



HAL
open science

Développement d'une nouvelle forme galénique pour l'administration intraoculaire de rifampicine

Mi-Yeon Lee

► **To cite this version:**

Mi-Yeon Lee. Développement d'une nouvelle forme galénique pour l'administration intraoculaire de rifampicine. Médecine humaine et pathologie. Université Claude Bernard - Lyon I, 2011. Français. NNT : 2011LYO10096 . tel-00926261

HAL Id: tel-00926261

<https://theses.hal.science/tel-00926261>

Submitted on 9 Jan 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

**Délivrée par
L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1**

ECOLE DOCTORALE de Chimie
Spécialité : Procédés et Pharmacotechnie

DIPLOME DE DOCTORAT
(arrêté du 7 août 2006)

soutenue publiquement le
8 Juin 2011

par
M^{elle} Mi-Yeon LEE

**Développement d'une nouvelle forme galénique pour
l'administration intraoculaire de rifampicine**

JURY

Madame BOCHOT Amélie (Rapporteur)
Madame BOURGEOIS Sandrine (Co-encadrant)
Monsieur HATEM Fessi (Directeur de Thèse)
Monsieur KODJIKIAN Laurent (Président du Jury)
Monsieur MIN Sang Gi
Monsieur SKIBA Mohamed (Rapporteur).

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

M. A. Bonmartin

Vice-président du Conseil d'Administration

M. le Professeur G. Annat

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

M. le Professeur D. Simon

Vice-président du Conseil Scientifique

M. le Professeur J-F. Mornex

Secrétaire Général

M. G. Gay

COMPOSANTES SANTÉ

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Directeur : M. le Professeur J. Etienne

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Directeur : M. le Professeur F-N. Gilly

UFR d'Odontologie

Directeur : M. le Professeur D. Bourgeois

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur : M le Professeur F. Locher

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Directeur : M. le Professeur Y. Matillon

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur P. Farge

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIES

Faculté des Sciences et Technologies

Directeur : M. le Professeur F. Gieres

Département Biologie

Directeur : M. le Professeur F. Fleury

Département Chimie Biochimie

Directeur : Mme le Professeur H. Parrot

Département GEP

Directeur : M. N. Siauve

Département Informatique

Directeur : M. le Professeur S. Akkouche

Département Mathématiques

Directeur : M. le Professeur A. Goldman

Département Mécanique

Directeur : M. le Professeur H. Ben Hadid

Département Physique

Directeur : Mme S. Fleck

Département Sciences de la Terre

Directeur : Mme le Professeur I. Daniel

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Directeur : M. C. Collignon

Observatoire de Lyon

Directeur : M. B. Guiderdoni

Ecole Polytechnique Universitaire de Lyon 1

Directeur : M. P. Fournier

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Directeur : M. G. Pignault

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Directeur : M. le Professeur C. Coulet

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. le Professeur J-C. Augros

Institut Universitaire de Formation des Maîtres

Directeur : M. R. Bernard

Remerciements

Cette étude a été réalisée au sein du laboratoire d'Automatique et de Génie des Procédés (LAGEP-UMR CNRS 5007) de l'Université Claude Bernard Lyon 1.

Elle a été menée sous la direction de Monsieur Hatem FESSI, Professeur à l'Université Claude Bernard Lyon 1, que je tiens à remercier tout particulièrement pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et aidé tout au long de mon travail.

Je remercie vivement Madame Sandrine Bourgeois, Maître de Conférences à l'Université Claude Bernard Lyon 1, qui m'a guidée et encouragée tout au long de la réalisation de ce travail, pour son apport scientifique ainsi que pour ses conseils éclairés.

Je remercie également Monsieur Laurent Kodjikian, Professeur à l'université Claude Bernard Lyon 1, pour m'avoir fait confiance pour mener à bien ce projet de recherche.

Je tiens à remercier, Madame Amélie Bochot et Monsieur Mohamed Skiba, respectivement Maître de Conférences dans les Universités de Paris Sud et Rouen, pour m'avoir fait l'honneur d'être rapporteurs de cette thèse et avoir pris le temps de l'examiner.

Je souhaite exprimer toute ma reconnaissance envers Monsieur Sang-Gi MIN, Professeur à KonKuk University de Séoul en Corée pour me faire l'honneur d'être membre du jury de cette thèse.

Je tiens aussi à remercier les laboratoires de l'Université Claude Bernard qui ont contribué au travail de ma thèse, notamment le laboratoire de Dermopharmacie et Cosmétologie (Mme Bolzinger) pour les analyses HPLC, et l'UMR-CNRS-5510 MATEIS (Mr Renaud) pour les études de microbiologie. Pour ces deux aspects je tiens particulièrement à remercier Mme Jocelyne Pelletier pour son aide et ses grandes connaissances de l'HPLC ainsi que Melle Aurélia Vetesse pour ses précieux conseils en microbiologie.

Enfin j'adresse mes chaleureux remerciements aux membres du laboratoire, le LAGEP, qui ont contribué, chacun à leur façon, au bon déroulement de cette étude, que ce soit de manière technique, scientifique, administrative ou amicale.

Sommaire

INTRODUCTION GÉNÉRALE	9
PARTIE 1 : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	14
CHAPITRE 1: ANATOMIE ET PHYSIOLOGIE DE L'ŒIL - ENDOPHTHALMIE POST OPÉRATOIRE .	15
Introduction.....	16
1. L'anatomie de l'œil	18
1.1 Le segment antérieur	19
1.2 Le segment postérieur	23
2. L'endophtalmie	27
2.1 Définition	27
2.2 Classification des endophtalmies.....	27
2.2.1. <i>Endophtalmie traumatique</i>	27
2.2.2. <i>Endophtalmie post-chirurgicale</i>	29
2.2.3. <i>Endophtalmie endogène</i>	31
2.3 Etiologie des endophtalmies	34
2.4 Traitements de l'endophtalmie	35
2.4.1 <i>Antibiothérapies curatives</i>	35
2.4.2 <i>Les traitements prophylactiques</i>	38
3. Application de la rifampicine au traitement des endophtalmies.....	41
3.1 Généralités sur la Rifampicine	41
3.2 Propriétés physicochimiques de la Rifampicine.....	42
3.3 Activité antibactérienne	43
3.3.1 <i>Mécanisme d'action</i>	43
3.3.2 <i>Spectre antibiotique</i>	43
3.3.3 <i>Sensibilité</i>	44
3.4 Administration ophtalmique	46
3.5 Nouvelle forme d'administration de rifampicine	47
4.Conclusion	48
Bibliographie.....	49

CHAPITRE 2 : NEW SYSTEM AND DISPOSITIVE OF ADMINISTRATION FOR OCULAR DELIVERY	.54
Introduction	55
1. Ocular administration	56
1.1 Methods for ocular administration	56
1.2. Recently developed ocular administration system	58
2. Methods for the preparation of polymeric micro or nanoparticles	70
2.1. General methods for the preparation of microparticles	70
2.2. The solvent displacement method or Nanoprecipitation	72
2.3. The salting-out technique	73
2.4. The solvent evaporation method	73
2.5. Emulsification diffusion	75
3. Conclusion	76
Bibliographie	78
PARTIE 2 : TRAVAUX PERSONNELS	85
Chapitre 1: DEVELOPMENT OF A NOVEL NANOCAPSULE FORMULATION BY EMULSION-DIFFUSION COMBINED WITH HIGH HYDROSTATIC PRESSURE	86
Résumé	87
Publication	89
CHAPITRE 2: PREPARATION AND OPTIMIZATION OF RIFAMPICIN-LOADED PLGA MICROPARTICLES FOR ENDOPHTHALMITIS PROPHYLAXIS	98
Résumé	99
1. Introduction	103
2. Materials and methods	106
2.1. Materials	106
2.2. Preparation of microcapsules and microspheres	106
2.3. Characterization of microparticles	109
2.4 Factorial design	111
3. Results and discussion	112
3.1 Influence of formulation and process parameters on microparticles properties	112
3.1.1. <i>Effect on microparticle size distributions</i>	113
3.1.2 <i>Effect on zeta potential</i>	119
3.1.3. <i>Formulation parameters effect on the drug encapsulation efficiency</i>	120

3.2. Optimization of microparticles preparation by experimental design	123
4. Conclusion	130
Bibliographie.....	131

CHAPITRE 3: MICROENCAPSULATION OF RIFAMPICIN FOR THE PREVENTION OF ENDOPHTHALMITIS: IN VITRO RELEASE STUDIES

CHAPITRE 3: MICROENCAPSULATION OF RIFAMPICIN FOR THE PREVENTION OF ENDOPHTHALMITIS: IN VITRO RELEASE STUDIES	133
Résumé.....	134
1. Introduction.....	139
2. Material and methods.....	140
2.1 Material	140
2.2 Methods	141
2.2.1 Preparation of microparticles.....	141
2.2.2 Particle size analysis	143
2.2.3 Yield of microparticles obtained and Rifampicin encapsulation efficiency....	143
2.2.4 In vitro drug release studies	144
2.2.5 Rifampicin quantification by HPLC analysis	145
2.2.6 Microscopic observations	146
3. Results and Discussion	146
3.1 Microparticle characterization	146
3.2 In vitro release profiles.....	149
4. Conclusion	157
Bibliographie.....	158

CHAPITRE 4 : STUDY OF ANTIBACTERIAL AND ANTIADHERENT ACTIVITY OF RIFAMPICIN MICROPARTICLES

CHAPITRE 4 : STUDY OF ANTIBACTERIAL AND ANTIADHERENT ACTIVITY OF RIFAMPICIN MICROPARTICLES	160
Résumé.....	161
1. Introduction.....	161
2. Material and Methods	167
2.1 Bacterial strain and Intraocular lenses	167
2.2 Rifampicin microparticles	167
2.3 Antibacterial activity of rifampicin microparticles	168
2.4 Bacterial adhesion evaluations	169
3. Results and discussion.....	170
3.1. Microparticle characterization	170
3.2. Evaluation of the antibacterial activity of rifampicin microparticles	170

3.3. Evaluation of the anti-adherence effect of rifampicin microparticles	174
4. Conclusion	177
Bibliographie.....	179
DISCUSSION GÉNÉRALE	181
CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES	201
Bibliographie.....	202

Introduction Générale

Les interventions de chirurgie ophtalmique sont en constante augmentation de nos jours, ce qui implique parallèlement des risques de contamination microbienne de plus en plus importants avec notamment une fréquence accrue des endophtalmies post-opératoires. Les endophtalmies post-opératoires représentent effectivement une des complications majeures de la chirurgie ophtalmique, comme les opérations de la cataracte, pouvant avoir de graves conséquences sur la l'intégrité physiologique de l'œil du patient. Le développement de traitements prophylactiques efficaces représente donc un enjeu majeur en ophtalmologie dans la prévention de l'endophtalmie post-chirurgicale.

La cataracte est une pathologie ophtalmique fréquente se traduisant par une opacification importante du cristallin de l'œil. Le traitement de la cataracte est essentiellement chirurgical par remplacement du cristallin par une lentille intraoculaire. Dans la majorité des cas de cataracte, l'opération donne de bons résultats et le patient retrouve une acuité visuelle optimale en quelques jours. Toutefois, des complications peuvent apparaître au cours de l'intervention chirurgicale comme une contamination intraoculaire par des microorganismes majoritairement d'origine bactérienne voire fongique, engendrant ainsi une endophtalmie dite postopératoire. Afin d'éviter ce type de complications, des traitements préventifs peuvent être mis en place comme des injections intraoculaires d'antibiotique nécessitant le maintien d'une concentration intra-ophtalmique en antibiotique supérieure à la concentration minimale inhibitrice (CMI) pendant au moins 24 heures. Plusieurs types d'antibiotiques peuvent être utilisés en prophylaxie comme la vancomycine, la ceftazidime, la gentamycine etc.,

Au cours de cette étude nous avons choisi d'utiliser la rifampicine pour

l'antibioprophylaxie de l'endophtalmie. Son utilisation dans le traitement prophylactique de l'endophtalmie post-chirurgicale peut être envisagée du fait qu'elle présente l'avantage d'être active sur les bactéries Gram positif et les bactéries Gram négatif. En effet, bien que la rifampicine soit surtout identifiée pour son utilisation dans le traitement des formes sévères de tuberculose ou autres infections à mycobactéries, elle est utilisée en traitement de deuxième intention de pathologies à bacilles Gram négatif ou à cocci Gram positif (entérocoques, staphylocoques...) résistants. Elle présente notamment une excellente activité bactéricide contre *Staphylococcus*, qui sont les germes prédominants dans l'endophtalmie post-chirurgicale. Comme la plupart des antibiotiques utilisés dans la prophylaxie de l'endophtalmie post-chirurgicale, tels que la vancomycine, la ceftazidime, etc., la rifampicine possède aussi des propriétés anti-adhérentes. Ces propriétés permettent ainsi d'éviter l'adhérence des bactéries incriminées sur les lentilles intraoculaires implantées lors des opérations de la cataracte.

Malgré cette efficacité son utilisation en antibioprophyllaxie de l'endophtalmie post-opératoire demeure à l'état d'étude car la rifampicine présente l'inconvénient d'être une molécule de couleur orange intense pouvant gêner la vision du patient et entraînant la coloration des tissus.

Par ailleurs, tous les antibiotiques utilisés à ce jour dans ce type de prophylaxie sont administrés en intravitréen sous forme de solution ou suspension classique. L'antibiotique est donc rapidement éliminé nécessitant des injections répétées. Afin de maintenir une concentration minimale bactéricide (CMB), des injections répétées sont donc nécessaires rendant ces traitements prophylactiques contraignants et douloureux. Compte tenu de la rapide élimination de l'antibiotique *in situ*, le développement de nouveaux systèmes galéniques pour l'administration prolongée d'antibiotique en intra-oculaire a donc été envisagé. Le travail qui sera développé au cours de cette

thèse consistera donc à mettre au point des microparticules polymères pour l'injection intraoculaire, renfermant la rifampicine, et capables de présenter une libération prolongée de l'antibiotique *in situ*. L'encapsulation de la rifampicine au sein des microparticules présentera ainsi plusieurs avantages : contrôler la libération de la rifampicine en maintenant des concentrations efficaces dans le vitré pendant plusieurs heures voire plusieurs jours, masquer sa coloration intense limitant ainsi la gêne occasionnée pour le patient et permettre aussi d'améliorer sa stabilité en suspension en la protégeant par l'encapsulation.

Toutefois, les microparticules devront présenter une taille adéquate suffisamment petite pour ne pas entraîner de gêne de la vision du patient mais suffisamment grosse pour éviter leur élimination trop rapide de l'œil.

Le présent manuscrit de thèse sera divisé en deux parties principales, elles-mêmes subdivisées en chapitre. La première partie, portera sur une étude bibliographique des travaux scientifiques réalisés antérieurement sur notamment la problématique de l'endophtalmie et de ses traitements ainsi que sur les moyens galéniques pouvant être mis en œuvre pour améliorer la biodisponibilité ophtalmique.

Deux chapitres seront ainsi développés au cours de cette première partie :

- Dans le premier chapitre seront présentées des généralités sur l'anatomophysiologie de l'œil et sera abordé l'endophtalmie et ses traitements.
- Dans le second chapitre, seront passés en revue différents systèmes galéniques innovants pouvant être mis en œuvre pour améliorer l'administration intra-ophtalmique des principes actifs.

Dans la seconde partie du manuscrit seront présentés les travaux expérimentaux réalisés au cours de la thèse, portant sur la mise au point de microparticules

biodégradables pour l'administration intra-ophtalmique de rifampicine. Cette partie sera elle-même divisé en quatre chapitres.

- Le premier chapitre portera sur le développement d'une technique d'amélioration du procédé d'encapsulation par émulsion-diffusion. Cette partie aura pour objet la mise au point d'une formulation de nanocapsules de rifampicine en utilisant la technique d'émulsion diffusion combinée à un traitement haute pression de l'émulsion afin d'entraîner la diffusion du solvant organique vers la phase externe. Cette technique permet d'éliminer le solvant organique sans avoir recours à l'étape de dilution, très consommatrice d'eau, généralement mise en œuvre lors d'une émulsion-diffusion conventionnelle. Cette première partie a fait l'objet d'une publication intitulée "*Development of a novel nanocapsule formulation by emulsion-diffusion combined with high hydrostatic pressure*" dans Journal of Microencapsulation en 2008.
- Le deuxième chapitre portera sur la mise au point de microparticules de rifampicine par émulsion-diffusion classique, à base d'un polymère biodégradable, le copolymère des acides lactique et glycolique ou PLGA. Dans ce chapitre seront abordés les différents paramètres de formulation et de procédé pouvant influencer les caractéristiques des microparticules de rifampicine. Cette étude sera conclue par la mise en place d'un plan d'expérience permettant ainsi d'optimiser les paramètres clefs de formulation afin d'obtenir des microparticules avec des propriétés maîtrisées.
- Le troisième chapitre consistera en l'étude du comportement *in-vitro* des microparticules de rifampicine. L'évaluation et le suivi de la libération de la

rifampicine à partir des microparticules sera réalisé *in vitro*. L'objectif étant de maîtriser la formulation des microparticules pour obtenir des cinétiques de libération optimales.

- Le quatrième chapitre portera sur l'évaluation de l'efficacité microbiologique des microparticules de rifampicine. L'effet bactéricide de la rifampicine encapsulée sera quantifié et comparé à une forme de référence non encapsulée, en incubant les microparticules avec une souche de *Staphylococcus epidermidis* reconnue comme étant une des pathogènes majeurs intervenant dans l'endophtalmie post-chirurgicale. L'activité anti-adhérente de la rifampicine encapsulée sur des lentilles intraoculaires sera parallèlement étudiée.

Enfin ce manuscrit se terminera par une discussion générale et une conclusion et perspectives.

PARTIE 1

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

PARTIE 1

CHAPITRE 1

ANATOMIE ET PHYSIOLOGIE DE L'ŒIL - ENDOPHTHALMIE POST OPERATOIRE

Introduction

De nos jours, les interventions de chirurgie ophtalmique sont en constante augmentation engendrant de façon concomitante une hausse non négligeable des complications postopératoires. Notamment une des complications majeures de l'opération de la cataracte est l'endophtalmie dite post-chirurgicale. Il s'agit d'une infection microbienne accompagnée d'un syndrome inflammatoire due à la contamination du vitré par des bactéries d'origine exogènes. La lutte contre ce type de complications post-chirurgicales passe donc par l'administration d'une antibioprophylaxie avant, pendant et parfois après l'opération. L'utilisation de nombreux antibiotiques a été décrite en application locale, intravitréenne ou systémique. Parmi ces antibiotiques la rifampicine apparait comme un très bon candidat en prophylaxie du fait de ces propriétés bactéricides très marquées vis-à-vis du genre *Staphylococcus*, très largement incriminé dans la survenue des endophtalmies.

Néanmoins à l'heure actuelle, l'antibioprophylaxie nécessite des injections intraoculaires d'antibiotique répétées et douloureuses pour le patient. L'élaboration d'un système d'administration permettant d'obtenir une libération prolongée d'antibiotique dans l'œil après une seule injection intraoculaire serait donc un progrès certain aussi bien sur le plan de l'efficacité de l'antibioprophylaxie et que pour le confort du malade.

Devant cette problématique, l'objectif de cette première partie du manuscrit, sera de faire un état des lieux bibliographiques sur les différentes formes d'endophtalmie existantes et leur traitement, mais aussi de s'intéresser aux formes galéniques innovantes pour l'administration ophtalmique. Cette partie bibliographique se découpera donc en deux chapitres:

- Un premier chapitre présentant d'une part, des généralités sur l'œil et son anatomie et d'autre part, une description plus précise des endophtalmies et de leur traitement en développant plus particulièrement la rifampicine.
- Un second chapitre reprendra différentes études portant sur le développement de systèmes d'administration de principes actifs innovants pour la voie ophtalmique.

1. L'anatomie de l'œil

L'œil est l'organe récepteur de la vision. Toutes ses structures sont destinées à favoriser la formation des images sur la rétine placée au-devant des prolongements du cerveau que sont les nerfs optiques. Par l'intermédiaire de ceux-ci et des relais intracérébraux, les impressions lumineuses sont transmises aux centres corticaux de la vision. L'animation des deux yeux doit se faire dans un synchronisme rigoureux afin de créer les conditions de la vision binoculaire [1].

Le globe oculaire est une sphère d'environ 24 mm de diamètre, d'environ 7g et d'un volume de 6,5 cm³. Il est séparé latéralement des parois osseuses de l'orbite par un matelas graisseux, beaucoup plus épais dans sa partie interne qu'externe. C'est dans cet environnement que se développent vaisseaux et nerfs oculo-orbitaires [2].

L'œil est principalement constitué de trois enveloppes: la sclérotique, l'uvée, et la rétine [3].

Les trois enveloppes constitutives de l'œil sont concentriques et formées de l'extérieur vers l'intérieur du globe oculaire:

- Une tunique fibreuse externe; sclère et cornée
- Une tunique vasculaire moyenne; choroïde, corps ciliaire et iris
- Une tunique interne; la rétine, qui comprend une partie optique et une partie non visuelle [4].

Ces différents aspects physiologiques de l'œil sont représentés en figure 1 [5].

Des milieux transparents constituent le contenu du globe oculaire avec notamment l'humeur aqueuse, entre la cornée et l'iris, le cristallin derrière l'iris, et enfin le corps

vitré dans la partie postérieure de l'œil.

Ces différentes structures sont usuellement réparties en deux zones: le segment antérieur formé notamment de la cornée, l'iris, le cristallin et l'humeur aqueuse, et le segment postérieur formé par la sclérotique, la choroïde, la rétine et le corps vitré.

Figure 1. Schéma illustrant l'anatomie de l'œil

1.1 Le segment antérieur

Le segment antérieur représente la partie avant du globe oculaire formé par la cornée, l'iris, le cristallin, l'angle irido-cornéen, le corps ciliaire et l'humeur aqueuse.

1.1.1 La cornée

Elle se présente comme une calotte transparente enchâssée dans l'ouverture antérieure de la sclérotique, comme un "hublot". Son épaisseur est de 0.5 mm environ au centre, 1 mm en périphérie et son diamètre moyen de 11,5 à 12 mm. La cornée est

caractérisée par ses rayons de courbure antérieurs et postérieurs. Des variations anormales du rayon de courbure antérieur engendrent les phénomènes d'astigmatie.

La cornée est avasculaire, richement innervée. Elle est reliée à la sclérotique par le limbe scléro-cornéen, recouvert en arrière par les constituants de l'angle irido-cornéen [6].

1.1.2 L'iris

Diaphragme circulaire situé dans un plan frontal, il est relié au bord antérieur du corps ciliaire par la racine de l'iris. Au centre il est perforé par la pupille. L'iris est séparé de la cornée en avant par l'angle irido-cornéen et en arrière du vitré par l'angle irido-ciliaire. En avant de l'iris, l'œil est rempli d'un liquide transparent, l'humeur aqueuse. L'iris divise ainsi en deux parties cette région précristallinienne : la chambre antérieure en avant de l'iris renfermant un liquide transparent, l'humeur aqueuse et la chambre postérieure en arrière de l'iris [3].

La pupille est un orifice mobile de petit diamètre à la vive lumière et de grand diamètre à l'obscurité. Deux muscles lisses animent cette pupille : le sphincter entourant comme un bandeau circulaire l'orifice pupillaire (innervé par le système nerveux parasympathique) et le dilateur, muscle plat, innervé par le système sympathique. La vascularisation de l'iris est assurée par des artères radiales issues du grand cercle artériel de l'iris. Des veines symétriques rejoignent les veines ciliaires et choroïdiennes.

1.1.3 Le cristallin

Lentille biconvexe placée dans un plan frontal derrière l'iris, le cristallin est centré sur la pupille et se situe devant le corps vitré. Il est ni vascularisé, ni innervé, et les échanges se font par diffusion. Sa nutrition dépend donc du milieu ambiant dans lequel il est inséré et dont il subit les modifications pathologiques [3].

Appareil optique capital, dont les modifications morphologiques conditionnent l'accommodation, son diamètre est d'environ 10 mm et son épaisseur de 5 mm. Ses courbures antérieure et postérieure sont différentes. Il est maintenu en place par un ligament suspenseur ou zonule de Zinn, constitué de fines fibrilles reliant l'équateur du cristallin au corps ciliaire. Le corps du cristallin est constitué par des cellules longues et transparentes disposées dans une architecture très précise autour d'un noyau central. Un épithélium antérieur se poursuit par une zone équatoriale dite germinative qui entretient la croissance du cristallin. L'ensemble est entouré d'une capsule. Les modifications de courbure du cristallin se font par tension ou relâchement de la zonule ciliaire qui se répercute sur la capsule, gonflant le cristallin dont la puissance se trouve ainsi accrue. L'accommodation se trouve limitée avec l'âge. L'altération de la transparence des cellules cristalliniennes engendre la cataracte [1].

1.1.4 La chambre antérieure et l'humeur aqueuse

La chambre antérieure constitue l'espace compris entre la face postérieure de la cornée et la face antérieure de l'iris et du cristallin [1]. La chambre antérieure est plus ou moins profonde, entre 3 et 4 mm au devant de la pupille dans les cas normaux. Elle est plus profonde chez le myope et plus étroite chez l'hypermétrope. Elle contient l'humeur aqueuse sécrétée au niveau du corps ciliaire, par les procès ciliaires, dans la chambre postérieure et écoulee dans la chambre antérieure au travers de la pupille, pour être éliminée au niveau de l'angle iridocornéen.

L'humeur aqueuse est un liquide nourricier entièrement limpide, de faible viscosité, d'une densité de 1,33 et occupant un volume de 0,15 mL [7] dans la chambre antérieure et de 0,06 ml dans la chambre postérieure. Sa pression osmotique équilibrée en fait l'élément régulateur de la pression oculaire (15 mm Hg). Le pH de 7.38 (la cornée tolère des osmolarités de 200 à 400 mosm/l et des pH de 6.8 à 8.2).

L'humeur aqueuse joue un rôle optique, mais aussi nutritionnel et métabolique pour la cornée ou le cristallin. Sa composition chimique est décrite dans le tableau 1 [8, 9].

Tableau 1 Composition chimique de l'humeur aqueuse

Constituants		Concentrations
1. Eau		99%
2. Protéines		teneur faible: 5 à 16 mg/100 ml
3. Substances non électrolytiques	Glucose	0,50 à 0,75 g/l
	Urée, créatinine, acide urique	Concentrations égales aux concentrations sériques
	Acides aminés	Concentrations plus faibles que dans le sang
	Acides ascorbique, lactique et hyaluronique	Concentrations supérieures aux concentrations sériques
4. Substances électrolytiques	Sodium (bicarbonate et chlorure)	Taux sériques
	Calcium, potassium, Phosphates	
5. Enzymes		surtout l'anhydrase carbonique, la hyaluronidase

1.1.5 L'angle irido-cornéen

Il est situé dans l'angle de jonction entre le limbe scléro-cornéen et l'iris. C'est une zone de constitution complexe par où l'humeur aqueuse est évacuée hors du globe, selon des conditions qui s'équilibrent avec la sécrétion. L'angle irido-cornéen est constitué, du centre vers la périphérie, de plusieurs couches constituant le trabeculum, filtre microscopique que traverse l'humeur aqueuse pour être finalement drainée par le canal de Schlem, ou sinus veineux intra-scléral. L'ensemble permet l'évacuation de l'humeur aqueuse vers la circulation sanguine via les veines ciliaires antérieures. 2 à 3 μ L d'humeur aqueuse sont éliminés par minute. L'obstruction de ce canal sera donc à l'origine de pathologie comme le glaucome [10].

1.1.6 Le corps ciliaire

Il fait partie, avec l'iris, de l'uvée antérieure. C'est un ruban d'environ 2 mm de largeur. Deux particularités anatomiques caractérisent le corps ciliaire [3]:

- Ses muscles lisses : leur contraction entraîne la diminution de la tension des fibres zonulaires et augmentent alors la courbure du cristallin. L'innervation est assurée par les nerfs ciliaires courts issus du moteur oculaire commun.
- Ses procès ciliaires : sortes de petites glandes situées en arrière de l'iris à l'origine de l'humeur aqueuse. La production de l'humeur aqueuse s'effectue au travers de cet épithélium ciliaire, à partir du sérum sanguin extravasé des capillaires des procès.

Toute augmentation du débit peut entraîner une hypertonie oculaire. L'atteinte étendue du corps ciliaire peut engendrer une hypotonie, voire une atrophie du globe.

1.2 Le segment postérieur

Le segment postérieur représente la partie du globe oculaire formée de la sclérotique, la choroïde, la rétine et l'humeur vitrée.

1.2.1 La sclérotique

La sclérotique (ou sclère) est une membrane blanche relativement épaisse (1 à 1.35 mm) et très résistante. Elle constitue le "blanc de l'œil" et a un rôle essentiellement de protection. Constituée de tissu conjonctif, elle est peu innervée, peu vascularisée [3]. La sclérotique forme les 5/6 postérieurs du globe oculaire, le 1/6 antérieur étant représenté par la cornée. Dans sa partie antérieure, elle est recouverte par la conjonctive. Sur sa face externe s'insèrent les six muscles oculomoteurs. La

sclère est perforée de nombreux orifices, dont notamment, dans sa partie postérieure, la papille [11, 12].

1.2.2 La papille

La papille optique est située au niveau du pôle postérieur du globe, d'où sortent les fibres optiques, elle représente la portion intraoculaire du nerf optique, lieu de regroupement des terminaisons nerveuses des cellules rétinienne. Elle apparaît comme un disque ovalaire à grand axe vertical d'environ 1,5 à 2 mm de diamètre. La papille occupe le canal scléro-choroïdien qui se termine par la lame criblée. Les fibres optiques la traversent par des orifices à la sortie desquels elles se recouvrent de myéline pour former le nerf optique naissant au niveau de la lame criblée. La papille est aussi traversée par l'artère et la veine centrales de la rétine [13].

1.2.3 La choroïde

La choroïde correspond à l'uvée postérieure. C'est une lame de tissu conjonctif située immédiatement sous la sclérotique. Elle est pigmentée et très vascularisée. Son rôle essentiel est d'assurer l'irrigation vasculaire et nerveuse de l'iris et des cellules photo-réceptrices de la rétine. Elle a un véritable rôle de membrane nourricière. Elle constitue aussi un écran opaque à l'intérieur de la paroi oculaire. La choroïde se prolonge en avant par le corps ciliaire au niveau de l'ora serrata, et en arrière se termine autour de la papille [12].

La face interne de la choroïde adhère étroitement à la face externe de la rétine (au niveau de l'épithélium pigmentaire) par la lame de Bruch. Grâce à la choriocapillaire, véritable sous-sol vasculaire de la rétine, la choroïde permet d'assurer la nutrition des couches externes de la rétine, les couches internes étant dépendantes de l'artère centrale de la rétine. Le drainage de la choriocapillaire se fait par quatre veines

vortiqueuses gagnant à leur tour les veines ophtalmiques supérieure et inférieure, puis le sinus caverneux.

Lors d'un décollement de la rétine, l'épithélium pigmentaire de la rétine reste appliqué sur la choroïde, tandis que l'épithélium sensoriel se soulève. Cela explique la perte de vision dans la portion de la rétine décollée dont les couches externes (cônes et bâtonnets) sont alors privées de leur nutrition et de leur écran pigmentaire. Par ailleurs, le système vasculaire choroïdien est doublé d'un système d'innervation très riche.

1.2.4 La rétine

Tunique profonde de l'œil, la rétine est un tissu neurosensoriel, destiné à recevoir les impressions lumineuses et à les transmettre au cerveau via le nerf optique. Elle est constituée de deux couches embryologiquement distinctes : l'épithélium pigmentaire dans sa partie externe et la rétine neurosensorielle, sur sa face interne.

La rétine est donc une structure nerveuse constituée de neurones et de cellules gliales. Sa densité cellulaire et son aspect varient selon les zones (centrale ou périphérique).

La rétine est doublement vascularisée, par le choriocapillaire comme décrit précédemment mais aussi par son système artériel propre issu de l'artère centrale de la rétine [12].

Deux grandes zones de la rétine peuvent être identifiées : la rétine centrale et la rétine périphérique [14].

La rétine centrale est une zone de 5 à 6 mm de diamètre située au niveau du pôle postérieur du globe oculaire. Elle comprend notamment la région maculaire. La macula apparaît sous forme d'une tache jaune contenant en son centre la fovéa elle-même constituée d'une partie centrale nommée la fovéola. C'est à ce niveau que se réalise la vision fine.

La rétine périphérique est quant à elle divisée en quatre zones : la périphérie proche

au contact du pôle postérieur, la périphérie moyenne, la périphérie éloignée et enfin l'ora serrata ou extrême périphérie.

1.2.6 L'humeur vitrée

Totalement transparente, l'humeur vitrée, ou corps vitré ou vitré, forme une sorte de gel remplissant les 3/7 du globe ophtalmique (4 mL), entre le cristallin et la rétine. Le vitré est un lieu d'échange avec les structures environnantes comme la rétine, la choroïde, le corps ciliaire ou encore le cristallin. Elle a chez le sujet jeune une consistance visqueuse et relativement dense. Elle se liquéfie avec l'âge. La composition chimique du vitré est décrite dans le tableau 2 [8].

Le corps vitré est entouré d'une fine membrane hyaloïde, qui prend des adhérences avec la face postérieure du cristallin, l'espace péripapillaire et l'ora serrata [2].

Tableau 2 Composition chimique de l'humeur vitrée

Constituants		Concentrations
1. Eau		99%
2. Electrolytes	sodium, potassium, calcium, chlore	concentrations comparables à celles de l'humeur aqueuse
3. Substances non électrolytiques	Protéines	pauvre en globulines, riche en glycoprotéines
	acides aminés	inférieurs aux taux sériques
	Lipides	en faibles quantités
	glucides dont glucose	moitié des taux de l'humeur aqueuse
	acide lactique, acide pyruvique, acide hyaluronique	en faibles quantités

2. L'endophtalmie

2.1 Définition

L'endophtalmie est une inflammation intraoculaire chronique d'origine infectieuse ou immunologique. Au sens strict du terme, toute inflammation intraoculaire est une endophtalmie mais, en pratique, on se réfère à une inflammation d'origine microbienne portant également sur le corps vitré. En revanche, on ne peut concevoir de vitrite isolée, sans participation des autres structures intra-oculaires car la chambre postérieure est avasculaire [13]. L'endophtalmie est communément d'origine exogène et fait notamment partie des complications de la chirurgie intraoculaire ou de la chirurgie réfractive (endophtalmie post-chirurgicale). Elle peut aussi faire suite à l'enlèvement de sutures après l'opération de la cataracte ou après une greffe de cornée. De plus, l'endophtalmie peut être engendrée par la pénétration d'objets extérieurs lors de blessure à l'œil (endophtalmie traumatique). Enfin, certains cas d'endophtalmie peuvent être issus d'une contamination via des fluides d'irrigation.

Les organismes pathogènes peuvent induire une infection chronique. Le risque d'infection est réduit par la préparation préopératoire attentive et l'utilisation de la povidone iodée, immédiatement avant ou après la chirurgie [15].

2.2 Classification des endophtalmies

2.2.1. Endophtalmie post-traumatique

L'endophtalmie post-traumatique est une complication infectieuse et inflammatoire des plaies pénétrantes oculaires [16]. Les traumatismes oculaires sont classés en 2

catégories, soit une blessure dite à globe fermé soit une blessure à globe ouvert. Une blessure à globe ouvert est due soit à une lacération pleine épaisseur de la cornée et / ou de la sclérotique, soit à une perforation [17].

2.2.1.1 Signes cliniques

Les signes cliniques de l'endophtalmie post-traumatique peuvent se manifester sous forme de douleurs, d'une photophobie et d'une diminution de l'acuité visuelle, des semaines voire des mois ou années après une plaie pénétrante à l'œil. La douleur est souvent aggravée par les mouvements oculaires. Ces symptômes sont souvent accompagnés d'une uvéite antérieure, d'hypopion (pus localisé dans la partie inférieure de la chambre antérieure) et d'une inflammation du vitré. L'endophtalmie peut aussi engendrer un œdème palpébral, un chémosis (gonflement œdémateux de la conjonctive), un œdème et une infiltration de la cornée, des hémorragies et une périphlébite rétinienne [17].

2.2.1.2 Conduite à tenir

Les facteurs de risque comprennent la rétention d'un corps étranger avec retard au diagnostic après la blessure oculaire. Après la prise en charge initiale de la plaie, des cultures de l'humeur aqueuse et du vitré sont pratiquées [18].

Si l'endophtalmie est suspectée, l'usage d'antibiotiques en injection intra-vitréenne sera envisagé comme la vancomycine (10 mg/ml) et l'amikacine (4 mg/ml) ou la ceftazidime (22,5 mg/ml). L'usage en routine d'antibiotiques intra-vitréens dans les plaies pénétrantes est cependant controversé, et l'usage d'antibiotiques locaux sera préféré.

Les genres *Staphylococcus*, *Streptococcus* et *Bacillus* sont les plus fréquemment isolés. Les *Bacillus* provenant d'une contamination tellurique présentent l'évolution la plus rapide et un mauvais pronostic. La vitrectomie, c'est à dire le retrait du vitré, est

indiquée en cas de persistance du corps étranger ou d'infection fulminante.

2.2.2. Endophtalmie post-chirurgicale

L'endophtalmie post-opératoire est une des complications majeures des opérations chirurgicales ophtalmiques comme notamment l'opération de la cataracte, au cours de laquelle l'implantation d'une lentille intraoculaire peut être source d'une contamination microbienne aigüe. Le fréquence des endophtalmies post-opératoires varie de 0,07% à 0,13% [19-21]. Le majorité de ces infections est d'origine bactérienne. La survenue d'endophtalmies fongiques après opération de la cataracte est rare. Cependant, les endophtalmies fongiques surviennent le plus souvent dans les pays en voie de développement [22].

2.2.2.1 Signes Cliniques

Lors d'une endophtalmie post-opératoire, l'inflammation oculaire est très importante, débutant habituellement dans la première semaine suivant l'opération. Dans la plupart des cas la douleur est intense. On retrouve une uvéite antérieure, souvent un hypopion, et une inflammation du vitré. Il peut aussi y avoir un œdème et un érythème palpébral, un chémosis, un œdème et une infiltration de la cornée, une périphlébite et des hémorragies de la rétine.

2.2.2.2 Diagnostic différentiel

Un diagnostic différentiel doit être envisagé notamment pour les endophtalmies toxiques présentant une inflammation entre 1 et 4 jours après l'intervention chirurgicale. Elles sont généralement dues à une rétention de matériel cristallinien, de corps étranger ou d'agents chimiques iatrogènes. De plus, les endophtalmies idiopathiques avec une réponse inflammatoire excessive chez certains individus, due au traumatisme

chirurgical, devront être écartées.

2.2.2.3 Conduite à tenir

Il est à noter que les sujets diabétiques ou immunodéprimés sont prédisposés à ce type de complications post-chirurgicales. Près de 70% des cultures du vitré ou de l'humeur aqueuse sont positives, avec par ordre de fréquence *S. Epidermidis*, *S. aureus*, puis les bacilles Gram négatif, comme *Serratia marcescens*, et les genres *Proteus* et *Pseudomonas* [23, 24].

Une évolution rapide de l'endophtalmie est de mauvais pronostic. En revanche, certaines endophtalmies à bas bruit, causées par *Propionibacterium acnes* ont pu être diagnostiquées jusqu'à un an après l'acte chirurgical [13]. D'autres endophtalmies tardives liées à des blebs après trabéculéctomie, ont également été signalées après plusieurs mois ou années, un cas a même été rapporté plus de 60 ans après la chirurgie. La plupart de ces cas sont causés par *Staphylococcus*, *Haemophilus influenzae* et *Streptococcus*. Dans tous les cas le pronostic est mauvais.

Lors de suspicion d'endophtalmie post-chirurgicale la démarche à suivre sera la suivante :

- Prendre un échantillon d'humeur aqueuse et faire une biopsie du vitré si l'œil a une vision supérieure à la simple perception lumineuse.
- Administration d'antibiotiques en intra-vitréen: vancomycine (10 mg/ml) et amikacine (4 mg/ml) ou ceftazidime (22,5 mg/1 ml).
- Antibiotiques sous-conjonctivaux: vancomycine (50 mg/ml) et ceftazidime (200 mg/ml) ou amikacine (50 mg/ml).
- Antibiotiques locaux: vancomycine (50 mg/ml) et amikacine (20 mg/ml) en alternance toutes les 1 à 4 heures.
- Corticoïdes: locaux, sous-conjonctivaux (dexaméthasone, 24 mg/ml) ou oraux

(prednisone, 30 mg 2 fois par jour pendant 5 à 10 jours), ou intra-vitréens (controversé).

- Agents cycloplégiques en administration topique

Les antibiotiques en administration intra-veineuse ou per os n'ont pas d'influence sur l'évolution.

Enfin, la vitrectomie par la pars plana (PPV) pourra être envisagée dans les cas s'accompagnant d'une perte importante de l'acuité visuelle (simple perception lumineuse ou moins), permettant ainsi d'améliorer considérablement le pronostic visuel.

2.2.3. Endophtalmie endogène

Il s'agit d'une forme d'endophtalmie rare représentant 2 à 8% des cas d'endophtalmie décrits. L'endophtalmie endogène est une infection oculaire d'origine septicémique survenant généralement chez les patients immunodéprimés [25, 26]. Les facteurs prédisposants sont: les perfusions intraveineuses à long terme, la nutrition parentérale, la chirurgie abdominale ou gynécologique, l'alcoolisme, l'abus de drogue, la grossesse...[27]. Les traitements immunosuppresseurs invasifs, les antibiotiques à large spectre, les corticoïdes, les antimétabolites, les déficits immunitaires et les maladies chroniques comme le diabète, les cancers, l'insuffisance rénale, les maladies cardio-vasculaires sont des facteurs prédisposants.

2.2.3.1 Signes cliniques

Il existe un large éventail de présentation initiale, soit une forme focale (antérieure et/ou postérieure), soit une panophtalmie avec baisse de l'acuité visuelle et présence de corps flottants qui sont des éléments fibrillaires apparaissant dans le vitré.

De nombreux signes cliniques peuvent se manifester lors d'une endophtalmie endogène comme : une inflammation de l'humeur aqueuse et du vitré, un hypopion,

une opacification de la cornée, des nodules blancs de l'iris, de la choroïde ou de la rétine, des hémorragies rétinienne à centre blanc, une occlusion vasculaire rétinienne, un œdème péri-orbitaire, une exophtalmie et une diminution de la motilité oculaire. Lors d'une infection mycosique des lésions rétinienne jaune-blanches à bordures duveteuses envahissant parfois le vitré, peuvent apparaître.

2.2.3.2 Conduite à tenir

Les microorganismes à l'origine de l'endophtalmie endogène sont généralement des bactéries ou des champignons. Les bactéries isolées incluent communément les *Streptococcus*, les *Staphylococcus*, *Listeria monocytogenes*, les Clostridia, les bacilles comme *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Serratia marescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Neisseria meningitidis*, les actinobacilles, les *Salmonella*, les *Proteus*, *Nocardia asteroides* et *Mycobacterium tuberculosis* (Tableau 3) [28].

Les champignons les plus souvent isolés sont les *Candida* (75% des cas de mycose) mais peuvent aussi être rencontrés *Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Sporotrichum schenckii*, *Blastomyces dermatidis*...

La prise en charge comprend:

- Des cultures d'humeur aqueuse, de vitré, de sang, et d'urines.
- L'administration d'antibiotiques ou d'antifongiques en intraveineux ou *per os*, de préférence adaptés aux microorganismes suspectés.
- L'administration d'antibiotiques intravitréens comme la vancomycine (10 mg/ml) et l'amikacine (4 mg/ml) ou la ceftazidime (22,5 mg/ml).
- Des antibiotiques ou antifongiques topiques peuvent être utilisés.
- L'utilisation des cycloplégiques est également recommandée.

Le pronostic global dépend de la virulence de l'agent mis en cause; des facteurs de

morbidité du patient et du délai de traitement. La vitrectomie est controversée et dépend de l'évolution globale [29].

Tableau 3 Les germes isolés à partir de ponctions de la chambre antérieure (PCA) et du vitré.

	PCA	Vitré	Total
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	34	5	39
<i>Staphylococcus aureus</i>	3	1	4
<i>Staphylococcus warneri</i>	2	1	3
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	2	-	2
<i>Staphylococcus capitis</i>	1	-	1
<i>Staphylococcus chromogenes</i>	1	-	1
<i>Staphylococcus hominis</i>	-	1	1
<i>Streptocoque sp.</i>	4	1	5
<i>Streptocoque groupe C</i>	2	-	2
<i>Streptocoque groupe D</i>	2	-	2
<i>Streptocoque groupe G</i>	-	1	1
<i>Streptococcus oralis</i>	2	-	2
<i>Streptococcus sanguis</i>	1	-	1
<i>Streptococcus salivarius</i>	1	-	1
<i>Enterococcus faecalis</i>	1	-	1
<i>Propionibacterium acnes</i>	3	3	6
<i>Bacillus circulans</i>	2	-	2
<i>Bacillus subtilis</i>	1	-	1
<i>Bacillus sphaericus</i>	1	-	1
<i>Actinomyces naeslundii</i>	1	-	1
<i>Corynebacterium minutissimum</i>	1	-	1
<i>Corynebactérie groupe A</i>	-	1	1
<i>Corynebactérie ANF</i>	-	1	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5	-	5
<i>Xanthomonas maltophilia</i>	1	-	1
<i>Acinetobacter Iwoffii</i>	1	-	1
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1	-	1
<i>Candida parapsilopsis</i>	1	-	1
<i>Candida albicans</i>	-	4	4
Total	74	19	93

2.3 Etiologie des endophtalmies

Les microorganismes les plus fréquemment mis en cause dans le développement de l'endophtalmie post-opératoire sont présentés dans les tableaux 4 et 5. Une étude réalisée par Salvanet-Bouccara *et al.* [30] , a permis de montrer que 65% des cas d'endophtalmie étaient dus à des bactéries gram positif (majoritairement *Staphylococcus epidermidis*, dans 28% des cas) et que seulement 24% des cas étaient issus de contamination par des germes gram négatif.

Tableau 4 Répartition des 65% de germes Gram positif impliqués dans les endophtalmies

Germes	Incidence
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	28%
<i>Staphylococcus aureus</i>	13%
<i>Streptococcus</i>	12%
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	2%
<i>Autres</i>	10%

Tableau 5 Répartition des 24% de germes Gram négatif impliqués dans les endophtalmies

Germes	Incidence
<i>Pseudomonas</i>	5%
<i>Proteus</i>	6%
<i>Haemophilus</i>	3%
<i>Escherichia</i>	1,5%
<i>Autres</i>	8,5%

Le corps vitré contenant peu de cellules (hyalocytes), il ne peut survenir une inflammation de corps vitré que si des cellules inflammatoires pénètrent dans la chambre postérieure à partir de l'uvée ou des vaisseaux réiniens.

Les mécanismes entrant en jeu sont les suivants:

Des germes pathogènes (bactéries, champignons ou virus) pénètrent dans la chambre postérieure soit par contamination (par une plaie pénétrante ou une intervention intra-oculaire invasive par exemple), soit par envahissement septique métastatique. L'infection peut être aiguë, subaiguë ou chronique, en fonction de la virulence des germes et du statut immunitaire du patient. Les infections bactériennes sont beaucoup plus fréquentes que les infections virales ou mycosiques. Cependant chez l'immunodéprimé, les endophtalmies sont souvent dues à des contaminations métastatiques et elles sont alors plus mycosiques (endophtalmie mycosique). Les germes sont alors souvent de l'espèce *Candida*.

Des processus inflammatoires (microbiens ou autoimmuns) des structures adjacentes au corps vitré, comme des uvéites ou des rétinites, peuvent déclencher une réaction secondaire du vitré.

2.4 Traitements de l'endophtalmie

Le traitement des inflammations d'origine infectieuse repose sur l'antibiothérapie intravitréenne, topique ou systémique, si possible adaptée au germe isolé. L'endophtalmie mycosique est habituellement traitée par l'amphotéricine B et des corticoïdes. La vitrectomie en première intention est une éventualité dont les indications restent à préciser.

Les réactions du vitré secondaires à une rétinite ou une uvéite sous-jacente répondent au traitement de la cause.

2.4.1 Antibiothérapies – Traitement curatif

Le but d'un traitement anti-infectieux est d'obtenir sur les lieux de l'infection une concentration en principe actif supérieure à la concentration minimale inhibitrice (CMI) de 90% des germes à traiter (CMI₉₀) [31]. Le choix de l'antibiotique ou de l'association d'antibiotiques dépend du germe à détruire (bactéricide) ou à inhiber (bactériostatique), mais aussi des facteurs pharmacodynamiques de la molécule et, surtout, de la localisation de l'infection : on ne traite pas de la même manière une infection des tuniques superficielles de l'œil et une endophtalmie. La voie d'administration d'un antibiotique sera fonction de l'atteinte infectieuse et de sa localisation notamment intraoculaire (endophtalmie); l'œil représentant un milieu clos difficilement accessible aux antibiotiques. Le traitement d'une endophtalmie pourra se faire par injection intravitréenne accompagnée d'une antibiothérapie systémique.

Les antibiotiques ne doivent pas être toxiques, notamment pour les structures oculaires fragiles que sont la cornée, le cristallin et la rétine. En cas de résistance aux antibiotiques, la prescription de plusieurs antibiotiques sera préconisée. Les antibiotiques qui ont la même structure chimique de base possèdent généralement le même mécanisme d'action antibactérien. Il est donc inutile de prescrire une association de deux antibiotiques de la même classe [32].

Les antibiotiques agissent suivant leur spectre d'action:

- spectre large touchant la majorité des germes Gram positif et Gram négatif
- spectre étroit touchant soit les germes Gram positif, soit les germes Gram négatif
- spectre très étroit touchant une seule bactérie.

Quant aux doses, il faut frapper fort et suffisamment longtemps. Néanmoins il faudra tenir compte du terrain: âge du patient, trouble hépatique, trouble rénal, femme enceinte. La plupart des doses indiquées s'adresse à un adulte sans complication particulière. Les différentes catégories d'antibiotiques utilisées sont présentées dans le tableau 6 en fonction de leur spectre d'action.

Tableau 6 Classification des antibiotiques en fonction de leur spectre d'action [31]

Spectre d'action	Antibiotiques
AB large spectre	Beta-lactamines Tétracyclines Phénicolés Rifamycines Phosphoniques: fosfomycine Aminosides
AB spectre moyen	Macrolides: érythromycine, spiramycine Fusidamines: fucidine Glycopeptides: vancomycine
AB spectre étroit :	Lincosanides: lincocine, dalacine Peptolides: polymyxine B, colimycine
AB synthétiques	Dapsone Sulfmides Quinolones: 1 ^{er} , 2 ^e , 3 ^e génération
Antituberculeux	Rifampicine, isoniazide, éthambutol

La prise en charge doit être rapide en administrant au patient un traitement antibiotique adapté. Avant les résultats du prélèvement bactériologique, les antibiotiques prescrits seront à large spectre. Il faudra donc envisager un traitement antibiotique en tenant compte des données épidémiologiques : environ 95% des cas d'endophtalmies sont dus à des germes Gram positif dont 70% de *Staphylococcus epidermidis* [33]. Selon une étude américaine conduite en 1996 [23], la majorité de ces germes Gram positif mis en cause sont sensibles à la vancomycine. L'injection intravitréenne de vancomycine demeure donc le traitement de première intention. Toutefois, cette

dernière sera souvent associée à un autre antibiotique actif sur les bactéries gram négatif dont l'incidence est plus faible mais de pronostic plus sévère (amikacine, ceftazidime...) [34]. Une bithérapie est donc préconisée mais compte-tenu de la toxicité rétinienne de certains antibiotiques le nombre d'injections devra être limité : une injection quotidienne pendant 3 jours en traitement d'attaque, suivie d'une injection hebdomadaire durant 2 semaines [35].

Une antibiothérapie systémique sera généralement associée aux injections intraoculaires. De même les antibiotiques administrés par voie intraveineuse devront avoir une très bonne activité sur *Staphylococcus* mais ils devront de plus avoir une bonne pénétration intraoculaire. Les fluoroquinolones (ciporfloxacin, oxacilline...), la fosfomycine ou encore l'imipénème, généralement utilisées en bithérapie pour éviter les résistances, font partie des traitements de choix pour la voie systémique [29]. Ensuite, selon les résultats de l'antibiogramme, le traitement antibiotique sera adapté aux germes mis en cause.

L'utilisation d'une corticothérapie intraoculaire en plus de l'antibiothérapie a aussi pu montrer un bénéfice incontestable sur l'évolution du syndrome inflammatoire aiguë associé à l'endophtalmie [36]. Une injection de dexaméthasone en intravitréen sera généralement faite en même temps que l'antibiotique et sera suivie d'une injection intraveineuse de corticoïdes dès le deuxième jour.

2.4.2 Les traitements prophylactiques des infections ophtalmiques postopératoires

Les infections postopératoires sont dues à une contamination aiguë par des microorganismes exogènes de diverses provenances: le patient lui-même, le chirurgien,

le matériel chirurgical, les implants, les solutions d'irrigation, etc. La chirurgie ophtalmique doit donc être extrêmement minutieuse afin d'éviter tout risque de contamination intraoculaire par des pathogènes.

Plusieurs moyens peuvent être mis en œuvre afin de prévenir les risques d'infection lors d'une chirurgie intraoculaire, en assurant par exemple l'asepsie des mains, des instruments, des champs opératoires, et en administrant au patient des antiseptiques locaux au niveau du cul de sac conjonctival [37]. De plus, une antibioprophylaxie du patient sera très souvent mise en place avant, pendant et/ou après la chirurgie. Plusieurs types d'antibiotique seront utilisés en administration topique, sous-conjonctivale, intra-oculaire ou systémique.

La première prophylaxie à mettre en place sera donc la désinfection du cul de sac conjonctival à l'aide d'une solution de polyvidone iodée (PVP) diluée (Bétadine®) à 5% permettant de réduire la flore conjonctivale et de diminuer ainsi les contaminations par des microorganismes exogènes [38, 39].

En plus de l'application locale d'un antiseptique, une antibioprophylaxie sera mise en place par voie topique, intravitréenne ou systémique.

✓ **Antibioprophylaxie par voie topique**

L'utilisation de différentes classes d'antibiotiques en application ophtalmique locale a été envisagée. L'administration topique de quinolones dont la ciprofloxacine a montré une très bonne efficacité permettant la destruction de la majorité des germes pathogènes du cul de sac conjonctival [40]. En revanche, dans une étude menée par l'ESCRS (European Society for Cataract and Refractive Surgeons), il a été montré que la lévofloxacine en application locale avant la chirurgie ne protégeait pas contre la survenue d'une endophtalmie [41]. De plus, une augmentation du développement de résistances aux antibiotiques utilisés, de la part de pathogènes du cul de sac

conjonctivale, a été mise en évidence [42, 43]. Par exemple, l'apparition d'une résistance doublée aux streptocoques nasopharyngés (16 à 31 %) a été décrite chez des enfants népalais ayant reçu une instillation de collyre de quinolones deux fois par jour pendant 6 semaines [44]. L'administration topique d'antibiotiques n'est donc pas considérée comme une solution pouvant prévenir la survenue des endophtalmies, mais elle contribue largement à diminuer le nombre de bactéries pathogènes présentes à la surface du globe oculaire.

✓ **Antibioprophylaxie par voie systémique**

Une antibioprophylaxie systémique peut être administrée au patient au moment de l'ouverture de la chambre antérieure de l'œil ainsi qu'à la suite de l'opération. Toutefois, le maintien d'un antibiotique par voie systémique pourrait masquer ou retarder le diagnostic d'une endophtalmie [45]. Les antibiotiques administrés par voie systémique devront majoritairement viser les germes les plus fréquemment incriminés dans l'endophtalmie et devront être peu coûteux avec une répercussion faible sur l'équilibre de la flore. Les fluoroquinolones sont relativement utilisées en prophylaxie systémique. Toutefois l'apparition de résistances aux quinolones remettent en question l'utilisation des antibioprophylaxie systémiques dans ce type d'interventions chirurgicales [46, 47].

✓ **Antibioprophylaxie par voie intraoculaire**

L'injection directe d'antibiotique en intravitréen, pendant ou en fin de chirurgie, présente plusieurs avantages : des quantités d'antibiotiques plus faibles peuvent être administrées, leur effet apparaît plus rapidement du fait qu'ils sont directement au contact des bactéries. En revanche, l'effet ne dure pas longtemps, et nécessite des injections répétées pouvant finalement amener à administrer de grandes quantités d'antibiotique ayant une toxicité non négligeable sur les tissus ophtalmiques. Plusieurs

antibiotiques peuvent être utilisés en injection intravitréenne comme par exemple, la lévofloxacine, le céfuroxime, la vancomycine, ou encore la rifampicine [41, 48-51].

Enfin, des antibiotiques peuvent également être administrés dans les liquides d'irrigation oculaire au cours de l'intervention [37, 52]. Toutefois l'estimation de la quantité d'antibiotique ayant réellement pénétrée dans l'œil demeure difficilement estimable.

3. Application de la rifampicine au traitement des endophtalmies

3.1 Généralités sur la Rifampicine

La rifampicine est un antibiotique semi-synthétique dérivé de la rifamycine SV, très actif sur les bactéries gram positif et gram négatif.

Les rifamycines font partie d'une famille d'antibiotique produite par une bactérie du genre *actinomycete*, initialement nommé *Streptomyces mediterranei* (*Nocardia mediterranei*) [53]. Toutes les rifamycines thérapeutiquement utiles sont semi-synthétiques dérivées de la rifamycine B, un produit faiblement actif mais facile à produire et facilement transformé chimiquement en plusieurs types de dérivés plus actifs. Les rifamycines agissent en inhibant la synthèse des acides nucléiques par liaison à l'ARN-polymérase ADN-dépendante des microorganismes. Elles possèdent l'unique propriété d'être actives à la fois sur les bacilles à croissance extra/intracellulaire et sur les bacilles à croissance lente intracellulaire, car l'inhibition

de l'ARN-polymérase semble avoir lieu même durant de très courtes périodes d'activité métabolique [54].

Son activité bactéricide marquée contre les cocci gram positif, fait de la rifampicine un excellent candidat pour le traitement des endophtalmies post-opératoires qui impliquent des bactéries du genre *Staphylococcus* dans la majorité des cas.

3.2 Propriétés physicochimiques de la Rifampicine

La rifampicine est une poudre cristalline inodore, rouge brun. De formule brute $C_{43}H_{58}N_4O_{12}$ (Figure 2), sa masse moléculaire est de 822,96 daltons. Son nom chimique est 3-[[[(4-méthyl-1-piperaziny) imino] méthyl]] rifamycin 5, 6, 9, 17, 19, 21-hexahydroxy- 23-methoxy-2, 4, 12, 16, 18, 20, 22-heptaméthyl-8-[N-(4-méthyl-1-piperaziny) formimidoyl] 2, 7-(epoxypentadecal [1, 11, 13] trienimino)-naphtha [2, 1-beta] furan-1, 11 (2H)-dione 21-acétate [55].

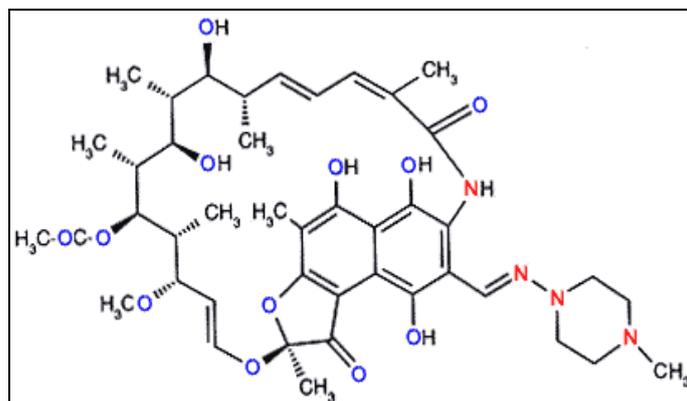


Figure 2 Structure moléculaire de la rifampicine

La rifampicine est peu soluble dans l'eau à 25°C: 2,5 mg/ml à pH 7,3 et 1,3 mg/ml à pH 4,3 [56]. Elle est relativement stable en solution aqueuse. En milieu acide (pH=2,3),

une légère hydrolyse a lieu, avec la formation d' amino 1-méthyl 4 piperazine et de formyl 3-rifamycine SV [57]. A pH 7 et en présence d'oxygène, la rifampicine est oxydée en petite quantité de rifampicine quinone. Sa dégradation a également lieu dans les solutions alcalines et les tampons phosphates avec formation de piperazine, mais seulement en faible quantité.

La rifampicine est également peu soluble dans l'acétone, l'éthylène glycol, le tétrachlorure de carbone et est soluble dans le méthanol, le chloroforme, l'acétate d'éthyle et le chlorure de méthylène.

3.3 Activité antibactérienne

3.3.1 Mécanisme d'action

La rifampicine inhibe les bactéries Gram positif en se liant de façon non covalente à l'ARN-polymérase, ce qui a pour effet de bloquer la synthèse de l'ARN. Toutefois, Les ARN-polymérases ADN-dépendantes des cellules eucaryotes ne sont pas affectées, étant donné que l'antibiotique se lie à une chaîne peptidique qui n'est pas présente dans l'ARN-polymérase des eucaryotes. La rifampicine est donc extrêmement sélective [54]

3.3.2 Spectre antibiotique

La rifampicine inhibe la croissance de la majorité des bactéries à gram positif ainsi que celle de nombreux microorganismes gram négatif comme *Escherichia coli*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Klebsiella*, etc. L'ensemble des germes sur lesquels elle est active est présenté dans le Tableau 7.

Tableau 7 Spectre d'activité de la rifampicine

Groupes	Exemples de germes sensibles
Coccis à gram positif	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Streptococcus pyogenes</i> <i>Streptococcus viridans</i> <i>Streptocoques du groupe B</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i> les Entérocoques
Coccis à gram négatif	<i>Neisseria meningitidis</i> <i>Neisseria gonorrhoeae</i>
Bacilles à gram positif	<i>Escherichia coli</i> <i>Proteus</i> <i>Klebsiella</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Corynebacterium diphtheriae</i> <i>Listeria monocytogenes</i> <i>Clostridium perfringens</i>
Bacilles à gram négatif	<i>Brucella</i> , <i>Legionella</i> <i>Chlamydia trachomatis</i>
Mycobactéries	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>

3.3.3 Sensibilité

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) de la rifampicine vis-à-vis des staphylocoques sont très basses (tableau 8, 9). La rifampicine est très active sur *Staphylococcus aureus* et sur les staphylocoques à coagulase négative. L'antibiotique est moins actif sur les souches Méti-R. (résistantes à la méticilline).

La détermination de la sensibilité de *Staphylococcus* à la rifampicine nécessite un calibrage précis de l'inoculum car des mutants résistants sont rapidement sélectionnés par la rifampicine, *in vitro* et *in vivo*, avec une fréquence de 10^{-6} à 10^{-7} . En dehors des souches résistantes à la rifampicine, des souches de sensibilité diminuée ont été rapportées. Celles-ci sont en général résistantes à la méticilline. Les CMI de la rifampicine sur ce type de souches avoisinent généralement 1 mg/ml (diamètre d'inhibition de 20 à 25 mm) alors que les CMI observées pour les souches totalement

sensibles sont comprises entre 0,008 et 0,06 mg/l (diamètre>30 mm) [53]. Dans 40% des cas les concentrations minimales bactéricides (CMB) vis-à-vis des souches de sensibilité diminuée sont égales à 32 fois la CMI; ces souches sont donc tolérantes .Ces souches de sensibilité diminuée doivent être rendues "intermédiaires".

Tableau 8 CMI (mg/l) de la rifampicine sur les staphylocoques [54]

	CMI ₅₀	CMI ₉₀
<i>S. aureus</i>	0,016-0,05	0,027-0,04
<i>S. epidermidis</i>	0,004-0,05	0,008-1,56
<i>S. hémolytiques</i>	0,008	0,008
<i>S. saprophytiques</i>	0,008	0,02

Tableau 9 Activité de la rifampicine sur les germes pathogènes communs [53].

Germes pathogènes	CMI (mg/l)
<i>S. aureus</i>	0,008-0,06
<i>S. pyogenes</i>	0,03-0,1
<i>S. pneumoniae</i>	0,06-4
<i>E. faecalis</i>	1-4
<i>M. tuberculosis</i>	0,1-1
<i>N. gonorrhoeae</i>	0,06-0,5
<i>N. meningitides</i>	0,01-0,5
<i>H. influenzae</i>	0,5-1
<i>E. coli</i>	8-16
<i>K. pneumoniae</i>	16-32
<i>P. aeruginosa</i>	32-64

Sur l'antibiogramme, les diamètres critiques sont de 14 à 19 mm pour des disques chargés à 30 µg de rifampicine. Cependant, compte tenu de la très grande sensibilité des souches sauvages, on estime actuellement qu'une souche pour laquelle le diamètre d'inhibition est inférieur à 26 mm a déjà subi une mutation et doit être considérée avec circonspection.

Les antibiotiques de la famille des rifamycines ont un spectre d'action très large incluant les mycobactéries (bacille de Koch et bacille de Hansen de la lèpre) et les

chlamydiae. La plupart des germes Gram positif sont sensibles de même que de nombreux germes Gram négatif comme *Haemophilus influenzae*, *Enterobacter*, *Acinetobacter* et parfois *Pseudomonas*.

3.4 Administration ophtalmique

La pénétration intraoculaire de la rifampicine est faible, sauf s'il y a association de la voie topique et de la voie systémique. La tolérance est bonne mais on peut observer des effets indésirables au niveau hépatique, sanguin ou rénal lors d'une administration systémique. Du point de vue topique, la rifampicine est généralement remplacée par la rifamycine sous forme de collyre ou de pommade [31].

Dans le cas du traitement prophylactique de l'endophtalmie postopératoire, l'utilisation de la rifampicine demeure peu étendue. Toutefois, elle fait l'objet d'une attention particulière compte-tenu de son spectre d'activité relativement large. La rifampicine est à la fois très active sur les bactéries Gram positif et Gram négatif. Elle est notamment très active sur le genre *Staphylococcus* majoritairement incriminé dans les infections ophtalmiques comme l'endophtalmie. Toutefois peu d'études sont référencées sur l'utilisation de la rifampicine en prophylaxie. En effet les études réalisées proposent généralement l'utilisation de la rifampicine dans le traitement "curatif" de l'endophtalmie en association avec d'autres antibiotiques [58]. De plus des études récentes ont montré l'apparition de certaines résistances à la rifampicine dans le cadre du traitement de l'endophtalmie, rendant son association à d'autres antibiotiques préférables Hellmark [59] montre que 39% des souches isolées de prothèses infectées sont résistantes à la rifampicine.

3.5 Nouvelle forme d'administration de rifampicine

La rifampicine est un antibiotique très efficace contre les bactéries Gram positif et négatif, mais sa demi-vie dans l'organisme est relativement faible, de 1,5 à 5 heures. L'administration de grande quantité est donc nécessaire afin de maintenir une concentration efficace sur une longue période; pouvant être à l'origine d'effets secondaires [60]. Afin de résoudre ce problème des nouvelles formes d'administration à libération contrôlée de rifampicine ont été envisagées. Elles présentent l'avantage d'améliorer l'efficacité du traitement ainsi que son observance. Quelques exemples de ces systèmes d'administration innovants de rifampicine sont décrits dans le tableau 10.

Tableau 10 Systèmes innovants pour l'administration ophtalmique de rifampicine

Référence	Véhicule	Taille
Madhan kumar A.B. et al., 1997 [61]	Poly(palmitoyl-L-hydroxyproline ester)	20,8-47,6 µm
Sreenivasa Rao B. et al., 2002 [62]	Ethylcellulose	
Rumpy A. F. E. et al., 2003 [63]	Polyurethane catheter	
Sharma A. et al., 2004 [64]	Poly lactide co glycolide	186–290 nm
Gürsoy A. et al., 2004 [65]	Liposome	
Zahoor A. et al., 2005 [66]	Sodium alginate	235,5 nm
Yoshida A. et al., 2006 [67]	PLGA	1,5-8,9 mm

Conclusion

L'œil est constitué d'un segment antérieur et d'un segment postérieur dont l'ensemble est délimité par deux enveloppes la cornée et la sclérotique, renfermant un environnement liquide plus ou moins gélifié en perpétuel renouvellement (humeurs aqueuse et vitrée). Cette physiologie fait de l'œil une barrière vis-à-vis de l'environnement et de l'administration de principes actifs par voie ophtalmique. En effet lors de l'administration topique d'un médicament par voie ophtalmique, on estime que seul 2 à 3 % du principe actif pénètre réellement dans l'œil. Néanmoins de nombreux antibiotiques peuvent être administrés par voie ophtalmique, la difficulté résidant dans le maintien d'une concentration locale en antibiotiques supérieure à leur CMI. Afin de maintenir des concentrations efficaces de principe actif à dans l'œil tout en limitant les doses administrées, de nombreux systèmes d'administrations ophtalmiques ou intraophtalmiques ont été développés. Cet aspect fera l'objet du deuxième chapitre de cette partie bibliographique.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] Presland A. *Applied ocular physiology and anatomy*. Anaesthesia & Intensive Care Medicine. **2007**; 8 (9): 379-82.
- [2] Guerzida V., Morales C., Belon J. P., *Ophthalmologie*. 1999, Paris: MASSON.
- [3] Malhotra A., Minja F. J., Crum A. *et al. Ocular Anatomy and Cross-Sectional Imaging of the Eye*. Seminars in Ultrasound, CT, and MRI. **2011**; 32 (1): 2-13.
- [4] Moore K. L., Dalley A.F., Dhem A., Milaire J., *Anatomie medicale: aspects fondamentaux ciliques*. 2011, Bruxelles: De Boeck. 905.
- [5] <http://www.snof.org/maladies/anat.html>. (consulté en janvier 2009)
- [6] DelMonte D. W. and Kim T. *Anatomy and physiology of the cornea*. J. Cataract & Refractive Surgery. **2011**; 37 (3): 588-98.
- [7] Behndig A., Markström K. *Determination of the aqueous humor volume by three-dimensional mapping of the anterior chamber*. Ophthalmic Res **2005**; 37: 13–16.
- [8] Adenis J. P., Denis F., Colin J., *L'endophtalmie; Pénétration intraoculaire des agents antimicrobiens*. 1988, Paris: Eclipses.
- [9] Laroche L., Weiser M., Montard M. , *Le Choix d'un Implant. Chap. in Chirurgie de la Cataracte*. . 1996, Paris. : Masson, . 271-86.
- [10] Cassin B., Solomon S., *Dictionary of Eye Terminology*. 1990, Gainesville: Florida.
- [11] Watson P. G. and Young R. D. *Scleral structure, organisation and disease. A review*. Experimental Eye Research. **2004**; 78 (3): 609-23.
- [12] Edman P., *Biopharmaceutics of ocular drug delivery*. 1993, USA: CRC press. 3-8.
- [13] Gerhard K. L., *Atlas OPHTALMOLOGIE*. 2002, Paris: Maloine. 212-15.
- [14] Lu L., Yaszemski M. J., and Mikos A. G. *Retinal pigment epithelium engineering using synthetic biodegradable polymers*. Biomaterials. **2001**; 22 (24): 3345-55.
- [15] Deal D. V., Bron A. J., *Antibiotic and Chemotherapy, Anti-infective agents and their use in therapy 8th edition*, ed. D.G. Roger, G Finch, S. R. Norrby, R. J. Whitley 2003, Livingstone: Churchill. 740.
- [16] Essex R. W., Yi Q., Charles P. G. P. *et al. Post-traumatic endophthalmitis*. Ophthalmology. **2004**; 111 (11): 2015-22.

- [17] Bhagat N., Nagori S., and Zarbin M. *Post-traumatic Infectious Endophthalmitis*. *Surv. Ophthalmol.* **2011**; 56 (3): 214-51.
- [18] Kresloff M. S., Castellarin A. A., and Zarbin M. A. *Endophthalmitis*. *Surv. Ophthalmol.* 43 (3): 193-224.
- [19] Aaberg T. M., Flynn H.W., Schiffman J., Newton J. *Nosocomial acute onset post operative endophthalmitis survey: A ten year review of incidence and outcome*. *Ophthalmology*. **1998**; 105: 1004–10.
- [20] Kresloff M. S., Castellarin A.A., Zarbin M.A. . *Major review Endophthalmitis*. *Surv Ophthalmol.* . **1998**; 43 (3): 193–224.
- [21] Javitt J. C., Vitale S., Canner J.K., Street D.A., Krakauer H., McBean M. . *National outcomes of cataract extraction; endophthalmitis following inpatient surgery*. *Arch Ophthalmol.* **1991**; 109: 1085–89.
- [22] Narang S., Gupta A., Gupta V. *et al. Fungal endophthalmitis following cataract surgery: clinical presentation, microbiological spectrum, and outcome*. *Am. J. Ophthalmol.* **2001**; 132 (5): 609-17.
- [23] Han D. P., Wisniewski SR., Wilson L.A., vine A.K., Doft B.H., Kelsey S.F.,. *Spectrum and susceptibilities of microbiologic isolates in the endophthalmitis vitrectomy study*. *Am. J. Ophtalmol.* **1996**; 122: 1-17.
- [24] Pinna A., Usai D., Sechi L. A. *et al. An Outbreak of Post-Cataract Surgery Endophthalmitis Caused by Pseudomonas aeruginosa*. *Ophthalmology*. **2009**; 116 (12): 2321-26.
- [25] Marrelli D. J. *Endogenous endophthalmitis*. *Clinic eye and vision care* **1995**; 7: 143 -49.
- [26] Cornut P.-L., Chiquet C. *Endophtalmies endogènes bactériennes Endogenous bacterial endophthalmitis*, . *J. Fr. Ophtalmol.* **2011**; 34 (1): 51-57.
- [27] Dudani A. I. *Endogenous Endophthalmitis*. *Journal of the Bombay Ophthalmologists' Association*. **2000**; 10 (4): 195-96.
- [28] Scat Y., Chaumeil C., et Batellier L. *Prélèvements endo-oculaires et endophtalmies : Etude des germes isolés au CHNO des Quinze-Vingts*. *Méd Mal Infect.* **1996**; 26: 1159-63.
- [29] Mandava S., Sweeney T., Guyer D., *Atlas de Poche d'ophtalmologie*. 2001, Paris: Médecin-Sciences Flammarion.
- [30] Salvanet-Bouccara A., Dubayle P., Forestier F., Lafaix C., Haroche G., Dublanchet A. *Vers une stratégie raisonnée du traitement des endophtalmies bactériennes post-opératoires*.

- J. Fr. Ophtalmol. **1986**; 9 (8-9): 523-32.
- [31] Offret H., Labetoulle M., Frau E., *Thérapeutiques médicamenteuses en ophtalmologie*. 2003, Paris: Masson.
- [32] Callegan M. C., Gilmore M. S., Gregory M. *et al. Bacterial endophthalmitis: Therapeutic challenges and host-pathogen interactions*. Progress in Retinal and Eye Research. **2007**; 26 (2): 189-203.
- [33] Salvanet-Bouccara A. *Complications infectieuses de la chirurgie de la cataracte :L'endophtalmie aigüe en questions*. J. Fr. Ophtalmol. **2000**; 23 (1): 81-87.
- [34] Roth D. B. and Flynn H. W. *Antibiotic selection in the treatment of endophthalmitis: The significance of drug combinations and synergy*. Surv. Ophthalmol. 41 (5): 395-401.
- [35] Endophthalmitis Vitrectomy Study Group. *Results of the endophthalmitis vitrectomy study. A randomized trial of immediate vitrectomy and of intravenous antibiotics for the treatment of postoperative bacterial endophthalmitis*. Arch Ophtalmol. **1995**; 113: 1479-96.
- [36] Peyman G. A., Herbst R., . *Bacterial endophthalmitis treatment with intraocular injection of gentamycin and dexamethason*. Arch. Ophtalmol. **1974**; 8 (91): 416-41.
- [37] Bron A., Creuzot-Garcher C. *Prophylaxie des endophtalmies après chirurgie de cataracte*. J Fr. Ophtalmologie. **2007**; 30 (10): 1027-36.
- [38] Apt L., Isenberg S., Yoshimori R., Paez J.H., . *Chemical preparation of the eye in ophthalmic surgery. III. Effect of povidone-iodine on the conjunctiva* Arch Ophthalmol. . **1984**; 102 (5): 728-9.
- [39] Lagoutte F., Fosse T., Jasinski M. *et al. [Iodized polyvidone (betadine) and prevention of postoperative infection. A multicenter study]*. J. Fr. Ophtalmol. **1992**; 15 (1): 14-8.
- [40] Katz H. R., Perlmutter L.S., . *The use of topical fluoroquinolones to reduce conjunctival flora in human subjects for surgical prophylaxis*. E.S.C.R.S. **1999**; avril: Seattle.
- [41] Barry P., Seal D.V., Gettinby G., Lees F., Peterson M. *Revie CW. ESCRS study of prophylaxis of postoperative endophthalmitis after cataract surgery: Preliminary report of principal results from a European multicenter study*. J Cataract Refract Surg. **2006**; 32 (407-410):
- [42] Knauf H. P., Silvany R., Southern P. M., Jr. *et al. Susceptibility of corneal and conjunctival pathogens to ciprofloxacin*. Cornea. **1996**; 15 (1): 66-71.
- [43] Koltus B. S., Wymbs R.A., Vellozzi E.M., Udell I.J. *In vitro activity of fluoroquinolones, vancomycin, and gentamicin against methicillin-resistant staphylococcus aureus ocular*

- isolates*. Am. J Ophthalmol. **2006**; 142 (726-729):
- [44] Gaynor B. D., Chidambaram J.D., Cevallos V., Miao Y., Miller Y., Jha H.C., Bhatta R.C., Chaudhary J.S.P., Osaki Holm S., Whitcher J.P., Holbrook K.A., Fry A.M., Lietman T.M. . *Topical ocular antibiotics induce bacterial resistance at extraocular sites*. Br. J Ophthalmol. **2005**; 89: 1097-99.
- [45] Meredith T. A. *Prevention of postoperative infection*. Arch. Ophthalmol. **1991**; 109: 944-45.
- [46] Miller D., Flynn P.M., Scott I.U., Alfonso E.C., Flynn H.W. *In vitro fluoroquinolone resistance in staphylococcal endophthalmitis isolates*. Am J Ophthalmol. **2006**; 124: 479-83.
- [47] Deramo V. A., Lai J.C., Fastenberg D.M., Udell I.J. *Acute endophthalmitis in eyes treated prophylactically with gatifloxacin and moxifloxacin*. Am J Ophthalmol. **2006**; 142: 721-25.
- [48] Gills J. P. *Filters and antibiotics in irrigating solution for cataract surgery*. J Cataract Refract Surg. **1991**; 7: 385.
- [49] Gimbel H. V., Sun R., DeBrof B.M. . *Prophylactic intracameral antibiotics during cataract surgery: the incidence of endophthalmitis and corneal endothelial cell loss*. Eur J Implant Ref Surg. **1994**; 6: 280-85.
- [50] Baum J., Peyman G. A., and Barza M. *Intravitreal administration of antibiotic in the treatment of bacterial endophthalmitis. III. Consensus*. Surv. Ophthalmol. **1982**; 26: 204-6.
- [51] Kodjikian L., Renaud F. N., Roques C. *et al. In vitro influence of vancomycin on adhesion of a Staphylococcus epidermidis strain encoding intercellular adhesion locus ica to intraocular lenses*. J. Cataract. Refract. Surg. **2005**; 31 (5): 1050-8.
- [52] Gritz D. C., Cevallos A.V., Smolin G., and Whitcher J.P., Jr. . *Antibiotic supplementation of intraocular irrigating solutions. An in vitro model of antibacterial action*. Ophthalmology. **1996**; 103 (8): 1204-8.
- [53] Parenti F., Lancini G., *Antibiotic and Chemotherapy, Anti-infective agents and their use in therapy 8th edition*, . Rifamycins, ed. D.G. Roger G. Finch, S. Ragnar Norrby, Richard J. Whitley. 2003, Livingstone: Churchill 374.
- [54] Graham L. P., *Chimie pharmaceutique* 2003, Paris: De Boeck diffusion S.A. 654.
- [55] O'Neil M. J., Smith A., Heckelman P. E. *et al., Merck index, 14th edition*. 2006, John Wiley & Sons. p. 1474.
- [56] Gallo G. G., and Radaelli, P., Anal., *Profiles of Drug Subs.*, ed. e. K. Florey. 1976, NY: Academic Press. 467.

- [57] Renouf B., *Etude pharmacologique et bactériologique de cinq antistaphylococciques, majeurs (Vancomycines, teicoplanine, acide fusidique, rifampicine et fosfomycine). Evolution de leur consommations au C.H.R.I. de Caen depuis 1988.*,Thèse, Université de Caen. 1994. p. 54.
- [58] Svensson E., Hanberger H., and Nilsson L. E. *Pharmacodynamic effects of antibiotics and antibiotic combinations on growing and nongrowing Staphylococcus epidermidis cells.* Antimicrob. Agents Chemother. **1997**; 41 (1): 107-11.
- [59] Hellmark B., Unemo M., Nilsson-Augustinsson A. *et al. Antibiotic susceptibility among Staphylococcus epidermidis isolated from prosthetic joint infections with special focus on rifampicin and variability of the rpoB gene.* Clin. Microbiol. Infec. **2009**; 15 (3): 238-44.
- [60] Jopling W. H. *Side effects of anti-leprosy drugs / common use.* Leprosy Rev. **1983**; 54: 261-69.
- [61] Madhan-Kumar A.B.,Panduranga R.K.*Poly(palmitoyl-L-hydroxyprolineester) microspheres as potential oral controlled drug delivery system.* Int J Pharm. **1997**; 149: 107-14.
- [62] Sreenivasa Rao B., Ramana Murthy K. V. *Studies on Rifampicin release from ethylcellulose coated nonpareil beads.* Int J Pharm. **2002**; 231 97-106.
- [63] Rump A. F. E., Güttler K., König D. P., Yücel N., Korenkov M., Schierhol J. M. *Pharmacokinetics of the antimicrobial agents rifampicin and miconazole released from a loaded central venous catheter.* J Hospital Infection. **2003**; 53: 129-35.
- [64] Sharma A., Pandey R., Sharma S., Khuller G.K. *Chemotherapeutic efficacy of poly (DL-lactide-co-glycolide) nanoparticle encapsulated antitubercular drugs at sub-therapeutic dose against experimental tuberculosis.* Int J Antimicrobial Agents **2004**; 244: 599–604.
- [65] Gürsoy A., Kut E., Ozkırımlı S. *Co-encapsulation of isoniazid and rifampicin in liposomes and characterization of liposomes by derivative spectroscopy.* Int J Pharm. **2004**; 271: 115–23.
- [66] Zahoor A., Sharma S., Khuller G.K. *Inhalable alginate nanoparticles as antitubercular drug carriers against experimental tuberculosis.* Int J Antimicrobial Agents **2005**; 26 298–303.
- [67] Yoshida A., Matumoto M., Hshizume H., Oba Y., Tomishige T., Inagawa H., Kohchi C., Hino M., Ito F., Tomoda K., Nakajima T., Makino K., Terada H., Hori H., Soma G. *(DL-lactic-co-glycolic) acid microspheres after phagocytotic uptake by alveolar macrophages, and the killing effect against intracellular Mycobacterium bovis Calmette-Guérin.* Microbes and Infection. **2006**; 8 2484-91.

PARTIE 1

CHAPITRE 2

NEW SYSTEM AND DISPOSITIVE OF ADMINISTRATION FOR OCULAR DELIVERY

Introduction

Ocular diseases can be treated by several methods of drug administration such as systemic administration, topical administration, and intra ocular injections. However, these methods of administration are limited by various problems. One of the major problems of ophthalmic drug delivery is to provide and maintain an adequate concentration of drug at the site of action for a prolonged time, because factors such as tear turnover, lachrymal drainage, and drug dilution induced by lachrymation; non-productive absorption etc, are responsible for an enormous loss of drug [1]. For example, topical administration is mainly used for ophthalmic delivery but has limited efficiency because of the rapid elimination of the drug by eye drops and the weak permeability of the cornea. In case of systemic administration, most of the drugs are degraded and disturbed by biological barriers before they have reached the eye. Intra ocular injection is one of the most effective methods of administration for ocular delivery, however, each injections cause damages on ocular physiology and patient discomfort.

To solve these problems and increase drug efficiency, several ophthalmic drug delivery systems were developed, such as micro or nanoparticles, liposomes, cyclodextrin-based delivery systems, or iontophoresis.

In this chapter, these recently developed drug delivery systems for ocular disorder treatments will be described, and additionally, methods for microparticle and nanoparticle preparation will be specifically developed.

1. Ocular administration

Several routes of administration for ocular disease are available. Topical application, subconjunctival, sus-tenon's and retrobulbar injections, intraocular injection, intramuscular injection, intravenous injection, delayed-release oral preparations are commonly used for the treatment of ocular diseases. However, these methods still have lot of drawbacks, such as drug loss or damage by often injection. To solve these problems, several vehicles are used such as, gel vehicles [2], ointments [3], liposomes [4], soluble drug inserts [5], iontophoresis [6], hydrophilic contact lens drug application [7].

In this chapter, several methods of ocular administration and their limitations will be presented and new methods for ocular administration which are recently investigated will be presented.

1.1 Methods for ocular administration

1.1.1 Topical instillation

Topical instillation is the most common administration method used to treat the diseases of the eye. By topical instillation, drug penetrates the cornea and reaches the anterior segments. However, drug do not reach the posterior segment targets [8] since less than 5% of the drug reaches the posterior segments [9], due to rapid and extensive precorneal loss by drainage, high tear fluid turnover and the poor penetration of the drugs to the posterior segments. For this reason, diseases affecting the posterior segments of the eye are difficult to treat by this route of administration [10]. Physical system for drug enhancement (e.g., ultrasounds, iontophoresis) or chemical system for increase adhesion of the delivery system (hydrogels, mucoadhesive polymers), or sustained concentration (polymeric micro-nanoparticles) are investigated.

1.1.2 Direct administration

Intraocular injections are used to achieve high drug concentrations in the vitreous and the retina. However, half-life of drugs in the vitreous is short and repeated injections are required. Moreover, repeated injection cause patients' discomfort due to pain and may cause complications such as vitreous haemorrhages, infections and lens or retinal injuries. Although these problems, drug can reach retina with high concentrations [11].

1.1.3 Systemic administration

Systemic administration is another major route for ocular drug delivery. Systemically administered drugs reach the chorioretinal tissue through the blood-retinal barriers impose limits on the influx of drugs into retinal tissue and the vitreous cavity [12]. Systemic administration of drugs is used to treat some vitreoretinal diseases. But a very small amount of drugs can reach the eye after systemic administration. A large systemic amount is required to obtain a therapeutic level of drug concentration in the eye. In addition, the blood-retinal barrier that is located at the level of retinal vascular endothelial cells and retinal pigment epithelium inhibit an entry of certain drugs from systemic circulation into the retinal tissue. From the above reasons, drug delivery to the posterior segments of the eye is challenging for both clinicians and basic scientists.

1.2. Recently developed ocular administration systems

As described above, the improvement of therapeutic efficiency of drug for ophthalmic delivery remains a real challenge. Thus, several methods of administration are developed for ocular delivery.

1.2.1. Iontophoresis for ocular therapeutic

Iontophoresis is a new drug delivery technique for introducing ionized molecules by enhancing of permeation through biological membranes using low electrical current [13]. This method very easy for application, can increase drug penetration directly into the target region and can minimize side effects [14]. Therefore, it used oftentimes not only for skin delivery [15, 16], but also for gene therapy [17-19], hydrogels [20] or nanoparticles penetration [21] into the eye. Iontophoresis for ocular administration was developed recently as a fast and safe ocular therapeutic method for high drug concentration administration in a target ocular site.

Two types of iontophoresis is using for ocular administration; trans-corneal, or trans-scleral iontophoresis [22]. Trans-corneal iontophoresis transfers a high concentration of drug to the anterior segment. In contrast, trans-scleral iontophoresis aims to administrate drug into the posterior segments. Drug can reach vitreous and retina through the choroid. It is a good alternative for multiple intra-vitreous injections or systemic therapy used for posterior ocular diseases as like endophthalmitis.

Behar-cohen *et al.* [23] were studied the efficacy of a Coulomb Controlled Iontophoresis system (CCI) in the local delivery of corticosteroids for the treatment of uveitis. The

therapeutic efficacy of dexamethasone administered by CCI was compared to systemic injection and to topical application with the iontophoresis apparatus in the absence of electrical current. They suggested that local administration of dexamethasone by CCI inhibited anterior and posterior signs of intraocular inflammation as effectively as systemic administration. In the anterior and posterior segments of the eye, the protein exudation, tumor necrosis factor levels and the cellular infiltration were inhibited. The tumor necrosis factor - α gene expression was inhibited in the anterior as well as the posterior segment of the eye. Also they found no clinical nor histological damage caused by the CCI apparatus. From the results they concluded that CCI administration of dexamethasone allows a therapeutic effect on the posterior as well as the anterior segment of the eye, and may present a viable alternative to systemic administration of glucocorticoids in severe ocular inflammations.

Hao *et al.*, [24] examined the feasibility of electrically assisted delivery of macromolecules such as small interfering RNA (siRNA) into the corneal epithelium, to optimize the iontophoresis and electroporation methods, and to study the mechanisms of corneal iontophoresis for macromolecules. Anodal and cathodal iontophoresis, electroporation and their combinations were the methods examined with mice *in vivo*. Cyanine 3 (Cy3)-labeled glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) siRNA and fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled dextran of different molecular weights (4–70 kDa) were the macromolecules studied. Microscopy and histology after cryostat sectioning were used to analyze and compare the delivery of the macromolecules to the cornea. Iontophoresis was effective in delivering siRNA and dextran up to 70 kDa into the cornea. The electroporation method studied was less effective than iontophoresis. Although both iontophoresis and electroporation alone can deliver macromolecules into the cornea, these methods alone were not as effective as the combination of iontophoresis and

electroporation (iontophoresis followed by electroporation). The significant enhancement of dextran delivery in anodal iontophoresis suggests that electroosmosis can be a significant flux-enhancing mechanism during corneal iontophoresis. These results illustrate the feasibility of electrically assisted delivery of macromolecules such as siRNA into the cornea.

Molokhia *et al.* [6] were studied trans-scleral and trans-corneal iontophoretic delivery and compared to passive delivery and intravitreal injection using nuclear magnetic resonance imaging (MRI) and investigate the factors affecting trans-scleral iontophoretic delivery. Trans-scleral iontophoretic delivery was related to the position and duration of the iontophoresis application *in vivo*. Permeants were observed to be delivered primarily into the anterior segment of the eye when the pars plana was the application site. Extending the duration of iontophoresis at this site allowed the permeants to be delivered into the vitreous more deeply and to a greater extent than when the application site was at the back of the eye near the fornix. They suggested that electrode placement was an important factor in trans-scleral iontophoresis, and the ciliary body (pars plana) was determined to be the pathway of least resistance for iontophoresis transport.

The basics of iontophoretic transport of model neutral, cationic, and anionic species were determined by Sevgi Güngör *et al.* [25]. They studied the electrical properties of the sclera (charge, permselectivity, and isoelectric point). The principles of trans-scleral iontophoretic transport of low molecular weight compounds are consistent with those observed for skin. Iontophoretic delivery of timolol and dexamethasone phosphate was proportional to applied current and drug concentration, and trans-scleral iontophoresis in rabbits led to enhanced intraocular levels of these compounds compared to passive delivery. They concluded that the sclera appears to be a cation-permselective membrane, supporting a

net negative charge at physiological pH. Drug transport numbers are optimized when competition from the background electrolyte is reduced. Iontophoretic fluxes are proportional to the applied current, at least for the tested small anionic and cationic drugs. The behavior of higher molecular weight species has been characterized by examining the trans-scleral iontophoresis of vancomycin, a glycopeptides antibiotic with a relatively high molecular weight of 1448 Da. They concluded that vancomycin can be delivered by iontophoresis but trans-scleral transport did not increase linearly with either increasing current density or drug concentration.

1.2.2. Micro-nano encapsulation

Microparticles and nanoparticles are colloidal drug delivery system in micro and nano size range [26]. Generally, size range between 1 to 1000 μm defined microparticles and systems below 1 μm are called nanoparticles. Micro-nanoparticles are usually formed of a polymeric wall material and core oil. The most commonly used biodegradable polymers are polylactide (PLA) and poly (lactide-co-glycolide) (PLGA) [27]. Depend on disposition of drug in the particles; they are classified into two groups. Micro/nanospheres defined when their active principle is dispersed into a polymeric matrix structure. In contrast, micro/nanocapsules are usually defined when the drug is placed in a liquid core surrounding of a polymeric coating (Figure 1). Micro-nano encapsulation system is also classified depend on the affinity of active principle, lipophilic active principle is placed in a core oil (O/W) (Figure 2), and hydrophilic active principle into an aqueous core using a W/O/W emulsion technique.

Figure 1. *Structural comparison of nanocapsule and nanosphere*

Figure 2. *Various types of polymeric microparticles*

Additionally, solid lipid nanoparticle (SLN) is another system making particles without polymer. SLN use characteristic of lipids which transfer their phase liquid-solid depending on the temperature. Lipophilic drugs can be dissolved into the lipid at the liquid state, afterwards, as lipid transfer to solid state, the drug is encapsulated into the lipid matrix. The carrier is composed of physiological and biodegradable lipids of low systemic toxicity and also low cytotoxicity [29], and used oftentimes for topical administration. Now days, optimization of process parameter [30, 31], recrystallization [32], morphological characterization [33] and in vivo toxicity [34] have been undertaken.

Aqueous dispersions SLN show some interesting features in topical drug delivery. However, to get a semisolid carrier having the appropriate consistency for topical application, the liquid SLN dispersions have to be incorporated in convenient topical dosage forms like hydrogels or creams. This is a time-consuming production process with several disadvantages. To avoid this drawback, Lippacher *et al* [35] produced semisolid SLN dispersions by high-pressure homogenization using an APV Lab 40 homogenizer. They suggested that despite the high lipid content of the SLN dispersions, they retained their colloidal particle size. Viscoelastic measurements proved the existence of a gel-like structure with a prevailing elastic component.

Poly micro/nano particles system is applied for ocular administration with several methods of instillation, as like topical administration or intra ocular injection.

A number of research results show micro-nano particulate system as efficient for sustained therapeutic drug release into the eye, both by topical and intra ocular administration (Table 1). In sustained delivery study of timolol maleate from PLGA microspheres, timolol maleate was released over 90 days [36]. Moreover, Table 2 shows several types of polymer improving ocular mucoadhesive capacity and increasing drug efficiency by topical administration.

Table 1 Examples of micro/nano encapsulation systems used for ocular delivery

Reference	Target	Drug	Polymer
Gavini E. et al. [37]	Topical	Vancomycin	PLGA
Hachicha W. et al. [38]	Intravitreal	Vancomycin	PLGA
Conti B. et al. [39]	Intravitreal	Acyclovir	PLGA
Merodio M. et al. [40]	Intravitreal	Ganciclovir	Albumin
Zimmer A.K. et al. [1]	Ocular	Pilocarpin	Albumin
Martinez-Sancho C. et al. [41]	Intravitreal	Acyclovir	PLGA
Pignatello R. et al. [42]	Ocular	Flurbiprofen	Eudragit
Monem A.S. et al. [43]	Intraocular	Pilocarpine	Liposome
Cortesi R. et al. [44]	Ocular		
Otha Y. et al. [45]	Ocular	Vitamin E	Liposome
Musenga A. et al. [46]		Vancomycin	Albumin
Di Colo G. et al. [47]	Ocular		Chitosan
Fattal E. et al. [48]	Topical or intraocular	Nucleic acids	
Bertram J.P. et al. [36]	Subconjunctival	Timolol Maleate	PLGA, PLA
Soltan Monem A. et al. [49]	Topical	Pilocarpine	Liposomes

However, in ophthalmic administration, mean particles diameter should be limited under 25µm [1], because larger size might occur scratching feeling. Additionally, type of polymer as wall material, and type of core oil should be limited to not provoke any problem for vision.

Table 2 Viscosifying polymers screened for ocular mucoadhesive capacity

Polymer	Charge	Mucoadhesive capacity
Poly(acrylic acid)	anionic	+++
Carbomer	anionic	+++
Hyaluronan	anionic	+++
Chitosan	cationic	++
Na Carboxymethylcellulose	anionic	++(+)
Poly(galacturonic acid)	anionic	++
Na-alginate	anionic	++(+)

Pectin	anionic	++(+)
Xanthan gum	anionic	+
Xyloglucan gum	anionic	+
Scleroglucan	anionic	+
Poloxamer	non-ionic	+(+)
Hydroxypropylmethycellulose	non-ionic	+
Methylcellulose	non-ionic	+
Poly(vinyl alcohol)	non-ionic	+
Poly(vinyl pyrrolidone)	non-ionic	+

Mucoadhesive capacity: +++: excellent, ++: good, +: poor/absent

1.2.3. Cyclodextrin-based delivery systems

Cyclodextrins are cyclic oligosaccharides derived from starch, usually exhibiting a hydrophilic surface and a lipophilic central cavity. They have a truncated cone shape (Figure 3), and can be classified in 3 types, α , β and γ -cyclodextrins (6, 7, and 8 of glucose units). β -cyclodextrins have most pharmaceutical interests, because they have the higher complexation ability, and have a low cost [50]. Topical delivery is the most common way of drug administration for the treatment of ocular diseases. However as mentioned previously, biological barriers decrease drug penetration. These biological barriers are characterized by the lipophilic nature of the cornea and the hydrophilic tear and mucin cover outside of lipophilic membrane. For this reason drug should exhibited lipophilic and hydrophilic properties at the same time to improve their intraocular penetration. Cyclodextrins can contribute to this amphiphilic characteristic because they have hydrophilic surface and lipophilic central cavity. Therefore, cyclodextrins can deliver lipophilic drugs to lipophilic biological membrane through tear and hydrophilic mucin. After delivering lipophilic drug cyclodextrins remain in the hydrophilic environment and are eliminated by the tear turnover [51].

Figure 3. Molecular structure of cyclodextrin

Davies *et al.* [54] reported the effect of hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP- β -CD) on the aqueous solubility and chemical stability of hydrocortisone (HC) with an ultimate aim of formulating a stable topical ophthalmic solution of HC. The ocular bioavailability following topical administration to rabbits of the aqueous formulation of HC was then compared to that of a suspension formulation having an equivalent HC concentration. The aqueous solubility of HC was markedly increased upon addition of HP- β -CD due to the formation of a soluble 1:1 inclusion complex. The ocular bioavailability following topical administration to rabbits of a tritium labeled 1% HC solution formulation of the HC:HP- β -CD complex was lower than that of a 1% suspension formulation. A significant reduction of between 25 and 40% was apparent in the cornea, aqueous humor, iris and sclera. They concluded that the complexation of poorly water-soluble drugs by cyclodextrins can often increase their water solubility. Consequently, cyclodextrins may be useful in the reformulation of ophthalmic suspensions as solutions thereby overcoming many of the problems associated with the formulation and use of ophthalmic suspensions.

1.2.4. Liposomal delivery system

Liposomes are microscopic vesicles composed by bilayer-like membranes. Depending of their size, the number and the nature of layers various types of liposome are described (Figure 4), such as small unilamellar vesicles (SUV), large unilamellar vesicles (LUV), giant unilamellar vesicles (GUV), oligo vesicular vesicle (OVV), multilamellar vesicles (MUV) [55].

Figure 4. *Various type of liposome*

Bilayers of liposome are usually made by phospholipids which have hydrophilic head and lipophilic tail (Figure 5). Because of this amphiphilic property, in aqueous condition, inside of membrane has lipophilic property, while surface of membrane and inside of liposome has hydrophilic property. This property of bilayers is similar with cell membrane composition, and liposome can be used like artificial cells. Moreover, amphiphilic nature of liposomes is effective for lipophilic or hydrophilic drug uptake. Due to this property,

liposome became a system broadly used for drug delivery. Depend on the methods of process and phospholipids, the various types of liposomes can be prepared. Solvent evaporation method [56], solvent injection method [57], detergent dialysis method [58], and emulsification using high shear rate [59] are the most frequently used process for liposome preparation.

Figure 5. *Molecular structure of liposome*

Liposomes were used as a hydrophobic drug carrier for ocular administration. Ohata *et al.* [45] studied the preventive effect of topical vitamin E-containing liposome instillation on the progression of galactose cataract. They prepared vitamin E-containing liposomes [LP(+VE)] and vitamin E-free liposomes [LP(-VE)] and instilled daily for 12 weeks into eyes of rat. After 5 and 12 weeks of treatment they found retarded cataract progression for LP(+VE), but not for LP(-VE). They concluded that topically instilled LP(+VE) can

retard cataract progression, mainly by the antioxidative action of vitamin E contained in the instilled liposomes.

Liposomes were also used for the intraocular delivery of antibiotics. Law *et al.* [61] investigated the *in vitro* corneal penetration and *in vivo* corneal absorption of acyclovir from an acyclovir-containing liposome system. They found that the positively charged liposomes resulted in a penetration rate lower than those of negatively charged liposomes and free acyclovir in solution. *In vivo* study results showed that the extent of acyclovir absorption from positively charged liposomes was higher than those from negatively charged liposomes and free acyclovir. The acyclovir concentration in the cornea after administration of positively charged liposomes showed an acyclovir deposition in the cornea greater than those of negatively charged liposomes and free acyclovir. From morphological observation of the cornea surface treated with liposomes, they suggested that positively charged liposomes formed a completely coated layer on the cornea surface. They concluded that liposomes would bind intimately on the cornea surface, leading to an increase of residence time. Therefore, positively charged liposomes resulted in an increase of acyclovir permeation through cornea.

2. Methods for the preparation of polymeric micro- or nanoparticles

2.1. General methods for the preparation of microparticles

In the early 1980s, nano-size range of polymeric dispersion was developed, which is called "latex carriers". Several methods was used to produce latex carriers such as solution emulsification, phase inversion, self emulsification [62]. Figure 6 presents two different methods commonly used for preparing latex systems. A typical emulsion polymerization method and a dispersion method [63]. During emulsion polymerization process, polymeric dispersion is formed by monomer reaction, and consumed monomer replaced by diffusion from outer phase of micelles. This method is limited by the presence of toxic compounds and residual monomers should removed after processing [64]. However, in case of solvent dispersion methods, polymer is already formed in aqueous phase [63]. For this reason, solvent dispersion method was more developed to produce polymeric dispersion.

Figure 6. Comparison of two different methods of latex preparation

Solvent dispersion method was developed with various formulation process, such as solvent evaporation (water immiscible organic solvent) (Figure 7) , emulsification diffusion (partially water miscible organic solvent) [65], and nanoprecipitation methods (water miscible organic solvent) [66, 67]. Number of micro/nanoparticles can be also produced by coacervation (phase separation), spray drying, and super critical fluids, solidified emulsion...

Figure 7. *Various solvent evaporation methods used for microparticle preparation depending on hydrophobicity of polymer and drug*

2.2. The solvent displacement method or Nanoprecipitation

The solvent displacement method is a straightforward procedure, which is based on the precipitation of a dissolved polymer in solution by addition to a solvent, lipophilic surfactant or drug containing solution [68].

In this method, the organic solvent should be a semi-polar water-miscible solvent, such as acetone or ethanol, and polymer should be soluble in solvent. Drug containing organic solution is poured or injected into an aqueous phase containing a stabilizer under stirring and nanoparticles are formed instantaneously by rapid solvent diffusion. After precipitation organic solvent is then eliminated from the suspension under reduced pressure. Even though precipitation or nanoprecipitation is often used to define this method, it is important to stress that the formation of nanoparticles is due to polymer aggregation in stabilized emulsion droplets. Apparently, nucleation and growth steps are not involved.

Properties of resulting particles related to the polymer concentration in the organic solvent. With low concentration of polymer, small-size particles can be produced easily. However, as polymer concentration is increased, large aggregations appear, and production of high concentration of nanoparticles is difficult [69]. The major limit to the application of this technique is represented by the difficulty of finding a drug/polymer/solvent/nonsolvent system in which nanoparticles are formed and the drug efficiently entrapped. In addition, this method is not suited for the encapsulation of water-soluble drugs, which quickly diffuse from the organic phase into water.

2.3. The salting-out technique

The salting-out technique, firstly applied to pseudolatexes, was adapted to the preparation of drug-loaded biodegradable nanoparticles. This method is based on the separation of a water-miscible solvent phase (e.g. acetone) from aqueous solutions promoted by a salting out effect. Hence this methods need supersaturation and it can be achieved by the adding of an antisolvent or electrolyte to the solution [70]. Water is added to the emulsion obtained by addition of an acetone solution of polymer and drug emulsified in an aqueous gel containing the salting-out agent and the colloidal stabilizer. As a consequence of dilution, acetone diffuses into water resulting in nanoparticles formation. Solvent and salting-out agents are then eliminated by cross-flow filtration. This procedure allows the incorporation of large amounts of drug with excellent yields, and procedure scale-up is fairly easy. However, this technique can be used only for loading lipophilic drugs. Moreover, the resulting crystals are small; however, it is easily agglomerated. Nevertheless, according to new experimental findings [71], it is possible to reduce or even eliminate the agglomeration in the presence of protective colloids or surfactants and/or by controlling the precipitation kinetics.

2.4. The solvent evaporation method

The solvent evaporation method is a well known technique for microencapsulation that basically consists in the formation of a oil in water emulsion (o/w) or multiple emulsion (w/o/w) [72]. Figure 8 presents process methods of the solvent evaporation. The inner

phase is constituted by a polymer solution in organic solvent, and continuous phase is an aqueous solution in which the polymer is insoluble. Several variables have been identified which can influence the properties of the microspheres, including drug solubility, internal morphology, solvent type, diffusion rate, temperature, polymer composition and viscosity, and drug loading [73-75]. This method is widely used for the preparation of micro and nanoparticles made of polysaccharides, aliphatic polyesters, such as PLA, PLGA, PGA, and other synthetic polymers such as PEG-copolymers... [76]. The solvent evaporation method may present some drawbacks. In fact, toxic chlorinated solvents, such as chloroform and methylene chloride are often used because of their water insolubility, easy emulsification, solubilizing properties, low boiling point. Moreover, the evaporation step can result in the agglomeration of microparticles. To avoid some of these problems, a modified procedure was developed for the preparation of PLGA nanoparticles, such as emulsification diffusion [77].

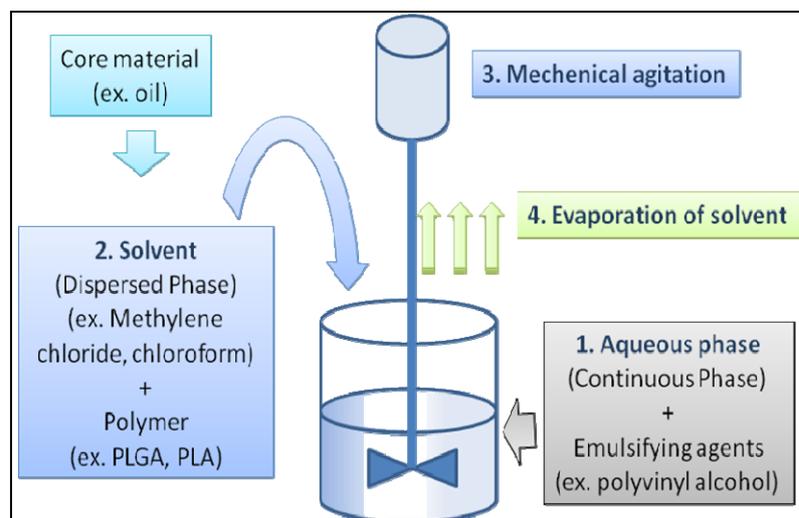


Figure 8. Schema of solvent evaporation

2.5. Emulsification diffusion

The emulsion diffusion method is a slight modification of the salting-out technique. It differs mainly because the organic solvent is only partially miscible with water, and it is previously saturated with water, in order to reach an initial thermodynamic equilibrium between water and the organic phase. After addition of water, solvent diffusion is observed, and micro/nanoparticle suspension is formed (Figure 9).

The emulsion diffusion technique is used to produce micro/nanoparticles based on biodegradable polymers. It is a two-step process based on the production of an emulsion, followed by a dilution leading to the deposition of the polymer around the droplets, thus, the formation of micro/nanoparticles. The size of the particles is a very important parameter, because it is one of the factors controlling the kinetics of drug release. The structure of the particle and the thickness of the polymer coating plays a major role in the protection of the drug and in the kinetic of drug release [78].

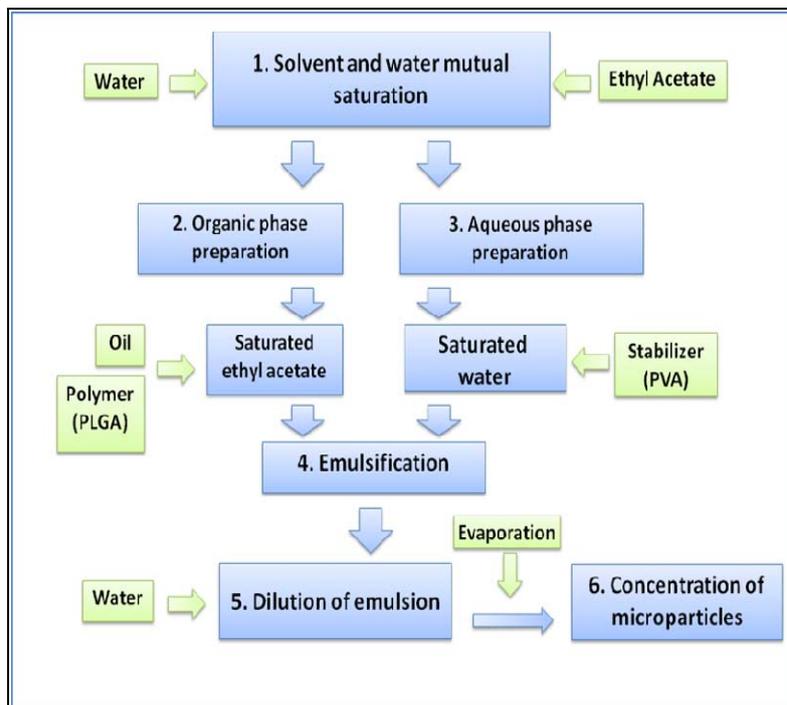


Figure 9. Schema of emulsification diffusion

3. Conclusion

Ocular administration is disturbed by several biological barriers. Recent development of therapeutic methods demonstrated a number of effective techniques. Iontophoresis is one of the interesting physical drug penetration enhancement techniques, and cyclodextrins, liposomes, and micro-nano particulate systems are widely investigated, and present good efficiency to improve membrane penetration and sustained concentration of drug. Above all these methods, micro-nano particulate systems, are one of the most interesting potential for the ophthalmic delivery of drug. A lot of methods for micro-nanoparticle preparation are described. However, among these methods, the parameters of the emulsification diffusion technique are easy to control, and non toxic organic solvent can be used. For this reason the emulsion diffusion method was retained in our study for the development of rifampicin loaded PLGA-microparticles for intra ocular injection after cataract surgery in order to prevent post-operative endophthalmitis.

Conclusion

Différents systèmes d'administration pour la voie ophtalmique peuvent donc être envisagés afin d'augmenter le temps de résidence du principe actif *in situ* et de contrôler sa vitesse de dissolution. Parmi eux les systèmes nano- et microparticulaires présentent l'avantage d'avoir des procédés de fabrication maîtrisés et reproductibles utilisant des polymères préformés comme la nanoprécipitation, l'émulsion-évaporation ou encore l'émulsion-diffusion qui sera retenue pour cette étude. Ces nano- ou microparticules permettent l'encapsulation de molécules lipophiles et hydrophiles, leur taille et la libération du principe actif peut par ailleurs être maîtrisés par leur formulation et leur procédé de fabrication. De plus elles peuvent être formées de polymères biodégradables et biocompatibles et présentent ainsi une bonne innocuité et une faible toxicité pour l'organisme.

Le développement de microparticules formées à partir d'un polymère biodégradable a donc était envisagé au cours de cette étude pour l'encapsulation de la rifampicine. Les résultats des travaux expérimentaux seront présentés dans la deuxième partie de ce manuscrit.

BIBLIOGRAPHIE

1. Zimmer, A.K., Zerbe H., Kreuter J., *Evaluation of pilocarpine-loaded albumin particles as drug delivery systems for controlled delivery in the eye I. In vitro and in vivo characterisation*. J. Control. Release, 1994. **32**: p. 57-70.
2. Budai, L., et al., *Gels and liposomes in optimized ocular drug delivery: Studies on ciprofloxacin formulations*. Int. J. Pharm., 2007. **343**(1-2): p. 34-40.
3. Miyazaki, D., et al., *Therapeutic Effects of Tacrolimus Ointment for Refractory Ocular Surface Inflammatory Diseases*. Ophthalmology, 2008. **115**(6): p. 988-992.e985.
4. Diebold, Y., et al., *Ocular drug delivery by liposome-chitosan nanoparticle complexes (LCS-NP)*. Biomaterials, 2007. **28**(8): p. 1553-1564.
5. Baeyens, V., et al., *Optimized release of dexamethasone and gentamicin from a soluble ocular insert for the treatment of external ophthalmic infections*. J. Control. Release, 1998. **52**(1-2): p. 215-220.
6. Molokhia, S.A., Jeong E.-K., Higuchi W. I., Li S. K. , *Examination of penetration routes and distribution of ionic permeants during and after transscleral iontophoresis with magnetic resonance imaging*. Int. J. Pharm., 2007. **335** p. 46–53.
7. Peng, C.-C., J. Kim, and A. Chauhan, *Extended delivery of hydrophilic drugs from silicone-hydrogel contact lenses containing Vitamin E diffusion barriers*. Biomaterials, 2010. **31**(14): p. 4032-4047.
8. Urtti, A., *Challenges and obstacles of ocular pharmacokinetics and drug delivery*. Adv. Drug Deliv. Rev., 2006. **58**(11): p. 1131-1135.
9. Le Boursais, C., et al., *Ophthalmic drug delivery systems--Recent advances*. Prog. Retin. Eye Res., 1998. **17**(1): p. 33-58.
10. Ogura, Y., *Drug delivery to the posterior segments of the eye*. Adv. Drug Deliv. Rev., 2001. **52**(1): p. 1-3.
11. Callegan, M.C., Hobden J. A., O'Callaghan R. J., Hill J. M., *Ocular drug delivery: a comparison of transcorneal iontophoresis to corneal collagen shields*. Int. J. Pharm., 1995. **123**: p. 173-179.
12. Yasukawa, T., Ogura Y., Tabata Y., Kimura H., Wiedemann P., Honda Y., *Drug delivery systems for vitreoretinal diseases*. Prog. Retin. Eye Res., 2004. **23** p. 253–281.

13. Kalia, Y.N., et al., *Iontophoretic drug delivery*. Adv. Drug Deliv. Rev., 2004. **56**(5): p. 619-658.
14. Eljarrat-Binstock, E. and A.J. Domb, *Iontophoresis: A non-invasive ocular drug delivery*. J. Control. Release, 2006. **110**(3): p. 479-489.
15. Anigbogu, A., Patil S., Singh P., Liu P., Dinh S., Maibach H., *An in vivo investigation of the rabbit skin responses to transdermal iontophoresis*. Int. J. Pharm., 2000. **200**(2): p. 195-206.
16. Bradley Phipps, J. and J.R. Gyory, *Transdermal ion migration*. Adv. Drug Deliv. Rev. **9**(2-3): p. 137-176.
17. Souied, E.H., et al., *Non-invasive gene transfer by iontophoresis for therapy of an inherited retinal degeneration*. Exp. Eye Res., 2008. **87**(3): p. 168-175.
18. Fattal, E. and A. Bochot, *Ocular delivery of nucleic acids: antisense oligonucleotides, aptamers and siRNA*. Adv. Drug Deliv. Rev., 2006. **58**(11): p. 1203-1223.
19. Bejjani, R.A., et al., *Electrically Assisted Ocular Gene Therapy*. Surv. Ophthalmol. . **52**(2): p. 196-208.
20. Eljarrat-Binstock, E., et al., *Transcorneal and transscleral iontophoresis of dexamethasone phosphate using drug loaded hydrogel*. J. Control. Release, 2005. **106**(3): p. 386-390.
21. Eljarrat-Binstock, E., et al., *Charged nanoparticles delivery to the eye using hydrogel iontophoresis*. J. Control. Release, 2008. **126**(2): p. 156-161.
22. Souied, E.H., Reid S.N.M., Piri N.I., Lerner L.E., Nusinowitz S., Farber D.B., *Non-invasive gene transfer by iontophoresis for therapy of an inherited retinal degeneration*. Exp. Eye Res., 2008. **87** p. 168–175.
23. Behar-Cohen, F.F., Parek J.-M., Pouliquen Y., Thillaye-Goldenberg B., Gourequ O., Heydolph O., Courtois Y. and De Kozak Y., *Iontophoresis of Dexamethasone in the Treatment of Endotoxin-Induced-Uveitis in Rats*. Exp. Eye Res., 1997. **65** p. 533-545.
24. Hao, J., Li S.K., Liu C.-Y., Kao W. W. Y., *Electrically assisted delivery of macromolecules into the corneal epithelium*. Exp. Eye Res. , 2009. **89**: p. 934–941.
25. GÜNGÖR, S., Delgado-Charro M. B., Ruiz-Perez B., Schubert W., Isom P., Moslemy P., Patane M. A., Guy R.H., *Trans-scleral iontophoretic delivery of low molecular weight therapeutics*. J. Control. Release, 2010. **147**: p. 225–231.
26. Zimmer, A., Kreuter J., *Microspheres and nanoparticules used in ocular delivery systems*. Adv. Drug Deliv. Rev., 1995. **16**: p. 61-73.

27. Moshfeghi, A.A., Peyman G.A., *Micro- and nanoparticulates*. Adv. Drug Deliv. Rev., 2005. **57** p. 2047-2052.
28. Bei, D., Meng J., Youan B. C., *Engineering nanomedicines for improved melanoma therapy: progress and promises*. Nanomedicine, 2010. **5**: p. 1385-1399.
29. Müller, R.H., et al., *Cytotoxicity of Solid Lipid Nanoparticles as a Function of the Lipid Matrix and the Surfactant*. Pharm. Res., 1997. **14**(4): p. 458-462.
30. Schwarz, C., et al., *Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery. I. Production, characterization and sterilization*. J. Control. Release, 1994. **30**(1): p. 83-96.
31. Almeida, A.J.R., Stephan Müller, Rainer H., *Peptide-loaded solid lipid nanoparticles (SLN): Influence of production parameters*. Int. J. Pharm., 1997. **149**(2): p. 255-265.
32. Siekmann, B. and K. Westesen, *Thermoanalysis of the recrystallization process of melt-homogenized glyceride nanoparticles*. Colloids Surf. B Biointerfaces, 1994. **3**(3): p. 159-175.
33. Seetapan, N., et al., *Rheological and morphological characterizations on physical stability of gamma-oryzanol-loaded solid lipid nanoparticles (SLNs)*. Micron, 2010. **41**(1): p. 51-58.
34. Huang, G., et al., *Solid lipid nanoparticles of temozolomide: Potential reduction of cardiac and nephric toxicity*. Int. J. Pharm., 2008. **355**(1-2): p. 314-320.
35. Lippacher, A., Muller R.H., and Mader K., *Preparation of semisolid drug carriers for topical application based on solid lipid nanoparticles*. Int. J. Pharm. , 2001. **214**: p. 9–12.
36. Bertram, J.P., Saluja S. S., McKain J., Lavik E. B., *Sustained delivery of timolol maleate from poly(lactic-co-glycolic acid)/poly(lactic acid) microspheres for over 3 months*. J. Microencapsul., 2008: p. 1–8.
37. Gavini, E., Chetoni P., Cossu M., Alvarez M.G., Saettone M.F., Giunchedi P., *PLGA microspheres for the ocular delivery of a peptide drug, vancomycin using emulsification/spray-drying as the preparation method: in vitro/in vivo studies*. Eur. J. Pharm. Biopharm., 2004. **57**: p. 207–212.
38. Hachicha, W., L. Kodjikian, and H. Fessi, *Preparation of vancomycin microparticles: Importance of preparation parameters*. International Journal of Pharmaceutics, 2006. **324**(2): p. 176-184.
39. Conti, B., Bucolo C., Giannavola C., Puglisi G., Giunchedi P., Conte U., *Biodegradable microspheres for the intravitreal administration of acyclovir: in vitro / in vivo evaluation*. Eur. J. Pharm. Sci., 1997 **5**: p. 287–293.

40. Merodio, M., Manuel Irache J., Valamanesh F., Mirshahi M., *Ocular disposition and tolerance of ganciclovir-loaded albumin nanoparticles after intravitreal injection in rats* Biomaterials 2002. **23**: p. 1587–1594.
41. Martínez-Sancho, C., Herrero-Vanrell R., Negro S., *Optimisation of aciclovir poly-lactide-co-glycolide microspheres for intravitreal administration using a factorial design study*. Int. J. Pharm., 2004. **273**(1-2): p. 45-56.
42. Pignatello, R., Bucolo C., Spedalieri G., Maltese A., Puglisi G., *Flurbiprofen-loaded acrylate polymer nanosuspensions for ophthalmic application*. Biomaterials, 2002. **23**: p. 3247-55.
43. Monem, A.S., Ali F. M., Ismail M.W., *Prolonged effect of liposomes encapsulating pilocarpine HCl in normal and glaucomatous rabbits*. Int. J. Pharm., 2000. **198**(1): p. 29-38.
44. Cortesi, R., Argnani R., Esposito E., Dalpiaz A., Scatturin A., Bortolotti F., Lufino M., Guerrini R., Cavicchioni G., Incorvaia C., Menegatti E., Manservigi R., *Cationic liposomes as potential carriers for ocular administration of peptides with anti-herpetic activity*. Int. J. Pharm., 2006. **317**(1): p. 90-100.
45. Ohta, Y., Yamasaki T., Niwa T., Majima Y. Ishiguro I., *Preventive effect of topical vitamin e-containing liposome instillation on the progression of galactose cataract. Comparison between 5-week- and 12-week-old rats fed a 25% galactose diet*. Exp. Eye Res., 1999. **68**: p. 747-755.
46. Musenga, A., Mandrioli R., Zecchi V., Luppi B., Fanali S., Raggi M.A., *Capillary electrophoretic analysis of the antibiotic vancomycin in innovative microparticles and in commercial formulations*. J. Pharm. Biomedical Analysis, 2006. **42**(1): p. 32-38.
47. Di Colo, G., Zambito Y., Burgalassi S., Nardini I., Saettone M. F., *Effect of chitosan and of N-carboxymethylchitosan on intraocular penetration of topically applied ofloxacin*. Int. J. Pharm., 2004. **273**(1-2): p. 37-44.
48. Fattal, E. and A. Bochot, *Ocular delivery of nucleic acids: antisense oligonucleotides, aptamers and siRNA*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2006. **58**(11): p. 1203-1223.
49. Monem, A.S., F.M. Ali, and M.W. Ismail, *Prolonged effect of liposomes encapsulating pilocarpine HCl in normal and glaucomatous rabbits*. Int. J. Pharm., 2000. **198**(1): p. 29-38.
50. Loftsson, T., Masson M., *Cyclodextrins in topical drug formulations: theory and practice*. Int. J. Pharm., 2001 **225** p. 15–30.
51. Loftsson, T., Järvinen T., *Cyclodextrins in ophthalmic drug delivery*. Adv. Drug Deliv. Rev., 1999. **36** p. 59–79.

52. <http://en.wikipedia.org/wiki/File:Beta-cyclodextrin3D.png>. (April 2009)
53. http://en.wikipedia.org/wiki/File:Gamma_CD_cone_shape.jpg. (April 2009)
54. Davies, N.M., Wang G., Tucker I. G., *Evaluation of a hydrocortisone:hydroxypropyl- β -cyclodextrin solution for ocular drug delivery*. Int. J. Pharm., 1997. **156**: p. 201–209.
55. Meisner, D., Mezei M., *Liposome ocular delivery systems*. Adv. Drug Deliv. Rev., 1995. **16**: p. 75-93.
56. Nordly, P., et al., *Immunity by formulation design: Induction of high CD8+ T-cell responses by poly(I:C) incorporated into the CAF01 adjuvant via a double emulsion method*. J. Control. Release, 2011. **150**(3): p. 307-317.
57. Maitani, Y., et al., *Cationic liposome (DC-Chol/DOPE = 1:2) and a modified ethanol injection method to prepare liposomes, increased gene expression*. Int. J. Pharm., 2007. **342**(1-2): p. 33-39.
58. Wacker, M. and R. Schubert, *From mixed micelles to liposomes: Critical steps during detergent removal by membrane dialysis*. Int. J. Pharm., 1998. **162**(1-2): p. 171-175.
59. Grohganz, H., I. Tho, and M. Brandl, *Development and in vitro evaluation of a liposome based implant formulation for the decapeptide cetorelix*. Eur. J. Pharm. Biopharm., 2005. **59**(3): p. 439-448.
60. <http://en.wikipedia.org/wiki/File:Liposome.jpg>. (April 2009)
61. Lawa, S.L., Huang K.J., Chiang C.H., *Acyclovir-containing liposomes for potential ocular delivery corneal penetration and absorption*. J. Control. Release 2000. **63**: p. 135–140.
62. Banker, G.S., *Pharmaceutical coating composition, and preparation and dosage so coated*. 1982: U.S.
63. Gurny, R., Boye T. and Ibrahim H., *Ocular therapy with nanoparticulate systems for controlled drug delivery*. J. Control. Release, 1985. **2** (353-61).
64. Gesler, R.N., Garvin P.J., Klamer B., Robinson R.U., Thompson C.R., Gibson W.R., Wheeler F.C. and Carlson R.G., *The biologic effects of polystyrene latex particles administered intravenously to rats - A collaborative study*. Bull. Parenter Drug Assoc, 1973. **27** p. 101-113.
65. Quintanar-Guerrero, D., et al., *Influence of stabilizing agents and preparative variables on the formation of poly(-lactic acid) nanoparticles by an emulsification-diffusion technique*. Int. J. Pharm., 1996. **143**(2): p. 133-141.

66. Fessi, H., Devissaguet, J.P., Puisieux, F. and Thies, C., *Process for the preparation of dispersible colloidal systems of a substance in the form of nanoparticles*. . 1992: US Patent
67. Thioune, O., et al., *Preparation of pseudolatex by nanoprecipitation: Influence of the solvent nature on intrinsic viscosity and interaction constant*. Int. J. Pharm., 1997. **146**(2): p. 233-238.
68. Jung, T., A. Breitenbach, and T. Kissel, *Sulfobutylated poly(vinyl alcohol)-graft-poly(lactide-co-glycolide)s facilitate the preparation of small negatively charged biodegradable nanospheres*. J. Control. Release, 2000. **67**(2-3): p. 157-169.
69. De Labouret, A., Thioune O., Fessi H., Devissaguet J. P. and Puisieux F., *Application of an original process for obtaining colloidal dispersions of some coating polymers. Preparation, characterization, industrial scale-up*. Drug Dev. Ind. Pharm., 1995 **21** p. 229-241.
70. Tóth, J., A. Kardos-Fodor, and S. Halász-Péterfi, *The formation of fine particles by salting-out precipitation*. Chem. Eng. Processing, 2005. **44**(2): p. 193-200.
71. Karpinsky, P.H., *Maneuvering through the Complexities of Batch Precipitation*. 1998, Tokyo, Japan: Proc. Int. Symp. Ind. Cryst.
72. Song, M., Li N., Sun S., Tiedt L.R., Liebenberg W., de Villiers M. M., Bron A., Creuzot-Garcher C., *Effect of viscosity and concentration of wall former, emulsifier and pore-inducer on the properties of amoxicillin microcapsules prepared by emulsion solvent evaporation*. II Farmaco, 2005 **60**: p. 261–267.
73. Benoit, J.P., Painbeni T., Venier-Julienne M.C. . *Internal morphology of biodegradable BCNU-loaded microspheres*. in *Proc. Int. Symp. Controlled Release Bioact. Mater.* 23rd. 1996.
74. Bodmeier, R., McGinity J.W., *Solvent selection in the preparation of poly(DL-lactide) microspheres prepared by the solvent evaporation method*. Int. J. Pharm., 1988. **43**: p. 179–186.
75. Bodmeier, R., McGinity J.W. , *Poly(lactic acid) microspheres containing quinidine base and quinidine sulfate prepared by the solvent evaporation method. III. Morphology of the microspheres during dissolution studies*. J. Microencapsulation 1988. **5**: p. 325–330.
76. Dalwadi, G., Sunderland B., *An ion pairing approach to increase the loading of hydrophilic and lipophilic drugs into PEGylated PLGA nanoparticles*. Eur. J. Pharm. & Biopharm., 2009. **71**: p. 231-242.

77. Quintanar-Guerrero, D., Tamayo-Esquivel D., Ganem-Quintanar A., Allemann, E., Doelker E., *Adaptation and optimization of the emulsification-diffusion technique to prepare lipidic nanospheres*. Eur. J. Pharm. Sci., 2005. **26**: p. 211–218.
78. Guinebretiere, S., et al., *Nanocapsules of biodegradable polymers: preparation and characterization by direct high resolution electron microscopy*. Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications, 2002. **21**(1-2): p. 137-142.

PARTIE 2

TRAVAUX PERSONNELS

PARTIE 2

Chapitre 1

DEVELOPMENT OF A NOVEL NANOCAPSULE FORMULATION BY EMULSION-DIFFUSION COMBINED WITH HIGH HYDROSTATIC PRESSURE

Résumé

L'émulsion diffusion est une technique d'encapsulation apparue dans les années 1990 et pouvant faire l'objet de nombreuses applications notamment dans le domaine pharmaceutique du fait de sa très bonne reproductibilité et de sa transposition d'échelle aisée. Elle permet la préparation de nano ou microparticules polymères à partir d'un polymère préformé, basée sur une première étape d'émulsification d'une phase organique partiellement miscible à l'eau (saturée en eau), renfermant le polymère et le principe actif, dans une phase aqueuse externe (saturée en solvant organique), suivie d'une étape de dilution entraînant la diffusion du solvant vers la phase externe et donc l'insolubilisation du polymère. Toutefois, ce procédé présente quelques inconvénients puisqu'il nécessite notamment l'addition d'une grande quantité d'eau lors de l'étape de dilution qui devra ensuite être éliminée afin de concentrer au maximum la suspension de microparticules. Or, lors d'un procédé d'émulsion diffusion classique cette étape de concentration sera longue et donc très limitante pour le procédé d'encapsulation. L'objectif de cette première partie de l'étude expérimentale porte donc sur la mise au point d'un procédé d'encapsulation basée sur l'émulsion-diffusion, mais pour lequel l'étape de dilution sera remplacée par un traitement sous haute pression permettant d'entraîner la diffusion du solvant organique vers la phase externe. Ce nouveau procédé est appliqué pour cette étude à la formulation de nanoparticules de rifampicine.

Après une première phase d'émulsification de la phase organique saturée d'eau dans la phase aqueuse à l'Ultraturrax® à une vitesse de 11000 rpm, l'émulsion est pressurisée afin d'engendrer la diffusion du solvant organique vers la phase aqueuse. Différentes pressions ont été appliquées sur l'émulsion, 100, 200 et 300 MPa, ainsi que différents temps de traitement pour chaque pression, 300, 600, 900 ou 1200 s. La taille des

particules est ensuite mesurée par granulométrie laser et leur morphologie observée par microscopies électroniques à balayage et à transmission.

La taille moyenne des nanoparticules obtenues après pressurisation de l'émulsion varie de 300 et 450 nm selon la pression appliquée et le temps du traitement. Les particules de plus petite taille (300 nm) sont obtenues par des traitements sous faible pression (100 MPa) et pendant un temps court (<60 s). La taille des particules augmentent lorsqu'une pression plus importante ou un temps de traitement plus long sont appliqués : un diamètre moyen d'environ 450 nm est obtenu après un traitement à 300 MPa pendant 1200 s.

L'application d'une forte pression hydrostatique entraîne la vaporisation du solvant organique et ainsi la diffusion de solvant vers la phase externe engendrant ainsi la précipitation du polymère dans la phase interne pour former les nanoparticules.

Les résultats de cette étude ont montré qu'il était possible, d'obtenir des particules par adaptation du procédé d'émulsion diffusion classique, en traitant l'émulsion sous haute pression afin d'éliminer le solvant organique. La formation de nanoparticules avec des caractéristiques maîtrisées nécessite toutefois l'utilisation de conditions précises de pression et de temps de traitement. Cette méthode représente donc une bonne alternative au procédé classique d'émulsion-diffusion pour la préparation de particules polymères.

Development of a novel nanocapsule formulation by emulsion-diffusion combined with high hydrostatic pressure

MI-YEON LEE¹, SANG-GI MIN², SANDRINE BOURGEOIS¹, & MI-JUNG CHOI³

¹Université de Lyon, Lyon, France, ²Department of Food Science and Biotechnology of Animal Resources, Konkuk University, Seoul, Korea, and ³National Nanotechnology Center (NANOTEC), National Science and Technology Development Agency (NSTDA), Pathumthani, Thailand

(Received 10 April 2008; accepted 9 May 2008)

Abstract

A common method used to prepare polymeric nanoparticles in pharmaceutical technology is emulsion-diffusion. However, this method has several disadvantages due to the long duration of the process. At the diffusion step of conventional emulsion-diffusion, high pressure treatment could replace the addition of great quantities of water resulting in diffusion of the solvents from the internal phase to the external phase. The objective of the present study was to develop a novel method for nanoparticle formulation by combining high pressure treatment with the emulsion-diffusion method to avoid an additional diffusion step in the aqueous phase. After emulsification at 11 000 rpm, the emulsions were pressurized at 100, 200 and 300 MPa, each for 300, 600, 900 or 1200 s. The mean size and morphology of the nanoparticles were analysed by Mastersizer[®], TEM and SEM. The mean size of pressurized emulsion nanoparticles was the same at 100 MPa for holding times up to 600 s. Also, the pressurized emulsion nanoparticle size increased and the peak and width of the size distribution curve was higher and slightly narrower depending on the pressure and the holding time. This study shows that pressure treatment can produce polymer membranes surrounding the oil surface owing to the precipitation of PCL, inducing the diffusion of solvent from the interior to the exterior based on TEM images. From these results, it is believed that high pressure treatment should be considered as a successful alternative for preparing nanoparticles.

Keywords: Novel formulation, nanocapsule, high pressure, emulsion-diffusion method

Introduction

In recent decades there has been increased interest in the use of nanoparticles for drug delivery applications. Nanoparticles are colloidal-sized particles with diameters ranging from 10–1000 nm and are described both as nanospheres and nanocapsules. The difference between these two forms lies in the morphology and body structure. Nanospheres have a matrix-type structure. Drugs or tracers may be adsorbed to their surface, entrapped in the particle or dissolved in it. Nanocapsules have a polymeric shell and an inner liquid core. In this case, the active substances are usually dissolved in the inner core, but may also be adsorbed to their surface (Limayem et al. 2004; Johnsen and Schmid 2007; Letchford and Burt 2007; Moinard-Chécot et al. 2008).

Among the various formulation methods, the emulsion-diffusion method is recommended for drug delivery systems by means of biodegradable polymer nanoparticles because of their versatility in pharmaceutical dosages. Moinard-Chécot et al. (2008) reported that this technique has clear advantages compared to the other current methods, such as the use of pharmaceutically acceptable organic solvents, high yields of encapsulation, high reproducibility, better control of particle size and ease of scaling up production.

The emulsion-diffusion process involves the emulsification of a partially water-miscible solvent (previously saturated with water) containing the polymer in an aqueous phase (previously saturated with the solvent) with a stabilizer (Quintanar-Guerrero et al. 1996, 1999; Le Roy Boehm et al. 2000). The subsequent addition of

Correspondence: Mi Jung Choi, National Nanotechnology Center (NANOTEC), National Science and Technology Development Agency (NSTDA), Pathumthani 12120, Thailand. Tel.: +66-2-564-7100 (ext 6628). Fax: +66-2564-6981. E-mail: mijung@nanotec.or.th

water to the system causes the diffusion of solvent into the external phase, resulting in the aggregation of polymer on nanoparticles. However, it is necessary to remove the solvent and a considerable amount of water in order to obtain a high polymer concentration in the final dispersion. Thus, this final purification step takes a long time due to the elimination of a great quantity of water.

At present, interest in various high pressure applications is growing in areas of research such as reaction control in chemical engineering (Klärner 1989), pharmaceutical and medical applications (Meyer-Pittroff 2002) and food processing and sterilization (Hong et al. 2005; Park et al. 2006). Some researchers have studied the diffusion phenomenon in relation to hydrostatic pressure (Byun et al. 2006; Machayekhi et al. 1996; Chattopadhyay et al. 2001; Moroz et al. 2001; Gusakov and Murin 2003). Among these investigations, of particular interest is the high-pressure behaviour of diffusing species in the molecular-sieves of microporous solids. For example, in the case of zeolite in water, a strong increase in H₂O diffusive mobility has been revealed along with the transition to the high-pressure phase (Moroz et al. 2001). From this theory of the diffusion effect of high pressure, high pressure treatment was applied as a substitute for water addition to induce the diffusion of organic solvents during the emulsion-diffusion procedure. Consequently, the total processing time should be economized by the resulting omission of evaporation processing for the removal of water. Therefore, high hydrostatic pressure treatment was substituted in place of the addition of water for inducing the diffusion process.

The aim of the present study is to develop a novel technique for the formulation of nanocapsules using high pressure treatment based on the conventional emulsion-diffusion method. In order to do this, this study investigated the precipitation of PCL polymer at various high pressure levels as a function of holding time at the diffusion stage during the emulsion-diffusion procedure. Subsequently, the sizes and morphology of nanocapsules were analysed using a light scattering sizer, TEM and SEM.

Materials and methods

Materials

Rifampicin was supported from Sanofi Aventis (Lyon, France) as an active substance. Polycaprolactone (PCL, Mw = 80 000, Sigma-Aldrich, Missouri) was selected as the coating polymer and ethyl acetate (EA) was used as the PCL chemical solvent. Pluronic[®] F68 (Poloxamer 188, Mw = 8400, Sigma, Missouri) was chosen as the stabilizer. Miglyol[®] 812 (CONDEA Chemie GmbH, Hamburg, Germany), which is composed of caprylic/capric triglycerides, was added as the main component of the nanoparticle core. All reagents were of chemical grade and used without further purification.

Methods

High hydrostatic pressure treatment. High hydrostatic pressure treatment was carried out in high pressure multi-vessel equipment (Figure 1) designed for laboratory scale experiments. The apparatus consists of four high pressure vessels (HPV-II; Hiptec,

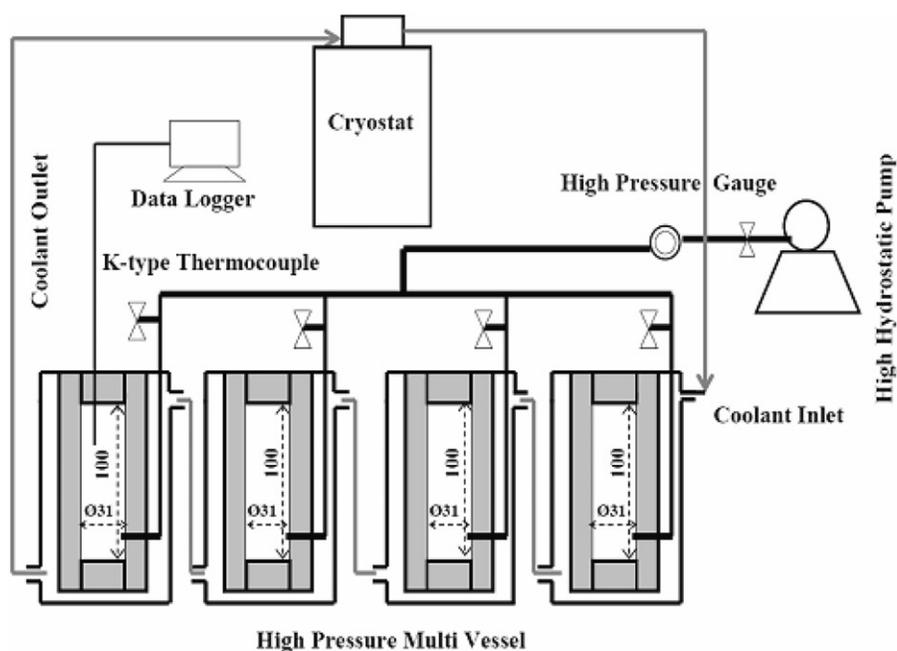


Figure 1. Schematic diagram of the high pressure lab-scale multi-vessel system.

Busan, Korea) connected with a hydrostatic pump (HSF-300; Haskel, California). Ethyl alcohol was used as the pressure transmitting fluid from a hydro-pneumatic pump. Coolant circulated through an external cooling jacket connected to a cryostat (FP-80; Julabo, Seelbach, Germany) to control the temperature during high pressure treatment. Temperature profiles of nano-suspensions were collected by a data acquisition system (MV-100; YOKOGAWA, Tokyo, Japan) with a K-type thermocouple and a sampling interval of 1 s. The accuracy of temperature monitoring was better than $\pm 0.2^\circ\text{C}$.

Preparation of nanocapsules

Conventional emulsification-diffusion method. Conventionally, nanocapsules are prepared by the emulsion-diffusion method as previously described (Quintanar-Guerrero et al. 1996). Briefly, Rifampicin, Miglyol[®] 812 and PCL were dissolved in ethyl acetate saturated with water and this organic phase was then emulsified with aqueous solution prior to saturation with ethyl acetate containing Pluronic[®] F68 using a high-speed homogenizer (Ultra-Turrax T25, IKA Labortechnik, Germany) at 11 000 rpm for 5 min. Finally, a great quantity of distilled water was added to this emulsion to induce the diffusion of ethyl acetate from the internal to external phase for the precipitation of the polymer surrounding oil phase and to form smaller nanocapsules. Ethyl acetate and a great quantity of water were eliminated by evaporation (Rotavapor[®] R210, Büchi Labortechnik AG, Postfach, Switzerland) under reduced pressure at 30 torr.

Emulsification-diffusion combined with high hydrostatic pressure. In order to reduce the conventional emulsification-diffusion procedure, high hydrostatic pressure treatment was substituted for the great amount of water added at the diffusion stage to induce precipitation of the PCL polymer on the surface of oil droplets. This diffusion step followed the emulsification stage. Figure 2 illustrates the sequence of preparation. Emulsions prepared by high-speed homogenization (Ultra-Turrax[®] T25, IKA Labortechnik, Germany) at 11 000 rpm for 5 min were pressurized at 100, 200 and 300 MPa for 300, 600, 900 or 1200 s. These pressurized emulsions were purified by eliminating the ethyl acetate by evaporation (Rotavapor[®] R210, Büchi Labortechnik AG, Postfach, Switzerland).

Measurement of particle size. Particle size and the distribution of emulsion droplets were determined by measuring light scattering (Mastersizer[®] S, MAM 5005, Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK).

Transmission electron microscopy (TEM). This study observed the morphology and structure of nanocapsules using a transmission electron microscope (JEM1010, JEOL, Tokyo, Japan) operated at 80 kV. For specimen preparation, a drop of the diluted nanocapsules suspensions were directly deposited on the film grid (300 mesh) without staining and observed after drying. The nanocapsules were fixed on the carbon film of the grid by the stabilizer polymer.

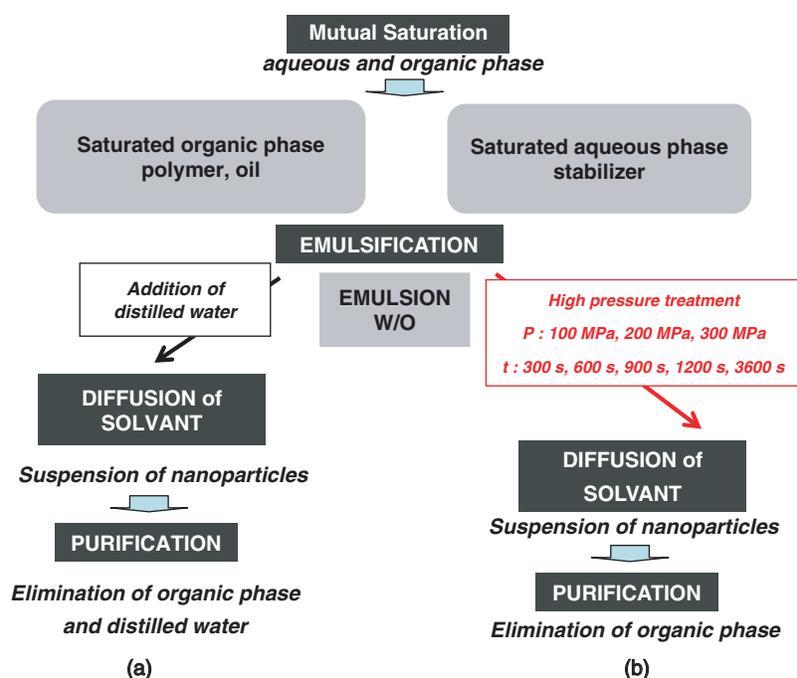


Figure 2. Schematic diagram of the conventional emulsification-diffusion method (a) and the emulsification-diffusion method with high pressure treatment (b).

Scanning electron microscopy (SEM). The surface structures of nanocapsules prepared conventionally and with high hydrostatic pressure were investigated by scanning electron microscopy (E-1010, Hitachi Science System Ltd., Hitachinaka, Japan). The freeze-dried nanocapsules were cut into rectangular forms ($5 \times 3 \times 2$ mm) and an ion sputter was used to gold-coat the samples.

Statistical analysis. The data were analysed by ANOVA using the SAS statistical program 9.1 (SAS Institute, Cary, NC). Differences among the means were compared using Duncan's Multiple Range test and the correlations between independent variables and measured values were calculated as Pearson's correlation coefficients. Each treatment had three replicate determinations.

Results and discussion

Influence of high pressure levels and holding time on size distributions of nanocapsules

Figure 3 represents the distribution of nanocapsules sizes depending on the pressurization holding time during the diffusion step after emulsification. After pressurization at 100 MPa, the nanoparticle sizes ranged from 100–10 000 nm with holding times of 300 and 600 s. With 900 and 1200 s holding times, the width was slightly narrower and the height of their distribution was slightly increased (Figure 3(a)). In contrast, the nanocapsules were more aggregated with increased holding times at 300 MPa. With holding times of 900 and 1200 s, the tail of the peak was in the range of 1–10 μ m (Figure 3(b)).

The influence of high pressure holding time (specifically, during the diffusion stage) on nanocapsules mean size is presented in Figure 4. Particle sizes were in the range of 300–450 nm for all preparation methods. In the control, the size of nanocapsules prepared by the conventional emulsion-diffusion method was 330 nm. With pressurization for 300 s, the particle sizes were not significantly different even at increased pressure levels. In contrast, the particle sizes with pressurization for 600, 900 and 1200 s were significantly influenced by increased pressure levels ($p < 0.05$). At 100 MPa of pressure, nanocapsules size did not change due to increasing the holding time from 300 to 1200 s (indicated by upper-case letters in Figure 4). Otherwise, the mean size of nanocapsules prepared at 200 and 300 MPa significantly expanded in relation to the holding time. From these results, the sizes of nanocapsules were slightly aggregated depending on increasing pressure levels and pressurization holding time.

On the other hand, the stability of loaded Rifampicin was more efficient under lower pressure level and short pressure holding time at the range of smaller size.

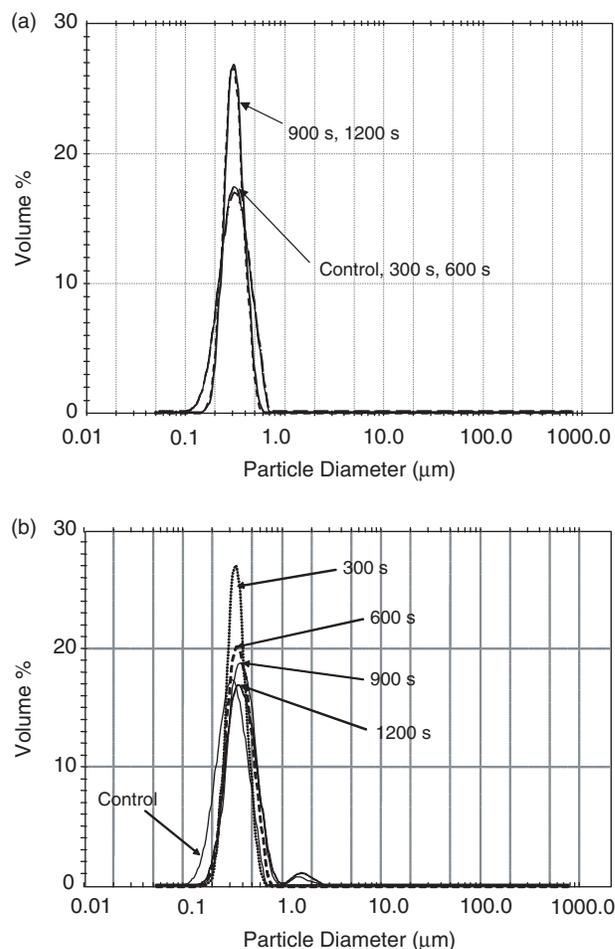


Figure 3. Distribution of particle size depending on the holding time, Control: nanocapsules prepared by the conventional emulsification-diffusion method, nanocapsules pressurized at 100 MPa (a) and 300 MPa (b) after emulsification.

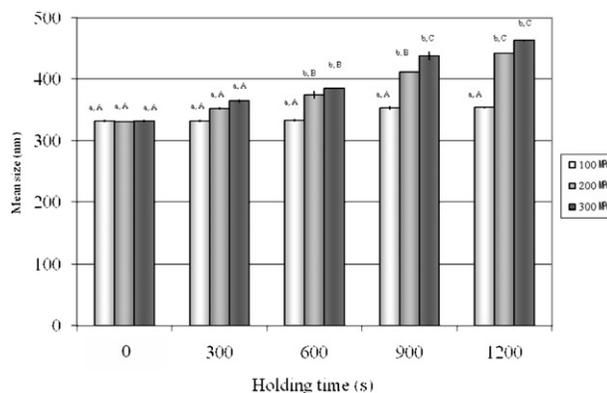


Figure 4. Changes in mean size of nanocapsules depending on the holding time at different high pressure levels. 0s: Nanocapsules prepared by the conventional emulsification-diffusion method. (a–b) Means with different superscripts within the same conditions of pressure are significantly different ($p < 0.05$). (a–c) Means with different superscripts within the same conditions of holding time are significantly different ($p < 0.05$).

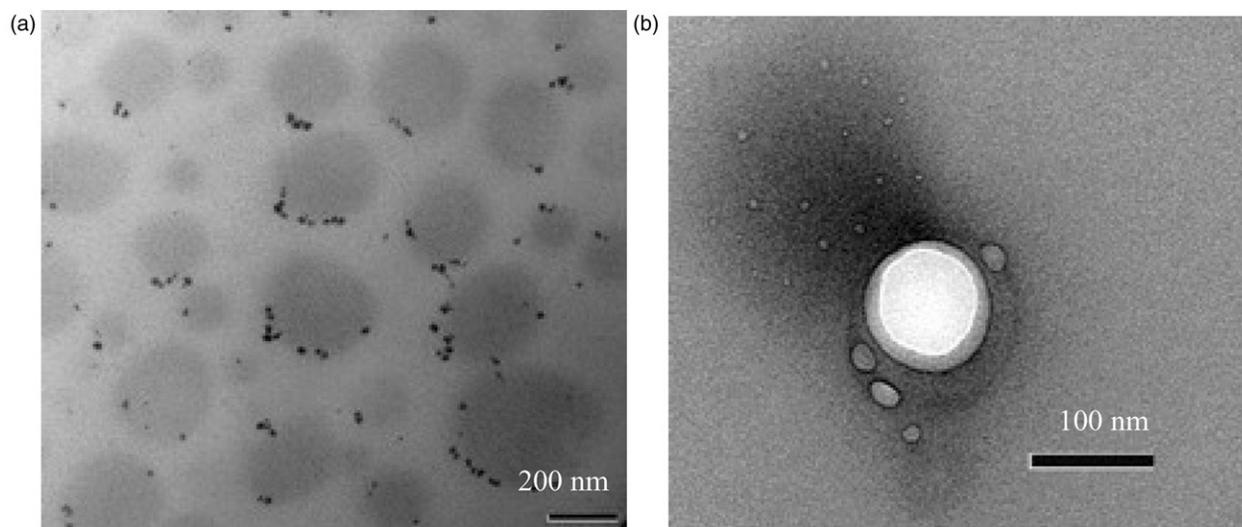


Figure 5. TEM images of O/W emulsions before the diffusion process (a) and nanocapsules prepared by the conventional emulsification-diffusion method (b).

TEM analysis

In order to determine whether the PCL polymer formed a membrane surrounding the oil phase, the morphology of each nano-emulsion was observed by TEM before the diffusion step for nanocapsules prepared by both the conventional emulsification-diffusion method and with pressurization to induce diffusion (Figures 5 and 6). All images showed that the morphology of nanocapsules was spherical. Nanocapsules before performing the diffusion process did not appear to have a polymer membrane (Figure 5(a)). On the contrary, nanocapsules prepared by the conventional method clearly presented a PCL membrane of Miglyol[®] oil. The nanocapsules membranes were extremely smooth and the thickness was homogeneous and intact, as shown in Figure 6.

With pressurization treatment to induce the diffusion of ethyl acetate, a membrane was not produced at 100 MPa for 300 s. In some cases, the morphology showed a polydispersed oil phase without a PCL polymer wall (Figure 6(a)). Otherwise, a membrane was observed with polymer treated at 100 MPa for 1200 s. At 200 and 300 MPa, nanocapsules showed a thin layer around the oil phase with holding times of 300 and 1200 s (Figures 6(c–f)). Therefore, it was reasoned that high pressure processing can promote the diffusion of the organic phase resulting in the precipitation of a PCL membrane for the encapsulation of oil with a sufficiently high pressure holding time.

However, nanoparticles pressurized at 200 and 300 MPa for 1200 s did not endure the stress of high pressure as shown by breaks in weak and thin membranes resulting in oil release from the interior (Figures 6(d) and (f)). In addition, the layer became

thinner, uneven and non-round in shape (Figure 6(d)). Thus, the membrane of nanoparticles should survive at high pressure for a short time, however if the holding time is prolonged, the morphology of nanoparticles is not stable or resistant based on TEM images.

SEM analysis

This study compared the structure of nanoparticles surfaces between conventionally prepared nanocapsules and high pressure prepared samples using scanning electron microscopy. Figure 7(a) shows the surface of nanoparticles which were prepared by the emulsification-diffusion method involving the addition of a great quantity of distilled water. According to this image, the nanoparticles were partially aggregated and partially stable, round and smooth in form. Figure 7(b) presents nanocapsules prepared by pressurization at 200 MPa for 1200 s. The surface morphology shows a rugged and rough form. At higher magnification, it could be seen that the nanocapsules structure had shrunk on the concave surface and the convex particle boundary (Figure 7(c)); it became smaller in size as a result of high pressure treatment, because the morphology was changed by high pressure treatment.

Discussion

The TEM images obtained for nanocapsules produced with high pressurization vs water addition enables one to conclude that the aggregation of PCL polymer on the oil surface is caused by the diffusion of ethyl acetate due to high pressure. Gusakov and Murin (2003) have experimented with oxygen diffusion rates in crystalline silicon both at normal and high hydrostatic pressure. They have shown that hydrostatic pressure

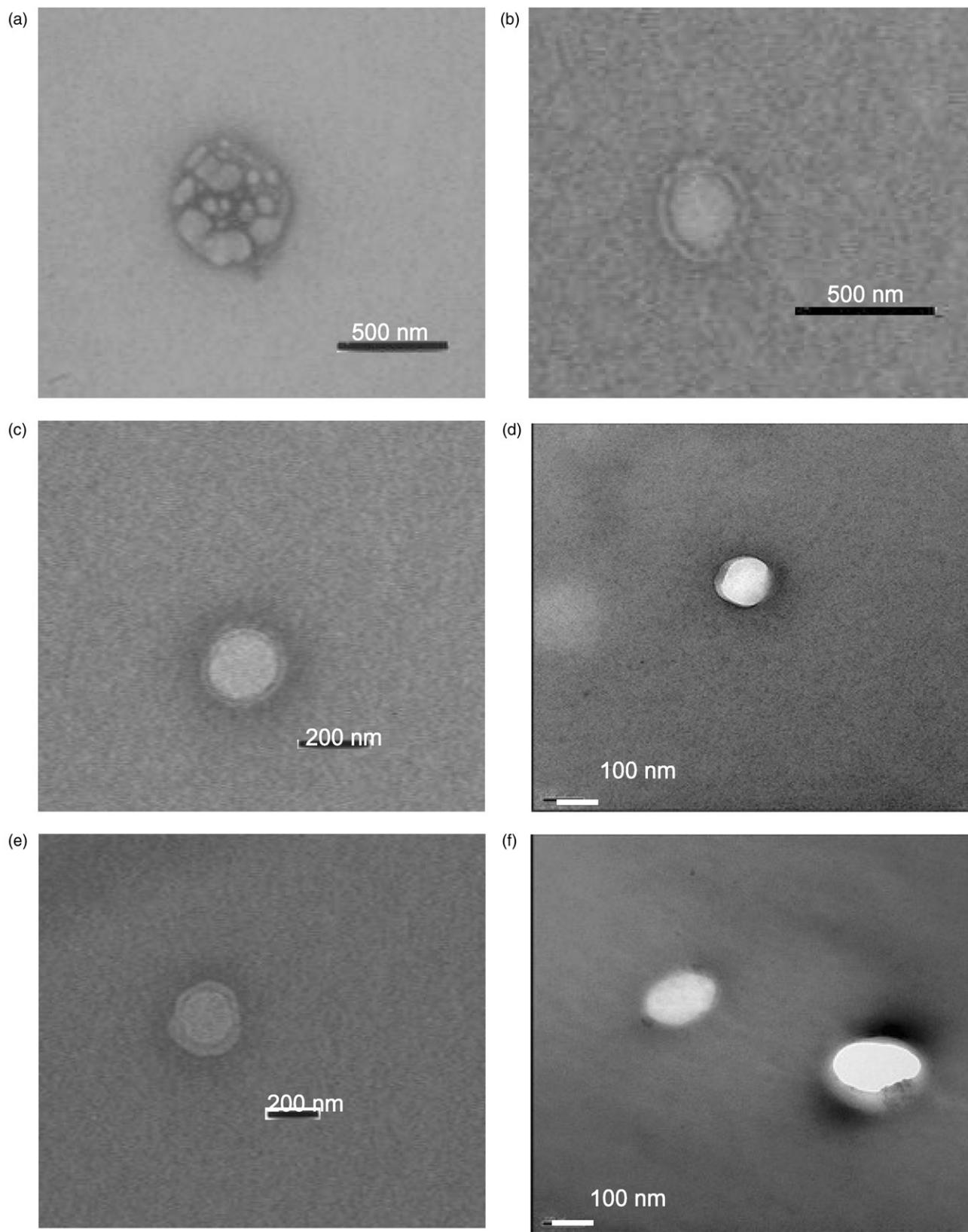


Figure 6. TEM images of nanocapsules prepared by the conventional emulsion-diffusion method and the high pressurized diffusion method, (a) 100 MPa, 300 s, (b) 100 MPa, 1200 s, (c) 200 MPa, 300 s, (d) 200 MPa, 1200 s, (e) 300 MPa, 300 s and (f) 300 MPa, 1200 s.

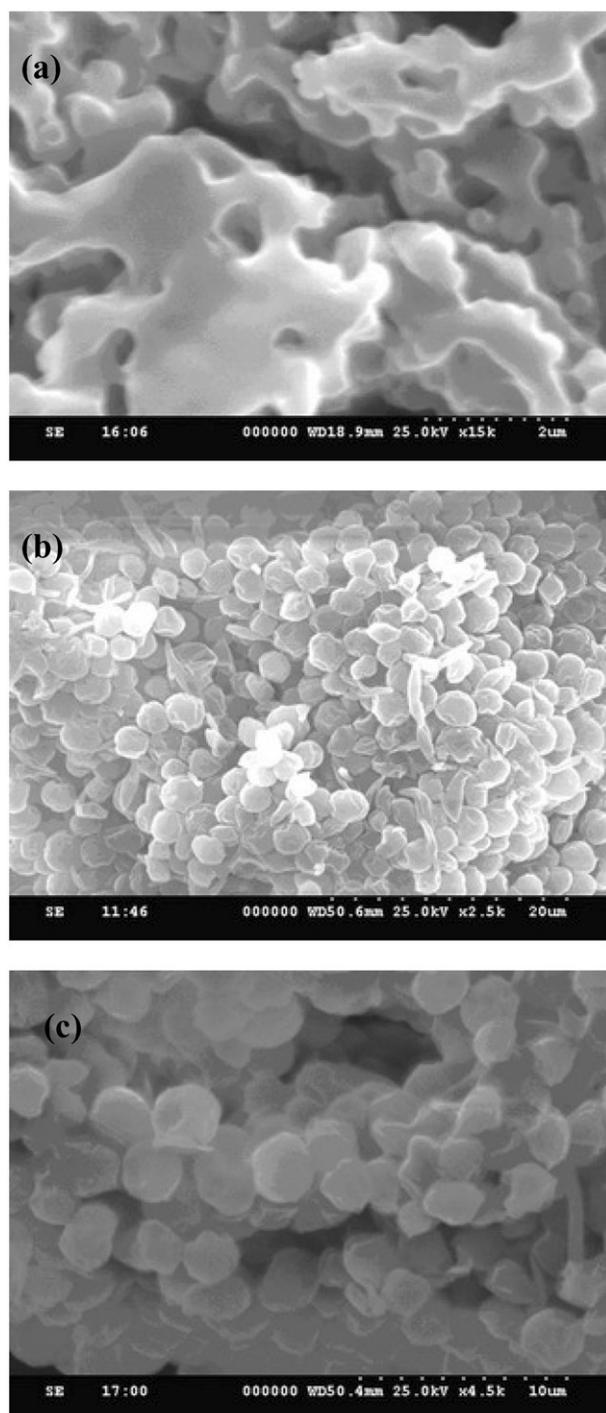


Figure 7. SEM images of nanocapsules prepared by the conventional emulsification-diffusion method (a) and the high pressurized diffusion method at 200 MPa for 1200 s (b and c).

leads to a decrease in the diffusion potential barrier and, accordingly, to an increase in the diffusion coefficient. In addition, the vapour-liquid equilibrium of the carbon dioxide-ethyl acetate systems at pressures from 2.96–11.79 MPa and temperatures from 313–393 K have been reported by Tina et al. (2004).

Therefore, it was assumed that the ethyl acetate should be transformed from liquid to vapour or

liquid-vapour state, namely a supercritical fluid state under high pressure treatment. Therefore, ethyl acetate might diffuse easily from the internal oil phase to the external aqueous phase of the emulsion based on TEM observations.

This study also investigated the various causes of the shrinkage of nanocapsules, such as osmotic effects. There were also some cases of broken PCL membranes due to high pressure or prolonged pressurization holding times. Wang and Li (2003) studied the shrinkage of gas-filled spherical voids in grains under hydrostatic pressure. It has been reported that high hydrostatic pressure may effectively accelerate the shrinkage rate of the voids. Therefore, high hydrostatic pressure may not only effectively diffuse the ethyl acetate to precipitate the PCL polymer on the oil boundary, but may also cause the shrinkage phenomena. The other reason why nanocapsules were shrunk after high pressure treatment should be related to the pressure gradient between the inside and outside of the nanocapsule. If the pressure of the vessel is released after treatment, the pressure level outside the nanocapsule is lower than in the core of the nanocapsule. Immediately, the pressure difference between the inside and the outside of polymer membrane might be equalized. An image of the nanocapsules before diffusion showed that the thickness of the membrane is not homogeneous. This pressure gradient could play a key role in mass transport from the inside to the outside of the nanocapsule. Thus, the polymer membrane is partly broken and shrunk and the nanocapsules are agglomerated easily to each other.

However, we can also consider the possibility of partial nanocapsules formation at the emulsion step prior to the diffusion process not only for hydrostatic pressure diffusion. Guinebretière et al. (2002) reported that some nanocapsules can also be formed at the emulsion step due to partial solvent evaporation, which could explain the peak observed in the size distribution for the emulsion.

Conclusions

High hydrostatic pressure may successfully diffuse ethyl acetate for preparing nanocapsules resulting in the aggregation of PCL polymer. In addition, the sizes of nanocapsules were slightly aggregated on the increment of high pressure level and pressurization time, particularly, at 300 MPa and 1200 s of pressurization holding time. Accordingly, the pressure must be less than a critical high pressure level and there are limits to the pressurization holding time. Nanocapsules might be stable below the critical value, whereas they will collapse above it. Nevertheless, the efficiency of PCL precipitation should be considered a subject for continued research.

Acknowledgements

This work was supported by the Korea Research Foundation Grant funded by the Korean Government (MOEHRD, Basic Research Promotion Fund) (KRF-2007-351-F00025). This study was partially supported by a grant from Brain Korea 21 Project. The authors wish to thank Mr Choi, Ik-Hyun and Miss Seo, Eun-Ju for their contributions.

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

References

- Byun HS, Choi MY, Lim JS. 2006. High-pressure phase behaviour and modelling of binary mixtures for alkyl acetate in supercritical carbon dioxide. *J Supercrit Fluids* 37:323–332.
- Chattopadhyay PP, Pabi SK, Manna I. 2001. On the enhancement of diffusion kinetics in nanocrystalline materials. *Mater Chem Phys* 68:80–84.
- Choi MJ, Briancon S, Andrieu J, Min SG, Fessi H. 2004. Effect of freeze-drying process conditions on the stability of nanoparticles. *Drying Technol* 22:335–346.
- Guinebretire S, Briancon S, Fessi H, Teodorescu VS, Blanchin MG. 2002. Nanocapsules of biodegradable polymers: Preparation and characterization by direct high resolution electron microscopy. *Mater Sci Eng C* 21:137–142.
- Gusakov V, Murin L. 2003. Effect of pressure on oxygen diffusion jump in Si: Quantum-chemical simulations. *Physica B* 340–342:773–776.
- Hong GP, Park SH, Kim JY, Lee SK, Min SG. 2005. Effects of time-dependent high pressure treatment on physico-chemical properties of pork. *Food Sci Biotechnol* 6:808–812.
- Johnsen H, Schmid RB. 2007. Preparation of polyurethane nanocapsules by miniemulsion polyaddition. *J Microencapsulation* 24:731–742.
- Klrner F-G. 1989. Chemie unter Hochdruck. *Chime in unserer Zeit* 2:53–63.
- Le Roy Boehm A-L, Zerrouk R, Fessi H. 2000. Poly- ϵ -caprolactone nanoparticles containing a poorly soluble pesticide: Formulation and stability study. *J Microencapsulation* 17:195–205.
- Letchford K, Burt H. 2007. A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: Micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes. *Eur J Pharm Biopharm* 65:259–269.
- Limayem I, Charcosset C, Fessi H. 2004. Purification of nanoparticle suspensions by a concentration/diafiltration process. *Separat Purific Technol* 38:1–9.
- Machayekhi B, Chevallier J, Theys B, Besson JM, Weill G, Syfosse G. 1996. Influence of hydrostatic pressure on the diffusion of hydrogen in n-GaAs:Si. *Solid State Comm* 200:821–824.
- Meyer-Pittroff R. 2002. High pressure applications in medicine. In: Winter R, editor. *Advances in high pressure and biotechnology II*. Berlin: Springer pp. 295–301.
- Moinard-Chcot D, Chevalier Y, Briancon S, Beney L, Fessi H. 2008. Mechanism of nanocapsules formation by the emulsion–diffusion process. *J Colloid Interface Sci* 317:458–468.
- Moroz NK, Kholopov EV, Belitsky IA, Fursenko BA. 2001. Pressure-enhanced molecular self-diffusion in microporous solids. *Microporous Mesoporous Mater* 42:113–119.
- Park SH, Ryu HS, Hong GP, Min SG. 2006. Physical properties of frozen pork thawed by high pressure assisted thawing process. *Food Sci Technol Int* 12:347–352.
- Quintanar-Guerrero D, Allmann E, Fessi H, Doelker E. 1999. Pseudolatex preparation using a novel emulsion–diffusion process involving direct displacement of partially water-miscible solvents by distillation. *Int J Pharm* 188:155–164.
- Quintanar-Guerrero D, Fessi H, Allmann E, Doelker E. 1996. Influence of stabilizing agents and preparative variables on the formation of poly(-lactic acid) nanoparticles by an emulsification-diffusion technique. *Int J Pharm* 143:133–141.
- Tina YL, Zhu HG, Xue Y, Liu ZH, Yin L. 2004. Vapor-liquid of the carbon-dioxide + ethyl propanoate and carbon dioxide + ethyl acetate systems at pressure from 2.96 MPa, to 11.79 MPa and temperature from 313 K to 393 K. *J Chem Eng Data* 49:1554–1559.
- Wang H, Li Z. 2003. Diffusive shrinkage of a void within a grain of a stressed polycrystal. *J Mech Phys Solids* 51:961–976.

PARTIE 2

CHAPITRE 2

PREPARATION AND OPTIMIZATION OF RIFAMPICIN-LOADED PLGA MICROPARTICLES FOR ENDOPHTHALMITIS PROPHYLAXIS

**Cette partie fait l'objet d'un article soumis dans
*International Journal of Pharmaceutics***

Résumé

Compte-tenu du cahier des charges retenu pour l'élaboration de particules polymères pour l'administration intraophtalmique de rifampicine (diamètre des particules compris entre 1 et 10 μm , encapsulation élevée de la rifampicine), le système d'administration retenu pour la suite de l'étude est formé de microparticules polymères à base de PLGA.

Ce chapitre porte sur l'étude de l'optimisation de la formulation des microparticules de rifampicine et la maîtrise de leurs propriétés. Pour cela, un plan d'expérience a été mis en place. La mise en place d'un plan d'expérience nécessite toutefois de connaître au préalable les facteurs pouvant influencer les caractéristiques des microparticules mais aussi de fixer les conditions d'étude en terme de gamme de concentration par exemple. Pour cela, des études préliminaires ont été réalisées.

Ces études préliminaires ont consisté à déterminer l'influence des paramètres du procédé ou de la formulation sur les caractéristiques des microparticules de rifampicine. Les paramètres testés sont les concentrations en polymère (PLGA), émulsionnant (PVA), huile (Miglyol[®] 812 et 829) mais aussi le type de l'huile (Miglyol[®] 812, 840 et 829) ainsi que la vitesse de cisaillement utilisée lors de l'étape d'émulsification. Les propriétés des microparticules étudiées sont le diamètre moyen des particules, leur potentiel zêta ainsi que leur taux d'encapsulation en rifampicine.

Ces études préliminaires ont permis de sélectionner trois paramètres influençant majoritairement les caractéristiques des particules que sont les concentrations en PLGA, PVA et huile, pour la mise en place du plan d'expérience.

Les résultats du plan d'expérience ont permis de montrer que les concentrations en PLGA et PVA avaient une influence très marquée sur la taille des particules et sur le taux d'encapsulation. L'augmentation de la concentration en polymère par exemple entraîne la

formation de particules de plus grande taille. Inversement l'utilisation d'une quantité plus importante de PVA entraîne une diminution de la taille des particules. Le même type d'observation peut être fait sur l'évolution du taux d'encapsulation en rifampicine. En revanche, nous avons pu constater au cours de cette étude que la concentration en huile avait un effet sur la taille des particules mais aucun effet sur le taux d'encapsulation.

Le plan d'expérience a permis d'identifier les conditions optimales de formulation permettant de maîtriser les propriétés des microparticules de rifampicine. Notamment, les concentrations en PLGA et PVA à utiliser afin d'obtenir de façon systématique des particules supérieures à 1 μm avec de bons taux d'encapsulation en rifampicine ont pu être déterminés. Néanmoins, les profils de libération *in vitro* de la rifampicine en fonction des facteurs de formulation, non étudiés dans ce chapitre, font aussi partie des caractéristiques essentielles à maîtriser et devront faire l'objet d'une étude supplémentaire, présentée dans le chapitre 3 de ces travaux expérimentaux.

**PREPARATION AND OPTIMIZATION OF RIFAMPICIN-LOADED PLGA MICROSPARTICLES FOR
ENDOPHTHALMITIS PROPHYLAXIS**

M.Y. Lee¹, S. Bourgeois^{1*}, C. Bordes², L. Kodjikian³, M.J. Choi⁴, H Fessi¹

¹ *Université de Lyon, F-69622, Lyon, France; Université Lyon 1, Villeurbanne; LAGEP, UMR CNRS 5007, 43 bd du 11 novembre, 69622 Villeurbanne Cedex, France*

² *Université de Lyon, F-69622, Lyon, France; Université Lyon 1, Villeurbanne; Laboratoires des Sciences Analytiques, UMR CNRS 5180, 43 bd du 11 novembre 1918, 69622 Villeurbanne cedex, France.*

³ *Croix-Rousse Hospital, Department of Ophthalmology, F-69004, Lyon, France.*

⁴ *Department of Food Science and Biotechnology, College of Natural Sciences, Kyonggi University, Kyonggi-Do, Korea*

* Corresponding author e-mail: bourgeois@lagep.univ-lyon1.fr

Abstract

Purpose: Rifampicin microparticles were investigated for intraocular injection during cataract surgery for endophthalmitis prophylaxis. The objective of this study is prepared the optimal rifampicin microparticles with the particle size of 1~10 μm , and constant release of the drug with minimal inhibitory concentration (10 $\mu\text{g/ml}$) during at least 24 hours.

Method: Emulsification diffusion method was used to prepare rifampicin loaded PLGA (Poly Lactide-co-Glycolide) microparticles. Preliminary studies were performed in order to evaluate the process and formulation parameters influencing microparticles properties (particle mean diameters, zeta-potential and rifampicin encapsulation efficiency) and to determine parameter experimental range for the development of an experimental design in order to control and optimize microparticle formulation.

Results: PLGA, PVA and oil concentrations, oil type such as the emulsification speed appeared as the main parameters influencing particle sizes and rifampicin encapsulation. The parameters retained for the experimental design were the PLGA (1 to 5 w/v%), PVA (1 to 5 w/v%) and oil (0 to 2.5 w/v%) concentrations. The influence of the three parameters on particle mean sizes was underlined. However, the experimental design showed that the oil had no influence on rifampicin encapsulation in the experimental range. Using the factorial design optimized formulation parameters could be retained in order to design microparticles bigger than 1 μm , with high encapsulation efficiency.

Keywords: Rifampicin, Microparticles, Emulsion-diffusion, PLGA, Experimental design

1. Introduction

Post-operative endophthalmitis is a serious bacterial infection mainly due to the eye contamination during cataract surgery with intraocular lens (IOLs) implantation, which can lead to severe eye damages and vision troubles. Topical prophylactic treatments, consisting of locally applied antiseptics and antibiotics, are frequently used before eye surgery to reduce bacterial populations on the ocular surface. However, this kind of prophylaxis is not totally efficient to avoid contamination by exogenous bacteria. Therefore, the intravitreal injections of antibiotics, firstly described for endophthalmitis treatment, were also suggested as prophylaxis during cataract surgery. The use of broad spectrum activity antibiotics like cefuroxime, ceftazidime or vancomycin, inhibiting the growth of cocci gram-positive such as *Staphylococcus* species mainly involved in post-operative endophthalmitis, is widely recommended. In the same way, the use of rifampicin, broad spectrum antibiotic, for endophthalmitis prophylaxis was also suggested. Rifampicin presents a large antibacterial effect against gram-positive cocci and moreover preserves IOLs from the adhesion of bacteria. However, in order to maintain antibiotic concentrations higher than its minimal inhibitory concentration (MIC), repeated injections are required that represents painful discomfort for patients. Hence, sustained release formulations for intraocular delivery of antibiotics have been developed. Among these formulations, polymeric microparticles have been widely described for ophthalmic delivery as a suitable way to increase drug bioavailability and to control drug release [1].

In the present study, rifampicin loaded-microparticles for intraocular injection were developed. This microparticulate delivery system aims to allow a controlled release of rifampicin and improve its half-life in order to maintain efficient concentrations in the eye

during and after the surgery.

Microparticles are spheroids between 0.1-100 μm of mean diameter. They are widely used on drug delivery, because of several benefits: controlled release, improved drug stability, both resulting in reduced drug administration amounts and limited side effects.

Several methods of drug encapsulation for polymeric microparticles are proposed such as salting out method, spray drying, extrusion, or solvent evaporation methods... A part of them uses natural macromolecules or synthetic polymers; for the others, the polymer is formed by chemical reaction simultaneously to the encapsulation step. Methods using preformed polymers are essentially based on rapid diffusion and mass transfer leading to the insolubilization of the polymer in the form of very small particles. The particles can be classified by their size (nano or microparticles) and by their structure type (capsules or spheres) [2].

The emulsion diffusion is one of the most widely used methods to form polymeric nano- or microparticles. This method allows the formation of nanoparticles from preformed polymers [3]. It starts with mutual saturation of water and partially water miscible solvent. Polymer is dissolved in water-saturated organic phase and added to an external solvent-saturated water phase containing a stabilizer to form an O/W emulsion. The addition of an abundant volume of water is leading to the diffusion of the solvent from the inner droplets of emulsion to the external phase, resulting in the polymer insolubilization to form particles.

Poly lactide-co-glycolic acid (PLGA) is a copolymer from poly lactic and poly glycolic acids broadly used for microparticle elaboration. PLGA is a biodegradable and biocompatible polymer. Its degradation properties depend on its chain length but also on the proportion of glycolic and lactic acids. Co-polymers 50% glycolic acid and 50% lactic acid degrade faster than homopolymer. This polymer is used for the preparation of various sustained delivery systems such as nano- or microparticles, implants or inserts,

administered by parenteral, oral, dermatological, pulmonary, nasal or ocular routes [4].

Therefore the objective of our project is to develop rifampicin PLGA microparticles for intraocular administration to prevent post cataract surgery endophthalmitis. Rifampicin is a red powder which can provoke ocular troubles when administered in too high quantity. Its encapsulation into microparticles allows not only a sustained release of the drug but also to avoid vision troubles due its red color. Thus, the use of rifampicin microparticles will allow supporting a sufficient intraocular concentration of rifampicin without vision troubles.

The present work aims to firstly evaluate the influence of formulation and process parameters on rifampicin-microparticles characteristics (microspheres or microcapsules). These preliminary experiments will allow to well-define the experimental factors influencing the microparticles mean size and the rifampicin encapsulation efficiency in microparticles, as well as their experimental range. Then, an experimental design will be performed to improve the operating and formulation conditions of the microencapsulation process and obtain optimized microparticles suitable for intraocular delivery.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Rifampicin was a generous gift of Sanofi Aventis (Lyon, France). The polymer used for microparticles production, poly (D,L-lactide-co-glycolic acid, 50:50) (PLGA, Mw = 7 kDa) was purchased from Boehringer Ingelheim (Germany), and the polyvinyl alcohol (PVA, Mowiol[®] 4–88) used as stabilizer were purchased from Sigma–Aldrich GmbH (Germany). Miglyol[®] 812, 829 and 840 were used to form the oil core of microcapsules and were supplied by Sasol (France) (Table1). Ethyl acetate and DMSO were purchased from Carlo Erba (France).

Table 1: Composition and viscosity of Miglyol[®] Oils*

Oil Type	Composition	Viscosity at 20°C (mPa·s)
Miglyol [®] 812	Caprylic / Capric triglyceride	27 – 33
Miglyol [®] 840	Propylene Glycol Dicaprylate/ Dicaprate	9 - 12
Miglyol [®] 829	Caprylic / Capric/ Succinic Triglyceride	230 - 270

*product information of SASOL

2.2. Preparation of microcapsules and microspheres

Emulsion-diffusion technique, patented by Quintanar-Guerrero *et al.* [5], was used to produce the microparticles based on biodegradable polymer, PLGA. Figure 1 described the several steps of microparticle preparation. The emulsification process involves a partially

water-soluble solvent previously saturated with water in order to ensure the initial thermodynamic equilibrium between the two liquids, the water and the organic solvent (ethyl acetate).

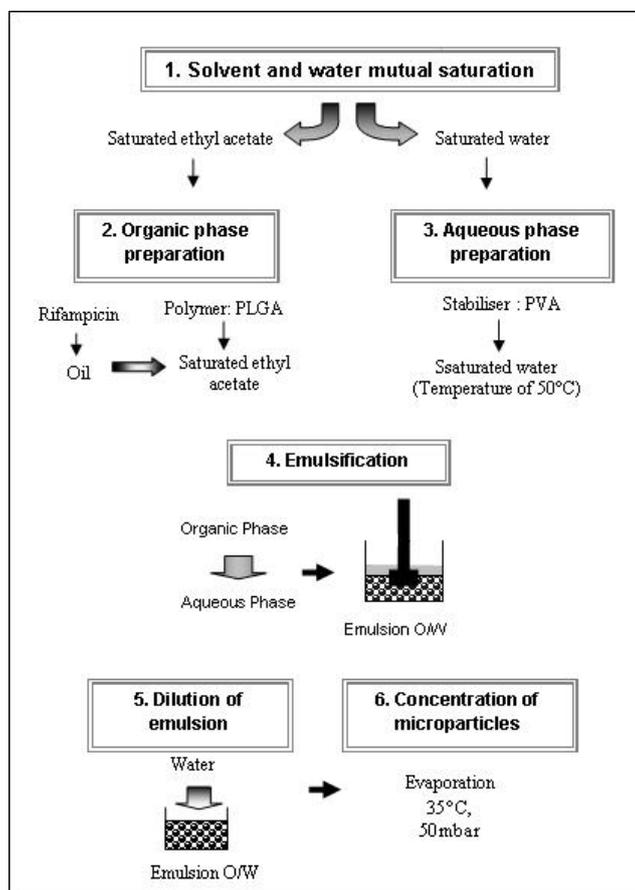


Figure 1: Schema of emulsion diffusion process

Firstly the polymer, PLGA, was dissolved in saturated ethyl acetate. For microsphere formation, rifampicin is directly dissolved in saturated ethyl acetate solution of PLGA. However, for microcapsule preparation, rifampicin was firstly dissolved in the oil, Miglyol[®], and then introduced in the saturated ethyl acetate phase containing PLGA. The polymer solution containing rifampicin was then emulsified in the aqueous phase in order to form an O/W emulsion. The aqueous phase is composed of polyvinyl alcohol (PVA) dissolved into purified water saturated by ethyl acetate. The emulsification process was

performed using a high speed rotor-stator homogenizer (Ultraturrax[®] T25 Basic, IKA, Germany) or mechanical stirrer (IKA, Germany) equipped with a three blade impeller for emulsion formation.

For the next step, a large volume of water was added into this emulsion to induce the solvent diffusion into the external phase. It led to the polymer deposition on the interfacial droplet forming the microparticles. Finally, the solvent was eliminated by evaporation at 40°C and 50 mbar during 1 hour (Rotavapor[®] R-144, Büchi, France). After evaporation, the microparticles were washed by distilled water and centrifuged at 2000 rpm for 10 min (Centrifuge 5417C, Eppendorf) to eliminate residual PVA. This step is repeated twice. After the 2nd centrifugation, recovered microparticles (pellet) were redispersed in 10 ml of a mannitol aqueous solution at 10 w/v% and immediately frozen at -80°C. Mannitol was added as a cryopreservative in microparticles suspension. Frozen microparticles were finally lyophilized during 16 hours at 10°C under 0.200 mBar. Freeze drying was finished with a secondary drying (25°C, 4 hours, 0.200mBar).

Controlled parameters used for the microencapsulation formulation and process were summarized in Table 2.

Table 2: Summarized of the process and formulation parameters used for microencapsulation.

Parameters		Value
Polymer	PLGA	1, 2.5, 5, 10 w/v%
Surfactant	PVA	1.25, 2.5, 5, 7.5 w/v%
Core oil	Miglyol [®] 812, 829, 840	0, 1, 2.5 w/v%
Emulsification speed	Propeller type stirrer	1000, 2000 rpm
	Rotor-stator Homogenizer	6500, 8000, 11000 rpm

2.3. Characterization of microparticles

PLGA microparticles were characterized by their mean diameter and size distribution, their zeta potential and their rifampicin encapsulation efficiency.

2.3.1 Particle size analysis

The size distribution of the microparticles were determined using a laser diffraction technique with a Coulter[®] apparatus, model LS 230 (Beckman Coulter, USA) equipped with supplementary large-angle detectors working under the polarization intensity differential scattering mode (PIDS). The PIDS enlarged the measurable size domain towards smaller sizes, giving the size distribution from 50 nm up to some millimeters. The dilution of the dispersions required for a right measurement was performed in order to reach a 10% obscuration as recommended. In our case, samples were diluted in distilled water and the size distribution was calculated from three measurements made on the same sample.

Results were expressed as the mean diameter (d50) of the microparticles with the standard deviation (n=3).

2.3.2 Zeta-potential measurements

Zeta (ζ)-potential of microparticles was measured using a Zetasizer[®] 3000 (Malvern Instruments, UK). Two or three drops of microparticles suspension was diluted in 3 ml of distilled water. Zeta potential measurements were carried out on microparticles suspensions just after their production. Each measurement was performed in triplicate.

2.3.4. Evaluation of the encapsulation efficiency of rifampicin in microparticles by HPLC quantification

The encapsulation efficiency (EE) was estimated by taking into account entrapped and total amount of rifampicin used in the preparation of microparticles. EE was determined following the equation 1.

$$EE(\%) = \frac{\text{entrapped fraction}}{\text{total drug used}} \times 100 \quad \text{Equation 1}$$

For this purpose, lyophilized microparticles were dissolved in DMSO, and the rifampicin containing in microparticles was quantified by a HPLC method as described above. The HPLC unit (Thermosystems, USA) consisted in a set of a Spectra System P1000XR pump, a Spectra System AS 300 auto sampler and a Spectra System UV 6000LP diode array detector. The data is recorded and analyzed with the Chromquest[®] PC software over the Spectra System SN4000 unit. Chromatographic separations were performed at 25°C. 10 µL of samples or calibration standards were injected and were eluted under isocratic conditions through an Eclipse Plus C18 column, 150 mm×4.6 mm, 5 µm (Agilent, USA). The mobile phase was composed of 5 mM potassium dihydrogen phosphate buffer (pH 5.2, adjusted with phosphoric acid) and acetonitrile (64:36, v/v). The total run time was 15 min at a flow rate of 1 mL/min. Each determination was carried out in triplicate.

2.4 Factorial design

The influence of several experimental factors (polymer and PVA concentrations, oil content...) on the microparticles size, polydispersity, zeta potential and rifampicin encapsulation efficiency was investigated by an experimental design methodology. In our objectives, the experimental design was chosen to support a quadratic regression model as adequate to estimate a potentially complex response function (Equation 2):

$$Y=b_0+b_1X_1+b_2X_2+b_3X_3+b_{11}X_1^2+b_{22}X_2^2+b_{33}X_3^2+b_{12}X_1X_2+b_{13}X_1X_3+b_{23}X_2X_3 \quad \text{Equation 2}$$

Where Y is the model response, b_0 is the arithmetic mean response of runs, b_1 , b_2 and b_3 are the estimated linear coefficients for the factors X_1 , X_2 and X_3 , b_{11} , b_{22} , b_{33} are the quadratic coefficients and b_{12} , b_{13} , b_{23} , b_{123} are the interaction coefficients.

Table 3: D-optimal design generated combinations (coded values)

Orthogonal values	PLGA (X1)	PVA (X2)	Miglyol® 829 (X3)
1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1
3	1	-1	-1
4	-1	-0.33	-1
5	1	-0.33	-1
6	-1	1	-1
7	0.25	1	-1
8	1	1	-1
9	0.25	-1	0
10	0.25	-0.33	0
11	-1	1	0
12	1	1	0
13	1	1	0
14	-1	-1	1
15	-1	-1	1
16	1	-1	1
17	1	-0.33	1
18	-1	1	1
19	0.25	1	1

To fit the quadratic model, a D-optimal design was computed by Modde software (Version 8 Umetrics AB, Sweden) allowing the definition of 19 experiments (Table 3) G-efficiency criterion was used to select the optimal worksheet design set. At last, run sequence of experimental units was completely randomized to minimize the effect of noise and then keeping out the experiment from systematic bias. For each factor, the lower, center and higher levels can be coded by -1, 0 and 1 respectively, as shown in Table 4. To obtain a clearer view, the formula used in the experimental design can also be presented in a cube shape, where the different axes constitute the different variables.

Table 4: Levels for chosen variables

Independent variables	Level	Values
(X1)	-1	1
PLGA concentration (w/v%)	0	3
	1	5
(X2)	-1	1.25
PVA (w/v%)	0	3.13
	1	5
(X3)	-1	0
Oil concentration (w/v%)	0	1.25
	1	2.5

3. Results and discussion

3.1 Influence of formulation and process parameters on microparticles properties

The first step of the present study was to evaluate the influence of various process and formulation parameters on rifampicin-microparticles properties. The parameters studied were the PLGA, PVA and oil concentrations, the oil type and the emulsification speed. The

evaluated microparticle properties were their mean diameter and size distribution, their zeta-potential and the rifampicin encapsulation efficiency.

3.1.1. Effect on microparticle size distributions

Particle mean size and their size distribution are two of the main characteristics of microparticles which have to be investigated in order to control drug release from particles, biodistribution or also particle stability. Moreover, in the case of intraocular injections, the size of microparticles has to be optimized to prevent their rapid elimination or vision troubles due the presence of microparticles in the vitreous.

Figure 2 showed the evolution of microsphere (no oil) mean sizes as a function of the PLGA concentration. Polymer concentration is a key factor influencing the properties of microparticles. It could be observed that the increase of the polymer concentration led to an increase of microparticle mean diameters for both applied emulsification speed (6500 and 8000 rpm). However, using the highest emulsification speed (8000 rpm), a significant effect on particle size appeared only for highest PLGA concentration (10 w/v%). Indeed at 8000 rpm, the size evolution was not clearly marked between 1 and 5% (around 0.8 μm) whereas it almost doubled for PLGA 10 w/v% (around 1.5 μm). When a 6500 rpm speed was applied the mean diameter mainly varied for small polymer concentration (0.8, 1.2 and 1.5 μm for PLGA 1, 2.5 and 5 w/v% respectively) whereas no differences could be observed between PLGA 5 and 10 w/v%.

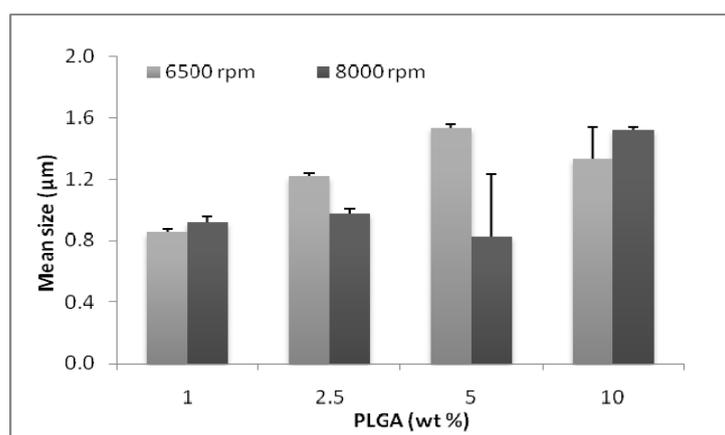


Figure 2. Influence of PLGA concentration on the microparticles size at PVA 5 w/v% without core oil. (■) emulsification speed 6500 rpm, (■) emulsification speed 8000 rpm.

Therefore, a main influence of the polymer concentration and of the emulsification speed was highlighted. The influence of PLGA concentration could be explained by the polymer chains aggregation during the solvent diffusion step, leading to its quicker insolubilisation on droplet surface and then to bigger microparticles. Moreover, during the emulsification step, the viscosity of the inner polymer solution, mainly depending on the polymer concentration, could widely modify the size of the emulsion droplets [6]. Therefore, for a given stirring speed, a higher concentrated PLGA solution led to the formation of bigger droplets, since higher shear forces are needed for droplets disruption due to the high viscosity, and so bigger microparticles were obtained [7-9]. Moreover, several studies have demonstrated that the increase of polymer concentration can modified the morphology of microparticles since less porous microparticles were formed with higher polymer concentration [7], thus modifying the release profile of drug from microparticles.

However, a higher shear rate for the emulsification step led to smaller droplets allowing the formation of smaller particles. By increasing the stirring speed, the stronger shear forces logically allowed the formation of smaller droplets [6, 10]. This increased shear force probably also minimise the effect of polymer concentration increase when some stirring speed was reached as observed at 8000 rpm between 1 and 5 w/v% of polymer.

The effect of PVA concentration on the size of microparticles was also investigated. The results were shown in Figure 3. This experiment was conducted on microcapsules using Miglyol[®]812 or Miglyol[®]829 as oil core. PLGA and oil concentrations were fixed at 1 and 2.5 w/v% respectively, and an 8000 rpm emulsification speed was applied. Overall, the mean size of particles decreased as the surfactant concentration increased. PVA 5 w/v% represented the superior limit of the PVA concentration usable to obtain microparticles upper or equal to 1 μm diameter. Using 7.5 w/v% of surfactant the particle size was less than 1 μm ; around 0.5 and 0.6 μm depending on the oil type.

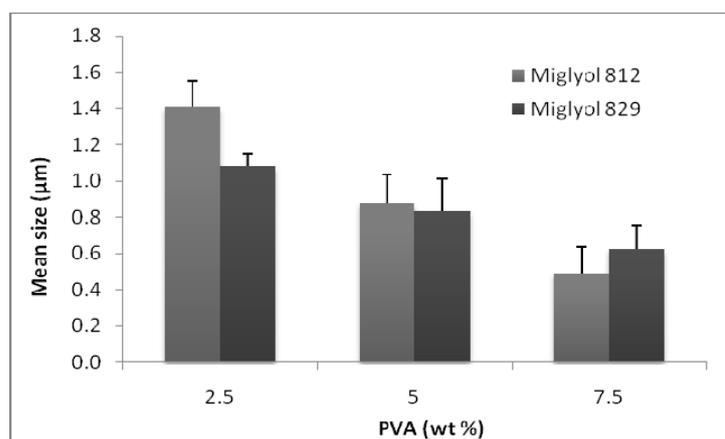


Figure 3. Influence of PVA concentration on microparticle mean diameters for Miglyol[®] 812 or 829 as oil core. PLGA 1 w/v%, Oil 2.5 w/v% and emulsification speed 8000 rpm; (■)Miglyol[®] 812 (■)Miglyol[®] 829.

This result of the PVA concentration effect could be rationally explained by the decrease of the droplet size during the emulsification process while the surfactant concentration increased. This effect is due to the emulsion droplet stabilization, at low PVA concentration the droplets tend to coalesce into larger particles. This phenomena has been widely described in previous studies [11-13]. However, we could observe that a too high PVA concentration led to a dramatic decrease of the microparticle size that represents a main

drawback for intraocular delivery system since smallest particles can be easily eliminated through the trabecular filter. Therefore a compromise as to be find in order to obtain microparticles with a high residence time in the eye, smaller enough to allow the controlled release of the encapsulated drug.

Moreover, some side effects were described after administration of health care products containing a too high amount of PVA requiring its major elimination before microparticles use [14].

In order to optimize microparticle formulation and rifampicin encapsulation, two types of particles were studied microspheres and microcapsules. Different oils forming the core of the capsules were tested: Miglyol[®]812, Miglyol[®]829 and Miglyol[®]840. These oils are triglycerides varying by their composition and their viscosity at 20°C as mentioned in table 1.

Figure 4 showed the influence of the oil type (Figure 4A) and oil concentrations (Figure 4B) on microparticle mean diameters. For this experiment, the microparticles were prepared with PLGA 1 w/v% and PVA 5 w/v% by applying an 8000 rpm and 11000 rpm emulsification speeds. As shown on Figure 4A, there is no significant effect of the oil type on particle sizes. However, microparticles formulated by emulsification speed at 8000 rpm had particle size around 0.8 µm while a higher speed (11000 rpm) led to the formation of smaller particles of approximately 0.4 µm. The same trends were observed for all types of Miglyol[®].

However, a size variation could be expected by modifying the oil type [15]. Indeed, high viscosity differences can be observed between Miglyol[®] 812, 829 and 840 which were respectively around 30 mPa.s, 230-270 mPa.s and 10 mPa.s, as mentioned in table 1.

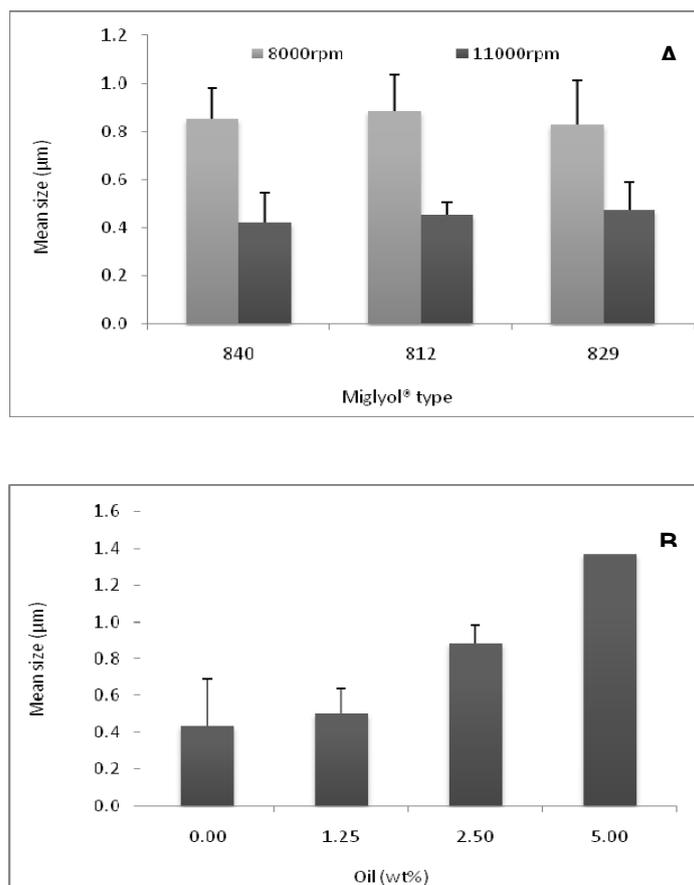


Figure 4. (A) Influence of the oil type on the particle sizes at PVA 5 %, PLGA 1 %, 8000 and 11000 rpm
 (B) Influence of oil (Miglyol® 812) concentration at PVA 5%, PLGA 1%, 8000 rpm

Moreover, the effect of the oil concentration was studied using Miglyol 812[®] at 0, 1.25, 2.5, and 5 w/v%. Results showed that, in these formulation conditions (PLGA 1 w/v% and PVA 5 w/v%) only 5 w/v% of Miglyol[®]812 allowed the formation of particles larger than 1 µm of mean diameter, under homogenization speed of 8000 rpm (figure 4B). The increasing amount of oil logically increased the volume of the inner core, and therefore microparticle mean diameters. Oil concentration can be adjusted in order to control the size of the produced microparticles [15, 16]. Moreover, the amount of oil in the inner core of the capsules should modify the rifampicin encapsulation efficiency that will be studied in the next part of these preliminary experiments.

Subsequently, the influence of the emulsification speed (1000, 2000, 6500, 8000, and 10000 rpm) was also investigated. In this experiment we used two different homogenizer equipments to control the emulsification speed. For the emulsification speeds of 1000 and 2000 rpm a mechanical stirrer equipped with a three blade impeller was used. While, for microparticles prepared under emulsification speed more than 6500 rpm, a high shear rate rotor-stator homogenizer (Ultra-Turrax[®]) was used. Batches of microparticles were prepared at 2000 rpm during 10 minutes with a propeller stirrer, and at 6500, 8000 and 11000 rpm during 30 seconds, with the high speed homogenizer (Ultraturrax[®]).

The results are presented in figure 5. The size of microparticles prepared under the emulsification speed at 2000 and 6500 rpm, was upper than 1 μm . Indeed, the mean diameters of microparticles prepared with a shear rate under 6500 rpm, varied from 1.1 to 1.5 μm , whatever the oil used. Applying higher homogenization speeds (8000 and 11000 rpm), the size of samples decreased dramatically since microparticle mean diameters varied between 0.45 and 0.88 μm for both type of oil (Figure 5). As expected, the size of the microparticles decreased with increasing the emulsifying speed (Figure 5). High speeds induce a more important shear and thus favors the formation of smaller microparticles. Consequently, in these experiment conditions, it should be better to emulsify with a stirring rate around 6500 rpm maximum to obtain interesting microparticles sizes, upper than 1 μm .

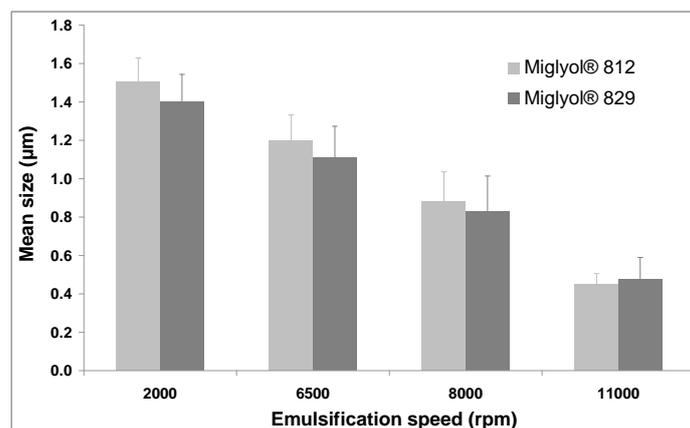


Figure 5. Influence of emulsification speed on microparticle mean diameters for two types of oil (Miglyol® 812 and 829) at PVA 5%, PLGA 1%, Oil 2.5%

Although a large range of particle sizes has been reported to be used in the intraocular route [17-19], a range between 1 µm and 10 µm appeared a good target for optimized drug delivery into the anterior chamber of the eye. In fact, particles smaller than 1 µm will easily pass through the trabecular filter [20], thus failing to stay long enough to deliver the drug into the anterior chamber of the eye. On the other hand, large particles might disturb the clarity of vision [21].

3.1.2 Effect on zeta potential

The zeta potential is a main indicator of particle surface charges, and can be used to predict and control the stability of dispersed microparticles [22]. The greater the absolute zeta potential is, the more likely the suspension is to be stable since the charged particles repel one another and thus overcome their natural tendency to aggregate. This parameter was measured just after the production of microparticles and elimination of the PVA excess. The influence of the PVA concentration and the oil type on the zeta potential was studied. The zeta potential of microparticles showed a negative mean surface charge of around -20mV. The negative charges may be due to the ionization of the free carboxylic acid ends

of the polymer (lactic acid) [11, 23]. Some differences of zeta potential can be observed depending on the PVA concentration used (Table 5). A stable layer of PVA formed on the surface of the particles could not be removed during the washing process. However these differences did not appear as enough significant to conclude about the effect of PVA concentration on zeta potential. A slightly effect of the type of oil used can be mentioned since microcapsules prepared with Miglyol[®] 829 seemed to have a higher negative charges than using Miglyol[®] 812.

Table 5: Electrical charge (ζ -potential) of microparticles surface

Oil type (Miglyol [®])	PVA (w/v%)	ζ -potential (mV)
812	2.5	-23.3± 2.7
	5.0	-19.9± 1.1
	7.5	-17.1± 2.8
829	2.5	-28.5± 0.9
	5.0	-15.0± 2.0
	7.5	-30.0± 2.2

*Emulsification speed 8000 rpm, PLGA 1 w/v%

3.1.3. Formulation parameters effect on the drug encapsulation efficiency

The effect of various formulation parameters such as the PLGA (Figure 6) and PVA (Figure 7) concentrations, the emulsification speed or the presence of the oil core, on rifampicin encapsulation efficiency (EE) in microparticles was studied.

As shown on figure 6, as the polymer concentration increased, the encapsulation efficiency of rifampicin in microparticles increased, whatever the speed used for the emulsification step. The lowest concentration of PLGA (1 w/v%) showed the lowest encapsulation efficiencies with values between 70 and 80% of encapsulation, clearly depending on the emulsification speed. However, for higher PLGA concentrations, encapsulation efficiencies were upper than 80% with no influence of the emulsification speed on rifampicin

encapsulation. A formulation with 10 w/v% of PLGA exhibited a percentage of encapsulation of almost 100%.

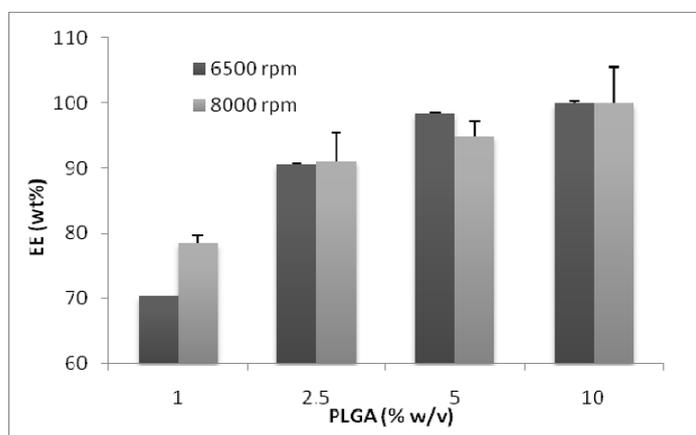


Figure 6. Influence of PLGA concentration (w/v%) on rifampicin encapsulation efficiency in microparticles at PVA 5%, without oil core

Encapsulation rate of rifampicin in microparticles was also evaluated as a function of the PVA concentration (Figure 7). For this experiment microcapsules were prepared with 1 w/v% of PLGA at 8000 rpm of emulsification speed. It could be observed in figure 7 that the increase of PVA concentration led to a decrease of the encapsulation rate. For concentration upper than 2.5 w/v% the encapsulation rate reached around 80% whereas this rate decreased to 15% for the highest PVA concentration, 7.5 w/v%.

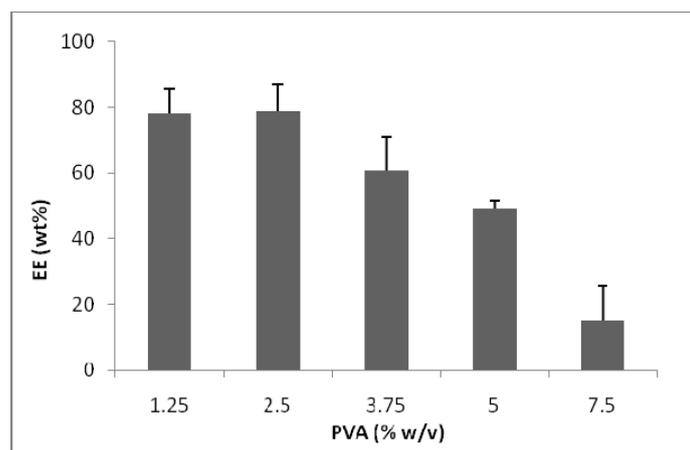


Figure 7. Influence of PVA concentration on the encapsulation rate (PLGA 1%, miglyol[®] 829, emulsification speed 8000 rpm)

Both results, obtained by varying the PLGA or the PVA concentrations can be related to the evolution of the particle sizes. Indeed as mentioned previously, the increase of PLGA concentration led to the formation of bigger particles that might allow a better rifampicin encapsulation. On the other hand, the decrease of particle mean diameters by increasing the PVA concentration could explain the decrease of the encapsulation rate. This effect of the PVA concentration could be also explained by the solubilisation properties of PVA. Indeed, the poor solubility of rifampicin in distilled water (1.3 mg/ml at pH 5.5) could be improved by increasing the amount of PVA in the outer aqueous phase during microparticle preparation, inducing a leak of the rifampicin from the inner organic phase to the outer aqueous phase. Therefore the encapsulation efficiency could be significantly decreased.

By comparing results from the figures 6 and 7 it could be observed that, surprisingly, the encapsulation rate is better for microspheres than for microcapsules: 79% versus 49% for microspheres and microcapsules respectively (PLGA 1 w/v% and PVA 5 w/v%). These results need to be confirmed as performed in the following part by the experimental design.

3.2. Optimization of microparticles preparation by experimental design

The preliminary experiments described in the previous part of this paper allowed to well-defined the experimental factors influencing microparticle properties (mean size, zeta potential, encapsulation rate...) as well as their experimental range. Then, an experimental design was performed in order to optimize the operating conditions of the microencapsulation process and obtain rifampicin microparticles suitable for ocular delivery (optimal size and high encapsulation yield of rifampicin...).

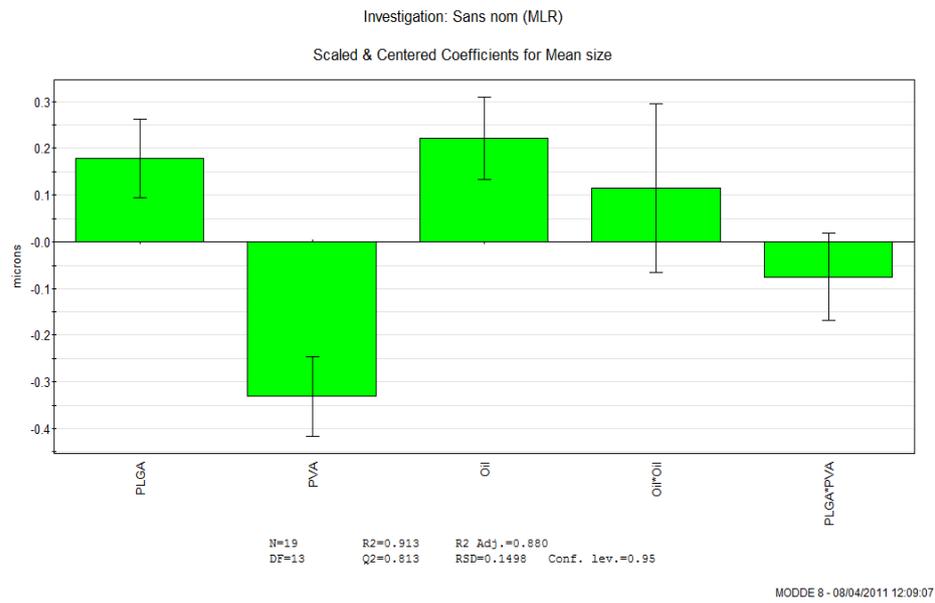
In this work only three experimental factors (PLGA, PVA, and oil concentrations) were studied with different ranges as shown in Table 4. Nineteen formulations were defined by applying the experimental design methodology previously described (Table 3). The other parameters such as the oil type or the emulsification speed were fixed. The oil used for the experimental design was the Miglyol[®] 829 and the emulsification speed fixed at 6500 rpm.

Table 5: Responses measured for each formulation: particle mean size (d_{50}), ζ -potential and rifampicin encapsulation.

Experiments n°	d_{50} (μm)	Zeta potential (mV)	Rifampicin encapsulation efficiency EE (%)
1	1.28	-19.7	76.10
2	1.71	-13.7	88.14
3	1.97	-14.1	90.82
4	1.04	-16.9	45.40
5	1.57	-14.7	73.58
6	0.76	-18.8	30.60
7	0.88	-16.3	52.53
8	0.91	-17	62.00
9	1.3	-13.8	80.49
10	1.57	-14.4	76.99
11	0.91	-17.3	31.70
12	1.22	-11.8	66.85
13	1.01	-19.3	59.44
14	1.98	-33	58.23
15	1.63	-20.6	68.06
16	2.26	-19	87.23
17	1.83	-22.4	86.36
18	1.15	-21.6	28.04
19	1.32	-19.5	55.08

As shown in table 5, the mean size of microparticles varied from 0.76 to 2.26 μm depending on the operating conditions. Similarly the encapsulation yield of rifampicin in microparticles could be significantly influenced by the formulation parameters since it varied from 30.6% to almost 91% (Table 5). However, no significant modification in microparticle zeta potential was observed since the measured variations corresponded to the experimental error estimated by the replication of experiments with a standard deviation around 5 mV. Therefore, no model has been developed to predict the zeta-potential response. However, microparticles exhibited a negative surface charge around -23 ± 9 mV whatever the formulation conditions used.

(a)



(b)

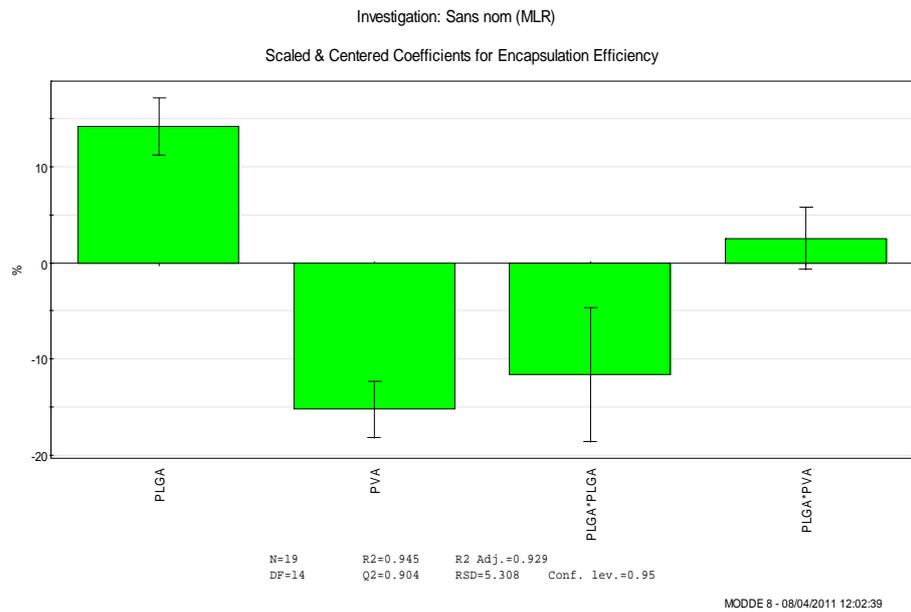


Figure 11. Scaled and centered coefficients calculated for size (a) and EE (b) models

The regression coefficients of the response model (equation 2) were computed by means of Multiple linear Regression method in order to minimize the sum of squares of the residuals. Only the significant coefficients were maintained in the model according to a Student's t-test (confidence level 95%). Figure 11 a and b represent the coefficient values and their confidence interval calculated for the size model and the encapsulation efficiency model respectively.

The "Encapsulation Efficiency model" showed that the experimental factor Oil did not affect the encapsulation of rifampicin in microparticles since all the coefficients involving oil were not statistically significant. But this conclusion can be only taken in the current experimental range of oil concentration (0; 1.25 and 2.5 w/v%). Surprisingly the presence of oil in the microcapsule core did not affect the rifampicin encapsulation showing that the encapsulation in microspheres was as efficient as in microcapsules. Usually the use of the microcapsules allowed improving the drug encapsulation compared to the spheres due to the high amount of oil incorporated in capsules.

The final obtained regression equations in terms of the coded variables for the size and for the encapsulation efficiency, with the corresponding statistical estimators R^2 and R^2 adjusted, can be given by the equations 3 and 4, as follow:

Equation 3

$$D_{50} = 1.315 + 0.179 \times PLGA - 0.331 \times PVA + 0.221 \times Oil + 0.116 \times Oil^2 - 0.075 \times PLGA \times PVA$$

$$R^2=0.913 \quad R^2Adj=0.88 \text{ (Degree of Freedom=13)}$$

Equation 4

$$EE = 73.17 + 14.14 \times PLGA - 15.21 \times PVA - 11.57 \times PLGA^2 + 2.52 \times PLGA \times PVA$$

$$R^2=0.945 \quad R^2Adj=0.929 \text{ (Degree of freedom=14)}$$

These response surface models were statistically validated for adequacy by analysis of variance (ANOVA) (results not shown). The R^2 and R^2_{adjusted} values indicate that more than 88% and 92.9% of the data variations for the mean size and the encapsulation efficiency respectively can be explained by the developed empirical models.

Moreover, as shown by the figure 12, a good appropriateness was obtained between the experimental data and their corresponding predicted value indicating that the models are usable for predictions and optimization.

Once validated, models were used to obtain the graphical representations of the response surfaces (figures 13 and 14).

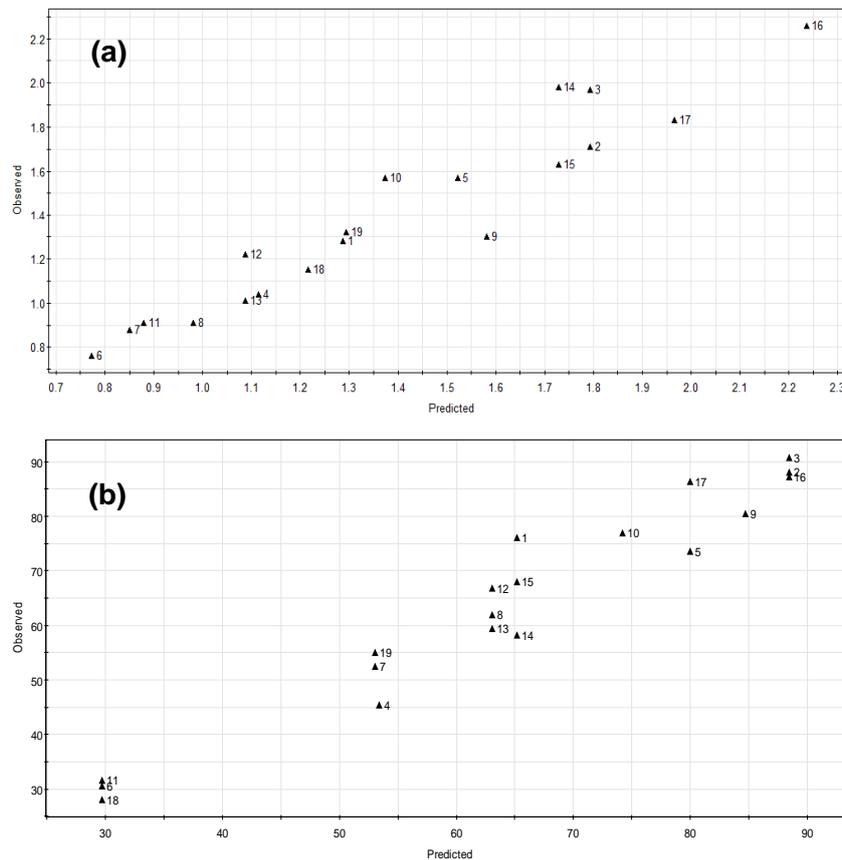


Figure 12: Experimental data Vs Predicted values obtained for the mean size (a) and the EE

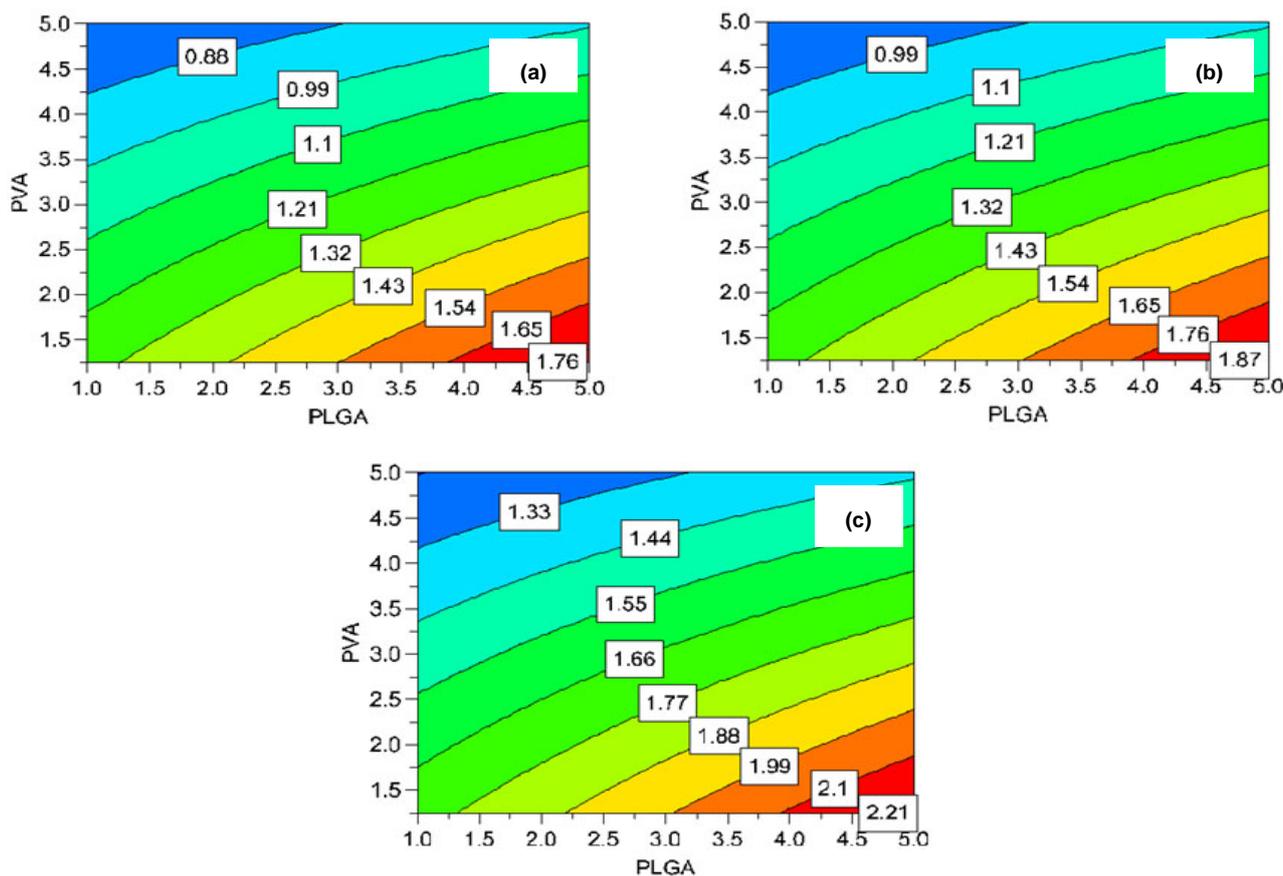


Figure 13. Contour plot of the predicted mean particle diameters for different oil concentrations: (a) 0%, (b) 1.25% and (c) 2.5%

Figure 13 showed that particle mean diameters increased as the PLGA and oil concentrations increased. As shown previously the increase of polymer concentration or of the oil content led to the formation of bigger droplets due to the higher viscosity of the inner organic phase and then to bigger microparticles. It may be also due to the quicker insolubilisation of the polymer at the droplet surface during the diffusion step and therefore to the formation of bigger microparticles. In contrast, the particle sizes decreased by increasing PVA concentration since smaller emulsion droplets are formed with increasing the stabilizer concentration. Moreover, these results showed that 2.5 w/v% of oil was required to obtain rifampicin-microparticles bigger than 1 μm whatever PVA or PLGA concentrations. However, in the case of microspheres, a PVA concentration less than 3 w/v% has to be used to form particles bigger than 1 μm whatever the polymer concentration.

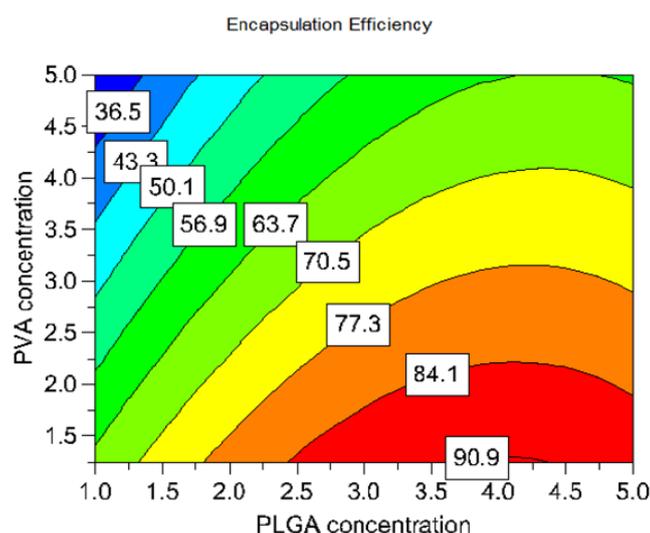


Figure 14. Contour plot of predicted rifampicin encapsulation efficiency (EE) in microparticles as a function of PVA and PLGA concentrations

Concerning rifampicin encapsulation efficiency in microparticles, it can be observed that the value of the encapsulated rifampicin can double depending on the formulation parameters used. The encapsulation was less efficient when small polymer and high PVA concentrations were involved as shown in figure 14. Conversely as expected, the highest values of encapsulation efficiency were obtained using the highest PLGA concentration and the lowest PVA concentration. The increase of encapsulation efficiencies can be logically correlated to the increase of the particle mean diameters.

The optimal formulation parameters leading to negatively charged microparticles with mean size larger than 1 μ m and highest encapsulation efficiency of rifampicin were then easily deduced from the response surfaces. Therefore, in order to obtain microparticles with mean diameters superior to 1 μ m and with an encapsulation efficiency of rifampicin upper than 60% for example, the formulation required at least PLGA 2 w/v% with the minimal PVA concentration (2.5 w/v%), whatever the oil concentration used. If a higher

amount of PVA is used a higher amount of PLGA is required. Conversely, if the concentration of PLGA has to be decreased to 1 w/v% for example, a lower PVA amount will be required around 1 w/v% too.

However this experimental design did not take into account the release profile of the rifampicin from the microparticles, which represents a main property of the particles to select suitable formulations.

4. Conclusion

The present study has shown that it is possible to produce rifampicin-loaded microparticles of suitable sizes, with a satisfying encapsulation rate. The concentrations of polymer and surfactant and the emulsifying speed were found to affect the size distribution of rifampicin microparticles. The experimental design allowed the determination of critical parameters to obtain optimized formulations. Suitable formulation parameters could be retained for the production of 1-2 μm microparticles with the higher encapsulation rate of rifampicin. Further studies have to be performed with optimized formulations such as *in vitro* release studies of rifampicin from microparticles.

BIBLIOGRAPHIE

1. Hachicha, W., et al., *In vitro efficacy of newly designed vancomycin-based microparticles*. Journal of Cataract and Refractive Surgery, 2007. **33**(4): p. 702-8.
2. Guinebretiere, S., et al., *Nanocapsules of biodegradable polymers: preparation and characterization by direct high resolution electron microscopy*. Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications, 2002. **21**(1-2): p. 137-142.
3. Quintanar-Guerrero, D., Fessi H., Allemann E., Doelker E., *Influence of stabilizing agents and preparative variables on the formation of poly(D,L-lactic acid) nanoparticles by an emulsification-diffusion technique*. International Journal of Pharmaceutics, 1996. **143** p. 133-141.
4. Vandervoort, J., Ludwig, A., *Biocompatible stabilizers in the preparation of PLGA nanoparticle; a factorial design study*. Int J Pharm, 2002. **238**: p. 77-92.
5. Quintanar-Guerrero, D., et al., *Methods for preparing vesicular nanocapsules*. 1999: PCT.
6. Hamishehkar, H., et al., *The effect of formulation variables on the characteristics of insulin-loaded poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres prepared by a single phase oil in oil solvent evaporation method*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2009. **74**(1): p. 340-9.
7. Mao, S., et al., *Effects of process and formulation parameters on characteristics and internal morphology of poly(d,l-lactide-co-glycolide) microspheres formed by the solvent evaporation method*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2008. **68**(2): p. 214-23.
8. Viswanathan, N.B., et al., *Preparation of non-porous microspheres with high entrapment efficiency of proteins by a (water-in-oil)-in-oil emulsion technique*. journal of Controlled Release, 1999. **58**(1): p. 9-20.
9. Jeyanthi, R., et al., *Effect of processing parameters on the properties of peptide-containing PLGA microspheres*. Journal of Microencapsulation, 1997. **14**(2): p. 163-74.
10. Yang, Y.Y., T.S. Chung, and N.P. Ng, *Morphology, drug distribution, and in vitro release profiles of biodegradable polymeric microspheres containing protein fabricated by double-emulsion solvent extraction/evaporation method*. Biomaterials, 2001. **22**(3): p. 231-41.
11. Karatas, A., et al., *Poly (-caprolactone) microparticles containing Levobunolol HCl prepared by a multiple emulsion (W/O/W) solvent evaporation technique: Effects of some formulation parameters on microparticle characteristics*. Journal of Microencapsulation, 2009. **26**: p. 63-74.

12. Benoit, M.A., B. Baras, and J. Gillard, *Preparation and characterization of protein-loaded poly(epsilon-caprolactone) microparticles for oral vaccine delivery*. International Journal of Pharmaceutics, 1999. **184**(1): p. 73-84.
13. Mainardes, R.M. and R.C. Evangelista, *PLGA nanoparticles containing praziquantel: effect of formulation variables on size distribution*. International Journal of Pharmaceutics, 2005. **290**(1-2): p. 137-144.
14. Lu, Z., Bei J.Z., Wang S.G., *A method for the preparation of polymeric nanocapsules without stabilizer*. J Controlled Release, 1999. **61**: p. 107-112.
15. Moinard-Checot, D., et al., *Mechanism of nanocapsules formation by the emulsion-diffusion process*. Journal of Colloid and Interface Science, 2008. **317**(2): p. 458-468.
16. Silva-Cunha, A., et al., *Poly-epsilon-Caprolactone Intravitreal Devices: An In Vivo Study*. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2009. **50**(5): p. 2312-2318.
17. Moritera, T., Ogura Y., Yoshimura N., Honda Y., Wada R., Hyon S.H., Ikada Y., *Biodegradable microspheres containing adriamycin in the treatment of proliferative vitreoretinopathy*. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 1992. **33**: p. 3125-30.
18. Yeh, M.K., Tung S.M., Lu D.W., Cheg J.L., Chiang C.H., *Formulation factors for preparing ocular biodegradable delivery system of 5-fluorouracil microparticles*. Journal of Microencapsulation, 2001. **18**: p. 507-19.
19. Wiechens, B., Krausse R., Grammer J.B., Neumann D., Pleyer U., Duncker G.I., *Clearance of liposome-incorporated ciprofloxacin after intravitreal injection in rabbit eyes*. Klin. Monatsbl. Augenheilkd, 1998. **213**: p. 284-292.
20. Saraux, H., *Physiologie de l'Humeur Aqueuse et de la Pression Oculaire* Chap. in Physiologie Oculaire. 1983, Paris: Masson. 122-153.
21. Ackerman, E., *Light and the eye. Chap. in Biophysical Science*. 1962, London: Prentice-Hall. 27-51.
22. Clarence, A.M., Neogi P., *Interfacial Phenomena: Equilibrium and dynamic effects* Surfactant Science Series. Vol. 17. 1985, New York: Marcel Dekker.
23. Evora, C., et al., *Relating the phagocytosis of microparticles by alveolar macrophages to surface chemistry: the effect of 1,2-dipalmitoylphosphatidylcholine*. Journal of Controlled Release, 1998. **51**(2-3): p. 143-152.

PARTIE 2

CHAPITRE 3

MICROENCAPSULATION OF RIFAMPICIN FOR THE PREVENTION OF ENDOPHTHALMITIS: *IN VITRO* RELEASE STUDIES

Ce chapitre fera l'objet d'une publication avec le chapitre 4

A soumettre

Résumé

Des microparticules polymères chargées de rifampicine ont été développées en vue du traitement antibioprophylactique des endophtalmies post-chirurgicales. Les microparticules à base de PLGA sont préparées par émulsion-diffusion. Les études présentées dans le chapitre précédent ont permis d'identifier les paramètres du procédé et les facteurs de formulation pouvant influencer les propriétés des microparticules. Parmi les paramètres de formulation identifiés les concentrations en polymère (PLGA), stabilisant (PVA) et huile (Miglyol® 829) apparaissent comme des facteurs discriminants pouvant influencer la taille moyenne des particules ainsi que l'encapsulation en rifampicine. La mise en place d'un plan d'expérience a ainsi permis d'identifier les conditions optimales pour l'obtention de microparticules de rifampicine adaptées à l'administration intraoculaire; c'est-à-dire une taille moyenne comprise entre 1 et 10 μm et une encapsulation en rifampicine maximale.

L'objectif de cette deuxième partie du travail sera d'évaluer les profils de libération *in vitro* de la rifampicine en fonction des paramètres retenues de formulation (concentration en PLGA variable et présence ou non d'huile par exemple). Pour cela 6 formulations de microparticules préparées avec des concentrations variables de polymère et d'huile sont incubées dans un milieu BSS pH 7,4 (balanced saline salt) à 32 °C pendant plusieurs heures voire plusieurs jours selon les formulations. La rifampicine libérée dans les milieux de dissolution est quantifiée par HPLC.

Dans un premier temps l'influence de l'huile sur la libération de rifampicine a été testée (forme microsphères ou forme microcapsules avec 1.25 et 2.5 m/V% d'huile), montrant une libération plus rapide pour les capsules que pour les sphères et que celle-ci était d'autant plus rapide que le contenu en huile était important. Ce résultat peut être expliqué

par la morphologie des particules. En effet dans les microcapsules, le polymère forme une fine membrane à la surface des particules délimitant le contenu huileux. L'augmentation de la proportion d'huile entraîne généralement la formation d'une couche polymérique plus fine. Cette fine couche présente donc un profil de dégradation plus rapide que le polymère d'une forme matricielle, expliquant la diffusion accélérée du principe actif à travers la membrane de la capsule voire même sa libération soudaine et totale lorsque la microcapsule se rompt.

L'étude de l'influence de la concentration en polymère (5; 1 et 0,5 m/V%) a ensuite été menée, sur des microsphères, montrant logiquement que la libération était d'autant plus rapide que la concentration en PLGA était faible. Curieusement, contrairement aux résultats précédents sur l'étude de l'influence de l'huile, les microsphères dans ce cas présentent un important "burst effect", d'autant plus marqué que la concentration en PLGA diminue : après 1h, 10% sont libérés à partir des particules avec 5 m/V% de PLGA, 35% avec 1 m/V% de PLGA et plus de 50% avec 0,5 m/V% de PLGA.

Le "burst effect" est fréquemment observé dans le cas des microsphères puisqu'une partie du principe actif peut se retrouver adsorbée en surface des particules et sera donc rapidement libérée. Cette libération rapide présente un avantage non négligeable dans le cas d'une antibioprofylaxie ophtalmique permettant d'obtenir une dose d'attaque en antibiotique dès la première heure de traitement.

Ces études ont par ailleurs permis de montrer que les microparticules préparées à partir de 5 et 1 m/V% de PLGA présentaient néanmoins des profils de libération très lents pouvant se prolonger sur plusieurs jours. Ce type de profil ne répond pas réellement au cahier des charges puisque la libération prolongée souhaitée devrait plutôt être de l'ordre de 24 à 48 heures. En effet, la majorité des endophtalmies post-opératoires surviennent dans les 24 heures suivant l'opération. L'objectif serait donc de maintenir dans le vitré une concentration de rifampicine supérieure à sa CMB (concentration minimale bactéricide)

pendant les 24 premières heures.

Compte-tenu des profils de libération observés les particules avec 0.5 m/V% de polymère présentent donc de nombreux avantages : "burst effect" important sur la première heure de traitement et effet prolongé sur 24 heures. Néanmoins leur efficacité sur le développement de microorganismes pathogènes reste à démontrer. L'association de plusieurs types de microparticules avec des profils de libération différents de la rifampicine *in vitro* pourra même être envisagée. Ces études d'efficacité sur le développement d'une bactérie pathogène du type *S epidermidis* feront l'objet du chapitre 3.

MICROENCAPSULATION OF RIFAMPICIN FOR THE PREVENTION OF ENDOPHTHALMITIS: *IN*

***VITRO* RELEASE STUDIES**

M.Y. Lee¹, S. Bourgeois¹, J. Pelletier¹, L. Kodjikian², H. Fessi¹

¹ *Universite de Lyon, F-69000, Lyon, France; Universite Lyon 1, F-69622, Villeurbanne; LAGEP, UMR 5007, CNRS, France*

² *Croix-Rousse Hospital, Department of Ophthalmology, F-69004, Lyon, France*

Abstract

Purpose: Rifampicin encapsulated microparticles were designed for intra ocular injection after cataract surgery to prevent endophthalmitis postoperative. In this study, *in vitro* release kinetics of rifampicin from microparticles was studied.

Methods: Microparticles were produced by emulsification diffusion method. Poly lactide-co-glycolic acid (PLGA) was used as a wall material polymer for microparticles and PVA was used as a stabilizer during preparation. Depending on processing formulation, different types of microparticles were prepared, and evaluated by *in vitro* release studies. Release kinetics were performed in BSS pH 7.4, at 32°C for several hours or days, depending on particle formulations. Rifampicin released from microparticles in BSS medium and remaining in microparticles was quantified by HPLC. The morphology of microparticles during release studies was observed by scanning electron microscopy.

Results: Rifampicin release rate from microparticles mainly depend of the PLGA concentration involved. Microparticles produced with 0.5 w/v% of PLGA released 50% of rifampicin in 1 hour; and rifampicin concentration was maintained until 24 hours. This rifampicin release amount is upper than MIC90 of *Staphylococcus epidermidis* mainly involved in postoperative endophthalmitis.

Keywords: rifampicin, microparticles, intraocular delivery, PLGA, in vitro release, endophthalmitis

1. Introduction

Rifampicin is one of the most potent and broad spectrum antibiotic against gram positive or gram negative bacterial pathogens. It can inhibit bacteria growth by interfering in their DNA transcription. However, rifampicin has several limitations like a high cost, short half-life, adverse effects, pH-dependant degradation, and low bioavailability. The short half-life of rifampicin, comprise between 1 and 5 hours, represents a main drawback for its ocular administration. In order to maintain active concentration of rifampicin during prophylactic treatment, several intraocular injections are necessary. Moreover, rifampicin has red-orange color which can provoke vision troubles when administrated intraocularly in high quantity. This explains partly the interest to use a form allowing an extended release of the antibiotic. Thus, the use of microparticles polymeric delivery systems will allow supporting a sufficient concentration in rifampicin, and without any vision troubles. These microparticles delivery systems could be considered as a possible approach to increase the ocular drug availability [1, 2], to avoid many drug administrations and to optimize an extended release of the antibiotic so as to improve its efficiency.

Poly (D,L-lactide-co-glycolic acid), PLGA, is a biocompatible and biodegradable polymer, widely used in microparticles delivery system as a wall material. PLGA is notably considered non-toxic for intraocular route since mainly hydrolyze into lactic acid and glycolic acid, and its use as an implantable drug carrier has been widely described [3-7].

In this study, rifampicin-loaded PLGA microparticles were prepared by emulsion-diffusion. The process and formulation parameters were previously studied in order to obtain more than 1 μm mean diameter microparticles with high encapsulation efficiency of rifampicin (around 60 and 70 %). The influence of the PLGA and PVA concentrations on particle mean diameters and rifampicin encapsulation has been particularly underlined. Moreover, no effect of the oil on the rifampicin encapsulation efficiency was revealed. Therefore the

objective of this first part of the work was to identify and control formulation parameters influencing size and rifampicin encapsulation. However, the *in vitro* rifampicin release profiles from microparticles were not investigated. Therefore, the aim of the present work was to evaluate the *in vitro* release of rifampicin depending of the microparticles formulations.

2. Material and methods

2.1 Material

Rifampicin was gift from Sanofi Aventis (France). The polymer used for microparticles production, poly (D,L-lactide-co-glycolic acid, 50:50) (PLGA, Mw = 7 kDa) was purchased from Boehringer Ingelheim (Germany), and the polyvinyl alcohol (PVA, Mowiol[®] 4-88) used as stabilizer from Sigma-Aldrich GmbH (Germany). Miglyol[®] 829 used to form the oil core of microcapsules were supplied by Sasol (France). Ethyl acetate and DMSO were purchased from Carlo Erba (France). Phosphate buffered solution (PBS) for HPLC analyses, composed with 2.7 mM potassium chloride and 137 mM sodium chloride (10 mM,) pH7.4 at 25°C) was purchased from Sigma-Aldrich (France). The Balanced Salt Solution (BSS) used for *in vitro* release studies was purchased from Alcon (Nanterre, France).

Figure 1. Molecular structure of rifampicin.

2.2 Methods

2.2.1 Preparation of microparticles

Rifampicin loaded microparticles were produced by using emulsion-diffusion technique, patented by *Quintanar-Guerrero et al.* [8]. It is a process based on the production of an emulsion, followed by a dilution leading to the deposition of the polymer around the droplets of rifampicin and thus the formation of microparticles. Briefly, ethyl acetate and distilled water was saturated mutually. After, 5 mg of rifampicin was dissolved in 20 ml of ethyl acetate saturated with water and containing 0.5, 1 or 5 w/v% of PLGA. For the preparation of microcapsules, rifampicin was previously dissolved in the oil (Miglyol[®] 829) at 1.25 or 2.5 w/v% and introduced in the solvent. This organic phase was poured into 40 ml of distilled water saturated by ethyl acetate containing 1.25, 2.5 or 5 w/v% of PVA. The two phases were emulsified by using a high shear rate rotor-stator homogenizer Ultraturrax[®] (T25 Basic, IKA-Werke, Germany) at 6500 rpm during 1 min at room temperature (20°C). After the emulsification, 200 ml of distilled water was added under magnetic stirring for the diffusion of the solvent from the microparticles to the outer phase.

The solvent was then eliminated by evaporation at 40°C and 50 mbar during 1 hour (Rotavapor R-144, Büchi). Microparticles were recovered by centrifugation at 2000 rpm during 10 min at 20°C (Centrifuge 5417C, Eppendorf). After centrifugation, particles in pellets were washed by distilled water twice to eliminate residual PVA (Figure 2). After the second centrifugation, microparticles were redispersed in 10 ml of a mannitol aqueous solution at 10 w/v% and frozen immediately at -80°C. Mannitol was added as a cryopreservative in microparticles suspension. Frozen microparticles were finally lyophilized during 16 hours at 10°C under 0.2 mBar. Freeze drying was finished with a secondary drying (25°C, 4 hours, 0.2 mBar).

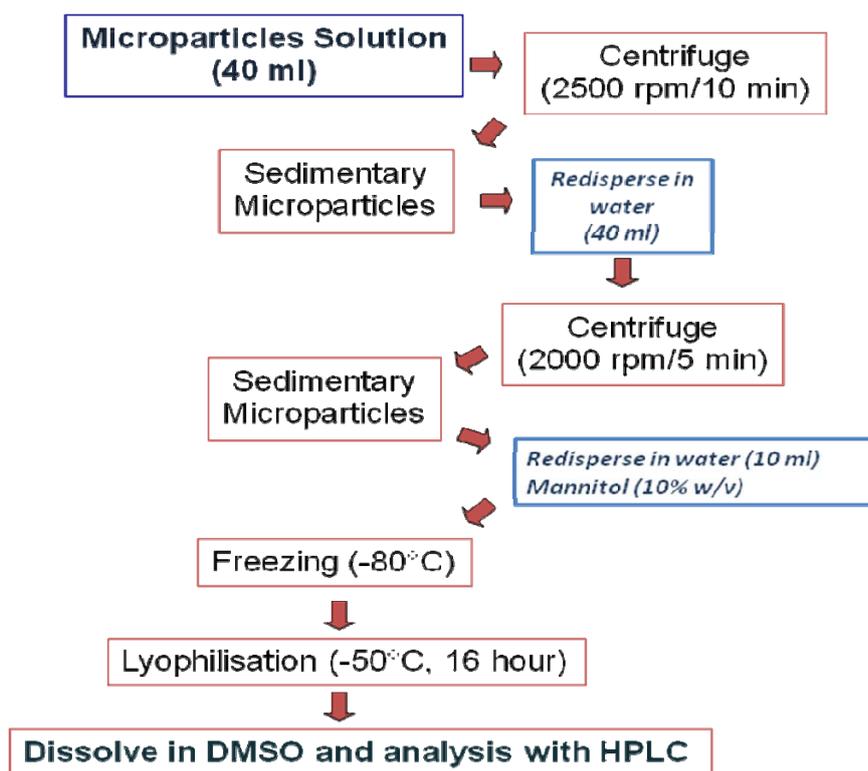


Figure 2. Schema of PVA washing step

2.2.2 Particle size analysis

The mean particle diameter and size distribution were determined using laser diffraction technique with a Coulter[®] apparatus, model LS 230 (Beckman Coulter, USA) equipped with supplementary large-angle detectors working under the polarization intensity differential scattering mode (PIDS). The dilutions of the suspensions required for a right measurement were carried out so as to reach 10% obscuration as recommended. In our case, samples were diluted in distilled water and the size distribution was calculated from three measurements made on the same sample.

2.2.3 Yield of microparticles obtained and Rifampicin encapsulation efficiency

After freeze-drying, the yield of microparticles obtained (Y) was calculated as follow (equation 1).

$$Y = \frac{Y_d}{Y_p} \times 100 \quad \text{Equation 1}$$

Where Y is the yield of microparticles (%), Y_d is sample weight after lyophilisation (mg), and Y_p represents the polymer and rifampicin amounts (mg) used for the microparticles preparation. The amount of PVA adsorbed as the microparticles surface was not considered. PVA was washed after production by centrifugation and re-dispersion of microparticles in water for 3 times, and it assumed that most of the PVA was removed.

Encapsulation efficiency (EE) of rifampicin in microparticles was calculated by measuring the amount of rifampicin contained microparticles after freeze-drying. Firstly the total amount of rifampicin in the lyophilised powder (encapsulated or not) was determined. For

this purpose, 4 mg of lyophilized microspheres were dissolved in 4 ml of DMSO and the solution was analyzed by HPLC as described above. Moreover, in order to evaluate the fraction of encapsulated and non encapsulated rifampicin, 4 mg of the lyophilized microspheres were suspended in 4 ml of water and centrifuged at 7000 rpm during 10 min. The supernatant was isolated and diluted in DMSO before HPLC analysis. The pellet (microparticles) was dissolved in DMSO and the rifampicin entrapped in microparticles quantified by HPLC.

Encapsulation efficiency (EE) was calculated as following (equation 2):

$$EE(\%) = \frac{\text{entrapped fraction}}{\text{total drug amount}} \times 100 \quad \text{Equation 2}$$

The encapsulation yield of rifampicin in microparticles was also defined, as the amount of encapsulated rifampicin per weight of particles. It was expressed as follow (Equation 3):

$$\text{Rifampicin Encapsulation Yield (\%)} = \frac{\text{entrapped rifampicin (mg)}}{\text{microparticles weight (mg)}} \times 100 \quad \text{Equation 3}$$

2.2.4 In vitro drug release studies

A given amount of rifampicin microspheres were suspended in 4 ml of balanced salt solution (BSS) in order to obtain a rifampicin concentration in the medium of 30 µg/ml. The volume of 4 ml for the dissolution medium was chosen as a representative volume of the vitreous in the eye. The dissolution medium BSS contains 0.1 w/v% of sodium metabisulfite anhydrous (Acros Organics, France) as antioxidant to avoid the degradation of released rifampicin in the dissolution medium. The samples (3 samples for each time of analysis) were incubated at 32°C under magnetic stirring. At appropriate intervals of time,

the samples were centrifuged at 7000 rpm during 10 minutes. The supernatant was filtered through 0.2 μm cellulose acetate membranes and the released quantity of rifampicin was determined by HPLC. The pellet (microparticles) was dissolved in 4 ml DMSO and filtered through a 0.45 μm nylon membrane for HPLC analysis.

Six formulations of microparticles were retained for these *in vitro* release studies. They were obtained by varying the concentration of PLGA, PVA and oil. The formulations and their properties were described in table 1

2.2.5 Rifampicin quantification by HPLC analysis

The HPLC method used for rifampicin quantification was a modified method from D.F Bain *et al.* [9]. The HPLC unit consisted in a set of Waters 600 controller, In-line degasser AF 717 Plus, Autosampler REV 3.1, 2996 photodiode Array Detector. 20 μl of samples were injected directly into the column (Zorbax Eclipse Plus C18 Analytical 4.6x150 mm, 5 μm , Agilent, USA). Chromatographic separations were performed at 20°C. Mobile phase was composed of 10 mM phosphate buffered solution (pH 7.4)-acetonitrile (64:36). The total run time was 30 min with a flow rate of 1 ml/min. Rifampicin was detected at $\lambda=238$ nm. The HPLC method was validated using chromatographic parameters including asymmetric of the peak, detection limit, repeatability and reproducibility.

2.2.6 Microscopic observations

Microspheres were observed by scanning electronic microscopy (SEM) after freeze-drying and during the *in vitro* release experiments. For the SEM analysis, suspension of microparticles was poured on a metallic probe and metalized with gold/palladium with a cathodic pulverizer technics Hummer II (6 V, 10 mA). SEM analyses were performed on a FEG Hitachi S800 SEM (Japan) at an accelerating voltage of 15 kV.

3. Results and Discussion

As shown in the previous study, optimized parameters for microparticles formulation could be obtained in order to form microparticles with a mean diameter upper than 1 μm and an efficient rifampicin encapsulation. Based on these specifications, several formulations were selected for *in vitro* release kinetics using PLGA, PVA and Oil concentrations varying from 1 to 5 w/v%, 1.25 to 5 w/v% and 0 to 2.5 w/v% respectively (table 1)

3.1 Microparticles characterization

Before *in vitro* release studies, rifampicin microparticles were characterized by their mean diameters, the rifampicin encapsulation efficiency in microparticles for each retained formulations. Results are mentioned in table 1. Particle mean diameters were measured after redispersion of freeze-dried particles into purified water.

Table 1 Formulation and properties of microparticles used for *in vitro* release studies

Formulation Parameters				Microparticles properties			
Formulation n°	PLGA (%)	PVA (%)	Oil (%)	Mean diameters (µm)	Yield of microparticles Y (%)	Rif. encapsulation efficiency EE (%)	Rif. encapsulation yield (mg/100mg MP)
1	5	5	0	0.91 ± 0.02	62.5 ± 4.3	62.60 ± 1.44	0.498 ± 0.021
2	5	5	1.25	1.01 ± 0.19	61.3 ± 3.8	60.13 ± 3.04	0.488 ± 0.009
3	5	5	2.5	1.13 ± 0.01	62.9 ± 2.9	55.27 ± 3.59	0.437 ± 0.012
4	1	2.5	0	1.04 ± 0.07	71.6 ± 4.5	45.40 ± 4.19	1.772 ± 0.142
5	5	2.5	0	1.57 ± 0.01	68.7 ± 5.7	75.43 ± 2.02	0.546 ± 0.026
6	0.5	1.25	0	1.39 ± 0.08	75.8 ± 6.4	76.22 ± 1.03	2.923 ± 0.334

As shown in table 1, particle mean diameters were upper than 1 µm except for formulation n°1 (0.91 ± 0.02 µm). Although a large range of particle sizes has been reported to be used in the intraocular route [1, 2, 10], a range between 1 µm and 10 µm appeared a good target for optimized drug delivery into the anterior chamber of the eye. In fact, particles smaller than 1 µm will easily pass through the trabecular filter [11], thus failing to stay long enough to deliver the drug into the anterior chamber of the eye. On the other hand, large particles might disturb the clarity of vision [12],. Even if its release profile *in vitro* was evaluated, due to particle size, the formulation n°1 appeared as not suitable for intraocular administration of drug.

The yield of microparticles obtained (process efficiency), varied from 61.3 to 75.8% depending of the formulation parameters. The higher amount of microparticles was obtained with the formulation n°6 (PLGA 0.5 w/v% and PVA 1.25 w/v%). This yield allowed determining the amount of rifampicin per milligram of microparticles. It can be observed in table 1, that the decrease of the polymer concentration allowed to increase the

encapsulation yield of rifampicin in microparticles since 1.772 ± 0.142 mg and 2.923 ± 0.334 mg of rifampicin per 100 mg of particles were obtained with 1 and 0.5 w/v% PLGA, respectively. These results were expected since the amount of rifampicin introduced was the same (5 mg) whereas the amount of polymer, and therefore the amount of particles obtained, decreased. However, it can be also observed that the encapsulation efficiency was better using the lower concentration of PLGA (76.22 ± 1.03 % for 0.5 w/v% PLGA versus a mean of approximately 60 % with PLGA 5 w/v%).

3.2 *In vitro* release profiles

In vitro release studies of rifampicin from microparticles were performed with several formulation of microparticles using different concentrations of polymer and PVA and for both type of particles: microspheres and microcapsules. The dissolution media retained was the BSS (balanced salt solution) used as a physiologic irrigation solution in various surgical procedures of the eyes. However, rifampicin released was degraded in BSS. To prevent degradation 0.1 w/v% sodium metabisulfite was added to BSS as antioxidant.

At first, microparticles with high concentration of PLGA (5 w/v%) were chosen for *in vitro* study, because their mean diameters were suitable for intraocular administration ($1\mu\text{m} < D_{50} < 2\mu\text{m}$) and they can display a sustained release profile of rifampicin. Two types of microparticles were prepared with 5 w/v% of polymer; microspheres and microcapsules. Hence, the influence of the oil concentration on rifampicin release from particles was evaluated (0, 1.25 and 2.5 w/v% of oil in the inner organic phase). Results of *in vitro* release profiles as a function of the oil amount are shown in figure 3.

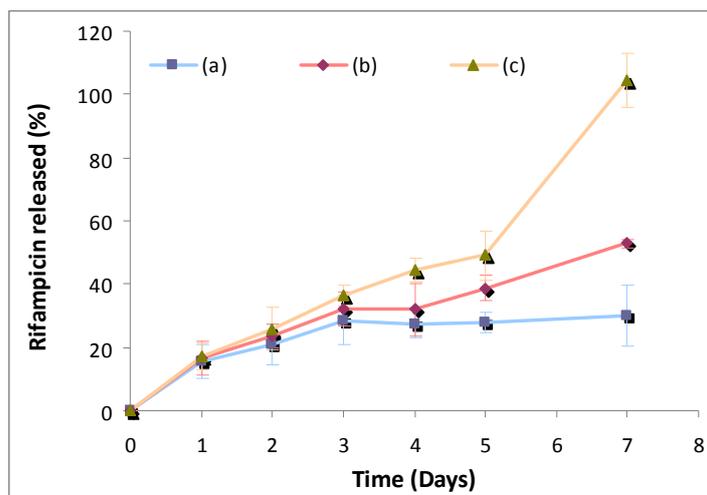


Figure 3. *In vitro* release profiles of rifampicin from microcapsules as a function of the oil concentration: PLGA:5%, PVA: 5%, Miglyol[®] 829: (a) 0%, (b) 1.25% and (c) 2.5%

It can be observed from figure 3 that until 3 days there is no significant differences on the release rate of rifampicin from microcapsules. However, at the fourth day the amount of rifampicin released from microcapsules prepared with 2.5 w/v% of oil was significantly higher than the two other formulations. This release remained faster with 2.5 w/v% oil and was finally total after 7 days of incubation, probably due to the microcapsule breaking. For the microspheres (oil 0%) only 25% of the encapsulated rifampicin was released after 7 days. The microcapsules prepared with 1.25 w/v% of oil presented an intermediate profile, since almost 50 % of the rifampicin was released at 7 days.

These various profiles can be explained by the nature and the morphology of the particles. For microcapsules, a thin polymeric shell coated the core oil. The thickness of the PLGA shell decreased as the volume of the core oil increased. Thinner is the shell, faster is the degradation of the polymer and then the drug release.

Moreover, the effect of PLGA concentration on rifampicin release was studied (figure 4).

In this case, only microspheres were investigated (oil 0%) and the PVA concentration was decreased in order to obtain microparticles bigger than 1 μm mean diameter. As shown on figure 4, as the PLGA concentration decreased from 5 to 1 w/v%, the release of rifampicin was increased from 25 to 60% after 5 days. In figure 4, the total amount of rifampicin released at 5 days with PLGA 5 w/v% was approximately the same than in figure 3. Both formulations only varied by the concentration of PVA used (5 and 2.5 w/v%). However, surprisingly a burst effect can be noticed for microspheres prepared with PVA 2.5 w/v%. The burst effect is common in the case of microspheres since usually a slight amount of drug was adsorbed on particle surfaces and quickly released in the medium whereas for microcapsules, the drug was confine in the inner core oil. The most commonly supported hypothesis for the explanation of the presence of high amount of rifampicin at the particle surface is that some drug could migrated at the surface during the diffusion step of the emulsion/diffusion process or also during the drying process of microspheres [13].

Furthermore, the decrease of the polymer concentration led to a higher burst effect since 32.64 ± 4.65 % of rifampicin was released during the first hour with PLGA 1 w/v% versus 8.33 ± 7.94 % released with the PLGA 5 w/v% microspheres. These amounts were not modified after 14 hours of incubation with 34.30 ± 3.75 % and 8.66 ± 5.28 % of rifampicin released for PLGA 1 and 5 w/v% respectively.

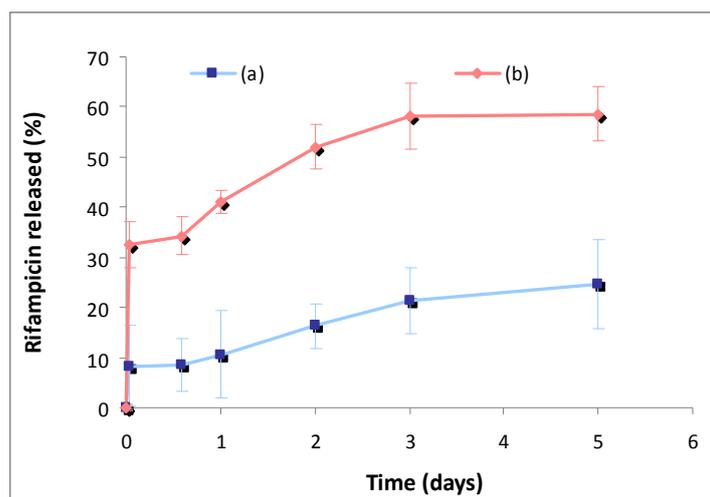


Figure 4. *In vitro* release profile of rifampicin from microparticles as a function of the PLGA concentration: PVA 2.5%, Oil: 0%, PLGA: (a) 1% and (b) 5%.

The evolution of the rifampicin microspheres morphology during *in vitro* release was observed by scanning electron microscopy. Figure 5 showed the aspect of microspheres made with PLGA 1 w/v% and PVA 2.5 w/v% (formulation n°4, table 1) over 1, 6 and 20 days of incubation in BSS at 32°C. As observed on figures 5b and c, degraded microspheres were presented in the medium after 6 days of incubation and only some residual aggregates were identified after 20 days.

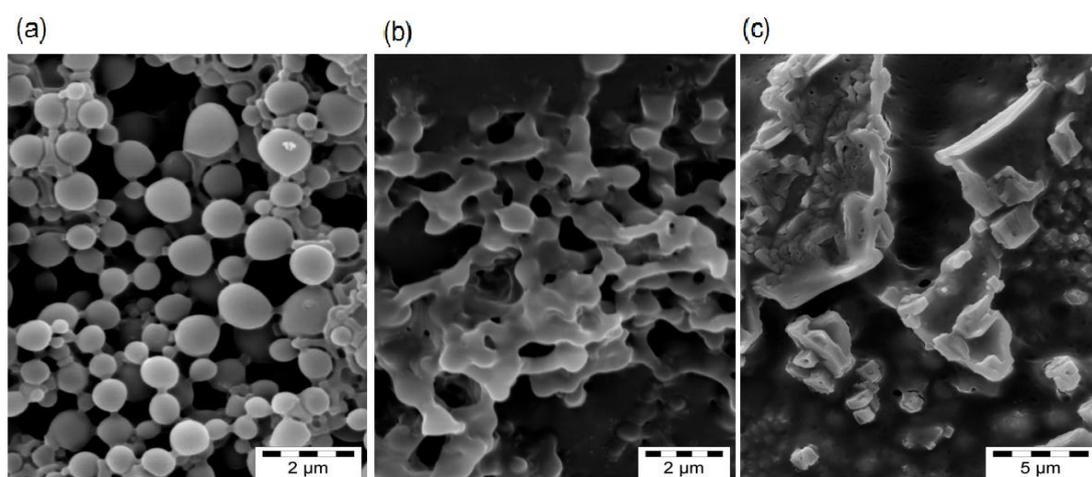


Figure 5. SEM image of rifampicin microparticles; PLGA: 1%, PVA: 2.5%, Oil: 0% (a) 1 day, (b) 6 days, (c) 20 days

The burst effect observed for both formulations with PLGA 1 and 5 w/v% represents an advantage for intraocular antibioprophyllaxis since it allows a faster release of antibiotics at the beginning to reach the MIC50 even the MIC90 (minimal inhibitory concentrations to inactivate 50% and 90% of the microorganism – Table 2), followed by a sustained release of the drug to maintained MIC during several hours or days.

Table 2: MIC (mg/l) of rifampicin against staphylococci species

	MIC 50	MIC 90
<i>S. aureus</i>	0.016-0.05	0.027-0.04
<i>S. epidermidis</i>	0.004-0.05	0.008-1.56
<i>S. haemolyticus</i>	0.008	0.008
<i>S. saprophyticus</i>	0.008	0.02

However, despite this fast release of rifampicin during the first hours, results of figures 3 and 4 showed that a too slow release of the rifampicin from microparticles was obtained over several days. The objective of an intraocular delivery system for antibioprophyllaxis in our case is to deliver a high amount of rifampicin in the first hour (MIC90) and maintained this high concentration over 24 hours after cataract surgery. So in order to obtain a faster release and to reach higher antibiotic amounts in the first hour, the polymer concentration used to form microparticles was decreased from 1 to 0.5 w/v%.

Decreasing the polymer amount helped to increase rifampicin release rate. However, the mean diameter of the microparticles will be consequently decreased. Using the regression equation in terms of the coded variables for the size, described in the first chapter of this manuscript (equation 3), a predictive value of mean diameter could be estimated to 0.75

μm using PLGA 0.5 w/v% and PVA 5 w/v%. Microparticles will be too small and they could be rapidly eliminated from the eye through the trabeculum. For this reason the PVA concentration used was adjusted to 1.25 w/v% in order to obtain bigger microparticles. The mean diameter of microparticles prepared with PLGA 0.5 w/v% and PVA 1.25 w/v% was $1.39 \pm 0.08 \mu\text{m}$ (table 1)

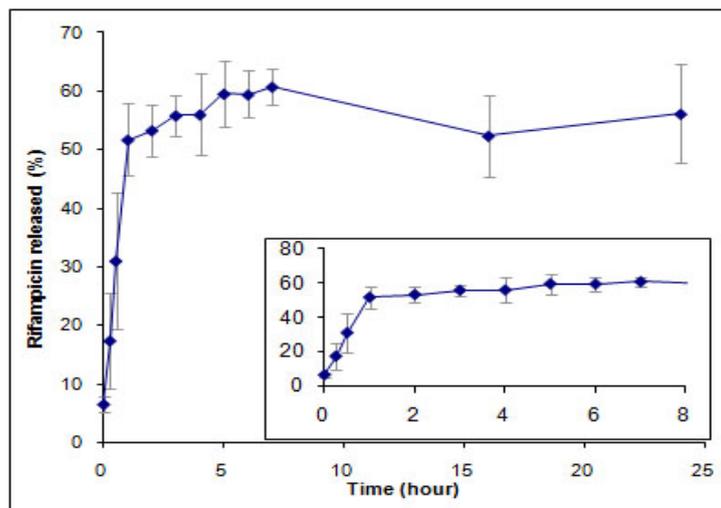


Figure 6. Percentage of rifampicin released from microparticles in BSS during 24 hours, at 32°C; PLGA 0.5%, PVA1.25%, no core oil.

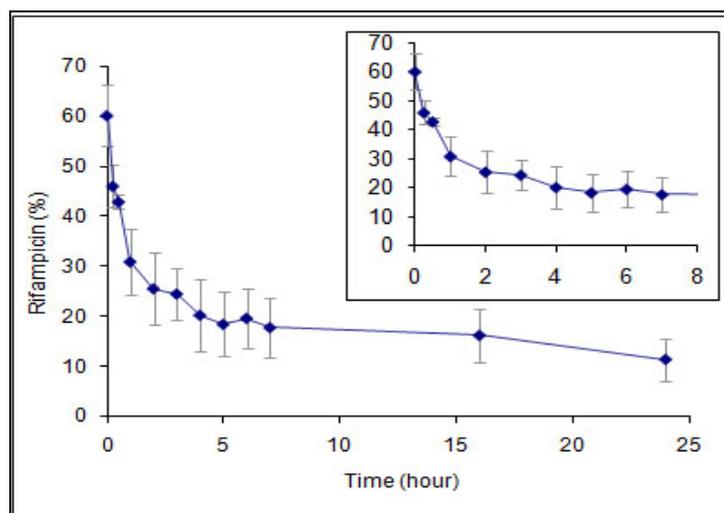


Figure 7. Percentage of rifampicin remaining in microparticles during the 24 hours of the *in vitro* release study, at 32°C; PLGA 0.5%, PVA1.25%, no core oil.

Figure 6 showed the results of the rifampicin released in BSS from microparticles produced with PLGA 0.5 w/v%, and PVA 1.25 w/v%. After 1 hour, 53.5% of rifampicin was released from particles corresponding to a rifampicin concentration in the medium of 16.03 $\mu\text{g/ml}$ (Table 3). For each studied time, the amount of rifampicin remaining in the microparticles was also determined (Figure 7). After 1 hour, 30.9% of rifampicin remained in the microparticles. By adding the amount in particles and the amount released only around 83% of the total amount of rifampicin introduced were retrieved, mainly due to its slight degradation in the medium despite the presence of the antioxidant.

After 24 hours, $11.37 \pm 4.28 \%$ of rifampicin were detected in particles and $58.55 \pm 4.06 \%$ ($17.67 \pm 3.03 \mu\text{g/ml}$) were released. The total amount after 24 hours was around 70% confirming a certain degradation of the rifampicin in the medium.

Table 3 Amounts of rifampicin released *in vitro* from microparticles and remaining in microparticles

Time (hours)	Rifampicin concentration	
	Released ($\mu\text{g/ml}$)	Remained in microparticles ($\mu\text{g/mg MP}$)
0	2.04 \pm 0.32	17.94 \pm 1.17
0.3	5.08 \pm 1.91	12.92 \pm 1.64
0.5	10.25 \pm 4.02	13.27 \pm 1.42
1	16.03 \pm 1.34	9.32 \pm 2.53
2	17.14 \pm 1.61	7.76 \pm 2.79
3	17.54 \pm 0.95	7.48 \pm 2.40
4	18.22 \pm 2.21	6.19 \pm 2.73
5	18.55 \pm 2.11	5.64 \pm 2.46
6	18.82 \pm 2.86	6.03 \pm 2.47
7	19.09 \pm 1.05	5.48 \pm 2.40
16	16.55 \pm 3.10	4.86 \pm 1.60
24	17.67 \pm 3.03	3.46 \pm 1.38

As done previously with microparticles at PLGA 1 w/v% (Figure 5), the evolution of the rifampicin microspheres morphology during *in vitro* release was observed by SEM for PLGA 0.5 w/v% (formulation n°6, table 1). The aspect of the lyophilized particles with or without mannitol was also compared. Freeze-dried microspheres had a spherical shape with a smooth surface (Figure 8a). When mannitol was added in formulations some surrounded layers at the particle surface can be observed (Figure 8c). After 24 hours incubation in BSS, almost all the particles were degraded or aggregated. This aggregation could slow down rifampicin release explaining that after 24 hours 10% of rifampicin still entrapped in microparticles.

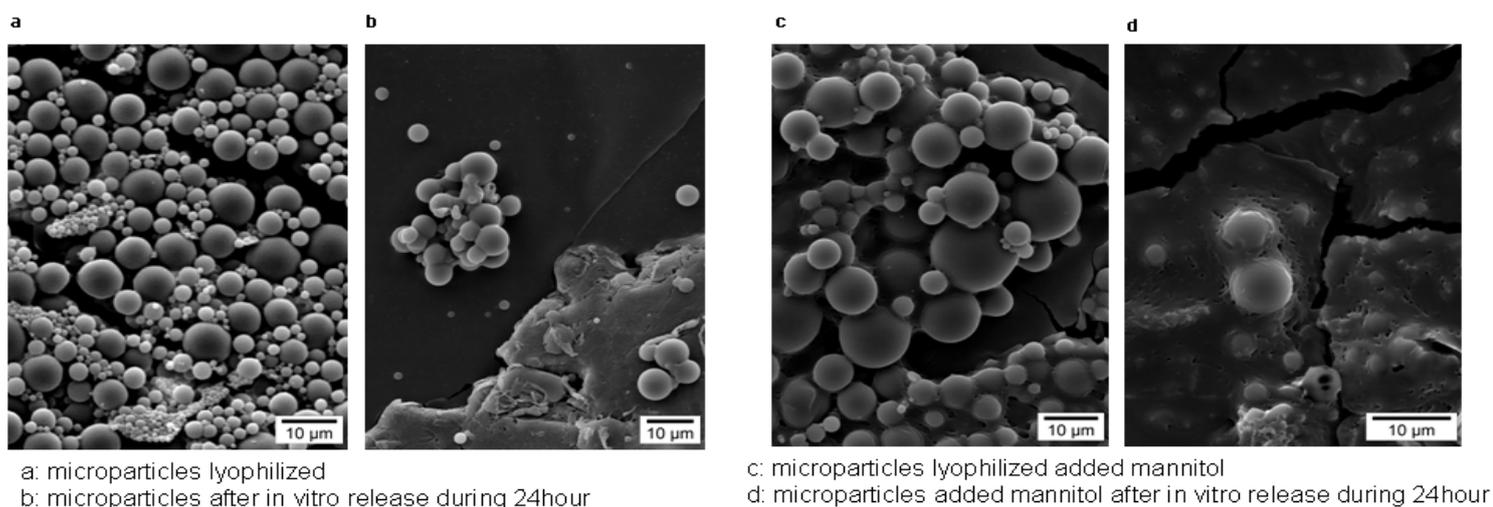


Figure 8. Scanning electron microscopic observations of lyophilized microparticles before and after incubation in BSS during 24 hours.

This study showed that a rapid release of rifampicin occurred in the first hour to reach a rifampicin concentration upper than the MIC₉₀. Indeed as mentioned on table 2, the MIC₅₀ and MIC₉₀ toward *Staphylococcus epidermidis* were 0.004-0.05 mg/L and 0.008-1.56 mg/L respectively. *S. epi.* were considered as one of the main pathogen bacteria involved in post-operative endophthalmitis.

The decrease of the polymer amount involved in microparticles preparation allowed the formation of faster release profile microparticles. In this study a small molecular weight (7 kDa) PLGA, with a 50:50 ratio of poly lactic and poly glycolic acids, was used, allowing a rapid drug release for low polymer concentration. Martinez-Sancho *et al.* [14] explained that the rate of degradation of microspheres *in vivo* depends on the presence of drug, the amount of injected microparticles, nature and molecular weight of the polymer, and the surface area of particles. The use of an amorphous 50:50 PLGA, the low molecular weight of the polymer and the small size of the microspheres affect the rate of degradation of microspheres making it faster.

However, even the concentration of rifampicin in the medium *in vitro* still upper than MIC90 during the 24 hours, some differences in the release profile could be expected *in vivo*. The vitreous has a continuous turnover and the rifampicin released is quickly eliminated from the eye. Therefore it should be consider associating two types of microparticles: one with a fast release of rifampicin for the first 5 hours and a second with a sustained release profile allowing maintaining efficient concentration during 24 hours even 48 hours. This association will be presented in the next chapter in order to test the *in vitro* rifampicin–microparticles efficiency on *S. epi.* growth.

4. Conclusion

In the present work, *in vitro* release kinetics of rifampicin from microparticles was evaluated with several types of microparticles with different polymer and PVA concentrations. The goal of our intraocular delivery system for antibioprohylaxis is to obtain a high loading dose of rifampicin (upper than MIC90) during the first hour combined to a sustained release profile during 24 hours after cataract surgery. The release of a rifampicin amount upper than MIC90 over 24 hours was demonstrated in this study. However the modification of the formulation parameters, mainly polymer concentration, can clearly modified *in vitro* release profile of rifampicin. Therefore in order to choose suitable microspheres formulation, the efficiency of rifampicin-loaded microparticles on bacterial growth has to be evaluated. In the next part of this work, the antibacterial activity and the anti-adhesive efficiency on IOLs of rifampicin microparticles will be studied.

BIBLIOGRAPHIE

1. Wiechens, B., Krausse R., Grammer J.B., Neumann D., Pleyer U., Duncker G.I., *Clearance of liposome-incorporated ciprofloxacin after intravitreal injection in rabbit eyes*. *Klin. Monatsbl. Augenheilkd*, 1998. 213: p. 284-292.
2. Yeh, M.K., Tung S.M., Lu D.W., Cheg J.L., Chiang C.H., *Formulation factors for preparing ocular biodegradable delivery system of 5-fluorouracil microparticles*. *J Microencaps.*, 2001. 18(507–19).
3. Dutt, M., Khuller G.K., *Therapeutic efficacy of poly(dl-lactide-coglycolide)-encapsulated antitubercular drugs against Mycobacterium tuberculosis infection induced in mice* *Antimicrob Agents Chemother.*, 2001. 45(1): p. 363–366.
4. Makino, K., Nakajima T., Shikamura M., Ito F., Ando S., Kochi C., Inagawa H., Soma G., Terada H., *Efficient intracellular delivery of rifampicin to alveolar macrophages using rifampicin-loaded PLGA microspheres: effects of molecular weight and composition of PLGA on release of rifampicin*. *Colloids Surface* 2004. B 36 p. 35–42.
5. Ito, F., Makino K., *Preparation and properties of monodispersed rifampicinloaded poly(lactide-co-glycolide)*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2004. 39: p. 17–21.
6. Bertram, J.P., Saluja S. S., McKain J., Lavik E. B., *Sustained delivery of timolol maleate from poly(lactic-co-glycolic acid)/poly(lactic acid) microspheres for over 3 months*. *J Microencaps.*, 2008: p. 1–8.
7. Kodjikian, L., Burillon C., and Garweg J.G., *Intracameral vancomycin and endophthalmitis prophylaxis*. *J. Cataract and Ref. Surgery* 2004. 30(10): p. 2030; author reply 2030-1.
8. Quintanar-Guerrero, D., et al., *Methods for preparing vesicular nanocapsules*. 1999: PCT.
9. Bain, D.F., Munday D.L., Cox P.J., *Evaluation of biodegradable rifampicin-bearing microsphere formulations using a stability-indicating high-performance liquid chromatographic assay*. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 1998. 7: p. 57–65.
10. Moritera, T., Ogura Y., Yoshimura N., Honda Y., Wada R., Hyon S.H., Ikada Y., *Biodegradable microspheres containing adriamycin in the treatment of proliferative vitreoretinopathy*. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 1992. 33: p. 3125-30.
11. Saraux, H., *Physiologie de l'Humeur Aqueuse et de la Pression Oculaire* Chap. in *Physiologie Oculaire*. 1983, Paris: Masson. 122-153.

12. Ackerman, E., *Light and the eye. Chap. in Biophysical Science*. 1962, London: Prentice-Hall. 27-51.
13. Cohen, S., Yoshiaka, T., Lucarelli, M., *Controlled delivery system for proteins based on poly (lactic/glycolic acid microspheres*. *Pharm. Res*, 1991. 8: p. 713-720.
14. Martínez-Sancho, C., Herrero-Vanrell R., Negro S., *Optimisation of aciclovir poly-lactide-co-glycolide microspheres for intravitreal administration using a factorial design study*. *Int J Pharm*, 2004. 273(1-2): p. 45-56.

PARTIE 2

CHAPITRE 4

STUDY OF ANTIBACTERIAL AND ANTI-ADHERENT ACTIVITY OF RIFAMPICIN MICROPARTICLES

Résumé

Suite aux études de libération *in vitro* de la rifampicine à partir des microparticules, des études d'efficacité ont été envisagées. Dans un premier temps, ces études d'efficacité ont consisté à suivre l'effet de la rifampicine encapsulée sur le développement d'un microorganisme pathogène, *Staphylocoques epidermidis*, germe souvent mis en cause dans la survenue des endophtalmies postopératoires. Puis dans un second temps, l'effet de la rifampicine encapsulée sur l'adhérence des bactéries à des lentilles intraoculaires (LIOs) a été évalué.

L'effet bactéricide de la rifampicine encapsulée est évaluée en incubant les microparticules dans une suspension de *S. epidermidis* (10^3 UFC/ml) dans du BSS (balanced salt solution) à 36°C. Des prélèvements du milieu sont réalisés après 1, 2, 3, 5, 6, 18, et 24 heures d'incubation et le nombre de bactéries en présence est quantifié après 24 heures de culture en milieu trypticase – soja. Suite aux résultats des cinétiques de libération *in vitro*, deux types de microparticules ont été retenues pour ces mesures d'efficacité : des particules à libération rapide de rifampicine (MP1) formées à partir de 0,5 m/V% de PLGA, et des particules à libération plus lente (MP2) préparées avec 1 m/V% de polymère. Des échantillons témoins ont aussi été utilisés comme contrôle : une suspension de BSS seule, une solution de rifampicine non encapsulée (forme de référence), des microparticules de PLGA blanches (non chargées en rifampicine). Enfin l'efficacité d'une association MP1 et MP2 a aussi été étudiée.

Les résultats de courbes de croissance bactérienne ont ainsi montré que les microparticules de rifampicine avaient une activité antibiotique comparable, voire légèrement supérieure à celle de la solution de rifampicine. En présence des MP1 une activité plutôt bactériostatique comparable à celle de la rifampicine a pu être observée

puisqu'après 30 heures d'incubation la rifampicine de référence et les MP1 avaient une efficacité antibactérienne de 56 et 58 % respectivement. En revanche avec les MP2, presque toutes les bactéries ont disparues après 30 heures d'incubation, avec une efficacité bactéricide de 98%. Aucun effet des microparticules de PLGA blanches n'a été observé sur l'inhibition de la croissance bactérienne.

Concernant l'activité anti-adhérente des microparticules, nous avons cherché à quantifier si la rifampicine encapsulée avait gardé son efficacité vis-à-vis de l'adhésion de bactéries sur les LIOs; En effet la rifampicine présente les caractéristiques d'être bactéricide et d'avoir une certaine efficacité contre l'adhésion des bactéries pathogènes sur les dispositifs implantables comme les LIOs. Le même type d'étude que celle décrite ci-dessus a donc été conduit en introduisant en plus dans le milieu d'incubation des LIOs. L'objectif étant de quantifier le nombre de bactéries adhérees aux LIOs au cours de l'incubation. Nous avons pu montrer que la présence de rifampicine encapsulée entraînait une large inhibition de l'adhésion de *S. epidermidis* sur les LIOs et que cet effet anti-adhérent était nettement plus marqué que la solution de rifampicine de référence (environ 60% d'efficacité anti-adhérente après 6h et plus de 99% après 20h contre seulement 50% à 20h avec la rifampicine seule).

Ces études ont donc permis de montrer que les microparticules étaient capables d'inhiber la croissance bactérienne lorsqu'elles sont mise en présence de *S. epidermidis*. Les MP1, à libération rapide de rifampicine, permettraient, dans les premières heures de traitement, d'avoir une efficacité comparable à la solution de rifampicine non encapsulée de référence. De plus, l'utilisation de microparticules avec un profil de libération plus lent permet d'atteindre une inactivation totale des bactéries après 30 heures d'incubation. Enfin un pouvoir anti-adhérent très marquée de la rifampicine encapsulée a pu être mis en évidence.

STUDY OF ANTIBACTERIAL AND ANTI-ADHERENT ACTIVITY OF RIFAMPICIN MICROPARTICLES

M.Y. Lee¹, S. Bourgeois^{1*}, H. Fessi¹, A. Vettese², F. Renaud^{2,3}, L. Kodjikian^{3,4}

1 Université de Lyon, F-69622, Lyon, France; Université Lyon 1, Villeurbanne; LAGEP, UMR CNRS 5007, , 43 bd du 11 novembre, 69100 Villeurbanne, France

2 UMR-CNRS-5510 MATEIS « I2B », Université Lyon1

3 IUT Lyon 1, Dpt Génie Biologie, Université Lyon1

4 Croix-Rousse Hospital, Department of Ophthalmology, F-69004, Lyon, France.

Abstract

Antibacterial activity and antiadhesive property on the intraocular lens of rifampicin loaded-microparticles are evaluated by assessing on *Staphylococcus epidermidis* clinical strain N890074 containing the intercellular adhesion locus Ica. 1 µg/ml of rifampicin solution was used as a standard. In this study Poly (lactide-co-glycolide) microparticles, containing rifampicin were prepared by emulsification diffusion method. Two different types of microparticles were used depending on rifampicin release rate. To obtain bacterial killing and anti-adhesion curves, experiments were first performed in a bacterial suspension containing 1000 colony-forming units per milliliter. Experiments were then performed with intraocular lenses incubated in the suspension. Efficacy was investigated by bacterial counts.

Keywords: Endophthalmitis, Rifampicin, Microparticles, IOLs

1. Introduction

The development and increase of ocular surgeries such as cataract or glaucoma surgeries, led to an increase incidence of bacterial infections [1-3]. This contamination of the anterior and posterior segments of the eye by pathogenic microorganisms can cause postoperative endophthalmitis leading to serious damages on the eye [4, 5]. Endophthalmitis is a severe inflammation involving complaints of the patients with reduced or blurred vision, ocular pain, conjunctive hyperemia of lid swelling [6]. Endophthalmitis is usually due to an infection by Gram positive bacteria [7]. In particular, during the cataract surgery, it has been showed that the intraocular lens implantation increased the bacterial contamination of the anterior chamber. Pathogenics may be carried into the eye by irrigation or may be adhered to the lens implantation [8-11]. To prevent postsurgical endophthalmitis, preoperative and postoperative antibiotic therapy is necessary.

Curative treatment of endophthalmitis mainly involved intraocular injections of antibiotics such as vancomycin or ceftazidime followed by systemic antibiotherapy via oral or parenteral routes. Usually a prophylactic treatment is administrated to the patients before surgery (antiseptic eye droplets and oral antibiotics) followed by several intraocular injections of antibiotic during and after surgery (12h and 24h). However, these antibiotics are rapidly eliminated from the eye and repeated intraocular injections are required. It appears as the main drawback of prophylactic antibiotherapy since it's very painful for patients. In order to limit the number of intraocular injections the development of sustained-release delivery system of antibiotics for intraocular administration was investigated [12].

Among antibiotics retained for the prophylactic treatment of endophthalmitis, rifampicin presents the advantage to be highly active against Gram positive bacteria, such

Staphylococcus species mainly involved in endophthalmitis infections. However, the application of this antibiotic is usually limited to curative treatment of endophthalmitis in association with others antibiotics to avoid resistances. For routinely administrated prophylactic treatment, rifampicin presents the drawback to have a marked orange color and therefore to involve vision troubles for the patient. So in order to limit these visions disorders and to maintain a sustained concentration of rifampicin in the eye, rifampicin microparticles for intraocular administration were developed.

In the previous studies, the formulation of rifampicin-microparticles was optimized and the *in vitro* release profiles of the antibiotic from microparticles were evaluated. These experiments allowed selecting microsphere formulations suitable for intraocular delivery of rifampicin: a mean diameter upper than 1 μm and controlled release profiles in order to have a burst release in a first time and a sustained-release over at least 24 hours.

This part of the study aims to evaluate the antibacterial and anti-adherent properties of two types of rifampicin microspheres: microparticles with a rapid-release profile for the loading dose (MP1) and microparticles with a sustained release profile of rifampicin to maintain prophylactic effect over 24 hours. Firstly the antibacterial activity of encapsulated rifampicin was evaluated by following the development of *Staphylococcus epidermidis* in the presence of rifampicin microparticles. Then, the evaluation of the anti-adherent properties of the encapsulated antibiotic were performed on intraocular lenses (IOLs) incubated in the medium with rifampicin microspheres and *S. epidermidis*.

2. Material and Methods

2.1 Bacterial strain and intraocular lenses

A clinical isolated *Staphylococcus epidermidis* (N890074) was provided by the Staphylococci National reference Center, Lyon, France. By using polymerase chain reaction amplification, it had been checked that this strain carried the intercellular adhesion (*ica*) locus, which is known to encode production of *S. epidermidis* antigens that mediate adhesion to biomaterials and between the bacterial cells [13].

Sterile hydrophobic intraocular lenses (IOLs) composed of polymethylmethacrylate (Sensar AR40e, Advanced Medical Optics Inc.) were used throughout the study. They had an identical optic diameter and overall diameter of 6.0 mm and 13.0 mm, respectively, and refractive power of 22.0 diopters.

2.2 Rifampicin microparticles

Rifampicin loaded microparticles were produced by using emulsion-diffusion technique, patented by *Quintanar-Guerrero et al. (1999)* [14]. Briefly, ethyl acetate and distilled water was saturated mutually. After, 5 mg of rifampicin was dissolved in 20 ml of ethyl acetate saturated with water and containing 0.5 or 1 w/v% of PLGA. This organic phase was poured into 40 ml of distilled water saturated by ethyl acetate containing 1.25 or 2.5 w/v of PVA. The two phases were emulsified by using a high shear rate rotor-stator homogenizer Ultraturrax[®] (T25 Basic, IKA-Werke, Germany) at 6500 rpm during 1 min at room temperature (20°C). After the emulsification, 200 ml of distilled water was added under magnetic stirring for the diffusion of the solvent from the inner phase to the outer phase and then to form the microparticles by PLGA insolubilisation. The solvent was then

eliminated by evaporation at 40°C and 50 mbar during 1 hour (Rotavapor R-144, Büchi). Microparticles were recovered by centrifugation at 2000 rpm during 10 min at 20°C (Centrifuge 5417C, Eppendorf). Collected microparticles were washed by water for 3 times and lyophilized as described in previous studies.

Two types of microparticles were retained for this study with two different release profiles of rifampicin.

- Microparticles type 1 (MP1): "rapid-release" profile microparticles, made with PLGA 0.5 w/v% and PVA 1.25 w/v%.

- Microparticles type 2 (MP2): "slow-release" profile microparticles, made with PLGA 1 w/v% and PVA 2.5 w/v%.

Freeze-dried microparticles were characterized by their mean diameter, their zeta potential and their rifampicin encapsulation efficiency.

2.3 Antibacterial activity of rifampicin microparticles

In order to evaluate the antibacterial effect of encapsulated rifampicin, loaded microparticles were incubated in presence of bacteria, *Staphylococcus epidermidis* (10^3 CFU/ml) at 36°C and the effect on bacterial growth was evaluated. Six groups of bacterial suspensions were incubated in different conditions (Table 1): BSS (balanced salt solution) solution alone (control; Group 1), rifampicin solution at 1 µg/ml in BSS (Group 2); unloaded microparticles (Group 3); rifampicin-loaded microparticles type 1 (rapid release; Group 4); rifampicin-loaded microparticles type 2 (slow release; Group 5); mixed rifampicin microparticles type 1 and 2 (Group 6). To obtain bacteria killing curves, samples were taken at fixed intervals (1, 2, 3, 5, 6, 18, and 24 hours), diluted 5 times, and cultured on trypticase soy agar for 24 hours at 36°C before bacterial counting. Test was

repeated 6 times.

Table 1 Different samples tested (volume of suspension bacterial= 10 ml)

	Samples	Concentration of rifampicin or amount of microparticles (MP)
Group 1	Control	
Group 2	Rifampicin solution	1 µg/mL
Group 3	Unloaded microparticles (blank)	MP 1.5 mg
Group 4	Microparticles type 1 (rapid release)	MP 1 mg (rifampicin ~ 1.5 µg/mL for 50% released = loading dose)
Group 5	Microparticles type 2 (slow release)	MP 0.5 mg
Group 6	Microparticles type 1+2 (rapid +slow release)	MP type 1 (1 mg) + MP type 2 (0.5 mg)

2.4 Bacterial adhesion evaluations

The same experiments were reproduced in the presence of intraocular lens (IOLs) in the bacteria suspensions (n=3). At fixed time, IOLs were isolated from the bacterial suspensions and washed 3 times in a sterile PBS 0.08 M (pH 7.8) solution to remove unbound bacteria. Isolated IOLs were introduced in 1ml of BSS, and the bacteria adhered to lens are released in the BSS using ultrasounds at 45 kHz during 5 minutes. The resulting suspension was diluted 5 times and dispersed into a nutritive trypticase soy agar plate. Colony of bacteria is counted after incubation at 36°C during 24 hours. Experiments were repeated 10 times in each group and for each incubation period.

3. Results and discussion

3.1. Microparticle characterization

The properties of the microparticles (MP type1 and MP type2) used for antibacterial and anti-adherent evaluations were presented in table 2.

Table 2 Characterization of microparticles used for antibacterial evaluations

Formulations			Microparticles properties			
	PLGA (%)	PVA (%)	Mean diameter (μm)	Zeta potential (mV)	Rifampicin Encapsulation Efficiency (%)	Rifampicin loading (mg/100mg MP)
MP1	0.5	1.25	1.39 ± 0.08	-18.3 ± 4.6	76.22 ± 1.03	2.923 ± 0.334
MP2	1	2.5	1.04 ± 0.07	-16.9 ± 5.3	45.40 ± 4.19	1.772 ± 0.142

3.2. Evaluation of the antibacterial activity of rifampicin microparticles

Antibacterial efficiency was studied by comparison of 6 groups presented above in table 1. As shown in figure 1, without any antibacterial agent (control group), bacteria increased from 4 logs to 7 logs during 48 hours. The amount of bacteria increased rapidly from 5 to 24 hours of incubation time to reach a plateau value. Although no additional nutrient was added on the suspension, bacteria survived.

Before the evaluation of rifampicin microparticle efficiency, effect of PLGA polymer on the bacteria growth was tested. PLGA is a biodegradable and a biocompatible polymer. Its degradation time is decided by the polymer length and composition rate between poly

lactic acid (PLA) and poly glycolic acid (PGA). Figure 1 showed bacteria growth curve in presence of PLGA microparticles without rifampicin (group 3). Until 18 hours, the number of bacteria in suspension with unloaded PLGA microparticles (5.36 ± 0.46 log) was slightly lower than with bacteria suspension alone (6.50 ± 0.04 log). However, after 24 hours of incubation, the amount of bacteria in presence of PLGA particles (6.74 ± 0.12 log) or BSS alone (6.99 ± 0.29 logs) were not considered as different. Although the number of bacteria in the presence of unloaded-PLGA microparticles was slightly lower than without any treatment, this difference was not significant. Moreover, after 24 hours bacteria growth curves became almost similar. Therefore, it could be concluded that the PLGA degradation had no effect on the growth of bacteria.

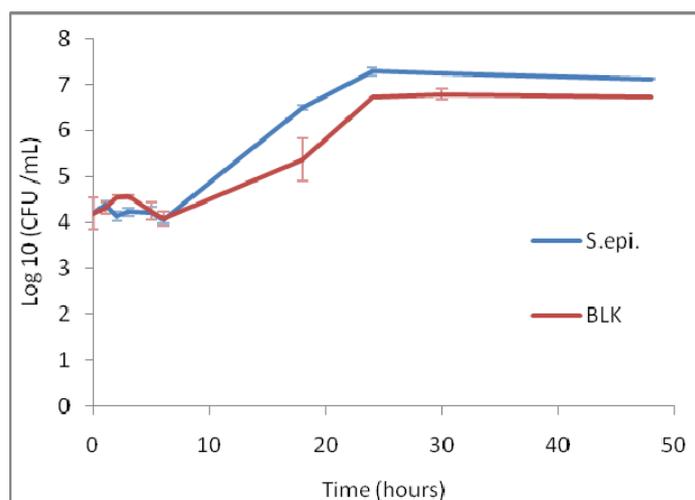


Figure 1. Bacterial growth curves of *S. epidermidis* in BSS alone (control=*S. epi*) and PLGA microparticles without rifampicin (blank=BLK)

To determine antibacterial efficiency of rifampicin-loaded microparticles, four different groups were studied: non-encapsulated rifampicin solution (group 2) used as a control, microparticles type 1 (MP1; Group 4) containing rifampicin 2.923 mg / microparticles 100 mg, microparticles type 2 (MP2; Group 5) containing rifampicin 1.772 mg / microparticles

100 mg and a mix of MP1 and MP2 (Group 6).

In this experiment two different types of microparticles (rapid release: type 1, slow release: type 2) were tested, since they presented various release profiles due to the different concentrations of PLGA used for the microparticle preparation. Previous studies have shown that *in vitro* release of rifampicin from type 1 microparticles (MP1) was performed within a short period time (50% released in 1 hour). Moreover, type 2 microparticles presented (MP2) a more slowly release profile (50% released in 2 days). In this experiment the antibacterial activity of type 1 and 2 microparticles was individually tested and additionally a mixture of both microparticles was evaluated (MP1+2; group 6).

Rifampicin-loaded microparticles showed compliant efficiency toward the inhibition of *Staphylococcus epidermidis* growth. In the case of MP1, a similar growth bacterial profile was obtained than with the control rifampicin solution (Figure 2A).

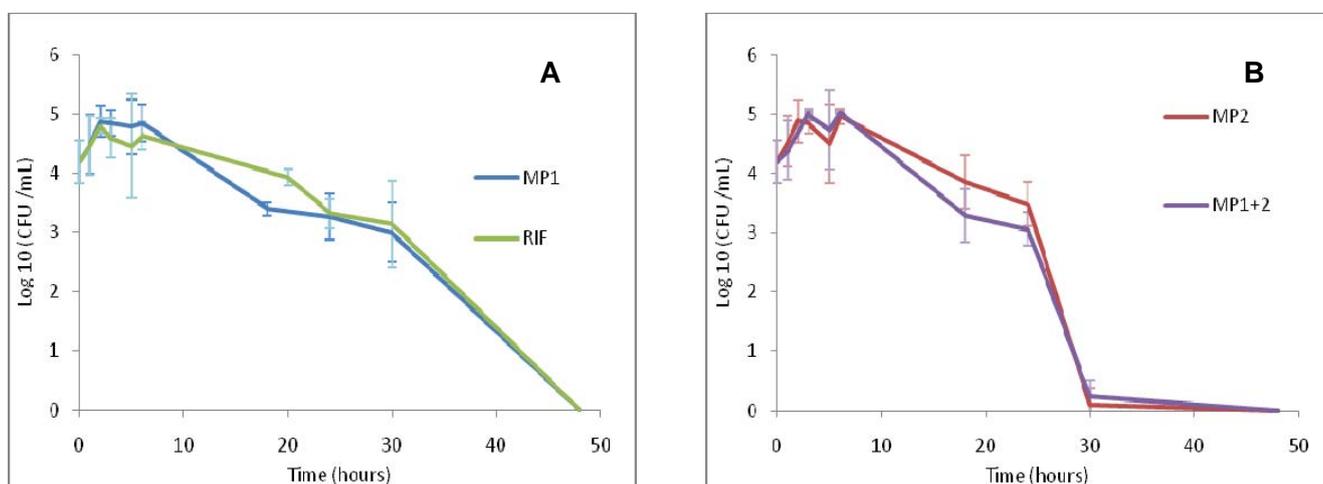


Figure 2. Bacterial growth curves of *S. epidermidis* in the presence of: (A) BSS containing rifampicin (RIF, Group 2) and rifampicin-loaded microparticles type 1 (MP1, Group 4); (B) rifampicin-loaded microparticles type 2 (MP2, Group 5) and a mixture of microparticles type 1 and 2 (MP1+2, Group 6).

Bacterial growth curves in figure 2 showed that the antibacterial effect started after 2 hours of incubation for both rifampicin solution and MP1. During the first 5 hours free rifampicin seemed slightly more efficient on bacterial growth inhibition than encapsulated rifampicin (MP1), probably due to the lag time of rifampicin release from microparticles to reach the MIC50. However, from 5 hours to 24 hours of incubation, rifampicin released from MP1 appeared slightly more effective than rifampicin solution. After 18 hours, rifampicin had around 40% of inhibitory effect on bacterial growth whereas MP1 had around 48% of inhibitory effect (Table 3). However, after 24 hours two groups showed no difference.

These results can be compared with type 2 microparticles (MP2) and the mixture of type 1 and 2 (MP1+2). Surprisingly MP2 had an effective bactericidal activity roughly similar to MP1 during the first hours (Figure 2B). At 18 hours bacteria growth was inhibited of 41% by MP2. This efficiency is similar to the control rifampicin solution (40%) but lower than MP1 (48%), However when the growth time reached 30 hours, MP2 showed an efficiency about 99% (0.106 ± 0.26 logs), with a quasi total bactericidal effect, while the control rifampicin and MP1 showed only a bacteriostatic effect with 56 to 58% (3 logs) of efficiency respectively.

These results confirmed the results of *in vitro* release kinetics. Rifampicin from MP1 was released more quickly and appeared as slightly more effective as rifampicin solution during the first 24 hours. But, after the first 24 hours, almost all the rifampicin is released from MP1 and the growth profile of bacteria was similar to those with control rifampicin solution. In contrast, *in vitro* release of rifampicin from MP2 was delayed, and during the first 24 hours, the number of *S. epidermidis* only slightly decreased. However, after 30 hours of incubation rifampicin still released in high quantity from MP2, and a bactericidal effect can be noticed.

Mixture of microparticles type 1 and type 2 (MP1+2) combined the two tendencies of growth curve of both microparticles. Until 24 hours it showed same efficiency as MP1 alone, and after 24 hours, all bacteria were almost killed before 30 hours like as MP2 (Figure 2B).

Table 3 Bactericidal efficiency (% \pm SD) of unloaded PLGA microparticles (Blank BLK), rifampicin solution (RIF), microparticles type 1 (MP1), 2 (MP2), 1+2 (MP1+2) compared to *S. epidermidis* suspension alone (control).

Time (hours)	BLK	RIF	MP1	MP2	MP1+2
0	0	0	0	0	0
1	8.48	5.18	4.77	3.64	7.05
3	5.27	4.53	<0.1	<0.1	<0.1
5	11.97	7.43	0.68	6.56	1.73
18	17.45	39.47	47.74	40.63	49.33
24	3.60	52.58	53.39	50.25	56.33
30	5.53	56.43	58.26	98.52	96.86
48	5.62	>99.9	>99.9	>99.9	>99.9

3.3. Evaluation of the anti-adherence effect of rifampicin microparticles

Bacterial adhesion studies were performed using the same method as antibacterial activity evaluations. Since this experiment was performed during 24 hours, only type 1 microparticles (MP1) were evaluated. IOLs were incubated in *S. epidermidis* suspension in the presence or not of rifampicin microparticles. Control assays by incubating IOLs and bacteria in BSS alone or with rifampicin solution were also performed.

Results of bacteria growth in suspension for this experiment (Figure 3) were similar to those mentioned previously (Figures 1 and 2A). Initial number of bacteria started at 4 logs,

and after 24 hours, without any antibacterial agent, they increased to reach more than 6 logs. In the presence of rifampicin solution and MP1, bacterial growth was inhibited of 3.66 logs and 3.14 logs respectively (Figure 3), both showing about 50% inhibition efficiency (Table 4).

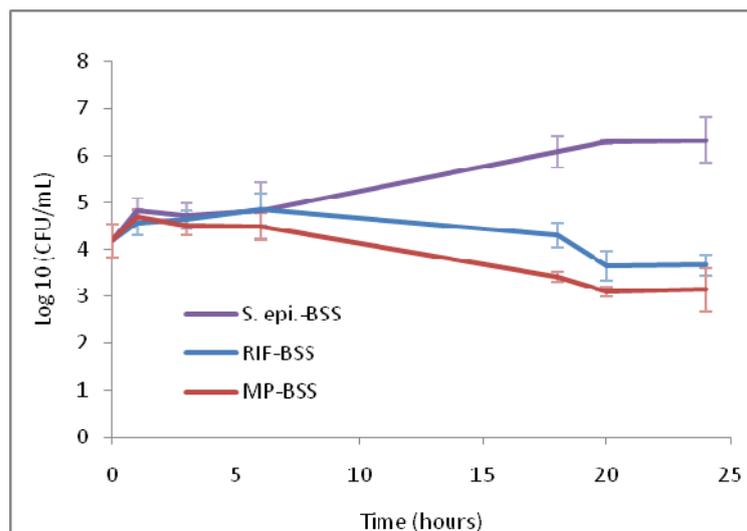


Figure 3. Bacterial growth curves of *S. epidermidis* incubated with IOLs: without treatment (control=*S epi*), with rifampicin solution (RIF) and with microparticles type 1 (MP)

Anti-adherent efficiency results showed more remarkable differences. Figure 4 represents the results of the growth of *S. epidermidis* removed from IOLs by sonication. IOLs were previously incubated during 1, 3, 6, 18 20 and 24 hours with the bacterial suspension and rifampicin-microparticles. Until 3 hours, bacteria increased of 2 logs in the three cases showing that some bacteria firstly adhered to IOLs. However, after 6 hours of incubation an important fall of the bacteria amount can be observed for the rifampicin microparticles (~58% of inhibition, table 4) whereas there is no modification for the controls. These results demonstrated that less *S. epidermidis* were adhered to the IOLs due to the action of rifampicin released from the microspheres. Moreover, after 20 hours the number of bacteria adhered dramatically increased to 5 logs for the control without any treatment and

was slightly reduced to 2 logs for the rifampicin solution, while there is no more bacteria adhered to IOLs with MP1 (> 99.9 % anti-adherent efficiency, table 4).

The slow effect of the antibiotic treatment at the beginning may be due to the rifampicin dissolution time in the medium and to the lag-time for inhibit bacterial since it was similar between free rifampicin solution and rifampicin microparticles. However, the absence of bacteria adhesion on IOLs after 18 hours demonstrated the sustained-release of rifampicin from microparticles allowing to maintain efficient anti-adherent concentration of the antibiotic in the medium for several hours.

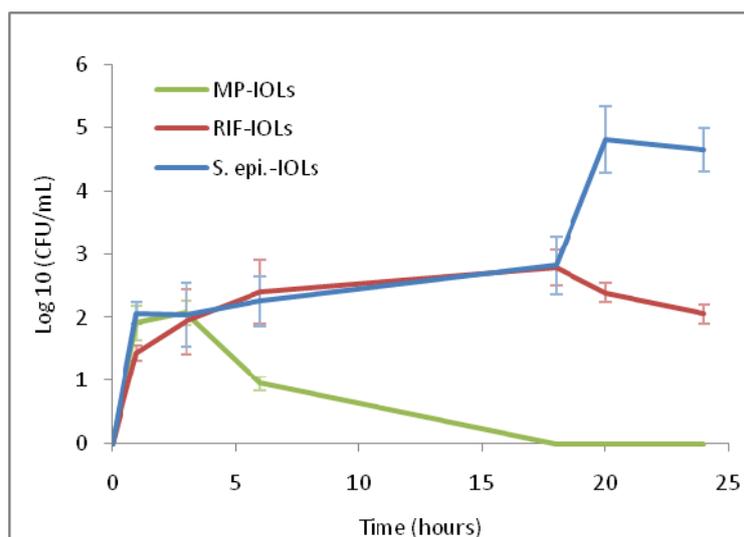


Figure 4. Bacterial growth curves of *S. epidermidis* adhered to IOLs during their incubation into bacterial suspensions: without treatment (*S. epi* IOLs), with rifampicin solution (RIF IOLs) and with rifampicin microparticles type 1 (MP IOLs)

Table 4 Bactericidal efficiency and anti-adhesion efficiency to IOLS of free and encapsulated rifampicin (MP1) compared to control

Time (hours)	Bactericidal efficiency (%)		Antiadherent efficiency (%)	
	Rifampicin	MP1	Rifampicin	MP1
0	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
1	5.75	2.62	30.31	7.32
3	1.44	4.31	5.19	0.00
6	<0.1	6.89	<0.1	57.90
18	29.29	43.78	1.40	>99.9
20	41.84	50.68	50.42	>99.9
24	42.10	50.37	55.86	>99.9

Rifampicin microparticles were able to maintain efficient concentration of rifampicin in the medium allowing to inhibit *S. epidermidis* growth and bacterial adhesion on IOLs over several hours. The same efficiency was mentioned for the study of Hachicha et al. who developed vancomycin-microparticles for endophthalmitis prophylaxis [15]

4. Conclusion

Bactericidal and anti-adherent efficiencies of rifampicin-loaded microparticles against *Staphylococcus epidermidis* were demonstrated. PLGA microparticles without rifampicin had no bactericidal efficiency. Type 1 microparticles, with a rapid rifampicin release profile *in vitro*, showed an effect towards bacteria development similar to unloaded rifampicin over 48 hours. However, slow-release profile microparticles (MP2) exhibited a similar antibacterial effect than MP1 during the first 24 hours, but were able to destroy all the *S epidermidis* in the medium after 30 hours. The association of MP1 and MP2 allowed to obtain both types of antibacterial profile since the same effect as MP1 was observed during 24 hours combined with the bactericidal effect of MP2 over 30 hours. Moreover,

rifampicin-loaded microparticles have shown a very efficient anti-adherent effect of *S. epidermidis* on IOLs at 24 hours.

Therefore, these results have shown that rifampicin loaded microparticles were suitable for antibioprohylaxis of the postoperative endophthalmitis due to their bactericidal effect and especially to their major anti-adherent effect on IOLs. However, some *in vivo* studies are required to confirm the better efficiency of rifampicin-loaded microparticles compared to conventional rifampicin solution.

BIBLIOGRAPHIE

1. Colleaux, K.M., Hamilton W.K., *Effect of prophylactic antibiotics and incision type on the incidence of endophthalmitis after cataract surgery*. Can J Ophthalmology, 2000. 35: p. 373-378.
2. Karp, C.L., Tuli S.S., Yoo S.H., *Infectious keratitis after LASIK*. Ophthalmology, 2003. 110: p. 503-510.
3. Nagaki, Y., Hayasaka S., Kadoi C., *Bacterial endophthalmitis after small-incision cataract surgery: effect of incision placement and intraocular lens type*. J Cataract Refract Surg, 2003. 29: p. 20-26.
4. Leid, J.G., Costerton J.W., Shirliff M.E., Gilmore M.S., Engelbert M., *Immunology of staphylococcal biofilm infections in the eye: New tools to study biofilm endophthalmitis*. DNA and Cell Biology, 2002. 21: p. 405-413.
5. Olson, R.J., *Reducing the risk of postoperative endophthalmitis*. Surv. Ophthalmol., 2004. 49 p. 55-61.
6. Seppälä, H., Al-Juhaish M., Järvinen H., Laitinen R., Huovinen P., *Effect of prophylactic antibiotics on antimicrobial resistance of viridans streptococci in the normal flora of cataract surgery patients*. J Cataract Refract Surg, 2004. 30: p. 307-315.
7. Salvanet-Bouccara, A., Robert M., *Infectious endophthalmitis*. Rev. Prat, 1992. 42: p. 960-965.
8. Dilly, P.N., Sellors P.J., *Bacterial adhesion to intraocular lenses*. J Cataract Refract Surg, 1989. 15: p. 317-320.
9. Mistlberger, A., Ruckhofer J., Raithel E., Müller M., Alzner E., Egger S.F., Grabner G., *Anterior chamber contamination during cataract surgery with intraocular lens implantation*. J Cataract Refract Surg, 1997. 23: p. 1064-1069.
10. Sherwood, D.R., Rich W.J., Jacob J.S., Hart R.J., Fairchild Y.L., *Bacterial contamination of intraocular and extraocular fluids during extracapsular cataract extraction*. Eye, 1989. 3: p. 308-312.
11. Vafidis, G.C., Marsh R.J., Stacey A.R., *Bacterial contamination of intraocular lens surgery*. Br. J. Ophthalmol., 1984. 68: p. 520-523.
12. Hachicha, W., L. Kodjikian, and H. Fessi, *Preparation of vancomycin microparticles: Importance of preparation parameters*. Int. J. Pharm., 2006. 324(2): p. 176-184.

13. Kodjikian, L., et al., *Biofilm formation on Intraocular lenses by a clinical strain encoding the ica locus: A scanning electron microscopy study*. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2003. 44(10): p. 4382-4387.
14. Quintanar-Guerrero, D., et al., *Methods for preparing vesicular nanocapsules*. 1999: PCT.
15. Hachicha, W., Fessi H., Casoli-Bergeron E., Lee M.Y., Jaafar C., Clayer-Montembault A., Burillon C., Freney J., Kodjikian L., *In vitro efficacy of newly designed vancomycin-based microparticles*. *J Cataract Refract Surg* 2007. 33: p. 702–708.

Discussion Générale

L'objectif de ce travail de thèse était de développer un système particulière pour l'administration intra-ophtalmique d'un antibiotique, la rifampicine, en vue du traitement prophylactique de l'endophtalmie post-chirurgicale.

L'endophtalmie est une infection majeure de l'œil due à une contamination le plus souvent d'origine bactérienne pouvant survenir suite à une opération chirurgicale. L'endophtalmie est donc un processus inflammatoire d'origine infectieuse, qui atteint les couches internes pariétales endosclérales et les cavités oculaires (chambre antérieure, chambre postérieure et surtout corps vitré) [1-2]. Il s'agit de la complication postopératoire la plus sévère de la chirurgie de la cataracte. Elle reste imprévisible et représente le type même de l'urgence diagnostique et thérapeutique, en raison de sa rapidité d'évolution et de son mauvais pronostic. Elle peut aujourd'hui être guérie avec un minimum de séquelles, mais elle reste, dans un pourcentage de cas non négligeables, responsable de la perte définitive fonctionnelle (50% ont une acuité visuelle inférieure à 1/20ème) [3] voire de la perte anatomique de l'œil. Le coût socio-économique, de par les soins et la perte de l'autonomie, ainsi que les retombées psychologiques justifient la prévention de cette complication, rare. La fréquence de l'endophtalmie est estimée actuellement entre 7 [4-5] et 32 [6] pour 1000 chirurgies de la cataracte.

L'endophtalmie a comme origine l'introduction de germes dans l'œil au cours de l'intervention, par l'orifice provisoirement ouvert. L'endophtalmie postopératoire d'origine endogène existe, mais elle est probablement exceptionnelle, et avec des caractères particuliers. Dans 82% des cas, les germes responsables de l'endophtalmie proviennent

du patient lui-même (conjonctive, paupières, nez...) [7]. L'adhérence des germes sur les implants, lors de leur introduction dans l'œil, est l'un des facteurs les plus importants dans l'étiopathogénie des endophtalmies post-chirurgicales. Ainsi, l'incidence de l'endophtalmie peut être limitée en évitant l'adhérence des germes, et principalement du staphylocoque, aux lentilles intraoculaires.

Les bactéries Gram positif viennent en tête des bactéries responsables des endophtalmies, avec une fréquence d'environ 70% (40% pour *Staphylococcus epidermidis*, 10% pour *Staphylococcus aureus*, 10% pour les autres *Staphylococcus* et 10% pour les autres bactéries Gram positif) [8]. Les germes Gram négatif représentent moins du 1/3 des étiologies, avec *Pseudomonas*, *Proteus* et *Klebsiella*, parmi les plus fréquents. Les champignons sont exceptionnellement rencontrés.

Dans les endophtalmies aiguës consécutives à une chirurgie de la cataracte, les staphylocoques à coagulase-négative sont retrouvés dans 50 à 60% des cas. Ils sont également retrouvés dans les endophtalmies dites chroniques mais à un degré moindre que le *Propionibacterium acnes* [9]. L'endophtalmie aiguë s'installe durant la première semaine postopératoire, la forme subaiguë s'étend de la deuxième à la fin de la quatrième semaine postopératoire, alors que la forme chronique débute après le premier mois [10].

La chirurgie est classée en différentes catégories: propre, propre contaminée, contaminée et sale. Pour chaque catégorie, on attribue une valeur prédictive d'infections opératoires avec et sans antibioprofylaxie (Classification d'Altemeier) [11]. La faible incidence des complications infectieuses en classe I dite chirurgie propre, groupe auquel pourrait être rattachée la chirurgie de la cataracte, ne justifie pas d'antibioprofylaxie. Toutefois, la gravité des endophtalmies, mettant en jeu le pronostic fonctionnel de l'œil, peut justifier une telle approche. Il n'en demeure pas moins que l'antibioprofylaxie demeure très

controversée en ophtalmologie. En effet, la faible fréquence d'endophtalmies post-chirurgicales rend difficile la réalisation d'études en double aveugle sur des cohortes nécessairement très importantes, qui permettraient de mettre en évidence l'éventuel effet bénéfique. Toutefois, certaines études rencontrées dans la bibliographie mettent l'accent sur l'intérêt de l'antibioprophylaxie par voie intraoculaire ou systémique (la voie topique présentant peu d'intérêt) [12-13]. La voie intraoculaire présenterait l'avantage d'une antibiothérapie locale plus ciblée.

Diverses méthodes ont été testées dans la prophylaxie de l'endophtalmie lors d'une chirurgie de la cataracte. A part les mesures nécessaires d'asepsie et d'antisepsie, le moyen de choix est d'employer des antibiotiques, évitant ainsi la prolifération bactérienne à l'intérieur de l'œil au cours et après l'intervention.

De plus, il a été établi qu'en diminuant l'adhérence bactérienne aux implants intraoculaires introduits dans l'œil au cours de l'intervention, la fréquence de survenue d'une endophtalmie postopératoire peut considérablement être diminuée [14].

Parmi les traitements antibiotiques de choix, la vancomycine occupe une place privilégiée, et de nombreuses études ont montré son efficacité notamment en tant que traitement curatif mais aussi en antibioprophylaxie. En effet elle présente l'avantage d'avoir une action bactéricide et une action anti-adhérente propre [15]. Cependant, il est difficile d'utiliser en prophylaxie quotidienne le principal traitement curatif efficace de par le risque d'émergence de mutants résistants. En effet, on connaît depuis 1987, grâce à Schwalbe *et al.*, des souches de *Staphylococcus epidermidis* à coagulase négative résistantes à la vancomycine [16]. Selon une estimation actuelle cela concernerait 4 à 20 % des souches. En revanche, la résistance de *Staphylococcus aureus* à la vancomycine, reste exceptionnelle. Cependant, l'action exclusivement locale de l'antibiotique administré en intracaméculaire diminue la sélection de germes et des résistances pouvant être

rencontrés lors d'administration de produits systémiques. La conférence de consensus sur la chirurgie de la cataracte qui s'est tenue à Paris le 4 mai 1995 rappelle en effet que l'avantage d'une telle voie est justement d'éviter une pression écologique bactérienne systémique, en plus de son faible coût [17]. De plus, dans la mesure où les patients viennent de la ville, séjournent très peu de temps à l'hôpital et retournent ensuite chez eux, le risque d'émergence et de transmission de mutants résistants est à priori réduit [18]. Ce risque ne représente donc pas un argument suffisant pour empêcher l'utilisation d'antibiotique en intraoculaire, sauf peut-être s'il concerne les seuls antibiotiques curatifs à savoir la vancomycine et la ceftazidime principalement.

Il est apparu donc essentiel d'utiliser d'autres antibiotiques pour la prophylaxie des endophtalmies. Parmi ces autres antibiotiques, l'utilisation de la rifampicine peut être envisagée car elle présente les avantages d'avoir une action bactéricide sur de nombreux germes Gram positif comme le genre *Staphylococcus* et d'avoir aussi une action anti-adhérente [19]. De plus, Obst *et al.* ont prouvé en 1988 que la rifampicine est particulièrement active sur le biofilm fabriqué par le *Staphylococcus epidermidis*, contrairement à la clindamycine [20]. En effet, elle fait partie des antibiotiques anti-staphylococciques de référence. Malgré ces avantages, la rifampicine n'est pas utilisée en administration intraoculaire, pour le traitement curatif ou prophylactique de l'endophtalmie, ni sur l'animal pour d'éventuelles études de toxicité, ni sur l'être humain. Elle a toutefois fait l'objet de plusieurs études cliniques ayant démontré son efficacité [21-23].

Néanmoins comme les autres antibioprofylaxie, l'utilisation de la rifampicine nécessite des injections intraoculaires répétées afin de maintenir au sein de l'humeur vitrée une concentration en antibiotique au moins supérieure à sa CMI voire à sa CMB (concentration minimale bactéricide). L'utilisation d'un système d'administration à libération prolongée de rifampicine en intraoculaire semble donc être une très bonne

alternative. Cela permet de plus de limiter les troubles de la vision du patient due à l'administration intraoculaire de rifampicine en suspension ou solution étant donné que cette dernière présente une coloration orange très marquée limitant d'ailleurs son utilisation dans telles applications.

1/ Développement d'un système d'encapsulation nano- ou microparticulaire pour l'administration intra-ophtalmique de rifampicine : études de formulation

Le système d'administration intra ophtalmique envisagé dans un premier temps pour cette étude était un système d'encapsulation multiparticulaire sous formes de nano- ou microparticules. Ces particules sont formées d'un polymère biodégradable, présentant l'avantage de ne pas être toxique pour l'organisme et d'être bio-assimilable. La méthode d'encapsulation retenue pour l'élaboration des particules polymères est la technique d'émulsion diffusion décrite par Quintenar *et al.* [24]. Cette technique permet notamment l'utilisation de solvants organiques compatibles avec une utilisation pharmaceutique, elle donne de bon rendement d'encapsulation en principes actifs, avec des particules de taille reproductible. Enfin cette méthode est facilement transposable à grande échelle, avec une bonne reproductibilité du procédé [25].

La technique d'émulsion-diffusion est basée sur une première étape d'émulsification, d'une phase organique partiellement miscible à l'eau (acétate d'éthyle préalablement saturée en eau), renfermant le polymère en solution et le principe actif à encapsuler, dans une phase aqueuse (saturée d'acétate d'éthyle), suivie d'une étape de dilution permettant d'entraîner la diffusion du solvant organique vers la phase aqueuse externe et ainsi la précipitation du polymère sous forme de particules. Toutefois l'étape de diffusion nécessite l'addition de grandes quantités d'eau dans l'émulsion, étape devant ensuite être

suivie d'une opération d'élimination du solvant organique et de l'eau par évaporation afin de concentrer au maximum la préparation en polymère donc en particules. Cette dernière étape étant très longue et consommatrice de temps, une méthode alternative a été étudiée.

Une première partie de ce travail de thèse a donc consisté à mettre au point un procédé de fabrication des particules de rifampicine par cette technique d'émulsion diffusion en essayant de s'affranchir de l'étape de dilution pour limiter les volumes d'eau utilisés et ainsi raccourcir l'étape de concentration par élimination de l'eau. L'étape de diffusion par addition d'eau a été remplacée par un traitement sous haute-pression de l'émulsion engendrant la diffusion du solvant organique. Cette nouvelle technique a été appliquée dans ce cas à la formulation de nanoparticules de rifampicine, forme retenue pour le début de ce travail. Les résultats de cette étude ont permis de montrer qu'il était possible de produire des nanoparticules par ce traitement sous autre pression. La taille des particules préparées peut varier de 300 et 450 nm selon la pression appliquée et le temps du traitement. Les particules de plus petite taille (300 nm) sont obtenues par des traitements sous faible pression (100 MPa) et pendant un temps court (<60 s). La taille des particules augmentent lorsqu'une pression plus importante ou un temps de traitement plus long sont appliqués : un diamètre moyen d'environ 450 nm est obtenu après un traitement à 300 MPa pendant 1200 s.

L'application d'une forte pression hydrostatique entraîne la vaporisation du solvant organique et ainsi la diffusion de solvant vers la phase externe engendrant ainsi la précipitation du polymère dans la phase interne pour former les nanoparticules.

Les images de microscopie électronique à transmission réalisées sur les suspensions de nanoparticules produites par émulsion et diffusion sous autre pression montrent la formation de nanoparticules d'aspect comparable à celles produites par émulsion-diffusion

classique. Néanmoins certaines conditions doivent être respectées pour obtenir des nanoparticules comparables. En effet lorsqu'une trop faible pression est appliquée (100 MPa pendant 300 s), la formation d'aucune couche de polymère à la surface des nanocapsules n'a pu être observée ; la pression exercée n'étant pas suffisante pour entraîner le passage de l'acétate d'éthyle à l'état de vapeur et donc favoriser sa diffusion vers la phase externe. En revanche lorsqu'une trop forte pression pendant un temps trop long est appliquée (200 et 300 MPa pendant 1200 s), un collapse des particules a pu être observé pouvant aboutir à une rupture de l'enveloppe des nanocapsules et à une fuite de la phase huileuse interne.

Ces travaux ont ainsi montré qu'il était possible d'engendrer la diffusion du solvant organique de l'émulsion en appliquant une pression importante et de former des nanoparticules. Cependant les conditions opératoires doivent être bien maîtrisées avec une pression bien établie pendant un temps restreint. De plus des études complémentaires sont nécessaires afin d'évaluer la capacité d'encapsulation en principe actif de ce procédé de fabrication. Cette étude représente donc des essais préliminaires de faisabilité d'une nouvelle technique d'encapsulation. Il peut par ailleurs être constaté que cette application de l'émulsion diffusion entraîne la formation de particules de quelques centaines de nanomètre de diamètre peu adaptées à une administration intraoculaire. Pour la suite du travail il a donc été plutôt envisagé de travailler avec la technique d'émulsion-diffusion classique afin de réussir à former des microparticules d'un diamètre de quelques micromètres ; l'objectif étant de permettre un temps de résidence optimale au sein du vitré et d'éviter la fuite des particules à travers le trabeculum [26].

La deuxième partie des études de formulation a donc porté sur l'optimisation des paramètres de formulation permettant de former des microparticules de rifampicine

adaptée à l'administration intra-ophtalmique. De nombreux paramètres du procédé ou de formulation peuvent influencer les caractéristiques des microparticules formées comme leur taille, leur charge de surface, leur taux d'encapsulation en rifampicine, etc. La mise en place d'un plan d'expérience a donc été envisagée afin de déterminer les conditions de formulation optimales permettant d'obtenir des microparticules aux propriétés maîtrisées. Toutefois, avant la mise en place du plan d'expérience des études préliminaires ont été nécessaires afin d'identifier les paramètres de formulation clés pouvant modifier les propriétés des particules ainsi que leur ordre de grandeur: les concentrations en polymère (PLGA), en stabilisant (PVA) et en huile, le type d'huile utilisé pour formuler les microcapsules, la vitesse d'émulsification... L'influence de ces différents paramètres sur la taille des particules, leur charge ainsi que l'encapsulation de la rifampicine a été étudié.

Influence des paramètres de formulation sur la taille des particules

Nous avons notamment pu mettre en évidence au cours de cette étude, un effet majeur de la vitesse d'émulsification sur la taille des microparticules. En effet, comme attendu, plus celle-ci est importante plus la taille de microparticules sera petite. Par exemple pour une formulation donnée (PLGA 1%, PVA 5% et huile 2.5 m/V%), un passage d'une vitesse d'émulsification de 1000 tpm à 10000 tpm entraîne une réduction de taille d'environ 1,6 μm à 0,6 μm soit une diminution d'environ 60% du diamètre moyen des particules. Ce résultat s'explique par l'augmentation de la force de cisaillement qui engendre la formation de plus petites gouttelettes d'émulsion donc de plus petite particules. La vitesse d'émulsification apparaît donc un paramètre clef du procédé à contrôler pour maîtriser la taille des particules formées. Celle-ci a été fixée à 6500 tpm pour la réalisation du plan d'expérience.

De même nombreuses sont les conditions de formulation modifiant la taille des particules.

Par exemple l'augmentation de la concentration en PLGA entraîne la formation de plus grosses particules. Principalement deux hypothèses peuvent être proposées : une concentration plus importante en polymère augmente la viscosité de la phase interne de l'émulsion et par conséquent la taille des globules et donc des particules formées. La deuxième hypothèse est liée à la plus rapide insolubilisation du polymère du fait de sa plus forte concentration en solution.

L'autre facteur influant est la concentration en agent stabilisant introduit dans la phase externe, comme le PVA. En effet l'augmentation de la concentration en PVA dans la phase externe permet la formation de plus petits globules d'émulsion donc de particules plus petites. L'augmentation de la concentration en PVA entraîne parallèlement une augmentation de la viscosité de la phase externe aboutissant ainsi à la formation d'une émulsion avec des gouttelettes plus fines et plus stables donc à des particules plus petites et moins polydisperses [27-28].

De nombreuses études ont permis de décrire le même type de phénomène quant à l'influence de la concentration en polymère et celle en émulsionnant sur la taille des particules, aboutissant aux mêmes conclusions [29-31]. Par exemple Mahdavi *et al.*, ont testé l'influence de la concentration en PLGA introduite sur la taille des microparticules et ont montré qu'en augmentant la concentration de 1,25 à 20 m/V% le diamètre moyen des microparticules passe de 3,5 à 20,65 μm [32]. De plus, Sahoo *et al.* par exemple, ont montré que le diamètre moyen de nanoparticules de PLGA préparées par une technique d'émulsion-évaporation, variait de 520 à 350 nm lorsque la concentration en PVA passait de 0,5 à 5 % [33].

Il semblerait par ailleurs, d'après ces essais préliminaires, que le type d'huile utilisé (Miglyol[®] 812, 829 ou 840) influence la taille des particules mais de façon corrélée à la concentration en PVA utilisée. En effet, la diminution de taille avec l'augmentation de la

concentration en PVA sera plus marquée avec le Miglyol[®] 812 qu'avec le Miglyol[®] 829 : lorsque la concentration en PVA varie de 1 à 5 m/V%, la taille des microcapsules avec le Miglyol[®] 812 diminue de 1 μm alors qu'elle ne varie que de 0,4 μm avec le Miglyol[®] 829. Cette différence peut notamment s'expliquer par la différence de viscosité des deux huiles. Le Miglyol[®] 812 est un caprylic-caprique triglycéride avec une viscosité allant de 27 à 33 mPa.s alors que le Miglyol[®] 829, un Caprylic-Capric-Succinic triglycéride, a une viscosité comprise entre 230 et 270 mPa.s. La taille des globules de l'émulsion formée avec le Miglyol[®] 812 sera probablement plus sensible aux variations de la concentration en PVA du fait de sa faible viscosité. En revanche, pour une huile avec une viscosité nettement plus élevée comme celle du Miglyol[®] 829, l'augmentation de la concentration en stabilisant n'est pas suffisante pour modifier la taille des gouttelettes de l'émulsion. Une force de cisaillement plus forte serait alors en plus nécessaire pour diminuer la taille des globules de façon significative.

En revanche, l'huile la plus visqueuse (Miglyol[®] 829) donne des particules de taille inférieure au Miglyol[®] 812. Ce résultat est assez contradictoire par rapport aux résultats attendus. En effet, nous aurions pu nous attendre à ce que l'augmentation de la viscosité de l'huile entraîne une augmentation de la taille des microparticules du fait de la formation de globules plus gros lors de la phase d'émulsification comme ce qui est généralement décrit dans la littérature [34-35]. Néanmoins, les natures chimiques différentes des huiles utilisées doivent être aussi prises en compte pour conclure à un effet éventuel sur la taille des globules.

De plus, il a été montré que l'augmentation de la concentration en Miglyol[®] 812 de 0 à 5 m/V% engendrait une augmentation de la taille des particules de 0,5 à 1,4 μm . Cet effet a été confirmé pour le Miglyol[®] 829 par les résultats du plan d'expérience.

Influence des paramètres de formulation sur la charge des particules

L'évaluation de la charge de surface des particules par la mesure du potentiel zêta est une manière indirecte d'avoir des informations sur la stabilité des particules en suspension. En effet, la présence de charges à la surface des particules engendrent des répulsions entre ces dernières, limitant ainsi les phénomènes d'agrégation. Une valeur absolue de potentiel zêta éloignée de zéro représente donc un gage de stabilité supplémentaire pour les particules. Les microparticules de rifampicine ont pour la plupart un potentiel zêta aux alentours de -25 mV, cette valeur laissant présager d'une certaine stabilité des particules en suspension. Une charge négative de la surface des particules peut notamment s'expliquer par la nature du polymère, le PLGA. En effet, celui-ci possède des fonctions acides terminales qui ne sont pas estérifiées et qui sont ainsi à l'origine de charges négatives du fait de la présence de groupement carboxyliques (COO-) en surface des microparticules. L'influence des paramètres de formulation sur la charge des microparticules a été testée montrant que les concentrations en polymère et en huile ainsi que la vitesse d'émulsification n'avaient pas d'influence significative sur les valeurs du potentiel zêta des particules. Toutefois, une légère influence de la concentration en PVA a été mise en évidence. Lorsque la concentration en PVA varie de 2.5 à 7.5 %, la charge des particules variait légèrement de -23 à -17 mV. Cette légère influence du PVA peut être due à un masquage des charges négatives de surface des particules par adsorption des molécules de PVA à la surface des particules [33]. En effet, malgré le lavage des microparticules des molécules de PVA restent adsorbées à la surface des particules. Des interactions étroites entre les chaînes de polymère et celles de PVA au cours de l'élimination du solvant entraînent ainsi le maintien d'une certaine quantité de PVA en surface des particules [33, 36].

Il a été reporté, dans certaines études, que la charge de surface de nanoparticules de

PLGA en l'absence totale de PVA atteignait les -45 mV, cette charge négative importante étant due au non masquage des fonctions carboxyliques ionisées par les molécules de PVA [37]. L'enrobage de la surface des particules par un polymère amphiphile comme le PVA ou des poloxamères par exemple entraîne une réduction du potentiel zêta [38]. De plus, une faible concentration en PVA rendra ainsi la charge de surface des particules plus sensibles aux variations de pH car plus de fonctions carboxyliques seront susceptibles d'être ou non déprotonnées [33].

Influence sur le taux d'encapsulation en rifampicine

L'étude de l'influence des paramètres de formulation sur l'encapsulation en rifampicine au sein des microparticules a montré que les concentrations en polymère et en stabilisant jouaient un rôle important sur l'efficacité d'encapsulation de la rifampicine. En effet, lorsque la concentration en PLGA augmente, l'efficacité d'encapsulation en rifampicine est nettement améliorée. Cela peut s'expliquer à différents niveaux; d'une part par le fait que l'augmentation de la concentration en PLGA entraîne la formation de particules plus grosses susceptibles d'encapsuler plus de principe actif du fait du caractère lipophile de la rifampicine, celle-ci aura effectivement plus d'affinité pour la phase organique interne; affinité d'autant plus marquée que la concentration en polymère sera élevée. En effet, des interactions entre le principe actif à encapsuler et le polymère peuvent exister. La rifampicine est une molécule complexe portant des fonctions diverses dont quatre fonctions hydroxyles (figure 1). Or, comme mentionné précédemment, le PLGA possède des fonctions carboxyliques de l'acide polylactique (figure 2). Une interaction entre les hydroxyles de la rifampicine et les carboxyles du PLGA est donc largement envisageable [39]. De plus, des interactions hydrophobes avec le polymère ont par ailleurs été suggérées du fait de l'hydrophobie importante de la rifampicine ($\log P = 1,25$) [40]. Ces

interactions peuvent être ainsi à l'origine d'une meilleure "capture" de l'antibiotique lorsque la concentration en polymère augmente. D'autre part, une deuxième hypothèse peut être émise du fait qu'à forte concentration le PLGA aura tendance à précipiter plus rapidement lors de l'étape de diffusion du solvant organique dans la phase aqueuse et donc à "emprisonner" plus facilement la rifampicine en ne lui laissant pas le temps de migrer vers la phase externe avec le solvant.

Figure 1. Structure moléculaire de la rifampicine

Figure 2. Structure moléculaire du PLGA

En revanche lorsque la concentration en PVA augmente l'encapsulation de la rifampicine devient plus difficile. Cela est probablement dû à l'augmentation de la solubilité de la rifampicine dans la phase aqueuse externe du fait de l'effet solubilisant du PVA. En effet, une modification de la concentration en PVA de 1,25 à 7,5 % entraîne une chute de l'efficacité d'encapsulation en rifampicine de 80 à 15 %. Cet effet peut aussi s'expliquer par la diminution importante de la taille des microparticules lorsqu'une forte concentration

en PVA est employée. Néanmoins l'effet de la concentration en PVA sur l'encapsulation dépend essentiellement de la nature du principe actif à encapsuler. En effet, des études ont montré l'effet inverse, c'est à dire que l'augmentation de la concentration en PVA entraînait une augmentation du taux d'encapsulation en principe actif dans des microparticules de PLGA. C'est le cas par exemple de l'étude réalisée par Samati *et al.* qui ont montré que l'accroissement de la concentration en PVA de 0,2 à 1 % entraînait une augmentation de l'encapsulation du flurbiprofène sodique au sein de microparticules de PLGA (50:50) [41]. Néanmoins ces résultats sont difficilement comparables car il s'agit en l'occurrence d'un principe actif hydrosoluble alors que la rifampicine est peu soluble dans l'eau et de plus les concentrations en PVA utilisées sont nettement plus importantes dans notre cas.

Optimisation de la formulation des microparticules par la mise en place du plan d'expérience

Les études préliminaires nous ont ainsi permis d'établir les conditions opératoires du plan d'expérience mis en place afin de mieux contrôler et de pouvoir optimiser la formulation des microparticules en vue d'une application ophtalmique. En effet l'administration intra-ophtalmique de microparticules de rifampicine pour une antibioprofylaxie requiert certaines exigences afin que les particules ne soient pas trop rapidement éliminées et qu'elles libèrent une quantité suffisante d'antibiotique *in situ* pour atteindre rapidement la concentration minimale inhibitrice envers les pathogènes incriminés. Afin de répondre à tous ces critères, nous avons cherché à obtenir des particules dont le diamètre moyen serait supérieur à 1 μm pour un meilleur temps de résidence dans l'œil [26], et avec un taux d'encapsulation maximal en antibiotique. La taille étant le paramètre primordial, le taux d'encapsulation en rifampicine a été jugé adéquate pour des taux supérieurs à 60%.

Trois paramètres ont été retenus pour la mise en place du plan d'expérience : les concentrations en PLGA (1 à 5 m/V%), PVA (1 à 5 m/V%) et en Miglyol[®] 829 (0; 1,25 et 2,5 m/V%).

Les résultats obtenus pour les essais préliminaires ont été confirmés par les résultats du plan d'expérience. Ces derniers montrent les effets des concentrations en PLGA, PVA et huile sur le diamètre moyen des microparticules, ainsi que l'influence du PLGA et du PVA sur l'encapsulation en rifampicine. En revanche, étonnement, nous avons pu constater que la variation de la concentration en Miglyol[®] 829 n'entraînait pas de modifications significatives du taux d'encapsulation en rifampicine alors qu'une modification de taille a pu être mise en évidence. Cette observation semble pour autant assez surprenante étant donné que la forme microcapsules est généralement utilisée, entre autres, pour ces capacités d'encapsulation plus importantes pour les principes actifs lipophiles.

Par conséquent il a été possible de fixer des conditions de formulation à respecter pour obtenir les particules adéquates : quelle que soit la concentration en huile (microsphères ou microcapsules), l'emploi d'une concentration d'au moins 2% de polymère avec une concentration minimale de 2,5 % de PVA est nécessaire pour obtenir des particules de taille supérieure à 1 µm avec un taux d'encapsulation en rifampicine d'au moins 60%. En revanche, si une plus faible concentration en PLGA est nécessaire, il faudra diminuer la concentration en PVA (environ 1% de PVA pour 1% de PLGA par exemple).

Toutefois, ces études d'optimisation se sont limitées à l'étude de deux critères (taille et taux d'encapsulation) sans tenir compte des profils de libération de la rifampicine à partir des microparticules ou encore de leur efficacité antimicrobienne.

2/ Etudes de libération *in vitro* de la rifampicine encapsulée et évaluation de son efficacité sur *Staphylococcus epidermidis*

Les études précédentes ont permis de sélectionner des formulations de microparticules optimisées afin de réaliser le suivi de la libération *in vitro* de la rifampicine. Ces études de libération *in vitro* sont nécessaires car elles permettent d'avoir une estimation de la vitesse de dissolution de la rifampicine à partir des microparticules et de la quantité qui sera approximativement libérée dans des conditions mimant celles pouvant être retrouvées *in vivo*. En effet, le milieu de dissolution retenu pour ces essais est un tampon BSS (balanced saline solution) isotonique pH 7,4 à 32 °C. Ce milieu est très utilisé comme milieu d'irrigation lors des interventions de chirurgie ophtalmique puisqu'il permet de préserver le pH et la pression osmotique intraoculaire. Par ailleurs le volume de BSS utilisé pour l'ensemble de ces expériences est de 4 ml ce qui correspond au volume de l'humeur vitrée. Cela permet ainsi d'essayer de corrélérer ces résultats à ceux qui pourraient être attendus *in vivo* au sein de l'œil.

Dans un premier temps, l'influence de l'huile sur la libération de rifampicine a été testée (forme microsphères ou forme microcapsules avec 1.25 et 2.5 % de Miglyol[®] 829). En fonction de la nature des microparticules les profils de dissolution *in vitro* de la rifampicine sont très variables, montrant une libération plus rapide pour les capsules que pour les sphères et que celle-ci était d'autant plus rapide que le contenu en huile est important. Ce résultat semble cohérent et peut s'expliquer par la morphologie des particules. En effet, dans les microcapsules, le polymère forme une fine membrane à la surface des particules délimitant le contenu huileux. L'augmentation de la proportion

d'huile entraîne généralement la formation d'une couche polymérique plus fine. Cette fine couche présente donc un profil de dégradation plus rapide que le polymère d'une forme matricielle, expliquant la diffusion accélérée du principe actif à travers la membrane de la capsule voire même sa libération soudaine et totale lorsque la microcapsule se rompt.

L'étude de l'influence de la concentration en polymère (5; 1 et 0,5 m/v%) a ensuite été menée, sur des microsphères, montrant que la libération était d'autant plus rapide que la concentration en PLGA était faible. Cette observation attendue peut s'expliquer notamment par la différence de taille des particules. Les microparticules préparées à partir d'une plus faible concentration de PLGA ont effectivement un diamètre moyen plus petit et donc une surface de contact avec le milieu de dissolution augmentée, engendrant une libération du principe actif plus rapide [30, 33].

Curieusement, contrairement aux résultats précédents sur l'étude de l'influence de l'huile, les microsphères dans ce cas présentent un important "burst effect", d'autant plus marqué que la concentration en PLGA diminue : après 1h, 10% de rifampicine sont libérés à partir des particules avec 5% de PLGA, 35% avec 1% de PLGA et plus de 50% avec 0,5% de PLGA. Il est à noter qu'aucun "burst effect" n'a été observé pour les microsphères préparées à partir de 5% de PLGA et 5% de PVA, or avec 5% de PLGA mais seulement 2,5% de PVA, un léger "burst effect" apparaît puisque 10% de la rifampicine sont libérés en 1 heure. Cet effet du PVA a aussi été reporté dans les travaux de Yang *et al.* et Mao *et al.* [42-43]. Comme décrit précédemment, l'augmentation de la concentration en PVA donnant des particules plus petites, donc une surface de contact plus importante, une quantité plus grande de molécules de PVA pourra alors s'adsorber à la surface des particules. Ces molécules PVA adsorbées engendrent la formation d'une couche visqueuse à la surface des particules ralentissant la diffusion du principe actif. Cela pourrait expliquer pourquoi, pour une même concentration de polymère, la libération est plus lente avec une

concentration de PVA augmentée [44].

Le "burst effect" est fréquemment observé dans le cas des microsphères puisqu'une partie du principe actif peut se retrouver adsorbée en surface des particules et sera donc rapidement libérée. Cette libération rapide présente un avantage non négligeable dans le cas d'une antibioprofylaxie ophtalmique permettant d'obtenir une dose d'attaque en antibiotique dès la première heure de traitement. Le même type d'observations a été fait par Maksimenko *et al.* sur la libération de rifampicine à partir de nanoparticules de PLGA [39]. Le profil de libération du principe actif à partir de particules de PLGA se découpe généralement en deux grandes étapes, une étape de diffusion du principe actif vers l'extérieur de la particule dans un premier temps, suivi d'une étape d'érosion du polymère permettant la libération du principe actif [45-46].

Ces études ont par ailleurs permis de montrer que les microparticules préparées à partir de 5 et 1% de PLGA présentaient néanmoins des profils de libération très lents pouvant se prolonger sur plusieurs jours. En effet, après 5 jours, 60% de la rifampicine sont libérés des microparticules formulées avec 1% de polymère alors que seulement 20% de rifampicine sont libérés des microparticules formulées avec 5% de polymère. Ce type de profil ne répond pas réellement au cahier des charges puisque la libération prolongée souhaitée devrait plutôt être de l'ordre de 24 à 48 heures. En effet, le développement des bactéries à l'origine de l'endophtalmie surviennent dans les 24 à 48 heures suivant l'opération voire jusqu'à plusieurs jours dans certains cas [47]. L'objectif serait donc de maintenir dans le vitré une concentration de rifampicine supérieure à sa CMB (concentration minimale bactéricide) pendant les 24 premières heures afin d'éviter tout développement des éventuels pathogènes en présence.

Une grande quantité de polymère permet d'obtenir des taux d'encapsulation en rifampicine importants mais sa libération se prolonge sur plusieurs jours. Or, compte-tenu

des profils de libération observés les particules avec 0,5% de polymère présentent donc de nombreux avantages : "burst effect" important sur la première heure de traitement et libération prolongée sur quelques heures. Toutefois il a été constaté qu'une certaine quantité de rifampicine restait dans les particules et n'était pas libérée après 24 heures. Certaines hypothèses ont été avancées notamment lorsque qu'un polymère amphiphile est utilisé comme agent émulsionnant. En effet, comme nous l'avons mentionné précédemment, malgré le lavage des particules des molécules de PVA restent adsorbées sur les microparticules, et celles-ci vont former une sorte de couche plus ou moins visqueuse en surface pouvant ralentir la diffusion du principe actif vers la phase externe et donc limiter la libération [30, 44].

Néanmoins, ces études de libération ne permettent pas d'augurer de l'effet antibactérien de la rifampicin encapsulée sur des microorganismes pathogènes. Des études d'efficacité sur le développement d'une bactérie pathogène du type *S. epidermidis* ont donc été menées. L'association de plusieurs types de microparticules avec des profils de libération différents de la rifampicine *in vitro* pourra même être envisagée.

L'effet bactéricide de la rifampicine encapsulée ainsi que son action anti-adhérente contre les bactéries sur les lentilles intraoculaires (LIOs) a été étudié *in vitro* sur une souche de *Staphylococcus epidermidis*. Deux formulations de microsphères de rifampicine ont été retenues pour cette étude : un type de microsphère à libération rapide de rifampicine formulé avec 0,5% de PLGA (MP1) et un type de microsphères à libération plus lente formulée à partir de 1% de polymère (MP2). La croissance bactérienne du *S. epidermidis* incubé en présence de ces 2 types de microparticules (seules ou associées) a été évaluée et a montré un effet bactéricide comparable à celui de la rifampicine non encapsulée utilisée comme contrôle. *S. epidermidis* fait partie des bactéries pathogènes fréquemment mises en cause dans la survenue des endophtalmies postopératoires [6, 48].

Les microparticules sont donc aussi efficaces, voire légèrement plus, qu'un traitement de référence de rifampicine en suspension puisqu'elles sont capables d'inhiber la croissance bactérienne par rapport au contrôle sans antibiotique. De plus, les MP2 (profil de libération prolongée) ont même permis la destruction totale des bactéries après 30 heures d'incubation.

Par ailleurs les microparticules de rifampicine de type 1 (MP1) ont démontré une forte action anti-adhérente sur LIOs dans les premières 24 heures d'incubation. En effet, après 24 heures, l'efficacité anti-adhérente de la rifampicine encapsulée (MP1) est supérieure à 99% d'incubation alors qu'elle est seulement de 50% pour la suspension de rifampicine seule. Cette activité est essentielle car la majorité des contaminations est due à une adhérence des bactéries sur les implants introduits lors de l'intervention chirurgicale comme les lentilles intraoculaires implantées lors des opérations de la cataracte [15, 49]. Il est donc capital que l'antibiotique utilisé en prophylaxie présente non seulement un effet bactéricide important mais soit aussi capable d'empêcher l'adhésion des bactéries pathogènes aux dispositifs implantables.

Les microparticules de rifampicine développées au cours de cette étude présentent donc ces deux caractéristiques indispensables à la bonne efficacité d'une antibioprofylaxie par injection intracamerale que sont l'effet bactéricide prolongé et l'effet anti-adhérent [13].

Conclusion générale et perspectives

Les travaux réalisés dans le cadre de cette thèse ont permis d'élaborer un système galénique adéquat pour l'administration intra-ophtalmique de rifampicine en vue du traitement prophylactique de l'endophtalmie post-chirurgicale.

Cette étude a notamment permis de maîtriser la formulation ainsi que les conditions opératoires permettant l'élaboration de microparticules d'acides polylactique et glycolique (PLGA) aux propriétés contrôlées comme leur taille et l'encapsulation en rifampicine ou encore les profils de libération *in vitro* de la rifampicine dans des conditions mimant les conditions intraoculaires.

Par ailleurs l'efficacité bactéricide de la rifampicine encapsulée envers *S. epidermidis* a été démontrée ainsi que sa capacité à lutter contre l'adhérence des bactéries sur les dispositifs implantables, comme les lentilles intraoculaires implantées au cours des chirurgies de la cataracte. L'effet bactéricide de la rifampicine libérée des microparticules polymères est effectivement aussi efficace qu'une suspension de rifampicine de référence avec la capacité supplémentaire de maintenir une action prolongée. De plus, l'action anti-adhérente apparaît comme nettement plus efficace que la forme de référence.

Cependant, des études complémentaires *in vivo* sont nécessaires afin d'évaluer l'efficacité bactéricide des microparticules de rifampicine mais aussi leur toxicité. Le suivi de la concentration intra-ophtalmique en rifampicine au cours du temps, après administration de microparticules chargées, pourra notamment être conduit sur un modèle animal comme le lapin, modèle de choix pour les études animales portant sur l'œil. De plus, l'efficacité bactéricide sur ce même modèle *in vivo* pourra être évaluée en implantant des lentilles intraoculaires contaminées. Enfin, des études de toxicité devront être conduites afin de démontrer l'innocuité des microparticules polymères blanches et chargées en rifampicine.

BIBLIOGRAPHIE

1. Bohigian, G.M., *Post-operative infection endophthalmitis*, in: J.B. Lippincott (Eds), *Complications in Ophthalmic Surgery*. 1980 Philadelphia 28-45.
2. Liesegang, T.J., *Endophthalmitis after cataract surgery* in *Cataract and Intraocular Surgery. A Compendium of modern Theories and Techniques* 1984, Kugler: Amsterdam. p. 386-411.
3. Alfonso, E.C. and H.W. Flynn, *Controversis in endophthalmitis prevention - The risk for emerging resistance to vancomycin*. Archives of Ophthalmology, 1995. **113**(11): p. 1369-1370.
4. Kattan, H.M., et al., *Nosocomial endophthalmitis survey - Current incidence of infection after intraocular surgery*. Ophthalmology, 1991. **98**(2): p. 227-238.
5. Masket, S. and M. Hedrick, *The ASCRS Endophthalmitis Survey*, in *European Society of Cataract and Refractive Surgeons (E.S.C.R.S.)*. 1997.
6. Salvanet-Bouccara, A., Robert M., *Infectious endophthalmitis*. Rev. Prat, 1992. **42**: p. 960-965.
7. Speaker, M.G., et al., *Role of external bacterial flora in the pathogenesis of acute postoperative endophthalmitis*. Ophthalmology, 1991. **98**(5): p. 639-650.
8. Rowsey, J.J., et al., *Endophthalmitis - Current approaches* Ophthalmology, 1982. **89**(9): p. 1055-1066.
9. Bron, A., *Endophthalmitis .1. Diagnosis*. Journal Francais d'Ophtalmologie, 1996. **19**(3): p. 225-240.
10. Bron, A., *Endophthalmitis .2. Treatment*. Journal Francais d'Ophtalmologie, 1996. **19**(4): p. 294-314.
11. Starr, M.B. and J.M. Lally, *Antimicrobial prophylaxis for ophthalmic surgery*. Survey of Ophthalmology, 1995. **39**(6): p. 485-501.
12. Baum, J., G.A. Peyman, and M. Barza, *Intravitreal administration of antibiotic in the treatment of bacterial endophthalmitis. III. Consensus*. Survey of Ophthalmology, 1982. **26**(4): p. 204-6.
13. Kodjikian, L., C. Burillon, and J.G. Garweg, *Intracameral vancomycin and endophthalmitis prophylaxis*. Journal of Cataract and Refractive Surgery, 2004. **30**(10): p. 2030; author reply 2030-1.
14. Kadry, A.A., et al., *Reduction of mucoid Staphylococcus epidermidis adherence to*

- intraocular lenses by selected antimicrobial agents*. Chemotherapy, 1999. **45**(1): p. 56-60.
15. Kodjikian, L., et al., *In vitro influence of vancomycin on adhesion of a Staphylococcus epidermidis strain encoding intercellular adhesion locus ica to intraocular lenses*. Journal of Cataract and Refractive Surgery, 2005. **31**(5): p. 1050-8.
 16. Schwalbe, R.S., J.T. Stapleton, and P.H. Gilligan, *Emergence of vancomycin resistance in coagulase-negative Staphylococci*. New England Journal of Medicine, 1987. **316**(15): p. 927-931.
 17. Adenis, J.P., et al., *L'antibioprophylaxie lors de la chirurgie de la cataracte*, in *Conférence du consensus sur la cataracte*. 1995: Paris.
 18. Cochereau, I., *L'antibioprophylaxie en chirurgie ophtalmique. Une efficacité non encore démontrée à réserver à certains patients*. Réalités Ophtalmologiques, 1995. **24**: p. 34-35.
 19. Chugh, T.D., et al., *Effect of sublethal concentration of antibiotics on the adherence of staphylococcus epidermidis to eucaryote cells*. Chemotherapy, 1989. **35**(2): p. 113-118.
 20. Obst, G., et al., *The activity of rifampin and analogs against Staphylococcus epidermidis biofilms in a CAPD environment model*. American Journal of Nephrology, 1989. **9**(5): p. 414-420.
 21. Drancourt, M., et al., *Oral treatment of Staphylococcus spp. infected orthopaedic implants with fusidic acid or ofloxacin in combination with rifampicin*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 1997. **39**(2): p. 235-240.
 22. Hellmark, B., et al., *Antibiotic susceptibility among Staphylococcus epidermidis isolated from prosthetic joint infections with special focus on rifampicin and variability of the rpoB gene*. Clinical Microbiology and Infection, 2009. **15**(3): p. 238-244.
 23. Soriano, A., et al., *Treatment of acute post-surgical infection of joint arthroplasty*. Clinical Microbiology and Infection, 2006. **12**(9): p. 930-933.
 24. Quintanar-Guerrero, D., et al., *Methods for preparing vesicular nanocapsules*. 1999: PCT.
 25. Moinard-Checot, D., et al., *Mechanism of nanocapsules formation by the emulsion-diffusion process*. Journal of Colloid and Interface Science, 2008. **317**(2): p. 458-468.
 26. Saraux, H., *Physiologie de l'Humeur Aqueuse et de la Pression Oculaire* Chap. in Physiologie Oculaire. 1983, Paris: Masson. 122-153.
 27. Lee, S.C., et al., *Quantitative analysis of polyvinyl alcohol on the surface of poly(D, L-lactide-co-glycolide) microparticles prepared by solvent evaporation method: effect of particle size and PVA concentration*. Journal of Controlled Release, 1999. **59**(2): p. 123-32.

28. Zambaux, M.F., et al., *Influence of experimental parameters on the characteristics of poly(lactic acid) nanoparticles prepared by a double emulsion method*. Journal of Controlled Release, 1998. **50**(1-3): p. 31-40.
29. Chorny, M., et al., *Lipophilic drug loaded nanospheres prepared by nanoprecipitation: effect of formulation variables on size, drug recovery and release kinetics*. Journal of Controlled Release, 2002. **83**(3): p. 389-400.
30. Dawes, G.J.S., et al., *Size effect of PLGA spheres on drug loading efficiency and release profiles*. Journal of Materials Science-Materials in Medicine, 2009. **20**(5): p. 1089-1094.
31. Quintanar-Guerrero, D., Fessi H., Allemann E., Doelker E., *Influence of stabilizing agents and preparative variables on the formation of poly(D,L-lactic acid) nanoparticles by an emulsification-diffusion technique*. International Journal of Pharmaceutics, 1996. **143** p. 133-141.
32. Mahdavi, H., et al., *The Effect of Process Parameters on the Size and Morphology of Poly(D,L-Lactide-Co-Glycolide) Micro/Nanoparticles Prepared by an Oil in Oil Emulsion/Solvent Evaporation Technique*. Journal of Applied Polymer Science, 2010. **116**(1): p. 528-534.
33. Sahoo, S.K., Panyam J. Prabha S., Labhasetwar V. J., *Residual polyvinyl alcohol associated with poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles affects their physical properties and cellular uptake*. Controlled Release, 2002. **82**: p. 105-114.
34. Bachtzi, A.R., C.J. Boutris, and C. Kiparissides, *Production of oil-containing crosslinked poly(vinyl alcohol) microcapsules by phase separation: Effect of process parameters on the capsule size distribution*. Journal of Applied Polymer Science, 1996. **60**(1): p. 9-20.
35. Sanghvi, S.P. and J.G. Nairn, *A method to control particle size of cellulose acetate trimellitate microspheres*. Journal of Microencapsulation, 1993. **10**(2): p. 181-94.
36. Boury, F., et al., *Dynamic properties of poly(dl-lactide) and polyvinyl-alcohol monolayers at the air-water and dichloromehtane water interfaces*. Journal of Colloid and Interface Science, 1995. **169**(2): p. 380-392.
37. Stolnik, S., et al., *The colloidal properties of surfactant-free biodegradable nanospheres from poly([beta]-malic acid-co-benzyl malate)s and poly(lactic acid-co-glycolide)*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 1995. **97**(3): p. 235-245.
38. Redhead, H.M., S.S. Davis, and L. Illum, *Drug delivery in poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles surface modified with poloxamer 407 and poloxamine 908: in vitro*

- characterisation and in vivo evaluation*. Journal of Controlled Release, 2001. **70**(3): p. 353-63.
39. Maksimenko, O.O., et al., *Effects of technical parameters on the physicochemical properties of rifampicin-containing polylactide nanoparticles*. Pharmaceutical Chemistry Journal, 2010. **44**(3): p. 151-156.
40. Mariappan, T.T., N. Sharda, and S. Singh, *Atypical Log D profile of rifampicin*. Indian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2007. **69**: p. 197-201.
41. Samati, Y., N. Yuksel, and N. Tarimci, *Preparation and characterization of poly(D,L-lactico-glycolic acid) microspheres containing flurbiprofen sodium*. Drug Delivery, 2006. **13**(2): p. 105-111.
42. Mao, S., et al., *Effects of process and formulation parameters on characteristics and internal morphology of poly(d,l-lactide-co-glycolide) microspheres formed by the solvent evaporation method*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2008. **68**(2): p. 214-23.
43. Yang, Y.Y., T.S. Chung, and N.P. Ng, *Morphology, drug distribution, and in vitro release profiles of biodegradable polymeric microspheres containing protein fabricated by double-emulsion solvent extraction/evaporation method*. Biomaterials, 2001. **22**(3): p. 231-41.
44. Liu, J., et al., *Controlled release of insulin from PLGA nanoparticles embedded within PVA hydrogels*. Journal of Materials Science-Materials in Medicine, 2007. **18**(11): p. 2205-2210.
45. Faisant, N., J. Siepmann, and J.P. Benoit, *PLGA-based microparticles: elucidation of mechanisms and a new, simple mathematical model quantifying drug release*. Eur J Pharm Sci, 2002. **15**(4): p. 355-66.
46. Siepmann, J. and A. Gopferich, *Mathematical modeling of bioerodible, polymeric drug delivery systems*. Advanced drug delivery reviews, 2001. **48**(2-3): p. 229-47.
47. Salvanet-Bouccara, A., *Complications infectieuses de la chirurgie de la cataracte :L'endophtalmie aigüe en questions*. J. Fr. Ophtalmol, 2000. **23**(1): p. 81-87.
48. Endophtalmitis Vitrectomy Study (EVS) Group, *Results of the endophtalmitis vitrectomy study. A randomized trial of immediate vitrectomy and of intravenous antibiotics for the treatment of postoperative bacterial endophtalmitis*. Archives of Ophthalmology, 1995. **113**: p. 1479-96.
49. Kodjikian, L., et al., *Intraocular lenses, bacterial adhesion and endophtalmitis prevention: a review*. Biomedical materials and engineering, 2004. **14**(4): p. 395-409.

RESUME

Des microparticules de rifampicine pour l'administration intraoculaire ont été développées en vue du traitement prophylactique de l'endophtalmie post-chirurgicale. Ces microparticules à base d'un polymère biodégradable, le PLGA, sont produites par émulsion-diffusion. Tout d'abord l'influence des paramètres de formulation et de procédé sur les caractéristiques des microparticules (taille, charge, taux d'encapsulation...) a été étudiée. La formulation a par la suite pu être optimisée par la mise en place d'un plan d'expérience, ce qui a permis de mettre en valeur les paramètres clés influençant les propriétés des microparticules (concentrations en PLGA et PVA, présence ou non d'un cœur huileux...) et donc d'optimiser la formulation pour obtenir des microparticules adéquates pour l'administration intraoculaire de rifampicine ($1\mu\text{m} < \text{taille} < 10\mu\text{m}$, encapsulation maximale...). Les études de libération de la rifampicine *in vitro*, dans des conditions mimant celles physiologiques, ont montré que d'une part plus de 50% de la rifampicine était libérée en 1h permettant d'obtenir une dose "d'attaque" et d'autre part que les microparticules permettaient de maintenir une libération prolongée sur 24h avec une concentration $> \text{CMI}_{50}$ de *Staphylococcus epidermidis* (pathogène modèle utilisé pour les études microbiologiques). Enfin, une évaluation de l'effet bactéricide et antiadhérent sur lentilles intraoculaires (IOLs) de la rifampicine microencapsulée a été menée en présence de *S. epidermidis*. Les microparticules de rifampicine présentent une efficacité nettement supérieure à la solution contrôle de rifampicine puisque une bactéricidie totale a pu être observée 30h après injection (contre 10^3 CFU/mL restantes avec la solution contrôle), avec une activité antiadhérente nettement plus marquée (aucune bactérie détectée sur IOLs après 18h). Les microparticules de rifampicine apparaissent donc comme système d'administration intraoculaire prometteur dans le traitement prophylactique de l'endophtalmie post-opératoire.

TITRE

Development of rifampicin encapsulated microparticles for intraocular injection

Abstract

In this study, rifampicin-loaded microparticles were designed for intra ocular injection after cataract surgery to prevent postoperative endophthalmitis. Microparticles were produced by emulsification diffusion method using PLGA as biodegradable polymer and PVA as stabilizer agent. Influence of formulation and process parameters on microparticle characteristics (size, zeta potential, encapsulation efficiency...) was firstly investigated. Main parameters influencing the properties of particles were then identified by experimental design and formulation parameters were optimized to get desired particle sizes for intraocular delivery (between 1 and 10 μm) and the highest encapsulation of rifampicin. *In vitro* release studies of rifampicin in BSS at 37°C were performed showing firstly a burst release in 1 hour (more than 50% of rifampicin released), followed by a sustained release with a rifampicin concentration in the medium higher than the ICM_{50} on *Staphylococcus epidermidis* during 24h. Finally, the antimicrobial efficiency of rifampicin microparticles was evaluated on *S. epidermidis*. The results showed a higher bactericidal effect of encapsulated rifampicin than the control rifampicin solution; no bacteria were retrieved after 30h in the medium. Moreover, the antiadhesive property of rifampicin microparticles on intraocular lens (IOLs) was demonstrated since no bacteria were found on IOLs after 18h of incubation. From these experimental results, rifampicin encapsulated polymeric microparticles seem to be a good candidate for intraocular delivery of rifampicin in postoperative endophthalmitis prophylaxis.

DISCIPLINE

Pharmacie galénique

MOTS-CLES

Microparticules, Rifampicine, Administration intraoculaire, PLGA, Endophtalmie, Emulsion-diffusion

INTITULE ET ADRESSE LABORATOIRE :

Laboratoire d'Automatique et de Génie de Procédés (LAGEP) - UMR CNRS 5007
Université Claude Bernard - Lyon1-Bât CPE- 308G, 43 bd. du 11 novembre 1918
69622 VILLEURBANNE CEDEX