### MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

#### REPUBLIQUE DE COTE D'IVOIRE

UNION - DISCIPLINE - TRAVAIL





N°1984/18

Année: 2017 – 2018

### **THESE**

Présentée en vue de l'obtention du

### DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Par

### **KESSE ETCHIEN REINE**

## FORMULATION D'UN HYDROGEL LYOPHILISE A BASE DE LACTOBACILLUS CRISPATUS DESTINE A LA VOIE VAGINALE

Soutenue publiquement le 21 Décembre 2018

### **COMPOSITION DU JURY:**

Président : Madame SAWADOGO DUNI, Professeur titulaire

Directeur : Monsieur KOFFI ARMAND, Maître de conférences agrégé

Assesseurs : Monsieur OUASSA TIMOTHEE, Maître de conférences agrégé

Madame SANGARE TIGORI BEATRICE, Maître de conférences agrégé

# ADMINISTRATION ET PERSONNEL ENSEIGNANT DE L'UFR SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES

#### I. HONORARIAT

Directeurs/Doyens Honoraires: Professeur RAMBAUD André

Professeur FOURASTE Isabelle

Professeur BAMBA Moriféré

Professeur YAPO Abbé †

Professeur MALAN Kla Anglade

Professeur KONE Moussa †

Professeur ATINDEHOU Eugène

#### II. ADMINISTRATION

Directeur Professeur KONE-BAMBA Diénéba

Sous-Directeur Chargé de la Pédagogie Professeur Ag. IRIE-N'GUESSAN A.G.

Sous-Directeur Chargé de la Recherche Professeur Ag. DEMBELE Bamory

Secrétaire Principal Madame NADO-AKPRO Marie Josette

Documentaliste Monsieur N'GNIMMIEN Koffi Lambert

Intendant Monsieur GAHE Alphonse

Responsable de la Scolarité Madame DJEDJE Yolande

#### III. PERSONNEL ENSEIGNANT PERMANENT

#### 1- PROFESSEURS TITULAIRES

M. ABROGOUA Danho Pascal Pharmacie Clinique

Mmes AKE Michèle Chimie Analytique, Bromatologie

ATTOUNGBRE HAUHOUOT M.L. Biochimie et Biologie Moléculaire

MM. DANO Djédjé Sébastien Toxicologie

GBASSI K. Gildas Chimie Physique Générale

INWOLEY Kokou André Immunologie

Mme KONE BAMBA Diéneba Pharmacognosie

M. KOUADIO Kouakou Luc Hydrologie, Santé Publique

Mme KOUAKOU-SIRANSY Gisèle Pharmacologie

MM. MALAN Kla Anglade Chimie Ana., contrôle de qualité

MENAN Eby Ignace Parasitologie - Mycologie

MONNET Dagui Biochimie et Biologie Moléculaire

Mme SAWADOGO Duni Hématologie

M. YAVO William Parasitologie - Mycologie

#### 2- MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

M. AHIBOH Hugues Biochimie et Biologie moléculaire

Mme AKE-EDJEME N'guessan Angèle Biochimie et Biologie moléculaire

MM. AMARI Antoine Serge G. Législation

AMIN N'Cho Christophe Chimie Analytique

BONY François Nicaise Chimie Analytique

DALLY Laba Ismael Pharmacie Galénique

DEMBELE Bamory Immunologie

DJOHAN Vincent Parasitologie -Mycologie

Mme IRIE-N'GUESSAN Geneviève Pharmacologie

M. KOFFI Angely Armand Pharmacie Galénique

Mme KOUAKOU-SACKOU Julie Santé Publique

MM. KOUASSI Dinard Hématologie

LOUKOU Yao Guillaume Bactériologie-Virologie

OGA Agbaya Stéphane Santé Publique et Economie de la Santé

OUASSA Timothée Bactériologie-Virologie

OUATTARA Mahama Chimie Organique, Chimie Thérapeutique

SANGARE TIGORI Béatrice Toxicologie

MM. YAPI Ange Désiré Chimie Organique, Chimie Thérapeutique

ZINZENDORF Nanga Yessé Bactériologie-Virologie

#### 3- MAITRES-ASSISTANTS

MM. ADJAMBRI Adia Eusebé Hématologie

ADJOUNGOUA Attoli Léopold Pharmacognosie

Mmes ABOLI-AFFI Mihessé Roseline Immunologie

AKA ANY-GRAH Armelle Adjoua S. Pharmacie Galénique

ALLA-HOUNSA Annita Emeline Santé Publique

M. ANGORA Kpongbo Etienne Parasitologie - Mycologie

Mmes AYE-YAYO Mireille Hématologie

BAMBA-SANGARE Mahawa Biologie Générale

BARRO-KIKI Pulchérie Parasitologie - Mycologie

MM. CABLAN Mian N'Dedey Asher Bactériologie-Virologie

CLAON Jean Stéphane Santé Publique

Mmes BLAO-N'GUESSAN Amoin Rebecca J. Hématologie

DIAKITE Aïssata Toxicologie

DONOU-N'DRAMAN Aha Emma Hématologie

M. EFFO Kouakou Etienne Pharmacologie

Mme FOFIE N'Guessan Bra Yvette Pharmacognosie

MM. KABRAN Tano Kouadio Mathieu Immunologie

KASSI Kondo Fulgence Parasitologie-Mycologie

Mme KONAN-ATTIA Akissi Régine Santé Publique

M. KONAN Konan Jean Louis Biochimie et Biologie Moléculaire

Mme KONATE Abibatou Parasitologie-Mycologie

M. KOUAME Dénis Rodrigue Immunologie

Mme KOUASSI-AGBESSI Thérèse Bactériologie-Virologie

MM. KPAIBE Sawa André Philippe Chimie Analytique

MANDA Pierre Toxicologie

N'GUESSAN Alain Pharmacie Galénique

Mme VANGA-BOSSON Henriette Parasitologie-Mycologie

M. YAYO Sagou Eric Biochimie et Biologie Moléculaire

### 4- ASSISTANTS

MM. ADIKO Aimé Cézaire Immunologie

AMICHIA Attoumou Magloire Pharmacologie

Mmes AKOUBET-OUAYOGODE Aminata Pharmacognosie

ALLOUKOU-BOKA Paule-Mireille Législation

TAHOU-APETE Sandrine Bactériologie-Virologie

BEDIAKON-GOKPEYA Mariette Santé publique

MM. BROU Amani Germain Chimie Analytique

BROU N'Guessan Aimé Pharmacie clinique et thérapeutique

COULIBALY Songuigama Chimie organique, chimie thérapeutique

DJADJI Ayoman Thierry Lenoir Pharmacologie

DJATCHI Richmond Anderson Bactériologie-Virologie

Mmes DOTIA Tiepordan Agathe Bactériologie-Virologie

KABLAN-KASSI Hermance Hématologie

MM. KACOU Alain Chimie organique, chimie thérapeutique

KAMENAN Boua Alexis Thierry Pharmacie clinique et thérapeutique

KOFFI Kouamé Santé publique

KONAN Jean Fréjus Biophysique

Mme KONE Fatoumata Biochimie et Biologie moléculaire

MM. KOUAHO Avi Kadio Tanguy Chimie organique, chimie thérapeutique

KOUAKOU Sylvain Landry Pharmacologie

KOUAME Jérôme Santé publique

Mme KRIZO Gouhonon Anne-Aymonde Bactériologie-Virologie

MM. LATHRO Joseph Serge Bactériologie-Virologie

MIEZAN Jean Sébastien Parasitologie-Mycologie

N'GBE Jean Verdier Toxicologie

N'GUESSAN Déto Ursul Jean-Paul Chimie organique, chimie thérapeutique

Mmes N'GUESSAN Kakwokpo Clémence Pharmacie Galénique

N'GUESSAN-AMONKOU Anne Cynthia Législation

ODOH Alida Edwige Pharmacognosie

SIBLI-KOFFI Akissi Joëlle Biochimie et Biologie moléculaire

SICA-DIAKITE Amelanh Chimie Organique, Chimie Thérapeutique

TANOH-BEDIA Valérie Parasitologie-Mycologie

M. TRE Eric Serge Chimie Analytique

Mme KOUASSI-TUO Awa Pharmacie Galénique

M. YAPO Assi Vincent De Paul Biologie Générale

Mme YAPO-YAO Carine Mireille Biochimie

#### 5- CHARGES DE RECHERCHE

Mmes ADIKO N'dri Marcelline Pharmacognosie

OUATTARA N'gnôh Djénéb Santé Publique

### 6- ATTACHE DE RECHERCHE

M. LIA Gnahoré José Arthur Pharmacie Galénique

### 7- IN MEMORIUM

Feu KONE Moussa Professeur Titulaire

Feu YAPO Abbé Etienne Professeur Titulaire

Feu COMOE Léopold Maître de Conférences Agrégé

Feu POLNEAU-VALLEE Sandrine Maître de Conférences Agrégé

Feu GUEU Kaman Maître Assistant

Feu ALLADOUM Nambelbaye Assistant

Feu COULIBALY Sabali Assistant

Feu TRAORE Moussa Assistant

Feu YAPO Achou Pascal Assistant

### IV. ENSEIGNANTS VACATAIRES

### 1- PROFESSEURS

M. DIAINE Charles Biophysique

OYETOLA Samuel Chimie Minérale

#### 2- MAITRES DE CONFERENCES

M. KOUAKOU Tanoh Hilaire Botanique et Cryptogamie

YAO N'Dri Athanase Pathologie Médicale

#### 3- MAITRE-ASSISTANT

M. KONKON N'Dri Gilles Botanique, Cryptogamie

#### 4- NON UNIVERSITAIRES

MM. AHOUSSI Daniel Ferdinand Secourisme

COULIBALY Gon Activité sportive

DEMPAH Anoh Joseph Zoologie

GOUEPO Evariste Techniques officinales

Mme KEI-BOGUINARD Isabelle Gestion-Comptabilité

MM KOFFI Alexis Anglais

KOUA Amian Hygiène

KOUASSI Ambroise Management

AHOUSSI Ferdinand Secourisme

KONAN Kouacou Diététique

Mme PAYNE Marie Santé Publique

### COMPOSITION DES DEPARTEMENTS DE L'UFR DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES

### I. <u>BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE</u>

Professeurs LOUKOU Yao Guillaume Maître de Conférences Agrégé

Chef de département

OUASSA Timothée Maître de Conférences Agrégé

ZINZENDORF Nanga Yessé Maître de Conférences Agrégé

Docteurs CABLAN Mian N'Dédey Asher Maître-Assistant

KOUASSI-AGBESSI Thérèse Maître-Assistante

TAHOU-APETE Sandrine Assistante

DJATCHI Richmond Anderson Assistant

DOTIA Tiepordan Agathe Assistante

KRIZO Gouhonon Anne-Aymonde Assistante

LATHRO Joseph Serge Assistant

### II. <u>BIOCHIMIE, BIOLOGIE MOLECULAIRE, BIOLOGIE DE LA REPRODUCTION ET PATHOLOGIE MEDICALE</u>

Professeurs MONNET Dagui Professeur Titulaire

Chef de Département

HAUHOUOT-ATTOUNGBRE M.L. Professeur Titulaire

AHIBOH Hugues Maître de Conférences Agrégé

AKE-EDJEME N'Guessan Angèle Maître de Conférences Agrégé

Docteurs KONAN Konan Jean Louis Maître-Assistant

YAYO Sagou Eric Maître-Assistant

KONE Fatoumata Assistante

SIBLI-KOFFI Akissi Joëlle Assistante

YAPO-YAO Carine Mireille Assistante

### III. BIOLOGIE GENERALE, HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE

Professeurs SAWADOGO Duni Professeur Titulaire

Chef du Département

INWOLEY Kokou André Professeur Titulaire

DEMBELE Bamory Maître de Conférences Agrégé

KOUASSI Dinard Maître de Conférences Agrégé

Docteurs ABOLI-AFFI Mihessé Roseline Maître-Assistante

ADJAMBRI Adia Eusebé Maître-Assistant

AYE-YAYO Mireille Maître-Assistante

BAMBA-SANGARE Mahawa Maître-Assistante

DONOU-N'DRAMAN Aha Emma Maître-Assistante

KABRAN Tano K. Mathieu Maître-Assistant

KOUAME Dénis Rodrigue Maître-Assistant

BLAO-N'GUESSAN A. Rebecca S. Maître-Assistante

ADIKO Aimé Cézaire Assistant

KABLAN-KASSI Hermance Assistante

YAPO Assi Vincent De Paul Assistant

### IV. CHIMIE ANALYTIQUE, CHIMIE MINERALE ET GENERALE, TECHNOLOGIE ALIMENTAIRE

Professeurs MALAN Kla Anglade Professeur Titulaire

Chef de Département

AKE Michèle Professeur Titulaire

GBASSI Komenan Gildas Professeur Titulaire

AMIN N'Cho Christophe Maître de Conférences Agrégé

BONY Nicaise François Maître de Conférences Agrégé

Docteurs KPAIBE Sawa André Philippe Maître-Assistant

BROU Amani Germain Assistant

TRE Eric Serge Assistant

### V. <u>CHIMIE ORGANIQUE ET CHIMIE THERAPEUTIQUE</u>

Professeurs OUATTARA Mahama Maître de Conférences Agrégé

Chef de Département

YAPI Ange Désiré Maître de Conférences Agrégé

Docteurs COULIBALY Songuigama Assistant

KACOU Alain Assistant

KOUAHO Avi Kadio Tanguy Assistant

N'GUESSAN Déto Ursul Jean-Paul Assistant

SICA-DIAKITE Amelanh Assistante

### VI. PARASITOLOGIE, MYCOLOGIE, BIOLOGIE ANIMALE ET ZOOLOGIE

Professeurs MENAN Eby Ignace H. Professeur Titulaire

Chef de Département

YAVO William Professeur Titulaire

DJOHAN Vincent Maître de Conférences Agrégé

Docteurs ANGORA Kpongbo Etienne Maître-Assistant

BARRO-KIKI Pulchérie Maître-Assistante

KASSI Kondo Fulgence Maître-Assistant

KONATE Abibatou Maître-Assistant

VANGA-BOSSON Henriette Maître-Assistante

MIEZAN Jean Sébastien Assistant

TANOH-BEDIA Valérie Assistante

### VII. PHARMACIE GALENIQUE, BIOPHARMACIE, COSMETOLOGIE, GESTION ET LEGISLATION PHARMACEUTIQUE

Professeurs KOFFI Armand Angelly Maître de Conférences Agrégé

Chef de Département

AMARI Antoine Serge G. Maître de Conférences Agrégé

DALLY Laba Ismaël Maître de Conférences Agrégé

Docteurs AKA ANY-GRAH Armelle A.S. Maître-Assistante

N'GUESSAN Alain Maître-Assistant

ALLOUKOU-BOKA P. Mireille Assistante

LIA Gnahoré José Arthur Attaché de recherche

N'GUESSAN Kakwokpo Clémence Assistante

N'GUESSAN-AMONKOU A. Cynthia Assistante

KOUASSI-TUO Awa Assistante

### VIII. PHARMACOGNOSIE, BOTANIQUE, BIOLOGIE VEGETALE, CRYPTOGAMIE

Professeur KONE-BAMBA Diénéba Professeur Titulaire

Chef de Département

Docteurs ADJOUGOUA Attoli Léopold Maître-Assistant

FOFIE N'Guessan Bra Yvette Maître-Assistante

ADIKO N'dri Marcelline Chargée de recherche

AKOUBET-OUAYOGODE Aminata Assistante

ODOH Alida Edwige Assistante

### IX. PHARMACOLOGIE, PHARMACIE CLINIQUE ET THERAPEUTIQUE ET PHYSIOLOGIE HUMAINE

Professeurs ABROGOUA Danho Pascal Professeur Titulaire

Chef de Département

KOUAKOU-SIRANSY N'doua G. Professeur Titulaire

IRIE-N'GUESSAN Amenan G. Maître de Conférences Agrégé

Docteurs EFFO Kouakou Etienne Maître-Assistant

AMICHIA Attoumou M Assistant

BROU N'Guessan Aimé Assistant

DJADJI Ayoman Thierry Lenoir Assistant

KAMENAN Boua Alexis Assistant

KOUAKOU Sylvain Landry Assistant

### X. PHYSIQUE, BIOPHYSIQUE, MATHEMATIQUES, STATISTIQUES

### **ET INFORMATIQUE**

Professeur GBASSI Komenan Gildas Professeur titulaire

Chef de Département

Docteur KONAN Jean-Fréjus Assistant

### XI. SANTE PUBLIQUE, HYDROLOGIE ET TOXICOLOGIE

Professeurs KOUADIO Kouakou Luc Professeur Titulaire

Chef de département

DANO Djédjé Sébastien Professeur Titulaire

OGA Agbaya Stéphane Maître de Conférences Agrégé

KOUAKOU-SACKOU Julie Maître de Conférences Agrégé

SANGARE-TIGORI Béatrice Maître de Conférences Agrégé

Docteurs CLAON Jean Stéphane Maître-Assistant

MANDA Pierre Maître-Assistant

DIAKITE Aissata Maître-Assistante

HOUNSA-ALLA Annita Emeline Maître-Assistante

KONAN-ATTIA Akissi Régine Maître-Assistante

OUATTARA N'gnôh Djénéba Chargée de Recherche

BEDIAKON-GOKPEYA Mariette Assistante

KOFFI Kouamé Assistant

KOUAME Jérôme Assistant

N'GBE Jean Verdier Assistant

### **DEDICACES**

Je dédie cette thèse...

### Au Seigneur...

Avant tout je tiens à rendre toute la gloire à Dieu Tout Puissant. C'est toi qui m'as donné la force et le courage durant toutes ces années d'études médicale, sans ta présence dans ma vie je n'aurai jamais pu réussir ce travail.

Garde moi encore dans ton amour, éclaire mon esprit, accorde moi la sagesse pour la suite de ma carrière et dans ma vie.

Merci mon Dieu.

Que ton nom soit glorifié à jamais Amen!

### A Mon père KESSE KAKOU

Merci pour le sens du travail bien fait que tu m'as inculqué et pour tous les sacrifices accomplis pour le bien-être de tous tes enfants. Tes conseils ont toujours guidé mes pas vers la réussite. Ta patience sans fin, ta compréhension et ton encouragement sont pour moi le soutien indispensable que tu as toujours su m'apporter.

Que Dieu le tout puissant te préserve, t'accorde santé, bonheur, quiétude de l'esprit et te protège de tout mal. Je t'aime papa

### A Ma Très Chère Mère KADJO ADJOBA épouse KESSE:

Tes prières et tes bénédictions m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études.

Autant de phrases aussi expressives soient-elles ne sauraient montrer le degré d'amour et d'affection que j'éprouve pour toi. En ce jour mémorable, pour moi ainsi que pour toi, reçois ce travail en signe de ma vive reconnaissance et mon amour infini. Merci pour tes précieux conseils et tes longues nuits de prière. Puisse le tout puissant te donner santé, bonheur et longue vie afin que je puisse te combler à mon tour. Je t'aime aussi maman

### A ma fille KOUAME AKISSI N'GOUAN ELVIRE

Que cette thèse soit une source d'inspiration dans tes études. Ne baisse jamais les bras lorsque les difficultés surviendront au cours de tes études et dans ta vie. Je t'aime énormément mon bébé.

### A Mes Frères et sœurs (Martial, Anthelme, Brigitte, Olivier, Blandine, Julie, Alice, Victoire, Gustave, Isabelle, Béranger, Sandrine et Franck)

Apres ces années d'études, je vous offre cette thèse qui est aussi votre fierté. Que la chaleur familiale qui nous entoure demeure car la richesse d'une famille réside dans son union et l'affection que nous nous témoignons.

### A mes neveux et nièces et petite fille

Que ce travail soit une source d'inspiration dans votre parcours scolaire. Puissiez-vous faire comme et même mieux que votre tante et grande mère.

### **A Mes Oncles et Tantes**

Merci pour toutes les bénédictions, tous les soutiens et encouragements tout le long de ce cursus. Que la miséricorde de Dieu soit sur vous.

Je vous dédie cette thèse pour vous exprimer mon affection.

### A mon bien aimé KODJO Assoi Sébastien

Ton apport a été appréciable dans la réalisation de cette œuvre. Tu m'as toujours soutenue et encouragée. Sans ton aide, tes conseils et tes encouragements ce travail n'aurait vu le jour aussi rapidement. Que dieu unisse nos chemins pour toute la vie et que ce travail soit le témoignage de ma reconnaissance et de mon amour pour toi. Je t'aime mon Sébastien!

### A mes cousins et cousines

Je tiens à vous remercier pour votre soutien et vos encouragements.

Que Dieu vous bénisse!

### A mes amies

Je tiens à vous remercier pour vos encouragements, en particulier Vingoné Lou Baffou Nadège, Dr Kanga Adjoua Joelle, Wadja Christelle et Yao Affoué Sandrine.

Que Dieu vous bénisse!

### A vous mes chers condisciples de la 33<sup>ème</sup> promotion de l'UFR de Sciences pharmaceutiques et biologiques

La route a été tortueuse et semblait interminable, mais nous nous sommes surpassés depuis le tronc commun et avons tenu jusqu'à la fin. Gardons toujours inaltérables les liens d'amitiés qui nous unissent. Puisse Dieu nous guider dans nos différentes carrières.

A Tout ceux qui de près ou de loin ont contribué à l'élaboration de ce travail...Un grand et infini merci. Puisse Dieu vous combler de ses grâces.

### REMERCIEMENTS

### Aux membres du corps professoral de l'UFR Sciences Pharmaceutiques et Biologiques d'Abidjan,

qui n'ont ménagé aucun effort pour parfaire notre formation.

Remerciement et infinie gratitude :

À mon Directeur de thèse, le **PROFESSEUR KOFFI ARMAND**, pour l'honneur que vous me faite en m'acceptant comme thésard dans votre illustre Département. Merci cher Maître de m'encadrer et de me prodiguer tous ces conseils et propos d'encouragements qui ont stimulé en moi la confiance et le courage.

Au Docteur N'GUESSAN Kakwokpo Clémence, Assistant à l'Unité de Formation et de Recherches (UFR) des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de l'Université Félix Houphouët-Boigny. Vous m'avez permis de découvrir la recherche et le développement d'un médicament en particulier la formulation d'un hydrogel à travers lesquels j'ai pu acquérir des connaissances et une expérience technique dans le domaine de la galénique. Merci cher Maître pour tout et sachez que votre aide m'a été indispensable. Que le Seigneur vous bénisse.

Au Docteur CHOUGOUO Rosine épouse NKUITCHOU pour sa disponibilité et ses conseils jours et nuit, tous les jours de la semaine. Vous voir travailler avec autant d'abnégation Docteur, a été pour moi une source d'inspiration et de motivation pour avancer malgré les difficultés. Femme au grand cœur soyez bénie.

Au **Docteur AKA ANY-GRAH SANDRINE**, Maître-Assistant à l'Unité de Formation et de Recherches (UFR) des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de l'Université Félix Houphouët-Boigny pour l'aide et les encouragements qu'elle m'a apportés.

Au **Docteur LIA José** pour sa disponibilité et ses conseils.

Au **Docteur YEO ALAIN** de L'institut pasteur de Cote D'Ivoire pour ses conseils et sa disponibilité dans la réalisation de la partie microbiologique de mes travaux.

Au **Docteur SENIN et madame ADJEMIAN** de la société ivoirienne d'abattage et de charcuterie (SIVAC) pour m'avoir permis de d'avoir la muqueuse vaginale de porc pour mes tests de mucoadhésion.

À Messieurs DJE BI Bernard et AKOMIA Awo Joachin pour leur disponibilité (de jour comme de nuit) et leur aide technique au sein du Laboratoire de Galénique. Recevez mes sincères remerciements pour tout le temps (souvent au gré de nombreuses privations) que vous avez bien voulu m'accorder au cours des travaux de recherches.

Au personnel du Laboratoire de Pharmacognosie pour m'avoir permis de réaliser la lyophilisation de mes préparations au sein de leur laboratoire.

Aux Secrétaires du Département de Pharmacie galénique madame KASSI et madame KOFFI pour les différentes convocations et informations diffusées lors de mes travaux.

Aux honorables membres du jury pour l'honneur que vous me faites en acceptant de siéger et d'apprécier mon travail. Recevez l'expression de mon infinie reconnaissance.

Puisse DIEU, le Tout Puissant, bénir chacun de vous.

# A NOS MAITRES ET JUGES

### A NOTRE MAITRE ET PRESIDENTE DE JURY

### Madame le Professeur SAWADOGO Duní

- Docteur en Pharmacie de l'Université d'Abidjan,
- ➤ Biologiste des hôpitaux,
- Docteur en Biologie Cellulaire option Hématologie de l'Université de Navarre,
   Pampelune, Espagne,
- Professeur Titulaire en Hématologie à l'UFR Sciences Pharmaceutiques et Biologiques à Abidjan,
- Chef du département de Biologie générale (Histologie-Cytologie-Cytogénétique) d'Hématologie et d'Immunologie à l'UFR Sciences Pharmaceutiques et Biologiques à Abidjan,
- ➤ Chef de l'Unité d'hématologie du laboratoire central du CHU de Yopougon,
- Responsable de l'enseignement d'Hématologie-Biologie au DES de Biologie,
- Membre de la Commission Nationale Permanente de Biologie Médicale (CNPBM),
- Membre de plusieurs sociétés savantes :
  - Société Pharmaceutique de Côte d'Ivoire (SOPHACI),
  - Société Ivoirienne d'Hématologie, Immunologie, Oncologie Transfusion Sanguine (SIHIO-TS),
  - Société Africaine Francophone d'Hématologie (SAFHEMA),
  - Société Française d'Hématologie (SFH),
  - European Hematology Association (EHA),
  - American Society of Hematology (ASH),
  - American Society of Hematologie oncology (SOHO).

### Cher maître,

C'est un honneur que vous nous faites en acceptant de présider ce jury de cette thèse, malgré vos nombreuses occupations et responsabilités.

Vos qualités académiques et professionnelles et votre courtoisie font de vous un Maître remarquable.

Veuillez trouver ici, cher Maître, l'expression de notre sincère reconnaissance et de notre profond respect. Que Dieu vous garde encore longtemps.

### A NOTRE MAITRE ET DIRECTEUR DE THESE

### Monsieur le Professeur KOFFI Armand Angely

- ➤ Maître de conférences agrégé en Pharmacotechnie et Biopharmacie
- ➤ Chef du département de pharmacie galénique, biopharmacie, cosmétologie, gestion et législation pharmaceutique de l'UFR des sciences pharmaceutiques et biologiques d'Abidjan
- Coordonnateur du Master de spécialité pharmacie industrielle et cosmétologie
- ➤ Chef de service de la pharmacie de l'Institut de cardiologie d'Abidjan
- Expert en pharmacie galénique et pharmacie industrielle au service de la DPLM
- Expert consultant à CODINORM, OLEA, CIPHARM
- ➤ Membre de l'Association de Pharmacie Galénique Industrielle (APGI)
- ➤ Membre de l'Association Française des Enseignants de Pharmacie Galénique (AFEPG)
- ➤ Membre de la SOPHACI
- ➤ Membre du Comité National de Lutte contre les Médicaments Illicites (COTRAMED...)
- Secrétaire Général de la société Ouest Africaine de Pharmacie Galénique et Industrielle (SOAPGI)

Cher maître,

Vous nous avez permis de réaliser ce travail passionnant, soyez en remercié. Tout au long de cette thèse nous avons pu apprécier non seulement votre ardeur au travail, mais aussi votre disponibilité, votre simplicité et votre bienveillance.

Vous nous avez donné le goût de la galénique et l'envie de faire de la recherche.

Nous vous remercions infiniment de nous avoir fait confiance pour la réalisation de cette thèse et de nous avoir si bien encouragée et soutenue.

Que ce travail témoigne de toute notre gratitude et de notre profond respect.

### A NOTRE MAITRE ET JUGE

### Madame le Professeur SANGARE TIGORI Béatrice

- Professeur en toxicologie (UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de l'Université Félix Houphouët Boigny)
- Docteur en Pharmacie
- Titulaire d'un Doctorat (PhD) en Toxicologie
- Experte en Toxicologie et Produits Pharmaceutiques près des Tribunaux de Côte d'Ivoire
- Pharmacien analyste au Laboratoire National de Santé Publique (LNSP)
- ➤ Titulaire du Diplôme d'Etudes Approfondies (DEA) de la valorisation de la Pharmacopée Africaine (UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de l'Université Félix Houphouët Boigny)
- ➤ Titulaire d'un DESS de toxicologie (UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de l'Université Félix Houphouët Boigny)
- ➤ Membre de la société Savante Pharmaceutique de Côte d'Ivoire (SOPHCI)
- ➤ Membre de la Société Ivoirienne de Toxicologie (SITOX)
- ➤ Membre de la société française de Toxicologie (STF)
- ➤ Membre du Bureau National d'Ordre des Pharmaciens de Côte d'Ivoire (Conseil central 3)

### Cher Maître,

En acceptant spontanément de siéger au sein de ce jury, vous confirmez votre caractère d'humilité, de disponibilité et de simplicité. Nous avons eu le privilège de bénéficier de vos qualités d'enseignant au cours notre cursus universitaire.

Nous vous prions de bien vouloir accepter, à travers ces mots l'expression de notre profonde gratitude.

### A NOTRE MAITRE ET JUGE

### Monsieur le professeur OUASSA Timothée

- Maitre de conférences agrégé de Bactériologie-Virologie,
- ➤ Responsable des unités de Bactériologie et de mycobactériologie du Centre de Diagnostic et de Recherche sur le SIDA (CeDRes),
- ➤ Membre de l'American Society for Microbiologie (ASM),
- ➤ Membre de l'European Respiratory Society (ERS),
- ➤ Membre de l'Observatoire pour la Surveillance de la Resistance des Microorganimes en Cote d'Ivoire (ORMICI),
- ➤ Membre du Cote d'Ivoire's Fulbright Alumni Association (CIFA),
- Ancien interne des hôpitaux d'Abidjan.

### Cher Maître

C'est avec promptitude que vous avez accepté d'apporter votre touche au perfectionnement de ce travail. Nous sommes honoré de vous compter parmi les membres de notre jury. Veuillez recevoir, cher maitre, l'expression de notre sincère gratitude.

### SOMMAIRE

LISTE DES ABREVIATIONS	XXX
LISTE DES TABLEAUX	XXXII
LISTE DES FIGURES	xxxIII
INTRODUCTION	1
I. GENERALITES	6
II. EPIDEMIOLOGIE	7
III. PHYSIOPATHOLOGIE	8
IV. ASPECTS CLINIQUES	11
V. DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE	13
VI. TRAITEMENT	15
VII. PREVENTION	18
CHAPITRE II :	20
VOIE VAGINALE	20
I. GENERALITES	21
II. LA FLORE VAGINALE COMMENSALE	22
III. BARRIERES NATURELLES	<b>2</b> 3
IV. LES FORMES GALENIQUES ADMINITREES PAR VOIE VAGINALE	26
CHAPITRE III:	28
LES HYDROGELS	28
I. GENERALITES	<b>2</b> 9
II. PROPRIETES RECHERCHEES ET APPLICATIONS DES HYDROGELS	33
III. POLYMERES THERMOGELIFIANTS: LES POLOXAMERS	34
IV. POLYMERES MUCOADHESIFS	37
V. ESSAIS	43
CHAPITRE IV :	47
LA LYOPHILISATION	47
I. GENERALITES	48
II. LE LYOPHILISATEUR	51
III. LES DIFFERENTES ETAPES DE LA LYOPHILISATION	52
Figure 16 : Mise en évidence du phénomène de surfusion (55)	54

Figure 17 : Effet de la vitesse de congélation et des cryoprotectants sur les cellules	57
DEUXIEME PARTIE :	62
ETUDE EXPERIMENTALE	62
CHAPITRE I:	63
MATERIELS ET METHODES	63
I. MATERIELS	64
II. METHODES	68
12. ESSAI DE STABILITE	76
CHAPITRE II:	77
RESULTATS	77
CHAPITRE III:	103
DISCUSSION	103
CONCLUSION	103
PERSPECTIVES	103
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	103
ANNEXES	103

### LISTE DES ABREVIATIONS

**CMC** : carboxyméthycellulose

**DSC** : calorimètre différentiel à balayage

**F127** : pluronic 127

**FVS** : fluide vaginal simulé

**G\*** : module de cisaillement ou de rigidité

g/l : gramme par litre

**G'** : module élastique

**G''** : module visqueux

**HEC** : hydroxyéthylcellulose

**HPC**: hydroxypolylcellulose

**HPMC** : hydroxypropylméthylcellulose

**HSH** : homme ayant des rapports sexuels avec des hommes

**Ig A** : immunoglobuline de type A

**IST** : infection sexuellement transmiscible

LOS : lipo-oligosaccharide

MC : méthylcellulose

**mPa.s** : millipascal par seconde

MRS : Man, Rogosa et Sharpe

N : newton

**OMS** : organisation mondiale de la santé

**P407** : poloxamer 407

**PA** : principe actif

**PBS**: phosphate buffer solution

**PC** : polycarbophile

**PCR** : Polymerase Chain Reaction

**pH** : potentiel hydrogen

**PVP** : Polyvinylpyrrolidone

**SDA** : Strand Displacement Amplification

**SIVAC** : société ivoirienne d'abattage et de charcuterie

**TAAN** : Technique d'amplification des acides nucléiques

**Tc** : température de collapse

**TCS** : température critique de la solution

**Tg** : température de transition vitreuse

**Tgel** : température de gélification

**TMA** : Transcription-Mediated Amplification

**TNF** : tumor nécrosis factor

**Tp** : température du produit

**UFC/ml** : unité formant colinie par millilitre

**VIH** : virus de l'immunodéficience humaine

### **LISTE DES TABLEAUX**

anorectales chez les adultes et les adolescents, les patients séropositifs et les HSH (World Health Organization and Reproductive Health and Research, 2016)	
Tableau IV: Molécules recommandées en cas d'échec du traitement de Neisseria gonorrhoeae (génitale oropharyngé) aux céphalosporines chez les adultes et les adolescents (World Health Organization and Reproductive Health and Research, 2016)	
Tableau V: Traitement et prévention de l'ophtalmie néonatale chez les nouveaux nés (World Health Organization and Reproductive Health and Research, 2016)	
Tableau VI: Recommandations pour le traitement de première intention d'autres infections gonococciques (Judlin and Thiebaugeorges, 2009)	
Tableau VII: Différents types de poloxamers et leurs structures chimiques (Gandra, n.d.)(Rowe, 2009)	
Tableau VIII: Quelques formulations à base de pluronic F127 utilisé par voie vaginale (Aka, 2011)	
Tableau XI: Aspect macroscopique et pH des suspensions de lactobacillus crispatus 80	
Tableau XII: Taux de survie de lactobacillus crispatus en fonction des solutions de cryoprotectants avant la lyophilisation	
Tableau XIII: Aspect macroscopique des gels formulés	
Tableau XIV: pH des gels sans lactobacillus crispatus avant la lyophilisation84	

### **LISTE DES FIGURES**

Figure 1 : Colonie de Niesseria gonorrhoeae après coloration de Gram (objectif * 100) (18)	)7
Figure 2 : Mécanisme d'infection de Neisseria gonorrhoeae et réponse immunitaire de l'hôt LOS= Lipo-oligosaccharide, TNF= Tumor Necrosis Factor	
Figure 3: Urétrite à Neisseria gonorrhoeae	11
Figure 4 : Cervicite aigue purulente à gonocoque	12
Figure 5: Pharyngite à Neisseria gonorrhoeae	13
Figure 6: Conjonctivite néonatale à Neisseria gonorrhoeae	13
Figure 7: Différentes couches du vagin	21
Figure 8: Souche de lactobacilles observée par microscopie électronique à balayage	24
Figure 9 : Différents types de stimuli	30
Figure 10 : Structure générale des poloxamers	35
Figure 11 : Installation expérimentale de mesure de la mucoadhésion	37
Figure 12: Etapes de la mucoadhésion	39
Figure 13: Elongation typique	39
Figure 14: Détermination de la température de gélification	45
Figure 15: Schéma des principaux composants d'un lyophilisateur	52
Figure 16 : Mise en évidence du phénomène de surfusion	54
Figure 17 : Effet de la vitesse de congélation et des cryoprotectants sur les cellules	57
Figure 18: Poudre d'alginate de sodium	65
Figure 19: Poudre de poloxamer 407	66
Figure 20: Structure chimique du poloxamer 407	66
Figure 21: Solutions de cryoprotectants	79
Figure 22: Viabilité de Lactobacillus crispatus en fonction des solutions de cryoprotectant pré-lyophilisation	82
Figure 23: Lyophilisat de Lactobacillus crispatus dans les solutions de cryoprotectant à gauche, et à droite lyophilisat reconstitué	83
Figure 24: Evolution de la viscosité en fonction de la température à 8,3 trs/min	85

Figure 25: Evolution de la viscosité du gel en fonction de la température du gel avant lyophilisation
Figure 26: Evolution de la viscosité du gel en fonction de la vitesse de cisaillement du gel avant lyophilisation
Figure 27: Evolution de la force de cisaillement en fonction de la vitesse de cisaillement du gel avant lyophilisation
Figure 28: Variation de la contrainte en fonction de la vitesse de cisaillement du gel à 25°C (A) et à 37°C (B) avant lyophilisation
Figure 29: Courbe d'évolution du travail d'adhésion du gel sur muqueuse vaginale de porc et sur film de polypropylène avant lyophilisation
Figure 30: Les gels lyophilisés à gauche, et à droite les gels reconstitués
Figure 31: Evolution de la viscosité du gel en fonction de la température à 8,3 trs/min 95
Figure 32: Evolution de la viscosité du gel en fonction de la température après lyophilisation96
Figure 33: Evolution de la viscosité du gel en fonction de la vitesse de cisaillement après lyophilisation
Figure 34: Evolution de la contrainte en fonction du taux de cisaillement du gel après lyophilisation
Figure 35: Variation de la force de cisaillement en fonction de la vitesse de cisaillement du gel à 25°C (A) et à 37°C (B) après lyophilisation
Figure 36: Courbe d'évolution du travail d'adhésion du gel sur muqueuse vaginale de porc et sur film de polypropylène
Figure 37: Courbe d'évolution de la force maximale de détachement du gel sur muqueuse vaginale de porc et sur film de polypropylène après lyophilisation

### INTRODUCTION

Les infections sexuellement transmissibles (IST) constituent un véritable problème de santé publique, avec le nombre sans cesse croissant de nouvelles infections (1). Ces infections mettent en péril la qualité de vie des populations et sont à l'origine de graves conséquences tant sur la santé sexuelle que reproductive des malades. Selon l'OMS la gonorrhée représente la deuxième IST bactérienne curable la plus répandue dans le monde avec 78 millions de cas chaque année parmi les 15 à 49 ans après la chlamydiose.

La gonorrhée est l'une des causes majeures de stérilité à travers le monde et sa présence accroit le risque de transmettre ou de contracter d'autres IST y compris le VIH (2). Le risque de contamination par transmission sexuelle après un contact infectant est estimé à 20 % chez l'homme, et de 50 % à 90 % chez la femme(3). Plus touchées par les formes asymptomatiques que les hommes (4) (5) (6), le risque de complications chez ces dernières est augmenté du fait d'un diagnostic tardif. Les complications rencontrées chez celles-ci incluent l'algie pelvienne inflammatoire, la stérilité tubaire et le risque de grossesse extrautérine (7) (4) ainsi que la contraction et la transmission de l'infection à VIH (8).

La prise en charge thérapeutique est basée sur une antibiothérapie simple et efficace. Cependant au cours de ces dernières années un traitement efficace devient de plus en plus problématique en raison de la résistance de *Neisseria gonorrhoeae* aux antimicrobiens (4) (9) (10) (11) (12) (13) (14).

Face à la recrudescence des souches de gonorrhée résistantes, l'OMS dans sa stratégie du secteur mondial de la santé contre les IST 2016-2021 encourage l'innovation thérapeutique par le développement de nouveaux médicaments microbicides efficaces afin de pallier la pharmaco-résistance. A cet effet le développement d'un hydrogel thermogélifiant et mucoadhésif à base de *lactobacillus crispatus* administré par voie vaginale semble être un moyen

efficace de prévention contre la gonococcie (15). En effet ce type de formulation offre à la fois les avantages des hydrogels et les avantages des probiotiques en empêchant l'adhésion et la fusion des bactéries à la surface de la muqueuse vaginale. Il serait intéressant que ce gel assure un taux de survie optimal des bactéries tout en conservant de bonnes propriétés d'adhésion. De plus cette formulation constituerait un moyen de prévention des IST contrôlé par les femmes.

C'est dans ce contexte que s'inscrit cette étude qui a pour objectif principal de formuler un gel lyophilisé à base de *Lactobacillus crispatus* destiné à la voie vaginale pour la prévention de la gonococcie. Pour atteindre cet objectif nous nous sommes fixés comme objectifs spécifiques de :

- Formuler un gel lyophilisé;
- Optimiser les propriétés rhéologiques et mucoadhésives du gel ;
- Evaluer simultanément l'influence de la lyophilisation sur les propriétés rhéologiques du gel ainsi que sur la viabilité de *lactobacillus crispatus*;
- Etudier l'influence du fluide vaginal simulé sur le lyophilisat.

Notre travail comprend deux grandes parties:

- ➤ La première partie porte sur une revue de la littérature en rapport avec la gonococcie, la lyophilisation, les hydrogels, la muqueuse et la flore vaginale.
- La deuxième partie est l'étude expérimentale qui présente le matériel, les méthodologies utilisées, les résultats obtenus et la discussion.

Une conclusion suivie de quelques perspectives sont proposées à la fin du document.

## PREMIERE PARTIE : REVUE DE LA LITTERATURE

### CHAPITRE I: LA GONOCOCCIE

#### I. GENERALITES

#### 1. Définition

La gonococcie également appelé blennorragie ou encore familièrement "chaude pisse" (7,16) est une infection sexuellement transmissible (13) qui touche les muqueuses de l'urètre, le col utérin, le vagin, la région anorectale, l'oropharynx, et parfois des conjonctives (3). Il s'agit d'une infection dont l'agent causal est une bactérie pyogène appelé *Neisseria gonorrhoeae* (17).

#### 2. Historique

Selon certains historiens, la gonococcie est une très ancienne pathologie car elle existait déjà dans l'antiquité puisque la première description a été faite en 2637 av J.-C. par l'empereur chinois Huang Ti (18).

Cependant la gonococcie fut pendant longtemps considérée comme la forme clinique de la syphilis (19). Ce n'est qu'en 1793 que Benjamin Bell (1749-1806) réussit à établir la différence entre la syphilis et la gonococcie. En effet il introduisit dans l'urètre d'un sujet sain de la matière issue du chancre d'un malade et chez un autre sujet sain il plaça entre le gland et le prépuce du pus blennorragique. Il observa alors chez ce dernier des manifestations cliniques propres à la gonococcie, et montra ainsi la différence entre ces deux affections.

La preuve définitive de la dualité de ces deux affections fut apportée en 1830 par Philippe Ricord (1800-1889) qui réussit à individualiser la gonococcie grâce à la méthode de confrontation entre partenaires contaminés et contaminants. Puis en 1879 le scientifique allemand Albert Neisser (1855-1916) découvrit pour la première fois sous son microscope la bactérie responsable de

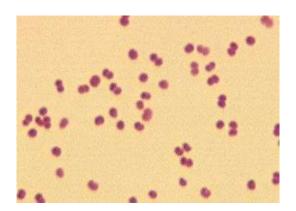
la gonococcie *Neisseria gonorrhoeae* dans un pus blennorragique. Six ans plus tard Ernst von Bumm réussit a isolé et à donner une description satisfaisante de la bactérie (17).

#### II. EPIDEMIOLOGIE

#### 1. Agent pathogène

Neisseria Gonorrhoeae appartient à la famille des Neisseriaceae et au genre Neisseria (19) (18).

*Neisseria* sont des Cocci gram négatif le plus souvent regroupés par paire ou diplocoques (20) ressemblant à des grains de café (**figure 1**) (16). Ce sont des bactéries aérobies strictes, encapsulées, immobiles, et oxydase positive intra ou extracellulaire (5) (6).



<u>Figure 1</u> Colonie de *Niesseria gonorrhoeae* après coloration de Gram (objectif \* 100) (18)

#### 2. Mode de contamination

*Neisseria gonorrhoeae* est une bactérie stricte de l'homme (18) (16). Sa transmission est presque toujours sexuelle (rapport vaginal, anal ou oral) (5) et le risque de transmission est plus important d'un homme infecté à sa partenaire

(50% à 90%) que d'une femme infectée à son partenaire (20%) (3). Il faut noter aussi que la contamination peut se faire également de la mère à l'enfant au cours de l'accouchement. Exceptionnellement, il a été rapporté des contaminations indirectes par les mains ou par des objets souillés (3) (6).

#### 3. Répartition géographique

La gonococcie est une affection cosmopolite touchant plus particulièrement les régions pauvres du globe. En effet en 1999 sur 60 millions de nouveaux cas de gonococcies, les deux tiers survenaient dans les pays en voie de développement avec 27 millions en Asie du Sud-Est et 17 millions Afrique subsaharienne (18). De plus en 2008, c'est environ la moitié des cas de gonocoques qui concernait les PVD (7).

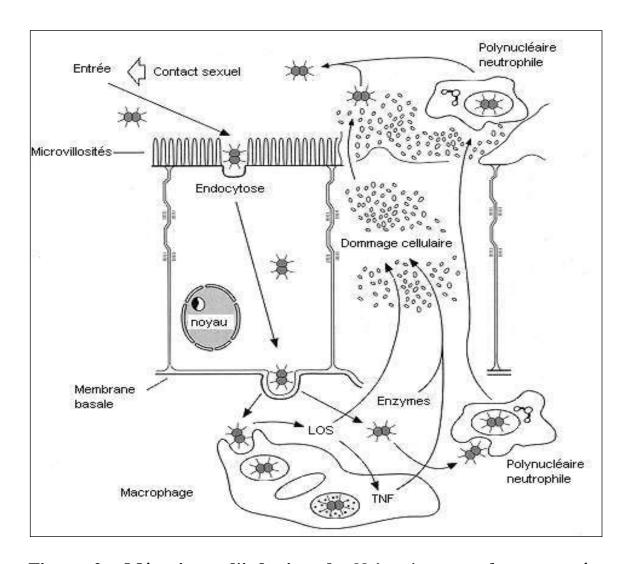
En Côte d'Ivoire *Neisseria Gonorrhoeae* représente 11,6% de l'ensemble des IST chez les professionnelles du sexe féminine derrière *Mycoplasma Genitalium* dont la prévalence est de15, 3%. Les localités les plus touchées sont Man, Gagnoa, Abidjan et Bondoukou avec respectivement 17%, 15,5% et 11,6% (21).

#### III. PHYSIOPATHOLOGIE

Le gonocoque possède des composants lui permettant à la fois, d'infecter l'hôte et d'échapper à sa réponse immunitaire. Le mécanisme d'infection du gonocoque est identifié par les étapes suivantes (**figure 2**).

Adhésion : le gonocoque possède des pili lui permettant d'adhérer aux microvillosités des cellules épithéliales

- Endocytose : inséré dans le feuillet externe de la membrane plasmique externe, les lipo- oligosaccharides (LOS) de *Neisseria gonorrhoeae* favorise la pénétration dans les cellules épithéliales par endocytose.
- Multiplication : après internalisation les bactéries se multiplient grâce au lipide A du LOS puis il est libéré par exocytose au niveau de la membrane basale.
- Exocytose : les vacuoles, chargées de bactéries, fusionnent avec la membrane basale et libèrent par exocytose les gonocoques dans le tissu conjonctif sous-épithélial. C'est le point de départ d'une inflammation locale ou d'une infection disséminée par passage sanguin si la bactérie échappe aux mécanismes de défense de l'hôte (19) (7) (18).



<u>Figure 2</u>: Mécanisme d'infection de *Neisseria gonorrhoeae* et réponse immunitaire de l'hôte LOS= Lipo-oligosaccharide, TNF= Tumor Necrosis Factor (18)

#### IV. ASPECTS CLINIQUES

#### 1. Chez l'homme

Chez l'homme, après une période d'incubation silencieuse et contagieuse de 2 à 7 jours apparait une urétrite aigue se manifestant par les symptômes suivants (**figure 3**):

- dysurie,
- écoulement urétral purulent
- brûlures mictionnelles intenses,
- parfois associé à une inflammation du gland (balanite) ou du méat urinaire (méatite)(7) (18) (3)



Figure 3: Urétrite à Neisseria gonorrhoeae (18)

#### 2. Chez la femme

Chez la femme l'infection est asymptomatique dans plus de 50% des cas. Lorsqu'elle est symptomatique, elle se manifeste par :

- une cervicite avec des leucorrhées purulentes (figure 4),
- parfois associée à une urétrite se traduisant par des brûlures mictionnelles, une dysurie, une pesanteur pelvienne, des métrorragies, une dyspareunie (3) (6).



Figure 4: Cervicite aigue purulente à gonocoque (18)

#### 3. Infection ano-rectale

Cette forme est apparue suite à une modification des comportements sexuels et est asymptomatique dans deux tiers des cas. Touchant les deux sexes elle se manifeste par les symptômes suivants :

- un prurit anal,
- une anite,
- un écoulement rectal purulent,
- des saignements ano-rectaux (18) (7) (3) (6)

#### 4. Infection pharyngée

Elle est le plus souvent asymptomatique (20). Selon des études françaises, elle touche 3 à 10 % des hétérosexuels, 10 à 40 % des homosexuels masculins et 5 à 20 % de femmes ayant une gonococcie tous sites confondus. Elle se traduit par une pharyngite ou une angine spontanément régressive en l'absence de traitement (**figure 5**) (7) (6) (3).



Figure 5: Pharyngite à Neisseria gonorrhoeae (18)

#### 5. Affection oculaire

Chez le nouveau-né la contamination se fait lors de l'accouchement et chez l'adulte elle résulte le plus souvent d'une auto-inoculation par manuportage (urines, sécrétions génitales contaminées). L'atteinte se traduit par un écoulement mucopurulent pouvant entrainer en l'absence de traitement une perforation du globe oculaire et une cécité (**figure 6**) (7) (3).



Figure 6: Conjonctivite néonatale à Neisseria gonorrhoeae (18)

#### V. <u>DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE</u>

Le prélèvement est un élément important pour le dépistage de l'infection à *Neisseria gonorrhoeae* car celui-ci doit respecter les exigences propres à chaque méthode diagnostic (sites de prélèvement, choix de l'écouvillon, milieux de

transport (18). Les deux principales techniques de dépistage de l'infection à gonocoque sont la culture et la biologie moléculaire (7).

- La culture est la méthode diagnostic de référence (3) permettant l'isolement de la souche de gonocoque et la réalisation d'un antibiogramme en particuliers chez les sujets symptomatiques (6). Elle est effectuée à partir d'un prélèvement bactériologique par écouvillonnage sur un écoulement urétral, cervical, pharyngé, ou anal (3) (7).
- Les nouvelles techniques de diagnostic par amplification d'acides nucléiques (TAAN) comme la PCR, la SDA, la TMA sont de plus en plus utilisées car ne requièrent pas la viabilité des bactéries (18), et permettent la détection des gonocoques dans tous les prélèvements en particulier ceux inadaptés ou peu sensibles à la culture (premier jet d'urine, anal, pharynx...) (3). De plus chez les sujets asymptomatiques ces techniques montrent une meilleure sensibilité par rapport à la culture (7).

#### VI. TRAITEMENT

Le traitement de la gonorrhée repose sur une antibiothérapie adaptée en fonction de la localisation et de l'âge du patient. La ceftriaxone est la molécule recommandée en première intention (tableau I, II, III, IV, V et VI).

<u>Tableau I</u>: Infections gonococciques génitales non compliquées (col utérin, urètre) et anorectales chez les adulte et les adolescents, les patients seropositifs et les HSH (22)

1ere intention	2ième intention		
Ceftriaxone	Therapie simple :		
$\geq$ 250 mg en IM x 1	Cefixime 800 mg en per os x1 ou x2, Azithromycine		
	1–2 g en per os, Cefixime 400 mg en per os, Gentamicine 240 mg en IM, Spectinomycine 2 g en IM, Kanamycine		
	2 g en IM ou la Ceftriaxone 125 mg en IM x1		
	Bithérapie :		
	Cefixime +Doxycycline (ou Azithromycine)		
	Ceftriaxone +Doxycycline (ou Azithromycine).		

<u>Tableau II</u>: Infections gonococciques génitales non compliqués et anorectales chez les femmes enceintes (22)

1 <sup>er</sup> intention	2ième intention	
Ceftriaxone	Therapie simple :	
$\geq$ 250 mg en IM x 1	Cefixime 400 mg en per os x 2	
	Cefixime 800 mg en per os, Azithromycine 1–2 g en per os ou la Cefixime 400 mg en per os x1	
	Bithérapie :	
	Cefixime + Azithomycine	
	Ceftriaxone + Azithomycine	

## <u>Tableau III</u>: Infections oropharyngées gonococciques chez les adultes et les adolescents (22)

1 <sup>er</sup> intention	2ième intention			
Ceftriaxone	Therapie simple :			
≥ 250 mg en IM x 1	Cefixime 400 mg per os x1 ou x 2, Cefixime 800 mg			
	en per os, Ceftriaxone 125 mg en IM, Gentamicine			
	240 mg en IM ou l'Azithromycine 2 g per os x 1			
	Bithérapie :			
	Azithromycine 1 g en per os x1 + l'une des molécules suivantes:			
	Cefixime 400 mg per os x2 ou x1, Cefixime 800 mg			
	per os x1, Ceftriaxone 500 mg en IM, Ceftriaxone			
	250 mg en IM, la			
	Ceftriaxone 125 mg en IM ou la Gentamicine 240 mg			
	en IM x 1			

#### <u>Tableau IV</u>: Molécules recommandées en cas d'échec du traitement de Neisseria gonorrhoeae (génitale oropharyngé) aux céphalosporines chez les adultes et les adolescents (22)

Médicaments prescrits

Gentamicine 240 mg en IM + Azithromycine 2 g per os x 1

Gentamicine 240 mg en IM + Azithromycine 1 g per os x 1

Spectinomycine 2 g en IM + Azithromycine 2 g per os x 1

Gemifloxacine 320 mg en per os +Azithromycine 2 g per os x 1

Ceftriaxone 1 g en IM + Azithromycine 2 g per os x 1

Gentamicine 240 mg en IM + Spectinomycine 2 g en IM x 1

Azithromycine 2 g en per os x 1

<u>Tableau V</u>: Traitement et prévention de l'ophtalmie néonatale chez les nouveaux nés (22)

<u>Tableau VI</u>: Recommandations pour le traitement de première intention d'autres infections gonococciques (23)

Situation clinique	Traitement de		
	première intention		
Endométrite/salpyngite	Ceftriaxone en plus du traitement probabiliste initié		
Orchi-épididymite	Ceftriaxone + Doxycycline		
Infection disséminée	Ceftriaxone puis relais par Cefixime à continuer pendant 24 à 48 heures après le début de l'amélioration clinique		

#### VII. <u>PREVENTION</u>

Comme toute IST, la prévention vise à réduire voire empêcher toute nouvelle contamination et aussi à dépister et traiter tous les sujets malades. Cette prévention repose essentiellement sur deux actions complémentaires :

- l'éducation et l'information;
- le dépistage.

#### 1. L'éducation et l'information

La prévention passe tout d'abord par une éducation et une information de la population en matière d'IST notamment sur la gonococcie. L'organisation de campagnes de masses destinées surtout aux populations à haut risques

(professionnelles du sexe, HSH, jeunes...) est en effet nécessaire pour informer la population sur la pathologie et surtout en insistant sur les conséquences et les attitudes à adopter pour l'éviter.

#### 2. <u>Dépistage</u>

Le dépistage des sujets les plus exposés surtout des femmes qui sont souvent asymptomatiques et contribuent à la propagation de la maladie, est un moyen de prévenir les infections à gonocoque. Par railleur tous les sujets positifs et leurs différents partenaires doivent être obligatoirement traité selon les recommandations en vigueur. Aussi des stratégies de dépistage doivent être mises en place en tenant compte des obstacles spécifiques à chaque population.

#### 3. Les moyens actuellement disponibles

Aujourd'hui, la prévention de la blennorragie repose essentiellement sur l'abstinence sexuelle et l'utilisation du préservatif masculin ou féminin. Par railleur la prévention de l'ophtalmie gonococcique chez le nourrisson passe par l'instillation systématique après la naissance de collyre antibiotique (rifampicine, tétracycline...) (18).

La gonorrhée est l'une des IST les plus répandues dans le monde qui a une incidence significative sur la morbidité des populations. Cependant *Neisseria gonorrhoeae* développe depuis quelques années une résistance aux médicaments utilisés pour le traitement d'où la nécessité de trouver de nouveaux médicament afin de pallier à cet antibiorésistance.

# CHAPITRE II : VOIE VAGINALE

#### I. **GENERALITES**

#### 1. ANATOMIE

Le vagin est un organe tubulaire (24) et fibromusculaire qui s'étend du col de l'utérus à vulve. Cet organe génital féminin est situé dans le bassin et mesure environ 9 cm de profondeur. Sur le plan histologique, la muqueuse vaginale est constituée de 4 parties distinctes :

- l'épithélium squameux stratifié,
- la lamina propia,
- la couche musculaire
- et l'adventice

La muqueuse vaginale forme une série de replis transverses appelés rugosités qui amplifient sa surface (25) (figure 7).

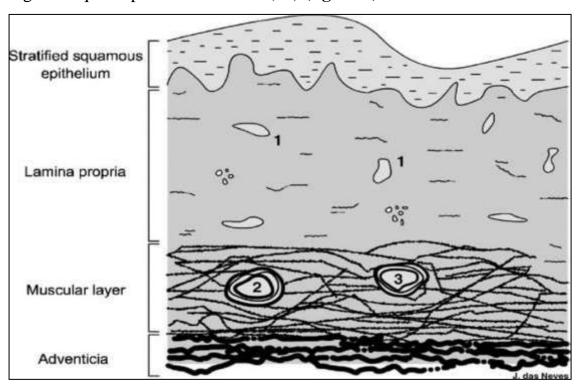


Figure 7: Différentes couches du vagin (25)

#### 2. PHYSIOLOGIE

Elle est recouverte par un gel viscoélastique appelé fluide vaginal ou sécrétion vaginale dont le rôle est de protéger la muqueuse vaginale des agressions extérieures et aussi d'assurer sa lubrification. Evaluée entre 0,5 et 0,75 g en moyenne, ce gel est un mélange de fluides provenant de diverses sources telles que l'utérus, le col de l'utérus le plasma et même les sécrétions menstruelles. Sa composition et ses caractéristiques physiques changent selon la période menstruelle.

Le pH vaginal normal est acide (4,5 à 5,5) et est le fait de l'acide lactique produit par les bactéries lactiques(26). Ce pH est aussi influencé par les sécrétions vaginales et le cycle menstruel (27) et vari selon l'âge (24).

L'écologie du vagin est influencée par des facteurs tels que la teneur en glycogène des cellules épithéliales, glucose, pH, taux d'hormone, traumatisme lors de rapports sexuels, contrôle des naissances dispositifs, l'âge et le traitement antimicrobien. Tous ces facteurs modifient la flore normale du vagin, entraînant une interférence de l'environnement pour les microbes les rendant ainsi pathogènes (24).

#### II. LA FLORE VAGINALE COMMENSALE

Les leucorrhées vaginales physiologiques contiennent des bactéries formant la flore vaginale. Cette flore est composée essentiellement de lactobacilles majoritairement de *Lactobacillus iners, Lactobacillus jensenii, et de Lactobacillus crispatus* (28) (29) (24). Ces lactobacilles encore appelé bacilles de Döderlein qui protègent le vagin des infections causées par des microorganismes pathogènes. Cette protection s'explique par la production d'acide lactique et de substances bactéricides telles que le peroxyde d'hydrogène ainsi que des substances tensioactives (30) (25).

#### III. BARRIERES NATURELLES

#### 1. LA MUQUEUSE VAGINALE

La muqueuse vaginale représente la première ligne de défense naturelle contre les infections. En effet elle contient dans ses sécrétions du lysozyme, de la lactoferrine et des anticorps de type IgA qui luttent contre les bactéries pathogènes. En effet :

- Le lysozyme est une enzyme produite par les polynucléaires neutrophiles et les monocytes. Elle est capable de dégrader le peptidoglycane des bactéries empêchant ainsi leur croissance.
- La lactoferrine est une molécule chélatrice du fer qui est nécessaire à la croissance des bactéries. Celle-ci en privant les bactéries du fer nécessaire à leur croissance protège contre les infections bactériennes(31) (32).
- Les IgA, ont également un rôle protecteur en captant les pathogènes (7).

#### 2. LES LACTOBACILLES

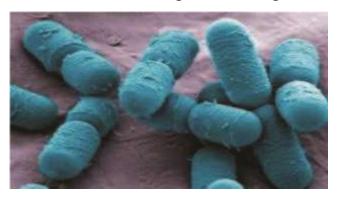
#### • <u>Définition</u>

Les lactobacilles sont des cellules vivantes, procaryotes, hétérotrophes et chimio-organotrophes (33). Elles appartiennent au groupe des *Firmicutes*, à la classe des Bacilli, à l'ordre des *Lactobacillales* et à la famille des *Lactobacillaceae* et au genre lactobacillus (34) (35).

Les lactobacilles constituent, entre autres, une part importante du microbiote humain. Chez l'Homme sain, ils se retrouvent tout au long du système digestif de la bouche au côlon et dans la muqueuse vaginale (34) (35).

#### • Caractères morphologiques

Les lactobacilles sont des bactéries Gram positif, immobiles, asporulées (35). Ce sont des bâtonnets ou des coccobacilles formant parfois de courtes chaînes (34) (36). La figure 8 montre l'aspect microscopique d'une souche de lactobacilles observée par microscopie électronique à balayage.



<u>Figure 8:</u> Souche de lactobacilles observée par microscopie électronique à balayage (34)

#### Caractères biochimiques

Les lactobacilles sont des bactéries microaérophiles ou anaérobies dépourvus de catalase (certaines souches possèdent une pseudocatalase), de cytochrome, de nitrate réductase et de gélatinase.

Le métabolisme énergétique des lactobacilles est exclusivement de type fermentaire permettant de distinguer trois groupes de lactobacilles.

- Groupe I : il comprend les espèces homofermentaires obligatoires qui produisent uniquement de l'acide lactique à partir du glucose.
- Groupe II : ce sont les espèces hétérofermentaires facultatives qui produisent de l'acide lactique et de l'acide acétique.

- Groupe III : il est constitué des espèces hétérofermentaires obligatoires qi sont capable de produire CO2, d'acide lactique, d'acide acétique et / ou d'éthanol (34) (35).

#### • <u>Caractères culturaux et exigences nutritionnelles</u>

Les lactobacilles se multiplient dans une gamme de température comprise entre 15°C et 42°C cependant pour les souches thermophiles la température peut atteindre 55 °C sans préjudice pour celle-ci.

De plus, les lactobacilles se développent au mieux dans des conditions acides, quand le pH avoisine les 4,5 à 6,4, mais leur croissance s'arrête, lorsque le pH avoisine 3,5.

Quant au milieu le plus adapté à leur culture est celui De Man, Rogosa et Sharpe (MRS), où les colonies se développent en 24 à 48 heures.

Par ailleurs, les lactobacilles sont caractérisés par des exigences nutritionnelles et ne peuvent croître facilement que dans des milieux riches en vitamines, bases nucléiques et en sources de carbone et d'azote...(33) (34) (35).

#### • <u>Intérêts des lactobacilles en médecine humaine</u>

Les principaux effets bénéfiques liés à l'utilisation des lactobacilles sont :

- atténuation de l'intolérance au lactose,
- prévention des allergies atopiques,
- prévention et retardement de l'apparition de certains cancers,
- réduction du taux de cholestérol et prévention de certaines maladies cardiovasculaires,
- modulation et stimulation de la fonction immunitaire,

- prophylaxie et thérapie des maladies intestinales inflammatoire : maladie de Crohn, et le syndrome du côlon irritable,
- prévention et traitement de l'infection par *Helicobacter pylori* (34)

Au niveau des organes sexuels ils peuvent également être employés pour la prévention ou le traitement des vaginoses bactériennes et aussi pour diminuer le risque d'infections urinaires. A cet effet il a été démontré que les lactobacilles présente dans la flore vaginale de la femme jouent un rôle important dans la protection contre les infections à *Neisseria gonorrhoeae* car (30):

- ils réduisent l'adhésion du gonocoque d'environ 50 %;
- ils ont la capacité de déplacer les gonocoques déjà adhérés aux cellules, ce qui suggère leur potentiel comme agent prophylactique post-exposition (7).
- l'acide lactique et le peroxyde d'hydrogène (H2O2) produits sont toxiques pour le gonocoque (7).

#### IV. <u>LES FORMES GALENIQUES ADMINITREES PAR VOIE</u> VAGINALE

La voie vaginale est un site d'application efficace pour des traitements locaux ou systémiques du fait de sa grande surface, de sa perméabilité et de sa riche vascularisation. Les formulations médicamenteuses administrées doivent se présenter sous une forme facilitant leur administration. Les formes galéniques destinées à la voie vaginale sont diverses et peuvent être regroupées comme suit :

- les formes liquides (solutions, émulsions et suspensions vaginales) ;
- les formes semi-solides (crèmes, pommades et gels);
- et les formes solides (ovules, comprimés vaginaux, capsules vaginales, films vaginaux).

Ces formes pharmaceutiques sont constituées d'excipients dans lesquels sont dissous ou dispersés le ou les PA. Une fois en place ces formulations doivent être distribuées de façon uniforme sur toute la surface de la muqueuse et y demeurer suffisamment afin d'augmenter la biodisponibilité et l'efficacité du PA (27).

La voie vaginale est une voie intéressante pour l'administration de traitement topique mais aussi générale, car elle permet une délivrance locale et non invasive d'agents antimicrobiens et une biodistribution de médicaments par sa riche vascularisation. Cependant pour être efficace ces formulations doivent tenir compte de la physiologie et des exigences de cette voie. Dans le cas du gonocoque, à l'heure actuelle l'abstinence et le préservatif sont les seuls moyens de prévention contre cette infection. Au vu des effets bénéfiques des lactobacilles une formulation topique contenant ces probiotiques serait un moyen supplémentaire de protection contre cette IST.

## CHAPITRE III : LES HYDROGELS

#### I. GENERALITES

#### 1. **DEFINITION**

Les hydrogels sont des réseaux tridimensionnels de polymères hydrophiles ayant la capacité d'absorber de très grande quantité d'eau ou de fluide biologique, sans se dissoudre et sans perdre leur structure (37).

Biocompatibles grâce à leur forte teneur en eau, ces préparations sont destinées à être appliquées sur les muqueuses (ophtalmique, nasale buccale, rectale, vaginale) ou sur la peau pour un usage thérapeutique (27).

#### 2. CLASSIFICATION

Il existe de nombreux critères permettant la classification des hydrogels cependant seuls les critères les plus utilisés seront retenus dans ce chapitre. Ainsi les hydrogels peuvent être classés en fonction de leurs propriétés physiques, de leur réticulation et de leur source (38).

#### a. Selon leurs propriétés physiques

Parmi ces hydrogels certains peuvent réagir aux changements de leur environnement. On les appelle hydrogels intelligents ou hydrogels type sol-gel. Ces hydrogels sont caractérisés par leur capacité à réagir à des stimuli extérieurs qui induisent des modifications des propriétés physico-chimiques telles que le gonflement. Ces stimuli peuvent être regroupés en trois classes (**figure 9**) :

- Les stimuli physiques : rayonnements lumineux, ultrasons, température, pression, champs électriques, champs magnétiques
- Les stimuli chimiques : pH, force ionique, composé chimique
- Les stimuli biologiques : enzymes, anticorps/antigènes, ligands(39) (38).

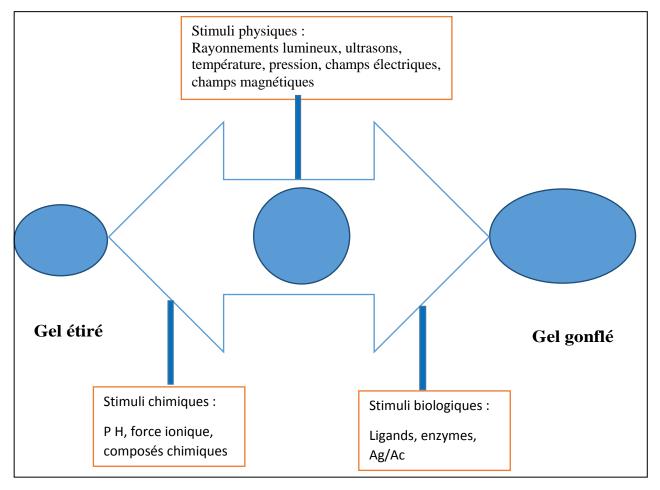


Figure 9 : Différents types de stimuli (40)

Les hydrogels pH sensibles ou ions sensibles et les systèmes thermosensibles sont les hydrogels les plus couramment étudiés.

#### - Les hydrogels pH sensibles ou ions sensibles

Les hydrogels sensibles au pH ou sensibles aux ions modifient leur comportement de gonflement en fonction du changement de pH de l'environnement externe (41).

#### - Les hydrogels thermosensibles

Les hydrogels sensibles à la température modifient leur comportement de gonflement en réponse à une modification de la température ambiante (41).

Parmi les systèmes thermosensibles décrits dans la littérature, on peut citer divers polymères naturels et leurs dérivés (exemple : dérivés cellulosiques, chitosane, xyloglycane, dextrane, gélatine), N-Isopropylacrylamide et ses copolymères, ainsi que les poloxamères (42).

Ce sont des formes bien acceptées. Ils montrent une variabilité du comportement de gonflement en réponse aux changements des températures (43).

Les hydrogels thermosensibles subissent une transition de phase (solide à liquide / liquide à solide ou gonflement / rétrécissement du réseau polymère) avec le changement de température supérieure ou inférieure à une certaine température appelée température critique de la solution (TCS) ou température de gélification (Tgel).

Les hydrogels sensibles à la température peuvent être à la fois biodégradables et biocompatibles.

Divers médicaments, comme les hormones, les agents antidiabétiques, les agents anticancéreux et les peptides, ont été étudiés pour une libération améliorée par l'utilisation de tels systèmes (44).

#### b. Selon la réticulation

#### • **Hydrogel chimique**

Dans les gels chimiques, les chaines de polymères sont liées entre elle par des liaisons covalentes. En raison de ces liaisons de haute énergie les gels ne sont ni thermoréversibles ni solvoréversibles on parle de caractère "permanent" des gels chimiques (39).

#### • Hydrogel physique

Pour les gels physiques, la connexion entre les chaines de polymères est de type transitoire (38). Ces liaisons de faible énergie (interactions de Van der Waals, interactions ioniques, enchevêtrements et liaisons hydrogène) entraine

une réversibilité de la gélification fournissant ainsi un caractère dit "transitoire"(39).

#### c. Selon leur origine

#### animale

Ces hydrogels sont formés à partir de polymères d'origine animale comme la gélatine, le collagène... (27).

#### • <u>végétale</u>

Ces hydrogels sont préparés à partir de polymères obtenu de végétaux comme les algues pour les alginates et les carraghénanes, de légumineuse pour la gomme guar...

#### • <u>inorganique</u>

Ils sont formés de substances inorganiques comme hydroxyde d'aluminium, bentonite, laponite. Les plus utilisés dans le domaine biomédical sont les pluronics (kolliphor®, poloxamer, synperonic®,tetronic®) et les carbomers car permettent d'obtenir dont gels dont la gélification n'est fonction que de l'environnement extérieur (température, pH) (27).

## II. PROPRIETES RECHERCHEES ET APPLICATIONS DES HYDROGELS

#### a) Propriétés recherchées

Pour une utilisation dans le domaine biomédical, les gels pharmaceutiques doivent posséder les propriétés suivantes :

- ✓ Biocompatibilité : polymère biocompatible est un système compatible avec les systèmes vivants (45)
- ✓ stabilité en milieu acide,
- ✓ adhérence au site d'administration,
- ✓ non liquéfaction à la température corporelle,
- ✓ dissolution lente,
- ✓ caractère lubrifiant,
- ✓ toucher non gras,
- ✓ non irritant

Pour ceux administrés par voie vaginale, d'autres propriétés sont en plus requises à savoir :

- être sous forme facilitant l'administration et une distribution homogène du principe actif au niveau de la muqueuse vaginale
- pouvoir maintenir le pH optimal pour l'épithélium vaginal,
- être compatible avec d'autres dispositifs vaginaux.

Aussi ces hydrogels sont particulièrement intéressants car leur réalisation est aisée et ils présentent la caractéristique d'être incolores, inodores, insipides et thermodynamiquement stables (31).

#### b) Applications thérapeutiques

La grande quantité d'eau qui les compose confère aux hydrogels des propriétés semblables à celles des tissus vivants, et les rend donc très intéressants pour des applications pharmaceutiques et biomédicales. Les trois principales applications dans le secteur pharmaceutique sont :

- **Système de délivrance de médicament** (haute perméabilité du PA; libération contrôlée du PA),
- **Immobilisation cellulaire** (par croissance des cellules dans la matrice ; par l'adsorption, la capture ou l'encapsulation),
- **Ingénierie tissulaire** (l'ensemble des techniques et des méthodes permettant développer des substituts biologiques pouvant restaurer, maintenir ou améliorer les fonctions des tissus) (45)

Leurs caractéristiques permettent de piéger les actifs et de les libérer grâce à un stimulus choisi lors de la fabrication de l'hydrogel (39).

#### III. POLYMERES THERMOGELIFIANTS: LES POLOXAMERS

Les poloxamers sont des polymères synthétiques constitués d'oxyde d'éthylène et de blocs d'oxyde de propylène disposés dans une structure tri-Block EOa –POb –EOa (**figure 10**). Les Poloxamers se présentent parfois sous forme de granules blancs inodores et insipides. Ils sont généralement solubles dans l'eau (46)(47). Ils sont enregistrés sous différents noms commerciaux Pluronic ®, Synpersonic ® ou Tetronic ® (40).

La balance hydrophile/lipophile de ces polymères est modulée par les variations de a et de b offrant ainsi des propriétés physico-chimiques diverses. C'est pourquoi les poloxamers sont une classe importante de tensio-actifs ayant

de nombreuses applications industrielles en tant que détergent, moussant, dispersant, émulsifiant, gélifiant, solubilisant et épaississant. Ils présentent également des propriétés thermoréversibles, qui présentent un grand intérêt pour l'optimisation de la formulation de médicaments. Les solutions aqueuses de poloxamer sont très stables en présence d'ions alcalins, acides ou métalliques (47).

$$H = O$$
  $A = O$   $A$ 

Figure 10 : Structure générale des poloxamers (48)

Les poloxamers issus de diverses Pharmacopées sont cités dans le Tableau VII.

<u>Tableau VII</u>: Différents types de poloxamers et leurs structures chimiques (48)

(40)	1	1	T	1
Poloxamers	a	b	Masse moléculaire (g/mol)	Pluronics <sup>®</sup>
124	12	20	2090-2360	L 44 NF
188	80	27	7680-9510	F 68 NF
237	64	37	6840-8830	F 87 NF
338	144	41	12700-17400	F 108 NF
407	101	56	9840-14600	F 127 NF

Un des poloxamers les plus étudiés est le poloxamer 407 ou Pluronic<sup>®</sup> F 127 car il permet la formation de gels transparents, incolores, facilement lavables à l'eau, peu irritants pour la peau et les muqueuses (**tableau VIII**) (27). Il est aussi connu pour son excellente compatibilité avec d'autres composés chimiques, sa capacité de solubilisation de diverses substances actives et son aptitude à libérer de manière prolongée les substances qu'il renferme (39).

Cependant, l'hydrogel de poloxamer 407 présente de faibles propriétés mécaniques et bioadhésives (49). Afin de pallier à cela, des polymères mucoadhésifs sont souvent rajoutés aux formulations permettant ainsi d'immobiliser le gel le plus longtemps possible au niveau de la muqueuse vaginale (50).

<u>Tableau VIII</u>: Quelques formulations à base de pluronic F127 utilisé par voie vaginale (27)

Formulations	Principe actif	Remarques	Réf.
F127/F68/Polycarbophile	Antigène HBS+RANTES exprimant un ADN plasmidique	Prolongation du temps de résidence au niveau du vagin	Oh et al., 2003
F127/F68/Polycarbophile 15/15/0,2 % ou 15/20/0,2 %	Clotrimazole	et libération prolongée du PA	Chang <i>et al.</i> , 2002b
F127/HPMC 20/0,2 % m/V F127/Polycarbophile 20/0,2 % m/V	Clotrimazole solubilisée dans la ß- cyclodextrine (1 :1) ratio molaire	Libération continue et prolongée du PA	Bilensoy et al., 2006
F127	_	Lubrifiant vaginal (commercialisé)	Rohan <i>et al.</i> , 2004

#### IV. POLYMERES MUCOADHESIFS

#### 1. FONDAMENTAUX DE LA MUCOADHESION

#### • <u>Définition</u>

La mucoadhésion est définie comme la force avec laquelle le produit se lie à la muqueuse à la température physiologique (37°C) (41). La figure 11 présente schématiquement le dispositif expérimental de la mucoadhésion.

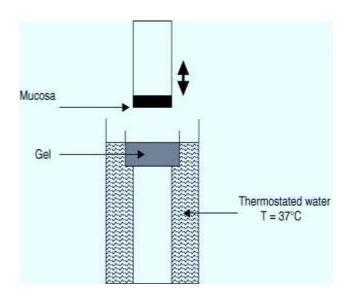


Figure 11 : Installation expérimental de mesure de la mucoadhésion (49)

#### • <u>Mécanismes</u>

Les mécanismes de mucoadhésion n'ont pas encore été entièrement élucidés mais il existe six principales théories qui s'appuient sur les interactions physico-chimiques entre l'excipient mucoadhésif et la surface épithéliale. Il s'agit de : l'hydratation, l'adsorption, la diffusion-interpénétration, l'interaction électronique, la fracture, et l'ancrage mécanique (**figure 12**).

- La théorie d'adsorption est la plus communément admise : lors du contact initial entre le mucus et les polymères mucoadhésifs il se forme des

liaisons de faible énergie comme les forces de Van der Waals, les liaisons hydrogènes, les interactions hydrophobes. Ces liaisons sont les interactions typiques pour la mucoadhésion en raison de leur rapidité et leur réversibilité.

- La théorie d'hydratation : Elle détermine la capacité d'étalement du polymère à la surface de la muqueuse. Dépendante de la tension interfaciale entre les deux surfaces cette théorie est principalement appliquée pour les formes liquides.
- La théorie de diffusion-interpénétration : lors du contact initial la diffusion des chaînes du polymère mucoadhésif dans le réseau de mucus, favorise l'enchevêtrement de ces deux surfaces. Elle repose sur certains paramètres à savoir la flexibilité des chaînes, la similitude entre les deux structures, le coefficient de diffusion ainsi que le temps de contact.
- La quatrième théorie est celle des interactions électroniques. Elle est basée sur la différence de propriétés électroniques entre le mucus et des polymères mucoadhésifs. Le contact favorise le transfert d'électrons avec formation d'une double couche électronique à l'interface adhésif-substrat ce qui conduit à des forces d'attraction au niveau de cette région.
- La théorie de fracture repose sur la force d'adhésion entre les systèmes. En effet plus la force d'adhésion est importante plus il sera difficile de séparer les deux systèmes ce qui augmente le temps de contact.
- La théorie d'ancrage mécanique est la plus ancienne des théories de l'adhésion et considère que l'adhésion est le résultat d'un ancrage physique entre les deux surfaces. Cette théorie est importante pour les matières rugueuses et poreuses (39).

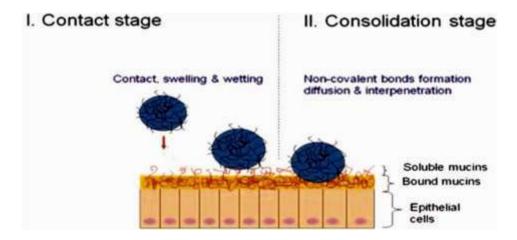
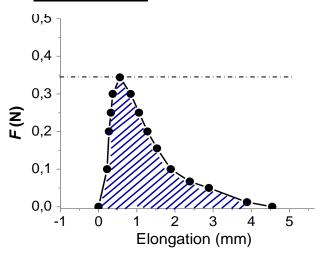


Figure 12: Etapes de la mucoadhésion (39)





**Figure 73: Elongation typique (40)** 

Cette courbe représente la force maximale de détachement et le travail d'adhésion. Plus la valeur du travail d'adhérence est élevée, plus la formulation se lie à la surface de la muqueuse, augmentant ainsi le temps de rétention et diminuant la fuite de la formulation.

# • Intérêt dans la formulation des médicaments

La mucoadhésion est une piste intéressante dans la formulation des produits pharmaceutiques. Elle permet de surmonter des obstacles physiologiques et d'améliorer certains paramètres technologiques en vue d'atteindre le ou les objectifs thérapeutique (s). En général, elle augmente le temps de contact de la formulation à ces sites permettant de maintenir un taux de libération élevé. En effet selon la forme galénique et l'itinéraire, les polymères mucoadhésifs peuvent être utilisés pour obtenir :

- un traitement local sur la peau ou sur une muqueuse ;
- également un traitement général. Dans ce cas l'absorption du principe actif est dépendante du site de rétention (vascularisation, l'effet de premier passage hépatique...) et de la durée de contact;
- un meilleur confort de traitement pour le patient (voie moins traumatisante) ;
- une meilleure observance thérapeutique par réduction du nombre de prises (40).

# • Classification des polymères bioadhésifs

Les polymères mucoadhésifs sont classés en première et deuxième génération.

• Les polymères de première génération peuvent être divisés en trois catégories : cationique, anionique et non-ionique. Les polymères anioniques et cationiques ont une capacité d'adhésion plus forte que les composés non-ioniques. Les polymères anioniques comme l'alginate de sodium sont les plus largement utilisés dans la formulation

pharmaceutique et présentent une faible toxicité. Cependant leur temps de contact est relativement court du fait du renouvellement du mucus. Pour pallier à cet inconvénient des polymères moins sensibles au renouvellement du mucus ont été développé.

Exemples de polymères de premières génération : le chitosan, l'acide polyacrylique, l'alginate de sodium, les dérivés cellulosiques (HPMC, CMC, HPC)

• Les polymères de deuxième génération. Ceux-ci peuvent adhérer directement à la surface des cellules épithéliales en formant des liaisons covalentes plutôt qu'au mucus. Cependant des investigations approfondies au niveau biologique sont encore nécessaires pour s'assurer de l'innocuité de ces polymères sur certaines muqueuse (les lectines, les thiomères) (39).

Exemples de polymères utilisés dans les formulations de gels pour la voie vaginale (27):

- Carraghénanes
- Carbopol® ou carbomer
- Gélatine
- Carboxyméthylcellulose (CMC)
- Hydroxyéthylcellulose (HEC)
- Hydroxypropylcellulose (HPC)
- Hydroxypropyl méthylcellulose (HPMC)
- Méthylcellulose (MC)
- Polycarbophile (PC)
- Pectine et traganth
- Acide hyaluronique
- Polysaccharides sulfatés

- Polyvinylpyrrolidone (PVP)
- Alginate de sodium
- Amidon (Offner & Kleth-Gelotte, 2002) (27).

# 2. L'ACIDE ALGINIQUE

L'acide alginique est un polymère polysaccharidique naturel extrait d'algues brunes (45). Il est formé mélange de résidus de L'acide D-mannuronique et l'acide L-glucuronique (51). A l'état pur, c'est une poudre blanche, inodore et insipide. L'acide alginique est insoluble dans l'eau mais il s'hydrate considérablement, jusqu'à cent fois son volume initial. L'acide alginique est un produit officinal; il est inscrit à la Pharmacopée Européenne (52). Employé dans beaucoup de préparations pharmaceutiques pour son pouvoir mucoadhésif, il augmente considérablement le temps de contact des préparations au site d'administration et par conséquent la biodisponibilité (27).

L'acide alginique est également utilisé dans une variété de médicaments oraux et topiques (51).

L'acide alginique est également utilisé comme :

- Epaississant en augmentant la viscosité de certaines préparations trop liquides réduisant ainsi le phénomène d'écoulement (52)
- Désintégrant/liant dans les comprimés les gélules l'acide alginique est utilisé à la fois comme liant et comme agent de désintégration à des concentrations de 1 à 5% p / p (51). En effet comme désintégrant lorsqu'il s'hydratant il permet de casser une masse solide (comprimé) en particules plus petites et plus faciles à dissoudre ou disperser et comme liant il induit l'agrégation des particules de poudres lors de la phase de granulation (52).

- En tant qu'agent stabilisant pour les émulsions huile dans eau. L'acide alginique a été utilisé pour améliorer la stabilité du levosimendane.
- Sur le plan thérapeutique, l'acide alginique a été utilisé comme antiacide en association avec un antagoniste des récepteurs H2, il a également été utilisé pour le traitement du reflux gastro-oesophagien (48).

#### V. ESSAIS

Plusieurs essais sont effectués sur les formulations d'hydrogel.

# 1. Les évaluations macroscopiques

La clarté, la couleur et la texture des formulations sont évaluées à l'oeil nu (53).

# 2. <u>Les évaluations physico chimiques</u>

Cette évaluation est réalisée d'une part, par la détermination du pH des préparations et d'autre part, par la mesure de la teneur en substance active (53).

# 3. Les analyses rhéologiques

Les études rhéologiques et viscoélastiques déterminent les interactions entre les poloxamers, les copolymères et les additifs.

Le comportement rhéologique des solutions de poloxamer peut être, soit newtonien (liquide), soit non newtonien (en gel), en se basant sur la température et la concentration en polymère. En dessous de la température de transition solgel, les solutions de poloxamers présentent des propriétés newtoniennes alors qu'au-dessus, ils présentent des propriétés non newtoniennes (40).

Les matériaux non newtoniens présentent des propriétés élastiques ainsi que des propriétés visqueuses; cette caractéristique particulière est connue sous le nom

de viscoélasticité. Des études viscoélastiques sont réalisées en utilisant une analyse mécanique dynamique, en appliquant une petite contrainte oscillatoire et en mesurant les modules élastiques ou de stockage (G') et les modules visqueux ou de perte (G'') et par conséquent l'angle de perte (40).

L'étude du comportement permet de diviser les changements des comportements rhéologiques en trois phases comme représenté ci-dessous.

Durant la première phase(1), avant le point de gélification, les propriétés élastiques sont négligeables et le comportement de la solution étudiée est celui d'un liquide visqueux. La deuxième phase (2) correspond à la gélification où le comportement élastique prend le dessus sur le comportement visqueux. La dernière phase (3) est une phase de stabilisation où le gel est formé. A partir de ces deux paramètres visqueux et élastiques, tan ( $\delta$ ) a été obtenue,  $\delta$  étant l'angle de perte qui est le déphasage observé entre la contrainte et la déformation. Il varie entre 0° (comportement élastique parfait) et 90° (comportement visqueux parfait).

Si  $0^{\circ} < \delta < 45^{\circ}$  (G' > G'') l'échantillon a un comportement élastique dominant.

Si  $45 < \delta < 90^{\circ}$  (G''> G') l'échantillon a un comportement visqueux dominant.

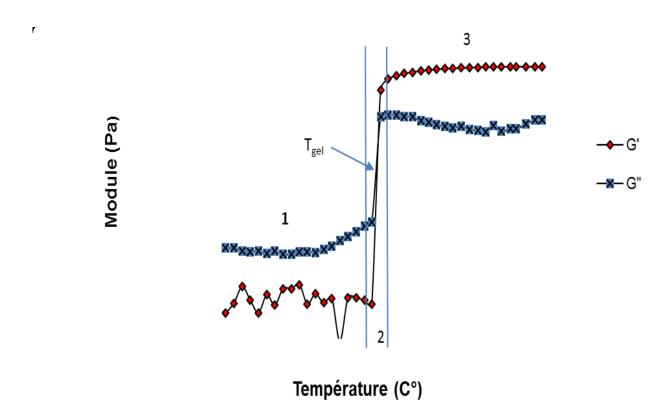
tan  $\delta$  = G''/G' relie donc le déphasage et ces deux modules.

Ainsi, G'= G\*cos  $\delta$  et G''= G\*sin  $\delta$ 

G\* = module de cisaillement ou de rigidité

G' est proportionnel à l'énergie élastique emmagasinée et restituée au cours d'une période. On parle de module de conservation. G'' est proportionnel à l'énergie dissipée par frottement au cours de cette même période. On parle de module de perte.

Cette étude rhéologique permet également de déterminer la Tgel, par balayage de température et en suivant la gélification des préparations. Les modules élastiques et visqueux sont déterminés au cours de ce balayage. Au moment où la courbe logarithmique est droite, la température de gélification est déterminée (**figure 14**).



<u>Figure 14</u>: Détermination de la température de gélification (54)

Les hydrogels pharmaceutiques offrent de nombreux avantages par rapport à d'autres formulations galéniques en occurrence une formulation simple et un faible coût (35) de production et de ce fait constituent une piste de recherche intéressante pour la formulation de nouveaux médicaments comme les formulations à libération contrôlées.

De plus l'activité bénéfique des lactobacilles contre certaines IST en occurrence contre *Neisseria gonorrhoeae* offre un double avantage quand a la formulation d'un microbicide pour la voie vaginale. Cependant la faible survie des lactobacilles en dehors de leur milieux de production néccessite de les mettre

sous forme favorisant leur survie à long terme. La lyophilisation est l'une des méthodes qui maintient les lactobacilles en vie pendant des périodes assez longues (années). Aussi il a été observé dans la littérature que la lyophilisation maintenait les caractéristiques viscoélastique et mucoadhésives des hydrogels. Au vu de tout ceci il serait intéressant de développer un hydrogel lyophilisé à base de lactobacilles pour prévenir des IST comme la gonococcie.

# CHAPITRE IV: LA LYOPHILISATION

# I. GENERALITES

# 1. <u>Définition</u>

La lyophilisation est une opération de déshydratation à basse température et a basse pression qui consiste à éliminer par sublimation, la majeure partie du solvant contenu dans un produit. Le solvant est généralement de l'eau mais peut également être un solvant organique ou un mélange d'eau et de co-solvant organique (55).

Le produit après congélation est placé très rapidement dans une enceinte sous vide, ce qui permet au solvant sous forme de glace de passer directement de l'état solide à l'état gazeux sans passer par une phase liquide. Le solvant, à l'état de gaz quitte le produit et est capturé sous forme congelé à l'aide d'un condensateur (56).

A la fin de l'opération de dessiccation, le produit obtenu est appelé "lyophilisat" qui est une poudre microporeuse et hygroscopique.

Son principe a été amélioré au cours de la 2nde guerre mondiale pour conserver et transporter les vaccins, le sang et produits dérivés entre autres afin de pallier à la réfrigération (57).

Aujourd'hui, elle se présente comme la méthode la plus adaptée pour la conservation des produits thermolabiles comme les lactobacilles(55).

#### 2. Principe

La lyophilisation est basée sur le principe la sublimation. La première étape consiste à congeler le produit de sorte à obtenir une masse totalement solidifiée ce qui implique de lui soustraire de l'énergie. La congélation est réalisée dans des appareils capables de fournir des températures basses en dessous de 0°C.

Il s'agit d'une étape critique dans le processus de lyophilisation car elle conditionne la qualité du séchage et donc du lyophilisat.

La seconde étape est la dessiccation qui se déroule en deux temps :

- La sublimation de l'eau cristallisée qui consiste à extraire du produit l'eau libre sous forme de glace en le faisant passer à l'état de gaz.
- La dessiccation secondaire qui permet d'extraire par désorption les molécules d'eau liées contenu dans la masse à sécher.

A la fin de l'opération de séchage, le produit séché ne contient qu'une très faible quantité d'eau résiduelle compatible avec des durées de conservation très longues (58).

# 3. Domaines d'application

#### a. L'industrie pharmaceutique

La lyophilisation est une méthode de choix pour conserver (56)dans les meilleures conditions les produits biologiques. En supprimant, par sublimation, l'eau des produits la lyophilisation permet une conservation à long terme tout en stabilisant parfaitement la substance active contenue dans ces produits (55).

Le coût prohibitif de production limite ce procédé à un certain type de produits altérables tels que :

- Les vaccins
- Plasma sanguin (55)
- Microorganismes (Lactobacillus rhamosus...)(58)

# b. l'industrie agro-alimentaire

De nos jours l'industrie agro-alimentaire est très utilisatrice de ce type de procédé car la lyophilisation assure une conservation à long terme des aliments en empêchant tout développement microbien mais également en permettant une reconstitution très rapide (café) (55).

# 4. Avantages et inconvénients de la lyophilisation

# Avantages

Les avantages du procédé de lyophilisation sont nombreux et résumé comme suit :

- Préservation des caractères organoleptiques: le lyophilisat à pratiquement le même aspect et le même volume que le produit pur (58)(59).
- **Durée de conservation :** les produits lyophilisés peuvent être stockés pendant plusieurs années et plus longtemps comparativement autres techniques de déshydration(58).
- Conservation de la substance active : la lyophilisation permet de conserver l'activité biologique ou médicamenteuse des substances traitées. De plus la réfrigération n'est pas nécessaire pour conserver le produit (59).
- **Poids et place** : une fois séchés, les produits sont plus légers. Ce qui réduit considérablement le cout du transport. De même, le rangement est plus aisé (60)(61).
- **Préparation**: la réhydratation du lyophilisat est très rapide à cause de sa texture très poreuse (58)(59).

# \* Inconvénients

Les inconvénients de cette méthode sont les suivants :

- La lyophilisation est méthode très coûteuse car elle nécessite un équipement spécialisé nécessaire pour le processus et énormément d'énergie pour éliminer le solvant (59).
- À cause des coûts de production élevés, la lyophilisation ne s'applique qu'aux produits à forte valeur ajoutés (59).
- A cause de la grande quantité d'énergie nécessaire pour le séchage la lyophilisation est limitée à de petites quantités (62).

# II. LE LYOPHILISATEUR

Le lyophilisateur est une machine permettant de dérouler un processus de lyophilisation (58) (**figure 15**).

. Il est généralement constitué de deux parties :

- ➤ Une chambre étanche munie d'étagères ou plateaux destinée à recevoir le produit. Ces plateaux a température contrôlée par un fluide peuvent soit chauffer pour apporter les calories nécessaires à la sublimation, soit refroidir pour assurer la congélation initiale dans le lyophilisateur.
- ➤ Un condensateur qui assure la condensation des vapeurs d'eau ou de solvants issus de la sublimation et ceux à des températures très basses variant entre -50°C et -80°C. Le condensateur est relié à la chambre par un tube de gros diamètre permettant le passage de la vapeur d'eau et est équipé d'une vanne de fermeture rapide.

A ces deux parties est connectée une pompe à vide dont le but est d'assurer le vide dans tout le système (55).

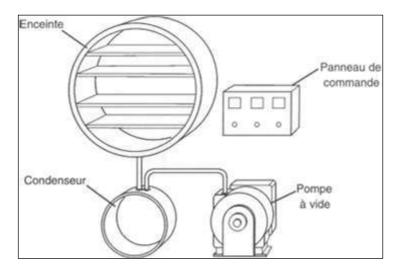


Figure 15: Schéma des principaux composants d'un lyophilisateur (63)

# III. <u>LES DIFFERENTES ETAPES DE LA LYOPHILISATION</u>

# 1. <u>La congélation</u>

La congélation, première étape de la lyophilisation, assure le passage du produit de l'état liquide à l'état solide. Cette technique consiste à abaisser la température du produit et à la maintenir en dessous de la température du point eutectique du mélange. Cette congélation doit être correctement menée afin de garantir l'efficacité du processus de déshydration (55). Ainsi pour réaliser une congélation satisfaisante il est important de comprendre tous les phénomènes sous-jacents de cette opération :

# a. Formation de glace

# Nucléation / Notion de surfusion

Au cours de la cinétique de congélation la formation de cristaux ou nucléation, est toujours précédée d'un phénomène appelé "surfusion" (**figure 16**). La surfusion est définie comme un état métastable de la matière qui demeure en phase liquide alors que la température est plus basse que son point de solidification. Il ne se forme donc pas immédiatement des cristaux de glace dès que la température de fusion est atteinte. La cristallisation étant un phénomène exothermique, il s'en suit une remonté de la température jusqu'à la température de solidification normale à la pression considérée puis le changement d'état se poursuit à cette température.

Le degré de surfusion se définit comme l'écart entre la température de fusion (Tf) à l'équilibre thermodynamique et la température à laquelle il y a apparition spontanée des premiers cristaux de glace. Le degré de surfusion détermine la morphologie des cristaux de glace (forme, taille, nombre) et par conséquent la texture (forme, taille) des pores du lyophilisat. En effet un grand degré de surfusion entrainera une nucléation rapide avec pour conséquence la formation de nombreux cristaux de petite taille avec un allongement du temps de sublimation a l'inverse un faible degré de surfusion entrainera une nucléation lente avec formation de gros cristaux de glace qui pourrait entrainer une diminution de la vitesse de réhydratation (55).

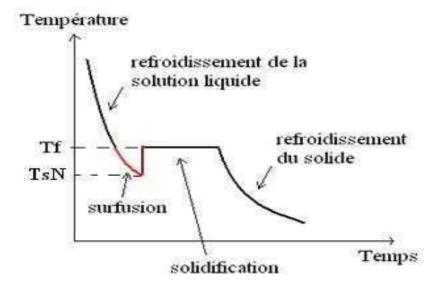


Figure 16 : Mise en évidence du phénomène de surfusion (55)

# • Etat cristallin/Etat amorphe

Au cours de la congélation une partie de l'eau cristallise à l'état pur et la formation des premiers cristaux de glace induit une cryoconcentration des solutés au sein de la phase non congelée devenant de plus en plus visqueuse. Lorsque le point de saturation est atteint la cohésion des molécules devient telle que les caractéristiques du liquide s'apparentent alors à celles d'un solide et il s'en suit une congélation simultanée de la glace et des solutés du mélange eutectique. La température de fin de congélation est appelé température eutectique. Ce mélange adopte autour des cristaux de glace déjà formé une structure amorphe. A la fin de la congélation, coexiste chez le produit traité l'état cristallin et l'état amorphe dans des proportions variés. La proportion de l'état vitreux est d'autant plus importante que la vitesse de refroidissement et la viscosité du produit sont élevées. A l'inverse, l'état cristallin est favorisé par une vitesse de congélation lente.

Selon certaines études, l'état amorphe améliore considérablement la vitesse de dissolution. De plus, le ralentissement des mouvements moléculaires et des réactions chimiques empêche la dégradation du produit favorisant ainsi un stockage à long terme (55).

# b. Vitesse de congélation

Afin de comprendre le rôle de la vitesse de congélation sur la survie des cellules exposées, il est important d'examiner les différents phénomènes extra et intra cellulaires qui se produisent lors la congélation. En effet au cours du procédé de congélation l'eau se sépare des solutés et cristallise à l'état pur dans l'environnement extra cellulaire ce qui induit une concentration en soluté de la partie non congelé. L'augmentation de la concentration du milieu extra cellulaire favorise la sortie de l'eau libre intra cellulaire des cellules qui commence a ce déshydrater et aussi à rétrécir sous l'effet des cristaux extracellulaire (58). Cependant il se produit une variation de ces phénomènes lorsque la vitesse de congélation est modifiée :

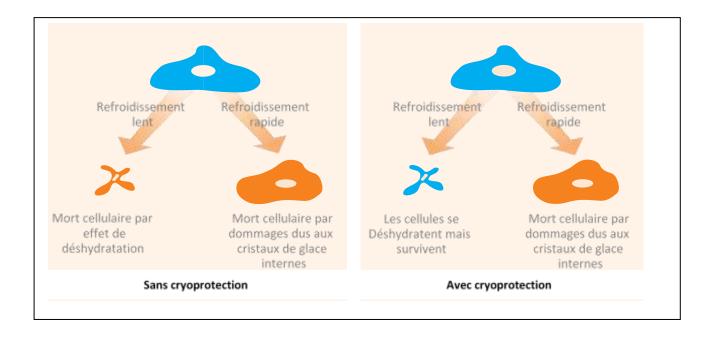
- Au cours d'une congélation lente les cristaux de glace extra cellulaire augmentent de taille, ce qui induit une cryoconcentration du milieu extérieur. De ce fait l'eau commence à sortir des cellules par osmose conduisant à une déshydratation des cellules. De plus les cellules subissent un effet d'écrasement avec l'augmentation de taille des cristaux de glace.
- Lors d'une congélation rapide il se forme de nombreux petits cristaux relativement instables dans l'espace intra cellulaire qui s'avèrent nuisible au cours d'un réchauffement.

La formation de cristaux extra cellulaires, l'effet de solution, la déshydration et la formation de cristaux intra cellulaires sont les différents phénomènes néfastes pour la survie des cellules au cours du processus de

congélation. Pour remédier à tous ces phénomènes certaines études préconisent une vitesse de refroidissement suffisamment lente pour empêcher la formation de glace intracellulaire, mais également suffisamment rapide pour éviter les effets de déshydratation graves des cellules. Ainsi pour réussir une congélation, il faut trouver une zone de transition dans laquelle les effets de ces deux types de congélation sont atténués afin d'obtenir une viabilité maximale des cellules (64).

#### c. Rôle des cryoprotecteurs

La lyophilisation est un procédé de séchage impliquant des variations de températures assez stressantes pour les cellules. L'adjonction de cryoproteur s'avère nécessaire pour améliorer considérablement la survie des microorganismes surtout lors de l'étape de congélation (figure 17). Les cryoprotectants sont classés en deux groupes (65): Les cryoprotecteurs intracellulaires qui ont un poids moléculaire inférieur a 400g.mol<sup>-1</sup>et les cryoprotecteurs extracellulaires qui ont un poids moléculaire supérieur à 10000g.mol<sup>-1</sup> (66). Le mécanisme d'action des cryoprotecteurs est encore mal connu et leur action semble fonctionner par une modification du milieu entourant les micro-organismes. En effet, ils baissent le point de congélation, tout en augmentant la viscosité du milieu physique et de ce fait le milieu au lieu de se cristalliser, devient une glace amorphe. Aussi ces cryoprotectants agissent en diminuant la taille des cristaux de glace par abaissement de la température de nucléation et par une réduction de leur vitesse de croissance. Ainsi selon certaines études les cryoprotectants ont peu d'effet sur les dommages causés par une congélation rapide (formation de cristaux de glace intracellulaires), mais préviennent ou diminuent généralement les dommages dus à la congélation lente (déshydratation et rétrécissement). Cependant cette protection n'est possible que si les cryoprotectants sélectionnés ne présentent aucune toxicité pour les éléments cellulaires (58).



<u>Figure 17</u>: Effet de la vitesse de congélation et des cryoprotectants sur les cellules

#### 2. La sublimation

La sublimation est la deuxième étape de la lyophilisation. C'est l'étape la plus longue du procédé de lyophilisation (67) et consiste à sublimer les cristaux de glace formés c'est-à-dire à faire passer l'eau libre sous forme de glace contenue dans le produit directement à l'état de gaz sans la faire fondre (58). Ce changement d'état ne peut se faire que dans certaines conditions de température et de pression. Le niveau de vide, la température du produit et le temps de dessiccation sont des paramètres importants car ils déterminent le flux et le temps de sublimation (56).

# **❖** Importance de l'apport calorique

La sublimation est une réaction endothermique et tend donc à abaisser la température du produit ce qui a pour effet d'empêcher la vaporisation des molécules de solvant avec pour risque d'arrêter la lyophilisation. Il faut pour cela un apport d'énergie d'environ 2809j/g de glace sublimée (23). Ainsi lorsque la quantité de chaleur fournie est supérieur à celle absorbée par la sublimation, le produit va se réchauffer et il risque de se décongeler à l'inverse si cet apport n'est pas fait ou est insuffisant, la température du produit à lyophiliser descendra jusqu'à celle du piège. A ce moment, il s'établira un équilibre entre les pressions de vapeur du produit et celle de la glace sur le piège et la lyophilisation s'arrêtera (67). En somme pour que le produit ne subisse pas de dégradation il maintenir sa température en dessous de la température de transition vitreuse lors de la sublimation (55).

# **Température de transition vitreuse**

La température de transition vitreuse se définit comme la température où a lieu la transition entre deux formes de l'état amorphe les formes vitreuses rigide et caoutchouteuse. Elle correspond également au point de transition de phase entre l'état liquide et l'état solide amorphe d'une matière au maximum de concentration en soluté (55).

La notation dépend de l'état physique du produit congelé. La notation Tg est utilisée lorsque le produit congelé est un solide amorphe sans cristaux de glace et T'g quand le produit présente une phase amorphe coexistant avec des cristaux de glace.

La T'g est un paramètre important pour la caractérisation de la phase amorphe d'un polymère car elle correspond à la zone de changement des propriétés mécaniques du matériau représenté par le module élastique. Lorsqu'elle est atteinte celui-ci acquiert une plus grande capacité de déformation. Au-dessus de cette température le matériau est à l'état viscoélastique et présente un comportement solide plastique. En dessous de T'g le produit est dans un état solide vitreux et présente un comportement solide élastique. De plus les produits sont plus stables à cause de la faible disponibilité de l'eau (viscosité élevée) et du ralentissement des mouvements moléculaires au sein de la matière. Ainsi pour éviter la dégradation de la substance pendant la sublimation il faut maintenir la température du produit (Tp) en dessus T'g en apportant une quantité d'énergie égale à la chaleur de sublimation de la glace :

- pour Tp T'g < 0, le matériau est stable
- pour Tp -T'g > 0, le matériau est instable et les réactions de dégradations (couleur, résistance mécanique, activité biologique) sont accélérées.

La T'g peut être déterminée par l'analyse calorimétrique différentielle à balayage (DSC). En effet, cette technique consiste à mesurer la différence de quantité de chaleur libérée ou consommée par l'échantillon par rapport à une référence subissant le même traitement thermique (58).

# **Température de collapse**

La température de collapse ou Tc est la température à partir de laquelle la sublimation de la glace s'accompagne de l'affaissement de la phase cryoconcentrée qui perd ainsi sa rigidité (58). La T'g et la Tc sont généralement très proches et pour des petites molécules de carbohydrates la T'g est légèrement inférieur à la Tc.

La cryo-microscopie permet de déterminer visuellement la température d'effondrement d'une substance au cours du procédé de lyophilisation. La détermination de la Tc est nécessaire afin d'éviter une augmentation importante

de la température du produit qui sera préjudiciable à la qualité du lyophilisat (réhydratation et teneur final en solvant) (55).

#### 3. La dessiccation secondaire

La dessiccation secondaire est la dernière étape de la lyophilisation et consiste à éliminer par désorption les molécules de solvant lié et non congelé piégées à la surface des pores ou incluses dans la masse vitreuse. Les molécules de solvants doivent d'abord subir une diffusion moléculaire dans la masse vitreuse et parvenir aux pores avant d'être évaporées. La désorption a lieu à des températures supérieure à celle de la sublimation car ce processus nécessite beaucoup plus d'énergie afin d'arracher les molécules d'eau restante. A la fin du processus de déshydratation, le lyophilisat ne contient qu'une très faible quantité d'eau inférieure à 3% (55).

La vitesse de congélation conditionne la taille des cristaux de glace qui eux déterminerons la porosité nécessaire à l'évaporation de l'eau après sublimation de la glace. En effet des cristaux de grande taille et jointifs forment un réseau conduisant aisément l'eau vers l'extérieur. De plus la réhydratation du lyophilisat est facilitée avec moins de risque d'obtenir de la matière en suspension (58).

# **Service** Isothermes de sorption

Ce sont des courbes généralement sigmoïdes représentants pour une température donnée la variation de la teneur en eau en fonction de l'activité de l'eau du produit à l'équilibre. Les isothermes de sorptions sont déterminées expérimentalement soit à partir du produit sec dans cas il s'agit de l'isotherme d'adsorption soit à partir du produit saturé en eau il s'agit alors de l'isotherme de

désorption. Ces courbes sont généralement différentes à cause du phénomène d'hystérèse. En effet la déshydratation entraine des modifications irréversibles de la structure et de la porosité.

La connaissance des isothermes de sorptions est particulièrement importante car elle permet de prédire les phénomènes de dégradation au cours du séchage et du stockage et de donner ainsi les conditions qui protègent au mieux le lyophilisat (55).

La congélation est la phase la plus critique du cycle de lyophilisation. La vitesse de refroidissement utilisée pour congeler les cellules doit être juste assez lente pour permettre aux cellules de se déshydrater, mais suffisamment rapide pour empêcher des altérations dues à une déshydratation excessive (64).

# DEUXIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE

# CHAPITRE I : MATERIELS ET METHODES

Nos travaux ont été effectués au laboratoire de pharmacie galénique de l'UFR Sciences pharmaceutiques et Biologiques d'Abidjan (Université Félix Houphouët Boigny) et à l'institut Pasteur de Côte d'Ivoire. Elles se sont déroulées du 13/02/2017 au 15/09/2018.

# I. MATERIELS

# 1. Matières premières

# a) Matières pharmaceutiques

- Eau distillée stérile : C'est une eau qui a subi une distillation puis une stérilisation. La pureté de l'eau distillée est d'ordinaire de 1.0 MWcm; et le pH est généralement compris entre 4,5 et 5,5 (68).
- **Eau osmosée**: C'est une eau ultra pure. Elle est produite par un osmoseur THERMO Scientifique <sup>R</sup> type micro pure UV et millipore qui utilise le phénomène d'osmose inverse pour la purification.

# - Glycérol bidistillé N°lot : 16I274109

Le glycérol est un polyalcool de formule chimique C3H8O3. C'est un liquide visqueux incolore et hygroscopique avec une masse moléculaire de 92.09g/mol. Son Point de fusion se varie entre 18°C -20°C(69).

Lactose monohydraté fourni par Labkem N°lot: 16480.300314
 Le lactose un oligosaccharide se présentant sous forme de poudre blanche.
 C'est un composé soluble dans l'eau avec une masse molaire de 360,32g/mol.

# - acide alginique fourni par Carl Roth Gmbh+Co.KG N°lot: 9180.2

C'est un polymère hydrophile se présentant sous forme de poudre de couleur blanc ivoire (figure 18).



Figure 18: Poudre d'alginate de sodium

# - KOLLIPHOR 407 $^{\rm R}$ (POLOXAMER 407) fourni par BASF, N°lot : $$\operatorname{WPAJ}508\mathrm{B}$$

Le poloxamer 407 est un copolymère synthétique formé de polyoxypropylène(POP) constituant la chaîne centrale hydrophobe et de polyoxyéthylène(POE) (**figure 20**) constituant les deux chaînes latérales hydrophiles. Il se présente sous forme microbilles blanche (**figure 19**) soluble dans l'eau et également dans l'alcool. Sa masse molaire est d'environ 12000g/mol et pont de fusion se situe entre 50°C et 56°C. C'est un composé non toxique(68).



Figure 19: Poudre de poloxamer 407

$$\begin{array}{c} \text{CH}^{3} \\ \text{HO} + \text{CH}^{5} - \text{CH}^{5} + \text{CH}^{5} - \text{C$$

Figure 20: Structure chimique du poloxamer 407

# b) Matières premières analytiques

- Poudre de bouillon MRS fourni par BD (Becton, Dickson and company) N°lot: 6154627
- Poudre de gélose MRS fourni par BD (Becton, Dickson and company)
   N°lot: 7067595
- Les matières premières qui ont servi à la préparation du tampon de phosphate pH 7,4: Eau distillée, Poudre de KH2PO4 fourni par Applichem Panreac ITW Companies N°lot 0000510211, Poudre Na2HPO4 2H2O fourni par MERCK N°lot 6580.

- Les matières premières qui ont servi à la préparation du fluide vaginal simulé (FVS): HCL à 37%, Nacl, KOH, Ca(OH) <sup>2</sup>, Albumine de sérum bovine, Acide lactique, Acide acétique, Glycérol, Urée, Glucose.

# c) Matières premières biologiques

- Muqueuse vaginale de porc fourni par la SIVAC
   Le porc a l'avantage d'être remarquablement semblable à l'humain en termes d'anatomie, de physiologie, de métabolisme et d'histologie. De plus, de nombreux travaux ont rapporté une excellente corrélation entre les tissus vaginaux humains et porcins.
- Cryotube de la substance de référence de *Lactobacillus crispatus*

# 2. APPAREILS

- ✓ Agitateur mécanique de type STIRRER<sup>R</sup> (Annexe I)
- ✓ Autoclave systec (Annexe II)
- ✓ Balance de précision de marque OHAUS PIONEER<sup>R</sup> (Annexe III)
- ✓ Centrifugeuse HORIZON (Annexe IV)
- ✓ Etuve
- ✓ Lyophilisateur CHRIST ALPHA 1-2 LD PLUS (**Annexe V**)

- ✓ Micro vortex HERDOLPH RZR1 (Annexe VI)
- ✓ Osmoseur THERMO Scientifique <sup>R</sup> type micro pure UV (**Annexe VII**)
- ✓ PH mètre type HANNA (**Annexe VIII**)
- ✓ Texturomètre de type (**Annexe IX**)
- ✓ Viscosimètre rotatif à géométrie type couette Haake VISCOTESTER 550
  associé à un Cryostat de marque JULABO ED F12® (Annexe X)

# II. METHODES

# 3. PREPARATION DE LA SOLUTION TAMPON PBS

La solution a été préparée en dissolvant 4,54g de KH2PO4 dans 500ml d'eau distillée d'une part, et 4,735g de Na2HPO4 2H2O dans 500ml d'eau distillée d'autre part, puis en mélangeant 161ml de solution de Na2HPO4 2H2O dans 39ml de solution KH2PO4.

# 4. PREPARATION DES SOLUTIONS DE CRYOPROTECTANTS

A partir du glycérol et du lactose des solutions de concentration différentes ont été préparées et résumé dans le tableau IX :

# **Tableau IX:** Solutions de cryoprotectants

Concentration	de la	Quantité de lactose ou	Quantité de PBS
solution		de glycérol	
0,1g/l		0,01 g	100 ml
10g/l		1g	100ml
100g/l		10g	100ml

Apres homogénéisation ces solutions ont été stérilisées à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes puis conservées au réfrigérateur.

# 5. PREPARATION DU FLUIDE VAGINAL SIMULE (FVS)

Le FVS a été préparé en ajoutant à 900 ml d'eau pure contenue dans un bécher sous agitation magnétique jusqu'à dissolution complète :

du NaCl (3,51 g), KOH (1,4 g), Ca(OH) <sup>2</sup>(0,22 g), du sérum albumine bovine (0,018 g), acide lactique (2,00 g), acide acétique (1,00 g), du glycérol (0,16 g), de l'urée (0,4 g) et du glucose (5,00 g) jusqu'à dissolution complète.

Le pH du mélange a ensuite été ajusté à 4,5 en utilisant HCl 37% et le volume final a été ajusté à 1L. La solution fut conservée à 4°C.

#### 6. PREPARATION DU BOUILLON MRS

Cinquante-cinq gramme (55g) de poudre pour bouillon MRS ont été dissout dans un litre d'eau distillée puis chauffer avec agitation. Une fois la cuisson

terminée le bouillon est réparti dans des flacons et autoclavé à 121°C pendant 15

min.

7. PREPARATION DE LA GELOSE MRS

Soixante-dix gramme (70g) de poudre pour bouillon MRS ont été dissout dans

un litre d'eau distillée et chauffé sous agitation. Apres cuisson le mélange a été

autoclavé comme précédemment.

8. PREPARATION DES SUSPENSIONS DE LACTOBACILLES

Les lactobacilles congelés ont été prélevée à l'aide d'une hanse stérile et incubé

sur une gélose MRS coulée en boîte de pétrie pendant 72h à 37°C en présence

de CO2. Apres incubation, une colonie fut prélevée et introduite dans 10ml de

bouillon MRS pendant 24h à 37°C en présence de CO2. Apres 24h, 100 µl de ce

bouillon a été mis dans 10ml d'un autre bouillon MRS et incuber pendant 16 h

dans les même conditions. Le bouillon a été centrifugé à 2800trs / min pendant

10 min afin de récupérer les lactobacilles contenu dans le culot .Le culot a été

par la suite rincer deux fois à l'eau distillée stérile et resuspendu dans 10 ml des

solutions de lactose et de glycérol ci-dessus.

Des dilutions décimales successives ont été réalisées à partir de 100 µl des

différentes combinaisons bactériennes dans 900µl de PBS. Puis 100µl des

dilutions 10-4,10-5, et 10-6 ont été déposé à la surface d'une gélose MRS et

étalé à l'aide d'un étaleur stérile en plastique et mis à incubé pendant 48h à 37°C

en présence de CO2 (Annexe XI). La formule utilisée pour le dénombrement est

la suivante:

 $N = \frac{\sum colonies \ comptées}{(n1+0.1n2)dilution1*E}$ 

N: concentration cellulaire

Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie **KESSE ETCHIEN REINE** 

70

Dilution 1: dilution la plus forte

n1 : nombre de boîte à la plus faible dilution

n2 : nombre de boîte à la plus forte dilution

E: Dilution

Simultanément le pH de ces solutions a été mesuré à l'aide du pH HAANA.

7. LYOPHILISATION DES SUSPENSIONS DE LACTOBACILLES

ET DETERMINATION DU TAUX DE SURVIE

Un millilitre de chaque suspension de lactobacilles ci-dessus a été repartit dans

des flacons (deux flacons par suspension) qui ont été recouvert par du parafilm

puis congelés pendant 24h et 48h à -20°C avant d'être lyophilisé.

Après la lyophilisation la poudre sèche a été resuspendu au volume initial avec

de l'eau distillée stérile. Des dilutions décimales successives ont été réalisées à

partir de 100 µl des différentes combinaisons bactérienne dans 900µl de PBS.

Puis 100µl des dilutions 10-4,10-5, et 10-6 ont été déposé à la surface d'une

gélose MRS et étalé à l'aide d'un étaleur stérile en plastique et mis à incubé

pendant 48h à 37°C en présence de CO2.

8. FORMULATION DES GELS

Gel de poloxamer et d'acide alginique

Dans un bécher à température ambiante la poudre d'acide alginique est dispersée

dans de l'eau osmosée sous agitation à 1000t/mn à l'aide d'un agitateur

mécanique de type STIRRER<sup>R</sup> jusqu' à dissolution complète. Le bécher est

ensuite placé dans un cristallisoir contenant des morceaux de glace selon la

méthode de Schmolka décrite en 1972 et une dispersion a été réalisé avec le

Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie

71

P407 sous agitation à 1000t/mn à l'aide d'un agitateur mécanique de type STIRRER<sup>R</sup> jusqu'à dissolution du poloxamer.

Le gel est conservé au réfrigérateur à -4°C pendant 48h afin d'éliminer les bulles d'air. Le gel préparé contient 1,25% d'alginate de sodium et 26,875% de P407. Quatre gramme de gel ont ensuite été repartit dans des flacons de verre et autoclavé à121°C pendant 15mn puis placé au réfrigérateur à 4°C pendant 24h.

# • Gel poloxamer 407/acide alginique et solution de glycérol de lactose et de PBS

Un millilitre (1ml) des solutions stériles de lactose de glycérol et de PBS préparées ci-dessus ont été introduites à l'aide d'une micropipette dans 4g de gels stériles de P407 et d'acide alginique puis homogénéisé par retournement.

# • Gel poloxamer 407/acide alginique et de *Lactobacillus crispatus*

A l'aide d'une micropipette un millilitre (1ml) de la suspension de lactobacilles retenue et de suspension de lactobacilles dans le PBS ont été introduit chacun dans 4g de gel stériles de poloxamer et d'acide alginique et homogénéisé par retournement.

# • Lyophilisation des gels

La lyophilisation a porté sur les gels suivants : P407/acide alginique ; P407/acide alginique/suspension de lactobacilles dans G3 et sur P407/acide alginique/suspension de lactobacilles dans PBS.

Les gels sélectionnés ont été congelés à -20  $^{\circ}$  C pendant 24 heures puis lyophilisés pendant 24 heures suivant le protocole de lyophilisation. Après avoir

terminé le cycle de lyophilisation, les flacons ont été fermés puis pesés. La perte en eau a ensuite été évaluée.

# 9. CARACTERISATION DES GELS

Cette partie à portée sur les gels suivant : P407/acide alginique/solutions de cryoprotectants ; P407/acide alginique suspensions de lactobacilles avec G3; P407/acide alginique/ suspensions de lactobacilles dans PBS avant et après lyophilisation.

# a) contrôle macroscopique

Les paramètres appréciés sont : -la limpidité,

-l'absence de particules en suspension

-et de l'absence de séparation de phase

Ces paramètres ont été évalués à l'œil nu après la préparation des gels puis 48h après conservation.

# b) Détermination du Ph

Le principe repose sur la détermination de la quantité des ions hydronium (H<sup>+</sup>) dans une solution. Le pH a été mesuré électroniquement au moyen PH-mètre à lecture directe de type HANNA HI 2211, en utilisant une électrode de verre et de référence au chlorure de potassium- calomel à saturation. Nous avons étalonné le PH-mètre avec des solutions tampon vendues dans le commerce (solution pH tampon 4 et solution pH tampon 7) selon les instructions fournies par le fabricant. L'électrode a ensuite été séchée et plongée dans les échantillons

Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie **KESSE ETCHIEN REINE** 

de manière à ce qu'elle baigne bien dans la solution. Enfin, nous avons branché l'appareil sur l'échelle de lecture et noté le pH à 0,01 unité près.

# c) Etude de la viscosité

Le viscosimètre rotatif type Haake VISCOTESTER 550 a été utilisé pour étudier l'écoulement du gel. L'échantillon était placé dans un bécher type SVDIN 222-1251 dans lequel tournait un rotor de type SVDIN 222-0505.

A partir du tableau de bord, la vitesse de cisaillement (trs/min) et/ou la température (°C) étaient fixées. Il était alors possible de lire la viscosité (mPa.s) et la force de cisaillement (Pa) au cours de la mesure. L'évolution de ces paramètres nous ont permis d'apprécier le caractère thermogélifiant et rhéofluidifiant de nos préparations. L'étude de la viscosité a été fait avant et après lyophilisation du gel retenu.

# d) <u>Détermination de la température de gélification</u>

Le viscosimètre rotatif type Haake VISCOTESTER 550 a été utilisé pour étudier l'écoulement du gel. Nous avons imposé une vitesse de cisaillement de 8,3trs/mn à différentes températures (6°C, 10°C, 15°C, 20°C, 25°C, 30°C, 35°C, 37°C, 40°C). L'échantillon était placé dans un bécher type SVDIN 222-1251 dans lequel tournait un rotor de type SVDIN 222-0505.

A partir du tableau de bord, la vitesse de cisaillement (8,3 trs/min) a été fixée et il était alors possible de lire la viscosité (mPa.s) et la température (°C). L'évolution de ces deux paramètres nous ont permis de déterminer la Tgel de nos échantillons.

Seulement la solution améliorant la viabilité des probiotiques et donnait une gélification proche de la température ambiante a été retenue pour la suite des travaux.

#### 10. ETUDE DE L'ADHESION

Nous avons effectué les études d'adhésion sur deux types de membranes :

- un film synthétique de type polypropylène
- membrane biologique, la muqueuse vaginale de porc.

Des études comparatives effectuées entre la peau humaine et celle de certains animaux à révéler que la peau de porc est le modèle animal le plus proche de la peau humaine sur le plan morphologique et physiologique et semble donc l'alternative la plus approprié à la réalisation de cette étude.

Le matériel biologique a été fourni par la SIVAC (société ivoirienne d'abattage et de charcuterie) qui une structure étatique basé à la zone industrielle de yopougon. La muqueuse vaginale a été prélevée juste après abatage de l'animal et conservé a -20°C. L'appareil utilisé était un analyseur de texture de marque TA1 AMETEK. Un fragment de membrane modèle a été collé sur la sonde de diamètre d= 14 mm à l'aide d'une colle cyanoacrylate. La sonde a été ensuite fixée à la traverse mobile de l'appareil. Puis, nous avons rempli le support en inox d'une quantité déterminé de gel. L'ensemble du système a été thermostaté à 37 ° C afin d'assurer la gélification du gel à la température corporelle.

Après un temps de contact de 120 secondes entre le gel et la membrane, et sous une force de contact initial de 0,5 N, les deux surfaces ont été séparées par traction à une vitesse constante de 1mm/s.

La résistance a été enregistrée en fonction du déplacement, et a permis de déterminer la force de séparation maximale Fmax (unité N), ainsi que le travail d'adhésion W (unité mJ) qui est assimilé à l'aire sous la courbe.

Les essais ont été répétés cinq fois pour chaque échantillon. Les résultats obtenus sont exprimés de la façon suivante : moyenne ± écart type. L'étude d'adhésion a été également réalisée avant et après lyophilisation du gel retenu.

#### • Méthodologie

**Etape 1:** fixation d'une membrane d'origine naturelle ou artificielle à l'extrémité de la sonde analytique.

**Etape 2**: La sonde portant la membrane est maintenue au contact de la surface de l'échantillon.

**Etape 3**: Au bout d'un temps déterminé, la sonde est rétractée à sa position d'origine. Une courbe d'élongation typique est obtenue (49).

#### 11. INFLUENCE DU FLUIDE VAGINAL SIMULE

Les échantillons de gel ont été reconstitués avec 0,75ml de SVF (fluide vaginal simulé) à 37 °C. Les mesures de mucoadhésion ont été effectuées comme décrit précédemment en utilisant un analyseur de texture qui a permis de déterminer de la force et du travail d'adhésion.

#### 12. ESSAI DE STABILITE

### • Stabilité aux cycles de température

Le gel était placé pendant 16h au congélateur à -18°C, puis pendant 8h à 25°C±2°C et enfin à la température du laboratoire (21±2°C) pendant 5 mn (40).

# CHAPITRE II: RESULTATS

#### I. PREPARATIONS DES SOLUTIONS

#### 1. Solutions de PBS

C'est une solution limpide, incolore avec un PH de 7,4 à 22.4°C.

#### 2. Solutions de cryoprotectants

Apres le processus de stérilisation toutes les solutions glycérol était incolore ce qui n'était pas le cas des solutions de lactose qui sont devenues jaunes. L'aspect macroscopique des solutions est présenté dans le tableau X et la figure 21.

<u>Tableau X</u>: Récapitulatif de l'analyse macroscopique des solutions de cryoprotectants préparées

Solutions	Aspect
Lactose C=0,1 g/l	Limpide, jaune clair
Lactose C=10g/l	Limpide, jaune orangé++
Lactose C=100g/l	Limpide, jaune orangée+++
Glycérol C=0,1g/l	Limpide, incolore
Glycérol C=10g/l	Limpide, incolore
Glycérol C=100g/l	Trouble, incolore



Figure 21: Solutions de cryoprotectants

De la gauche vers la droite la solution de glycérol C=0,1g/l, glycérol C=10g/l, glycérol C=100g/l, solution de lactose C=0,1g/l, lactose C=100g/l.

#### 3. Fluide vaginal simule (FVS)

C'est une solution limpide, incolore avec un PH de 4.4 à 22.4°C.

#### 4. Bouillon MRS

Nous avons obtenu un liquide de couleur brune à odeur agréable.

#### 5. Gélose MRS

Nous avons obtenu une masse solide de couleur brune à odeur agréable.

#### 6. Suspensions microbiennes

Le tableau XI résume les caractéristiques des suspensions bactériennes obtenu avec les solutions de cryoprotectants.

<u>Tableau XI</u>: Aspect macroscopique et pH des suspensions de *Lactobacillus crispatus* 

Composition	Aspect macroscopique	рН
Lactobacilles dans le PBS	Limpide, incolore	7,40
Masse bactérienne dans la solution de lactose C=0,1g/l	Limpide, incolore	7,36
Masse bactérienne dans la solution de lactose C=10g/l	Limpide, jaune orangé++	6,87
Masse bactérienne dans la solution de lactose C=100g/l	Limpide, jaune orangée+++	5,80
Masse bactérienne dans la solution de glycérol C=0,1g/l	Limpide, incolore	7,45
Masse bactérienne dans la solution de glycérol C=100g/l	Limpide, incolore	7,44
Masse bactérienne dans la solution de glycérol C=100g/l	Trouble, jaune pale	7,41

Les suspensions de *Lactobacillus crispatus* dans les solutions de glycérol était incolore ce qui n'était pas le cas des solutions de lactose qui sont devenues jaunes.

Le pH des suspensions de lactobacilles dans les solutions de cryoprotectant était compris entre 7 et 5.

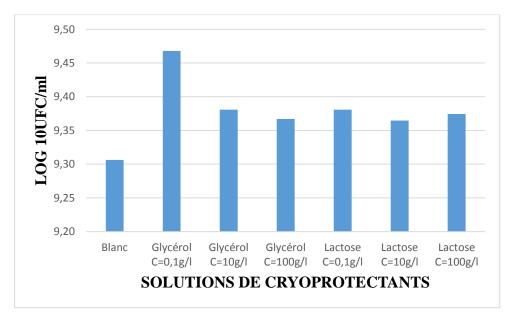
En effet le pH des suspensions diminuait avec l'augmentation de la concentration en cryoprotectant et cette diminution était plus prononcée dans solutions de lactose.

# 7. <u>Détermination du taux de survie des lactobacilles en présence des cryoprotecteurs avant la lyophilisation (n=3)</u>

La capacité des solutions de cryoprotecteurs à améliorer la survie des lactobacilles est résumée dans le tableau XII et la figure 22.

<u>Tableau XII</u>: Taux de survie de *Lactobacillus crispatus* en fonction des solutions de cryoprotectants avant la lyophilisation

Solution	Log 10 UFC/ml
Blanc	9,31± 0,3
Glycérol C=0,1g/l	9,47±0,2
Glycérol C=10g/l	9,38±0,2
Glycérol C=100g/l	9,37±0,2
Lactose C=0,1g/l	9,38±0,2
Lactose C=10g/l	9,36±0,3
Lactose C=100g/l	9,37±0,2



<u>Figure 22</u>: Viabilité de *Lactobacillus crispatus* en fonction des solutions de cryoprotectant pré-lyophilisation

Toutes les solutions de cryoprotecteurs augmentent la survie de *Lactobacillus crispatus*. La capacité des solutions de glycérol à augmenter la survie de *Lactobacillus crispatus* est meilleure par rapport à celle des solutions de lactose. La solution sans cryoprotectant a un taux de survie de 9,31 UFC/ml tandis que celle des solutions de glycérol à 0,1g/l, à 10g/l et 100g/l sont respectivement de 9,47UFC/ml, 9,38 UFC/ml et 9,37 UFC/ml et celle des solutions de lactose à 0,1g/l à 10g/l et à 100g/l sont de 38 UFC/ml, 36 UFC/ml et 37 UFC/ml.

# 8. <u>Détermination du taux de survie en présence des cryoprotecteurs</u> après la lyophilisation (n=3)

Aucune des solutions de cryoprotectants n'a permis d'obtenir des colonies après ensemencement pendant 48h.



<u>Figure 23</u>: Lyophilisat de *Lactobacillus crispatus* dans les solutions de cryoprotectant à gauche, et à droite lyophilisat reconstitué

#### II. PRE-FORMULATION DES GELS

Nous sommes partis de systèmes composés de P407 (polymère thermosensible) et d'acide alginique (polymère mucoadhésif) respectivement à 21,5 % et 1% sur la base des travaux similaires déjà publié(70) (35).

Le gel à base de P407 et d'acide alginique était homogène, sans grumeaux, ni bulles d'air. L'ajout des solutions de cryoprotectants au gel de P407/acide alginique n'a pas modifié l'homogénéité du gel. Tous les gels préparés sont résumés dans le tableau XIII.

Tableau XIII: Aspect macroscopique des gels formulés

Systèmes	Compostions	Aspect macroscopique
Blanc	Gel +PBS	Homogène, visqueux, translucide,
L1	Gel+ Lactose C=0,1g/l	Homogène, visqueux, jaune clair
L2	Gel+ lactose C=10g/l	Homogène, visqueux, jaune orangé++
L3	Gel+ lactose C=100g/l	Homogène, visqueux, jaune orangé+++
G1	Gel+ glycerol C=0,1g/l	Homogène, visqueux, translucide
G2	Gel+ glycerol C=10g/l	Homogène, visqueux, translucide
G3	Gel+ glycerol C=100g/l	Homogène, visqueux, translucide

#### 1. Détermination du pH des gels obtenus

Le tableau XIV résume le pH des différents systèmes sans *Lactobacillus* crispatus.

<u>Tableau XIV</u>: pH des gels sans *Lactobacillus crispatus* avant la lyophilisation

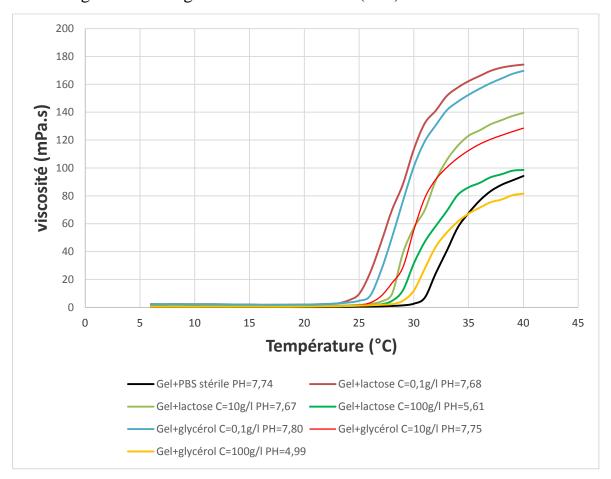
Composition	pН	Observation
Blanc	7,74	Non conforme
L1	7,68	Non conforme
L2	7,67	Non conforme
L3	5,61	Non conforme
G1	7,80	Non conforme
G2	7,75	Non conforme
G3	4,99	Conforme

Le pH des gels Blanc, L1, L2, L3, G1 et G2 était non conforme car inadapté pour une administration vaginale. Seul le G3 était conforme car le pH était compris entre 4 et 5,5.

#### 2. Etude de la viscosité

### Détermination de la température de gélification des systèmes sans Lactobacillus crispatus

Cette étude a été réalisée en évaluant la viscosité en fonction de la température à la vitesse de cisaillement de 8,3 trs/min. L'évolution de la viscosité est donnée dans la figure 24 et la tgel dans le tableau XV (n=3).



<u>Figure 24</u>: Evolution de la viscosité en fonction de la température à 8,3 trs/min

De 6°C à 23 °C la viscosité de nos gels était peu influencée par la température mais après 25°C nos gels étaient thermosensibles car la viscosité augmentait avec la température.

En effet à 25°C la viscosité du blanc, de L1, L2, L3, G1, G2 et de G3 était respectivement de 0,5 mPa.s; 9,6 mPa.s; 1,76 mPa.s; 1,30 mPa.s; 4,74 mPa.s; 1,64 mPa.s et 1,26 mPa.s.

A 30°C la viscosité des gels était de 2,63 mPa.s; 113,47 mPa.s; 57,14 mPa.s; 31,58 mPa.s; 101,05 mPa.s; 55,60 mPa.s; 12,08 mPa.s respectivement pour le blanc, L1, L2, L3, G1, G2 et G3.

A 40°C la viscosité du blanc, de L1, L2, L3, G1, G2 et de G3 était respectivement de 94,25 mPa.s; 174,17 mPa.s; 139,50 mPa.s; 98,57 mPa.s; 169,67 mPa.s; 128,50 mPa.s; 81,57 mPa.s.

En somme la viscosité était plus importante dans les gels moins concentrés en cryoprotecteurs par rapport aux gels plus concentrés en cryoprotectants.

**Tableau XV:** Tgel des gels avec cryoprotectants

Solution	Tgel (°C)
Blanc	32
G1	27
G2	28
G3	30
L1	26
L2	29
L3	29

La température de gélification augmentait globalement avec la concentration en cryoprotectant mais restait inférieur à celle du blanc. En effet la Tgel du blanc

était de 32°C, celle des gels avec cryoprotectants était de 27°C, 28°C, 30°C, 26°C respectivement pour G1, G2, G3, L1, et 29°C pour L2 et L3.

#### III. CHOIX DE LA FORMULATION ET CARACTERISATION

Au vu de tout ce qui précède, nous avons choisi comme formulation finale le gel à base:

- ✓ Lactobacillus crispatus comme substance active
- ✓ poloxamer 407, comme agent gélifiant (21,5%),
- ✓ acide alginique, comme agent adhésif (1%),
- ✓ Solution de cryoprotectant de glycérol C=100g/l

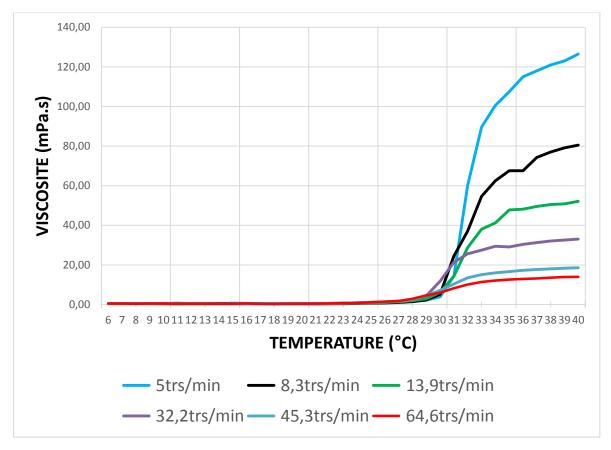
La température de gélification (Tgel) de ce gel obtenu était de 30°C.

#### 1. ANALYSE MACROSCOPIQUE

D'un point de vue macroscopique, notre gel était incolore, onctueux au toucher, sans grumeaux ni bulles d'air après conservation à 4°C ±2°C pendant 48 h.

#### 2. ETUDE RHEOLOGIQUE DE LA FORMULATION RETENUE

❖ Etude de la viscosité en fonction de la température à différents taux de cisaillements (figure 25).



<u>Figure 25</u>: Evolution de la viscosité du gel en fonction de la température du gel avant lyophilisation

La viscosité à 30 °C était de 3,9mPa.s; 5,18 mPa.s; 6,1 mPa.s; 11,8 mPa.s; 7,2 mPa.s; 5,9 mPa.s respectivement à 5 trs/min, 8,3 trs/min, 13,9 trs/min, 32,2 trs/min, 45,3 trs/min, et à 64,6 trs/min.

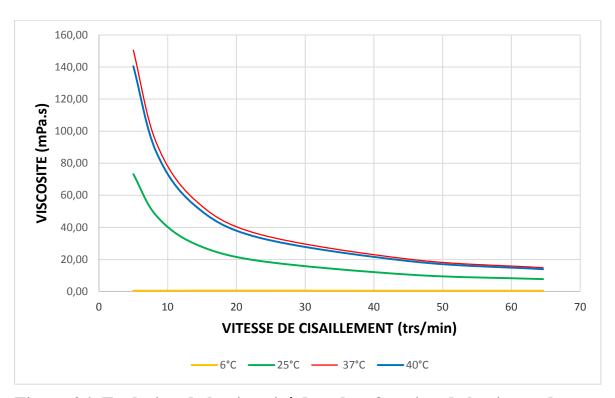
Celle à 35°C était de 107,50 mPa.s; 67,5 mPa.s; 47,8 mPa.s; 29,1 mPa.s; 16,7 mPa.s; 12,6 mPa.s respectivement à 5 trs/min, 8,3 trs/min, 13,9 trs/min, 32,2 trs/min, 45,3 trs/min, et à 64,6 trs/min.

Nous avons noté une diminution de la viscosité lorsque la vitesse de cisaillement augmentait. Et donc notre gel avait un caractère rhéofluidifiant sur la plage de température étudiée.

La présence des probiotiques a fait passer la Tgel de notre gel de 30°C à 31°C, il y a donc eu une augmentation de 1°C.

Aussi la Tgel du gel n'a pas varié quelque soit la vitesse de cisaillement ce qui implique que la vitesse de cisaillement n'a pas d'influence sur la Tgel du gel. De plus la viscosité augmentait quand la température augmentait, notre gel était également thermosensible.

# **Etude de la viscosité en fonction de la vitesse de cisaillement à différentes températures (Figure 26):**



<u>Figure 26</u>: Evolution de la viscosité du gel en fonction de la vitesse de cisaillement du gel avant lyophilisation

A 8,3 trs/min la viscosité du gel à 6°C, 25°C, 37°C et 40°C était respectivement de 0,5 mPa.s; 47,5 mPa.s; 93,3 mPa.s et 87,4 mPa.s.

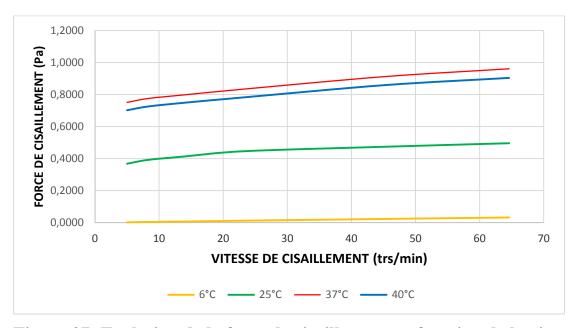
A 64,6 trs/min la viscosité du gel à 6°C, 25°C, 37°C et 40°C était respectivement de 0,5 mPa.s; 7,7 mPa.s; 14,8 mPa.s et 14,0 mPa.s.

En somme la viscosité de notre gel diminuait lorsque la vitesse de cisaillement augmentait pour les tests réalisés à 25°C, 37°C et 40°C. Donc le caractère rhéofluidifiant de notre gel a été conservé pour ces températures.

Par contre, en dessous de la Tgel (31°C), la viscosité n'était pas significativement modifiée par la vitesse de cisaillement.

# **Etude de la force de cisaillement en fonction de la vitesse de cisaillement à différentes températures**

La figure 27 représente l'évolution de la contrainte en fonction de la vitesse de cisaillement.



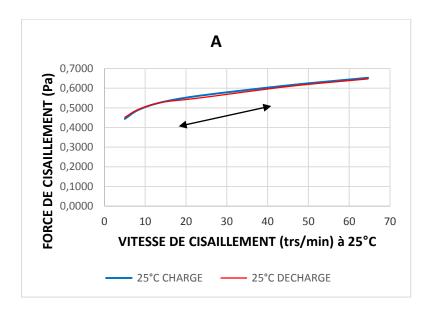
<u>Figure 27</u>: Evolution de la force de cisaillement en fonction de la vitesse de cisaillement du gel avant lyophilisation

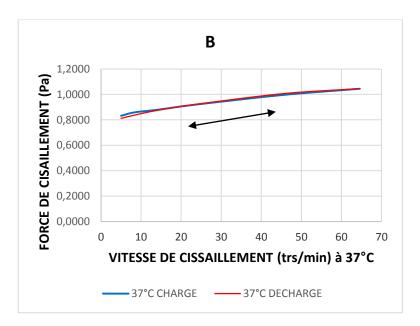
A 8,3 trs/min, la force de cisaillement de notre gel était de 4,510-3 Pa; 3,9 10-1Pa; 7,8 10-1 Pa; 7,3 10-1 Pa respectivement à 6°C, 25°C, 37°C et 40°C. De même à 64,6 trs/min la force de cisaillement du gel était 3,3 10-2 Pa; 4,9 10-1Pa; 9,6 10-1 Pa; 9,0 10-1 Pa respectivement à 6°C, 25°C, 37°C et 40°C.

Il en ressort que la vitesse de cisaillement augmentait quelle que soit la température de travail par conséquent notre gel avait un comportement rhéofluidifiant.

#### **Etude du caractère thixotrope du gel**

L'étude du caractère thixotrope a été évaluée à partir des tracés représentant la force de cisaillement en fonction de la vitesse de cisaillement en charge et décharge (figure28).



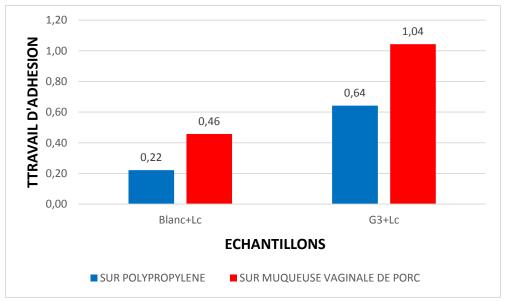


<u>Figure 28</u>: Variation de la contrainte en fonction de la vitesse de cisaillement du gel à 25°C (A) et à 37°C (B) avant lyophilisation

Les courbes ascendantes obtenues en augmentant la vitesse de cisaillement et les courbes descendantes en diminuant la vitesse de cisaillement coïncidaient quelque soit la température (25°C et 37°C). Il n'y avait pas de boucle d'hystérésis. Notre gel était par conséquent non-thixotrope car son état n'était pas influencé quelque soit le sens de variation de la contrainte à 25°C et à 37°C.

#### 3. ANALYSE TEXTURALE: MUCOADHESION

Nous avons évalué le travail d'adhésion sur muqueuse vaginale de porc et sur membrane de polypropylène à 37°C (**figure 29**).



<u>Figure 29</u>: Courbe d'évolution du travail d'adhésion du gel sur muqueuse vaginale de porc et sur film de polypropylène avant lyophilisation

En général, le travail d'adhésion était plus important sur muqueuse vaginale de porc que sur film de polypropylène.

Aussi quelque soit le type de membrane, le travail d'adhésion de G3+ Lactobacillus crispatus était plus important que celui du blanc+ Lactobacillus crispatus. Donc l'ajout du glycérol à la formulation a considérablement augmenté le travail d'adhésion. En effet le travail d'adhésion du blanc+ Lactobacillus crispatus était de 0,22 mJ sur muqueuse vaginale de porc et de 0,45 mJ sur membrane de polypropylène alors que le travail d'adhésion de G3+ Lactobacillus crispatus sur muqueuse vaginale de porc de était de 1,04 mJ et de 0,64 mJ sur membrane de polypropylène.

#### 4. ESSAIS PRELIMINAIRE DE STABLITE

#### **Stabilité aux cycles de température**

Notre gel est resté stable.

#### IV. CARACTERISATION DU LYOPHILISAT

Le lyophilisat obtenu à partir de P407/acide alginique n'a pas pu être reconstitué donc celui-ci n'a pas fait l'objet des autres caractérisations.

Le lyophilisat a été réhydraté au volume initial avec de l'eau distillée stérile de pH 7,24 à 24,6°C (**figure30**).



Figure 30: Les gels lyophilisés à gauche, et à droite les gels reconstitués

Le gel reconstitué était visqueux, translucide avec présence de quelques flotteurs avec un pH de 7,33 à 8,1°C.

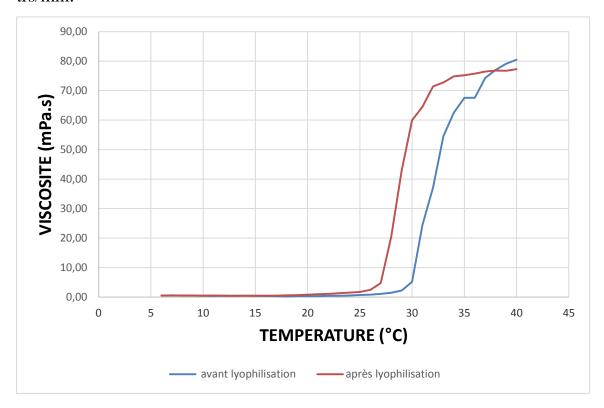
## 1. <u>DETERMINATION DE LA PERTE A LA DESSICCATION ET DU</u> TAUX D'HUMIDITE

Après déshydratation la perte à la dessiccation de notre gel était de 3,79g d'eau avec une teneur en eau de 5,47%.

#### 2. ETUDE DE LA VISCOSITE APRES LYOPHILISATION

#### **❖** Mesure de la température de gélification avant et après lyophilisation

Cette étude a été réalisée en évaluant la viscosité du gel reconstitué en fonction de la température (**figure31**). La vitesse de cisaillement retenue était de 8,3 trs/min.



<u>Figure 31</u>: Evolution de la viscosité du gel en fonction de la température à 8,3 trs/min

De 6°C à 37°C la viscosité du gel après la lyophilisation était plus importante que celle du gel avant la lyophilisation, en effet :

A 20°C la viscosité du gel avant et après lyophilisation était respectivement de 0,30mPa.s et 0,84mPa.s.

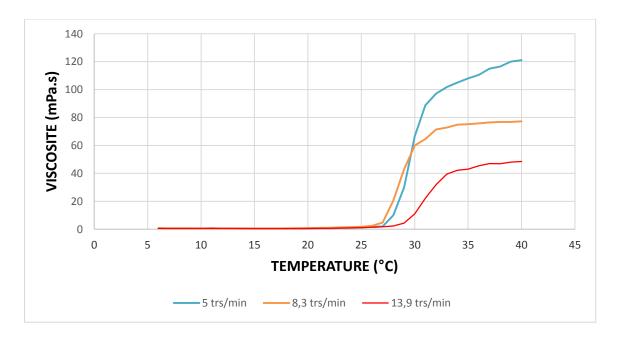
A 27°C la viscosité du gel avant et après lyophilisation était respectivement de 1,08 mPa.s et 4,69 mPa.s.

A 37°C la viscosité du gel avant et après lyophilisation était respectivement de 74,30 mPa.s et 76,45 mPa.s.

Cependant après 37°C la viscosité du gel avant la lyophilisation était inférieure à celle après lyophilisation. En effet la viscosité du gel à 38°C, 39°C et 40°C avant lyophilisation était respectivement de 77,00mPa.s; 79,15mPa.s; 80,50mPa.s et celle du gel lyophilisé de 76,8mPa.s; 76,75mPa.s et 77,3mPa.s.

### **Etude de la viscosité en fonction de la température a différents taux de cisaillement**

Cette étude a été réalisée en évaluant la viscosité du gel reconstitué en fonction de la température à 5trs/min, 8,3trs/min et 13,9trs/min (**figure32**).



<u>Figure 8</u>: Evolution de la viscosité du gel en fonction de la température après lyophilisation

Le caractère rhéofluidifiant du gel a été conservé après lyophilisation car la viscosité diminuait lorsque la vitesse de cisaillement augmentait. En effet :

A 25°C la viscosité du gel a 5trs/min; 8,3trs/min et à 13,9trs/min était respectivement de 1,3 mPa.s, 1,7mPa.s et 1,1mPa.s.

A 27°C la viscosité du gel était de 2,0mPa.s; 4,7mPa.s; 1,8mPa.s respectivement à 5trs/min; 8,3trs/min et à 13,9trs/min.

A 30°C la viscosité était de 97,1mPa.s; 77,4mPa.s; 31,9mPa.s respectivement à 5trs/min; 8,3trs/min et à 13,9trs/min.

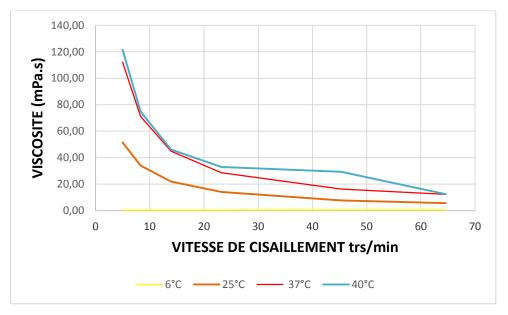
A 37°C la viscosité était de 115,0mPa.s; 75,5mPa.s et 47,5mPa.s respectivement à 5trs/min; 8,3trs/min et à 13,9trs/min.

Aussi lorsque la température augmentait la viscosité augmentait également signe que le caractère thermosensible a aussi été conservé après lyophilisation.

Aussi la Tgel du gel n'a pas varié quelques soit la vitesse de cisaillement ce qui implique que la vitesse de cisaillement n'a pas d'influence sur la Tgel du gel.

## **Etude de la viscosité en fonction de la vitesse de cisaillement a**différentes températures

Cette étude a été réalisée en évaluant la viscosité du gel reconstitué en fonction de la température à différents taux de cisaillement (**figure 33**).



<u>Figure 33</u>: Evolution de la viscosité du gel en fonction de la vitesse de cisaillement après lyophilisation

La viscosité du gel reconstitué à 25°C était de 34,1mPa.s ; 14,1mPa.s et 5,6mPa respectivement à 8,3 trs/min ; 23,2 trs/min et à 64,6 trs/min.

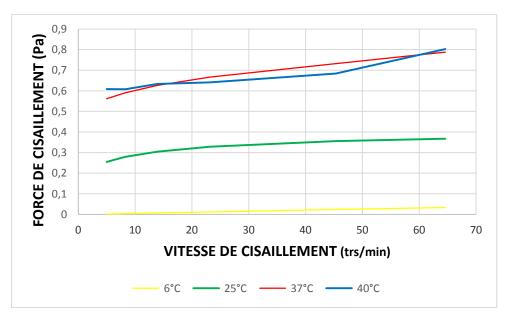
La viscosité du gel reconstitué à 37°C était de 71,2mPa.s; 28,6mPa.s et 12,3mPa.s respectivement à 8,3 trs/min; 23,2 trs/min et à 64,6 trs/min.

La viscosité du gel reconstitué à 40°C était de 74,9mPa.s ; 33,0mPa.s et 12,4mPa.s respectivement à 8,3 trs/min ; 23,2 trs/min et à 64,6 trs/min

Donc la viscosité de notre gel diminuait lorsque la vitesse de cisaillement augmentait pour les tests réalisés à 25°C, 37°C et 40°C. Par conséquent le gel avait un comportement rhéofluidifiant. Par contre, en dessous de la température de gélification (28°C), la viscosité n'était pas significativement modifiée par la vitesse de cisaillement.

### **Etude de la force de cisaillement en fonction de la vitesse de cisaillement a différentes températures**

Cette étude a été réalisée après reconstitution du gel en évaluant la contrainte en fonction des taux de cisaillement à différentes températures.



<u>Figure 34</u>: Evolution de la contrainte en fonction du taux de cisaillement du gel après lyophilisation

La force de cisaillement de notre gel à 25°C était de 0,2 Pa; 0,3 Pa et 0,4 Pa respectivement à 8,3 trs/min; 23,2 trs/min et à 64,6 trs/min.

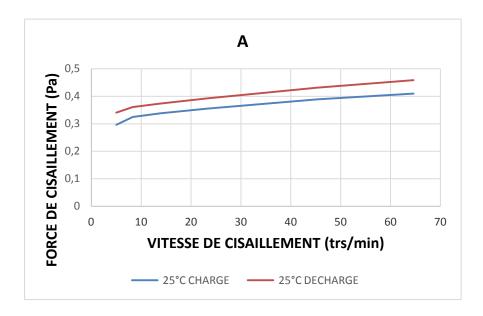
A 37°C la force de cisaillement de notre gel était de 0,6 Pa; 0,7 Pa et 0,8 Pa respectivement à 8,3 trs/min; 23,2 trs/min et à 64,6 trs/min.

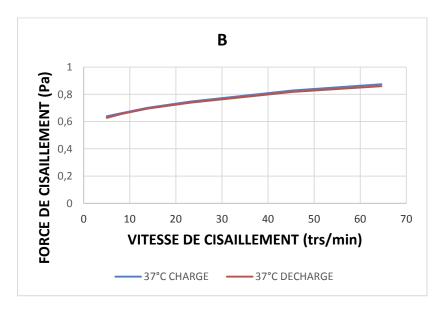
A 40°C la force de cisaillement de notre gel était de 0,6 Pa; 0,6 Pa et 0,8 Pa respectivement à 8,3 trs/min; 23,2 trs/min et à 64,6 trs/min.

Il en ressort que lorsque la force de cisaillement augmentait la vitesse de cisaillement augmentait également quelle que soit la température de travail. Donc le gel avait un comportement rhéofluidifiant.

#### **\*** Etude du caractère thixotrope

La thixotropie a été évaluée à partir des courbes d'évolution de la contrainte en fonction de la vitesse de cisaillement à 25°C et à 37°C.





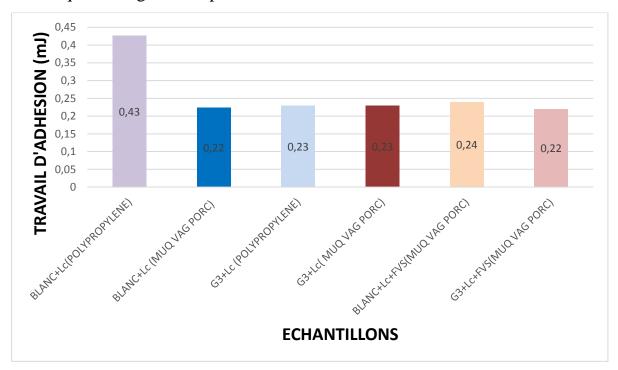
<u>Figure 35</u>: Variation de la force de cisaillement en fonction de la vitesse de cisaillement du gel à 25°C (A) et à 37°C (B) après lyophilisation

Nous avons remarqué que les courbes ascendante et descendante ne coïncident pas à 25°C tandis qu'a 37°C les courbes ascendante et descendante coïncident.

Le gel reconstitue avait donc un caractère thixotrope 25 °C et un caractère non thixotrope à 37°C. Par conséquent l'état de notre gel était modifié par la contrainte à 25°C et non modifié par la contrainte à 37°C.

#### 3. ETUDE D'ADHESION

Cette étude a été réalisé à la fois sur film de polypropylène et sur muqueuse vaginale de porc. L'influence du fluide vaginal simulé a été également évaluée sur muqueuse vaginale de porc.



<u>Figure 36</u>: Courbe d'évolution du travail d'adhésion du gel sur muqueuse vaginale de porc et sur film de polypropylène

Le travail d'adhésion du blanc + Lc sur film de polypropylène était plus important que celui sur muqueuse vaginale de porc alors que pour le G3+Lc le travail d'adhésion était le même quelque le type de membrane avec une valeur de 0,23mJ. En effet le travail d'adhésion du blanc+Lc sur film de polypropylène était de 0,43 mJ et de 0,22 mJ sur muqueuse vaginale de porc.

L'addition du FVS a entrainé une modification non significative du travail d'adhésion sur la muqueuse vaginale de porc des deux formulations. En effet le travail d'adhésion du blanc+ Lc était de 0,22mJ avant la dilution et 0,24mJ après dilution tandis que celui de G3+Lc était de 0,23mJ avant la dilution et 0,22mJ après la dilution.

#### 0,90 FORCE MAXIMALE DE DETACHEMENT 0,9 0,8 0,7 0,57 0,6 0,47 0,45 0,43 0,41 0,41 0,5 0,35 0,33 0,4 0,29 0,3 0,2 0,1 3LANC+Lc+FVS(MUQ VAG BLANC+Lc(POLYPROPYLENE) G3+Lc( MUQ VAG PORC) 3LANC+Lc+(POLYPROPYLENE) G3+Lc+FVS(MUQ VAG PORC) G3+Lc( MUQ VAG PORC) G3+Lc (POLYPROPYLENE) G3+Lc (POLYPROPYLENE) **3LANC+Lc (MUQ VAG PORC)** BLANC+Lc (MUQ VAG PORC) **AVANT LYOPHILISATION** APRES LYOPHILISATION **ECHANTILLONS**

#### Etude de la force maximale de détachement

Figure 37: Courbe d'évolution de la force maximale de détachement du gel sur muqueuse vaginale de porc et sur film de polypropylène après lyophilisation

La force maximale de détachement est plus importante sur muqueuse vaginale de porc que sur film de polypropylène que ce soit avant ou après lyophilisation. La Fmax après lyophilisation est plus faible comparativement à la Fmax avant lyophilisation quelques soit le type de membrane.

L'ajout du FVS aux différentes formulations lyophilisé a entrainé une diminution de la Fmax du blanc+Lc et une augmentation de la Fmax de G3+Lc.

En effet la Fmax du blanc+Lc est passé de 0,47N à 0,43N sur muqueuse vaginale de porc tandis que la Fmax de G3+Lc est passé de 0,41N à 0,45N également sur muqueuse vaginale de Porc.

# CHAPITRE III: DISCUSSION

L'objectif de ce travail a consisté en la mise au point d'un système mucoadhésif et thermogélifiant lyophilisé pour la prévention de la gonococcie. A cet effet, nous avons formulé des systèmes associant le poloxamer 407 (agent gélifiant), l'acide alginique (agent mucoadhésif), *Lactobacillus crispatus* (probiotiques) le tampon de phosphate et le glycérol ou le lactose (cryoprotecteur). La température de gélification et les caractéristiques sur le plan macroscopique, microbiologique (viabilité en fonction du cryoproteur) et physico-chimique (p H), rhéologique et texturale ont été évaluées. Enfin nous avons caractérisé le gel après lyophilisation.

### I. FORMULATION ET CARACTERISATION PHYSICO-CHIMIQUE DU GEL A BASE DE P407/ACIDE ALGINIQUE/Lactobacillus crispatus/GLYCEROL

#### **❖** CHOIX DU TAMPON DE PHOSPAHTE (PBS)

Cette solution a été choisie pour éliminer les résidus de milieu de culture et équilibrer le ph à7 (71). De plus elle a déjà été utilisé sur des lactobacilles comme solution de resuspension (72,73) et elle est compatible avec la muqueuse vaginale.

### \* CHOIX DU GLYCEROL ET SU LACTOSE COMME CRYOPROTECTANT

Le lactose et le glycérol sont des cryoprotectant intracellulaires qui ont déjà été utilisé dans des études afin d'accroitre la survie de bactéries lactique après lyophilisation et pendant le stockage (65,74). De plus ils sont non toxiques et compatibles avec la muqueuse vaginale. Ces deux substances ont pu maintenir un niveau standard minimum de concentration microbienne (107 UFC / ml) avant la lyophilisation (73).

#### **CHOIX DE LA FORMULE**

Au cours des deux dernières décennies, les polymères thermosensibles et leurs hydrogels ont suscité un intérêt croissant car selon leur composition, la température de gélification des préparations peut être ajustée autour de 37°C pour des applications pharmaceutiques (49)(75). La lyophilisation quant à elle est une technique de déshydratation couramment utilisée pour la préparation de produits pharmaceutiques stables (76). Dans la présente étude, la lyophilisation des formes semi-solides a été explorée avec l'intention de développer un hydrogel lyophilisé préventif contre la gonococcie favorable à la stabilité de *lactobacillus crispatus* (58). L'avantage était que la lyophilisation fournirait une stabilisation du produit à long terme même à température ambiante et une facilité de reconstitution. Aussi après administration ces formulations conserveraient les attributs bénéfiques prévus des formulations semi-solides originales, y compris les propriétés mucoadhésives permettant un contact intime prolongé du candidat avec l'épithélium vaginal (76).

Nos gels ont été formulé à partir du P407 un polymère dont les propriétés thermosensibles favorisent la gélification à la température corporelle. Le choix s'est porté sur le P407 qui permet d'obtenir des hydrogels transparents,

incolores et facilement lavables à l'eau. Ces hydrogels sont peu irritants pour les muqueuses. Cependant, ils présentent faible propriété mucoadhésives nécessitant de les associer à d'autres polymères bioadhésifs tels que l'acide alginique (35). Nous avons donc ajouté au P407 l'acide alginique comme polymère mucoadhésif sur la base des travaux de N'GUESSAN et al (71). Ceci permettra d'accroitre le temps de résidence de la formulation au site d'application permettant une libération prolongée de la substance active et une réduction du nombre d'administration journalier.

A partir de ces polymères, des hydrogels ont été formulé en y ajoutant les suspensions bactériennes constituées de PBS de lactose ou glycérol.

Toutes nos formulations à base de P407 ont présenté un comportement viscoélastique et une Tgel supérieur à 25°C. La Tgel du blanc était de 32°C tandis que celle de G1, G2, G3, L1, L2 et L3 était respectivement de 27°C, 28°C, 30°C, 26°C, 29°C témoignant de l'influence négative des cryoprotectant sur la Tgel. Il faut aussi noter que la température de gélification augmentait globalement avec la concentration en cryoprotectant mais restait inférieur à celle du blanc. Cependant l'augmentation de la Tgel (30°C) jusqu'à température ambiante idéal pour une administration muqueuse (75), l'obtention d'un PH de 4,99 adapté à une administration vaginale (35) et l'augmentation de la survie de *lactobacillus crispatus* avant la lyophilisation a permis de retenir le glycérol a 2,49% comme cryoprotectant de notre formulation.

Ainsi parmi toutes les préparations réalisées, et après avoir effectué une analyse microbiologique, rhéologique et physicochimique, la formulation finale retenue était donc pour 5g de gel (77); P407 (21,5%); acide alginique (1%); solution de glycérol dans le PBS (2,49%); Lactobacillus crispatus (0,033g). Il faut noter que la masse bactérienne lyophilisé de 330 mg est similaire à celle des formulations retrouvé sur le marché.

Ces hydrogels étaient homogènes, incolores, onctueux au touché. Ils étaient stables à la variation de températures. Ils ont présenté un Ph acide de 4,99 adapté à une administration vaginale. Cependant, la lyophilisation n'a pas permis de maintenir la masse bactérienne en vie car le séchage la lyophilisation était partiel (dessiccation primaire). En effet la lyophilisation doit se poursuivre jusqu'à la dessiccation secondaire pour extraire toutes les molécules d'eau piégés après la sublimation car la présence de l'eau favorise les réactions biologiques pouvant altérer le lyophilisat (55).

#### \* RHEOLOGIE

Leurs propriétés élastiques ont été plus prononcées que les propriétés visqueuses (G ' > G ") à 25°C±°C tandis que leurs propriétés visqueuses ont été plus prononcées que les propriétés élastiques (G " > G ') à 37°C±°C car leur Tgel était supérieure à 25°C. Des résultats similaires ont été obtenus par Chang et al. (2002) (78). Nos résultats étaient proches de ceux de Guei et al (2012) et Aka et al (2011) (27,68). Guei et al ont travaillé sur la formulation d'un gel mucoadhésif à base de plante pour le traitement de l'ulcère de buruli (P407/CMC/Sacoglottis gabonensis). Aka et al ont formulé des gels à base de P407/HPMC pour application vaginale.

L'acide alginique a permis d'augmenter la viscoélasticité des gels et de diminuer la température de gélification. En effet lorsque la température augmente, les polymères mucoadhésifs se lient aux micelles de Poloxamer 407 par des ponts hydrogènes, augmentant ainsi la taille des micelles et stabilisant ces structures. Ceci a pour effet de diminuer la température de gélification contrairement au Poloxamer 407 utilisé seul (79).

Le glycérol a augmenté de manière significative la viscosité de nos systèmes car comme l'indique la littérature le glycérol est un liquide visqueux (80). Cette

influence est non significative au-dessus de la Tgel du P407. Cela s'expliquerait par le fait qu'a ces températures la viscosité dépend fortement du P407.

Lactobacillus crispatus n'influençait pas de manière significative la viscosité.

Nos gels avait un comportement rhéofluidifiant et thermogélifiant car leur viscosité augmentait avec la température et diminuait avec la vitesse de cisaillement. Ces comportements sont bénéfiques pour une formulation vaginale car faciliterait l'écoulement et l'étalement de la forme sur la muqueuse vaginale après administration prolongeant ainsi le contact entre les probiotiques et la muqueuse. Des résultats similaires ont été obtenu avec AKA et al et de KOUAKOU et al (22,25).

Nos gels avaient également un caractère viscoélastique. Cette viscoélasticité permet d'avoir des systèmes visqueux lors de la conservation du gel et élastique lors de son administration, ce qui faciliterait son étalement sur la muqueuse vaginale. Ces résultats similaires sur les gels à base de poloxamer 407 associés ou non à des polymères mucoadhésifs ont été obtenus par de nombreux auteurs (40).

Le caractère thixotrope de nos gels a été évalué à 37°C température du corps et à 25°C pour mimer les conditions de conservation. Nos gels étaient non thixotropes ce qui permettait à la formulation de rester en place même si la femme est en activité.

La température de gélification était de 30°C pour le gel sans probiotiques et après ajout de lactobacillus crispatus la Tgel est passé à 31°C. Cette augmentation est significative et elle est due à une modification des propriétés physicochimiques car la variation de l'élasticité des hydrogels n'est pas seulement affectée par la concentration pluronique mais aussi par la composition du milieu(77).

### **\*** ETUDE D'ADHÉSION

L'étude d'adhésion a été réalisée sur des préparations déjà gélifiées dans le but de mimer les conditions réelles d'utilisation. En effet, celles-ci gélifiaient à température inférieur (30°C) à la température corporelle (37°C).

Dans le présent travail, des tests sur muqueuse vaginale de porc et sur film de polypropylène, ont permis de caractériser les propriétés bioadhésives des hydrogels en mesurant le travail d'adhésion de nos formulations à 37°C.

Dans l'ensemble le travail d'adhésion était plus important sur muqueuse vaginale de porc à 37°C, ces résultats sont similaires à ceux obtenus par GAMENE et al (80). Le travail d'adhésion du gel sans cryoprotectant était moins important que ceux des gels avec glycérol à 37°C ce qui implique que la formulation restera plus longtemps en contact avec la muqueuse vaginale. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par SYMI et al (81).

#### **❖ IMPACT DE LA LYOPHILISATION SUR LA FORMULATION**

La lyophilisation n'a pas permis la survie des bactéries pour toutes les solutions de cryoprotectants utilisés. Cela pourrait s'expliquer par l'arrêt de la lyophilisation a la dessiccation primaire. La sublimation ne permet pas à elle seule d'extraire toutes les molécules d'eau prouvé par une teneur élevé en eau de 5,47%.

L'aspect visuel de G3+Lc était non conforme car l'on a obtenu une masse qui a adhéré au fond du tube et non une masse poreuse. Cela pourrait être du a un écoulement visqueux qu'aurait subi le milieu par dépassement de la Tg et ou de la Tc. Cela indique que le cycle de lyophilisation n'a pas été réalisé de façon correcte et donc afin d'éviter l'effondrement des préparations pendant la

lyophilisation, l'analyse DSC s'avère nécessaire pour optimiser les protocoles de lyophilisation. Ces résultats sont contraires à ceux obtenu par BOGDANI Eni et al qui a travaillé sur l'optimisation du procédé de lyophilisation de l'ibuprofène en milieu organique(55).

La lyophilisation a entrainé une augmentation significative des propriétés viscoélastiques et une diminution significative de la Tgel. Cela pourrait être du a un réarrangement des chaines de polymères induits par la déshydratation. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par WOOLFSON et al(82).

En outre les caractères rhéofluidifiant, viscoélastique, thermogélifiant et non thixotrope à 37°C ont été conservés après lyophilisation favorable à une administration vaginale.

La dilution avec FVS n'a pas modifié de façon significative les propriétés mucoadhésives, ce qui représente un avantage surtout chez les femmes ayant une lubrification vaginale pauvre ou insuffisante, comme par exemple pendant la ménopause(77). Ces résultats sont contraires à ceux obtenus par AKA et al(77).

## CONCLUSION

Notre travail s'est proposé de formuler et de caractériser un hydrogel lyophilisé pour la prévention de la gonococcie. Les essais de préformulation et de formulation effectués nous ont permis d'identifier une formulation à base de P407 (21,5%); acide alginique (1%); solution de glycérol dans le PBS (2,49%); Lactobacillus crispatus (0,033g). Cette formulation à par la suite été caractérisée d'un point de vu organoleptique, physicochimique, rhéologique et textural avant et après lyophilisation. Cette formulation obtenue était stable, homogène avec un pH entre 4,99. Le gel formulé était Rhéofluidifiant, thermosensible et bioadhésif et non thixotrope a 37°C avant lyophilisation. Bien que les lactobacilles n'aient pas survécu après le séchage, sur le gel la lyophilisation n'a pas entrainé de modification des propriétés rhéologiques et mucoadhésives. Par ailleurs, nous avons aussi démontré que la mucoadhésion n'étaient pas influencées par le fluide vaginal simulé ce qui présente un avantage pour les femmes ayant une lubrification pauvre.

Les résultats de ce travail paraissent encourageants. Toutefois, des études plus approfondies seront réalisées pour mieux d'améliorer la viabilité de lactobacillus crispatus après lyophilisation. A ces études seront associées des études de stabilité plus poussée et des études précliniques qui permettrons de proposer nos formulations comme des candidats potentiels pour des études cliniques.

## **PERSPECTIVES**

Plusieurs perspectives se dégagent à l'issue de ce travail. Nous avons notamment :

- ✓ l'étude in vitro de l'activité anti gonococcique du gel avant lyophilisation
- ✓ l'étude de la solution de reconstitution du gel
- ✓ optimiser le cycle de lyophilisation par la détermination de la Tg et de la Tc
- ✓ Poursuivre la lyophilisation jusqu'à la dessiccation secondaire
- ✓ l'étude in vitro de l'activité anti bactérienne sur d'autres IST (chlamydia...)
- ✓ l'étude de l'innocuité du gel sur les animaux.
- ✓ Les essais de conservation dans le conditionnement primaire.

# REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Sultan S. Épidémiologie des infections sexuellement transmissibles. Côlon Rectum [Internet]. mai 2014 [cité 18 sept 2018];8(2):84-7. Disponible sur: http://link.springer.com/10.1007/s11725-014-0517-7
- OMS. STRATÉGIE MONDIALE DU SECTEUR DE LA SANTÉ CONTRE LES INFECTIONS SEXUELLEMENT TRANSMISSIBLES 2016-2021 [Internet]. 2016. Report No.: JUIN 2016. Disponible sur: http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/250242/WHO-RHR-16.09-fre.pdf;jsessionid=24E7A2C4C9BD67C468FE53E1A254A69C?sequence=1
- 3. HAUTE AUTORITE DE SANTE. Dépistage et prise en charge de l'infection à Neisseria gonorrhoeae : état des lieux et propositions [Internet]. 2010 déc. Disponible sur: https://webzine.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2011-03/argumentaire\_gonocoque\_vf.pdf
- Pogany L, Romanowski B, Robinson J, Gale-Rowe M, Latham-Carmanico C, Weir C, et al. Prise en charge de l'infection gonococcique chez les adultes et les jeunes. Can Fam Physician [Internet]. oct 2015 [cité 18 sept 2018];61(10):e451- 6. Disponible sur: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4607348/
- 5. Item 95 Maladies sexuellement transmissibles : infections urogénitales à gonocoque et Chlamydia trachomatis (en dehors de la maladie de Nicolas-Favre). /data/revues/01519638/v139i11sS/S0151963812000099/ [Internet]. 22 nov 2012 [cité 18 sept 2018]; Disponible sur: http://www.em-consulte.com/en/article/769267
- 6. Tissier B. Prévalence de Neisseria gonorrhoeae asymptomatique au CIDDIST-CDAG du CHU nord de la Réunion par dépistages combinés chlamydia-gonocoque. :58. Disponible sur: https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01243064/document
- 7. ALIMI ép. MARDOUKH Eléonore Rébecca. DÉPISTAGE ET TRAITEMENT DES INFECTIONS À GONOCOQUE EN MÉDECINE DE VILLE [Internet]. UNVERSITE PARIS DIDEROT PARIS 7 FACULTE DE MEDECINE; 2014. Disponible sur: http://www.bichat-larib.com/publications.documents/4679\_ALIMI\_these.pdf
- Wi T, Lahra MM, Ndowa F, Bala M, Dillon J-AR, Ramon-Pardo P, et al. Antimicrobial resistance in Neisseria gonorrhoeae: Global surveillance and a call for international collaborative action. PLoS Med [Internet]. 7 juill 2017 [cité 5 nov 2018];14(7). Disponible sur: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5501266/
- 9. Bourgeade A. GONOCOCCIES ET RESISTANCE DU GONOCOQUE AUX ANTIBIOTIQUES. 1990;2. Disponible sur: http://www.santetropicale.com/Resume/113715.pdf
- Costa-Lourenço APR da, Abrams AJ, dos Santos KTB, Argentino ICV, Coelho-Souza T, Caniné MCA, et al. Phylogeny and antimicrobial resistance in Neisseria gonorrhoeae isolates from Rio de Janeiro, Brazil. Infect Genet Evol [Internet]. mars 2018 [cité 19 sept 2018];58:157-63. Disponible sur: http://sci-hub.tw/https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S156713481730429X
- 11. Gianecini R, Oviedo C, Irazu L, Rodríguez M, Galarza P. Comparison of disk diffusion and agar dilution methods for gentamicin susceptibility testing of Neisseria gonorrhoeae. Diagn

- Microbiol Infect Dis [Internet]. août 2018 [cité 19 sept 2018];91(4):299- 304. Disponible sur: http://sci-hub.tw/https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S073288931830083X
- 12. Kanga JM, Ndoye I. TRAITEMENT DE LA GONOCOCCIE FEMININE NON COMPLIQUEE, PAR UNE ADMINISTRATION ORALE UNIQUE DE 800 MG DE PEFLOXACINE. Médecine Afr Noire [Internet]. 1991;4. Disponible sur: http://www.santetropicale.com/Resume/103808.pdf
- 13. Serra-Pladevall J, Gulin Blanco C, Vila Olmo N, Arjona Camacho P, Andreu Domingo A. Preservation of Neisseria gonorrhoeae: should swabs be refrigerated or not? J Microbiol Methods [Internet]. févr 2018 [cité 19 sept 2018];145:37-9. Disponible sur: http://sci-hub.tw/https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167701217303500
- 14. Table de concertation nationale en maladies infectieuses, Groupe de travail pour le contrôle de l'infection gonococcique, Laberge C, Tsarevsky I, Québec (Province), Ministère de la santé et des services sociaux. Augmentation du nombre de souches de Neisseria gonorrhoeae résistantes aux fluoroquinolones au Québec: avis [Internet]. Québec: Santé et services sociaux Québec; 2007. Disponible sur: http://sbisrvntweb.uqac.ca/archivage/030006865.pdf
- 15. Kakwokpo Clemence N'Guessan epse GNAMAN, Armelle Sandrine AKA ANY GRAH, Armand KOFFI, Sandrine GEIGER Florence AGNELY, Gilles PONCHEL. APPROCHE INNOVANTE POUR LA PREVENTION DES INFECTIONS SEXUELLEMENT TRANSMISSIBLES.
- 16. KHADIDJA DRAVE DIOP. Prévalence de Neisseria gonorrhoeae dans les prélèvements génitaux examinés à l'Institut National de Recherche en Santé Publique. [Internet]. [FACULTE DE MEDECINE DE PHARMACIE ET D'ODONTO- STOMATOLOGIE]: UNIVERSITE DE BAMAKO (MALI); 2002. Disponible sur: http://www.keneya.net/fmpos/theses/2003/pharma/pdf/03P08.pdf
- 17. Androutsos G, Vladimiros L. De la gonorrhée à la blennorragie: Les grandes étapes historiques. Basic Clin Androl [Internet]. 1 juin 2007 [cité 7 sept 2018];(Volume 17, Issue 2). Disponible sur: http://paperity.org/p/31177472/de-la-gonorrhee-a-la-blennorragie-les-grandes-etapes-historiques
- 18. Céline ACKER MEDETE. Intérêt d'une technique de biologie moléculaire dans le diagnostic des infections à Neisseria gonorrhoeae : Etude de 1165 patientes [Internet]. UNIVERSITE HENRI POINCARE NANCY I FACULTE DE PHARMACIE; 2010. Disponible sur: http://docnum.univ-lorraine.fr/public/SCDPHA\_T\_2010\_ACKER\_CELINE.pdf
- 19. ABED TOURIA. INFECTIONS SEXUELLEMENT TRANSMISSIBLES EXPERIENCE DU SERVICE DE DERMATOLOGIE A L'HOPITAL MILITAIRE MOULAY ISMAIL DE MEKNES (À propos de 119 cas) [Internet]. [MAROC]: UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE FES; 2015. Disponible sur: http://scolarite.fmp-usmba.ac.ma/cdim/mediatheque/e\_theses/204-15.pdf
- Janier M, Lassau F, Dupin N, Bouscarat F, Pelletier F, Alcaraz I. Gonococcie. Ann Dermatol Vénéréologie [Internet]. nov 2016 [cité 19 sept 2018];143(11):710- 2. Disponible sur: http://sci-hub.tw/https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S015196381630388X
- 21. HEARTLAND ALLIANCE INTERNATIONAL. EVALUATION A MI PARCOURS DU PROJET IMPACT-CI. COTE D'IVOIRE; 2017 AOUT.

- 22. World Health Organization, Reproductive Health and Research. WHO guidelines for the treatment of Neisseria gonorrhoeae. [Internet]. 2016 [cité 5 nov 2018]. Disponible sur: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK379221/
- 23. Judlin PG, Thiebaugeorges O. Physiopathologie, diagnostic et prise en charge des infections génitales hautes. Gynécologie Obstétrique Fertil [Internet]. févr 2009 [cité 5 nov 2018];37(2):172- 82. Disponible sur: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S129795890800547X
- 24. Justin-temu M, Damian F, Kinget R, Mooter GVD. Intravaginal Gels as Drug Delivery Systems. J Womens Health [Internet]. sept 2004 [cité 5 nov 2018];13(7):834- 44. Disponible sur: http://www.liebertpub.com/doi/10.1089/jwh.2004.13.834
- 25. das Neves J, Bahia MF. Gels as vaginal drug delivery systems. Int J Pharm [Internet]. août 2006 [cité 5 nov 2018];318(1- 2):1- 14. Disponible sur: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517306002304
- 26. Bonferoni MC, Giunchedi P, Scalia S, Rossi S, Sandri G, Caramella C. Chitosan gels for the vaginal delivery of lactic acid: Relevance of formulation parameters to mucoadhesion and release mechanisms. AAPS PharmSciTech. 1 févr 2006;7:104.
- 27. Aka AAS. Développement de systèmes d'administration originaux destinés à la prévention de la contamination par le VIH chez la femme. 2011;222.
- 28. Protection of Vaginal Epithelial Cells with Probiotic Lactobacilli and the Effect of Estrogen against Infection by *Candida albicans* [Internet]. [cité 26 oct 2018]. Disponible sur: https://sci-hub.tw/https://file.scirp.org/Html/2-2260018\_22814.htm
- 29. Tomás MSJ, Nader-Macías ME. Effect of a medium simulating vaginal fluid on the growth and expression of beneficial characteristics of potentially probiotic lactobacilli. M. 2007;8.
- 30. THORAL C, Tchoreloff P, MAZEL V, Busignies V, NIVOLIEZ A. Comprime vaginal muco-adhesif a liberation prolongee [Internet]. EP3116517A1, 2017 [cité 26 sept 2018]. Disponible sur: https://patents.google.com/patent/EP3116517A1/fr
- 31. Lactoferrine [Internet]. [cité 5 nov 2018]. Disponible sur: https://www.zoelho.com/zoelhofr/publish/Basiselementen/Lichaamshulpstoffen/Lactoferrine. htm
- 32. Pierce A, Legrand D, Mazurier J. La lactoferrine : une protéine multifonctionnelle. médecine/sciences [Internet]. avr 2009 [cité 5 nov 2018];25(4):361- 9. Disponible sur: http://www.medecinesciences.org/10.1051/medsci/2009254361
- 33. BENGUETTANE, Rachida. Effets de quelques cryoprotecteurs sur la conservation d'une souche de lactocoques isolée à partir du lait caprin [Internet]. KA S DI MERBAH OUARGLA; 2015. Disponible sur: https://bu.univ-ouargla.dz/master/pdf/BENGUETTANE\_Rachida.pdf?idmemoire=1900
- 34. BAHRI Fathia. ISOLMENT ET CARACTERISATION DES SOUCHES DE LACTOBACILLES A CARACTERES PROBIOTIQUES A PARTIR DE SELLES D'ENFANTS [Internet]. [Algérie]: Constantine I; 2014. Disponible sur: https://bu.umc.edu.dz/theses/biologie/BAH6554.pdf

- 35. BENSIDHOUM Keltoum, BOUDRAHEM Nedjma. Isolement et caractérisation des bactéries lactiques du genre Lactobacillus à partir des produits laitiers traditionnels artisanaux [Internet]. [Algérie]: A.MIRA-Bejaia; 2017. Disponible sur: http://www.univ-bejaia.dz/dspace/bitstream/handle/123456789/5087/Isolement%20et%20caract%C3%A9risati on%20des%20bact%C3%A9ries%20lactiques%20du%20genre%20Lactobacillus%20%C3%A0%20 partir%20des%20produits%20laitiers%20traditionnels%20artisanaux.pdf?sequence=1&isAllowe d=y
- 36. Canada A de la santé publique du, Canada A de la santé publique du. Fiche Technique Santé-Sécurité: Agents Pathogènes Lactobacillus spp. [Internet]. aem. 2012 [cité 5 nov 2018]. Disponible sur: https://www.canada.ca/fr/sante-publique/services/biosecurite-biosurete-laboratoire/fiches-techniques-sante-securite-agents-pathogenes-evaluation-risques/lactobacillus.html
- 37. Lapointe J. FABRICATION ET CARACTÉRISATION D'HYDROGELS THERMOSENSIBLES POUR DES APPLICATIONS DE LIVRAISON CIBLÉE DE MÉDICAMENT ET D'EMBOLISATION. :88.
- 38. Ahmed EM. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. J Adv Res [Internet]. mars 2015 [cité 26 sept 2018];6(2):105- 21. Disponible sur: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2090123213000969
- 39. Zeng N. Formulation et caractérisation d'une forme buccale mucoadhésive thermogélifiante pour administration de sulfate de salbutamol. :193.
- 40. KOUAKOU AMENAN SEVERINE. FORMULATION D'UN GEL MUCOADHESIF RECTAL A BASE DE CTA POUR LE TRAITEMENT DU PALUDISME CHEZ L'ENFANT. COTE D'IVOIRE; 2017.
- 41. Gandra SCR. The Preparation and Characterization of Poloxamer-based Temperature-sensitive Hydrogels for Topical Drug Delivery. University of Toledo; 2013. 99 p.
- 42. Klouda L, Mikos AG. Thermoresponsive hydrogels in biomedical applications. Eur J Pharm Biopharm [Internet]. janv 2008 [cité 4 nov 2018];68(1):34- 45. Disponible sur: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0939641107002470
- 43. Qiu Y, Park K. Environment-sensitive hydrogels for drug delivery. Adv Drug Deliv Rev [Internet]. déc 2012 [cité 4 nov 2018];64:49- 60. Disponible sur: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169409X12002840
- 44. (PDF) Hydrogels as potential drug delivery systems [Internet]. [cité 4 nov 2018]. Disponible sur: https://www.researchgate.net/publication/230785490\_Hydrogels\_as\_potential\_drug\_delivery\_systems
- 45. Vallée F. Synthèse et caractérisation d'un hydrogel d'alginamide pour la régénération de voies nerveuses lésées au sein du Système Nerveux Central chez le rat. :277. Disponible sur: https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01752836/document
- 46. Gandra SC. The preparation and characterization of poloxamer-based temperature-sensitive hydrogels for topical drug delivery. :112.
- 47. Ganem-Quintanar A. Applications of thermo-reversible pluronic F-127 gels in pharmaceutical formulations. J Pharm Amp Pharm Sci Publ Can Soc Pharm Sci Société Can Sci Pharm [Internet].

- [cité 3 oct 2018]; Disponible sur: http://www.academia.edu/31416812/Applications\_of\_thermo-reversible\_pluronic\_F-127\_gels\_in\_pharmaceutical\_formulations
- 48. Rowe RC, éditeur. Handbook of pharmaceutical excipients. 6. ed. London: APhA, (PhP) Pharmaceutical Press; 2009. 888 p.
- 49. Koffi AA, Agnely F, Ponchel G, Grossiord JL. Modulation of the rheological and mucoadhesive properties of thermosensitive poloxamer-based hydrogels intended for the rectal administration of quinine. Eur J Pharm Sci [Internet]. mars 2006 [cité 3 oct 2018];27(4):328-35. Disponible sur: http://sci-hub.tw/https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16356700
- 50. Justin-Temu M, Damian F, Kinget R, Van Den Mooter G. Intravaginal gels as drug delivery systems. J Womens Health 2002 [Internet]. sept 2004;13(7):834- 44. Disponible sur: file:///C:/Users/HP/AppData/Local/Temp/29299-77989-1-PB.pdf
- 51. Handbook of Pharmaceutical Excipients [Internet]. Cinquième. Raymond C Rowe, Paul J Sheskey and Siân C Owen; Disponible sur: http://www.gmpua.com/RD/RD/HandbookPharmaceutical%20Excipients.pdf
- 52. LAMPRE JMA. Laboratoire de Ph armacie Galénique, Faculté de Pharmacie de NANCY. 2004;155.
- 53. Sen J, Pillai S, P G, G S. Formulation and Evaluation of Muco-adhesive In-situ Gel for Site-Specific Delivery of Clotrimazole. Res Rev J Pharm Nanotechnol [Internet]. 24 déc 2014 [cité 5 nov 2018];2(3):1- 8. Disponible sur: http://www.rroij.com/peer-reviewed/formulation-and-evaluation-of-mucoadhesive-insitu-gel-for-sitespecific-delivery-of-clotrimazole-34365.html
- 54. GAMENE LEGRE AMOIN LYDIE. DEVELOPPEMENT D'UN GEL VAGINAL A BASE D'ANTIBIOTIQUE POUR LE TRAITEMENT DE LA GONOCOCCIE. COTE D'IVOIRE; 2018.
- 55. M. BOGDANI Eni. Étude expérimentale et optimisation du procédé de lyophilisation de l'ibuprofène en milieu organique [Internet]. [FRANCE]: CLAUDE BERNARD LYON 1; 2011. Disponible sur: https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00838568/document
- 56. Oleksii PARNIAKOV. Intensification de la congélation des aliments sous l'effet des champs électriques pulsés Soutenue [Internet]. Université de Tecnologie Compiègne; 2017. Disponible sur: file:///C:/Users/HP/Downloads/These\_UTC\_Oleksii\_Parniakov.pdf
- 57. Lyophilisation des aliments Définition et Avantages Lyophilise & Co [Internet]. [cité 3 nov 2018]. Disponible sur: https://www.lyophilise.fr/A-4151-lyophilisation-des-aliments-definition-et-avantages.aspx
- 58. Coulibaly I, Dubois-Dauphin R, Danthine S, Majad L, Mejoub T, Destain J, et al. Techniques de séchage des starters lactiques et mécanismes affectant la viabilité cellulaire suite à la lyophilisation. BASE [Internet]. 10 juin 2011 [cité 26 sept 2018]; Disponible sur: https://popups.uliege.be:443/1780-4507/index.php?id=7551
- 59. MARIN M, RENÉ F. Lyophilisation [Internet]. Ref : TIP700WEB « Agroalimentaire ». 2000 [cité 3 nov 2018]. Disponible sur: https://www.techniques-ingenieur.fr/base-documentaire/procedes-

- chimie-bio-agro-th2/operations-unitaires-du-genie-industriel-alimentaire-42430210/lyophilisation-f3240/
- 60. AVANTAGES, LIMITES ET COMPARAISON [Internet]. [cité 3 nov 2018]. Disponible sur: http://tpelyophilisation2011.doomby.com/pages/t-p-e/avantages-limites-et-comparaison.html
- 61. La lyophilisation [Internet]. Bio Equin. [cité 3 nov 2018]. Disponible sur: http://bio-equin.com/les-complements-nutritionnels/la-lyophilisation/
- 62. Daraoui N, Dufour P, Hammouri H, Hottot A. Model predictive control during the primary drying stage of lyophilisation. Control Eng Pract [Internet]. mai 2010 [cité 2 oct 2018];18(5):483-94. Disponible sur: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0967066110000134
- 63. Lyophilisation des artefacts archéologiques Notes de l'Institut canadien de conservation (ICC) 4/2 [Internet]. aem. 2017 [cité 3 nov 2018]. Disponible sur: https://www.canada.ca/fr/institut-conservation/services/publications-conservation-preservation/notes-institut-canadien-conservation/lyophilisation-artefacts-archeologiques.html
- 64. John Ryan. Guide général de cryoconservation de cultures de cellules animale [Internet]. 2004. Disponible sur: http://www.labcluster.com/images/Cryoconservation\_Corning.pdf
- 65. Sophie Declomesnil. Viabilité des bactéries lactiques après lyophilisation en fonction de l'excipient ajouté. LA VAGUE [Internet]. mars 2014; Disponible sur: https://a3p.org/wp-content/uploads/2014/04/article\_scientifique\_vague41\_0pdf\_articles\_la\_vague\_41\_bd-24-26.pdf
- 66. Impact du séchage sur la viabilité de Pseudomonas fluorescens (synthèse bibliographique) | Université de Liège [Internet]. [cité 26 sept 2018]. Disponible sur: https://popups.uliege.be/1780-4507/index.php?id=10882
- 67. PASSOT S, Fonseca F, MARIN M. Compositions pour la lyophilisation de proteines [Internet]. EP1843753A2, 2007 [cité 26 sept 2018]. Disponible sur: https://patents.google.com/patent/EP1843753A2/fr
- 68. GUEI LOVE. FORMULATION D'UN HYDROGEL A BASE DE SACOGLOTTIS GABONENSIS POUR LE TRAITEMENT DE L'ULCERE DE BURULI [Internet]. UNIVERSITE FELIX HOUPHOUET BOIGNY; 2014. Disponible sur: http://www.revues-ufhb-ci.org/fichiers/FICHIR\_ARTICLE\_2099.pdf
- 69. Fiches internationales de sécurité chimique [Internet]. [cité 5 oct 2018]. Disponible sur: http://training.itcilo.it/actrav\_cdrom2/fr/osh/ic/nfrn0624.html
- 70. Koffi AA, Agnely F, Besnard M, Kablan Brou J, Grossiord JL, Ponchel G. In vitro and in vivo characteristics of a thermogelling and bioadhesive delivery system intended for rectal administration of quinine in children. Eur J Pharm Biopharm [Internet]. mai 2008 [cité 3 oct 2018];69(1):167- 75. Disponible sur: https://sci-hub.tw/10.1016/j.ejpb.2007.09.017
- 71. Etude du potentiel probiotique et technologique des lactobacilles isolés du lait cru de chamelle. :100.
- 72. Bolla PA, de los Angeles Serradell M, de Urraza PJ, De Antoni GL. Effect of freeze-drying on viability and in vitro probiotic properties of a mixture of lactic acid bacteria and yeasts isolated

from kefir. J Dairy Res [Internet]. févr 2011 [cité 25 oct 2018];78(01):15- 22. Disponible sur: https://sci-hub.tw/https://www.cambridge.org/core/journals/journal-of-dairy-research/article/effect-of-freezedrying-on-viability-and-in-vitro-probiotic-properties-of-amixture-of-lactic-acid-bacteria-and-yeasts-isolated-from-kefir/C740F162D779B4438EE04D07B630BC22

- 73. R. M. U. S. K. Rathnayaka. Effect of Freeze Drying on Viability and Probiotic Properties of a Mixture of Probiotic Bacteria. ARPN Journal of Science and Technology [Internet]. nov 2013; Disponible sur: https://pdfs.semanticscholar.org/5ab4/9cad8d1dc1981ca9c7c7a25428f7831c0f7f.pdf?\_ga=2.1 78730979.69947955.1540474720-970939964.1540474720
- 74. Savini M, Cecchini C, Verdenelli MC, Silvi S, Orpianesi C, Cresci A. Pilot-scale Production and Viability Analysis of Freeze-Dried Probiotic Bacteria Using Different Protective Agents. Nutrients [Internet]. 11 mars 2010 [cité 25 oct 2018];2(3):330- 9. Disponible sur: https://sci-hub.tw/https://www.mdpi.com/2072-6643/2/3/330
- 75. Karavana SY, Ren?be S, Ay ?enyi?it Z, Balo?lu E. A New In-Situ Gel Formulation of Itraconazole for Vaginal Administration. Pharmacol Pharm [Internet]. 11 oct 2012 [cité 25 oct 2018];03:417. Disponible sur: http://www.scirp.org/journal/PaperInformation.aspx?PaperID=23617&#abstract
- 76. Donnelly L, Curran RM, Tregoning JS, McKay PF, Cole T, Morrow RJ, et al. Intravaginal immunization using the recombinant HIV-1 clade-C trimeric envelope glycoprotein CN54gp140 formulated within lyophilized solid dosage forms. Vaccine [Internet]. juin 2011 [cité 26 oct 2018];29(27):4512- 20. Disponible sur: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0264410X11005445
- 77. Aka-Any-Grah A, Bouchemal K, Koffi A, Agnely F, Zhang M, Djabourov M, et al. Formulation of mucoadhesive vaginal hydrogels insensitive to dilution with vaginal fluids. Eur J Pharm Biopharm [Internet]. oct 2010 [cité 3 oct 2018];76(2):296- 303. Disponible sur: http://sci-hub.tw/https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20656027
- 78. Chang JY, Oh Y-K, Choi H, Kim YB, Kim C-K. Rheological evaluation of thermosensitive and mucoadhesive vaginal gels in physiological conditions. Int J Pharm [Internet]. juill 2002 [cité 25 oct 2018];241(1):155- 63. Disponible sur: https://sci-hub.se/https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517302002326?via%3Dihub
- 79. Nyström B, Walderhaug H. Dynamic Viscoelasticity of an Aqueous System of a Poly(ethylene oxide)–Poly(propylene oxide)–Poly(ethylene oxide) Triblock Copolymer during Gelation. J Phys Chem [Internet]. janv 1996 [cité 28 oct 2018];100(13):5433- 9. Disponible sur: http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jp952486p
- 80. Universalis E. GLYCÉRINE [Internet]. Encyclopædia Universalis. [cité 26 oct 2018]. Disponible sur: http://www.universalis.fr/encyclopedie/glycerine/
- 81. SIMY GLANGNON CHARLES DEVINCI. OPTIMISATION D'UN HYDROGEL A BASE DE SACOGLOTTIS GABONENSIS (HUMIRIACEAE) POUR LE TRAITEMENT DE L'ULCERE DE BURULI. COTE D'IVOIRE; 2018.

82. Woolfson AD, Umrethia ML, Kett VL, Malcolm RK. Freeze-dried, mucoadhesive system for vaginal delivery of the HIV microbicide, dapivirine: Optimisation by an artificial neural network. Int J Pharm [Internet]. mars 2010 [cité 26 oct 2018];388(1- 2):136- 43. Disponible sur: https://sci-hub.tw/https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20045043

### **ANNEXES**



**ANNEXE I**: Agitateur mécanique de type STIRRER<sup>R</sup>



**ANNEXE II**: Autoclave systec



**ANNEXE III**: Balance de précision de marque OHAUS PIONEER<sup>R</sup>



**ANNEXE IV**: Centrifugeuse HORIZON



**ANNEXE V**: Lyophilisateur CHRIST ALPHA 1-2 LD PLUS



ANNEXE VI: Micro vortex HERDOLPH RZR1



**ANNEXE VII**: Osmoseur THERMO Scientifique <sup>R</sup> type micro pure UV



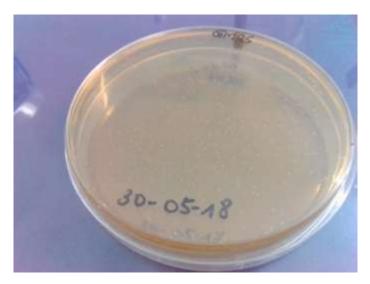
ANNEXE VIII: PH mètre type HANNA



**ANNEXE IX** : Texturomètre de marque TA1 AMETEK



<u>ANNEXE X</u>: Viscosimètre rotatif type Haake Viscotester 55O associé à un Cryostat de marque JULABO ED F12®



ANNEXE XI: Colonie de lactobacillus crispatus sur gélose MRS

#### **RESUME**

La gonococcie est l'une des IST bactériennes les plus répandu dans le monde dont la présence accroit le risque de contracter ou de transmettre d'autres IST. Malheureusement ces dernières décennies l'on assiste à une résistance de l'agent pathogène au antimicrobiens utilisés pour sa prise en charge thérapeutique. Dans ce cadre nous avons formulé un hydrogel lyophilisé à base de *Lactobacillus crispatus*. *Lactobacillus crispatus* est une bactérie gram positif vivant en commensal dans le vagin dont des essais in vitro ont montré son efficacité sur le germe responsable de la gonococcie.

Les dénombrements de *Lactobacillus crispatus* réalisés avant la lyophilisation ont permis de sélectionner le glycérol comme cryoprotectant. Des formulations combinant le poloxamer 407 (P407) l'acide alginique, le glycérol et *Lactobacillus crispatus* ont été réalisées. Les gels obtenus ont fait l'objet d'études rhéologiques et d'adhésion avant et après la lyophilisation.

Toutes les préparations réalisées étaient homogènes et présentaient un comportement viscoélastique. Les gels à base de P407 (21,5%) d'acide alginique (1%) de glycérol (2,49%) et de Lactobacillus crispatus (0,033g) ont donné un pH conforme à une administration vaginale et une température de gélification de 31°C avant lyophilisation. La lyophilisation a permis d'améliorer les propriétés viscoélastiques des formulations. De plus ces formulations étaient moins sensibles à la dilution par le fluide vaginal simulé. Cependant le processus de lyophilisation incomplet n'as pas permis la survie des Lactobacilles.

Mots-clés: Gonococcie, Hydrogel, Lactobacillus crispatus, Lyophilisation

KESSE ETCHIEN REINE

FORMULATION D'UN HYDROGEL LYOPHILISE A BASE <i>DE LACTOBACILLUS CRISPATUS</i> DESTINE A LA VOIE VAGINALE