

Matériel et protocoles

Produits

- Poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA)
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/719897?lang=fr®ion=FR>
- Poly vinyl alcool (PVA)
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/363138?lang=fr®ion=FR>
- Amoxicilline (AMX)
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/a8523?lang=fr®ion=FR>
- Curcumine
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/c1386?lang=fr®ion=FR>
- Bovine sérum albumine (BSA)
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/a7906?lang=fr®ion=FR>
- Eau distillée
- Ethanol
- Dichlorométhane
- THF
- Soude
- Chloroform
- Méthanol

Encapsulation de principes actifs dans un polymère

Solution de PVA

- Préparer une solution de PVA à 1% en masse dans l'eau. Porter à reflux pendant 2h à 150°C pour obtenir une dissolution complète du PVA dans l'eau.

BSA

- Préparer 200mL de solution de PVA à 1% en masse.
- Peser 80 mg de PLGA. Sous hotte, prélever avec une pipette en verre 5 mL de dichlorométhane et les verser dans un flacon à rapidement fermer. Ajouter, dans le flacon contenant le dichlorométhane, le PLGA. Peser 20 mg de BSA. Les ajouter à la solution de PLGA dans le dichlorométhane. Agiter avec un agitateur magnétique à 1500 tours/min pendant 5 minutes.
- Pour le témoin : dans un second flacon, peser 80 mg de PLGA et les dissoudre dans 5 mL de dichlorométhane. Agiter avec un agitateur magnétique à 1500 tours/min pendant minutes.
- Préparer un ballon contenant 100 mL de solution aqueuse de PVA. Verser le plus rapidement possible au goutte-à-goutte la solution BSA dans le ballon tout en agitant vigoureusement avec un agitateur magnétique. Mélanger l'émulsion à 600 tours/min durant 2h afin de faire évaporer le solvant organique.
- Faites de même avec la solution témoin.
- Centrifuger les solutions à 3000 tours/min. Jeter le surnageant, ajouter de l'eau, mélanger les tubes de centrifugation et recentrifuger. Recommencer cette opération.
- Remettre les particules en solution dans environ 100mL d'eau et lyophiliser les solutions. Les conserver au réfrigérateur.

Curcumine

- Préparer 50mL d'une solution aqueuse de PVA à 1% en masse.
- Peser 20mg de curcumine et 20mg de PLGA. Sous hotte, prélever avec une pipette en verre de 10mL, 1,5 mL de chloroform et avec une pipette de 1mL, 0,15 mL de méthanol. Ajouter la curcumine et le PLGA à la solution de chloroform et méthanol et agiter.
- Verser cette solution dans la solution de PVA et agiter à 1000 tours/min avec un agitateur magnétique pendant 5 minutes.
- Evaporer les solvants à l'évaporateur rotatif.
- Centrifuger la solution à 3000 tours/min. Jeter le surnageant, ajouter de l'eau, mélanger les tubes de centrifugation et recentrifuger. Recommencer cette opération.
- Remettre les particules en solution dans environ 100mL d'eau et lyophiliser les solutions. Les conserver au réfrigérateur.

AMX

- Préparer une solution de 2 mL de soude dans l'eau à 2,25 mol/L.
- Peser 0,05 g d'amoxicilline et les ajouter à 0,2 mL de la solution de soude prélevée à l'aide d'une pipette en verre de 1 mL.
- Ajouter à cette solution 0,1 mL de solution aqueuse de PVA à 1% en masse. Agiter la solution avec un agitateur magnétique.
- Peser 0,2g de PLGA et les dissoudre dans 2 mL de dichlorométhane.
- Verser en goutte-à-goutte rapide la phase aqueuse avec une pipette de 1mL dans la phase organique, agiter vigoureusement à l'agitateur magnétique.
- Verser en goutte-à-goutte cette émulsion dans une 10mL de solution aqueuse à 1% en masse. Attention une fois l'émulsion W/O formée, il faut la verser très rapidement dans la solution aqueuse ! Mélanger l'émulsion à 600 tours/min durant 2h afin de faire évaporer le solvant organique.
- Centrifuger la solution à 3000 tours/min. Jeter le surnageant, ajouter de l'eau, mélanger les tubes de centrifugation et recentrifuger. Recommencer cette opération.
- Pour le témoin : appliquer le même protocole sans ajouter l'amoxicilline dans la phase aqueuse.
- Remettre les particules en solution dans environ 100 mL d'eau et lyophiliser les solutions. Les conserver au réfrigérateur.

Observation au microscope électronique à balayage

- Les particules en suspension sont laissées à sécher sur la paillasse.
- Pulvériser cathodiquement 15 nm d'or, sur la surface des échantillons.
- Les échantillons sont observés avec un MEB Hitachi S-3400N à 10kV.

Mesure de l'efficacité d'encapsulation

Objectif : calculer le rendement d'encapsulation (masse de principe actif encapsulé/masse de principe actif utilisé)

BSA et AMX

- Garder le surnageant de la réaction d'encapsulation après centrifugation à 3000 tours/min pendant 4 min.

- Mesurer l'absorbance de ce surnageant dans une cuve en quartz à 275 nm pour l'AMX, et 280 nm pour la BSA.

Curcumine

- Ajouter dans un flacon en verre les particules lyophilisées préparées à l'étape précédente.
- Ajouter quelques millilitres de THF pour solubiliser le PLGA.
- Mesurer l'absorbance de la solution dans une cuve en quartz à 420 nm.

Cinétique de relargage du principe actif

Objectif : étudier le relargage du principe actif dans le milieu extérieur au cours du temps

BSA

- Peser 11 mg de particules lyophilisées et les introduire dans un tube de centrifugation, ajouter 3 mL eau. Conserver le tube à température ambiante.
- Pour faire la mesure d'absorbance, centrifuger le tube à 5000 tours/min, prélever le surnageant et faire la mesure d'absorbance dans une cuve en quartz à 280 nm en faisant le blanc avec les particules témoin.
- Réintroduire le surnageant dans le tube de centrifugation et mélanger le tube pour remettre les particules en suspension.

AMX

- Peser 13 mg de particules lyophilisées et les introduire dans un tube de centrifugation, ajouter 4mL eau. Conserver le tube à température ambiante.
- Pour faire la mesure d'absorbance, centrifuger le tube à 5000 tours/min, prélever le surnageant et faire la mesure d'absorbance dans une cuve en quartz à 275 nm en faisant le blanc avec les particules témoin.
- Réintroduire le surnageant dans le tube de centrifugation et mélanger le tube pour remettre les particules en suspension.

Curcumine

- Peser 1 mg de particules lyophilisées et les introduire dans un tube de centrifugation, ajouter 7 mL d'eau et 7 mL d'éthanol. Conserver le tube à température ambiante.
- Pour faire la mesure d'absorbance, centrifuger le tube à 5000 tours/min, prélever le surnageant et faire la mesure d'absorbance dans une cuve en quartz 420 nm.
- Réintroduire le surnageant dans le tube de centrifugation et mélanger le tube pour remettre les particules en suspension.