

Université de Montréal

**Nanoparticules et réseaux de neurones artificiels:
de la préparation à la modélisation**

Par

Névine Rizkalla

Faculté de Pharmacie

Thèse présentée à la faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Philosophiæ Doctor (Ph.D.)
en sciences pharmaceutiques

février 2005

© Névine Rizkalla, 2005



QV
705
U58
2005
v.014

Direction des bibliothèques

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

**Nanoparticules et réseaux de neurones artificiels :
de la préparation à la modélisation**

présentée par

Névine Rizkalla

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Président - rapporteur : D^r Louis Cartilier

Directeur de recherche : D^r Patrice Hildgen

Membre du jury : D^r Fahima Nekka

Examineur externe : D^r Christian Merle

Représentant du doyen de la FES : À déterminer

Thèse acceptée le :

Sommaire

Cette thèse porte sur l'optimisation de la préparation et la caractérisation de nanoparticules polymériques contenant un modèle d'ADN ainsi que la modélisation du procédé de leur fabrication. Une revue de littérature permet d'explorer les différentes méthodes utilisées pour la préparation de vecteurs microparticulaires et nanoparticulaires, en portant une attention particulière aux nanosphères. Les approches de modélisation et d'optimisation de procédés sont également décrites. Ensuite les méthodes basées sur l'intelligence artificielle, à savoir les réseaux de neurones artificiels (RNA) et l'algorithme génétique (AG), sont présentées puisque ces approches seront adoptées dans la présente étude. Finalement une introduction sur des nouvelles méthodes de caractérisation de la structure interne des NP met en relief deux nouveaux outils : la dimension fractale (D) et la lacunarité (L).

Les nanoparticules ont été préparées à partir de différents polymères biodégradables par double émulsion en utilisant une homogénéisation à haute pression. La forme et texture ont été élucidées par microscopie électronique à balayage et par microscopie à force atomique. La taille des nanoparticules a été évaluée par spectroscopie par corrélation de photons, et la porosité mesurée par adsorption de gaz. La vitesse de libération de l'ADN a été déterminée par une méthode appropriée. De même la

dégradation des nanoparticules de PLA a été étudiée en suivant la progression de la porosité.

Les résultats obtenus montrent des nanoparticules qui atteignent des tailles aussi petites que 100-300 nm, et ce en l'absence même d'un tensioactif. La taille et porosité varient selon les conditions de préparation et facteurs de formulation. Les différences de porosité existant entre les nanoparticules préparées à partir de différents polymères sont des raisons principales des différences dans le comportement de libération de l'ADN.

Les résultats de modélisation illustrent l'intérêt des RNA. En appliquant un programme de type boîte noire, nous avons obtenu des prédictions qui étaient supérieures à celles produites par les méthodes statistiques classiques. Ces prédictions ont même été améliorées en utilisant un deuxième programme plus flexible : dans ce cas, nous avons construit un réseau qui était encore plus approprié aux données, et qui a démontré d'excellentes capacités de prédiction.

Finalement, la structure interne des nanoparticules a été évaluée par une étude de la microporosité, et par la mesure de D . Les résultats ont permis d'expliquer certaines caractéristiques reliées aux conditions de préparation. Les calculs de D et de L ont démontré la capacité de ces types de mesure à quantifier un phénomène, à savoir la dégradation des

nanoparticules qui était jusque là étudiée par des méthodes conventionnelles.

En concluant, cette thèse souligne l'importance de la compréhension du rôle des paramètres de préparation sur les propriétés physiques des nanoparticules; des propriétés qui contrôlent potentiellement la libération à partir de ces vecteurs. Cette compréhension nécessite une modélisation simple, telle que fournie par les RNA. D'autre part, les travaux mettent également en œuvre des outils de caractérisation qui s'avèrent prometteurs dans le domaine pharmaceutique, quoique leurs applications initiales appartiennent aux mathématiques ou à la physique: les fractales et la lacunarité.

Mots-Clé :

nanoparticules, double-émulsion, homogénéisation, tensioactif, ADN, taille, porosité, réseaux de neurones artificiels, algorithme génétique, dimension fractale, lacunarité.

Summary

The aim of this study was the optimization of the preparation and characterization of polymeric nanoparticles containing a model DNA, in addition to modeling of the manufacturing process. A review of the literature allows exploring different methods used for the preparation of polymeric carriers: namely microparticles and nanoparticles, with a special emphasis on nanospheres.

Methods for modeling and process optimization are described. Then, new approaches based on artificial intelligence are presented; these include artificial neural networks (ANN) and genetic algorithm (GA), which will be applied in the present study. Finally an introduction on new methods for characterizing complex structures highlights two recent tools: Fractal dimension (D) and Lacunarity (L). These will be used to quantitatively describe internal structure of nanoparticles.

Nanoparticles were prepared from different biodegradable polymers by a double emulsion method based on high pressure homogenization. Morphology and texture of nanoparticles were elucidated by scanning electron microscopy (SEM) and atomic force microscopy (AFM). Nanoparticle mean size and size distributions were measured by photon correlation spectroscopy, and porosity by gas adsorption. Release rate of

DNA was determined by an appropriate technique. Also, degradation of poly(lactic acid) nanoparticles was studied by following porosity changes.

Results showed nanoparticles of varying mean size, which may decrease to reach 100-300 nm, even in the absence of surfactant. Size and porosity data were depending on preparation conditions and formulation factors. Differences in porosity existing among nanoparticles prepared from different polymers appeared to be a major reason for differences in DNA release behavior.

Results of modeling study illustrated the advantages of using ANN. Upon applying a 'black-box' program, we have obtained predictions which were closer to experimental data than those obtained from classic statistical methods. ANN predictions were even improved by using a second program which offers a great flexibility in network building. In this case the built networks demonstrated excellent prediction capacities.

Finally, the internal structure of nanoparticles was further characterized by evaluating microporosity as well as the fractal dimension D . Results allowed to explain certain characteristics related to preparation conditions. Also, fractal dimension and lacunarity measurements demonstrated the capacity of these tools to describe nanoparticle degradation which is used to be done by conventional techniques.

To conclude, this thesis shows the importance of understanding the role played by each variable on the physical properties of nanoparticles, those properties which potentially govern release of encapsulated material. A simple modeling study, as provided by ANN is essential for this understanding and for optimization purpose. On the other hand, the present work shows the interest of applying new characterization tools in the pharmaceutical field, which demonstrated promising results, even though their initial application belonged to mathematics or physics: Fractals and lacunarity.

Key words:

nanoparticles, double emulsion, homogenization, surfactant, DNA, size, porosity, artificial neural networks, genetic algorithm, fractal dimension, lacunarity.

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE	iii
SUMMARY.....	vi
TABLE DES MATIÈRES	ix
LISTE DES FIGURES.....	xiii
LISTE DES TABLEAUX	xviii
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	xx
LISTE DES ÉQUATIONS.....	xxii
REMERCIEMENTS.....	xxv
DÉDICACE	xxvii
AVANT-PROPOS.....	xxviii
REVUE DE LA LITTÉRATURE.....	1
I. PARTICULES POLYMÉRIQUES.....	2
1.1. POLYMÈRES POUR LA FABRICATION DE VECTEURS PARTICULAIRES	3
<i>1.1.1. Propriétés physico-chimiques des polymères biodégradables.....</i>	<i>4</i>
1.2. MÉTHODES DE PRÉPARATION DE MICROPARTICULES	5
<i>1.2.1. Évaporation et extraction de solvant.....</i>	<i>5</i>
<i>1.2.2. Séparation de phase (coacervation).....</i>	<i>7</i>
<i>1.2.3. Atomisation (Spray-drying)</i>	<i>9</i>
1.3. MÉTHODES DE PRÉPARATION DE NANOPARTICULES	11
<i>1.3.1. Préparation de nanocapsules</i>	<i>12</i>
<i>1.3.2. Préparation de nanosphères.....</i>	<i>13</i>
1.3.2.1. Nanoparticules obtenues par la polymérisation d'un monomère ..	13
<i>1.3.2.1.1. Nanoparticules de polyacrylamide.....</i>	<i>13</i>
<i>1.3.2.1.2. Nanoparticules de polyglutaraldéhyde.....</i>	<i>14</i>
<i>1.3.2.1.3. Nanoparticules de poly(alkyl méthacrylate).....</i>	<i>14</i>
<i>1.3.2.1.4. Nanoparticules de poly(alkyl cyanoacrylates)</i>	<i>15</i>

1.3.2.2. Nanoparticules obtenues par la dispersion de polymères préformés	16
1.3.2.2.1. Nanoparticules préparées à partir de macromolécules naturelles... ..	16
1.3.2.2.2. Nanoparticules préparées à partir de polymères synthétiques.....	17
i) Émulsification et évaporation de solvant.....	17
ii) Méthode du 'salting-out'	18
iii) Méthode de précipitation (nanoprécipitation-déplacement de solvant)	18
1.4. PURIFICATION	19
1.5. LYOPHILISATION ET CRYOPROTECTION	20
1.6. DÉGRADATION DES VECTEURS D'ACIDE POLYLACTIQUE ET DE SES	
COPOLYMÈRES	21
II. OPTIMISATION DU PROCÉDÉ DE PRÉPARATION	23
2.1. ANALYSE INDIVIDUELLE DES VARIABLES.....	23
2.2. ANALYSE SIMULTANÉE DES VARIABLES	25
2.2.1. <i>Surface de réponse et analyse factorielle</i>	25
2.2.2. <i>Méthodes basées sur l'intelligence artificielle</i>	28
2.2.2.1. Les réseaux de neurones artificiels (RNA).....	28
2.2.2.1.1. <i>Définition</i>	28
2.2.2.1.2. <i>Du neurone biologique au neurone artificiel</i>	29
2.2.2.1.3. <i>Revue historique</i>	29
2.2.2.1.4. <i>Analogie</i>	34
2.2.2.1.5. <i>Le Perceptron Multicouche (MLP)</i>	36
2.2.2.1.6. <i>Classification des réseaux de neurones : Modèle et algorithme</i>	
<i>d'apprentissage</i>	38
i) Réseaux associatifs avec apprentissage supervisé	39
ii) Réseaux extracteurs de caractéristiques avec apprentissage non supervisé	42
2.2.2.1.7. <i>Performance d'un RNA</i>	43
2.2.2.1.8. <i>Avantages des réseaux de neurones</i>	43
2.2.2.1.9. <i>Les réseaux de neurones versus la régression polynomiale</i>	44
2.2.2.2. <i>L'algorithme génétique</i>	45
2.2.2.3. <i>Applications des réseaux de neurones et de l'algorithme</i>	
<i>génétique en technologie pharmaceutique</i>	46
III. DE LA POROSITÉ À LA STRUCTURE INTERNE DES	
NANOPARTICULES	47
3.1. ÉTUDE DE LA MICROPOROSITÉ DES NANOPARTICULES PAR ADSORPTION DE	
GAZ.....	48
3.1.1. <i>Volume et surface des micropores</i>	48
3.1.2. <i>Distribution de taille des micropores</i>	50
3.2. MÉTHODES BASÉES SUR LA DIMENSION FRACTALE	52
3.2.1. <i>Définition</i>	52

3.2.2. Détermination de la dimension fractale	53
3.3. LA LACUNARITÉ	56
3.3.1. Définition	56
3.3.2. Mesure de la lacunarité	57
IV. HYPOTHÈSE.....	60
V. OBJECTIFS.....	61
PARTIE EXPÉRIMENTALE	62
VI. MATÉRIEL.....	63
VII. MÉTHODES.....	64
7.1. PRÉPARATION DE NANOPARTICULES.....	64
7.2. CARACTÉRISATION DE LA MORPHOLOGIE DE SURFACE	66
7.2.1. Microscopie électronique à balayage (SEM)	66
7.2.2. Microscopie à force atomique (AFM)	66
7.3. MESURE DE LA TAILLE.....	67
7.4. DÉTERMINATION DE LA SURFACE SPÉCIFIQUE ET DE LA POROSITÉ	67
7.5. ÉTUDE DE LA DÉGRADATION	68
7.6. LIBÉRATION IN VITRO DE L'ADN.....	70
7.7. MODÉLISATION DU PROCÉDÉ DE PRÉPARATION DES NANOPARTICULES... 70	
7.7.1. Neuroshell [®] Predictor	71
7.7.2. NeuroSolutions [®]	72
7.7.3. Régression polynomiale.....	75
7.8. ÉTUDE DE LA STRUCTURE INTERNE DES NANOPARTICULES	75
7.8.1. Mesure de la dimension fractale	75
7.8.2. Mesure de la lacunarité.....	75
RÉSULTATS ET DISCUSSION	77
VIII. INFLUENCE DES DIFFÉRENTS PARAMÈTRES DE FORMULATION SUR LES PROPRIÉTÉS DES NANOPARTICULES POLYMÉRIQUES	78
8.1. MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE À BALAYAGE ET MICROSCOPIE À FORCE ATOMIQUE	78
8.2. TAILLE DES NANOPARTICULES	83
8.3. POROSITÉ ET SURFACE SPÉCIFIQUE	96
8.4. ÉTUDE DE LA DÉGRADATION	102

8.5. LIBÉRATION IN VITRO DE L'ADN.....	105
IX. MODÉLISATION DU PROCÉDÉ DE PRÉPARATION DES NANOPARTICULES DE PLA EN UTILISANT LES RÉSEAUX DE NEURONES ARTIFICIELS ET L'ALGORITHME GÉNÉTIQUE.....	108
9.1. DESIGN EXPÉRIMENTAL ET VALEURS OBTENUES.....	109
9.2. NEUROSHELL [©] PREDICTOR, APPRENTISSAGE ET PRÉDICTIONS	113
9.2.1. Modèles représentant l'effet sur la taille.....	113
9.2.2. Modèles représentant l'effet sur la surface des micropores	126
9.2.3. Importance relative des variables indépendantes	133
9.2.3. Importance relative des variables indépendantes	133
9.3. RÉSULTATS DE LA RÉGRESSION.....	135
9.3.1. Régression linéaire multiple	135
9.3.2. Régression non linéaire	140
9.4. NEURO SOLUTIONS [®] : COMPARAISON ENTRE DIFFÉRENTS MODÈLES DE RÉSEAUX DE NEURONES	150
9.4.1. Architecture du réseau.....	150
9.4.2. Nombre de neurones cachés	158
9.4.3. Qualité des données d'apprentissage	163
X. ÉTUDE DE LA MICROSTRUCTURE DES NANOPARTICULES.....	168
10.1. ÉTUDE DE LA MICROPOROSITÉ.....	168
10.2. CARACTÉRISTIQUES DE SURFACE (DIMENSION FRACTALE DE NEIMARK)	173
10.3. CARACTÉRISATION DE LA STRUCTURE INTERNE : ANALYSE DE LA DISTRIBUTION DE TAILLE DES PORES	177
10.3.1. Mesure de la dimension fractale	177
10.3.2. Mesure de la lacunarité.....	179
CONCLUSION.....	183
BIBLIOGRAPHIE	187

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1. DIFFÉRENCES ENTRE UNE NANOSPHERE ET UNE NANOCAPSULE.....	11
FIGURE 2. SCHÉMA DE LA DÉGRADATION DE MICROSPHÈRES D'ACIDE POLYLACTIQUE, ET D'ACIDE POLYLACTIQUE-CO-GLYCOLIQUE, ADAPTÉ DE (VISWANATHAN, PATIL <i>ET AL.</i> , 2001).....	22
FIGURE 3. LE NEURONE BIOLOGIQUE.....	30
FIGURE 4. LE NEURONE FORMEL.....	31
FIGURE 5. INTERACTION DE SIGNAUX PROVENANT DE N NEURONES ET ANALOGIE À LA SOMMATION DE SIGNAUX DANS UN NEURONE ARTIFICIEL (ADAPTÉ DE (BASHEER AND HAJMEER, 2000)).....	34
FIGURE 6. UN PERCEPTRON MULTICOUCHE	36
FIGURE 7. RÉSEAU ASSOCIATIF AVEC APPRENTISSAGE SUPERVISÉ ILLUSTRANT LA RÉTROPROPAGATION D'ERREUR (ADAPTÉ DE (AGATONOVIC-KUSTRIN AND BERESFORD, 2000)).....	40
FIGURE 8. SELON NEIMARK, LA SURFACE FRACTALE EST PAVÉE PAR DES SPHÈRES DE L'ADSORBAT LIQUIDE DONT LE RAYON DE COURBURE A_C DÉPEND DE LA PRESSION RELATIVE, ADAPTÉ DE (PFEIFER, WU <i>ET AL.</i> , 1989).	54
FIGURE 9. MESURE DE LA LACUNARITÉ PAR LA MÉTHODE DE LA BOÎTE GLISSANTE, MONTRANT DEUX TAILLES ET TROIS POSITIONS DE BOÎTE.	59
FIGURE 10. PRÉPARATION DES NANOPARTICULES PAR LA MÉTHODE DE LA DOUBLE ÉMULSION.....	65
FIGURE 11. MONTAGE UTILISÉ POUR L'ÉTUDE DE LA DÉGRADATION DES NANOPARTICULES, AINSI QUE LA LIBÉRATION DE L'ADN	69
FIGURE 12. MODE DE FONCTIONNEMENT DU RNA CONSTRUIT PAR NEUROSHELL [®] PREDICTOR	71
FIGURE 13. ÉTAPES D'UTILISATION DE NEUROSOLUTIONS DANS EXCEL [®]	73
FIGURE 14. ÉTAPES DE CONSTRUCTION DE RÉSEAU DE NEURONES EN UTILISANT NEURALBUILDER [®] DANS NEUROSOLUTIONS [®]	74
FIGURE 15. MICROPHOTOGRAPHIES DE NANOPARTICULES DE PLGA (A), PLGA, CRYOPROTÉGÉES AVEC DU SORBITOL 0.5 % P/V (B) ET (C), ET PLGA, CRYOPROTÉGÉES AVEC DU SORBITOL 5% P/V (D).	79
FIGURE 16. IMAGES AFM DE NANOPARTICULES DE PLGA CRYOPROTÉGÉES AVEC DU SORBITOL 0.5% P/V (A) TOPOGRAPHIE ET (B) PHASE, ET IMAGES AFM (TOPOGRAPHIE) DE NANOPARTICULES DE PLA (C) ET (D).....	80

FIGURE 17. IMAGES AFM MONTRANT LA TAILLE DE QUELQUES NANOPARTICULES DE PLA	81
FIGURE 18. IMAGES AFM DE COUPES DE NANOPARTICULES DE PLA, MONTRANT DES NANOSPHERES AINSI QUE DES NANOCAPSULES.	82
FIGURE 19. DIMINUTION DE LA TAILLE DES GLOBULES DE LA DOUBLE ÉMULSION DURANT L'ÉVAPORATION DU DICHLOROMÉTHANE	83
FIGURE 20. LE CONCEPT DU 'BLOB' D'UNE TAILLE ξ AYANT UN NOMBRE DE MONOMÈRES DE TAILLE B (ADAPTÉ DE (TERAOKA, 2002)).	85
FIGURE 21. EFFET DE LA CONCENTRATION DE LA SOLUTION DE POLYMÈRE SUR LA TAILLE DU BLOB. LORSQUE LA CONCENTRATION AUGMENTE, LA TAILLE DU BLOB DIMINUE DE 'A' VERS 'B', ADAPTÉ DE (TERAOKA, 2002).	86
FIGURE 22. EFFET DE LA PRESSION D'HOMOGENÉISATION SUR LA TAILLE DES NANOPARTICULES DE PLA PRÉPARÉES À 0% PVA	88
FIGURE 23. EFFET DE LA CONCENTRATION DU PVA SUR LA TAILLE DES NANOPARTICULES PRÉPARÉES À 5% PLA ET 5000PSI.....	89
FIGURE 24. EFFET DE LA CONCENTRATION ET DE LA MASSE MOLAIRE DU PVA, AINSI QUE DE LA PRESSION D'HOMOGENÉISATION SUR LA TAILLE MOYENNE DE QUELQUES LOTS CHOISIS DE NANOPARTICULES DE LGA.....	91
FIGURE 25. EFFET DU SORBITOL SUR LA TAILLE DES NANOPARTICULES PRÉPARÉES À 5% PLA ET 5000 PSI	92
FIGURE 26. EFFET DE LA CONCENTRATION DU POLYMÈRE (PLA) SUR LA TAILLE DES NANOPARTICULES PRÉPARÉES À DES DIFFÉRENTES PRESSIONS D'HOMOGENÉISATION.....	95
FIGURE 27. SCHÉMA ILLUSTRANT LA DIFFÉRENCE DE POROSITÉ ENTRE LES NANOPARTICULES DE PLA PUR (A) ET DE COPOLYMÈRE (B).....	97
FIGURE 28. CHANGEMENT DU VOLUME CUMULATIF DE PORES AVEC LE DIAMÈTRE MOYEN DE PORES POUR LES NANOPARTICULES PRÉPARÉES DE DIFFÉRENTS POLYMÈRES BIODÉGRADABLES.....	98
FIGURE 29. CHANGEMENT DU VOLUME CUMULATIF DE PORES EN FONCTION DU DIAMÈTRE MOYEN DE PORES POUR DES NANOPARTICULES PRÉPARÉES À DES DIFFÉRENTES PRESSIONS D'HOMOGENÉISATION	100
FIGURE 30. CHANGEMENT DU VOLUME CUMULATIF DE PORES EN FONCTION DU DIAMÈTRE MOYEN DE PORES POUR DES NANOPARTICULES PRÉPARÉES À DES DIFFÉRENTES CONCENTRATIONS DE TENSIOACTIF	101
FIGURE 31. CHANGEMENT DU VOLUME CUMULATIF DE PORES EN FONCTION DU DIAMÈTRE MOYEN DE PORES POUR DES NANOPARTICULES CRYOPROTÉGÉES AVEC DIFFÉRENTES CONCENTRATIONS DE SORBITOL	102

FIGURE 32. FORMATION DE PORES ET DÉSAGRÉGATION DES NANOPARTICULES DURANT LA DÉGRADATION.....	104
FIGURE 33. CHANGEMENT DU VOLUME CUMULATIF DE PORES EN FONCTION DU DIAMÈTRE MOYEN DE PORES POUR LES NANOPARTICULES DURANT LA DÉGRADATION.....	105
FIGURE 34. LIBÉRATION DE L'ADN À PARTIR DE NANOPARTICULES PRÉPARÉES EN UTILISANT DIFFÉRENTS POLYMÈRES BIODÉGRADABLES.....	106
FIGURE 35. SURFACES DE RÉPONSE POUR LES DONNÉES EXPÉRIMENTALES DE TAILLE (A) NP À 5% P/V DE PLA, (B) NP À 7.5% P/V DE PLA ET (C) NP À 10% P/V DE PLA	111
FIGURE 36. DONNÉES DE TAILLE EXPÉRIMENTALES ET CALCULÉES PAR LE NEUROSHELL PREDICTOR POUR 36 LOTS DE NANOPARTICULES DE PLA.....	114
FIGURE 37. PROGRESSION DE L' <i>RECM</i> , DU R^2 , ET DE L'ERREUR MOYENNE EN FONCTION DU NOMBRE DE NEURONES CACHÉS DURANT L'APPRENTISSAGE AVEC NEUROSHELL [®] PREDICTOR (STRATÉGIE NEURONALE)	115
FIGURE 38. PROGRESSION DE L' <i>RECM</i> , DU R^2 , ET DE L'ERREUR MOYENNE EN FONCTION DU NOMBRE DE GÉNÉRATIONS DURANT L'APPRENTISSAGE AVEC NEUROSHELL [®] PREDICTOR (STRATÉGIE GÉNÉTIQUE).....	116
FIGURE 39. TAILLE MOYENNE DES NP: VALEURS EXPÉRIMENTALES ET PRÉDITES POUR LES LOTS À 7.5% P/V DE PLA.....	123
FIGURE 40. TAILLE MOYENNE DES NP: VALEURS EXPÉRIMENTALES ET PRÉDITES POUR LES LOTS À 5% P/V DE PLA.....	124
FIGURE 41. TAILLE MOYENNE DES NP: VALEURS EXPÉRIMENTALES ET PRÉDITES POUR LES LOTS À 10 % P/V DE PLA	125
FIGURE 42. DONNÉES DE SURFACE DES MICROPORES, EXPÉRIMENTALES ET PRÉDITES PAR LE NEUROSHELL [®] PREDICTOR	126
FIGURE 43. SURFACE DES MICROPORES : VALEURS EXPÉRIMENTALES ET PRÉDITES POUR LES LOTS À 7.5% P/V DE PLA.....	131
FIGURE 44. SURFACE DES MICROPORES : VALEURS EXPÉRIMENTALES ET PRÉDITES POUR LES LOTS À 5% P/V DE PLA.....	131
FIGURE 45. SURFACE DES MICROPORES : VALEURS EXPÉRIMENTALES ET PRÉDITES POUR LES LOTS À 10% P/V DE PLA.....	132
FIGURE 46. IMPORTANCE RELATIVE DES VARIABLES INDÉPENDANTES SUR LES CARACTÉRISTIQUES PHYSIQUES DES NANOPARTICULES.....	134
FIGURE 47. COURBES DE CORRÉLATION ENTRE LES VALEURS EXPÉRIMENTALES DE TAILLE ET CELLES PRÉDITES PAR LE MODÈLE DE RÉGRESSION LINÉAIRE (A) ET LE RÉSEAU DE NEURONES (B).....	138

FIGURE 48. COURBES DE CORRÉLATION ENTRE LES VALEURS EXPÉRIMENTALES DE SURFACE DE MICROPORES ET CELLES PRÉDITES PAR LE MODÈLE DE RÉGRESSION LINÉAIRE (A) ET LE RÉSEAU DE NEURONES (B)	139
FIGURE 49. TAILLE DES NANOPARTICULES : COMPARAISON ENTRE LES PRÉDICTIONS DES DEUX MODÈLES NEURONAL ET STATISTIQUE.....	143
FIGURE 50. SURFACES DE RÉPONSE OBTENUES PAR LES DONNÉES EXPÉRIMENTALES ET PAR LES DIFFÉRENTS MODÈLES POUR L'EFFET DU PVA ET DE LA PRESSION SUR LA TAILLE DES NP PRÉPARÉES À 10% P/V DE PLA	145
FIGURE 51. SURFACE DES MICROPORES : COMPARAISON ENTRE LES PRÉDICTIONS DES DEUX MODÈLES NEURONAL ET STATISTIQUE.....	148
FIGURE 52. SURFACES DE RÉPONSE OBTENUES PAR LES DONNÉES EXPÉRIMENTALES ET PAR LES DIFFÉRENTS MODÈLES POUR L'EFFET DU PVA ET DE LA PRESSION SUR LA SURFACE DES MP DES NP PRÉPARÉES À 10% P/V DE PLA.....	149
FIGURE 53. RÉSEAU DU TYPE PERCEPTRON MULTICOUCHE.....	151
FIGURE 54. RÉSEAU DU TYPE RÉCURSIF.....	152
FIGURE 55. RÉSEAU DU TYPE MODULAIRE.....	153
FIGURE 56. VALEURS DE TAILLE DES NP PRÉDITES SELON DIFFÉRENTS RÉSEAUX CONSTRUITS DANS NEURO SOLUTIONS [®] , EN COMPARAISON AVEC LES VALEURS EXPÉRIMENTALES	154
FIGURE 57. CORRÉLATION ENTRE LES VALEURS EXPÉRIMENTALES DE TAILLE ET CELLES PRÉDITES PAR DIFFÉRENTS RÉSEAUX CONSTRUITS DANS NEURO SOLUTIONS [®]	156
FIGURE 58. CHANGEMENT DE L'ERREUR CARRÉE MOYENNE (E_{CM}) EN FONCTION DU NOMBRE DE NEURONES CACHÉS DURANT L'APPRENTISSAGE AVEC LE RÉSEAU DU TYPE PMC	160
FIGURE 59. CHANGEMENT DU COEFFICIENT DE DÉTERMINATION MULTIPLE (R^2) EN FONCTION DU NOMBRE DE NEURONES CACHÉS DURANT L'APPRENTISSAGE AVEC LE RÉSEAU DU TYPE PMC.....	161
FIGURE 60. CHANGEMENT DE L' E_{CM} EN FONCTION DU NOMBRE DE NEURONES CACHÉS DURANT LA PRÉDICTION AVEC LES RÉSEAUX PMC ET ACP	162
FIGURE 61. L'ERREUR CARRÉE MOYENNE (E_{CM}) DURANT L'APPRENTISSAGE AVEC ET SANS RANDOMISATION POUR LES RÉSEAUX PMC, ACP, LE RÉSEAU CANFIS ET LE NEURO SHELL PREDICTOR [®]	163
FIGURE 62. ERREUR CARRÉE MOYENNE POUR TROIS CYCLES D'APPRENTISSAGE AVEC UNE VALIDATION CROISÉE	165
FIGURE 63. EFFET DE LA VALIDATION CROISÉE SUR LA PERFORMANCE DU RÉSEAU	166

FIGURE 64. DISTRIBUTION DE TAILLE DES MICROPORES POUR DES LOTS DE NP DE PLA PRÉPARÉS À DES DIFFÉRENTES CONCENTRATIONS DE POLYMÈRE.	168
FIGURE 65. DISTRIBUTION DE TAILLE DES MICROPORES POUR DES LOTS DE NP PRÉPARÉS EN UTILISANT DIFFÉRENTES CONCENTRATIONS DE PVA.	171
FIGURE 66. DISTRIBUTION DE TAILLE DES MICROPORES POUR DES LOTS DE NP PRÉPARÉES EN UTILISANT DIFFÉRENTES VALEURS DE PRESSION D'HOMOGENÉISATION.....	172
FIGURE 67. INFLUENCE DU PVA ET DE LA PRESSION D'HOMOGENÉISATION SUR LA DIMENSION FRACTALE DE NEIMARK POUR DES LOTS DE NP PRÉPARÉS AVEC 5% P/V (A) ET 10% P/V (B) DE PLA	175
FIGURE 68. SCHÉMA MONTRANT LE PVA RÉSIDUEL À L'INTERFACE HUILE/EAU ET SON INTERPÉNÉTRATION AVEC LES CHAÎNES DU PLA, ADAPTÉ DE (GALINDO-RODRIGUEZ, ALLÉMANN <i>ET AL.</i> , 2004).....	176
FIGURE 69. REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DE LA DÉGRADATION D'UNE NANOPARTICULE. MONTRANT LA FORMATION DE PORES ET LA DÉSAGRÉGATION.	182

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1. CARACTÉRISTIQUES PHYSIQUES DE NANOPARTICULES PRÉPARÉES À 5% PLA, 0% PVA ET 5000 PSI, CRYOPROTÉGÉES EN UTILISANT DIFFÉRENTES CONCENTRATIONS DE SORBITOL	93
TABLEAU 2. CARACTÉRISTIQUES PHYSIQUES DE NANOPARTICULES PRÉPARÉES À PARTIR DE DIFFÉRENTS POLYMÈRES BIODÉGRADABLES	96
TABLEAU 3. CHANGEMENT DE LA SURFACE SPÉCIFIQUE ET DE LA POROSITÉ DES NANOPARTICULES DURANT LA DÉGRADATION.....	103
TABLEAU 4. DESIGN EXPÉRIMENTAL UTILISÉ DANS L'ÉTUDE DE MODÉLISATION ET DONNÉES EXPÉRIMENTALES DE TAILLE.....	110
TABLEAU 5. STATISTIQUES D'APPRENTISSAGE SELON LES MODÈLES NEURONAL ET GÉNÉTIQUE EN UTILISANT LE NEURO SHELL [®] PREDICTOR.....	118
TABLEAU 6. PARAMÈTRES STATISTIQUES DES DEUX MODÈLES NEURONAL ET GÉNÉTIQUE DURANT L'APPRENTISSAGE, PUIS LA PRÉDICTION DE TAILLE DES LOTS À 7.5% PLA P/V.....	119
TABLEAU 7. PARAMÈTRES STATISTIQUES DES DEUX MODÈLES NEURONAL ET GÉNÉTIQUE DURANT L'APPRENTISSAGE, PUIS LA PRÉDICTION DE TAILLE DES LOTS À 5% PLA P/V.....	121
TABLEAU 8. PARAMÈTRES STATISTIQUES DES DEUX MODÈLES NEURONAL ET GÉNÉTIQUE DURANT L'APPRENTISSAGE, PUIS LA PRÉDICTION DE TAILLE DES LOTS À 10% PLA P/V.....	122
TABLEAU 9. PARAMÈTRES STATISTIQUES DES MODÈLES NEURONAL ET GÉNÉTIQUE APRÈS L'APPRENTISSAGE.....	127
TABLEAU 10. PARAMÈTRES STATISTIQUES DES DEUX MODÈLES NEURONAL ET GÉNÉTIQUE DURANT L'APPRENTISSAGE, PUIS LA PRÉDICTION DE SURFACE DES MICROPORES DES LOTS À 7.5% P/V DE PLA.....	128
TABLEAU 11. PARAMÈTRES STATISTIQUES DES DEUX MODÈLES NEURONAL ET GÉNÉTIQUE DURANT L'APPRENTISSAGE, PUIS LA PRÉDICTION DE SURFACE DES MICROPORES DES LOTS À 5% P/V DE PLA.....	129
TABLEAU 12. PARAMÈTRES STATISTIQUES DES DEUX MODÈLES NEURONAL ET GÉNÉTIQUE DURANT L'APPRENTISSAGE, PUIS LA PRÉDICTION DE SURFACE DES MICROPORES DES LOTS À 10% P/V DE PLA.....	130
TABLEAU 13. RÉSULTATS DE LA RÉGRESSION LINÉAIRE MULTIPLE SUR LES DONNÉES DE TAILLE	136
TABLEAU 14. RÉSULTATS DE LA RÉGRESSION LINÉAIRE MULTIPLE SUR LES DONNÉES DE SURFACE DE MICROPORES.....	136

TABLEAU 15. RÉSULTATS DE LA RÉGRESSION NON LINÉAIRE SUR LES DONNÉES DE LA TAILLE DES NANOPARTICULES	141
TABLEAU 16. RÉSULTATS DE LA RÉGRESSION NON LINÉAIRE SUR LES DONNÉES DE LA SURFACE DES MICROPORES	147
TABLEAU 17. DONNÉES DE POROSITÉ POUR LES LOTS PRÉPARÉS À DIFFÉRENTES CONCENTRATIONS DE PLA	169
TABLEAU 18. CHANGEMENT DE LA DIMENSION FRACTALE D_{DTP} DURANT LA DÉGRADATION	178
TABLEAU 19. CHANGEMENT DES MOMENTS ET DE LA LACUNARITÉ DES NANOPARTICULES DURANT LA DÉGRADATION	180

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

ACP	ANALYSE EN COMPOSANTES PRINCIPALES
ADN	ACIDE DÉOXYRIBONUCLÉIQUE
AFM	MICROSCOPIE À FORCE ATOMIQUE (<i>ATOMIC FORCE MICROSCOPY</i>)
AG	ALGORITHME GÉNÉTIQUE
BET	BRUNAUER-EMMETT-TELLER
CANFIS	SYSTÈME D'INTERFÉRENCE NEURO-FLOUE CO-ACTIF : TYPE DE RÉSEAU DE NEURONE BASÉ SUR LA LOGIQUE FLOUE (<i>CO-ACTIVE NEURO-FUZZY INTERFERENCE SYSTEM</i>)
CAO	CARTES AUTO-ORGANISATRICES
CP	CENTIPOISE (UNITÉ DE VISCOSITÉ)
D	DIMENSION FRACTALE
D_{DTP}	DIMENSION FRACTALE DE LA DISTRIBUTION DE TAILLE DES PORES
D_N	DIMENSION FRACTALE DE NEIMARK
ε	ÉTALON DE MESURE
EDTA	ACIDE(ÉTHYLÈNEDIAMINOTETRACÉTIQUE) – <i>ETHYLENE DIAMINE TETRA ACETIC ACID</i>
FIV	FACTEUR D'INFLATION DE LA VARIANCE
L	LACUNARITÉ
MLP	PERCEPTRON MULTICOUCHE (<i>MULTILAYER PERCEPTRON</i>)
M_w	MASSE MOLAIRE EN POIDS
NP	NANOPARTICULES

PACA	POLYALKYLCYANOACRYLATE
PEG	POLYÉTHYLÈNE GLYCOL
PGA	ACIDE POLYGLYCOLIQUE
PLA	ACIDE POLYLACTIQUE
PLGA	ACIDE POLY(LACTIQUE-CO-GLYCOLIQUE)
PSI	LIVRE PAR POUCE CARRÉE, UNITÉ DE PRESSION (<i>POUND PER SQUARE INCH</i>)
PVA	ALCOOL POLYVINYLIQUE
RNA	RÉSEAU DE NEURONES ARTIFICIELS
RPM	TOUR PAR MINUTE (<i>ROTATION PER MINUTE</i>)
T_G	POINT DE TRANSITION VITREUSE

LISTE DES ÉQUATIONS

$Y = 1/(1 + \exp(-d * X))$	ÉQUATION 132
$Y = 2/(1 + \exp(-2 * X))^{-1}$	ÉQUATION 232
$Y = \exp(-x^2/2)$	ÉQUATION 332
$N_{cach} = N_{app} / [R + (N_{ent} + N_{sort})]$	ÉQUATION 437
$N_{cach} = (N_{app} / \beta) - N_{sort} / (N_{ent} + N_{sort} + 1)$	ÉQUATION 537
$E = 0.5 \sum (y_j - d_j)^2$	ÉQUATION 641
$\Delta w = -\eta \frac{\partial E}{\partial w}$	ÉQUATION 7.141
$\Delta w_m = -\eta \frac{\partial E}{\partial w} + \alpha \Delta w_{m-1}$	ÉQUATION 7.242
$R^2 = 1 - \frac{\sum (y - \hat{y})^2}{\sum (y - \bar{y})^2}$	ÉQUATION 843
$V = V_o e^{-k(E/\beta)^2}$	ÉQUATION 948
$\beta = \frac{E}{E_{ref}}$	ÉQUATION 1048
$E = RT \left(\ln \frac{P_o}{P} \right)$	ÉQUATION 1149
$\log W = \log(V_o) - k \left(\log \frac{P_o}{P} \right)^2$	ÉQUATION 1249
$k = 2.303K \left(\frac{RT}{\beta} \right)^2$	ÉQUATION 1349
$\log W = \log W_m - K \left(\log \frac{P_o}{P} \right)^2$	ÉQUATION 1449
$S = \frac{W_m NA}{M}$	ÉQUATION 1550
$r_k = \frac{-2\gamma W_m}{RT \ln(P/P_o)}$	ÉQUATION 1650
$a = b^D$	ÉQUATION 1753
$S_{lg} = K(a_c)^{2-D}$	ÉQUATION 1854
$S_{lg} = \frac{RT}{\gamma} \int_n^{n_{max}} \ln \left(\frac{P_o}{P} \right) dn$	ÉQUATION 1954

$-\frac{dV}{dr} \propto r^{2-D}$	ÉQUATION 20	55
PROPRIÉTÉ = (PRÉ-FACTEUR)*(QUANTITÉ) ^{EXPOSANT}	ÉQUATION 21	56
PROPRIÉTÉ D'UN SOLIDE POREUX = $L\varepsilon^{-D}$	ÉQUATION 22	56
$Z(1) = \sum sQ(s, r)$	ÉQUATION 23	58
$Z(2) = \sum s^2 Q(s, r)$	ÉQUATION 24	58
$\Lambda(r) = \frac{Z(2)}{[Z(1)]^2}$	ÉQUATION 25	58
$N(r_0) = \frac{r_{\max} - r_{\min}}{r_0}$	ÉQUATION 26	75
$p(s, r_0) = \frac{n(s, r_0)}{N(r_0)}$	ÉQUATION 27	76
$p'(s, r_0) = \frac{p(s, r_0)}{\sum_{r_{\min}}^{r_{\max}} p(s, r_0)}$	ÉQUATION 28	76
$M_1(r_0) = \sum_{s=1}^r sp(s, r_0)$	ÉQUATION 29	76
$M_2(r_0) = \sum_{s=1}^r s^2 p(s, r_0)$	ÉQUATION 30	76
$L(r_0) = \frac{M_2(r_0)}{[M_1(r_0)]^2}$	ÉQUATION 31	76
$\xi \cong b^{-5/4} \rho^{-3/4}$	ÉQUATION 32	84
$\frac{\rho}{N} = \frac{cN_A}{M}$	ÉQUATION 33	85
$\bar{r} = \frac{2\gamma_i^0}{\Delta P} - \frac{2BC_i}{\Delta P}$	ÉQUATION 34	89
$E = \left \frac{V_{act} - V_{pred}}{N} \right $	ÉQUATION 35	117
$E_{CM} = \frac{(V_{act} - V_{pred})^2}{N}$	ÉQUATION 36	117
$Y = a_0 + a_1x_1 + a_2x_2 + a_3x_3$	ÉQUATION 37	135

$f = y_0 + ax + by + cx^2 + dy^2$ ÉQUATION 38	140
$f = a \exp(-0.5(((x - x_0)b)^2 + ((y - y_0)c)^2))$ ÉQUATION 39.....	146
$M_1 = \sum V_{\text{int}} P$ ÉQUATION 40.....	179
$M_2 = \sum (V_{\text{int}})^2 P$ ÉQUATION 41	179
$L = \frac{M_2}{(M_1)^2}$ ÉQUATION 42	179

REMERCIEMENTS

J'aimerais en tout premier lieu exprimer ma profonde gratitude à l'égard de mon directeur de recherche, le D^r Patrice Hildgen, qui m'a prodigué son encouragement et ses précieux conseils. Son esprit ouvert et la confiance qu'il m'a accordée m'ont créé un environnement idéal pour accomplir ce travail. Je me souviendrai toujours que je lui dois mon savoir et mon avenir.

Comme il est de mon devoir primordial de remercier le D^r Louis Cartilier, président du jury, le D^r Christian Merle et le D^r Fahima Nekka, qui m'ont fait ce point d'honneur en acceptant d'évaluer cette thèse.

Comment puis-je passer sous silence mes amis du laboratoire et du département avec qui j'ai passé des moments agréables et qui ont marqué mes années de doctorat ; sachez que je ne vous oublierai jamais.

Je tiens à remercier également la compagnie Novartis et la Faculté des Études Supérieures qui m'ont procuré les moyens financiers nécessaires à la poursuite de cette formation.

Je ne pourrais oublier une personne digne de confiance, M^{me} Simone Zriel, qui n'hésitait pas à régler mes petits problèmes avec la plus grande attention. Elle restera pour moi une très bonne amie.

Quels remerciements chaleureux devrais-je adresser à mes parents, Élane et Georges, pour leurs nombreux sacrifices et leurs encouragements

qui m'ont aidée à poursuivre mon chemin. Et ma sœur Géanne, ne mérite-elle pas un merci du plus profond de mon cœur pour son attention et le temps qu'elle m'a alloué malgré ses préoccupations.

Quoi dire enfin à Philippe, un dernier merci et non le moindre pour ton amour, ta compréhension, ta générosité et ton support constant durant toutes ces années.

*À Philippe,
et à mon petit Alexandre*

AVANT-PROPOS

Avec le progrès continu en biotechnologie, de nombreux peptides, protéines et matériaux génétiques sont considérés comme étant de futurs agents thérapeutiques. Cependant, la plupart de ces substances possèdent une demi-vie *in vivo* d'une courte durée due à une instabilité physique et/ou chimique, ou à une dégradation enzymatique. Par conséquent, une administration fréquente est requise pour réaliser la thérapie désirée. Une solution alternative consiste à préparer des formes posologiques qui assurent une protection ainsi qu'une libération contrôlée de ces agents. L'encapsulation, dans des microparticules ou nanoparticules, s'avère être une approche idéale pour réaliser un tel but. De plus, compte tenu de leur taille, les nanoparticules sont considérées plus appropriées pour le ciblage et la pénétration intracellulaire.

La présente étude se compose de trois parties : La première a consisté à préparer des nanoparticules contenant un modèle d'ADN, comme exemple d'une biomolécule hydrophile, en utilisant différents polymères biodégradables, à savoir, l'acide polylactique (PLA), l'acide poly(lactique-co-glycolique) (PLGA), un tribloc (PLA-PEG-PLA) et un multibloc (PLA-PEG-PLA)_n, et cela par une méthode de double émulsion. Tel qu'il sera décrit dans l'introduction, la phase externe de cette double émulsion contient généralement un tensioactif agissant comme une barrière physique pour empêcher l'agrégation des nanoparticules. Bien que ces

dernières soient rincées plusieurs fois, des traces d'émulsifiant peuvent persister dans la suspension, pour s'adsorber sur les nanoparticules finales. Or, la toxicité de ces agents suivant l'injection a été rapportée dans la littérature. Ainsi l'un des objectifs de ce travail était de tester la faisabilité de préparer des nanoparticules sans l'utilisation d'agents de surface. De plus, l'absence d'un émulsifiant permettrait d'étudier la porosité externe des nanoparticules, puisqu'il pourrait influencer les résultats en masquant les pores.

Une étape essentielle pour obtenir les nanoparticules est la lyophilisation, qui stabilise le produit final et empêche la libération précoce de la substance encapsulée. Toutefois, ce processus pourrait induire des changements dans les propriétés physiques des vecteurs polymériques, surtout leur taille, dus à l'agrégation. À cet effet, différentes concentrations d'un cryoprotecteur, le sorbitol, ont été utilisées, et leur capacité de préservation de la taille a été évaluée.

Différentes variables de formulation pourraient moduler les propriétés physiques des nanoparticules. Ces propriétés mesurées ont été la taille moyenne et la distribution de taille avant et après la lyophilisation, la surface spécifique ainsi que la porosité en termes de volume total de pores et distribution de taille des pores, de même que la microporosité. Trois paramètres ont été considérés importants dans cette étude : la concentration du polymère, puisqu'elle affecte la viscosité de la phase organique et par suite la densité de la matrice polymérique, ce qui influe

sur la taille et la porosité des nanoparticules. Le deuxième paramètre a été la concentration du tensioactif (ou l'émulsifiant), puisqu'il empêche la coalescence des nanoparticules, contrôlant ainsi leur taille. Finalement, la pression d'homogénéisation a été choisie comme le troisième paramètre, puisqu'elle contrôle l'efficacité de l'émulsification. Les changements de porosité des nanoparticules de PLA durant la dégradation ont été suivis, et finalement la libération *in vitro* de l'ADN a été étudiée.

La deuxième partie de la thèse a été consacrée à une étude de modélisation en appliquant les réseaux de neurones de même que l'algorithme génétique. Ces deux systèmes informatisés basés sur l'intelligence artificielle ont permis d'évaluer les paramètres précédents d'une manière simultanée, et en plus, de déterminer l'importance de chacun de ces paramètres sur les caractéristiques sélectionnées des nanoparticules. Les prédictions obtenues ont été comparées aux données de deux modèles de régression.

Enfin la troisième partie s'est orientée vers une étude de la structure interne des nanoparticules, un aspect qui a reçu peu d'intérêt dans la littérature. Cette étude a été basée sur les données de microporosité, qui a permis de mesurer des pores de quelques angströms de diamètre. De plus la rugosité a été quantifiée par le calcul de la dimension fractale de surface. Une dernière étape a été d'évaluer la dimension fractale de la porosité et la lacunarité. Jusqu'à date, ces outils de caractérisation n'ont pas été encore appliqués dans le domaine des vecteurs polymériques.

REVUE DE LA LITTÉRATURE

*Beaucoup de questions actuelles
peuvent être abordées par des
expériences simples, et aussi par des
raisonnements simples.*

Pierre-Gilles de Gennes

I. Particules polymériques

La libération contrôlée d'agents thérapeutiques constitue l'un des premiers objectifs dans la formulation de nouveaux systèmes médicamenteux. Les nouvelles formes pharmaceutiques tentent d'améliorer l'accès des molécules actives vers leurs sites d'action selon deux méthodes : La première vise à développer des vecteurs capables de délivrer l'agent thérapeutique à son site biologique, tout en assurant sa protection dans l'organisme. La deuxième méthode vise à développer des systèmes à libération soutenue qui prolongent l'effet biologique de la molécule active (Davis and Illum, 1988).

Les particules polymériques utilisées comme vecteurs sont préparées à partir de polymères naturels ou synthétiques. Les vecteurs polymériques, notamment les microparticules et nanoparticules ont montré des résultats prometteurs pour l'encapsulation de principes actifs. Ces vecteurs ont été utilisés pour la préparation de systèmes administrés par voie orale (Jung, Kamm *et al.*, 2000), nasale (Illum, Farraj *et al.*, 1994; Lemoine, Deschuyteneer *et al.*, 1999), pulmonaire (Kawashima, Yamamoto *et al.*, 1999), ophtalmique (Zimmer and Kreuter, 1995; Langer, Zimmer *et al.*, 1997),) et parentérale (Luck, Pistel *et al.*, 1998; Radwan, Zaghloul *et al.*, 1999).

1.1. Polymères pour la fabrication de vecteurs particulières

Les polymères d'origine naturelle ou synthétique utilisés pour la fabrication de nanoparticules ou microparticules doivent être à la fois biocompatibles et biodégradables (Chasin and Langer, 1990). Ainsi, ils se dégradent in vivo par des méthodes enzymatiques et/ou non-enzymatiques pour donner des produits biocompatibles, non-toxiques, qui seront éliminés par les voies métaboliques normales.

De nombreux polymères naturels et synthétiques ont été investigués pour le ciblage ou la libération contrôlée. Des polymères naturels comme le collagène et la gélatine ont été évalués pour l'encapsulation de principes actifs, cependant leur utilisation est limitée en raison de leur prix élevé, et de leur pureté imparfaite.

Par ailleurs, des travaux de synthèse sur les oligomères de bas poids moléculaire de lactide et/ou glycolide ont été achevés depuis plusieurs décennies (Lewis, 1990; Wu, 1995a). Plus tard, des méthodes de synthèse de polymères de plus haut poids moléculaires ont été rapportées (Wu, 1995a).

Ainsi, depuis les deux dernières décennies, la technologie des vecteurs polymériques a connu un intérêt croissant envers l'utilisation des polymères synthétiques biodégradables. Différents groupes de polymères, tels que les poly(amides), les poly(alkyl- α -cyano-acrylates), les poly(esters) et les poly(orthoesters) ont été utilisés. Parmi ceux-là, les poly(esters)

aliphatiques tels que l'acide polylactique (PLA), l'acide polyglycolique (PGA), et surtout leur co-polymère, l'acide poly(lactique-co-glycolique) (PLGA) ont généré un intérêt énorme, grâce à leur biocompatibilité et biodégradabilité (Smith and Hunneyball, 1986; Arshady, 1991; Brannon-Peppas, 1995; Anderson and Shive, 1997; Blanco-Prieto, Besseghir *et al.*, 2000; Chandy, Das *et al.*, 2000; Jain, 2000; Leo, Forni *et al.*, 2000; Nam, Song *et al.*, 2000; O'Hara and Hickey, 2000; Yang, Chia *et al.*, 2000)

1.1.1. Propriétés physico-chimiques des polymères biodégradables

La compréhension des propriétés physico-chimiques du polymère utilisé est une étape essentielle qui précède la formulation, puisque ces propriétés peuvent influencer entre autres, le choix du procédé d'encapsulation et la libération du principe actif.

L'acide poly(lactique) peut exister sous une forme optiquement active (L-PLA), ou une forme racémique optiquement inactive (D,L-PLA) (Tice and Cowsar, 1984). Le L-PLA est semi-cristallin, en raison d'une régularité de chaîne, alors que le D,L-PLA est amorphe dû à la présence d'irrégularités dans sa structure. Ainsi cette forme racémique est préférée dans l'encapsulation puisqu'elle permet une dispersion homogène du principe actif à travers la matrice polymérique.

En ce qui concerne l'acide poly(glycolique), c'est un polymère hautement cristallin, puisqu'il lui manque les groupements méthyle latéraux présents

dans le PLA. Il est moins hydrophobe que le PLA. Ainsi les copolymères de PLGA riches en lactide sont moins hydrophiles, absorbent moins d'eau, et par conséquent se dégradent plus lentement (Jain, 2000).

De plus, les propriétés physiques telles que le poids moléculaire peuvent affecter la vitesse de biodégradation et l'hydrolyse du polymère (Kitchell and Wise, 1985).

1.2. Méthodes de préparation de microparticules

Le choix de la technique de préparation dépend de la nature du polymère, celle du principe actif, la voie d'administration et la durée d'action désirée.

Les méthodes sont décrites comme suit :

1.2.1. Évaporation et extraction de solvant

1.2.1.1. Émulsion simple (huile/eau)

Ce procédé consiste à préparer une émulsion huile/eau. D'abord, le polymère est dissous dans un solvant organique volatil non miscible avec l'eau. Puis, le principe actif est ajouté à la solution organique pour produire une solution ou une dispersion qui est ensuite émulsifiée dans un grand volume d'eau contenant un tensioactif, en appliquant une agitation appropriée. Afin de solidifier les globules, le solvant est éliminé par évaporation en agitant l'émulsion sous pression réduite, ou par extraction. Durant l'extraction, l'émulsion est transférée dans une grande quantité d'eau, contenant ou non un tensioactif, vers laquelle le solvant associé aux globules va diffuser (Arshady, 1991; Wu, 1995b). Les microsphères solides

ainsi obtenues sont lavées, et séparées par filtration, tamisage ou centrifugation. Finalement, elles sont lyophilisées pour donner le produit fini.

Il est à noter que durant l'élimination du solvant organique par évaporation, celui-ci doit d'abord diffuser vers la phase aqueuse externe avant d'être éliminé du système par évaporation (Arshady, 1991; Wu, 1995b).

La vitesse d'élimination du solvant par extraction dépend de la température du milieu, le rapport du volume de l'émulsion au volume de la phase aqueuse, et les caractéristiques de solubilité du polymère, du solvant et de la phase aqueuse. Quant à la vitesse d'élimination du solvant par évaporation, elle dépend de la pression, de la température, et des caractéristiques de solubilité mentionnée plus haut. Une évaporation très rapide cause une explosion locale à l'intérieur des gouttelettes et mène à la formation de structures poreuses à la surface de microsphères (Arshady, 1991).

Cette technique est utilisée pour l'encapsulation des principes actifs liposolubles (Martinez, Lairion *et al.*, 1997; O'Hara and Hickey, 2000).

1.2.1.2. Double émulsion

Cette méthode consiste à préparer une émulsion eau/huile/eau pour l'encapsulation de principes actifs hydrosolubles tels que les peptides, les protéines et les vaccins. Une solution aqueuse du principe actif est ajoutée sous une forte agitation à une phase organique qui consiste en une

solution de polymère dans un solvant volatil, souvent du dichlorométhane, pour former une émulsion eau/huile. Cette émulsion est ensuite ajoutée à la phase aqueuse externe contenant un tensioactif pour stabiliser l'émulsion eau/huile/eau. Puis le solvant organique est éliminé par évaporation ou extraction, et l'on procède tel que décrit ci haut dans le cas de l'émulsion simple jusqu'à l'obtention de microsphères solides.

La double émulsion a été utilisée pour l'encapsulation d'un grand nombre de substances hydrophiles, telles que les hormones (Kamijo, Kamei *et al.*, 1996), les vaccins (Alonso, Cohen *et al.*, 1993; Cheng and Gupta, 1996), les protéines et peptides (Yan, Resau *et al.*, 1994; Kissel, Li *et al.*, 1996; Couvreur, Blancoprieto *et al.*, 1997; Yang, Chia *et al.*, 2000), les oligonucléotides (Akhtar and Lewis, 1997) et les plasmides (Capan, Woo *et al.*, 1999; Tinsley-Bown, Fretwell *et al.*, 2000).

1.2.2. Séparation de phase (coacervation)

Ce procédé consiste à réduire la solubilité du polymère par l'ajout d'une troisième composante à la solution du polymère dans le solvant organique (Lewis, 1990; Wu, 1995 b).

Pour un certain rapport de volume, deux phases liquides apparaissent, d'où le nom 'séparation de phase' : Un coacervat contenant le polymère, et un surnageant. Le principe actif qui est dispersé ou dissous dans la solution polymérique devient enrobé avec le coacervat. Ainsi la coacervation se compose de trois étapes:

- (i) Séparation de phase de la solution polymérique enrobante
- (ii) Adsorption du coacervat autour des particules du principe actif
- (iii) Solidification des microsphères

Tout d'abord, le polymère est dissous dans un solvant organique. Les principes actifs hydrosolubles, tels que les peptides et les protéines sont dissous dans l'eau et ensuite dispersés dans la solution du polymère pour former une émulsion eau/huile. Les principes actifs hydrophobes sont solubilisés ou dispersés dans la solution du polymère. Puis, un non solvant organique est ajouté au système polymère-principe actif-solvant avec agitation, afin d'extraire graduellement le solvant, ce qui entraîne la formation de globules de coacervat, à partir du polymère, dont la taille est contrôlée par l'agitation. Ces globules encapsulent le principe actif. Le système est transféré dans une grande quantité d'un autre non solvant pour solidifier les globules et former les microsphères qui sont par la suite séparées par rinçage, tamisage, filtration ou centrifugation, et finalement solidifiées (Wu, 1995b).

La vitesse d'ajout du premier non solvant doit assurer une extraction lente du solvant de façon à permettre au polymère de se déposer et d'enrober uniformément la surface des particules du principe actif durant la coacervation. La concentration du polymère joue un rôle important dans le procédé : Des concentrations trop élevées pourraient accélérer la séparation de phase, et par la suite produire un enrobage non uniforme. En raison de l'absence d'un stabilisateur de l'émulsion, une agglomération

peut se produire. Les globules du coacervat sont extrêmement collants, et peuvent adhérer les uns aux autres, bien avant leur solidification. Ce problème peut être réglé en ajustant la vitesse de l'agitation de même que la température. Cette technique est utilisée pour encapsuler les principes actifs hydrosolubles et liposolubles. Contrairement aux méthodes d'émulsification, le solvant organique peut ne pas être immiscible dans l'eau : Plusieurs solvants ont été utilisés, tels que le dichlorométhane, l'acétonitrile, l'acétate d'éthyle et le toluène (Nihant, Grandfils *et al.*, 1995; Thomasin, Merkle *et al.*, 1997; Thomasin, Nam-Trân *et al.*, 1998). Concernant les non solvants utilisés, ils ne doivent pas dissoudre le polymère ou le principe actif, mais doivent être miscibles avec le solvant. Quelques huiles utilisées comme premier non solvant sont l'huile de silicone, les huiles végétales et les polymères de méthacrylate de bas poids moléculaire. Le deuxième non solvant doit être relativement volatil, des exemples incluent les hydrocarbures aliphatiques, tel que l'hexane, l'heptane et l'éther de pétrole (Nihant, Stassen *et al.*, 1994; Nihant, Grandfils *et al.*, 1995; Thomasin, Merkle *et al.*, 1997).

1.2.3. Atomisation (*Spray-drying*)

Cette technique offre un nombre d'avantages comparée aux autres techniques de microencapsulation (Giunchedi and Conte, 1995). Elle représente une méthode rapide, qui dépend moins des paramètres de solubilité du principe actif ou du polymère. De ce fait, elle est utilisée pour

des principes actifs hydrosolubles ou liposolubles. Une solution, suspension ou émulsion du polymère avec le principe actif est atomisée dans un jet d'air chaud. Les microsphères solides sont recueillies et requièrent uniquement une étape de séchage final. Cependant, le faible rendement est un inconvénient significatif. De plus, l'utilisation d'une température assez élevée empêche l'application de cette technique pour encapsuler des substances thermolabiles, comme les protéines ou les acides nucléiques.

1.3. Méthodes de préparation de nanoparticules

Les nanoparticules sont des vecteurs polymériques colloïdaux, d'une taille inférieure à 1 μm . Selon le procédé de préparation, des nanosphères ou des nanocapsules sont obtenues. La figure 1 illustre la différence entre les deux types de vecteurs : les nanosphères sont des systèmes matriciels où le principe actif est dissous ou dispersé à travers la particule, tandis que les nanocapsules sont des systèmes vésiculaires où le principe actif est confié à une cavité entourée d'une membrane polymérique.

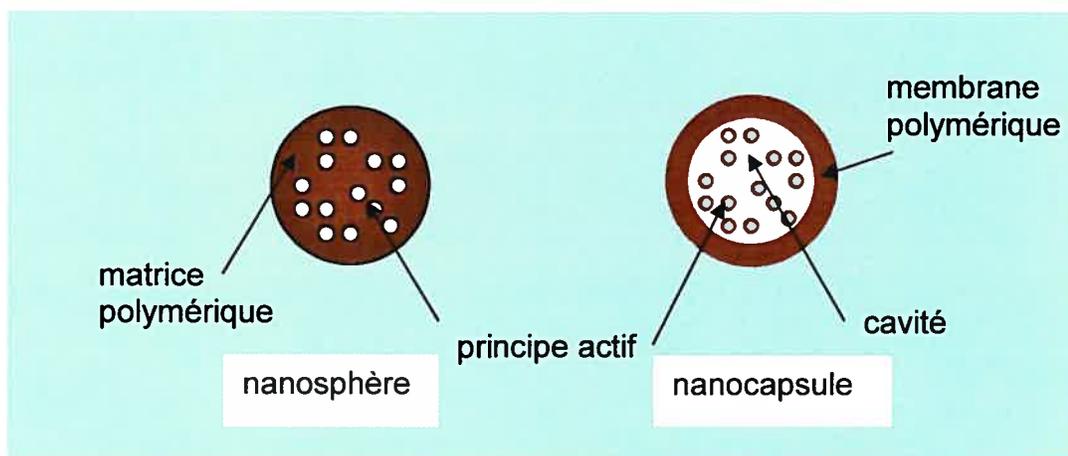


Figure 1. Différences entre une nanosphère et une nanocapsule

Les nanoparticules peuvent être préparées par les mêmes méthodes de préparation que celles décrites pour les microparticules, sauf que les paramètres de fabrication sont ajustés pour obtenir des globules d'une taille inférieure au micron. Cela est réalisé en utilisant un petit rapport phase dispersée/volume de dispersion, de même qu'une vitesse d'agitation plus élevée. De plus, d'autres techniques plus spécifiques pour

la préparation de nanoparticules existent. Étant donné que cela constitue l'un des objectifs de ce travail, une description détaillée de la préparation, purification et solidification des nanoparticules est présentée dans les prochaines sections.

1.3.1. Préparation de nanocapsules

La préparation de nanocapsules a été décrite dans la littérature par Fessi et ses collaborateurs en utilisant un procédé de déplacement de solvant, suivi par une déposition interfaciale (Fessi, Puisieux *et al.*, 1989). Cependant il a été démontré que ces nanocapsules libéraient le principe actif en quelques minutes (Ammoury, Dubrasquet *et al.*, 1993), d'où l'avantage des nanosphères.

Cette même technique a été utilisée par Mosqueira et ses collaborateurs pour préparer des nanocapsules d'acide polylactique (Mosqueira, Legrand *et al.*, 2000). Chouinard et al. ont préparé des nanocapsules de poly(isobutylcyanoacrylate) et de poly(isohexylcyanoacrylate) par une méthode de précipitation interfaciale qui consiste à dissoudre le monomère dans une phase organique, puis mélanger cette dernière avec une phase aqueuse contenant un tensioactif (Chouinard, Buczkowski *et al.*, 1994).

Une méthode alternative consiste en une polymérisation interfaciale de microémulsion en ajoutant sous agitation le polymère à une émulsion eau/huile (Watnasirichaikul, Davies *et al.*, 2000).

1.3.2. Préparation de nanosphères

Ces méthodes peuvent être divisées en deux catégories : les méthodes basées sur les propriétés physico-chimiques telles que la séparation de phase et l'évaporation de solvant, et celles basées sur les réactions chimiques telles que la polymérisation et la condensation (Bodmeier and Chen, 1990; Vauthier-Holtzscheler, Benabbou *et al.*, 1991; Allémann, Gurny *et al.*, 1992; Ibrahim, Bindschaedler *et al.*, 1992; Allémann, Gurny *et al.*, 1993; Sakuma, Hayashi *et al.*, 2001)

1.3.2.1. Nanoparticules obtenues par la polymérisation d'un monomère

Les méthodes de préparation sont classifiées selon le type de polymère obtenu, soit le polyacrylamide, le polyglutaraldéhyde, les poly(alkyl-méthacrylates) et les poly(alkyl-cyanoacrylates).

La plupart de ces méthodes consistent à introduire un monomère dans la phase dispersée d'une émulsion. Dans ce cas, les réactions de polymérisation se produisent en deux étapes; une étape de nucléation, suivie par une étape de croissance.

1.3.2.1.1. Nanoparticules de polyacrylamide

Birrenbach et Speiser ont décrit en 1976 la préparation de nanosphères pour usage pharmaceutique en polymérisant de l'acrylamide avec du N,N'-méthylène bisacrylamide dans une microémulsion eau/huile (Birrenbach

and Speiser, 1976). Cette méthode utilisait de grandes quantités de solvants organiques, notamment le toluène et le chloroforme, un agent de surface anionique pour former la microémulsion, et un initiateur chimique ou physique pour induire la polymérisation (Candau and Holtzschere, 1985; Labhateswar and Dorle, 1990; Vauthier-Holtzschere, Benabbou *et al.*, 1991). À cause de la nature non biodégradable du polymère, ainsi que la difficulté du procédé de fabrication, peu d'intérêt a été accordé aux nanosphères de polyacrylamide, sauf en immunologie où elles sont encore utilisées.

1.3.2.1.2. Nanoparticules de polyglutaraldéhyde

La préparation de nanosphères de polyglutaraldéhyde a été rapportée en 1988 par McLeod et ses collaborateurs en polymérisant le monomère en milieu aqueux alcalin, en présence du dextran comme stabilisateur, et d'une quantité contrôlée d'oxygène (McLeod, Lam *et al.*, 1988). À cause de la présence de groupements carboxyle libres à la surface du polymère, il a été possible de former des liaisons chimiques avec des principes actifs afin de réduire le *burst* qui a lieu pendant la libération de ces substances *in vivo*.

1.3.2.1.3. Nanoparticules de poly(alkyl méthacrylate)

Kreuter et Speiser ont produit en 1976 des nanosphères de poly(méthylméthacrylate) (PMMA) par une méthode de dispersion-

polymérisation en milieu aqueux en présence ou non d'un tensioactif non ionique (Kreuter and Speiser, 1976). La polymérisation est initiée physiquement par radiation γ , ou chimiquement en utilisant du persulfate de potassium. Le principe actif pouvait être incorporé directement dans le milieu de polymérisation, ou adsorbé à la surface des nanosphères déjà préparées (Rolland, Gibassier *et al.*, 1986; Pimienta, Lenaerts *et al.*, 1990). Deux inconvénients ont limité l'utilisation du PMMA, le polymère n'étant pas biodégradable, et le besoin d'un initiateur pour la polymérisation. Ceci a mené au développement de nanoparticules à partir du poly(alkyl cyanoacrylate).

1.3.2.1.4. Nanoparticules de poly(alkyl cyanoacrylates)

La simplicité du procédé de polymérisation et la biodégradabilité du polymère constituent les avantages majeurs des alkylcyanoacrylates. Les nanoparticules de poly(alkylcyanoacrylate) (PACA) sont préparées par une méthode d'émulsification-polymérisation, dans laquelle des gouttelettes de monomères insolubles dans l'eau sont émulsifiées dans une phase aqueuse. Une polymérisation anionique a lieu, spontanément initiée par les ions hydroxydes de l'eau (Couvreur and Vauthier, 1991). La vitesse de polymérisation dépend du pH du milieu, et généralement les nanoparticules sont préparées en milieu acide afin de réduire cette vitesse. Un tensioactif non ionique, tel que le poloxamère 188 ou le polysorbate 20, est utilisé pour stabiliser l'émulsion. Les nanoparticules obtenues sont

d'une taille d'environ 200 nm, mais qui peut diminuer jusqu'à 30 nm en augmentant le pH du milieu de polymérisation ainsi que la concentration du tensioactif (Seijo, Fattal *et al.*, 1990).

1.3.2.2. Nanoparticules obtenues par la dispersion de polymères préformés

La plupart des monomères utilisés dans la polymérisation micellaire produisent des polymères qui sont non biodégradables, ou qui se dégradent lentement. En outre, les molécules résiduelles dans le milieu de polymérisation, en particulier les monomères et les oligomères peuvent être toxiques, ce qui nécessite une purification laborieuse. Dans le but d'éviter ces problèmes, des méthodes de préparation utilisant des polymères préformés ou des macromolécules ont été proposées.

1.3.2.2.1. Nanoparticules préparées à partir de macromolécules naturelles

Scheffel et ses collaborateurs ont été les premiers à produire des nanoparticules pour des applications médicales en utilisant des macromolécules naturelles (Scheffel, Rhodes *et al.*, 1972). Ces particules étaient obtenues par la dénaturation thermique d'une émulsion eau/huile de l'albumine. Cette technique reposait sur l'émulsification puis l'homogénéisation d'une solution aqueuse d'albumine dans de l'huile de grains de coton à la température ambiante. L'émulsion était ensuite versée dans de l'huile préchauffée afin de dénaturer les macromolécules (Gallo,

Hung *et al.*, 1984). Cette méthode présentait deux inconvénients : Le premier était l'utilisation de grandes quantités d'huile, qui devaient être par la suite éliminées en lavant plusieurs fois les nanoparticules avec des solvants organiques. Le deuxième inconvénient résidait dans la température élevée qui servait à la dénaturation, mais qui pouvait, en même temps, nuire aux médicaments thermosensibles. Afin d'éliminer de tels problèmes, plusieurs auteurs ont proposé des solutions alternatives, citons à titre d'exemple, la désolvation de l'albumine ou de la gélatine pour simplifier les étapes de purification, et la réticulation de l'albumine pour remplacer sa dénaturation par la chaleur (Oppenheim, 1986; Bodmeier, Chen *et al.*, 1989). Plus tard les alginates ont été proposés pour la préparation de nanosphères (Vauthier, Rajaonarivony *et al.*, 1991). Une quantité optimisée de chlorure de calcium est mélangée avec une solution aqueuse d'alginate de sodium pour former un microgel, auquel de la poly(L-lysine) est ajoutée pour produire les nanosphères.

1.3.2.2.2. Nanoparticules préparées à partir de polymères synthétiques

Plusieurs approches ont été proposées, elles sont résumées comme suit :

i) Émulsification et évaporation de solvant

Pareillement aux microparticules, cette méthode comporte une préparation d'une solution de polymère dans un solvant chloré, suivie par une émulsification dans une phase aqueuse contenant un tensioactif, puis une

évaporation du solvant organique sous pression réduite. Cette procédure a été appliquée pour préparer des nanoparticules d'acide polylactique (Gurny, Peppas *et al.*, 1981). Dans le but d'améliorer la technique, Krause et ses collaborateurs ont réalisé l'émulsion en utilisant les ultrasons (Krause, Schwartz *et al.*, 1985), alors que Bodmeier et Chen ont appliqué l'homogénéisation à haute pression, encore appelée microfluidisation, pour préparer des nanoparticules contenant de l'indométacine (Bodmeier and Chen, 1990).

ii) Méthode du 'salting-out'

Cette technique permet d'éviter l'utilisation des solvants organiques chlorés. Une solution aqueuse saturée contenant de l'alcool polyvinylique (PVA) est ajoutée sous agitation mécanique à une solution de polymère dans de l'acétone. La raison d'utiliser une solution saturée, c'est d'empêcher l'acétone de se mélanger à l'eau à cause de l'effet de sel. Une fois que l'émulsion est formée, une quantité suffisante d'eau est ajoutée pour permettre la diffusion de l'acétone vers la phase aqueuse, et par conséquent, la formation des nanoparticules (Allémann, Doelker *et al.*, 1992; Allémann, Gurny *et al.*, 1992; Ibrahim, Bindschaedler *et al.*, 1992).

iii) Méthode de précipitation (nanoprécipitation-déplacement de solvant)

Selon cette approche, une solution de polymère est préparée dans un solvant miscible dans l'eau, et ajoutée par la suite à un non solvant

(généralement de l'eau contenant un tensioactif), sous agitation, ce qui conduit à la précipitation de nanosphères d'une taille d'environ 200 nm (Fessi, Devissaguet *et al.*, 1986). Le succès de cette technique dépend essentiellement du choix polymère - solvant - non solvant, puisque ces deux derniers doivent être totalement miscibles.

Barichello *et al.* ont noté une meilleure encapsulation de principes actifs lipophiles en utilisant cette technique. À l'opposé, les principes actifs hydrophiles auront tendance à se perdre suite à leur diffusion vers le non solvant aqueux (Barichello, Morishita *et al.*, 1999).

1.4. Purification

La purification constitue une étape cruciale, puisqu'elle élimine toutes les impuretés pouvant être toxiques. Ces dernières dépendent de la méthode de préparation, et incluent des traces de solvants organiques, des tensioactifs, des monomères résiduels, des initiateurs de polymérisation ainsi que des fragments de polymères. Les solvants organiques, et plus particulièrement les solvants chlorés, doivent être éliminés. Pour la plupart d'entre eux, la concentration dans le produit final ne doit pas excéder 100 ppm (Rabiant, 1991). L'évaporation sous pression réduite pour une durée de temps suffisante sert à éliminer les impuretés volatiles, autrement dit, les solvants organiques (Gurny, Peppas *et al.*, 1981). Les méthodes de purification qui servent à éliminer les impuretés non volatiles mentionnées auparavant, ainsi que l'excès de principe actif, comprennent la dialyse

(Rolland, Gibassier *et al.*, 1986), la filtration, ainsi que l'ultracentrifugation. Durant l'ultracentrifugation, de trois à cinq cycles de centrifugation à haute vitesse, généralement de 15000 à 20000 rpm, suivi chacun de la redispersion des nanoparticules dans de l'eau pure, éliminent 99% des impuretés (Allémann, Gurny *et al.*, 1993).

1.5. Lyophilisation et cryoprotection

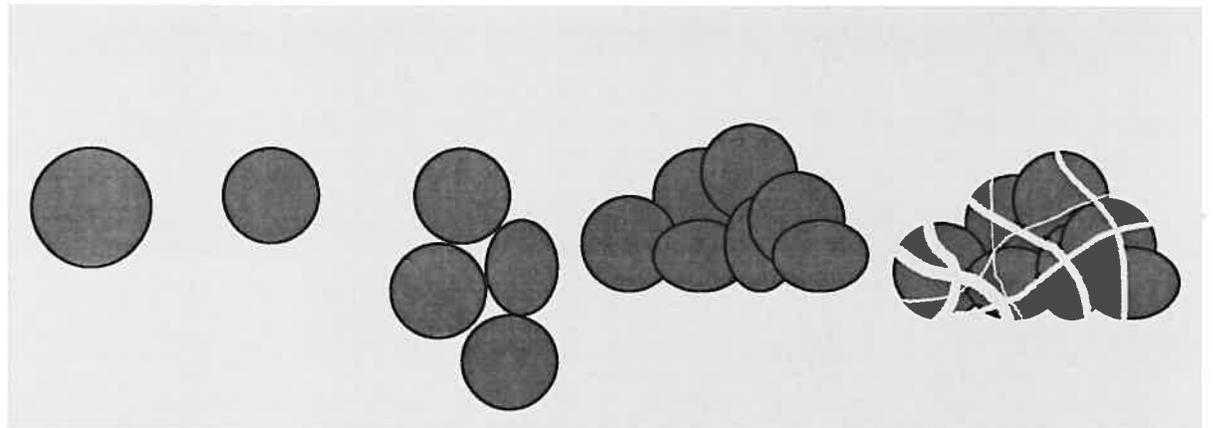
La conservation des vecteurs colloïdaux nécessite la plupart du temps une dessiccation. La présence de l'eau pourrait affecter la stabilité de la préparation durant son entreposage, et causer la biodégradation du polymère, ou initier la libération et/ou la dégradation du principe actif (Auvillain, Cavé *et al.*, 1989; Guterres, Fessi *et al.*, 1995; De Chasteigner, Cavé *et al.*, 1996). La lyophilisation demeure la méthode la mieux adaptée pour éliminer l'eau. Dans la plupart des cas, cette opération dure 72 heures. Une fois lyophilisées, les nanoparticules, sous forme de poudre, sont gardées à -4°C, et elles sont d'habitude facilement dispersées dans l'eau. Bien qu'un certain nombre d'études ait démontré l'absence de changement significatif dans la taille des nanoparticules suite à la lyophilisation (Verdun, Couvreur *et al.*, 1986; Seijo, Fattal *et al.*, 1990), plusieurs auteurs ont constaté une agrégation (Chacon, Molpeceres *et al.*, 1999), donc une augmentation de la taille des nanoparticules. Afin de briser les agrégats, le traitement aux ultrasons des suspensions reconstituées a été proposé (Krause, Schwartz *et al.*, 1985). Une

procédure alternative repose sur l'utilisation de cryoprotecteurs. Comme leur nom l'indique, ces substances, dont la plupart sont des sucres ou des polyalcools, protègent le produit lyophilisé contre les altérations liées à la phase de congélation (Crowe, Reid *et al.*, 1996; De Chasteigner, Cavé *et al.*, 1996; Guzman, Molpeceres *et al.*, 1996; Esquisabel, Hernandez *et al.*, 1997; Molpeceres, Aberturas *et al.*, 1997).

1.6. Dégradation des vecteurs d'acide polylactique et de ses copolymères

Le PLGA se dégrade pour produire les acides lactique et glycolique (Kitchell and Wise, 1985). L'acide lactique est métabolisé dans le cycle des acides tricarboxyliques pour être éliminé de l'organisme en tant que dioxyde de carbone et eau (Tice and Cowsar, 1984). L'acide glycolique suit la même voie métabolique, ou peut être éliminé tel quel (Wu, 1995a).

Viswanathan *et al.* ont schématisé la dégradation de microsphères d'acide polylactique, et d'acide polylactique-co-glycolique (Viswanathan, Patil *et al.*, 2001), ceci est illustré par la figure 2.

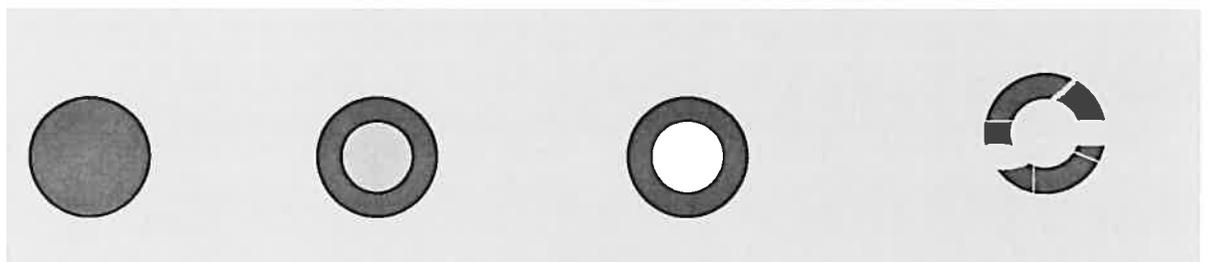


L'hydratation mène à la réduction du T_g et la plastification, et par la suite, à la densification de la particule

La plastification produit un agrégat, qui est d'abord floculé avant de devenir non-redispersible

L'agrégat persiste et la dégradation continue jusqu'à ce que le système perde son intégrité mécanique

(a) Représentation schématique de la séquence de dégradation de microsphères de PLGA



La dégradation hétérogène génère une porosité à l'intérieur des microsphères, tandis que la sphéricité est maintenue

Au fur et à mesure que la dégradation continue, la porosité augmente jusqu'à la formation d'une cavité, avec une paroi intacte

Après que presque tout l'intérieur se soit dégradé, le système se désagrège

(b) Représentation schématique de la séquence de dégradation de microsphères de PLA

Figure 2. Schéma de la dégradation de microsphères d'acide polylactique, et d'acide polylactique-co-glycolique, adapté de (Viswanathan, Patil et al., 2001)

II. Optimisation du procédé de préparation

La préparation de vecteurs polymériques, surtout les nanoparticules, est un procédé complexe dans lequel interviennent plusieurs facteurs de formulation. Par conséquent, les différentes caractéristiques requises du produit fini doivent être optimisées simultanément. Or, cela requiert de l'expertise de même qu'une expérimentation considérable afin de réaliser un vecteur ayant les propriétés désirées.

La compréhension de la relation existant entre les facteurs de causalité et les réponses obtenues représente une difficulté dans l'approche quantitative d'un design pharmaceutique. De plus, un facteur ajusté en fonction d'une propriété quelconque n'est pas toujours idéal pour les autres caractéristiques du produit. On appelle ceci un problème d'optimisation multi-objective.

2.1. Analyse individuelle des variables

Une variété d'approches ont été mises au point afin d'assurer une optimisation des procédés de préparation des vecteurs polymériques : La première est basée sur la variation d'un seul paramètre à la fois. À titre d'exemple, Zambaux et al. ont évalué l'effet de plusieurs paramètres expérimentaux sur les propriétés physico-chimiques de nanoparticules préparées par double émulsion (Zambaux, Bonneaux *et al.*, 1998) ; les paramètres étudiés étaient la température de préparation, les méthodes

d'évaporation de solvant, le volume de la phase aqueuse interne, la concentration du tensioactif et le poids moléculaire du polymère. Les propriétés des nanoparticules affectées étaient la taille, le potentiel zêta, le pourcentage de tensioactif résiduel, ainsi que l'indice de polydispersion. Les conditions de préparation ont été optimisées pour obtenir une taille appropriée, autour de 200 nm, et un indice de polydispersion inférieur à 0.1. Mosqueira et al. ont évalué l'influence de la composition utilisée pour la préparation de nanocapsules en terme de taille de particules, polydispersion, potentiel zêta, homogénéité, ainsi que les caractéristiques structurales des systèmes. La nature de la phase organique, le poids moléculaire du polymère, le type et la concentration des différents tensioactifs ont été étudiés individuellement pour optimiser la formulation afin d'obtenir des nanocapsules pour administration intraveineuse. La tension interfaciale entre la phase organique et la phase aqueuse avait la plus grande influence sur la taille des nanocapsules. Sahoo et al. ont montré que le PVA résiduel qui demeure associé aux nanoparticules de PLGA préparées par double émulsion est contrôlé par la concentration du PVA et le type de solvant organique utilisés dans la formulation (Sahoo, Panyam *et al.*, 2002). En effet, la quantité résiduelle de PVA à la surface des nanoparticules sert à modifier plusieurs propriétés telles que la taille, le potentiel zêta, l'indice de polydispersion, ainsi que l'hydrophobie de la surface.

En suivant la même méthodologie, une étude plus récente a démontré que le temps de sonication, la concentration du polymère et celle du PVA, ainsi que la méthode d'évaporation du solvant organique, représentaient, entre autres, des paramètres déterminant la distribution de taille des nanoparticules de PLGA préparées par émulsion simple (Mainardes and Evangelista, 2005).

D'autres études appliquant toujours cette méthode d'optimisation sont également décrites dans la littérature (Ueda and Kreuter, 1997; Chorny, Fishbein *et al.*, 2002; Langer, Balthasar *et al.*, 2003).

Quoiqu'elle permette d'élucider l'effet de chaque variable sur des caractéristiques sélectionnées, cette approche présente quelques inconvénients liés à l'incapacité de montrer les effets simultanés de plusieurs paramètres sur les propriétés des nanoparticules, et par conséquent, les interactions qui peuvent exister entre ces paramètres.

2.2. Analyse simultanée des variables

2.2.1. Surface de réponse et analyse factorielle

Le développement de méthodes fondées sur des bases mathématiques a permis une approche rationnelle de l'optimisation. La méthodologie de surface de réponse a été largement utilisée dans l'investigation de l'espace de design (Myers and Montgomery, 2002). Cette approche permet la sélection des paramètres optimaux pour l'obtention de quelques

caractéristiques désirées des vecteurs polymériques. Quelques exemples tirés de la littérature illustrent l'optimisation de la préparation de nanoparticules ou microparticules en utilisant la régression polynomiale qui peut également être couplée au design factoriel, ce qui réduit le nombre d'expériences réalisées. Vandervoort et Ludwig ont étudié l'influence de quatre paramètres sur les propriétés de nanoparticules de PLGA préparées par double émulsion en suivant un plan factoriel (Vandervoort and Ludwig, 2001). Les facteurs étudiés étaient la concentration du tensioactif dans la phase aqueuse externe, la présence d'un tampon dans cette même phase, la quantité du principe actif relativement à la quantité du polymère ainsi que le type de PLGA utilisé. Ils ont démontré que la taille était affectée par la concentration du PVA et la présence du tampon, tandis que le rapport principe actif/polymère influençait le taux d'encapsulation.

Das et al. ont appliqué l'analyse factorielle pour évaluer l'effet du tensioactif, du stabilisateur et du pH sur les propriétés physico-chimiques de nanoparticules de poly(isobutylcyanoacrylate) (Das, Tucker *et al.*, 1995). Ils ont trouvé un effet significatif de ces trois variables sur la taille des nanoparticules.

McCarron et al. ont déterminé l'effet des conditions de préparation, à savoir le pH de polymérisation, la quantité de monomère, et la concentration du tensioactif sur les propriétés physico-chimiques de

nanoparticules d'isobutylycyanoacrylate en suivant une méthodologie de surface de réponse (McCarron, Woolfson *et al.*, 1999) .

Ko *et al.* ont étudié les effets des variables de la formulation sur la libération de la félodipine à partir de microparticules de chitosan, en combinant un design composite centré à la méthodologie de surface de réponse. La concentration du chitosan et le temps de réticulation ont négativement affecté la libération du principe actif (diminué la quantité libérée), tandis que le pH de la réticulation avait un effet positif, et l'influence la plus élevée (Ko, Park *et al.*, 2003). Un milieu de réticulation acide favoriserait donc une libération contrôlée à partir du chitosan.

Une revue de la littérature permet de trouver plusieurs autres études qui décrivent des méthodes d'optimisation de la préparation de nanoparticules ou microparticules basées sur un plan factoriel, suivi ou non par une analyse de données en utilisant la régression polynomiale (Abu-Izza, Garcia-Contreras *et al.*, 1996; Prakobvaitayakit and Nimmannit, 2003; Dillen, Vandervoort *et al.*, 2004)

Cependant, la prédiction de caractéristiques ou de réponses basée sur l'équation polynomiale qui est généralement utilisée dans la méthodologie de surface de réponse, est souvent limitée à un faible niveau, ce qui mène à une estimation imprécise de la formulation optimale. De plus, malgré la minimisation effective du travail expérimental fournie par l'analyse factorielle, une quantité de données demeure requise pour une description adéquate des systèmes complexes comportant plusieurs variables

dépendantes et indépendantes. Ces observations ont suscité le besoin d'appliquer des techniques d'optimisation ou de modélisation plus adaptées.

2.2.2. Méthodes basées sur l'intelligence artificielle

Pour tout promeneur quelque peu attentif à son environnement, la nature est source d'inspiration.

François Blayo et Michel Verleysen dans 'Les réseaux de neurones artificiels', Presses Universitaires de France, 1996.

Le progrès réalisé en microinformatique a donné lieu au développement et à la mise en œuvre de systèmes basés sur l'intelligence artificielle. Deux disciplines en ont découlé, apportant une solution aux problèmes d'optimisation et de prédiction : les réseaux de neurones artificiels et l'algorithme génétique.

2.2.2.1. Les réseaux de neurones artificiels (RNA)

2.2.2.1.1. Définition

Les RNA sont des programmes informatiques qui tentent de simuler quelques aspects de fonctionnement du cerveau humain, notamment l'apprentissage et la généralisation. Ces systèmes sont capables de

discerner des relations entre des couples de variables indépendantes et de variables dépendantes durant le processus d'apprentissage. La capacité de généralisation permet aux RNA de produire un résultat correct lorsqu'ils sont appliqués sur des exemples de données différents de ceux utilisés dans la phase d'apprentissage.

Les RNA sont constitués d'unités de calcul, les neurones, organisées dans une structure spécifique pour former un réseau.

2.2.2.1.2. Du neurone biologique au neurone artificiel

Du point de vue morphologique, un neurone biologique est constitué d'un noyau (soma), d'où émergent deux types de prolongements : les dendrites et l'axone (Figure 3). Un signal arrivant d'un autre neurone est capté par les dendrites grâce à leur membrane réceptrice. Lorsque le nombre total d'impulsions dépasse un seuil, le neurone émet à son tour un signal à travers l'axone vers d'autres neurones ou effecteurs à l'aide des synapses. L'effet d'une impulsion arrivant à un neurone peut être excitateur ou inhibiteur, donc ajouté ou déduit de l'effet total des impulsions, et incitant alors le neurone à propager ou non l'information.

2.2.2.1.3. Revue historique

S'étant inspirés du neurone biologique, McCulloch et Pitts conçoivent en 1943 le premier modèle connu sous le nom du neurone formel ou l'automate à seuil (McCulloch and Pitts, 1943) (Figure 4).

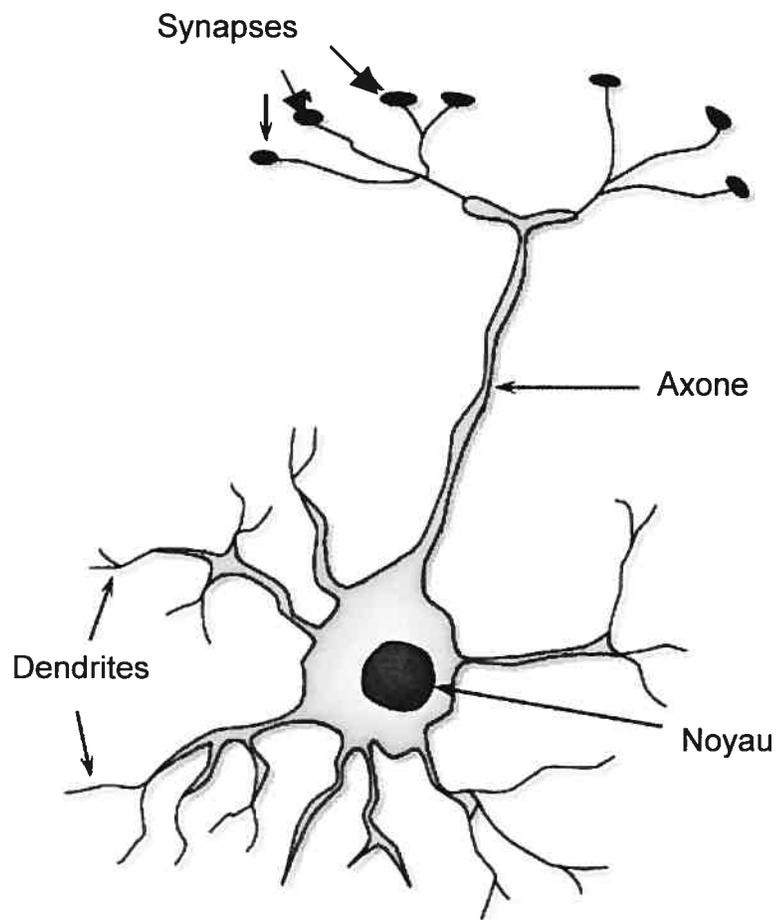


Figure 3. Le neurone biologique

Les signaux (X_1, X_2, \dots, X_n) représentent les entrées (*inputs*), et le noyau du neurone est représenté par un sommateur et par une fonction d'activation.

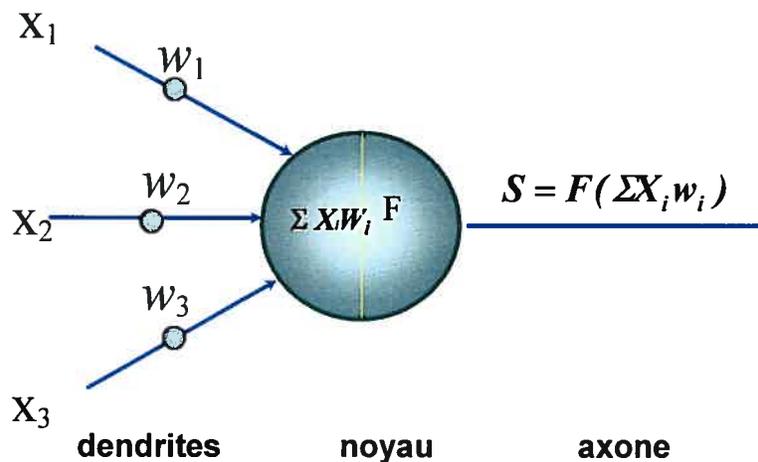


Figure 4. Le neurone formel

Lorsque le neurone reçoit les signaux d'entrées, ceux-ci sont d'abord multipliés par des coefficients de pondération appelés encore 'poids de connexion' (W_1, W_2, \dots, W_n). Ensuite la somme pondérée $\sum X_i Y_i$ est comparée à une valeur de seuil du neurone. Si le seuil est franchi, une fonction d'activation est appliquée sur la somme pour donner une valeur de sortie (S), sinon, le neurone reste inhibé.

La fonction d'activation semble être un élément constitutif important. Souvent des fonctions non linéaires sont nécessaires.

À titre d'exemple, les fonctions les plus couramment utilisées sont :

a. La fonction sigmoïde standard (encore appelée fonction logistique)

$$Y = 1/(1 + \exp(-d * X)) \quad \text{Équation 1}$$

b. La tangente hyperbolique

$$Y = 2/(1 + \exp(-2 * X))^{-1} \quad \text{Équation 2}$$

c. La fonction Gaussienne

$$Y = \exp(-x^2/2) \quad \text{Équation 3}$$

Par la suite, Donald Hebb propose en 1949 une formulation du mécanisme d'apprentissage, sous la forme d'une règle de modification des connexions synaptiques (Hebb, 1949). Finalement, c'est en 1958 que Rosenblatt, combinant les idées de ses prédécesseurs, conçoit le perceptron, un réseau de neurones artificiels inspiré du système visuel, possédant une couche de neurones 'perceptive' ou couche d'entrée et une couche de neurones 'décisionnelle' ou couche de sortie (Rosenblatt, 1958). Ce réseau, qui parvient à apprendre à identifier des formes simples et à calculer certaines fonctions logiques, constitue le premier système artificiel exhibant une faculté jusque là réservée au vivant, la capacité d'apprendre par l'expérience; le premier réseau de neurones artificiel proprement dit.

Cependant, en 1969, Minsky et Papert publient un livre démontrant les limites intrinsèques du perceptron monocouche, en particulier son incapacité à résoudre les problèmes non linéairement séparables (Minsky and Papert, 1969). Ceci mène alors à une période de désintérêt par rapport aux réseaux de neurones qui dure jusqu'au début des années 80.

En 1982, Hopfield introduit le concept de la non linéarité dans les relations entrée-sortie. Il démontre aussi l'utilité des réseaux complètement connectés (les réseaux récurrents avec rétroaction, qui constituent la deuxième grande classe de réseaux avec ceux du type perceptron, aussi connus par l'alimentation-avant) dans la compréhension et la modélisation des processus de la mémoire (Hopfield, 1982).

Parallèlement aux travaux de Hopfield, Rumelhart et al. popularisent un mécanisme d'apprentissage pour les réseaux multicouches de type perceptron : c'est l'algorithme d'apprentissage par rétropropagation de l'erreur qui fournit un moyen simple d'entraîner les neurones des couches cachées (décrites plus tard dans ce chapitre) (Rumelhart, Hinton *et al.*, 1986). Cet algorithme a rendu possible l'application des RNA dans plusieurs domaines scientifiques.

2.2.2.1.4. Analogie

La figure 5 illustre n neurones biologiques avec plusieurs signaux d'intensité x et force synaptique w pénétrant un neurone avec un seuil b , ainsi que le système de neurone artificiel correspondant.

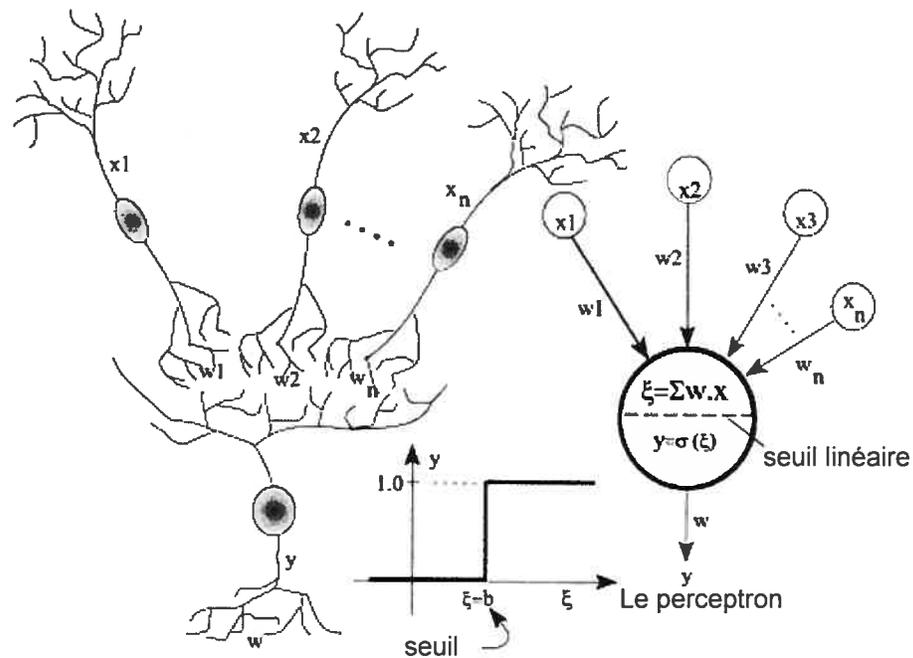


Figure 5. Interaction de signaux provenant de n neurones et analogie à la sommation de signaux dans un neurone artificiel (adapté de (Basheer and Hajmeer, 2000))

Les points d'analogie entre le neurone artificiel et le neurone biologique sont résumés comme suit (Basheer and Hajmeer, 2000):

- Les connexions entre les neurones représentent les axones et les dendrites.
- Les poids des connexions représentent les synapses

- Le seuil représente l'activité dans le soma

De plus, tout comme pour les neurones biologiques, les neurones artificiels peuvent recevoir des données qui sont excitatrices ou inhibitrices. Les données excitatrices font que le mécanisme de sommation du neurone suivant additionne les entrées pondérées, tandis que les données inhibitrices l'incitent à les soustraire. Un neurone peut aussi inhiber d'autres neurones de la même couche, une opération nommée 'inhibition latérale'.

Enfin, les deux réseaux biologique et artificiel apprennent par l'ajustement incrémental de poids, ou de forces synaptiques. L'hypothèse avancée dans ce contexte est que la force d'une synapse augmente lorsque les neurones qu'elle relie agissent de la même façon simultanément. L'intensité de cette force varie donc selon l'activité simultanée des neurones interconnectés. De même, la force synaptique détermine la quantité relative d'impulses qui pénètrent dans le corps cellulaire à travers les dendrites. Des changements rapides dans les forces synaptiques reflètent un mécanisme vital dans le fonctionnement du cerveau (Zupan and Gasteiger, 1999). Le même principe est appliqué aux neurones artificiels : durant l'apprentissage, les neurones entrent simultanément dans un état d'activité qui provoque une modification de l'ensemble des poids ; certains augmentant et d'autres diminuant. L'apprentissage produit donc un état énergétique particulier où l'information devient répartie sur l'ensemble du réseau.

2.2.2.1.5. Le Perceptron Multicouche (MLP)

La structure de réseau la plus employée – dite du ‘perceptron multicouche’- consiste en un arrangement en plusieurs niveaux de neurones ou couches. Dans un perceptron à trois couches (Figure 6), on trouve :

- **Une couche d’entrée**

Cette couche reçoit les données source, qui sont les variables indépendantes ou les valeurs d’entrées. Le nombre de neurones de cette couche est donc égal au nombre d’entrées dans l’analyse.

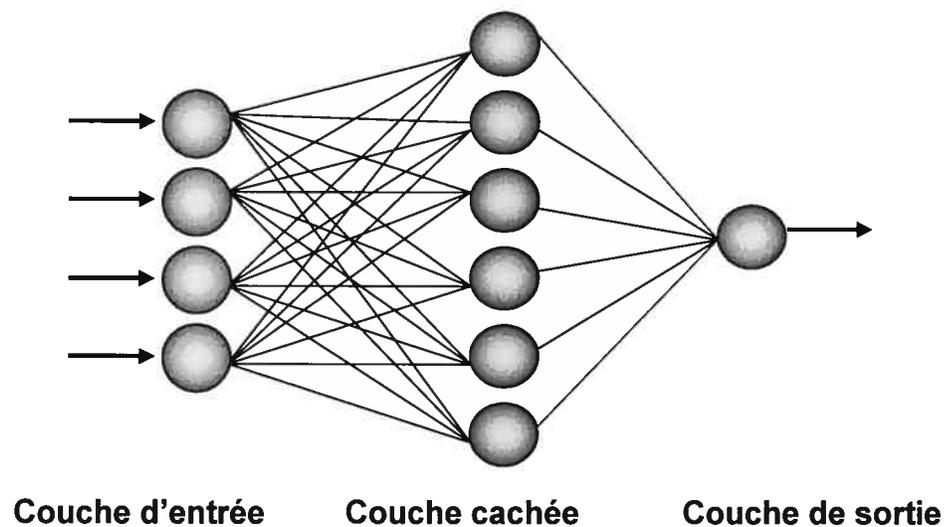


Figure 6. Un perceptron multicouche

- **Une couche cachée**

Ce nom signifie qu'elle n'a qu'une utilité intrinsèque pour le réseau, et n'a pas de contact direct avec l'extérieur. Sur cette couche, les fonctions d'activation sont en général non linéaires. Le choix de la taille de cette couche n'est pas implicite et doit être ajusté. Trop peu de neurones entrave la capacité d'apprentissage du réseau, de même que trop de neurones fait que le réseau 'mémorise' les données utilisées dans la phase de l'apprentissage, et perd ainsi sa capacité de généralisation. Une méthode empirique pour estimer le nombre de neurones cachés proposée par Kolmogorov consiste à doubler le nombre de variables d'entrée et y ajouter un (Hecht-Nielsen, 1987). D'autres méthodes ont proposé une limite supérieure de neurones cachés selon l'équation :

$$N_{cach} = N_{app} / [R + (N_{ent} + N_{sort})] \quad \text{Équation 4}$$

où N_{cach} est le nombre de neurones cachés; N_{app} est le nombre de données de l'apprentissage; R est une constante ayant une valeur entre 5 et 10; N_{ent} est le nombre d'entrées; et N_{sort} est le nombre de sorties (Jadid and Fairbairn, 1996).

Une autre équation basée sur les mêmes paramètres est telle que

$$N_{cach} = (N_{app} / \beta) - N_{sort} / (N_{ent} + N_{sort} + 1) \quad \text{Équation 5}$$

où β est un paramètre relié au degré de surdétermination. Ce terme se réfère à la présence d'un nombre de paires de données d'apprentissage supérieur au nombre de connexions; cela a pour effet de produire un réseau qui satisfait aux ensembles de l'apprentissage, et possède une bonne capacité de généralisation, et ne présente aucun problème de surapprentissage (Carpenter and Hoffman, 1995).

- **Une couche de sortie**

Cette couche donne le résultat obtenu après compilation des données d'entrées par le réseau. Le nombre de neurones de cette couche est égal au nombre de variables dépendantes, ou de données de sortie, que l'on veut obtenir.

2.2.2.1.6. Classification des réseaux de neurones : Modèle et algorithme d'apprentissage

Lorsque les réseaux de neurones sont utilisés dans l'analyse de données, un aspect important est de distinguer entre les différents 'modèles' et 'algorithmes'. Le modèle signifie l'arrangement du réseau, alors que l'algorithme désigne les calculs qui produisent les valeurs de sortie du réseau. Une fois que le réseau est structuré pour une application particulière, il est prêt pour 'apprendre'.

L'apprentissage consiste à calculer les pondérations optimales des différentes connexions. L'efficacité du réseau est améliorée en modifiant

ces pondérations de façon itérative. Les RNA apprennent la relation entre entrées et sorties à partir d'un ensemble représentatif d'exemples. Le type d'information fournie au réseau constitue le paradigme d'apprentissage, il en existe trois principaux : L'apprentissage supervisé, l'apprentissage non supervisé, et l'apprentissage hybride. L'algorithme d'apprentissage est la procédure dans laquelle les règles d'apprentissage sont utilisées en vue de l'ajustement des poids. Les RNA peuvent être classées selon l'une ou l'autre de leurs caractéristiques; ainsi, selon le modèle et le paradigme d'apprentissage, on peut obtenir les réseaux suivants (Agatonovic-Kustrin and Beresford, 2000):

i) Réseaux associatifs avec apprentissage supervisé

Dans le cas de l'apprentissage supervisé, on fournit au réseau la réponse cible pour chaque entrée. Le but est donc de prédire une ou des valeurs de sortie à partir d'une ou de plusieurs données d'entrée. L'apprentissage supervisé peut être considéré comme une forme de régression basée sur des paires de données : entrée et sortie. Ce type de réseau se compose de neurones totalement connectés, organisés sous forme de couches : la couche d'entrée, la couche de sortie, et une ou plusieurs couches cachées. La couche d'entrée reçoit les données à partir d'un fichier de données, et la couche de sortie fournit la réponse aux données d'entrée. Les neurones cachés communiquent seulement avec d'autres neurones

du réseau. L'information transmise d'un neurone à l'autre est contenue dans les pondérations (poids de connexion). Ceux-ci peuvent augmenter ou diminuer, de sorte que le réseau fournisse une réponse aussi proche que possible de la réponse cible (Figure 7).

Algorithme d'apprentissage pour réseaux associatifs

L'algorithme le plus utilisé est celui de la rétropropagation de l'erreur. Cette procédure ajuste de façon répétitive les poids de connexion dans le réseau afin de minimiser la différence entre la sortie du réseau, et la sortie attendue.

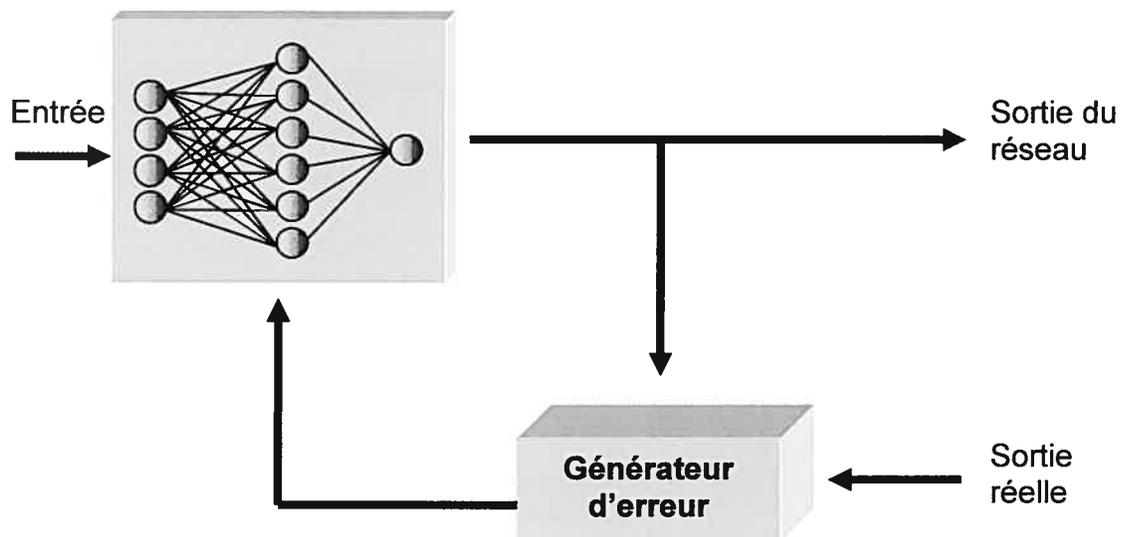


Figure 7. Réseau associatif avec apprentissage supervisé illustrant la rétropropagation d'erreur (adapté de (Agatonovic-Kustrin and Beresford, 2000))

L'apprentissage commence en attribuant des valeurs aléatoires aux poids des connexions (w_i). Les valeurs de sortie du réseau sont produites, à la suite de deux étapes : (i) sommation des entrées, $\sum x_i w_i$, et (ii) application d'une fonction d'activation, $f(\sum x_i w_i)$. Les sorties calculées sont ensuite comparées aux valeurs cibles, pour générer une erreur E définie comme :

$$E = 0.5 \sum (y_j - d_j)^2 \quad \text{Équation 6}$$

où j est un indice des neurones de sortie,

y est la sortie du réseau,

d est la sortie désirée

La rétropropagation de l'erreur est généralement calculée par descente de gradient. Ce calcul a pour but de converger de manière itérative vers une configuration optimisée des poids de connexions, afin de minimiser la fonction d'erreur. L'ajustement de poids (Δw) s'effectue alors d'une manière proportionnelle à la dérivée partielle de E par rapport au poids. Nous avons donc :

$$\Delta w = -\eta \frac{\partial E}{\partial w} \quad \text{Équation 7.1}$$

où η est la vitesse d'apprentissage du réseau.

La procédure se répète jusqu'à ce que la moyenne de la différence entre les sorties calculées et les sorties attendues atteigne son minimum.

Or, une augmentation de η pourrait empêcher le réseau de converger en produisant des oscillations dans les changements de poids. L'introduction

d'un gradient de moment modifie la règle d'apprentissage en incluant le dernier changement de poids pour donner :

$$\Delta w_m = -\eta \frac{\partial E}{\partial w} + \alpha \Delta w_{m-1} \quad \text{Équation 7.2}$$

où $m-1$ est l'itération antérieure, m l'itération actuelle et α le moment. Le nombre de neurones dans la couche cachée influe sur les résultats obtenus à partir du réseau. Un nombre insuffisant de neurones va diminuer l'apprentissage, tandis que trop de neurones cachés affectent la capacité de prédiction à travers le surapprentissage, menant à la mémorisation, qui diminue la capacité de généralisation du réseau.

ii) Réseaux extracteurs de caractéristiques avec apprentissage non supervisé

Dans le cas de l'apprentissage non supervisé, aucune information sur la valeur cible de sortie n'est fournie au réseau. Celui-ci doit donc explorer les corrélations existantes entre les données, et organiser ces dernières en catégories à partir de ces corrélations. Ce comportement est connu sous le nom de 'auto-organisation' ou adaptation. L'auto-organisation implique une compétition et/ou une coopération entre les neurones. Dans le cadre de l'apprentissage compétitif, les neurones sont groupés de sorte que lorsqu'un neurone répond à une entrée particulière, il diminue ou supprime les sorties à partir des autres neurones dans le groupe. En ce qui

concerne l'apprentissage coopératif, les neurones de chaque groupe coopèrent pour renforcer leur sortie.

Les réseaux extracteurs de caractéristiques sont utilisés dans la réduction de données, en diminuant le nombre de variables, tout en gardant l'information contenue dans les facteurs originaux.

L'apprentissage hybride, quant à lui, combine les deux approches; une partie des poids étant déterminée via un apprentissage supervisé et une autre à l'aide d'un apprentissage non supervisé.

2.2.2.1.7. Performance d'un RNA

La performance statistique du réseau est déterminée par son coefficient de détermination multiple R^2 , qui est généralement appliqué dans l'analyse de régression multiple. La formule utilisée pour le calcul de R^2 est la suivante :

$$R^2 = 1 - \frac{\sum(y - \hat{y})^2}{\sum(y - \bar{y})^2} \quad \text{Équation 8}$$

où y est la valeur expérimentale, \hat{y} est la valeur prédite, et \bar{y} est la moyenne des valeurs de y .

2.2.2.1.8. Avantages des réseaux de neurones

Les avantages des réseaux de neurones peuvent être résumés par les points suivants :

- Possibilité de traiter les problèmes complexes
- Possibilité d'analyser des données incomplètes
- Capacité d'apprentissage et d'adaptation
- Capacité de généralisation
- Efficacité et rapidité
- Flexibilité

2.2.2.1.9. Les réseaux de neurones versus la régression polynomiale

L'analyse par les RNA est flexible par rapport à la quantité et la forme de données expérimentales utilisées pour l'apprentissage. Par conséquent, ceci permet d'utiliser des designs informels, contrairement aux approches statistiques classiques qui exigent des données produites selon des structures rigides. De plus les modèles de réseaux neuronaux généralisent mieux que les modèles de régression, puisque ces derniers sont basés sur des niveaux de signification statistique prédéterminée. Ainsi, les termes de moindre signification ne sont pas inclus dans le modèle. Par contre, les méthodes de RNA utilisent toutes les données, permettant une prédiction plus précise (Agatonovic-Kustrin, Zecevic *et al.*, 1998). Enfin, on n'a pas besoin de spécifier un degré pour une équation *à priori*, ou définir une interaction quelconque entre les variables.

2.2.2.2. L'algorithme génétique

Cet algorithme représente une technique d'optimisation. Il reprend, afin de résoudre un problème, la théorie de l'évolution de 'Darwin'. Le but est de se rapprocher au maximum d'une solution optimale. À partir des données du problème, on crée généralement de façon aléatoire une "population" de solutions possibles. Les caractéristiques de chaque solution représentent ses gènes. Puis, on évalue chacune des solutions. On élimine une partie infime de celles qui se sont montrées inutiles, et on recombine les gènes des autres afin d'obtenir de nouveaux individus-solutions. Selon la théorie évolutionniste, cette nouvelle génération sera globalement plus adaptée au problème que la précédente. On itère alors le procédé jusqu'à la naissance d'une solution que l'on jugera satisfaisante.

Bien qu'il soit basé sur les concepts de l'évolution biologique, le mécanisme opératoire de l'algorithme génétique est basé sur la logique et les mathématiques. Il représente une technique d'optimisation d'une grande efficacité. Pour une opération effective d'un algorithme génétique, une rétroaction rapide du succès ou de l'échec de solutions proposées est requise. Pour cette raison, une combinaison d'un algorithme génétique et d'un réseau de neurones s'avère avantageuse.

2.2.2.3. Applications des réseaux de neurones et de l'algorithme génétique en technologie pharmaceutique

Plusieurs auteurs ont utilisé différents types de modèles de RNA et d'algorithme d'apprentissage pour modéliser et/ou optimiser des procédés pharmaceutiques. Comparés aux prédictions de l'équation polynomiale, les modèles de RNA ont révélé un meilleur lissage et des capacités de prédiction supérieures dans le développement des formes pharmaceutiques solides, tels que l'investigation des effets de la formulation et les paramètres de compression sur les propriétés des comprimés (Türkoğlu, Ozarslan *et al.*, 1995; Bourquin, Schmidli *et al.*, 1997; Takahara, Takayama *et al.*, 1997; Bourquin, Schmidli *et al.*, 1998a; Bourquin, Schmidli *et al.*, 1998b). Récemment, des auteurs ont appliqué les RNA pour modéliser les procédés de préparation de particules à libération contrôlée, à savoir les pastilles (Peh, Lim *et al.*, 2000), les granules (Vaithiyalingam and Khan, 2002) et les microsphères (Yüksel, Türkoğlu *et al.*, 2000).

Quelques études ont combiné les deux approches, les réseaux de neurones artificiels et l'algorithme génétique, pour optimiser des procédés de fabrication pharmaceutique (Türkoğlu, Aydin *et al.*, 1999; Agatonovic-Kustrin and Alany, 2001). Néanmoins, l'application de l'algorithme génétique en technologie pharmaceutique demeure très marginale.

III. De la porosité à la structure interne des nanoparticules

L'évaluation des caractéristiques physiques des vecteurs polymériques, surtout leur porosité, constitue une étape cruciale pour prédire et/ou comprendre leur comportement *in vivo*, plus particulièrement en ce qui concerne la biodégradation de la matrice polymérique, et la libération du principe actif encapsulé. La caractérisation de la structure poreuse des microparticules a fait l'objet de plusieurs études. La plupart de ces travaux sont consacrés à l'étude des microsphères préparées par double émulsion. La raison est que cette méthode de préparation permet un niveau de contrôle sur la structure interne. Bien que plusieurs méthodes mathématiques et numériques aient été développées pour expliquer et prédire la libération de principes actifs à partir des structures poreuses (Balazs, Calae *et al.*, 1985; Crofts and Park, 1995; Wang, Wang *et al.*, 2002), nous ne retrouvons l'information quantitative concernant la structure interne que dans quelques études. Ehtezazi *et al.* ont évalué la structure interne de microsphères de polylactique en utilisant des méthodes stéréologiques. Ils ont noté des variations dans la taille et la distribution de pores dépendamment de la vitesse d'homogénéisation appliquée pour former l'émulsion primaire (Ehtezazi, Washington *et al.*, 1999).

Compte tenu de leur taille, l'étude de la structure interne des nanoparticules est encore moins évidente puisque les techniques connues

telles que l'analyse d'images sont difficiles à appliquer. L'adsorption de gaz s'avère alors la méthode de choix pour mesurer des pores inférieurs au nanomètre.

3.1. Étude de la microporosité des nanoparticules par adsorption de gaz

L'adsorption d'azote permet de calculer plusieurs paramètres, à savoir le volume, la surface des micropores (pores < 2 nm), la taille moyenne, ainsi que la distribution de taille des micropores. Les méthodes utilisées dans la présente étude pour l'évaluation de chacun de ces paramètres sont expliquées brièvement ci-dessous.

3.1.1. Volume et surface des micropores

Dubinin et Radushkevich ont postulé que la fraction du volume V occupé par l'adsorbat liquide à un potentiel E pourrait être exprimé par la fonction Gaussienne suivante (Quantachrome, 2003):

$$V = V_o e^{-K(E/\beta)^2} \quad \text{Équation 9}$$

où
$$\beta = \frac{E}{E_{ref}} \quad \text{Équation 10}$$

K = une constante basée sur la forme de la distribution de pores

V = Volume d'adsorption de l'adsorbat liquide

V_o = Volume d'adsorption de l'adsorbat liquide de référence

Puisque

$$E = RT \left(\ln \frac{P_o}{P} \right) \quad \text{Équation 11}$$

Une substitution et une simplification donnent

$$\log W = \log(V_\rho) - k \left(\log \frac{P_o}{P} \right)^2 \quad \text{Équation 12}$$

où ρ = densité de l'adsorbat liquide, et W = le poids adsorbé à une pression relative P/P_o et température T

$$k = 2.303K \left(\frac{RT}{\beta} \right)^2 \quad \text{Équation 13}$$

Lorsque $\log W$ est tracé en fonction de $\left(\log \frac{P_o}{P} \right)^2$, on obtient une ligne droite, avec une ordonnée à l'origine = $\log V_\rho$, d'où V , le volume de micropores pourrait être calculé.

Une modification de l'équation 12

$$\log W = \log W_m - K \left(\log \frac{P_o}{P} \right)^2 \quad \text{Équation 14}$$

permet une représentation graphique de $\log W$ versus $\left(\log \frac{P_o}{P} \right)^2$, qui

produit une ligne droite, ayant une ordonnée à l'origine égale à $\log W_m$, W_m étant le poids d'une monocouche, d'où la surface des micropores S est calculée selon l'équation

$$S = \frac{W_m NA}{M}$$

Équation 15

où N est la constante d'Avogadro, A l'aire de surface de la molécule d'azote, et M la masse molaire de l'azote.

3.1.2. Distribution de taille des micropores

La méthode HK (Horvath and Kawazoe, 1983) permet le calcul de la distribution de taille des micropores à partir de la région de faible pression relative de l'isotherme d'adsorption. Cette méthode est dérivée de l'équation de Kelvin

$$r_k = \frac{-2\gamma V_m}{RT \ln(P/P_0)}$$

Équation 16

où

γ = La tension de surface de l'azote

V_m = Le volume molaire de l'azote liquide

R = la constante universelle des gaz

T = La température d'adsorption

P/P_0 = La pression relative de l'azote

r_k = Le rayon de Kelvin

En choisissant le rayon effectif dans l'intervalle des micropores, nous pouvons calculer les valeurs de pression relative correspondantes. Ensuite, le volume de gaz adsorbé à chaque pression relative est

déterminé à partir de l'isotherme d'adsorption. Enfin, à l'aide d'un calcul différentiel du volume du gaz adsorbé par rapport au rayon effectif de pore, une distribution de taille des micropores est obtenue.

Cependant, si puissante qu'elle soit, l'estimation de la porosité en tant que volume de pores ou distribution de taille des pores allant jusqu'à la microporosité peut dans certains cas être insuffisante pour caractériser complètement la structure interne des nanoparticules. Des nanoparticules ayant le même volume poreux peuvent différer dans l'arrangement des pores, ce qui mène à créer des différences dans leur structure, et par conséquent dans leur comportement quant à la dégradation et/ou la libération du principe actif. Deux outils récents permettent d'approfondir la caractérisation de structures physiques : la dimension fractale et la lacunarité.

3.2. Méthodes basées sur la dimension fractale

La Physique est limitée, par définition, à la finitude de l'expérimentation : finitude du savoir, de la mesure et finitude de la matière avec laquelle nous opérons (sa résolution). . . l'infini est le signe qu'on a quitté la physique proprement dite.

Jean-Pierre Luminet

3.2.1. Définition

Le terme 'fractal' a été créé par Benoît Mandelbrot (Mandelbrot, 1982; Mandelbrot, 1989) afin de quantifier la complexité de structures. Le mot est dérivé du latin *fractus* signifiant fragmenté ou brisé de manière irrégulière. Une fractale désigne un objet ayant un aspect très irrégulier, qui est rugueux, poreux ou fragmenté. Les méthodes de caractérisation basées sur la géométrie fractale décrivent la topographie de surfaces réelles en terme d'un exposant de rugosité, appelé la dimension fractale, D .

Les surfaces idéales, étant relativement lisses, peuvent être modélisées en utilisant les concepts géométriques simples. Pour de telles surfaces, la dimension fractale $D=2$. Par contre, les surfaces réelles sont généralement rugueuses dû à l'arrangement d'atomes, aux défauts, aux dislocations et enfin aux pores. Lorsque les surfaces réelles présentent des irrégularités qui sont similaires à différentes échelles, ces surfaces sont dites fractales, et l'exposant D aura alors une valeur comprise entre 2

et 3. La dimension fractale est donc utilisée pour quantifier les surfaces réelles par un seul paramètre.

La dimension fractale D peut être définie comme suit :

$$a = b^D \quad \text{Équation 17}$$

où a représente une propriété commune de l'objet, b est l'échelle d'observation et D est la dimension fractale.

3.2.2. Détermination de la dimension fractale

Les techniques utilisées consistent à couvrir la structure avec des unités de mesure, appelées étalons, ensuite à déterminer le nombre de ces étalons nécessaires pour paver la structure en fonction de leur taille.

Les méthodes de calcul de la dimension fractale sont variées et dépendent de l'objet analysé. Dans les prochaines sections, nous allons décrire deux méthodes de mesure de la D de surface, la première décrivant la rugosité, appelée la méthode thermodynamique, ou encore la méthode de Neimark, et la deuxième basée sur la distribution de taille des pores. Celles-ci seront appliquées dans la présente étude.

3.2.2.1. Méthode thermodynamique (Méthode de Neimark)

En combinant des arguments thermodynamiques et fractals, Neimark propose qu'au-delà de la condensation capillaire, les surfaces fractales obéissent à la formule suivante (Neimark, 1990):

$$S_{\text{lg}} = K(a_c)^{2-D} \quad \text{Équation 18}$$

Où D est la dimension fractale de surface, K est une constante, a_c , le rayon moyen de courbure de l'interface adsorbat-vapeur, correspond à r_k dans l'équation de Kelvin (équation 16).

S_{lg} est l'aire de l'interface adsorbat-vapeur, donnée par l'équation de Kiselev,

$$S_{\text{lg}} = \frac{RT}{\gamma} \int_n^{n_{\text{max}}} \ln\left(\frac{P_0}{P}\right) dn \quad \text{Équation 19}$$

Avec n et n_{max} étant le nombre de moles de gaz adsorbé à une pression relative P/P_0 et à la saturation, respectivement.

Autrement dit, l'aire de surface cumulative S_{lg} est considérée comme étant une surface adsorbante mesurée par un étalon ayant une taille proportionnelle à a_c (Figure 8)

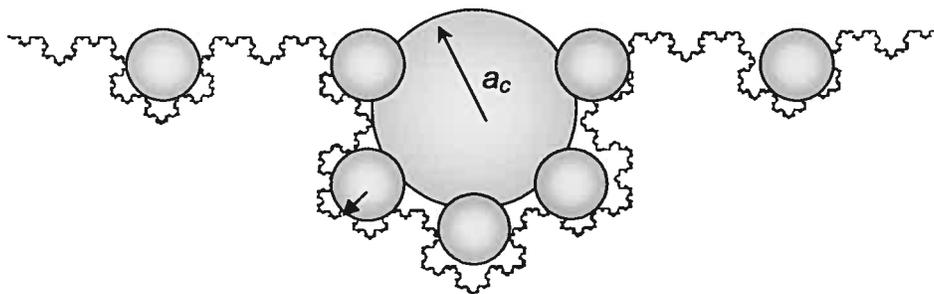


Figure 8. Selon Neimark, la surface fractale est pavée par des sphères de l'adsorbat liquide dont le rayon de courbure a_c dépend de la pression relative, adapté de (Pfeifer, Wu et al., 1989).

3.2.2.2. Méthode de la distribution de taille des pores

Bien que les irrégularités géométriques et la rugosité de surface soient les raisons essentielles du caractère fractal d'un solide, il est reconnu que la présence d'une distribution des tailles de pores, contribue également à la nature fractale de la structure. Donc, la dimension fractale D peut être calculée à partir de la formule (Avnir, 1989):

$$-\frac{dV}{dr} \propto r^{2-D} \quad \text{Équation 20}$$

où V représente le volume cumulé des pores, et r représente le rayon moyen des pores. Schématiquement, la valeur de D augmente lorsque le volume des plus petits pores est important, et elle diminue lorsque la contribution des petits pores est faible. Une distribution de taille de pores qui est étroite ne caractérise pas une structure fractale (Lebon and Hillel, 1995).

En plus de la relation représentée par l'équation 18, d'autres équations ont été dérivées pour évaluer la dimension fractale de surface D à partir d'une seule isotherme d'adsorption.

Or, selon la littérature, des structures différentes pourraient avoir des D identiques ou proches l'une de l'autre (Hildgen, Paquette *et al.*, 2002). Ce problème, assez général dans le domaine des fractales, a créé le besoin

d'un autre type de mesure qui, éventuellement, pourrait différencier de tels objets.

3.3. La lacunarité

3.3.1. Définition

Le terme lacunarité a été cité pour la première fois par Benoît Mandelbrodt, afin de mieux décrire les objets fractals. L'origine de ce mot provient du latin *lacuna* qui désigne 'lacune'. Ainsi une fractale est dite lacunaire lorsque les espaces à l'intérieur de cet objet sont suffisamment larges. Mandelbrot a inventé cette propriété pour décrire les objets possédant des dimensions fractales identiques, mais, en même temps, différents détails de texture (Mandelbrot, 1982).

La lacunarité est une mesure de la non-conformité (hétérogénéité) de la structure, ou du degré de la variance structurale à l'intérieur d'un objet (Gefen, Meir *et al.*, 1983). C'est une dimension qui tient compte de la masse de l'objet.

La lacunarité est reliée à la dimension fractale tel que

$$\text{Propriété} = (\text{pré-facteur}) * (\text{quantité})^{\text{exposant}} \quad \text{Équation 21}$$

où l'exposant correspond à la dimension fractale, et le pré-facteur correspond à la lacunarité. L'équation 19 peut être exprimée sous la forme :

$$\text{Propriété d'un solide poreux} = L\varepsilon^{-D} \quad \text{Équation 22}$$

où L est la lacunarité, ε l'étalon de mesure et D la dimension fractale.

3.3.2. Mesure de la lacunarité

Tandis que la dimension fractale est calculée de façon routinière à partir de la représentation logarithmique de l'équation 17, il n'existe pas un accord sur une procédure qui soit la meilleure, ou la plus correcte pour le calcul de la lacunarité (Allain and Cloitre, 1991).

Mandelbrot a proposé de chercher l'information sur la lacunarité à partir des variations dans les mesures fractales (Mandelbrot, 1982). Apparemment, les méthodes basées sur cette variabilité ont toutes leurs limitations. Allain et Cloitre ont établi l'algorithme de la boîte glissante, illustré par la figure 9 (Allain and Cloitre, 1991). Une boîte de taille r est placée à l'origine de l'ensemble en question. Le nombre de sites occupés à l'intérieur de cette boîte est déterminé et la masse de la boîte est égale à s . Ensuite la boîte est déplacée d'un espace, et la masse de la boîte est de nouveau déterminée. Cette procédure est répétée de telle sorte à couvrir tout l'ensemble, produisant une distribution de fréquence de masse de la boîte $n(s,r)$. Cette distribution de fréquence est transformée en distribution de probabilité $Q(s,r)$ en divisant par le nombre total de boîtes $N(r)$ de taille r . Les premiers et deuxième moments de cette distribution sont calculés :

$$Z(1) = \sum sQ(s,r) \quad \text{Équation 23}$$

$$Z(2) = \sum s^2Q(s,r) \quad \text{Équation 24}$$

La lacunarité pour cette taille de boîte est alors définie telle que

$$\Lambda(r) = \frac{Z(2)}{[Z(1)]^2} \quad \text{Équation 25}$$

Ce calcul est répété sur un intervalle de tailles de boîte, commençant par $r=1$ jusqu'à une fraction de M (où M est la taille de l'ensemble), généralement $M/2$. Ensuite une représentation logarithmique de la lacunarité versus la taille de la boîte glissante est reproduite.

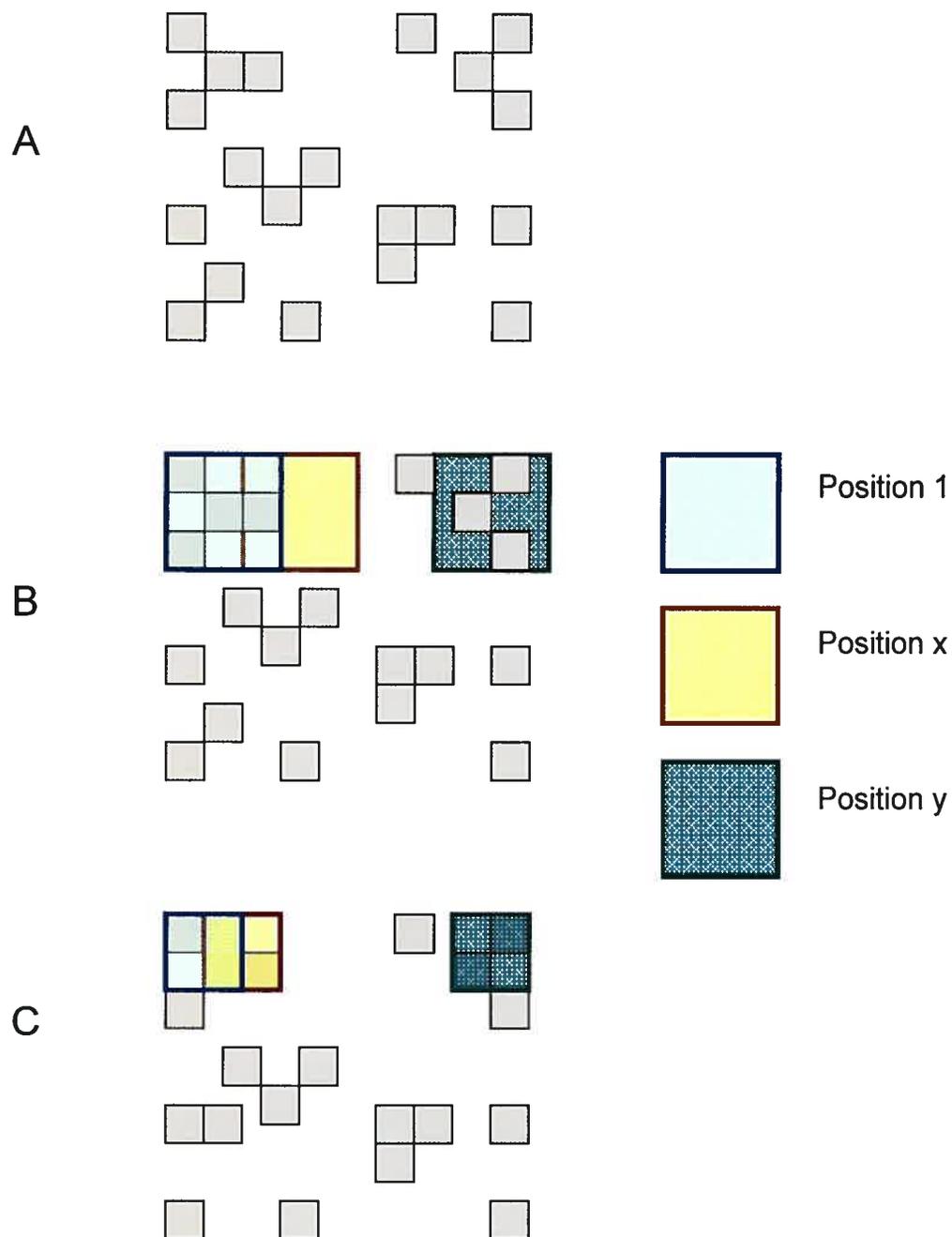


Figure 9. Mesure de la lacunarité par la méthode de la boîte glissante, montrant deux tailles et trois positions de boîte.

IV. HYPOTHÈSE

La libération de principes actifs à partir des nanoparticules polymériques dépend, entre autres, de la structure du polymère, mais aussi des propriétés physiques de ces vecteurs telles que la taille et la porosité; celles-ci contrôlent la surface exposée, la pénétration du milieu de libération, ainsi que la diffusion du principe actif. Or, les propriétés physiques de ces nanoparticules dépendent essentiellement des conditions de préparation. Il serait donc possible de contrôler ces propriétés en ajustant les variables de procédé et/ou les facteurs de formulation. De plus, une modélisation du procédé de la préparation permettrait la sélection des niveaux de variables qui produiront des propriétés désirées. Les réseaux de neurones artificiels représentent une approche prometteuse pour la modélisation, et comparés aux méthodes statistiques classiques, ils offrent une plus grande précision de prédiction, rapidité et flexibilité.

Enfin, l'étude de la microporosité des nanoparticules serait plus complète si elle était suffisamment décrite et quantifiée. Ainsi la connaissance de surface ou du volume des micropores à l'intérieur des nanoparticules devrait être accompagnée par la description de la complexité de la distribution. Nous estimons que l'analyse fractale et le calcul de la lacunarité apporteront une telle information.

V. OBJECTIFS

Cette étude vise à optimiser une technique de préparation de nanoparticules polymériques pour l'encapsulation de l'ADN. Ceci débute par la compréhension de l'effet des variables choisies sur les propriétés physiques des nanoparticules, ensuite progresse jusqu'à la modélisation. Cette dernière sera réalisée à l'aide des réseaux de neurones artificiels, en comparaison avec la régression classique. Au cours de cette modélisation, notre but sera de construire un réseau performant en variant la topologie et le mode d'apprentissage, afin d'obtenir une bonne capacité de prédiction et de généralisation du réseau.

Durant les étapes de caractérisation, nous tenterons d'appliquer les nouvelles méthodes de quantification de structure, et cela par la détermination de la dimension fractale et de la lacunarité, qui n'ont pas encore été exploitées dans le domaine des vecteurs polymériques à usage pharmaceutique. Les données de microporosité seront utilisées et notre but sera de calculer la dimension fractale de surface D_N afin de comparer entre différentes formulations de nanoparticules. Enfin, à l'aide de la dimension fractale de pore D_{DTP} et de la lacunarité, nous essayerons de décrire les changements de structure ayant lieu durant la dégradation.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

*La connaissance s'acquiert par
l'expérience, tout le reste n'est que de
l'information.*

Albert Einstein

VI. MATÉRIEL

- Polymères biodégradables :

Le PLGA (M_w 48000, RG 504) est en provenance de Boehringer Ingleheim (lot 87H7840). Le PLA (M_w 50000-60000) et ses copolymères : le tribloc PLA-PEG-PLA (M_w 4000), et le multibloc (PLA-PEG-PLA)_n (M_w 16000) sont synthétisés dans le laboratoire (Quesnel and Hildgen, 2002).

- Acide désoxyribonucléique (ADN) hautement polymérisé de thymus de veau, sous la forme d'un sel de sodium, est fourni par Sigma (lot 87H7840)
- Alcool polyvinylique (PVA) hydrolysé à 87-89%, M_w 13000-23000 (lot 19607 DU) et M_w 9000-10000 (lot 12805 DI) provient de chez Aldrich Chemical Company Inc.
- Tampon Tris-EDTA (filtré à 0,22 μ m) pour biologie moléculaire, pH 8 (0,1M Tris*HCl contenant 0,001M EDTA) est en provenance de Sigma (lot 70K8928)
- Sorbitol (lot 5238-1157) est fourni par les laboratoires Denis Giroux.
- Dichlorométhane (grade analytique) provient d'Anachemia.

VII. MÉTHODES

7.1. Préparation de nanoparticules

Les nanoparticules ont été préparées selon une méthode de double émulsion (eau/huile/eau) (Figure 10) : une quantité de polymère égale à 0.5 g, 0.75 g ou 1.0 g est dissoute dans 10 ml de dichlorométhane. Une phase aqueuse contenant 5 mg d'ADN dans 0.5 ml de tampon tris-EDTA (pH 8) est émulsifiée dans la solution organique en utilisant un mélangeur à turbine (*Polytron, Brinkmann Instruments, Toronto, Ontario, Canada*) pour former une émulsion primaire (eau/huile). Cette dernière est rapidement versée dans la phase aqueuse externe qui consiste en 50 ml d'une solution de PVA à 0%, 0.1%, 0.5% ou 1.0% (p/v) contenue dans le récipient d'un homogénéiseur à haute pression (*Emulsiflex C30, Avestin, Ottawa, Ontario, Canada*). L'homogénéisation est réalisée à 5000, 10000, 15000 ou 20000 psi. La double émulsion est récupérée en rinçant avec 50 ml additionnels de phase externe. Le solvant organique est évaporé par agitation sous aspiration d'air pendant 3 heures. La suspension obtenue est centrifugée à 17000 rpm pendant 30 min à 4°C (centrifugeuse Sorvall SL-50T super T21, DuPont Company, Sorval Products, Wilmington, USA). Les nanoparticules isolées sont lavées cinq fois à l'eau distillée pour éliminer les traces du PVA. Puis elles sont dispersées dans 10 ml d'eau

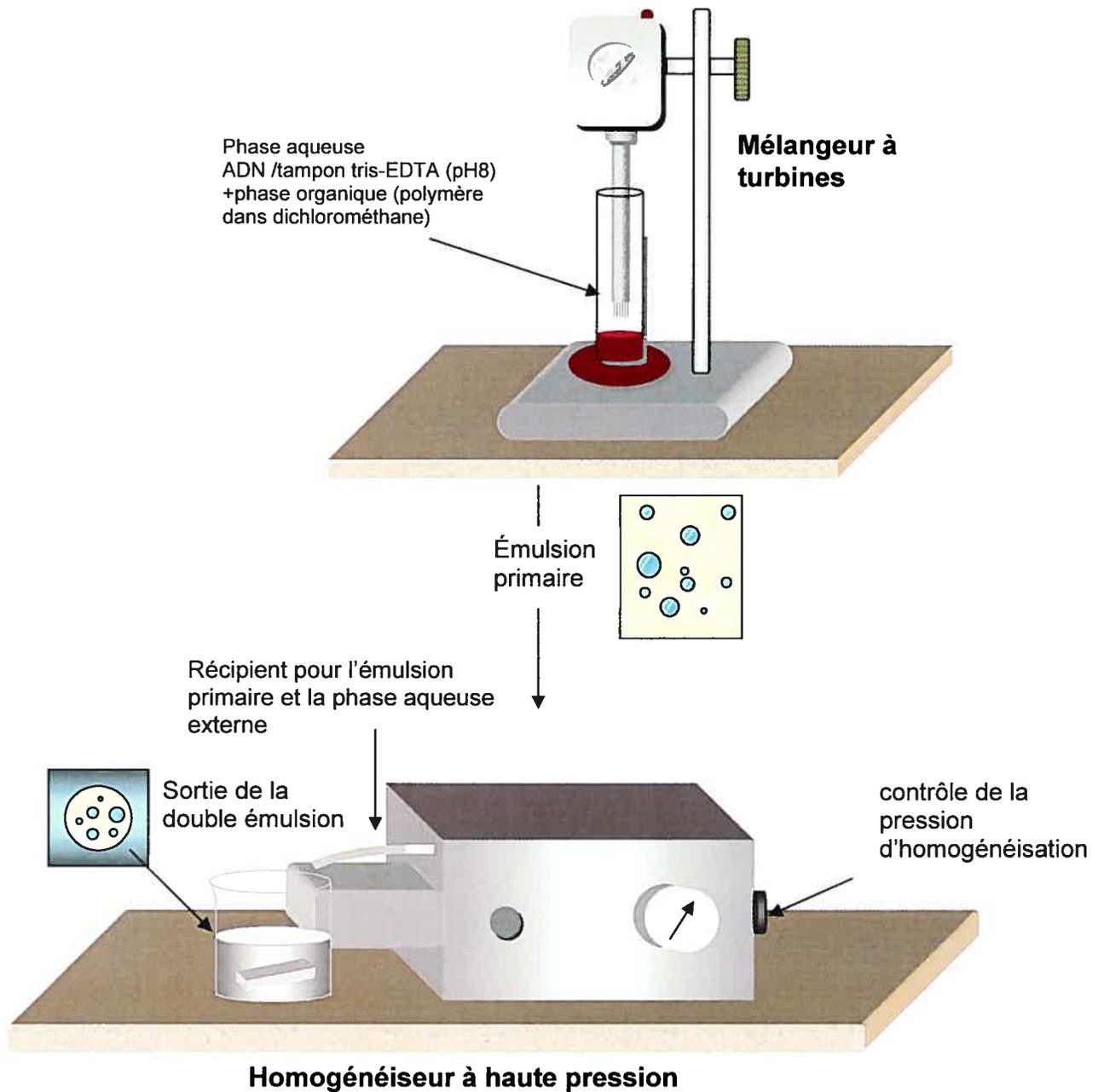


Figure 10. Préparation des nanoparticules par la méthode de la double émulsion

distillée, congelées dans de l'azote liquide et enfin lyophilisées pendant 72 heures (*lyophilisateur Labconco, lyph-lock 4.5*). Afin de tester l'effet du cryoprotecteur, les nanoparticules sont dispersées dans une solution de sorbitol à 0.5%, 1.0% ou 5.0% à la place de l'eau distillée pure. Après la lyophilisation, les nanoparticules sont gardées à -4°C.

7.2. Caractérisation de la morphologie de surface

7.2.1. Microscopie électronique à balayage (SEM)

Les nanoparticules lyophilisées à partir de différents lots ont été examinées sans enrobage au microscope électronique à balayage (JEOL JSM 6700F, Japon), avec un voltage d'accélération de 1.0 KV.

7.2.2. Microscopie à force atomique (AFM)

Les nanoparticules lyophilisées à partir de différents lots ont été fixées sur un papier double-adhésif collé à une plaque de mica, et observées à l'aide d'un Nanoscope IIIa Dimension 3100 (Digital instruments, Santa Barbara, CA) en appliquant le mode oscillant sur une pointe de silicone (TESP7) à une fréquence de résonance de 200-400 kHz. Une méthode alternative consistait à suspendre les nanoparticules dans quelques gouttes d'eau distillée sur une plaque de mica, puis observer au microscope AFM après avoir évaporé l'eau sous pression réduite. Dans le but d'examiner la structure interne, les nanoparticules ont été mélangées avec de la paraffine fondue, et des coupes ont été faites dans la masse solidifiée en

utilisant un microtome. Ces coupes ont été également observées au microscope à force atomique.

7.3. Mesure de la taille

La taille moyenne des globules de la double émulsion à plusieurs intervalles de temps durant l'évaporation, ainsi que celle des nanoparticules avant et après la lyophilisation, a été déterminée en spectroscopie par corrélation de photons (Nanosizer N4 Plus, Coulter Electronics, Hialeah, FL). Les nanoparticules lyophilisées ont été dispersées par des ultrasons pendant une minute avant de mesurer leur taille, afin de briser les agrégats. Les échantillons ont été ajustés pour donner une vitesse de comptage comprise entre $5 \cdot 10^4$ et $1 \cdot 10^6$ particules/seconde. Le diamètre moyen a été calculé selon un mode processeur de distribution de taille en utilisant les conditions suivantes : Indice de réfraction 1.33, température 20°C, viscosité 0.93 cp, angle de mesure 90° et durée de mesure 60 secondes.

7.4. Détermination de la surface spécifique et de la porosité

La surface totale et la porosité des nanoparticules ont été déterminées par adsorption d'azote à l'aide d'un porosimètre SA3100 (Coulter Electronics, Miami, FL). Une certaine quantité de nanoparticules (50-100mg) est placée dans un tube et dégazée à 25°C pendant 60 minutes avant d'être

analysée. Ensuite le tube contenant les nanoparticules et un tube de référence sont plongés dans un bain d'azote à -196°C . L'isotherme d'adsorption est obtenue à partir du volume de l'azote (cm^3/g) adsorbé sur la surface des nanoparticules en fonction de la pression relative. La surface spécifique est calculée selon la méthode de Brunauer-Emmett-Teller (BET) (Brunauer, Emmett *et al.*, 1938) en utilisant cinq points d'adsorption dans la région de pression relative P/P_0 0,05-0,2. Le volume total de pores est calculé à une valeur de pression relative égale à 0,9814 durant l'adsorption. Pour l'étude des micropores, un porosimètre Autosorb-1 est utilisé (Quantachrome Instruments, Boynton Beach, FL), la distribution de taille des micropores est calculée selon la méthode HK dans l'intervalle de 3-20Å, et leur surface est calculée selon la méthode DR à l'aide du programme AS1Win[®] version 1.27.

7.5. Étude de la dégradation

La dégradation est réalisée dans un tampon tris-EDTA pH 7.4. Une quantité de nanoparticules est suspendue dans 10 ml de tampon en utilisant un tube pour chaque intervalle de temps. Les tubes sont fixés à une plaque tournante placée dans un incubateur maintenu à 37°C (Figure 11). Les tubes sont centrifugés à des intervalles prédéterminés, les résidus sont lyophilisés et analysés pour la surface spécifique et la porosité.

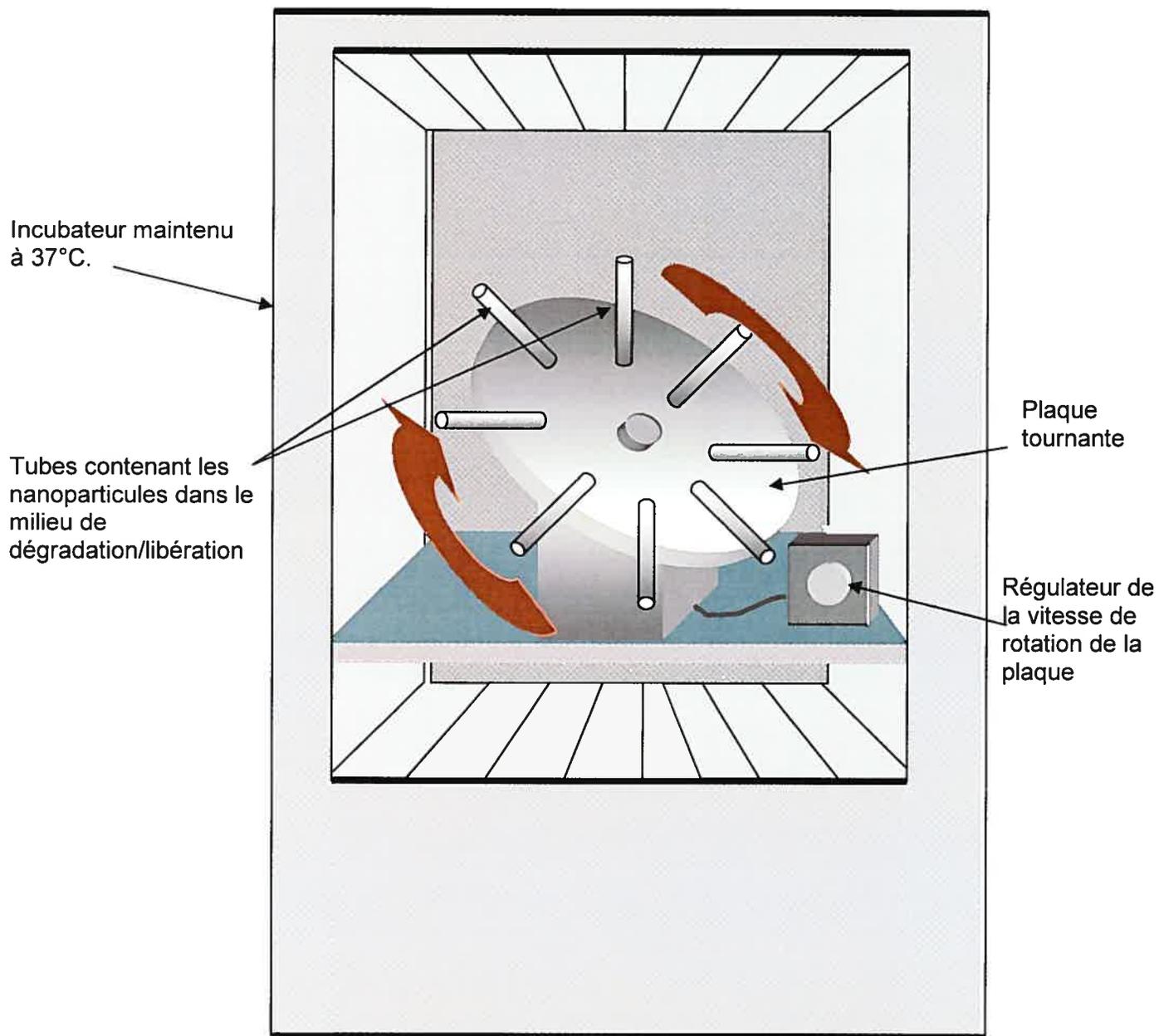


Figure 11. Montage utilisé pour l'étude de la dégradation des nanoparticules, ainsi que la libération de l'ADN

7.6. Libération in vitro de l'ADN

La libération de l'ADN est réalisée dans un tampon tris-EDTA pH 7.4. Une quantité pré-pesée de nanoparticules (20-30 mg) est ajoutée à 10 ml de tampon en utilisant le même montage que celui de l'étude de dégradation. À plusieurs intervalles de temps, des prélèvements de 1ml chacun sont aspirés et placés dans des tubes *Eppendorf* de 1.5 ml puis centrifugés à une vitesse de 10000 rpm pendant 15 minutes. Le dosage de l'ADN dans le surnageant a été effectué par spectrophotométrie UV à une longueur d'onde λ_{\max} de 260 nm (Hitachi, U-2001 spectrophotomètre UV/Vis, Japon). Un ml de tampon frais est ajouté à chaque tube pour compenser le prélèvement et maintenir des conditions de libération optimales.

7.7. Modélisation du procédé de préparation des nanoparticules

Un plan expérimental a été adopté afin de tester l'influence de trois variables (entrées), soit la pression d'homogénéisation, la concentration du polymère, et la concentration du tensioactif, sur deux caractéristiques physiques (sorties), soit la taille des nanoparticules et la surface des micropores. Pour ce faire, 36 lots de nanoparticules ont été préparés. Les données ont été modélisées à l'aide de deux logiciels commerciaux: Le premier est le Neuroshell[®] Predictor (version 2.2, Ward Systems Group,

Inc. Frederick, MD), qui combine les réseaux de neurones et un algorithme génétique. Le deuxième logiciel est le NeuroSolutions® (Version d'évaluation 4.3, NeuroDimension Inc., Gainesville, FL).

7.7.1. Neuroshell® Predictor

Ce logiciel comprend un réseau pré-construit du type rétro-propagation. La figure 12 illustre son mode de fonctionnement:

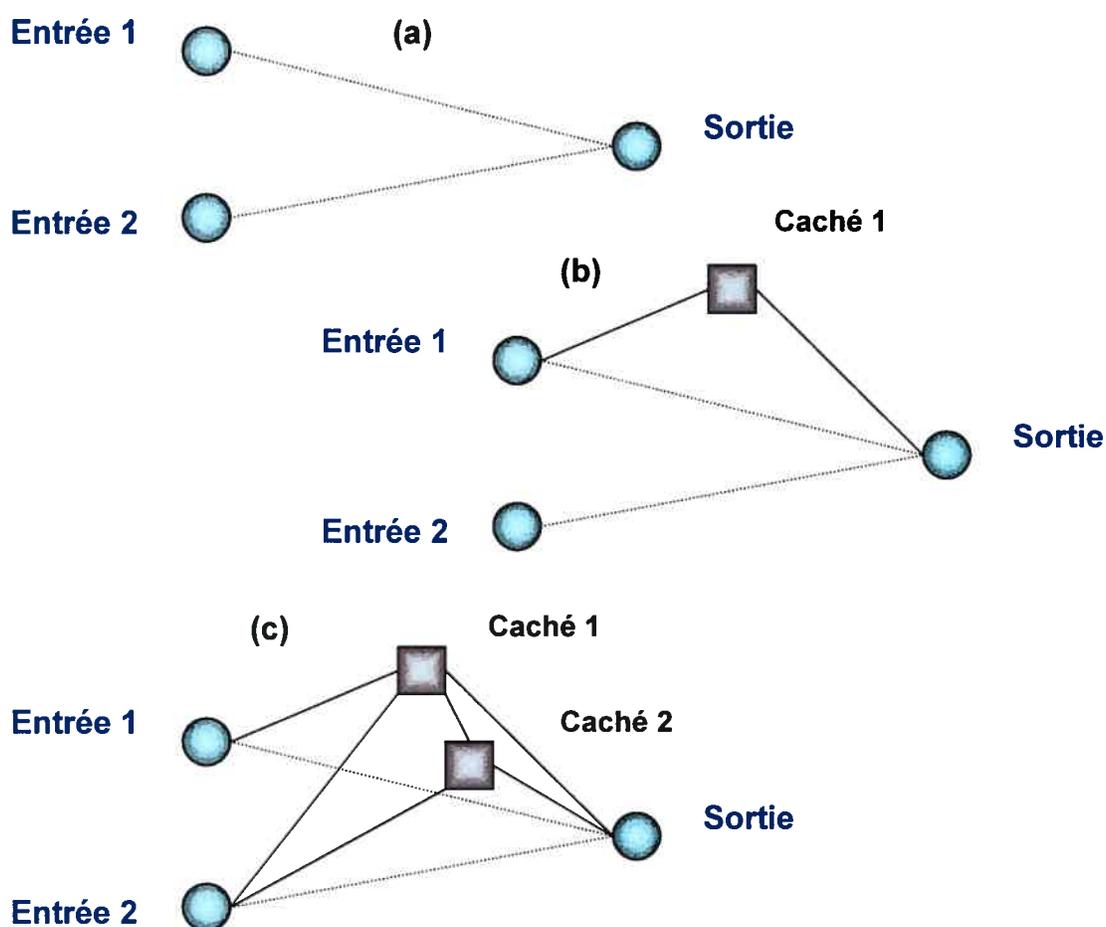


Figure 12. Mode de fonctionnement du RNA construit par NeuroShell® Predictor

Celui-ci débute avec des connexions directes pondérées entre les entrées et les sorties, sans unités cachées interconnectées. Les poids sont attribués d'une façon aléatoire, et la performance du réseau est mesurée. Ensuite, un neurone caché est ajouté, recevant une connexion pondérée d'une unité d'entrée, pour la transférer au neurone de sortie. Encore une fois l'erreur est calculée, et utilisée pour l'ajout d'un autre neurone caché, etc. L'apprentissage continue jusqu'à ce que l'erreur diminue et atteigne un certain seuil, ou jusqu'à ce que le nombre de neurones cachés atteigne un maximum prédéterminé.

7.7.2. NeuroSolutions®

L'utilisation de NeuroSolutions® comprend deux interfaces : *NeuralBuilder®* pour la construction de réseaux et *Neurosolutions pour Excel®* pour la représentation graphique de données. Ce logiciel offre une flexibilité dans la construction du réseau en permettant de choisir, entre autres, le modèle, l'algorithme d'apprentissage, le nombre de couches et le nombre de neurones cachés, ainsi que la fonction de transfert. Les étapes d'utilisation de chaque interface sont résumées par les figures 13 et 14 pour le *Neurosolutions pour Excel®* et le *NeuralBuilder®* respectivement.

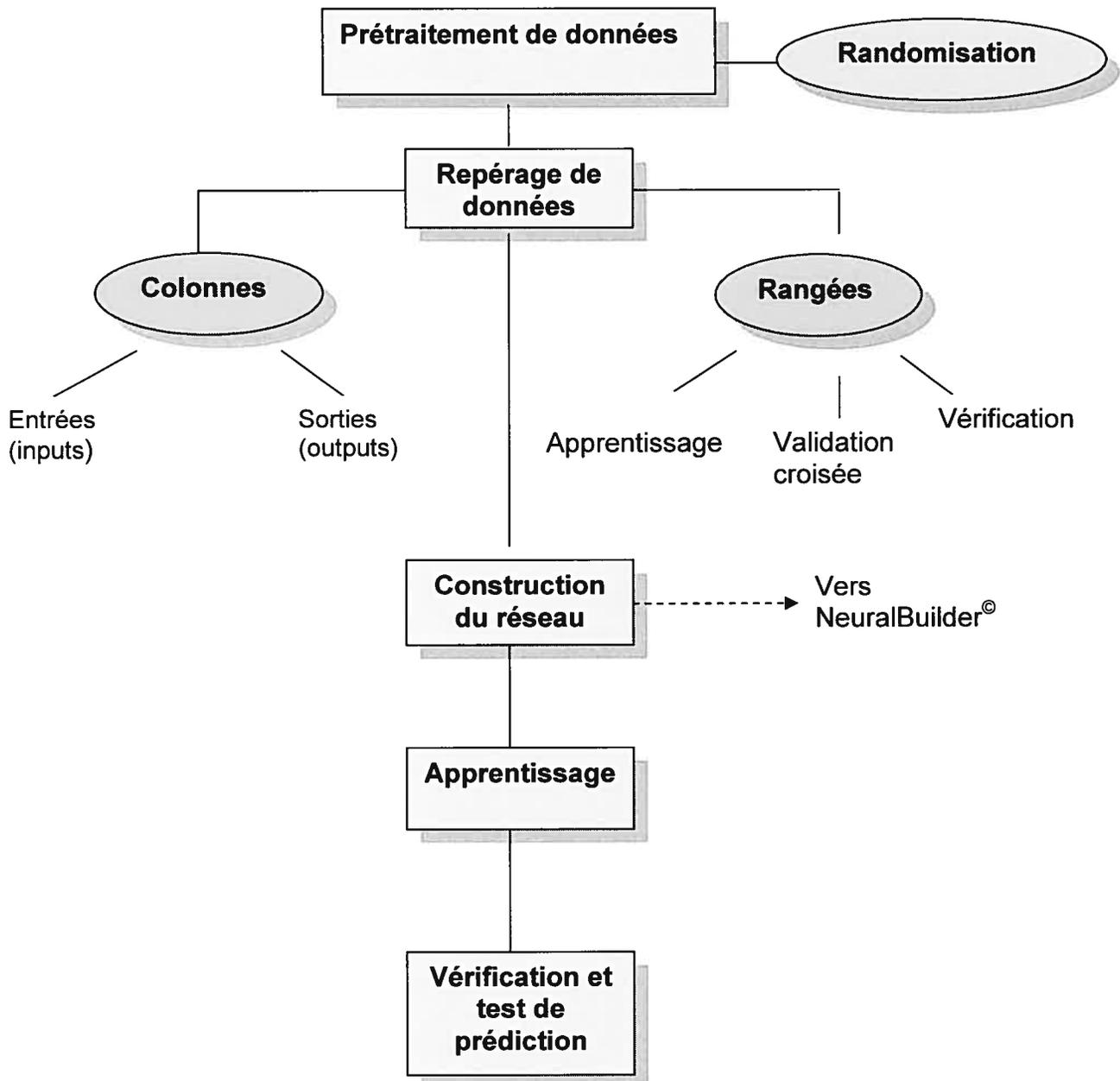


Figure 13. Étapes d'utilisation de Neurosolutions dans Excel®

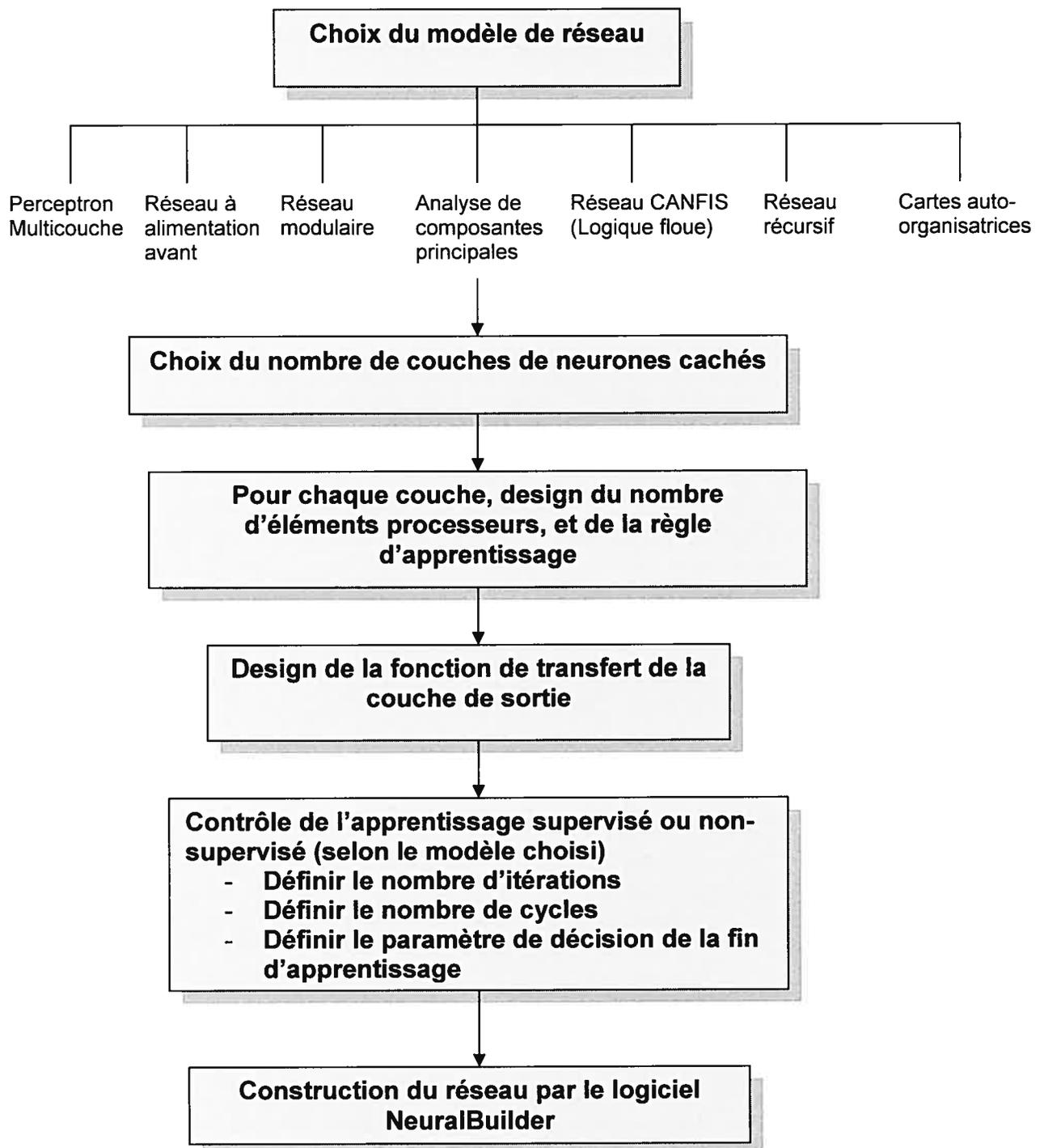


Figure 14. Étapes de construction de réseau de neurones en utilisant NeuralBuilder[®] dans NeuroSolutions[®]

7.7.3. Régression polynomiale

Les données ont été également analysées en utilisant SigmaStat® pour Windows, version 3.0.1. Les résultats obtenus par la régression polynomiale classique ont été comparés aux données prédites par les réseaux de neurones.

7.8. Étude de la structure interne des nanoparticules

7.8.1. Mesure de la dimension fractale

La dimension fractale a été calculée selon la méthode thermodynamique (équation 18) et celle de la distribution de taille des pores (équation 20) à partir des isothermes d'adsorption d'azote.

7.8.2. Mesure de la lacunarité

La lacunarité a été déterminée à partir des données d'adsorption de gaz selon la méthode suivante (Armatas, Kolonia *et al.*, 2002), qui est dérivée de l'algorithme de la boîte glissante :

On considère une fonction de densité de différentes tailles de pores, qui décrit un nombre infini de groupes de pores ayant une certaine taille moyenne de pore. Alors, Le nombre total de groupes de pores est calculé selon l'équation :

$$N(r_0) = \frac{r_{\max} - r_{\min}}{r_0} \quad \text{Équation 26}$$

où r_{\max} et r_{\min} représentent les tailles maximale et minimale de pores, selon les données de l'adsorption de gaz, et r_0 représente l'étalon de mesure, qui est égal à 0.5 nm, une valeur qui correspond approximativement à la taille d'une molécule d'azote.

Le nombre de pas de taille r_0 qui contiennent s pores est défini comme $n(s, r_0)$, et la séquence de probabilité est donnée par l'équation :

$$p(s, r_0) = \frac{n(s, r_0)}{N(r_0)} \quad \text{Équation 27}$$

La probabilité normalisée est alors :

$$p'(s, r_0) = \frac{p(s, r_0)}{\sum_{r_{\min}}^{r_{\max}} p(s, r_0)} \quad \text{Équation 28}$$

Enfin, les moments de premier et deuxième ordre de la distribution sont définis selon les équations :

$$M_1(r_0) = \sum_{s=1}^r s p(s, r_0) \quad \text{Équation 29}$$

$$M_2(r_0) = \sum_{s=1}^r s^2 p(s, r_0) \quad \text{Équation 30}$$

La lacunarité est alors calculée en terme de moments selon l'équation

$$L(r_0) = \frac{M_2(r_0)}{[M_1(r_0)]^2} \quad \text{Équation 31}$$

RÉSULTATS ET DISCUSSION

*Rendre géométrique la représentation,
c'est-à-dire dessiner les phénomènes et
ordonner en série les événements
décisifs d'une expérience, voilà la tâche
où s'affirme l'esprit scientifique*

Gaston Bachelard

VIII. INFLUENCE DES DIFFERENTS PARAMETRES DE FORMULATION SUR LES PROPRIETES DES NANOPARTICULES POLYMERIQUES

8.1. Microscopie électronique à balayage et microscopie à force atomique

La figure 15 montre des images de nanoparticules de PLGA sans cryoprotection (Fig15.a), ainsi que des nanoparticules de PLGA cryoprotégées avec du sorbitol 0.5% p/v (Fig 15.b, 15.c) et 5% p/v (Fig 15.d). Ces lots ont été préparés à 0% p/v de PVA, 10% p/v de PLGA, et à une pression d'homogénéisation de 20000 psi. Tel que les microphotographies le montrent, les nanoparticules obtenues sont sphériques, et d'une taille comprise entre 100 et 700 nm. La figure 15.a montre deux populations des nanoparticules de PLGA, une population proche de 300 nm, et une autre proche de 700 nm, tandis que la figure 15.b montre une taille plus uniforme, avec une moyenne d'environ 200 nm. La figure 15.c illustre une population ayant une taille moyenne de 250 nm, en plus de quelques nanoparticules plus larges.

Les images obtenues par microscopie à force atomique confirment la taille des nanoparticules. Les figures 16.a et 16.b représentent respectivement une image de topographie et une image de phase pour des nanoparticules de PLGA cryoprotégées avec du sorbitol 0.5% p/v.

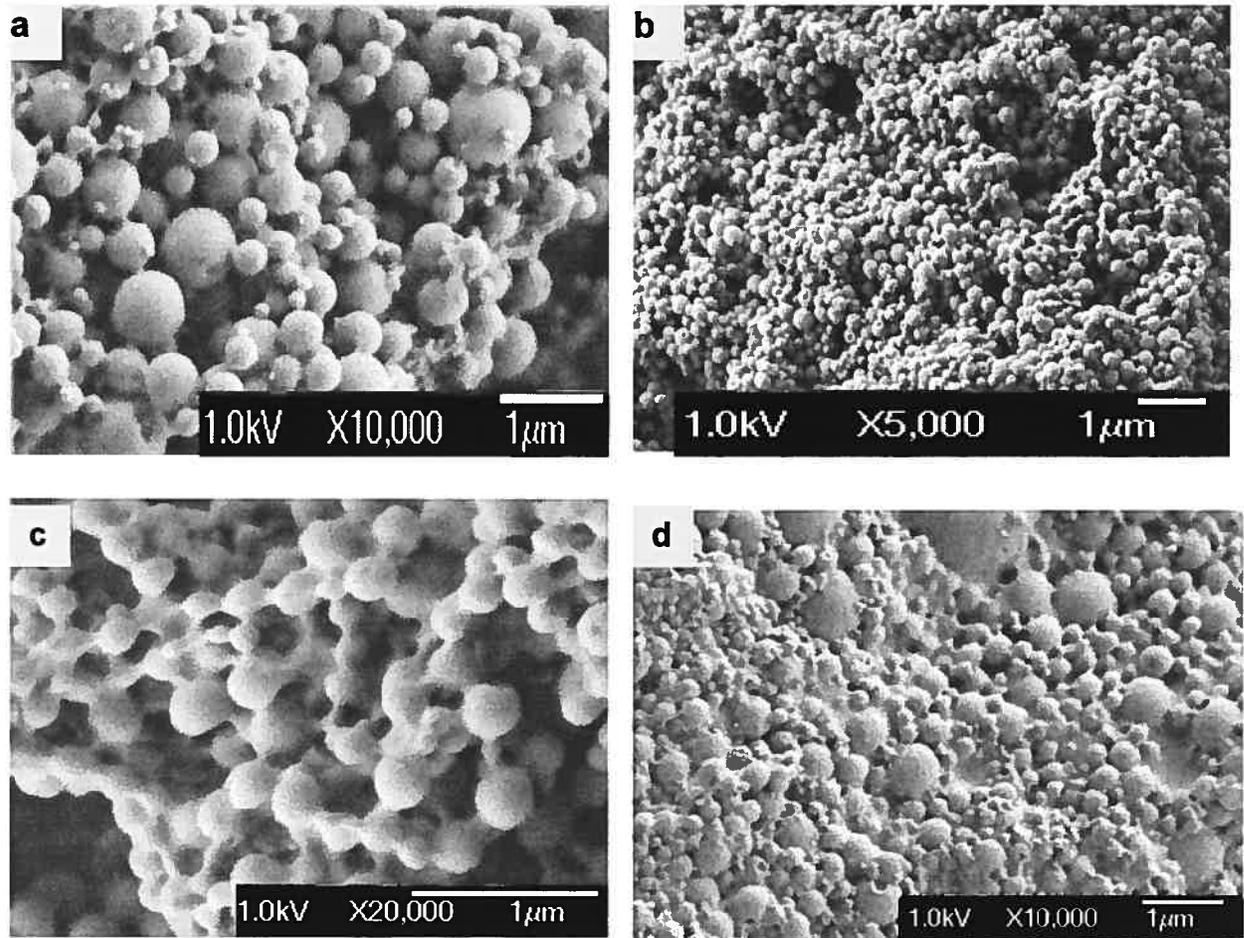


Figure 15. Microphotographies de nanoparticules de PLGA (a), PLGA, cryoprotégées avec du sorbitol 0.5 % p/v (b) et (c), et PLGA, cryoprotégées avec du sorbitol 5% p/v (d).

L'image de phase montre clairement le sorbitol enrobant les nanoparticules. Quant aux figures 16.c et 16.d, elles montrent des images

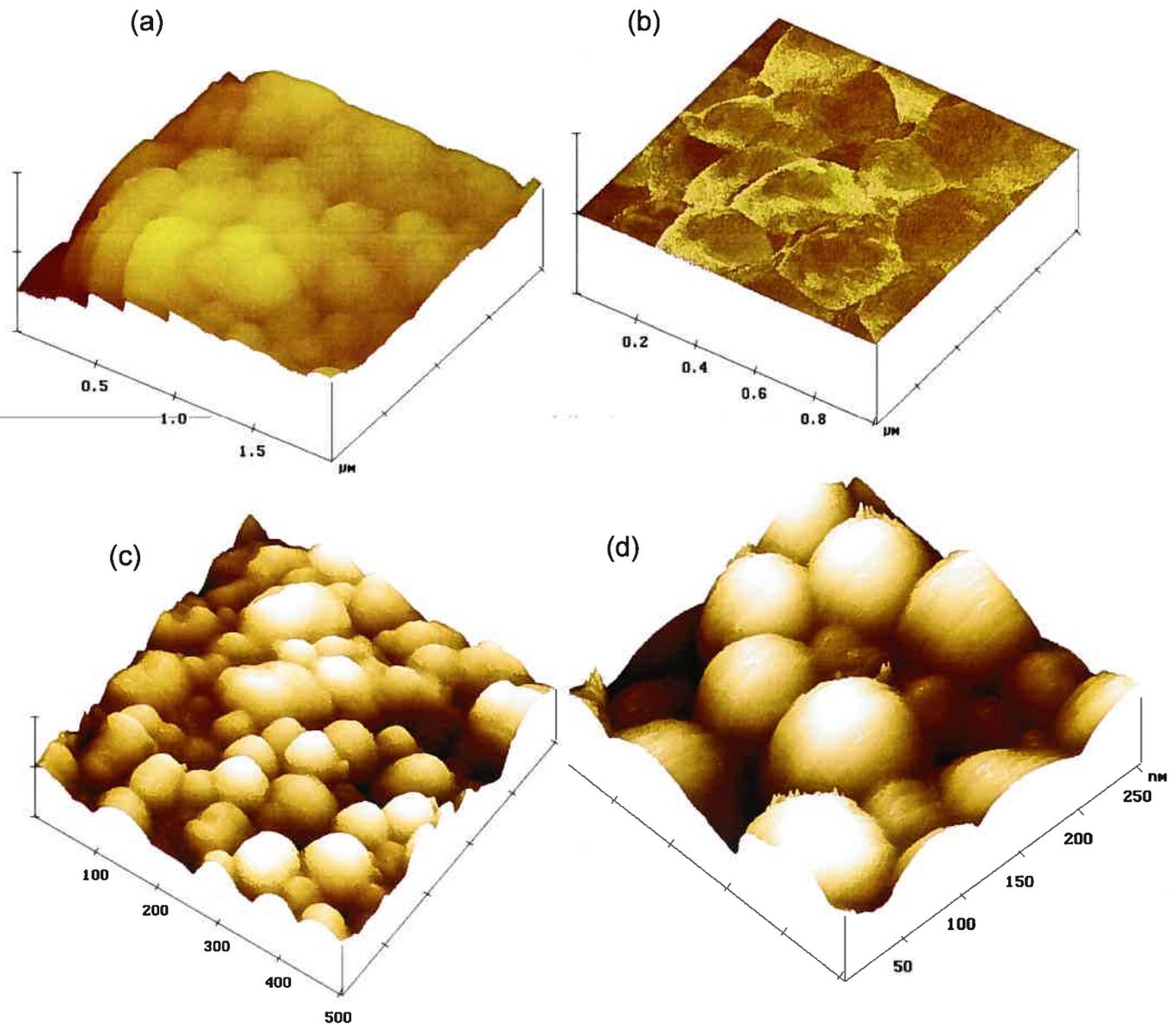


Figure 16. Images AFM de nanoparticules de PLGA cryoprotégées avec du sorbitol 0.5% p/v (a) topographie et (b) phase, et images AFM (topographie) de nanoparticules de PLA (c) et (d).

de nanoparticules de PLA préparées à 5% p/v de polymère, une pression d'homogénéisation de 5000 psi et 0% p/v PVA. La figure 17 reprend des

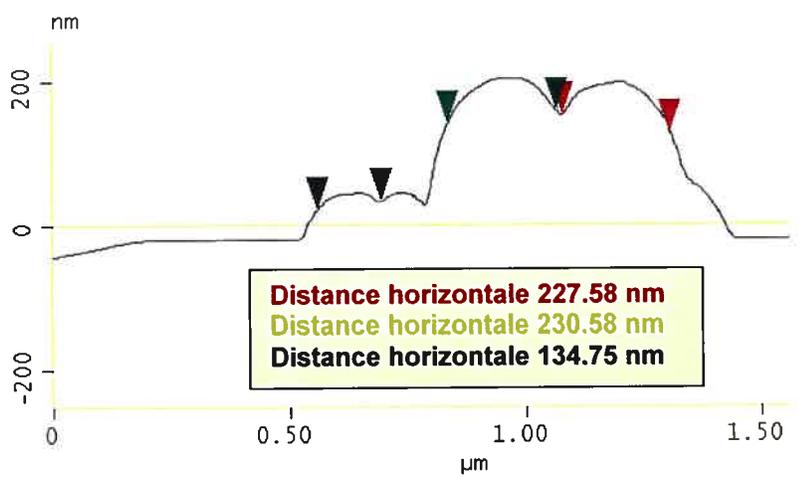
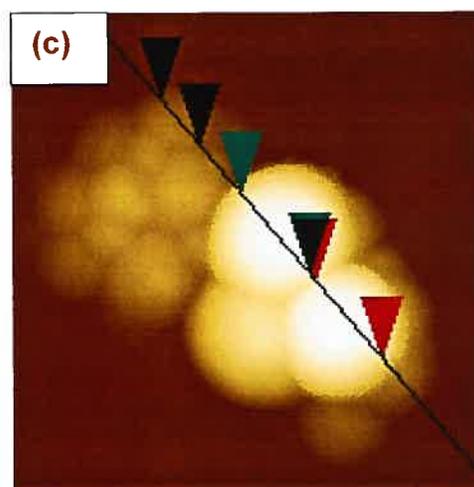
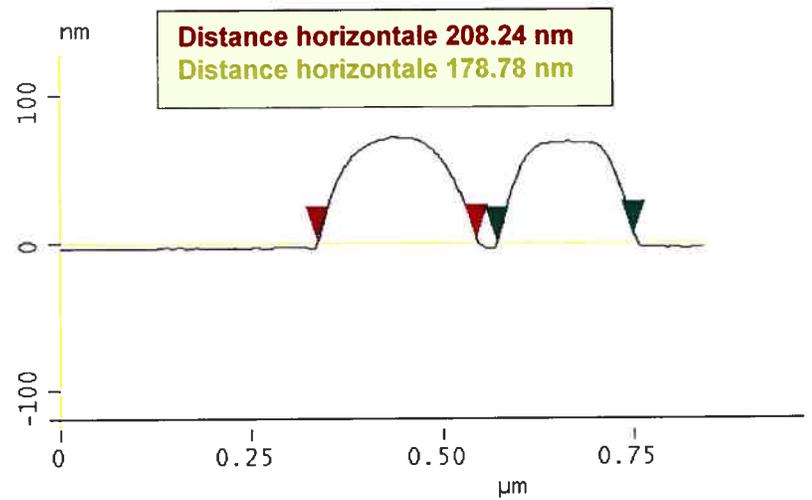
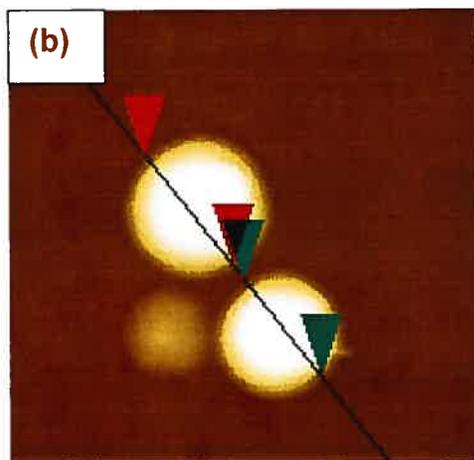
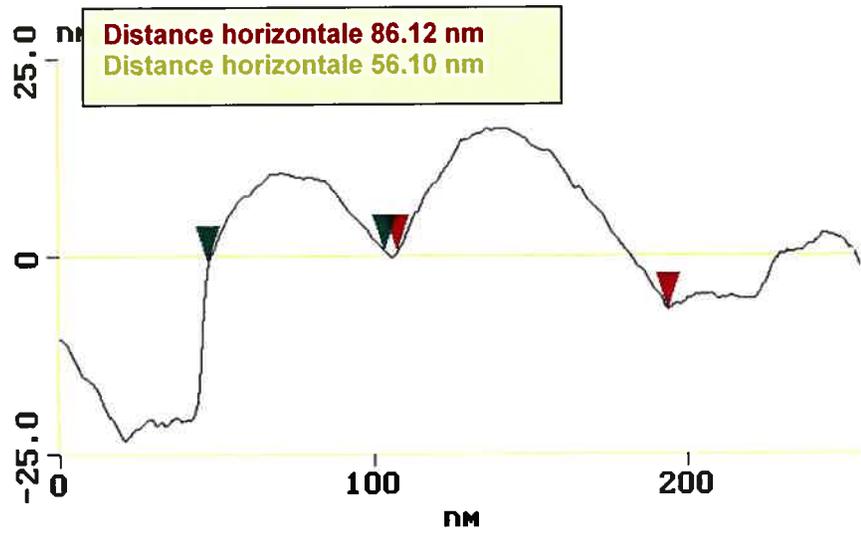
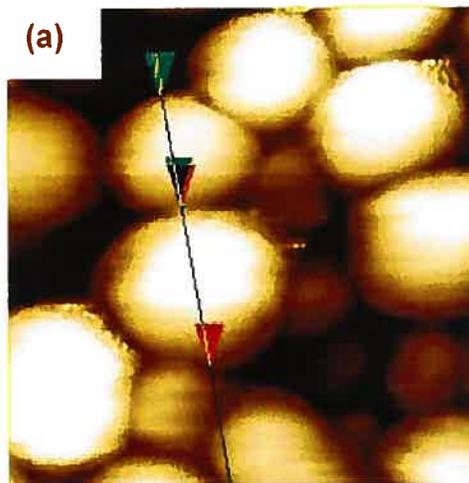


Figure 17. Images AFM montrant la taille de quelques nanoparticules de PLA

images à l'AFM de nanoparticules de PLA, avec des mesures de taille effectuées au microscope. D'après les images, le même lot de PLA contient des nanoparticules qui mesurent près de 50 nm, aussi bien que des nanoparticules de 230 nm. Cette polydispersion assez large peut être due à l'absence de PVA puisque la stabilité de l'émulsion est relativement réduite. Les coupes des nanoparticules de PLA sont illustrées dans la figure 18 (a) et (b).

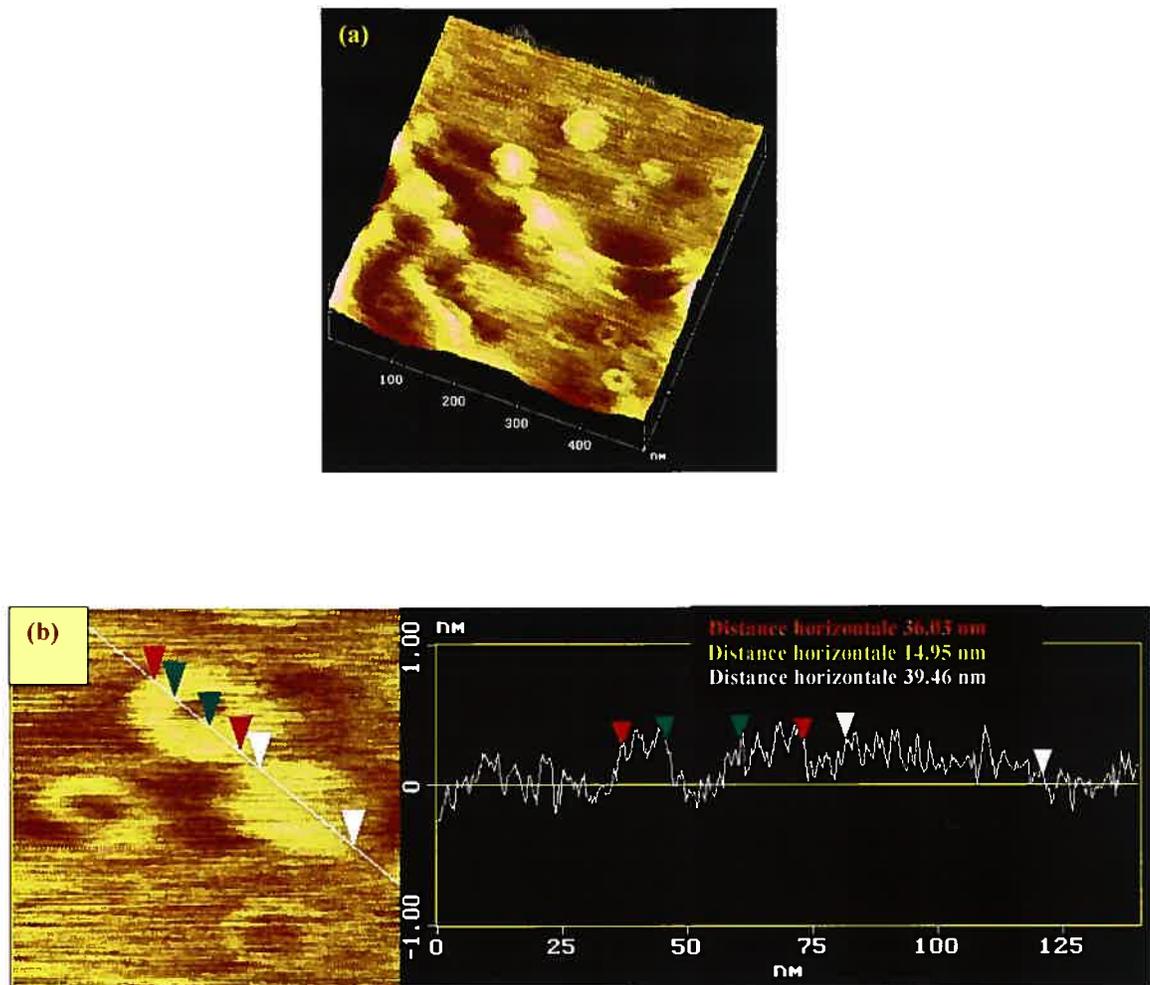


Figure 18. Images AFM de coupes de nanoparticules de PLA, montrant des nanosphères ainsi que des nanocapsules.

Ces images révèlent la présence de nanosphères, aussi bien que des nanocapsules ayant une cavité centrale assez large. La formation de nanocapsules en même temps que les nanosphères pourrait être attribuée au mécanisme suivant : durant l'extraction du solvant organique, une partie du PLA migre avec le solvant vers la phase aqueuse, mais étant insoluble dans l'eau, le polymère précipite à l'interface, produisant la forme de nanocapsules. Une autre explication pourrait se baser sur une coalescence éventuelle des globules aqueux internes, puisque l'émulsion primaire est préparée en l'absence d'un tensioactif.

8.2. Taille des nanoparticules

Nous avons observé une diminution de taille des globules de la double émulsion durant l'évaporation du solvant organique, et la formation de nanoparticules d'un lot préparé à partir de PLA (Figure 19).

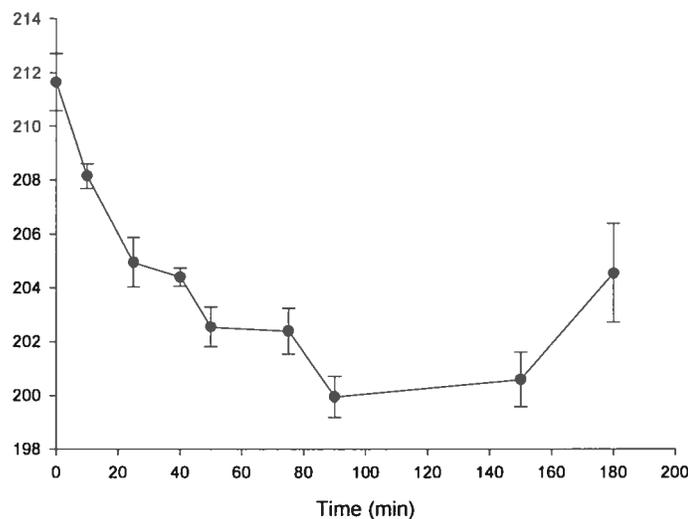


Figure 19. Diminution de la taille des globules de la double émulsion durant l'évaporation du dichlorométhane

D'après la courbe obtenue, la taille des globules a diminué jusqu'à 90 minutes, durée après laquelle aucune diminution n'a été notée. Ceci est interprété comme suit : Durant l'évaporation du solvant, les chaînes polymériques s'enchevêtrent en raison de la viscosité qui augmente. Cela est accompagné par une réduction du volume occupé par chacune de ces chaînes, et par conséquent une diminution globale de la taille des nanoparticules en développement. Cette interprétation est basée sur la théorie du '*blob*' proposée dans les années soixante dix. Selon ce modèle, les chaînes polymériques enchevêtrées peuvent être considérées comme étant formées de *blobs*.

Un *blob* peut être défini comme étant une sphère virtuelle qui comprend une partie de chaîne de polymère. Dans ce cas, la taille d'un segment d'une chaîne polymérique, encore appelée chaîne partielle, est représentée par la taille du *blob* superposé (Figure 20). Cette taille diminue au fur et à mesure que les chaînes s'interpénètrent (Teraoka, 2002).

Selon la théorie, la taille du *blob* est affectée par la densité du monomère tout au long des chaînes tel que le montre l'équation :

$$\xi \cong b^{-5/4} \rho^{-3/4} \quad \text{Équation 32}$$

où ξ est la taille du *blob*, b est la taille du monomère, et ρ est la densité des monomères. L'exposant négatif sur ρ indique que les *blobs* deviennent de plus en plus petits avec une augmentation de la densité.

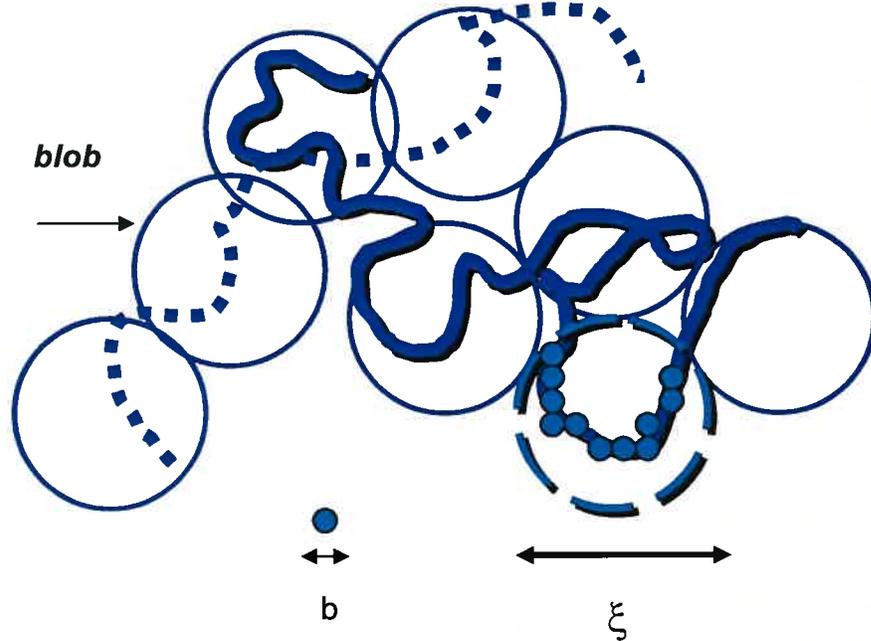


Figure 20. Le concept du 'blob' d'une taille ξ ayant un nombre de monomères de taille b (adapté de (Teraoka, 2002)).

La densité des monomères est définie comme étant le nombre de monomères par unité de volume, et elle est reliée à la concentration c tel que

$$\frac{\rho}{N} = \frac{cN_A}{M} \quad \text{Équation 33}$$

où N est le nombre de monomères, et M est la masse molaire du polymère.

L'augmentation de la densité a lieu durant l'évaporation du solvant, tel qu'illustré par la figure 21 :

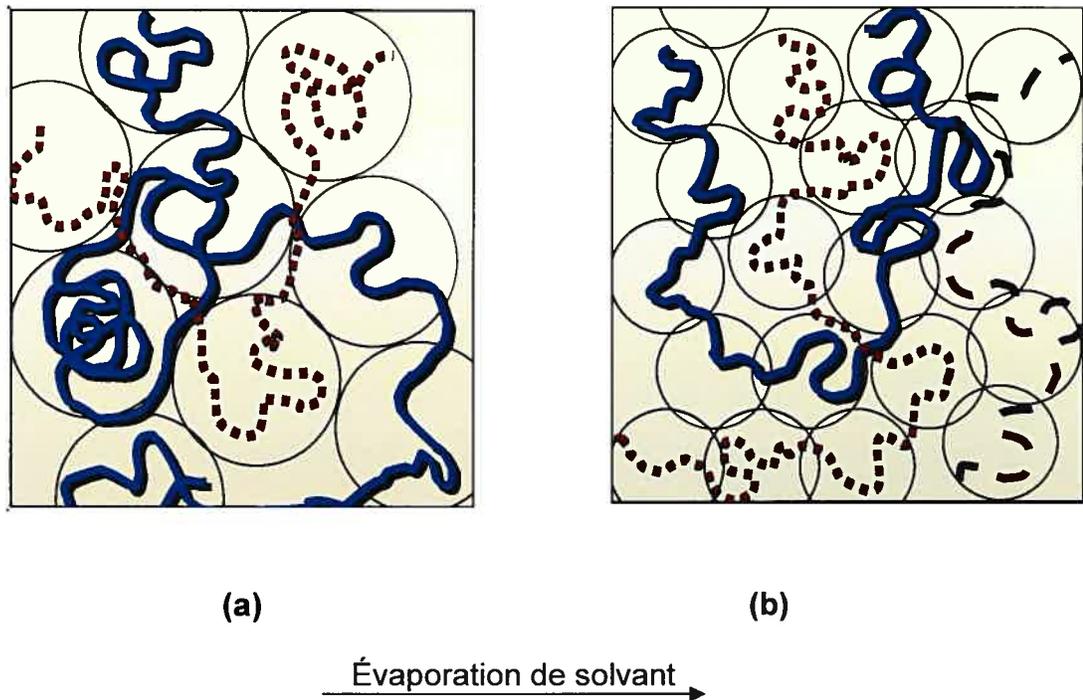


Figure 21. Effet de la concentration de la solution de polymère sur la taille du *blob*. Lorsque la concentration augmente, la taille du *blob* diminue de 'a' vers 'b', adapté de (Teraoka, 2002).

Lorsque le solvant est complètement évaporé, ce qui est le cas vers la fin des premières 90 minutes, le réseau de chaînes polymériques enchevêtrées est déjà formé. Par conséquent, la taille de la plupart des nanoparticules cesse de diminuer puisque le réseau polymérique formé demeure intact malgré la formation de pore à la surface externe des nanoparticules (Deng, Liu *et al.*, 2002). Cependant, après ces 90 minutes, la taille mesurée commence à augmenter. Ce comportement pourrait se justifier par le gonflement des nanoparticules formées, un phénomène qui

résulte d'une grande porosité de la matrice polymérique, ce qui est fort probable avec le PLA (effet éponge).

Les figures (22-26) montrent l'effet des différents paramètres sur la taille moyenne des nanoparticules de PLA. Ces paramètres sont la pression d'homogénéisation, la concentration du PVA dans la phase aqueuse externe, la concentration du sorbitol comme milieu de dispersion des nanoparticules avant la lyophilisation, et enfin, la concentration du polymère dans la phase organique. Chaque variable a été étudiée séparément sur les nanoparticules avant et après lyophilisation.

Pression d'homogénéisation

La figure 22 montre l'effet de la pression d'homogénéisation sur la taille des nanoparticules en l'absence d'un tensioactif, et sans l'utilisation d'un cryoprotecteur.

Une diminution significative de la taille, et plus particulièrement des nanoparticules lyophilisées, de 726.0 nm à 297.9 nm a été observée avec l'augmentation de la pression d'homogénéisation de 5000 à 15000 psi.

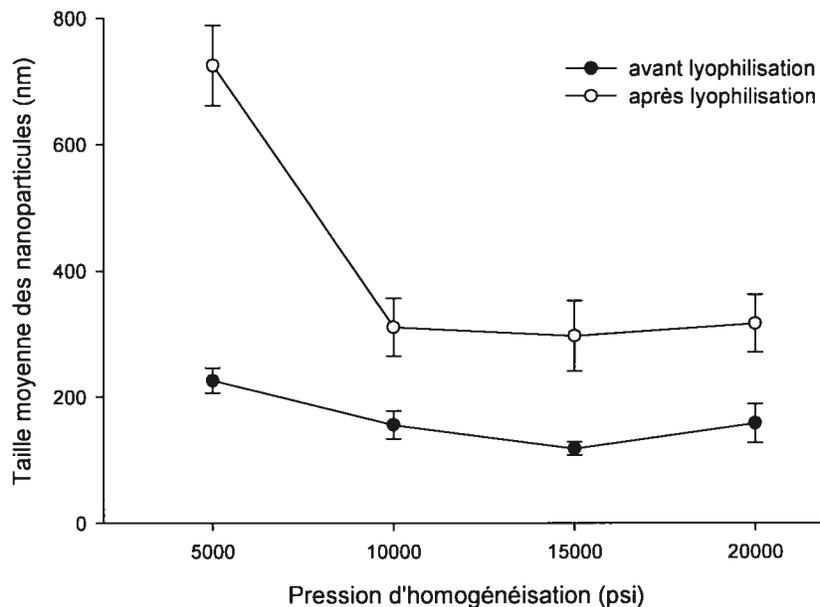


Figure 22. Effet de la pression d'homogénéisation sur la taille des nanoparticules de PLA préparées à 0% PVA

Ceci résulte de la création de plus petites gouttelettes durant la formation de la double émulsion liée à l'augmentation des forces de cisaillement. Toutefois, une augmentation de la pression entre 15000 et 20000 psi a entraîné un faible accroissement de la taille des nanoparticules, en raison de l'agrégation due à une énergie de surface élevée.

Concentration du tensioactif

En ce qui concerne le PVA, la figure 23 traduit une relation inversement proportionnelle entre la taille des nanoparticules de PLA (préparées à 5000 psi) et la concentration du PVA dans la phase aqueuse externe, et cela pour des concentrations allant de 0.1 % p/v jusqu'à 1% p/v qui est la concentration maximale utilisée dans cette étude. Allémann et al. ont

observé cet effet (Allémann, Gurny *et al.*, 1992 b) qui est attribué à la stabilisation de la surface créée durant l'émulsification (Zweers, Grijpma *et al.*, 2003).

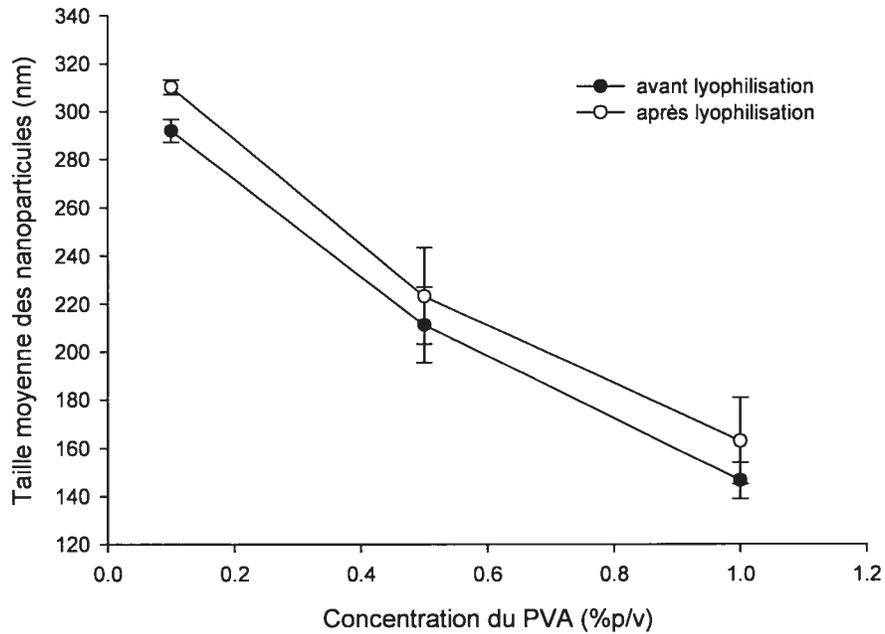


Figure 23. Effet de la concentration du PVA sur la taille des nanoparticules préparées à 5% PLA et 5000psi

Silvestri et Lostritto ont dérivé une équation de premier ordre décrivant la relation linéaire qui se développe durant l'émulsification (Silvestri and Lostritto, 1989) :

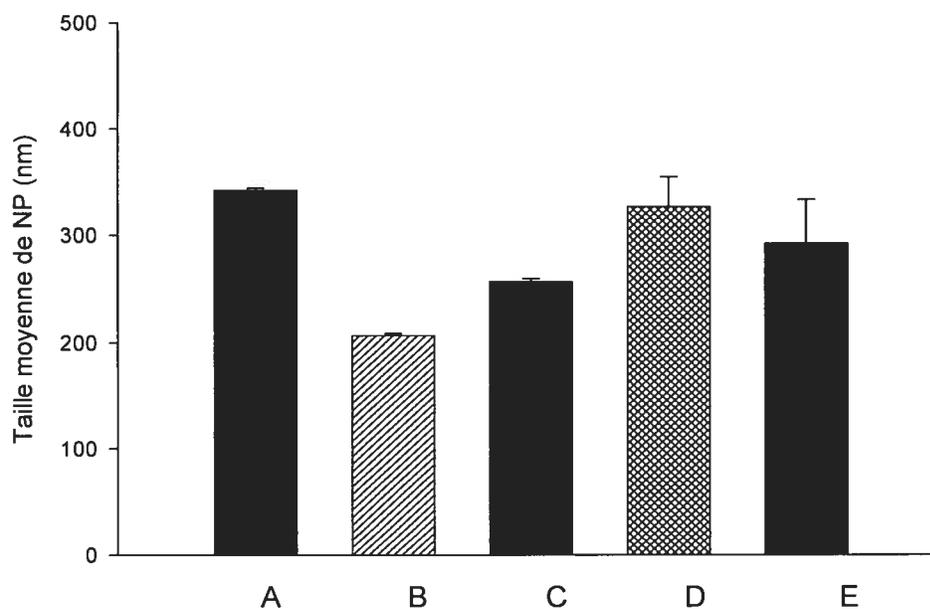
$$r = \frac{2\gamma_i^0}{\Delta P} - \frac{2BC_i}{\Delta P}$$

Équation 34

où \bar{r} est le rayon moyen des globules, γ_i^0 est la tension interfaciale des composantes liquides pures, ΔP est la pression finale à travers l'interface huile/eau, B est une constante qui dépend du tensioactif et qui représente une mesure de la force d'adhésion entre l'interface et le tensioactif, et enfin C_i représente la concentration du tensioactif. Par ailleurs, il n'y a pas eu de différence significative de taille avant et après lyophilisation, preuve d'une bonne capacité de dispersion du PVA.

L'utilisation de PVA de plus haut poids moléculaire, 13000-23000, a produit des nanoparticules relativement plus larges à cause de l'augmentation de la viscosité de la phase externe. La figure 24 montre cet effet par rapport à différents lots de nanoparticules de PLGA.

Pour la même raison, de plus fortes concentrations de PVA pourraient mener à une augmentation de taille. Murakami et al. ont constaté une augmentation de la taille des nanoparticules de PLGA lorsque la concentration du PVA s'est accrue de 2% w/v à 6% w/v (Murakami, Kawashima *et al.*, 1997). Il a été démontré qu'une couche de tensioactif est essentielle pour couvrir les nanoparticules, mais que l'excès présent dans la phase externe augmente sa viscosité, et par conséquent diminue l'efficacité de l'émulsification (Guinebretière, Briançon *et al.*, 2002).



- (A) PVA 1%w/v Mw 13,000-23,000, pression 20,000
- (B) PVA 1%w/v Mw 9,000-10,000, pression 20,000
- (C) PVA 0.5%w/v Mw 9,000-10,000, pression 20,00
- (D) PVA 1% w/v Mw 13,000-23,000, pression 5,000
- (E) PVA 1%w/v Mw 13,000-23,000, pression 10,000

Figure 24. Effet de la concentration et du poids moléculaire du PVA, ainsi que de la pression d'homogénéisation sur la taille moyenne de quelques lots choisis de nanoparticules de PLGA

À la suite de ces résultats, il est possible de dégager deux idées importantes : la première étant la possibilité de préparer des nanoparticules d'une taille appropriée sans l'utilisation d'un tensioactif, dont l'élimination pourrait être fastidieuse, la deuxième idée étant l'aggrégation évidente des nanoparticules en l'absence du PVA, tel qu'il est illustré par la figure 23.

Ce problème a été partiellement résolu par l'utilisation d'un cryoprotecteur, le sorbitol. La figure 25 montre une réduction nette de l'aggrégation de nanoparticules, avec une augmentation de la concentration du sorbitol dans la suspension finale jusqu'à 1%.

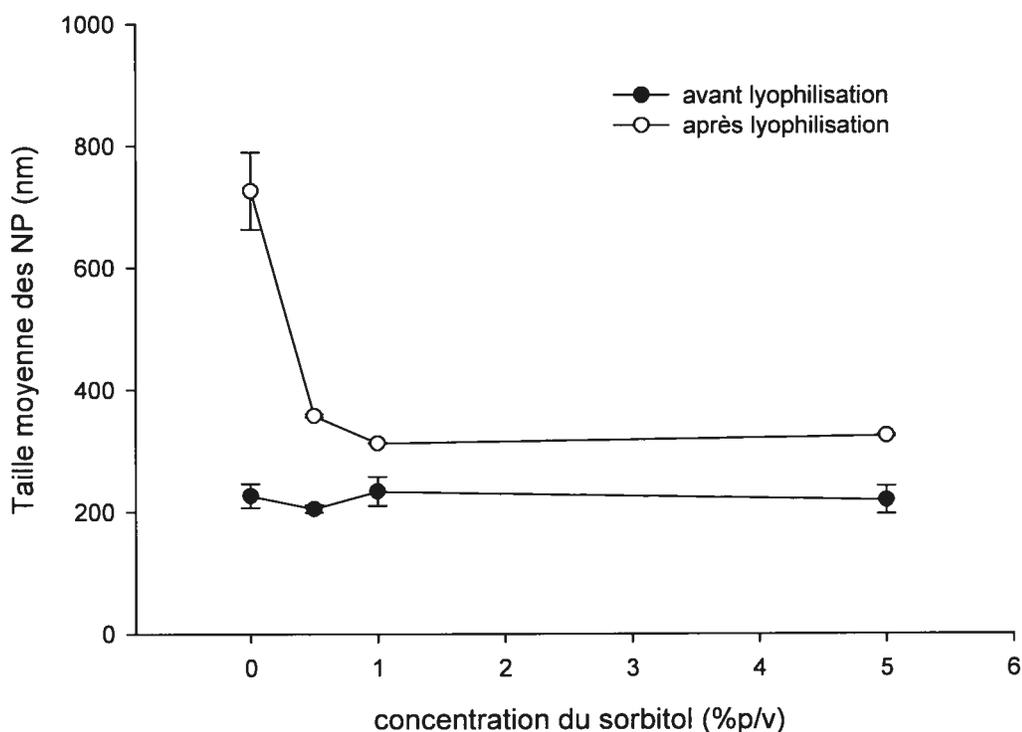


Figure 25. Effet du sorbitol sur la taille des nanoparticules préparées à 5% PLA et 5000 psi

Toutefois, lorsque la concentration du sorbitol augmente de 1% p/v à 5% p/v, aucun changement de taille n'est observé, dû probablement à la neutralisation de l'effet anti-agrégant du sorbitol par son caractère hygroscopique qui favorise l'agrégation des nanoparticules.

Le tableau 1 met en évidence l'effet des différentes concentrations de sorbitol sur la taille des nanoparticules.

Conc. du sorbitol (%p/v)	Taille initiale de NP (avant lyophilisation) (nm) moyenne± D. S.	Taille finale de NP (après lyophilisation) (nm) moyenne± D. S.	T_f/T_i	Surface spécifique BET (m ² /g) moyenne± D.S.	Volume total de pore (cm ³ /g) moyenne± D.S.
0	226.30 ± 19.93	726.00 ± 63.67	3.20	19.03±0.30	0.240 ±0.018
0.5	205.05 ± 6.15	357.60 ± 2.55	1.74	4.56±0.24	0.046 ±0.016
1	233.50 ± 23.76	312.35 ± 1.06	1.34	2.82±0.81	0.037 ±0.006
5	218.95 ± 22.84	324.65 ± 1.91	1.48	0.20±0.15	0.010 ±0.003

Tableau 1. Caractéristiques physiques de nanoparticules préparées à 5% PLA, 0% PVA et 5000 psi, cryoprotégées en utilisant différentes concentrations de sorbitol

Des valeurs de T_f/T_i , (taille de NP après lyophilisation) / (taille de NP avant lyophilisation), proches de 1 indiquent que la taille initiale a été maintenue, tandis que des valeurs approchant ou même dépassant 2 traduisent une agrégation significative des nanoparticules.

En l'absence de cryoprotection, une agrégation macroscopique et irréversible est observée. Le mécanisme d'action des cryoprotecteurs réside dans leur capacité d'agir en tant qu'une matrice d'espacement entre les nanoparticules, empêchant ainsi leur agrégation. L'addition d'agents cryoprotecteurs induit un arrangement irrégulier des molécules dans la masse vitrée interstitielle, produisant un plus grand espace interne, et par conséquent, menant à une densité réduite comparée à la masse plus ordonnée formée par les cristaux de glace. Cela fait que la masse congelée se comporte plus comme un fluide que comme un solide. De plus, les nanoparticules acquièrent une meilleure protection mécanique, ce qui empêche leur agrégation ou encore n'importe quel changement qui pourrait être lié à la pression développée par la croissance des cristaux de glace (Saez, Guzmán *et al.*, 2000).

Effet de la concentration du polymère

Lorsque la concentration du PLA s'accroît de 5% à 7.5% et puis 10%, la taille des nanoparticules augmente en conséquence, et ceci pour toutes les valeurs de pression d'homogénéisation utilisées (Figure 26). Plusieurs auteurs ont noté le même phénomène (Scholes, Coombes *et al.*, 1993; Quintanar-Guerrero, Fessi *et al.*, 1996; Kwon, Lee *et al.*, 2001; Chorny, Fishbein *et al.*, 2002; Mainardes and Evangelista, 2005), qui pourrait s'expliquer par la faible capacité de dispersion qui accompagne l'augmentation de la viscosité de la phase organique. Ceci crée une

résistance qui s'oppose aux forces de cisaillement opérant durant l'homogénéisation.

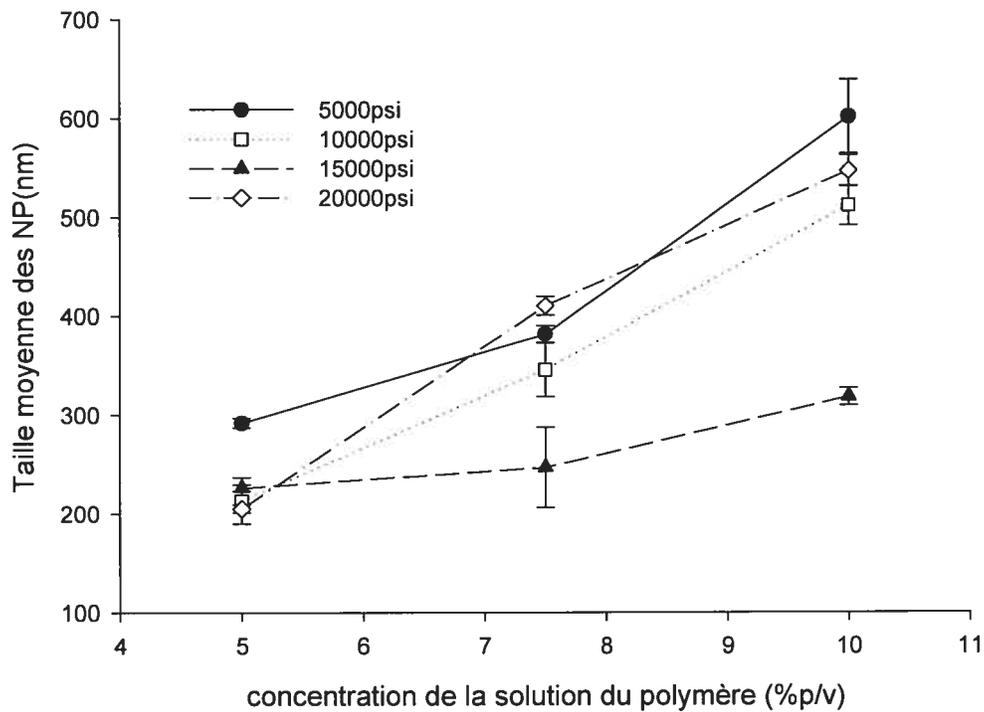


Figure 26. Effet de la concentration du polymère (PLA) sur la taille des nanoparticules préparées à des différentes pressions d'homogénéisation

De gros globules sont ainsi obtenus qui, lors de l'évaporation du solvant, produisent des nanoparticules de plus grande taille.

8.3. Porosité et surface spécifique

Le tableau 2 regroupe les données de surface spécifique et de porosité, de même que la taille des nanoparticules préparés à partir du PLGA, du PLA, du tribloc (PLA-PEG-PLA) et du multibloc (PLA-PEG-PLA)_n.

Polymère	Taille de NP (nm) moyenne ± D.S.	Surface spécifique BET m ² / g moyenne ± D.S.	Volume total de pores cm ³ / g moyenne ± D.S.
PLGA	178.15±16.90	9.73±0.79	0.070±0.020
PLA	177.91±3.54	20.42±0.94	0.170±0.005
PLA-PEG-PLA	176.70±1.55	0.49±0.09	0.008±0.004
(PLA-PEG-PLA) _n	171.95±13.22	1.81±0.94	0.023±0.002

Tableau 2. Caractéristiques physiques de nanoparticules préparées à partir de différents polymères biodégradables

Ces lots ont été préparés à 10% p/v de polymère, 1% p/v de PVA, et une pression d'homogénéisation de 10000 psi. Alors qu'il n'y a pas eu de différence significative de taille parmi les différents lots, la surface spécifique et la porosité ont démontré, par contre, une grande variation d'un polymère à l'autre. Les nanoparticules de PLA révèlent les plus grandes valeurs de surface spécifique et de porosité, 20.42 m²/g et 0.17 cm³/g respectivement. Par contre, celles du tribloc montre les plus petites valeurs : 0.49 m²/g et 0.008 cm³/g. Étant donné que la taille est quasiment la même entre les différents lots, cet écart majeur dans les valeurs de

surface spécifique pourrait alors confirmer des porosités différentes, qui à leur tour, seraient responsables des différents comportements de libération.

La présence de longues chaînes et une polydispersité assez faible pourraient être la raison de la grande porosité du PLA, puisque cela a pour effet de créer de larges pores entre les chaînes. Cette hypothèse est schématisée par la figure 27.

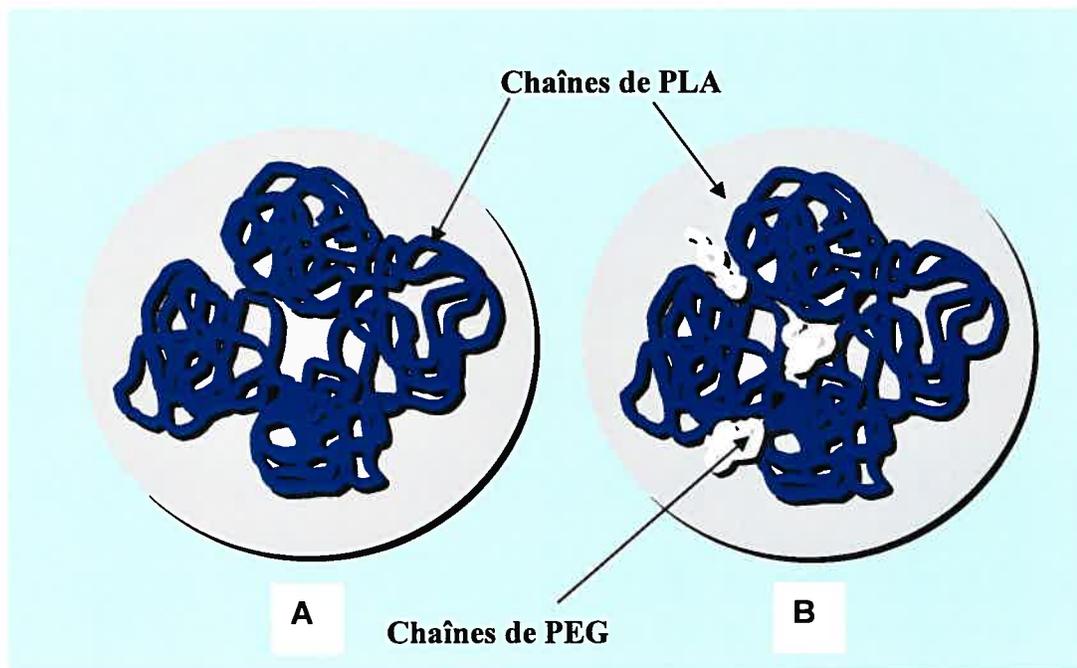


Figure 27. Schéma illustrant la différence de porosité entre les nanoparticules de PLA pur (A) et de copolymère (B)

Par contre, le tableau 2 montre une plus petite valeur de porosité, 0.07 cm^3/g pour les nanoparticules de PLGA. Il a été proposé que cela résulte d'une polydispersité élevée, où les chaînes les plus courtes interpénètrent

les plus longues. Dans le cas du tribloc et du multibloc, les sections relativement plus courtes du PEG rempliraient les espaces entre les chaînes plus longues du PLA, et contribueraient ainsi à une diminution de la porosité de la matrice du co-polymère. D'ailleurs, cette hypothèse est confirmée par la présence d'une grande proportion de pores de petite taille associée au multibloc (Figure 28). En outre, le tribloc contenant la plus grande proportion de PEG (Quesnel and Hildgen, 2002) a particulièrement produit des nanoparticules ayant la plus petite porosité.

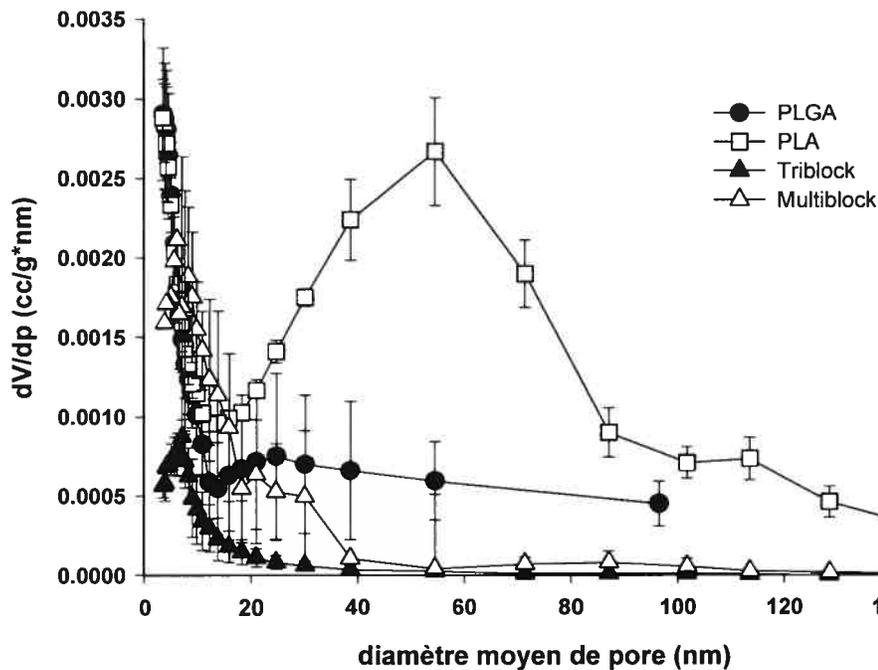


Figure 28. Changement du volume cumulé de pores avec le diamètre moyen de pores pour les nanoparticules préparées de différents polymères biodégradables

Dans ce contexte, nous tenons à mentionner que le phénomène d'interpénétration de chaînes a été déjà rapporté dans la littérature (Lapp, Mottin *et al.*, 1992), et qu'il est relié au concept du 'blob' décrit dans la section précédente.

La figure 28 montre la distribution de taille des pores pour les différents polymères. En ce qui concerne les nanoparticules de PLA, le changement du volume total de pore avec la taille des pores (dV/dp) a suivi l'augmentation du diamètre des pores. Cela est observé aussi, mais à un moindre degré, pour les nanoparticules de PLGA. Cette propriété révèle un simple réseau poreux. Par contre, les nanoparticules de tribloc et de multibloc possèdent un réseau poreux plus complexe, puisque dV/dp augmente avec la diminution de taille des pores. Autrement dit, plus on diminue l'échelle de mesure, plus on trouve de pores. Cette propriété est reliée au caractère fractal, ou complexe, du réseau, qui sera décrit en détail dans le chapitre 10. La complexité est le résultat d'une contribution majeure de petits pores, ce qui implique la présence de plus de parois et de partitions (Rizkalla, Hildgen *et al.*, 1999).

La figure 29 reprend la distribution de taille des pores pour des nanoparticules de PLA préparées aux différentes valeurs de pression d'homogénéisation utilisées. Une distribution décalée vers les plus petites tailles pourrait être nettement observée pour les lots de 10000 à 20000 psi.

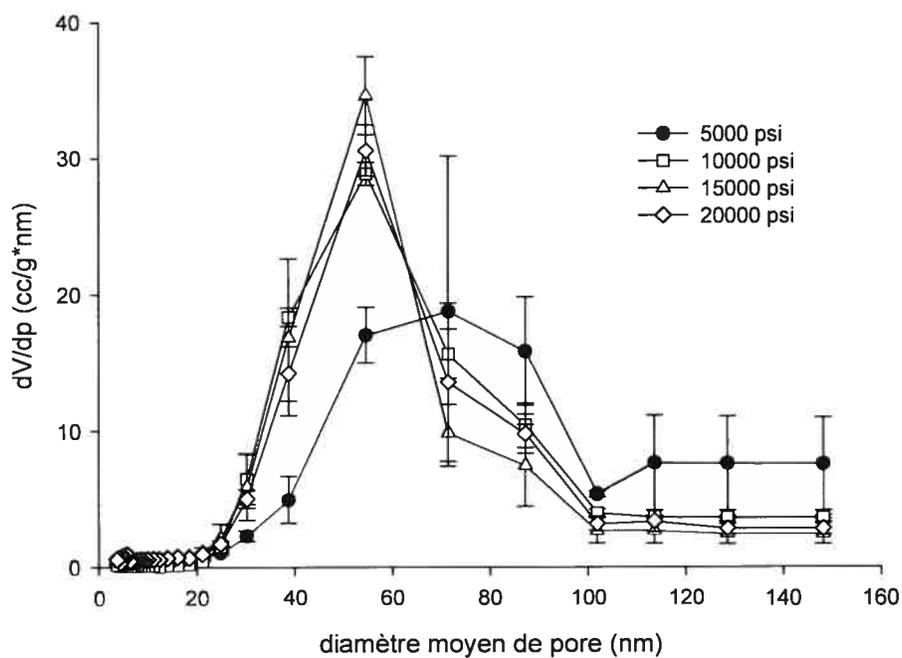


Figure 29. Changement du volume cumulé de pores en fonction du diamètre moyen de pores pour des nanoparticules préparées à des différentes pressions d'homogénéisation

Un tel résultat est relié à une plus petite taille des nanoparticules elles-mêmes, comparée au lot préparé à 5000 psi.

L'effet de différentes concentrations du PVA sur la distribution de taille des pores est illustré dans la figure 30. Lorsque la concentration du PVA augmente, le diamètre moyen des pores diminue. Cette relation pourrait

s'expliquer par la diminution de la taille des nanoparticules elles-mêmes, ou par l'augmentation de la viscosité de la phase aqueuse externe de la

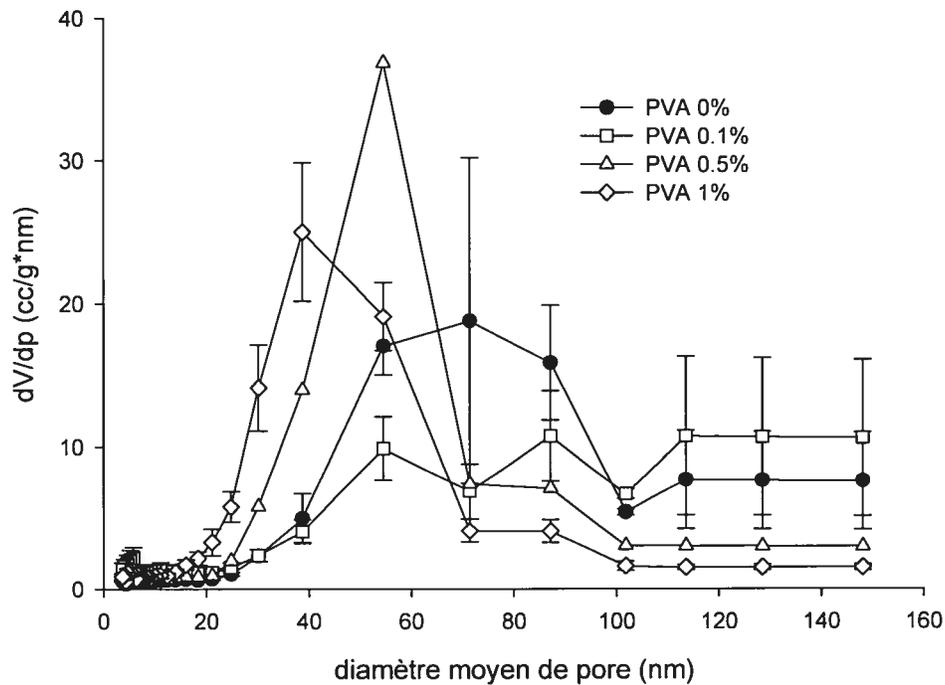


Figure 30. Changement du volume cumulé de pores en fonction du diamètre moyen de pores pour des nanoparticules préparées à des différentes concentrations de tensioactif

double émulsion, qui à son tour affecterait la vitesse d'évaporation et/ou de l'extraction du solvant organique, et par conséquent la formation de pores.

Concernant le sorbitol, il semblerait assez évident que l'augmentation de sa concentration pourrait obturer les pores à la surface des nanoparticules.

D'ailleurs, la figure 31 montre effectivement une diminution significative

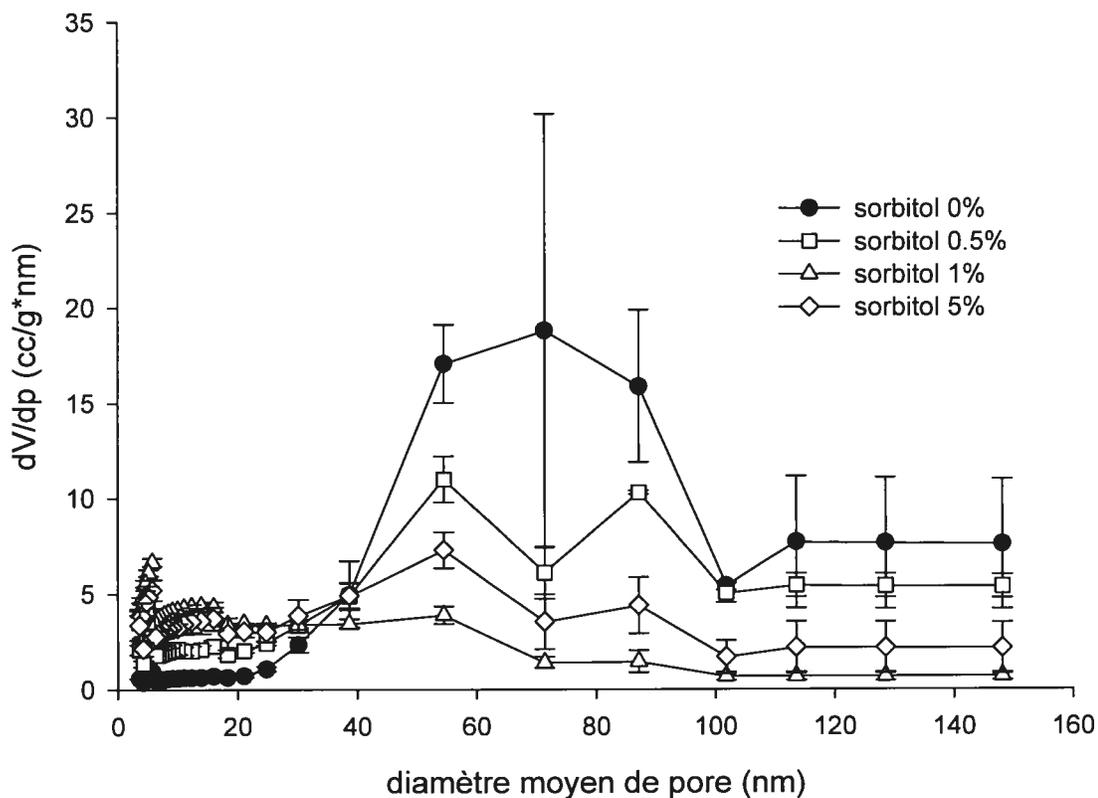


Figure 31. Changement du volume cumulé de pores en fonction du diamètre moyen de pores pour des nanoparticules cryoprotégées avec différentes concentrations de sorbitol

des pores de grande taille causée par la précipitation du sorbitol à la surface.

8.4. Étude de la dégradation

Le changement de la porosité et de la surface spécifique BET de nanoparticules de PLA durant une période de dégradation de 17 jours est résumé dans le tableau 3. Selon les résultats obtenus, il y a eu une

augmentation initiale rapide de surface et de porosité durant le premier jour uniquement. Cet effet est attribué à la pénétration du milieu de dégradation à l'intérieur de la matrice polymérique avec la formation subséquente de nouveaux pores.

jour	Surface spécifique BET (m ² /g) moyenne ± D.S.	Volume total de pore (ml/g) moyenne ± D.S.
0	19.03±0.30	0.2396±0.018
1	23.38±1.96	0.2672±0.007
3	20.28±0.68	0.2691±0.019
6	20.21±0.55	0.2547±0.015
10	16.14±0.86	0.2106±0.012
14	13.04±1.96	0.1935±0.008
17	10.04±0.24	0.1840±0.016

Tableau 3. Changement de la surface spécifique et de la porosité des nanoparticules durant la dégradation

Une diminution graduelle de la surface est observée par la suite : ce comportement accompagne la coalescence de pores déjà présents et, en

même temps, la diminution de la porosité totale puisque les particules se désagrègent et/ou s'érodent, tel qu'illustré par la figure 32.

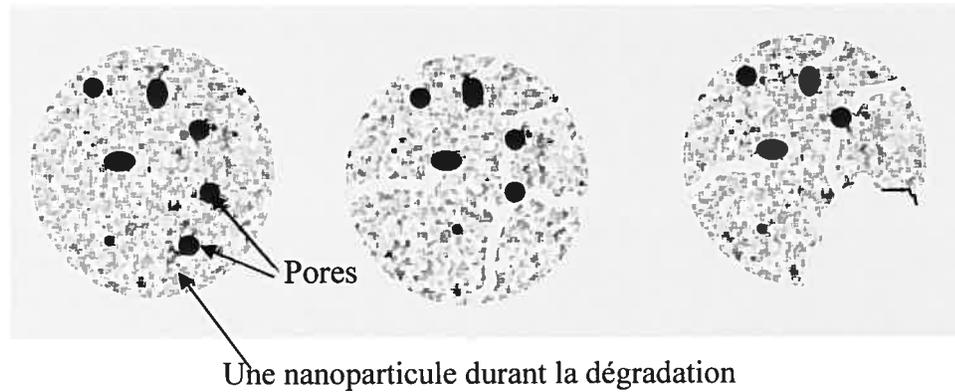


Figure 32. Formation de pores et désagrégation des nanoparticules durant la dégradation

La figure 33 reprend la distribution de taille des pores durant la dégradation, une augmentation des pores de large diamètre est nettement observée du jour 0 jusqu'au jour 6.

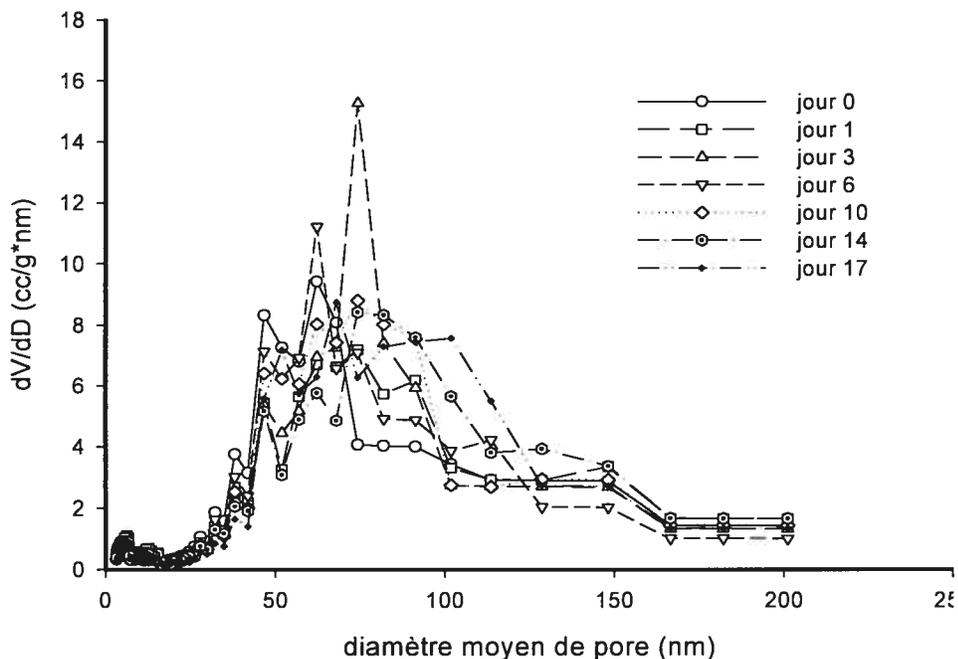


Figure 33. Changement du volume cumulatif de pores en fonction du diamètre moyen de pores pour les nanoparticules durant la dégradation

8.5. Libération *in vitro* de l'ADN

La figure 34 montre la libération *in vitro* de l'ADN à partir de nanoparticules préparées de différents polymères. Le comportement vis-à-vis de la libération est le résultat net de plusieurs facteurs co-agissants. Les nanoparticules de PLA montrent la libération la plus rapide : un comportement justifié par la plus grande porosité initiale (tableau 2) et par

le réseau poreux le plus simple, ce qui facilite la diffusion. De plus, une autre raison réside dans la dégradation rapide du polymère, due à une

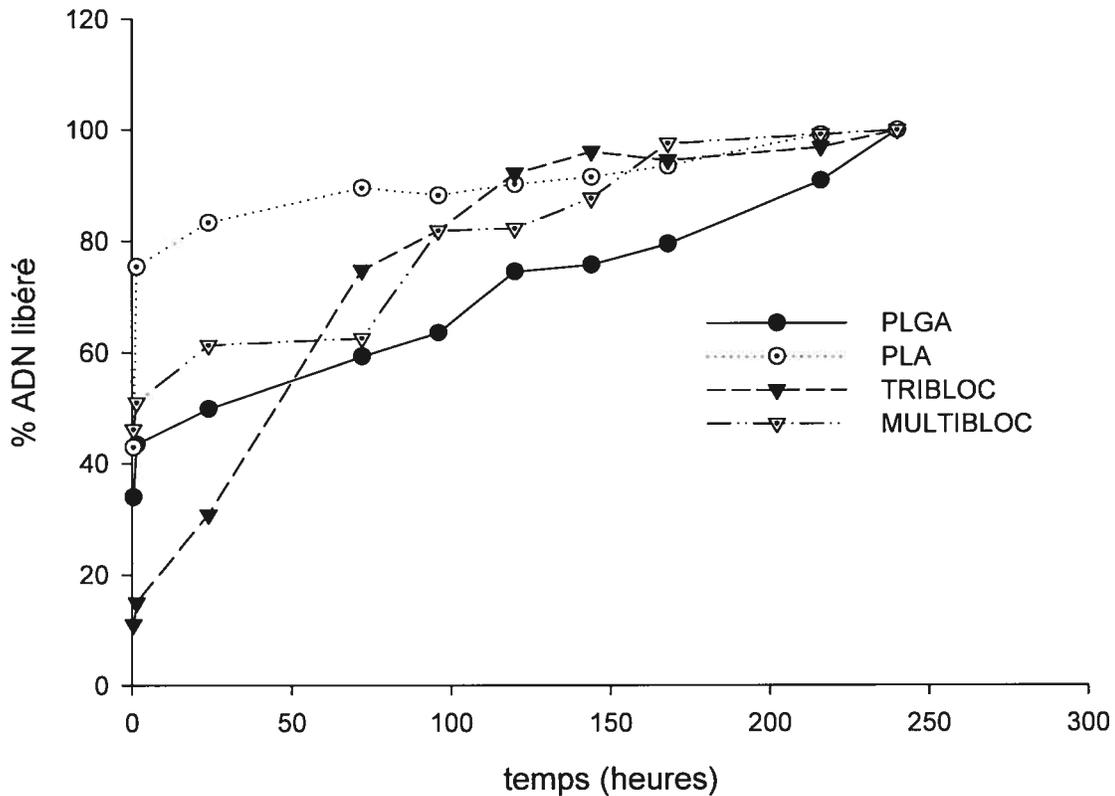


Figure 34. Libération de l'ADN à partir de nanoparticules préparées en utilisant différents polymères biodégradables

cristallinité réduite (Martinez, Lairion *et al.*, 1997), avec la formation subséquente de plus de pores. Pour les trois polymères : le PLA, le PLGA et le multibloc, il y a eu un *burst* significatif durant les premières heures, résultant de la diffusion de l'ADN proche de la surface et des pores déjà existants dans les nanoparticules. Ce *burst* a été suivi par une libération plutôt graduelle, durant laquelle une diffusion à partir de l'intérieur de la

matrice et une dégradation du polymère ont lieu conjointement. Le milieu aqueux de la libération pénètre lentement dans la structure interne des nanoparticules causant une dégradation progressive des chaînes polymériques et une augmentation de porosité (Martinez, Lairion *et al.*, 1997).

Par contre, le *burst* a été moins prononcé dans le cas du tribloc, où les nanoparticules sont moins poreuses. Ayant uniquement des pores de petit diamètre, la diffusion de l'ADN qui se fait bien au début de la libération est ainsi limitée.

Ces résultats sont en nette contradiction avec ceux rapportés dans la littérature, où l'incorporation de chaînes hydrophiles du PEG augmente la libération du principe actif à partir du co-polymère, dû à un effet sur la dégradation de la matrice (Hu and Liu, 1993; Youxin and Kissel, 1993; Shah, Zhu *et al.*, 1994; Kissel, Li *et al.*, 1996; Matsumoto, Nakada *et al.*, 1999).

L'effet de la porosité pourrait avoir joué un rôle prédominant, et conséquemment la libération de l'ADN se ferait par diffusion à travers les pores, plutôt que par érosion. La différence existant parmi les vitesses de libération pourrait être interprétée selon le même principe. Selon la littérature, le tribloc ayant un poids moléculaire plus bas, aurait distinctement montré une libération plus rapide (Matsumoto, Nakada *et al.*, 1999). Cependant, une porosité totale plus élevée des nanoparticules de multibloc, a probablement compensé un tel effet.

IX. MODÉLISATION DU PROCÉDÉ DE PRÉPARATION DES NANOPARTICULES DE PLA EN UTILISANT LES RÉSEAUX DE NEURONES ARTIFICIELS ET L'ALGORITHME GÉNÉTIQUE

Dans le chapitre précédent, l'effet de chacun des paramètres sélectionnés a été étudié individuellement en variant un seul paramètre à la fois. Cependant, puisque l'influence d'une variable quelconque pourrait être modifiée par une autre, il paraît donc avantageux d'étudier simultanément l'effet des trois paramètres sélectionnés, afin de modéliser, ne serait-ce que d'une manière descriptive, le procédé de préparation des nanoparticules.

Ce chapitre se compose de deux parties. En premier lieu, les résultats de la modélisation réalisée en utilisant le logiciel Neuroshell[®] Predictor sont présentés; cette modélisation a été effectuée en suivant deux stratégies, les réseaux de neurones et l'algorithme génétique. Le NeuroShell[®] Predictor est un système de type 'boîte noire', ce qui signifie que l'utilisateur n'a pas de contrôle sur la configuration du réseau. Les valeurs prédites ont été ensuite comparées aux valeurs calculées à partir du modèle de régression.

Par la suite, les résultats de la modélisation obtenus en utilisant le logiciel NeuroSolutions[®] sont présentés. Ce logiciel permet de configurer le

réseau, donc de choisir le modèle, de préciser sa topographie, le nombre de neurones cachés, et d'avoir un contrôle sur l'apprentissage.

9.1. Design expérimental et valeurs obtenues

Le tableau 4 montre le design expérimental suivi pour la modélisation, ainsi que les données expérimentales de taille pour les 36 lots de nanoparticules de PLA préparés en utilisant trois niveaux pour la concentration du polymère et celle du tensioactif (représentant deux variables de la formulation) et quatre niveaux pour la pression d'homogénéisation (représentant une variable du procédé de fabrication). Ces mêmes données sont illustrées par les graphiques tridimensionnels de la figure 35. Dans cette figure, l'effet du PVA et de la pression d'homogénéisation sur la taille des nanoparticules est étudié pour chaque concentration du PLA : 5%, 7.5% et 10% p/v (Figure 35 a, b et c respectivement). En comparant les trois graphiques, on observe à l'évidence une augmentation globale de la taille avec une augmentation de la concentration du PLA, due à une augmentation de la viscosité des globules de la double émulsion, produisant une haute tendance à l'agrégation durant l'évaporation du solvant. À une concentration constante de PLA, une diminution de la taille des nanoparticules peut être observée avec une augmentation de la concentration du PVA, en raison de son effet stabilisateur sur l'émulsion, et à la prévention de l'agrégation des globules

# de lot	Concentration du polymère (%p/v)	Pression (psi)	Concentration du PVA (% p/v)	Taille (nm)
1	5	5000	0.1	295.3
2	5	5000	0.5	225.5
3	5	5000	1	141.3
4	5	10000	0.1	214.5
5	5	10000	0.5	177.0
6	5	10000	1	137.8
7	5	15000	0.1	229.0
8	5	15000	0.5	178.1
9	5	15000	1	128.2
10	5	20000	0.1	205.4
11	5	20000	0.5	176.3
12	5	20000	1	152.4
13	7.5	5000	0.1	387.0
14	7.5	5000	0.5	197.1
15	7.5	5000	1	169.8
16	7.5	10000	0.1	343.3
17	7.5	10000	0.5	197.0
18	7.5	10000	1	158.1
19	7.5	15000	0.1	290.6
20	7.5	15000	0.5	196.8
21	7.5	15000	1	153.2
22	7.5	20000	0.1	413.6
23	7.5	20000	0.5	188.5
24	7.5	20000	1	173.4
25	10	5000	0.1	545.2
26	10	5000	0.5	211.8
27	10	5000	1	192.6
28	10	10000	0.1	502.2
29	10	10000	0.5	194.4
30	10	10000	1	183.5
31	10	15000	0.1	437.9
32	10	15000	0.5	219.4
33	10	15000	1	178.9
34	10	20000	0.1	500.2
35	10	20000	0.5	214.9
36	10	20000	1	178.0

Tableau 4. Design expérimental utilisé dans l'étude de modélisation et données expérimentales de taille

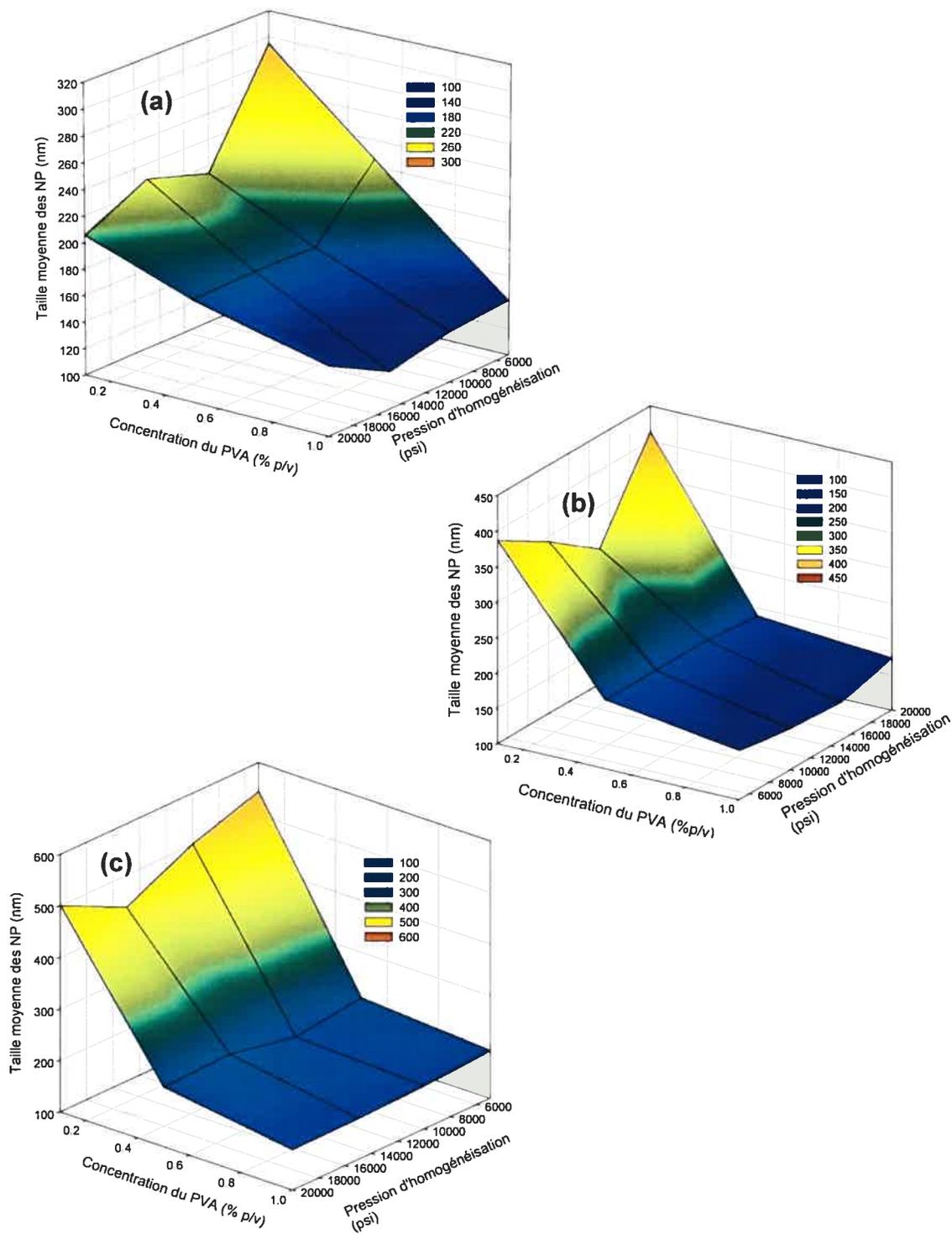


Figure 35. Surfaces de réponse pour les données expérimentales de taille (a) NP à 5% p/v de PLA, (b) NP à 7.5% p/v de PLA et (c) NP à 10% p/v de PLA

naissants dans la double émulsion. Les figures 35(b) et 35(c) montrent des courbes biphasiques, où la taille chute brusquement de 400-500nm à 150-200 nm avec l'augmentation de la concentration du PVA de 0.1 à 0.5 % p/v, pour suivre ensuite une diminution légère et plus graduelle jusqu'à la concentration maximale utilisée (1% p/v), et cela pour toutes les valeurs de pression. Quant à la pression, son effet dépendait du tensioactif, étant plus prononcé à des faibles concentrations de PVA, pour être presque aboli avec l'augmentation des concentrations, comme le montrent les différentes zones des graphiques mentionnés.

9.2. NeuroShell[®] predictor, apprentissage et prédictions

Le modèle de réseau préconstruit par le logiciel NeuroShell[®] Predictor est du type 'alimentation avant', fournissant un apprentissage rapide et ajoutant des neurones cachés selon le besoin. Par ailleurs, le réseau construit comprend un seul neurone de sortie, et par conséquent il a fallu construire un réseau pour chaque valeur de sortie : soit la taille ou la surface des micropores.

Tout d'abord, toutes les données ont été utilisées pour l'apprentissage. Les données calculées par le réseau de neurone et par l'algorithme génétique représentent la capacité de chaque système à établir une corrélation mathématique entre les entrées ou variables indépendantes, et les sorties ou variables dépendantes. En d'autres termes, elles expriment la capacité 'd'apprendre' la relation qui existe entre les entrées et les sorties.

9.2.1. Modèles représentant l'effet sur la taille

La figure 36 reprend les données expérimentales de taille, ainsi que les valeurs calculées par chaque modèle. Cette figure montre que les deux réseaux ont réussi à apprendre, bien que les sorties que fournit le RNA soient plus proches des valeurs expérimentales.

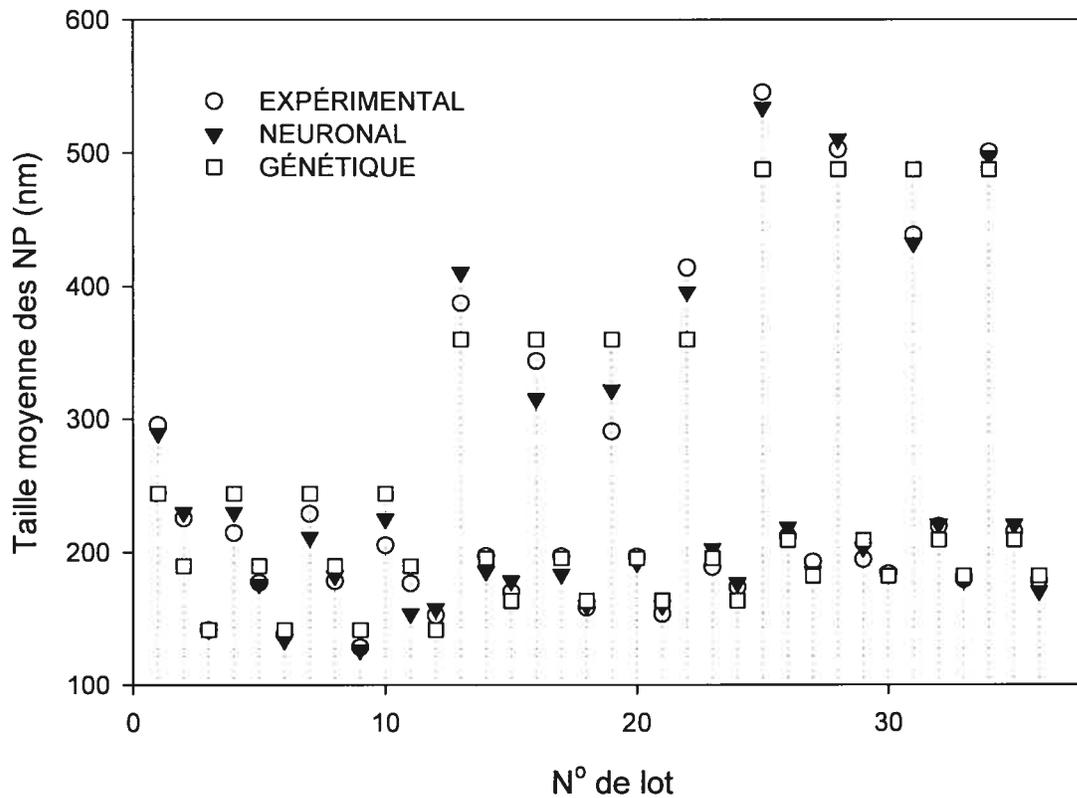
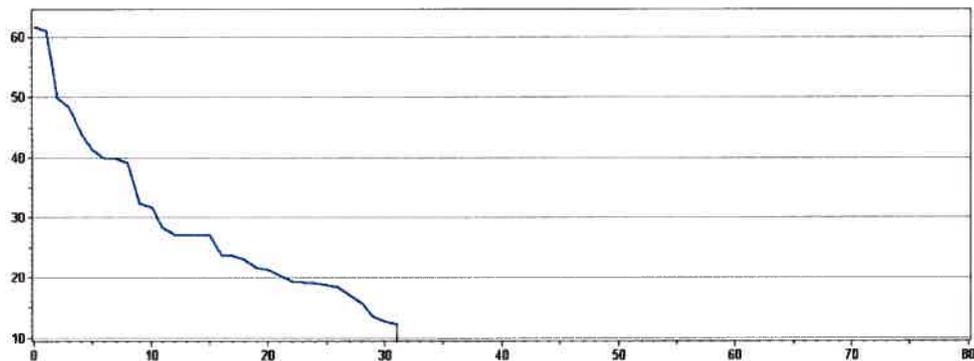


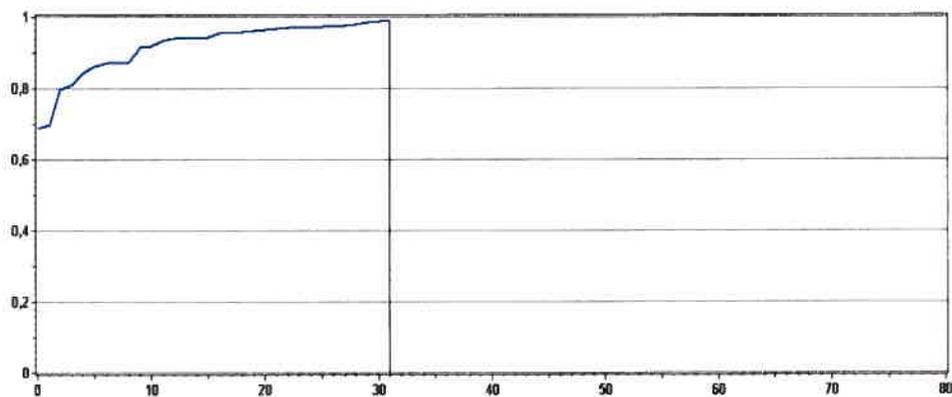
Figure 36. Données de taille expérimentales et calculées par le NeuroShell Predictor pour 36 lots de nanoparticules de PLA

La figure 37 présente l'évolution des paramètres de performance du réseau de neurone construit en fonction du nombre de neurones cachés. Ainsi, nous observons nettement une diminution de l'erreur moyenne (de ≈ 50 à ≈ 10), et de la *RECM* (de >60 à ≈ 10), ainsi qu'une augmentation du coefficient de détermination (de 0.68 à 0.98) avec le nombre de neurones cachés, jusqu'à l'arrêt de l'apprentissage à 31 neurones. De même, la performance du modèle génétique est illustrée par la figure 38.

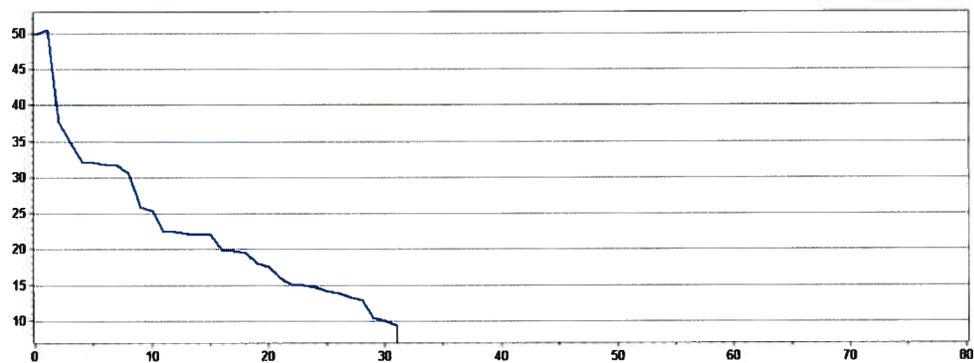
RECM par neurone caché



R^2 par neurone caché



Erreur moyenne par neurone caché



Nombre de neurones cachés

Figure 37. Progression de l'RECM, du R^2 , et de l'erreur moyenne en fonction du nombre de neurones cachés durant l'apprentissage avec NeuroShell® Predictor (stratégie neuronale)

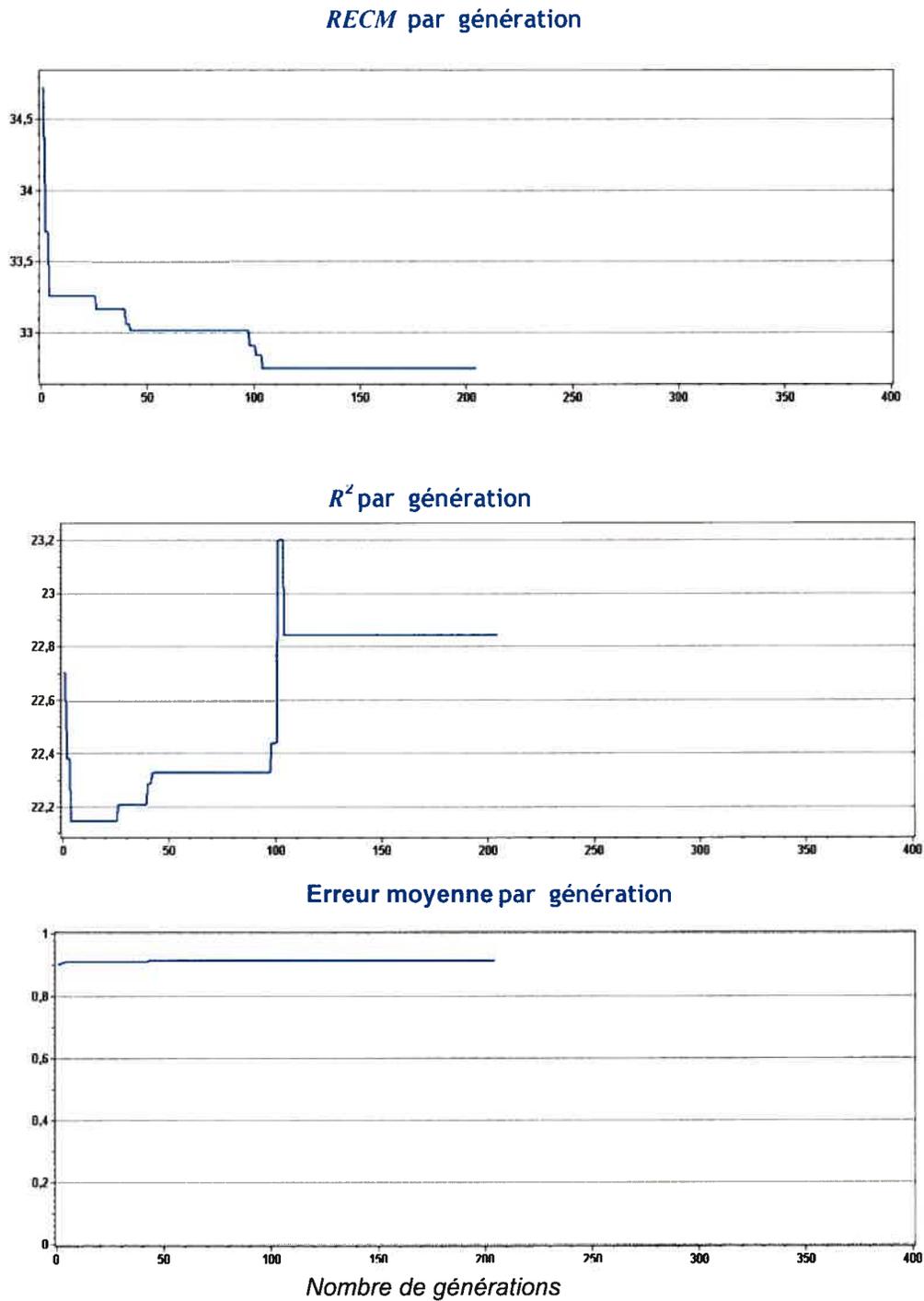


Figure 38. Progression de l'*RECM*, du R^2 , et de l'erreur moyenne en fonction du nombre de générations durant l'apprentissage avec NeuroShell[®] Predictor (stratégie génétique)

L'erreur moyenne E ainsi que la $RECM$ ont changé avant de finalement se stabiliser après 204 générations. Le tableau 5 résume les modèles, les coefficients de détermination (R^2), l'erreur moyenne E , l'erreur carrée moyenne E_{CM} , et la racine carrée de l' E_{CM} (ou $RECM$) après la session d'apprentissage en utilisant les 36 points expérimentaux. Le coefficient de détermination multiple est déjà défini dans l'introduction de cet ouvrage. Les autres paramètres sont définis tel que :

Si V_{act} est la valeur expérimentale, V_{pred} est la valeur prédite ou calculée par le modèle, et N est le nombre de points expérimentaux,

Alors l'erreur moyenne E est définie tel que :

$$E = \left| \frac{V_{act} - V_{pred}}{N} \right| \quad \text{Équation 35}$$

Et l'erreur carrée moyenne E_{CM} est calculée tel que :

$$E_{CM} = \frac{(V_{act} - V_{pred})^2}{N} \quad \text{Équation 36}$$

L'erreur carrée moyenne est choisie comme paramètre de performance du réseau afin de repérer facilement les écarts, de même que pour annuler le signe négatif obtenu lorsque la valeur expérimentale est supérieure à celle prédite par le modèle.

	Modèle neuronal	Modèle génétique
R^2	0.987772	0.912239
Erreur moyenne	9.297591	22.84510
Coeff. de Corrélacion	0.993867	0.955136
Erreur carrée moyenne (E_{CM})	149.4141	1072.372
Racine carrée de l' E_{CM}	12.22351	32.74709

Tableau 5. Statistiques d'apprentissage selon les modèles neuronal et génétique en utilisant le NeuroShell® Predictor

Selon le tableau 5, la taille a été modélisée avec succès en utilisant les réseaux de neurones de même que l'algorithme génétique, quoique le réseau de neurones se montre supérieur, présentant un meilleur coefficient de détermination, et des paramètres d'erreur plus faibles, preuve que les valeurs calculées étaient plus proches des valeurs expérimentales.

Afin de tester la capacité de prédiction de chaque modèle, l'étape suivante a été d'exclure des données de l'apprentissage les 12 données représentant les lots préparés à 7.5% p/v de PLA, puis de construire un nouveau modèle avec les 24 lots restants, et finalement tester les modèles construits sur les lots exclus. Le tableau 6 montre les paramètres statistiques de chaque modèle durant l'apprentissage puis durant la prédiction.

	Modèle neuronal	Modèle génétique
<i>Paramètres de l'apprentissage</i>		
R^2	0.931298	0.934281
Erreur moyenne	20.45882	21.24865
Coeff. de corrélation	0.965038	0.966933
Erreur carrée moyenne (E_{CM})	981.9074	939.2708
Racine carrée de l' E_{CM}	31.33540	30.64752
# de neurones cachés ou de générations	19 neurones	101 générations
<i>Paramètres de la prédiction</i>		
R^2	0.768583	0.903412
Erreur moyenne	28.50528	17.29252
Coeff. de corrélation	0.881519	0.951350
Erreur carrée moyenne (E_{CM})	1866.766	778.9807
Racine carrée de l' E_{CM}	43.20146	27.91022

Tableau 6. Paramètres statistiques des deux modèles neuronal et génétique durant l'apprentissage, puis la prédiction de taille des lots à 7.5% PLA p/v

Nous tenons à mentionner que le R^2 , le coefficient de détermination multiple, est différent du r^2 , le coefficient de détermination. Les deux valeurs sont égales dans une analyse de régression, mais pas en utilisant les réseaux de neurones, ou toute autre technique de modélisation.

Bien que la performance des deux modèles ait été presque équivalente durant l'apprentissage, le modèle génétique s'est avéré plus puissant en ce qui concerne la prédiction. Türkoğlu et al. ont constaté le même phénomène, en utilisant ce type de réseau pour modéliser un procédé galénique (Türkoğlu, Aydin *et al.*, 1999).

Il est cependant à noter que les lots qui ont été exclus et utilisés pour tester la prédiction des deux modèles, représentaient des lots de 7.5% p/v de PLA, ainsi les valeurs de taille dans ce lot étaient comprises dans la gamme de tailles déjà 'vues' par le réseau durant l'apprentissage puisque ce dernier a été achevé avec des valeurs de taille aussi petites que 137.8 nm (5% de PLA) et aussi grandes que 545.2 nm (10% de PLA), comme le montre le tableau 4. Or, nous avons tenté de tester la prédiction d'une manière plus approfondie. À cette fin, les lots à 5%, puis ceux à 10% ont été exclus durant l'apprentissage et la prédiction du nouveau réseau construit à chaque fois a été testée sur ces lots.

La performance de chaque modèle construit est illustrée par les tableaux 7 et 8. Les coefficients de détermination soulignent que les différents modèles ont 'appris' la relation existant entre les entrées et les sorties; mais qu'ils ont été incapables de généraliser (R^2 pas calculable). Les résultats manifestent, tout de même, un certain succès dans la prédiction de taille pour le lot à 10% p/v de PLA.

	Modèle neuronal	Modèle génétique
<i>Paramètres de l'apprentissage</i>		
R^2	0.832723	0.925695
Erreur moyenne	38.15354	21.27181
Coeff. de corrélation	0.912537	0.962135
Erreur carrée moyenne (E_{CM})	2536.616	1126.770
Racine carrée de l' E_{CM}	50.36483	33.56739
# de neurones cachés ou de générations	19 neurones	324 générations
<i>Paramètres de la prédiction</i>		
R^2	Pas calculable	Pas calculable
Erreur moyenne	55.30218	55.60850
Coeff. de corrélation	0.861355	0.788947
Erreur carrée moyenne (E_{CM})	4306.942	5737.936
Racine carrée de l' E_{CM}	65.62730	75.74916

Tableau 7. Paramètres statistiques des deux modèles neuronal et génétique durant l'apprentissage, puis la prédiction de taille des lots à 5% PLA p/v

	Modèle neuronal	Modèle génétique
Paramètres de l'apprentissage		
R^2	0.912924	0.796091
Erreur moyenne	14.98867	23.79060
Coeff. de corrélation	0.955470	0.892351
Erreur carrée moyenne (E_{CM})	499.4756	1169.634
Racine carrée de l' E_{CM}	22.34895	34.19992
# de neurones cachés ou de générations	19 neurones	193 générations
Paramètres de la prédiction		
R^2	0.673071	0.646706
Erreur moyenne	67.84551	58.07767
Coeff. de corrélation	0.850846	0.983324
Erreur carrée moyenne (E_{CM})	6737.172	7280.495
Racine carrée de l' E_{CM}	82.08028	85.32581

Tableau 8. Paramètres statistiques des deux modèles neuronal et génétique durant l'apprentissage, puis la prédiction de taille des lots à 10% PLA p/v

Les valeurs de taille prédites pour les lots à 7.5%, 5% et 10% p/v de PLA sont reprises dans les figures 39-41 respectivement. La figure 39 montre que les prédictions du modèle génétique étaient plus proches des valeurs mesurées, contrairement à la figure 40 qui montre une surestimation

générale des valeurs de taille par l'algorithme génétique, tandis que le résultat des réseaux de neurones dépendait du lot. Une sous-estimation apparaissait périodiquement, parce qu'elle correspondait aux lots préparés à 1% p/v de PVA, tandis qu'une surestimation correspondait aux lots préparés à 0.1% p/v de PVA.

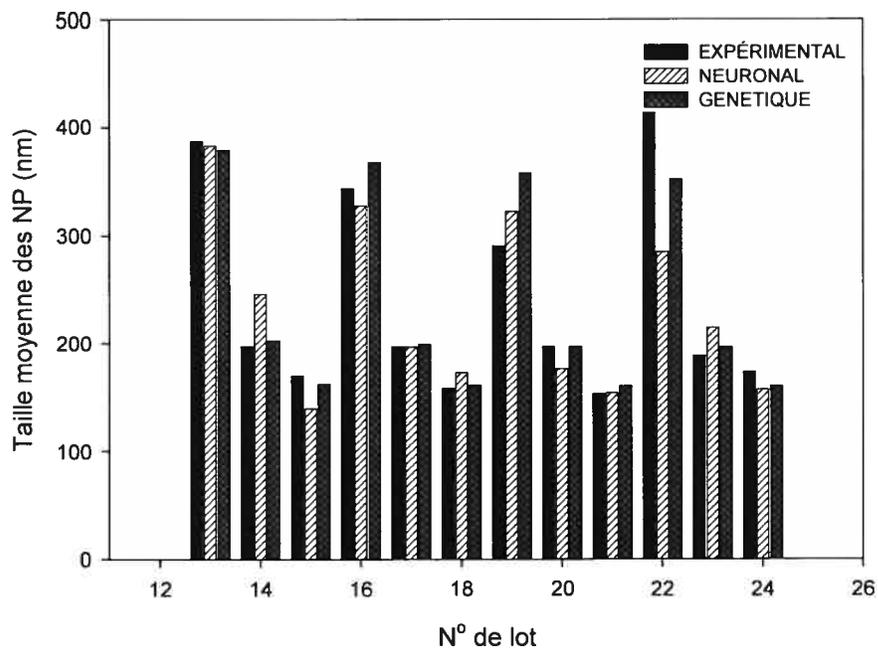


Figure 39. Taille moyenne des NP: Valeurs expérimentales et prédites pour les lots à 7.5% p/v de PLA

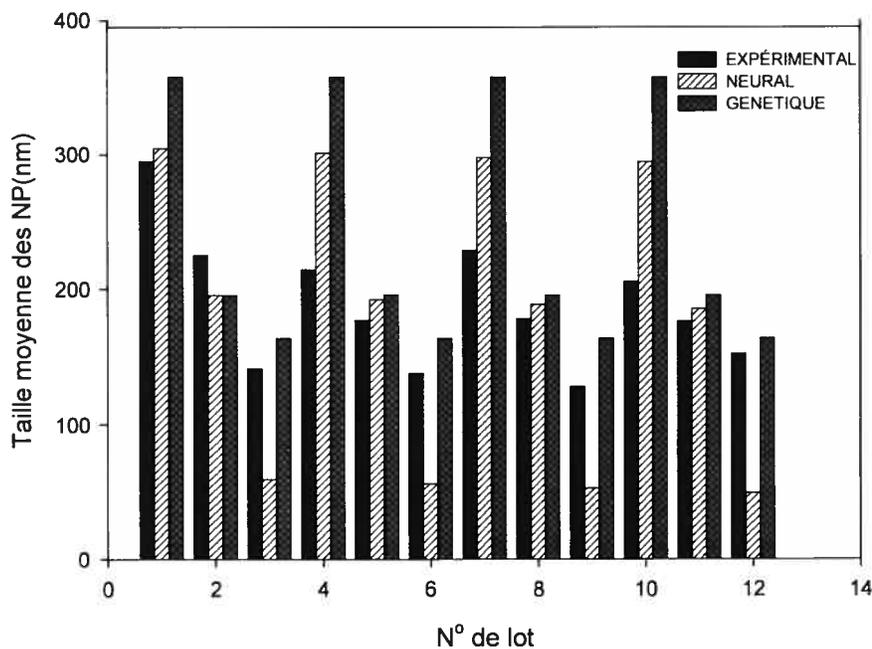


Figure 40. Taille moyenne des NP: Valeurs expérimentales et prédites pour les lots à 5% p/v de PLA

Finalement la figure 41 révèle des prédictions de l'algorithme génétique qui sous-estiment légèrement les valeurs mesurées, sauf pour les lots à 0.5% p/v de PLA, où nous observons une différence prononcée entre les deux valeurs. Le cas du réseau de neurones était différent. Une sous-estimation à 0.1% PVA, une surestimation à 0.5% PVA et une valeur très proche de la valeur expérimentale à 1% PVA, et ceci pour toutes les valeurs de la pression d'homogénéisation.

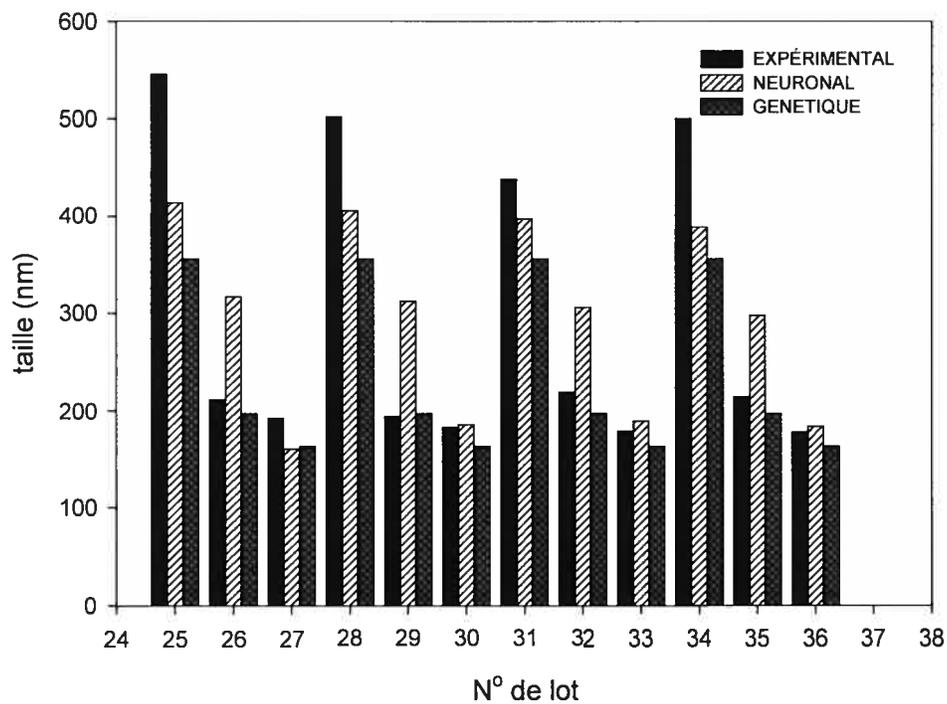


Figure 41. Taille moyenne des NP: Valeurs expérimentales et prédites pour les lots à 10 % p/v de PLA

À partir de ces trois cas, nous pouvons déduire que les données utilisées pour l'apprentissage d'un réseau de neurones doivent couvrir l'espace expérimental et contenir une variété d'informations afin de permettre au réseau de bien généraliser. Ceci a été bien rapporté dans la littérature (Sun, Peng *et al.*, 2003).

9.2.2. Modèles représentant l'effet sur la surface des micropores

Les données de surface des micropores et les valeurs prédites à partir des deux modèles sont illustrées dans la figure 42.

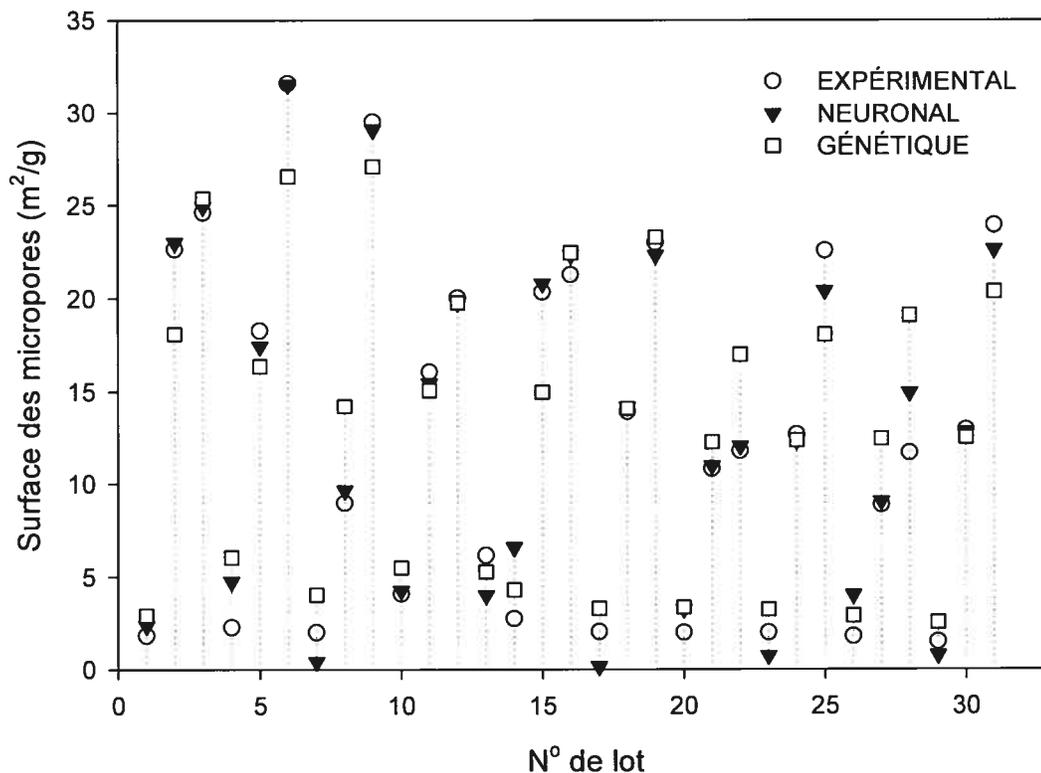


Figure 42. Données de surface des micropores, expérimentales et prédites par le Neuroshell® Predictor

Une fois de plus, le réseau de neurones a fourni des valeurs plus proches des données expérimentales. Cela est d'avantage confirmé par les paramètres de chaque modèle qui figurent dans le tableau 9. Ces paramètres traduisent une supériorité du RNA concernant l'apprentissage,

avec un $R^2=0.97578$ et une $E_{CM} = 2.04568$ versus un $R^2=0.79958$ et une E_{CM} de 16.93243 pour la stratégie génétique.

	Modèle neuronal	Modèle génétique
R^2	0.97578	0.79958
Erreur moyenne	1.20311	2.93584
Coeff. de corrélation	0.98782	0.89427
Erreur carrée moyenne (E_{CM})	2.04568	16.93243
Racine carrée de l' E_{CM}	1.43028	4.11490

Tableau 9. Paramètres statistiques des modèles neuronal et génétique après l'apprentissage

La même démarche décrite pour tester la généralisation avec les données de taille a été suivie avec les données de surface des micropores. Les résultats obtenus, récapitulés dans les tableaux (10-12) et reprises dans les figures (43-45) révèlent une meilleure prédiction pour les lots à 7.5% p/v de PLA.

	Modèle neuronal	Modèle génétique
<i>Paramètres de l'apprentissage</i>		
R^2	0.938870	0.746776
Erreur moyenne	1.727037	3.612487
Coeff. de corrélation	0.968953	0.864264
Erreur carrée moyenne (E_{CM})	5.775749	23.92548
Racine carrée de l' E_{CM}	2.403279	4.891367
# de neurones cachés ou de générations	16 neurones	140 générations
<i>Paramètres de la prédiction</i>		
R^2	0.870159	0.881294
Erreur moyenne	2.608573	1.900602
Coeff. de corrélation	0.969109	0.959142
Erreur carrée moyenne (E_{CM})	8.230808	7.524934
Racine carrée de l' E_{CM}	2.868938	2.743161

Tableau 10. Paramètres statistiques des deux modèles neuronal et génétique durant l'apprentissage, puis la prédiction de surface des micropores des lots à 7.5% p/v de PLA

	Modèle neuronal	Modèle génétique
<i>Paramètres de l'apprentissage</i>		
R^2	0.922844	0.759640
Erreur moyenne	1.229584	2.717025
Coeff. de corrélation	0.960648	0.872259
Erreur carrée moyenne (E_{CM})	4.625172	14.40860
Racine carrée de l' E_{CM}	2.150621	3.795867
# de neurones cachés ou de générations	17 neurones	118 générations
<i>Paramètres de la prédiction</i>		
R^2	0.815353	0.758220
Erreur moyenne	5.265537	4.649052
Coeff. de corrélation	0.905639	0.926221
Erreur carrée moyenne (E_{CM})	24.27250	31.78279
Racine carrée de l' E_{CM}	4.926713	5.637622

Tableau 11. Paramètres statistiques des deux modèles neuronal et génétique durant l'apprentissage, puis la prédiction de surface des micropores des lots à 5% p/v de PLA

	Modèle neuronal	Modèle génétique
<i>Paramètres de l'apprentissage</i>		
R^2	0.931849	0.861128
Erreur moyenne	2.015737	2.856800
Coeff. de corrélation	0.965323	0.933011
Erreur carrée moyenne (E_{CM})	6.648709	13.54813
Racine carrée de l' E_{CM}	2.578509	3.680779
# de neurones cachés ou de générations	14 neurones	101 générations
<i>Paramètres de la prédiction</i>		
R^2	0.627447	0.411793
Erreur moyenne	3.808176	4.307084
Coeff. de corrélation	0.852674	0.851090
Erreur carrée moyenne (E_{CM})	19.97830	31.54281
Racine carrée de l' E_{CM}	4.469709	5.616299

Tableau 12. Paramètres statistiques des deux modèles neuronal et génétique durant l'apprentissage, puis la prédiction de surface des micropores des lots à 10% p/v de PLA

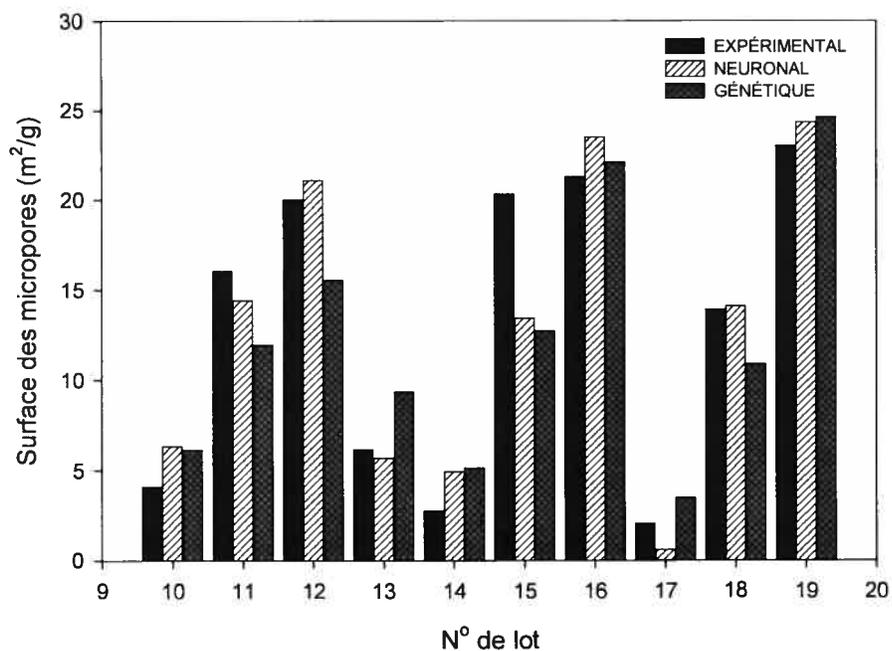


Figure 43. Surface des micropores : Valeurs expérimentales et prédites pour les lots à 7.5% p/v de PLA

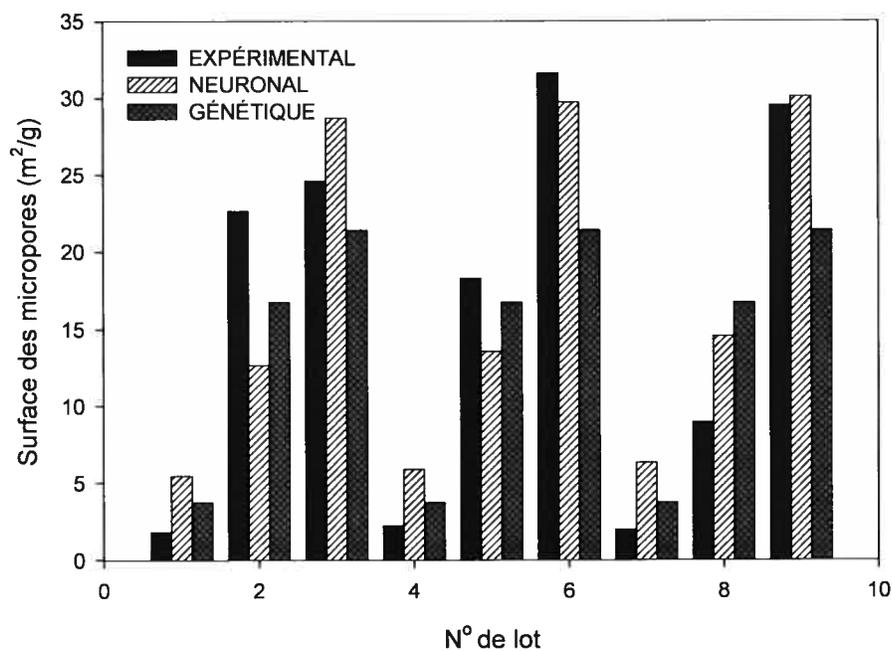


Figure 44. Surface des micropores : Valeurs expérimentales et prédites pour les lots à 5% p/v de PLA

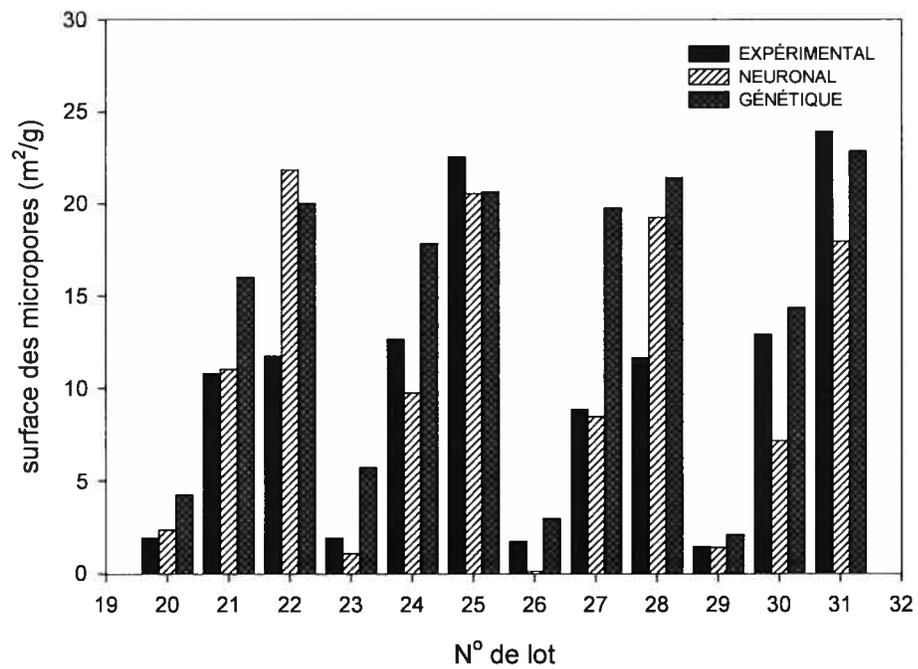


Figure 45. Surface des micropores : Valeurs expérimentales et prédites pour les lots à 10% p/v de PLA

9.2.3. Importance relative des variables indépendantes

Ce terme définit la contribution de chaque variable au fonctionnement total du système. La stratégie génétique utilise l'algorithme génétique, ou la technique de survie du plus apte pour déterminer un schéma de poids pour les entrées. Ce schéma détermine lesquelles des entrées sont les plus importantes pour prédire les sorties. L'algorithme génétique va tester plusieurs schémas de poids jusqu'à ce qu'il trouve celui qui donne les meilleures prédictions pour les données d'apprentissage. Les poids ont des valeurs comprises entre 0 et 1. Des poids proches de 0 signifient que les variables de faible importance, tandis que des poids proches de 1 désignent des variables de forte contribution.

La figure 46 montre l'importance relative des entrées sur la taille et la surface des micropores. Il paraît évident que le PVA présente une contribution majeure par rapport à la taille, suivi par la concentration du polymère. Par contre, la pression ne paraît exercer qu'une influence minime sur cette propriété. Quant à la surface des micropores, elle est manifestement influencée par les trois variables, mais avec une plus grande contribution de la concentration du polymère. Ce facteur affecterait la vitesse d'évaporation du solvant organique, qui semble être un déterminant majeur de la microporosité. Une discussion plus détaillée

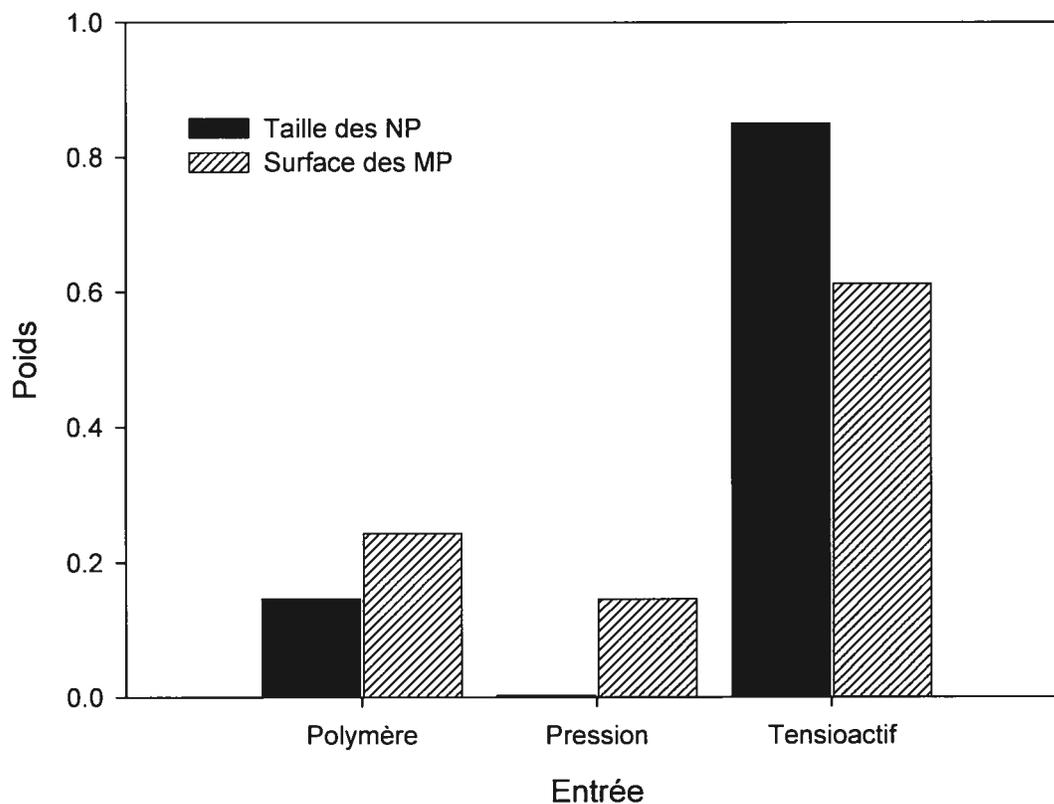


Figure 46. Importance relative des variables indépendantes sur les caractéristiques physiques des nanoparticules

de l'effet de la concentration du polymère sur la microporosité des nanoparticules sera présentée dans le chapitre 10.

Le besoin d'évaluer l'importance relative des variables qui régissent un procédé devient encore plus pressant lorsque le nombre de ces variables augmente. Dans ce cas, des paramètres d'une importance minime pourraient être exclus de la modélisation, ce qui diminuerait considérablement le nombre de lots ou d'essais effectués.

9.3. Résultats de la régression

9.3.1. Régression linéaire multiple

Un modèle de régression linéaire multiple a été appliqué pour les données de taille et de surface de micropores. L'équation appliquée est de la forme

$$Y = a_0 + a_1x_1 + a_2x_2 + a_3x_3 \quad \text{Équation 37}$$

où Y est la réponse (taille ou surface de micropores), x_1 = concentration de polymère; x_2 = pression d'homogénéisation; et x_3 = concentration du PVA.

a_1 , a_2 et a_3 sont les coefficients de régression correspondants. La validité du modèle a été vérifiée par les paramètres statistiques appropriés. Le 't statistique' est défini comme le rapport coefficient de régression/erreur standard du coefficient de régression. Ainsi plus la valeur de 't' augmente, plus la variable indépendante peut être utilisée pour prédire la variable dépendante. Le facteur d'inflation de la variance, ou le FIV, mesure la multicolinéarité, en d'autres termes, l'inflation de l'erreur standard de chaque coefficient de régression due à une information redondante sur les autres variables indépendantes. Un FIV égal à 1 indique l'absence de redondance, ce qui suggère l'absence d'interaction entre les variables indépendantes. Les résultats sont regroupés dans les tableaux 13 et 14. Dans le tableau 13, les coefficients a_1 et a_3 sont statistiquement significatifs ($p < 0.001$) pour les deux variables. Cependant, une probabilité de 0.51 et une faible valeur de t associées au coefficient a_2 indiquent que

la pression d'homogénéisation n'a qu'une influence minime et non significative sur la taille.

Le même résultat a été reproduit pour la surface des micropores (tableau 14). Le modèle a laissé entrevoir le rôle significatif de la concentration du polymère et celle du PVA ($p = 0.005$ et $p < 0.001$ respectivement), alors que l'effet de pression d'homogénéisation demeurerait non significatif ($p = 0.204$).

Coefficients	Taille (nm)	Erreur standard	t	Probabilité P	FIV
a_0	211.329	50.642	4.173	<0.001	
a_1	21.637	5.338	4.053	<0.001	1.000
a_2	- 0.001	0.00195	-0.666	0.510	1.000
a_3	-217.559	29.597	-7.351	<0.001	1.000

Tableau 13. Résultats de la régression linéaire multiple sur les données de taille

Coefficients	Surface des micropores (m^2/g)	Erreur standard	t	Probabilité P	FIV
a_0	17.118	4.792	3.572	0.002	
a_1	-1.339	0.428	-3.129	0.005	1.000
a_2	-0.000280	0.000214	-1.308	0.204	1.000
a_3	20.973	2.373	8.840	<0.001	1.000

Tableau 14. Résultats de la régression linéaire multiple sur les données de surface de micropores

Afin de comparer la performance du modèle de régression linéaire à celle du réseau de neurones, les valeurs prédites de chaque modèle ont été représentées versus les valeurs expérimentales. La figure 47(a) et (b) montre la corrélation pour les données de taille, tandis que la figure 48(a) et (b) représente les données de surface des micropores. Une meilleure corrélation obtenue avec les réseaux de neurones, plutôt qu'avec la régression linéaire, est facilement observée et confirmée par les valeurs des différents R^2 .

Or, le degré de lissage n'étant pas très satisfaisant, l'étape suivante a été donc de tenter de trouver un modèle de régression non linéaire, qui s'adapte mieux aux résultats de taille et de microporosité obtenus.

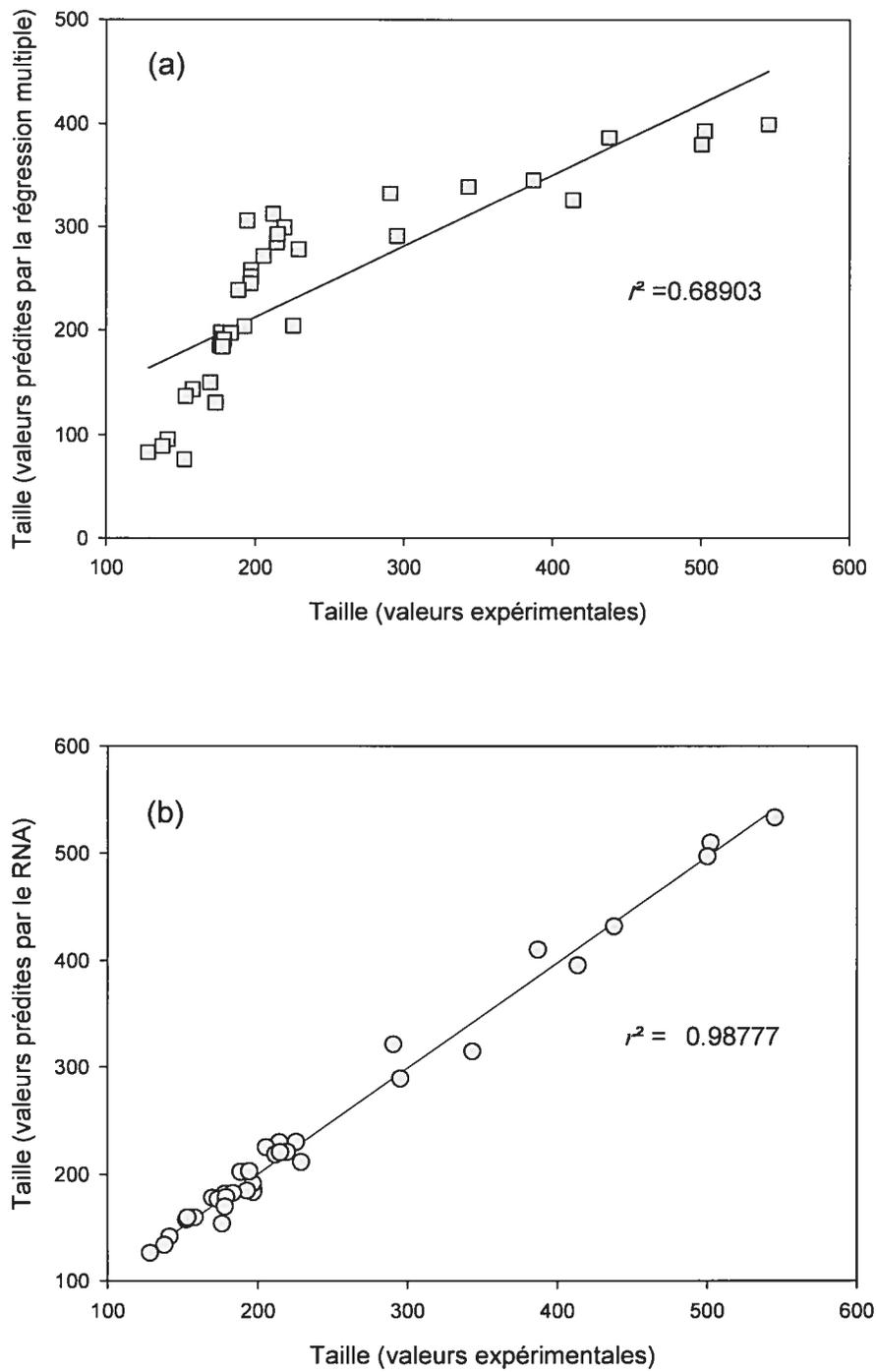


Figure 47. Courbes de corrélation entre les valeurs expérimentales de taille et celles prédites par le modèle de régression linéaire (a) et le réseau de neurones (b)

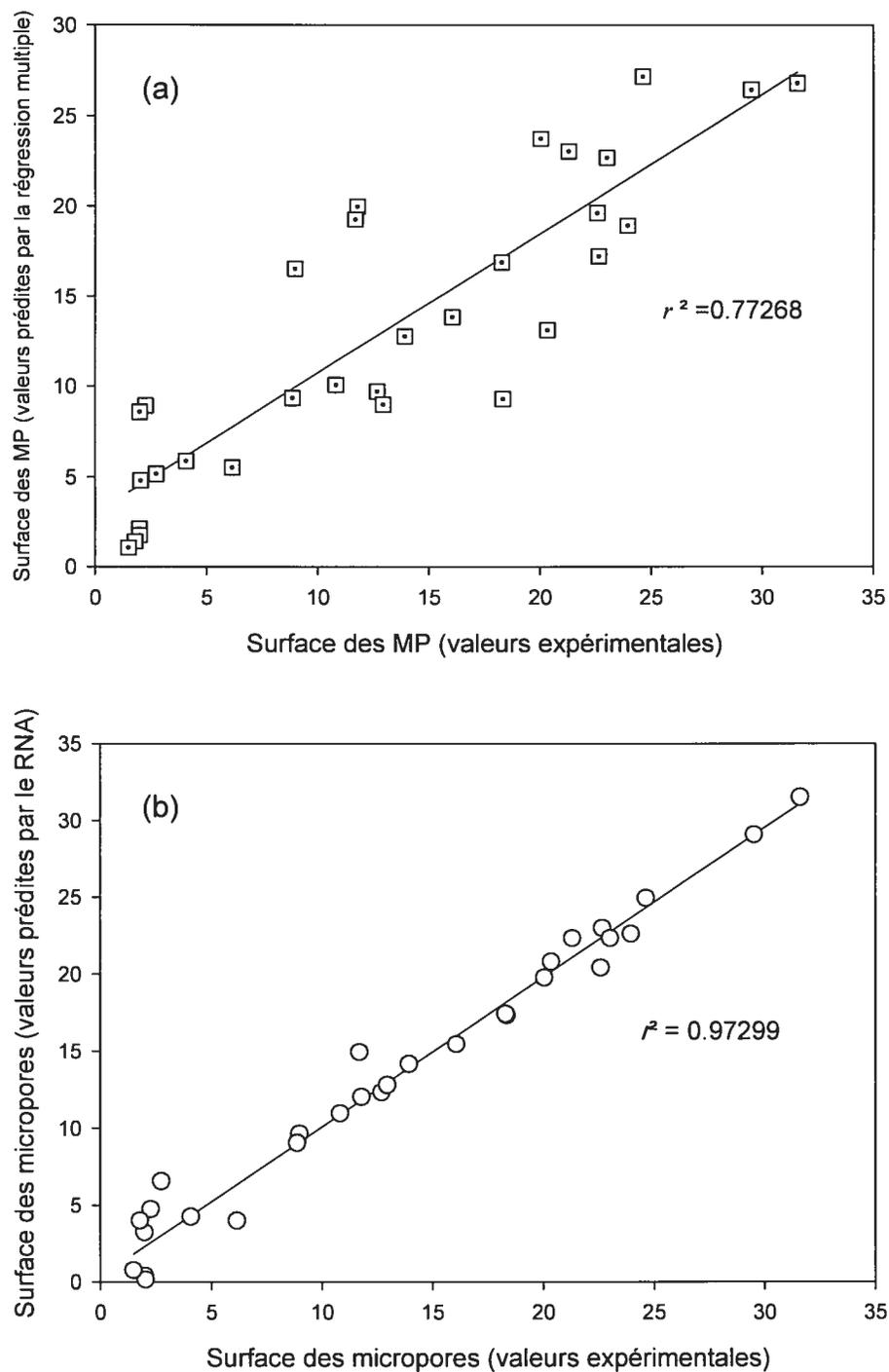


Figure 48. Courbes de corrélation entre les valeurs expérimentales de surface de micropores et celles prédites par le modèle de régression linéaire (a) et le réseau de neurones (b)

9.3.2. Régression non linéaire

Un modèle de régression non linéaire a été appliqué sur les données expérimentales de taille et de microporosité afin de trouver un meilleur lissage, et aussi pour ne pas sous-estimer la capacité des méthodes statistiques classiques.

Pour obtenir également une surface de réponse, les lots ont été classés selon la concentration du polymère en trois groupes, et un modèle a été construit pour chacun de ces groupes en variant la concentration du PVA et la pression d'homogénéisation. Par ailleurs, à la suite de plusieurs essais, la taille et la microporosité ont été modélisées par deux équations différentes.

9.3.2.1. Régression non linéaire pour l'effet sur la taille des nanoparticules

L'équation produisant le meilleur lissage pour la taille a été la suivante :

$$f = y_0 + ax + by + cx^2 + dy^2 \quad \text{Équation 38}$$

où f est la taille des nanoparticules, x est la pression d'homogénéisation, et y est la concentration du PVA. Cette équation a été appliquée pour chaque concentration de polymère.

Les résultats de la régression par rapport à la taille sont rassemblés dans le tableau 15. Un nombre d'observations en ressortent : Tout d'abord, le modèle a produit un lissage significatif ($p < 0.001$ pour les coefficients b et d

	Coefficient	Erreur standard	<i>t</i>	<i>p</i>
5%				
PLA	334.9369	37.2986	8.9799	<0.0001
<i>y</i> ₀				
<i>a</i>	-0.0135	0.0063	-2.1474	0.0689
<i>b</i>	-129.3152	75.0725	-1.7225	0.1286
<i>c</i>	0.0000	0.0000	1.7731	0.1195
<i>d</i>	20.4673	65.5501	0.3122	0.7640
$R^2 = 0.8747$				
7.5% PLA				
<i>y</i> ₀	440.6621	45.3621	9.7143	<0.0001
<i>a</i>	-0.0082	0.0076	-1.0810	0.3155
<i>b</i>	-554.3271	91.3023	-6.0713	0.0005
<i>c</i>	0.0000	0.0000	0.6992	0.5070
<i>d</i>	340.5505	79.7213	4.2718	0.0037
$R^2 = 0.9325$				
10% PLA				
<i>y</i> ₀	675.0930	43.0386	15.6858	<0.0001
<i>a</i>	-0.0119	0.0072	-1.6521	0.1425
<i>b</i>	1156.8624	86.6257	-13.3547	<0.0001
<i>c</i>	0.0000	0.0000	1.4785	0.1828
<i>d</i>	735.4064	75.6379	9.7227	<0.0001
$R^2 = 0.9828$				

Tableau 15. Résultats de la régression non linéaire sur les données de la taille des nanoparticules

pour les lots à 7.5% et 10%, mais pas ceux à 5% p/v de PLA. En outre, la valeur des coefficients de détermination (r^2) pour chaque groupe est supérieure à celle obtenue par la régression linéaire multiple, ainsi l'étape d'après consiste à comparer les résultats de la régression non linéaire aux prédictions des réseaux de neurones et à ceux de l'algorithme génétique.

La figure 49 montre la corrélation entre les valeurs expérimentales et celles prédites par le RNA et la régression polynomiale. Cette dernière a produit un coefficient de détermination r^2 (0.9694) inférieur à celui du modèle neuronal (0.9877), déjà présenté dans le tableau 5.

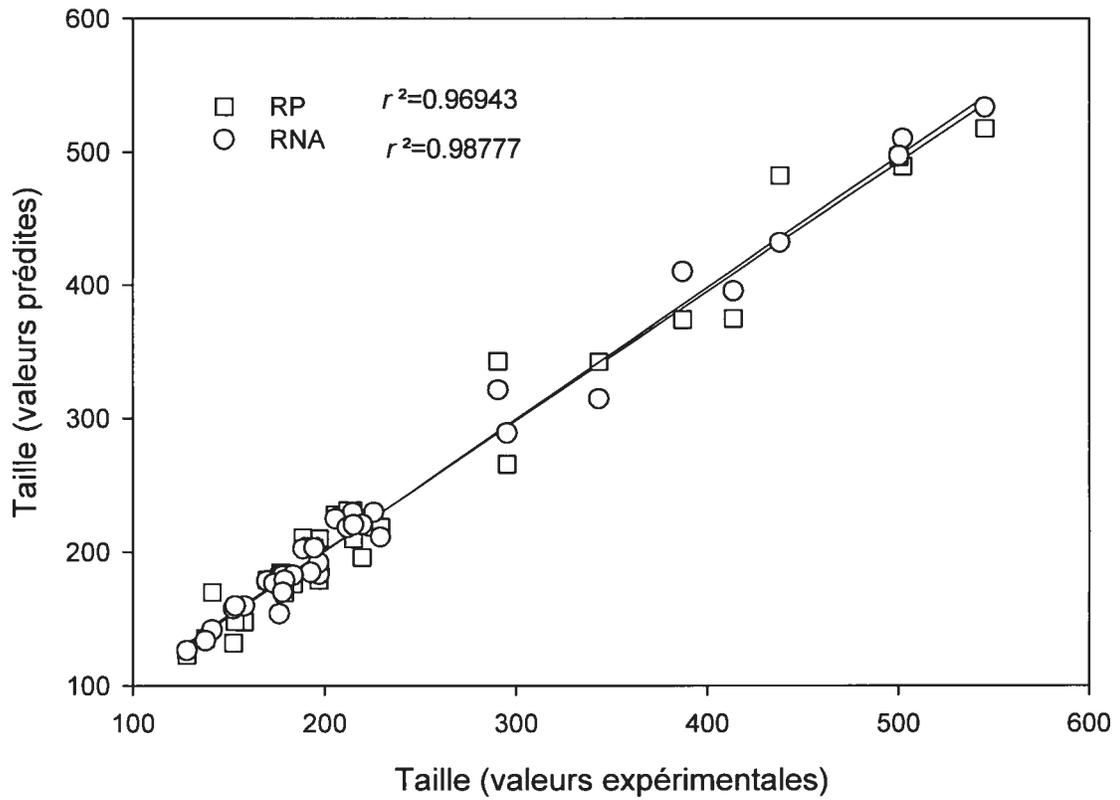


Figure 49. Taille des nanoparticules : Comparaison entre les prédictions des deux modèles neuronal et statistique

La figure 50 regroupe les surfaces de réponse obtenues à partir des résultats expérimentaux (Fig 50a) la régression non linéaire (Fig 50b), le réseau de neurones (Fig 50c), et l'algorithme génétique (Fig 50d) pour les lots préparés à 10% p/v de PLA. Il est à remarquer que la régression polynomiale a produit une surface de réponse quasiment plane, contrairement aux prédictions du réseau de neurones qui se sont montrées sensibles aux relations non-linéaires entre les entrées et la sortie. Ce comportement avait été rapporté dans la littérature (Takahara, Takayama *et al.*, 1997), et il est attribué à une plus grande capacité des réseaux de neurones à déceler les relations complexes entre les variables de cause et les réponses mesurées; ces relations ne peuvent être traduites par les équations de régression connues. Par ailleurs, bien que les prédictions basées sur l'algorithme génétique aient été supérieures à celles du réseau de neurones (tableau 6), la surface de réponse créée montre une forme multiphasique, dont l'aspect est bien différent des résultats expérimentaux. Ce résultat est probablement lié au fait que, selon l'algorithme génétique, l'influence de la pression sur la taille des nanoparticules est quasiment nulle (Figure 46).

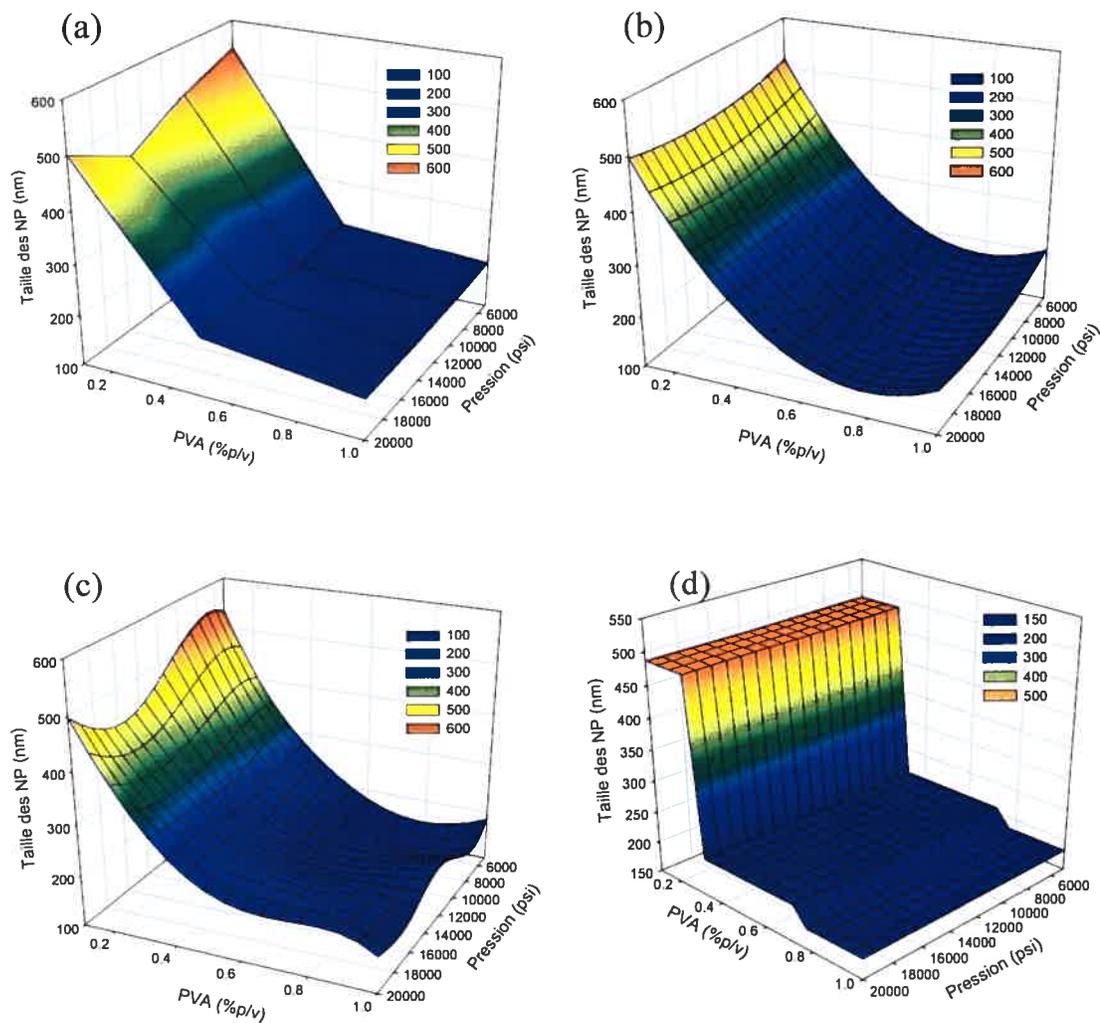


Figure 50. Surfaces de réponse obtenues par les données expérimentales et par les différents modèles pour l'effet du PVA et de la pression sur la taille des NP préparées à 10% p/v de PLA

9.3.2.2. Régression non linéaire pour l'effet sur la surface des micropores

La relation entre la pression d'homogénéisation, la concentration du PVA et la surface des micropores a suivi un modèle gaussien. La régression a été obtenue avec l'équation :

$$f = a \exp\left(-0.5\left(\left(\frac{x-x_0}{b}\right)^2 + \left(\frac{y-y_0}{c}\right)^2\right)\right) \quad \text{Équation 39}$$

où f est la surface des micropores, x la pression d'homogénéisation, et y la concentration du PVA.

Les résultats de la régression sont résumés dans le tableau 16. Les valeurs de p et t associées aux différents coefficients révèlent un lissage relativement réussi.

La figure 51 montre la corrélation entre les valeurs expérimentales et prédites par le RN et la régression polynomiale. Encore une fois, la régression polynomiale démontre un coefficient de détermination ($r^2=0.86537$) inférieur à celui du modèle neuronal ($r^2=0.97299$)

La figure 52 reprend les surfaces de réponse obtenues à partir des résultats expérimentaux (Fig 52 a), la régression non linéaire (Fig 52b), le réseau de neurones (Fig 52c), et l'algorithme génétique (Fig 52d). Encore une fois, et contrairement à la régression polynomiale et l'algorithme génétique, les réseaux de neurones ont fourni des prédictions qui reflètent un aspect non linéaire.

	Coefficient	Erreur standard	<i>t</i>	<i>p</i>
5% PLA				
x_0	14288.98	1995.33	7.1612	0.0020
y_0	0.8625	0.1133	7.6136	0.0016
<i>a</i>	34.4601	8.6213	3.9971	0.0162
<i>b</i>	9030.65	5275.88	1.7117	0.1621
<i>c</i>	0.3264	0.1408	2.3175	0.0814
$R^2 = 0.91391, P=0.0210, \text{erreur standard} = 5.0459$				
7.5% PLA				
x_0	15336.34	1432.25	10.7078	0.0004
y_0	0.8051	0.0327	24.6493	<0.0001
<i>a</i>	27.1128	3.1121	8.7122	0.0010
<i>b</i>	10626.76	4826.38	2.2018	0.0925
<i>c</i>	0.3398	0.0522	6.5047	0.0029
$R^2 = 0.96335, P=0.0039, \text{erreur standard} = 2.3098$				
10% PLA				
x_0	9816.70	371.66	26.4129	<0.0001
y_0	0.8516	0.0537	15.8607	<0.0001
<i>a</i>	23.3866	2.4682	9.4753	0.0007
<i>b</i>	4881.78	474.85	10.2807	0.0005
<i>c</i>	0.3552	0.0678	5.2375	0.0064
$R^2 = 0.96894, P=0.0028, \text{erreur standard} = 1.6832$				

Tableau 16. Résultats de la régression non linéaire sur les données de la surface des micropores

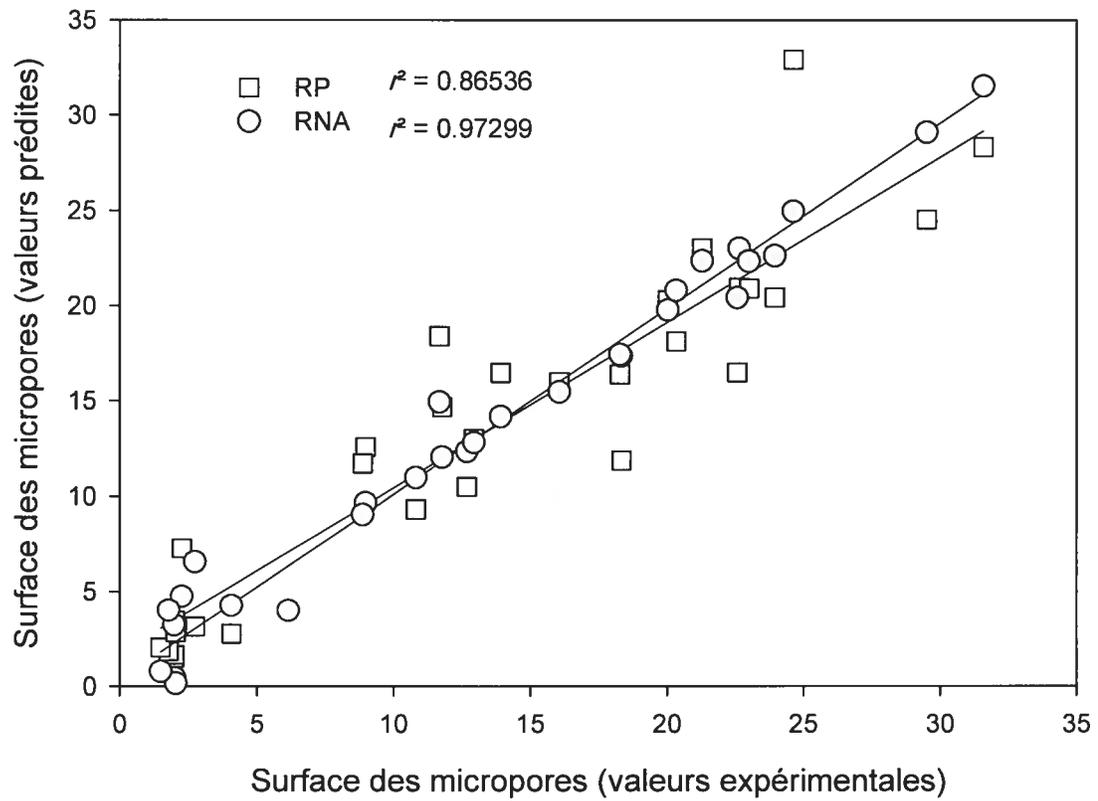


Figure 51. Surface des micropores : Comparaison entre les prédictions des deux modèles neuronal et statistique

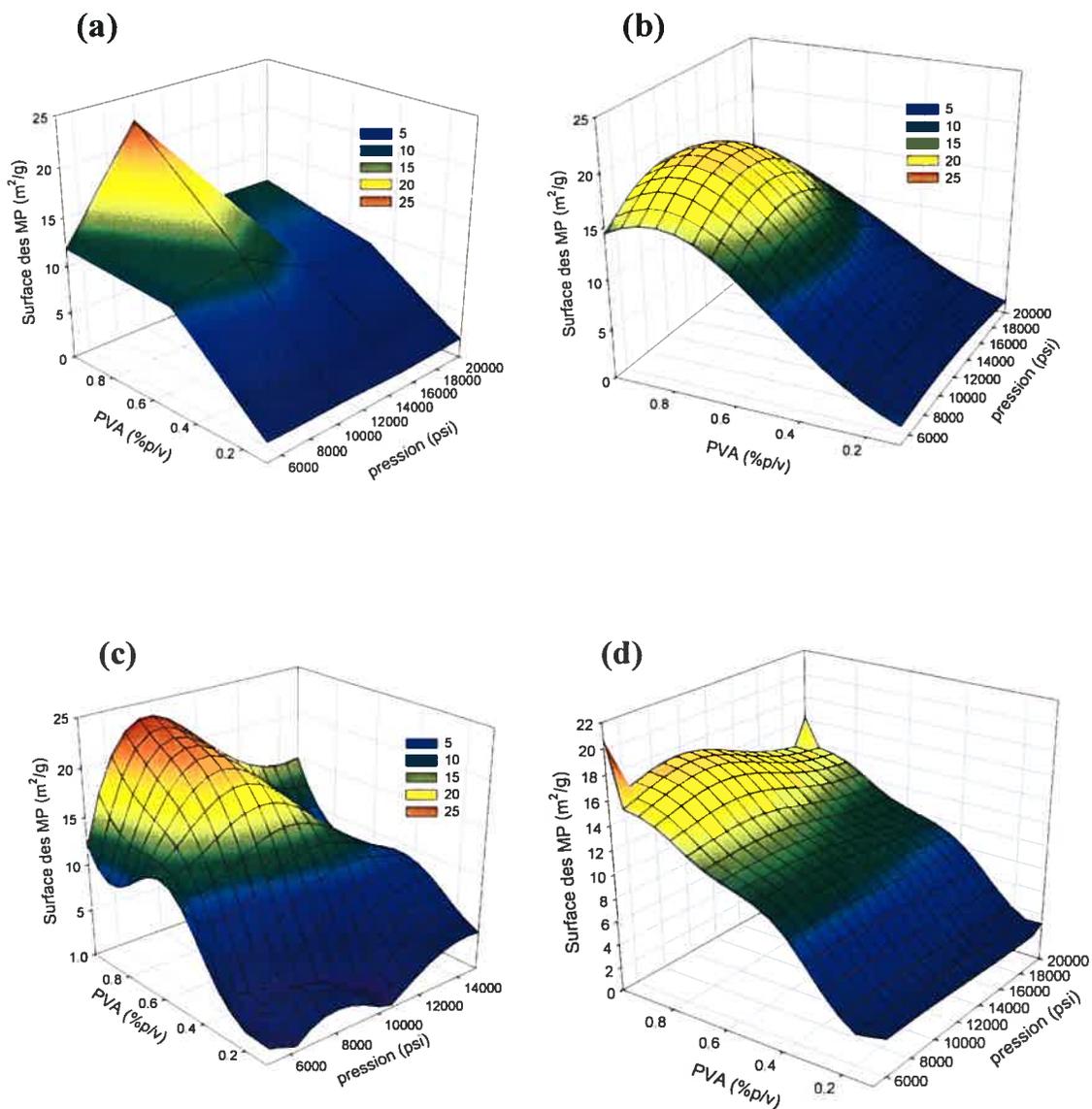


Figure 52. Surfaces de réponse obtenues par les données expérimentales et par les différents modèles pour l'effet du PVA et de la pression sur la surface des MP des NP préparées à 10% p/v de PLA

9.4. NeuroSolutions[®] : Comparaison entre différents modèles de réseaux de neurones

L'intérêt de l'utilisation de ce programme a été d'avoir un contrôle sur le réseau construit. Les pages qui suivent présentent l'effet de la variation des différents paramètres sur la performance du réseau, autrement dit, sa capacité d'apprendre et de généraliser. Les paramètres étudiés ont été l'architecture même du réseau, le nombre de neurones cachés et la nature des données d'entrée. Le nombre de cycles d'apprentissage a été fixé à 3, et le nombre d'itérations a été fixé à 1000/cycles. De plus, contrairement au NeuroShell[®] Predictor, il a été possible de présenter les deux sorties (taille et microporosité) au même réseau, ce qui a permis d'optimiser ainsi les paramètres du réseau une fois pour toutes les données.

9.4.1. Architecture du réseau

Parmi les réseaux qui peuvent être construits, sept modèles ont été choisis pour cette étude, étant les plus appropriés à la nature des données. Ces modèles présentent des complexités variables et des modes de traitement des entrées assez différents. Les réseaux choisis ont été le perceptron multicouche (PMC), le réseau à alimentation avant généralisé (AAG), le réseau modulaire, le réseau à analyse en composantes principales (ACP), le réseau CANFIS basé sur la logique floue (Co-Active Neuro-Fuzzy

Interference System), le réseau récuratif et enfin le réseau à cartes auto-organisatrices (CAO). Les figures 53-55 illustrent différentes architectures de réseaux construits durant l'apprentissage ou la prédiction, en montrant les fonctions de transfert et les moments.

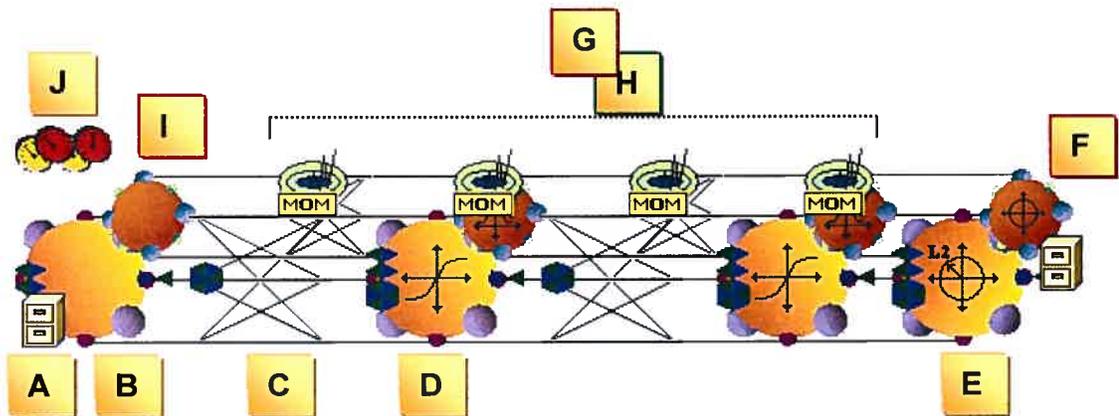


Figure 53. Réseau du type perceptron multicouche

Les éléments principaux:

- A Fichier de données : contient les entrées et les sorties désirées
- B Axon : couche d'éléments processeurs ayant une fonction de transfert d'identité, agit comme une couche de neurones d'entrée
- C synapse : connexion de 2 couches d'axon
- D Tanhaxon : couche d'éléments processeurs ayant une fonction de transfert sigmoïde ou hyperbolique, agit comme une couche de neurones cachés ou de sortie
- E Critère de l'erreur carrée, calcule l'erreur entre la sortie et le signal désiré, et ensuite le passe au réseau de la rétro propagation pour la correction de poids
- F Rétro contrôle : reçoit l'erreur et la transmet au réseau de rétropropagation
- G Axon arrière : Couche de neurones ayant une fonction de transfert d'identité, s'attache à l'axon avant pour la rétropropagation
- H Composantes de gradient de moment : augmentent la vitesse d'apprentissage
- I Contrôleurs statiques avant : contrôlent l'activation avant du réseau
- J Contrôleurs statiques arrière : contrôlent l'activation de la rétroaction

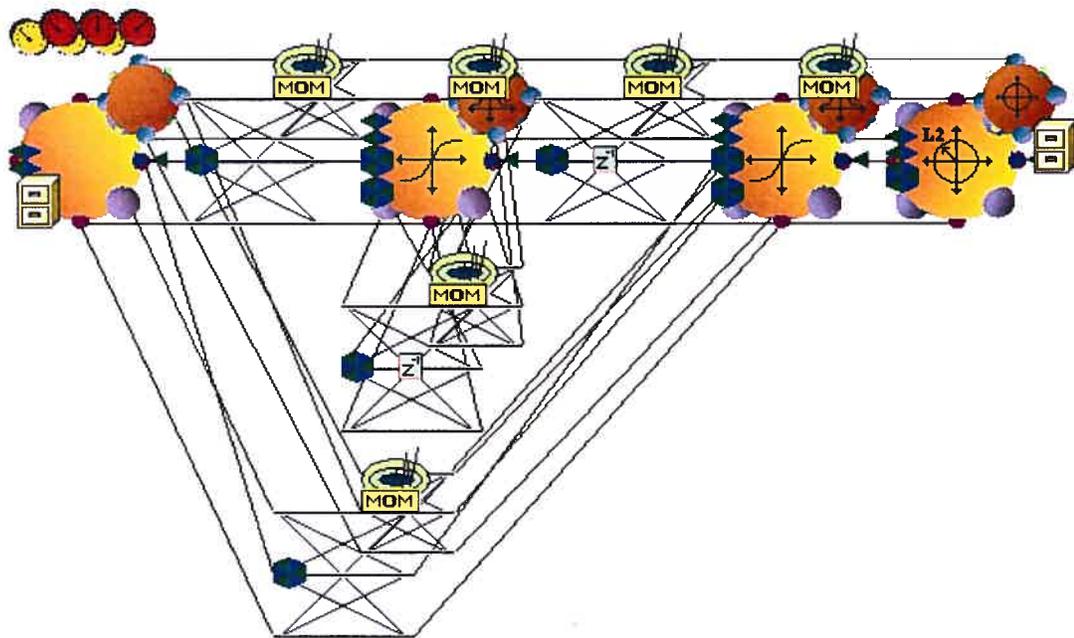


Figure 54. Réseau du type récurrent

Le réseau récurrent est basé sur une rétroaction de la couche de neurones cachés

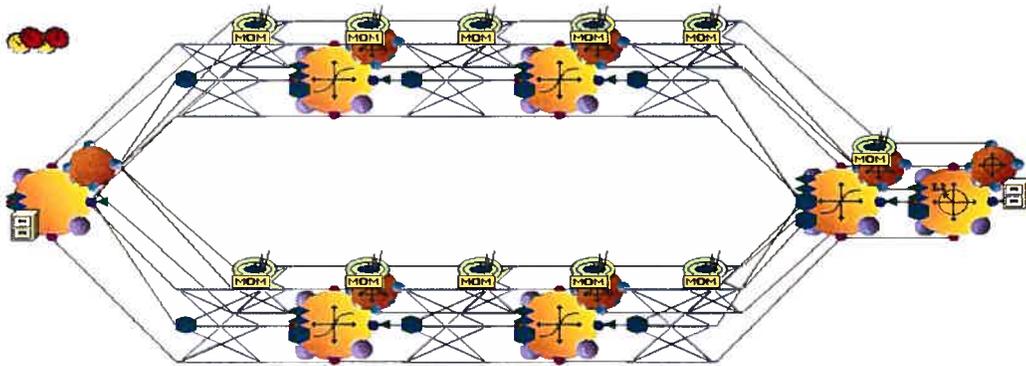


Figure 55. Réseau du type modulaire

Les entrées sont traitées en utilisant plusieurs perceptrons multicouche en parallèle, puis les résultats sont recombinaés.

Les fonctions de transfert choisies pour les neurones des couches cachées et ceux de sortie sont du type tangente hyperbolique. La raison est que cette fonction est flexible, non-linéaire, continue et différentiable. L'apprentissage par moment a été appliqué.

La figure 56 montre les valeurs prédites durant l'apprentissage par les réseaux construits selon les différentes topologies. Les prédictions s'approchaient des valeurs mesurées mais à des degrés qui différaient d'un réseau à un autre, sauf les réseaux modulaire et récuratif, qui ont fourni des données assez différentes.

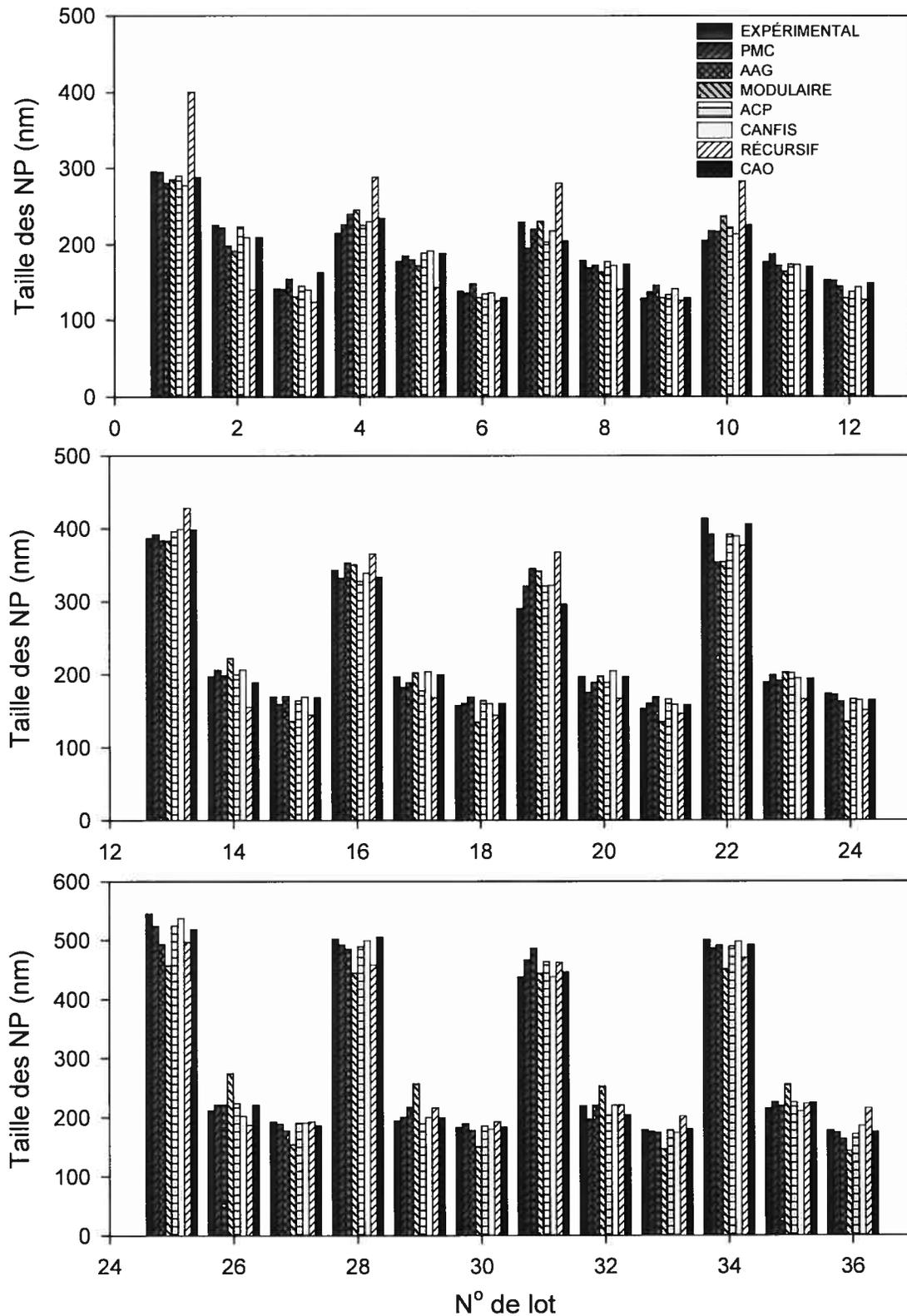


Figure 56. Valeurs de taille des NP prédites selon différents réseaux construits dans NeuroSolutions®, en comparaison avec les valeurs expérimentales

D'ailleurs, les R^2 présentés dans la figure 57 a et b confirment ces observations, étant égales à 0.90411 pour le réseau modulaire, et 0.87656 pour le réseau récursif. En revanche, le réseau CANFIS a fait preuve du meilleur apprentissage ($R^2 = 0.99758$). Ainsi la corrélation entre les valeurs expérimentales et les valeurs prédites a été obtenue dans l'ordre décroissant suivant :

CANFIS> ACP> CAO >PMC>AAG>Modulaire>Récursif.

De ce fait, les réseaux modulaire et récursif se sont révélés inappropriés pour la présente modélisation. À l'opposé, les réseaux CANFIS, ACP et CAO ont représenté les architectures les plus réussies, il s'avère donc utile de décrire brièvement leurs particularités:

Les excellentes capacités d'apprentissage et de prédiction du réseau CANFIS seraient le résultat de l'intégration d'un modèle basé sur la logique floue, à un modèle neuronal modulaire. La logique floue met en avant une notion de raisonnement basée sur une fonction d'appartenance entre les entrées et les sorties. Ce concept permet donc d'établir des relations complexes entre les variables d'une façon continue, et non pas basée sur le principe binaire (0 ou 1) du *tout ou rien* (Jamshidi, 2003). Par conséquent, le modèle neuro-flou semble accentuer la synergie entre la logique floue et le mode de fonctionnement neuronal, et faire le lien entre la modélisation numérique et la modélisation symbolique.

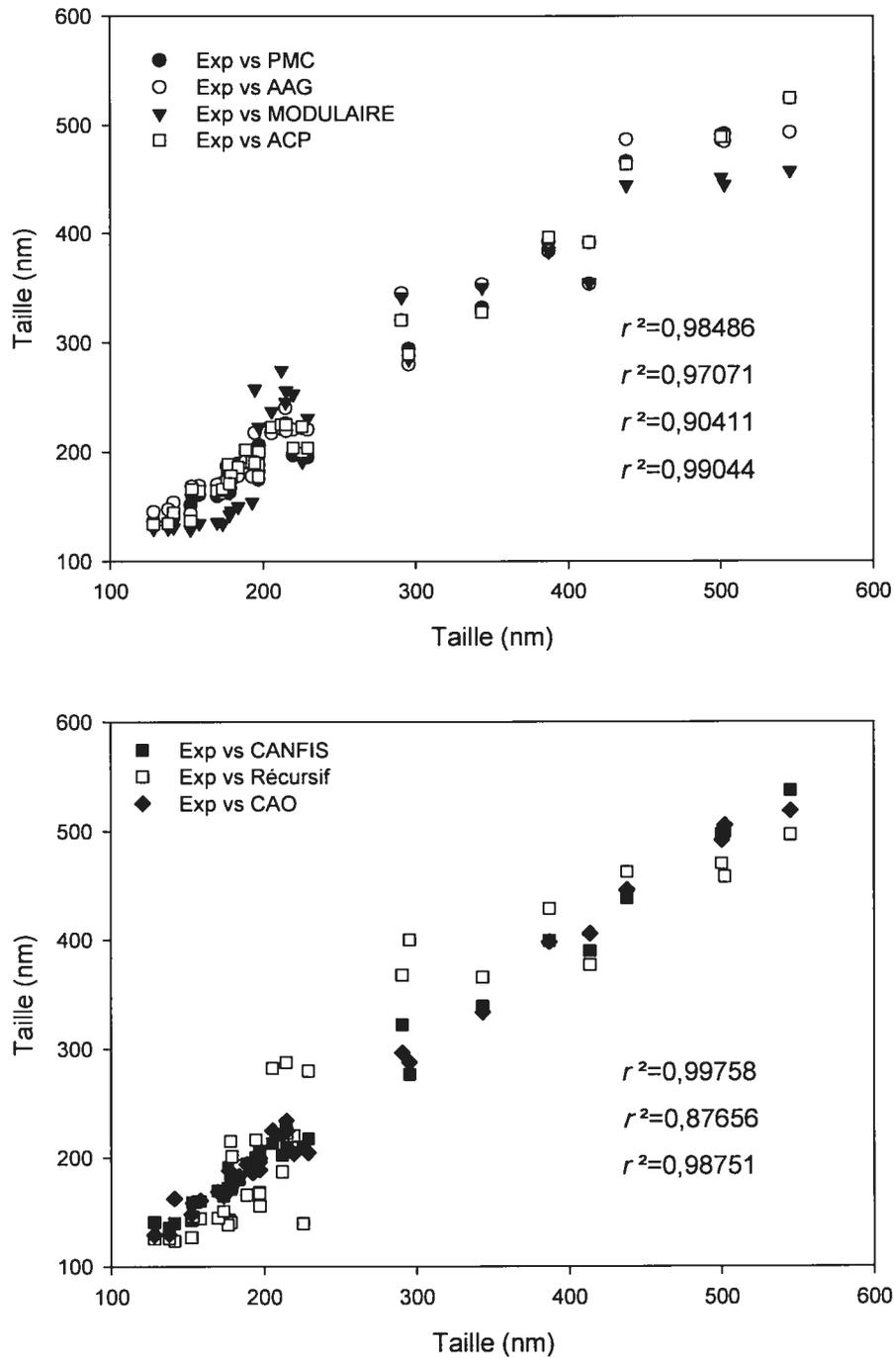


Figure 57. Corrélation entre les valeurs expérimentales de taille et celles prédites par différents réseaux construits dans NeuroSolutions®

Les deux réseaux ACP et CAO sont basés sur l'extraction des caractéristiques de données. Le réseau ACP combine l'apprentissage supervisé et non supervisé dans la même topologie. Durant l'apprentissage non supervisé, il trouve un ensemble de caractéristiques non corrélées (composantes principales) à partir des entrées. Ensuite, un PMC intégré effectue une classification non linéaire à partir de ces composantes (apprentissage supervisé). Ce réseau converge rapidement. Comme le nom l'indique, le réseau CAO, ou cartes auto-organisatrices, réorganise l'espace de données : la dimensionnalité est réduite mais la structure de l'espace reste la même. Ce réseau constitue une alternative à l'approche ACP classique. Il n'utilise pas les données d'entrée et de sortie pour son apprentissage ; en revanche, il dresse à l'instant même un plan global de l'ensemble, ce qui est considéré comme une excellente méthode d'identification des relations entre les variables (Agatonovic-Kustrin and Beresford, 2000).

En partant de là, ces deux modèles fournissent un apprentissage rapide et efficace.

Le réseau récuratif a été le moins performant ; quoiqu'il soit considéré comme un modèle puissant, il est difficile à apprendre et démontre une instabilité ; en conséquence, des cycles supplémentaires d'entraînement doivent être appliqués de manière à atteindre un niveau d'apprentissage acceptable.

Les observations précédentes mettent en évidence l'intérêt d'essayer systématiquement plusieurs architectures de réseau, comme une étape essentielle lors de la modélisation d'un nouveau procédé.

9.4.2. Nombre de neurones cachés

L'influence du nombre de neurones cachés sur l'apprentissage du réseau de neurones a été étudiée en utilisant un réseau Perceptron Multicouche (PMC) avec les données de la taille. Le nombre de neurones cachés a été augmenté graduellement, commençant par quatre neurones qui est le nombre par défaut du programme. Deux cas ont été étudiés : Le premier est l'apprentissage, et le deuxième est la prédiction ou la généralisation. Dans le premier cas toutes les données ont été utilisées pour entraîner le réseau, tandis que dans le deuxième cas, les données ont été divisées en données d'apprentissage et données de vérification. L'erreur carrée moyenne, E_{CM} , et le coefficient de détermination multiple, R^2 , ont été suivis en fonction du nombre de neurones, Figures 58 et 59, respectivement. Dans le premier cas, une diminution évidente de E_{CM} , ainsi qu'une augmentation du R^2 ont été observées avec une augmentation du nombre de neurones cachés jusqu'à 15 neurones. Au-delà de ce nombre, l'ajout de neurones supplémentaires a nuit à la capacité de l'apprentissage. L'augmentation de neurones cachés de 15 à 30 a donc produit une augmentation de l'erreur et une diminution de la valeur de R^2 , tel que le

montrent les 2 figures. Ce comportement est attribué à un ralentissement de l'apprentissage (Hussain, Xuanqiang *et al.*, 1991). Cependant les résultats ont été différents dans le deuxième cas où la capacité de prédiction est mesurée. En effet, pour la prédiction, nous avons commencé par un neurone caché, auquel d'autres neurones ont été ajoutés jusqu'au maximum de 30 neurones. Le résultat obtenu est illustré par la figure 60. Une diminution de l'erreur carrée moyenne a été observée avec l'augmentation du nombre de neurones cachés de 1 à 4 neurones, après lesquels l' E_{CM} a commencé à augmenter de nouveau : une tendance qui est bien différente de celle obtenue durant l'apprentissage. Cela mène à déduire que même si une augmentation du nombre de neurones cachés renforce la capacité de l'apprentissage d'un côté; elle nuit à la capacité de prédiction puisqu'elle cause une mémorisation, le réseau devient alors incapable de prédire avec précision les sorties pour des entrées suffisamment différentes de celles 'vues' durant l'apprentissage.

Afin de confirmer les résultats obtenus, nous avons répété l'étude en variant le réseau; ainsi nous avons utilisé un réseau ACP. La même tendance a été observée (Figure 60).

Nous tenons à mentionner que le nombre optimal de neurones cachés n'a pas obéi à une règle précise, telle que la théorie de Kolmogorov, qui avait été rapportée dans plusieurs travaux. Ce nombre ne peut être prédit ou calculé à l'avance, mais il est exclusivement atteint par l'essai. De plus, il ne dépend pas de l'architecture du réseau.

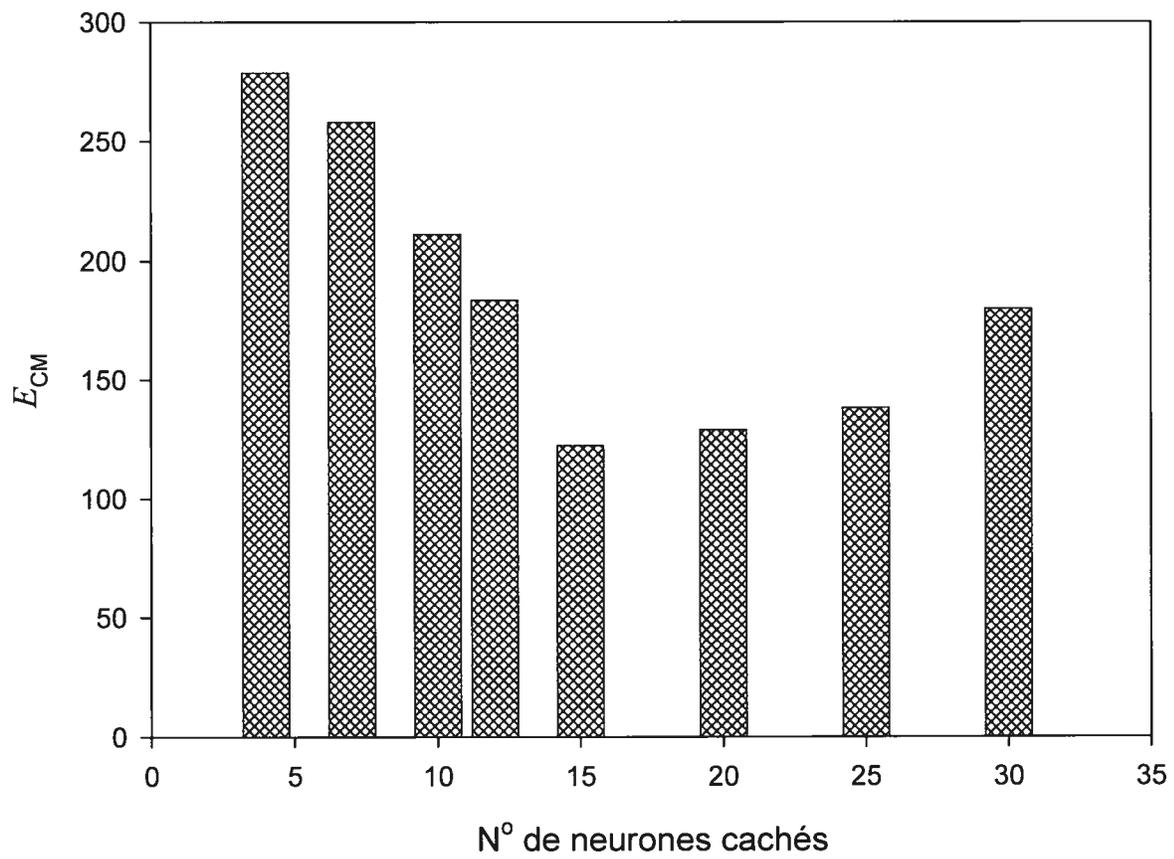


Figure 58. Changement de l'erreur carrée moyenne (E_{CM}) en fonction du nombre de neurones cachés durant l'apprentissage avec le réseau du type PMC

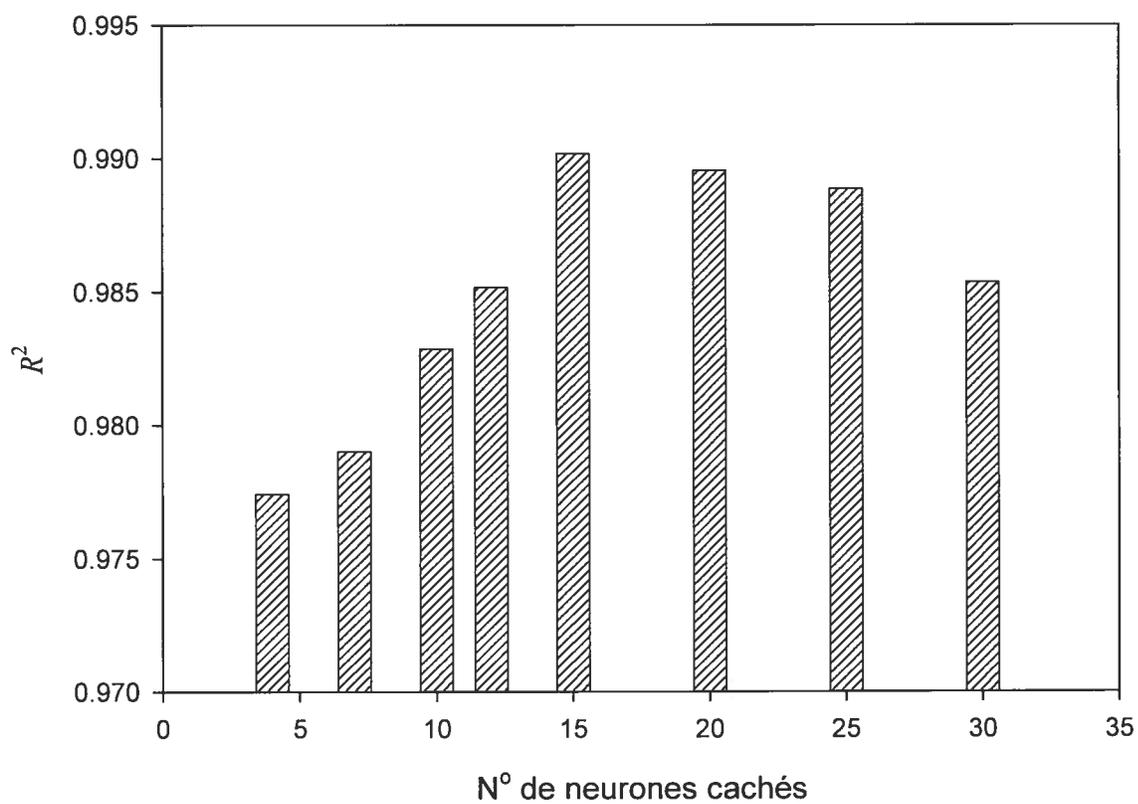


Figure 59. Changement du coefficient de détermination multiple (R^2) en fonction du nombre de neurones cachés durant l'apprentissage avec le réseau du type PMC

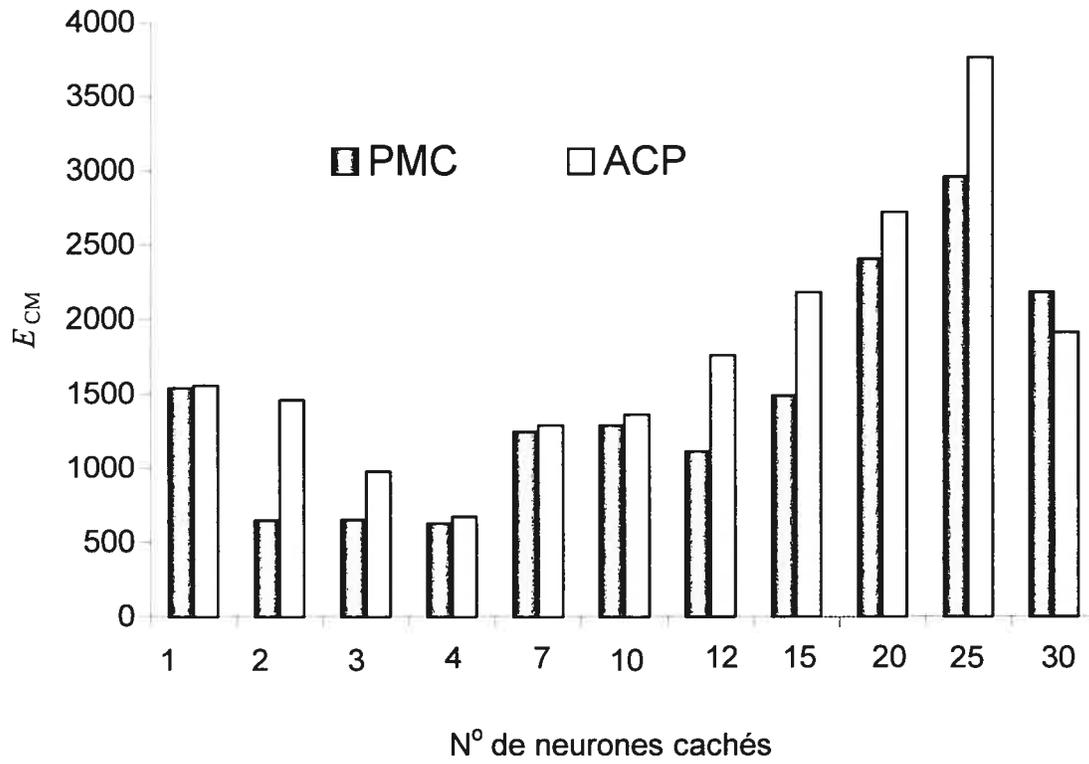


Figure 60. Changement de l' E_{CM} en fonction du nombre de neurones cachés durant la prédiction avec les réseaux PMC et ACP

9.4.3. Qualité des données d'apprentissage

9.4.3.1. Effet de la randomisation

Lorsqu'elle est activée, cette fonction permet un réarrangement des données de l'apprentissage d'une manière complètement aléatoire (à laquelle l'utilisateur n'a pas accès), avant de les présenter au réseau. Nous avons comparé les données prédites sans et avec randomisation des entrées, et ceci pour les trois réseaux : PMC, ACP et CANFIS, de même que celui construit dans NeuroShell[®] Predictor. La figure 61 montre l'erreur carrée moyenne pour chaque essai.

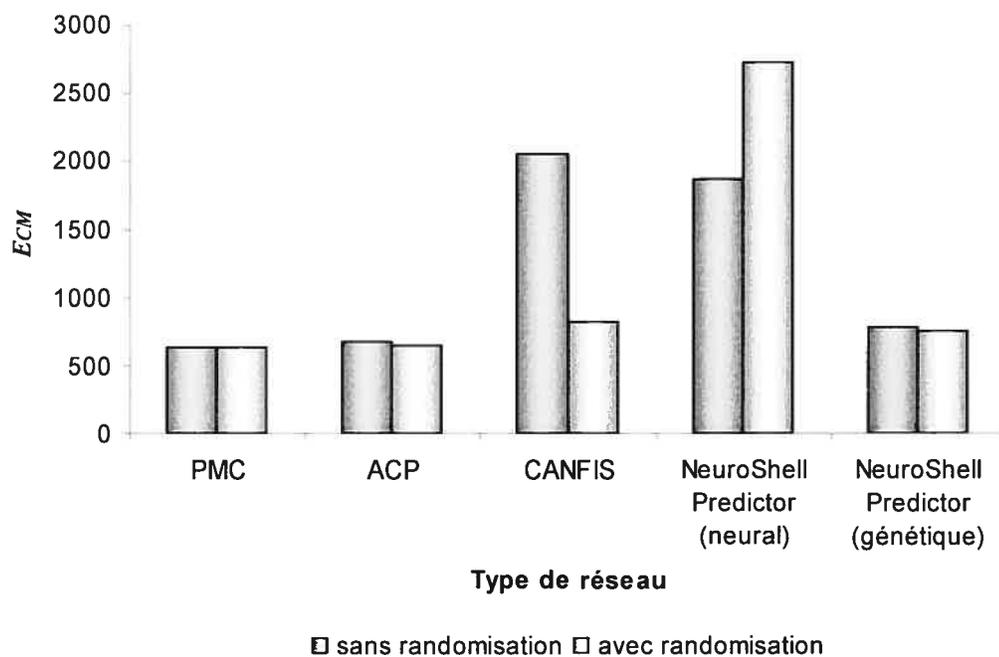


Figure 61. L'erreur carrée moyenne (E_{CM}) durant l'apprentissage avec et sans randomisation pour les réseaux PMC, ACP, le réseau CANFIS et le NeuroShell Predictor[®]

Les réseaux testés ont démontré des réponses variables vis-à-vis de la randomisation, Aucune différence n'a été observée pour le PMC et l'ACP, de même que le modèle génétique de NeuroShell[®] Predictor, ce qui indique que ces réseaux sont insensibles par rapport à l'arrangement des données d'apprentissage. Par contre, le réseau CANFIS a montré une amélioration de lissage, avec une E_{CM} de 2060, diminuant à 827 avec la randomisation. De par sa nature, ce réseau a prouvé une meilleure capacité de généralisation. Quant au modèle neuronal de NeuroShell[®] Predictor, il a montré une augmentation dramatique de l' E_{CM} de 1867 à 2724, ce qui signifie moins de flexibilité par rapport à la structure des données de l'apprentissage.

En effet la randomisation est considérée comme un défi pour les capacités d'apprentissage et de généralisation d'un réseau de neurones, puisque les données ne lui sont pas présentées selon un plan statistique rigide (Bourquin, Schmidli *et al.*, 1998b).

9.4.3.2. Effet de la validation croisée

Les ensembles (entrées-sorties) peuvent être introduits au réseau selon plusieurs modes. Dans le cas de la validation croisée, un ensemble de données prédéterminé est omis de l'apprentissage, et il est utilisé pour la validation pendant le déroulement de l'apprentissage, tel qu'illustré dans la figure 62. Les différences entre les sorties du réseau et les valeurs désirées de l'ensemble de validation sont suivies, et l'apprentissage est arrêté lorsque ces différences atteignent leur minimum.

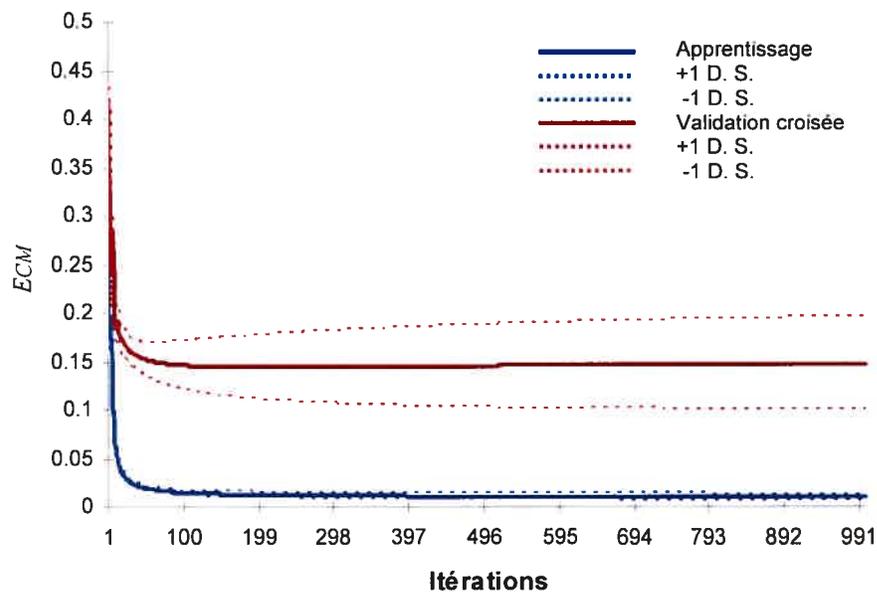


Figure 62. Erreur carrée moyenne pour trois cycles d'apprentissage avec une validation croisée

Dans cette étude, les données de surface de micropores ont été classifiées en données d'apprentissage, de validation croisée, et de vérification (ou prédiction). Lorsque les prédictions sont comparées sans et avec la validation croisée pour différents types de réseaux, nous observons une amélioration significative des capacités de prédiction, comme le montre les différences existant dans les valeurs de l'erreur carrée moyenne à la figure 63 (à l'exception du réseau CANFIS et le réseau récursif, où la différence est faible).

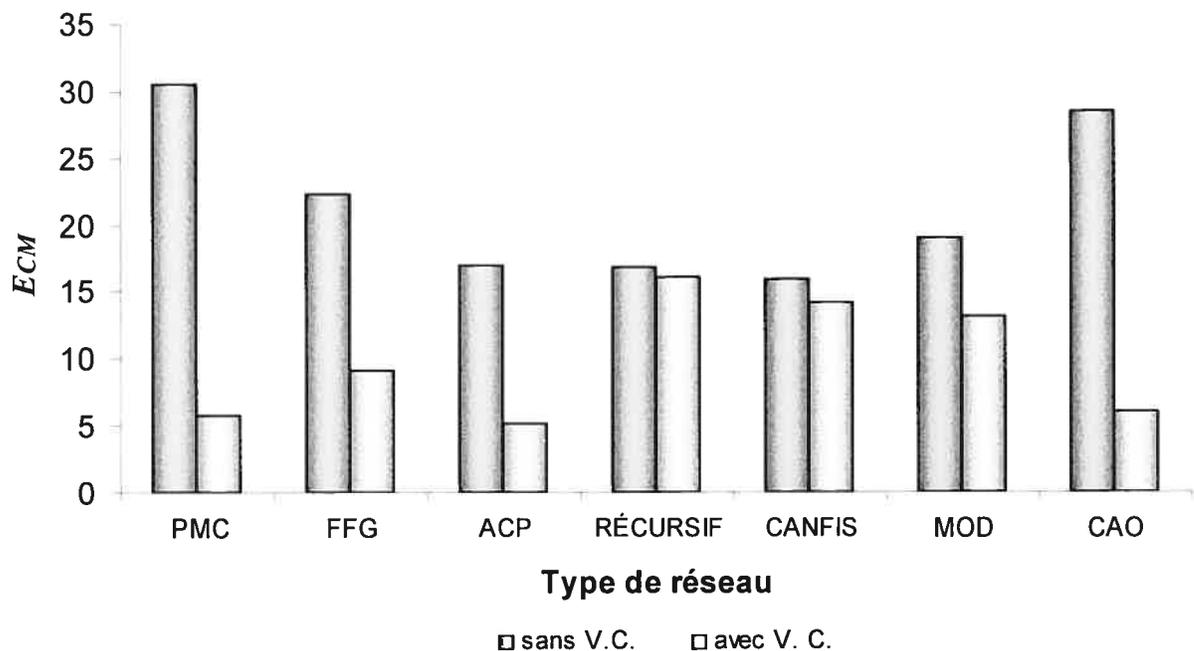


Figure 63. Effet de la validation croisée sur la performance du réseau

Cette technique fait preuve d'une grande efficacité et elle constitue la base de la méthode appelée '*leave-one-out*' (Sun, Peng *et al.*, 2003). Dans cette méthode, le réseau est entraîné en utilisant toutes les données d'apprentissage sauf une seule donnée utilisée pour la validation. Puis une autre donnée est exclue de l'apprentissage et utilisée pour la validation, etc. Ce protocole est adopté lorsque l'ensemble de données est relativement petit, puisqu'il permet au réseau d'utiliser virtuellement toutes les données pour son apprentissage, tout en assurant une validation efficace.

X. ÉTUDE DE LA MICROSTRUCTURE DES NANOPARTICULES

10.1. Étude de la microporosité

La figure 64 montre une distribution de taille des micropores dans un intervalle de 3 à 20 Å pour des nanoparticules préparées avec 5%, 7.5% et 10% p/v de PLA.

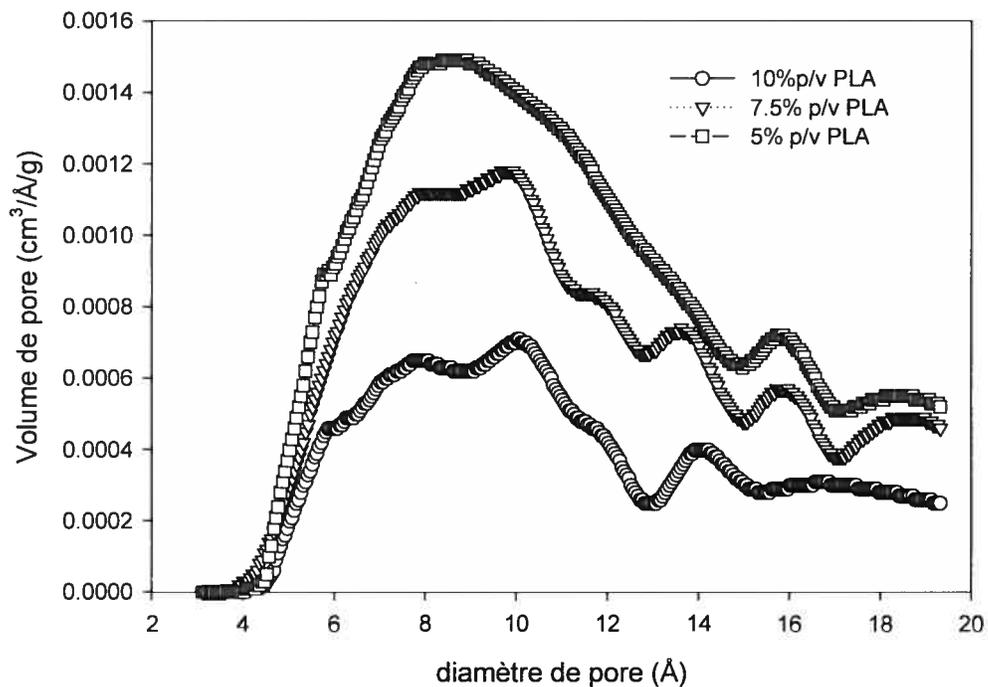


Figure 64. Distribution de taille des micropores pour des lots de NP de PLA préparés à des différentes concentrations de polymère.

La figure montre une plus grande microporosité pour le lot préparé à 5% p/v de PLA, suivi par le lot à 7.5% p/v de PLA, et enfin celui à 10% p/v de PLA. Cette propriété est liée à la différence de viscosité entre les

globules de la double émulsion parmi les trois lots, et par conséquent, à la vitesse d'évaporation du solvant organique. Ainsi une concentration de polymère de 5% p/v produit des globules moins visqueux, qui vont mener à une structure polymérique plus poreuse (Yan, Resau *et al.*, 1994). Notons que la viscosité de départ a été de 2.08(0.02), 2.51(0.01) et 3.00(0.04) cp pour les solutions de PLA/dichlorométhane à 5%, 7.5% et 10% p/v respectivement. Les données de porosité et de microporosité des nanoparticules provenant des trois lots sont regroupées dans le tableau 17.

	5% p/v de PLA	7.5% p/v de PLA	10% p/v de PLA
Surface BET (m ² /g)	35.93	15.36	8.45
Volume total de pore (cm ³ /g)	0.5177	0.3112	0.2556
Volume de micropores (cm ³ /g)	0.0140	0.0108	0.0062
Taille moyenne de micropore (Å)	8.63	9.83	10.08

Tableau 17. Données de porosité pour les lots préparés à différentes concentrations de PLA

L'examen de ce tableau met en évidence des valeurs nettement différentes entre les trois lots, aussi bien pour le volume que pour la taille

moyenne des micropores. Notons que les données soulignent également des différences dans la porosité totale. Ainsi les volumes de pores et de micropores des nanoparticules à 5% p/v de PLA représentent le double de ceux des nanoparticules à 10% p/v de PLA. Cela explique d'ailleurs la raison pour laquelle la concentration du polymère influait sur la surface des micropores, comme il a été déjà présenté dans le chapitre 9 sur la modélisation avec les RNA.

Des observations similaires ont par ailleurs été décrites pour les microsphères. Li et ses collaborateurs (Li, Anderson *et al.*, 1995) ont constaté qu'une augmentation de la concentration de la solution polymérique produit une élimination rapide du solvant organique et accélère la solidification à la surface des microsphères. Ainsi les chaînes polymériques à l'interface atteignent un état vitreux qui va inhiber la continuation de l'évaporation du solvant. Ces auteurs ont également noté que la porosité pourrait résulter de la diffusion de la phase aqueuse externe vers l'intérieur des microsphères, et que la solidification rapide diminuerait également ce phénomène.

Cependant, Tsai et ses collaborateurs ont constaté un effet opposé en observant une augmentation de la porosité des microcapsules avec l'augmentation de la concentration du polymère (Tsai, Jong *et al.*, 2001). Selon cette étude, une accélération de la solidification diminuerait les possibilités d'alignement des chaînes polymériques, créant ainsi plus d'espace et donnant lieu à une microcapsule plus poreuse. Pourtant, cette

hypothèse ne tient pas compte de l'augmentation de la viscosité de la phase organique qui accompagne l'augmentation de la concentration du polymère, ce qui produirait une matrice plus dense.

La figure 65 met en relief l'effet du PVA sur la microporosité des nanoparticules. Une augmentation de la concentration du tensioactif entraîne une augmentation du volume des micropores mesurant entre 4 et 20 Å.

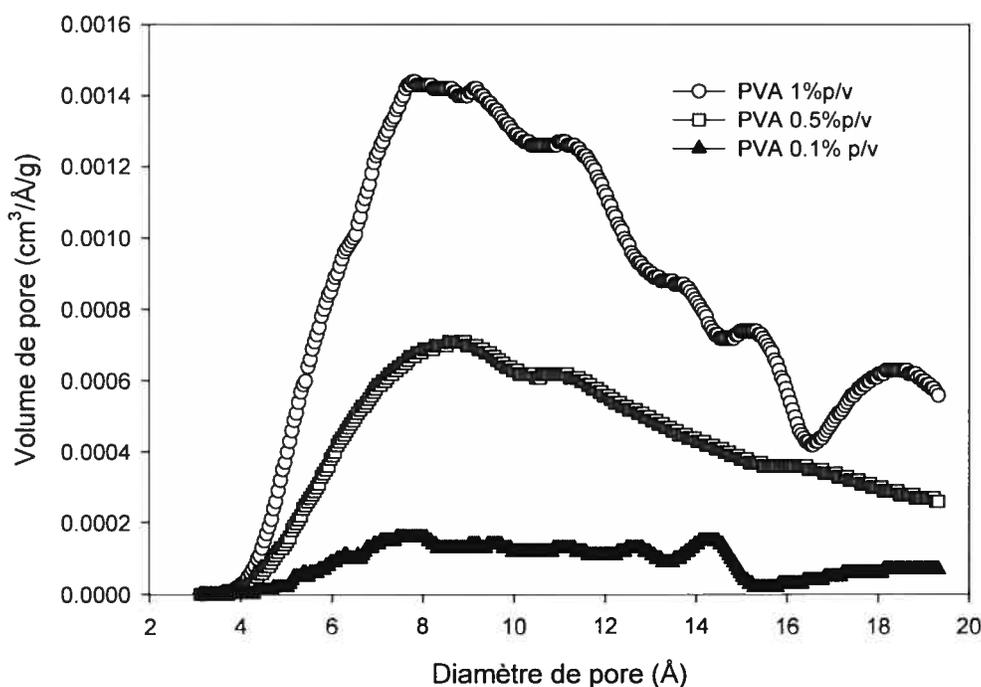


Figure 65. Distribution de taille des micropores pour des lots de NP préparés en utilisant différentes concentrations de PVA.

Ce comportement est expliqué par la formation d'une couche résiduelle de PVA à la surface des nanoparticules dont la densité augmente avec la concentration du tensioactif (Sahoo, Panyam *et al.*, 2002; Galindo-

Rodriguez, Allémann *et al.*, 2004). Par conséquent, on observe un décalage de la distribution de pores vers les plus petites tailles, comme il a été déjà démontré par la figure 30 (Chapitre 8). Une discussion plus détaillée de l'effet du PVA résiduel sur les caractéristiques de surface des nanoparticules sera présentée dans la section 10.2.

Par contre, des différences relativement faibles dans la distribution de taille des micropores sont obtenues en variant la pression d'homogénéisation (Figure 66). Notons néanmoins qu'une pression de 20000 psi est associée à une microporosité réduite, et à une distribution de micropores plus homogène, comparée à celle de 5000 psi.

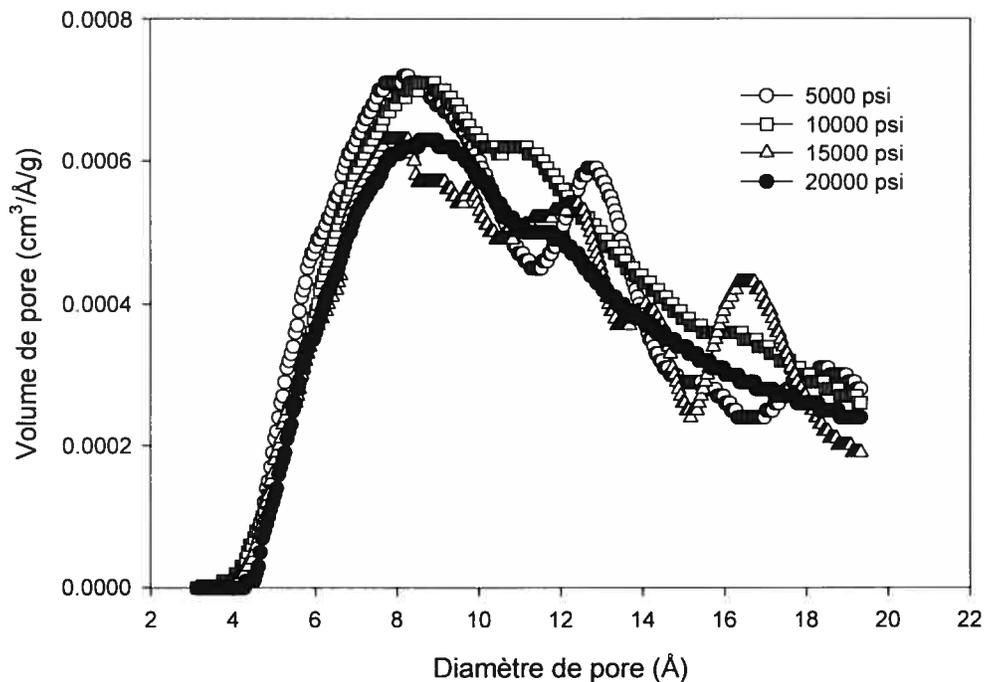


Figure 66. Distribution de taille des micropores pour des lots de NP préparées en utilisant différentes valeurs de pression d'homogénéisation.

Yoncheva et ses collaborateurs ont constaté une diminution significative de la vitesse de libération à partir des nanoparticules de PLGA lorsque la pression d'homogénéisation a augmenté de 100 à 500 bar, malgré la diminution de taille et l'augmentation de la surface spécifique qui favoriserait la libération. Ils ont attribué ce comportement à la formation d'une matrice polymérique plus dense sous l'effet de l'homogénéisation (Yoncheva, Vandervoort *et al.*, 2003).

10.2. Caractéristiques de surface (Dimension fractale de Neimark)

*La science de la réalité ne se contente plus du comment
phénoménologique ; elle cherche le pourquoi mathématique
Gaston Bachelard*

Contrairement aux microsphères dont la surface peut être facilement étudiée à l'aide des techniques microscopiques, la caractérisation de la surface des nanoparticules représente un défi majeur. Ainsi nous avons tenté de quantifier les aspects de surface des nanoparticules de PLA en utilisant la géométrie fractale et les données d'adsorption de gaz.

L'application de la méthode thermodynamique (méthode de Neimark) sur une échelle de quelques Angströms a permis de calculer des dimensions qui reflètent la rugosité de surface due à l'arrangement et l'enchevêtrement des chaînes; un aspect difficile à élucider avec la plupart des techniques microscopiques. Les résultats sont illustrés dans la figure 67, montrant l'influence du PVA et de la pression d'homogénéisation sur la

dimension fractale D_N calculée pour des nanoparticules préparées à 5% et 10% p/v de PLA (Fig. 67a et 67b respectivement). Cette figure permet d'en dégager quelques observations importantes :

Tout d'abord, on remarque une diminution de la D_N moyenne avec une augmentation de la concentration du polymère de 5% à 10% p/v ; ceci est en accord avec les données de microporosité, puisque les micropores présents à la surface contribuent à sa rugosité.

Ensuite, une augmentation de la D_N (de 2.391 à 2.526) avec l'augmentation de la concentration du PVA (de 0.1% à 1% p/v) est clairement démontrée (Fig. 67a). Ce résultat est expliqué par la quantité résiduelle de PVA qui persiste à la surface des nanoparticules malgré le rinçage et qui augmente avec la concentration du PVA dans la phase aqueuse (Sahoo, Panyam *et al.*, 2002). Le PVA utilisé dans cette étude est partiellement hydrolysé (88%) ce qui lui confère un caractère amphiphile à cause de la présence de groupements acétate (partie hydrophobe) avec les groupements hydroxyle (partie hydrophile) tout le long des chaînes. Cela signifie que le PVA sera adsorbé et orienté à l'interface liquide/liquide pour réduire la tension de surface et stabiliser la dispersion (Galindo-Rodriguez, Allemann *et al.*, 2004).

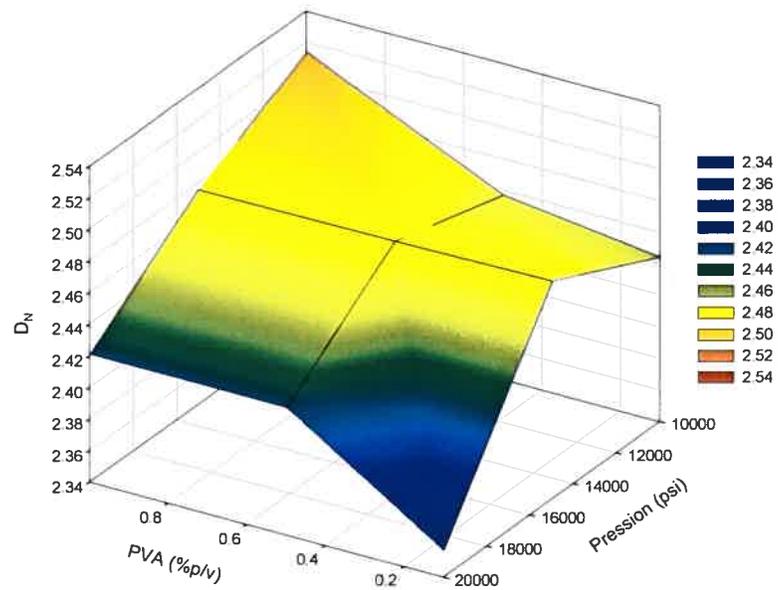
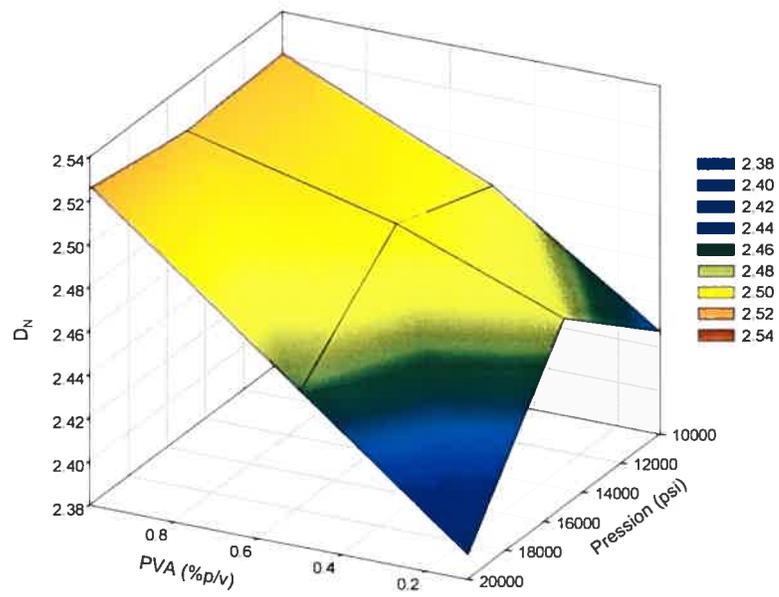


Figure 67. Influence du PVA et de la pression d'homogénéisation sur la dimension fractale de Neimark pour des lots de NP préparés avec 5% p/v (a) et 10% p/v (b) de PLA

En effet, l'interface huile/eau s'avère être une région d'adsorption irréversible pour les molécules du PVA (Boury, Ivanova *et al.*, 1995), comme le montre le schéma suivant (Figure 68).

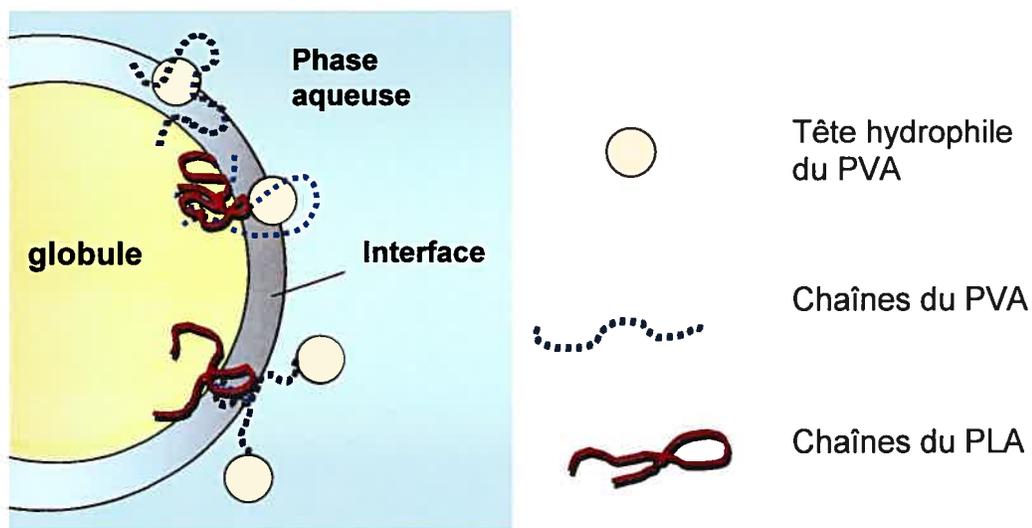


Figure 68. Schéma montrant le PVA résiduel à l'interface huile/eau et son interpénétration avec les chaînes du PLA, adapté de (Galindo-Rodriguez, Allémann *et al.*, 2004)

Selon cette illustration, les segments hydrophobes des molécules du PVA adsorbées à la surface des globules de la double émulsion interpénètrent les chaînes du PLA, un phénomène ayant lieu surtout durant l'évaporation du solvant organique. Après la lyophilisation, cette couche de PVA formant des boucles à la surface des nanoparticules est responsable de lui

conférer un degré de rugosité; et plus la concentration du PVA augmente, plus cette couche devient dense, et les nanoparticules plus rugueuses.

Finalement, une diminution évidente de la dimension fractale est observée avec l'augmentation de la pression d'homogénéisation, surtout entre 15000 et 20000 psi, où D_N diminue de 2.478 à 2.357 (Fig. 67b). Cela résulte du cisaillement appliqué à la surface des nanoparticules, qui aurait pour effet de diminuer la projection spatiale des chaînes polymériques et de rendre leur arrangement plus linéaire.

10.3. Caractérisation de la structure interne : Analyse de la distribution de taille des pores

Cette analyse a été effectuée sur des nanoparticules de PLA durant leur dégradation sur une période de 17 jours dans un milieu aqueux à 37°C et un pH de 7.4. Deux types de mesure ont été calculés; la dimension fractale de la distribution de taille des pores (D_{DTP}) et la lacunarité (L).

10.3.1. Mesure de la dimension fractale

La méthode choisie pour le calcul de la dimension fractale à partir des données d'adsorption de gaz est celle basée sur la distribution de taille des pores (équation 20), pour calculer la dimension D_{DTP} . Ce choix est justifié par la possibilité de coupler et/ou comparer cette dimension fractale à la lacunarité.

Le tableau 20 résume le changement de D_{DTP} qui accompagne la dégradation des nanoparticules du jour 0 jusqu'au jour 17. Il met en évidence une augmentation temporaire de D_{DTP} durant le premier jour, suivie par une diminution graduelle tout au long de la dégradation, et enfin par une augmentation au jour 17. L'augmentation initiale est due à la pénétration du milieu de dégradation à travers la matrice avec la formation de nouveaux pores et canaux de tailles variables.

Temps (jours)	Dimension fractale Moyenne \pm Déviation standard
0	2.867 \pm 0.010
1	2.931 \pm 0.007
3	2.882 \pm 0.012
6	2.957 \pm 0.001
10	2.858 \pm 0.004
14	2.748 \pm 0.020
17	2.655 \pm 0.001

Tableau 18. Changement de la dimension fractale D_{DTP} durant la dégradation

Notons qu'une augmentation de la surface spécifique et de la porosité des nanoparticules durant la dégradation a été déjà décrite dans le chapitre 8.

Cependant cet effet est rapidement aboli avec la continuation de la pénétration du milieu de dégradation, ce qui mène à la coalescence de pores, puis la désagrégation de la matrice entraînant ainsi une diminution de la dimension fractale. Finalement, une distribution de taille des pores est créée de nouveau avec la dégradation progressive des morceaux désagrégés ce qui explique l'augmentation de la dimension fractale de nouveau au jour 17.

10.3.2. Mesure de la lacunarité

Le calcul de la lacunarité a été basé sur une modification de la méthode du calcul des moments illustrée dans la méthodologie, en utilisant les mêmes données de distribution de taille des pores des nanoparticules durant la dégradation. Ainsi les moments de premier et deuxième ordre ont été calculés selon les équations:

$$M_1 = \sum V_{\text{int}} P \quad \text{Équation 40}$$

$$M_2 = \sum (V_{\text{int}})^2 P \quad \text{Équation 41}$$

où V_{int} est le volume correspondant à chaque classe de pores, et P est la probabilité correspondante. La lacunarité L est alors définie selon l'équation

$$L = \frac{M_2}{(M_1)^2} \quad \text{Équation 42}$$

Le tableau 21 résume les valeurs de la lacunarité tel qu'elles ont évolué durant la dégradation.

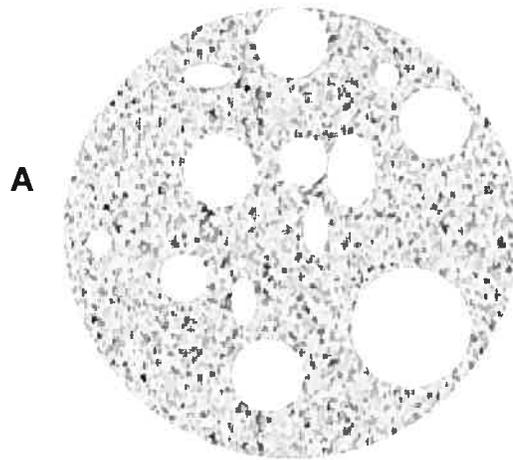
jour	M_1	M_2	L
0	0.0356	0.0056	4.4012
1	0.0327	0.0035	4.8082
3	0.0280	0.0038	4.8713
6	0.0338	0.0048	4.2197
10	0.0258	0.0029	4.3541
14	0.0212	0.0020	3.3572
17	0.0217	0.0019	4.0921

Tableau 19. Changement des moments et de la lacunarité des nanoparticules durant la dégradation

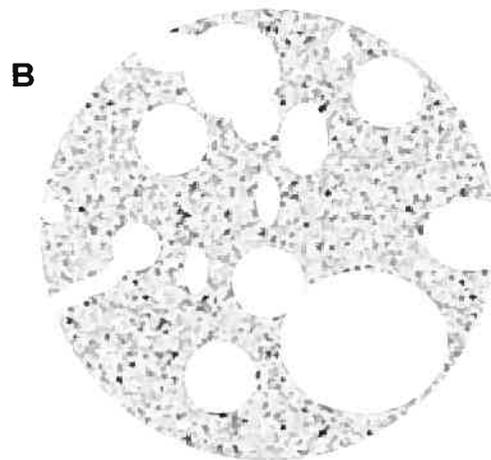
Bien que les différences entre les valeurs soient relativement faibles, il est possible d'observer une augmentation de la lacunarité avec la formation de nouveaux pores et canaux (jour 1 jusqu'au jour 3), cela est associé au changement survenu à la taille des pores (augmentation) et à leur distribution (création de nouveaux pores, fusion de pores déjà existants). Après cela, la lacunarité a démontré une diminution accompagnée de légères fluctuations pendant toute la période de dégradation étudiée, ce qui pourrait être attribué à la perte de masse.

L'interprétation de l'évolution de la dimension fractale et la lacunarité est schématiquement représentée par la figure 69, et elle est en accord avec la littérature (Armatas, Kolonia *et al.*, 2002).

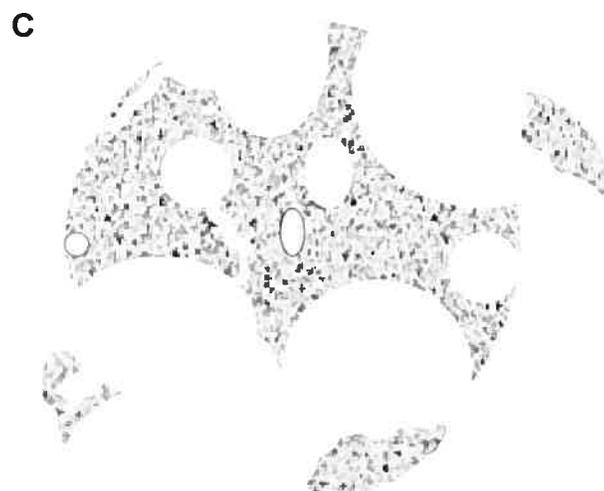
À partir de ces déterminations, nous pouvons déduire que les outils utilisés ont pu expliquer des changements de la structure interne des nanoparticules. Ils pourraient être appliqués pour étudier d'autres phénomènes liés à l'érosion, ou de caractériser des vecteurs préparés de différents polymères, donc présentant probablement différentes textures et structures.



La formation de nouveaux pores et canaux (B) cause une augmentation de la dimension fractale ainsi que la lacunarité



La lacunarité continue à augmenter, tandis que la dimension fractale diminue durant la coalescence de pores



Suite à la désagrégation des nanoparticules et à la perte de masse, les deux types de mesure diminuent.

Figure 69. Représentation schématique de la dégradation d'une nanoparticule, montrant la formation de pores et la désagrégation.

CONCLUSION

*Il nous faut peu de mots pour
exprimer l'essentiel.*

Paul Eluard

Dans cette étude, nous avons utilisé l'homogénéisation à haute pression qui produit une énergie de cisaillement, pour préparer des nanoparticules par double émulsion à partir de différents polymères biodégradables. Ces nanoparticules ont réussi à encapsuler un modèle d'ADN, comme un exemple d'une macromolécule hydrophile. De plus, il a été possible d'atteindre des tailles aussi petites que 100-300 nm et ce, en l'absence d'un tensioactif, dont les traces peuvent être relativement toxiques, ce qui prouve une grande efficacité de la technique d'émulsification utilisée. Les nanoparticules préparées ont fourni une libération contrôlée de l'ADN encapsulé. Les résultats de la dégradation et de la libération ont suggéré que cette dernière ait eu lieu essentiellement par diffusion à travers les pores, plutôt que par érosion de la matrice polymérique.

Une caractérisation de la taille et de la porosité des nanoparticules a illustré une théorie thermodynamique des polymères: le concept du *blob*, introduit par de Gennes en 1979, et qui permet de comprendre différents comportements des particules polymériques.

Le design et le développement des nanoparticules ont été réalisés par deux approches distinctes : La première approche a consisté à identifier et comprendre les effets de quelques variables choisies sur les propriétés des nanoparticules ; tandis que la deuxième approche a été de modéliser le procédé en utilisant les réseaux de neurones artificiels.

Tout d'abord, nous avons décrit l'influence de la concentration du polymère dans la phase organique, et de la concentration du tensioactif dans la phase aqueuse externe, qui constituent deux facteurs de formulation, de même que l'effet de la pression d'homogénéisation, qui représente une variable de procédé, sur la taille et la porosité des nanoparticules obtenues. Cela a été achevé en variant un facteur à la fois. Quant aux réseaux de neurones, nous avons utilisé deux programmes : NeuroShell[®] Predictor et NeuroSolutions[®], ainsi que deux modèles statistiques : une régression linéaire multiple et une régression non-linéaire.

Les prédictions de NeuroShell[®] Predictor étaient plus précises et plus proches des valeurs expérimentales que les résultats des deux modèles statistiques. De plus, l'application de l'algorithme génétique a permis de quantifier l'importance relative des variables étudiées par rapport aux propriétés des nanoparticules.

En outre, lors de la modification des paramètres du RNA, qui a été possible avec NeuroSolutions[®], nous avons pu, en variant l'architecture du réseau, le nombre de neurones cachés, de même que la qualité des données d'apprentissage, augmenter davantage la performance des réseaux utilisés.

En général, comparés aux méthodes statistiques, plusieurs aspects dans les caractéristiques inhérentes des RNA en font la supériorité: Tout

d'abord, ils présentent une technique rapide de modélisation. Contrairement aux méthodes statistiques, les RNA ne requièrent pas un plan expérimental rigide, ni la connaissance d'une équation *à priori*, autrement dit, ils n'exigent pas d'expertise statistique. De plus, les prédictions des RNA présentent souvent un lissage plus proche des valeurs expérimentales que celui accompli par la régression.

Ce profil fait des réseaux de neurones une alternative prometteuse, mais surtout pratique, pour la modélisation et/ou l'optimisation des procédés. L'étude menée laisse envisager de nombreuses applications, tant dans le domaine des vecteurs polymériques, que dans celui de la technologie pharmaceutique dans son immense étendue.

Enfin, compte tenu de leur taille et leur texture, l'utilisation des techniques microscopiques conventionnelles n'était pas appropriée pour l'étude de la structure interne des nanoparticules. Ainsi nous avons utilisé des méthodes indirectes. Tout d'abord, le calcul de la dimension fractale de surface a pu expliquer l'effet des facteurs de formulation sur les caractéristiques de surface des nanoparticules. Ensuite, nous avons suivi les changements de microporosité ayant lieu durant la dégradation des nanoparticules en déterminant la dimension fractale de la distribution de taille des pores ainsi que la lacunarité. La contribution de ces outils aux études de caractérisation de structure ne cesse d'augmenter, et leurs applications dans le domaine pharmaceutique s'avèrent primordiales.

BIBLIOGRAPHIE

- Abu-Izza, K. A., Garcia-Contreras, L. and Lu, D. R., 1996, Preparation and evaluation of sustained release AZT-loaded microspheres: Optimization of the release characteristics using response surface methodology. *J. Pharm. Sci.*, **85**, 144-149.
- Agatonovic-Kustrin, S. and Alany, R. G., 2001, Role of genetic algorithms and artificial neural networks in predicting the phase behavior of colloidal delivery systems. *Pharm. Res.*, **18**, 1049-1055.
- Agatonovic-Kustrin, S. and Beresford, R., 2000, Basic concepts of artificial neural network (ANN) modeling and its application in pharmaceutical research. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **22**, 717-727.
- Agatonovic-Kustrin, S., Zecevic, M., Zivanovic, L. and Tucker, I. G., 1998, Application of artificial neural networks in HPLC method development. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **17**, 69-76.
- Akhtar, S. and Lewis, K. J., 1997, Antisense oligonucleotide delivery to cultured macrophages is improved by incorporation into sustained-release biodegradable polymer microspheres. *Int. J. Pharm.*, **151**, 57-67.
- Allain, C. and Cloitre, M., 1991, Characterizing the lacunarity of random and deterministic fractal sets. *Phys. Rev. A*, **44**, 3552-3558.
- Allémann, E., Doelker, E. and Gurny, R., 1992, Drug loaded poly(lactic acid) nanoparticles produced by a reversible salting-out process: purification of an injectable dosage form. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **39**, 13-18.
- Allémann, E., Gurny, R. and Doelker, E., 1992, Preparation of aqueous polymeric nanodispersions by a reversible salting-out process: Influence of process parameters on particle size. *Int. J. Pharmacol.*, **87**, 247-254.
- Allémann, E., Gurny, R. and Doelker, E., 1993, Drug-loaded nanoparticles-Preparation methods and drug targeting issues. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **39**, 173-191.
- Alonso, M. J., Cohen, S., Park, T. G., Gupta, R. K., Siber, G. R. and Langer, R., 1993, Determinants of release rate of tetanus vaccine from polyester microspheres. *Pharm. Res.*, **10**, 945-953.

- Ammoury, N., Dubrasquet, M., Fessi, H., Devissaguet, J. P., Puisieux, F. and Benita, S., 1993, Indomethacin-loaded poly(d,l-lactide) nanocapsules: Protection from gastrointestinal ulcerations and anti-inflammatory activity evaluation in rats. *Clin. Mater.*, **13**, 121-130.
- Anderson, J. M. and Shive, M. S., 1997, Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **28**, 5-24.
- Armatas, G. S., Kolonia, K. M. and Pomonis, P. J., 2002, Morphometry of porous solids: lacunarity, fractal dimensions, connectivity, and some topological similarities with neurons. *Langmuir*, **18**, 10421-10429.
- Arshady, R., 1991, Preparation of biodegradable microspheres and microcapsules: 2. Polylactides and related polyesters. *J Control Rel.*, **17**, 1-22.
- Auvillain, M., Cavé, G., Fessi, H. and Devissaguet, J. P., 1989, Lyophilisation de vecteurs colloïdaux submicroscopiques. *S. T. P. Pharma*, **5**, 738-744.
- Avnir, D. The fractal approach to heterogeneous chemistry. Surfaces, Colloids, Polymers. John Wiley & Sons: New York, 1989.
- Balazs, A. C., Calae, D. F., Deutch, J. M., Siegel, R. A. and Langer, R., 1985, The role of polymer matrix structure and interparticle interactions in diffusion-limited drug release. *Biophys. J.*, **47**, 97-104.
- Barichello, J. M., Morishita, M., Takayama, K. and Nagai, T., 1999, Encapsulation of hydrophilic and lipophilic drugs in PLGA nanoparticles by the nanoprecipitation method. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **25**, 471-476.
- Basheer, I. A. and Hajmeer, M., 2000, Artificial neural networks: fundamentals, computing, design, and application. *J. Microbiol. Meth.*, **43**, 3-31.
- Birrenbach, G. and Speiser, P. P., 1976, Polymerized micelles and their use as adjuvants in immunology. *J. Pharm. Sci.*, **65**, 1763-1766.
- Blanco-Prieto, M. J., Besseghir, K., Azerbe, O., Andris, D., Orsolini, P., Heimgartner, F. and Merkle, H. P., 2000, In vitro and in vivo evaluation of somatostatin analogue released from PLGA microspheres. *J. Control. Release*, **67**, 19-28.

- Bodmeier, R. and Chen, H., 1990, Indomethacin polymeric nanosuspensions prepared by microfluidization. *J. Control. Release*, **12**, 223-233.
- Bodmeier, R., Chen, H. and Paeratakul, O., 1989, A novel approach to the oral delivery of micro- or nanoparticles. *Pharm Res*, **6**, 413-417.
- Bourquin, J., Schmidli, H., van Hoogevest, P. and Leuenberger, H., 1997, Application of artificial neural networks (ANN) in the development of solid dosage forms *Pharm. Dev. Technol.*, **2**, 111-121.
- Bourquin, J., Schmidli, H., van Hoogevest, P. and Leuenberger, H., 1998a, Advantages of Artificial Neural Networks (ANNs) as alternative modelling technique for data sets showing non-linear relationships using data from a galenical study on a solid dosage form. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **7**, 5-16.
- Bourquin, J., Schmidli, H., van Hoogevest, P. and Leuenberger, H., 1998b, Comparison of artificial neural networks (ANN) with classical modelling techniques using different experimental designs and data from a galenical study on a solid dosage form. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **6**, 287-300.
- Boury, F., Ivanova, T., Panaiotov, I., Proust, J. E., Bois, A. and Richou, J., 1995, Dynamic properties of poly (DL-lactide) and polyvinyl alcohol monolayers at the air/water and dichloromethane/water interfaces. *J. Colloid Interface Sci.*, **169**, 380-392.
- Brannon-Peppas, L., 1995, Recent advances on the use of biodegradable microparticles and nanoparticles in controlled drug delivery. *Int. J. Pharm.*, **116**, 1-9.
- Brunauer, S., Emmett, P. H. and Teller, E., 1938, Adsorption of gases in multimolecular layers. *J. Am. Chem. Soc.*, **60**, 309-319.
- Candau, F. and Holtzscheler, C., 1985, Microlatex inverses: étude de leur formation et de leurs propriétés. *J. Chim. Phys.*, **82**, 691-694.
- Capan, Y., Woo, B. H., Gebrekidan, S., Ahmed, S. and DeLuca, P. P., 1999, Preparation and characterization of poly (D, L-lactide-co-glycolide) microspheres for controlled release of poly (L-lysine) complexed plasmid DNA. *Pharm. Res.*, **16**, 509-513.
- Carpenter, J. C. and Hoffman, M. E., 1995, Understanding neural network approximations and polynomial approximations helps neural network performance. *AI Expert*, **10**, 31-33.

- Chacon, M., Molpeceres, J., Berges, L., Guzman, M. and Aberturas, M. R., 1999, Stability and freeze-drying of cyclosporine loaded poly(D,L lactide-glycolide) carriers. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **8**, 99-107.
- Chandy, T., Das, G. S. and Rao, G. H. R., 2000, 5-fluorouracil-loaded chitosan coated polylactic acid microspheres as biodegradable drug carriers for cerebral tumours. *J. Microencapsul.*, **17**, 625-638.
- Chasin, M. and Langer, R. Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems New York, 1990.
- Cheng, A.-C. and Gupta, R. K., 1996, Stabilization of tetanus toxoid in poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) microspheres for the controlled release of antigen. *J. Pharm. Sci.*, **85**, 129-132.
- Chorny, M., Fishbein, I., Danenberg, H. D. and Golomb, G., 2002, Lipophilic drug loaded nanospheres prepared by nanoprecipitation: effect of formulation variables on size, drug recovery and release kinetics. *J. Control. Release*, **83**, 389-400.
- Chouinard, F., Buczkowski, S. and Lenaerts, V., 1994, Poly(alkylcyanoacrylate) nanocapsules: physicochemical characterization and mechanism of formation. *Pharm. Res.*, **11**, 869-874.
- Couvreur, P., Blancoprieto, M. J., Puisieux, F., Roques, B. and Fattal, E., 1997, Multiple emulsion technology for the design of microspheres containing peptides and oligopeptides (Review). *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **28**, 85-96.
- Couvreur, P. and Vauthier, C., 1991, Polyalkylcyanoacrylate nanoparticles as drug carrier: present state and perspectives. *J. Control. Release*, **17**, 187-198.
- Crotts, G. and Park, T. G., 1995, Preparation of porous and nonporous biodegradable polymeric hollow microspheres. *J. Control. Release*, **35**, 91-105.
- Crowe, L. M., Reid, D. S. and Crowe, J. H., 1996, Is trehalose special for preserving dry biomaterials? *Biophys. J.*, **71**, 2087-2093.
- Das, S. K., Tucker, I. G., Hill, D. J. and Ganguly, N., 1995, Evaluation of poly(isobutylcyanoacrylate) nanoparticles for mucoadhesive ocular drug delivery. I. Effect of formulation variables on physicochemical characteristics of nanoparticles. *Pharm. Res.*, **12**, 534-540.

- Davis, S. S. and Illum, L., 1988, Polymeric microspheres as drug carriers. *Biomaterials*, **9**, 111-115.
- De Chasteigner, S., Cavé, G., Fessi, H., Devissaguet, J.-P. and Puisieux, F., 1996, Freeze-drying of itraconazole-loaded nanosphere suspensions: a feasibility study. *Drug Dev. Res.*, **38**, 116-124.
- Deng, X., Liu, Y., Yuan, M., Li, X., Liu, L. and J, W. X., 2002, Preparation and characterization of poly-DL-lactide-poly(ethylene glycol) microspheres containing DNA. *J. Appl. Polymer Sci.*, **86**, 2557-2566.
- Dillen, K., Vandervoort, J., den Mooter, G. V., Verheyden, L. and Ludwig, A., 2004, Factorial design, physicochemical characterisation and activity of ciprofloxacin-PLGA nanoparticles. *Int. J. Pharm.*, **175**, 171-187.
- Ehtezazi, T., Washington, C. and Melia, C. D., 1999, Determination of the internal morphology of poly (D,L-lactide) microspheres using stereological methods. *J. Control. Release*, **57**, 301-314.
- Esquisabel, A., Hernandez, R. M., Igartua, M., Gascon, A. R., Calvo, B. and Pedraz, J. L., 1997, Production of BCG alginate-PLL microcapsules by emulsification/internal gelation. *J. Microencapsul.*, **14**, 627-638.
- Fessi, H., Devissaguet, J. P., Puisieux, F. and Thies, C., 1986, Procédé de préparation de systèmes colloïdaux dispersibles d'une substance, sous forme de nanoparticules. France. Patent n° 2,608,988.
- Fessi, H., Puisieux, F., Devissaguet, J.-P., Ammoury, N. and Benita, S., 1989, Nanocapsule formation by interfacial deposition following solvent displacement. *Int J Pharm*, **55**, R1-R4.
- Galindo-Rodriguez, S., Allémann, E., Fessi, H. and Doelker, E., 2004, Physicochemical parameters associated with nanoparticle formation in the salting-out, emulsification-diffusion, and nanoprecipitation methods. *Pharm. Res.*, **21**, 1428-1439.
- Gallo, J. M., Hung, C. T. and Perrier, D. G., 1984, Analysis of albumin microsphere preparation. *Int. J. Pharm.*, **22**, 63-74.
- Gefen, Y., Meir, Y., Mandelbrot, B. and Aharony, A., 1983, Geometric implementation of hypercubic lattices with noninteger dimensionality by use of low lacunarity fractal lattices. *Phys. Rev. Lett.*, **50**, 145-148.

- Giunchedi, P. and Conte, U., 1995, Spray-drying as preparation method of microparticulate drug delivery systems: an overview. *S. T. P. Pharma Sci.*, **5**, 276-290.
- Guinebretière, S., Briançon, S., Lieto, J., Mayer, C. and Fessi, H., 2002, Study of the emulsion-diffusion of solvent: preparation and characterization of nanocapsules. *Drug Develop Res*, **57**, 18-33.
- Gurny, R., Peppas, N., Harrington, D. D. and Banker, G. S., 1981, Development of biodegradable and injectable latices for controlled release of potent drugs. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **7**, 1-25.
- Guterres, S. S., Fessi, H., Barrat, G., Devissaguet, J. P. and Puisieux, F., 1995, Poly(D,L-lactide) nanocapsules containing diclofenac: I Formulation and stability study. *Int. J. Pharm.*, **113**, 57-63.
- Guzman, M., Molpeceres, J., Garcia, F. and Aberturas, M. R., 1996, Preparation, characterization and in vitro drug release of poly- ϵ -caprolactone and hydroxypropyl methylcellulose phthalate ketoprofen loaded microspheres. *J. Microencapsul.*, **13**, 25-39.
- Hebb, D. O. The organization of behaviour Wiley: New York, 1949.
- Hecht-Nielsen, R. 1987, Kolmogorov's mapping neural network existence theorem. *Proc. First IEEE Int. Joint Conf. Neural Networks*, San Diego, June 21-24.
- Hildgen, P., Paquette, D. and Nekka, F., 2002, Lacunarity: a new concept for characterization of porous pharmaceutical materials *J. Pharm. Belg.*, **57**, HS1; 59-62.
- Hopfield, J. J., 1982, Neural networks and physical systems with emergent collective computational abilities. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 2554-2558.
- Horvath, G. and Kawazoe, K., 1983, Method for the calculation of effective pore size distribution in molecular sieve carbon. *J. Chem. Eng. Japan*, **16**, 470-475.
- Hu, D. S. G. and Liu, H. J., 1993, Effect of soft segment on the degradation kinetics in polyethyleneglycol/poly(L-lactide) block copolymers. *Polym. Bull.*, **30**, 669-676.
- Hussain, A. S., Xuanqiang, Y. and Johnson, R. D., 1991, Application of neural computing in pharmaceutical product development. *Pharm Res*, **8**, 1248-1252.

- Ibrahim, H., Bindschaedler, C., Doelker, E., Buri, P. and Gurny, R., 1992, Aqueous nanodispersions prepared by a salting-out process. *Int. J. Pharm.*, **87**, 239-246.
- Illum, L., Farraj, N. F., Fisher, A. N., Gill, I., Miglietta, M. and Benedetti, L. M. J. C. R., 1994, Hyaluronic acid ester microspheres as a nasal delivery system for insulin. *J. Control. Release*, **29**, 133-141.
- Jadid, M. N. and Fairbairn, D. R., 1996, Predicting moment-curvature parameters from experimental data. *Eng. Appl. Artif. Intell.*, **9**, 303-319.
- Jain, R. A., 2000, The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices (Review). *Biomaterials*, **21**, 2475-2490.
- Jamshidi, M., 2003, Tools for intelligent control: fuzzy controllers, neural networks and genetic algorithms. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. A*, **361**, 1781-1808.
- Jung, T., Kamm, W., Breitenbach, A., Kaiserling, E., Xiao, J. X. and Kissel, T., 2000, Biodegradable nanoparticles for oral delivery of peptides: is there a role to affect mucosal uptake? (Review). *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **50**, 147-160.
- Kamijo, A., Kamei, S., Saikawa, A., Igari, Y. and Ogawa, Y., 1996, In vitro release test system of (D,L-lactic-glycolic) acid copolymer microcapsules for sustained release of LHRH agonist (leuprorelin). *J. Control. Release*, **40**, 269-276.
- Kawashima, Y., Yamamoto, H., Takeuchi, H., Fujioka, S. and Hino, T., 1999, Pulmonary delivery of insulin with nebulized D,L-lactide/glycolide copolymer (PLGA) nanospheres. *J. Control. Release*, **62**, 279-287.
- Kissel, T., Li, L. Y., Volland, C., Görich, S. and Koneberg, R., 1996, Parenteral protein delivery systems using biodegradable polyesters of ABA block structure, containing hydrophobic poly(lactide-co-glycolide) A blocks and hydrophilic poly(ethylene oxide) B blocks. *J. Control. Release*, **39**, 315-326.
- Kitchell, J. P. and Wise, D. L., 1985, Poly(lactic/glycolic acid) biodegradable drug-polymer matrix systems. *Methods Enzymol.*, **112**, 436-448.

- Ko, J. A., Park, H. J., Park, Y. S., Hwang, S. J. and Park, J. B., 2003, Chitosan microparticle preparation for controlled drug release by response surface methodology. *J. Microencapsul.*, **20**, 791-797.
- Krause, H. J., Schwartz, A. and Rohdewald, P., 1985, Polylactic acid nanoparticles, a colloidal drug delivery system for lipophilic drugs. *Int. J. Pharm.*, **27**, 145-155.
- Kreuter, J. and Speiser, P. P., 1976, In vitro studies of poly(methyl methacrylate) adjuvants. *J. Pharm. Sci.*, **65**, 1624-1627.
- Kwon, H. Y., Lee, J. Y., Choi, S. W., Jang, Y. S. and Kim, J. H., 2001, Preparation of PLGA nanoparticles containing estrogen by emulsification-diffusion method. *Colloid Surf A Physicochem Eng Asp*, **182**, 123-130.
- Labhatewar, V. D. and Dorle, A. K., 1990, Nanoparticles. A colloid drug delivery system for primaquine and metronidazole. *J. Control. Release*, **12**, 113-119.
- Langer, K., Balthasar, S., Vogel, V., Dinauer, N., von Briesen, H. and Schubert, D., 2003, Optimization of the preparation process for human serum albumin (HSA) nanoparticles. *Int. J. Pharm.*, **257**, 169-180.
- Langer, K., Zimmer, A. and Kreuter, J., 1997, Acrylic nanoparticles for ocular drug delivery. *S. T. P. Pharma Sci.*, **7**, 445-451.
- Lapp, A., Mottin, M., Strazielle, C., Broseta, D. and Leibler, L., 1992, Experimental evidence for the strong interpenetration of two polymer chains very different in size. *J. Phys. II France*, **2**, 1247-1256.
- Lebon, S. and Hillel, R., 1995, Fractal analysis of graphite matrices: Influence of impregnation of salts. *J. Colloid Interface Sci.*, **173**, 215-220.
- Lemoine, D., Deschuyteneer, M., Hogge, F. and Preat, V., 1999, Intranasal immunization against influenza virus using polymeric particles. *J. Biomat. Sci. Polym. Ed.*, **10**, 805-825.
- Leo, E., Forni, F. and Bernabei, M. T., 2000, Surface drug removal from ibuprofen-loaded PLA microspheres. *Int. J. Pharm.*, **196**, 1-9.
- Lewis, D. H. 1990, Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymers. In *Biodegradable polymers as drug*

delivery systems. M. Chasin and R. Langer. New York, Marcel Dekker: 1-41.

- Li, W.-I., Anderson, K. W., Mehta, R. C. and DeLuca, P. P., 1995, Prediction of solvent removal profile and effect on properties for peptide-loaded PLGA microspheres prepared by solvent extraction/evaporation method. *J. Control. Release*, **37**, 199-214.
- Luck, M., Pistel, K. F., Li, Y. X., Blunk, T., Muller, R. H. and Kissel, T., 1998, Plasma protein adsorption on biodegradable microspheres consisting of poly(D, L-lactide, co-glycolide), poly(L-Lactide) or ABA triblock copolymers containing poly(oxyethylene)-Influence of production method and polymer composition. *J. Control. Release*, **55**, 107-120.
- Mainardes, R. M. and Evangelista, R. C., 2005, PLGA nanoparticles containing praziquantel: effect of formulation variables. *Int. J. Pharm.*, **290**, 137-144.
- Mandelbrot, B. The fractal geometry of nature Freeman: New York, 1982.
- Mandelbrot, B. Les objets fractals. Forme, Hasard et Dimension. Flammarion: Paris, 1989.
- Martinez, B., Lairion, F., Pena, M. B., Di Rocco, P. and Nacucchio, M. C., 1997, In vitro Ciprofloxacin release from poly(lactide-co-glycolide) microspheres. *J. Microencapsul.*, **14**, 155-161.
- Matsumoto, J., Nakada, Y., Sakurai, K., Nakamura, T. and Takahashi, Y., 1999, Preparation of nanoparticles consisting of poly(-lactide)-poly(ethylene glycol)-poly(-lactide) and their evaluation in vitro. *Int. J. Pharm.*, **185**, 93-101.
- McCarron, P. A., Woolfson, A. D. and Keating, S. M., 1999, Response surface methodology as a predictive tool for determining the effects of preparation conditions on the physicochemical properties of poly(isobutylcyanoacrylate) nanoparticles. *Int. J. Pharm.*, **193**, 37-47.
- McCulloch, W. S. and Pitts, W., 1943, A logical calculus of the ideas immanent in nervous activity. *Bull. Math. Biophys.*, **5**, 115-133.
- McLeod, A. D., Lam, F. C. and Hung, C. T., 1988, Optimized synthesis of polyglutaraldehyde nanoparticles using central composite design. *J. Pharm. Sci.*, **77**, 704-710.

- Minsky, M. and Papert, S. Perceptrons: an Introduction to Computational Geometry. MIT Press: 1969.
- Molpeceres, J., Aberturas, M. R., Chacon, M., Berges, L. and Guzman, M., 1997, Stability of cyclosporine-loaded poly- ϵ -caprolactone nanoparticles. *J. Microencapsul.*, **14**, 777-787.
- Mosqueira, V. C., Legrand, P., Pinto-Alphandary, H., Puisieux, F. and Barratt, G., 2000, Poly(D,L-lactide) nanocapsules prepared by a solvent displacement process: influence of the composition on physicochemical and structural properties. *J. Pharm. Sci.*, **89**, 614-626.
- Murakami, H., Kawashima, Y., Niwa, T., Hino, T., Takeuchi, H. and Kobayashi, M., 1997, Influence of the degrees of hydrolyzation and polymerization of poly(vinylalcohol) on the preparation and properties of poly(-lactide-co-glycolide) nanoparticle. *Int. J. Pharm.*, **149**, 43-49.
- Myers, R. H. and Montgomery, D. C. Response surface methodology: Process and product optimization using designed experiments. J. Wiley: New York, 2002.
- Nam, Y. S., Song, S. H., Choi, J. Y. and Park, T. G., 2000, Lysozyme microencapsulation within biodegradable PLGA microspheres: Urea effect on protein release and stability. *Biotechnol. Bioengin.*, **70**, 270-277.
- Neimark, A. V., 1990, Thermodynamic method for calculating surface fractal dimension. *JETP Lett.*, **51**, 607-610.
- Nihant, N., Grandfils, C., Jérôme, R. and Teyssié, P., 1995, Microencapsulation by coacervation of poly(lactide-co-glycolide) IV. Effect of the processing parameters on coacervation and encapsulation. *J. Control. Release*, **35**, 117-125.
- Nihant, N., Stassen, S., Grandfils, C., Jérôme, R., Teyssié, P. and Goffinet, G., 1994, Microencapsulation by coacervation of poly(lactide-co-glycolide) III. Characterization of the final microspheres. *Polym. Int.*, **34**, 289-299.
- O'Hara, P. and Hickey, A. J., 2000, Respirable PLGA microspheres containing rifampicin for the treatment of tuberculosis: Manufacture and characterization. *Pharm. Res.*, **17**, 955-961.

- Oppenheim, R. C. (1986). Nanoparticulate drug delivery systems based on gelatin and albumin. In *Polymeric nanoparticles and microspheres*. P. Guiot and P. Couvreur. Boca Raton, CRC Press: 1-26.
- Peh, K. K., Lim, C. P., Quek, S. S. and Khoh, K. H., 2000, Use of artificial neural networks to predict drug dissolution profiles and evaluation of network performance using similarity factor. *Pharm. Res.*, **17**, 1384-1388.
- Pfeifer, P., Wu, Y. J., Cole, M. W. and Krim, J., 1989, Multilayer adsorption on a fractally rough surface. *Phys. Rev. Lett.*, **62**, 1997-2000.
- Pimienta, C., Lenaerts, V., Cadieux, C., Raymond, P., Juhasz, J. and Simard, M. A., 1990, Mucoadhesion of hydroxypropylmethacrylate nanoparticles to rat intestinal ileal segments in vitro. *Pharm. Res.*, **7**, 49-53.
- Prakobvaitayakit, M. and Nimmannit, U., 2003, Optimization of polylactic-co-glycolic acid nanoparticles containing itraconazole using 2(3) factorial design. *AAPS PharmSci. Tech.*, **4**, E71.
- Quantachrome (2003). Autosorb-1 operating manual, version 1.27. Florida, USA: 40.
- Quesnel, R. and Hildgen, P., 2002, Synthesis and characterization of alternate (PLA-PEG-PLA)_m multiblock copolymers *Proc. 4th World Meeting ADRITELF/APGI/APV, Florence*.
- Quintanar-Guerrero, D., Fessi, H., Allemann, E. and Doelker, E., 1996, Influence of stabilizing agents and preparative variables on the formation of poly(D,L-lactic acid) nanoparticles by an emulsification-diffusion technique. *Int. J. Pharmacol.*, **143**, 133-141.
- Rabiant, J., 1991, La limitation des solvants résiduels. *S. T. P. Pharma*, **1**, 278-283.
- Radwan, M. A., Zaghloul, I. Y. and Aly, Z. H., 1999, In vivo performance of parenteral theophylline-loaded polyisobutylcyanoacrylate nanoparticles in rats. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **8**, 95-98.
- Rizkalla, N., Hildgen, P. and Thibert, R., 1999, Influence of the fractal character of model substances on their reactivity at solid-liquid interfaces. *J. Colloid Interface Sci.*, **215**, 43-53.

- Rolland, A., Gibassier, D., Sado, P. and Le Verge, R., 1986, Purification et propriétés physico-chimiques des suspensions de nanoparticules de polymère. *J. Pharm. Belg.*, **41**, 94-105.
- Rosenblatt, F., 1958, The perceptron: a probabilistic model for information storage and organization in the brain. *Psychol. Rev.*, **65**, 386-408.
- Rumelhart, D. E., Hinton, G. E. and Williams, R. J., 1986, Learning representations by back-propagating errors. *Nature*, **323**, 533-536.
- Saez, A., Guzmán, M., Molpeceres, J. and Aberturas, M. R., 2000, Freeze-drying of polycaprolactone and poly(lactic-glycolic) nanoparticles induce minor particle size changes affecting the oral pharmacokinetics of loaded drugs. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **50**, 379-387.
- Sahoo, S. K., Panyam, J., Prabha, S. and Labhateswar, V., 2002, Residual polyvinyl alcohol associated with poly (lactide-co-glycolide) nanoparticles affects their physical properties and cellular uptake. *J. Control. Release*, **82**, 105-114.
- Sakuma, S., Hayashi, M. and Akashi, M., 2001, Design of nanoparticles composed of graft copolymers for oral peptide delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **47**, 21-37.
- Scheffel, U., Rhodes, B. A., Natarajan, T. K. and Wagner, H. N., 1972, Albumin microspheres for study of the reticulo-endothelial system. *J. Nucl. Med.*, **13**, 498-503.
- Scholes, P. D., Coombes, A. G. A., Illum, L., Davis, S. S., Vert, M. and Davies, M. C., 1993, The preparation of sub-200 nm poly(lactide-co-glycolide) microspheres for site-specific drug delivery. *J. Control. Release*, **25**, 145-153.
- Seijo, B., Fattal, E., Roblot-Treupel, L. and Couvreur, P., 1990, Design of nanoparticles of less than 50 nm diameter: preparation, characterization and drug loading. *Int. J. Pharm.*, **62**, 1-7.
- Shah, S. S., Zhu, K. J. and Pitt, C. G., 1994, Poly(D,L-lactic) acid-polyethylene glycol block copolymers. The influence of polyethylene glycol on the degradation of poly-DL-lactic acid. *J. Biomater. Sci. Polym.*, **5**, 421-431.
- Silvestri, S. L. and Lostritto, R. T., 1989, Theoretical evaluation of dispersed droplet radii in submicron oil-in-water emulsions. *Int. J. Pharm.*, **50**, 141-146.

- Smith, A. and Hunneyball, I. M., 1986, Evaluation of poly(lactic acid) as a biodegradable drug delivery system for parenteral administration. *Int. J. Pharm.*, **30**, 215-220.
- Sun, Y., Peng, Y., Chen, Y. and Shukla, A. J., 2003, Application of artificial neural networks in the design of controlled release delivery systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **55**, 1201-1215.
- Takahara, J., Takayama, K. and Nagai, T., 1997, Multi-objective simultaneous optimization technique based on an artificial neural network in sustained release formulations. *J. Control. Release*, **49**, 11-20.
- Teraoka, I. Polymer solutions: an introduction to Physical properties John Wiley & Sons, Inc.: New York, 2002.
- Thomasin, C., Merkle, H. P. and Gander, B. A., 1997, Physico-chemical parameters governing protein microencapsulation into biodegradable polyesters by coacervation. *Int. J. Pharm.*, **147**, 173-186.
- Thomasin, C., Nam-Trân, H., Merkle, H. P. and Gander, B., 1998, Drug microencapsulation by PLA/PLGA coacervation in the light of thermodynamics. 1. Overview and theoretical considerations. *J. Pharm. Sci.*, **87**, 259-268.
- Tice, T. R. and Cowsar, D. R., 1984, Biodegradable controlled-release parenteral systems. *Pharm. Technol.*, **11**, 26-35.
- Tinsley-Bown, A. M., Fretwell, R., Dowsett, A. B., Davis, S. L. and Farrar, G. H., 2000, Formulation of poly (D,L-lactic-co-glycolic acid) microparticles for rapid plasmid DNA delivery. *J. Control. Release*, **66**, 229-241.
- Tsai, Y.-L., Jong, C.-C. and Chen, H., 2001, Preparation of double-encapsulated microcapsules for mitigating drug loss and extending release. *J. Microencapsul.*, **18**, 701-711.
- Türkoğlu, M., Aydın, I., Murray, M. and Sakr, A., 1999, Modeling of a roller-compaction process using neural networks and genetic algorithms. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **48**, 239-245.
- Türkoğlu, M., Ozarslan, R. and Sakr, A., 1995, Artificial neural network analysis of a direct compression tableting study. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **41**, 315-322.

- Ueda, M. and Kreuter, J., 1997, Optimization of the preparation of loperamide-loaded poly (L-lactide) nanoparticles by high pressure emulsification-solvent evaporation. *J. Microencapsul.*, **14**, 593-605.
- Vaithiyalingam, S. and Khan, M. A., 2002, Optimization and characterization of controlled release multi-particulate beads formulated with a customized cellulose acetate butyrate dispersion. *Int. J. Pharm.*, **234**, 179-193.
- Vandervoort, J. and Ludwig, A., 2001, Preparation factors affecting the properties of polylactide nanoparticles: a factorial design study. *Pharmazie*, **56**, 484-488.
- Vauthier, C., Rajaonarivony, M. and Couvreur, P., 1991. Development of new hydrophilic nanoparticles, made from alginate. Proc. Int. Symp. Contr. Rel. Bioact. Mater.
- Vauthier-Holtzscheler, C., Benabbou, S., Spenlehauer, G., Veillard, M. and Couvreur, P., 1991, Methodology for the preparation of ultra-dispersed polymer systems. *S. T. P. Pharma*, **1**, 109-116.
- Verdun, C., Couvreur, P., Vranckx, H., Lenaerts, V. and Roland, M., 1986, Development of a nanoparticle controlled-release formulation for human use. *J. Control. Release*, **3**, 205-210.
- Viswanathan, N. B., Patil, S. S., Pandit, J. K., Lele, A. K., Kulkarni, M. G. and Mashelkar, R. A., 2001, Morphological changes in degrading PLGA and P(DL)LA microspheres : implications for the design of controlled release systems. *J. Microencapsul.*, **18**, 783-800.
- Wang, J., Wang, B. M. and Schwendeman, S. P., 2002, Characterization of the initial burst release of a model peptide from poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres. *J. Control. Release*, **82**, 289-307.
- Watnasirichaikul, S., Davies, N. M., Rades, T. and Tucker, I. G., 2000, Preparation of biodegradable insulin nanocapsules from biocompatible microemulsions. *Pharm. Res.*, **17**, 684-689.
- Wu, X. S. (1995a). Synthesis and properties of biodegradable lactic/glycolic acid polymers. In *Encyclopedic Handbook of Biomaterials and Bioengineering*. Wise, New York, Marcel Dekker: 1015-1054.
- Wu, X. S. (1995b). Preparation, characterization, and drug delivery applications of microspheres based on biodegradable lactic/glycolic

- Yan, C., Resau, J. H., Hewetson, J., West, M., Rill, W. L. and Kende, M., 1994, Characterization and morphological analysis of protein-loaded poly(lactide-co-glycolide) microparticles prepared by water-in-oil-in-water emulsion technique. *J. Control. Release*, **32**, 231-241.
- Yang, Y. Y., Chia, H. H. and Chung, T. S., 2000, Effect of preparation temperature on the characteristics and release profiles of PLGA microspheres containing protein fabricated by double-emulsion solvent extraction/evaporation method. *J. Control. Release*, **69**, 81-96.
- Yoncheva, K., Vandervoort, J. and Ludwig, A., 2003, Influence of process parameters of high-pressure emulsification method on the properties of pilocarpine-loaded nanoparticles. *J. Microencapsul.*, **20**, 449-458.
- Youxin, L. and Kissel, T., 1993, Synthesis and properties of biodegradable ABA triblock copolymers consisting of poly(L-lactic acid) or poly(L-lactic-co-glycolic) A-blocks attached to central poly(oxy-ethylene) B-blocks. *J. Control. Release*, **27**, 247-257.
- Yüksel, N., Türkoğlu, M. and Baykara, T., 2000, Modelling of the solvent evaporation method for the preparation of controlled release acrylic microspheres using neural networks. *J. Microencapsul.*, **17**, 541-551.
- Zambaux, M. F., Bonneaux, F., Gref, R., Maincent, P., Dellacherie, E., Alonso, M. J., Labrude, P. and Vigneron, C., 1998, Influence of experimental parameters on the characteristics of poly (lactic acid) nanoparticles prepared by a double emulsion method. *J. Control. Release*, **50**, 31-40.
- Zimmer, A. and Kreuter, J., 1995, Microspheres and nanoparticles used in ocular delivery systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **16**, 61-73.
- Zupan, J. and Gasteiger, J. Neural networks in chemistry and drug design, Wiley-VCH: Toronto, 1999
- Zweers, M. L. T., Grijpma, D. W., Engbers, G. H. M. and Feijen, J., 2003, The preparation of monodisperse biodegradable polyester nanoparticles with a controlled size. *J. Biomed. Mater. Res.*, **66B**, 559-566.