature: N/A



Run Summary Report

Page 2 of 2

Project: anapath
 Assay: Eukaryote Total RNA StdSens
 Run: Run_3-8-2013_1-30-54 PM
 Run Version: N/A

Acq. Analyst: DefaultUser
 Acq. Time: 3/8/2013 1:30:55 PM
 Signature: N/A

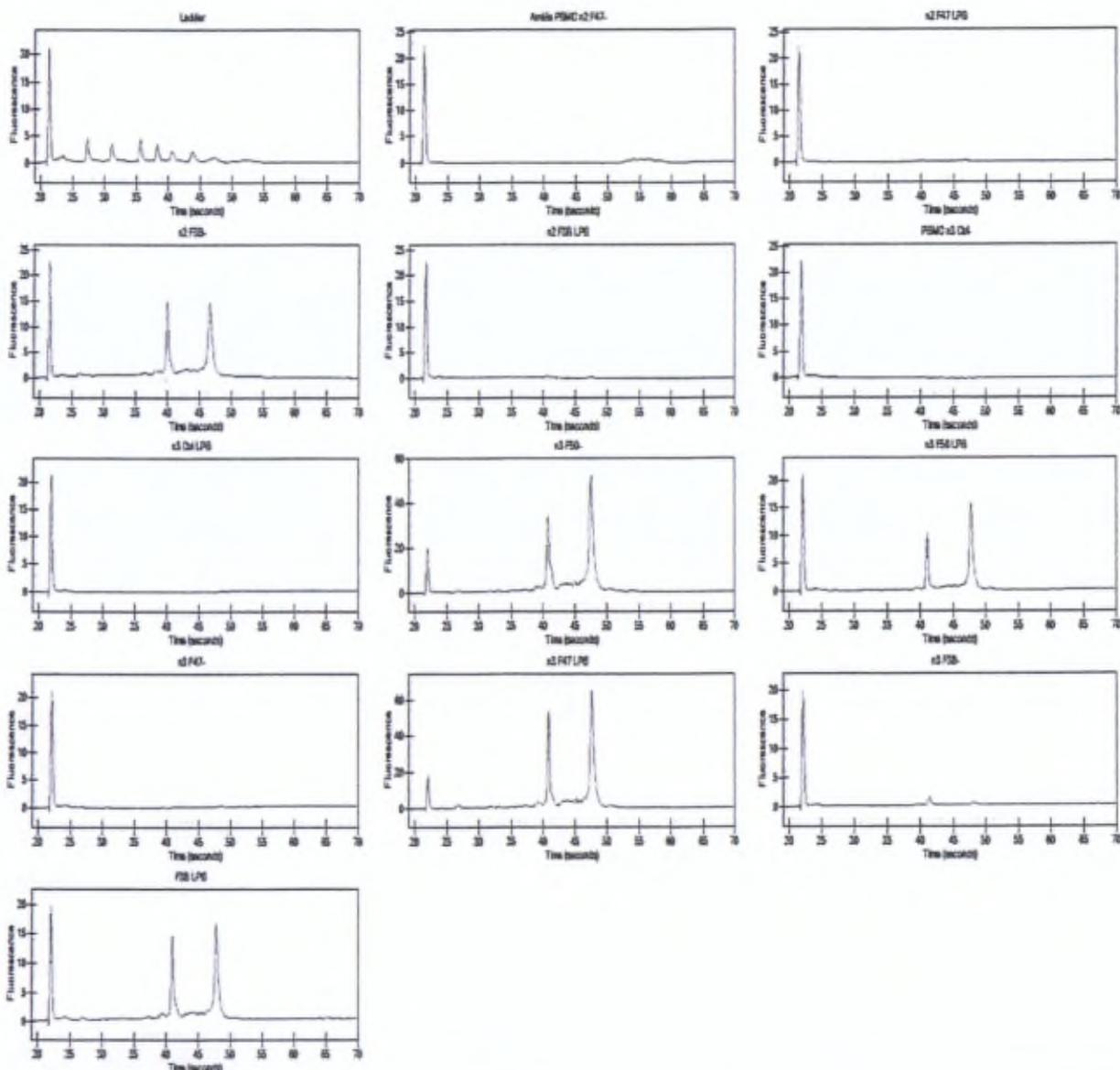
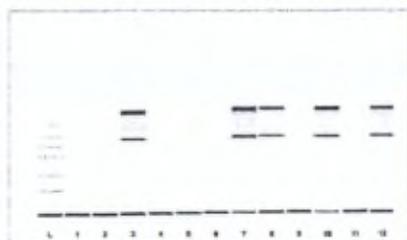
Well ID	Sample Name	RNA Area	RNA Concentration (ng/ μ l)	Ratio [28S:18S]	RQI	RQI Classification	RQI Alert
L	Ladder	433.93	160.00				
1	Amélié PBMC n1 ctrl-	163.64	60.34	1.61	9.7	■	
2	n1 Ctrl LPS	179.56	66.21	1.54	9.7	■	
3	n1 F50-	160.50	59.18	1.61	9.8	■	
4	n1 F50 LPS	173.33	63.91	1.63	9.7	■	
5	n1 F47-	165.36	60.97	1.62	9.7	■	
6	n1 F47 LPS	309.32	114.05	1.62	9.7	■	
7	n1 F3B-	123.12	45.40	1.57	9.6	■	
8	n1 F3B LPS	206.52	76.15	1.63	9.7	■	
9	PBMC n2 Ctrl-	114.56	42.24	1.42	9.4	■	
10	n2 Ctrl LPS	102.62	37.84	1.55	9.7	■	
11	n2 F50-	83.52	30.80	1.38	9.2	■	
12	n2 F50 LPS	179.29	66.11	1.62	9.7	■	

Printed: Friday, March 08, 2013 2:03:47 PM

Run Overview Report

Project: anapath
Assay: Eukaryote Total RNA StdSens
Run: Run_3-8-2013_2-30-04 PM
Run Version: N/A

Acq. Analyst: DefaultUser
Acq. Time: 3/8/2013 2:30:05 PM
Signature: N/A



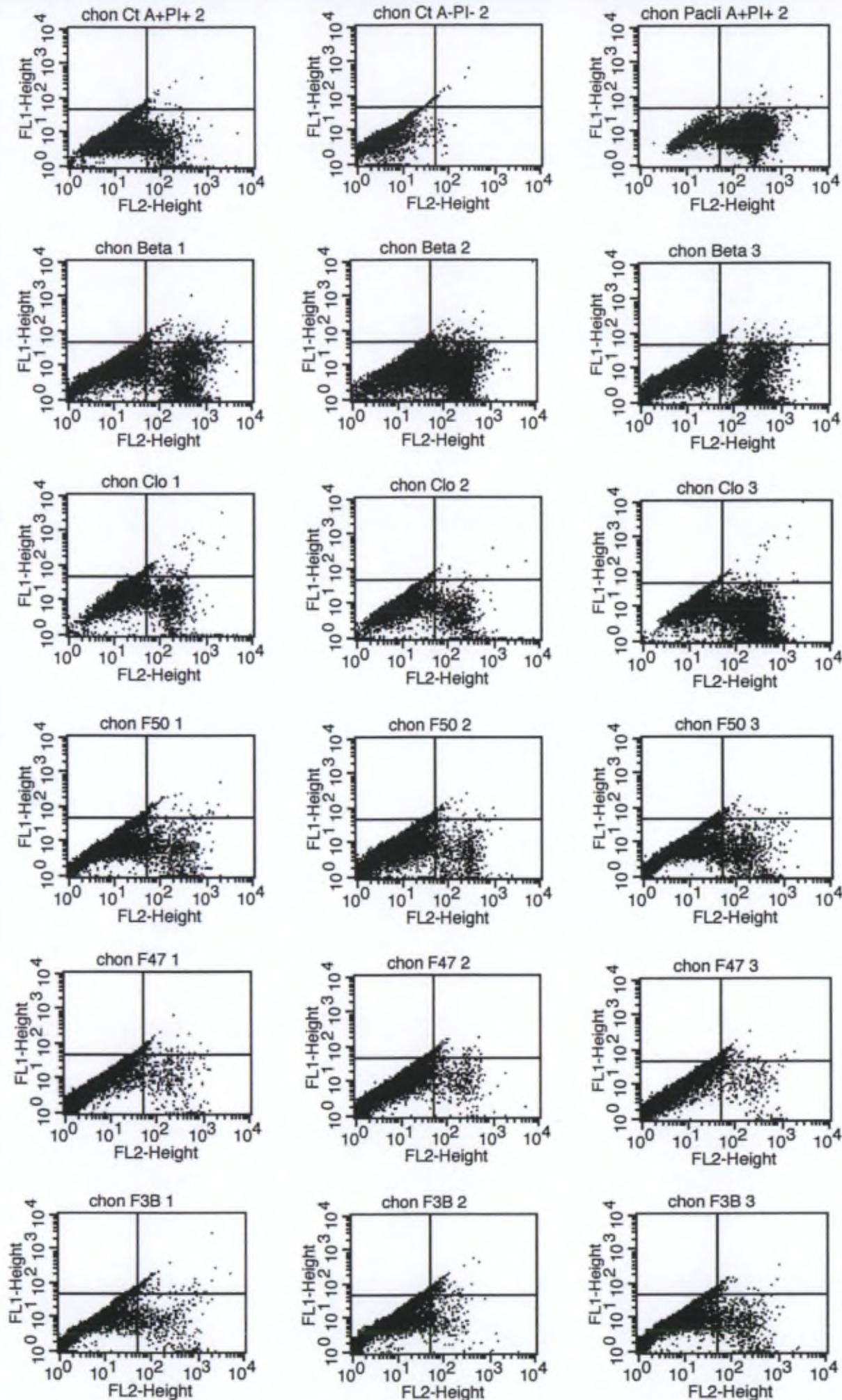
Run Summary Report

Page 2 of 2

Project: anapath
 Assay: Eukaryote Total RNA StdSens
 Run: Run_3-8-2013_2-30-04 PM
 Run Version: N/A

Acq. Analyst: DefaultUser
 Acq. Time: 3/8/2013 2:30:05 PM
 Signature: N/A

Well ID	Sample Name	RNA Area	RNA Concentration (ng/µl)	Ratio [28S:18S]	RQI	RQI Classification	RQI Alert
L	Ladder	0.00	0.00				
1	Amélie PBMC n2 F47-	0.00	0.00	0.00	0.0		
2	n2 F47 LPS	0.00	0.00	0.00	0.0		
3	n2 F3B-	0.00	0.00	0.00	0.0		
4	n2 F3B LPS	0.00	0.00	0.00	0.0		
5	PBMC n3 Ctrl-	0.00	0.00	0.00	0.0		
6	n3 Ctrl LPS	0.00	0.00	0.00	0.0		
7	n3 F50-	0.00	0.00	0.00	0.0		
8	n3 F50 LPS	0.00	0.00	0.00	0.0		
9	n3 F47-	0.00	0.00	0.00	0.0		
10	n3 F47 LPS	0.00	0.00	0.00	0.0		
11	n3 F3B-	0.00	0.00	0.00	0.0		
12	F3B LPS	0.00	0.00	0.00	0.0		



Quadrant Statistics

File: chon Ct A+PI+ 2 Log Data Units: Linear Values
 Sample ID: chon Ct A+PI+ 2 Patient ID:
 Tube: Untitled Panel: Untitled Acquisition Tube List
 Acquisition Date: 15-Mar-13 Gate: No Gate
 Gated Events: 10000 Total Events: 10000
 X Parameter: FL2-Height (Log) Y Parameter: FL1-Height (Log)
 Quad Location: 49, 47

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
UL	49	0.49	0.49	37.28	36.85	56.48	55.84
UR	27	0.27	0.27	121.72	91.37	108.15	92.19
LL	9080	90.80	90.80	10.74	8.40	7.97	6.70
LR	844	8.44	8.44	147.96	111.51	6.18	4.33

Quadrant Statistics

File: chon Ct A-PI- 2 Log Data Units: Linear Values
 Sample ID: chon Ct A-PI- 2 Patient ID:
 Tube: Untitled Panel: Untitled Acquisition Tube List
 Acquisition Date: 15-Mar-13 Gate: No Gate
 Gated Events: 10000 Total Events: 10000
 X Parameter: FL2-Height (Log) Y Parameter: FL1-Height (Log)
 Quad Location: 49, 47

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
UL	45	0.45	0.45	34.83	34.24	62.09	61.01
UR	11	0.11	0.11	103.66	86.81	192.65	157.30
LL	9924	99.24	99.24	4.18	3.31	7.17	5.88
LR	20	0.20	0.20	75.86	73.42	9.71	7.98

Quadrant Statistics

File: chon Pacli A+PI+ 2 Log Data Units: Linear Values
 Sample ID: chon Pacli A+PI+ 2 Patient ID:
 Tube: Untitled Panel: Untitled Acquisition Tube List
 Acquisition Date: 15-Mar-13 Gate: No Gate
 Gated Events: 10000 Total Events: 10000
 X Parameter: FL2-Height (Log) Y Parameter: FL1-Height (Log)
 Quad Location: 49, 47

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
UL	1	0.01	0.01	43.32	43.32	56.74	56.74
UR	19	0.19	0.19	1133.13	593.52	85.24	76.93
LL	1921	19.21	19.21	16.57	13.70	8.42	7.42
LR	8059	80.59	80.59	260.43	223.42	9.18	7.99

Quadrant Statistics

File: chon Beta 1
 Sample ID: chon Beta 1
 Tube: Untitled
 Acquisition Date: 15-Mar-13
 Gated Events: 10000
 X Parameter: FL2-Height (Log)
 Quad Location: 49, 47

Log Data Units: Linear Values
 Patient ID:
 Panel: Untitled Acquisition Tube List
 Gate: No Gate
 Total Events: 10000
 Y Parameter: FL1-Height (Log)

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
UL	45	0.45	0.45	42.62	42.50	55.04	54.75
UR	151	1.51	1.51	392.51	191.15	90.04	78.66
LL	7662	76.62	76.62	10.68	7.12	9.67	7.33
LR	2142	21.42	21.42	381.84	283.07	11.41	6.49

Quadrant Statistics

File: chon Beta 2
 Sample ID: chon Beta 2
 Tube: Untitled
 Acquisition Date: 15-Mar-13
 Gated Events: 10000
 X Parameter: FL2-Height (Log)
 Quad Location: 49, 47

Log Data Units: Linear Values
 Patient ID:
 Panel: Untitled Acquisition Tube List
 Gate: No Gate
 Total Events: 10000
 Y Parameter: FL1-Height (Log)

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
UL	29	0.29	0.29	39.97	39.47	58.60	57.92
UR	125	1.25	1.25	252.89	133.43	157.49	74.33
LL	6379	63.79	63.79	16.22	11.96	8.40	6.47
LR	3467	34.67	34.67	210.68	168.56	9.87	6.46

Quadrant Statistics

File: chon Beta 3
 Sample ID: chon Beta 3
 Tube: Untitled
 Acquisition Date: 15-Mar-13
 Gated Events: 10000
 X Parameter: FL2-Height (Log)
 Quad Location: 49, 47

Log Data Units: Linear Values
 Patient ID:
 Panel: Untitled Acquisition Tube List
 Gate: No Gate
 Total Events: 10000
 Y Parameter: FL1-Height (Log)

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
UL	51	0.51	0.51	41.88	41.64	54.63	54.35
UR	116	1.16	1.16	389.28	216.87	78.22	72.78
LL	7728	77.28	77.28	9.62	6.07	8.74	6.45
LR	2105	21.05	21.05	333.77	251.71	10.90	6.34

Quadrant Statistics

File: chon Clo 1
 Sample ID: chon Clo 1
 Tube: Untitled
 Acquisition Date: 15-Mar-13
 Gated Events: 10000
 X Parameter: FL2-Height (Log)
 Quad Location: 49, 47

Log Data Units: Linear Values
 Patient ID:
 Panel: Untitled Acquisition Tube List
 Gate: No Gate
 Total Events: 10000
 Y Parameter: FL1-Height (Log)

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
UL	97	0.97	0.97	37.89	37.41	57.69	57.03
UR	91	0.91	0.91	229.48	128.51	171.45	103.55
LL	8957	89.57	89.57	12.12	10.46	12.50	10.97
LR	855	8.55	8.55	216.89	153.68	11.19	7.82

Quadrant Statistics

File: chon Clo 2
 Sample ID: chon Clo 2
 Tube: Untitled
 Acquisition Date: 15-Mar-13
 Gated Events: 10000
 X Parameter: FL2-Height (Log)
 Quad Location: 49, 47

Log Data Units: Linear Values
 Patient ID:
 Panel: Untitled Acquisition Tube List
 Gate: No Gate
 Total Events: 10000
 Y Parameter: FL1-Height (Log)

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
UL	35	0.35	0.35	37.39	37.03	56.92	56.44
UR	17	0.17	0.17	616.30	205.35	108.14	94.15
LL	9192	91.92	91.92	9.01	7.49	9.79	8.48
LR	756	7.56	7.56	223.52	156.62	7.21	4.91

Quadrant Statistics

File: chon Clo 3
 Sample ID: chon Clo 3
 Tube: Untitled
 Acquisition Date: 15-Mar-13
 Gated Events: 8025
 X Parameter: FL2-Height (Log)
 Quad Location: 49, 47

Log Data Units: Linear Values
 Patient ID:
 Panel: Untitled Acquisition Tube List
 Gate: No Gate
 Total Events: 8025
 Y Parameter: FL1-Height (Log)

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
UL	25	0.31	0.31	39.27	38.85	58.09	57.36
UR	42	0.52	0.52	430.68	217.44	453.15	125.30
LL	5011	62.44	62.44	12.36	10.16	9.94	8.63
LR	2947	36.72	36.72	271.56	207.85	6.63	4.16

Quadrant Statistics

File: chon F50 1
 Sample ID: chon F50 1
 Tube: Untitled
 Acquisition Date: 15-Mar-13
 Gated Events: 10000
 X Parameter: FL2-Height (Log)
 Quad Location: 49, 47

Log Data Units: Linear Values
 Patient ID:
 Panel: Untitled Acquisition Tube List
 Gate: No Gate
 Total Events: 10000
 Y Parameter: FL1-Height (Log)

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
UL	150	1.50	1.50	38.16	37.82	56.25	55.85
UR	82	0.82	0.82	359.20	125.35	93.04	83.58
LL	9000	90.00	90.00	8.86	5.66	9.74	6.45
LR	768	7.68	7.68	232.83	171.41	8.62	5.52

Quadrant Statistics

File: chon F50 2
 Sample ID: chon F50 2
 Tube: Untitled
 Acquisition Date: 15-Mar-13
 Gated Events: 10000
 X Parameter: FL2-Height (Log)
 Quad Location: 49, 47

Log Data Units: Linear Values
 Patient ID:
 Panel: Untitled Acquisition Tube List
 Gate: No Gate
 Total Events: 10000
 Y Parameter: FL1-Height (Log)

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
UL	120	1.20	1.20	38.48	38.11	56.11	55.71
UR	65	0.65	0.65	143.58	94.20	88.31	82.75
LL	9245	92.45	92.45	8.43	5.28	8.56	5.61
LR	570	5.70	5.70	235.28	178.51	8.35	4.84

Quadrant Statistics

File: chon F50 3
 Sample ID: chon F50 3
 Tube: Untitled
 Acquisition Date: 15-Mar-13
 Gated Events: 10000
 X Parameter: FL2-Height (Log)
 Quad Location: 49, 47

Log Data Units: Linear Values
 Patient ID:
 Panel: Untitled Acquisition Tube List
 Gate: No Gate
 Total Events: 10000
 Y Parameter: FL1-Height (Log)

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
UL	143	1.43	1.43	37.51	37.18	56.43	56.06
UR	61	0.61	0.61	121.19	83.09	81.77	78.46
LL	8995	89.95	89.95	9.19	6.43	9.99	7.40
LR	801	8.01	8.01	199.44	148.19	7.81	4.94

Quadrant Statistics

File: chon F47 1
 Sample ID: chon F47 1
 Tube: Untitled
 Acquisition Date: 15-Mar-13
 Gated Events: 10000
 X Parameter: FL2-Height (Log)
 Quad Location: 49, 47

Log Data Units: Linear Values
 Patient ID:
 Panel: Untitled Acquisition Tube List
 Gate: No Gate
 Total Events: 10000
 Y Parameter: FL1-Height (Log)

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
UL	141	1.41	1.41	38.43	38.06	55.61	55.28
UR	75	0.75	0.75	150.60	91.12	92.01	82.80
LL	9476	94.76	94.76	7.46	4.63	9.56	6.10
LR	308	3.08	3.08	265.52	184.19	13.80	8.72

Quadrant Statistics

File: chon F47 2
 Sample ID: chon F47 2
 Tube: Untitled
 Acquisition Date: 15-Mar-13
 Gated Events: 10000
 X Parameter: FL2-Height (Log)
 Quad Location: 49, 47

Log Data Units: Linear Values
 Patient ID:
 Panel: Untitled Acquisition Tube List
 Gate: No Gate
 Total Events: 10000
 Y Parameter: FL1-Height (Log)

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
UL	144	1.44	1.44	39.35	39.01	56.24	55.82
UR	102	1.02	1.02	107.32	82.77	81.54	77.45
LL	9377	93.77	93.77	9.45	5.96	10.61	6.93
LR	377	3.77	3.77	217.96	155.91	15.22	10.88

Quadrant Statistics

File: chon F47 3
 Sample ID: chon F47 3
 Tube: Untitled
 Acquisition Date: 15-Mar-13
 Gated Events: 10000
 X Parameter: FL2-Height (Log)
 Quad Location: 49, 47

Log Data Units: Linear Values
 Patient ID:
 Panel: Untitled Acquisition Tube List
 Gate: No Gate
 Total Events: 10000
 Y Parameter: FL1-Height (Log)

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
UL	243	2.43	2.43	39.54	39.20	57.01	56.58
UR	120	1.20	1.20	116.31	77.65	84.09	80.09
LL	9383	93.83	93.83	8.99	5.66	11.52	7.26
LR	254	2.54	2.54	247.88	167.67	16.48	10.40

Quadrant Statistics

File: chon F3B 1 Log Data Units: Linear Values
 Sample ID: chon F3B 1 Patient ID:
 Tube: Untitled Panel: Untitled Acquisition Tube List
 Acquisition Date: 15-Mar-13 Gate: No Gate
 Gated Events: 10000 Total Events: 10000
 X Parameter: FL2-Height (Log) Y Parameter: FL1-Height (Log)
 Quad Location: 49, 47

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
UL	424	4.24	4.24	39.04	38.78	55.98	55.65
UR	218	2.18	2.18	172.80	80.77	103.51	87.04
LL	8985	89.85	89.85	9.56	6.26	12.17	7.97
LR	373	3.73	3.73	293.02	183.10	9.26	6.07

Quadrant Statistics

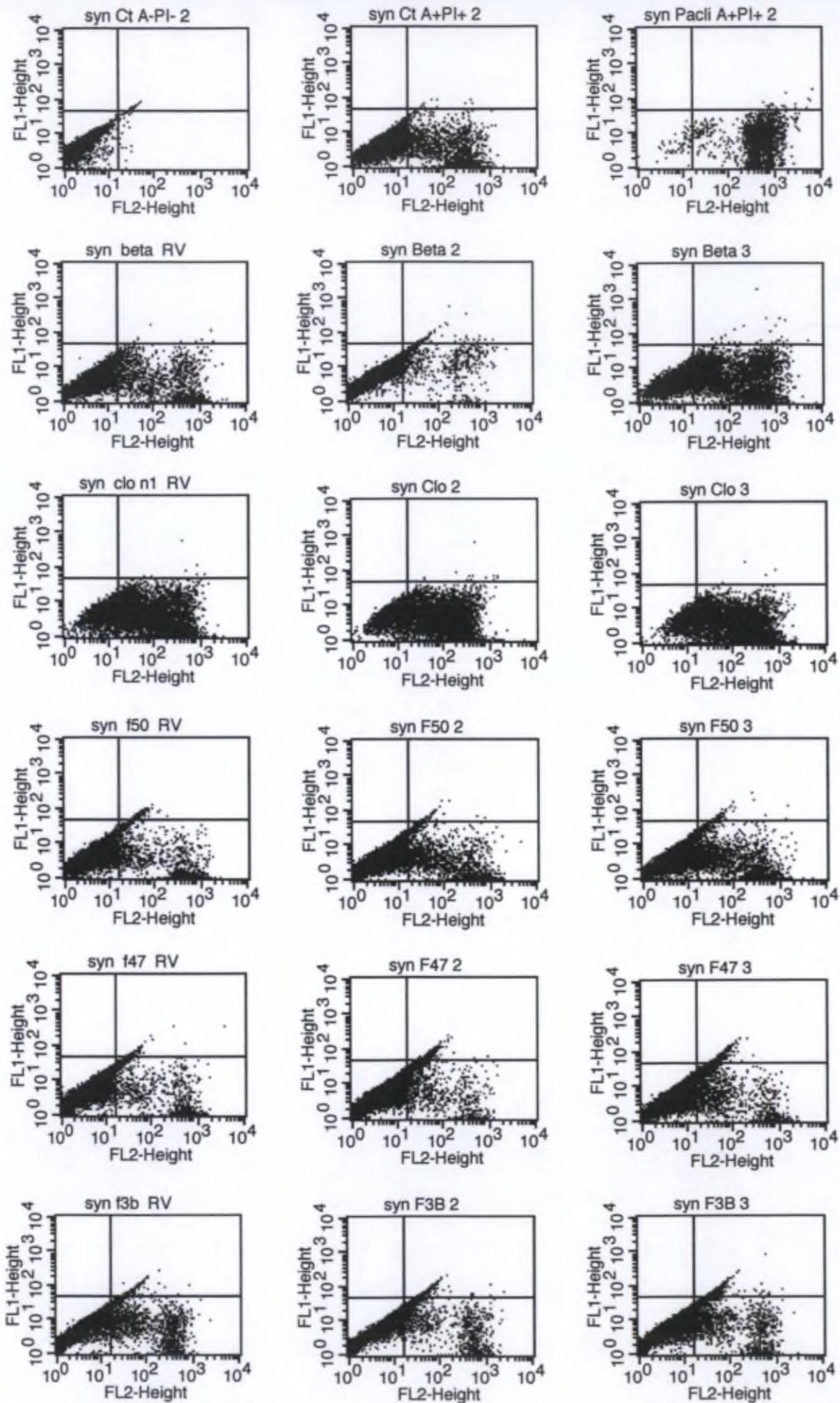
File: chon F3B 2 Log Data Units: Linear Values
 Sample ID: chon F3B 2 Patient ID:
 Tube: Untitled Panel: Untitled Acquisition Tube List
 Acquisition Date: 15-Mar-13 Gate: No Gate
 Gated Events: 10000 Total Events: 10000
 X Parameter: FL2-Height (Log) Y Parameter: FL1-Height (Log)
 Quad Location: 49, 47

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
UL	446	4.46	4.46	39.48	39.16	56.98	56.57
UR	258	2.58	2.58	75.85	68.98	92.19	86.33
LL	9033	90.33	90.33	10.03	6.35	11.75	7.61
LR	263	2.63	2.63	150.67	100.61	12.95	9.02

Quadrant Statistics

File: chon F3B 3 Log Data Units: Linear Values
 Sample ID: chon F3B 3 Patient ID:
 Tube: Untitled Panel: Untitled Acquisition Tube List
 Acquisition Date: 15-Mar-13 Gate: No Gate
 Gated Events: 10000 Total Events: 10000
 X Parameter: FL2-Height (Log) Y Parameter: FL1-Height (Log)
 Quad Location: 49, 47

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
UL	204	2.04	2.04	38.14	37.77	57.37	56.92
UR	80	0.80	0.80	100.08	70.68	90.10	86.46
LL	9166	91.66	91.66	8.95	6.03	10.99	7.66
LR	550	5.50	5.50	216.17	157.84	8.98	5.90



Quadrant Statistics

File: syn Ct A-PI- 2 Log Data Units: Linear Values
 Sample ID: syn Ct A-PI- 2 Patient ID:
 Tube: Untitled Panel: Untitled Acquisition Tube List
 Acquisition Date: 15-Mar-13 Gate: No Gate
 Gated Events: 10000 Total Events: 10000
 X Parameter: FL2-Height (Log) Y Parameter: FL1-Height (Log)
 Quad Location: 16, 47

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
UL	0	0.00	0.00	***	***	***	***
UR	17	0.17	0.17	33.36	32.69	60.33	59.54
LL	9947	99.47	99.47	2.13	1.82	4.12	3.52
LR	36	0.36	0.36	20.99	20.56	26.66	19.02

Quadrant Statistics

File: syn Ct A+PI+ 2 Log Data Units: Linear Values
 Sample ID: syn Ct A+PI+ 2 Patient ID:
 Tube: Untitled Panel: Untitled Acquisition Tube List
 Acquisition Date: 15-Mar-13 Gate: No Gate
 Gated Events: 10000 Total Events: 10000
 X Parameter: FL2-Height (Log) Y Parameter: FL1-Height (Log)
 Quad Location: 16, 47

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
UL	0	0.00	0.00	***	***	***	***
UR	14	0.14	0.14	160.04	89.25	63.49	62.00
LL	8406	84.06	84.06	4.45	3.77	4.07	3.56
LR	1580	15.80	15.80	210.63	120.22	5.38	3.34

Quadrant Statistics

File: syn Pacli A+PI+ 2 Log Data Units: Linear Values
 Sample ID: syn Pacli A+PI+ 2 Patient ID:
 Tube: Untitled Panel: Untitled Acquisition Tube List
 Acquisition Date: 15-Mar-13 Gate: No Gate
 Gated Events: 4545 Total Events: 4545
 X Parameter: FL2-Height (Log) Y Parameter: FL1-Height (Log)
 Quad Location: 16, 47

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
UL	0	0.00	0.00	***	***	***	***
UR	25	0.55	0.55	2522.73	1891.80	68.65	64.40
LL	65	1.43	1.43	9.17	7.80	6.07	4.93
LR	4455	98.02	98.02	532.33	458.91	8.72	6.65

Quadrant Statistics

File: syn clo n1 RV Log Data Units: Linear Values
 Sample ID: syn clo n1 RV Patient ID:
 Tube: Untitled Panel: Untitled Acquisition Tube List
 Acquisition Date: 15-Mar-13 Gate: No Gate
 Gated Events: 10000 Total Events: 10000
 X Parameter: FL2-Height (Log) Y Parameter: FL1-Height (Log)
 Quad Location: 16, 47

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
UL	0	0.00	0.00	***	***	***	***
UR	9	0.09	0.09	444.35	226.94	120.72	79.86
LL	4283	42.83	42.83	9.44	8.70	6.15	5.51
LR	5708	57.08	57.08	171.88	85.81	6.52	4.23

Quadrant Statistics

File: syn Clo 2 Log Data Units: Linear Values
 Sample ID: syn Clo 2 Patient ID:
 Tube: Untitled Panel: Untitled Acquisition Tube List
 Acquisition Date: 15-Mar-13 Gate: No Gate
 Gated Events: 10000 Total Events: 10000
 X Parameter: FL2-Height (Log) Y Parameter: FL1-Height (Log)
 Quad Location: 16, 47

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
UL	0	0.00	0.00	***	***	***	***
UR	15	0.15	0.15	598.94	347.65	101.45	71.43
LL	4739	47.39	47.39	8.70	8.01	6.60	5.94
LR	5246	52.46	52.46	166.48	107.07	5.74	3.84

Quadrant Statistics

File: syn Clo 3 Log Data Units: Linear Values
 Sample ID: syn Clo 3 Patient ID:
 Tube: Untitled Panel: Untitled Acquisition Tube List
 Acquisition Date: 15-Mar-13 Gate: No Gate
 Gated Events: 10000 Total Events: 10000
 X Parameter: FL2-Height (Log) Y Parameter: FL1-Height (Log)
 Quad Location: 16, 47

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
UL	0	0.00	0.00	***	***	***	***
UR	7	0.07	0.07	680.97	469.76	88.56	75.38
LL	3232	32.32	32.32	10.55	10.00	5.67	5.16
LR	6761	67.61	67.61	218.54	106.80	5.13	3.45

Quadrant Statistics

File: syn f50 RV Log Data Units: Linear Values
 Sample ID: syn f50 RV Patient ID:
 Tube: Untitled Panel: Untitled Acquisition Tube List
 Acquisition Date: 15-Mar-13 Gate: No Gate
 Gated Events: 10000 Total Events: 10000
 X Parameter: FL2-Height (Log) Y Parameter: FL1-Height (Log)
 Quad Location: 16, 47

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
UL	0	0.00	0.00	***	***	***	***
UR	130	1.30	1.30	46.34	43.86	63.96	62.31
LL	8647	86.47	86.47	4.35	3.53	4.75	3.85
LR	1223	12.23	12.23	285.22	106.98	11.19	4.89

Quadrant Statistics

File: syn F50 2 Log Data Units: Linear Values
 Sample ID: syn F50 2 Patient ID:
 Tube: Untitled Panel: Untitled Acquisition Tube List
 Acquisition Date: 15-Mar-13 Gate: No Gate
 Gated Events: 10000 Total Events: 10000
 X Parameter: FL2-Height (Log) Y Parameter: FL1-Height (Log)
 Quad Location: 16, 47

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
UL	0	0.00	0.00	***	***	***	***
UR	40	0.40	0.40	79.00	52.81	71.68	67.20
LL	8360	83.60	83.60	4.65	3.83	4.55	3.81
LR	1600	16.00	16.00	236.14	98.02	7.92	4.12

Quadrant Statistics

File: syn F50 3 Log Data Units: Linear Values
 Sample ID: syn F50 3 Patient ID:
 Tube: Untitled Panel: Untitled Acquisition Tube List
 Acquisition Date: 15-Mar-13 Gate: No Gate
 Gated Events: 10000 Total Events: 10000
 X Parameter: FL2-Height (Log) Y Parameter: FL1-Height (Log)
 Quad Location: 16, 47

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
UL	0	0.00	0.00	***	***	***	***
UR	93	0.93	0.93	86.14	52.06	68.96	64.25
LL	7927	79.27	79.27	5.47	4.57	4.49	3.68
LR	1980	19.80	19.80	212.85	85.65	8.73	4.38

Quadrant Statistics

File: syn f47 RV Log Data Units: Linear Values
 Sample ID: syn f47 RV Patient ID:
 Tube: Untitled Panel: Untitled Acquisition Tube List
 Acquisition Date: 15-Mar-13 Gate: No Gate
 Gated Events: 10000 Total Events: 10000
 X Parameter: FL2-Height (Log) Y Parameter: FL1-Height (Log)
 Quad Location: 16, 47

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
UL	0	0.00	0.00	***	***	***	***
UR	68	0.68	0.68	110.12	49.03	76.23	68.23
LL	8937	89.37	89.37	4.13	3.19	5.30	4.03
LR	995	9.95	9.95	244.57	92.35	14.06	6.69

Quadrant Statistics

File: syn F47 2 Log Data Units: Linear Values
 Sample ID: syn F47 2 Patient ID:
 Tube: Untitled Panel: Untitled Acquisition Tube List
 Acquisition Date: 15-Mar-13 Gate: No Gate
 Gated Events: 10000 Total Events: 10000
 X Parameter: FL2-Height (Log) Y Parameter: FL1-Height (Log)
 Quad Location: 16, 47

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
UL	0	0.00	0.00	***	***	***	***
UR	254	2.54	2.54	54.80	47.84	69.89	66.39
LL	8337	83.37	83.37	4.87	3.84	5.88	4.53
LR	1409	14.09	14.09	100.19	40.70	21.17	13.61

Quadrant Statistics

File: syn F47 3 Log Data Units: Linear Values
 Sample ID: syn F47 3 Patient ID:
 Tube: Untitled Panel: Untitled Acquisition Tube List
 Acquisition Date: 15-Mar-13 Gate: No Gate
 Gated Events: 10000 Total Events: 10000
 X Parameter: FL2-Height (Log) Y Parameter: FL1-Height (Log)
 Quad Location: 16, 47

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
UL	0	0.00	0.00	***	***	***	***
UR	294	2.94	2.94	55.03	51.43	73.01	68.38
LL	7773	77.73	77.73	5.48	4.43	5.64	4.46
LR	1933	19.33	19.33	140.49	46.95	17.84	10.65

Quadrant Statistics

File: syn f3b RV Log Data Units: Linear Values
 Sample ID: syn f3b RV Patient ID:
 Tube: Untitled Panel: Untitled Acquisition Tube List
 Acquisition Date: 15-Mar-13 Gate: No Gate
 Gated Events: 10000 Total Events: 10000
 X Parameter: FL2-Height (Log) Y Parameter: FL1-Height (Log)
 Quad Location: 16, 47

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
UL	0	0.00	0.00	***	***	***	***
UR	251	2.51	2.51	52.77	44.63	66.31	63.54
LL	7708	77.08	77.08	5.75	4.42	8.29	6.26
LR	2041	20.41	20.41	127.95	53.65	18.51	11.53

Quadrant Statistics

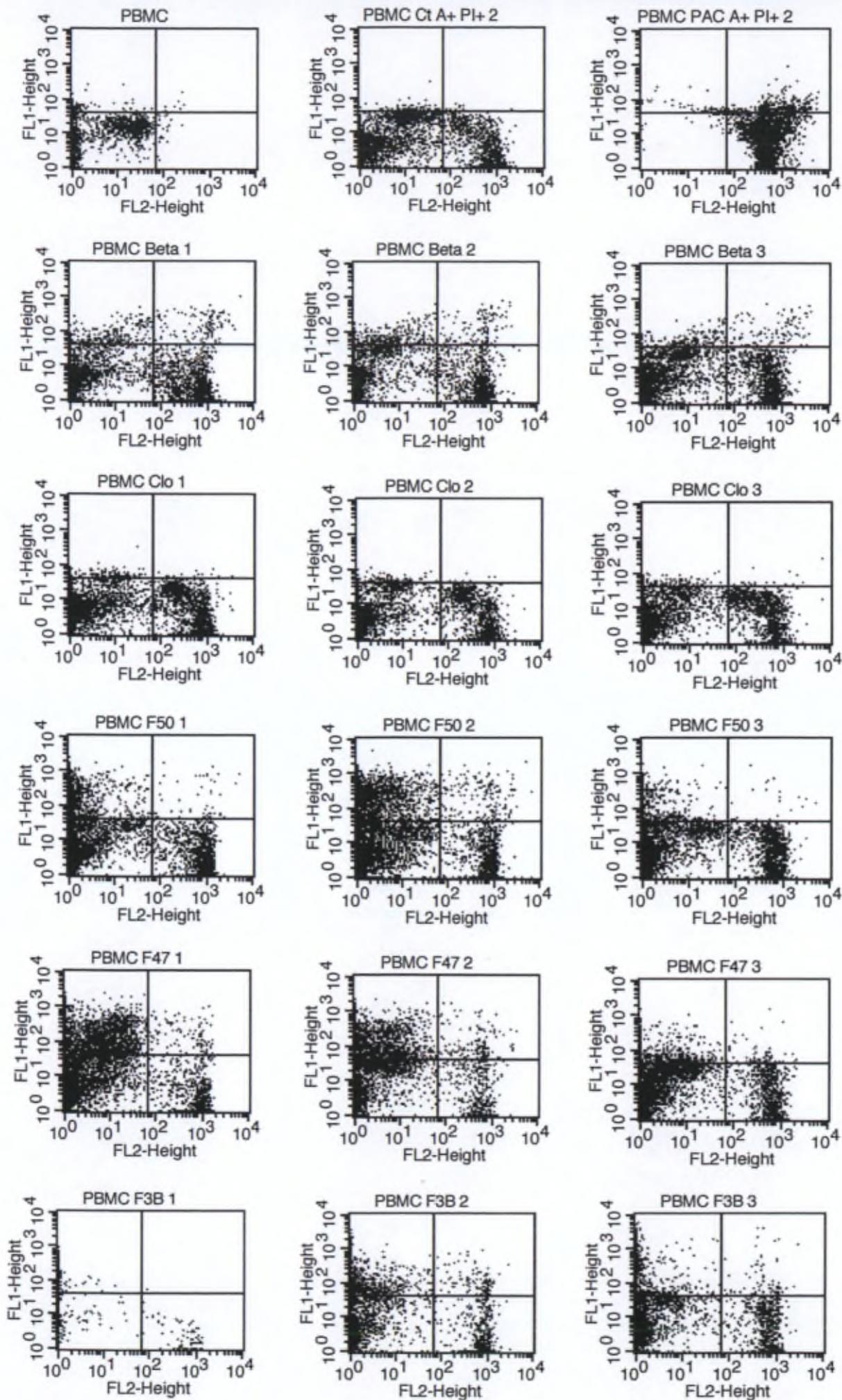
File: syn F3B 2 Log Data Units: Linear Values
 Sample ID: syn F3B 2 Patient ID:
 Tube: Untitled Panel: Untitled Acquisition Tube List
 Acquisition Date: 15-Mar-13 Gate: No Gate
 Gated Events: 10000 Total Events: 10000
 X Parameter: FL2-Height (Log) Y Parameter: FL1-Height (Log)
 Quad Location: 16, 47

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
UL	0	0.00	0.00	***	***	***	***
UR	529	5.29	5.29	59.72	47.45	67.67	65.12
LL	7408	74.08	74.08	6.29	4.99	8.75	6.81
LR	2063	20.63	20.63	155.94	48.92	23.42	15.83

Quadrant Statistics

File: syn F3B 3 Log Data Units: Linear Values
 Sample ID: syn F3B 3 Patient ID:
 Tube: Untitled Panel: Untitled Acquisition Tube List
 Acquisition Date: 15-Mar-13 Gate: No Gate
 Gated Events: 10000 Total Events: 10000
 X Parameter: FL2-Height (Log) Y Parameter: FL1-Height (Log)
 Quad Location: 16, 47

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
UL	0	0.00	0.00	***	***	***	***
UR	727	7.27	7.27	56.28	47.41	71.35	67.45
LL	7030	70.30	70.30	6.21	4.85	8.37	6.38
LR	2243	22.43	22.43	125.18	45.20	22.40	14.99



Quadrant Statistics

File: PBMC
 Sample ID: PBMC
 Tube: Untitled
 Acquisition Date: 24-Apr-13
 Gated Events: 10000
 X Parameter: FL2-Height (Log)
 Quad Location: 65, 42

Log Data Units: Linear Values
 Patient ID:
 Panel: Untitled Acquisition Tube List
 Gate: No Gate
 Total Events: 10000
 Y Parameter: FL1-Height (Log)

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
UL	185	1.85	1.85	3.97	1.53	58.72	55.62
UR	10	0.10	0.10	173.23	159.78	66.90	61.03
LL	9780	97.80	97.80	2.44	1.25	7.65	6.09
LR	25	0.25	0.25	94.88	90.19	16.23	12.47

Quadrant Statistics

File: PBMC Ct A+ PI+ 2
 Sample ID: PBMC Ct A+ PI+ 2
 Tube: Untitled
 Acquisition Date: 24-Apr-13
 Gated Events: 10000
 X Parameter: FL2-Height (Log)
 Quad Location: 65, 42

Log Data Units: Linear Values
 Patient ID:
 Panel: Untitled Acquisition Tube List
 Gate: No Gate
 Total Events: 10000
 Y Parameter: FL1-Height (Log)

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
UL	68	0.68	0.68	20.06	13.98	55.03	51.83
UR	13	0.13	0.13	320.33	191.89	49.17	48.66
LL	8915	89.15	89.15	2.63	1.38	6.08	4.42
LR	1004	10.04	10.04	652.49	501.17	7.27	3.70

Quadrant Statistics

File: PBMC PAC A+ PI+ 2
 Sample ID: PBMC PAC A+ PI+ 2
 Tube: Untitled
 Acquisition Date: 24-Apr-13
 Gated Events: 10000
 X Parameter: FL2-Height (Log)
 Quad Location: 65, 42

Log Data Units: Linear Values
 Patient ID:
 Panel: Untitled Acquisition Tube List
 Gate: No Gate
 Total Events: 10000
 Y Parameter: FL1-Height (Log)

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
UL	59	0.59	0.59	24.71	14.64	68.91	61.55
UR	354	3.54	3.54	1086.64	713.75	70.24	62.93
LL	38	0.38	0.38	32.99	21.91	29.32	25.80
LR	9549	95.49	95.49	462.95	428.76	7.94	5.52

Quadrant Statistics

File: PBMC Beta 1
 Sample ID: PBMC Beta 1
 Tube: Untitled
 Acquisition Date: 24-Apr-13
 Gated Events: 10000
 X Parameter: FL2-Height (Log)
 Quad Location: 65, 42

Log Data Units: Linear Values
 Patient ID:
 Panel: Untitled Acquisition Tube List
 Gate: No Gate
 Total Events: 10000
 Y Parameter: FL1-Height (Log)

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
UL	235	2.35	2.35	15.15	8.19	98.39	83.34
UR	125	1.25	1.25	984.44	636.93	191.73	151.49
LL	8385	83.85	83.85	1.75	1.16	6.15	5.03
LR	1255	12.55	12.55	583.62	457.82	4.61	2.63

Quadrant Statistics

File: PBMC Beta 2
 Sample ID: PBMC Beta 2
 Tube: Untitled
 Acquisition Date: 24-Apr-13
 Gated Events: 10000
 X Parameter: FL2-Height (Log)
 Quad Location: 65, 42

Log Data Units: Linear Values
 Patient ID:
 Panel: Untitled Acquisition Tube List
 Gate: No Gate
 Total Events: 10000
 Y Parameter: FL1-Height (Log)

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
UL	288	2.88	2.88	11.94	6.53	86.33	74.58
UR	116	1.16	1.16	753.01	539.45	185.19	134.57
LL	8528	85.28	85.28	1.68	1.14	5.48	4.10
LR	1068	10.68	10.68	596.75	493.99	4.79	2.52

Quadrant Statistics

File: PBMC Beta 3
 Sample ID: PBMC Beta 3
 Tube: Untitled
 Acquisition Date: 24-Apr-13
 Gated Events: 10000
 X Parameter: FL2-Height (Log)
 Quad Location: 65, 42

Log Data Units: Linear Values
 Patient ID:
 Panel: Untitled Acquisition Tube List
 Gate: No Gate
 Total Events: 10000
 Y Parameter: FL1-Height (Log)

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
UL	168	1.68	1.68	17.57	10.55	77.20	68.95
UR	109	1.09	1.09	1090.75	644.84	166.16	123.34
LL	8562	85.62	85.62	2.07	1.28	5.84	4.30
LR	1161	11.61	11.61	571.89	477.31	7.08	3.66

Quadrant Statistics

File: PBMC Clo 1
 Sample ID: PBMC Clo 1
 Tube: Untitled
 Acquisition Date: 24-Apr-13
 Gated Events: 10000
 X Parameter: FL2-Height (Log)
 Quad Location: 65, 42

Log Data Units: Linear Values
 Patient ID:
 Panel: Untitled Acquisition Tube List
 Gate: No Gate
 Total Events: 10000
 Y Parameter: FL1-Height (Log)

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
UL	116	1.16	1.16	9.56	5.90	58.14	55.33
UR	17	0.17	0.17	964.88	468.27	51.57	50.91
LL	8176	81.76	81.76	2.08	1.26	6.35	5.17
LR	1691	16.91	16.91	606.85	477.39	7.50	3.88

Quadrant Statistics

File: PBMC Clo 2
 Sample ID: PBMC Clo 2
 Tube: Untitled
 Acquisition Date: 24-Apr-13
 Gated Events: 10000
 X Parameter: FL2-Height (Log)
 Quad Location: 65, 42

Log Data Units: Linear Values
 Patient ID:
 Panel: Untitled Acquisition Tube List
 Gate: No Gate
 Total Events: 10000
 Y Parameter: FL1-Height (Log)

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
UL	97	0.97	0.97	6.99	4.30	52.82	51.70
UR	8	0.08	0.08	369.57	273.84	53.27	52.33
LL	8680	86.80	86.80	1.61	1.16	5.73	4.47
LR	1215	12.15	12.15	587.68	449.99	7.86	3.94

Quadrant Statistics

File: PBMC Clo 3
 Sample ID: PBMC Clo 3
 Tube: Untitled
 Acquisition Date: 24-Apr-13
 Gated Events: 10000
 X Parameter: FL2-Height (Log)
 Quad Location: 65, 42

Log Data Units: Linear Values
 Patient ID:
 Panel: Untitled Acquisition Tube List
 Gate: No Gate
 Total Events: 10000
 Y Parameter: FL1-Height (Log)

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
UL	125	1.25	1.25	7.79	4.01	55.64	54.40
UR	17	0.17	0.17	1065.18	469.26	74.93	63.48
LL	8587	85.87	85.87	1.85	1.20	6.07	4.74
LR	1271	12.71	12.71	511.57	381.80	9.91	5.47

Quadrant Statistics

File: PBMC F50 1
 Sample ID: PBMC F50 1
 Tube: Untitled
 Acquisition Date: 24-Apr-13
 Gated Events: 10000
 X Parameter: FL2-Height (Log)
 Quad Location: 65, 42

Log Data Units: Linear Values
 Patient ID:
 Panel: Untitled Acquisition Tube List
 Gate: No Gate
 Total Events: 10000
 Y Parameter: FL1-Height (Log)

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
UL	2061	20.61	20.61	2.31	1.33	270.44	185.39
UR	55	0.55	0.55	961.88	574.89	278.39	144.76
LL	6546	65.46	65.46	2.31	1.29	8.69	6.08
LR	1338	13.38	13.38	812.43	679.68	5.97	3.18

Quadrant Statistics

File: PBMC F50 2
 Sample ID: PBMC F50 2
 Tube: Untitled
 Acquisition Date: 24-Apr-13
 Gated Events: 10000
 X Parameter: FL2-Height (Log)
 Quad Location: 65, 42

Log Data Units: Linear Values
 Patient ID:
 Panel: Untitled Acquisition Tube List
 Gate: No Gate
 Total Events: 10000
 Y Parameter: FL1-Height (Log)

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
UL	2558	25.58	25.58	3.78	1.87	253.60	174.87
UR	179	1.79	1.79	841.06	508.24	338.43	215.34
LL	6300	63.00	63.00	2.92	1.50	8.68	5.48
LR	963	9.63	9.63	753.02	650.23	6.12	3.18

Quadrant Statistics

File: PBMC F50 3
 Sample ID: PBMC F50 3
 Tube: Untitled
 Acquisition Date: 24-Apr-13
 Gated Events: 10000
 X Parameter: FL2-Height (Log)
 Quad Location: 65, 42

Log Data Units: Linear Values
 Patient ID:
 Panel: Untitled Acquisition Tube List
 Gate: No Gate
 Total Events: 10000
 Y Parameter: FL1-Height (Log)

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
UL	471	4.71	4.71	3.57	1.96	193.29	126.59
UR	27	0.27	0.27	896.08	450.75	237.06	125.34
LL	8190	81.90	81.90	2.22	1.27	6.85	4.92
LR	1312	13.12	13.12	619.68	535.88	8.29	4.44

Quadrant Statistics

File: PBMC F47 1 Log Data Units: Linear Values
 Sample ID: PBMC F47 1 Patient ID:
 Tube: Untitled Panel: Untitled Acquisition Tube List
 Acquisition Date: 24-Apr-13 Gate: No Gate
 Gated Events: 10000 Total Events: 10000
 X Parameter: FL2-Height (Log) Y Parameter: FL1-Height (Log)
 Quad Location: 65, 42

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
UL	2647	26.47	26.47	7.40	3.49	200.53	136.89
UR	104	1.04	1.04	644.65	425.73	222.72	159.79
LL	6580	65.80	65.80	2.44	1.42	9.28	6.34
LR	669	6.69	6.69	804.05	658.22	5.52	2.72

Quadrant Statistics

File: PBMC F47 2 Log Data Units: Linear Values
 Sample ID: PBMC F47 2 Patient ID:
 Tube: Untitled Panel: Untitled Acquisition Tube List
 Acquisition Date: 24-Apr-13 Gate: No Gate
 Gated Events: 10000 Total Events: 10000
 X Parameter: FL2-Height (Log) Y Parameter: FL1-Height (Log)
 Quad Location: 65, 42

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
UL	2832	28.32	28.32	3.55	1.79	200.40	138.22
UR	145	1.45	1.45	612.33	396.01	221.82	133.55
LL	6624	66.24	66.24	2.03	1.28	9.79	5.92
LR	399	3.99	3.99	578.67	477.93	9.45	4.25

Quadrant Statistics

File: PBMC F47 3 Log Data Units: Linear Values
 Sample ID: PBMC F47 3 Patient ID:
 Tube: Untitled Panel: Untitled Acquisition Tube List
 Acquisition Date: 24-Apr-13 Gate: No Gate
 Gated Events: 10000 Total Events: 10000
 X Parameter: FL2-Height (Log) Y Parameter: FL1-Height (Log)
 Quad Location: 65, 42

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
UL	579	5.79	5.79	6.28	3.15	102.98	77.09
UR	67	0.67	0.67	510.24	360.50	119.73	75.80
LL	8535	85.35	85.35	2.03	1.30	8.24	5.55
LR	819	8.19	8.19	623.80	545.90	9.26	4.65

Quadrant Statistics

File: PBMC F3B 1
 Sample ID: PBMC F3B 1
 Tube: Untitled
 Acquisition Date: 24-Apr-13
 Gated Events: 1213
 X Parameter: FL2-Height (Log)
 Quad Location: 65, 42

Log Data Units: Linear Values
 Patient ID:
 Panel: Untitled Acquisition Tube List
 Gate: No Gate
 Total Events: 1213
 Y Parameter: FL1-Height (Log)

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
UL	471	38.83	38.83	1.12	1.04	126.06	101.13
UR	1	0.08	0.08	84.29	84.29	50.94	50.94
LL	662	54.58	54.58	1.44	1.10	10.03	6.22
LR	79	6.51	6.51	663.56	533.59	3.17	2.23

Quadrant Statistics

File: PBMC F3B 2
 Sample ID: PBMC F3B 2
 Tube: Untitled
 Acquisition Date: 24-Apr-13
 Gated Events: 10000
 X Parameter: FL2-Height (Log)
 Quad Location: 65, 42

Log Data Units: Linear Values
 Patient ID:
 Panel: Untitled Acquisition Tube List
 Gate: No Gate
 Total Events: 10000
 Y Parameter: FL1-Height (Log)

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
UL	4007	40.07	40.07	1.67	1.16	178.45	125.04
UR	123	1.23	1.23	688.57	532.68	155.07	111.89
LL	5400	54.00	54.00	1.56	1.16	9.47	5.72
LR	470	4.70	4.70	767.46	670.75	5.98	2.85

Quadrant Statistics

File: PBMC F3B 3
 Sample ID: PBMC F3B 3
 Tube: Untitled
 Acquisition Date: 24-Apr-13
 Gated Events: 10000
 X Parameter: FL2-Height (Log)
 Quad Location: 65, 42

Log Data Units: Linear Values
 Patient ID:
 Panel: Untitled Acquisition Tube List
 Gate: No Gate
 Total Events: 10000
 Y Parameter: FL1-Height (Log)

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
UL	3430	34.30	34.30	1.39	1.09	398.25	196.61
UR	71	0.71	0.71	655.37	490.50	363.09	136.41
LL	5829	58.29	58.29	1.61	1.18	11.57	6.72
LR	670	6.70	6.70	669.28	585.56	8.73	4.45

RESEARCH ARTICLE

New sustained-release intraarticular gel formulations based on monolein for local treatment of arthritic diseases

Jonathan Réeff, Amelie Gaignaux, Jonathan Goole, Carine De Vriese, and Karim Amighi

Laboratory of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, Pharmacy Institute, Université Libre de Bruxelles (ULB), Campus Plaine, Brussels, Belgium

Abstract

Inflammatory osteoarthritis (OA) is characterized by painful and destructive inflammatory flares of a single joint, mainly in the back, the knees, the wrists or the hips. Monoarthritis is generally treated by intraarticular (IA) injections of corticosteroids or hyaluronic acid (HA). However, due to their toxicity, the chronic use of corticosteroids should be avoided. The aim of this work was to develop a new slow-release formulation for a parenteral route of administration (e.g., IA). The development's strategy was based on the use of amphiphilic ingredients such as glyceryl monooleate (GMO), which is able to generate viscous crystalline phase structures upon contact with an aqueous fluid (e.g., synovial fluid) to sustain the drug activity over weeks. Clonidine (CLO) was suggested as a small and hydrophilic model drug and HA as a hydrophilic viscoelastic scaffold. Thermal analyses showed that the stability of GMO, HA, and CLO in mixtures with a ratio of 1:1 (wt/wt) was not affected in comparison with the raw materials. In order to obtain a formulation presenting suitable syringeability and containing GMO, CLO, and HA, two elements were found to be essential: a minimum of about 15% (wt/wt) water content and the use of co-solvents such as ethanol (ET) and propylene glycol (PG), approved by the FDA for parenteral use. Several developed gels presented pseudoplastic flow behavior. Moreover, the best composition provided an *in vitro* release of CLO for about 1 week that was similar to a cubic reference formulation, described by many authors as presenting poor syringeability but the best sustained-release capacity.

Keywords: parenteral administration, arthritic diseases, clonidine, hyaluronic acid, glyceryl monooleate, lipids, liquid crystals, drug delivery

Introduction

Osteoarthritis (OA), the most common form of arthritis, is a disease characterized by slow degenerative processes in the articular cartilage within synovial joints that is associated with hypertrophy of the bone (subchondral bone and osteophytes sclerosis) and thickening of the capsule. This phenomenon can occur in any joint, but is most common in joints of the hand, spine, knee, hip, and foot¹. It is a degenerative disease that involves an irreversible and progressive loss of articular cartilage, changes in synovial membrane, and an increased volume of synovial fluid with modification of its composition and reduction of its viscoelastic/lubrication properties^{2–4}. Most cases of OA are characterized by unknown causes and are referred to as primary or idiopathic OA. When the cause

of the OA is known, the condition is referred as secondary OA⁵. Clinically, the symptoms are characterized by joint pain, tenderness, limitation of movement, crepitus, occasional effusion, and variable degrees of local inflammation^{1,5}. The most common symptom is pain in the affected joint(s) after repeated use but also after a long period of inactivity. OA affects people of all ethnic groups in all geographic locations, regardless of the gender, although it occurs more commonly in women. The World Health Organization (WHO) estimates that 10% of the world's people over the age of 60 years suffer from OA¹.

Currently, available pharmacological therapies target palliation of pain and include analgesic drugs (e.g., nonsteroidal anti-inflammatory drugs and opioids)^{3,4,6}. However, the clinical presentation of OA is

Address for Correspondance: Jonathan Réeff, Ph D. student, Laboratoire de Pharmacie Galénique et Biopharmacie, Université Libre de Bruxelles, Campus de la Plaine, CP207, Boulevard du Triomphe, 1050 Bruxelles, Belgique. Tel: +32-2-650 53 31; Fax: +32-2-650 52 69. E-mail: jreeff@gmail.com

(Received 19 July 2012; revised 10 September 2012; accepted 11 September 2012)

Abbreviations

CLO, clonidine
 DSC, differential scanning calorimetry
 ET, ethanol
 GMO, glyceryl monooleate
 HA, hyaluronic acid

IA, intraarticular
 Mw, molecular weight
 OA, osteoarthritis
 PG, propylene glycol
 TGA, thermogravimetry analysis
 WHO, World Health Organization

usually monoarticular with fluctuations in intensity and localization over time. Therefore, local drug delivery is of great interest to avoid systemic side effects. Several compounds are usually used intraarticularly such as glucocorticoids and hyaluronic acid (HA)^{3,6}.

Glucocorticoids are used for treatment of acute arthritic flares. The short-term benefit of intraarticular (IA) corticosteroids in monoarthritis flare is well established. Nevertheless, glucocorticoids are thought to be responsible for accelerating cartilage damage by inducing osteonecrosis or increasing the risk of septic arthritis⁷. As a consequence, injectable corticosteroids can only be administered a few times, with this limitation leading, in the absence of an alternative, to early surgical intervention.

On the other hand, viscosupplementation therapy by IA injection of HA is effective for restoring the mechanical integrity of the joint⁸. Indeed, arthritic human synovial fluids lose some or all of their viscoelastic properties due to a reduction in both the molecular weight (Mw) and the IA concentration of HA, which is naturally produced by chondrocytes and fibroblast of the synovial lining^{2-4,9}. Nevertheless, due to high enzymatic activity in inflamed joints, the half-life of HA after injection only ranges from 11 to 15 h in rabbit¹⁰ and 1-2 days in human⁸. Hence, to preserve a suitable efficacy of the treatment, it is recommended that injections of HA are repeated once a week for 3-5 weeks, resulting in discomfort for the patient.

Improved formulations with controlled drug release that is able to deliver a sufficient amount of both anti-inflammatory drug and HA locally into the site of arthritic inflammation would be of great interest³. For this point of view, α_2 -adrenergic agonists such as clonidine (CLO) could represent a new suitable alternative to the administration of corticosteroids. Indeed, a recent study performed by Bastianelly and coworkers has shown that CLO decreased the secretion of cytokines such as IL-1 β , providing an anti-inflammatory effect¹¹. Moreover, replacing synovial fluid in painful arthritis with high Mw HA protected from enzymatic degradation could allow the alleviation of pain and promote the healing of IA wounds.

In this purpose, lipids have recently received considerable attention as an alternative to polymeric carriers or coating materials in the development of drug delivery systems. Glyceryl monooleate (GMO) has the capacity to form highly viscous systems in the presence of water and would therefore provide *in-situ* gelification after injection by contact with residual physiological fluid (e.g., synovial fluid)^{12,13}. Indeed, when IA administration is needed, aspiration of synovial fluid is generally recommended

to improve the accuracy of injection, to reduce the dilution of the therapeutic drugs after administration, and to allow the use of collected synovial fluid for diagnosis. Nevertheless, a small amount of fluid can often be found in the knees, although it is less common at other sites^{14,15}. Interestingly, GMO also possesses biocompatible, biodegradable, and bioadhesive properties and can be used to enhance the therapeutic efficacy of drugs by increasing the residence time at the site of injection¹⁶.

The present work concerns the development of a suitable IA injectable solution containing GMO, CLO as a small hydrophilic model drug that could present anti-inflammatory properties, HA, and inactive FDA-approved ingredients¹⁷ for the long-term management of arthritic diseases. For this purpose, a compatibility study of the main compounds of the formulation (GMO, CLO, HA) was firstly done. Next, in order to develop a composition presenting sustained release of CLO and suitable syringeability properties, a feasibility study was performed, leading to the preparation of various formulations. Therefore, their physicochemical properties such as their macro- and microscopical aspect, rheology, syringeability, and *in-vitro* drug release profiles were evaluated to select the most appropriate formulation.

Materials and methods

GMO (Rylo MG 20 with 99% purity) was used as an *in-situ* gelling agent and was supplied by Danisco (Grinsted, Denmark) Rylo MG 20 (99% purity). Sodium hyaluronate (Mw 1.9 MDa) was used as a reference viscoelastic polysaccharide and was supplied by European Technologies Inc. (Dolni Dobrouc, Czech Republic). CLO HCl was used as a small and hydrophilic model drug (Chemicals International Group, Holte, Denmark). Ethanol (ET) absolute was used as a co-solvent to improve the syringeability of the formulation (VWR, Leuven, Belgium). Propylene glycol (PG) was used as a co-solvent and was supplied by Certa (Braine l'Alleud, Belgium). Ultrapure water (sterile, apyrogen, and endotoxin-free) was obtained using a Purelab® apparatus (Analisis, Namur, Belgium) and was used as a solvent and found to be essential for dissolving sodium hyaluronate.

Preparation of the gel

All operations required in the preparation of the formulations were carried out under aseptic conditions in a class IIB biosafety cabinet (ADSLaminaire, Le Pre-Saint-Gervais, France). Moreover, each laboratory glassware

used was previously sterilized by autoclave (Systec, Wetzlar, Germany).

GMO was gently melted at a maximal temperature of $45 \pm 2^\circ\text{C}$. Afterwards, co-solvents, such as ET and PG, were added to dissolve the GMO. This organic phase was filtered on a $0.22 \mu\text{m}$ filter under vacuum. Next, sterile HA was dispersed using a T25 Ultra-Turrax® (IKA® Werke GmbH & Co. KG, Janke & Kunkel, Staufen, Germany) with a rotational speed fixed at 24000 rpm for 3 min. This step was very important for breaking up the agglomerates of powder and improving the solubilization of HA. Simultaneously, an aqueous solution of CLO HCl was prepared by dissolving the drug in ultra-pure water. This aqueous solution was finally sterilized by filtration and added to the dispersion of GMO at $45 \pm 2^\circ\text{C}$ under vacuum and stirred magnetically until the sodium hyaluronate was completely dissolved. Finally, the formulations were packaged in glass vials and stored at $4-8^\circ\text{C}$ for 48 h before performing evaluations.

Quantification of CLO in formulations

CLO was quantified using a validated high-performance liquid chromatography (HPLC) method adapted from the USP 25 method described for the uniformity of dosage units. The HPLC system consisted of an HPLC system (Series 1200, Agilent® technologies, Diegem, Belgium) equipped with a quaternary pump, a degasser, an ALS auto sampler equipped with a TCC thermostated column oven, and a diode-array detector set at 210 nm. The separation system was an Agilent® Zorbax Eclipse Plus C8 $4.6 \times 150 \text{ mm}$ ($3.5 \mu\text{m}$) column. The temperature was set at 25°C . The isocratic mobile phase was composed of a 50:50 (vol/vol) ratio of water/methanol, adjusted to pH 3.0 with 1 mL phosphoric acid 85% (wt/wt) (Riedel-de Haën®, Seelze, Germany) and 1 N sodium hydroxide solution (Merck®, Overijse, Belgium); 1.1 g of sodium octanesulfonate (Sigma-Aldrich®, Bornem, Belgium) was added as an ion pair. The mobile phase was filtered through a $0.22 \mu\text{m}$ Acrodisc® Syringe filter with a $0.22 \mu\text{m}$ HT Tuffryn® Membrane (Millipore®, Overijse, Belgium). The flow rate was set at 1 mL/min. The volume of injection was set at 5 μL . Limits of detection and quantification were evaluated at 0.029 and 0.095 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. This quantification method was used on samples extracted from formulations to evaluate the exact amount of CLO that they contained.

Quantification of CLO in residues of gel at the end of the dissolution studies

The HPLC method was similar to that described for the quantification of CLO from gel except that the volume of injection was set at 50 μL to improve the sensitivity of the method. Indeed, the limits of detection and quantification were decreased to 0.0029 and 0.0095 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively.

Extraction of CLO from gel formulations

A liquid-liquid extraction of CLO from the gel formulations was performed before the HPLC analysis to remove

potential impurities such as GMO and HA, allowing the quantification of the CLO. Therefore, about 2 g of gel was weighed and placed in 25.0 mL of dichloromethane, with 2.0 mL of a tizanidine HCl solution (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) used as an internal standard. About 10 mL of citrate buffer, pH 3.0 was added and the mixture was stirred for 30 min. When the entire amount of gel was dissolved, CLO was extracted twice in 10 mL of citrate buffer, pH 3.0 and the final volume was adjusted to 25.0 mL with the same buffer. The resulting solution was centrifuged at 7000g for 10 min.

As HA is a polysaccharide characterized by a relatively high Mw, it is important to remove it from the samples before injection in HPLC systems to avoid an agglomeration of polymer at the head of the column. Therefore, a 250 μL aliquot of supernatant was withdrawn and the dissolved HA was extracted using an Amicon® centrifugal filter unit (Millipore®, Overijse, Belgium), which is an ultrafiltration device with a nominal molecular mass limit of 30 kDa. Centrifugation of the samples through this filter at 14000g for 30 min with 250 μL of citrate buffer, pH 3.0 allowed the separation of the HA from the filtrate. At the end of the separation process, 500 μL of methanol was added to the samples, which could then be analyzed by HPLC.

Extraction of CLO in residues of gel at the end of dissolution studies

In order to verify the correlation between the amounts of CLO released and that still remaining inside the residues of gel at the end of the dissolution studies, an extraction step was performed. The extraction method was similar to that described for the quantification of CLO from gel except that only 0.5 mL of tizanidine HCl (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) solution was added instead of 2 mL and 500 μL of a methanolic solution of sodium octanesulfonate (2.2 g/L) was added to the filtrate instead of methanol before injection into HPLC system. Due to the increased volume of injection, these modifications in the protocol of extraction were necessary to stay in the linearity domain of quantification and to improve the resolution of tizanidine and CLO.

Rheological studies

Rheological studies were performed in triplicate using a digital Brookfield® LVDV-II+ (Brookfield Engineering Laboratories, Middleboro, MA, USA) viscometer mounted with a small sample adapter. SC4-18 or SC4-25 spindles were used to evaluate the rheological properties of the formulations. The analyses were performed at $25.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$. The viscosity (mPa·s) was recorded from 5 to 200 rpm. The rheograms were obtained after converting the viscosity and the spindle speed values into shear stress (dynes/cm^2) and shear rate (s^{-1}), respectively.

The rheological properties of the developed formulations were evaluated by drawing the rheograms representing the evolution of viscosity as a function of the shear rate applied. If the viscosity values do not depend on the shear rates applied to the formulation, it means

that the rheological flow behavior of the sample is Newtonian. In contrast, if the viscosity values decrease when the shear rate applied to the formulation increases, it means that the rheological flow behavior of the sample is pseudoplastic¹⁸.

Evaluation of syringeability

Syringeability can be considered as the ability of a preparation to be successfully administered by a syringe with an appropriate needle. In the present study, syringeability was manually assessed and was considered as an all or nothing process in evaluating the capacity of the developed system to be injected. For each formulation developed, its syringeability was evaluated using a 5 mL plastic syringe (Terumo® Europe N.V., Leuven, Belgium) fitted with needles in the range 21G to 23G (Terumo® Europe N.V., Leuven, Belgium).

Thermal analysis

A common use of the thermal analysis described was to investigate the stability and compatibility between ingredients to identify potential incompatibilities and to reduce potential stability issues that might arise at the later stages of development.

Differential scanning calorimetry (DSC) was carried out using a DSC Q2000 (TA Instruments®, Zellik, Belgium) equipped with a refrigerated cooling system. The instrument was continuously purged with nitrogen at 50 mL/min; 1–3 mg samples were placed in Tzero hermetic aluminium sealed pans (TA Instruments®, Zellik, Belgium) and were thermally scanned, according to the following cycles of temperature: equilibration at –30.0°C for 1 min, heating from –30.0 to 200.0°C at a rate of 5.0°C/min, quick cooling to –30°C at rate of 20°C/min, and finally heating again from –30.0 to 200.0°C at a rate of 5.0°C/min.

Thermogravimetry analyses (TGA) were performed using a TGA Q500 (TA Instruments®, Zellik, Belgium). Samples of about 10 mg were loaded onto a platinum pan connected to an analytical balance and continuously purged with nitrogen at 50 mL/min to avoid atmospheric moisture uptake. The samples were heated from 25.0 to 400.0°C at 10.0°C/min and the loss of weight was recorded.

Studies were performed on the raw materials (GMO, HA, and CLO) and on pairs of these mixed in a ratio of 1:1 (wt/wt). All samples were stored at 4°C to preserve the stability of the GMO before performing analyses.

Microscopy

Microscopy was conducted using a Linkam THMS 600 hot stage (Linkam, Tadworth, England) assembled on an Olympus-BX 60 microscope (Olympus Belgium N.V., Aartselaar, Belgium) equipped with a JVC TK-C1381 (Olympus Belgium N.V.) colour video camera and polarized lens. Data were imported into a computer for real-time observation and storage. Captured images were analyzed using Olympus Microimage software, version 4.0 (Olympus Belgium N.V.).

Dissolution studies

In vitro dissolution studies were conducted in triplicate using a Distek 2100C USP32 dissolution apparatus (Distek Inc., North Brunswick, NJ) Type II (paddle method), equipped with small volume bath vessels of 200 mL (Sysmex, Etten-Leur, Holland). The paddle was positioned at 1.5 cm from the top of the sample and its rotational speed was fixed at 50 rpm. Topical dissolution cells (Sysmex) were filled with an appropriate amount of preparation (1 g, which corresponded to 225 µg of CLO HCl) and then put into the vessels. The dissolution studies were carried out in 50 mL of saline phosphate buffer solution (1.06 mM Potassium phosphate monobasic/2.97 mM Sodium phosphate dibasic/155.17 mM Sodium Chloride) at pH 7.4 ± 0.05 (Invitrogen®, Merelbeke, Belgium). Sodium azide (0.02% wt/wt) was added to the dissolution medium to prevent bacterial contamination.

After 6, 12, 24, 48, 72, 96, 144, and 240 h, 250 µL of dissolution medium was withdrawn from each vessel and immediately replaced by fresh dissolution medium. Each sample was filtered on an Amicon® centrifugal filter unit (Millipore®, Overijse, Belgium) with a nominal molecular mass limit of 30 kDa, and added to 250 µL of a 0.004 N HCl solution to achieve acidic conditions and prevent adsorption of CLO in the filter unit. Before HPLC analysis, 500 µL of a methanolic solution of sodium octanesulfonate (2.2 g/L) was then added to the filtrate. The HPLC method was similar to that described for the quantification of CLO from gel except that the volume of injection was set at 50 µL to improve the sensitivity of the method.

At the end of the experiment, the residual amount of CLO was evaluated as described previously.

The possible loss of drug inside the filter unit was estimated ($n = 4$) using a control, which was prepared by dispersing 0.5 g of the tested formulation in 25 mL of the dissolution medium, using a T25 Ultra-Turrax® (IKA® Werke GmbH & Co. KG, Janke & Kunkel, Staufen, Germany) set at 24000 rpm for 3 min. In these conditions, it was proved that all the CLO inside the preparation was released.

Statistical evaluation

As recommended in the FDA's Guidances for Industry¹⁹, the similarity factor f_2 was used to assess the similarity of dissolution profiles²⁰. The dissolution profiles compared were obtained under the same test conditions and their dissolution time points were similar. As indicated by Shah and coworkers (1998), the similarity factor value has to be higher than 50 to assess two dissolution profiles as being similar²⁰.

Results and discussion

As described previously, the present work concerns the development of a new sustain release and IA injectable solution. This contains CLO as a small hydrophilic model

drug that could present anti-inflammatory properties and HA as a viscoelastic scaffold for the long-term management of arthritic diseases. The strategy of formulation was the development of hydrolipidic formulations (i.e., GMO) that are able to form gels after administration in contact with physiological liquids (i.e., synovial fluid) at the site of injection. Such gels based on GMO were already developed by the laboratory as biodegradable implants²¹.

In the first step of the development, thermal analyses were performed on the main compounds of the formulation (GMO, CLO, HA) to investigate the stability and compatibility between ingredients, to identify potential incompatibilities and to reduce potential stability issues that might arise at the later stages of development.

Thermal analyses and compatibility study

TGA curves obtained with CLO, HA, and GMO showed that the majority of weight loss, which was assumed to correspond to their degradation, started at around 198, 203, and 193°C, respectively (Figure 1). The TGA analyses performed on pair mixtures in a 1:1 ratio (wt/wt) provided similar results in comparison with the raw materials (data not shown).

The TGA thermogram of HA represented the first stage of weight loss (15.6% wt/wt), occurring between ambient temperature and 200°C. This probably corresponded to the evaporation of free and structural water. The loss of weight then sharply increased from 210°C, probably due to the degradation of the HA itself.

DSC analysis was firstly performed to evaluate the potential interaction between HA and CLO. The temperature range was selected according to TGA data to avoid the degradation of the evaluated material during the process. This mixture provided similar results in comparison with the raw materials (data not shown). DSC analysis was then also performed to evaluate the potential interaction between GMO and either HA or CLO. In accordance with the literature, the DSC thermogram (Figure 2) obtained with GMO during the first heating showed an endothermic peak ranging from 20 to 40°C (mean value around 31°C), which corresponded to the melting of the lipidic compound^{21,22}. As observed

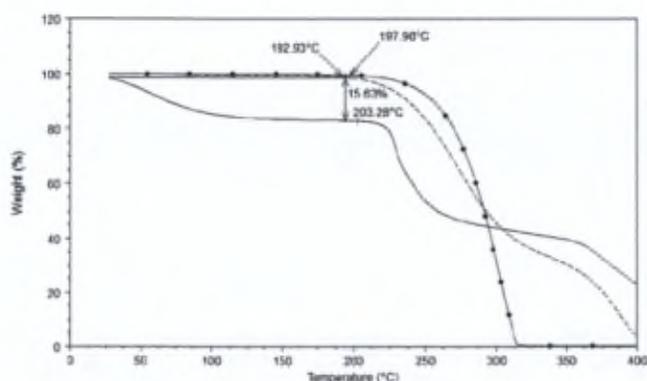


Figure 1. TGA thermograms of clonidine HCl (●), hyaluronic acid (-) and GMO (---). GMO, glyceryl monooleate; TGA, thermogravimetry analysis.

in TGA, the DSC thermogram of CLO only showed an endothermic peak appearing at 195°C and corresponding to the progressive melting followed by degradation of the drug (data not shown). DSC curves of HA showed an endothermic peak from ambient temperature to 200°C that corresponded to water loss. After that, the degradation of HA occurred (data not shown). The endothermic peak of GMO remained similar regardless of the addition of both CLO and HA (Figure 2). However, an exothermic peak appeared around -5°C when HA was added. This could correspond to the crystallization of GMO due to the free water contained in HA.

Concerning the second cycle of heating, which was performed on raw materials and mixtures of pairs of these in a 1:1 ratio (wt/wt), these thermograms provide similar results in comparison with those for the raw materials and the first cycle of heating (data not shown).

TGA and DSC results showed that thermal interaction or degradation did not appear between GMO and the drugs within a temperature range of 0 to 55°C after 2 months of storage. Therefore, it seemed that the stability of GMO, HA, and CLO in mixtures with a ratio of 1:1 (wt/wt) was not affected in comparison with that of the raw materials. As a consequence, it was assumed that there was no incompatibility between these ingredients.

Development and evaluation of gel formulations

A feasibility study was performed to develop a composition presenting sustained release of CLO and suitable syringeability properties, and that could reach a desirable viscosity upon contact with physiological fluids within a few minutes after injection. Therefore, their physicochemical properties such as their macro- and microscopical aspect, rheology, syringeability, and *in-vitro* drug release profiles were evaluated to select the most appropriate formulations.

In the case of the IA injection for OA of the knee, very narrow needles are currently used (e.g., from 20 to 25G)²³. The choice depends on the site of injection but also on

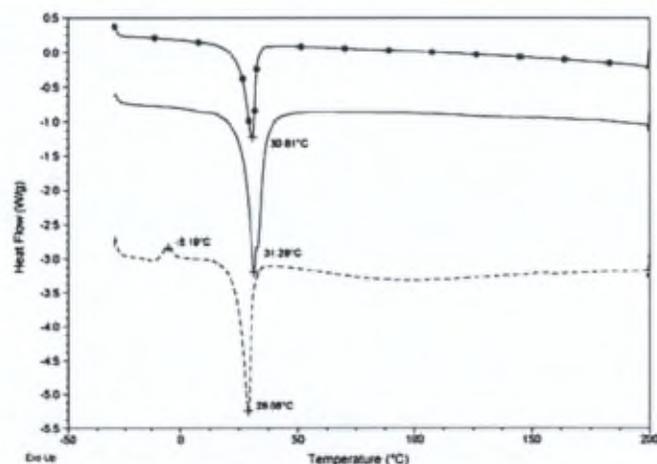


Figure 2. DSC thermograms of GMO (-), GMO-HA (---), and GMO-clonidine (●). DSC, differential scanning calorimetry; GMO, glyceryl monooleate; HA, hyaluronic acid.

the viscosity of the formulation to be injected. Indeed, polymeric solutions such as hyaluronan solutions are characterized by a very high viscosity that depends on their Mw and their concentrations. As a consequence, the syringeability of such preparations remains a challenging issue in their development. Therefore, the syringeability study performed on the developed formulations was done with syringes fitted with 21, 22, and 23G needles.

Concerning the Mw of the HA incorporated in the developed formulations, it was decided, as reported by Gerwin *et al.*, to select a HA of high Mw, which provides superior viscoelastic properties and prolonged half-life in the joint space³. These properties lead to a greater effectiveness of the treatment. However, depending on the Mw of HA and their concentrations, hyaluronan solutions are characterized by very high viscosity. Therefore, to reduce the risk of obtaining a formulation presenting poor syringeability, HA concentrations were fixed at 5 and 7.5 mg/g of formulation, which are in the range of available concentrations of HA, from 5 to 15 mg/ml, reported by Gerwin *et al.*³. Moreover, the volume of formulation in pre-filled syringes was fixed at 2 mL, which is currently used in several marketed products such as Hyalgan®, Orthovisc®, and Synvisc®²⁴.

Due to its physiological and physicochemical properties related above, a HA characterized by a high Mw was selected as the viscoelastic scaffold and CLO was selected as a model anti-inflammatory drug. GMO was selected as the gel-forming agent to provide a sustained release of CLO and HA¹³. However, HA is exclusively soluble in water while GMO forms a non-injectable viscous structure due to the formation of a cubic phase in the presence of small amount of water^{12,13,21,25}. Indeed, many authors reported that this cubic phase structure is extremely viscous and does not flow²⁵⁻²⁷. Consequently, co-solvents such as ET or PG must be incorporated in the formulation to obtain a solution with suitable rheological and, consequently, syringeability properties. Therefore, the influence of the proportion of ET and PG on both the rheological properties of the solution and its syringeability was evaluated (Table 1). Moreover, the use of such co-solvents allowed

the sterilization of the preparation by filtration, which was the only method of sterilization that could be used with preparations containing GMO.

To evaluate the syringeability and further the sustained-release properties of the developed formulations, it was suggested to compare it with a formulation wherein GMO adopted the cubic crystalline phase structure that is reported by many authors as presenting high viscosity and poor syringeability but the best sustained-release properties^{13,26}. For this purpose, a formulation (cubic reference, Table 1) composed of 25% of water and 75% of GMO was prepared^{21,25,26}.

As HA is known to increase, notably, the viscosity of the system, it was initially not introduced into the preparation. This was done to evaluate properly the influence of the water content and the co-solvents on the initial viscosity and on the potential syringeability of the formulation²⁵.

Formulations F1 and F2, which both contained 5.0% (wt/wt) water and <7.5% (wt/wt) ET, provided viscous solutions that could not be evaluated by the described method due to a too high viscosity of the sample (Table 1). As a consequence, the evaluation of the syringeability of these preparations through the currently used 21, 22, and 23G needles was not possible. As reported on the phase diagram of GMO-water systems, this observation could certainly be explained by considering that purified GMO quickly adopted a crystalline phase structure with the water incorporated inside the formulations such as the lamellar phase or cubic phase, which could be responsible for the increase in the viscosity of the preparation^{13,25,26}.

Therefore, to decrease the initial rheological properties of the system, the amount of ET was increased to 7.5 and 10.0% (wt/wt) in F3 and F4, respectively. The resulting preparations presented Newtonian flow behavior and a substantial decrease in their viscosity (Table 1 and Figure 3). Indeed, viscosity values obtained at 25°C and 20 rpm were 72 and 65 mPa·s for formulations F3 and F4, respectively. This statement could certainly be explained by considering that GMO was totally dissolved in ET.

Table 1. Composition and rheological properties of the HA-free formulations investigated (all quantities are given as percentages (wt/wt)).

Formulations	ET	PG	Water	GMO	Viscosity at 20 rpm and 25°C (mPa·s)	Viscosity at 100 rpm and 25°C (mPa·s)	Flow behavior
Cubic reference	0	0	25.0	75.0	NA**	NA**	Pseudoplastic*
F1	2.5	0	5.0	92.5	NA**	NA**	-
F2	5.0	0	5.0	90.0	NA**	NA**	-
F3	7.5	0	5.0	87.5	72***	72***	Newtonian
F4	10.0	0	5.0	85.0	65***	65***	Newtonian
F5	10.0	0	10.0	80.0	9 094****	3 177****	Pseudoplastic
F6	10.0	0	15.0	75.0	NA**	NA**	-
F7	10.0	10.0	15.0	65.0	6 695****	2 259****	Pseudoplastic
F8	10.0	20.0	15.0	55.0	60***	60***	Newtonian

ET, ethanol; GMO, glyceryl monooleate; HA, hyaluronic acid; PG, propylene glycol.

*As reported in the literature for a cubic phase structure (Ouedraogo *et al.*, 2008). **NA: not applicable, with the described materials and methods due to a too high viscosity of the sample. ***Rheological study performed with the SC4-18 spindle. ****Rheological study performed with the SC4-25 spindle.

This kind of composition provided suitable rheological properties for injection of the preparation through 21, 22, and 23G needles but it was further demonstrated that the amount of water incorporated was insufficient to allow the complete dissolution of further incorporated HA. The percentage of water was hence increased to 10.0 and 15.0% (wt/wt) in F5 and F6, respectively (Table 1). Nevertheless, in such a proportion, the injection of the preparation through 21, 22, and 23G needles was complicated due to excessive viscosity of the system. For example, formulation F5 provided a viscosity value at 25°C and 20 rpm of 9094 mPa.s and a pseudoplastic property, which meant that the amount of ET was not sufficient to preserve the GMO in solution (Table 1 and Figure 3). Moreover, the addition of HA in the following step of the development should increase further the viscosity of the system.

For parenteral administration, the amount of ET was limited to 10.0% (wt/wt) by the FDA guidance¹⁷. The use of a second co-solvent, such as PG, therefore seemed necessary to decrease the viscosity of the system. In F7 and F8, the amount of water was kept constant at 15.0% (wt/wt), which corresponded to the minimal amount that allowed the complete solubilization of an HA amount of 5–15 mg. At the same time, PG was incorporated at 10.0 and 20.0% (wt/wt) for F7 and F8, respectively (Table 1). When 10.0% (wt/wt) PG was incorporated in F7, the system presented pseudoplastic characteristics and excessive viscosity (data not shown). Indeed, formulation F7 provided a viscosity value at 25°C and 20 rpm of 6695 mPa.s. In contrast, when 20.0% (wt/wt) PG was incorporated, the system presented Newtonian flow behavior. This behavior certainly meant, as previously observed for formulations F3 and F4, that the GMO was totally dissolved by the co-solvents (Table 1 and Figure 3). This composition provided a formulation that presented suitable rheological properties for injection through 21, 22, and 23G needles

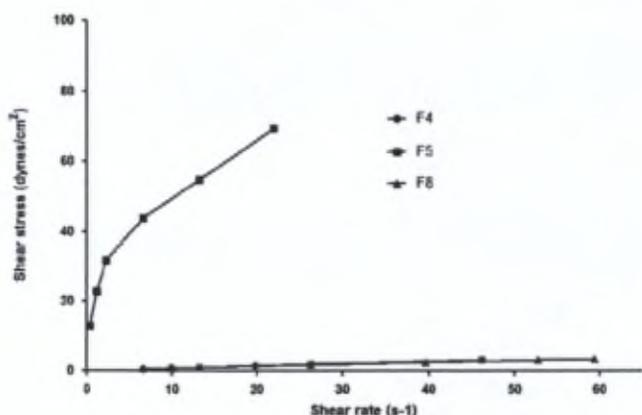


Figure 3. Newtonian flow behavior of F4 (●) and F8 (▲), measured with a SC4-18 spindle, and pseudoplastic flow behavior of F5 (■), measured with a SC4-25 spindle. Differences between ranges of the shear rate that could be measured depended on the spindle that had to be used, which was a consequence of the viscosity of the sample.

(F8). Indeed, formulation F8 provided a viscosity value at 25°C and 20 rpm of 60 mPa.s, which was similar to that obtained for formulation F4 (Table 1).

To evaluate the sustained-release capacity of the developed formulation that presented a suitable syringeability such as F8, it was suggested that it could be compared with a formulation wherein the GMO adopted the cubic crystalline phase structure. This structure is reported by many authors as presenting high viscosity and poor syringeability but the best sustained-release capacity^{13,21,25,26}. Therefore, a cubic reference preparation as previously described containing CLO, GMO, and water was used as sustained-release reference²¹. However, early disintegration of formulations that are characterized by high amounts of co-solvent system, such as F4 or F8, occurred immediately after immersion, leading to a burst release of the drug. Indeed, the entire amount of CLO was released within a few minutes after immersion (Figure 4). The relatively low viscosity of formulation F8 (60 mPa.s at 25°C and 20 rpm in Table 1), could explain a faster penetration of water, which led to an unstructured gel that was not able to remain on the topical immersion cell. As a consequence, the area of diffusion between the droplets of disintegrated gel formulation and the medium increased, accelerating the release process.

As HA is known to increase viscosity when dissolved in aqueous fluids, it was then incorporated into our system to preserve its integrity in the dissolution media for a prolonged period of time. To reduce the risk of obtaining a formulation presenting poor syringeability and using the range of 5–15 mg/mL reported by Gerwin *et al.*, two low concentrations of HA were evaluated: 5 and 7.5 mg/g of formulation³. Indeed, in the presence of water, the combination of dissolved HA and GMO was thought to increase the viscosity of the system notably. Running parallel with the influence of HA on both the dissolution profile of CLO and the rheological properties of the formulation, the syringeability of the formulations was also manually evaluated with plastic syringes fitted with 21, 22, and 23G needles (Table 2).

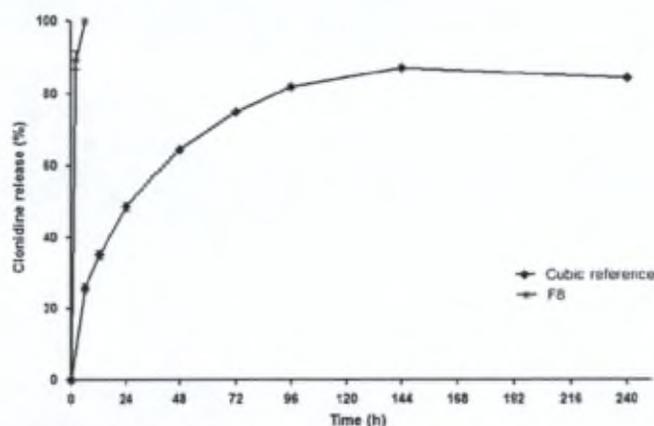


Figure 4. *In-vitro* dissolution profiles of clonidine contained in formulations F8 (■) and the cubic reference (◆) in saline phosphate buffer, pH 7.4, at 50 rpm and 37°C ($n = 3$, mean \pm SD).

As previously reported for formulations F6 (10% wt/wt ET) and F7 (10% w/w ET and 10% w/w PG) (Table 1), the composition of formulations F9 and F10 (Table 2), which contained similar ratio of ingredients than F6 and F7, respectively, did not provide suitable rheological properties for allowing the injection of the preparation, regardless of the amount of HA incorporated (i.e., not applicable syringeability for formulations F9-F9' and F10-F10'). On the other hand, the evaluated formulations F11-F11' were presented as liquid and limpid formulations containing GMO, HA, and CLO and were characterized by suitable syringeability properties regardless of the size of the needle used. Moreover, these compositions presented a pH value of

about 5.7 regardless to the amount of PG and HA incorporated. The acceptable pH range is 4-9 for parenteral preparations²⁸.

To visualize the influence of the amount of PG incorporated on the crystalline phase structure adopted by the GMO and the subsequent flow behavior of the preparations developed, F11' and F10' were both evaluated by microscopy at room temperature under polarized light (Figure 5). The structural aspect of preparation F11' (10% wt/wt ET and 20% wt/wt PG) looked smooth and regular when HA was completely dissolved, as compared with the thread-like network observed with F10' (10% wt/wt ET and 10% wt/wt PG). It seemed that HA was dispersed as a suspension in F10' and it was assumed

Table 2. Composition of the HA-containing formulations investigated (all quantities are given as percentages (w/w)).

Formulations	ET	PG	Water	GMO	CLO ($\mu\text{g/g}$)	HA (mg/g)	Syringeability
F9-F9'	10.0	0	15.0	75.0	225	5.0-7.5	NA**
F10-F10'	10.0	10.0	15.0	65.0	225	5.0-7.5	NA**
F11-F11'	10.0	20.0	15.0	55.0	225	5.0-7.5	Suitable
F12-F12'	10.0	30.0	15.0	45.0	225	5.0-7.5	Suitable
F13-F13'	10.0	40.0	15.0	35.0	225	5.0-7.5	Suitable
F14'	10.0	20.0	10.0	60.0	225	7.5	NA***
F15'	10.0	20.0	20.0	50.0	225	7.5	Suitable

For the same amount of excipients and drug (ET, PG, water, GMO, CLO), formulations contained 5 mg/g of HA (F9 to F13) or 7.5 mg/g of HA (F9' to F15'). Syringeability was performed with plastic syringes fitted with 21, 22, and 23G needles.

CLO, clonidine; ET, ethanol; GMO, glyceryl monooleate; HA, hyaluronic acid; PG, propylene glycol.

NA: not applicable, due to excessive viscosity of the sample. *NA: not applicable, due to particles of HA not being dissolved.

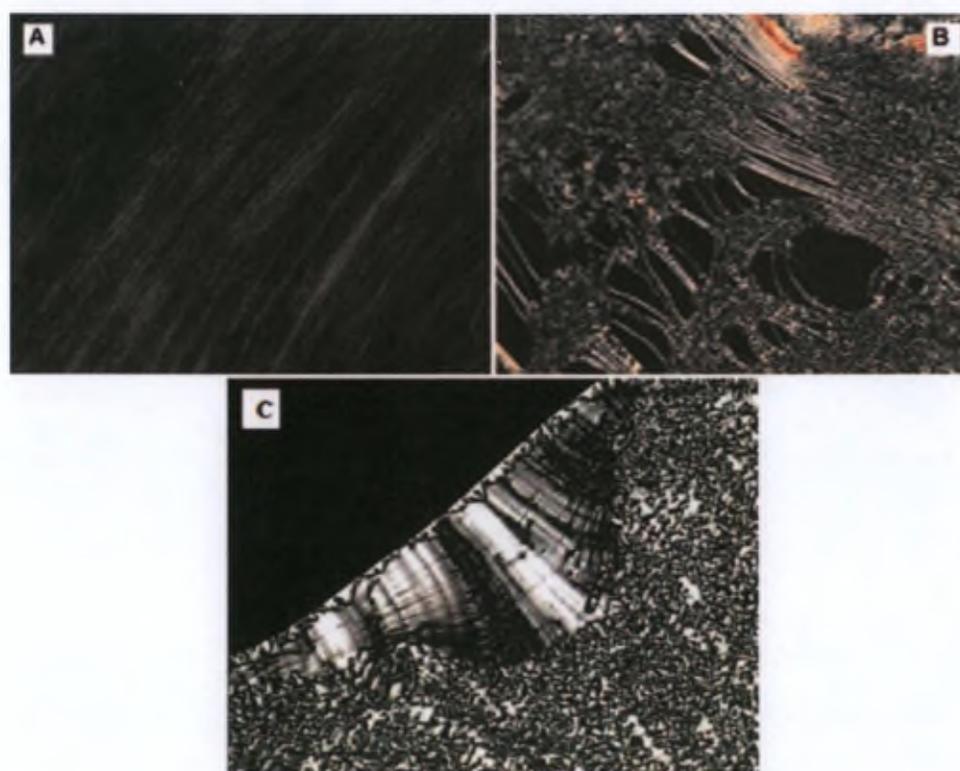


Figure 5. Microphotographs of (A) formulation F11', (B) formulation F10', and the (C) cubic reference.

that GMO adopted a crystalline phase structure that was responsible for the increase of the viscosity of the formulation^{21,25}. Indeed, the cubic phase structure could be demonstrated by microscopy under a polarized lens, as shown in Figure 5C for the cubic reference²⁵. The presence of other crystalline phase structures such as lamellar and reverse hexagonal phases could be demonstrated by the same technique. Therefore, regarding the amount of water incorporated in formulation F10' and the phase diagram of GMO-water system¹³, the microphotograph showed in Figure 5B probably represented a lamellar phase structure²⁹.

Therefore, it seemed that a minimum of 30.0% (wt/wt) of co-solvents, split into 10.0% (wt/wt) ET and 20.0% (wt/wt) PG, was necessary to reach a homogenous and cohesive structure, in which all the ingredients of the formulation are dissolved.

Solutions containing GMO, HA, and CLO, characterized by pseudoplastic flow behavior and suitable pH value and syringeability properties, were also obtained when the concentration of PG was increased from 20.0 to 40.0% (wt/wt) in formulations F11, F12, and F13, respectively (Table 2, Figure 6). This occurred regardless of the amount of HA incorporated. Moreover, in the HA-containing formulations evaluated, the proportion of PG from 20.0 to 40.0% (wt/wt) in formulations F11', F12', and F13' and the amount of water incorporated, from 15.0% (F11') to 20.0% (F15'), seemed to have no substantial effect on the rheological properties of the final product (Figure 6).

Nevertheless, the amount of HA incorporated seemed to provide a substantial effect on the viscosity of the formulation, as can be seen in Figure 6. For example, formulation F11, which contained 5.0 mg/g of HA, presented viscosity values of 5831 ± 34 and 1337 ± 12 mPa.s at a shear rate of 20 and 200 rpm (25°C), respectively (Table 3). The pseudoplastic properties of the gel formulations were preserved with higher amounts of HA (Figure 6), although this led to a higher viscosity of the system. Indeed, in comparison with its homologue, F11, formulation F11', which contained 7.5 mg/g of HA, presented

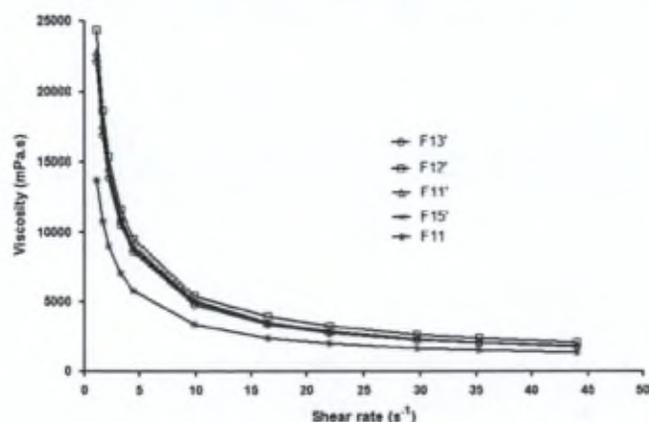


Figure 6. Rheological properties of the formulations F11' (Δ), F12' (\square), F13' (\circ), F15' (\times), and F11 (\ast).

at 25°C higher viscosity values of 8936 ± 150 and 1815 ± 22 mPa.s at 20 and 200 rpm, respectively (Table 3). As a consequence, formulations containing 5 mg/g HA (F11, F12, and F13) are easier to inject than their analogues containing 7.5 mg/g HA (F11', F12', and F13').

As reported previously, 10.0% (wt/wt) water in F14' was not sufficient to dissolve the HA completely, leading to a composition presenting poor syringeability due to agglomerates of particles of HA at the base of the needles regardless of their size (F14' in Table 2). As a consequence, a minimum of 15% (wt/wt) water was proved to be essential.

According to the rheological and suitable syringeability properties, the compositions F11-F11', F12-F12', and F13-F13' were selected to evaluate their capacity to sustain the CLO release. Dissolution profiles of CLO from such formulations were evaluated and compared to those obtained with the cubic reference formulation previously described (Table 1).

Figure 7 showed that formulation F11, containing 5.0 mg/g of HA, could sustain the *in-vitro* release of CLO for about 4 days but that the dissolution profile was not similar to the reference due to a larger burst release

Table 3. Rheological flow behavior and viscosity of formulations F11-F11', F12-F12', and F13-F13' containing 20, 30, and 40% (wt/wt) PG with 5.0 or 7.5 mg/g of HA, respectively.

Formulations		Rheological behavior	Viscosity (mPa.s) at 20 rpm (25°C)	Viscosity (mPa.s) at 200 rpm (25°C)
F11	5.0 mg/g HA	Pseudoplastic	5831 ± 34	1337 ± 12
F11'	7.5 mg/g HA	Pseudoplastic	8936 ± 150	1815 ± 22
F12	5.0 mg/g HA	Pseudoplastic	5111 ± 24	1237 ± 28
F12'	7.5 mg/g HA	Pseudoplastic	9646 ± 615	1933 ± 162
F13	5.0 mg/g HA	Pseudoplastic	4919 ± 125	1159 ± 68
F13'	7.5 mg/g HA	Pseudoplastic	8830 ± 571	1756 ± 106

Measurements ($n = 3$, mean \pm SD) of viscosity were performed at 25°C and evaluated at shear rates of 20 and 200 rpm. HA, hyaluronic acid; PG, propylene glycol.

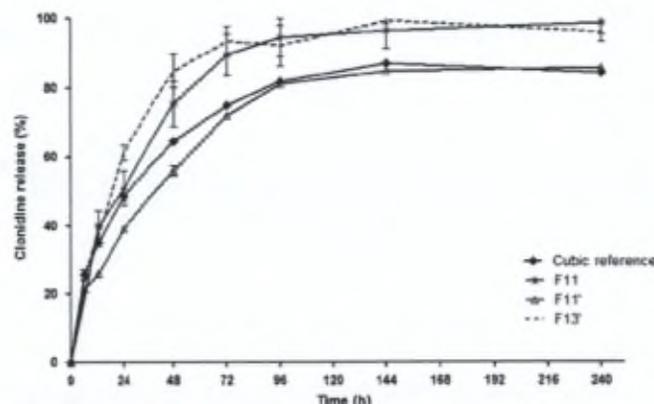


Figure 7. *In-vitro* dissolution profiles of clonidine contained in formulations F11 (\ast), F11' (Δ), F13' (\cdots), and the cubic reference (\diamond) in saline phosphate buffer pH 7.4 at 50 rpm and 37°C ($n = 3$, mean \pm SD).

Table 4. *In-vitro* dissolution profiles represented by f_2 factor values and estimated residues of clonidine inside the F11, F11', and F13' gels and the cubic reference after 10 days of immersion in phosphate buffer pH 7.4 at 50 rpm and 37°C ($n = 3$).

Formulation		f_2 factor values compared with the cubic reference	Residue in the gel after 10 days of dissolution test (%)
F11	5.0 mg/g HA (20% PG)	45.9	4.2 ± 3.5
F11'	7.5 mg/g HA (20% PG)	61.3	12.2 ± 1.4
F13'	7.5 mg/g HA (40% PG)	45.3	4.1 ± 3.8
Cubic reference		-	16.3 ± 0.4

HA, hyaluronic acid; PG, propylene glycol.

(75.4% for F11 and 64.6% for the cubic reference) of the drug within the first 2 days ($f_2 = 45.9$). Moreover, an extraction step performed on the resultant gels demonstrated that only 4.2 ± 3.5% (wt/wt) of CLO still remained inside the preparation after 10 days of immersion in contrast with 16.3 ± 0.4% (wt/wt) for the cubic reference (Table 4). This observation could certainly be explained by the lower viscosity of the formulation, which led to a fast penetration of water and formation of a partially structured gel that did not remain completely on the topical immersion cell. As a consequence, the area of diffusion between the formulation and the medium increased, leading to an accelerated release process. In contrast, when the amount of HA incorporated was increased to 7.5 mg/g in F11', the release of CLO was prolonged within the first week. Interestingly, the dissolution profile of F11' containing 7.5 mg/g of HA became similar to the reference dissolution profile ($f_2 = 61.3$). At the end of the experiment, only about 85–90% (wt/wt) of the drug was released in the dissolution media from both the developed formulation F11' and the cubic reference. Indeed, an extraction step performed on the resultant gels demonstrated that 12.2 ± 1.4 and 16.3 ± 0.4% (wt/wt) of CLO still remained inside preparation F11' and the cubic reference, respectively, after 10 days of immersion (Table 4). These results showed that both the F11' formulation and the cubic reference presenting a similar *in-vitro* sustained release of CLO, which demonstrated the ability of preparation F11' to sustain the release of the model drug properly.

As reported in Figure 6, when the percentage of PG was increased to 30.0 and 40.0% (wt/wt) in formulations F12–F12' and F13–F13' respectively, the viscosity at 20 and 200 rpm was similar to that observed for F11–F11', depending on the concentration of HA incorporated (Table 3). However, the *in-vitro* dissolution profile of CLO obtained with F13', which contained 40.0% (wt/wt) PG, was significantly faster than the F11' formulations ($f_2 = 37.3$), which contained only 20.0% (wt/wt) PG, and the cubic reference ($f_2 = 45.3$) (Table 4 and Figure 7). Moreover, the residue of CLO found in F13' (4.1 ± 3.8% wt/wt) was lower in comparison with the cubic reference (16.3 ± 0.4% wt/wt) and the developed F11' (12.2 ± 1.4% wt/wt). These observations could certainly be explained

by the formation of an unstructured gel due to an inappropriate GMO/co-solvents ratio. This seemed to hinder the *in-situ* gelling process, leading to an increase in the diffusion and, thus, release process. These increases were associated probably with a fast penetration of water inside the preparation. Detailed studies will be performed to evaluate the exchanges of water from the external media into the matrix and results will be published as soon as possible.

Conclusion

The feasibility and preliminary *in vitro* characterization of a new injectable system based on monoleine, containing CLO HCl as a model anti-inflammatory drug and HA as a viscoelastic scaffold, showed promising potential as a biodegradable and biocompatible preparation for the local management of arthritic diseases. In this respect, a formulation containing 30% (wt/wt) co-solvents split into 10% (wt/wt) ET and 20% (wt/wt) PG, 7.5 mg/g HA, 15% (wt/wt) water, and 55% (wt/wt) GMO, appeared to be the most suitable preparation. Indeed, it presented pseudoplastic flow behavior, which allows relatively fast injection through a narrow needle, followed by an increase in viscosity upon contact with aqueous fluids such as physiological fluids to obtain an *in-situ* sustained-release of CLO. Moreover, its homogeneous, clear and smooth characteristics avoided its early disintegration both before and after passage through the needle. Since there is no description in the literature of an injectable formulation developed for IA route of administration and based on GMO that provides *in-vitro* sustained release of a drug over 1–2 days, these results were very promising. Indeed, the developed formulation F11' provided an *in-vitro* sustained release of CLO for about 1 week.

Declaration of Interest

The authors report no conflicts of interest.

References

1. Symmons D, Mathers C, Pfleger B. Global burden of osteoarthritis in the year 2000. World Health Organization [Online] (WHO), 2006. Available at: www.who.int/entity/healthinfo/statistics/bod_osteoarthritis.pdf (Accessed 19 July 2012).
2. Balazs EA. The Physical Properties of Synovial Fluid and the Special Role of Hyaluronic Acid in Disorder of the Knee. Helfet A, ed. Philadelphia: T.B. Lippincott Company, 1974:63–75.
3. Gerwin N, Hops C, Lucke A. (2006). Intraarticular drug delivery in osteoarthritis. *Adv Drug Del Rev*, 58:226–242.
4. Sarzi-Puttini P, Cimmino MA, Scarpa R, Caporali R, Parazzini F, Zaninelli A, Atzeni F, Canesi B. (2005). Osteoarthritis: an overview of the disease and its treatment strategies. *Semin Arthritis Rheum*, 35:1–10.
5. Buckwalter JA, Martin JA. (2006). Osteoarthritis. *Adv Drug Deliv Rev*, 58:150–167.
6. Uthman I, Raynauld JP, Haraoui B. (2003). Intra-articular therapy in osteoarthritis. *Postgrad Med J*, 79:449–453.

7. Bellamy N, Campbell J, Gee TL, Bourne R, Wells G. (2009). Intraarticular corticosteroid for treatment of osteoarthritis of the knee (review). *Cochrane Database Syst Rev*:CD005328.
8. Scale D, Wobig M, Wolpert W. (1994). Viscosupplementation of osteoarthritic knees with hylan: a treatment schedule study. *Curr Therap Res*, 55(3):220-232.
9. Dahl LB, Dahl IM, Engstrom-Laurent A, Granath K. (1985). Concentration and molecular weight of sodium hyaluronate in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis and other arthropathies. *Ann Rheum Dis*, 44:817-872.
10. Brown TJ, Laurent UB, Fraser JR. (1991). Turnover of hyaluronan in synovial joints: elimination of labelled hyaluronan from the knee joint of the rabbit. *Exp Physiol*, 76:125-134.
11. Bastianelly. (2009). Pharmaceutical composition for use in the treatment or prevention of osteoarticular diseases. International publication number: W0 2009/101210.
12. Engstrom S. (1990). Drug delivery from cubic and other lipid-water phases. *Lipid Technol*, 2:42-45.
13. Shah JC, Sathale Y, Chilukuri DM. (2001). Cubic phase gels as drug delivery systems. *Adv Drug Del Rev*, 47:229-250.
14. Ayril X. (2001). Injections in the treatment of osteoarthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 15:609-626.
15. Schumacher HR Jr. (2003). Aspiration and injection therapies for joints. *Arthritis Rheum*, 49:413-420.
16. Nielsen LS, Schubert L, Hansen J. (1998). Bioadhesive drug delivery systems I: Characterization of mucoadhesive properties of systems based on glyceryl monooleate and glyceryl monolinoleate. *Eur J Pharm Sci*, 6:231-239.
17. U.S. Food and Drug Administration (FDA). Database of Inactive Ingredients for approved drug products, 2012. Available at: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/lig/> (Accessed 19 July 2012).
18. Kroschwitz JL. (1990). *Polymers: polymer characterization and analysis*; USA: a Wiley-Interscience publication. Rheological measurements:637-725.
19. Guidance for Industry, Extended Release Oral Dosage Forms: Development, Evaluation, and Application of In Vitro/In Vivo Correlations, September 1997, U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research.
20. Shah VP, Tsong Y, Sathe P, Liu J-P. (1998). In vitro dissolution profile comparison - statistics and analysis of the similarity factor f2. *Pharm. Res*, 15:889-896.
21. Ouedraogo M, Semde R, Some IT, Traore R, Guisson IP, Evrard B, Henschel V, Dubois J, Amighi K. (2008). Monooleine-water liquid crystalline gels of gentamicin as bioresorbable implants for the local treatment of chronic osteomyelitis: in vitro characterization. *Drug Dev Ind Pharm*, 34:753-760.
22. Rowe RC, Sheskey PJ, Owen SC. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, Fifth edition, 2006:306-307.
23. Neustadt DH. (2006). Intra-articular injections for osteoarthritis of the knee. *Cleve Clin J Med*, 73:897-8, 901.
24. Balazs EA. (2004). Viscoelastic properties of hyaluronan and its therapeutic use. In: Garg, Hales, ed. *Chemistry and Biology of Hyaluronan*, Chapter 20.
25. Chang C-M, Bodmeier R. (1997). Swelling of and Drug Release from Monoglyceride-Based Drug Delivery Systems. *J Pharm Sci*, 86(6):747-752.
26. Ganem-Quintanar A, Quintanar-Guerrero D, Buri P. (2000). Monolein: A review of the pharmaceutical applications. *Drug Dev Ind Pharm*, 26(8):809-820.
27. Shah MH, Paradkar A. (2007). Effect of HLB of additives on the properties and drug release from glyceryl monooleate matrices. *Eur J Pharm Biopharm*, 67:166-174.
28. Ghosh AK, Jasti BR. (2004). *Theory and practice of contemporary pharmaceuticals. Parenteral Routes of Delivery*, First Edition. USA: CRC Press, 387-423.
29. He R, Craig DQM. (1998). Identification of thermotropic phase transitions of glyceryl monoolein-water systems by low frequency dielectric spectroscopy. *Int J Pharm*, 169:131-141.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

International Journal of Pharmaceutics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijpharm

Characterization and optimization of GMO-based gels with long term release for intraarticular administration



J. Réeff^{a,*}, A. Gaignaux^a, J. Goole^a, J. Siepmann^b, F. Siepmann^b, C. Jerome^c, J.M. Thomassin^c, C. De Vriese^a, K. Amighi^a

^a Laboratory of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, Université Libre de Bruxelles (ULB), Campus de la Plaine, BC, B-1050 Brussels, Belgium

^b College of Pharmacy, INSERM U 1008, University of Lille 2, 3 rue du Professeur Laguesse, 59006 Lille, France

^c Center for Education and Research on Macromolecules (CERM), University of Liege, Sart-Tilman, B6, B-4000 Liège, Belgium

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 January 2013

Received in revised form 22 April 2013

Accepted 24 April 2013

Available online 4 May 2013

Keywords:

Intraarticular

Parenteral

Drug delivery

Hyaluronic acid

Glycerol monooleate

Sustained-release

ABSTRACT

Osteoarthritis is characterized by slow degenerative processes in the articular cartilage within synovial joints. It could be interesting to develop a sustained-release formulation that could be effective on both pain/inflammation and restoration of mechanical integrity of the joint. Recently, an injectable system based on glycerol monooleate (GMO), containing clonidine as a model hydrophilic analgesic/anti-inflammatory drug and hyaluronic acid as a viscoelastic scaffold, showed promising potential as a biodegradable and biocompatible preparation to sustain the drug activity. However, drug release from the system is relatively fast (complete within 1 week) and the underlying drug release mechanisms not fully understood. The aims of this study were: (i) to significantly improve this type of local controlled drug delivery system by further sustaining clonidine release, and (ii) to elucidate the underlying mass transport mechanisms. The addition of FDA-approved inactive ingredients such as sodium oleate or purified soybean oil was found to be highly effective. The release rate could be substantially reduced (e.g., 50% release after 10 days), due to the increased hydrophobicity of the systems, resulting in slower and reduced water uptake and reduced drug mobility. Interestingly, Fick's second law of diffusion could be used to quantitatively describe drug release.

© 2013 Published by Elsevier B.V.

1. Introduction

Osteoarthritis (OA), the most common form of arthritis, is characterized by slow degenerative processes in the articular cartilage within synovial joints, which could be associated with hypertrophy of bones (subchondral bone and osteophytes sclerosis) and thickening of the capsule. This degenerative disease involves an irreversible and progressive loss of articular cartilage, changes in synovial membrane, and an increased volume of synovial fluid with modification of its composition and reduction of its viscoelastic/lubrication properties (Balazs, 1974; Gerwin et al., 2006; Sarzi-Puttini et al., 2005). Clinically, the main symptoms are characterized by joint pain, tenderness, limitation of movement, crepitus, occasional effusion,

and variable degrees of local inflammation (Symmons et al., 2000; Buckwalter and Martin, 2006).

Currently available pharmacological therapies target palliation of pain and include analgesic drugs (e.g., non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and opioids) (Sarzi-Puttini et al., 2005; Gerwin et al., 2006; Uthman et al., 2003). Different compounds, such as glucocorticoids and hyaluronic acid, have usually been used intraarticularly (Gerwin et al., 2006; Uthman et al., 2003). Nevertheless, glucocorticoids are thought to have many side effects on the cartilage (Bellamy et al., 2006a) and hyaluronan products need several injections to be effective (Scale et al., 1994).

Nevertheless, α_2 -adrenergic agonists such as clonidine (CLO) could represent a new suitable alternative to the administration of corticosteroids. Indeed, the intraarticular (IA) use of α_2 -adrenergic receptor agonists are thought to produce analgesia mainly through an inhibition of the transmission of nociceptive stimulation (Sullivan et al., 1987; Gentili et al., 1996; Lavelle et al., 2007; Larsen et al., 2008). Moreover, Bastianelly et al. (2009) have recently shown that the combination of CLO and hyaluronan decreased the secretion of cytokines such as IL-1 β and inflammatory cell proliferation, providing an anti-inflammatory effect. Indeed, cytokines produced by the synovium and chondrocytes,

Abbreviations: GMO, glycerol monooleate; CLO, clonidine; HA, hyaluronic acid; ET, ethanol; PG, propylene glycol; IA, intraarticular; OA, osteoarthritis; Mw, molecular weight.

* Corresponding author at: Laboratoire de Pharmacie Galénique et Biopharmacie, Université Libre de Bruxelles, Campus de la Plaine, CP207, Boulevard du Triomphe, 1050 Bruxelles, Belgium. Tel.: +32 2 650 53 20; fax: +32 2 650 52 69.

E-mail address: jreeff@gmail.com (J. Réeff).

especially interleukine 1 (IL-1) and tumor necrosis factor alpha (TNF- α), seem to play a significant role in the degradation of the cartilage (Sarzi-Puttini et al., 2005). Unfortunately, it was demonstrated that small therapeutic molecules, such as CLO, are rapidly cleared from the synovial space after IA injection (Larsen et al., 2008).

Therefore, it seems that there is a need to improve the design of formulations. More particularly, it could be useful to develop a sustained-release formulation that could be effective both on pain/inflammation and on restoration of the mechanical integrity of the joint.

Lipids have recently received considerable attention as an alternative to polymeric carrier or coating materials in the development of drug delivery systems. Glyceryl monooleate (GMO), also called monolein, allows the formation of an *in situ* gel that is able to sustain the delivery of various water-soluble and water-insoluble drugs, based on its capacity to form viscous systems in the presence of water (Engstrom, 1990; Shah et al., 2001). Interestingly, GMO is biocompatible and biodegradable. Moreover, it is characterized by bioadhesive properties and can be used to enhance the therapeutic efficacy of drugs by increasing their residence time at the site of administration (Nielsen et al., 1998). Generally, injectable formulations based on GMO that were described in the literature are not able to sustain the release of a drug for more than a couple of days (Shah et al., 2001). Nevertheless, a new injectable formulation containing CLO as a model hydrophilic drug and hyaluronic acid (HA) as a viscoelastic scaffold was recently described as being able to sustain the release of this active drug for about one week (Réeff et al., 2012). Moreover, it was demonstrated that this formulation provided a similar release profile to that obtained from a cubic reference formulation ($f_2 = 61.3$), containing 75% (w/w) GMO and 25% (w/w) water, which is reported by many authors as presenting very high viscosity and as a consequence poor syringeability properties but the best sustained-release capacity (Shah et al., 2001; Ouedraogo et al., 2008). Nevertheless, it was suggested that the selected formulation could be optimized to improve the sustained release of CLO. For instance, it was reported by Shah et al. that the addition of ingredients characterized by a low HLB value could potentiate the formation of crystalline phase structures (Shah and Paradkar, 2007). Another approach could be the addition of sodium oleate, which can form insoluble complexes with many drugs (Chang and Bodmeier, 1997; Ouedraogo et al., 2008). For a stability point of view, α -tocopherol acetate could also be added to protect lipid compounds from oxidation.

The aim of this study was to substantially improve the sustained-release properties of a GMO based injectable formulation, previously described by Réeff et al., and containing CLO as a model drug for the treatment of OA (Réeff et al., 2012), and to better understand the underlying mass transport mechanisms. The present work evaluates the influence of different inactive ingredients such as sodium hyaluronate, propylene glycol, sodium oleate or purified soybean oil and their concentrations on the release profile of the CLO. Physico-chemical properties such as rheological properties, syringeability, release profiles, and the water uptake of each formulation were also evaluated.

2. Materials and methods

Glyceryl monooleate (Rylo MG 20 characterized by 99% purity) was used as an *in situ* gelling-agent and was supplied by Danisco® (Grinsted, Denmark). Sodium hyaluronate (Mw 1.9 MDa) was used as a reference viscoelastic polysaccharide and was supplied by European Technologies Inc.® (Dolní Dobrouč, Czech Republic). Clonidine HCl was used as a small, hydrophilic model drug and supplied by Chemicals International Group® (Holte, Denmark). Ethanol

absolute was used as a solvent to improve the syringeability of the formulation and was supplied by VWR® (Leuven, Belgium). Propylene glycol was used as a co-solvent and was supplied by Certa® (Braine l'Alleud, Belgium). Sodium oleate and purified soybean oil were kindly donated by Lipoid® (Cham, Switzerland). These kinds of excipients could be able to improve the sustained-release properties of the formulation by complexing the drug or potentiating the formation of crystalline phase structures. α -Tocopherol acetate was used as an antioxidant to protect lipid compounds and was supplied by Certa® (Braine l'Alleud, Belgium). Sterile, apyrogenic, and endotoxin-free water was distributed from a Purelab apparatus (Analisis®, Namur, Belgium) and was found to be essential to dissolve sodium hyaluronate.

2.1. Preparation of the gel

All operations required in the preparation of the formulations were carried out under aseptic conditions in a class IIB biosafety cabinet (ADS Laminaire®, Le Pre-Saint-Gervais, France). Moreover, laboratory glasswares used were previously sterilized by steam sterilization using an autoclave (Systec® D-65, Wetztenberg, Germany).

GMO was gently melted at a maximal temperature of $45 \pm 2^\circ\text{C}$. Afterwards, co-solvents, such as ethanol (ET) and propylene glycol (PG), were added to dissolve the GMO. Alternatively, organic oil (e.g., soybean oil) or sodium oleate and an antioxidant (e.g., α -tocopherol) could also be incorporated. HA-parenteral grade was then dispersed using a T25 Ultra-Turrax® (IKA® Werke GmbH & Co. KG, Janke & Kunkel, Staufen, Germany) with a rotational speed fixed at 24,000 rpm for 3 min. Simultaneously, an aqueous solution of CLO was prepared by dissolving the drug in purified, apyrogenic water. This aqueous solution was finally added to the solution of GMO at $45 \pm 2^\circ\text{C}$ under magnetic stirring. The gels were stored at 6°C for 48 h before performing any experiment.

2.2. Quantification of clonidine in the gel formulations and in residues of gel at the end of the release studies

Two validated High Performance Liquid Chromatography (HPLC) methods adapted from USP 25 monograph of CLO, which is developed to verify the uniformity of dosage units, were previously described (Réeff et al., 2012). Briefly, the HPLC system (Series 1200, Agilent® Technologies, Diegem, Belgium) was equipped with a quaternary pump, a degasser, an ALS auto sampler equipped with a TCC thermostated column oven set at 25°C , and a diode-array detector (DAD) set at 210 nm. The separation system was an Agilent® Zorbax Eclipse Plus C8 4.6 mm \times 150 mm (3.5 μm) column. The isocratic mobile phase was composed of a 50:50 (v/v) ratio of water/methanol, adjusted to pH 3.0 with 1 ml phosphoric acid 85% (w/w) (Riedel-de Haën®, Seelze, Germany) and 1 N sodium hydroxide solution (Merck®, Overijse, Belgium). 1.1 g of sodium octanesulfonate (Sigma-Aldrich®, Bornem, Belgium) was added as an ion pair. The flow rate was set at 1 ml/min and the injection volume was set at 5 μl or 50 μl depending on the study performed.

2.3. Extraction of clonidine from the gel formulations and in residues of gel at the end of release studies

Two liquid-liquid extraction steps of CLO from the gel formulations and residues of gels at the end of release studies were previously described to remove potential impurities such as GMO and HA before doing HPLC analysis (Réeff et al., 2012). Briefly, 2 g of gel was weighed and placed in 25.0 ml of dichloromethane with 2.0 ml or 0.5 ml of a tizanidine HCl solution (200 $\mu\text{g/ml}$) used as the internal standard. When the entire amount of gel was dissolved, CLO was extracted twice in 10 ml of citrate buffer pH 3.0 and the

final volume was adjusted to 25.0 ml with the same buffer. The resulting solution was then centrifuged and a suitable extraction step of dissolved HA, also previously described by Réeff et al. (2012), was performed on supernatant by using Amicon® centrifugal filter unit (Millipore®, Overijse, Belgium) before injection in HPLC systems to avoid an agglomeration of polymer at the head of the column. Finally, 500.0 µl of methanol or of a methanolic solution of sodium octanesulfonate (2.2 g/l) was added to the filtrates depending on the study performed.

2.4. Rheological studies

In order to test the viscosity and elasticity of the formulations, the rheological properties of different formulations were analyzed. The analyses were performed using a TA instrument ARES-G2 rheometer with cone-plate geometry (diameter 25.0 mm, 0.0997 rad) at 25 °C or 37 °C.

The instrument was used in the flow-sweep mode that allowed studying the flow behavior properties of the formulations. In that purpose, the shear stress was evaluated by varying the shear rate from 0.1 to 100 s⁻¹. In order to compare the rheological properties of all the formulations, Power Law $\tau = k\dot{\gamma}^n$ – where τ is the shear stress (Pa), $\dot{\gamma}$ is the shear rate (s⁻¹) and k is the consistency coefficient (Pa sⁿ) – was then applied. This mathematical relationship allows the evaluation of shear-thinning and shear-thickening systems, depending on the power factor n (also called the flow behavior index). The flow behavior index “ n ” of a formulation was defined as the slope of the graph drawn in log–log scale of the shear stress as a function of shear rate. If the n value is less than 1, the fluid can be considered as shear-thinning; if it is greater than 1, the fluid can be considered as shear-thickening (Kroschwitz, 1990).

The rheometer was also used in the oscillation–frequency mode, where the strain was set at 1% and the angular frequency was set from 100 to 0.1 rad/s. This mode allowed the evolution of the storage modulus (G') – also called elastic modulus – and loss modulus (G'') – also called viscous modulus – in function of the angular frequency applied on the samples to be studied. These parameters provided important information about the viscoelastic properties of the developed formulations. These rheological properties are of great interest in the present work to evaluate the capacity of the developed formulations to restore the mechanical integrity of the joint by an in vitro study. Moreover, it could provide important information on the molecular structure of the gel depending on the stress applied on.

Finally, to evaluate the rheological properties of the forming gel after contact upon aqueous fluid, about 1 ml of formulation and 1 ml of saline phosphate buffer pH 7.40 were mixed. The sample was immediately analyzed at 25 and 37 °C using the oscillation-time mode, where the strain was set at 1%, the sampling rate was set at 0.1 pts/s, the angular frequency was set at 6.3 rad/s, and the duration was fixed at 4000 s.

2.5. Evaluation of syringeability

The force required for the injection of a formulation at a given injection rate via a needle of predetermined gauge and length is referred to as “syringeability” (Burckbuchler et al., 2010). As a consequence, syringeability can be considered as the ability of a preparation to be successfully administered by syringe with an appropriate needle.

The syringeability of the formulations was tested using a Stable Micro Systems TA-XT Plus Texture Analyser (Stable Micro systems, Godalming, UK) equipped with a 50 kg loading cell. The principle consisted of applying a given displacement rate to the plunger of the syringe pre-filled with the formulation and measuring the resulting force (N). The parameters of analysis were set as follows:

pre-test speed, 1.00 mm/s; test speed, 1.00 mm/s; post-test speed, 10.0 mm/s; distance covered by the plunger, 15 mm; trigger force, 0.04903 N.

The study was performed ($n=6$) using plastic syringes of 5 ml (Terumo® Europe N.V., Leuven, Belgium) presenting a cross sectional area of plunger of about 1.3 cm and glass syringes from Structovial®, a marketed product based on aqueous solution of HA and presenting a smaller cross sectional area of about 0.8 cm. Syringes were fitted with needles ranged from 21 G to 23 G (Terumo® Europe N.V., Leuven, Belgium) to evaluate the effect of their length and inner diameter on the syringeability properties of the developed formulations. Indeed, it was reported by Adler that the travel force is dependent on several parameters. Viscosity is the only one that depends on the formulation. Others are determined by the pre-fillable syringe itself (needle inner diameter, needle length and cross sectional area of syringe plunger) (Adler, 2012).

2.6. Changes in wet weight

About 250 µl of formulation were placed and weighed (initial weight, W_i) in a 2 ml Eppendorf® tube ($n=6$). One ml of saline phosphate buffer pH 7.40 was carefully added onto the top of the sample and the tube was kept at 37 °C. At fixed time intervals (2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 16 h, 24 h, 48 h and 1 week), saline phosphate buffer was removed and the samples were blotted with tissue paper to remove excess of water in order to be weighed again (final weight, W_f).

The changes in wet weight was expressed in percentage (w/w) and calculated as follows:

$$\text{Wet weight change (\%)} = \frac{W_f - W_i}{W_i} \times 100 \quad (1)$$

2.7. Drug release studies

An in vitro drug release measurement set-up using a Distek 2100C USP32 dissolution apparatus (Distek Inc., North Brunswick, NJ, USA) Type II (paddle method) equipped with small-volume bath vessels of 200 ml (Sysmex, Etten-Leur, Holland) was previously described (Réeff et al., 2012). Briefly, the paddle was positioned at 1.5 cm from the top of the sample and its rotational speed was fixed at 50 rpm. Topical dissolution cells (Sysmex, Etten-Leur, Holland), which presented an area between samples and dissolution medium of about 1.77 cm², were filled with an appropriate amount of formulation and then placed into the vessels. The release studies were carried out in 50 ml of saline phosphate buffer solution (Invitrogen®, Merelbeke, Belgium) at pH 7.40 ± 0.05 and 37 °C. Sodium azide (0.02%, w/v) was added to the release medium to prevent bacterial contamination. Sink conditions were provided throughout the experiments.

At predetermined times: 6 h, 12 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 144 h, and 240 h, aliquots (250 µl) of the release medium were withdrawn and replaced with fresh medium. Each sample added to 250.0 µl of a 0.004 N HCl solution was then filtered on an Amicon® centrifugal filter unit (Millipore®, Overijse, Belgium) to remove dissolved HA prior to HPLC analysis. Finally, 500.0 µl of a methanolic solution of sodium octanesulfonate (2.2 g/l) was added to the filtrate.

At the end of the experiment, the residual amount of CLO was evaluated by extraction as described previously (Réeff et al., 2012).

The possible loss of drug inside the filter unit was estimated ($n=4$) using a control, which was prepared by dispersing 0.5 g of the tested formulation in 25 ml of the release medium, using a T25 Ultra-Turrax® (IKA® Werke GmbH & Co. KG, Janke & Kunkel, Staufen, Germany) set at 24,000 rpm for 3 min. In these conditions, it was proved that all the CLO inside the preparation was released.

Table 1
Composition of the formulations investigated (all quantities are given as percentages (w/w)).

Formulations	[CLO] ($\mu\text{g/g}$)	[HA] (mg/g)	ET (%)	PG (%)	GMO (%)	Water (%)	Oleate Na (%)	α -Tocopherol (%)	Soybean oil (%)
F1	225	5 ^a	10	20	55	15	–	–	–
F2	225	7.5	10	20	55	15	–	–	–
F3	225	10 ^a	10	20	55	15	–	–	–
F4	225	15 ^a	10	20	55	15	–	–	–
F5	450 ^a	7.5	10	20	55	15	–	–	–
F6	675 ^a	7.5	10	20	55	15	–	–	–
F7	225	7.5	10	40 ^a	35 ^a	15	–	–	–
F8	225	7.5	10	20	55	15	0.3 ^a	0.03 ^a	–
F9	225	7.5	10	17.5 ^a	55	15	–	0.03 ^a	2.5 ^a
F10	225	7.5	10	15 ^a	55	15	–	0.03 ^a	5 ^a
F11 ^b	225	7.5	10	15 ^a	55	15	–	0.03 ^a	5 ^a
CUBIC REF	225	–	–	–	75	25	–	–	–

^a Underlined values are modifications compared to formulation F2.

^b pH value adjusted at 6.5 with NaOH 1 N.

Finally, in order to better understand the underlying drug release mechanisms from these formulations, a mechanistically realistic mathematical model was fitted to the experimentally measured CLO release kinetics. In this way, the apparent drug diffusion coefficient (D) within the formulations could be calculated.

2.8. Statistical evaluation

As recommended in the FDA Guidances for Industry, the similarity factor f_2 was used to determine the similarity of release profiles (FDA, 2012; Shah et al., 1998). The compared release profiles were obtained under the same test conditions and their release time points were similar. As indicated by Shah and coworkers, the similarity factor value has to be higher than 50 to assess two release profiles as similar. However, the similarity factor f_2 is no perfect measure, and – as in the case of any statistical analysis with a limited number of data points – some caution should be paid.

3. Results and discussion

Recently, a new type of injectable systems has been proposed for intraarticular administration, based on GMO and containing CLO as a model hydrophilic drug and HA as a viscoelastic scaffold (Réeff et al., 2012). The formulations F1 and F2 (Table 1) have been shown to provide suitable syringeability and sustained-release profiles of CLO from 4 days to 1 week. The systems contain 30% (w/w) co-solvents [10% (w/w) ethanol and 20% (w/w) propylene glycol], 15% (w/w) water, 55% (w/w) glyceryl monooleate and 5 mg/g or 7.5 mg/g sodium hyaluronate. Formulation F2 provided a release profile of CLO that was similar to that obtained with a cubic phase preparation, which contained 75% GMO and 25% water. This cubic phase preparation was used as a reference (CUBIC REF) due to its highly stable and viscous structure, which was shown to provide a suitable sustained-release profile of a hydrophilic drug (Ouedraogo et al., 2008). However, a release period of 4 days to 1 week in vitro release is relatively short for this type of formulations. In order to be able to provide an in vivo activity of the drug over a few weeks after one single administration, the system requires fundamental improvement. For these reasons, the composition of the formulation was substantially altered in this study, as detailed in Table 1. Namely, other FDA-approved inactive ingredients such as sodium oleate or purified soybean oil, which can form insoluble complexes with many drugs (Chang and Bodmeier, 1997; Ouedraogo et al., 2008) or potentiate the formation of crystalline phase structures (Shah and Paradkar, 2007) were added. Moreover, α -tocopherol acetate was added to protect the lipidic compounds from oxidation. The present work evaluates the effects of these modifications on both, the release profiles of CLO and on the physico-chemical

properties such as rheology, syringeability and swelling of the developed gel carrier.

The development of parenteral formulations requires specific properties such as clarity, a pH value within a range from 4 to 9 (Tapash et al., 2004) and suitable syringeability. The marketed product Structovial[®], currently used in the treatment of OA, was chosen as the comparator product as it contains HA derivatives characterized by high molecular weight and is usually used intra-articularly for the management of arthritic disorders (Gerwin et al., 2006; Uthman et al., 2003).

Table 2 shows some physico-chemical properties of the formulations described in Table 1: the pH values, syringeability, color and limpidity of the formulations developed.

As reported in Table 2, most of these compositions presented a pH value slightly acidic of about 5.7 certainly due to CLO and free fatty acids present in the GMO product (Rowe et al., 2006).

Nevertheless, the addition of sodium oleate (F8) influenced the final pH of the formulation, which became neutral (pH 7.1). Moreover, it was observed that at neutral pH (F8) or by addition of 5% (w/w) soybean oil (F10 and F11), the color of the preparation quickly turned to yellow during storage at 6 °C. Up to now, this phenomenon is not clarified. Nevertheless, it was suggested that the pH could play an important role on the stability of the different ingredients of the formulations developed, in particular on the hyaluronic acid, which is hydrolytically degraded at basic and acidic pH (Tokita and Okamoto, 1995). Unfortunately, the incorporation of buffer salts to the present carrier had to be avoided because it was demonstrated that addition of salts induced the precipitation of hyaluronic acid (data not shown). These salts seemed to increase the ionic strength of the solution, which became quickly cloudy. Nevertheless, this problem could be solved by adjusting the pH of the final formulation with a small amount of NaOH 1 N under magnetic stirring (F11, Table 1). A stability study had to be performed to verify the stability of the formulation depending on its pH value.

Concerning the aspect of the solutions developed, all were transparent and did not present any particles in suspension. This statement confirmed the complexity of the mixture wherein all ingredients were solubilized in the hydrolipidic structures provided by the GMO-water and co-solvent systems. These compositions were characterized by homogenous gel structures.

Finally, depending on the amount of HA incorporated, most of these compositions (F5, F6, and F8–F11) presented similar syringeability properties in comparison with F2. This observation could certainly be explained by their similar viscosity values obtained at 100 s^{-1} (Table 3). Indeed, viscosity is reported by Adler (2012) as the only parameter from the formulation that influences its syringeability. Nevertheless, “generally accepted” limits for viscosity and associated injection force do not exist and may depend, for example on the indication and the dexterity of the patient population (Adler,

Table 2
Color, limpidity, pH and syringeability of the formulations investigated.

	Color of solutions	Clarity of solutions	pH of solutions	Syringeability ^a (N) n = 6
F1	–	Transparent	5.70	62.4 ± 1.6
F2	–	Transparent	5.65	78.1 ± 1.8
F3	–	Transparent	5.65	89.7 ± 0.8
F4	–	Transparent	5.70	142.5 ± 3.2
F5	–	Transparent	5.60	84.0 ± 0.2
F6	–	Transparent	5.55	82.1 ± 0.6
F7	–	Transparent	6.00	69.5 ± 1.0
F8	Yellow	Transparent	7.10	75.0 ± 0.5
F9	–	Transparent	5.65	79.5 ± 1.2
F10	Slightly yellow	Transparent	5.60	80.7 ± 0.6
F11	Slightly yellow	Transparent	6.50 ^b	81.2 ± 0.3
Structovial	–	Transparent	7.4	5.3 ± 0.1

^a Syringeability study was performed on the formulations developed by using 5 ml plastic syringes fitted with 21 G needles. The syringeability of the Structovial[®] was performed with the packaging of the manufacturer, which is a glass syringe fitted with a 21 G needle.

^b pH value was adjusted at 6.5 with NaOH 1 N.

Table 3
Determination of the flow behavior and viscosity of the gel formulations. Measures of shear stress were performed from 0.1 to 100 s⁻¹ as a shear rate (n = 3).

	Flow behavior	Flow behavior index "n"	Viscosity at 1 s ⁻¹ (Pa s)	Viscosity at 100 s ⁻¹ (Pa s)
F1	Pseudo-plastic	0.32 ± 0.01	15.9 ± 1.1	0.67 ± 0.01
F2	Pseudo-plastic	0.21 ± 0.01	47.7 ± 2.6	1.18 ± 0.004
F3	Pseudo-plastic	0.13 ± 0.005	94.5 ± 2.9	1.65 ± 0.02
F4	Pseudo-plastic	0.09 ± 0.01	184.4 ± 4.6	2.20 ± 0.08
F5	Pseudo-plastic	0.20 ± 0.01	48.1 ± 6.5	1.11 ± 0.06
F6	Pseudo-plastic	0.23 ± 0.004	40.0 ± 0.2	1.06 ± 0.01
F7	Pseudo-plastic	0.23 ± 0.005	35.7 ± 0.9	0.95 ± 0.005
F8	Pseudo-plastic	0.19 ± 0.01	57.4 ± 1.8	1.29 ± 0.01
F9	Pseudo-plastic	0.10 ± 0.02	67.4 ± 5.9	1.14 ± 0.01
F10	Pseudo-plastic	0.11 ± 0.03	63.4 ± 2.2	1.15 ± 0.01
F11	Pseudo-plastic	0.10 ± 0.05	63.8 ± 3.9	1.12 ± 0.01
Structovial [®]	Pseudo-plastic	0.439 ± 0.005	5.5 ± 0.3	0.65 ± 0.02

2012). As reported in Table 3, formulations F5, F6, and F8 exhibited similar viscosity and pseudoplasticity, defined by the flow behavior index *n*. The 3 formulations had a similar composition as F2. The gel formulations were characterized by pseudoplastic flow behavior: their viscosity decreased with an increasing rate of shear stress. This particularity of pseudoplastic fluids explained the suitable syringeability values reported in Table 2, despite the high viscosity at rest of the formulations. This observation could be important regarding the ease of the product's injection into the patients.

Nevertheless, the syringeability of the developed formulations was directly dependent on the amount of incorporated HA. The higher the concentration of HA, the higher was the force required to apply to the plunger of the syringe filled with the formulation to assure a given displacement rate (Table 2). Indeed, the formulations containing 5 mg/g (F1) and 15 mg/g (F4) of HA showed a syringeability of 62.4 ± 1.6 N and 142.5 ± 3.2 N, respectively (Table 2). As reported previously, this observation could be easily explained by the increase of the viscosity of the formulation that depended on the concentration of HA. Indeed, formulations F1–F4, which contained 5, 7.5, 10 and 15 mg/g of HA, respectively, were characterized by increasing viscosity values at 1 s⁻¹ and 100 s⁻¹ as a function of the increased concentration of HA (Table 3). For instance, viscosity values obtained at 1 s⁻¹ and 25 °C were 15.9 Pa s and 184.4 Pa s for formulations F1 and F4, which contained 5 mg/g and 15 mg/g of HA, respectively.

The addition of soybean oil instead of PG (F9, F10 and F11) seemed to result in a slight increase in the viscosity of the formulation. Indeed, viscosity values obtained at 1 s⁻¹ and 25 °C were 47.7 Pa s and 63.4 Pa s for formulations F2 and F10, which contained 5% (w/w) of soybean oil. Nevertheless, as reported by the flow behavior index *n* value in Table 3, the addition of soybean oil to the preparation seemed to increase its pseudoplasticity. Indeed, *n* values decreased from 0.21 to 0.11 for F2 and F10, respectively.

This observation could explain the similar syringeability properties of both formulations reported in Table 2, despite the higher viscosity value at 1 s⁻¹ of formulation F10. Indeed, syringeability values obtained with formulations F2 and F10 were 78.1 ± 1.8 N and 80.7 ± 0.6 N, respectively.

Nevertheless, the syringeability property obtained with the marketed product (Structovial) was considerably lower in comparison with the data obtained for the GMO gel formulations (Table 2). For instance, syringeability of F2 was higher than that of the marketed product, Structovial[®], 78.1 ± 1.8 N vs. 5.3 ± 0.1 N, respectively (Table 2). This observation could be explained by two parameters. Firstly, the viscosity value of 5.5 ± 0.3 Pa s obtained at 1 s⁻¹ and 25 °C with Structovial[®] was considerably lower (Table 3). Secondly, the syringeability study of the Structovial[®] was performed with the packaging of the manufacturer, which is a glass syringe with a smaller cross sectional area of the plunger that is reported as providing an influence on the syringeability properties (Adler, 2012). Given the considerable difference in the syringeability values obtained for Structovial[®] and the GMO gel formulations, it was decided to test the formulation F2 and the Structovial[®] with the same glass syringe fitted with needle from 21 to 23 G (Table 4).

In these new conditions, the syringeability value obtained with formulation F2 with glass syringes fitted with a 21 G needle was 19.7 ± 0.3 N. As reported in Table 4, it significantly improved the syringeability of the developed formulation regardless of the

Table 4
Comparison of the syringeability of marketed product Structovial[®] and the developed formulation F2 in glass syringes fitted with needles from 21 to 23 G (n = 6).

	21 G needle	22 G needle	23 G needle
F2	19.7 ± 0.3	21.8 ± 0.7	24.0 ± 0.5
Structovial	5.3 ± 0.1	5.6 ± 0.2	5.9 ± 0.1

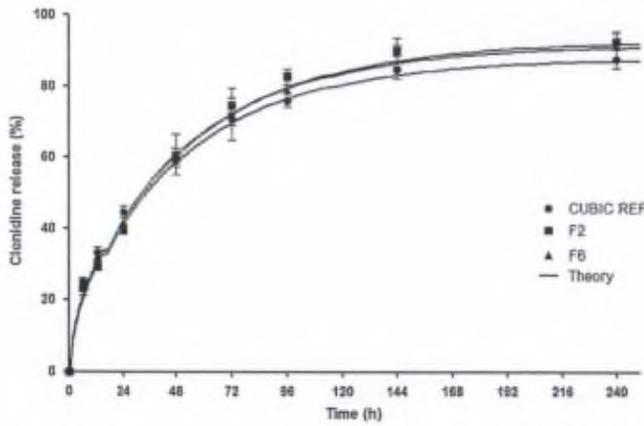


Fig. 1. In vitro release of clonidine in saline phosphate buffer (pH 7.40) at 50 rpm and 37 °C from formulations F2 (■), F6 (▲), and CUBIC REF (●), containing 225 μg/g, 675 μg/g, and 225 μg/g, respectively ($n=3$ for F6 and $n=9$ for F2 and CUBIC REF). The symbols represent the experimentally measured results (mean, SD), the curves the fitted theory (Eq. (2)).

needle used. Indeed, the force required to displace the plunger was significantly decreased ($p < 0.05$) from 78.1 ± 1.8 N to 19.7 ± 0.3 N using the plastic and the glass syringe fitted with a 21 G needle, respectively.

Nevertheless, despite the considerable difference in the syringeability values of Structovial® and GMO gel formulations, a syringeability value about 20 N seemed to be acceptable for a parenteral injection (Adler, 2012).

In addition to the syringeability, also the formulation's drug release kinetics is of utmost importance. Recently, Réeff et al. (2012) reported controlled CLO release from a formulation containing 225 μg/g CLO, 7.5 mg/g HA, 10% ET, 20% PG, 55% GMO and 15% water (F2) during 1 week. The filled squares in Fig. 1 illustrate the experimentally measured drug release rate from this system in phosphate saline buffer pH 7.4. One of the major aims of the present study was to significantly prolong the drug release period in order to reduce administration frequency. For reasons of comparison, the filled circles in Fig. 1 show CLO release from a previously reported cubic phase formulation (CUBIC REF). As it can be seen, drug release was similar in both cases ($f_2 = 68.5$). However, the cubic phase reference formulation exhibited much poorer syringeability than F2 (Shah et al., 2001; Ouedraogo et al., 2008; Réeff et al., 2012). In an attempt to decrease the drug release rate, the CLO loading of the formulation was increased from 225 to 675 μg/g (F2 vs. F6). As it can be seen in Fig. 1, the resulting relative drug release rate was almost unaffected by this change in formulation ($f_2 = 71.0$).

In order to better understand the underlying drug release mechanisms from these formulations, a mechanistically realistic mathematical model was fitted to the experimentally measured CLO release kinetics. The model is based on the assumption that drug diffusion through the in situ formed gel is the dominant mass transport step. Considering the given initial and boundary conditions (initial homogeneous drug distribution within the system, perfect sink conditions throughout the experiment, restriction of mass transfer to one dimension), Fick's second law of diffusion can be solved using the method of Laplace transformation, leading to the following equation (Vergnaud, 1993):

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \sum_{n=0}^{\infty} \frac{8}{(2 \cdot n + 1)^2 \cdot \pi^2} \cdot \exp\left(-\frac{(2 \cdot n + 1)^2 \cdot \pi^2}{4 \cdot L^2} \cdot D \cdot t\right) \quad (2)$$

where M_t and M_∞ represent the absolute cumulative amounts of CLO released at time t and infinite time, respectively. L denotes the height of the gel, and D is the apparent diffusion coefficient

Table 5

Similarity factors and apparent drug diffusion coefficients D calculated from the CLO release profiles obtained with the different formulations.

	f_2 factor values (compared to F2)	Apparent drug diffusion coefficients D (10^{-6} cm ² /s) $n=3$
F1	<u>42.5</u>	1.78 ± 0.56
F2	-	1.19 ± 0.12 ($n=9$)
F3	73.9	1.28 ± 0.10
F4	67.4	1.25 ± 0.05
F6	71.0	1.23 ± 0.24
F7	<u>37.3</u>	2.13 ± 0.25
F8	57.9	1.66 ± 0.18
F9	50.7	1.09 ± 0.02
F10	<u>26.0</u>	0.75 ± 0.06 ($n=9$)
F11	<u>31.6</u>	0.90 ± 0.11 ($n=9$)
CUBIC REF	68.5	1.25 ± 0.14 ($n=9$)

Underlined values are formulations that presenting a release profile of CLO that was significantly different compared to that obtained for F2.

of the drug within the system. The programming language C++ (Code:Blocks 10.05) was used for model implementation.

The curves in Fig. 1 show the fittings of Eq. (2) to the experimental results. Clearly, good agreement was obtained in all cases (coefficient of determination $R^2 > 0.99$), indicating that drug diffusion indeed seems to play a major role in these gels. Based on these calculations, the apparent diffusion coefficient of CLO in the systems could be determined: D (in 10^{-6} cm²/s) = 1.19 ± 0.12 , 1.25 ± 0.14 and 1.23 ± 0.24 for F2, CUBIC REF and F6, respectively (Table 5).

Since drug diffusion through the gel is likely to be of importance, increasing HA concentrations in the formulation could be expected to decrease the resulting CLO release rate: the higher the HA concentration, the denser the polymer network and, thus, the less mobile are the drug molecules. Fig. 2 shows that this strategy at least partially worked out: the HA concentration in the formulation was varied from 5 to 7.5, 10 and 15 mg/g (F1–F4). As it can be seen, the CLO release rate was highest at the lowest HA concentration. The release profiles of formulations F1 and F2 are significantly different ($f_2 = 42.5$). However, no significant differences were observed between F2, F3 and F4 ($f_2 = 73.9$ and 67.4 when comparing F2 with F3 and F2 with F4, respectively). Thus, other effects (e.g., cubic phase formation by GMO) are likely to play a more important role than the degree of HA chain entanglement. Looking at the curves (theory, Eq. (2)) and symbols (experimental results) in Fig. 2, it becomes obvious that the underlying drug release mechanisms

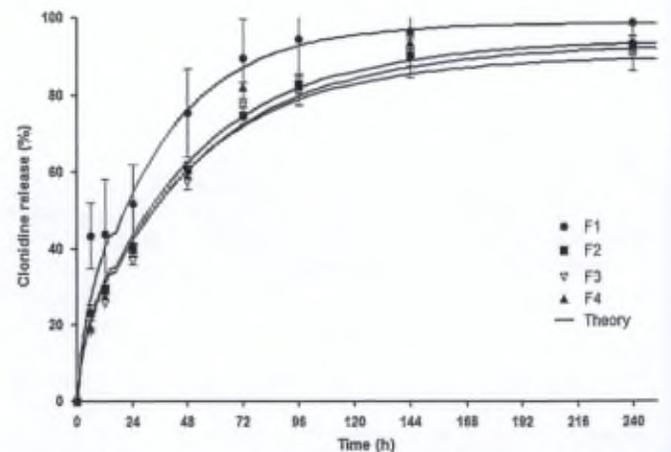


Fig. 2. In vitro release of clonidine in saline phosphate buffer (pH 7.40) at 50 rpm and 37 °C from formulations F1 (●), F2 (■), F3 (△) and F4 (▲) containing 5 mg/g, 7.5 mg/g, 10 mg/g and 15 mg/g of sodium hyaluronate, respectively ($n=3$). The symbols represent the experimentally measured results (mean, SD), the curves the fitted theory (Eq. (2)).

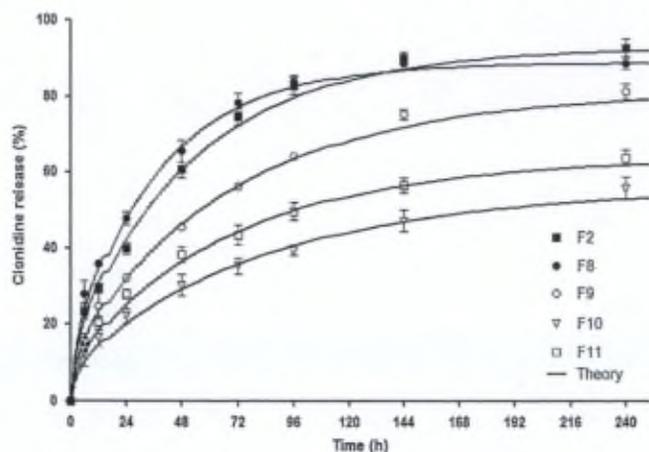


Fig. 3. In vitro release of clonidine in saline phosphate buffer pH 7.40 at 50 rpm and 37 °C from formulations F2 (■) and F8 (●) in the absence or presence of 0.3% (w/w) of sodium oleate, respectively ($n=3$) and formulations F2 (■), F9 (○) and F10 (△) containing 0% (w/w), 2.5% (w/w), 5% (w/w) of purified soybean oil instead of PG, respectively ($n=9$). Formulation F11 (□) contains 5% (w/w) of purified soybean oil instead of PG and has a pH value adjusted at 6.5, in contrast to formulations F2, F9 and F10 with pH values about 5.7 ($n=9$). The symbols represent the experimentally measured results (mean, SD), the curves the fitted theory (Eq. (2)).

were not significantly affected by these changes in HA concentration (coefficient of determination $R^2 > 0.95$). The apparent diffusion coefficient of CLO within the gels was found to be equal to 1.78 ± 0.56 , 1.19 ± 0.12 , 1.28 ± 0.10 and $1.25 \pm 0.05 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ for F1, F2, F3 and F4, respectively (Table 5). This is consistent with the above discussed significant effect of increasing the HA concentration from 5 to 7.5 mg/g, but non-significant effect of further increasing the HA concentration to 10 and 15 mg/g.

The addition of co-solvents to such in situ forming gels was recently shown to be highly efficient to provide injectable systems with suitable rheological properties and syringeability. Indeed, as reported in Table 2, increasing the PG concentration from 20% to 40% (w/w) (F2 and F7) reduced the injection force required under the given experimental conditions from 78.1 ± 1.8 to $69.5 \pm 1.0 \text{ N}$. Moreover, it was recently demonstrated that the concentration of the co-solvent plays an important role in the sustained-release properties of the formulation (Réeff et al., 2012). This is consistent with the observations in this study: The CLO release rate significantly increased when adding 40.0% (w/w) PG (F7) (data not shown, $f_2 = 37.3$ when compared to F2, which contained only 20.0% PG). Also, the determined apparent diffusion coefficient of CLO significantly increased (from 1.19 ± 0.12 to $2.13 \pm 0.25 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$, F2 vs. F7, Table 5). This phenomenon can at least partially be explained by faster water penetration into the system (Réeff et al., 2012).

In order to significantly decrease the release rate of CLO from the investigated formulations, other FDA-approved inactive ingredients, namely sodium oleate (which can form insoluble complexes with many drugs such as propranolol and gentamycin (Chang and Bodmeier, 1997; Ouedraogo et al., 2008)) and purified soybean oil were added. The idea was to render the system more lipophilic and potentially affect the penetration of water and the formation of crystalline phase structures (Shah and Paradkar, 2007).

Fig. 3 shows the influence of the addition of sodium oleate or purified soybean oil and their concentration on the release profile of CLO. The influence of the pH value of formulation F10 on the release profile of CLO was also evaluated (F11).

As it can be seen, the incorporation of 0.3% sodium oleate (F8) did not significantly affect the clonidine release rate ($f_2 = 57.9$, when compared with F2). Importantly, adding higher amounts of purified soybean oil to the formulation (2.5 and 5%, respectively) resulted in a significant decrease in the CLO release rate (F9 and F10 in

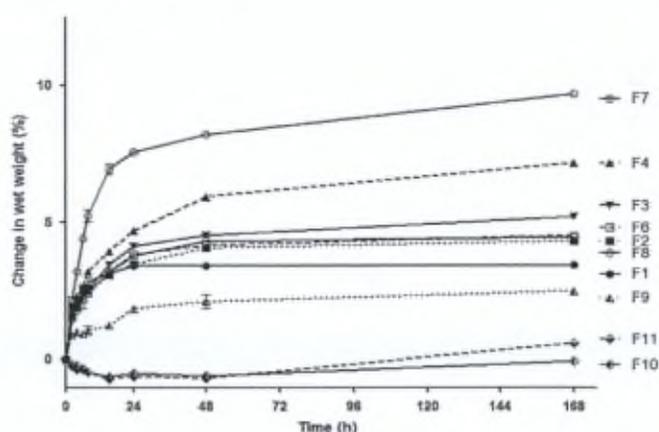


Fig. 4. Changes in the formulations wet weight upon exposure to saline phosphate buffer pH7.40 at 37 °C; mean, SD ($n=6$).

Fig. 3) ($f_2 = 50.7$ and 26 when comparing F2 with F9 and F10, respectively). Interestingly, the underlying drug release mechanism did not seem to be significantly affected, as indicated by the good agreement between the curves and symbols in Fig. 3 (theory and experiment) (coefficient of determination $R^2 > 0.99$). The apparent diffusion coefficients of CLO were determined to be equal to 1.09 ± 0.02 and $0.75 \pm 0.06 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ for F9 and F10, compared to $1.19 \pm 0.12 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ for F2.

Moreover, and in good agreement with previously reported results, the pH value of the formulation slightly affected the release rate of CLO. When increasing the pH value of the formulation from 5.7 to 6.5 (F10 vs. F11), CLO release was slightly (but not significantly, $f_2 = 57.3$) faster (Fig. 3). This phenomenon might at least partially be attributed to an increased degree of HA ionization at pH 6.5, resulting in more pronounced polymer chain repulsion and, thus, increased mesh size and increased drug mobility.

When further increasing the amount of soybean oil [e.g., 10% (w/w)], HA precipitated during the preparation steps and early disintegration occurred immediately after immersion, leading to a burst release of the drug (data not shown). This observation could certainly be explained by the formation of a highly hydrophobic and unstructured gel due to an inappropriate GMO/oil ratio. This seemed to avoid the complete solubilization of HA, which is a hydrophilic compound and to hinder the in situ gelling process, leading both to an increase in the drug release rate.

In order to further characterize the systems and dynamic changes in their composition upon exposure to the release medium (e.g., the water uptake capacity of the gel formulations), their wet weight was monitored (Fig. 4). Clearly, the addition of 2.5 and 5% soybean oil (F9 and F10, respectively) significantly reduced the increase in wet weight (and partially even led to a temporary decrease in wet weight for the formulations F10 and F11 containing 5% soybean oil). This can at least partially be attributed to the higher lipophilicity of the systems, resulting in reduced water uptake. The lower water contents compared to the other investigated formulations are consistent with the lower observed CLO release rates.

According to the results obtained for the syringeability/rheological properties and release studies, formulation F10 was selected as the most suitable candidate and its rheological properties were compared with the marketed product, Structovial® and the synovial fluid (Fig. 5 and Table 6). For a higher efficiency the formulation must exhibit comparable rheological behavior as the synovial fluid of the knee, Mazzucco et al. (2002) and Fam et al. (2007) have shown that these fluids develop a crossover between the storage modulus G' and the loss modulus G'' at a frequency equal to $0.41 \pm 0.12 \text{ Hz}$. Below this frequency, the synovial fluid has a predominantly viscous function ($G'' > G'$), which means that

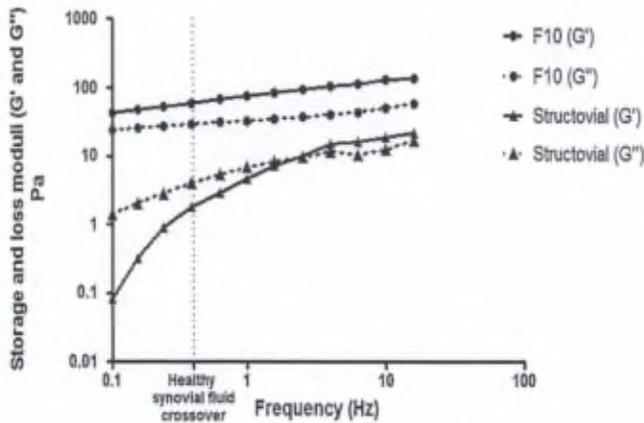


Fig. 5. Rheological properties of the selected formulation, F10 (●), and the marketed product, Structovial® (▲). Storage modulus (G') and loss modulus (G'') are represented by continuous and dotted lines, respectively.

Table 6
Rheological properties of the selected formulation, F10 in comparison with Structovial® and healthy synovial fluid.

	Storage modulus (G') at 2.5 Hz (Pa)	Loss modulus (G'') at 2.5 Hz (Pa)	Crossover
Healthy synovial fluid ^a	117 ± 13	45 ± 8.2	Yes
F10	88.6 ± 9.0	32.7 ± 2.7	No
Structovial	14.6 ± 5.6	15.0 ± 7.3	Yes

^a As reported by Balazs (1974).

the joint is strongly lubricated when the patient is at rest. While above 0.41 Hz, the synovial fluid has a predominantly elastic function ($G' > G''$), which highlight the ability of the fluid to absorb the impacts when the patient runs or jumps (Mazzucco et al., 2002; Fam et al., 2007). Moreover, an evaluation of viscoelastic properties of the gel formed upon contact with the saline phosphate buffer at 25 °C and 37 °C was performed (Fig. 6).

In contrast to Structovial®, the selected formulation possesses storage and loss moduli much closer to the synovial fluid (Table 6). These characteristics of the developed formulation could be important concerning the efficiency of the treatment. Indeed, it was suggested that the weak activity of the marketed product in restoring the mechanical integrity of the joint (Scale et al., 1994; Bellamy et al., 2006b) and its short half-life in the damaged joint after injection (Brown et al., 1991; Scale et al., 1994) is a consequence of its low viscosity and low moduli (Table 3 and Fig. 5).

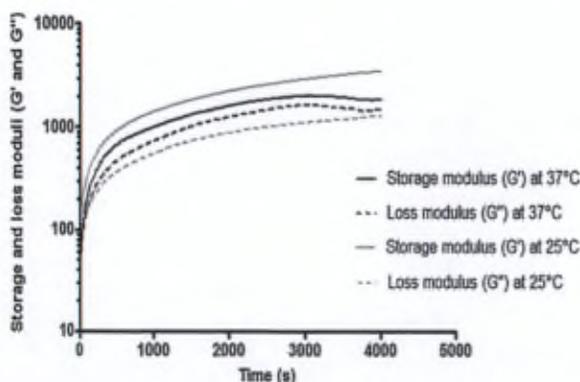


Fig. 6. Rheological properties of the selected formulation, F10, after contact with saline phosphate buffer pH 7.40 at 25 and 37 °C as a function of time. The storage modulus (G') and loss modulus (G'') are represented by continuous and dotted lines, respectively.

In contrast to the synovial fluid, the developed formulation did not present any crossover; the structure of the gel was conserved in the range of frequencies studied (Fig. 5). This behavior guaranteed that the structure of an elastic gel, able to strongly absorb impacts, will be kept when the patient is at rest or in movement.

As a consequence, it was assumed that these observations could be important for increasing the residence time of the formulation in the damaged joint. In contrast to marketed products used for the treatment of OA, such as Structovial®, the presented formulation F10 could be a suitable substitute for synovial fluid by restoring the mechanical integrity of the joint immediately after injection. Moreover, these rheological properties, represented by G' and G'' values, strongly increased after contact with saline phosphate buffer pH 7.40 at 25 °C and 37 °C (Fig. 6). This gelification process could play an important role for the protection of HA against enzymatic degradation. Indeed, it was assumed that enzymatic activity of hyaluronidase could be inhibited by the high viscosity of the in situ forming gels.

In order to evaluate the safety and efficiency of the developed formulations, it was suggested to perform an in vivo study on rabbits, which seemed to be the most appropriate animal model for this kind of intraarticular formulations. This in vivo study is expected to start as soon as possible.

4. Conclusion

The formulation containing 30% (w/w) co-solvents [split into 10% (w/w) ethanol and 20% (w/w) PG] 7.5 mg/g HA, 15% (w/w) water and 55% (w/w) GMO appears to be a suitable delivery system. Indeed, it presents marked pseudoplastic behavior that allows relatively fast injection through a narrow needle, followed by an increase in viscosity upon contact with aqueous fluids such as physiological fluids to obtain an in situ sustained release of clonidine. Moreover, this composition provides a release profile of CLO for about one week that is similar to a very viscous cubic reference system. Nevertheless, the replacement of 5% of PG with purified soybean oil allows the sustained release properties of clonidine from the formulation to be improved. Indeed, this kind of composition provides an in vitro release profile of clonidine over a few weeks. These promising results can probably be attributed to an increase in the hydrophobicity of the formulation. Moreover, the presented composition assures suitable syringeability and rheological properties that are close to those of healthy synovial fluid.

References

- Adler, M., 2012. Challenges in the development of pre-filled syringes for biologics from formulation scientist's point of view. *Am. Pharm. Rev.* 15, <http://www.americanpharmaceuticalreview.com/Featured-Articles/38372-Challenges-in-the-Development-of-Pre-filled-Syringes-for-Biologics-from-a-Formulation-Scientist-s-Point-of-View/>
- Balazs, E.A., 1974. The physical properties of synovial fluid and the special role of hyaluronic acid. In: Helfet, A. (Ed.), *In Disorders of the Knee*. T.B. Lippincott Company, Philadelphia, pp. 63–75.
- Bastianelly, et al., 2009. Pharmaceutical composition for use in the treatment or prevention of osteoarthritic diseases. Patent: WO 2009/101210.
- Bellamy, N., Campbell, J., Welch, V., Gee, T.L., Bourne, R., Wells, G.A., 2006a. Intra-articular corticosteroid for treatment of osteoarthritis of the knee. *Cochrane Database Syst. Rev.*, <http://dx.doi.org/10.1002/14651858.CD005328.pub2>, Art. No.: CD005328.
- Bellamy, N., Campbell, J., Welch, V., Gee, T.L., Bourne, R., Wells, G.A., 2006b. Viscosupplementation for the treatment of osteoarthritis of the knee. *Cochrane Database Syst. Rev.*, <http://dx.doi.org/10.1002/14651858.CD005321.pub2>, Art. No.: CD005321.
- Brown, T.J., Laurent, U.B.G., Fraser, J.R.E., 1991. Turnover of hyaluronan in synovial joints: elimination of labeled hyaluronan from the knee joint of the rabbit, experimental. *Physiology* 76, 125–134.
- Buckwalter, J.A., Martin, J.A., 2006. Osteoarthritis. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 58, 150–167.

- Burckbuchler, V., Mekhloufi, G., Paillard Giteau, A., Grossiord, J.L., Huille, S., Agnely, F., 2010. Rheological and syringeability properties of highly concentrated human polyclonal immunoglobulin solutions. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 76, 351–356.
- Chang, C.M., Bodmeier, R., 1997. Effect of dissolution media and additives on the drug release from cubic phase delivery systems. *J. Control. Release* 46, 215–222.
- Engstrom, S., 1990. Drug delivery from cubic and other lipid-water phases. *Lipid Technol.* 2, 42–45.
- Fam, et al., 2007. Rheological properties of synovial fluids. *Biorheology* 44, 59–74.
- Gentili, M., Juhel, A., Bonnet, F., 1996. Peripheral analgesic effect of intra-articular clonidine. *Pain* 64, 593–596.
- Gerwin, N., Hops, C., Lucke, A., 2006. Intraarticular drug delivery in osteoarthritis. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 58, 226–242.
- Kroschwitz, J.I., 1990. Polymers: polymer characterization and analysis. *Rheol. Meas.* 63, 7–725.
- Larsen, C., Ostergaard, J., Larsen, S.W., Jensen, H., Jacobsen, S., Lindegaard, C., Andersen, P.H., 2008. Intra-articular depot formulation principles: role in the management of postoperative pain and arthritic disorders. *J. Pharm. Sci.* 97, 4622–4654.
- Lavelle, W., Lavelle, E.D., Lavelle, L., 2007. Intra-articular injections. *Anesthesiol. Clin.* 25, 853–862.
- Mazzucco, D., et al., 2002. Rheology of joint fluid in total knee arthroplasty patients. *J. Orthop. Res.* 20, 1157–1163.
- Nielsen, L.S., Schubert, L., Hansen, J., 1998. Bioadhesive drug delivery systems. I. Characterization of mucoadhesive properties of systems based on glyceryl monooleate and glyceryl monolinoleate. *Eur. J. Pharm. Sci.* 6, 231–239.
- Ouedraogo, M., Semdé, R., Some, I.T., Traore, R., Guisson, L.P., Evrard, B., Henschel, V., Dubois, J., Amighi, K., 2008. Monooleine-water liquid crystalline gels of gentamicin as bioresorbable implants for the local treatment of chronic osteomyelitis: in vitro characterization. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 34, 753–760.
- Réeff, J., Gaignaux, A., Goole, J., De Vriese, C., Amighi, K., 2012. New sustained-release intraarticular gel formulations based on monoolein for local treatment of arthritic diseases. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 39, 1731–1741.
- Sarzi-Puttini, P., Cimmino, M.A., Scarpa, R., Caporali, R., Parazzini, F., Zaninelli, A., Atzeni, F., Canesi, B., 2005. Osteoarthritis: an overview of the disease and its treatment strategies. *Semin. Arthritis Rheum.* 35, 1–10.
- Scale, D., Wobig, M., Wolpert, W., 1994. Viscosupplementation of osteoarthritic knees with hylan: a treatment schedule study. *Curr. Therap. Res.* 55, 220–232.
- Shah, V.P., Tsong, Y., Sathe, P., Liu, J.-P., 1998. In vitro dissolution profile comparison – statistics and analysis of the similarity factor f_2 . *Pharm. Res.* 15, 889–896.
- Shah, J.C., Sadhale, Y., Chilukuri, D.M., 2001. Cubic phase gels as drug delivery systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 47, 229–250.
- Shah, M.H., Paradkar, A., 2007. Effect of HLB of additives on the properties and drug release from the glyceryl monooleate matrices. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 67, 166–174.
- Rowe, R.C., Sheskey, P.J., Owen, S.C., 2006. Handbook of Pharmaceutical Excipients, vol. 30, fifth ed., pp. 6–307.
- Sullivan, A.F., Dashwood, M.R., Dickenson, A.H., 1987. Alpha-2-adrenoreceptor modulation of nociception in rat spinal cord: location, effects and interactions with morphine. *Eur. J. Pharmacol.* 138, 169–177.
- Symmons, D., Mathers, C., Pflieger, B., 2006. Global Burden of Osteoarthritis in the Year 2000 [Online]. World Health Organization (WHO). Available at: <http://www.who.int/entity/healthinfo/statistics/bod.osteoarthritis.pdf> (accessed 19.07.12).
- Ghosh, T.K., Jasti, B.R., 2004. Parenteral routes of delivery. In: Theory and Practice of Contemporary Pharmaceutics, first ed. CRC Press, USA, pp. 387–423.
- Tokita, Y., Okamoto, A., 1995. Hydrolytic degradation of hyaluronic acid. *Polym. Degrad. Stabil.* 48, 269–273.
- U.S. Food and Drug Administration (FDA), 2012. Database of Inactive Ingredients for Approved Drug Products, Available at: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/iig/> (accessed 19.07.12).
- Uthman, I., Raynauld, J.-P., Haraoui, B., 2003. Intra-articular therapy in osteoarthritis. *Postgrad. Med. J.* 79, 449–453.
- Vergnaud, J., 1993. Controlled Drug Release of Oral Dosage Forms. Ellis Horwood Limited, Chichester.

the 1990s, the number of people in the UK who are aged 65 and over has increased from 10.5 million to 13.5 million (19.5% of the population).

There is a growing awareness of the need to address the needs of older people, and the Government has set out a strategy for doing so in the White Paper on *Ageing Better* (Department of Health 1999). This paper sets out the following objectives:

- (i) to improve the health and well-being of older people;
- (ii) to improve the opportunities for older people to live independently and to participate in society;
- (iii) to improve the opportunities for older people to live in their own homes;
- (iv) to improve the opportunities for older people to live in their own communities.

The White Paper also sets out a number of key principles which should guide the development of policies and services for older people:

- (i) to support older people to live independently and to participate in society;
- (ii) to support older people to live in their own homes;
- (iii) to support older people to live in their own communities;
- (iv) to support older people to live in their own families;
- (v) to support older people to live in their own countries.

The White Paper also sets out a number of key actions which should be taken to achieve these objectives:

- (i) to improve the health and well-being of older people;
- (ii) to improve the opportunities for older people to live independently and to participate in society;
- (iii) to improve the opportunities for older people to live in their own homes;
- (iv) to improve the opportunities for older people to live in their own communities.

The White Paper also sets out a number of key actions which should be taken to achieve these objectives:

- (i) to improve the health and well-being of older people;
- (ii) to improve the opportunities for older people to live independently and to participate in society;
- (iii) to improve the opportunities for older people to live in their own homes;
- (iv) to improve the opportunities for older people to live in their own communities.

The White Paper also sets out a number of key actions which should be taken to achieve these objectives:

- (i) to improve the health and well-being of older people;
- (ii) to improve the opportunities for older people to live independently and to participate in society;
- (iii) to improve the opportunities for older people to live in their own homes;
- (iv) to improve the opportunities for older people to live in their own communities.

The White Paper also sets out a number of key actions which should be taken to achieve these objectives:

- (i) to improve the health and well-being of older people;
- (ii) to improve the opportunities for older people to live independently and to participate in society;
- (iii) to improve the opportunities for older people to live in their own homes;
- (iv) to improve the opportunities for older people to live in their own communities.