



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A.MIRA-BEJAIA
Faculté de Technologie
Département de Génie des Procédés
Laboratoire des Matériaux Organiques (LMO)

THÈSE

Présentée par

BOURICHE Sihem

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR EN SCIENCES

Filière : Génie des Procédés

Option : Génie des Polymères

Thème

**Optimisation des paramètres d'encapsulation d'un antidiabétique
(chlorhydrate de metformine) dans du polylactide (PLA), étude de la
cinétique de libération in vitro et in-vivo**

Soutenue le : 29/07/2021

Devant le Jury composé de :

Nom et Prénom	Grade		
Mr FATMI Sofiane	MCA	Univ. de Béjaïa	Président
Mr REZGUI Farouk	Professeur	Univ. de Bejaïa	Rapporteur
Mr DAOUD Kamel	Professeur	Univ. de USTHB	Examinateur
Mr HADJSADOK Abdelkader	Professeur	Univ. de Blida 1	Examinateur
M ^{me} BENAHMED DJILALI Adiba	MCA	Univ. de MMTO	Examinatrice
Mr KEBIECHE Mohamed	MCA	Univ. de Batna 2	Examinateur

Année Universitaire : 2020/2021

Dédicace

Je dédie ce travail de thèse :

A mes parents,

A mes frères et sœurs,

A mes collègues.

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier tout particulièrement mon directeur de thèse, Monsieur **Farouk REZGUI**, professeur à l'Université de Béjaïa pour m'avoir intégrée dans son équipe de recherche, de la confiance qu'il m'a accordée en me proposant ce thème. Je le remercie infiniment pour ses nombreux conseils, remarques et suggestions qui m'ont permis d'améliorer constamment la qualité de ce travail ainsi que pour la gentillesse et la patience qu'il a manifestée à mon égard durant cette thèse.

Je remercie sincèrement les membres du Jury d'avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse : monsieur **Sofiane FATMI**, MCA à l'université de Bejaïa, pour avoir accepté d'être président du jury. Monsieur **Kamel DAOUD**, professeur à l'université USTHB, monsieur **Abdelkader HADJSADOK**, professeur à l'université de Blida 1, Madame **Adiba BENAHMED DJILALI**, maître de conférences classe A à l'université UMMTO et monsieur **Mohamed KEBIECHE**, maîtres de conférences classe A à l'université de Batna 2 qui ont examiné ce travail. Je les remercie tous pour leurs remarques constructives qui ont permis d'améliorer sensiblement la qualité de ce manuscrit.

Un grand merci également à María Luisa González-Rodríguez et Antonio María Rabasco Álvarez, de m'avoir accueilli au sein du laboratoire de pharmacie et technologies pharmaceutiques (Séville, Espagne) et de m'avoir aidée au quotidien dans ce travail de recherche. Je suis très reconnaissante du temps que vous m'avez consacré et l'aide précieuse non seulement dans l'expérimentation, mais aussi dans la discussion des résultats. Je les remercie des échanges souvent riches que nous avons eus au cours des réunions ou des discussions et la rédaction de mes articles ; elle a vraiment su me transmettre une partie de sa passion pour la recherche.

Je tiens également à remercier les doctorants ou autres membres du laboratoire pour votre accueil et votre gaieté au quotidien qui ont rendu mon séjour au laboratoire si agréable : Ana, Sergio, Nabila, Vicente, Gloria, Marta, Mari belle, Mazen, Edouardo. Je vous remercie pour toutes les pauses-café partagées et pour tous les moments passés ensemble.

Aux Dr Emilio Fernández-Varón et Carlos M. Cárceles-Rodríguez, Antonio Vicente Penalver et à Angela Alonso-García de la faculté de médecine vétérinaire de l'université de Murcie (Espagne), je vous remercie de votre accueil et votre collaboration à la réalisation des tests in vivo.

À tous mes collègues et membres du laboratoire LMO passés et présents avec qui j'ai passé de bons moments. Merci aussi à tous les masters de passage que je n'ai pas cités mais qui contribuent à l'esprit joyeux du laboratoire.

... Et tous ceux que j'ai oublié de citer !

Enfin, un grand merci du fond du cœur à mes proches, et plus particulièrement à mes parents et à Sabrina et Abd Rahim qui m'ont toujours aidé, soutenu et supporté tout au long de ces années.

Sommaire

Sommaire

Liste des tableaux	i
Liste des figures	ii
Introduction générale	1

Chapitre I : Synthèse bibliographiques

I.1 Définition et physiopathologie du diabète type II	6
I.2 Les traitements de diabète type II	7
I.3 La metformine	7
I. 3.1 Origine	7
I. 3.2 Structure et propriétés physico-chimiques	8
I. 3.3 Mécanisme d'action	9
I. 3.4 Caractéristiques pharmacocinétiques	10
I. 3.5 Administration de la metformine	10
I. 4 Les systèmes à libération prolongée	11
I.4.1 Les microparticules	12
I.4.1.1 Définition et morphologies	12
I.4.1.2 Préparation de microparticules	13
I.4.1.3 Microencapsulation par double émulsion	14
I.4.1.3.1 Principe de la double émulsion	14
I.4.1.3.2 Tensioactifs utilisés	15
I.4.1.3.3 Polymères utilisés en W/O/W	16
I.4.2 Mécanismes de libération à partir des microparticules polymères	18
I.4.2.1 Modèle d'ordre 0	19
I.4.2.2 Modèle d'Ordre 1	19
I.4.2.3 Modèle d'Higuchi	19
I.4.2.4 Modèle de Korsmeyer et Peppas (loi puissance)	20
I.4.3 Choix d'un modèle mathématique	20
I.5 La metformine et ses formulations par microencapsulation	20
Références bibliographiques	30

Chapitre II : Matériels et méthodes

II.1 Matériels	46
II.1.1 Principe Actif : chlorhydrate de metformine	46
II.1.2 Polymères	46
II.1.3 Les tensioactifs	46
II.1.3.1 Tween® 80	46
II.1.3.2 Span 20	46
II.1.3.3 Span 80	47
II.1.3.4 Polyvinylique Alcool (PVA)	47
II.1.4 L'héparine sodique	47
II.1.5 Solvants et produits chimiques	47
II.2 Méthodes	47
II.2.1 Élaboration des microparticules	47
II.2.1.1 Modélisation et optimisation par les plans d'expériences	49
II.2.1.1.1 Introduction	49
II.2.1.1.2 Choix des paramètres et du plan d'expérience	50
II.2.1.1.3 Construction du plan d'expériences	51
II.2.1.2 Étude de formulation des particules de PLA co-stabilisées par des bio polymères	53
II.2.2 Caractérisation des microparticules	53
II.2.2.1 Détermination de l'efficacité d'encapsulation	53
II.2.2.2 Mesure de la taille des microparticules	54
II.2.2.3 Mesure du potentiel zêta	55
II.2.2.4 Microscopie Électronique à Balayage (MEB)	55
II.2.2.5 Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (IRTF)	56
II.2.2.6 Analyse calorimétrique différentielle (DSC)	56
II.2.2.7 Diffraction des Rayons X (DRX)	57
II.2.3 Études de libération <i>in vitro</i> de la metformine encapsulés dans les microparticules	57
II.2.4 Étude pharmacocinétique des microparticules de metformine chez des lapins	58
II.2.4.1 Préparation des animaux	59
II.2.4.2 Protocole expérimental	59

II.2.4.3 Analyse du plasma	60
II.2.4.4 Analyse pharmacocinétique	61
II.2.4.5 Analyse statistique des résultats	61
Références bibliographiques	62

Chapitre III : Résultats et discussions

Partie 1. Optimisation des paramètres d'encapsulation par les plans d'expériences

III.1.1 Introduction	64
III.1.2 Sélection du couple de surfactants approprié	64
III.1.3 Optimisation et modélisation par les plans d'expériences	66
III.1.3.1 Estimation graphique des effets principaux et les interactions	68
III. 1.3.1.1 Taux d'encapsulation	68
III. 1.3.1.2 La taille des microparticules	70
III. 1.3.1.3 Le potentiel zeta	71
III.1.3.2 Analyse par les surfaces de réponses	73
III.1.3.2.1 Taux d'encapsulation	73
III.1.3.2.2 Tailles des microparticules	76
III. 1.3.2.3 Potentiels zêtas	78
III.1.3.3 Analyse statistique des coefficients du modèle	79
III.1.3.3.1 Analyse de la variance ANOVA pour le taux d'encapsulation	80
III.1.3.3.2 Analyse de la variance ANOVA pour la taille	81
III.1.3.3.3 Analyse de la variance ANOVA pour le potentiel zêta	82
III.1.3.4 Détermination des modèles mathématiques	83
III.1.3.5 Validation des modèles	83
III.1.3.5.1 Analyse du manque d'ajustement (Recherche de biais)	84
III.1.3.5.2 Coefficient de détermination (R^2)	85
III.1.3.6 Optimisation des paramètres de préparation et leurs validations.	85
III.1.4 Caractérisation des microparticules obtenues aux conditions optimales	86
III.1.4.1 Microscopie électronique à balayage	86
III.1.4.2 Diffraction aux Rayons X (DRX)	89
III.1.4.3 Analyse par (DSC)	90
III.1.5. Évaluations <i>in vitro</i> des microparticules de PLA contenant la metformin	91

III.1.6. Étude pharmacocinétique de la metformine à partir des microparticules du PLA	94
a. Administration intraveineuse	96
b. Administration orale de metformine en solution	97
c. Administration orale de metformine encapsulée	98
d. Étude comparative du processus d'absorption de la metformine par voie orale (en solution et encapsulée)	98
III.1.7 Conclusion	100

**Partie 2 : Influence des bio-polymères sur les propriétés des microparticules et
étude de la cinétique de la libération résultantes**

III.2.1 Introduction	102
III.2.2 Étude morphologique des microparticules	102
III.2.3 Analyse granulométrique et potentiel zêta des particules	105
III.2.4 Caractérisation des microparticules par diffraction des rayons X	108
III.2.5 Analyse thermique des microparticules par DSC	110
III.2.6 Caractérisation des microparticules par Spectroscopie Infra-Rouge (IR)	112
III.2.7 Efficacité d'encapsulation	114
III.2.8 Étude de la cinétique de libération	115
III.2.9 Modélisation des profils de dissolution	120
II.2.10 Conclusion	124
références bibliographiques	125
Conclusions générales et perspectives	134
Annexe	

Tableau 1. Les tensioactifs utilisés dans la méthode de double émulsion évaporation du solvant

Tableau 2. Exemples des polyesters utilisés en micro-encapsulation par la méthode de double émulsion évaporation de solvant

Tableau 3. Pourcentages et tensioactifs utilisés lors des essais préliminaires

Tableau 4. Niveaux des paramètres d'élaboration des microparticules

Tableau 5. Matrice du plan d'expérience de Box Behnken en variables codées

Tableau 6. Résultats expérimentaux de l'efficacité d'encapsulation (Y1), de la taille des microparticules (Y2) et le potentiel zêta (Y3)

Tableau 7. Analyse de la variance et des paramètres statistiques du modèle estimés par le logiciel JMP 7 pour l'efficacité d'encapsulation (Y1)

Tableau 8. Analyse de la variance et des paramètres statistiques du modèle estimés par le logiciel JMP 7 pour la taille des microparticules (Y2)

Tableau 9. Analyse de la variance et des paramètres statistiques du modèle estimés par le logiciel JMP 7 pour le potentiel zêta (Y3)

Tableau 10. Validation du modèle Mathématique pour : l'efficacité d'encapsulation (Y1), taille des microparticules (Y2) et potentiel zêta (Y3)

Tableau 11. Concentrations plasmatiques moyennes de la metformine après administrations de metformine en solution par voie intraveineuse (sol IV), orale (sol orale) et sous forme de microparticules (MPs orale) à des lapins (Moyenne \pm SD, ug/ml), (n=5)

Tableau 12. Paramètres pharmacocinétiques (PK) de la metformine après administration intraveineuse (IV) de metformine pure en solution, administration orale de metformine pure en solution ou sous forme de microparticules de PLA. La dose unique administré est de 5 mg metformine / kg (moyenne \pm SD) (n=5)

Tableau 13. Caractéristiques des microparticules obtenues avec différentes concentrations en bio polymère MC et HPMC, après séchage

Tableau 14. Quantité de metformine résiduel (QR) dans les microparticules au bout de 24 heures (%)

Tableau 15. Les coefficients de corrélation (R^2) et les paramètres d'ajustement obtenus à partir de modèles mathématiques d'ordre zero, ordre 1, Higuchi et Korsmeyer-Peppas pour la libération de la metformine à partir des microparticules E6-E10

Figure 1. Structure des médicaments ayant un motif guanidine

Figure 2. Structure chimique de chlorhydrate de metformine

Figure 3. Photographies obtenues par microscopie électronique à balayage (MEB) représentant : A. Microsphère B. Microcapsule

Figure 4. Schématisation des mécanismes de libération d'un principe actif encapsulé dans un polymère. (a) Diffusion à travers les pores, (b) Diffusion à travers le polymère et (c) Erosion

Figure 5. Schéma des différentes étapes de préparation des microparticules par double émulsion / évaporation de solvant

Figure 6. Chromatogramme obtenu par HPLC pour la metformine dans le plasma du lapin

Figure 7. Observation au microscope électronique à balayage des microparticules préparés avec Span[®] 80/Tween[®] 80 (Barre d'échelle =500,100 µm)

Figure 8. Observation au microscope électronique à balayage des microparticules préparés avec le Span[®] 80/PVA (Barre d'échelle =500,100 µm)

Figure 9. Diagramme des effets principaux sur l'efficacité d'encapsulation moyenne

Figure 10. Diagramme des interactions des paramètres sur l'efficacité d'encapsulation moyenne

Figure 11. Diagramme des effets principaux sur la taille moyenne des microparticules

Figure 12. Diagramme des interactions des paramètres sur la taille moyenne des microparticules

Figure 13. Diagramme des effets principaux sur le potentiel zêta moyen des microparticules

Figure 14. Diagramme des interactions des paramètres sur le potentiel zêta des microparticules

Figure 15. Surface de réponses en 3 dimensions montrant l'influence de : (A) la quantité de metformine (mg) et Concentration de PVA (% p/v), (B) la quantité de metformine le pH de la phase aqueuse externe et (C) vitesse d'agitation Concentration de PVA (% p/v) sur l'efficacité d'encapsulation

Figure 16. Surface de réponses en 3 dimensions montrant l'influence de: (A) Quantité de metformine (mg) et pH de la phase aqueuse, (B) Quantité de metformine (mg) Concentration de PVA (% p/v), (C) Vitesse d'agitation (r.p.m.) et pH de la phase aqueuse sur la taille moyenne des microparticules

Figure 17. Surface de réponses en 3 dimensions montrant l'influence de : (A) la quantité de metformine et le pH de la phase aqueuse, (B) concentration du PVA et le pH de la phase aqueuse sur le potentiel zêta des microparticules

Figure 18. Conditions optimales obtenues par le modèle pour la préparation des microparticules

Figure 19. Observations au microscope électronique à balayage : (a) chlorhydrate de metformine pure, (b) microparticules placebo, (c) microparticules PLA metformine (formulation optimum)

Figure 20. Diagrammes de diffraction des rayons X du (a) metformine, (b) PLA, (c) mélange physique metformine -PLA et de la (d) formulation optimum

Figure 21. Courbes DSC du (a) metformine, (b) PLA, (c) mélange physique metformine -PLA et de la (d) formulation optimum

Figure 22. Profils de libération in vitro de la metformine pure sans membrane de dialyse (A) et à partir de la membrane de dialyse (B).

Figure 23. Profils de libération in vitro de la metformine pure (A) et des microparticules du PLA (formulation optimum, B)

Figure 24. Évolution de la concentration plasmatique en metformine au cours du temps après administration intraveineuse (IV) de metformine en solution, administration orale de metformine en solution ou sous forme de microparticules de PLA. La dose unique administré est de 5 mg metformine / kg (n=5)

Figure 25. Observations au microscope électronique à balayage des microparticules préparées avec différentes concentrations du MC

Figure 26. Observations au microscope électronique à balayage des microparticules préparées avec différentes concentrations du l'HPMC.

Figure 27. Courbes de distribution de taille en DLS des microparticules préparées avec MC (E1-E5)/ HPMC (E6-E10) à différentes concentration

Figure 28. Potentiel Zêta des différentes microparticules préparées avec différents concentrations de MC (E1-E5) et l'HPMC (E6-E10)

Figure 29. diffractogrammes de rayon X de la metformine pure (a), PLA pur (b), microparticules préparées avec le MC (c) et le HPMC (d)

Figure 30. Thermogrammes DSC de la metformine pure (a), PLA pur (b), microparticules préparées avec le MC (c) et l'HPMC (d)

Figure 31. Spectres IRTF de la metformine pure (a), PLA pur (b), microparticules préparées avec le MC (E1-E5) et le HPMC (E6-E10)

Figure 32. Efficacité d'encapsulation de la metformine en fonction de la concentration du MC et le HPMC

Figure 33. Profils de libération de la metformine à partir de microparticules préparées en présence de la MC E1-E5

Figure 34. Profils de libération de la metformine à partir de microparticules à différentes concentrations en HPMC

Figure 35. Comparaison des profils de libérations de la metformine à partir de microparticules préparées avec la MC (E1-E5) et l'HPMC (E6-E10)

Figure 36. Thermogrammes DSC des formulations préparées avec le MC (E5) et le HPMC (E10) après 24h de test de dissolution

Figure 37. Images MEB des microparticules de PLA chargées en metformine préparées avec le MC (A) et le HPMC (B) après 24h de test de dissolution

Figure 38. Représentations graphiques des cinétiques de libération selon les modèles d'ordre zéro (A), de premier ordre (B), de Higuchi (C), Korsmeyer-Peppas (D), et de Hixson-Crowell (E) appliqués à notre résultats

Introduction générale

I. Introduction

Le diabète de type 2 (DT2) est une des maladies les plus importantes dans le monde aussi bien par l'augmentation de son incidence, sa prévalence et de sa mortalité. Il s'agit d'un problème de santé prioritaire qui est motivé par le fait que le DT2 est une cause de décès majeure dans la plupart des pays du monde (**Atlas, 2019**). Le traitement médicamenteux consiste en l'administration par voie orale de la metformine et reste à ce jour l'un des antidiabétiques le plus utilisé en thérapeutique comme première ligne dans le traitement de la DT2.

La metformine est une molécule à faible masse moléculaire (165,62 g/mol) (**Pharmacopée Européenne, 2008**), possède une charge cationique et une forte solubilité aqueuse dans l'intervalle de pH de 1,2 - 6,8 (**Hernández et al., 2015**). En raison de ses propriétés physico-chimiques, la metformine est peu absorbée au niveau du tractus gastro-intestinal (TGI) lui conférant une très faible biodisponibilité orale. Ce traitement nécessite l'administration des doses multiples afin de maintenir une concentration suffisante sur le plan thérapeutique, ce qui engendre des effets indésirables importants (**Bouchoucha et al., 2011**).

L'administration de principes actifs par voie orale est la plus répandue et une des mieux acceptée par les patients, notamment lorsqu'un traitement prolongé est nécessaire. Elle présente plusieurs intérêts comme l'accroissement du confort du patient au moment de l'administration, simplicité du traitement, et amélioration de la sécurité du traitement pour le patient (**Ahadian et al., 2020**). Cependant, lors du passage dans le tractus gastro-intestinal, certaines molécules sont dégradées par les enzymes du tractus digestif (**Wong et al., 2018**), d'autres molécules présentent des propriétés physico-chimiques (grande solubilité et faible perméabilité) qui limitent leur absorption par la muqueuse digestive et ne parviennent pas en quantité suffisante à la circulation sanguine afin d'exercer leur effet pharmacologique.

L'une des stratégies pharmaceutiques utilisée pour améliorer l'efficacité des médicaments hydrophiles est leur encapsulation dans des matrices polymériques selon un procédé déterminé. La matrice polymérique permet d'augmenter la durée de vie, modifie la cinétique de libération du principe actif et son élimination, de réduire les doses administrées, limiter les effets secondaires, favoriser son absorption au niveau de la barrière intestinale, et constituer des systèmes de libération prolongée et contrôlée. En

effet, la libération contrôlée permet de maîtriser la vitesse et le site de libération des molécules actives. Dans le cas de principes actifs hydrophiles tels que la metformine, la libération prolongée vise à diminuer leurs effets secondaires et améliorer sa biodisponibilité (George et al., 2019).

De nombreuses études ont été consacrées à l'encapsulation de la metformine dans des polymères biodégradables afin de réduire ses effets indésirables et d'augmenter sa biodisponibilité. Plusieurs polymères ont été utilisés à cet effet, on peut citer l'éthyle cellulose (Patel et al., 2006 ; Choudhury et al., 2009), le poly hydroxybuterate co valerate (Farago et al., 2008), l'eudragit (Ghodake et al., 2010 ; Hassan et al., 2013) et les alginates de sodium (Masarady et al., 2011).

Des recherches menées au laboratoire des matériaux organiques ont été réalisées sur l'encapsulation de la metformine dans une matrice de PLA (Bouriche, 2013). Le travail présenté dans cette thèse constitue la continuité de ces études. L'objectif proposé dans ce travail s'agit d'étudier et de caractériser des microparticules à base d'un polyester de l'acide lactique PLA obtenues par la méthode de double émulsion, destinées à permettre une libération prolongée de la metformine après administration par voie orale. L'optimisation de quelques paramètres de production est réalisée par des plans d'expérience. Des essais de libération in vitro et in vivo de la metformine à partir des microparticules sont réalisés.

La difficulté rencontrée lors de l'élaboration des microparticules de PLA est d'obtenir une libération du PA efficace et qui répond aux besoins d'une administration orale. Cette problématique est traitée par l'ajout de bio-polymères comme co-tensioactifs afin de modifier la structure des microparticules et améliorer la libération de la metformine.

Le premier chapitre de cette thèse est consacré à une mise au point bibliographique qui expose des généralités relatives sur le diabète de type 2 et ses traitements notamment avec la metformine. Les propriétés de la metformine et les contraintes de son administration par voie orale. Puis, nous présentons l'intérêt de l'utilisation des systèmes à libération prolongée. En particulier, nous définirons la forme microparticule, les méthodes de préparation, une attention particulière est portée sur la microencapsulation par la méthode de double émulsion évaporation de solvant. Les mécanismes et profils de libération du principe actif à partir des microparticules

polymères et une modélisation mathématique des cinétiques de libération ont été détaillés. Les différents travaux antérieurs réalisés sur la metformine seront présentés.

Dans **le deuxième chapitre**, seront présentées toutes les informations relatives aux produits et protocoles expérimentaux utilisés dans ce travail. Nous présenterons les caractéristiques des matériaux utilisés, la procédure expérimentale d'élaboration des microparticules de PLA chargées en metformine, la stratégie du travail expérimental d'optimisation des paramètres de préparation des microparticules par la méthodologie des plans d'expérience. Les techniques et les protocoles expérimentaux de caractérisations utilisées seront décrits.

Le troisième chapitre a pour objectif la présentation des différents résultats expérimentaux.

La première partie du troisième chapitre est focalisée sur une étude préliminaire de préparation des microparticules, l'influence de différents paramètres de préparation des microparticules de PLA et leurs optimisations par la méthode des plans d'expériences. L'encapsulation de la metformine dans le PLA a été mise en évidence par la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier et l'efficacité d'encapsulation a été évaluée par dosage en chromatographie HPLC. La caractérisation de microparticules élaborées et les matières pures a été menée en utilisant différentes techniques de caractérisation notamment la Zétamétrie, la DLS, la diffraction des rayons X (DRX), la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IR-TF), l'analyse calorimétrique différentielle (DSC), et la microscopie électronique à balayage (MEB). Des tests de libération de la metformine à partir des microparticules de PLA dans des milieux physiologiques ont été réalisés.

La seconde partie du troisième chapitre est consacrée à la formulation des microparticules en présence des biopolymères comme co tensioactifs conçue pour la metformine. L'HPMC et le MC sont utilisés pour la préparation des microparticules. Les microparticules ont été caractérisées du point de vue de leur efficacité d'encapsulation, de taille, et de la charge de la surface et aussi caractérisées par différentes techniques (DRX, IRTF, MEB). L'influence de la HPMC et le MC sur la libération *in vitro* de la metformine et sa modélisation par application de plusieurs modèles mathématiques ont été étudié.

Enfin, on termine ce manuscrit par une conclusion générale et quelques perspectives de ce travail.

Références bibliographiques

Ahadian, S., Finbloom, J. A., Mofidfar, M., Diltemiz, S. E., Nasrollahi, F., Davoodi, Khadem hosseini, A. (2020). Micro and nanoscale technologies in oral drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*.

Atlas, D. (2019). International diabetes federation. *IDF diabetes atlas*. Brussels: International Diabetes Federation.

Bouchoucha, M., Uzzan, B., Cohen, R. (2011). Metformin and digestive disorders. *Diabetes & metabolism*, 37(2), 90-96.

Bouriche, S. (2013). Encapsulation de la metformine dans des polymères biodégradables. Mémoire de magister, université de Bejaia.

Choudhury, P.K., Kar, M. (2009). Controlled release metformin hydrochloride microspheres of ethyl cellulose prepared by different methods and study on the polymer affected parameters. *Journal of Microencapsulation*, 26 (1), 46-53.

Farago, P. V., Raffin, R. P., Pohlmann, A. R., Guterres, S. S., Zawadzki, S. F. (2008). Physicochemical characterization of a hydrophilic model drug-loaded PHBV microparticles obtained by the double emulsion/solvent evaporation technique. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 19 (7), 1298-1305.

George, A., Shah, P. A., Shrivastav, P. S. (2019). Natural biodegradable polymers based nano-formulations for drug delivery: A review. *International journal of pharmaceutics*, 561, 244-264.

Ghodake, J.D., Vidhate, J.S., Shinde, D.A., Kadam, A.N. (2010). Formulation and evaluation of floating microsphere containing anti-diabetic (metformin hydrochloride) drug. *International journal of pharmaceutical technology research*, 2, 378-384

Hasan, I., Paul, S., Akhter, S., Ayon, N. J., Reza, M. S. (2013). Evaluation and optimization of influence of permeability property and concentration of polymethacrylic polymers on microspheres of metformin HCl. *Dhaka University Journal of Pharmaceutical Sciences*, 12 (2), 131-141.

Hernández, B., Pflüger, F., Kruglik, S. G., Cohen, R., & Ghomi, M. (2015). Protonation–deprotonation and structural dynamics of antidiabetic drug metformin. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 114, 42-48.

Masareddy, R. S., Bolmal, U. B., Patil, B. R., Shah, V. (2011). Metformin HCl loaded sodium alginate floating microspheres prepared by ionotropic gelation technique: Formulation, evaluation and optimization. *Evaluation and Optimization: Indian Journal of Novel Drug Delivery*, 125-133.

Patel, A., Ray, S., Thakur, R. A. M. S. (2006). In vitro evaluation and optimization of controlled release floating drug delivery system of metformin hydrochloride. *DARU 14 Pharmacopée Européenne 6eme édition*, 2008

Wong, C. Y., Al-Salami, H., Dass, C. R. (2018). Microparticles, microcapsules and microspheres: a review of recent developments and prospects for oral delivery of insulin. *International journal of pharmaceutics*, 537 (1-2), 223-244.

Chapitre I.
Synthèse bibliographique

I.1 Définition et physiopathologie du diabète type II

Le diabète un véritable enjeu de santé publique constitue une des affections chroniques les plus fréquentes classé parmi les dix causes du décès des adultes dans le monde (Saeedi et al., 2020). C'est une maladie chronique en pleine expansion, selon un rapport récent de la Fédération International du Diabète, plus de 463 millions de personnes dans le monde souffrent de diabète, et les perspectives estiment que ce nombre augmentera à près de 700 millions d'ici 2045 (Williams et al., 2020).

Le diabète de type 2 (DT2) est l'un des types de diabète sucré le plus répandu avec une incidence croissante dans le monde entier, représente plus de 90 % de tous les cas et affecte généralement les adultes (Saeedi et al., 2019). Il est associé très souvent à l'obésité et représente plus de 80 % des sujets diabétiques.

D'un point de vue diagnostique, le diabète de type 2 dite aussi non insulino-dépendant est une affection métabolique définie par une hyperglycémie caractérisée par des taux de glucose dans le sang dépassant les seuils définis par l'OMS (David et Boinet., 2018 ; ADA, 2020):

- une glycémie supérieure ou égale à 126 mg/d L après un jeûne de 8 heures vérifiée à deux reprises ;
- une glycémie supérieure ou égale à 200 mg/d L 2 heures après une charge orale de 75 g de glucose (oral glucose tolerance test, OGTT) avec la présence de symptômes de diabète (polyurie, polydipsie, amaigrissement, et parfois par une polyphagie et des troubles de vision)
- ou un taux d'hémoglobine glyquée H1C $\geq 6,5$ % (11,1 mmol/l) quantifié selon des méthodes des références internationales.

Les éléments physiopathologiques du DT2 comprennent une résistance accrue des tissus périphériques (foie, muscles) à l'action de l'insuline, une insuffisance de sécrétion d'insuline par les cellules β du pancréas, une sécrétion de glucagon inappropriée, ainsi qu'une diminution de l'effet des incrétines, hormones intestinales stimulant la sécrétion post-prandiale de l'insuline (ADA, 2020).

Le diabète de type 2 entraîne des complications tel que l'acidocétose, néphropathie, neuropathie, rétinopathie, maladies cardiovasculaires, responsable de l'accroissement de la mortalité non seulement dans les pays développés, mais aussi dans les pays en développement (Nyane et al., 2017).

I.2 Les traitements de diabète type II

Le traitement du diabète type II fait appel à différents médicaments administrés par voie orale, dans le cas de l'échec d'activité physique et les mesures hygiéno-diététiques pour rétablir l'équilibre glycémique. Des molécules tel que les biguanides, les sulfamides hypoglycémiant, les glinides (répaglinide les méglitinides), les inhibiteurs des alpha glucosidases et les glitazones sont utilisée depuis plusieurs décennies séparément ou combiné (Pillon et al., 2014 ; Scheen, 2015). Deux nouvelles classes thérapeutiques ont été rajoutées, il s'agit des analogues du glucagon (GLP1) et des inhibiteurs de l'enzyme dipeptidyl peptidase 4 (DPP4) (Philippe, 2009). Nous aborderons ici le traitement médicamenteux constitué par les biguanides essentiellement la metformine qui est considérée comme un traitement de première ligne.

I.3 La metformine

I.3.1 Origine

Les biguanides sont des dérivés de l'alcaloïde galéguine, la substance active de *galéga officinalis*, également connue sous le nom du lilas français possède diverses vertus thérapeutiques (Daugan, 2016). En médecine traditionnelle, elle est utilisée pour le traitement de l'épilepsie et la fièvre (Bailey et Day, 2004 ; He et Wondisford , 2015). En Europe, des préparations à base des extraits de la plante *G. officinalis* ont été prescrites pour traiter la polyurie, la soif et d'autres symptômes du diabète sucré depuis le Moyen Âge. Dans les années 1900, la guanidine a été identifiée comme base organique responsable de l'effet hypoglycémiant de l'extrait de *G officinalis*. Vue la toxicité de la guanidine pour les applications cliniques, l'isoamyline guanidine est utilisée comme agent antidiabétique jusqu'au développement de la metformine et la phenformine (Romero et al., 2017).

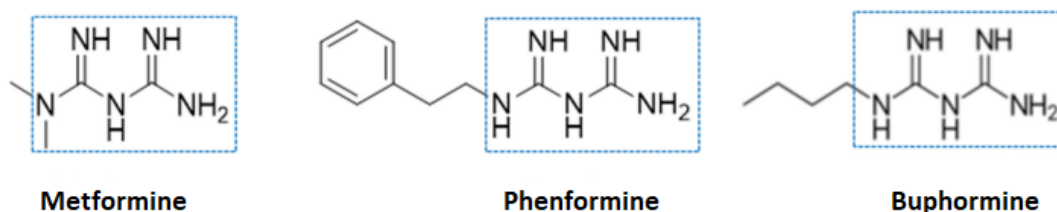


Figure 1. Structure des médicaments ayant un motif guanidine (Barbieri et al., 2019)

La phenformine (Figure 1) est utilisée dans le traitement du diabète puis retirée du marché à la fin des années 1970 à cause de sa toxicité élevée fréquemment des accidents d'acidose lactique mortels (**Bailey, 2017**).

Malgré la découverte de son effet hypoglycémiant dans les années 1920s, ce n'est qu'en 1949, que l'intérêt pour la metformine a été ravivé lorsque un médecin français a observé des effets abaissantes du glucose de la «flumamine», une formulation contenant du diméthylguanide utilisée pour le traitement de la grippe aux Philippines (**Vallianou et al., 2019**). La commercialisation de la metformine comme agent anti hyperglycémiant oral pour le traitement du diabète s'est produite pour la première fois au Royaume-Uni en 1958 (**Daugan, 2016**). L'utilisation de la metformine était relativement sûre, après quelques années de son utilisation clinique en Europe, le médicament a été approuvé pour être utilisé au Canada en 1972 et aux États-Unis en 1995 (**Maniar, et al., 2017**). L'association américaine du diabète (American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes) et l'association européenne pour l'étude du diabète le recommandent maintenant comme traitement oral initial pour les patients atteints de diabète type 2 (**Romero et al., 2017**).

I.3.2 Structure et propriétés physico-chimiques

La formule brute de la metformine est $C_4H_{11}N_5 \cdot HCl$ et sa masse molaire est 165,63 g/mol. C'est une molécule obtenue par condensation de deux molécules de guanidine avec élimination d'ammoniac d'où son nom chimique 'Chlorhydrate de 1,1-diméthyle-biguanide' (Figure 2). La metformine se présente sous forme d'une poudre blanche caractérisée par une température de fusion de 220-225°C. C'est une molécule très hydrosoluble (>300 mg/ml à 25°C), et pratiquement insoluble dans l'acétone, l'éther et dans le chlorure de méthylène (chloroforme) (**Roselet et Kumari, 2019**). Cette molécule appartient à la classe III du système de classification biopharmaceutique (biopharmaceutics classification system : BCS) dû à sa grande solubilité dans l'eau et sa faible perméabilité intestinale (**Cheng et al., 2004**).

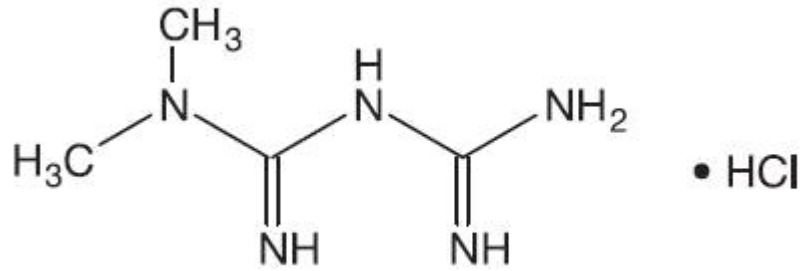


Figure 2. Structure chimique de chlorhydrate de metformine

La metformine est dotée d'un comportement basique ($pK_a=11,5$ et $2,9$). Dans les formes galéniques orales, il est généralement présent sous une forme d'un sel de chlorhydrate, qui à des pH physiologique existe sous forme d'espèce cationique (Roselet and Kumari, 2019 ; Hernández et al., 2015).

I.3.3 Mécanisme d'action

La metformine est l'unique médicament de la classe des biguanides utilisé comme première ligne pour le traitement du diabète DT2. Cette molécule possède des effets anti hyperglycémiant, réduit la glycémie basale et postprandiale. Elle ne stimule pas la sécrétion d'insuline et ne provoque pas d'hypoglycémie. La metformine agit par l'intermédiaire de trois mécanismes ; au niveau du foie, elle contribue à la réduction de la production de glucose par inhibition de la néoglucogenèse et de la glycogénolyse, stimulation de la synthèse intracellulaire du glycogène. Au niveau du muscle squelettique l'effet anti-hyperglycémiant réside dans l'amplification de la sensibilité à l'insuline en favorisant la captation et l'utilisation périphérique du glucose. Enfin, la metformine retarde l'absorption intestinale du glucose (Tielmans et al., 2006).

I.3.4 Caractéristiques pharmacocinétiques

Après administration orale, la metformine est absorbée dans la partie supérieure du tractus digestive (petit intestin) ayant une demi-vie biologique courte (1,5 à 1,6 h). Sa biodisponibilité orale varie de 40 à 60 % (Papanas et Maltezos, 2009 ; Nanjwade et al., 2011). Elle est rapidement distribuée après son absorption, ne se lie pas aux protéines plasmatiques, et subit une excrétion rénale sans identification de métabolite ou de conjugué (Scheen, 1996).

I.3.5 Administration de la metformine

L'administration des médicaments par voie orale constitue le mode d'administration le plus simple et le plus largement employé grâce à son confort d'utilisation et à la facilité d'administration ou encore sa capacité à contenir de grandes quantités en PA. Afin d'atteindre sa cible et promouvoir son effet pharmacologique, le principe actif doit être absorbé au niveau du tractus gastro-intestinal et entrer en quantité suffisante au niveau de la circulation systémique (**Fox et al., 2015**). Cependant, cette phase d'absorption à travers le TGI est un processus complexe qui dépend à la fois des paramètres physiologiques (pH, présence d'enzymes, motilité intestinale) et des propriétés physicochimiques du principe actif (solubilité, poids moléculaire, perméabilité et facteurs de formulation).

En effet, pour être absorbée par voie orale, les molécules doivent, dans un premier temps, être solubilisées dans le liquide gastro-intestinal. Une fois solubilisée et dispersée, les molécules doivent, dans un second temps, franchir la barrière épithéliale soit en traversant les cellules (passage transcellulaire) soit en passant entre les cellules (passage paracellulaire). Ainsi, des molécules de petite taille passent plus facilement que des molécules de grande taille.

La metformine chlorhydrate est une molécule hydrophile positivement chargée, la perméation de l'épithélium digestif apparaît comme particulièrement difficile : il s'agit, selon la littérature, du facteur limitant son absorption. En plus, elle présente une grande hydrosolubilité dans les milieux physiologiques, ce qui induit une excrétion de façon rapide, par voie urinaire. Pour assurer une concentration plasmatique efficace, la metformine est administrée régulièrement et la posologie recommandée est de 3 g par jour (**Bouchoucha et al., 2011**). Cependant cette consommation journalière conduit à des effets indésirables notamment les troubles digestifs. Dans le but d'améliorer l'adhérence du patient pour son traitement, le développement de nouvelles formes galéniques est nécessaire.

Différentes stratégies galéniques sont décrites dans la littérature pour améliorer la biodisponibilité orale des principes actifs et l'une des solutions proposées consiste à élaborer des systèmes à libération prolongée par encapsulation dans un polymère (**Mancer et al., 2018; Raza et al., 2020**).

I.4 Les systèmes à libération prolongée

La libération prolongée de principe actif à partir de systèmes polymériques pour une administration orale est une approche très intéressante. Les systèmes à libération prolongée sont des formulations innovantes élaborées pour palier aux problèmes liées aux médicaments classiques. De tels systèmes offrent plusieurs avantages comparativement au médicament conventionnel, à savoir :

- **Réduction des effets toxiques potentiels du médicament.** De nombreuses thérapies utilisent des molécules toxiques, en particulier dans le traitement du cancer. Pour assurer l'efficacité thérapeutique du principe actif, il est néanmoins nécessaire d'administrer une quantité importante de médicament et/ou de répéter la dose requise pour obtenir l'efficacité souhaitée, ce qui peut provoquer des effets indésirables liés à la toxicité de la molécule. La libération prolongée permet une diminution du nombre de doses et améliore le confort du patient (**Montané et al., 2020**);
- **Vectorisation ciblée du principe actif.** Certain principe actif tel que la cisplatine présente une efficacité limitée due à sa faible spécificité pour le tissu tumoral ce qui provoque des effets secondaires graves lors de son utilisation. Pour être dirigé directement vers son site d'action, des vecteurs sont conçus afin de ne libérer les principes actifs (sélectivité de la libération) qu'au niveau de la cellule cible. (**Ledezma-Gallegos et al., 2020**) ;
- **Protection (stabilisation) du principe actif.** Une protection du principe actif contre l'inactivation chimique, enzymatique ou réduire leur dégradation indésirable dans l'estomac est assurée par le polymère dans le milieu physiologique et par conséquent l'amélioration de sa stabilité in vivo. Ce type de vecteurs est particulièrement intéressant pour la vectorisation des principes actifs instables dans l'environnement biologique telle que l'insuline (**Mimi et al., 2015**) ;
- **Obtention de profils pharmacocinétiques plus favorables.** La libération contrôlée d'un principe actif à une vitesse spécifique, durant une période de temps bien définie (prolongement de la durée d'action pendant des temps déterminée variant de quelques heures à plusieurs mois) obtenue par le piégeage du principe actif dans la matrice vecteur, assure le maintien de son niveau de concentration

dans la plage thérapeutique et la réduction des fluctuations de concentration en principe actif dans le sang (**Berrocso et al., 2017**).

I.4.1 Les microparticules

Bien qu'une large variété de systèmes à libération prolongée soit étudiée dans la littérature, pour l'amélioration de l'efficacité du médicament (liposome, hydrogel, micro-nanoparticule, complexe principe actif-polymère), les microparticules polymériques s'illustrent surtout pour leur stabilité depuis leur découverte. Ce sont des systèmes importants à libération prolongée de nombreuses substances actives, initialement conçues pour protéger certaines vitamines contre les réactions d'oxydation. Les microparticules ont été progressivement adaptées au fur et à mesure pour le développement de nouveaux principes actifs (anticancéreux, hormones, ...) (**Lengyel et al., 2019**).

I.4.1.1 Définition et morphologies

La microencapsulation est une technologie impliquée dans la fabrication de produits formulés utilisée par un grand nombre d'industries. Elle consiste à la préparation de particules individualisées, constituées d'un matériau enrobant contenant une ou plusieurs substances actives (solide, liquide ou volatil). Ces particules ayant une taille allant de 1 à 1000 µm et contiennent entre 5 et 90 % (en masse) de matière active (**Dubey et al., 2009**). Les microparticules peuvent renfermer plusieurs types de substances telles que les médicaments (**Takada et al., 2003 ; Vrignaud et al., 2012 ; Cosco al., 2015**), parfums, arômes, colorants, pesticides, catalyseurs de réaction chimique (**Boh et Sumiga, 2008**), microorganismes (**zajkoska et al., 2013**) et les cellules (**Rathore et al., 2013 ; Orive et al., 2015**). Ces molécules sont alors protégées de l'environnement et peuvent être libérées hors de la microparticule, pendant des temps plus ou moins longs variant de quelques heures à plusieurs mois, dans des conditions précises de pH, de température, ou d'autres contraintes spécifiques.

Les microparticules polymériques sont des petites particules solides présentant deux variétés de structures internes, en fonction de leur microstructure et sont classés en deux types : les microsphères et les microcapsules (**Nesterenko et al., 2013 ; Lengyel et al., 2019**).

- **Les microcapsules** : sont des systèmes réservoirs, sphériques composés d'une enveloppe polymérique continue entourant un cœur liquide (huileux ou aqueux), le principe actif est généralement dissous dans le cœur mais peut également être adsorbé à la surface des microcapsules. (Figure 3.A) (Nesterenko et al., 2013).
- **Les microsphères** : sont des systèmes matricielles sphériques constituées d'une matrice polymérique dans laquelle le principe actif est dispersé ou dissous durant la formation des microsphères, soit adsorbé à leur surface après préparation par l'intermédiaire de liaisons électrostatique ou covalente (Figure 3.B) (Nesterenko et al., 2013).

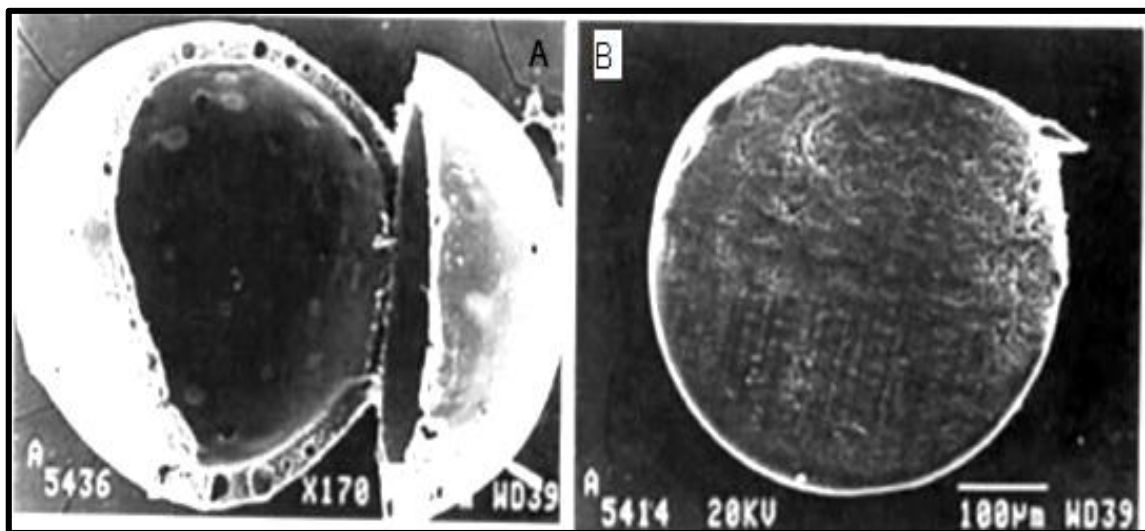


Figure 3. Photographies obtenues par microscopie électronique à balayage (MEB) représentant : A. Microsphère B. Microcapsule (Schugens et al., 1994).

L'intérêt majeur de ces particules réside dans la nature solide de la matrice enrobant (polymère) qui leur confère une grande stabilité et des propriétés performantes d'encapsulation sur les temps longs (Couvreur et al., 1995 ; Soppimath K.S., 2001).

I.4.1.2 Préparation de microparticules

Diverses méthodes de préparation des microparticules à partir de polymères préformés existent et largement décrites dans la littérature. Parmi les techniques les plus utilisées on peut citer la nanoprécipitation, émulsion/évaporation de solvants, le séchage par pulvérisation, le système d'électro-spray coaxial, la coacervation, l'enrobage en lit d'air fluidisé (Lee et al., 2016).

Choisir la méthode adéquate pour une application donnée est une étape très importante, car elle détermine les caractéristiques des particules résultantes (la taille, l'efficacité d'encapsulation). Pour une encapsulation efficace, le choix et la sélection du procédé sont basés essentiellement sur les caractéristiques physico-chimiques du principe actif utilisé notamment de sa solubilité (**Iqbal et al., 2015**), mais aussi la nature du polymère, l'utilisation prévue et la durée du traitement. La méthode de micro-encapsulation utilisée doit répondre aux exigences suivantes (**Jain, 2000**):

- La stabilité et l'activité biologique de la substance active ne doivent pas être affectées au cours du procédé d'encapsulation ou dans les microparticules (produit final).
- Le rendement de fabrication des microparticules dans la gamme de taille souhaitée et l'efficacité d'encapsulation doivent être élevés.
- La qualité des microparticules et les profils de libération de la substance active doivent être reproductibles.

L'étude faisant l'objet de ce manuscrit concerne la technique de micro-encapsulation par double émulsion évaporation de solvant qui sera détaillée dans la partie suivante.

I.4.1.3 Micro encapsulation par double émulsion

La méthode d'encapsulation par double émulsion évaporation du solvant est décrite dans de nombreuses publications (**Chong et al., 2015; Iqbal et al., 2015 ; Ding et al., 2019**). Des principes actifs hydrophiles tels que les médicaments anticancéreux, anti-inflammatoires et antibiotiques ont été encapsulés par cette méthode (**Giri et al., 2013; Iqbal et al., 2015**).

I.4.1.3.1 Principe de la double émulsion

La préparation de microparticules par le procédé d'encapsulation de double émulsion évaporation de solvant nécessite trois phases pour la formation d'une émulsion double de type eau dans huile dans eau ($E_1/H/E_2$). Cette méthode se déroule en trois étapes (**Garti et Bisperink, 1998 ; Zhao et al., 2007 ; Ye et Chi, 2018**):

- **La première étape** est la réalisation d'une émulsion relative au mélange sous agitation (agitation mécanique, sonication, ultraturax, ...etc) des phases organique (contenant le polymère dissout dans un solvant) et aqueuse interne (contenant le principe actif à encapsuler qui est dissoute ou dispersé) stabilisée grâce à un agent stabilisant (tensioactifs, moléculaires ou polymères) pour former une émulsion E_1/H .
- **La deuxième étape** concerne la dispersion de l'émulsion primaire (E_1/H) dans la phase aqueuse externe, en présence d'un tensioactif adéquat, pour former une émulsion double de type eau/huile/eau ($E_1/H/E_2$).
- **La troisième étape** durant laquelle le solvant diffuse progressivement à travers la membrane polymère en formation vers la phase aqueuse externe par gradient de concentration puis s'évapore à l'interface phase dispersante (généralement de l'eau)/air. L'évaporation du solvant peut s'effectuer sous une pression réduite, par évaporateur rotatif ou par simple agitation à la température ambiante. Lorsque le solvant s'évapore, le polymère contenu dans les gouttelettes de phase organique précipite en encapsulant le principe actif hydrosoluble. Des microparticules sont séparées par filtration ou centrifugation, lavées plusieurs fois afin d'éliminer l'émulsifiant résiduel et séchées sous vide ou lyophilisées. Les microparticules obtenues pourront être stockées sous forme de poudre ou bien re-dispersée dans une solution aqueuse (suspension).

I.4.1.3.2 Tensioactifs utilisés

L'instabilité de l'émulsion primaire entraîne la perte de gouttelettes aqueuses contenant le médicament à la phase aqueuse externe qui est la cause des faibles taux d'encapsulation (Coccoli et al., 2008 ; Ito et al., 2008). La stabilité de l'émulsion primaire (E_1/H) et secondaire ($E_1/H/E_2$) est une étape importante lors de la préparation des microparticules. Ainsi, leurs préparations fait intervenir dans leurs compositions deux tensio-actifs : l'un stabilise les films directs et l'autre les films inverses.

Les tensioactifs sont de petites molécules amphiphiles ayant des propriétés émulsifiantes utilisées pour stabiliser deux phases non miscibles et donc former une émulsion. Les tensioactifs sont largement utilisés dans la préparation de particules polymériques pour stabiliser l'émulsion, mais aussi pour améliorer les caractéristiques des particules (la taille, la forme, l'efficacité de la charge, les propriétés de surface, la stabilité colloïdale) et aussi la cinétique de libération (Molavi et al., 2020).

Les tensioactifs utilisés pour stabiliser l'émulsion primaire et secondaire lors de la préparation des microparticules par la méthode de double émulsion évaporation de solvant sont répertoriés dans le tableau 1. La stabilisation de l'émulsion primaire peut également être obtenue sans utilisation de tensioactif, et cela juste par homogénéisation à grande vitesse (Meng et al., 2003 ; Miyazaki et al., 2006 ; Zhao et al., 2007 ; Machado et Evangelista, 2010). En plus les tensioactifs cités dans le tableau 1, des polymères telle que le HPMC, MC sont utilisées comme tensioactifs ou associées dans la préparation de microparticules (Sharipova et al., 2017 ; Ydjedd et al., 2017).

Tableau 1. Les tensioactifs utilisés dans la méthode de double émulsion évaporation du solvant

Emulsion primaire	Emulsion secondaire	Références
Span 80	PVA	Beneitez et al., 2014 Cosco et al., 2015
PVA	PVA	Coccoli et al., 2008 Yang et al., 2000
Sunsoft 818H	PVA	Ito et al., 2008
Span 80	Tween 80	Maiti et al., 2010
Tween 80	PVA	Amasya el., 2016 Cózar-Bernal et al., 2011

I.4.1.3.3 Polymères utilisés en W/O/W

Différents types de polymères sont disponibles pour l'obtention des microparticules destinées à une libération prolongée de principes actifs. Les polymères synthétiques tels que le polyacide lactique (PLA), le copolymère d'acide lactique et glycolique (PLGA), la poly- ϵ -caprolactone (PCL), le polyhydroxybutyrate covalérate (PHBV), le polyméthyle méthacrylate ou naturels comme le chitosane, la gélatine et le dextrane sont généralement utilisés pour la microencapsulation. Les polymères de la famille des polyesters (PLA, PCL, PLGA) sont les plus utilisés pour la synthèse de

microparticules par double émulsion évaporation du solvant (Miladi et al., 2014). L'avantage majeur de ces polymères réside dans leurs propriétés de biodégradation et de biocompatibilité (Riekes et al., 2011; Bragagni et al., 2013). Les polyesters les plus étudiés dans l'encapsulation par la méthode de double émulsion évaporation de solvant W/O/W sont présentés dans le tableau 2 ci-dessous.

Tableau 2. Exemples des polyesters utilisés en micro-encapsulation par la méthode de double émulsion évaporation de solvant.

Polymère	PA encapsulé	Taille des particules (μm)	EE (%)	référence
PLA	rhEGF	75-131	5,9-70,9	Han et al., 2001
	Ampiciline-sodium	100-350	/	Kim et al., 1996
	Prilocine	31,8-68,3	/	Bragagni et al., 2013
PCL	Doxycycline	55,9- 76,9	20,09-81,38	Raval et al., 2014
	Lamivudine	0,454 -0,604	78-68	Tshweu et al., 2013
PHBV	Paclitaxel	0,228	34,9	Vilos et al., 2013
	Docétaxel	0,253- 0,274	28- 44	Vardhan et al., 2017
	Metformine HCl	5,46-26,24	0,85-9,76	Farago et al., 2008
	Tetracycline HCl	322-538	18-30,1	Sendilet al., 1999

I.4.2 Mécanismes de libération à partir des microparticules polymères

L'étude de la libération du principe actif à partir des microparticules est une étape importante pour évaluer les systèmes destinés à la libération prolongée d'un principe actif, par lesquels on cherche à délivrer le principe actif à une vitesse déterminée et constante, pendant une durée suffisamment longue (Costa et al., 2003; Ramteke et al., 2014). La libération des principes actifs à partir des systèmes polymériques biodégradables à base de polyesters est gouverné par deux phénomènes principaux qui sont la diffusion et la dégradation /érosion (Arifin et al., 2006 ; Fredenberg et al., 2011; Petlin et al., 2017 ; Macha et al., 2019). À partir de microparticules polymères, la libération du principe actif se produit par plusieurs mécanismes (figure 4) basés sur les phénomènes déjà mentionnés. Ces mécanismes sont: a) la diffusion à travers des pores, b) la diffusion à travers de la matrice polymérique, c) et l'érosion.

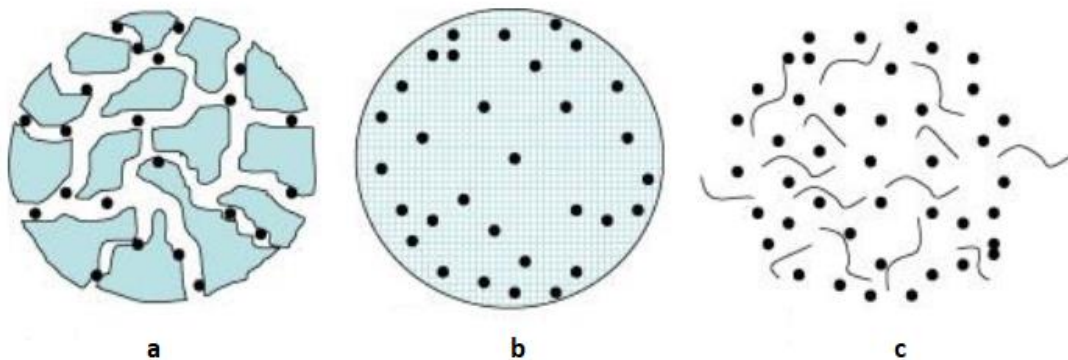


Figure 4. Schématisation des mécanismes de libération d'un principe actif encapsulé dans un polymère. (a) Diffusion à travers les pores, (b) Diffusion à travers le polymère et (c) Erosion (Fredenberg et al., 2011).

Afin de mieux comprendre les mécanismes de libération du principe actif à partir des microparticules à base de polymère, des modèles mathématiques sont appliqués pour décrire le profil de dissolution (Costa et al., 2003 ; Ramteke et al., 2014). Les principaux modèles mathématiques empiriques existents dans la littérature, utilisés pour décrire la vitesse de libération sont présentés ci-dessous (Jose et al., 2013 ; Bruschi, 2015).

I.4.2.1 Modèle d'ordre 0

Le modèle d'ordre zéro décrit les systèmes où la vitesse de libération du médicament est indépendante de sa concentration. C'est-à-dire une vitesse de libération constante au cours du temps. Le modèle d'ordre zéro se représente par l'équation suivante :

$$Q = K_0 \times t \dots \dots \dots (1)$$

Où : Q est la quantité du médicament libérée

K_0 est la constante de vitesse d'ordre zéro

t est le temps

I.4.2.2 Modèle d'Ordre 1

Ce modèle est observé dans le cas de la dissolution du médicament hydrophile à partir des formes pharmaceutiques poreuses. La fraction de dissolution est fonction du logarithme du temps, la vitesse de dissolution diminue en fonction du temps. La libération du médicament qui suit la cinétique du premier ordre peut être exprimée par l'équation ci-dessous :

$$\text{Log } Q = \text{Log } Q_0 + K_1 \times t / 2,303 \dots \dots \dots (2)$$

Avec Q_0 est la quantité initiale du médicament

K_1 = constante d'ordre 1

t = temps

I.4.2.3 Modèle d'Higuchi

Ce modèle a été proposé par Higuchi en 1961, c'est le premier modèle mathématique conçu pour décrire la libération du médicament à partir des systèmes matriciels. Le modèle est connu comme un modèle de diffusion. La fraction de libération du PA évolue linéairement en fonction de la racine carrée du temps. L'équation simplifiée du modèle d'Higuchi est donnée par l'équation suivante :

$$f_t = K_H \times \sqrt{t} \dots \dots \dots (3)$$

Où : K_H est la constante de dissolution d'Higuchi

f_t est la fraction du principe actif libérée à un temps t

I.4.2.4 Modèle de Korsmeyer et Peppas (loi puissance)

Ce modèle a été proposé en 1983 par Korsmeyer et Peppas pour décrire les mécanismes de libération des systèmes polymériques (microsphères ou microcapsules). Ce modèle, reconnu comme la loi de puissance, est donné par l'équation suivante :

$$\frac{M_t}{M_\infty} = K_{KP} \times t^n \dots\dots\dots(4)$$

La valeur de n est utilisée pour caractériser les différents mécanismes de libération du médicament correspondant, qui est déterminé juste pour la fraction M_t/M_∞ inférieure à 60 %. Les résultats sont tracés comme log % de libération en fonction du log du temps.

I.4.3 Choix d'un modèle mathématique

La sélection du modèle mathématique dans l'étude de la modélisation de la cinétique de libération est une étape essentielle et difficile pour garantir l'efficacité de l'étude. L'analyse statistique est l'un des critères du choix du modèle mathématique, par la détermination du coefficient (R^2). Néanmoins, le meilleur model est celui qui a le coefficient de corrélation le plus élevé (**Dash et al., 2010; Shaikh et al., 2015**).

I.5 la metformine et ses formulations par microencapsulation

Le développement de nouvelles formulations galéniques pour l'administration de la metformine a fait l'objet de nombreuses études. Ces travaux visent à réduire les effets secondaires liés au traitement et à améliorer son activité thérapeutique. Ces différents travaux de recherche sont présentés ci-dessous.

Patel et al (**2006**) ont développé des microparticules de metformine obtenue à partir d'éthyle cellulose par la méthode d'évaporation du solvant. L'influence du rapport principe actif/polymère et le volume du solvant a été étudié par un plan composite centré. Les résultats de cette étude ont montré que les microsphères d'éthyle cellulose présentent des propriétés intéressantes en termes d'efficacité d'encapsulation (> 78.32 %) et de rendement (> 44.93 %). Les microsphères obtenues flottent dans le milieu gastrique pendant plus de 8 h. Des teneurs élevées en éthyle cellulose ont conduit à des microsphères avec de grande efficacité d'encapsulation et une libération prolongée et

incomplète au bout de 8 h. Le mécanisme de libération de la metformine à partir des microsphères d'éthyle cellulose est de type diffusion.

Corti et al (2007) ont démontré l'usage d'un dérivé hydrophobe de la cyclodextrine, le triacétyl cyclodextrine, comme vecteur pour la metformine sous forme d'un complexe metformine - triacétyl cyclodextrine et ce afin de développer une forme à libération prolongée. Le mélange metformine – triacétyl cyclodextrine a été élaboré par différentes méthodes (mélange physique, malaxage, co-broyage et séchage par pulvérisation); et l'influence sur la cinétique de libération du mélange final a été évaluée. La libération de la metformine in vitro a été ralentie pour le mélange metformine- triacétyl-cyclodextrine préparé par la méthode de séchage par pulvérisation comparé aux mélanges préparés avec les autres méthodes.

Farago et al (2008) ont fabriqué des microparticules du PHBV contenant la metformine par la méthode de double émulsion évaporation du solvant. Ils ont utilisé deux tensioactifs ; le polysorbate 80 pour stabiliser l'émulsion primaire et le polyvinyle alcool pour stabiliser l'émulsion secondaire. Les microparticules préparées ont une forme sphérique avec une surface rugueuse et un diamètre qui varie entre 5-26 μm . L'efficacité d'encapsulation de ces microparticules était faible (3 %). L'ajout d'un sel (Na Cl) à la phase aqueuse externe pour la modification de son pH a permis d'augmenter l'efficacité d'encapsulation à 9 %. Les résultats des analyses par rayon X (DRX) et l'analyse thermique par DSC montrent que la cristallinité de la metformine a diminué après encapsulation dans les microsphères et qu'elle est dispersée à l'état moléculaire dans les microparticules. Le profil de libération de la metformine obtenue dans le milieu gastrique (0,1 mol/L en HCL) montre une libération complète au bout de 3 h.

Choudhury et Kar (2009) ont étudié l'encapsulation de la metformine dans l'éthyle cellulose par deux méthodes ; l'émulsion évaporation du solvant et la coacervation. La morphologie, la taille, l'efficacité d'encapsulation et le profil de libération des nanoparticules ont été tous affectés par les paramètres de fabrication et les conditions opératoires notamment le ratio éthyle cellulose/metformine, la température de préparation et la vitesse d'agitation. Les microsphères de méthyle cellulose sont testées in vitro et elles sont administrées à des souris rendues diabétiques par administration d'alloxane. Les profils de libération de la metformine à partir des

différentes formulations dans le milieu gastrique (pH=1,2) ont montré que la metformine se libérait lentement avec une libération incomplète au bout de 3 h. L'effet hyper glycémique de la metformine est maintenu pendant 10 heures après administration orale d'une dose de 60 mg /kg des microsphères préparées par les deux méthodes.

Jain et gupta (2009) ont préparés des particules lipidiques (gelucire) contenant la metformine. L'influence du rapport principe actif/lipide a été étudiée. Les résultats de cette étude ont montré que l'efficacité d'encapsulation et la taille de particules lipidiques obtenues ne sont pas influencées par la variation du rapport metformine/lipide. Les particules obtenues sont sphériques et flottent dans le milieu gastrique. Pour toutes les formulations, les profils sont biphasiques avec une libération incomplète. Le mécanisme de libération de la metformine à partir des particules lipidique est de type diffusion.

Nath et al (2009) ont étudié des microcapsules de metformine à partir de deux polymères (acétate butyrate de cellulose CAB, eudragit RL100) préparées par la méthode d'évaporation du solvant à partir d'une émulsion huile/huile. Il a été observé que la taille et l'efficacité d'encapsulation diminue avec l'augmentation de la vitesse d'agitation. Le test de libération a été réalisé dans le milieu gastrique (pH=1,2) et intestinal (6,8) pendant 10 h. Les résultats ont montré que la libération de la metformine à partir des microparticules préparées avec l'eudragit RL100 dans les deux milieux est plus rapide par rapport à celle obtenue à partir des microparticules préparées avec le CAB.

Ghodake et al (2010) ont fabriqué des microparticules de metformine en utilisant deux polymères l'eudragit RS 100 et l'hydroxypropyle méthyle cellulose (HPMC K4M). Les microparticules ont été préparées par la méthode de diffusion évaporation du solvant (simple émulsion de type huile/eau) et l'influence de différents ratios HPMC/eudragit sur l'efficacité d'encapsulation, le rendement et la cinétique de libération ont été étudiés. Les résultats de cette étude montrent qu'il existait une relation entre la quantité de HPMC et l'efficacité et le rendement d'encapsulation de la metformine, plus on augmente la quantité du HPMC, plus l'efficacité d'encapsulation de la metformine et son rendement sont faible. Le test de libération de la metformine à partir des différentes microparticules a été réalisé dans le milieu gastrique (pH=1,2) et

intestinal (6,8) pendant 12 h. Les profils montrent une libération incomplète de la metformine dans les deux milieux de dissolution. Elle est influencée par la quantité de l'HPMC dans les formulations. Plus la quantité de HPMC augmente, plus la libération de la metformine est importante.

Cetin et al (2011) ont développé des nanoparticules d'eudragit RSPO et du poly lactique co glycolique acide (PLGA) contenant la metformine obtenue par la méthode de nano précipitation. L'augmentation de la concentration de l'eudragit a conduit à l'augmentation de la taille des nanoparticules et l'efficacité d'encapsulation de la metformine. Cette différence a été attribuée à l'augmentation de viscosité de la phase organique. Une augmentation de la concentration de polymère Eudragit dissous dans la phase organique augmente la viscosité de phase organique et réduit l'efficacité d'agitation ce qui entraîne la formation de grosses gouttelettes d'émulsion. Les nanoparticules obtenues par utilisation d'un mélange d'eudragit et du PLGA (150/50 mg) possèdent une faible efficacité d'encapsulation qui selon les auteurs est due à la différence du poids moléculaire des deux polymères. La libération de la metformine à partir des différentes formulations présente des profils biphasiques caractérisés d'une libération initiale suivie d'une libération lente et presque complète au bout de 12 h du test de libération.

Kumar et al (2011) ont étudié l'encapsulation de la metformine dans un mélange alginate de sodium et une gomme de Karaya par la méthode de gélification. Les microparticules obtenues sont sphériques et fluides. L'analyse de taille des différentes formulations montre que les microcapsules avaient une taille de 939 à 1204 μm et l'efficacité d'encapsulation de la metformine varie de 73 % à 86 %. Des tests de libération de la metformine à partir des microparticules ont été réalisés dans le milieu gastrique (pH=1,2) pendant 12 h. La libération de la metformine était lente et dépendait de la composition de la couche alginate de sodium /gomme de Karaya de microcapsules, et suit une cinétique de libération d'ordre zéro caractérisée par une diffusion non fickienne ($0,59 < n < 0,72$).

Masareddy et al (2011) ont préparé des microsphères de metformine à partir d'alginate de sodium par la méthode de gélation ionique en présence du carbonate de sodium comme source de formation de gaz. Deux polymères ayant la propriété de gonflement ont été utilisés (hydroxy propyle méthyle cellulose (HPMC E50) ; l'éthyle

cellulose (EC)) et le chlorure de calcium comme agent gélifiant. L'influence de la concentration de l' HPMC et l'EC sur les propriétés des microsphères a été étudiée par utilisation d'un plan factoriel complet. Les microsphères obtenues ont une forme sphérique avec une surface poreuse et une taille qui accroît avec la concentration du polymère (576.60 ± 11.09 à $730.36 \pm 10.33 \mu\text{m}$), ceci est dû à l'augmentation de la viscosité de la solution de polymère ce qui a influencés la taille des gouttelettes. L'efficacité d'encapsulation de la metformine est inversement proportionnelle à la concentration de polymère en raison de sa viscosité qui affecte le coefficient de diffusion du principe actif. Le piégeage du principe actif a été attribué à la perméabilité des polymères utilisés, qui pourrait faciliter la diffusion d'une partie de médicament encapsulé dans le milieu environnant lors de la préparation de microsphères flottantes. Il a été constaté d'après les études de libération, que l'augmentation de la concentration de HPMC E50 et l'éthyle cellulose affectaient négativement la libération de médicament.

Allena et al (2012) ont développé un pansement à base d'un mélange de deux polymères le chitosane et l'HPMC pour une application cutanée de la metformine. La membrane a été préparée par la méthode d'évaporation du solvant en utilisant plusieurs ratio du chitosane /HPMC. Les membranes obtenues possèdent une épaisseur de 198 - 215 μm et leur teneur en metformine est supérieure à 91 %. Toutes les membranes résistent à la rupture et conservent leur intégrité avec possibilité au pliage une fois utilisé. Le test in vitro a été réalisé à l'aide d'une cellule de diffusion de Franz à 37 °C. La cinétique de libération est influencée par la composition en polymère et les résultats obtenus montrent une libération prolongée de metformine avec une libération incomplète au bout de 24 h.

Garut et al (2012) ont utilisé différents polymères (éthyle cellulose, hydroxy propyle méthyle cellulose et le chitosane) pour préparer des microsphères contenant la metformine par la méthode d'évaporation de solvant. Ils ont étudié l'influence du rapport metformine/polymère (1 :1-1 :3), vitesse d'agitation (600-1800) et le type du polymère sur la taille des microsphères, l'efficacité d'encapsulation et la cinétique de libération. Des microsphères poreuses de taille supérieure à 350 μm ont été obtenues. L'augmentation de la vitesse d'agitation (du 600 à 1200 tpm) et de la concentration du polymère engendre une amélioration de l'efficacité d'encapsulation; ceci est dû à la grande quantité en polymère qui recouvre plus de particules du metformine. Les

résultats de la libération *in vitro* ont révélé que la metformine se libère graduellement à partir des microsphères obtenues. Les microsphères préparées présentent un effet prolongé jusqu'à 15 h.

Maji et al (2012) ont préparé des microparticules l'éthyle cellulose contenant la metformine par la méthode d'émulsion évaporation de solvant. L'influence de quelques variables comme le rapport metformine-polymère, la vitesse d'agitation et la concentration du tensioactif span 80 sur les propriétés des microparticules d'éthyle cellulose a été étudié. L'efficacité d'encapsulation, la taille des microparticules et le profil de libération sont très influencée par ces variables.

Hasan et al (2013) ont préparé des microsphères à partir de deux copolymères du poly méthacrylate ayant des différentes perméabilités : eudragit RSPO et RLPO par la méthode d'émulsion évaporation du solvant. Les microsphères ont été préparées avec différentes rapports principe actif/polymère afin d'évaluer l'influence de la concentration du principe actif sur l'efficacité d'encapsulation et la cinétique de libération. Les résultats de l'étude ont montré que des efficacités d'encapsulation élevée ont été obtenues avec un rapport metformine/eudragit égale à 30/70 %. Le profil de libération de la metformine à partir des microsphères obtenues est caractérisé par un effet prolongé, les microsphères de l'eudragit RLPO présentent une libération complète de la metformine en 10 h contrairement aux microsphères de l'eudragit RSPO qui libèrent environ 69 % de la metformine durant la même période.

Lokhande et al (2013) ont préparé des microparticules d'Eudragit RS100 chargé en metformine par la méthode d'émulsion/évaporation de solvant. Le méthanol est utilisé comme solvant pour la metformine et le polymère ; la paraffine liquide (contenant 0,5 % v/v de Span 80 comme tensioactif et 20 ml de n-hexane comme agent solidifiant) est utilisée comme phase externe. Les microparticules sont préparées en utilisant différentes ratios metformine/polymère. L'augmentation de la concentration de polymère influe considérablement l'efficacité d'encapsulation (EE) ou le rapport de 1/10 permet d'avoir une EE maximale de 99 %. Les microparticules obtenues sont sphériques et d'une taille uniforme avec une surface poreuse. Les résultats des tests de libération *in vitro* réalisés dans un tampon phosphate (pH= 6.8) ont révélé que l'incorporation de la metformine dans la matrice Eudragit RS100 permet de ralentir sa libération pendant 12 h, les microparticules préparés avec un rapport de 1/10 présente une libération lente. Tous les

profils de libération présentent un effet burst important (environ 50 % en metformine) libéré en 1 h du test avec une libération incomplète au bout de 12 h.

Manconi et al (2013) ont élaboré des liposomes à partir de deux phospholipides commerciaux (phosphatidylcholine hydrogénée et phosphatidylcholine de soja). Le but de cette étude était de développer un système capable d'augmenter la biodisponibilité et de contrôler la libération de la metformine. Les liposomes obtenus ont été caractérisés pour déterminer leur morphologie, taille et l'efficacité d'encapsulation. Les interactions metformine-polymères ont été réalisées par DRX et DSC et des tests de libération in vitro et de biodisponibilité ont été aussi effectués. Les résultats de l'étude révèlent la formation de vésicules sous forme sphérique avec une taille d'environ 4 nm, une efficacité d'encapsulation de 10 %, qui est améliorée (15 %) par enrobage avec la chitosane. Les analyses DSC et DRX confirment la présence d'interactions entre les composants des liposomes. Les essais de libération in vitro ont montré des profils de libération rapide dans le milieu gastrique et prolongé dans le milieu intestinal. L'adhésion des liposomes sur les tissus de l'estomac et de l'intestin des rats dépend fortement de la structure des polymères, la chitosane positivement chargé peut former des complexes avec la mucine chargée négativement. Après administration orale des liposomes, la biodisponibilité de la metformine contenue dans les liposomes se trouve améliorée (23 ± 4 %) par comparaison à la solution de metformine (20 ± 8 %).

Nayak et al (2013) ont développé des billes muco adhésives chargées en metformine à partir d'un mélange alginate-polysaccharide (extrait de la graine du tamarin : EGT) par la méthode de gélification ionique. Le plan factoriel complet a été utilisé dans le but d'étudier l'influence du rapport alginate/EGT et la concentration du CaCl_2 , sur l'efficacité d'encapsulation et la libération de la metformine. Les billes d'alginate-polysaccharide sont testées in vitro et elles sont administrées à des souris rendues diabétiques par administration d'Alexane. L'optimisation par la méthodologie des plans d'expériences a permis de préparer des billes alginate-EGT avec une efficacité d'encapsulation de 94,86 % avec une taille d'environ 1 mm. La libération de la metformine à partir des formulations a été étudiée pendant 2 h dans le milieu gastrique simulé ensuite pendant 8 h dans le milieu intestinal (tampon phosphate). Les résultats ont montré que 94 % de la metformine est libérée au bout de 10 h. Le test d'adhésion testé sur la muqueuse intestinale de la chèvre, montre que les billes préparées

présentent une bonne adhésion dans le milieu gastrique. Les billes ont permis de réduire la glycémie de 25 % pendant 10 heures après administration orale d'une dose de 100 mg de metformine/kg.

Sander et al (2013) ont fabriqué des microparticules bio-adhésives de chitosane chargées en metformine par la méthode de séchage par pulvérisation. Ces microparticules sont conçues pour la délivrance de la metformine dans la muqueuse buccale ainsi, les résultats ont montré que l'efficacité d'encapsulation est de 87 %. Des tests de bio adhésion ex vivo de la metformine à partir des microparticules préparées ont été effectués sur la muqueuse buccale des porcs et les résultats ont montré que la rétention de la metformine sur la muqueuse buccale du porc a été améliorée lors de son incorporation dans les microparticules du chitosane. L'augmentation du ratio chitosane/metformine engendre une amélioration de la rétention de la metformine ce qui est due à la grande quantité de polymère aux propriétés d'adhésion importante.

Sharma et al (2013) ont utilisé des extraits polysaccharidiques de deux plantes pour préparer des microsphères contenant la metformine par la méthode d'émulsion évaporation de solvant. Les auteurs ont réussi à obtenir des microsphères avec une efficacité d'encapsulation jusqu'à 84,7 % et une taille de 145 μm . Les résultats des analyses DSC et DRX montrent que la metformine est dispersée à l'état moléculaire dans les microsphères sous une forme amorphe. Des tests de dissolution in vitro des microsphères de metformine ont été réalisés dans le milieu intestinal simulé (pH=7,4) à 37 °C et les résultats obtenus indiquent que la libération du principe actif est incomplète et est caractérisée par une cinétique de diffusion non fickienne influencée par la diffusion et le gonflement du polysaccharide.

Priyadarshini et al (2016) ont développé des comprimés gastro-résistants de metformine destinée à une libération prolongée à base de copolymère poly méthacrylate de méthyle greffé géllane (PMMA-g-GG) et la gomme de la graine tamarin (GGT) obtenu par granulation humide. Le plan factoriel complet a été utilisé pour évaluer l'influence de 3 facteurs ; la quantité du PMMA-g-GG, GGT et la quantité de bicarbonate de sodium NaHCO_3 (contributeur à la flottabilité) sur la force de mucoadhésion, temps de latence de flottabilité et la cinétique de libération dans le milieu gastrique simulé. Les comprimés présentaient une épaisseur variable de 5,07 à

6,18 mm avec une friabilité maximale de 0,46 %. Les analyses thermiques (DSC, ATG) effectuées sur la metformine pure et les comprimés préparés ont indiqué une réduction de la température de fusion de la metformine. L'étude cristallographique (DRX) confirme aussi la nature cristalline de la metformine dans les comprimés. Les résultats de la cinétique de libération obtenus indiquent que la libération de la metformine est incomplète et elle est caractérisée par une cinétique de diffusion non fickienne qui est influencée par la diffusion contrôlée par le gonflement du polymère.

L'équipe de Shariatinia et Zahraee (2017) ont utilisé un mélange du chitosane (CH) et de poly (éthylène glycol)-bloc-poly (propylène glycol)-bloc-poly (éthylène glycol) (BP) pour préparer des films chargés en metformine dans le but de développer un nouveau système de libération du médicament. La libération de la metformine à partir des films préparés a été réalisée dans un milieu tampon phosphate PBS pendant 15 jours. Il a été observé que la libération est caractérisée par un effet 'burst' pendant 24 h (~ 86 %) ensuite la metformine se libère progressivement dans le temps. Le film préparé avec 10 % en metformine présente un système favorable pour la libération du médicament.

Martínez-Gómez et al (2017) ont préparé un hydrogel à base d'un mélange des alginates de sodium et de poly vinyle alcool. L'effet du pH et de la température sur la propriété du gonflement du gel ont été évalués. L'hydrogel préparé ne présente aucun changement pour le stimulus pH, en revanche, à la température de 37 °C l'hydrogel se trouve dispersé. L'efficacité d'encapsulation de la metformine dans cet hydrogel est de 81 %. L'étude de la cinétique de libération de la metformine à partir de l'hydrogel a été étudiée dans quatre milieux physiologiques simulant le tractus gastro intestinal ont été utilisés (estomac (pH 1,2), duodénum et jéjunum (pH 6,5), iléon (pH 8,0) et côlon (pH 6,5)) ; les résultats de ce test ont montré que la metformine est retenue dans l'hydrogel et présente une libération de 38 % au bout de 72 h.

Mancer et al (2018) ont préparé des microcapsules d'isolat de protéine de soja (SPI) et pectine chargées de metformine par la méthode de double émulsion suivie d'une coacervation complexe. Le but de cette étude est l'optimisation par la méthodologie des plans d'expériences des paramètres (concentration des deux tensioactifs la lécithine et le tween 80, la vitesse d'agitation et la durée d'agitation) influençant sur l'efficacité d'encapsulation et la distribution de la taille des

microparticules. L'efficacité d'encapsulation de la metformine dans les microparticules SPI/pectine varie de 70 % à 85 % et la taille de 0,37 μm à 28 μm . Les résultats obtenus montrent que l'efficacité d'encapsulation et la distribution de la taille sont influencées par les paramètres étudiés. La formulation optimale a montré une efficacité d'encapsulation de $83,7 \pm 0,45$ % et une distribution de taille (span) de $1,26 \pm 0,07$.

Kaur et al (2019) ont étudié l'usage de la beta cyclodextrine (β -CD) pour la formation d'un complexe metformine dans le but d'améliorer la libération prolongée orale du médicament. Le complexe d'inclusion MF- β -CD est préparé par la méthode d'irradiation en micro-onde avec des méthodes conventionnelles telles que le mélange physique, méthode de malaxage et méthode de co-précipitation. Les complexes d'inclusion caractérisés par différentes techniques FTIR, FESEM, PXRD, DSC et ^1H NMR ont révélé que les méthodes de micro-onde et de co-précipitation forment de véritables complexes d'inclusion. Les résultats de libération in vitro dans le tampon phosphate (pH= 7) montrent que la libération de la metformine est incomplète à partir des complexes obtenue par malaxage.

Sarwar et al (2020) ont mené une étude de libération de la metformine à partir des films préparés à base d'un mélange chitosane/polyéthylène glycol méthyle éther (PEGME). Les films ont été préparés en solution avec différents rapports chitosane/PEGME. La morphologie, les caractéristiques mécaniques, thermiques et structurales des films obtenus ont été étudiés. La libération de la metformine a été réalisée dans une solution tampon phosphate (pH =7,4) et le profil de libération indique une libération d'environ 20 % de la metformine au bout de 22 h.

Rebitski et al (2020) ont démontré l'usage de deux types d'argiles : une montmorillonite naturelle du Wyoming (commercialisé sous le nom de Cloisite Na ; Mt) et une hectorite synthétique (commercialisé sous le nom de Laponite® XLG ; Lap), pour l'encapsulation de la metformine. La première étape de la préparation consiste à l'intercalation de la metformine dans des feuillets de silicates, ensuite les échantillons obtenus sont introduits dans une solution aqueuse de pectine pour former une suspension, qui est ensuite dispersée dans une solution aqueuse de chlorure de calcium. L'intercalation de la metformine dans les substrats argileux a été confirmée par XRD et l'analyse par infrarouge révèle la présence d'interactions entre les deux composants. Les auteurs ont observé un taux de libération de metformine dans le milieu simulé gastrique

pendant 2 h à partir des particules de 37 et 45 % pour les deux types d'argiles Mt et Lap respectivement.

En conclusion, ces différentes études visant au développement de formes à libération prolongé pour l'administration de la metformine dans la plupart des cas par voie orale. L'ensemble des travaux réalisés démontrent l'intérêt de la communauté scientifique pour la problématique de l'administration d'un biguanide par voie orale pour le traitement de diabète type 2.

Références bibliographiques

Agnihotri, N. Mishra, R., Goda, C. and Arora, M. (2012). Microencapsulation a novel approach in drug delivery. *Indo Global Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2 (1), 1-20.

Allena, R. T., Yadav, H. K., Sandina, S., Sarat Chandra Prasad, M. (2012). Preparation and evaluation of transdermal patches of metformin hydrochloride using natural polymer for sustained release. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4 (3), 297-02.

Amasya, G., Badilli, U., Aksu, B., Tarimci, N. (2016). Quality by design case study 1: Design of 5-fluorouracil loaded lipid nanoparticles by the W/O/W double emulsion-Solvent evaporation method. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 84, 92-102.

American Diabetes Association. (2020). Classification and diagnosis of diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes. *Diabetes care*, 43 (Supplement 1), S14-S31.

André-Abrant, A., Taverdet, J. L., & Jay, J. (2001). Microencapsulation par évaporation de solvant. *European polymer journal*, 37 (5), 955-963.

Arifin, D .Y., Lee, L.Y., Wan,g C-H. (2006). Mathematical modeling and simulation of drug release from microspheres: Implications to drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58, 1274-1325.

Babu, P. K., Maruthi, Y., Pratap, S. V., Sudhakar, K., Sadiku, R., Prabhakar, M. N., Song, j., subha M. C. S., & RAO, K. C. (2015). Development and characterization of polycaprolactone (PCL)/poly ((R)-3-hydroxybutyric acid) (PHB) blend microspheres for tamoxifen drug relese studies. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 7(9), 95-100.

- Badri, W., Miladi, K., Nazari, Q. A., Fessi, H., & Elaissari, A. (2017). Effect of process and formulation parameters on polycaprolactone nanoparticles prepared by solvent displacement. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 516, 238-244.
- Bailey, C. J. (2017). Metformin: historical overview. *Diabetologia*, 60 (9), 1566-1576.
- Bailey, C. J., Day, C. (2004). Metformin: its botanical background. *Practical Diabetes International*, 21(3), 115-117.
- Barbieri, F., Verduci, I., Carlini, V., Zona, G., Pagano, A., Mazzanti, M., Florio, T. (2019). Repurposed biguanide drugs in glioblastoma exert antiproliferative effects via the inhibition of intracellular chloride channel 1 activity. *Frontiers in oncology*, 9, 135.
- Benítez, M. C., Espada, J. I., Fernandes, D., de la Ossa, D. H. P., Gil- Alegre, M. E. (2014). Influence of surfactant on the characteristics of W1/O/W2-microparticles. *Journal of Surfactants and Detergents*, 17(1), 11-18.
- Berrocoso, E., Rey-Brea, R., Fernández-Arévalo, M., Micó, J. A., Martín-Banderas, L. (2017). Single oral dose of cannabinoid derivate loaded PLGA nanocarriers relieves neuropathic pain for eleven days. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 13(8), 2623-2632.
- Boh, B., Šumiga, B. (2008). Microencapsulation technology and its applications in building construction materials. *Tehnologija mikrokapsuliranja. RMZ—Materials and Geoenvironment*, 55(3), 329-344.
- Bouchoucha, M., Uzzan, B., Cohen, R. (2011). Metformin and digestive disorders. *Diabetes & metabolism*, 37(2), 90-96.
- Bragagni, M., Beneitez, C., Martín, C., de la Ossa, D. H. P., Mura, P. A., Gil-Alegre, M. E. (2013). Selection of PLA polymers for the development of injectable prilocaine controlled release microparticles: usefulness of thermal analysis. *International journal of pharmaceutics*, 441(1-2), 468-475.
- Bruschi, M. L. (2015). *Strategies to modify the drug release from pharmaceutical systems*. Woodhead Publishing.
- Campos, E., Branquinhho, J., Carreira, A.S., Carvalho, A., Coimbra, P., Ferreira, P., Gil, M.H. (2013). Designing polymeric microparticles for biomedical and industrial applications. *European Polymer Journal*, 49, 2005-2021

- Cao, Z., Li, W., Liu, R., Li, X., Li, H., Liu, L., Liu, Y. (2019). pH-and enzyme-triggered drug release as an important process in the design of anti-tumor drug delivery systems. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 118, 109340.
- Cetin, M., Atila, A., Sahin, S., & Vural, I. (2013). Preparation and characterization of metformin hydrochloride loaded-Eudragit® RSPO and Eudragit® RSPO/PLGA nanoparticles. *Pharmaceutical development and technology*, 18(3), 570-576.
- Cha, Y., Pitt, C. G. (1989). The acceleration of degradation-controlled drug delivery from polyester microspheres, *Journal of controlled release*, 8, 259-265
- Cheng, C. L., Lawrence, X. Y., Lee, H. L., Yang, C. Y., Lue, C. S., Chou, C. H. (2004). Biowaiver extension potential to BCS Class III high solubility-low permeability drugs: bridging evidence for metformin immediate-release tablet. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 22(4), 297-304.
- Chong, D., Liu, X., Ma, H., Huang, G., Han, Y. L., Cui, X., Yan, J., & Xu, F. (2015). Advances in fabricating double-emulsion droplets and their biomedical applications. *Microfluidics and Nanofluidics*, 19(5), 1071-1090.
- Choudhury, P. K., Kar, M. (2009). Controlled release metformin hydrochloride microspheres of ethyl cellulose prepared by different methods and study on the polymer affected parameters. *Journal of Microencapsulation*, 26(1), 46-53.
- Coccoli, V., Luciani, A., Orsi, S., Guarino, V., Causa, F., & Netti, P. A. (2008). Engineering of poly (ϵ -caprolactone) microcarriers to modulate protein encapsulation capability and release kinetic. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 19(4), 1703-1711.
- Corti, G., Capasso, G., Maestrelli, F, Cirri, M., Mura, P. (2007). Physical chemical characterization of binary systems of metformin hydrochloride with triacetyl-cyclodextrin. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 45, 480–486.
- Cosco, D., Paolino, D., De Angelis, F., Cilurzo, F., Celia, C., Di Marzio, L., Russo, D., Tsapis, N., Fattal, E., Fresta, M. (2015). Aqueous-core PEG-coated PLA nanocapsules for an efficient entrapment of water soluble anticancer drugs and a smart therapeutic response. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 89, 30-39.
- Costa, F. O., Sousa, J. J. S., Pais, A. A. C. C., Formosinho, S. J. (2003). Comparison of dissolution profiles of Ibuprofen pellets. *Journal of controlled release*, 89(2), 199-212.

- Couvreur, P., Dubernet, C., Puisieux, F. (1995). Controlled drug delivery with nanoparticles: current possibilities and future trends. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, 41(1), 2-13.
- Cózar-Bernal, M. J., Holgado, M. A., Arias, J. L., Muñoz-Rubio, I., Martín-Banderas, L., Alvarez-Fuentes, J., Fernández-Arévalo, M. (2011). Insulin-loaded PLGA microparticles: flow focusing versus double emulsion/solvent evaporation. *Journal of Microencapsulation*, 28(5), 430-441.
- Dash, S., Murthy, P. N., Nath, L., Chowdhury, P. (2010). Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. *Acta Pol Pharm*, 67(3), 217-223.
- Dash, S., Murthy, P. N., Nath, L., Chowdhury, P. (2010). Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. *Acta Pol Pharm*, 67(3), 217-223.
- Daugan, M., Wojcicki, A. D., d'Hayer, B., Boudy, V. (2016). Metformin: An anti-diabetic drug to fight cancer. *Pharmacological research*, 113, 675-685.
- David, C., Boinet, T. (2018). Diabète de type 2 non équilibré et haut risque cardiovasculaire. *Actualités Pharmaceutiques*, 57(573), 14-17.
- Della Porta, G., Castaldo, F., Scognamiglio, M., Paciello, L., Parascandola, P., Reverchon, E. (2012). Bacteria microencapsulation in PLGA microdevices by supercritical emulsion extraction. *The Journal of Supercritical Fluids*, 63, 1-7.
- Dey, N. S., Majumdar, S., & Rao, M. E. B. (2008). Multiparticulate drug delivery systems for controlled release. *Tropical journal of pharmaceutical research*, 7(3), 1067-1075.
- Dhanaraju, M. D., Sathyamoorthy, N., Sundar, V. D., Suresh, C. (2010). Preparation of poly (epsilon-caprolactone) microspheres containing etoposide by solvent evaporation method. *Asian J. Pharm. Sci*, 5(3), 114-122.
- Dinarvand, R., Moghadam, S., Sheikhi, A., Atyabi, F. (2005). Effect of surfactant HLB and different formulation variables on the properties of poly-D, L-lactide microspheres of naltrexone prepared by double emulsion technique, *Journal of Microencapsulation*. 22, 139-151
- Ding, S., Serra, C. A., Vandamme, T. F., Yu, W., Anton, N. (2019). Double emulsions prepared by two-step emulsification: History, state-of-the-art and perspective. *Journal of controlled release*, 295, 31-49.

- Dubey, T.C. Shami, K.U. Bhasker, R. (2009). Microencapsulation technology and applications. *Defence Science Journal*, 59 (1) 82-95.
- Elmowafy, E. M., Tiboni, M., & Soliman, M. E. (2019). Biocompatibility, biodegradation and biomedical applications of poly (lactic acid)/poly (lactic-co-glycolic acid) micro and nanoparticles. *Journal of Pharmaceutical Investigation*, 49(4), 347-380.
- Farago, P. V., Raffin, R. P., Pohlmann, A. R., Guterres, S. S., & Zawadzki, S. F. (2008). Physicochemical characterization of a hydrophilic model drug-loaded PHBV microparticles obtained by the double emulsion/solvent evaporation technique. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 19(7), 1298-1305.
- Fernández-Carballido, A., Herrero-Vanrell, R., Molina-Martinez, I. T., Pastoriza, P. (2004). Biodegradable ibuprofen-loaded PLGA microspheres for intraarticular administration: effect of Labrafil addition on release in vitro. *International journal of pharmaceutics*, 279(1-2), 33-41.
- Fox, C. B., Kim, J., Le, L. V., Nemeth, C. L., Chirra, H. D., Desai, T. A. (2015). Micro/nanofabricated platforms for oral drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 219, 431-444.
- 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. *International journal of pharmaceutics*, 415 (1-2), 34-52.
- Gaignaux, A., Réeff, J., Siepmann, F., Siepmann, J., De Vriese, C., Goole, J., Amighi, K. (2012). Development and evaluation of sustained-release clonidine-loaded PLGA microparticles. *International journal of pharmaceutics*, 437(1-2), 20-28.
- Gangurde, A. B., Ali, M. T., Pawar, J. N., Amin, P. D. (2017). Encapsulation of vitamin E acetate to convert oil to powder microcapsule using different starch derivatives. *Journal of Pharmaceutical Investigation*, 47(6), 559-574.
- Garti, N., Bisperink, C. (1998). Double emulsions: progress and applications. *Current opinion in colloid & interface science*, 3, 657-667
- Garud, N., Garud, A. (2012). Preparation and in-vitro evaluation of metformin microspheres using non-aqueous solvent evaporation technique. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 11(4), 577-583.

- Ghodake, J.D., Vidhate, J.S., Shinde, D.A., Kadam, A.N. (2010). Formulation and evaluation of floating microsphere containing anti-diabetic (metformin hydrochloride) DRUG. *International journal of pharmaceutical technology research*, 2, 378-384
- Giri, T. K., Choudhary, C., Alexander, A., Badwaik, H., Tripathi, D. K. (2013). Prospects of pharmaceuticals and biopharmaceuticals loaded microparticles prepared by double emulsion technique for controlled delivery. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 21(2), 125-141.
- Han, K., Lee, K.D., Gao, Z.G., Park, J.S. (2001). Preparation and evaluation of poly (L-lactic acid) microspheres containing rhEGF for chronic gastric ulcer healing. *Journal of Controlled Release*, 75, 259 -269
- Hasan, I., Paul, S., Akhter, S., Ayon, N. J., Reza, M. S. (2013). Evaluation and optimization of influence of permeability property and concentration of polymethacrylic polymers on microspheres of metformin HCl. *Dhaka University Journal of Pharmaceutical Sciences*, 12 (2), 131-141.
- He, L., Wondisford, F. E. (2015). Metformin action: concentrations matter. *Cell metabolism*, 21(2), 159-162.
- Hernández, B., Pflüger, F., Kruglik, S. G., Cohen, R., Ghomi, M. (2015). Protonation–deprotonation and structural dynamics of antidiabetic drug metformin. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 114, 42-48.
- Herrmann, J., Bodmeier, R. (1995). The effect of particle microstructure on the somatostatin release from poly (lactide) microspheres prepared by a W / O / W solvent evaporation method. *Journal of Controlled Release*, 36, 63-71
- Hombreiro Pérez, M. Zinutti, C., Lamprecht, A., Ubrich, N., Astier, A., Hoffman, M., Bodmeier, R., Maincent, P. (2000). The preparation and evaluation of poly(ϵ -caprolactone) microparticles containing both a lipophilic and a hydrophilic drug. *Journal of Controlled Release*, 65 (3), 429-438
- Iqbal, M., Zafar, N., Fessi, H., Elaissari, A. (2015). Double emulsion solvent evaporation techniques used for drug encapsulation. *International journal of pharmaceutics*, 496(2), 173-190.

- Ito, F., Fujimori, H., Makino, K. (2008). Factors affecting the loading efficiency of water-soluble drugs in PLGA microspheres. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 61(1), 25-29.
- Jain, R. A., Rhodes, C. T., Railkar, A. M., Malick, A. W., Shah, N. H. (2000). Controlled delivery of drugs from a novel injectable in situ formed biodegradable PLGA microsphere system. *Journal of microencapsulation*, 17(3), 343-362.
- Jain, S. K., & Gupta, A. (2009). Development of Gelucire 43/01 beads of metformin hydrochloride for floating delivery. *AAPS Pharm Sci Tech*, 10(4), 1128-1136.
- James, R., Manoukian, O. S., Kumbar, S. G. (2016). Poly (lactic acid) for delivery of bioactive macromolecules. *Advanced drug delivery reviews*, 107, 277-288.
- Jelvehgari, M., Nokhodchi, A., Rezapour, M., Valizadeh, H. (2010). Effect of formulation and processing variables on the characteristics of tolmetin microspheres prepared by double emulsion solvent diffusion method. *Indian journal of pharmaceutical sciences*, 72(1), 72.
- Jose, S., Fanguero, J. F., Smitha, J., Cinu, T. A., Chacko, A. J., Premaletha, K., Souto, E. B. (2013). Predictive modeling of insulin release profile from cross-linked chitosan microspheres. *European journal of medicinal chemistry*, 60, 249-253.
- Kaur, K., Jindal, R., Jindal, D. (2019). Synthesis, characterization and studies on host-guest interactions of inclusion complexes of metformin hydrochloride with β -cyclodextrin. *Journal of Molecular Liquids*, 282, 162-168.
- Kim, B. K., Hwang, S. J., Park, J. B., Park, H. J. (2005). Characteristics of felodipine located poly (ϵ -caprolactone) microspheres. *Journal of microencapsulation*, 22 (2), 193-203.
- Kim, J., Kwon, I. C., Kim, Y. H., La, S. B., Sohn, Y T and Jeong, S. Y. (1996). Preparation of Biodegradable Microspheres Containing Water Soluble Drug, β -lactam Antibiotic. *Archives of pharmacal research*, 1, 30-35
- Kumar, A., Balakrishna, T., Rajiv, J. (2011). Formulation and evaluation of mucoadhesive microcapsules of metformin HCL with gum karaya. *Internacional journal of pharmacy and pharmaceutical sciences*, 3(3), 150-5.
- Le Ray, A. M., Chiffolleau, S., Iooss, P., Grimandi, G., Gouyette, A., Daculsi, G., Merle, C. (2003). Vancomycin encapsulation in biodegradable poly (ϵ -caprolactone)

microparticles for bone implantation. Influence of the formulation process on size, drug loading, in vitro release and cytocompatibility. *Biomaterials*, 24(3), 443-449.

Ledezma-Gallegos, F., Jurado, R., Mir, R., Medina, L. A., Mondragon-Fuentes, L., Garcia-Lopez, P. (2020). Liposomes Co-Encapsulating Cisplatin/Mifepristone Improve the Effect on Cervical Cancer: In Vitro and In Vivo Assessment. *Pharmaceutics*, 12(9), 897.

Lee, B. K., Yun, Y., Park, K. (2016). PLA micro-and nano-particles. *Advanced drug delivery reviews*, 107, 176-191.

Lee, J.H., Park, T.G., Choi, H.K. (2000). Effect of formulation and processing variables on the characteristics of microspheres for water-soluble drugs prepared by W:O:O double emulsion solvent diffusion method. *International Journal of Pharmaceutics*, 196, 75-83.

Lee, M. H., Lim, R. H., Lee, T. H., Park, J.C. (2009). Preparation of PLGA microparticles by a double emulsion solvent technique for sustained release of (-)-epigallocatechin gallate (egcg) and their growth inhibitory effect on rat aortic smooth muscle cells. *Biomaterials Research*, 13(1), 11-15.

Lengyel, M., Kállai-Szabó, N., Antal, V., Laki, A. J., Antal, I. (2019). Microparticles, microspheres, and microcapsules for advanced drug delivery. *Scientia Pharmaceutica*, 87(3), 20.

Li, G., Zhao, M., Xu, F., Yang, B., Li, X., Meng, X., Teng, L., Sun, F., Li, Y. (2020). Synthesis and Biological Application of Polylactic Acid. *Molecules*, 25(21), 5023

Li, M., Rouaud, O., Poncelet, D. (2008). Microencapsulation by solvent evaporation: state of the art for process engineering approaches. *International Journal of Pharmaceutics*, 363, 26-39.

Lokhande, A. B., Deshmukh, T. A., Patil, V. R., Valley, T., Madhukarrao, L. (2013). Fabrication and in vitro evaluation of metformin entrapped sustained release ammonio methacrylate copolymer microparticles prepared by non-aqueous emulsion solvent evaporation technique. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 4(3), 444 - 453.

Macha, I. J., Ben-Nissan, B., Vilchevskaya, E. N., Morozova, A. S., Abali, B. E., Müller, W. H., Rickert, W. (2019). Drug delivery from polymer-based

nanopharmaceuticals—an experimental study complemented by simulations of selected diffusion processes. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 7, 1-14

Machado, S. R. P., Evangelista, R. C. (2010). Development and characterization of cefoxitin loaded D, L-PLA nanoparticles. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, 31(3). 193-202

Maia, J. L., Santana, M. H. A., Ré, M. I. (2004). The effect of some processing conditions on the characteristics of biodegradable microspheres obtained by an emulsion solvent evaporation process. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 21(1), 01-12.

Mainardes, R. M., Evangelista, R. C. (2005). Praziquantel-loaded PLGA nanoparticles: preparation and characterization. *Journal of microencapsulation*, 22(1), 13-24.

Maiti, S., Dey, P., Sa, B., Ray, S. (2010). Influence of microenvironmental pH of alginate facilitated ethyl cellulose microspheres on entrapment efficiency and release characteristics of fluconazole. *Int J Curr Pharm Res*, 2, 17-23.

Maji, R., Ray, S., Das, B., Nayak, A. K. (2012). Ethyl cellulose microparticles containing metformin HCl by emulsification-solvent evaporation technique: effect of formulation variables. *International Scholarly Research Notices*, 2012.1-7

Mancer, D., Allemann, E., Daoud, K. (2018). Metformin hydrochloride microencapsulation by complex coacervation: Study of size distribution and encapsulation yield using response surface methodology. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 45, 184-195.

Manconi, M., Nácher, A., Merino, V., Merino-Sanjuan, M., Manca, M. L., Mura, C., Diez-Sales, O. (2013). Improving oral bioavailability and pharmacokinetics of liposomal metformin by glycerolphosphate–chitosan microcomplexation. *Aaps Pharmscitech*, 14(2), 485-496.

Maniar, K., Moideen, A., Mittal, A., Patil, A., Chakrabarti, A., & Banerjee, D. (2017). A story of metformin-butyrate synergism to control various pathological conditions as a consequence of gut microbiome modification: genesis of a wonder drug?. *Pharmacological research*, 117, 103-128.

- Marcela, F., Lucía, C., Esther, F., Elena, M. (2016). Microencapsulation of L-ascorbic acid by spray drying using sodium alginate as wall material. *Journal of Encapsulation and Adsorption Sciences*, 6(01), 1.
- Martínez-Gómez, F., Guerrero, J., Matsuhira, B., Pavez, J. (2017). In vitro release of metformin hydrochloride from sodium alginate/polyvinyl alcohol hydrogels. *Carbohydrate polymers*, 155, 182-191.
- Masareddy, R. S., Bolmal, U. B., Patil, B. R., Shah, V. (2011). Metformin HCl loaded sodium alginate floating microspheres prepared by ionotropic gelation technique: Formulation, evaluation and optimization. *Evaluation and Optimization: Indian Journal of Novel Drug Delivery*, 125-133.
- Matsumoto, K., Kimura, S. I., Itai, S., Kondo, H., Iwao, Y. (2019). In vivo temperature-sensitive drug release system triggered by cooling using low-melting-point microcrystalline wax. *Journal of Controlled Release*, 303, 281-288.
- Meng, F. T., Ma, G. H., Qiu, W., Su, Z. G. (2003). W/O/W double emulsion technique using ethyl acetate as organic solvent: effects of its diffusion rate on the characteristics of microparticles. *Journal of controlled release*, 91(3), 407- 416.
- Metaxa, A. F., Efthimiadou, E. K., Boukos, N., Kordas, G. (2012). Polysaccharides as a source of advanced materials: Cellulose hollow microspheres for drug delivery in cancer therapy. *Journal of colloid and interface science*, 384(1), 198-206.
- Miladi, K., Ibraheem, D., Iqbal, M., Sfar, S., Fessi, H., Elaissari, A. (2014). Particles from preformed polymers as carriers for drug delivery. *EXCLI journal*, 13, 28.
- Mimi, N., Belkacemi, H., Sadoun, T., Sapin, A., Maincent, P. (2015). How the composition and manufacturing parameters affect insulin release from polymeric nanoparticles. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 30, 458-466.
- Miyazaki, Y., Onuki, Y., Yakou, S., Takayama, K. (2006). Effect of temperature increase rate on drug release characteristics of dextran microspheres prepared by emulsion solvent evaporation process. *International journal of pharmaceutics*, 324(2), 144-151.
- Molavi, F., Barzegar-Jalali, M., Hamishehkar, H. (2020). Polyester based polymeric nano and microparticles for pharmaceutical purposes: A review on formulation approaches. *Journal of Controlled Release*, 320, 265-282.

- Montané, X., Bajek, A., Roszkowski, K., Montornés, J. M., Giamberini, M., Roszkowski, S., Garcia-Valls, R., & Tylkowski, B. (2020). Encapsulation for cancer therapy. *Molecules*, 25(7), 1605.
- Nanjwade, B. K., Mhase, S. R., Manvi, F. V. (2011). Formulation of extended-release metformin hydrochloride matrix tablets. *Tropical journal of pharmaceutical research*, 10 (4), 375-383.
- Nath, B., Nath, L. K., Mazumdar, B., Sharma, N., Sarkar, M. (2009). Design and development of Metformin HCl floating microcapsules using two polymers of different permeability characteristics. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology*, 2(3), 627-637.
- Nayak A.K., Pal D. (2013). Ionotropically-gelled mucoadhesive beads for oral metformin HCL delivery: Formulation, optimization antidiabetic evaluation. *Journal of scientific and industrial Research*, 72, 15-22.
- Nelson, G. (2002). Application of microencapsulation in textiles. *International journal of pharmaceutics*, 242(1-2), 55-62.
- Nesterenko A., Alric I., Silvestre F., Durrieu V. (2013). Vegetable proteins in microencapsulation: A review of recent interventions and their effectiveness. *Industrial Crops and Products*, 42, 469-479.
- Nyane, N. A., Tlaila, T. B., Malefane, T. G., Ndwandwe, D. E., Owira, P. M. O. (2017). Metformin-like antidiabetic, cardio-protective and non-glycemic effects of naringenin: Molecular and pharmacological insights. *European journal of pharmacology*, 803, 103-111.
- Orive, G., Santos, E., Poncelet, D., Hernández, R. M., Pedraz, J. L., Wahlberg, L. U., Emerich, D. (2015). Cell encapsulation: technical and clinical advances. *Trends in pharmacological sciences*, 36 (8), 537-546.
- Pancelet D. *Microencapsulation: fundamentals, methods and applications*, Chapter · January 2006.
- Papanas, N., Maltezos, E. (2009). Metformin: a review of its use in the treatment of type 2 diabetes. *Clinical Medicine. Therapeutics*, 1, CMT-S1085.
- Park, J., Ye, M., Park, K., (2005). Biodegradable polymers for microencapsulation of drugs. *Molecules*, 10, 146–161.

- Patel, A., Ray, S., Thakur, R. A. M. S. (2006). In vitro evaluation and optimization of controlled release floating drug delivery system of metformin hydrochloride.
- Petlin, D. G., Tverdokhlebov, S. I., Anissimov, Y. G. (2017). Plasma treatment as an efficient tool for controlled drug release from polymeric materials: a review. *Journal of Controlled Release*, 266, 57-74.
- Philippe, J. (2009). Role et place des analogues du GLP-I dans le traitement du diabète de type 2. *Revue médicale suisse*, (206), 1260.
- Pillon, F., Tan, K., Jouty, P., Frullani, Y. (2014). Le traitement médicamenteux du diabète de type 2. *Actualités pharmaceutiques*, 53(541), 23-28.
- Priyadarshini, R., Nandi, G., Changder, A., Chowdhury, S., Chakraborty, S., Ghosh, L. K. (2016). Gastroretentive extended release of metformin from methacrylamide-gellan and tamarind seed gum composite matrix. *Carbohydrate Polymers*, 137, 100-110.
- Ramteke, K.H., Dighe, P.A., Kharat, A. R., Patil, S.V. (2014). Mathematical Models of Drug Dissolution: A Review. *Scholars Academic Journal of Pharmacy*, 3(5), 388-396.
- Rathore, S., Desai, P.M., Liew, C.V., Chan, L.W., Heng, P. W.S. (2013). Microencapsulation of microbial cells. *Journal of Food Engineering*, 116(2), 369-381.
- Raval, J.P., Naik, D. R., Amin, K.A., Patel, P.S. (2014). Controlled-release and antibacterial studies of doxycycline-loaded poly (ε-caprolactone) microspheres. *Journal of Saudi Chemical Society*, 18, 566-573.
- Raza, H., Javeria, S., Rashid, Z. (2020). Sustained released Metformin microparticles for better management of type II diabetes mellitus: in-vitro studies. *Materials Research Express*, 7(1), 015343.
- Rebitski, E. P., Darder, M., Sainz-Diaz, C. I., Carraro, R., Aranda, P., Ruiz-Hitzky, E. (2020). Theoretical and experimental investigation on the intercalation of metformin into layered clay minerals. *Applied Clay Science*, 186, 105418.
- Riekes MK, Malaquias Barboza F, Vecchia D D, Bohatch M, Farago P V, Fernandes D, Segatto Silva M A, Stulzer H K. (2011). Evaluation of oral carvedilol microparticles prepared by simple emulsion technique using poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and polycaprolactone as polymers. *Materials Science and Engineering C*, 31, 962–968

Romero, R., Erez, O., Hüttemann, M., Maymon, E., Panaitescu, B., Conde-Agudelo, Grossman, L. I. (2017). Metformin, the aspirin of the 21st century: its role in gestational diabetes mellitus, prevention of preeclampsia and cancer, and the promotion of longevity. *American journal of obstetrics and gynecology*, 217(3), 282-302.

Roselet, S. L., & Kumari, J. P. (2020). An investigation on host-guest complexation of Metformin hydrochloride with hydroxypropyl- α -cyclodextrin for enhanced oral bioavailability. *Materials Today: Proceedings*, 21, 514-518.

Saeedi, P., Petersohn, I., Salpea, P., Malanda, B., Karuranga, S., Unwin, N., IDF Diabetes Atlas Committee. (2019). Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas. *Diabetes research and clinical practice*, 157, 107843.

Saeedi, P., Salpea, P., Karuranga, S., Petersohn, I., Malanda, B., Gregg, E.W., Williams, R. (2020). Mortality attributable to diabetes in 20–79 years old adults, 2019 estimates: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas. *Diabetes research and clinical practice*, 162, 108086.

Sander, C., Madsen, K. D., Hyrup, B., Nielsen, H. M., Rantanen, J., Jacobsen, J. (2013). Characterization of spray dried bioadhesive metformin microparticles for oromucosal administration. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, 85(3), 682-688.

Sarwar, M. S., Ghaffar, A., Islam, A., Yasmin, F., Oluz, Z., Tuncel, E., Qaiser, A. A. (2020). Controlled drug release behavior of metformin hydrogen chloride from biodegradable films based on chitosan/poly (ethylene glycol) methyl ether blend. *Arabian Journal of Chemistry*, 13(1), 393-403.

Scheen, A. J. (1996). Clinical pharmacokinetics of metformin. *Clinical pharmacokinetics*, 30(5), 359-371.

Scheen, A. J. (2015). Antidiabétiques oraux dans le traitement du diabète de type 2: perspectives historique et médico-économique. *Médecine des maladies Métaboliques*, 9(2), 186-197.

Schugens, C., Laruelle, N., Nihant, N., Grandfils, C., Jérôme, R., Teyssie, P. (1994). Effect of the emulsion stability on the morphology and porosity of semicrystalline poly

l-lactide microparticles prepared by w/o/w double emulsion-evaporation. *Journal of controlled release*, 32(2), 161-176.

Sendil, D., Gürsel, I., Wise, D. L., Hasirc, V. (1999). Antibiotic release from biodegradable PHBV microparticles. *Journal of Controlled Release*, 59(2), 207-217

Shaikh, H. K., Kshirsagar, R. V., Patil, S. G. (2015). Mathematical models for drug release characterization: a review. *World journal of pharmacy and pharmaceutical sciences*, 4(4), 324-338.

Shariatnia, Z, Zahraee, Z. (2017). Controlled release of metformin from chitosan-based nanocomposite films containing mesoporous MCM-41 nanoparticles as novel drug delivery systems. *Journal of Colloid and Interface Science*, 501, 60-76.

Sharipova, A. A., Aidarova, S. B., Mutaliyeva, B. Z., Babayev, A. A., Issakhov, M., Issayeva, A. B., Miller, R. (2017). The use of polymer and surfactants for the microencapsulation and emulsion stabilization. *Colloids and Interfaces*, 1(1), 3.1-15

Sharma, H. K., Lahkar, S., Nath, L. K. (2013). Formulation and in vitro evaluation of metformin hydrochloride loaded microspheres prepared with polysaccharide extracted from natural sources. *Acta Pharmaceutica*, 63(2), 209-222.

Shima, M., Kobayashi, Y., Kimura, Y., Adachi, S., Matsuno, R. (2004) Effect of the hydrophilic surfactants on the preparation and encapsulation efficiency in course and fine W/O/W type emulsions. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Engineering Aspects*, 238, 83-90.

Soppimath, K. S., Aminabhavi, T. M., Kulkarni, A. R., Rudzinski, W. E. (2001). Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *Journal of controlled release*, 70(1-2), 1-20.

Su, Z., Sun, F., Shi, Y., Jiang, C., Meng, Q., Teng, L., Li, Y. (2009). Effects of formulation parameters on encapsulation efficiency and release behavior of risperidone poly (d, l-lactide-co-glycolide) microsphere. *Chem. Pharm. Bull.* 57(11) 1251—1256

Takada, S., Yamagata, Y., Misaki, M., Taira, K., Kurokawa, T. (2003). Sustained release of human growth hormone from microcapsules prepared by a solvent evaporation technique. *Journal of Controlled Release*, 88, 229-242.

- Thi, T. H. H., Lemdani, M., Flament, M. P. (2013). Optimizing the taste-masked formulation of acetaminophen using sodium caseinate and lecithin by experimental design. *International journal of pharmaceutics*, 453(2), 408-415.
- Tielmans, A., Laloi-Michelin, M., Coupaye, M., Virally, M., Meas, T., Guillausseau, P. J. (2006). Drug treatment of type 2 diabetes. *Presse medicale (Paris, France: 1983)*, 36(2 Pt 2), 269-278.
- Tshweu, L., Katata, L., Kalombo, L., Swai, H. (2013). Nanoencapsulation of water-soluble drug, lamivudine, using a double emulsion spray-drying technique for improving HIV treatment. *Journal of nanoparticle research*, 15(11), 1-11.
- Vallianou, N. G., Stratigou, T., Tsagarakis, S. (2019). Metformin and gut microbiota: their interactions and their impact on diabetes. *Hormones*, 1-4.
- Vardhan, H., Mittal, P., Adena, S. K. R., Mishra, B. (2017). Long-circulating polyhydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate nanoparticles for tumor targeted docetaxel delivery: formulation, optimization and in vitro characterization. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 99, 85-94.
- Vilos, C., Morales, F. A., Solar, P. A., Herrera, N. S., Gonzalez-Nilo, F. D., Aguayo, D. A., Velasquez, L. A. (2013). Paclitaxel PHBV nanoparticles and their toxicity to endometrial and primary ovarian cancer cells. *Biomaterials*, 34(16), 4098-4108.
- Vrignaud, S., Benoit, J.P., Saulnier, P. (2011). Strategies for the nanoencapsulation of hydrophilic molecules in polymer-based nanoparticles. *Biomaterials*, 32, 8593-8604.
- Vrignaud, S., Hureauux, J., Wack, S., Benoit, J.P., Saulnier, P. (2012). Design, optimization and in vitro evaluation of reverse micelle-loaded lipid nanocarriers containing erlotinib hydrochloride. *International Journal of Pharmaceutics*, 436, 194-200.
- Wieber, A., Selzer, T., Kreuter, J. (2011). Characterisation and stability studies of a hydrophilic decapeptide in different adjuvant drug delivery systems: A comparative study of PLGA nanoparticles versus chitosan-dextran sulphate microparticles versus DOTAP-liposomes. *International Journal of Pharmaceutics*, 421(1), 151-159.
- Williams, R., Karuranga, S., Malanda, B., Saeedi, P., Basit, A., Besançon, S., Colagiuri, S. (2020). Global and regional estimates and projections of diabetes-related health

expenditure: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas. *Diabetes research and clinical practice*, 162, 108072.

Xu, Y., Kim, C. S., Saylor, D. M., Koo, D. (2017). Polymer degradation and drug delivery in PLGA- based drug-polymer applications: A review of experiments and theories. *Journal of biomedical materials research part B: applied biomaterials*, 105(6), 1692-1716.

Yadav, A., Jain, D. K. (2010). Formulation and characterization of gastroretentive floating microballoons of metformin. *Int J Pharm Sci Res*, 1, 38-43.

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. *Chemical Engineering Science*, 55(12), 2223-2236.

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. *Chemical Engineering Science*, 55(12), 2223-2236.

Ydjedd, S., Bouriche, S., López-Nicolás, R., Sánchez-Moya, T., Frontela-Saseta, C., Ros-Berruezo, Rezgui, F., G., Kati, D. E. (2017). Effect of in vitro gastrointestinal digestion on encapsulated and nonencapsulated phenolic compounds of carob (*Ceratonia siliqua* L.) pulp extracts and their antioxidant capacity. *Journal of agricultural and food chemistry*, 65(4), 827-835.

Ye, C., Chi, H. (2018). A review of recent progress in drug and protein encapsulation: Approaches, applications and challenges. *Materials Science and Engineering: C*, 83, 233-246.

Zajkoska, P., Rebroš, M., Rosenberg, M. (2013). Biocatalysis with immobilized *Escherichia coli*. *Applied microbiology and biotechnology*, 97 (4), 1441-1455.

Zhao, H., Gagnon, J., Häfeli, U. O. (2007). Process and formulation variables in the preparation of injectable and biodegradable magnetic microspheres. *Biomagnetic research and technology*, 5 (1), 1-11.

Chapitre II.

Matériels et méthodes

II.1 Matériels

II.1.1 Principe Actif : chlorhydrate de metformine

Le chlorhydrate de metformine a été obtenu auprès de Granules INDIA (Madhapur, INDIA). Son degré de pureté est de 99,6 % et sa masse moléculaire est de 136,5 g. mol⁻¹.

II.1.2 Polymères

La matrice poly acide lactique (PLA) utilisé pour la préparation des microparticules est fournie en granulés et produite par l'industrie Evonik (Allemagne) sous le nom commercial « PLE 005».

L'hydroxypropyle méthyle cellulose (HPMC) utilisée dans cette étude est le methocel K4M provient de la compagnie Dow chemical (USA).

Le méthyle cellulose (MC) de viscosité 1000 Cp utilisé dans ce travail est fourni par Acofarma (Terrassa Barcelone).

II.1.3 Les tensioactifs

Les microparticules de PLA seront préparées à partir d'émulsions double, deux tensioactifs sont donc nécessaires à leurs formation. Dans notre travail nous avons utilisé plusieurs tensioactifs: Tween 80, Span 20, Span 80 et le Polyvinyle Alcool (PVA).

II.1.3.1 Tween® 80

Le nom chimique du Tween 80 est le Polysorbate 80. C'est un tensio-actif hydrophile biodégradable d'une HLB=15, sa masse molaire est égale à 1310 g/mol et sa viscosité varie de 300 à 500 Cp. Il est fourni par Acofarma, Madrid, Espagne.

II.1.3.2 Span 20

Le span 20 ou le polyoxyethylene sorbitane (20) monooleate d'une HLB égale à 8,6 est fourni par Acofarma, Madrid, Spain.

II.1.3.3 Span 80

Le Sorbitane monooléate (Span 80) est fourni par la société Croda Ibérica (Barcelone, Espagne). C'est un surfactant de type ester, d'une viscosité élevée (100 cP à 25 °C), d'un caractère lipophile, la valeur de son HLB est égale à 4,3 ; sa masse moléculaire est égale à 428 g/mole.

II.1.3.4 Le Polyvinylique Alcool (PVA)

Le PVA hydrolysé à 87 - 89 % avec une masse moléculaire de 30 000–70 000 g/mol ET d'une HLB égale à 18 fourni par Sigma-Aldrich a été utilisé dans cette étude.

II.1.4 Héparine sodique

L'héparine sodique à 5 % provient du Laboratoire ROVI (Barcelone, Espagne) est utilisée comme un anticoagulant sous forme d'une solution injectable.

II.1.5 Solvants et produits chimiques

L'eau utilisée dans cette étude est bi-distillée et purifiée avec un système de purification d'eau Milli-Q (Advantage A 10).

Le sodium Dodécile sulfate (SDS ultrapure), Acétate d'ammonium, le dihydrogénophosphate de potassium ainsi que l'hydroxyde de sodium (NaOH) sont fournis par Panreac, Barcelone. Les solvants utilisés (Dichlorométhane, Acétonitrile, Méthanol) sont de qualité analytique fournie par Sigma Aldrich.

II.2 Méthodes

II.2.1 Élaboration des microparticules

II.2.1.1 Étude préliminaire

Avant l'application de l'optimisation, des expériences préliminaires sont réalisées pour déterminer la meilleure combinaison de tensioactif auquel le procédé donne lieu à des microparticules. La préparation des microparticules est réalisée par la technique de double émulsion et évaporation de solvant (Figure 5) selon le mode opératoire décrit dans la littérature (Cózar-Bernal et al., 2011) .

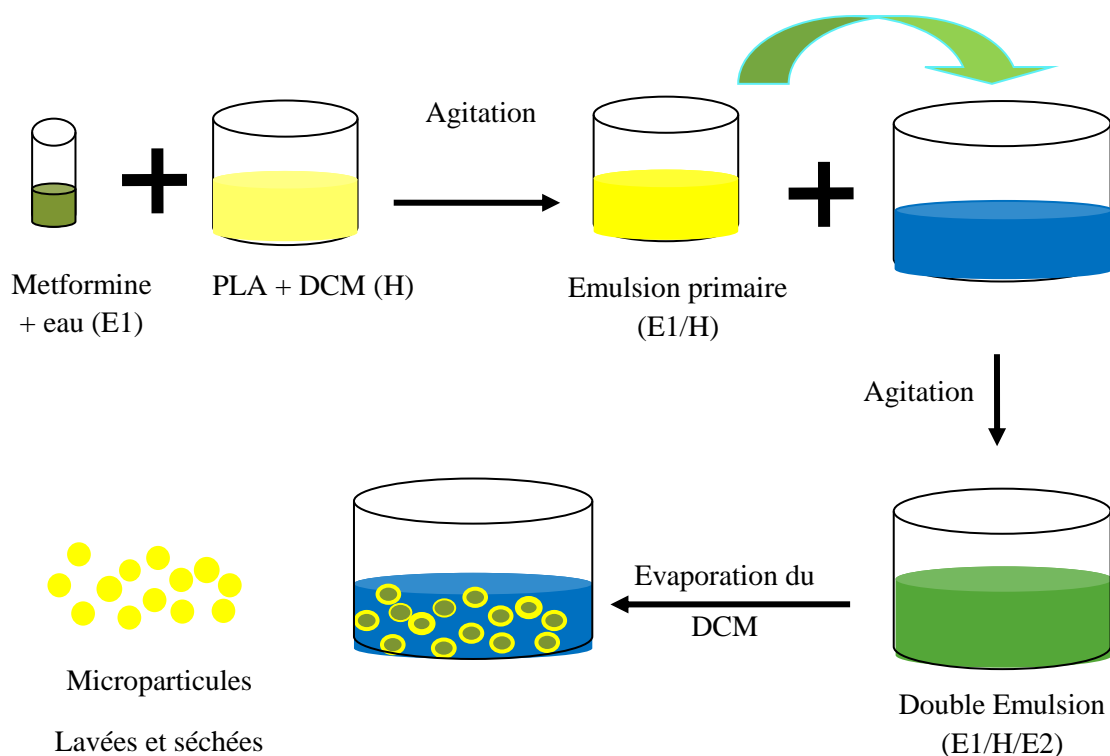


Figure 5. Schéma des différentes étapes de préparation des microparticules par double émulsion / évaporation de solvant.

Une solution aqueuse de Chlorhydrate de Metformine (1 ml contenant 5 mg en metformine) est ajoutée à 5 ml d'une solution de dichlorométhane à une concentration de 20 mg/ml en PLA en présence d'un tensioactif lipophile, une émulsion eau dans huile (E₁/H) est formée par agitation à l'aide d'un mélangeur à haute vitesse de cisaillement.

Cette émulsion est introduite goutte à goutte dans la phase aqueuse externe contenant un tensioactif sous forte agitation à l'aide d'un agitateur (IKA®Euro star 60) pour former une double émulsion (E₁/H/E₂). Le CH₂Cl₂ est ensuite évaporé sous agitation modérée (300 tr/min) à l'aide d'un mélangeur (IKA® RT 10 Power IKA MAG Agitateur magnétique multi-positions, plaque chauffante) à la température ambiante et sous pression atmosphérique.

Après centrifugation à 10 000 tr/min pendant 20 min, les microparticules sont récupérées, puis lavées avec l'eau distillée (60 ml) et ensuite séchées à l'aide d'un lyophilisateur de type (Freeze Dryers Telstar® CRYODOS, Liofilizador, Madrid,

Espagne) à $-80,0 \pm 0,5$ °C et 0,05 mbar pendant 24 h. Enfin, les microparticules sont conservées dans un dessiccateur en vue de réaliser des essais de caractérisations.

Trois formulations notées F1, F2 et F3 à différentes combinaisons de tensioactifs (Tween® 80/PVA, Span® 80/Tween® 80 et Span® 80/PVA) sont résumées dans le tableau ci-dessous.

Tableau 3. Pourcentages et tensioactifs utilisés lors des essais préliminaires

Formulations	F1	F2	F3
PLA (mg)	100	100	100
Metformine (mg)	25	25	25
Emulsion primaire (% v/v)	Tween 80 5	Span 80 5	Span 80 5
Emulsion secondaire (% w/v)	PVA 1,5	Tween 80 5	PVA 1,5

II.2.1.2 Modélisation et optimisation par les plans d'expériences

II.2.1.2.1 Introduction

L'approche classique consiste à varier un seul paramètre du procédé d'encapsulation et mesurer son effet sur les propriétés des microparticules en maintenant tous les autres paramètres constants. Malheureusement, cette méthode est longue et les interactions entre les paramètres du procédé ne peuvent pas être évaluées (**González Rodríguez et al., 2012 ; Nayak et al., 2014**).

Contrairement à la méthode classique, les plans d'expériences appliqués à l'étude des surfaces de réponses sont des méthodes statistiques faisant appel à des notions mathématiques qui consistent à sélectionner et planifier les essais afin d'identifier, les effets des paramètres sur la réponse tout en faisant varier tous les facteurs simultanément. Il permet aussi de détecter les interactions éventuelles entre les facteurs, de déterminer les facteurs optimum dans la formulation d'un nouveau produit et de prédire par modélisation mathématique le comportement d'un procédé (**Anderson-Cook et al., 2009**).

Les plans d'expériences sont appliqués à des études industrielles en recherche-développement dans de nombreux domaines vu qu'ils s'inscrivent dans une démarche générale d'amélioration de la qualité (**Zhang et Mao, 2017**). Actuellement, différents types des plans d'expériences existent, qui peuvent être regroupés en deux grandes familles ; les plans de criblage ou screening et les plans de modélisation (**Benoit et Yves, 1994**). Le choix d'un plan d'expérience adéquat afin de répondre à une problématique bien précise se fait selon les informations recherchées.

II.2.1.2.2 Choix des paramètres et du plan d'expérience

La méthode de micro-encapsulation par double émulsion évaporation est utilisée pour l'élaboration des microparticules du PLA chargées de metformine HCl. Plusieurs facteurs peuvent influencer les propriétés des microparticules. Pour cette étude, nous avons sélectionné les facteurs suivants :

- la quantité de metformine (mg)
- pH de la phase aqueuse externe
- quantité du PVA (% p/v)
- la vitesse d'agitation (rpm)

Un taux d'encapsulation important et une libération du médicament prolongée sont recherchées lors de la micro-encapsulation d'un principe actif, pour cela les réponses qu'on souhaite optimiser sont :

- L'efficacité d'encapsulation
- la taille des microparticules
- le potentiel zêta

Dans le but de modéliser et optimiser les différents facteurs influençant le procédé d'élaboration des microparticules, nous avons fait appel au plan d'expérience de Box Behnken combiné à la méthode de surface de la réponse (RSM). Selon ce dernier, chaque facteur est étudié à 3 niveaux différents noté (-1, 0, +1) en variables codées pour le niveau **faible, moyen et élevé** respectivement. Les niveaux de variation des paramètres étudiés ont été déterminés après quelques essais expérimentaux préliminaires.

Le Tableau 4 présente les paramètres utilisés ainsi que leurs niveaux. Dans cette étude, la concentration de PLA est maintenue constante dans toutes les expériences (20 mg/ml).

Tableau 4. Niveaux des paramètres d'élaboration des microparticules.

Paramètres	Code	Niveaux		
		-1	0	+1
Quantité de metformine (mg)	X ₁	25	50	75
pH de la phase aqueuse	X ₂	4	5,5	7
Quantité du PVA (% w/v)	X ₃	0,5	1	1,5
Vitesse d'agitation (rpm)	X ₄	400	800	1200

II.2.1.2.3 Construction du plan d'expériences

Le plan BOX-Behnken est une classe des modèles rotatoire de second ordre. Il est basé sur des modèles factoriels incomplets de trois niveaux. Le nombre d'expériences (N) nécessaires pour le développement du plan BOX-Behnken est défini par l'équation ci-dessous (**Ferreira et al., 2007**) :

$$N = 2 k * (k-1) + C_0 \dots\dots\dots(5)$$

Avec

k est le nombre de facteurs.

C₀ est le nombre des points centraux.

En fonction des quatre facteurs choisis et de leurs niveaux de variation, la matrice d'expériences à réaliser est déterminée par le logiciel JMP 7 (institut de SAS à Cary, NC, Etats Unis). Le plan d'expériences est détaillé dans le tableau 5 en variables codées. Les microparticules ont été synthétisées suivant le protocole expérimental décrit dans le paragraphe (§II.2.1.1).

Tableau 5. Matrice du plan d'expérience de Box Behnken en variables codées.

N° exp	Variables centrés réduites			
	X_1	X_2	X_3	X_4
1	-1	+1	0	0
2	-1	0	+1	0
3	0	+1	+1	0
4	0	0	-1	-1
5	+1	0	-1	0
6	-1	0	-1	0
7	+1	-1	0	0
8	0	-1	+1	0
9	0	+1	0	+1
10	0	-1	-1	0
11	0	0	+1	+1
12	+1	0	+1	0
13	+1	0	0	-1
14	0	0	0	0
15	-1	0	0	+1
16	0	-1	0	+1
17	0	-1	0	-1
18	0	+1	-1	0
19	0	0	0	0
20	+1	0	0	+1
21	0	0	-1	+1
22	0	0	+1	-1
23	-1	-1	0	0
24	0	+1	0	-1
25	+1	+1	0	0
26	-1	0	0	-1
27	0	0	0	0

II.2.1.3 Étude de formulation des particules de PLA co-stabilisées par des biopolymères

Afin d'étudier l'influence des biopolymères HPMC et MC comme co-tentioactifs sur les propriétés des microparticules et la cinétique de libération, des microparticules (notés E1-E5 et E6-E10, respectivement) ont été préparées dans les conditions optimales estimées lors de l'étude d'optimisation par les surfaces de réponses selon le mode opératoire décrit précédemment. Le span 80 a été substitué par la MC et l' HPMC et nous avons fait varier leur concentration de 0,05 à 0,5 % (w/v).

II.2.2 Caractérisation des microparticules

L'encapsulation de la metformine dans la matrice PLA a été mise en évidence par évaluation de l'efficacité d'encapsulation en utilisant la chromatographie en phase liquide haute performance (HPLC).

La connaissance détaillée des propriétés structurale et morphologique des microparticules élaborées chargées ou non de metformine passe par une combinaison de plusieurs techniques d'analyse telles que la granulométrie à diffraction laser, la microscopie électronique à balayage (MEB), la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF), la diffraction des rayons X (DRX), les propriétés thermiques des microparticules élaborées ont été suivies par l'analyse calorimétrique différentielle à balayage (DSC).

II.2.2.1 Détermination de l'efficacité d'encapsulation

L'efficacité d'encapsulation (Encapsulation Efficiency : EE %), correspondant au pourcentage de matière active dans les microparticules est évaluée par dosage indirect de la quantité non encapsulées présente dans le surnageant récupéré après centrifugation (**Bahari Javan et al., 2016 ; Homar et al., 2007**). La quantification de la metformine dans le surnageant a été réalisée par chromatographie liquide haute performance (high performance liquid chromatography : HPLC) suivant la méthode décrite ci-dessous.

1 ml du surnageant filtré avec des filtres de 0,22 μm de diamètres des pores est dilué dans l'eau distillée, ensuite sont introduit dans des ampoules destinées à des analyses par HPLC (Hitachi autosampler L-2200, Elite Lachrom) pour déterminer la quantité de metformine non encapsulées.

Le système chromatographique est composé d'un réservoir de solvant (phase mobile), d'un système de pompage, d'une colonne (phase stationnaire), d'un injecteur, d'un détecteur UV-Vis et d'une station d'acquisition de données. L'appareil utilisé est équipé d'une colonne C18, 125 x 4 mm, 5 µm (Lichrospher® 100 RP-18- Merck, Barcelona). Les conditions opératoires de la colonne ont été optimisées : phase mobile est un mélange acétonitrile: tampon dihydrogenophosphate de potassium (0,02 M pH= 6,8) 60:40 %. La température de la colonne est de 45 °C ; temps d'expérience 7 min ; détection UV à la longueur d'onde de 236 nm et le volume d'injection de 10 µL. Les expériences ont été effectuées en triplicata (**Maestrelli et al., 2017**).

L'efficacité d'encapsulation EE (%), définie comme étant le rapport de la quantité de metformine encapsulée et la quantité introduite initialement, est déterminé par la formule suivante :

$$EE(\%) = \frac{m_2}{m_1} \times 100 \dots \dots \dots (6)$$

Où : m_1 est la masse initiale de la metformine

m_2 est la masse de la metformine dans les microparticules, c'est la différence entre la masse initiale introduite et la masse en metformine dans le surnageant.

II.2.2.2 Mesure de la taille des microparticules

La taille des microparticules et leur distribution sont deux paramètres d'indicateurs d'homogénéité des microparticules.

Dans notre étude, la détermination de la taille des microparticules est effectuée en solution en utilisant deux appareils ; un de type Partica et un de type Mastersizer 2000. La gamme de taille des microparticules détectées par le granulomètre à diffraction laser de type Partica (LA-950 V2, Horiba, Kyoto, Japan) est de 0,01 à 3000 µm et la gamme de mesure de l'appareil Mastersizer 2000 (Malvern Instruments) est comprise entre 0,2 µm et 2000 µm.

Avant d'effectuer la mesure, on doit tenir compte des hypothèses suivantes : lumière incidente monochromatique, particules sphériques, milieu de dispersion non absorbant. L'indice de réfraction utilisé pour le calcul de taille des microparticules η_{PLA}/η_{eau} est de 1,12 ($\eta_{PLA}=1,482$, $\eta_{eau}=1,333$). Par cette méthode, un cycle de 3

mesures successives est effectué pour chaque test. Avant de réaliser l'analyse, les microparticules sont dispersées dans l'eau distillée.

Les données brutes sont traitées par le logiciel *Sizer Sv2.17* (Malvern Instruments, Orsayn France) afin de déterminer la distribution de taille des particules. Les résultats obtenus sont exprimés soit en diamètre moyen en volume **D[4,3]**, ou bien en diamètre moyen en surface **D[3,2]**. La distribution moyenne de la taille des microparticules aussi appelé Span est utilisée pour décrire les résultats granulométriques obtenus.

$$\text{Span} = \frac{d_{90}-d_{10}}{d_{50}} \dots\dots\dots(7)$$

Les critères d10, d50 et le d90 exprimés en micromètres (µm), signifient que 10 % 50 % ou 90 % des particules en volume ont un diamètre inférieur à ce critère.

II.2.2.3 Mesure du potentiel zêta

Le potentiel fournit des informations sur la stabilité et la charge des microparticules en solution et dans les fluides physiologiques.

Les mesures du potentiel zêta sont réalisées sur les microparticules après lyophilisation. Nous avons préparé des suspensions de 0,1 g de chaque échantillon dans 10 ml d'eau distillée ou le milieu physiologique adéquat (solution physiologique simulée de pH 1,2 ou 6,8), la suspension est bien agitée et ensuite le potentiel zêta a été mesuré à 25 °C par diffusion dynamique de la lumière à l'aide de l'appareil Zetasizer de type Nano ZS 90 (zêta mètre NS, Malvern Instruments, Worcestershire, UK) équipé d'un laser de longueur d'onde $\lambda = 633$ nm et d'un angle de détection de 90 °. Les résultats ont été rapportés comme la moyenne de trois différentes mesures par échantillon.

II.2.2.4 Microscopie Electronique à Balayage (MEB)

La caractérisation de la morphologie et de l'état de surface des microparticules obtenues ont été effectués par microscopie électronique à balayage (MEB). Dans notre étude, nous avons utilisé deux appareils MEB Philips XL30 et Zeiss Evo 50 (Allemagne) au centre CITIUS de l'université de Séville (Espagne).

Les microparticules sont déposées sur un ruban adhésif double face d'un porte-échantillon puis métallisées avec un mélange constitué de palladium et d'or (épaisseur

de 10 nm) par pulvérisation (Edward S X PIRANI50 I) pendant 5 min sous vide ($4,5 \times 10^{-4}$ Pa). Les microparticules sont ensuite examinées à différents grossissements à la tension d'accélération de 20 kV.

II.2.2.5 Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (IRTF)

L'Analyse des microparticules par Spectroscopie Infra-rouge à Transformée de Fourier (FTIR) a été mise en œuvre afin de mettre en évidence la présence de l'agent encapsulé (la metformine) dans les microparticules du PLA. Cette technique aussi est utilisée pour détecter les interactions entre le PLA et la metformine susceptible de se former lors de la microencapsulation.

À cet effet, des échantillons ont été mélangés avec du KBr parfaitement sèche (1 mg de l'échantillon dans 80 mg de KBr), pressés sous forme de pastilles avec une presse hydraulique à 70 kN pendant 5 min. Les spectres IRTF ont été enregistrés en mode transmittance entre 4 000 et 400 cm^{-1} avec un nombre de scans de 20 et d'une résolution de 1 cm^{-1} sur un appareil FTIR Shimadzu (université de Bejaia). Le logiciel IR affinity permet la sauvegarde et le traitement des données.

II.2.2.6 Analyse calorimétrique différentielle (DSC)

L'analyse calorimétrique différentielle (Differential Scanning Calorimetry : DSC) est l'une des méthodes les plus utilisées pour la caractérisation de la structure cristalline des polymères et des principes actifs. Cette technique permet aussi d'enregistrer les températures de transition vitreuse (T_g), les enthalpies de cristallisation et de fusion (T_f) qui se produisent au cours du chauffage (ou du refroidissement) d'une substance ou d'un mélange de substances (**pharmacopée européenne, 2008**).

Les propriétés thermiques des matériaux purs (PLA, metformine), les microparticules élaborées et les mélanges physiques respectifs de metformine avec le polymère PLA ont été étudiées avec un appareil type DSC-131 Setaram à l'université de Séville.

Les échantillons, d'une masse d'environ 10-12 mg, sont introduits dans des creusets DSC en aluminium de 40 μl fermé avec des couvercles. Les échantillons sont soumis au cycle de température (30–300 $^{\circ}\text{C}$) avec une vitesse de chauffage de 10 $^{\circ}/\text{min}$. Les T_f et T_g en $^{\circ}\text{C}$ ont été déterminés sur les courbes de chauffage et la valeur de

l'enthalpie de fusion est obtenue par intégration du pic de fusion. Un balayage thermique a été effectué suivi d'un refroidissement pour chaque échantillon.

II.2.2.7 Diffraction des Rayons X (DRX)

La caractérisation de l'état cristallin est nécessaire pour détecter les éventuelles modifications des propriétés physiques du principe actif incorporé dans les microparticules et celle du polymère. La structure cristalline de la metformine pure et celle du PLA pur, et les microparticules a été étudiée par diffraction des rayons X (DRX).

Les analyses DRX ont été effectuées sur un diffractomètre à poudre X' Pert-Pro (PANalytical, Netherland) à Université A. Mira, Bejaia. La raie $K\alpha$ du cuivre a été utilisée comme source des rayons X ($K-\alpha_1 = 1,540598 \text{ \AA}$). Les diffractogrammes DRX des échantillons ont été enregistrés entre 5 et 80° (40°) avec un balayage de 5° min^{-1} sous un potentiel de 40 kV et une intensité du courant de 30 mA .

II.2.3 Études de libération *in vitro* de la metformine encapsulés dans les microparticules

La technique retenue pour étudier la libération *in vitro* de la metformine incorporée dans les microparticules est la technique de la membrane de dialyse (**D' Souza, 2014**).

Deux milieux de libération sont étudiés, une solution acide à pH 1,2 et une solution tampon phosphate à pH 6,8. Ces deux milieux sont préconisés par la Pharmacopée française (édition de 2006) pour l'étude des formes à libération prolongée, simulent respectivement le milieu gastrique et le milieu intestinal.

➤ Mode opératoire

Les microparticules pesés de façon à contenir une quantité équivalente de 5 mg en metformine, sont introduites dans une membrane de dialyse formé d'un film de cellulose (rétention MWCO: $12-14,000 \text{ Da}$, Spectra/Por 6, laboratoires Spectrum, EE.UU), dont les extrémités sont fermées par deux pinces (OSI, Elancourt, France).

La membrane de dialyse contenant les microparticules est immergé dans le milieu de dissolution (100 ml) placé dans un bécher qui est placé dans un bain-marie à $37 \pm 0,5$

°C sous agitation modérée à 100 tours/minute (agitateur immergeable Variomag tele modul 20P, Bioblock Scientific, Illkirch, France). La libération in vitro de la metformine à partir des microparticules est étudiée pendant 2 h dans le milieu gastrique, puis dans le tampon phosphate pH 6,8 pendant 24 h. Trois répétitions seront effectuées pour chaque échantillon testé.

Des prélèvements d'un volume de 2 ml du milieu sont réalisés aux temps 15, 30,45 et 60 minutes ainsi qu'aux temps 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 et 24 heures après immersion du sac de dialyse dans le milieu de libération. La metformine est dosée par la méthode HPLC décrite précédemment (pages 54-55). A chaque mesure, le volume prélevé est réintroduit dans le milieu de libération.

A la fin de la manipulation, le résidu des microparticules dans la membrane du dialyse est récupéré et une extraction liquide-liquide de la metformine est appliquée selon la méthode décrite ci-dessous. Une quantité connue de poudre de microparticules est pesée et dissoute dans du dichlorométhane (2 ml). Quatre extractions de la phase organique sont réalisées consécutivement à l'aide de l'eau bi-distillée (8 ml). Vu sa grande hydrophilie, la metformine passe vers la phase aqueuse, ou il sera ensuite dosé par HPLC.

II.2.4 Pharmacocinétique des microparticules de metformine chez des lapins

Comme nous l'avions décrit précédemment, le but de notre travail est de développer une formulation de microparticules de polymère -PLA- permettant une libération prolongée et une amélioration de la biodisponibilité de la metformine. Très peu de travaux en ce sens ont été réalisés sur le PLA pour une administration orale.

Dans cette optique, une étude pharmacocinétique des microparticules du PLA chargée en metformine, après administration d'une dose unique a été explorée chez des lapins.

II.2.4.1 Préparation des animaux

Toutes l'étude a été réalisée sur des lapins femelles New zélandaise provenant de la Faculté de Vétérinaire de l'Université de Murcie (Espagne) de poids compris entre 1759- 1814 g à leur arrivée.

Les animaux sont placés dans des cages par groupe de 2, au sein d'une salle à température ambiante (20 ± 1 °C). Les lapins sont maintenus dans un cycle de 12 heures d'obscurité et 12 heures de lumière et sont nourris avec de granules d'aliment standard (RABIUNIC NANTA, Madrid, Espagne). Les animaux ont accès libre à la nourriture et à l'eau. Les lapins n'ont pas reçu de traitement avant les expériences et tous les protocoles expérimentaux ont été effectués en conformité avec les recommandations de la législation nationale appliquée et approuvée par le comité bioéthique de l'université de Murcie (numéro d'agrément de l'animalerie de laboratoire).

II.2.4.2 Protocole expérimental

Les lapins ont été répartis en trois groupes de cinq. Chaque animal a reçu une dose de 5 mg/kg de chlorhydrate de metformine. Chaque solution est préparée par dissolution de la quantité adéquate de la metformine (équivalent de microparticules) dans un sérum physiologique (1,5 ml) le jour même de l'étude.

- le groupe 1 : les lapins ont reçu par voie intraveineuse une dose de metformine en solution, l'administration est réalisée par injection dans la veine marginale de l'oreille du l'animal.
- le groupe 2 : les lapins ont reçu une dose de metformine en solution par voie oral.
- le groupe 3 : les lapins ont reçu une dose de metformine encapsulée par voie oral à l'aide d'une aiguille d'alimentation connectée à une seringue.

Avec une seringue contenant de l'héparine comme anticoagulant, des échantillons de sang de 1 ml ont été prélevés dans la veine marginale de l'oreille du lapin aux temps suivants : 10, 20, 30, 45, 60, 90 minutes et à 2, 4, 6, 8, 10, 24, 34, 48 heures après l'administration de la dose de metformine.

Les prélèvements sanguins sont centrifugés juste après la collecte pendant 10 min à 10.000 rpm. Les échantillons de plasma récoltés ont été congelé à -50 °C, jusqu'à ce

qu'ils soient dosés pour déterminer la concentration plasmatique de la metformine et d'évaluer les paramètres pharmacocinétiques.

II.2.4.3 Analyse du plasma

Les concentrations plasmatiques en metformine ont été déterminées par HPLC après l'étape d'extraction comme décrite ci-dessous :

Tout d'abord les échantillons sont décongelés et 200 µl de plasma est mélangé avec 200 µl d'acetonitrile pour précipiter les protéines sous agitation (un vortex pendant 1 min après 5 min dans un bain ultrasons) suivie d'une centrifugation à 12000 tr/min pendant 10 min. Cette étape permet d'isoler les analytes qui seront solubles dans la phase organique et d'éliminer par hydrolyse les autres molécules comme les protéines. Ensuite 200 µl du surnageant est mélangé avec la phase aqueuse (ratio 1 : 3) et transféré dans des ampoules destinées à l'analyse HPLC. Les paramètres pharmacocinétiques ont été calculés par utilisation de la méthode non compartimentale.

La détermination de la concentration de la metformine est effectuée par la méthode décrite par Carceles Rodriguez (**Carceles Rodriguez et al., 2019**). L'analyse HPLC a été réalisée à l'aide d'une HPLC JASCO 1575 avec un détecteur UV/VIS à une longueur d'onde de 236 nm. La séparation chromatographique est réalisée sur une colonne Kromasil C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm Analyse Vinicos S.L. Espagne) à 25 °C. La phase mobile utilisée est un mélange d'acetonitrile, acétate d'ammonium (25 mM) dodécyle sulfate de sodium (9 mM) (pH=7,02) 45 : 55. Le débit et le volume d'injection sont 1 ml/min et 100 µl respectivement. En vue de quantifier la metformine plasmatique, une courbe d'étalonnage réalisé avec le plasma du lapin a été déterminée dans l'intervalle de concentration entre 100-10000 µg/L, la durée du chromatogramme est de 10 minutes et le temps de rétention de la metformine est d'environ 4,3 minutes (Figure 6). Le coefficient de corrélation obtenue est de $R^2 = 0,99$.

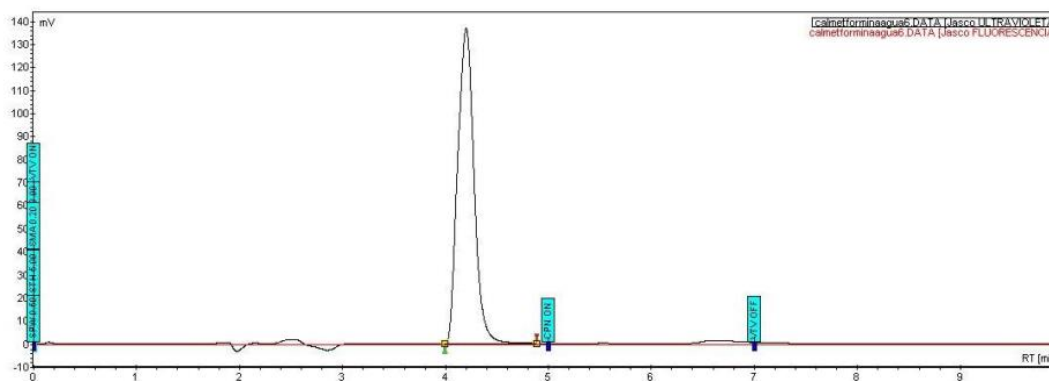


Figure 6. Chromatogramme obtenu par HPLC pour la metformine dans le plasma du lapin.

II.2.4.4 Analyse pharmacocinétique

Les paramètres pharmacocinétiques ont été estimés sur la base des courbes de concentration plasmatique obtenues pour chaque groupe après administration orale ou intraveineuse de la solution de la metformine ou après administration orale des microparticules de metformine, par une analyse non compartimentale, réalisée à l'aide du logiciel Win Nonlin (Professional® version 5,3).

Les paramètres estimés sont : la concentration plasmatique maximale (C_{max}), le temps du pic de concentration maximale (T_{max}), les surfaces sous la courbe des concentrations plasmatiques (AUC, Area Under concentration-time Curve), temps de demi-vie plasmatique $t_{1/2}$, volume de distribution (Vd) et clairance (CL), la constante d'élimination (K_{el}), le temps moyen de résidence (mean residence time, MRT), le temps moyen d'adsorption (mean adsorption time, MAT) et la biodisponibilité F.

II.2.4.5 Analyse statistique des résultats

Tous les paramètres analysés sont déterminés en moyenne pour chacun des groupes et présentés sous la forme de moyenne \pm l'écart type. Les différences entre les différentes formes de metformine sont déterminées en comparant tous les variables étudiées à l'aide d'un test de Kruskal-Wallis. Les différences sont considérées significatives au seuil de $p < 0,05$.

Références bibliographiques

Anderson-Cook, C. M., Borror, C. M., Montgomery, D. C. (2009). Response surface design evaluation and comparison. *Journal of Statistical Planning and Inference*, 139(2), 629-641.

Bahari Javan, N., Rezaie Shirmard, L., Jafary Omid, N., Akbari Javar, H., Rafiee Tehrani, M., Abedin Dorkoosh, F. (2016). Preparation, statistical optimisation and in vitro characterisation of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)/poly (lactic-co-glycolic acid) blend nanoparticles for prolonged delivery of teriparatide. *Journal of microencapsulation*, 33(5), 460-474.

Benoit, D., Yves, T, S. (1994). *Plans d'expériences: construction et analyse*. Edition: Lavoisier. Paris.

Cózar-Bernal, M. J., Holgado, M. A., Arias, J. L., Muñoz-Rubio, I., Martín-Banderas, L., Alvarez-Fuentes, J., Fernández-Arévalo, M. (2011). Insulin-loaded PLGA microparticles: flow focusing versus double emulsion/solvent evaporation. *Journal of Microencapsulation*, 28(5), 430-441.

D'Souza, S. (2014). A review of in vitro drug release test methods for nano-sized dosage forms. *Advances in Pharmaceutics*, 1-12.

Ferreira, S. C., Bruns, R. E., Ferreira, H. S., Matos, G. D., David, J. M., Brandão, G. C., Dos Santos, W. N. L. (2007). Box-Behnken design: an alternative for the optimization of analytical methods. *Analytica chimica acta*, 597(2), 179-186.

González- rodríguez, M. L., Mouram, I., Cózar- bernal, M. J., Villasmil, S., Rabasco, A. M. (2012). Applying the Taguchi method to optimize sumatriptan succinate niosomes as drug carriers for skin delivery. *Journal of pharmaceutical sciences*, 101(10), 3845-3863.

Homar, M., Ubrich, N., Ghazouani, F. E., Kristl, J., Kerč, J., Maincent, P. (2007). Influence of polymers on the bioavailability of microencapsulated celecoxib. *Journal of microencapsulation*, 24(7), 621-633.

Maestrelli, F., Mura, P., González-Rodríguez, M. L., Cózar-Bernal, M. J., Rabasco, A. M., Mannelli, L. D. C., Ghelardini, C. (2017). Calcium alginate microspheres

containing metformin hydrochloride niosomes and chitosomes aimed for oral therapy of type 2 diabetes mellitus. *International journal of pharmaceutics*, 530 (1-2), 430-439.

Nayak, A. K., Pal, D., Santra, K. (2014). Ispaghula mucilage-gellan mucoadhesive beads of metformin HCl: Development by response surface methodology. *Carbohydrate polymers*, 107, 41-50.

Pharmacopée Européenne 6^{ème} édition, 2008

Ross, M. S. F. (1977). Determination of metformin in biological fluids by derivatization followed by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 133(2), 408-411.

Zhang, L., Mao, S. (2017). Application of quality by design in the current drug development. *Asian journal of pharmaceutical sciences*, 12(1), 1-8.

Chapitre III.

Résultats et discussions

Partie 1. Optimisation des paramètres d'encapsulation par les plans d'expériences

III.1.1 Introduction

Ce chapitre comporte trois parties : la première concerne la modélisation et l'optimisation de la microencapsulation de la metformine dans des microparticules de PLA. La deuxième partie a pour objet de caractériser la formulation optimale élaborée par différentes techniques physico-chimiques. La troisième partie est consacrée à l'étude de libération *in vitro* et *in vivo* de la metformine.

III.1.2 Sélection du couple de surfactants approprié

L'étape essentielle lors de la formulation des microparticules par double émulsion de type W/O/W évaporation du solvant est la stabilité de l'émulsion primaire et secondaire. La préparation des microparticules par cette méthode fait intervenir dans leurs compositions deux tensio-actifs. Pour cela, le choix des émulsifiants appropriés est primordial afin d'obtenir une stabilité optimale.

Dans une première expérience, le couple Tween 80/PVA a été utilisée pour stabiliser l'émulsion primaire et secondaire respectivement (l'expérience 1), nous avons remarqué une séparation de phase ce qui n'a pas permis la formation d'une émulsion stable et donc aucune microparticule n'est obtenue. Ce résultat n'est pas conforme avec ceux obtenus dans la littérature (**Cózar-Bernal et al., 2011 ; Amasya et al., 2016**) qui, dans leurs études ont utilisé le tween 80 pour stabiliser l'émulsion primaire lors de la préparation des microparticules par la méthode de double émulsion évaporation de solvant (**Cózar-Bernal et al., 2011 ; Amasya et al., 2016**). La séparation de phase observée dans notre cas est peut-être due aux propriétés du tween 80 et de la metformine. L'utilisation de tween 80 ne permet pas la synthèse des microparticules de PLA et de la metformine.

Dans l'expérience (2), nous avons utilisé le span 80 et le tween 80 pour stabiliser la première et la seconde émulsion respectivement. Une émulsion stable est formée et une poudre de particule est obtenue avec présence des agrégats facilement détectable visuellement. Leurs observations au microscope électronique à balayage montrent la présence des agrégats et des microparticules formées (figure 7). Ce résultat est en accord avec ceux obtenus par Cosco et collaborateurs (**Cosco et al., 2015**).

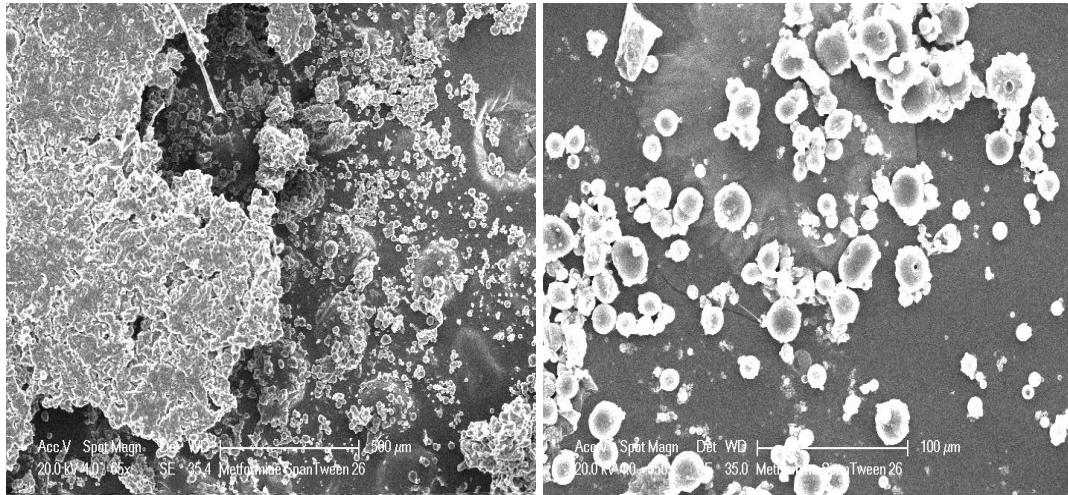


Figure 7. Observation au microscope électronique à balayage des microparticules préparés avec Span[®] 80/Tween[®] 80 (Barre d'échelle =500,100 μm).

Dans le but d'éliminer/diminuer les agrégats, nous avons réalisé l'expérience (3) où le Tween[®] 80 est remplacé par le PVA pour stabiliser la première et la seconde émulsion respectivement. Une émulsion stable s'est formée et des microparticules sont obtenues. Leurs observations au microscope électronique à balayage révèlent que les microparticules préparées ont une forme sphérique et aucun agrégat n'est observé (Figure 8).

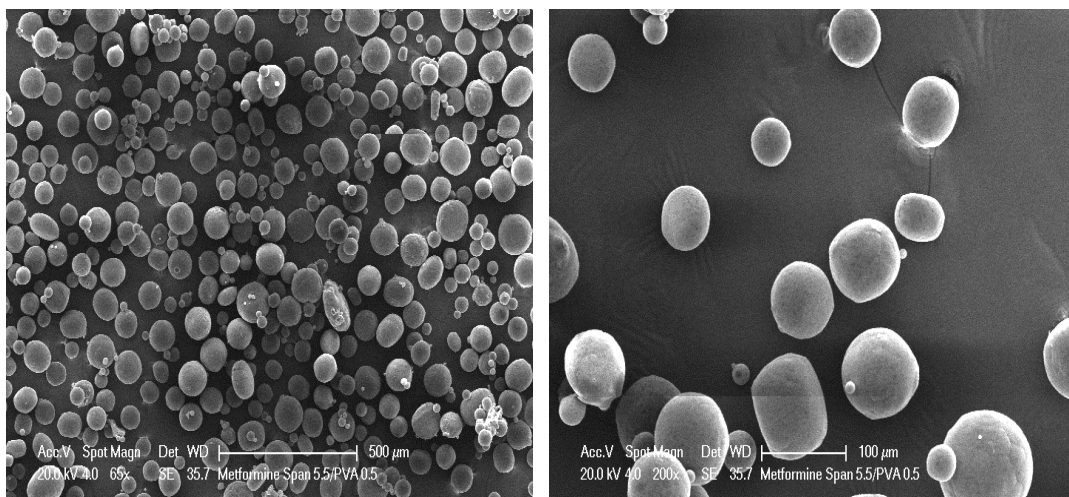


Figure 8. Observation au microscope électronique à balayage des microparticules préparés avec le Span[®] 80/PVA (Barre d'échelle =500,100 μm).

Afin de préparer des microparticules à base de polymères par la méthode de double émulsion évaporation du solvant, la stabilité de l'émulsion primaire (E1/H) et secondaire (E1/H/E2) est un paramètre critique et qui dépend essentiellement de la nature du tensioactif utilisé.

La stabilisation d'émulsion de type eau/huile (E/H) est couramment obtenue par l'utilisation d'un tensioactif avec une faible valeur d'HLB (Hydrophilic-Lipophilic Balance, ou équilibre hydrophile/lipophile) tel que le span[®] 80 (4,6). (**Dinarvand et al., 2005**). L'utilisation du PVA, un tensioactif de type polymère dont la valeur du HLB est de 18 conduits à la formation des microparticules sans agrégations par comparaison au Tween[®] 80 (**HLB 15**) (**Xu et al., 2009**). Pour la suite de l'étude, le couple Span[®] 80/PVA est utilisé dans l'élaboration des microparticules.

III.1.3 Optimisation et modélisation par les plans d'expériences

Ce travail vient comme suite à l'étude réalisée sur le criblage par la méthode classique des facteurs qui influent sur l'efficacité d'encapsulation de la metformine dans un polyester (PLA) obtenue par double émulsion évaporation du solvant (**Bouriche, 2013**). Cette étude a permis de dégager un ensemble de facteurs jugés influents sur l'efficacité d'encapsulation.

Dans ce travail, nous avons pu réaliser une optimisation de ces facteurs en utilisant les plans d'expériences d'optimisation du type 'surface de réponse'. Les microparticules ont été préparées par la méthode de double émulsion-évaporation du solvant (E₁/H/E₂) conformément au plan de Box Behnken généré par le logiciel JMP 7 (Institut SAS a Cary, NC, USA).

Les résultats expérimentaux de l'efficacité d'encapsulation, de la taille et du potentiel zêta des microparticules obtenus sont présentés dans le tableau 6.

Tableau 6. Résultats expérimentaux de l'efficacité d'encapsulation (Y1), de la taille des microparticules (Y2) et le potentiel zêta (Y3).

Test	EE (%)	Y2 (μm)	Y3 (mV)
1	53,91	383,76	-15,20
2	66,14	129,4	-8,11
3	23,38	87,94	-23,5
4	25	721	-14,2
5	24,35	565,31	-31,4
6	23,02	1723,52	-17,7
7	26,18	1543,86	-22,1
8	29,93	262,62	-26,1
9	15,38	258,53	-24,4
10	26,1	1643,08	-27,5
11	5,57	72,28	-8,54
12	24,7	378,56	-31,9
13	35,92	99,92	-19,5
14	15,73	325,29	-8,5
15	28,78	433,72	-11,9
16	10,84	54,58	-18,1
17	33,54	897	-17,4
18	8,56	900,94	-27,7
19	15,18	381,96	-8,69
20	16,7	73,32	-25,5
21	15,08	378,27	-33,8
22	30,88	245	-31,7
23	42,74	264,77	-6,91
24	21,19	188,2	-18,1
25	24,49	205	-24
26	52,47	144	-10,7
27	6,16	323,59	-7,94

D'après le tableau 6, on remarque que l'efficacité d'encapsulation varie entre 5 % et 66 %. La valeur maximale de l'efficacité d'encapsulation a été trouvée suivant les conditions d'essai N° 2. Ce résultat est en accord avec ceux obtenus dans la littérature (Han et al., 2001). La taille des microparticules varie de 54 μm à 1723 μm , la valeur minimale de taille a été enregistrée pour les conditions d'encapsulation de l'essai N° 16.

Le potentiel zêta est négatif pour toutes les microparticules, il varie de -6,91 à -33,8 mV. Les variations des réponses sont importantes, ce qui confirme l'influence des paramètres (quantité de metformine, pH, concentration du PVA, vitesse d'agitation) sur les réponses étudiés.

III.1.3.1 Estimation graphiques des effets principaux et les interactions

L'analyse graphique des effets principaux et les interactions des paramètres nous informent de leurs influences sur les valeurs moyennes des réponses étudiées (l'efficacité d'encapsulation, la taille et le potentiel zêta) lors de la microencapsulation. La représentation graphique de ses effets est donnée par le logiciel **Minitab 14**.

III.1.3.1.1 Efficacité d'encapsulation

Au vu de la figure 9, qui représente les effets principaux des facteurs sur l'efficacité d'encapsulation, on remarque que l'augmentation de la quantité en metformine (X_1) de 25 à 50 mg est accompagnée d'une augmentation de l'efficacité d'encapsulation puis une diminution au-delà de cette masse. Ceci s'explique qu'au-delà d'un rapport metformine /polymère de ($\frac{1}{2}$) moins de metformine sera encapsulé.

Pour l'influence du pH (X_2), on remarque que la variation du pH de 4 à 5,5 n'a pas d'effet significatif sur l'efficacité d'encapsulation. Mais la variation du 5,5 à 7 engendre l'accroissement du l'EE. La variation de la concentration du PVA (X_3) semble ne pas avoir d'effet significatif sur l'efficacité d'encapsulation.

Concernant l'influence de la vitesse d'agitation (X_4), d'une manière générale, l'effet est défavorable surtout à partir de la vitesse d'agitation de 800 tr/min. Ceci est dû à la fragmentation des microparticules d'où des efficacités d'encapsulations faibles.

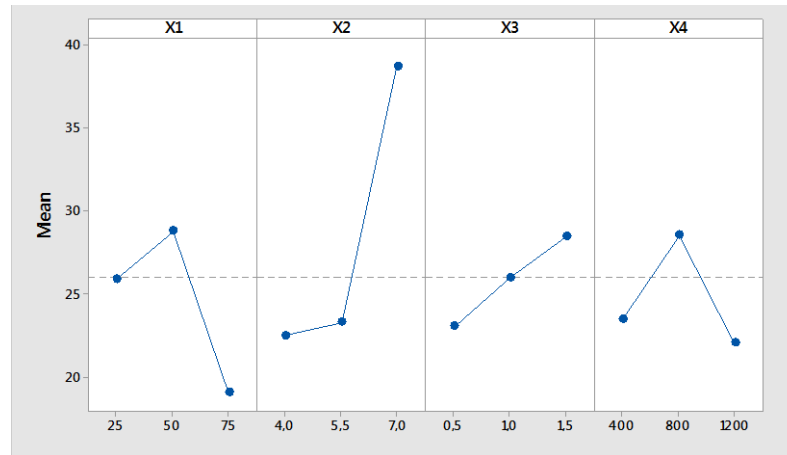


Figure 9. Diagramme des effets principaux sur l'efficacité d'encapsulation moyenne

L'effet des interactions est relatif à l'influence combinée des deux facteurs en question. Certaines interactions ont un effet positif, d'autres un effet négatif et d'autres sont sans effet sur la microencapsulation de la metformine dans le PLA. D'après la figure 10, on constate que les effets d'interactions entre le PVA et le pH (X_3X_2), PVA et vitesse d'agitation (X_3X_4) et la vitesse d'agitation et le pH (X_4X_2) sont importants pour l'efficacité d'encapsulation.

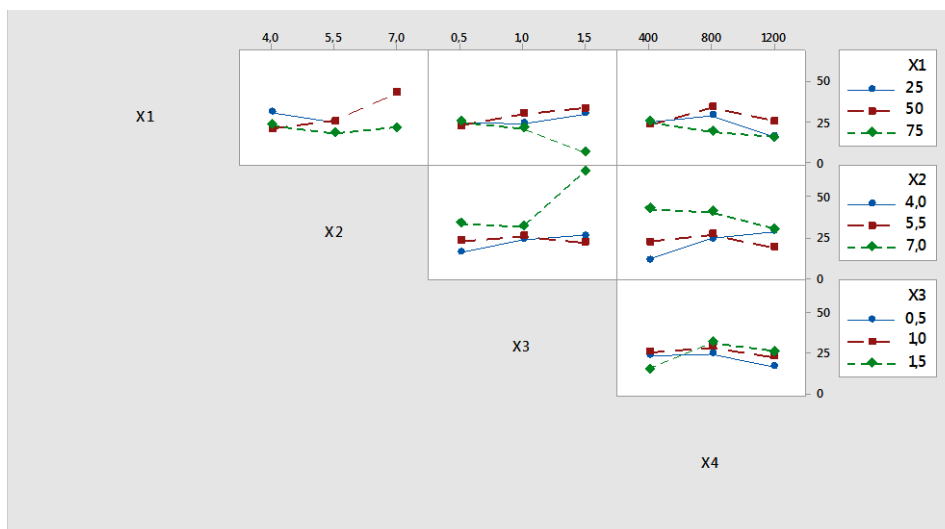


Figure 10. Diagramme des interactions des paramètres sur l'efficacité d'encapsulation moyenne

III.1.3.1.2 La taille des microparticules

La figure 11 représente les effets principaux des facteurs sur la taille des microparticules, on remarque que l'augmentation de la quantité en metformine (X_1) de 25 à 75 mg n'a pas d'effet significatif sur la taille des microparticules.

Pour l'influence du pH (X_2), on remarque que la pente de la droite est accentuée ce qui signifie que l'effet est important. La variation de la concentration du PVA a un effet significatif sur la taille des microparticules.

Concernant l'influence de la vitesse d'agitation (X_4) sur la taille des microparticules, l'effet est favorable jusqu'à la vitesse d'agitation de 800 au-delà on voit un effet défavorable de la vitesse sur la taille. Ceci est dû à la fragmentation des microparticules d'où des microparticules de petite taille.

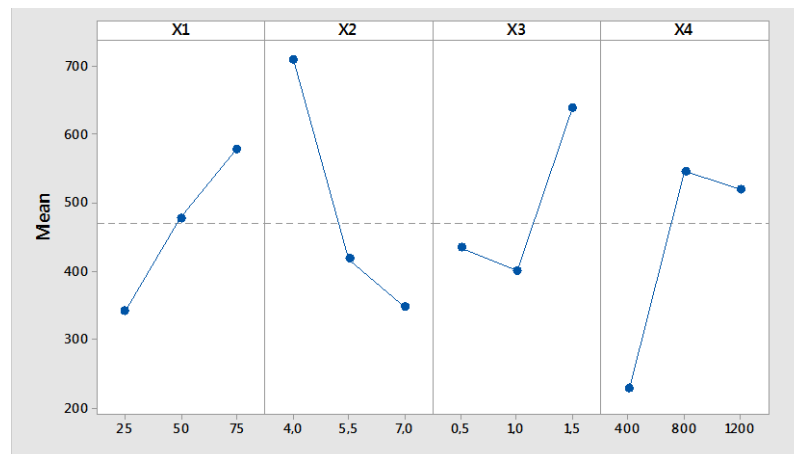


Figure 11. Diagramme des effets principaux sur la taille moyenne des microparticules

Sur la figure 12, on constate que les effets d'interactions entre la concentration du PVA et la quantité de metformine (X_2X_1), la concentration du PVA et le pH (X_2X_3) et PVA et la vitesse d'agitation (X_2X_4) sont importants pour la taille des microparticules.

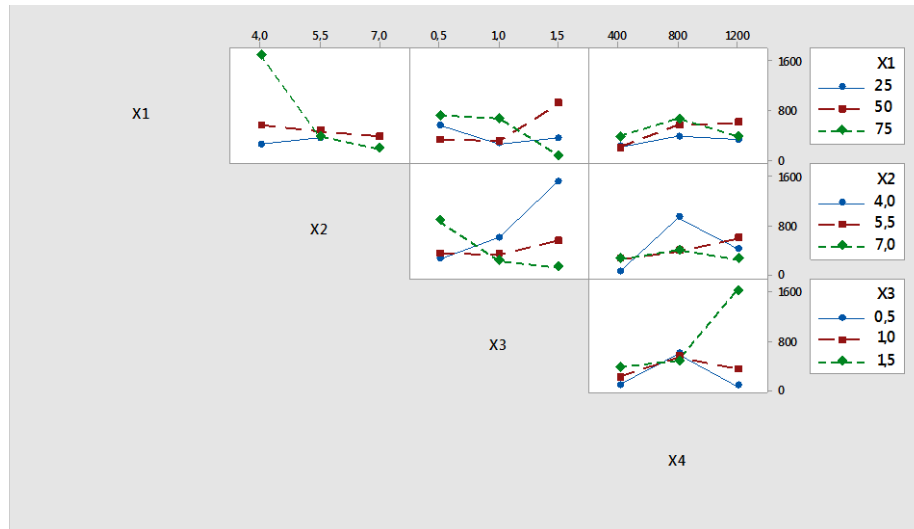


Figure 12. Diagramme des interactions des paramètres sur la taille moyenne des microparticules

III.1.3.1.3 Le potentiel zeta

La figure 13 représente les effets principaux des facteurs sur le potentiel zêta des microparticules. On remarque que l'augmentation de la quantité en metformine (X_1) de 25 à 50 mg est accompagnée d'une augmentation en valeur absolue du potentiel zêta, et lorsque la masse varie de 50 à 75 mg, le potentiel zêta diminue en valeur absolue. Pour l'influence du pH (X_2), on remarque un effet moins significatif sur la variation du potentiel zêta jusqu'au pH de 5,5, au-delà l'effet est significatif. La variation de la concentration du PVA (X_3) entre 0,5 et 1 semble avoir effet significatif positive sur le potentiel zêta suivi d'un effet négatif lorsque PVA varie de 1 à 1,5. Pour la vitesse d'agitation (X_4), on ne remarque aucun effet significatif sur la variation du potentiel zêta lorsque la vitesse augmente de 800 à 1200 rpm.

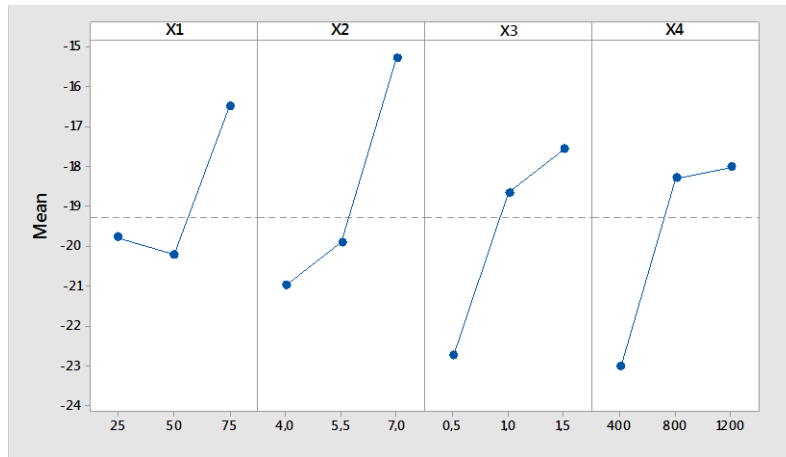


Figure 13. Diagramme des effets principaux sur le potentiel zêta moyen des microparticules

D'après la figure 14, les effets d'interactions entre la quantité de metformine PVA (X_1X_3), la quantité de metformine et la vitesse d'agitation (X_1X_4), la vitesse d'agitation et le pH (X_4X_2), sont importants pour le potentiel zêta.

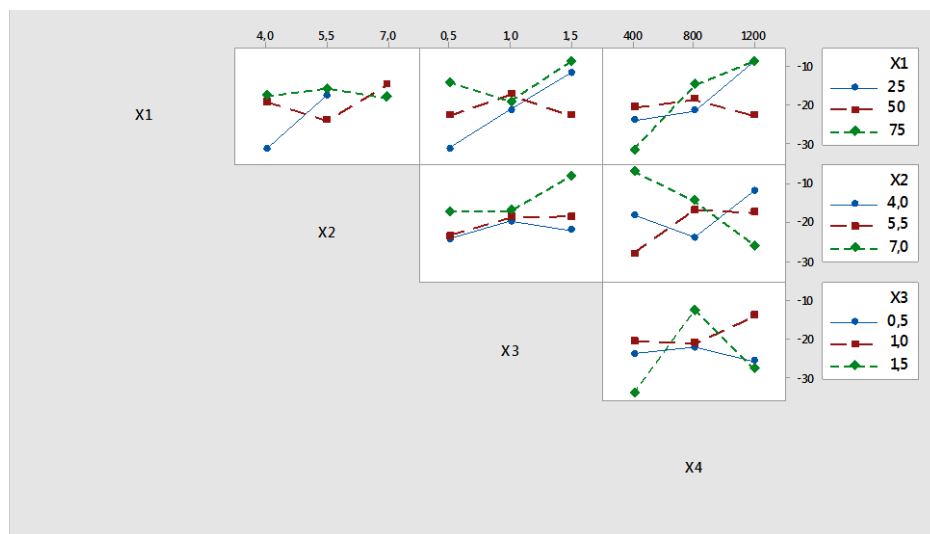


Figure 14. Diagramme des interactions des paramètres sur le potentiel zêta des microparticules.

III.1.3.2 Analyse par les surfaces de réponses

Pour visualiser l'effet des variables sur les trois réponses, une représentation graphique de la surface de réponse sous forme de surface en trois dimensions a été établie par le logiciel JMP 7.

III.1.3.2.1 Efficacité d'encapsulation

La figure 15 représente le tracé 3 D des surfaces de réponse montrant la variation de l'efficacité d'encapsulation en fonction du changement des variables indépendantes.

La figure 15 A a montré l'influence de la quantité du metformine (X_1) et la concentration du PVA (X_3) à une valeur constante de pH et de vitesse d'agitation (pH 5,5 et 800 rpm, respectivement). Une augmentation de la quantité de metformine et de la concentration du PVA dans la phase aqueuse externe conduit à une faible efficacité d'encapsulation. La viscosité de la phase organique qui ralentit la diffusion du metformine de l'émulsion primaire vers la phase aqueuse externe devrait donner lieu à une efficacité d'encapsulation élevée alors que ce n'est pas le cas avec notre résultat, ceci peut-être expliquer par la formation des microparticules poreuses ce qui facilite la migration de la metformine dans la phase aqueuse externe (**Peltonen et al., 2004**). Un résultat similaire a été trouvé par l'équipe de **S. Marquette (Marquette et al., 2014)** dans leur étude sur le poly vinylique alcool (PVA) ou ce dernier a été utilisé en tant que surfactant dans la phase aqueuse externe W2. Son rôle est d'empêcher la coalescence des gouttelettes durant la deuxième émulsion et de favoriser la formation de fines gouttelettes. Cependant, le surfactant n'améliore pas l'EE de ces formulations ; une concentration trop élevée en surfactant devient même délétère pour l'encapsulation.

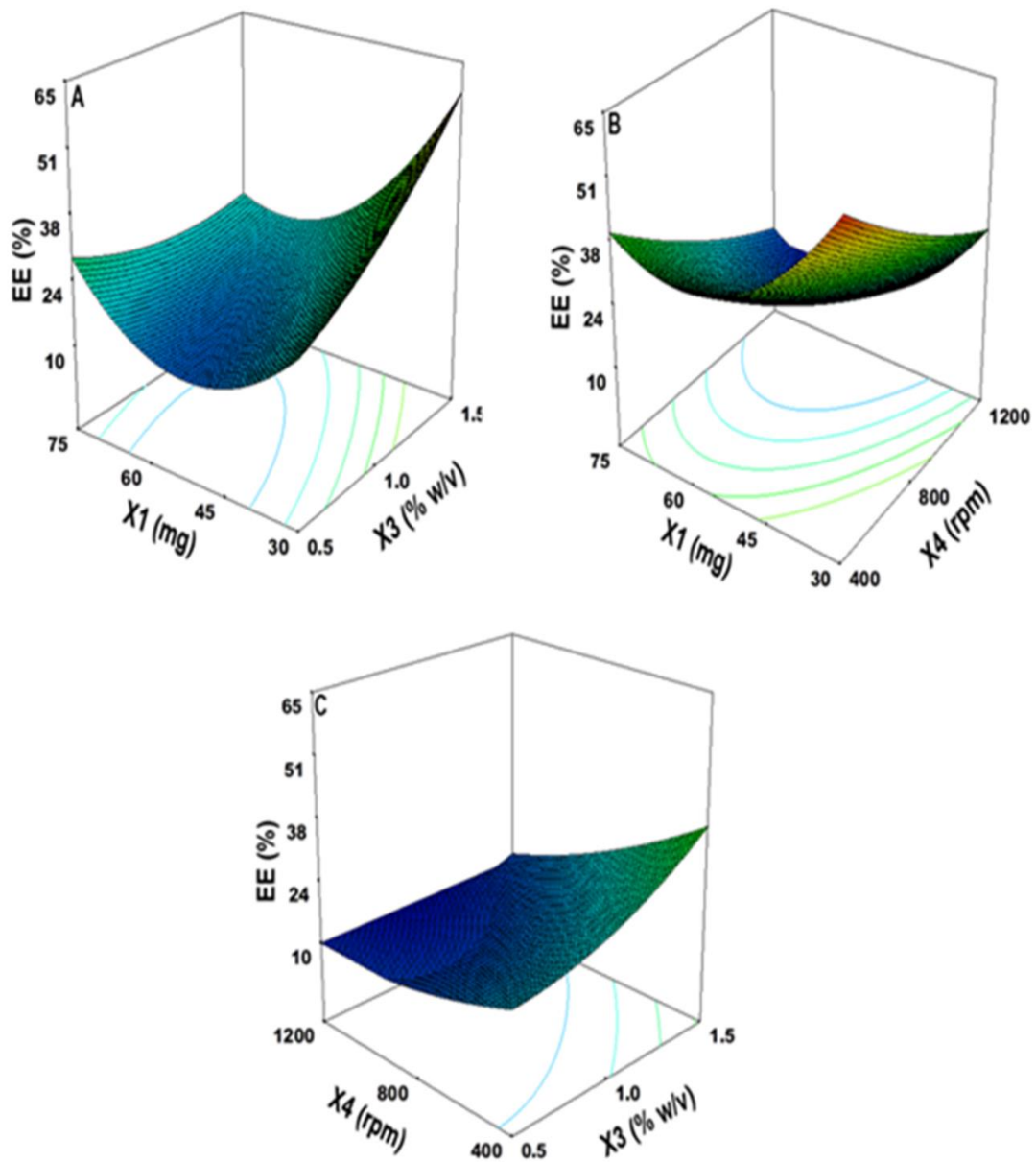


Figure 15. Surface de réponses en 3 dimensions montrant l'influence de : (A) la quantité de metformine (mg) et Concentration de PVA (% p/v), (B) la quantité de metformine le pH de la phase aqueuse externe et (C) vitesse d'agitation Concentration de PVA (% p/v) sur l'efficacité d'encapsulation.

Dans la figure 15 B, l'augmentation de la quantité du metformine et de la vitesse d'agitation donne lieu à des faibles efficacités d'encapsulations. La vitesse d'agitation utilisée au cours de la seconde étape d'émulsification se révèle être un facteur déterminant ; en effet, durant l'étape de dispersion de l'émulsion E_1/H dans la phase aqueuse externe (E_2) doit être relativement faible afin d'éviter la rupture des

gouttelettes formées au cours de la première étape de l'émulsion. Ce résultat est en accord avec ceux obtenus par divers auteurs (**Yang et al., 2001 ; Maiti et al., 2009**). Dans l'étude de **Yang et al. (Yang et al., 2001)**, les résultats de l'encapsulation d'une protéine dans des polyesters, ont montré que l'efficacité d'encapsulation diminue (de 90 % à 85,1 %) lorsque la vitesse d'agitation augmente de 500 à 700 tr/min. L'équipe de **Maiti et al. (Maiti et al., 2009)** ont trouvé dans leur étude que la variation la vitesse d'agitation de 700 à 1300 tr/min conduit à la diminution de l'efficacité d'encapsulation du fluconazole dans l'éthyle cellulose.

En effet, l'augmentation de la vitesse d'agitation, lors de la formation de l'émulsion, entraîne une diminution de la taille des gouttelettes, augmentant ainsi la surface d'échange entre la phase dispersée et la phase continue, et de ce fait, favorise le transfert du PA dans cette dernière avant que les gouttelettes durcissent, ce qui explique la diminution de l'efficacité d'encapsulation (**André-Abrant et al., 2001**). Des vitesses d'agitations plus élevées produisent des particules de très petites tailles comme conséquence de la réduction des gouttelettes de l'émulsion (**Ibraheem et al., 2014**) .

Dans la figure 15 C, on peut voir que l'efficacité d'encapsulation diminue avec l'augmentation de la concentration du PVA et la vitesse d'agitation. Une efficacité d'encapsulation élevée est observée à une vitesse d'agitation minimale et une concentration du PVA maximale. (**Samati et al., 2006**) qui ont encapsulé le flurbiprofène sodique (AINS) dans le PLGA par la technique d'émulsion-évaporation du solvant, ont montré que l'efficacité d'encapsulation augmente avec l'augmentation de la concentration du tensioactif (PVA) dans la phase aqueuse.

III.1.3.2.2 Tailles des microparticules

Le tracé 3 D des surfaces de réponses montrant l'effet du changement des variables indépendantes sur la taille des microparticules est donné par la figure 16.

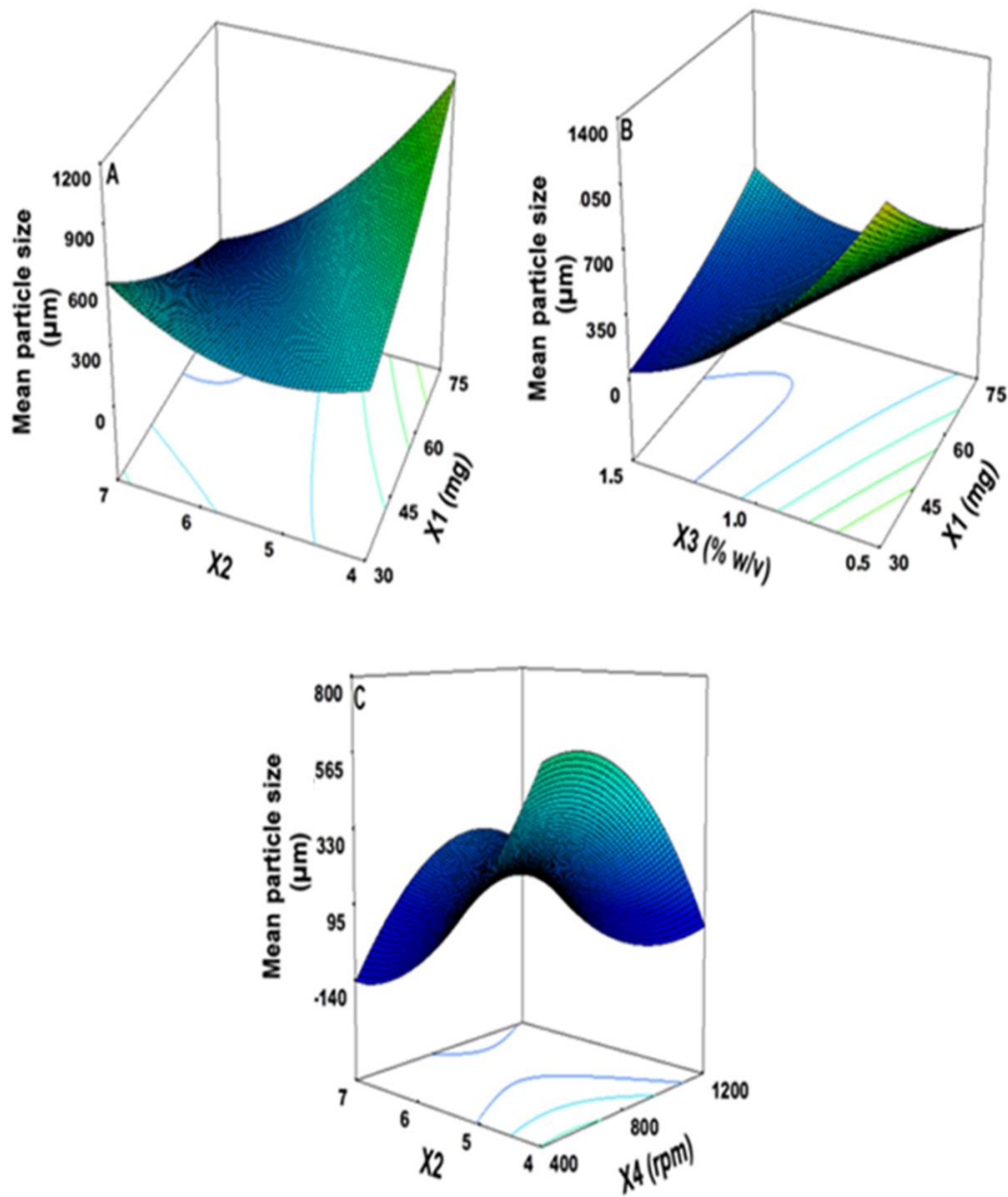


Figure 16. Surface de réponses en 3 dimensions montrant l'influence de : (A) Quantité de metformine (mg) et pH de la phase aqueuse, (B) Quantité de metformine (mg) Concentration de PVA (% p/v), (C) Vitesse d'agitation (r.p.m.) et pH de la phase aqueuse sur la taille moyenne des microparticules.

À partir de la figure 16 A présentant l'effet de la quantité de metformine et le pH de la phase aqueuse, on voit que l'augmentation de ces derniers provoque l'accroissement de la taille des microparticules. Le pH de la phase aqueuse externe peut influencer l'ionisation de la metformine qui est chargée positivement dans cet intervalle du pH (**Desai et al., 2014**) donnant lieu à des fortes interactions entre la metformine et le groupement terminale du PLA ce qui produit de particules de grande taille.

D'après la figure 16 B, on remarque la taille des microparticules diminue avec l'augmentation de la concentration du PVA et la quantité du metformine. Il a été trouvé que la taille des microparticules diminue lorsque la concentration du PVA dans la phase aqueuse augmente de 0,1 % à 2 % (**Liu et al., 2005**). L'augmentation de la concentration du PVA assure la stabilisation des émulsions contre la coalescence d'où la formation de petites microparticules (**Vysloužil et al., 2014**).

Dans la figure 16 C, on peut voir que la taille des microparticules diminue avec l'augmentation de la vitesse d'agitation et le pH de la phase aqueuse. La vitesse d'agitation est un facteur très important qui contrôle la taille des microparticules (**Tobio et al., 2000**). Selon Marquette et ses collaborateurs (**Marquette et al., 2014**) une diminution significative de la taille des microsphères est observée lorsque la vitesse d'agitation augmente.

III.1.3.2.3 Potentiels zêtas

Le tracé 3 D des surfaces de réponses montrant l'effet du changement des variables indépendantes sur le potentiel zêta des microparticules est donné par la figure 17.

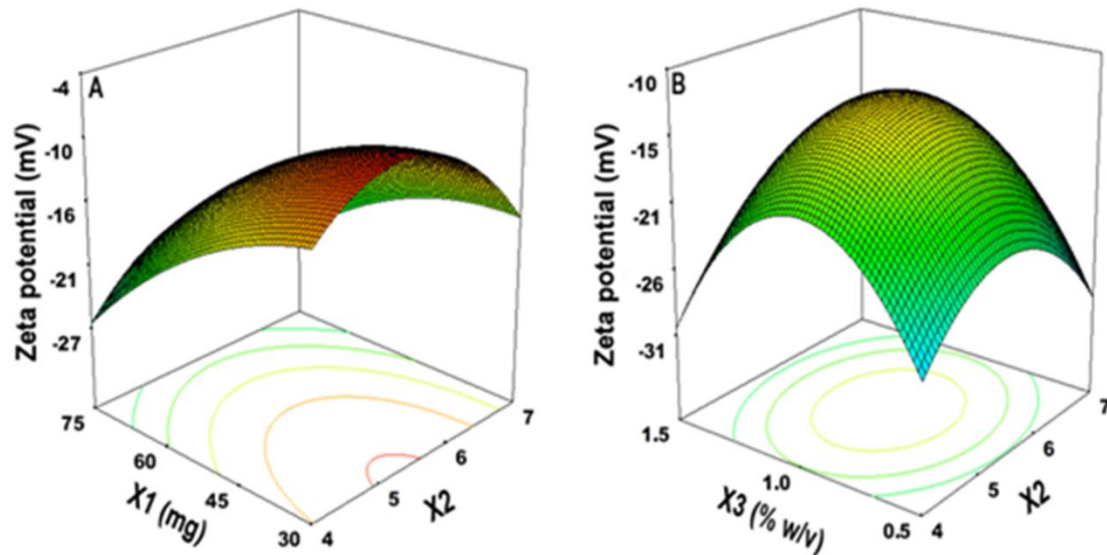


Figure 17. Surface de réponses en 3 dimensions montrant l'influence de : (A) la quantité de metformine et le pH de la phase aqueuse, (B) concentration du PVA et le pH de la phase aqueuse sur le potentiel zêta des microparticules.

La figure 17 A montre l'effet de la quantité de metformine et du pH de la phase aqueuse. Il en résulte une diminution des valeurs du potentiel zêta lorsque la quantité de metformine et les valeurs de pH augmentent. La metformine qui est chargée positivement au pH compris entre 4 et 7 (**Hernández et al., 2015**) peut interagir avec les groupes terminaux carboxyliques négatifs du PLA, abaissant la valeur du potentiel zêta. D'après la figure 17 B, le potentiel zêta diminue lorsque la concentration de PVA augmente. Il est bien connu que le PVA est difficile à éliminer de la surface des microparticules et que ses résidus pourraient diminuer le potentiel négatif des microparticules (**Gao et al., 2005**).

L'analyse précédente, basée sur le détail de l'effet moyen des paramètres étudiés et les diverses interactions existantes entre eux, fait apparaître plusieurs ordres de grandeurs. Afin de déterminer parmi ces derniers ceux attribués aux facteurs

déterminants et aux interactions dominantes qui ont le plus d'influence sur la méthode d'encapsulation, plusieurs étapes de sélection et de validations seront suivies permettant ainsi de construire des modèles du système étudié et la détermination des conditions optimales.

III.1.3.3 Analyse statistique des coefficients du modèle

Le but de ce test statistique est d'identifier les coefficients des facteurs et les interactions influents sur chacune des réponses. Dans le cas où il existe un ou plusieurs coefficients non influents, ils seront supprimés du modèle mathématique afin de le simplifier et améliorer sa qualité.

L'équation du modèle mathématique qui relie la réponse Y en fonction des facteurs étudiés se présente sous forme d'un polynôme de 2^{ème} degré qui s'écrit sous la forme générale suivante :

$$Y = b_0 + \sum_{j=1}^k b_j x_j + \sum_{u=1, u \neq j}^k b_{uj} x_u x_j + \sum_{j=1}^k b_{jj} a_j^2 \dots\dots\dots(8)$$

Les coefficients de l'équation de régression représentent :

b_0 : le terme constant de l'équation de régression ;

b_j : les effets linéaires ;

b_{jj} : les effets quadratiques;

b_{uj} : les effets d'interactions;

x_j : représente le niveau attribué au facteur j par l'expérimentation pour réaliser un essai.

Y est la valeur expérimentale ou mesurée de la réponse.

L'identification des variables significatives et la détermination des valeurs des coefficients de régression des modèles mathématiques des trois réponses sont effectuées par analyse de la variance (ANOVA) à partir des résultats expérimentaux obtenus. La signification statistique a été déterminée par les valeurs de test de Fisher (F) et les valeurs des probabilités (P) correspondantes, les valeurs de p inférieures à 0,05, indiquent que les coefficients sont significatifs (**Paulo et Santos, 2016**).

III.1.3.3.1 Analyse de la variance ANOVA pour l'efficacité d'encapsulation

Les résultats de l'analyse de la variance de l'efficacité d'encapsulation sont donnés dans le tableau 7. Selon ces résultats, les effets linéaires de la quantité de metformine (X_1), de la vitesse d'agitation (X_4) et de la concentration du PVA (X_3) sont statistiquement significatifs. En effet, nous remarquons que les coefficients ont des valeurs de p inférieures à 0,05. L'effet de l'interaction entre la quantité de metformine et la concentration du PVA ($X_1 X_3$) et l'effet quadratique de la metformine (X_1^2) sont très significatifs avec des valeurs de P inférieures à 0,01. Tous les autres coefficients ont des valeurs de P supérieures à 0,05 ce qui montre que leurs effets ne sont pas significatifs (exemple $P = 0,3548 > 0,05$ pour X_2 et l'interaction $X_1 X_4$ $P = 0,7453 > 0,05$).

Tableau 7. Analyse de la variance et des paramètres statistiques du modèle estimés par le logiciel JMP 7 pour l'efficacité d'encapsulation (Y1)

Coefficients de régression	Valeurs	erreur standard	valeur de F	valeur de P
Constant	12,35	3,88	3,18	0,0079*
X_1	-9,56	1,94	-4,93	0,0004*
X_2	-1,86	1,94	-0,96	0,3548
X_3	4,87	1,94	2,51	0,0273*
X_4	-8,88	1,94	-4,58	0,0006*
$X_1 X_2$	-3,21	3,36	-0,96	0,3578
$X_1 X_3$	-10,69	3,36	-3,18	0,0079*
$X_2 X_3$	2,74	3,36	0,82	0,4297
$X_1 X_4$	1,11	3,36	0,33	0,7453
$X_2 X_4$	4,22	3,36	1,26	0,2330
$X_3 X_4$	-3,84	3,36	-1,14	0,2748
X_1^2	18,54	2,91	6,37	<,0001*
X_2^2	5,64	2,91	1,94	0,0762
X_3^2	3,96	2,91	1,36	0,1990
X_4^2	2,54	2,91	0,87	0,4004

III.1.3.3.2 Analyse de la variance ANOVA pour la taille

Le tableau 8 expose les résultats de l'analyse de variance ANOVA pour la taille. L'effet linéaire de la concentration du PVA (X_3) est statistiquement significatif avec une valeur de p inférieures à 0,05 ($P = 0,0002$). Les effets d'interactions entre la quantité de metformine et le pH ($X_1 X_2 P = 0,0002 < 0,05$), la quantité de metformine et la concentration du PVA sont significatifs. En effet, nous remarquons que les coefficients de régression $X_1 X_2$ et $X_1 X_3$ présentent des valeurs de p inférieures à 0,05. Les effets quadratiques du pH ($P = 0,0439$) et la vitesse d'agitation ($P = 0,0424$) sont significatifs avec des valeurs de p inférieures à 0,05.

Tous les autres coefficients dont les valeurs de p sont supérieures à 0,05 montrent que leurs effets ne sont pas significatifs.

Tableau 8. Analyse de la variance et des paramètres statistiques du modèle estimés par le logiciel JMP 7 pour la taille des microparticules (Y_2)

Coefficients de régression	Valeurs	erreur standard	valeur de F	valeur de p
Constant	343,61	143,84	2,39	0,0359*
X_1	-95,07	78,78	-1,21	0,2528
X_2	-142,81	78,78	-1,81	0,0972
X_3	-396,36	71,924	-5,51	0,0002*
X_4	-85,36	71,924	-1,19	0,2603
X_1X_2	-596,39	157,57	-3,78	0,0030*
X_1X_3	351,84	124,57	2,82	0,0165*
X_2X_3	141,86	124,57	1,14	0,2790
X_1X_4	-79,08	124,57	-0,63	0,5385
X_2X_4	228,18	124,57	1,83	0,0942
X_3X_4	42,50	124,57	0,34	0,7394
X_1^2	163,03	112,58	1,45	0,1755
X_2^2	256,18	112,58	2,28	0,0439*
X_3^2	192,42	109,07	1,76	0,1054
X_4^2	-250,34	109,07	-2,30	0,0424*

III.1.3.3.3 Analyse de la variance ANOVA pour le potentiel zêta

Les résultats de l'analyse de la variance pour le potentiel zêta sont donnés dans le tableau 9. Les effets linéaires de la quantité de metformine et celle de la concentration du PVA sont statistiquement significatifs. En effet, nous remarquons que les coefficients de régression X_1 , X_1 présentent des valeurs de p inférieures à 0,05 ($p = 0,0012$ et $0,0429$ pour X_1 et X_2 respectivement). D'autre part l'effet d'interaction entre la concentration du PVA et la vitesse d'agitation est significatif avec une valeur de p inférieure à 0,05. Les effets quadratiques de tous les facteurs sont statistiquement significatifs avec des valeurs de p inférieures à 0,05.

Tableau 9. Analyse de la variance et des paramètres statistiques du modèle estimés par le logiciel JMP 7 pour le potentiel zêta (Y3)

Coefficients de régression	Valeurs	erreur standard	valeur de F	valeur de P
Constant	-8,37	1,64	-5,08	0,0004*
X_4	-7,22	0,90	-8,01	<,0001*
X_3	-0,99	0,90	-1,10	0,2950
X_2	1,87	0,82	2,27	0,0443*
X_1	-0,88	0,82	-1,08	0,3050
X_1X_2	0,87	1,80	0,49	0,6362
X_1X_3	-2,52	1,42	-1,77	0,1049
X_2X_3	0,70	1,42	0,49	0,6335
X_1X_4	-1,20	1,42	-0,84	0,4184
X_2X_4	-1,40	1,42	-0,98	0,3478
X_3X_4	10,69	1,42	7,49	<,0001*
X_4^2	-3,02	1,28	-2,34	0,0390*
X_3^2	-6,28	1,28	-4,87	0,0005*
X_2^2	-10,53	1,24	-8,43	<,0001*
X_1^2	-4,49	1,24	-3,60	0,0042*

III.1.3.4 Détermination des modèles mathématiques

Après analyse des réponses obtenues à partir de RSM. Les équations de régression pour l'efficacité d'encapsulation, la taille des microparticules et le potentiel zêta en fonction des termes qui ont un effet significatif données en variables codées sont les suivantes :

$$EE (\%) = 12.35 - 9.56 X_1 + 4.87 X_3 - 8.89 X_4 - 10.69 X_1 X_3 + 18.54 X_1^2 \quad (9)$$

$$\begin{aligned} \text{Mean particle size } (\mu\text{m}) = & 343.61 - 396.36 X_3 - 596.39 X_1 X_2 + 351.84 X_1 X_3 + \\ & 256.18 X_2^2 - 250.34 X_4^2 \end{aligned} \quad (10)$$

$$\begin{aligned} \text{Zeta potential } (mV) = & -8.38 - 7.23 X_1 + 1.87 X_3 + 10.69 X_3 X_4 - 3.02 X_1^2 - \\ & 6.28 X_2^2 - 10.53 X_3^2 - 4.5 X_4^2 \end{aligned} \quad (11)$$

X_1 , X_2 , X_3 , X_4 sont les valeurs des variables d'essai ; X_1 : quantité de metformine (g), X_2 : pH de la phase aqueuse externe, X_3 : concentration du PVA (%), X_4 : vitesse d'agitation (rpm).

Le signe de chaque coefficient indique comment le facteur associé influence la réponse. Si le coefficient est positif, le facteur possède un effet synergique, et s'il est négatif, le facteur possède un effet antagoniste (**Hao et al., 2011**). Après avoir trouvé les coefficients des modèles, on procède à l'analyse statistique des résultats pour la validation de ces derniers.

III.1.3.5 Validation des modèles

La validation du modèle mathématique est une des étapes fondamentales des plans d'expériences. Elle consiste à la vérification de plusieurs grandeurs telle que le manque d'ajustement (recherche du biais), l'analyse de la variance du modèle et le coefficient de détermination (R^2).

III.1.3.5.1 Analyse du manque d'ajustement (Recherche de biais)

La première étape de validation s'effectuera par la recherche de biais du modèle en utilisant le test de Fisher, qui consiste à vérifier la probabilité P du manque d'ajustement. Si la p -value qu'il lui associait est supérieure à 0,05, le modèle ne présente pas de biais, ce qui permet de valider le modèle régression (Ghari et al., 2014). Les résultats d'analyse de variance des trois modèles sont présentés dans le tableau ci-dessous :

Tableau 10. Validation du modèle Mathématique pour : l'efficacité d'encapsulation (Y1), taille des microparticules (Y2) et potentiel zêta (Y3)

Réponse	Source	SDC	DL	CM	F	P
Y1	Modèle	4975,5503	16	310,972	7,8421	< 0,0005*
	Résidus	530,443	10	53,044		
	"Lack of Fit"	489,7628	9	54,4181	1,3377	0,5903
	"Pure Error"	40,6802	1	40,6802		
Y2	Modèle	4921465,2	16	307592	3,0205	0,0406
	Résidus	1018348,8	10	101835		
	"Lack of Fit"	1016645,3	9	112961	66,3098	0,0950
	"Pure Error"	1703,5	1	1704		
Y3	Modèle	1811,4040	16	113,213	12,9781	0,0001
	Résidus	87,2335	10	8,723		
	"Lack of Fit"	92,79	10	9,27	61,0331	0,1317
	"Pure Error"	0,304	2	0,152		

Les valeurs de la probabilité P du manque d'ajustement ne sont pas significatives ($P > 0,05$), cela implique que les modèles sont sans biais. Les valeurs de P associées aux différents modèles sont inférieures à 0,05 ce qui confirme que les équations de régression peuvent être considérées comme adéquates et les modèles sont valides à 95 %.

III.1.3.5.2 Coefficient de détermination (R^2)

Lorsque le modèle est sans biais, on passe à la deuxième étape qui consiste à vérifier la signification de la régression. Les coefficients de détermination ajusté R_a^2 et prédit R^2 traduisent respectivement, l'explication et la prédiction du modèle associé aux résultats obtenus dans le domaine expérimentale (Swamy et al., 2014). Lorsque ces deux derniers tendent vers l'unité, le modèle associé explique la variation et prédit totalement la réponse. En revanche, lorsque les valeurs de R^2 ou R_a^2 tendent vers 0, alors le modèle ne peut être utilisé ni pour expliquer la variation ni la prédiction des réponses. Le R^2 doit avoir au moins une valeur de 0,85 pour un bon modèle (Noronha et al., 2013).

L'analyse statistique indique des coefficients de détermination R^2 d'ordre de 0,9014 pour l'efficacité d'encapsulation, 0,8848 pour la taille et 0,95 pour le potentiel zêta. Cela signifie qu'approximativement 90 % de la variation de l'efficacité d'encapsulation, 80 % de la variation de la taille et 95 % de la variation du potentiel zêta sont expliquées par les modèles.

La différence entre R^2 prédit et R_a^2 ajusté doit être toujours dans l'intervalle de 0 à 0,20 pour un modèle adéquat (Moghddam et al., 2016). Dans notre étude, la différence entre les deux coefficients est de 0,1149, 0,1465 et 0,06 pour les trois réponses respectivement.

En résumé, les résultats des différents tests statistiques précédant confirment la validation du modèle linéaire du 2^{ème} degré pour les trois réponses choisi dans tous les domaines des facteurs appliqués.

III.1.3.6 Optimisation des paramètres de préparation et leurs validations.

La méthode de surface de réponse (RSM) est une technique mathématique et statistique utilisées pour obtenir les conditions d'encapsulation optimales en utilisant comme réponses l'efficacité d'encapsulation, la taille et le potentiel zêta des microparticules. Dans cette partie seule l'efficacité d'encapsulation sera optimisée.

Après l'étape de la modélisation qui a permis d'établir un modèle de 2^{ème} degré traduisant la variation de l'efficacité d'encapsulation en fonction des différents paramètres opératoires; le logiciel JMP 7 nous a permis d'identifier les conditions optimales théoriques de préparation des microparticules ainsi que la valeur prédite d'efficacité d'encapsulation. Les conditions opératoires identifiées, par l'utilisation du logiciel JMP 7, sont présentées dans la figure 18.

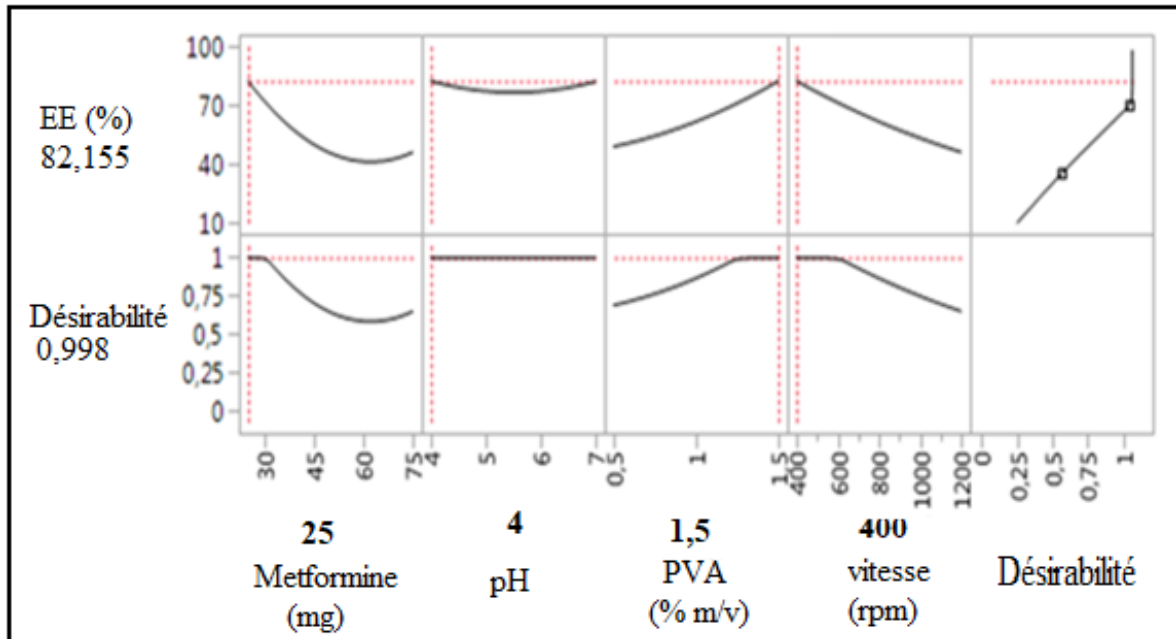


Figure 18. Conditions optimales obtenues par le modèle pour la préparation des microparticules.

Selon la figure, la formulation optimale est obtenue en fixant les paramètres expérimentaux aux valeurs ci-dessous :

- ✓ quantité du metformine : 25 mg
- ✓ pH de la phase aqueuse externe : 4
- ✓ concentration du PVA : 1,5
- ✓ vitesse d'agitation : 400 rpm

Trois répétitions ont été réalisées avec les conditions optimales théoriques de préparations de microparticules, pour faire une comparaison des résultats expérimentaux avec les résultats théoriques calculés par le logiciel.

L'efficacité d'encapsulation obtenue est de $78,05 \pm 1,87$ (%), cette valeur est proche de celle prédite par le logiciel (JMP 7) qui est de 82,155 %, ce qui confirme la validation du modèle.

III.1.4 Caractérisation des microparticules obtenues aux conditions optimales

III.1.4.1 Microscopie électronique à balayage

La metformine pure et les microparticules de PLA obtenus (placebo et chargée en metformine) ont été observées au microscope électronique à balayage (MEB) comme le montre la figure 19.

La metformine (figure 19 a) se présente sous forme de cristaux rectangulaire lisse. Les microparticules placebo (figure 19 b) sont sphériques avec une surface rugueuse et de taille variables et celles chargées en metformine sont sphériques avec une surface lisse et de taille variables aussi (figure 19 c).

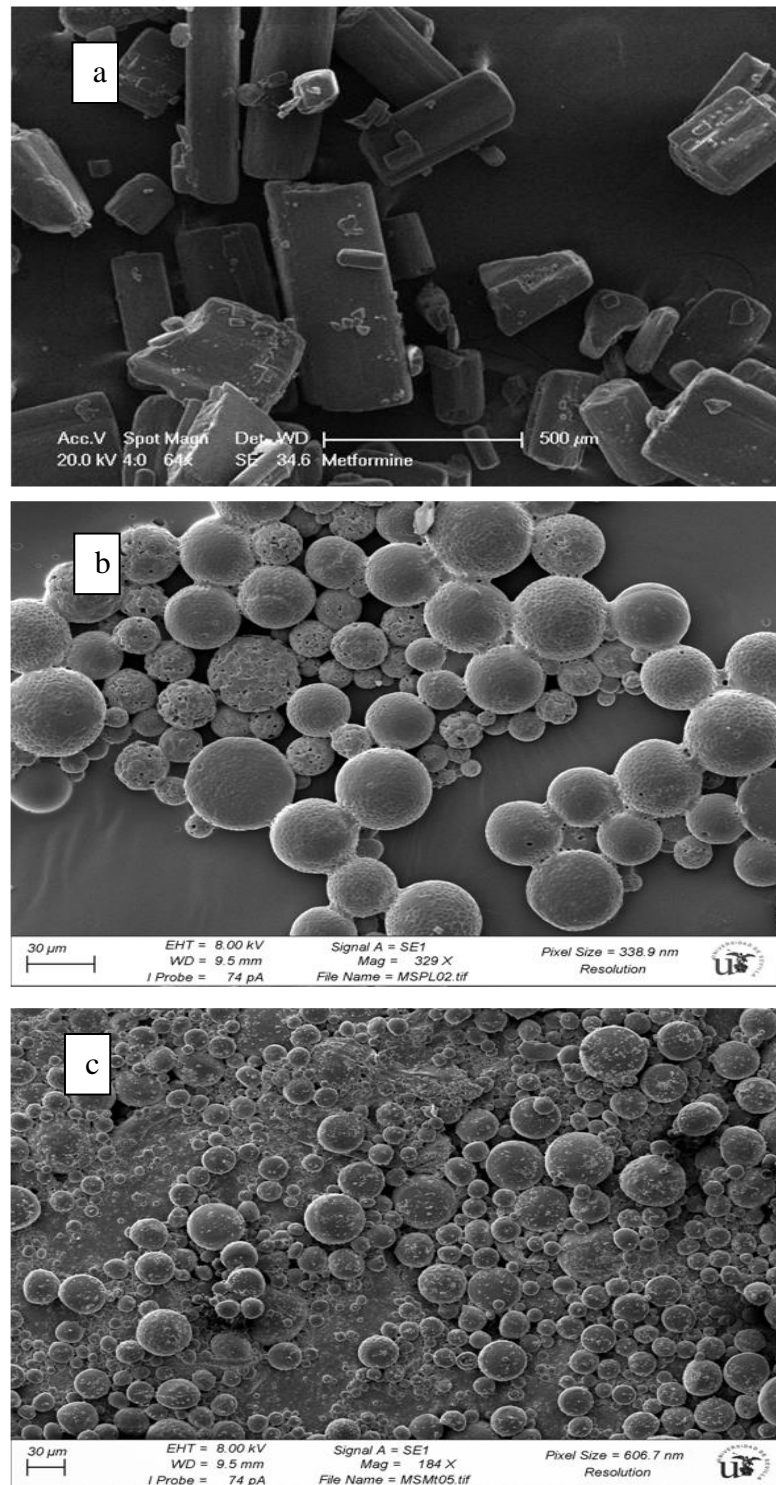


Figure 19. Observations au microscope électronique à balayage : (a) chlorhydrate de metformine pure, (b) microparticules placebo, (c) microparticules PLA metformine (formulation optimum).

III.1.4.2 Diffraction aux Rayons X (DRX)

Les propriétés cristallines de la metformine dans les microparticules du PLA ont été déterminées par analyse DRX. La figure 20 représente les diagrammes de diffraction des rayons X, dans la plage d'angles comprise entre 5 et 40 de la metformine (a), du PLA (b), du mélange physique metformine- PLA (c) et de la (d) formulation optimum.

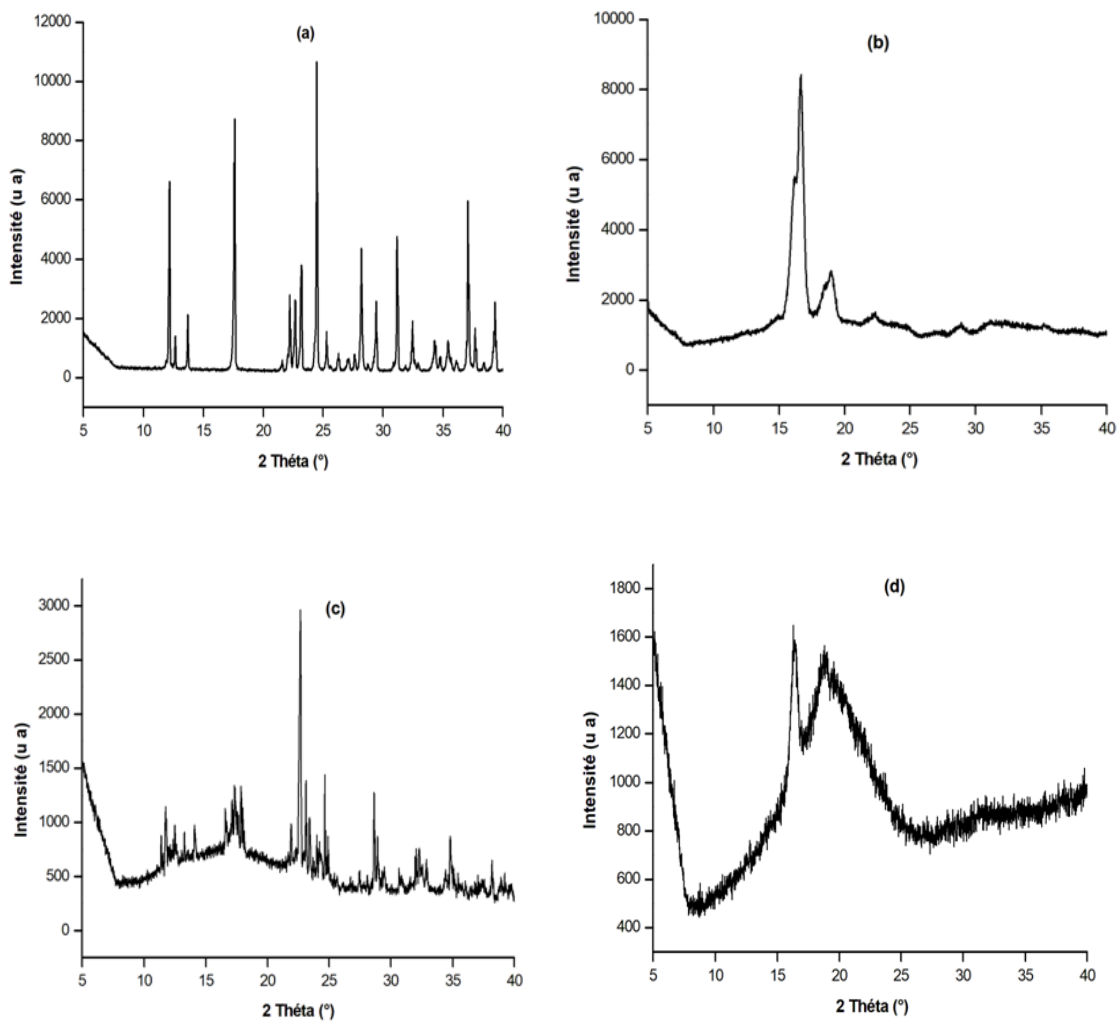


Figure 20. Diagrammes de diffraction des rayons X du (a) metformine, (b) PLA, (c) mélange physique metformine -PLA et de la (d) formulation optimum.

Le diffractogramme RX du PLA présente deux pics intense, apparus aux angles $2\theta = 16,75^\circ$ et $2\theta = 18,94^\circ$ ce qui indique la nature semi-cristalline du PLA. Le diffractogramme RX de la metformine présente plusieurs pics notés à 17,44, 24,5, 37,13 et 39,34 caractéristiques d'un état cristallin. Le diffractogramme de la formulation optimum révèle une diminution de l'intensité du pic de cristallinité du PLA et l'absence des pics caractéristiques de la metformine. Cette absence peut s'expliquer par la présence de la metformine à l'état amorphe dans les microparticules. Des résultats similaires à nos résultats ont été rapportés par **Farago et al. (Farago et al., 2008)**, ils ont expliqué la cristallinité diminuée après l'encapsulation par la dispersion moléculaire de chlorhydrate de metformine dans la matrice du polymère. **Hombreiro-Perez et al. (Hombreiro-Perez et al., 2003)**, ont expliqué l'absence de la cristallinité par la présence du propranolol HCl sous une forme amorphe dans le polymère.

III.1.4.4 Analyse par (DSC)

Les thermogrammes obtenus pour la metformine, PLA, mélange physique metformine HCl-PLA et les microparticules de la formulation optimum sont présentés sur la figure 21 ci-après.

L'analyse par DSC a montré que la metformine présente un point de fusion égal à $232,8^\circ\text{C}$ associé à une enthalpie de fusion de $270,05\text{ J/g}$ ce qui indique l'état cristallin de la metformine. Un pic intense endothermique correspondant à la fusion du PLA apparaît à $178,7^\circ\text{C}$. Le thermogramme de mélanges physiques de PLA et la metformine (50 : 50) présente les pics caractéristiques du PLA ($178,8^\circ\text{C}$) et celui de la metformine ($234,8^\circ\text{C}$). Le thermogramme des MPS contenant la metformine ne montre aucun pic endotherme correspondant à la fusion de la metformine tandis que le pic de fusion du PLA apparaît sur le thermogramme. Ces résultats indiquent que la metformine est à l'état amorphe dans la matrice du PLA.

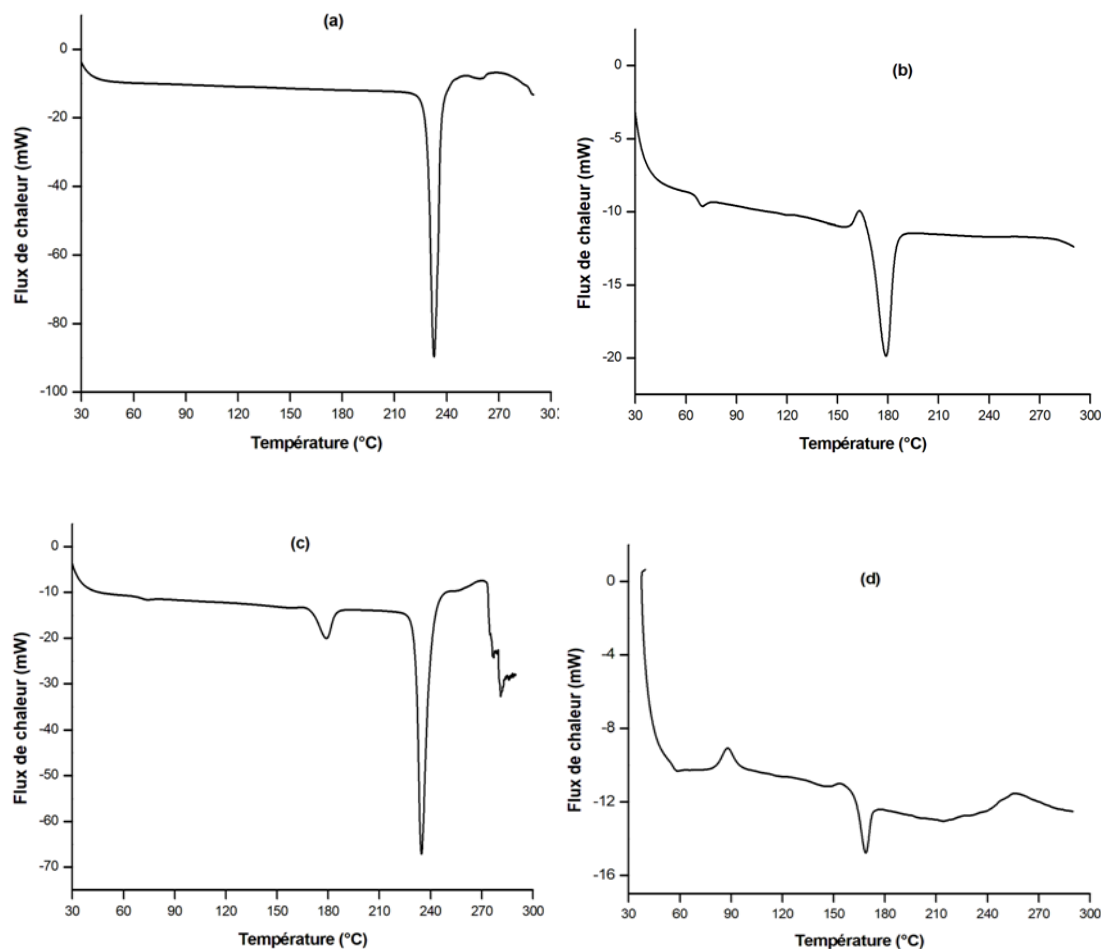


Figure 21. Courbes DSC du (a) metformine, (b) PLA, (c) mélange physique metformine -PLA et de la (d) formulation optimum.

III.1.5 Evaluations *in vitro* des microparticules de PLA contenant la metformin

La libération *in vitro* de la metformine à partir des microparticules de PLA a été étudiée dans deux milieux simulé gastrique (pH=1,2) et intestinal (pH=6,8). Le problème rencontré c'est que les microparticules flottent à la surface des milieux de dissolution. Pour cela, les microparticules ont été enfermées dans un sac de dialyse (membranes Spectra/por MWCO : 12-14,000, Laboratoires Spectrum, EU) afin d'assurer l'immersion des microparticules dans le milieu de dissolution.

Les profils de libération de la metformine pure suivie dans le milieu gastrique obtenue sans sac de dialyse et à partir du sac de dialyse sont illustrés dans la figure 22.

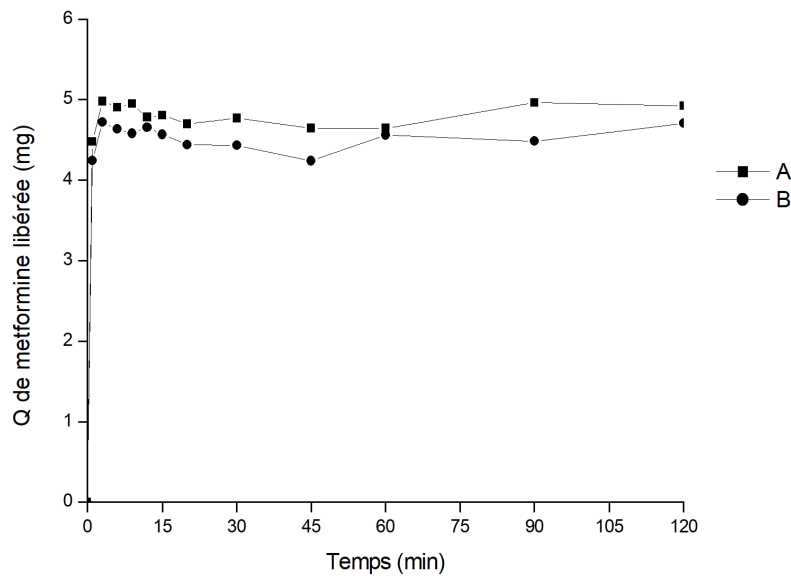


Figure 22. Profils de libération in vitro de la metformine pure sans membrane de dialyse (A) et à partir de la membrane de dialyse (B).

La comparaison entre les deux profils de dissolution obtenus, est réalisée par le calcul du facteur de similarité f_2 qui peut être utilisé pour l'estimation de la similarité de deux profils de dissolution. Sachant que deux profils de dissolution sont considérés similaires si f_2 est compris entre 50 et 100. La valeur de f_2 est calculée selon l'équation (12) par le Microsoft Excel. Le calcul de f_2 (99,489) indique que les profils sont considérés comme similaires. Nous pouvons constater que la membrane de dialyse ne présente aucun effet significatif sur la libération de la metformine.

$$f_2 = 50 \times \log \left\{ \left[1 + \frac{1}{n} \sum_{t=1}^{t=n} (R_t - T_t)^2 \right]^{-0,5} \times 100 \right\} \dots \dots \dots (12)$$

La figure 23 illustre le profil de libération obtenu pour la formulation optimum du PLA comparé à celui de la metformine pure.

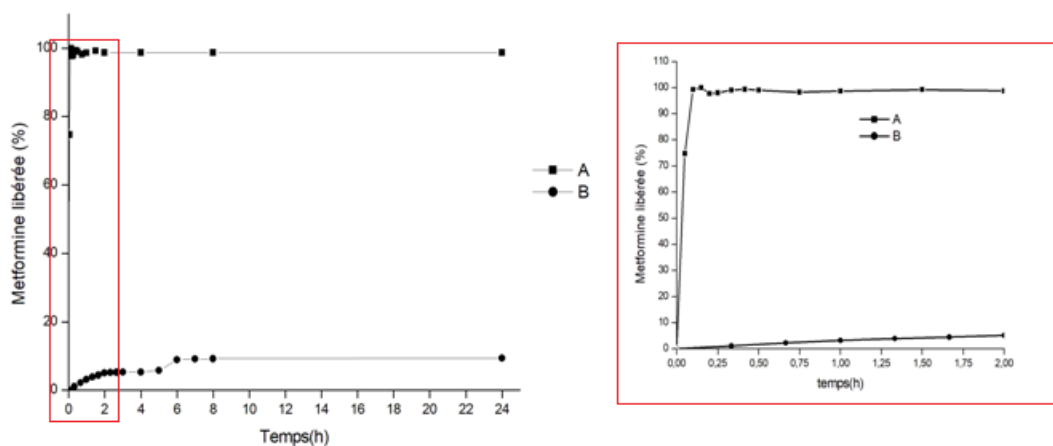


Figure 23. Profils de libération *in vitro* de la metformine pure (A) et des microparticules du PLA (formulation optimum, B)

Les cinétiques de libération *in vitro* effectuées montrent que la libération de la metformine pure est rapide et totale (quantité libérée estimée à ~100 % au bout de 12 minutes). Cependant, les microparticules du PLA montrent un profil de dissolution progressive et lent avec un pourcentage de 7 % de metformine libéré à $t=2$ h. À $t=24$ h, Seulement un faible pourcentage (~10 %) de libération de la metformine est notée (Figure 23). La même tendance a été observée pour les microparticules de PLA encapsulant l'ibuprofène ou ~30 % d'ibuprofène est libéré après 18 de test de libération (Bazzo et al., 2012).

Le PLA est un poly ester hydrophobe empêche la diffusion de la metformine vers le milieu de dissolution. L'effet prolongé assuré par le PLA est lié ; à sa cristallinité qui ralentisse la mobilité des chaînes polymères et donc la libération du médicament (Karavelidis et al., 2010), et aux interactions entre le groupement carboxyle du PLA chargé négativement et le médicament chargé positivement (Herrmann et Bodmeier, 1995). De plus, l'absence des pores sur la surface des microparticules est à l'origine de la faible libération du principe actif à partir des systèmes préparés (Zhou et al., 2019).

Le test de libération *in vitro* réalisé ne permis pas de prédire avec certitude la libération *in vivo* de la metformine à partir des microparticules de PLA. Pour cela, une étude préliminaire *in vivo* a été menée sur des lapins sains afin de déterminer le profil de

libération et les paramètres pharmacocinétiques de la metformine avec la formulation précédemment utilisée pour le test in vitro.

III.1.6 Étude pharmacocinétique de la metformine à partir des microparticules du PLA

Dans cette série d'expériences, le suivi des concentrations plasmatique de la metformine chez des lapins sains a été effectué après administration d'une dose de 5mg/kg. Le tableau suivant résume les concentrations absorbées en ($\mu\text{g/ml}$) de la metformine jusqu' à 10 heures après administration. La quantification de la metformine dans le plasma au-delà de 10 h n'a pas pu être détectée par HPLC.

Tableau 11. Concentrations plasmatiques moyennes de la metformine après administrations de metformine en solution par voie intraveineuse (sol IV), orale (sol orale) et sous forme de microparticules (MPs orale) à des lapins (Moyenne \pm SD, $\mu\text{g/ml}$), (n=5)

Temps (min)	sol IV	sol orale	MPs orale
5	34,12 \pm 3,06	0,53 \pm 0,04	0,22 \pm 0,03
10	21,91 \pm 1,18	0,82 \pm 0,05	0,44 \pm 0,03
20	15,98 \pm 0,44	1,03 \pm 0,10	0,65 \pm 0,01
30	12,65 \pm 0,16	1,13 \pm 0,06	0,84 \pm 0,02
45	11,45 \pm 0,40	1,78 \pm 0,09	1,06 \pm 0,03
60	7,64 \pm 0,36	2,61 \pm 0,09	1,26 \pm 0,04
90	5,81 \pm 0,27	3,19 \pm 0,16	1,36 \pm 0,05
120	4,90 \pm 0,13	2,61 \pm 0,09	1,26 \pm 0,03
240	3,05 \pm 0,12	2,33 \pm 0,06	1,13 \pm 0,10
360	1,57 \pm 0,06	1,93 \pm 0,09	0,79 \pm 0,03
480	0,83 \pm 0,03	1,34 \pm 0,05	0,59 \pm 0,02
600	/	0,85 \pm 0,03	0,33 \pm 0,02

Pour vérifier l'homogénéité des données pour chaque groupe de lapins, une analyse non-paramétrique de la variance (tests de Kruskal-Wallis et Monte Carlo) a été réalisée pour analyser les différences éventuelles des concentrations aux mêmes temps. Les résultats trouvés indiquent qu'il n'y pas de différences significatives entre les concentrations obtenus au même temps ($P > 0,05$).

De la même manière l'analyse non-paramétrique de la variance a été appliquée pour analyser les différences éventuelles des concentrations aux différents temps. L'analyse réalisée montre qu'il existe des différences significatives entre les différents animaux à des temps différents ($P < 0,05$).

La figure 24 représente l'évolution chronologique des concentrations plasmatiques moyennes de metformine, mesurées dans le plasma sanguin des différents groupes de lapins, après administration intraveineuse (IV) de metformine en solution, administration orale de metformine en solution ou sous forme de microparticules de PLA. La dose unique administrée est de 5 mg metformine/kg de poids corporel.

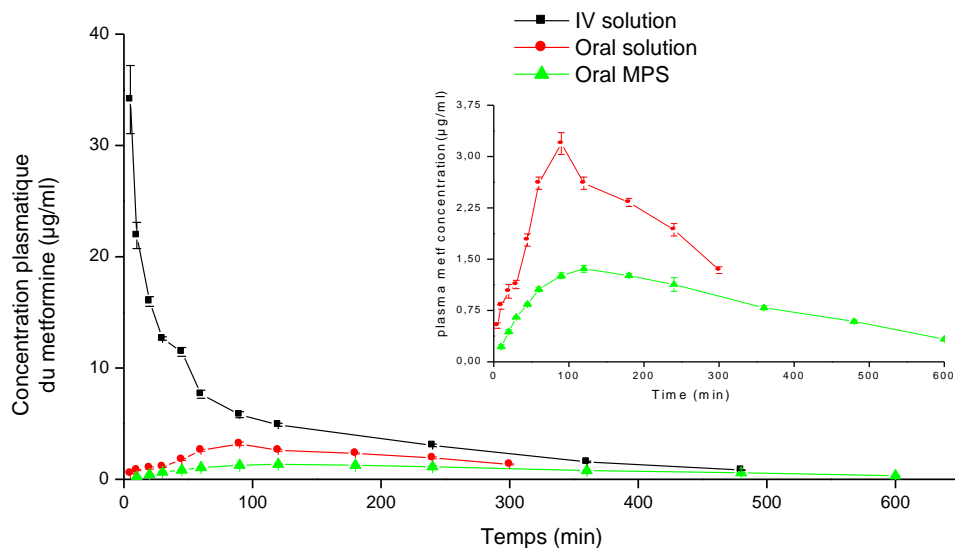


Figure 24. Évolution de la concentration plasmatique en metformine au cours du temps après administration intraveineuse (IV) de metformine en solution, administration orale de metformine en solution ou sous forme de microparticules de PLA. La dose unique administré est de 5 mg metformine / kg ($n=5$).

Les résultats obtenus à l'issue du suivi de variation des concentrations plasmatique-temps, nous ont permis de calculer les paramètres pharmacocinétiques et sont illustrés dans le tableau 12 (moyenne \pm SD).

Tableau 12. Paramètres pharmacocinétiques (PK) de la metformine après administration intraveineuse (IV) de metformine pure en solution, administration orale de metformine pure en solution ou sous forme de microparticules de PLA. La dose unique administré est de 5 mg metformine / kg (moyenne \pm SD) (n=5).

PK	Metformine (moyenne \pm SD)		
	solution IV	solution Oral	MPs Oral
C _{max} ($\mu\text{g/ml}$)	-	3,19 \pm 0,16	1,36 \pm 0,05
T _{max} (min)	-	110,5 \pm 2,37	138,94 \pm 4,73
T _{1/2} (min)	139,61 \pm 4,39	153,78 \pm 4,19	223,30 \pm 21,30
AUC _{0-∞} ($\mu\text{g/ml/ min}$)	2440,77 \pm 68,71	882,85 \pm 23,90	617,88 \pm 12,92
V _d (mL/Kg)	412,65 \pm 9,63	1257,59 \pm 58,98	2606,33 \pm 233,54
Cl (mL/min/kg)	2,05 \pm 0,06	5,67 \pm 0,15	8,09 \pm 0,17
MRT (min)	156,52 \pm 3,81	254,59 \pm 4,54	369,08 \pm 18,98
MAT (min)	-	98,05 \pm 3,36	206,95 \pm 31,91
F (%)	-	36,19 \pm 1,27	25,59 \pm 0,46

a. Administration intraveineuse

À partir de l'analyse des différents paramètres pharmacocinétiques obtenus, nous pouvons observer que le temps de demi-vie a été de 139,61 \pm 4,39 min. Si nous comparons les données obtenues avec d'autres études pharmacocinétiques de la metformine chez le lapin, la valeur obtenue dans notre étude est considérablement inférieure à celle obtenue chez cette même espèce (Díez et al., 2017). Cependant, il est à noter que ces différences peuvent être dues au fait que l'étude précédente a été réalisée

chez des lapins diabétiques et avec une dose significativement supérieure à celle de notre étude (30 mg /kg). Si l'on compare avec d'autres espèces, la valeur obtenue dans notre étude est similaire à celle obtenue chez le rat ($176 \pm 61,5$ min) (Choi et al., 2008), mais supérieure à celle obtenue chez le cheval ($24,9 \text{ min} \pm 0,4$) (Hustace et al., 2009). Dans le cas de la demi-vie chez l'homme qui est de 6,5 heures (390 min) (dianben), significativement plus élevée que celle obtenue dans notre étude, ce qui est logique, compte tenu du fait que le lapin fait partie des espèces dites éliminateurs rapides, qui présentent une élimination plus accélérée des médicaments par rapport à l'espèce humaine.

Le MRT obtenu dans notre étude est de $156,52 \pm 3,81$ min, ce qui est nettement supérieur à celui obtenu dans l'étude de Díez et al ($81,70 \pm 3,98$) pour la voie intraveineuse. Cependant, il est similaire à celui obtenu chez ces mêmes lapins diabétiques par voie orale après administration de 30 mg/kg.

Le volume de distribution obtenu est de $412,65 \pm 9,63$ mL/kg. Qui, compte tenu de la variabilité inter spécifique, est du même ordre que celui obtenu chez le rat (539 ± 243 mL/kg) (Choi et al., 2008) et chez les chevaux (300 ± 100 ml/kg) (Hustace et al., 2009). Cependant, il est nettement inférieur à celui obtenu chez les lapins diabétiques ($5137,7 \pm 1839,9$ mL / min) (Díez et al., 2017). Étant donné que la dose utilisée dans cette étude était bien plus élevée que la nôtre, il est possible qu'un certain pourcentage de la dose s'accumule dans des compartiments profonds, ce qui se traduirait par une augmentation du volume de distribution calculé.

b. Administration orale de metformine en solution

Nos résultats sont de l'ordre de ceux obtenus par d'autres chercheurs sur d'autres modèles animaux. Chez les lapins diabétiques (Díez et al., 2017), une demi-vie de 155 minutes a été obtenue par rapport à $153,78 \pm 4,19$ min dans nos données, tandis que chez les rats diabétiques (Wu et al., 2019) une TRM de $300 \pm 1,03$ minutes a été calculée, légèrement supérieure à celle calculée dans nos travaux ($254,59 \pm 4,54$ min). Le volume de distribution obtenu dans notre étude était de $1257,59 \pm 58,98$ mL / kg et le temps d'absorption moyen (MAT) était de $98,05 \pm 3,36$ min. Au vu des résultats obtenus pour le MRT IV ($156,52$ min) et le MAT oral ($98,05$ min), on peut voir

comment les animaux présentent une valeur MAT inférieure à la MRT intraveineuse. On en conclut que, en principe, l'absorption, après administration orale de la metformine non encapsulée, ne se comporte pas comme un facteur limitant d'élimination. L'explication réside probablement dans le degré élevé d'effet de premier passage que la metformine subit chez toutes les espèces.

c. Administration orale de metformine encapsulée

Les résultats obtenus pour le MRT ($369,08 \pm 18,98$ min), MAT ($206,95 \pm 31,91$ min), le temps de demi-vie ($223,30 \pm 21,30$ min), Vd ($2606,33 \pm 233,54$ mL / kg) indiquent que le procédé de microencapsulation modifie les principaux paramètres pharmacocinétiques de la metformine. Dans l'étude de Hong et ses collaborateurs (**Hong et al., 2019**), le MRT de la metformine encapsulée par la méthode de double émulsion évaporation du solvant a été augmenté d'un facteur de 2,49 et le temps de demi-vie de 4,02.

Au vu des résultats obtenus pour le MRT IV (156,52 min) et le MAT encapsulé par voie orale (206,95 min), on peut voir que les animaux présentent une valeur MAT plus élevée que le MRT intraveineux. De là, on conclut que, en principe, l'absorption, après administration orale microparticules de metformine, se comporte comme un facteur limitant d'élimination, et donc conditionne l'apparition d'un phénomène de flip-flop dans cette formulation. Cette situation peut être considérée comme avantageuse car elle permet une libération prolongée du médicament et il passe dans la circulation sanguine de manière plus uniforme, sans pics de concentration, ce qui serait intéressant pour un médicament tel que la metformine, dont la fonction est de réguler la glycémie.

d. Étude comparative du processus d'absorption de la metformine par voie orale (en solution et encapsulée)

Les résultats obtenus indiquent que la microencapsulation de la metformine modifie ses paramètres pharmacocinétiques. Statistiquement significatifs, nous avons trouvé des augmentations de la constante d'absorption (K_a), du volume de distribution (Vd) et de la demi-vie ($T_{1/2}$) et une réduction de la constante d'élimination (k_e).

L'augmentation statistiquement significative des valeurs de MAT et de MRT de la formulation de metformine encapsulée par rapport à la metformine en solution, indique qu'elle permet d'atteindre des concentrations plasmatiques plus homogènes et prolongées. Ce qui pourrait avoir une importance clinique en fournissant une réponse pharmacologique plus uniforme.

La concentration plasmatique maximale des microparticules PLA metformine est 2,34 fois inférieure de celle de la metformine en solution. En plus, le temps nécessaire pour atteindre la concentration plasmatique est significativement prolongé pour les microparticules PLA metformine qui peut être due à la faible absorption de la metformine par les cellules du tractus gastro-intestinale suite à son incorporation dans des microparticules hydrophobe à base de PLA qui libèrent lentement le principe actif.

Le temps de demi-vie d'élimination $t_{1/2}$ (min) pour la metformine encapsulé suite à une administration orale est plus élevé chez le groupe de lapins ayant reçu par voie orale des microparticules de PLA que les lapins ayant reçu par voie IV ou orale une solution de metformine pure. Ce résultat indique que l'incorporation de metformine dans les microparticules de PLA augmente la demi-vie du principe actif.

La valeur du **temps moyen de résidence (mean residence time, MRT)** est significativement plus élevée chez le groupe de lapins ayant reçu par voie orale des microparticules de PLA par rapport aux lapins ayant reçu par voie IV ou orale une solution de metformine pure. Il est aussi à noter que les autres paramètres pharmacocinétiques de la metformine encapsulée tel que le volume de distribution moyens V_d ($2606,33 \pm 233,54$ mL/Kg), la clairance moyenne Cl ($8,09 \pm 0,17$ mL/min/kg), le temps d'absorption moyen ($206,95 \pm 31,91$ min) sont supérieurs a ceux de la solution pure de metformine après administration orale ou IV. Cette augmentation montre une prolongation de la libération de la metformine à partir de ces microparticules dans le plasma ce qui devrait améliorer l'efficacité pharmacologique du principe actif.

L'aire sous la courbe **AUC** $(0-\infty)$ qui reflète la quantité du médicament qui a séjourné dans le sang a significativement diminué pour les microparticules comparée à la solution de metformine pure. La valeur d'**AUC** $(0-\infty)$ de metformine après

administration orale des microparticules est de $617,88 \pm 12,92 \mu\text{g/ml/min}$, cependant l'AUC $(0-\infty)$ de la solution de metformine pure est de $882,85 \pm 23,90 \mu\text{g/ml/min}$ et $2440,77 \pm 68,71 \mu\text{g/ml/min}$ après administration orale et IV respectivement. Une $ASC_{0-\infty}$ significativement faible des microparticules de metformine PLA indique une faible libération de metformine à partir des microparticules développées par rapport à la solution pure. Dans le cas des microparticules de PLA, la diminution de l'AUC $(0-\infty)$ et la faible valeur de C_{max} pourraient s'expliquer par une diminution de la diffusion de la metformine à partir des microparticules de PLA qui limitent la libération du médicament. La comparaison des formes de la metformine après administration par voie orale indique que la biodisponibilité orale après incorporation de la metformine dans les microparticules de PLA n'est pas améliorée ($25,59 \pm 0,46 \%$). Cette baisse inattendue de la biodisponibilité est probablement la conséquence de la faible durée d'exposition des microparticules de PLA aux fluides physiologiques. En effet, la dégradation enzymatique (lysozyme, protéinase K, lipase) des microparticules de PLA lors du passage de l'estomac à l'intestin, se produit après 72 heures (Kuo et al., 2012).

III.1.7 Conclusion

Dans cette première partie, des microparticules de PLA ont été préparées par la méthode de double émulsion évaporation du solvant, et parmi les tensio-actifs utilisés le span 80 a été sélectionné pour stabiliser la première émulsion (E1/H). L'effet des paramètres de préparation (la quantité en metformine, pH de la phase aqueuse, concentration de l'émulsifiant (PVA) et vitesse d'agitation) sur le taux d'encapsulation, la taille et le potentiel zêta des microparticules ont été étudiés par la méthodologie des plans d'expériences (Plan de box Behnken). L'analyse de la variance a révélé que l'effet de ces quatre facteurs sur les réponses étudiés est bien décrit par des modèles de second ordre. Le modèle polynomial du second ordre appliqué a donné une description satisfaisante des données expérimentales montrant que l'efficacité d'encapsulation était plus affectée par la quantité en metformine, concentration de l'émulsifiant (PVA) et vitesse d'agitation.

L'optimisation expérimentale des paramètres déjà cités précédemment est basée sur l'obtention de microparticules ayant une efficacité d'encapsulation la plus importante. Le taux d'encapsulation prédit par le modèle dans les conditions

expérimentales optimales s'est avéré être en bonne corrélation avec celui déterminé expérimentalement 82,15 % et $78,05 \pm 1,87$ % respectivement.

La forme sphérique des microparticules obtenues a été mise en évidence par l'observation au microscope électronique à balayage (MEB). Les analyses DRX et DSC ont montré que la metformine encapsulée est présente à l'état amorphe.

La libération de la metformine à partir des microparticules est faible au bout de 24h (~10 %) et les tests in vivo ont montré que la biodisponibilité orale de la metformine n'est pas améliorée (25 %). Comme perspective à cette première partie il est nécessaire d'avoir une cinétique de libération du PA adaptée afin d'améliorer le passage du PA dans le sang pour espérer une meilleure biodisponibilité. Dans la suite de ce travail, nous étudierons l'effet de l'ajout de biopolymères sur les propriétés des microparticules afin d'obtenir une amélioration de la cinétique de libération.

Partie 2 : Influence des bio-polymères sur les propriétés des microparticules et étude de la cinétique de la libération résultantes

III.2.1 Introduction

La metformine est encapsulée dans du PLA par la méthode de double émulsion évaporation du solvant selon les conditions optimum déterminés dans la première partie. Dans la phase aqueuse interne est ajouté du méthyle cellulose (MC) ou l'hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) comme co-tensioactifs remplaçant le span 80 dans le but d'étudier leurs influences sur les propriétés physicochimiques des microparticules et la cinétique de la libération dans des milieux physiologiques simulés.

III.2.2 Étude morphologique des microparticules

La caractérisation morphologique des microparticules de PLA préparées par l'ajout du MC dans la phase aqueuse interne a été effectuée par le microscope électronique à balayage (figure 25).

Les microparticules ont relativement une forme sphérique ou allongée et lisse (formulations E2 et E3) sauf la formulation E4 qui présente des formes et des tailles hétérogènes. L'augmentation de la concentration en MC semble ne pas avoir un effet sur la structure de la surface des microparticules.

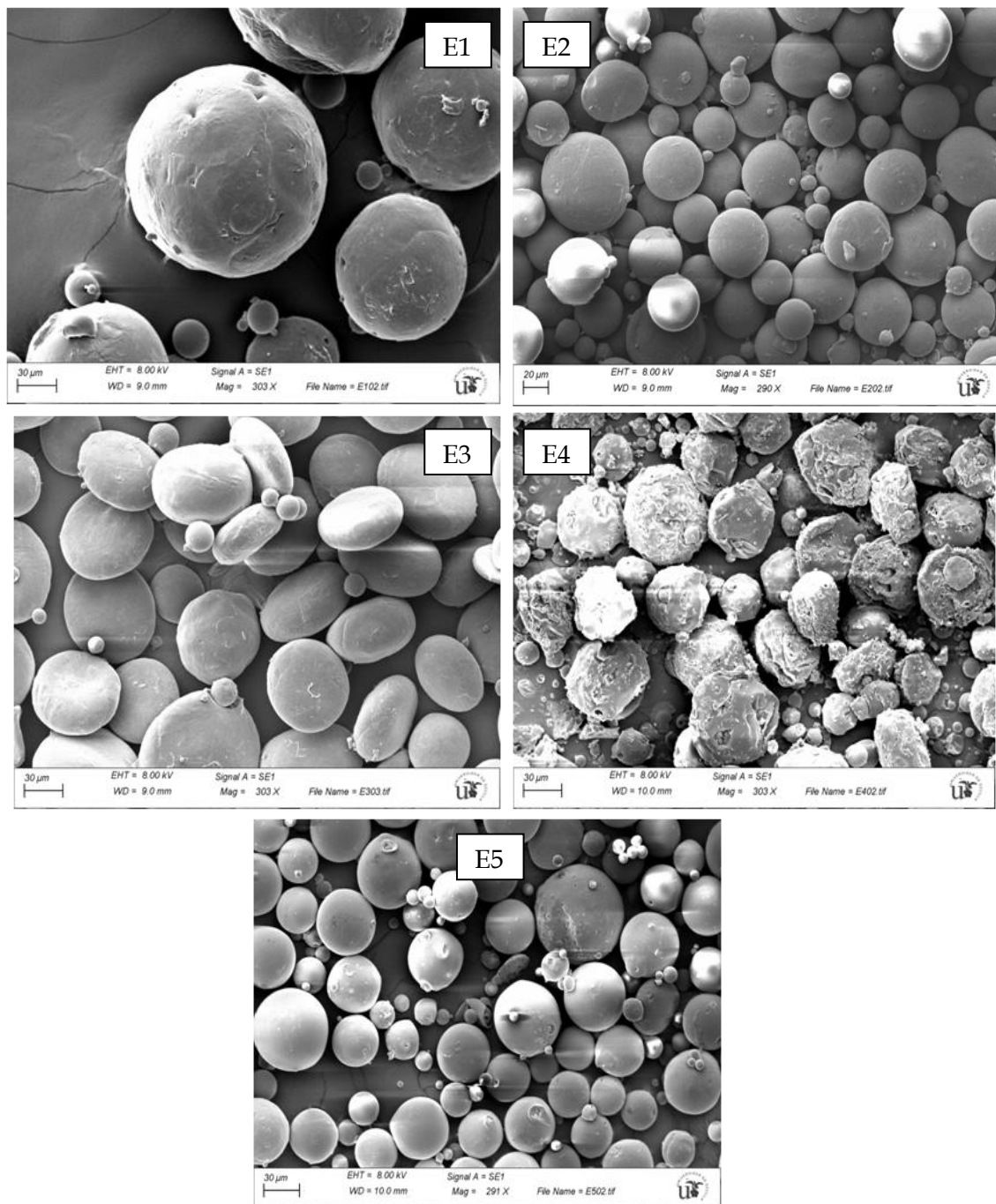


Figure 25. Observations au microscope électronique à balayage des microparticules préparées avec différentes concentrations du MC

La microscopie électronique réalisée sur les microparticules de metformine obtenues par l'ajout du HPMC (Figure 26) montre, que quelle que soient les concentrations utilisées, les microparticules sont hétérogènes en tailles avec des surfaces rugueuses et présence des pores non uniformes à l'exception des microparticules de la formulation E9 qui sont sphériques et lisses.

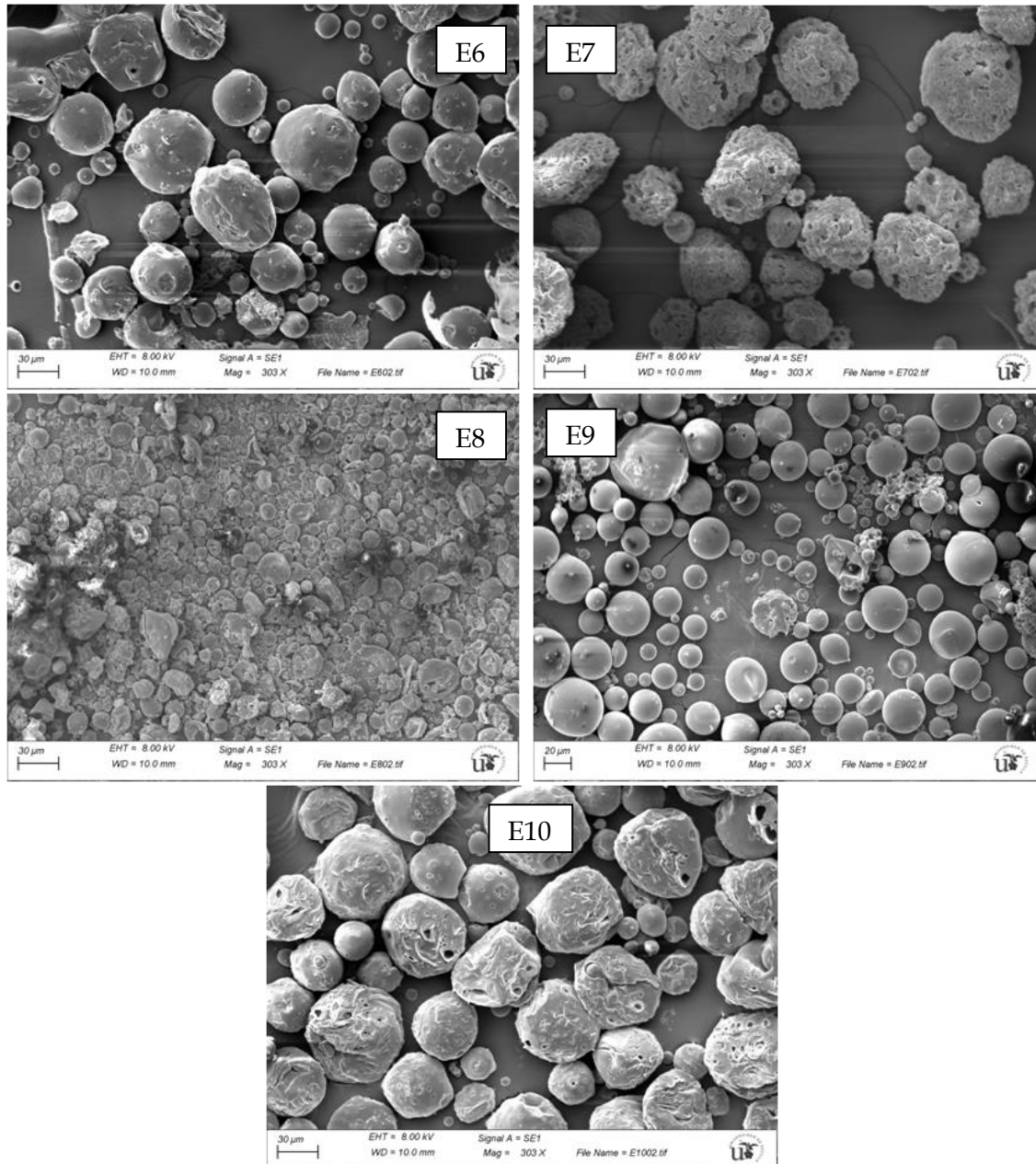


Figure 26. Observations au microscope électronique à balayage des microparticules préparées avec différentes concentrations du l'HPMC.

III.2.3 Analyse granulométrique et potentiel zêta des particules

La répartition granulométrique des microparticules obtenue en solution (l'eau bi distillée) est présentée dans le tableau 13.

Tableau 13. Caractéristiques des microparticules obtenues avec différentes concentrations en bio polymère MC et HPMC, après séchage.

Formulation	[%]	d10 (μm)	d50 (μm)	d90 (μm)	D (4,3)	Span
E1	0,05	14,26 \pm 0,15	50,56 \pm 0,08	70,04 \pm 0,14	47,77 \pm 0,11	1,10
E2	0,1	10,44 \pm 0,94	63,01 \pm 0,54	92,02 \pm 0,47	58,35 \pm 0,65	1,29
E3	0,2	42,16 \pm 2,90	91,15 \pm 2,10	473,91 \pm 76,23	176,05 \pm 0,01	4,73
E4	0,4	6,751 \pm 0,01	14,85 \pm 0,03	29,38 \pm 0,07	17,64 \pm 22,73	1,52
E5	0,5	7,56 \pm 0,029	26,56 \pm 0,03	75,21 \pm 0,98	34,04 \pm 0,08	2,54
E6	0,05	32,84 \pm 1,55	57,52 \pm 1,15	78,97 \pm 0,57	56,32 \pm 0,11	0,80
E7	0,1	38,94 \pm 0,25	68,11 \pm 0,36	92,14 \pm 0,41	66,45 \pm 0,27	0,78
E8	0,2	28,17 \pm 0,29	52,557 \pm 0,31	72,71 \pm 0,32	51,71 \pm 0,14	0,84
E9	0,4	20,107 \pm 0,37	42,507 \pm 0,18	58,75 \pm 0,32	41,62 \pm 0,24	0,90
E10	0,5	17,53 \pm 1,82	42,87 \pm 0,44	61,46 \pm 0,10	41,68 \pm 0,65	1,02

D (4,3) : diamètre moyenne en volume

D10 : 10e centile de la distribution.

D50 : taille médiane de la taille des particules.

D90 : 90e centile de la distribution.

Span : largeur de la distribution de taille des particules.

Les tailles des microparticules obtenues varient entre 17,05 \pm 0,01 μm à 176,64 \pm 22,73 μm (taille exprimé en D (4,3)) avec une polydispersité supérieure à 1 pour les

formulations E1-E5, ce qui indique que la gamme de tailles est large. Aucune tendance entre l'évolution de taille des microparticules et la concentration du bio-polymère MC n'est observée. Cependant, pour le HPMC, les tailles obtenues diminuent de $66,45 \pm 0,27$ μm à $41,62 \pm 0,24$ μm lorsque la concentration en HPMC augmente de 0,1 à 0,4 % dans la phase aqueuse interne et l'indice de polydispersité augmente de 0,78 à 0,90, mais il reste toujours inférieur par comparaison à celui obtenu avec la MC. La concentration élevée de l'HPMC conduit à l'augmentation de la viscosité de la phase aqueuse interne résultant en des gouttelettes plus grosses produisant des microparticules possédant une taille plus grande (**Ghaderi et al., 1996**). L'augmentation de la concentration du HPMC de 0,4 à 0,5 n'a pas d'effet significatif sur la taille. Les grandes valeurs de l'indice de polydispersité peuvent être corrélées à la présence de plusieurs populations de microparticules de tailles différentes.

La distribution de taille des particules peut être monomodale (une population) ou polymodale (plusieurs populations), mono-disperse (distribution étroite) ou poly-disperse (distribution large) (**Gaumet et al., 2008**). Les distributions de taille des microparticules de PLA préparées avec MC / HPMC à différentes concentrations sont présentées sur la Figure 27.

Les microparticules préparées avec différentes concentrations en MC possèdent la même allure de distribution de taille, qui d'après la littérature correspond à une distribution monomodale avec une agglomération (le faible pic en volume). Lorsque la concentration du MC augmente, plusieurs épaulements se manifestent. Quelle que soit la concentration du HPMC, les microparticules préparées possèdent la même allure de distribution de taille. Un signal et un épaulement (deux signaux) sont observés ; le signal principal correspond au signal de microparticules individualisées et le second signal de faible intensité correspond à des agglomérats de microparticules. Ces résultats sont conformes à ce que l'on trouve dans la littérature, à savoir que la taille des particules polymères produites par double émulsion évaporation du solvant n'est pas mono-disperse et que leur distribution est large (**Ibraheem et al., 2015 ; Morais et al., 2017**).

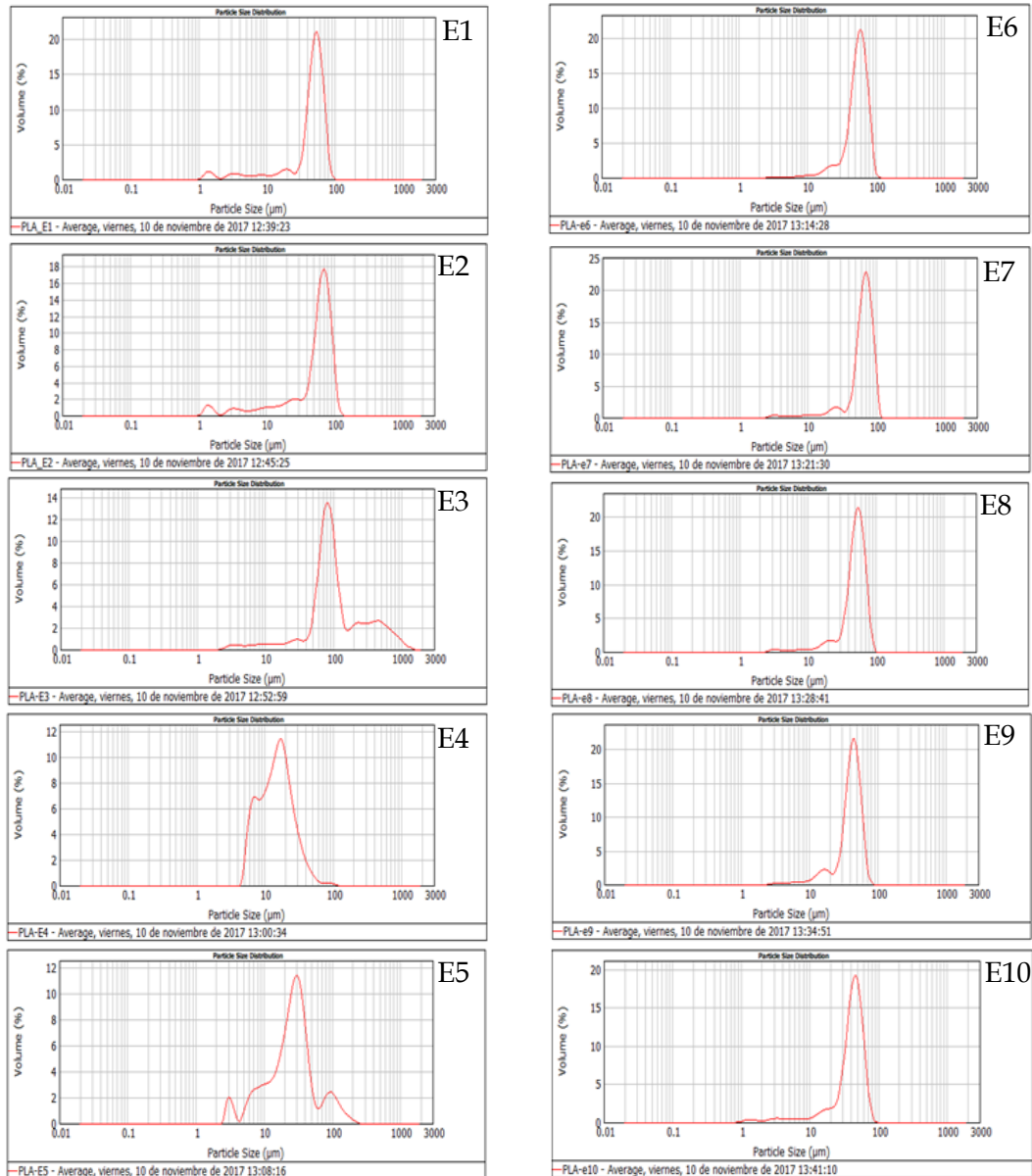


Figure 27. Courbes de distribution de taille en DLS des microparticules préparées avec MC (E1-E5)/ HPMC (E6-E10) à différentes concentration.

La connaissance de la charge ou le potentiel zêta des microparticules est très importante pour la stabilité des microparticules mais aussi pour la délivrance du médicament (**Honary et Zahir, 2013**). Le potentiel zêta est la mesure de la charge d'une microparticule dispersé dans un liquide et peut être également relié à la stabilité du système et sa valeur dépend essentiellement de la composition des microparticules et du milieu dispersant. Les microparticules préparées à partir de polyesters telle que le PLA présentent des potentiels zêta négatifs (**Altmeyer et al., 2016 ; Liu et al., 2014**).

Les valeurs de potentiel zêta sont présentées sur la figure 28. Nous pouvons remarquer que toutes les microparticules obtenues ont une charge négative. On constate que la surface des microparticules E1-E5 est moins chargée que celles des microparticules E6-E10. L'ensemble des valeurs du potentiel zêta des microparticules sont inférieures en valeur absolue à 30 mV (à l'exception de la formulation E10), en se référant à la classification relative de la stabilité des particules en suspension reporté dans la littérature (**Honary et Zahir, 2013**), nous pouvons affirmer que, nos microparticules possèdent une stabilité limitée.

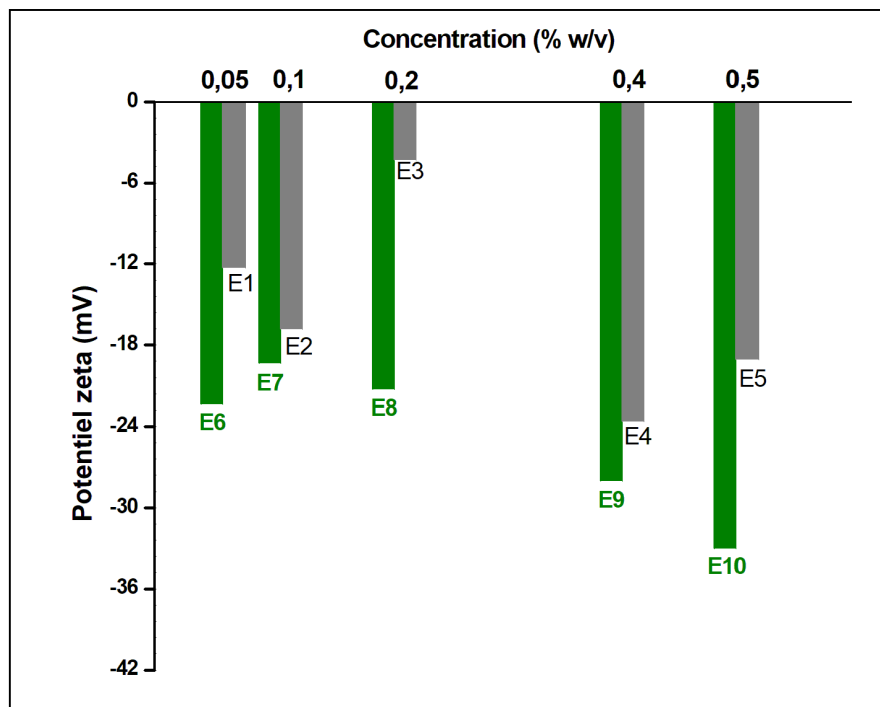


Figure 28. Potentiel Zêta des différentes microparticules préparées avec différents concentrations de MC (E1-E5) et l'HPMC (E6-E10).

III.2.4 Caractérisation des microparticules par diffraction des rayons X

L'analyse par diffraction des rayons X permet de détecter les éventuelles modifications du réseau cristallin du principe actif en interactions avec la matrice PLA. Les diffractogrammes du PLA et de la metformine pure, et les différentes formulations sont illustrée dans la figure 29.

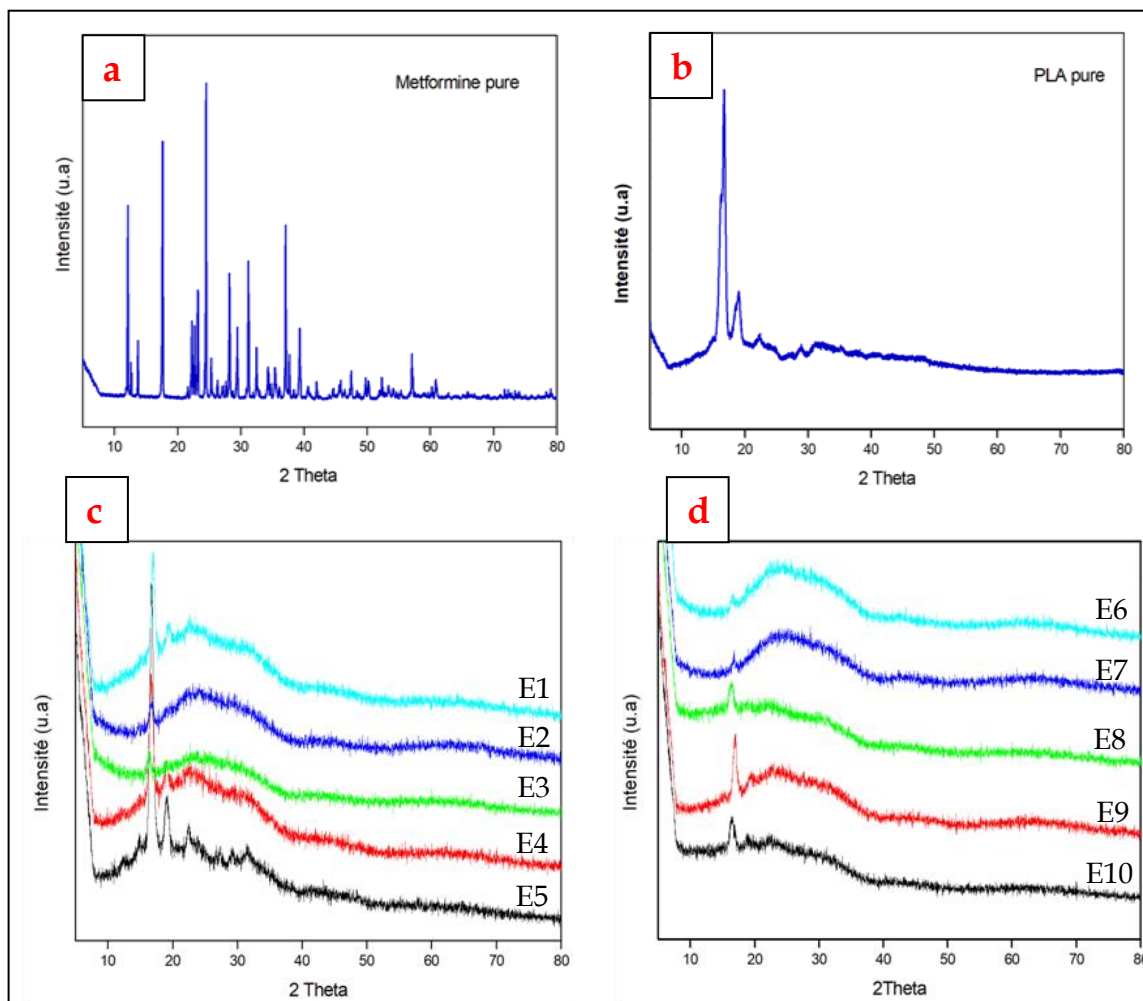


Figure 29. diffractogrammes de rayon X de la metformine pure (a), PLA pur (b), microparticules préparées avec le MC (c) et le HPMC (d)

Le diffractogramme de la metformine pure (Figure 29 a) montre une structure cristalline caractérisée par la présence de plusieurs pics cristallins fins situés successivement à 2θ égales à $12,09^\circ$, $17,47^\circ$, $24,44^\circ$, $28,29^\circ$, $31,05^\circ$, $37,09^\circ$ et à $39,20^\circ$. Le diffractogramme du PLA pure (Figure 29 b) montre une structure semi cristalline. Le PLA possède deux pics cristallins intenses, situés à des angles 2θ d'environ de $21,55$ et $23,79$.

En comparant les diffractogrammes des microparticules préparées avec le méthyle cellulose (Figure 29 c) avec ceux de la metformine et du PLA pure, on observe l'absence des pics caractéristiques de la metformine. Pour les pics caractéristiques du PLA, on remarque une légère diminution de leurs intensités.

Tout comme le MC, les diffractogrammes des microparticules de PLA préparé en présence du HPMC (Figure 29 d) montre une similitude dans les profils, révèle la disparition de tous les raies caractéristiques de la metformine. Par ailleurs, les deux principaux pics du PLA tendent à disparaître par diminution très remarquées de leurs intensités.

L'absence des pics caractéristiques de la metformine et la diminution des intensités des pics caractéristiques du polymère met en évidence le caractère amorphe la metformine dans toutes les microparticules, et ceci est dû à la dispersion moléculaire de la metformine dans la matrice PLA pendant la microencapsulation.

III.2.5 Analyse thermique des microparticules par DSC

Le comportement thermique du PLA, la metformine et les différentes microparticules sont observé par DSC pour enregistrer les éventuels changements d'états de l'échantillon qui peuvent avoir lieu lors de l'encapsulation. Les thermogrammes obtenus lors du premier chauffage sont illustrés par la figure 30.

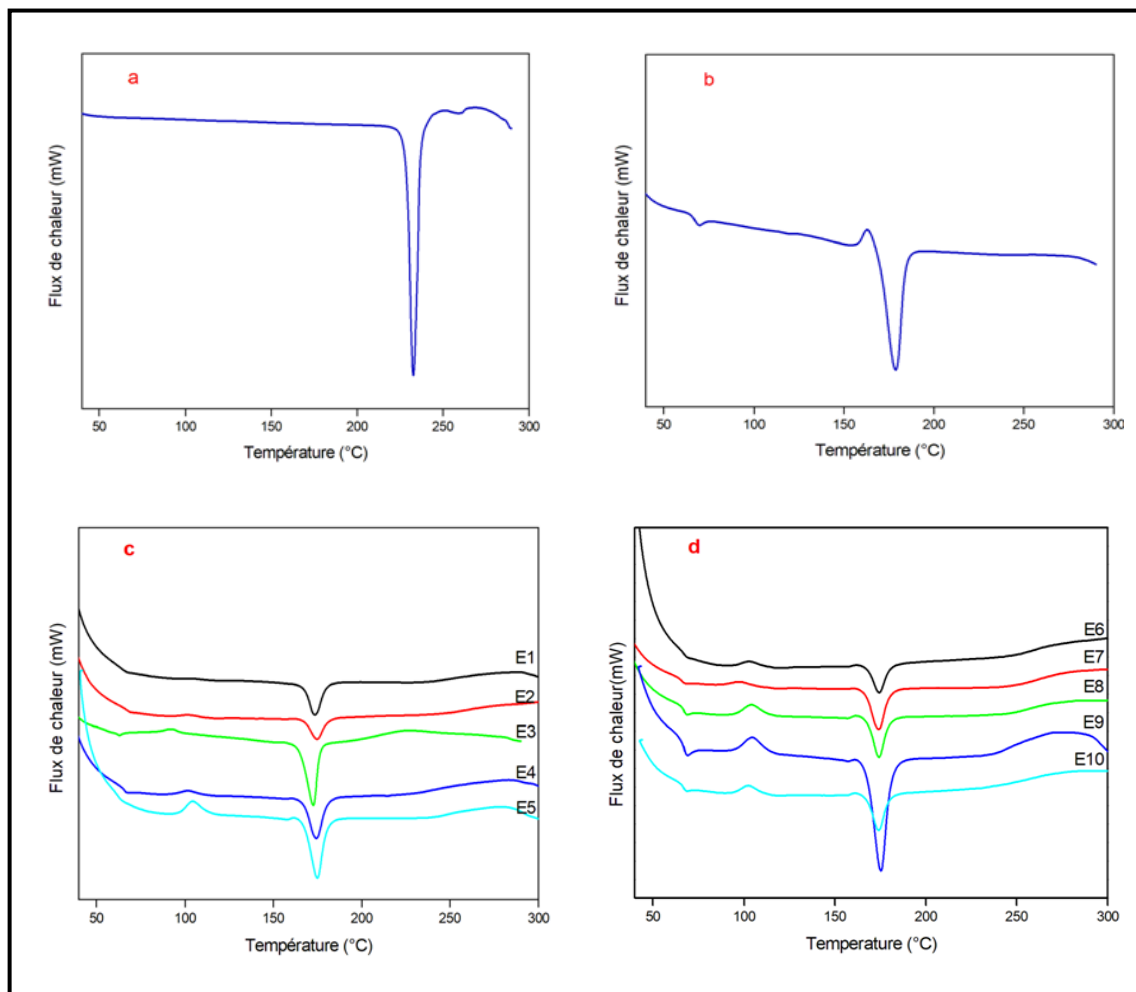


Figure 30. Thermogrammes DSC de la metformine pure (a), PLA pur (b), microparticules préparées avec le MC (c) et l'HPMC (d).

Le thermogramme (DSC) obtenu pour la metformine pure (Figure 30 a) montre un seul pic endothermique entre 200 et 250 °C, centré à $T_f = 233$ °C ($54,7$ J g⁻¹) attribué à sa température de fusion. Le thermogramme (DSC) du PLA pure (Figure 30 b) montre un pic endothermique de fusion situé à 179 °C, correspond à la fusion de la partie cristalline du PLA.

La comparaison entre les diagrammes DSC du PLA, metformine et les différentes microparticules (Figure 30 c et d) montre ; la disparation du pic de fusion de la metformine et la diminution de l'intensité du pic de fusion du PLA avec l'addition de la MC et le HPMC. Ce résultat confirme, une fois de plus la bonne dispersion de la metformine dans la matrice polymère. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus

par analyse DRX montrant la dispersion/dissolution de la metformine dans la matrice du PLA (Machado et al., 2009).

III.2.6 Caractérisation des microparticules par Spectroscopie Infra-Rouge (IR)

La figure 31 présente les spectres infrarouges (IR) du PLA, la metformine pure, et les différentes microparticules. L'utilisation de cette méthode d'analyse nous a permis d'identifier les groupements caractéristiques de PLA et de chlorhydrate de metformine, et aussi d'identifier les interactions entre ces derniers dans les microparticules.

Le spectre IR-TF de la metformine pure (Figure 31 a) présente deux bandes de vibration de valence de la liaison N-H de C-N-H primaire se situant dans la région 3400 et 3100 cm^{-1} . Les absorbances à 3396 cm^{-1} , 3296 cm^{-1} et 3176 cm^{-1} correspondent à l'élongation symétrique et asymétrique de N-H primaire. Une bande intense positionnée à 1620 cm^{-1} est assignée à la déformation dans le plan de la liaison NH_2 . Les bandes à 734 cm^{-1} et 933 cm^{-1} de moyenne à faible intensité sont assignées aux balancements de la liaison C-H et CN-C respectivement. À 1625 cm^{-1} une forte bande d'adsorption qui est due à la vibration d'élongation du groupement C=N. Les vibrations d'élongation symétrique et asymétrique du groupement -CH du méthyle aliphatique sont notées entre 2974 cm^{-1} et 2933 cm^{-1} . Trois bandes de déformations du groupement CH_3 d'une moyenne intensité sont observées à 1413 cm^{-1} , 1448 cm^{-1} et 1477 cm^{-1} . Deux bandes caractéristiques situées à 1064 cm^{-1} et 1176 cm^{-1} sont attribuées à la vibration de valence de C-N d'une amine secondaire. Deux vibrations d'élongation du groupement C-Cl sont notées à 605 et 636 cm^{-1} . (Patiño-Herrera et al., 2019 ; Refat et al., 2015).

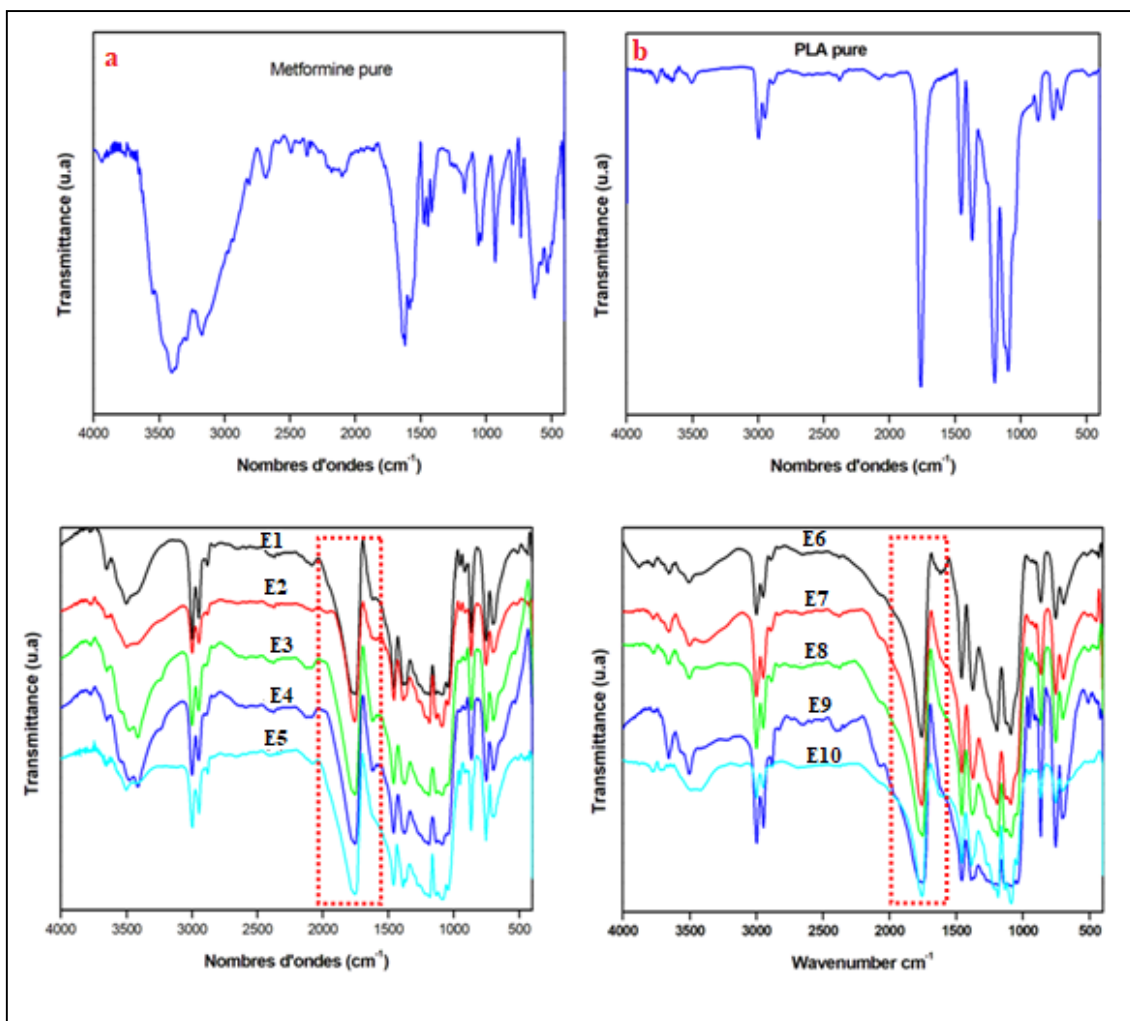


Figure 31. Spectres IRTF de la metformine pure (a), PLA pur (b), microparticules préparées avec le MC (E1-E5) et le HPMC (E6-E10)

Le spectre du PLA (Figure 31 b) révèle l'existence d'une bande d'adsorption intense observée à 1735 cm^{-1} qui est due à la vibration d'élongation de la liaison du groupe carbonyle ester C=O. Les bandes situées dans la région $2800\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$ sont dues à la vibration d'élongation de la liaison -CH du groupe CH₃. D'autres bandes sont observées dans la région $1300\text{-}1050\text{ cm}^{-1}$ qui sont caractéristiques de la vibration d'élongation de la liaison C-O de l'ester. Une bande observée à 3446 cm^{-1} est attribué à la vibration d'élongation de l'hydroxyde OH terminal (Hyvönen et al., 2005).

La comparaison des spectres des différentes microparticules avec celui de la metformine et du PLA montre l'absence des bandes caractéristiques du principe actif, cependant toutes les bandes caractéristiques du PLA sont présentes avec un décalage de

leurs longueurs d'ondes (nombre inférieurs) et un changement de leurs formes. Pour les liaisons (-C-O) situés entre 800 et 1200 cm^{-1} on remarque un changement de l'aspect des épaulements par rapport à celui du PLA (Figure 31 c et d) qui est probablement due à la formation des liaisons hydrogènes avec les amines de la metformine confirmant son encapsulation dans la matrice poly acide lactique (Nayak et al., 2014).

III.2.7 Efficacité d'encapsulation

L'efficacité d'encapsulation des différentes microparticules sont déterminée par la méthode HPLC de la même manière décrite précédemment. Les résultats obtenus sont représentés sur la figure 32.

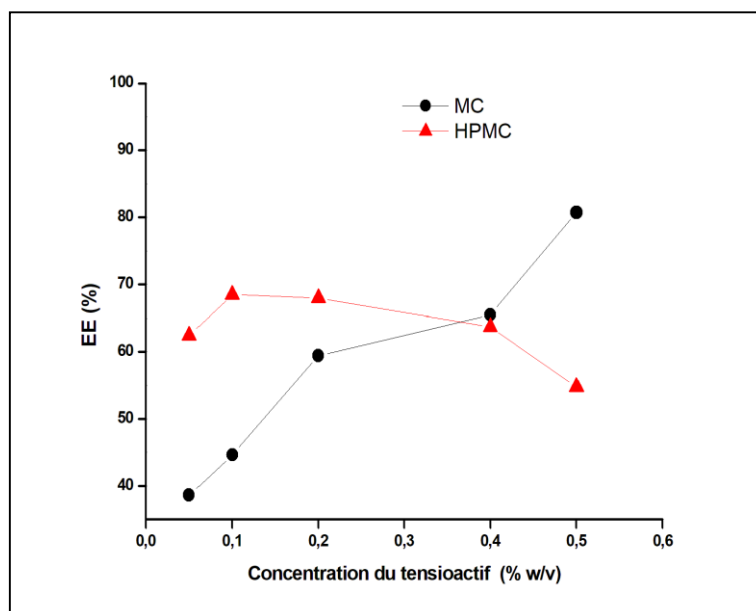


Figure 32. Efficacité d'encapsulation de la metformine en fonction de la concentration du MC et le HPMC.

Dans le cas du méthyle cellulose (MC), les valeurs de l'efficacité d'encapsulation augmentent avec l'augmentation de la concentration de MC. L'efficacité d'encapsulation passe de 38,62 % à 80,72 % quand la concentration de MC varie de 0,05 (% m/v) à 0,5 (% m/v). Cette amélioration de rétention de metformine en fonction de la concentration de MC est due probablement à l'augmentation de la viscosité de la phase aqueuse interne qui diminue la perte de principe actif et améliore l'efficacité d'encapsulation (**Martín-Sabroso et al., 2015**).

Dans le cas de l'hydroxypropyl méthylcellulose (HPMC), les valeurs d'efficacité d'encapsulation diminuent quand la concentration du HPMC augmente, passant de 68,49 % à 54,78 % quand la concentration du HPMC varie de 0,1 (% m/v) à 0,5 (% m/v). Cette diminution peut être expliquée par le fait qu'après la formation de la double émulsion, et durant l'étape l'évaporation progressive du dichlorométhane, les molécules de la metformine diffusent vers la phase aqueuse externe à travers les pores formée à la surface des microparticules (**Ghaderi et al., 1996**).

L'addition du HPMC à la phase aqueuse interne durant la formulation des microparticules engendre la formation des pores ce qui réduit l'efficacité de rétention du principe actif par les microparticules (**Aho et al., 2017**).

III.2.8 Étude de la cinétique de libération

L'étude de libération *in vitro* de la metformine à partir des microparticules préparées a été suivie dans les mêmes conditions que celles décrites au chapitre précédent, à savoir 2 h dans le milieu simulé gastrique (pH=1,2) ensuite dans le milieu simulé intestinal (pH=6,8).

Les profils de libération obtenus exprimées en pourcentage de metformine libéré en fonction du temps, sont présentés aux figures 33 et 34 pour les formulations E1-E5 et E6-E10 respectivement. Chaque point de chaque profil de dissolution est une moyenne des pourcentages de dissolution pour trois tests.

La libération de la metformine à partir des microparticules E1-E5 dans le milieu simulant les conditions gastrique et intestinal, est faible durant les 24 heures (Figure 33), moins de 10 % de la quantité totale en metformine est libérée à partir des formulations testées. La comparaison entre les différents profils de dissolution a été

réalisée par le calcul du facteur de similarité f_2 . Nous avons considéré la formulation E1 comme un échantillon de référence. Les valeurs de f_2 calculé se situent entre 50 et 100 (f_2 égale à 82,88 - 86,35 - 86,23 - 96,68 pour les formulations E2, E3, E4 et E5 respectivement) ce qui indique que tous les profils de dissolution sont similaires. L'introduction de la MC dans la phase aqueuse interne lors de la préparation des microparticules a conduit à la formation des matrices dense ayant une surface lisse. Cette caractérisation de surface empêche l'intrusion du milieu de dissolution au sein des microparticules ce qui conduit au faible taux de libération de la metformine. Une libération incomplète de principe actif a été rapportée dans la littérature concernant les microparticules de PLA après administration orale (**Wichert et Rohdewald, 1990**).

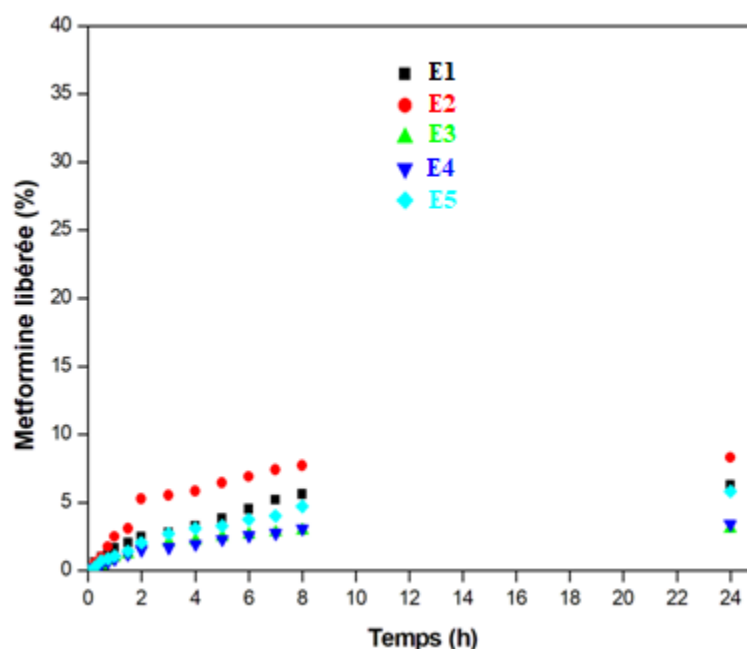


Figure 33. Profils de libération de la metformine à partir de microparticules préparées en présence de la MC E1-E5.

Les profils de libérations de la metformine à partir des microparticules de PLA préparées en présence du l'HPMC (E6-E10) sont caractérisés par une libération incomplète avec présence d'une libération rapide au début du test. La libération initiale survenue au cours des 2 premières heures (Figure 34) peut être due à la libération de metformine située près de la surface des microparticules (**de Azevedo et al., 2017**). La présence des pores à la surface des microparticules avant incubation dans le milieu de

dissolution contribuent aussi à la libération rapide de la metformine dans les premiers temps du test de libération. Après la phase rapide, la libération de metformine montre un ralentissement jusqu'à la fin de l'expérience (libération plus lente de 2 h à 24 h). La libération de la metformine à partir de toutes les microparticules présente un profil diphasique (un effet burst initial suivi d'une phase de libération plus lente). Notre résultat est en accord avec les travaux réalisées sur la libération d'autres principes actifs à partir des microparticules de PLA (Leo et al., 2006 ; Yoshida et al., 2015).

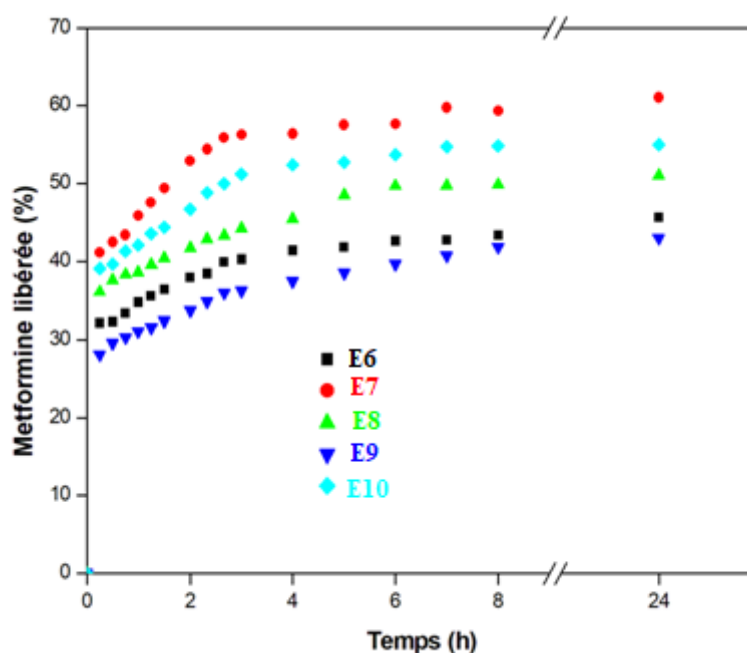


Figure 34. Profils de libération de la metformine à partir de microparticules à différentes concentrations en HPMC

La comparaison entre les profils de dissolution (Figure 34) révèle que la libération la plus élevée de metformine provient des microparticules poreuses (E 7), tandis que la libération la plus faible provient des microparticules lisses (E 9). On constate que la libération de metformine augmente avec l'augmentation de la rugosité et/ou la porosité de surface des microparticules. La surface rugueuse des microparticules fournit plus de surface disponible pour le milieu de dissolution, améliore ainsi la mouillabilité, conduisant à une augmentation de la libération par rapport à celles ayant des surfaces lisses (Hussain et al., 2017). Klose et al se sont intéressés à l'influence de la porosité des microparticules sur la cinétique de libération. Des particules ayant une surface

poreuse permettent un meilleur contact entre les particules et le solvant ce qui accroissent la diffusion des molécules de principe actif vers le milieu de dissolution (Klose *et al.*, 2006).

La comparaison entre les profils de libérations (**Figure 35**) montre que la libération de la metformine est significativement lente dans les microparticules préparées avec la MC (E1-E5) par rapport à celles préparées avec l'HPMC (E6-E10). Cela est expliqué par les propriétés des microparticules utilisées (poreuse ou lisse) qui ont en effet une influence sur la vitesse de libération du PA.

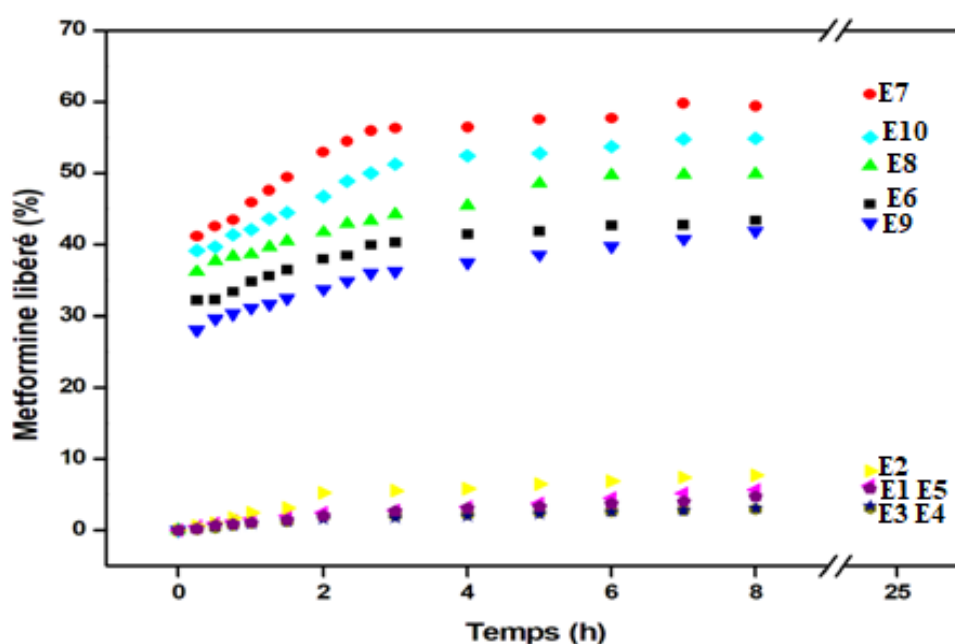


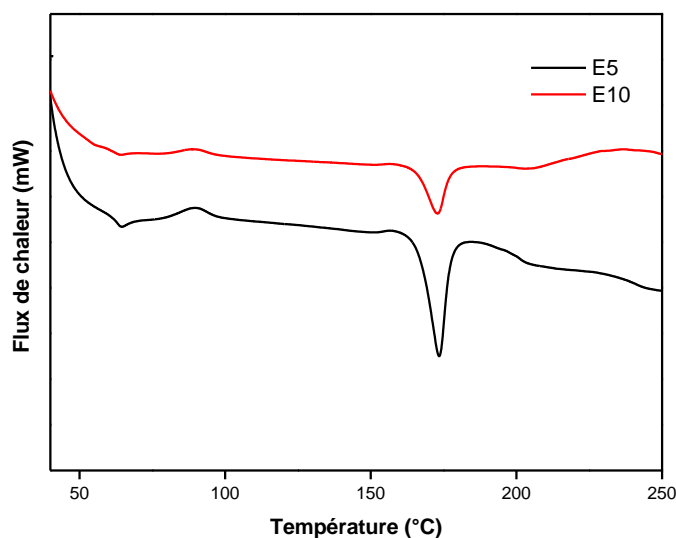
Figure 35. Comparaison des profils de libérations de la metformine à partir de microparticules préparées avec la MC (E1-E5) et l'HPMC (E6-E10).

La libération de la metformine à partir des microparticules de PLA est incomplète pour toutes les microparticules et correspond à des pourcentages de libération inférieurs à 100 %. Les pourcentages de metformine non libéré au bout de 24 h sont fournis par les dosages du metformine résiduel dans les microparticules sont présentés au tableau 14.

Tableau 14. Quantité de metformine résiduel (QR) dans les microparticules au bout de 24 heures (%)

	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10
QL(%)	6,28	8,31	3,08	3,41	5,84	45,64	61,04	51,32	43,49	55,14
QR(%)	93,31	90,48	95,21	96,08	93,46	55,06	37,26	48,43	55,78	43,48

La connaissance de l'état physique du PLA est très importante pour la compréhension des mécanismes de libération de la metformine. L'analyse par calorimétrie différentielle à balayage (Figure 36) des microparticules (formulation E5 et E10) après le test de libération a montré que la température de fusion du PLA n'est pas affectée. Le maintien de cette température constante lors du test de libération indique que la dégradation du PLA n'a pas eu lieu. L'état de la matrice est vitreux lors de la libération de la metformine, ce qui conduit à des vitesses de libération lente.

**Figure 36.** Thermogrammes DSC des formulations préparées avec le MC (E5) et le HPMC (E10) après 24h de test de dissolution.

La figure (37) montre, après 24 h d'exposition au test de dissolution que, certaines microparticules gardent leurs formes sphériques et d'autre sont effondré et cela est due à la couche du polymère n'est pas épaisse pour maintenir la forme des microparticules. On constate aussi que quelques microparticules sont devenues plus poreuses comparativement à leur état initial, des pores sont devenus de plus en plus visibles à la surface.

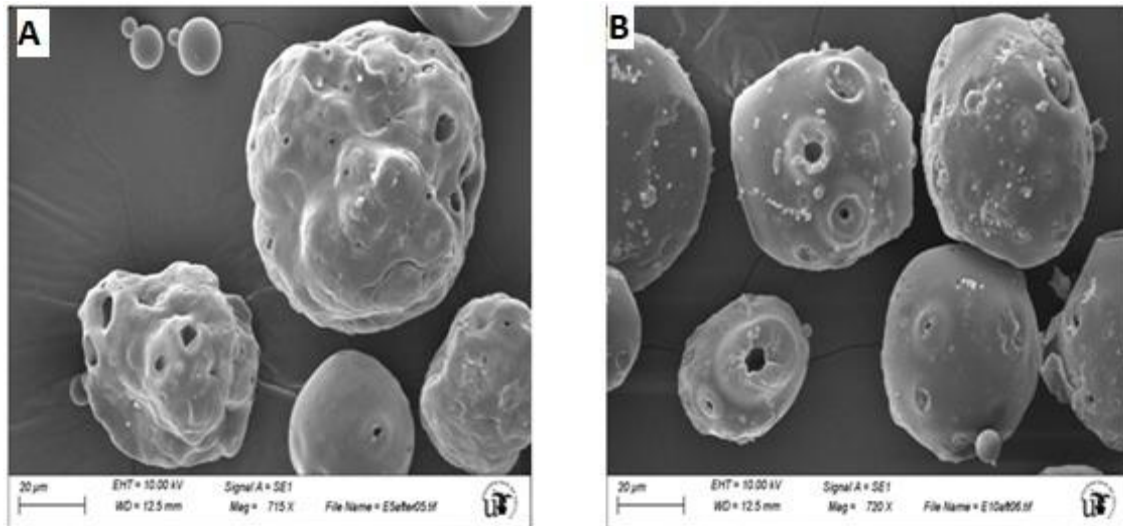


Figure 37. Images MEB des microparticules de PLA chargées en metformine préparées avec le MC (A) et le HPMC (B) après 24h de test de dissolution.

III.2.9 Modélisation des profils de dissolution

L'évaluation de la cinétique de libération de la metformine à partir des microparticules préparées avec le MC n'a pas été possible car les particules ont libérées moins de 10 % du principe actif.

Afin de fournir une analyse complète des résultats de dissolution obtenue et d'identifier le mécanisme de libération de metformine à partir des microparticules de PLA préparées avec le HPMC, la modélisation des profils de dissolution a été réalisée par application de quatre modèles mathématiques. La figure 38 regroupe les représentations graphiques du modèle mathématique d'ordre zéro, de premier ordre, de Higuchi et Korsmeyer-Peppas respectivement.

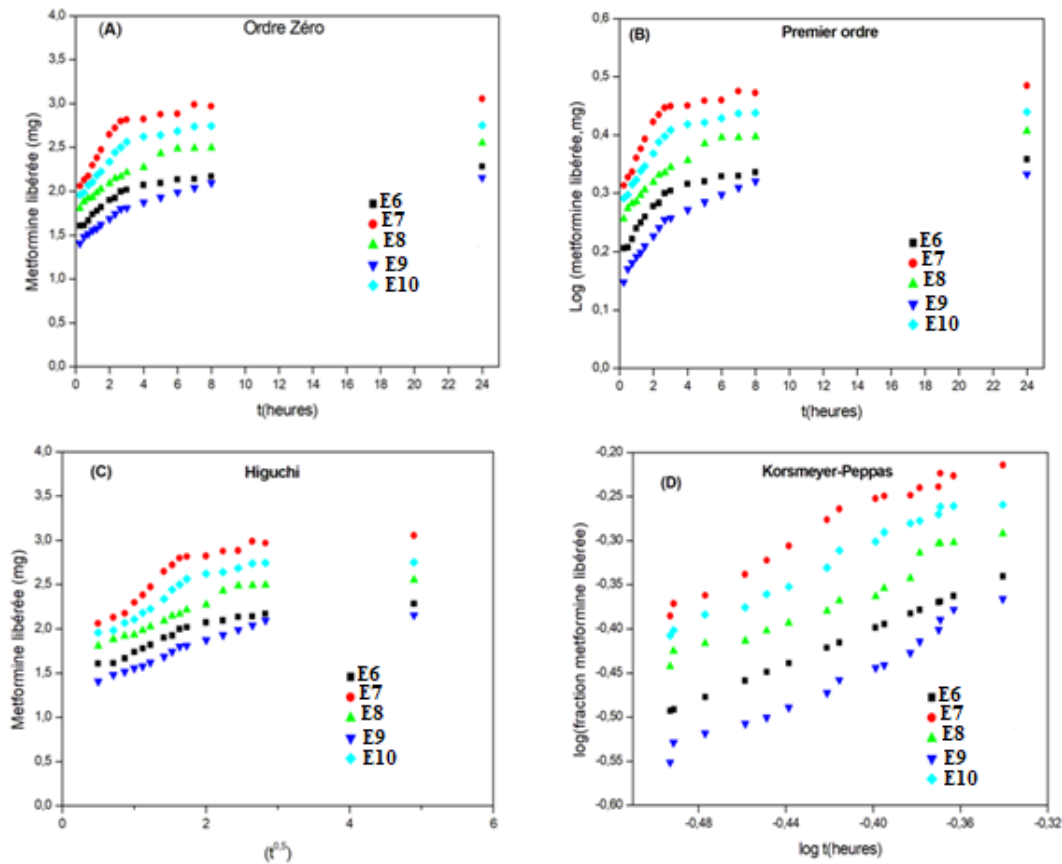


Figure 38. Représentations graphiques des cinétiques de libération selon les modèles d'ordre zéro (A), de premier ordre (B), de Higuchi (C), Korsmeyer-Peppas (D), et de Hixson-Crowell (E) appliqués à notre résultats.

L'application de ces modèles aux cinétiques de libération obtenues pour les microparticules E6, E7, E8, E9 et E10 et la non linéarité de chacune de ses représentations graphiques sur l'ensemble de la cinétique est observée. Néanmoins, on remarque une linéarisation lors des trois premières heures avec les modèles d'ordre zéro (A), de premier ordre (B), de Higuchi (C), et de Hixson-Crowell (E). Donc nous ne pouvons conclure la nature du phénomène sur la totalité de l'expérience (24 heures). Pour cela nous avons appliqué les modèles aux cinétiques de libération obtenues pour chaque milieu de dissolution. Les valeurs des paramètres obtenues pour chaque modèle sont reportées dans le tableau 15.

Tableau 15. Les coefficients de corrélation (R^2) et les paramètres d'ajustement obtenus à partir de modèles mathématiques d'ordre zéro, ordre 1, Higuchi et Korsmeyer-Peppas pour la libération de la metformine à partir des microparticules E6-E10.

formulations	E6		E7		E8		E9		E10	
	pH=1,2	pH=6,8	pH=1,2	pH=6,8	pH=1,2	pH=6,8	pH=1,2	pH=6,8	pH=1,2	pH=6,8
Paramètres de l'équation d'Ordre zéro										
$K_0(h)$	0,178	0,0374	0,344	0,04	0,152	0,04	0,151	0,058	0,223	0,049
R^2	0,675	0,460	0,725	0,451	0,646	0,466	0,669	0,51	0,678	0,441
Paramètres de l'équation d'ordre 1										
K_1	0,102	0,018	0,147	0,014	0,077	0,029	0,97	0,030	0,104	0,018
R^2	0,704	0,667	0,783	0,727	0,673	0,724	0,692	0,734	0,717	0,729
Paramètres de l'équation d'Higuchi										
K_H	0,340	0,165	0,652	0,174	0,293	0,304	0,294	0,253	0,424	0,217
R^2	0,997	0,924	0,983	0,907	0,934	0,937	0,937	0,994	0,991	0,943
Paramètres de l'équation de Korsmeyer-Peppas										
$K_{KP} (h^{-1})$	1	1	1,371	1,029	0,929	2,798	0,920	1,181	1,093	1,11
R^2	1	1	0,984	0,873	0,923	0,897	0,932	0,936	0,983	0,972
n	0,093	0,101	0,107	0,122	0,095	0,105	0,111	0,12	0,1	0,116

Le choix du modèle qui s'ajustant le mieux aux données est basé sur l'évaluation des coefficients de détermination (R^2) obtenu lors du traçage des résultats expérimentaux selon les équations correspondantes aux modèles étudiés. Le modèle avec le R^2 le plus proche de l'unité sera considéré le mieux adéquat pour l'explication la libération de la metformine (Abou-El Nour, et al., 2019 ; Mircioiu et al., 2019).

En analysant ces résultats, on observe,

Pour le model **d'ordre zéro**, les valeurs de R^2 obtenue sont faible (0,45 – 0,7), ce qui signifie que le model ne peut pas être utilisé pour décrire la libération de la metformine à partir de la matrice de PLA (Regnier-Delplace et al., 2013; Dekyndt et al., 2015). De même pour le model **d'ordre un**, les valeurs de R^2 trouvés sont aussi

faibles (0,66 – 0,78). cela signifie que le model ne peut pas être considéré comme acceptable pour décrire la libération de la metformine (**De Oliveira et al., 2017**).

Le model d' Higuchi dans le milieu gastrique et intestinal, quant à lui présente des coefficients R^2 qui sont supérieurs à 0,90. Ce résultat indique que le processus de libération de la metformine à partir de ces microparticules est gouverné par la diffusion, avec libération de la metformine à travers les pores et les fissures des microparticules (**Singh et al., 1998**).

En ce qui concerne le modèle de Korsmeyer-Peppas (loi de puissance), les coefficients de corrélation R^2 sont supérieurs à ($R^2 \geq 0,92$). Celui-ci est utilisé pour analyser la libération du principe actif à partir des microparticules de PLA. Suivant la valeur numérique de n , l'exposant de libération on peut déterminer le phénomène impliqué (**Obayemi et al., 2016**).

D'après les résultats, à pH=1,2 et 6,8, les microparticules présentent des valeurs de n comprises entre 0,093 et 0,122, ne correspondant pas à la gamme de valeurs de n établies dans la littérature. Les valeurs de n reportées dans la littérature sont valables pour des microparticules mono disperse (**Unagolla et al., 2018**). L'influence de la polydispersité des microparticules sur le mécanisme de libération a été étudiée par Ritger, et Peppas. L'application de l'équation de korsmeyer Peppas pour modéliser la cinétique de libération à partir d'un échantillon de microparticules de différentes tailles (20 % à 20 μm , 60 % à 100 μm , et 20 % à 500 μm) a abouti à une valeur de n égale à $0,30 \pm 0,01$ qui est différente de celle obtenue pour un échantillon mono disperse de taille de 100 μm ($n=0,43$). D'après nos résultats obtenus ($n < 0,43$), on peut dire que la libération de la metformine à partir des microparticules de PLA se fait par un mécanisme de diffusion fickienne (**Ritger et Peppas, 1987**).

Nos résultats sont en accord à ceux trouvés par (**Graves et al., 2004**) ou la modélisation de la cinétique de libération du pentamidine à partir des microparticules de PLGA avec le modèle de Korsmeyer-Peppas a donnée des valeurs de n inférieurs à 0,45 (0,056 et 0,187) qui est corrélé à une biodégradation de la matrice polymère. Dans une autre étude (**Carreras et al., 2013**) concernant la modélisation de la cinétique de libération à partir des microparticules de PCL, les valeurs du coefficient n obtenus par

application du model loi de puissance (Korsmeyer-Peppas) varient de 0,1258 à 0,1368 ($n < 0,43$). Selon les auteurs le médicament se libère à partir des microparticules suivant un mécanisme de diffusion fickienne.

III.2.10 Conclusion

Dans cette partie expérimentale, l'effet de l'ajout de la MC et l'HPMC sur les propriétés des microparticules et la cinétique de libération in vitro a été mis en évidence par différentes techniques de caractérisations (HPLC, MEB, IR, DSC, DRX, DLS).

Les résultats ont démontré que les microparticules obtenues par la MC et l'HPMC présentent des tailles inférieures à 100 μm avec des potentiels zêtas négatifs. L'efficacité d'encapsulation de la metformine augmente avec la concentration de la MC et une diminution est observée dans le cas de l'HPMC.

L'observation au microscope électronique à balayage des microparticules préparées avec la MC indique que ces derniers ont une surface lisse et présentent une libération faible en metformine ($< 10\%$). Tandis qu'en présence de l'HPMC, des microparticules avec des surfaces rugueuses et poreuses sont obtenues et une libération améliorée de la metformine ou environ 58 % est notée.

Références bibliographiques

Abou-ElNour, M., Ishak, R. A., Tiboni, M., Bonacucina, G., Cespi, M., Casettari, L., Geneidi, A. S. (2019). Triamcinolone acetonide-loaded PLA/PEG-PDL microparticles for effective intra-articular delivery: synthesis, optimization, in vitro and in vivo evaluation. *Journal of Controlled Release*, 309, 125-144.

Aho, J., Halme, A., Boetker, J., Water, J. J., Bohr, A., Sandler, N., Baldursdottir, S. (2017). The effect of HPMC and MC as pore formers on the rheology of the implant microenvironment and the drug release in vitro. *Carbohydrate polymers*, 177, 433-442.

Altmeyer, C., Karam, T. K., Khalil, N. M., Mainardes, R. M. (2016). Tamoxifen-loaded poly (L-lactide) nanoparticles: development, characterization and in vitro evaluation of cytotoxicity. *Materials Science and Engineering: C*, 60, 135-142.

Amasya, G., Badilli, U., Aksu, B., Tarimci, N. (2016). Quality by design case study 1: Design of 5-fluorouracil loaded lipid nanoparticles by the W/O/W double emulsion-Solvent evaporation method. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 84, 92-102.

André-Abrant, A., Taverdet, J. L., Jay, J. (2001). Microencapsulation par évaporation de solvant. *European polymer journal*, 37(5), 955-963.

Bazzo, G. C., Macedo, A. T. D., Crenca, J. P., Silva, V. E., Pereira, E. M., Zétola, M., Pezzini, B. R. (2012). Microspheres prepared with biodegradable PHBV and PLA polymers as prolonged-release system for ibuprofen: in vitro drug release and in vivo evaluation. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 48(4), 773-780.

Bouriche, S. (2013). Encapsulation de la metformine dans des polymères biodégradables. Mémoire de magister, université de Bejaia.

Carreras, N., Acuña, V., Martí, M., Lis, M. J. (2013). Drug release system of ibuprofen in PCL-microspheres. *Colloid and Polymer Science*, 291(1), 157-165.

Choi, Y. H., Chung, S. J., Lee, M. G. (2008). Pharmacokinetic interaction between DA- 8159, a new erectogenic, and metformin in rats: competitive inhibition of metabolism via hepatic CYP3A1/2. *British journal of pharmacology*, 153(7), 1568-1578.

Cosco, D., Paolino, D., De Angelis, F., Cilurzo, F., Celia, C., Di Marzio, L., Fresta, M. (2015). Aqueous-core PEG-coated PLA nanocapsules for an efficient entrapment of water-soluble anticancer drugs and a smart therapeutic response. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 89, 30-39.

Cózar-Bernal, M. J., Holgado, M. A., Arias, J. L., Muñoz-Rubio, I., Martín-Banderas, L., Alvarez-Fuentes, J., Fernández-Arévalo, M. (2011). Insulin-loaded PLGA microparticles: flow focusing versus double emulsion/solvent evaporation. *Journal of Microencapsulation*, 28(5), 430-441.

De Azevedo, C. R., von Stosch, M., Costa, M. S., Ramos, A. M., Cardoso, M. M., Danhier, F., Oliveira, R. (2017). Modeling of the burst release from PLGA micro- and nanoparticles as function of physicochemical parameters and formulation characteristics. *International journal of pharmaceutics*, 532(1), 229-240.

De Oliveira, E. G., de Caland, L. B., de Oliveira, A. R., Machado, P. R. L., Farias, K. J. S., da Costa, T. R., da Silva-Júnior, A. A. (2017). Monitoring thermal, structural properties, methotrexate release and biological activity from biocompatible spray-dried microparticles. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 130(3), 1481-1490.

Dekyndt, B., Verin, J., Neut, C., Siepmann, F., Siepmann, J. (2015). How to easily provide zero order release of freely soluble drugs from coated pellets. *International journal of pharmaceutics*, 478(1), 31-38.

Desai, D., Wong, B., Huang, Y., Ye, Q., Tang, D., Guo, H., Timmins, P. (2014). Surfactant-mediated dissolution of metformin hydrochloride tablets: wetting effects versus ion pairs diffusivity. *Journal of pharmaceutical sciences*, 103(3), 920-926.

Dianben, fiche technique : Agence Espagnole du Médicament. Fiche Technique Dianben® 850 mg, [Fiche consulte le 20 May 2019]. Disponible en: https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/55211/FT_55211.html#4-3-contraindicaciones

Díez, R., García, J. J., Díez, M. J., Sierra, M., Sahagun, A. M., Fernández, N. (2017). Influence of *Plantago ovata* husk (dietary fiber) on the bioavailability and other pharmacokinetic parameters of metformin in diabetic rabbits. *BMC complementary and alternative medicine*, 17(1), 1-9.

Dinarvand, R., Moghadam, S. H., Sheikhi, A., Atyabi, F. (2005). Effect of surfactant HLB and different formulation variables on the properties of poly-D, L-lactide microspheres of naltrexone prepared by double emulsion technique. *Journal of microencapsulation*, 22(2), 139-151.

Erden, N., Celebi, N. (1996). Factors influencing release of salbutamol sulphate from poly (lactide-co-glycolide) microspheres prepared by water-in-oil-in-water emulsion technique. *International journal of pharmaceutics*, 137(1), 57-66.

Farago, P. V., Raffin, R. P., Pohlmann, A. R., Guterres, S. S., Zawadzki, S. F. (2008). Physicochemical characterization of a hydrophilic model drug-loaded PHBV microparticles obtained by the double emulsion/solvent evaporation technique. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 19(7), 1298-1305.

Freitas, S., Merkle, H. P., Gander, B. (2005). Microencapsulation by solvent extraction/evaporation: reviewing the state of the art of microsphere preparation process technology. *Journal of controlled release*, 102(2), 313-332.

Gao, H., Wang, Y. N., Fan, Y. G., Ma, J. B. (2005). Synthesis of a biodegradable tadpole-shaped polymer via the coupling reaction of polylactide onto mono (6-(2-aminoethyl) amino-6-deoxy)- β -cyclodextrin and its properties as the new carrier of protein delivery system. *Journal of controlled release*, 107(1), 158-173.

Gaumet, M., Vargas, A., Gurny, R., Delie, F. (2008). Nanoparticles for drug delivery: the need for precision in reporting particle size parameters. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, 69(1), 1-9.

Ghaderi, R., Stureson, C., Carlfors, J. (1996). Effect of preparative parameters on the characteristics of poly d, l-lactide-co-glycolide) microspheres made by the double emulsion method. *International journal of pharmaceutics*, 141(1-2), 205-216.

Ghari, T., Mortazavi, S. A., Khoshayand, M. R., Kobarfard, F., Gilani, K. (2014). Preparation, optimization, and in vitro evaluation of azithromycin encapsulated nanoparticles by using response surface methodology. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 24(4), 352-360.

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. *International journal of pharmaceutics*, 270(1-2), 251-262.

Han, K., Lee, K.D., Gao, Z.G., Park, J.S. (2001). Preparation and evaluation of poly (L-lactic acid) microspheres containing rhEGF for chronic gastric ulcer healing. *Journal of Controlled Release*, 75, 259 -269

Hao, J., Fang, X., Zhou, Y., Wang, J., Guo, F., Li, F., Peng, X. (2011). Development and optimisation of solid lipid nanoparticle formulation for ophthalmic delivery of chloramphenicol using a Box-Behnken design. *International Journal of Nanomedicine*, 6, 683-692.

Hernández, B., Pflüger, F., Kruglik, S. G., Cohen, R., Ghomi, M. (2015). Protonation–deprotonation and structural dynamics of antidiabetic drug metformin. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 114, 42-48.

Herrmann, J., Bodmeier, R. (1995). The effect of particle microstructure on the somatostatin release from poly (lactide) microspheres prepared by a W/O/W solvent evaporation method. *Journal of controlled release*, 36(1-2), 63-71.

Hombreiro Pérez, M. Zinutti, C., Lamprecht, A., Ubrich, N., Astier, A., Hoffman, M., Bodmeier, R., Maincent, P. (2000). The preparation and evaluation of poly(ϵ -caprolactone) microparticles containing both a lipophilic and a hydrophilic drug. *Journal of Controlled Release*, 65 (3), 429-438

Honary, S., Zahir, F. (2013). Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems-a review (Part 2), *Trop. J. Pharmaceut. Res*, 12, 265-27.

Hong, L., Li, X., Bao, Y., Duvall, C. L., Zhang, C., Chen, W., Peng, C. (2019). Preparation, preliminary pharmacokinetic and brain targeting study of metformin encapsulated W/O/W composite submicron emulsions promoted by borneol. *European journal of pharmaceutical sciences*, 133, 160-166.

Hussain, M., Xie, J., Hou, Z., Shezad, K., Xu, J., Wang, K., Zhu, J. (2017). Regulation of drug release by tuning surface textures of biodegradable polymer microparticles. *ACS applied materials & interfaces*, 9(16), 14391-14400.

Hustace, J. L., Firshman, A. M., Mata, J. E. (2009). Pharmacokinetics and bioavailability of metformin in horses. *American journal of veterinary research*, 70(5), 665-668.

Hyvönen, S., Peltonen, L., Karjalainen, M., Hirvonen, J. (2005). Effect of nanoprecipitation on the physicochemical properties of low molecular weight poly (L-lactic acid) nanoparticles loaded with salbutamol sulphate and beclomethasone dipropionate. *International journal of pharmaceutics*, 295(1-2), 269-281.

Ibraheem, D., Iqbal, M., Agusti, G., Fessi, H., Elaissari, A. (2015). Effects of process parameters on the colloidal properties of polycaprolactone microparticles prepared by double emulsion like process. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 445, 79-91.

Karavelidis, V., Giliopoulos, D., Karavas, E., Bikiaris, D. (2010). Nanoencapsulation of a water soluble drug in biocompatible polyesters. Effect of polyesters melting point and glass transition temperature on drug release behavior. *European journal of pharmaceutical sciences*, 41(5), 636-643.

Klose, D., Siepmann, F., Elkharraz, K., Krenzlin, S., Siepmann, J. (2006). How porosity and size affect the drug release mechanisms from PLGA-based microparticles. *International journal of pharmaceutics*, 314(2), 198-206.

Kuo, C. F., Tsao, N., Chou, H. H., Liu, Y. L., Hsieh, W. C. (2012). Release of FITC-BSA from poly (l-lactic acid) microspheres analysis using flow cytometry. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 89, 271-276.

Lee, Y. S., Johnson, P. J., Robbins, P. T., Bridson, R. H. (2013). Production of nanoparticles-in-microparticles by a double emulsion method: A comprehensive study. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 83(2), 168-173.

Leo, E., Ruozi, B., Tosi, G., Vandelli, M. A. (2006). PLA-microparticles formulated by means a thermoreversible gel able to modify protein encapsulation and release without being co-encapsulated. *International journal of pharmaceutics*, 323(1-2), 131-138.

Liu, R., Ma, G. H., Wan, Y. H., Su, Z. G. (2005). Influence of process parameters on the size distribution of PLA microcapsules prepared by combining membrane

emulsification technique and double emulsion-solvent evaporation method. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 45(3-4), 144-153.

Liu, Y., Chen, X., Wang, L., Yang, T., Yuan, Q., Ma, G. (2014). Surface charge of PLA microparticles in regulation of antigen loading, macrophage phagocytosis and activation, and immune effects in vitro. *Particuology*, 17, 74-80.

Machado, S. R., Lunardi, L. O., Tristão, A. P., Marchetti, J. M. (2009). Preparation and characterization of D, L-PLA loaded 17- β -Estradiol valerate by emulsion/evaporation methods. *Journal of microencapsulation*, 26(3), 202-213.

Maiti, S., Dey, P., Kaity, S., Ray, S., Maji, S., Sa, B. (2009). Investigation on processing variables for the preparation of fluconazole-loaded ethyl cellulose microspheres by modified multiple emulsion technique. *Aaps Pharmscitech*, 10(3), 703-715.

Manconi, M., Náchér, A., Merino, V., Merino-Sanjuan, M., Manca, M. L., Mura, C., Diez-Sales, O. (2013). Improving oral bioavailability and pharmacokinetics of liposomal metformin by glycerolphosphate-chitosan microcomplexation. *Aaps Pharmscitech*, 14(2), 485-496.

Marquette, S., Peerboom, C., Yates, A., Denis, L., Goole, J., Amighi, K. (2014). Encapsulation of immunoglobulin G by solid-in-oil-in-water: effect of process parameters on microsphere properties. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, 86(3), 393-403.

Martín-Sabroso, C., Fraguas-Sánchez, A. I., Aparicio-Blanco, J., Cano-Abad, M. F., Torres-Suárez, A. I. (2015). Critical attributes of formulation and of elaboration process of PLGA-protein microparticles. *International journal of pharmaceutics*, 480(1-2), 27-36.

Mircioiu, C., Voicu, V., Anuta, V., Tudose, A., Celia, C., Paolino, D., Mircioiu, I. (2019). Mathematical modeling of release kinetics from supramolecular drug delivery systems. *Pharmaceutics*, 11(3), 140.

Moghddam, S. R. M., Ahad, A., Aqil, M., Imam, S. S., Sultana, Y. (2016). Formulation and optimization of niosomes for topical diacerein delivery using 3-factor, 3-level Box-Behnken design for the management of psoriasis. *Materials science and engineering: C*, 69, 789-797.

- Morais, W. A., Barros Neto, B. D., Cavalcanti, I. M., Xavier Junior, F. H., Santos-Magalhães, N. S., Maciel, M. A. M. (2017). Coencapsulation of trans-Dehydrocrotonin and trans-Dehydrocrotonin: hydroxypropyl- β -cyclodextrin into Microparticles. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 28(8), 1494-1505.
- Nayak, A. K., Pal, D., Santra, K. (2014). Development of calcium pectinate-tamarind seed polysaccharide mucoadhesive beads containing metformin HCl. *Carbohydrate polymers*, 101, 220-230.
- Noronha, C. M., Granada, A. F., de Carvalho, S. M., Lino, R. C., de OB Maciel, M. V., Barreto, P. L. M. (2013). Optimization of α -tocopherol loaded nanocapsules by the nanoprecipitation method. *Industrial Crops and Products*, 50, 896-903.
- Obayemi, J. D., Danyuo, Y., Dozie-Nwachukwu, S., Odusanya, O. S., Anuku, N., Malatesta, K., Soboyejo, W. O. (2016). PLGA-based microparticles loaded with bacterial-synthesized prodigiosin for anticancer drug release: effects of particle size on drug release kinetics and cell viability. *Materials Science and Engineering: C*, 66, 51-65.
- Patiño-Herrera, R., Louvier-Hernández, J. F., Escamilla-Silva, E. M., Chaumel, J., Escobedo, A. G. P., Pérez, E. (2019). Prolonged release of metformin by SiO₂ nanoparticles pellets for type II diabetes control. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 131, 1-8.
- Paulo, F., Santos, L. (2016). Design of experiments for microencapsulation applications: A review. *Materials Science and Engineering: C*, 77, 1327-1340.
- Peltonen, L., Aitta, J., Hyvönen, S., Karjalainen, M., Hirvonen, J. (2004). Improved entrapment efficiency of hydrophilic drug substance during nanoprecipitation of poly (D) lactide nanoparticles. *Aaps Pharmscitech*, 5(1), 115-120.
- Refat, M. S., Al-Azab, F. M., Al-Maydama, H. M., Amin, R. R., Jamil, Y. M., Kobeasy, M. I. (2015). Synthesis, spectroscopic and antimicrobial studies of La (III), Ce (III), Sm (III) and Y (III) Metformin HCl chelates. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 142, 392-404.
- Regnier-Delplace, C., Du Boullay, O. T., Siepmann, F., Martin-Vaca, B., Degrave, N., Demonchaux, P., Siepmann, J. (2013). PLGA microparticles with zero-order release of

the labile anti-Parkinson drug apomorphine. *International journal of pharmaceutics*, 443(1-2), 68-79.

Ritger, P. L., Peppas, N. A. (1987). A simple equation for description of solute release I. Fickian and non-fickian release from non-swellable devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs. *Journal of controlled release*, 5(1), 23-36.

Samati, Y., Yüksel, N., Tarimci, N. (2006). Preparation and characterization of poly (D,L lactic- co- glycolic acid) microspheres containing furbiprofen sodium. *Drug Delivery*, 13, 105–111.

Singh, U. V., & Udupa, N. (1998). In vitro characterization of methotrexate-loaded poly (lactic acid) microspheres of different molecular weights. *Drug delivery*, 5(1), 57-61.

Swamy, G. J., Sangamithra, A., Chandrasekar, V. (2014). Response surface modeling and process optimization of aqueous extraction of natural pigments from *Beta vulgaris* using Box–Behnken design of experiments. *Dyes and Pigments*, 111, 64-74.

Tobio, M., Sanchez, A., Vila, A., Soriano, I., Evora, C., Vila-Jato, J. L., Alonso, M. J. (2000). The role of PEG on the stability in digestive fluids and in vivo fate of PEG-PLA nanoparticles following oral administration. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 18(3-4), 315-323.

Unagolla, J. M., Jayasuriya, A. C. (2018). Drug transport mechanisms and in vitro release kinetics of vancomycin encapsulated chitosan-alginate polyelectrolyte microparticles as a controlled drug delivery system. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 114, 199-209.

Vysloužil, J., Doležel, P., Kejdušová, M., Mašková, E., Mašek, J., Lukáč, R., Dvořáčková, K. (2014). Influence of different formulations and process parameters during the preparation of drug-loaded PLGA microspheres evaluated by multivariate data analysis. *Acta Pharmaceutica*, 64(4), 403-417.

Wichert, B., Rohdewald, P. (1990). A new method for the preparation of drug containing polylactic acid microparticles without using organic solvents. *Journal of controlled release*, 14(3), 269-283.

Wu, B., Chen, M., Gao, Y., Hu, J., Liu, M., Zhang, W., Huang, W. (2019). In vivo pharmacodynamic and pharmacokinetic effects of metformin mediated by the gut microbiota in rats. *Life sciences*, 226, 185-192.

Xu, Q., Crossley, A., Czernuszka, J. (2009). Preparation and characterization of negatively charged poly (lactic-co-glycolic acid) microspheres. *Journal of pharmaceutical sciences*, 98(7), 2377-2389.

Yang, Y.Y., Chung, T.S. Ping, N. (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.

Yoshida, V. M., Balcão, V. M., Vila, M. M., Júnior, J. M. O., Aranha, N., Chaud, M. V., Gremião, M. P. (2015). Zidovudine-poly (L-lactic acid) solid dispersions with improved intestinal permeability prepared by supercritical antisolvent process. *Journal of pharmaceutical sciences*, 104(5), 1691-1700.

Zhou, X., Chen, Q., Ma, Y., Huang, Y., Gou, S., Xiao, B. (2019). Porous polymeric microparticles as an Oral drug platform for effective ulcerative colitis treatment. *Journal of pharmaceutical sciences*, 108(7), 2238-2242.

Conclusion générale

Conclusion générale

Les travaux réalisés au cours de cette thèse ont été orientés vers l'élaboration d'une forme galénique destinée à une libération prolongée journalière de la metformine, une molécule qui est utilisée dans le traitement du DDT2. Des microparticules à base de poly acide lactique (PLA) ont été préparées par la méthode de double émulsion évaporation du solvant.

Dans un premier temps, le choix du span® 80 et du PVA comme tensioactif respectivement pour la stabilisation de la première et de la seconde émulsion et pour l'obtention d'une meilleure morphologie des microparticules a été adopté pour la première partie de ce travail.

L'effet des paramètres (quantité en metformine, pH de la phase aqueuse, concentration de l'émulsifiant (PVA) et vitesse d'agitation) sur la préparation des microparticules a été étudiés par la méthodologie des plans d'expériences (Plan de box Behnken) de façon à optimiser l'efficacité d'encapsulation, la taille et la charge des microparticules. Le modèle polynomial du second ordre appliqué a donné une description satisfaisante des données expérimentales montrant que l'efficacité d'encapsulation était la plus affecté par la quantité en metformine, concentration de l'émulsifiant (PVA) et vitesse d'agitation. Le profil de libération *in vitro* de la formulation optimale a montré que les microparticules libéraient la metformine de manière prolongée et incomplète.

Ces microparticules ont été testées *in vivo* chez le lapin afin de déterminer les paramètres pharmacocinétiques. Les résultats ont confirmé l'obtention d'un profil prolongé sans amélioration de la biodisponibilité de la metformine qui est significativement faible ($25,59 \pm 0,46$ %). Par ailleurs, nous avons trouvé que le temps moyen de résidence et le MAT de la metformine incorporée dans les microparticules est meilleur par rapport à la solution de metformine pure. Ces améliorations restent insuffisantes pour une éventuelle application thérapeutique.

Dans un second temps, nous avons essayé d'améliorer le profil de libération de la metformine encapsulée par l'ajout de deux bio-polymères HPMC et MC comme co-tensioactifs associés avec le span 80 lors de leurs préparation. Il a été démontré que :

Les microparticules préparées en présence du méthyle cellulose présentent une surface lisse non poreuse avec une efficacité d'encapsulation qui varie de 38,62% à 80,72%. Cependant des microparticules non uniformes avec des surfaces poreuses ont été obtenues en présence du HPMC. L'efficacité d'encapsulation varie de 55 % à 68 %.

Des essais de libération ont montré que les formulations libèrent la metformine de manière prolongée. La comparaison des profils de libération montre que les microparticules préparées en présence de HPMC améliorent nettement le taux de libération de la metformine par rapport à celles préparées par le MC et la formulation optimale de la première partie.

En résumé, cette étude nous a permis de mieux appréhender les facteurs influençant les caractéristiques physico-chimiques des microparticules de PLA qui à leurs tours influencent la cinétique de libération de la metformine. Même si ce travail n'a pas permis d'obtenir un système de libération prolongée de metformine parfaitement abouti (taux de libération important en 24 h), il peut cependant être utilisé comme base de travail à des études ultérieures. De nombreux points relatifs à l'élaboration des microparticules méritent d'être étudiés afin d'améliorer la libération de la metformine, ainsi, plusieurs perspectives de recherche peuvent être proposées comme :

- ✓ Etudier la libération in vivo de la metformine contenue dans les microparticules HPMC-MPs, afin de confirmer ou infirmer d'éventuelle amélioration de la biodisponibilité du principe actif.
- ✓ Investiguer plus en profondeur l'activité pharmacologique de la metformine encapsulée afin de mettre en évidence une éventuelle action antidiabétique.
- ✓ Etudier les distributions de la metformine pour mieux comprendre et expliquer le phénomène régissant la libération de la metformine à partir des microparticules.

Annexe



Optimization of preparation method by W/O/W emulsion for entrapping metformin hydrochloride into poly (lactic acid) microparticles using Box-Behnken design

Sihem Bouriche^a, María José Cózar-Bernal^b, Farouk Rezgui^{a,*}, Antonio María Rabasco Álvarez^b, María Luisa González-Rodríguez^b

^a Laboratoire des Matériaux Organiques (LMO), Faculté de Technologie, Département de Génie des Procédés, Université de Bejaia, 06000, Bejaia, Algeria

^b Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, Universidad de Sevilla, Sevilla, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Metformin hydrochloride
Poly (lactic acid)
Double emulsion
Microparticles
Response surface methodology
Box-Behnken design

ABSTRACT

The aim of this study was to encapsulate an anti-diabetic drug (Metformin hydrochloride) within poly (lactic acid) microspheres, by using a double emulsion solvent evaporation method with different emulsifiers. Response surface methodology using Box-Behnken design was used to optimize the effects of four factors (the amount of metformin in the inner aqueous phase (X_1), pH of the external aqueous phase (X_2), amount of polyvinyl alcohol as a surfactant in the external aqueous phase (X_3) and the stirring rate (X_4)) on the encapsulation efficiency, particle size and zeta potential. The optimized microspheres had a spherical shape and exhibited a zeta potential of -20.8 mV, average diameter of $271.41 \mu\text{m}$ and encapsulation efficiency of 78.05% . These values were reached by applying the following conditions: $X_1 = 25$ mg, $X_2 = 4$, $X_3 = 1.5\%$ and $X_4 = 400$ rpm. Differential scanning calorimetry and powder X-ray diffraction studies revealed that Metformin was present in an amorphous state in the microparticles. The study of the in-vitro drug release performed in simulated gastric and intestinal fluids showed that the drug release was more rapid with HPMC than with Span[®] 80 emulsifier.

1. Introduction

Metformin hydrochloride (Metformin) chemically designed as N,N-dimethyl imido dicarbonimidic diamide hydrochloride is an oral hypoglycemic drug commonly used to treat type II diabetes [1,2]. This drug has also beneficial effects as an anticancer agent [3]. Metformin being a highly water-soluble agent (solubility 300 mg/mL) [4], is absorbed in the proximal part of the small intestine within 6 h with a short biological half-life time (1.5 – 1.6 h) [5,6], thus demanding dosage of 2 – 3 times per day; unfortunately, various side effects, such as nausea, vomiting and diarrhea are frequent [7]. In order to increase the bioavailability, prolonged release formulation of Metformin is crucial. This approach results in a prolonged treatment of drug and allows decreasing the administration frequency, leading to decreased side effects and improved patient convenience which will give rise to an improvement of the patient adherence [8]. In this sense, microencapsulation becomes an interesting technology which may avoid the influence of many physiological parameters on the drug bioavailability, such as the gastric emptying.

Different biodegradable and non-biodegradable polymers have been

investigated for the preparation of polymeric microparticles. Among them, Poly (lactic acid) (PLA) is the most used polymer, owing to its biocompatibility and biodegradability [9]. This polyester is widely used in the formulation of sutures, bone implants, and screws [10] and also as matrix material for the sustained release of various drugs. For oral delivery, PLA is used to encapsulate non-steroidal anti-inflammatory drug ibuprofen, reaching the systemic circulation with reduced gastric toxicity [11]. Rotavirus encapsulated into PLA microparticles for efficient immunogenicity using oral, intranasal and intramuscular routes of administration [12]. PLA is used to encapsulate tetanus toxoid in oral drug delivery tetanus toxoid [13]. Azithromycin loaded microspheres were investigated by blending with poly-L-lactide and poly-D,L-lactide-co-glycolide polymers [14].

Different methods have been used to prepare microparticles. The choice of them depends on the physicochemical properties of the used polymer and those of the drug to be encapsulated, the site-specific delivery of drug and the duration of the therapeutic action [15]. Among them, water-in-oil-in-water ($W_1/O/W_2$) double emulsion solvent evaporation method is frequently used for encapsulating hydrophilic drugs like proteins, peptides and vaccines [16,17].

* Corresponding author.

E-mail addresses: faroukrezgui@gmail.com, farouk.rezgui@univ-bejaia.dz (F. Rezgui).

<https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.03.011>

Received 21 September 2018; Received in revised form 11 March 2019; Accepted 12 March 2019

Available online 15 March 2019

1773-2247/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

The optimization of the process/formulation variables using a double emulsion method is one of the most important stages in the preparation of polymeric microparticles. Interactions between independent variables are not considered when the effect of a factor was studied while keeping others constant. The design of experiments is a powerful statistical tool wherein many factors/variables and their interactions can be tested with fewer experiment trials in less time [5,18,19].

The response surface methodology (RSM) is a collection of mathematical and statistical techniques for designing experiments, building models, evaluating the effects of factors, and searching the optimum condition of factors for the desired responses [20]. Box-Behnken Design (BBD) in RSM constitutes an important design tool that is used for the optimization of different processes. BBD provides conclusions and detailed information with a smaller number of experiments and interactive effects of operating parameters on all responses [21]. In this sense, Farago et al. [22] developed loaded Metformin Poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxy valerate) microparticles via double emulsion method; polysorbate 80 and polyvinyl alcohol (PVA) were used as stabilizers for the first and second emulsion respectively. The highest value of encapsulation efficiency (9.76%) was obtained using alkaline pH external water phase. Nayak et al. [5,6] used a 2-factor 3-level factorial design to analyze the effect of some parameters on the encapsulation efficiency of Metformin loaded tamarind seed polysaccharide beads using the ionic gelation technique.

High encapsulation efficiency of a drug becomes an important parameter in the development of drug delivery systems. In addition to this parameter, it is very important to know how the process variables influence microparticle properties (averaged particle size & zeta potential). To our knowledge, the encapsulation of Metformin in PLA by double emulsion solvent extraction/evaporation method using Box-Behnken design was not done.

In the present study, a three-level Box-Behnken design was employed to investigate the effects of four independent factors, i.e., the amount of Metformin, pH of the external aqueous phase, PVA concentration and the stirring rate on the following responses: encapsulation efficiency, particle size and zeta potential. For this multi-factor optimization, the traditional method of “changing one factor at a time” could have been applied, but this possibility was avoided because it is tedious and does not guarantee to attain the optimum set of parameters. Instead, the Box-Behnken design method was selected here based on a mathematical model of the combined effect of the processing factors; this approach is known to be much more reliable [23]. Various techniques of analysis were used to characterize PLA microparticles such as PCS, DLS, DSC, XRD, SEM as well as the in vitro release of the optimized formulation.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Metformin hydrochloride (99.6%, batch No 4913001 TO 4913010) was obtained from Granules INDIA (Madhapur, INDIA); Poly (lactic acid) PLA was purchased from Evonik Industries AG, Germany. Dichloromethane (CH_2Cl_2) and potassium dihydrogen phosphate were provided from Panreac Química (Barcelona, Spain). Polyvinyl alcohol (PVA, 87–90% hydrolyzed, average molecular weight 30 000–70 000, (Sigma Aldrich, Chimie GmbH), sorbitan monooleate (Span[®] 80, Croda Ibérica, Barcelona, Spain), polyoxyethylene sorbitan (20) monooleate (Tween[®] 80, Acofarma, Madrid, Spain) and HPMC Methocel K4M (the Dow chemical US) were used as emulsifiers. All other chemicals and solvents used in this study were of analytical reagent grade.

2.2. Methods

Before application, the design, preliminary experiments were

performed to determine the surfactant at which the process resulted in microspheres. Different combinations of surfactants (Tween[®] 80/PVA, Span[®] 80/PVA and Span[®] 80/Tween[®] 80) were evaluated. The microparticles were finally prepared by double emulsion as in paragraph 2.2.2.

2.2.1. Experimental design

To elucidate the effect of some formulation and process parameters on the encapsulation efficiency, particle size and zeta potential of Metformin encapsulated into PLA microparticles, Box-Behnken response surface design with four factors at three levels was carried out applying JMP 7 software (from SAS Institute at Cary, NC, USA). Box-Behnken design requires an experiment number according to $N = K^2 + k + cp$, where (k) is the number of factors and (cp) is the replicate number of the central point [21]. The resultant experimental data were evaluated by statistical analysis using the same software package.

The studied factors selected as independent variables were: the amount of Metformin in the inner aqueous phase (X_1 , mg), pH of the external aqueous phase (X_2), amount of PVA as a surfactant in the external aqueous phase (X_3 , % w/v) and the stirring rate (X_4 , r.p.m.) during the emulsification process of the first water-in-oil (W_1/O) emulsion into the external aqueous phase (W_2) to obtain the water-in-oil-in-water ($W_1/O/W_2$) double emulsion. Each of the independent factors was coded at three levels named low (−1), mid (0) and high (+1) are ascribed to each of the four factors whose experimental values are the following: i) $X_1 = 25, 50$ or 75 mg, ii) $X_2 = 4, 5.5$ or 7 , iii) $X_3 = 0.5, 1$ or 1.5% and iv) $X_4 = 400, 800$ or 1200 r.p.m. Min and max levels of “the amount of Metformin in the inner aqueous phase”, “pH of the external aqueous phase”, “amount of polyvinyl alcohol as a surfactant in the external aqueous phase” and “the stirring rate” were determined based on the literature [24,25] and adjusted in the laboratory on the basis of the preliminary study results.

2.2.2. Preparation of PLA microparticles

PLA microparticles were prepared by a double emulsion solvent evaporation method described by Cózar-Bernal et al. (2011) [26] according to the experimental Box-Behnken design matrix as shown in Table 1. Briefly, 100 mg of PLA was dissolved in 5 mL of dichloromethane; 1 mL of Span[®] 80 (5% v/v) aqueous solution which contains an appropriate amount of Metformin was added dropwise to the organic solution under sonication for 5 min at 50 kHz (sonication power: 50 W; Selecta S.A., Barcelona, Spain). The obtained w_1/o emulsion was dispersed in an aqueous solution of PVA emulsifier using overhead stirrer (IKA[®] Euro star 60 Digital Overhead Stirrer). A stable double emulsion $W_1/O/W_2$ was obtained which was further diluted in 20 mL of a 2% (w/v) PVA. The dichloromethane was evaporated under magnetic stirring at 300 r.p.m for 3 h (IKA[®] RT 10 Power IKAMAG Multi-position Magnetic Stirrer, Hotplate). The microparticles were then collected by centrifugation (Eppendorf centrifuge, 5804R. Eppendorf, Germany), at 10 000 r.p.m for 20 min, and were washed three times with distilled water. Finally, the microparticles were frozen and lyophilized at -80.0 ± 0.5 °C and 0.05 mbar during 24 h (Freeze Dryers Telstar[®] CRYODOS, Liofilizador, Madrid, Spain) and stored at room temperature until use.

2.2.3. Characterization of microparticles

2.2.3.1. Encapsulation efficiency. The drug content in PLA microparticles was determined by high-performance liquid chromatography (HPLC, Hitachi autosampler L-2200, Elite Lachrom) by indirectly measuring the amount of Metformin non-encapsulated recovered after centrifugation. HPLC analysis was carried out under the following conditions: cartridge C18 column (Lichrospher[®] 100 RP-18; 125×4 mm, 5 μm (Merck, Barcelona). The wavelength was fixed at 236 nm and the mobile phase was composed of acetonitrile and potassium dihydrogen phosphate buffer 0.02 M pH 6.8. The amount of drug inside the particles was calculated by subtracting the amount of

Table 1
Experimental design and observed responses: encapsulation efficiency (%), mean particle size (μm) and zeta potential (mV).

Factors	Levels		
	Low (-1)	Central (0)	High (+1)
X1: Amount of Metformin (mg)	25	50	75
X2: pH of the aqueous phase	4	5.5	7
X3: Amount of PVA (% w/v)	0.5	1	1.5
X4: Stirring rate (r.p.m.)	400	800	1200

Run No.	Independent factor				Experimental values of responses		
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	Encapsulation efficiency (%)	Mean particle size (μm)	Zeta Potential (mV)
1	-1	+1	0	0	53.91	383.76	-15.20
2	-1	0	+1	0	66.14	129.4	-8.11
3	0	+1	+1	0	23.38	87.94	-23.5
4	0	0	-1	-1	25	721	-14.2
5	+1	0	-1	0	24.35	565.31	-31.4
6	-1	0	-1	0	23.02	1723.52	-17.7
7	+1	-1	0	0	26.18	1543.86	-22.1
8	0	-1	+1	0	29.93	262.62	-26.1
9	0	+1	0	+1	15.38	258.53	-24.4
10	0	-1	-1	0	26.1	1643.08	-27.5
11	0	0	+1	+1	5.57	72.28	-8.54
12	+1	0	+1	0	24.7	378.56	-31.9
13	+1	0	0	-1	35.92	99.92	-19.5
14	0	0	0	0	15.73	325.29	-8.5
15	-1	0	0	+1	28.78	433.72	-11.9
16	0	-1	0	+1	10.84	54.58	-18.1
17	0	-1	0	-1	33.54	897	-17.4
18	0	+1	-1	0	8.56	900.94	-27.7
19	0	0	0	0	15.18	381.96	-8.69
20	+1	0	0	+1	16.7	73.32	-25.5
21	0	0	-1	+1	15.08	378.27	-33.8
22	0	0	+1	-1	30.88	245	-31.7
23	-1	-1	0	0	42.74	264.77	-6.91
24	0	+1	0	-1	21.19	188.2	-18.1
25	+1	+1	0	0	24.49	205	-24
26	-1	0	0	-1	52.47	144	-10.7
27	0	0	0	0	6.16	323.59	-7.94

X₁: Amount of Metformin (mg).

X₂: pH of the aqueous phase.

X₃: Amount of PVA (% w/v).

X₄: Stirring rate (r.p.m.).

drug in the aqueous phase of the suspension from the total amount of the drug used in the formulation. Encapsulation efficiency (%) of Metformin was calculated as follows:

$$\text{Encapsulation efficiency (\%)} = \frac{\text{Total amount of Metformin} - \text{free amount of Metformin}}{\text{Total amount of Metformin}} \times 100 \quad (1)$$

2.2.3.2. Particle size. The mean particle size of microparticles was calculated by laser particle size analyzer (Partica LA-950V2, Horiba laser diffraction particle size analyzer, Kyoto, Japan). The size was measured after the dispersion of microparticles in distilled water using refractive indexes of 1.333 and 1.482 for the water and PLA respectively. An average diameter of three measurements was calculated.

2.2.3.3. Zeta potential. The zeta potential (surface charge) of microparticles was measured at 25 °C by using Zetasizer (Malvern Zetasizer 2000, Malvern Instruments Ltd., Malvern, UK). The microparticles were dispersed in distilled water before every measurement. The zeta potential for each measurement was made in triplicate.

2.2.3.4. Differential scanning calorimetry (DSC). Thermograms of the samples (pure Metformin, PLA, PLA Metformin binary mixtures and optimized formulation) were recorded on a DSC-131 (Setaram, France). Samples (10–12 mg) were weighed and sealed into aluminum pans; an empty sealed pan was used as a reference. Thermal behavior of the samples was investigated in the temperature range of 30–300 °C at a heating rate of 10°/min.

2.2.3.5. X-ray diffraction analysis. Wide-angle X-ray diffraction spectra (XRD) were recorded with powdered metformin-filled polymer microparticles, the incident beam being produced by a copper X-ray source. The X'Pert-Pro diffractometer (PANalytical, the Netherlands) was set at 40 kV and 30 mA. The diffracted intensity was measured in a range of 2 θ angles from 5 to 40° with a scanning speed of 5° min⁻¹.

2.2.3.6. Scanning electron microscopy (SEM). The morphological characteristics of pure Metformin and microparticles were observed by Scanning Electron Microscopy (SEM). Samples were spread on a stub and sputter-coated with gold/palladium (Au/Pd 10 nm) using a vacuum evaporator (4.5 × 10⁻⁴ Pa) (Edwards) then examined using a SEM (Philips XL30) operated at 20 kV accelerating voltage. The SEM of the optimized formulation was observed by Zeiss Evo 50 (Germany) scanning electron microscope using the same procedure.

2.2.3.7. In vitro drug release. In vitro drug release of Metformin from loaded PLA-microspheres was investigated in simulated gastric fluid (SGF) for the first 2 h and then in simulated intestinal fluid (SIF) until 24 h at 37 ± 0.5 °C and 100 rpm. The dissolution medium SGF and SIF were prepared according to the European Pharmacopoeia 9.0 (European Pharmacopoeia 9.0, 2017). About 5 mg drug equivalent microparticles were introduced in a dialysis membrane bag (Spectra/por membranes MWCO: 12–14,000, Spectrum Laboratories, EE. UU.) closed by tying, and dropped into 100 mL of the dissolution medium. At predetermined time intervals, 2 mL of the dissolution medium was withdrawn and replaced by the same volume of fresh medium to maintain the sink conditions. The Metformin content of each sample was assayed by HPLC under the conditions described above. The reported values are averages of two duplicates.

3. Results and discussion

3.1. Preliminary studies to select the suitable surfactant

For preparing the microparticles, Tween[®] 80 was initially used as a stabilizer of the first emulsion, and PVA in the second emulsion. However, a separation of phases was observed and no microparticles were obtained. To solve this problem, Tween[®] 80 was replaced by Span[®] 80 for stabilizing the first emulsion and a stable double emulsion and microparticles were obtained. In another experiment, PVA was replaced by Tween[®] 80 and a double emulsion was observed. SEM images were conducted showing that microparticles prepared using Span[®] 80/PVA were spherical in shape and dispersed. However, for those obtained by using Span[®] 80/Tween[®] 80, it was observed that the microparticles obtained were not free-flowing (Fig. 1).

The use of a suitable stabilizer is very important for the stability of a double emulsion and then for the formation of microparticles. As expected, a separation of phase was observed when Tween[®] 80 is used mainly due to the high Hydrophilic-Lipophilic Balance (HLB) value of Tween[®] 80 (HLB 15.0). The stabilization of emulsion W/O requires the use of a surfactant with low HLB value [17]. Span[®] 80 a surfactant with a low HLB value (4.6), is frequently used for the stabilization of emulsion type (W/O) [17]. When PVA was used, the double emulsion was stable compared to that prepared with Tween[®] 80; this could be explained by the high value of HLB of PVA (HLB = 18) compared with Tween[®] 80 [27]. For further studies, Span[®] 80/PVA composition was selected, since they allowed the preparation of free-flowing

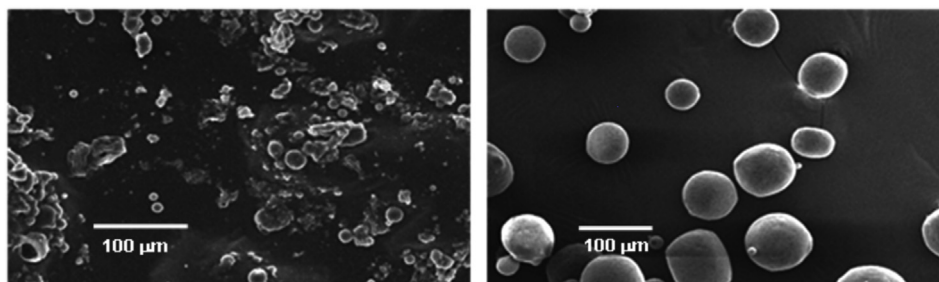


Fig. 1. Scanning electron micrograph of PLA microparticles loaded Metformin prepared with Span® 80/Tween® 80 (on the left) & Span® 80/PVA (on the right).

microparticles.

3.2. Optimization of the encapsulation process

3.2.1. Effect of the experimental factors on the encapsulation efficiency, mean size and zeta potential

PLA microparticles containing Metformin were formulated by double emulsion solvent evaporation technique. For RSM involving Box-Behnken experimental design, a total number of $n = 27$ experiments were performed for four factors each of them at three levels. Table 1 summarizes the experimental runs, their factor combinations and the levels of experimental units used in the study as well as the encapsulation efficiency, mean particle size and zeta potential obtained for each factor combination. The statistical significance of the parameters for the encapsulation study, particle size and zeta potential was investigated by ANOVA.

The responses of the Box–Behnken experimental design ranged from a too low encapsulation efficiency in run 11 (around 5%) to high encapsulation efficiency in run 2 (66%). For the particle size, they ranged from 54 µm (run 16) to 1723 µm (run 6). The zeta potential values for all PLA microparticles were negative.

Interactions plots and the influence of a single factor on a dependent variable averaged across the levels of the other factors is indicated in Fig. 2, Fig. 3 and Fig. 4.

As observed in Fig. 2 (a), the encapsulation efficiency within the microparticles increased with metformin amount up to 50 mg, for Metformin amount higher than 50 mg, it results in lower encapsulation efficiency. This may be attributed to the fact that the ratio of metformin and the polymer is higher (0.5), hence, allow for less drug to be entrapped. The encapsulation efficiency increase with the pH of the aqueous phase, this is may be due to the protonation of metformin and carboxylic group of PLA. PVA concentration did not appear to show any particular effect. As such factor PVA concentration is a weak factor by itself; based on the interaction its preferred level should be determined. It is observed from Fig. 2 (b) that the interactions between PVA x pH of the aqueous phase, PVA x stirring rate show a significant effect on encapsulation efficiency. Hence factor PVA cannot be neglected. The encapsulation efficiency increased with stirring rate up to 800 then it decreases, it may be attributed to the fragmentation of microparticles as they were exposed to high stirring rate. An interaction between stirring rate and pH of the aqueous phase is observed in Fig. 2 (b).

For the particle size Fig. 3 (c), the microparticles size increase with increasing the metformin amount, similar results have been reported in the literature with PLA and ibuprofen [23]. pH of the aqueous phase demonstrated an inverse relationship with the microparticle size. The microparticles size decrease while PVA concentration increase up to 1%, then it increases with increasing PVA concentration, this is due to the increase of the viscosity of the aqueous phase which leads to the formation of larger microparticles, interactions between PVA concentration x metformin amount, PVA concentration x pH of the aqueous phase and PVA concentration x stirring rate were observed Fig. 3 (d). The microparticles size increased with stirring rate up to 800 then it decreases, it may be attributed to the fragmentation of microparticles

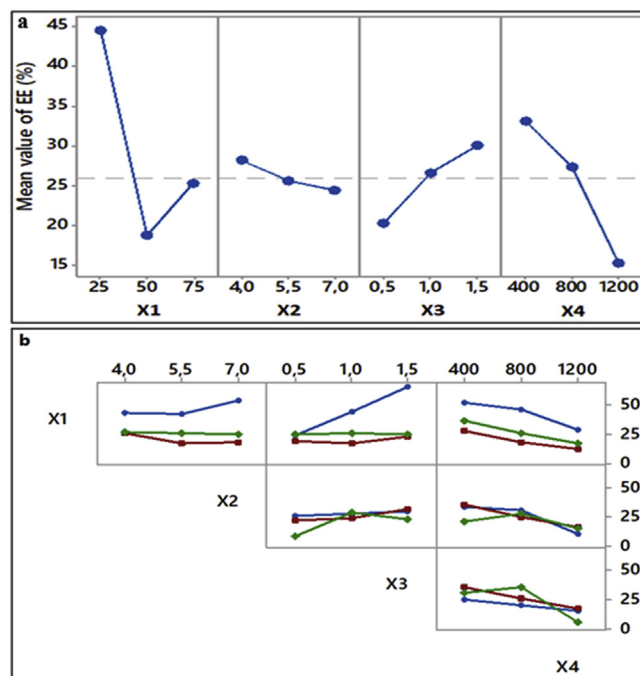


Fig. 2. (a) Influence of the experimental factors (amount of metformin X_1 , pH of the external aqueous phase X_2 , amount of PVA X_3 and stirring rate X_4) on the mean value of encapsulation efficiency (%). (b) Interaction plots of the experimental factors on the encapsulation efficiency. The red lines (rectangular symbol) correspond to the low level of the factor. The blue lines (circle symbol) correspond to the medium level of the factor and the green lines (rhombus symbol) correspond to the high level of the factor. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

exposed to high stirring rate.

From Fig. 4 (e), the zeta potential of microparticles decreases with the increase of metformin amount, beyond 50 mg of metformin, the zeta potential of microparticles increase. The increase of zeta potential of microparticles with the increase of the pH of the aqueous phase may be due to the charge of metformin and carboxylic group of PLA. Zeta potential increased with the increase of PVA concentration and stirring rate up to 1% and 800 respectively. From Fig. 4 (f), it is observed that interactions metformin x PVA concentration, metformin x stirring rate, stirring rate x pH show a significant effect on the zeta potential of microparticles.

3.2.2. Data analyses and validation of the applied model on the encapsulation efficiency (EE %)

Analysis of variance (ANOVA) was used to evaluate the significance of the factors on the EE (%). Values of probability F less than 0.05 and 0.01 indicate that model terms are significant and highly significant respectively, and the values greater than 0.05 indicate that the model

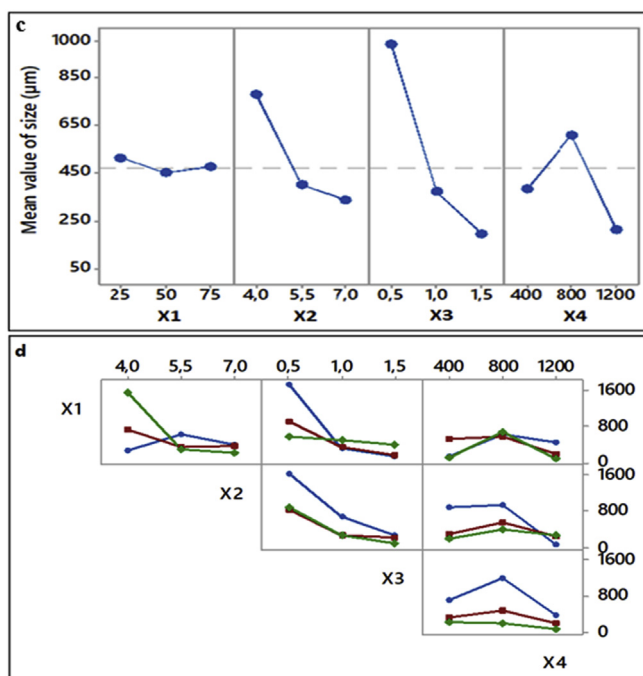


Fig. 3. (c) Influence of the experimental factors (amount of metformin X_1 , pH of the external aqueous phase X_2 , amount of PVA X_3 and stirring rate X_4) on the mean value of particles size. (d) Interaction plots of the experimental factors on the particles size. The red lines (rectangular symbol) correspond to the variation low level of the factor. The blue lines (circle symbol) correspond to the medium level of the factor and the green lines (rhombus symbol) correspond to the high level of the factor. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

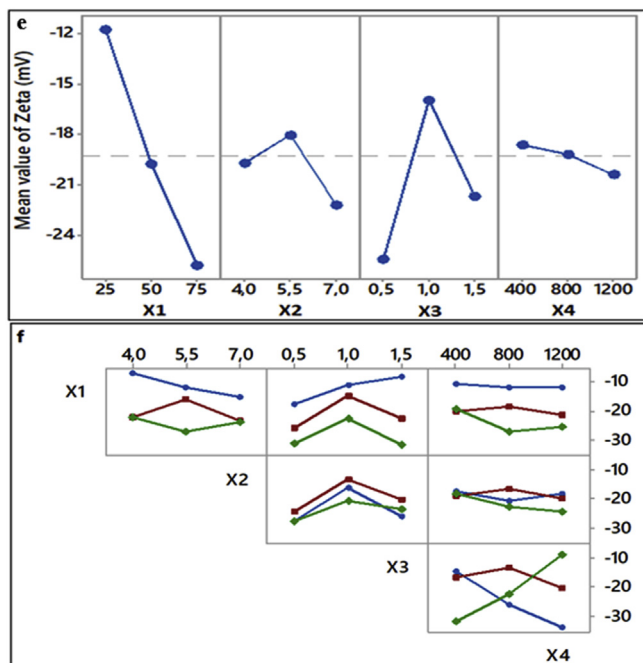


Fig. 4. (e) Influence of the experimental factors (amount of metformin X_1 , pH of the external aqueous phase X_2 , amount of PVA X_3 and stirring rate X_4) on the mean value of zeta potential. (f) Interaction plots of the experimental factors on the zeta potential. The red lines (rectangular symbol) correspond to the low level of the factor. The blue lines (circle symbol) correspond to the medium level of the factor and the green lines (rhombus symbol) correspond to the high level of the factor. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

terms are not significant.

The linear terms X_1 amount of Metformin ($p = 0.0004 < 0.05$), X_4 stirring rate ($p = 0.0006 < 0.05$), the quadratic effect of the amount of Metformin X_1^2 ($p = < 0.0001$), and the interactions X_1X_3 ($p = 0.0079 < 0.05$) were highly significant. X_3 (PVA concentration) is significant with $p = 0.0273 < 0.05$. While the other term coefficients were not significant (example $p = 0.3548 > 0.05$ for X_2 and interaction X_1X_4 $p = 0.7453 > 0.05$). The coefficient of determination (R^2) of the model for encapsulation efficiency was 0.9014 with adjusted R^2 of 0.7865, indicating that 90.14% of the model can be predicted. The resulting RSM model equation after eliminating the non-significant terms is the following:

$$EE (\%) = 12.35 - 9.56 X_1 + 4.87 X_3 - 8.89 X_4 - 10.69 X_1X_3 + 18.54 X_1^2 \quad (2)$$

Positive values indicate synergism whereas negative values indicate antagonism. From equation (2), it was observed that the amount of Metformin and the stirring rate during the second emulsification had a negative effect on EE (%) whereas the concentration of surfactant had a positive effect. Interactions between the amount of metformin and concentration of PVA X_1X_3 showed a significant effect on the encapsulation efficiency.

In order to determine whether the polynomial mathematical model is significant, it is necessary to run a variance test. The result of the first order model fitting is significant through the values of F and p. A small p-value (< 0.0005) and a larger F (7.8421) indicate that the corresponding variables are significant. It is the case here since the p-value given by the model is less than 0.0005. As such, this analysis can be used to determine the optimum combination of experimental factors which leads to the higher EE (%) for Metformin. The model F-value of 7.8421 corresponding to the encapsulation efficiency, as well as the p-value larger than 0.05 for the lack of fits, confirm the validity of the polynomial model for describing and predicting the mean particle size.

Fig. 5 provides the 3D response surface plots showing the transition of EE (%) corresponding to the change of independent variables. Fig. 5A shows the effect of the amount of Metformin and concentration of surfactant at a constant rate and pH (800 rpm and 5.5, respectively). An increase in the amount of Metformin resulting in lower encapsulation efficiency has visualized from the plot. The increase in drug amount leads to the formation of porous microparticles through which the drug could easily escape to the outer phase [28]. Higher encapsulation efficiency was obtained by using a lower amount of Metformin (25 mg).

In addition, low EE (%) was observed in Fig. 5B when the stirring rate was increased. That was probably caused by the decrease in particle size; moreover, with the increase of rate, more drug molecules may partition rapidly into the aqueous phase during the second emulsification and fewer drug amounts remained in emulsion droplets hence decreasing the encapsulation efficiency [29]. Higher stirring rates produce very small particle sizes because of the dismantling of the second emulsion into smaller droplets. However, the final particles yield is low, due to the breaking down of the resultant microspheres [30].

From Fig. 5A and (C), we can observe that this parameter was enhanced by increasing PVA concentration. PVA was used as emulsion stabilizing between the organic and aqueous phase. It is generally added to the continuous phase to prevent the coalescence of the drug/matrix dispersion droplets [31]. In the present work, the vinyl acetate segment of the partially hydrolyzed PVA could be interpenetrated with the PLA molecule when the solvent diffuses towards the aqueous phase during the polymer solidification process [32].

3.2.3. Data analyses and validation of the applied model on the mean particle size

The results of analysis of variance of the fitting model for the mean particle size was assumed that the regression coefficients and the correlation between each factor can be considered statistically significant

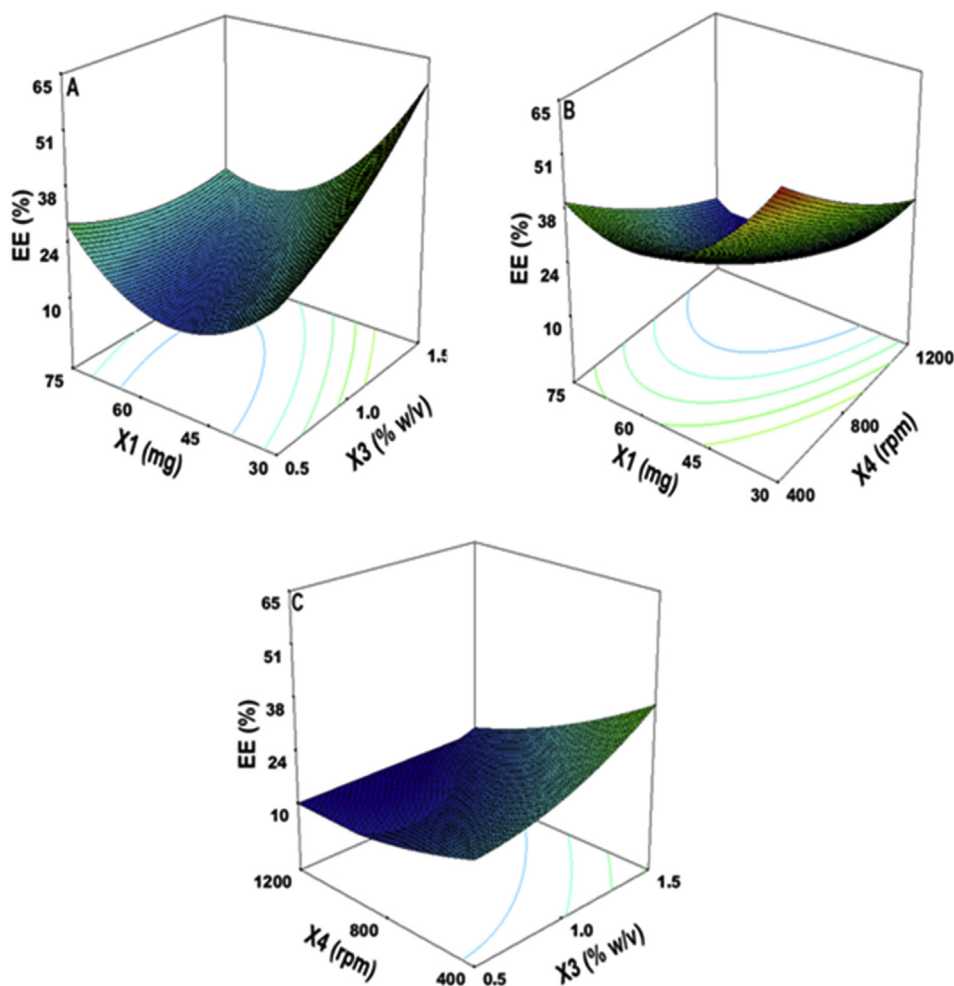


Fig. 5. Response surface plots of encapsulation efficiency (EE %) as a function of: (A) Amount of Metformin (mg) and PVA concentration (% w/v); (B) Amount of Metformin (mg) and stirring rate (r.p.m.); (C) Stirring rate (r.p.m.) and PVA concentration (% w/v).

for p-values below 0.05 whereas the values greater than 0.05 indicate that the model terms are not significant.

The linear term X_3 PVA concentration ($p = 0.0002 < 0.05$), interactions between the amount of Metformin and pH X_1X_2 ($p = 0.0002 < 0.05$), amount of Metformin and PVA concentration X_1X_3 ($p = 0.0002 < 0.05$), and quadratic effect of pH X_2^2 ($p = 0.0439 < 0.05$), and stirring rate X_4^2 ($p = 0.0424 < 0.05$), were significant. The other coefficients were not significant ($p > 0.05$). The coefficient of determination (R^2) of the model for mean particle size was 0.8848 with adjusted R^2 of 0.7383 indicating that only 12% of the total variations are not explained by the model. For a good statistical model, the adjusted determination coefficient R^2_{adj} should be close to R^2 . In our model, it was 0.83 and then quite close to R^2 . P-value of the model (< 0.0102) was less than 0.05, indicating the statistical significance of the model and further demonstrating that the model has a good fit. The probability value (p-value) and Fisher's test (F-value) of the model were < 0.0102 and 4.0314 respectively, which demonstrated the significance of the model at 83% confidence level ($p < 0.05$) [33]. The effect of significant terms can be described by the following quadratic equation:

$$\text{Mean particle size } (\mu\text{m}) = 343.61 - 396.36 X_3 - 596.39 X_1 X_2 + 351.84 X_1 X_3 + 256.18 X_2^2 - 250.34 X_4^2 \quad (3)$$

The effect of variables tested and their interactions on the mean particle size were analyzed by means of 3D RSM as shown in Fig. 6. Fig. 6A presents the effect of the amount of Metformin and pH of the

aqueous phase. From the plot, we appreciated an increase in the mean particle size with the increase of Metformin amount and pH. The pH of the medium influences the ionization of Metformin which is charged positively in this range of pH [4]. The increase of particle size with the increase of Metformin amount and pH may be explained by the strong interaction between Metformin and the terminal groups of PLA.

From Fig. 6B we can see that the mean particle size was decreased by increasing PVA concentration. It was found that the increase of PVA concentration from 0.1% to 2% in the external aqueous phase decreased the mean diameter of microparticles [34]. An increase of PVA concentration ensures better stabilization of the system against coalescence of the emulsion and therefore led to the formation of smaller microparticles [35]. In addition, the mean particle size decreases with the increase of the stirring rate as shown in Fig. 6C. The stirring rate constitutes an important parameter that controls the size of microparticles [13]. Marquette and co-workers [36] observed that an increase in the emulsification rate leads to a significant decrease in the mean diameter of the microspheres.

3.2.4. Data analyses and validation of the applied model on the zeta potential of microspheres

It was observed that the amount of Metformin ($p = 0.0012 < 0.05$) and PVA concentration ($p = 0.0429 < 0.05$) had significant influence whereas other factors had not an effect on the zeta potential ($p > 0.05$). It was also found that the interaction between PVA concentration and stirring rate in the second emulsion significantly influence zeta potential ($p = 0.0001 < 0.05$). All the quadratic effects (X_1^2 ,

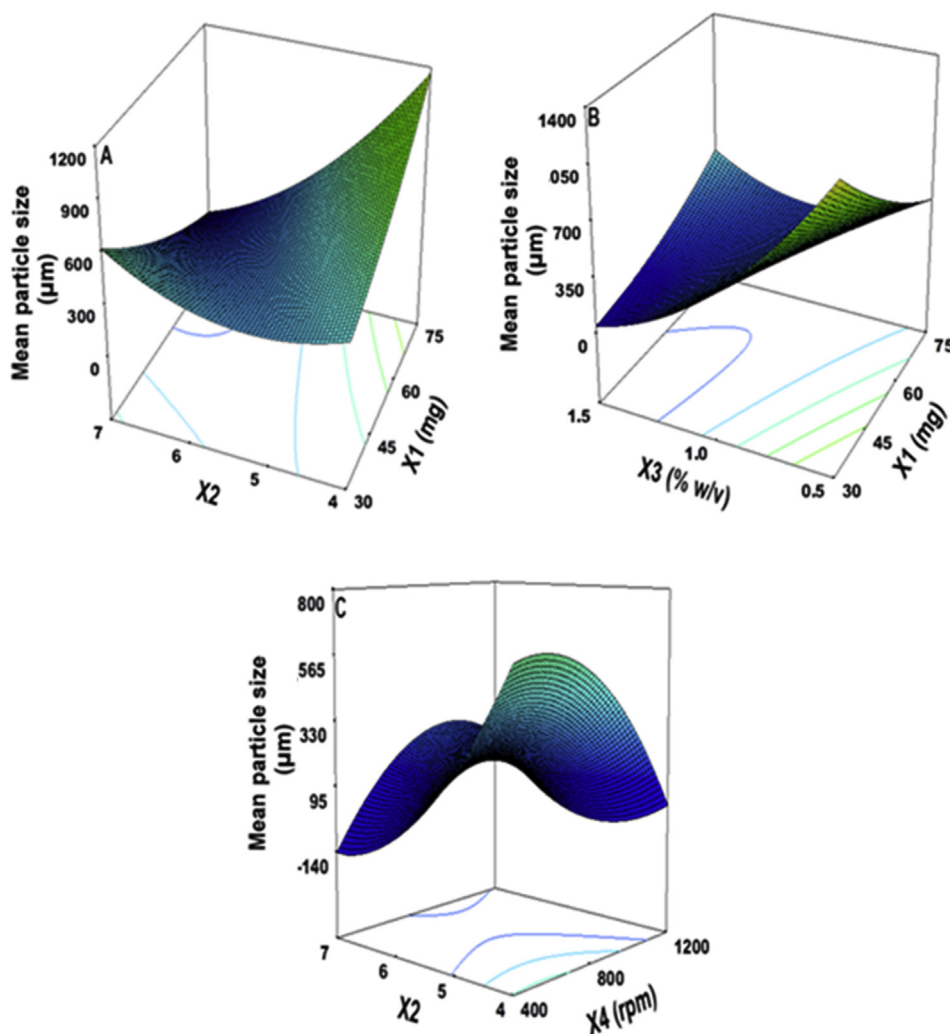


Fig. 6. Response surface plots of mean particle size (μm) as a function of: (A) Amount of Metformin (mg) and pH of the aqueous phase, (B) Metformin (mg) and PVA concentration (% w/v), (C) Stirring rate (r.p.m.) and pH of the aqueous phase.

X_2^2 , X_3^2 , X_4^2) are statistically significant ($p < 0.05$). The coefficient of determination R^2 (0.95) for the response was found to be closed to adj R^2 (0.89) indicating that the model has well predicted the response values.

The p-value of the model ($p < 0.0001$) was less than 0.05, indicating that the model is significant and has a good fit. The F-value of the model was 16.6240 demonstrated the significance of the model at 95% confidence level ($p < 0.05$) [33]. The quadratic model of zeta potential was:

$$\text{Zeta potential (mV)} = -8.38 - 7.23 X_1 + 1.87 X_3 + 10.69 X_3 X_4 - 3.02 X_1^2 - 6.28 X_2^2 - 10.53 X_3^2 - 4.5 X_4^2 \quad (4)$$

Where X_1 , X_3 represent the amount of Metformin and concentration of surfactant, respectively. $X_3 X_4$ is the interaction effect between the concentration of the surfactant and stirring rate during the second emulsification while X_1^2 , X_2^2 , X_3^2 and X_4^2 are quadratic effects.

Zeta potential is the charge at the hydrodynamic shear plane and provides information about particle stability into the dispersion [23,37]. The zeta potential (Y3) values ranged between -7.94 and -33.7 mV for the PLA microparticles. These negative values were due to the carboxyl end groups of the PLA onto the surface of the microparticles [38].

Fig. 7 provides the 3D response surface plots showing the effect of independent variables on the zeta potential of microparticles. Fig. 7A shows the effect of the amount of Metformin and pH of the aqueous

phase. A decrease in the zeta potential values resulted as the Metformin amount and pH values were increased. Metformin is positively charged in pH ranging from 4 to 7 [3] and may interact with negative carboxylic end groups of PLA, lowering the zeta potential value. From Fig. 7B the zeta potential is decreased as the concentration of PVA increase. It is well known that PVA is difficult to be removed from the microparticle surfaces and its residue could decrease the negative potential of the microparticles [38].

3.2.5. Optimizing the values for the formulation of metformin-loaded PLA microparticles

The optimization process was carried out to verify the fitted model after establishing the polynomial equations which describe the relationship between the factors and the processed responses. Of the three responses, EE (%) becomes a critical property in the development of our microparticles. Theoretically, higher values of this parameter are desirable. Therefore, the maximization of EE (%) was adopted as a criterion while mean particle size and zeta potential were excluded. In this analysis, the desirability parameter was selected. The factors that optimize the entrapment of Metformin-loaded microparticles were studied. The statistical procedure of this stage is collected in Fig. 8 leading to the following optimum factors with a desirability of 0.998: $X_1 = 25$ mg, $X_2 = 4$, $X_3 = 1.5\%$, and $X_4 = 400$ r.p.m. The EE (%) predicted by the model under these optimal conditions is found to be 82.15%.

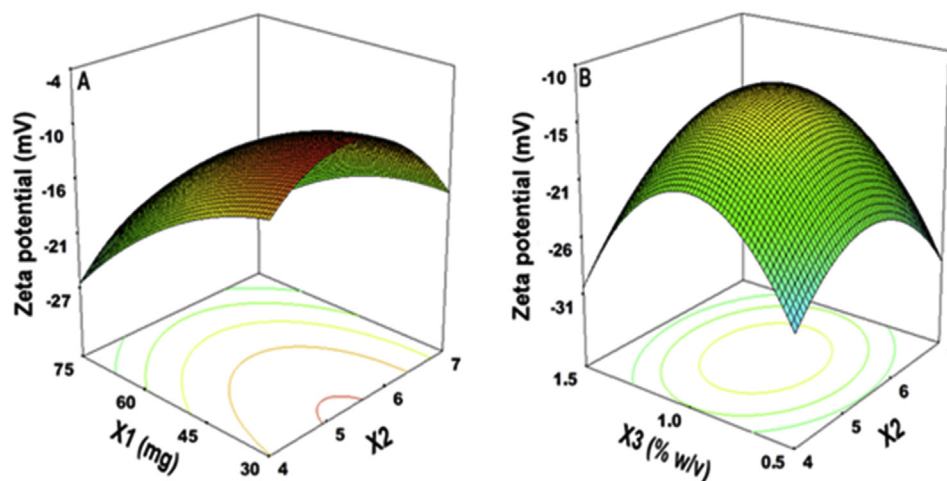


Fig. 7. Response surface plots of Zeta potential (mV) as a function of: (A) Amount of Metformin (mg) and pH of the aqueous phase, (B) PVA concentration (% w/v) and pH of the aqueous phase.

In order to validate this model, an optimal experiment value was compared with the predicted value given through the mathematical model. This verification proved the accuracy of the model since the mean value of EE (%) drawn from the experiments was equal to $78.05 \pm 1.87\%$. Upon comparison of the observed drug entrapment with the predicted one, a percentage of error (4.9%) less than $\pm 15\%$ is acceptable [39], so the good ability prediction of the model was confirmed. The percentage of prediction errors (%) is useful to assure the validity of the obtained regression equation. By using JM7 software experimental value, the predicted value and percentage of errors prediction (residual) for the EE (%) were shown in Table 2. The prediction error was found to vary between $+6.76\%$ and $+0.59\%$. Thus, the low magnitude of error difference between experimental and predicted values in the current study proves the good prediction ability of the Box–Behnken designs.

In addition, the EE (%) of the optimized formulation ($78.05 \pm 1.87\%$) exceed the limit of observed responses in the studied Box-Behnken design which shows the range of 5.57–66.14%. This could be the result of the synergistic effect of the parameters on the response evaluated. The higher EE (%) achieved in the presence of PVA in the outer water phase is in agreement with published data about the encapsulation of somatostatin acetate in PLA by double emulsion using PVA as an emulsifier in the outer aqueous phase [25].

3.3. Differential scanning calorimetry (DSC)

Differential scanning calorimetry (DSC) is a technique employed for characterizing pharmaceutical materials. It is used to check/point out the drug-polymer incompatibility and to study the physical state of the drug in the formulation [40]. The DSC thermograms of the raw

Table 2

Experimental, predicted values and Residual prediction. errors of encapsulation efficiency (%).

Run No.	Experimental values ^a	Predicted values ^b	Predicted errors ^c
1	53.91	47.45	6.45
2	66.14	59.98	6.15
3	23.38	27.71	-4.33
4	25	19.01	5.98
5	24.35	31.117	-6.76
6	23.02	28.85	-5.83
7	26.18	32.07	-5.89
8	29.93	25.95	3.97
9	15.38	14.01	1.36
10	26.1	21.70	4.39
11	5.57	10.99	-5.42
12	24.7	19.48	5.21
13	35.92	31.64	4.27
14	15.73	12.35	3.37
15	28.78	32.99	-4.21
16	10.84	9.30	1.53
17	33.54	35.52	-1.98
18	8.56	12.47	-3.91
19	15.18	12.35	2.82
20	16.7	16.109	0.59
21	15.08	8.93	6.14
22	30.88	36.46	-5.58
23	42.74	44.76	-2.02
24	21.19	23.34	-2.15
25	24.49	21.90	2.58
26	52.47	53.00	-0.53
27	6.16	12.35	-6.19

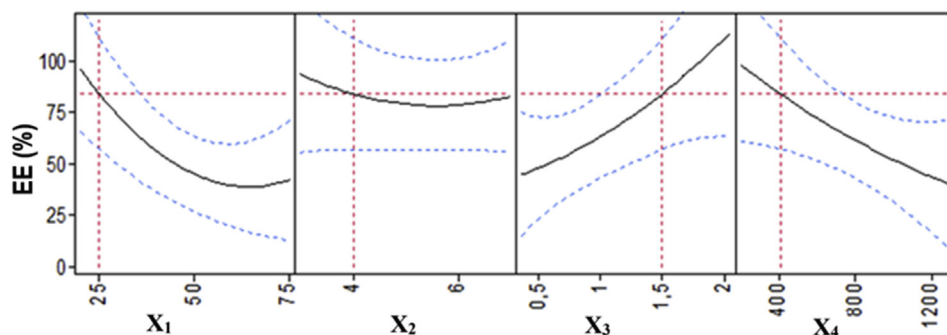


Fig. 8. Profiles for the optimum conditions predict the EE (%) value obtained by the RSM model with a desirability of 0.998.

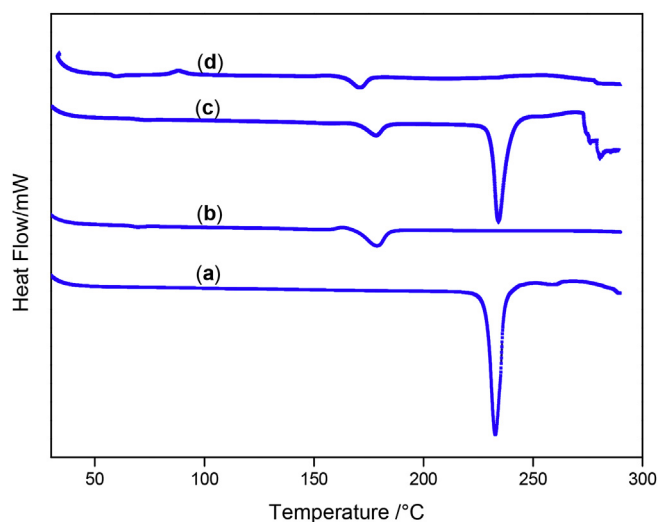


Fig. 9. DSC thermograms: (a) Metformin hydrochloride, (b) PLA, (c) physical mixture of Metformin hydrochloride-PLA and (d) optimum formulation.

materials (PLA, Metformin), Metformin-loaded PLA microparticles prepared from the optimized formulation and physical binary mixture of PLA-Metformin are illustrated in Fig. 9.

The thermal curve of pure Metformin (Fig. 9a) exhibited an initial flat profile followed by a sharp endothermic peak at 232.8 °C and an associated melting enthalpy of 270.05 J/g, indicating its anhydrous crystalline state [41]. The DSC profile of PLA (Fig. 9b) showed a sharp endothermic effect, with a T_{peak} at 178.7 °C, corresponding to the melting point [42]. The thermal curve of the physical mixture (Fig. 9c) showed a sharp endothermic peak at 178.8 °C, corresponding to the melting point of PLA followed by the flat profile and then the endothermic peak of the drug at 234.8 °C. Thus, the physical mixture exhibited thermal characteristics of individual components blended; this means that there is no incompatibility between Metformin and PLA [37]. In the curve of Metformin-loaded PLA microspheres (Fig. 9d), the peak of PLA was maintained. However, no melting peak of Metformin was detected indicating that Metformin in the microparticles is in an amorphous state. These results suggest that the interaction between the drug and polymer occurs which is due to changes in the physical form of crystalline to an amorphous state. The disappearance of peaks in drug-loaded microspheres showed that the drug was uniformly dispersed in the polymer matrix at the molecular level [43].

3.4. X-ray diffraction

To investigate the crystallization properties of Metformin in the drug-loaded PLA microparticles, XRD analysis was performed.

Fig. 10 shows the XRD patterns of Metformin, pure PLA, Metformin-loaded PLA microparticles and physical mixture of Metformin and PLA. X-ray diffraction spectra of single components showed the crystalline nature of Metformin and semi-crystalline for PLA, many diffraction bands with major peaks at 17.44, 24.5, 37.13 and 39.34° for Metformin (Fig. 10a) and higher peaks at 16.75 and 18.94° for PLA (Fig. 10b). Metformin-loaded PLA microparticles (Fig. 10d) having no different peaks confirms the amorphous nature of Metformin in the PLA matrix. This result confirms those found by DSC measurement.

3.5. Scanning electron microscopy (SEM)

In addition to the measurement of EE found, it is interesting to observe the electron micrographs of the obtained microparticles. The scanning electron microscopy of Metformin and microparticles prepared from optimum conditions were shown in Fig. 11. Pure Metformin

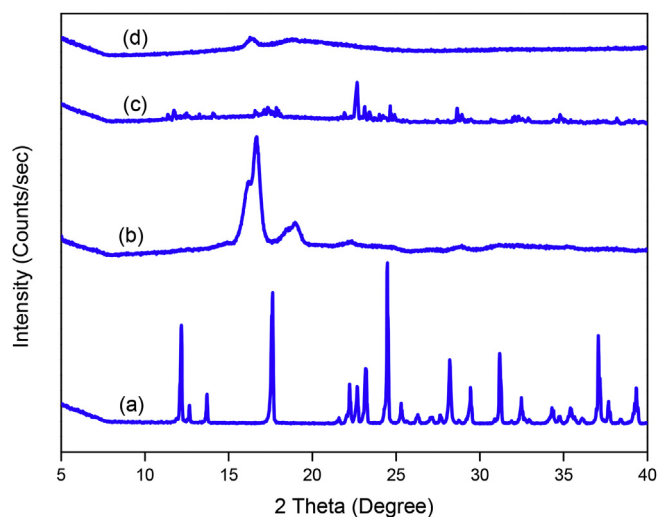


Fig. 10. X-ray diffraction patterns: (a) Metformin hydrochloride, (b) PLA, (c) physical mixture of Metformin hydrochloride-PLA and (d) optimum formulation.

(Fig. 11a) appeared as smooth surfaced rectangular crystals. Whereas no Metformin crystals were present in PLA microparticles (Fig. 11b), the surface of them exhibited a smooth spherical shape with non-homogenous size distribution. This suggests that Metformin was suitably dispersed at a molecularly level inside the PLA microparticles. This conclusion supports our result found by the DSC study.

3.6. In vitro release profiles

The achievement of a sustained release pattern is very important while developing microparticles delivery system used in the nanomedicine area [44]. In this study, in vitro release profiles of formulations as a function of time were compared with the free Metformin, are shown in Fig. 12.

The in vitro Metformin release profiles obtained for none and encapsulated drug showed that there was a pronounced time prolongation of drug release from microparticles compared to the non-encapsulated drug. While about 100% of free Metformin drug were found after approximately 12 min dissolved in the release medium, only ~10% of Metformin was released from microparticles after 24 h from PLA-MPs. The prolonged drug release profile resulted from the Metformin-loaded hydrophobic PLA microparticles acts as a barrier to the diffusion of Metformin in a medium release which is governed by the properties of microparticles (size and porosity) and the degradation of the polymer [45]. Karavelidis and co-workers [46] explained the prolonged release from PLA microparticles by the glass transition of the polymer T_g (~58 °C) which prevents the mobility of polymer chain and thus the drug release. Herrmann & Bodmeir in their study have observed a prolonged drug release resulted from the interactions between the carboxyl groups of PLA, charged negatively, and cationic drug [25].

To improve the Metformin release of loaded microparticles, an alternative experiment was conducted with HPMC as an emulsifier for the first emulsion in the same conditions of the optimized formulation. Under these conditions, EE (%) of 54.78%, an average diameter of 41.68 μm and zeta potential of -33.1 mV were obtained. The drug release (Fig. 12) show that approximately 54% of Metformin was released from microparticles within 3 h of the release study. The release rate of the drug from the prepared microparticles with HPMC is higher than those prepared with Span® 80. The use of HPMC as the emulsifier for the first emulsion results in small microparticles compared with those of span 80 (271.41 μm). In addition, the microparticles present a pore on their surface which may be formed during the drying process (Fig. 13). The increase of surface exchange between the microparticles

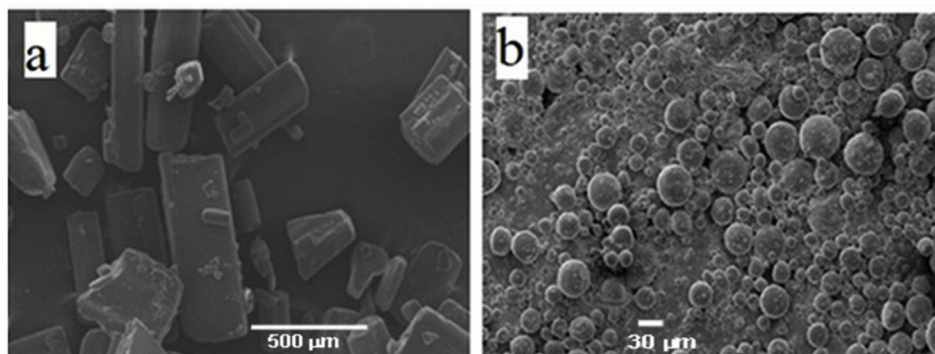


Fig. 11. Scanning electron micrograph of: (a) Metformin, (b) PLA microparticles (optimum formulation).

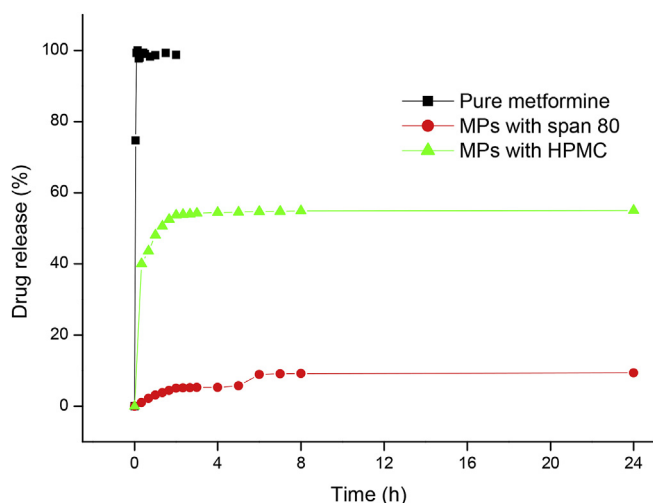


Fig. 12. In vitro release profiles of pure metformin and metformin loaded microparticles.

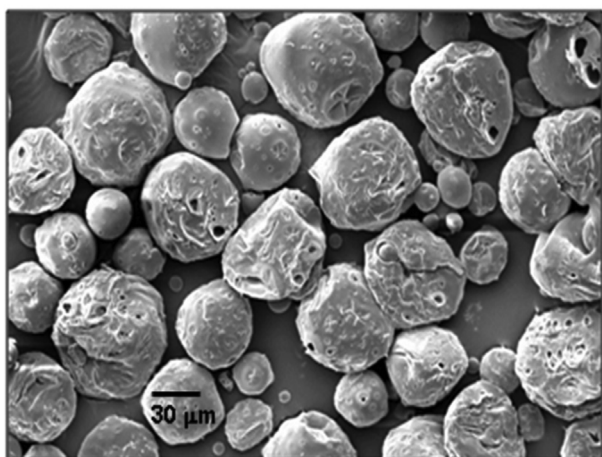


Fig. 13. Scanning electron micrograph of the optimized formulation prepared with HPMC as emulsifier.

and the release medium leads to a faster release of Metformin from microparticles fabricated with HPMC as emulsifier [29].

4. Conclusion

The preparation and optimization of PLA microparticles as a delivery system for the anti-diabetic drug Metformin were the goals of this study. The use of a Box-Behnken design allows us to study the influence

of different factors of formulation and manufacturing process on the double emulsion solvent evaporation method. The use of Span® 80 as the stabilizer for the first emulsion led to a formation of a stable double emulsion, microparticles were obtained and aggregates were prevented.

The critical parameters for the process were determined through the experimental design. By selecting the values of these parameters Metformin-loaded PLA microparticles with known properties in terms of EE%, particle size and zeta potential were prepared. The optimized formulation was achieved by using 25 mg of Metformin, 4 pH of the outer phase, 1.5% of PVA and 400 r.p.m. Under these conditions, EE (%) of 78.05%, average diameter of 271.41 μm and zeta potential of -20.8 mV were obtained. A good agreement was found between the predicted and experimental of EE (%) under these conditions (82.15 and 78.05% respectively).

Metformin was not released completely from the obtained microparticles prepared with Span® 80 during 24 h. This type of release profile is not advantageous for an oral application since the microparticles avoided the complete release of Metformin, but such sustained profile is interesting for other routes like intramuscular for various hydrophilic drugs. The in-vitro Metformin release profile obtained with HPMC was higher in simulated gastric and intestinal fluids than with Span® 80 emulsifier. A promising result was obtained with HPMC and will be developed in future studies.

Declaration of interest

The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

Acknowledgment

The authors are pleased to express their grateful acknowledgments to all persons of the laboratory of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, Universidad de Seville, Seville, Spain for their help in the experimental work. The authors are also grateful to CITIUS service of the University of Seville, for the microscopic images.

References

- [1] A.M.I. Mohamed, F.A.F. Mohamed, S. Ahmed, Y.A.S. Mohamed, An efficient hydrophilic interaction liquid chromatographic method for the simultaneous determination of Metformin and pioglitazone using high-purity silica column, *J. Chromatogr. B* 997 (2015) 16–22 <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2015.05.032>.
- [2] F. Al-Rimawi, Development and validation of an analytical method for Metformin hydrochloride and its related compound (1-cyanoguanidine) in tablet formulations by HPLC-UV, *Talanta* 79 (2009) 1368–1371 <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2009.06.004>.
- [3] B. Hernández, F. Pflüger, S.G. Kruglik, R. Cohen, M. Ghomi, Protonation-deprotonation and structural dynamics of antidiabetic drug Metformin, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 114 (2015) 42–48 <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2015.04.041>.
- [4] D. Desai, B. Wong, Y. Huang, Q. Ye, D. Tang, H. Guo, M. Huang, P. Timmins, Surfactant mediated dissolution of metformin hydrochloride tablets: wetting effects

- versus ion pairs diffusivity, *J. Pharm. Sci.* 103 (2014) 920–926 <https://doi.org/10.1002/jps.23852>.
- [5] A.K. Nayak, D. Pal, K. Santra, Ispaghula mucilage-gellan mucoadhesive beads of Metformin HCl: development by response surface methodology, *Carbohydr. Polym.* 107 (2014) 41–50 <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.02.022>.
- [6] A.K. Nayak, D. Pal, K. Santra, Tamarind seed polysaccharide-gellan mucoadhesive beads for controlled release of Metformin HCl, *Carbohydr. Polym.* 103 (2014) 154–163 <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.12.031>.
- [7] M. Bouchoucha, B. Uzzan, R. Cohen, Metformin and digestive disorders, *Diabetes Metab.* 37 (2011) 90–96 <https://doi.org/10.1016/j.diabet.2010.11.002>.
- [8] F. Maestrelli, P. Mura, M.L. González Rodríguez, M.J. Cózar-Bernal, A.M. Rabasco, D.C. Mannelli Lorenzo, C. Ghelardini, Calcium alginate microspheres containing Metformin hydrochloride niosomes and chitosomes aimed for oral therapy of type 2 diabetes mellitus, *Int. J. Pharm.* 530 (1–2) (2017) 430–439 <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.07.083>.
- [9] V. Lassalle, M.L. Ferreira, PLA nano and microparticles for drug delivery: an overview of the methods of preparation, *Macromol. Biosci.* 7 (2007) 767–783 <https://doi.org/10.1002/mabi.200700022>.
- [10] B. Tyler, D. Gullotti, A. Mangraviti, T. Utsuki, H. Brem, Poly(lactic acid) (PLA) controlled delivery carriers for biomedical applications, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 107 (2016) 163–175 <https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.06.018>.
- [11] C.P. Reis, J.P. Ferreira, S. Candeias, C. Fernandes, N. Martinho, N. Aniceto, A.S. Cabrita, I.V. Figueiredo, Ibuprofen nanoparticles for oral delivery: proof of concept, *J. Nanomed. Biother. Discov.* 4 (1) (2013) 1–5 <https://doi.org/10.4172/2155-983X.1000119>.
- [12] B. Nayak, A.R. Ray, A.K. Panda, P. Ray, Improved immunogenicity of biodegradable polymer particles entrapped rotavirus vaccine, *J. Biomater. Appl.* 25 (5) (2010) 469–496 <https://doi.org/10.1177/0885328209353642>.
- [13] M. Tobío, A. Sánchez, A. Vila, I. Soriano, C. Eavor, J.L. Vila-Jato, M.J. Alonso, The role of PEG on the stability in digestive fluids and in vivo fate of PEG-PLA nanoparticles following oral administration, *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 18 (3–4) (2000) 315–323 [https://doi.org/10.1016/S0927-7765\(99\)00157-5](https://doi.org/10.1016/S0927-7765(99)00157-5).
- [14] X. Li, S. Chang, G. Du, Y. Li, J. Gong, M. Yang, Z. Wei, Encapsulation of azithromycin into polymeric microspheres by reduced pressure-solvent evaporation method, *Int. J. Pharm.* 433 (2012) 79–88 <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.04.081>.
- [15] J. Park, M. Ye, K. Park, Biodegradable polymers for microencapsulation of drugs, *Molecules* 10 (2005) 146–161 <https://doi.org/10.3390/10010146>.
- [16] M. Li, O. Rouaud, D. Poncelet, Microencapsulation by solvent evaporation: state of the art for process engineering approaches, *Int. J. Pharm.* 363 (2008) 26–39 <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.07.018>.
- [17] R. Dinarvand, S. Moghadam, A. Sheikhi, F. Atiyabi, Effect of surfactant HLB and different formulation variables on the properties of poly-D, L-lactide microspheres of naltrexone prepared by double emulsion technique, *J. Microencapsul.* 22 (2005) 139–151 <https://doi.org/10.1080/02652040400026392>.
- [18] M.L. González Rodríguez, I. Mouram, M.J. Cózar bernal, S. Villasmil, A.M. Rabasco, Applying the taguchi method to optimize sumatriptan succinate niosomes as drug carriers for skin delivery, *J. Pharm. Sci.* 101 (2012) 3845–3863 <https://doi.org/10.1002/jps.23252>.
- [19] L.V. Candiotti, M.M. De Zan, M.S. Camara, H.C. Goicoechea, Experimental design and multiple response optimization. Using the desirability function in analytical methods development, *Talanta* 124 (2014) 123–138 <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.01.034>.
- [20] C.M. Anderson-Cook, C.M. Borror, D.C. Montgomery, Response surface design evaluation and comparison, *J. Stat. Plan. Inference* 139 (2009) 629–641 <https://doi.org/10.1016/j.jspi.2008.04.004>.
- [21] S.C. Ferreira, R. Bruns, H. Ferreira, G. Matos, J. David, G. Brandao, E.P. da Silva, L.A. Portugal, P.S. Dos Reis, A.S. Souza, W.N. Dos Santos, Box-Behnken design: an alternative for the optimization of analytical methods, *Anal. Chim. Acta* 597 (2007) 179–186 <https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.07.011>.
- [22] P.V. Farago, R.P. Raffin, A.R. Pohlmann, S.S. Guterres, S.F. Zawadzki, Physicochemical characterization of a hydrophilic model drug-loaded PHBV microparticles obtained by the double emulsion/solvent evaporation technique, *J. Braz. Chem. Soc.* 19 (2008) 1298–1305 <https://doi.org/10.1590/S0103-50532008000700011>.
- [23] L. Azouz, F. Dahmoune, F. Rezgui, C. G'Sell, Full factorial design optimization of anti-inflammatory drug release by PCL-PEG-PCL microspheres, *Mater. Sci. Eng., A: C. Materials for biological applications* 58 (2016) 412–419 <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.08.058>.
- [24] T. Feczkó, J. Tóth, G. Dósa, J. Gyenis, Influence of process conditions on the mean size of PLGA nanoparticles, *Chem. Eng. Process* 50 (2011) 846–853 <https://doi.org/10.1016/j.cep.2011.05.006>.
- [25] J. Herrmann, R. Bodmeier, The effect of particle microstructure on the somatostatin release from poly(lactide) microspheres prepared by a W/O/W solvent evaporation method, *J. Control. Release* 36 (1995) 63–71 [https://doi.org/10.1016/0168-3659\(95\)00051-9](https://doi.org/10.1016/0168-3659(95)00051-9).
- [26] M.J. Cózar-Bernal, M. Holgado, J. Arias, I. Muñoz-Rubio, L. Martín-Banderas, J. Álvarez-Fuentes, M. Fernández-Arévalo, Insulin-loaded PLGA microparticles: flow focusing versus double emulsion/solvent evaporation, *J. Microencapsul.* 28 (2011) 430–441 <https://doi.org/10.1208/pt05011610.3109/02652048.2011.576786>.
- [27] Q. Xu, A. Crossley, J. Czernuszka, Preparation and characterization of negatively charged poly (lactic-co-glycolic acid) microspheres, *J. Pharm. Sci.* 98 (7) (2009) 2377–2389 <https://doi.org/10.1002/jps.21612>.
- [28] L. Peltonen, J. Aitta, S. Hyvönen, M. Karjalainen, J. Hirvonen, Improved entrapment efficiency of hydrophilic drug substance during nanoprecipitation of poly (D) lactide nanoparticles, *AAPS PharmSciTech* 5 (2004) 115–120 <https://doi.org/10.1208/pt050116>.
- [29] A. André-Abrant, J.L. Taverdet, J. Jay, Microencapsulation par évaporation de solvant, *Eur. Polym. J.* 37 (2001) 955–963 [https://doi.org/10.1016/S0014-3057\(00\)00197-X](https://doi.org/10.1016/S0014-3057(00)00197-X).
- [30] D. Ibraheem, M. Iqbal, G. Agusti, H. Fessi, A. Elaissari, Effects of process parameters on the colloidal properties of polycaprolactone microparticles prepared by double emulsion like process, *Colloid. Surf. Physicochem. Eng. Asp.* 445 (2014) 79–91 <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2014.01.012>.
- [31] S. Freitas, H.P. Merkle, B. Gander, Microencapsulation by solvent extraction/evaporation: reviewing the state of the art of microsphere preparation process technology, *J. Control. Release* 102 (2005) 313–332 <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2004.01.015>.
- [32] Y.S. Lee, P.J. Johnson, P.T. Robbins, R.H. Bridson, Production of nanoparticles-in-microparticles by a double emulsion method: a comprehensive study, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 83 (2013) 168–173 <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2012.10.016>.
- [33] A. Asfaram, M. Ghaedi, M.K. Purkait, Novel synthesis of nanocomposite for the extraction of Sildenafil Citrate (Viagra) from water and urine samples: process screening and optimization, *Ultrason. Sonochem.* 38 (2017) 463–472 <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2017.03.045>.
- [34] R. Liu, G.H. Ma, Y.H. Wan, Z.G. Su, Influence of process parameters on the size distribution of PLA microcapsules prepared by combining membrane emulsification technique and double emulsion-solvent evaporation method, *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 45 (2005) 144–153 <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2005.08.004>.
- [35] J. Vysloužil, P. Doležel, M. Kejdušová, E. Mašková, J. Mašek, R. Lukáč, V. Košťál, D. Vetchý, K. Dvořáčková, Influence of different formulations and process parameters during the preparation of drug-loaded PLGA microspheres evaluated by multivariate data analysis, *Acta Pharm.* 64 (2014) 403–417 <https://doi.org/10.2478/acph-2014-0032>.
- [36] S. Marquette, C. Peerboom, A. Yates, L. Denis, J. Goole, K. Amighi, Encapsulation of immunoglobulin G by solid-in-oil-in-water: effect of process parameters on microsphere properties, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 86 (2014) 393–403 <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2013.10.013>.
- [37] S. Honary, F. Zahir, Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems—a review (Part 2), *Trop. J. Pharmaceut. Res.* 12 (2013) 265–273 <https://doi.org/10.4314/tjpr.v12i2.20>.
- [38] H. Gao, Y. Wang, Y. Fan, J. Ma, Synthesis of a biodegradable tadpole-shaped polymer via the coupling reaction of polylactide onto mono (6-(2-aminoethyl) amino-6-deoxy)- β -cyclodextrin and its properties as the new carrier of protein delivery system, *J. Control. Release* 107 (2005) 158–173 <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2005.06.010>.
- [39] S. Maleki Dizaj, F. Lotfipour, M. Barzegar-Jalali, M.H. Zarrintan, K. Adibkia, Box-Behnken experimental design for preparation and optimization of ciprofloxacin hydrochloride-loaded CaCO₃ nanoparticles, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 29 (2015) 125–131 <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2015.06.015>.
- [40] J.L. Ford, T.E. Mann, Fast-Scan DSC and its role in pharmaceutical physical form characterisation and selection, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 64 (2012) 422–430 <https://doi.org/10.1016/j.addr.2011.12.001>.
- [41] S. Patil, B. Kuchekar, A. Chabukswar, S.C. Jagdale, Formulation evaluation of extended-release solid dispersion of Metformin hydrochloride, *J. Young Pharm.* 2 (2010) 121–129 <https://doi.org/10.4103/0975-1483.63147>.
- [42] P.S.C. Sacchetin, R.F. Setti, P.d.T. Rosa, Á.M. Moraes, Properties of PLA/PCL particles as vehicles for oral delivery of the androgen hormone 17 α -methyltestosterone, *Mater. Sci. Eng. C* 58 (2016) 870–881 <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.09.071>.
- [43] H.K. Sharma, S. Lahkar, L. Kanta Nath, Formulation and in vitro evaluation of Metformin hydrochloride loaded microspheres prepared with polysaccharide extracted from natural sources, *Acta Pharm.* 63 (2013) 209–222 <https://doi.org/10.2478/acph-2013-0019>.
- [44] M. Beck-Broichsitter, T. Schmehl, T. Gessler, W. Seeger, T. Kissel, Development of a biodegradable nanoparticle platform for sildenafil: formulation optimization by factorial design analysis combined with application of charge-modified branched polyesters, *J. Control. Release* 157 (3) (2012) 469–477 <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.09.058>.
- [45] J. Wang, X. Dong, S. Chen, J. Lou, Microencapsulation of capsaicin by solvent evaporation method and thermal stability study of microcapsules, *Colloid J.* 75 (2013) 26–33 <https://doi.org/10.1134/S1061933X13010134>.
- [46] V. Karavelidis, D. Giliopoulos, E. Karavas, D. Bikiaris, Nanoencapsulation of a water soluble drug in biocompatible polyesters. Effect of polyesters melting point and glass transition temperature on drug release behavior, *Eur. J. Pharm. Sci.* 41 (2010) 636–643 <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2010.09.004>.

Résumé

La thèse porte sur l'étude des microparticules à libération prolongée de la metformine préparée à base de poly (acide lactique) en utilisant la méthode de double émulsion évaporation du solvant. La première partie, après avoir sélectionné le span 80 pour la stabilisation de la première émulsion (E1/H) et la formation des microparticules sphériques, est consacrée à l'optimisation des paramètres de formulation par le plan de Box-Behnken et à l'étude de la libération in vitro et in vivo de la metformine. Au travers les différents résultats obtenus, il a été observé que l'efficacité d'encapsulation mesurée expérimentalement est en bonne adéquation avec celle prédite par le modèle. Les microparticules obtenues aux conditions optimales sont lisses et sphériques et se caractérisent par une libération d'environ ~10 % de metformine obtenue dans des milieux physiologiques simulés et une biodisponibilité de 25 % déterminée chez des lapins sains. La seconde partie traite l'influence de la substitution du span 80 par le HPMC sur les propriétés des microparticules et la libération in vitro de la metformine. L'étude révèle que les microparticules sont caractérisées par des surfaces poreuses et rugueuses, ce qui a améliorées le taux de libération de la metformine à 58 %.

Mots clés

Chlorhydrate de metformine, poly (acide lactique), double émulsion, microparticules, méthodologie de surface de réponse, pharmacocinétique, libération prolongée.

Abstract

The thesis focuses on the study of a sustained-release microparticles of metformin prepared from poly (lactic acid) using the double emulsion solvent evaporation method. After the selection of span 80 emulsifier for the stabilization of the first emulsion (E1/H) and the formation of the spherical microparticles, the first part is devoted to the optimization of formulation parameters by Box-Behnken design and to the study of the in vitro/in vivo release of metformin. The results indicate that the encapsulation efficiency obtained experimentally is in good agreement with that predicted by the model. The microparticles prepared under optimal conditions are smooth, spherical and characterized by a slow release of metformin (~10 %) obtained in simulated physiological media and with a bioavailability of 25 % determined in healthy rabbits. The second section discusses the effect of the substitution of span 80 by HPMC on the properties of the microparticles and the in vitro release of the metformin. The study reveals that the addition of HPMC as a co-surfactant lead to the formation of porous and rough microparticles. Metformin release rate has been considerably improved with the incorporation of HPMC (58 %).

Keywords: metformin hydrochloride, poly (lactic acid), double emulsion, microparticles, response surface methodology, pharmacokinetics, sustained-release.

المخلص

تركز الأطروحة على دراسة الجسيمات الدقيقة ذات التحرير المستمر من الميتفورمين المحضر من بولي (حمض اللاكتيك) باستخدام طريقة المستحلب المزدوج و تبخير المذيب. بعد اختيار 80 span لتثبيت المستحلب الأول (E1/H) وتشكيل الجزيئات الدقيقة الكروية، تم تخصيص الجزء الأول لدراسة عوامل التحضير المؤثرة على الجزيئات الدقيقة بواسطة تصميم Box-Behnken ودراسة تحرير الميتفورمين في وسط فسيولوجي محاكي و في الجسم الحي للأرنب. تشير النتائج إلى أن كفاءة التغليف التي تم الحصول عليها تجريبياً متوافقة بشكل جيد مع تلك التي تتنبأ بها النموذج. الجسيمات الدقيقة المحضرة في ظل الظروف المثلى تكون ناعمة وكروية وتتميز بتحرير بطيء للميتفورمين (حوالي 10%) تم الحصول عليها في وسط فسيولوجي محاكي وبتوافر حيوي بنسبة 25% في الأرنب السليمة. يناقش القسم الثاني تأثير إستبدال 80 span بواسطة HPMC على خصائص الجسيمات الدقيقة وإطلاق الميتفورمين في وسط فسيولوجي محاكي. كشفت الدراسة أن إضافة HPMC كعامل خافض للتوتر السطحي يؤدي إلى تكوين جسيمات دقيقة خشنة مسامات و تم تحسين معدل إطلاق الميتفورمين بشكل كبير (58%).

الكلمات المفتاح: ميتفورمين هيدروكلوريد، بولي (حمض اللاكتيك)، مستحلب مزدوج، جزيئات دقيقة، منهجية سطح الاستجابة، التحرير المستمر.