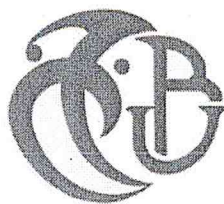


République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université BLIDA 1

Faculté des Sciences



Mémoire

Présentée pour l'obtention du diplôme de Master en chimie

En : Chimie Moléculaire

Option : Chimie Organique

Présenté Par : LOUNICI FAIZA

Thème

*Préparation et caractérisation des nano/micro particules
à base du chitosane pour la vectorisation de la
doxycycline*

Soutenu le 06 /11/2014, devant le jury composé de :

Mr M. ZOUIKRI

Professeur

Président

Mr R. BELAL

Professeur

Examineur

Mr Y. BAL

Professeur

Directeur de mémoire

MA-540-85-1

Laboratoire de Chimie –Physique Moléculaire et Macromoléculaire

2014

Remerciements

« A l'issue de ce travail, nous adressons nos remerciements premièrement à dieu tout puissant pour la volonté, la santé et la patience qu'il nous a donné durant ces longues années d'études »

Aucun travail n'est possible dans l'isolement. Les rencontres, les conseils et les encouragements constituent des aides précieuses souvent décisives. C'est pourquoi nous tenons à remercier ici tous ceux qui ont contribué à ce travail parfois sans le savoir ou du moins sans mesurer la portée de leur influence.

Mes plus profonds remerciements s'adressent à Monsieur Y.BAL pour avoir proposé et dirigé ce travail et pour son continuel suivi tout le long de la réalisation et de la correction de ce mémoire. Je lui exprime toute ma reconnaissance pour sa méthode de travail, sa patience et pour la confiance qu'il m'a accordé. Il m'est impossible de lui exprimer toute ma gratitude en seulement quelques lignes, mais je dirai j'avais de la chance de l'avoir comme promoteur. Merci pour tout.

Je remercie Monsieur M.ZOUIKRI professeur à l'USDB qui m'a fait l'honneur de présider ce jury.

J'adresse aussi mes remerciements à Monsieur R.BELAL professeur à l'université de SAAD Dahleb de BLIDA pour avoir accepté de faire partie du jury.

Je remercie également tous mes enseignants, qui m'ont donné les bases de la science, en particulier Monsieur A. Boulahouache, M^{me} Salli, M^{me} Belal.

Mes sincères remerciements aussi à toute l'équipe de laboratoire (LCPMM) qui m'ont aidé à réaliser ce travail. Il s'agit de Madame A.Ben Mihoub, Madame T.Benfoudil, Melle O. Rehmani et Melle K.El Acheache, Monsieur Kars et Monsieur S.Abbes et sans oublier les gens du centre de développement des technologies avancées CDTA.

Je remercie tous mes amis (es) de la promotion pour les bons souvenirs durant les cinq années d'étude, en particulier Ouahiba, Dalila, Moufida, Hassiba, Rym, Zineb, Imene.

Résumé

Dans ce travail, la préparation et la caractérisation de micro/nanoparticules de chitosane par la méthode de gélation ionotropique ont été entreprises en vue de l'encapsulation et la libération contrôlée de la Doxycycline qui est un antibiotique important appartenant à la classe des tétracyclines.

Ces systèmes micro/nanoparticulaires simples à base du chitosane (NP-CS, μ P-CS, μ S-CS) ou chargés en principe actif (NP-CS-Doxy, μ P-CS-Doxy, μ S-CS-Doxy) ont été par la suite caractérisés par spectroscopie infrarouge (FTIR), par diffraction des rayons X (DRX) et par microscopie électronique à balayage (MEB).

Les résultats obtenus montrent, à priori, que la capacité d'encapsulation des nanoparticules en doxycycline est supérieure par rapport à celle des microparticules (μ P) et des microsphères (μ S) et que l'agent actif est supporté sans aucune modification chimique. En outre, les résultats montrent que la libération de l'antibiotique est relativement lente et peut demander plus que 24 heures ce qui est normalement un critère pour assurer une action contrôlée ou prolongée.

Mots clés : Chitosane, doxycycline, nano/microparticules, vectorisation.

Abstract

In this work, we carried out the synthesis and characterization of the micro/nanoparticules based on chitosan using the ionotropic gelation route in the case of encapsulation, protection and controlled release of Doxycycline is an important antibiotic belonging to the tetracycline class.

A simple systems based on chitosan (CS-NP, μ P-CS, μ S-CS) or blends ones (CS-Doxy, μ P-CS-Doxy, μ S-CS-Doxy) were prepared and characterized by infra-red spectroscopy (IR), (DRX), scanning electron microscopy (SEM).

The results show, a priori, that the encapsulation in nanoparticles doxycycline capacity greater compared to that of the microparticles (μ P) and microspheres (μ S) and that the active agent is supported without any chemical modification. In addition, the results show that the release of the antibiotic is relatively slow and may require more than 24 hours which is normally a criterion for controlled or prolonged action.

Key words:

Chitosan ,doxycyclin , nano/microparticules,targeting.

المخلص

في هذا العمل قمنا بتحقيق تحضير و تمييز جسيمات مجهرية و نانومترية من الكيتوزان حسب طريقة التهليم الشاردي و ذلك من اجل تغليف و حماية و متابعة تحرير دوكسيسيلين هذا الأخير هو مضاد حيوي مهم ينتمي إلى فئة النتراتسيكلين. إن نظام الجسيمات المجهرية و النانومترية على أساس الكيتوزان (CS-NP, μ P-CS, μ S-CS) أو المعقد

(CS-Doxy, μ P-CS-Doxy, μ S-CS-Doxy) أعدت و ميزت بجهاز المطياف الشعاعي (IR) , (DRX) و المجهرى

(MEB)

وتبين النتائج أن قدرة كبسلة الجسيمات النانومترية بالدوكسيسيلين أكبر مقارنة مع الجسيمات المجهرية ويتم اعتماد عامل نشط من دون أي تعديل كيميائي إضافة على ذلك، فقد بينت النتائج أن تحرير المضادات الحيوية بطيء نسبيا وربما يتطلب أكثر من 24 ساعة وهي عادة عبارة عن معيار لتبيين عمل مراقب أو متواصل.

الكلمات المفتاحية

الكيتوزان , الدوكسيسيلين , الجسيمات المجهرية و النانومترية , كمية موجهة.

LISTE D'ABREVIATION

CS : Chitosane.

Doxy : Doxycycline.

TPP/TPPS : tripolyphosphate / tripolyphosphate de sodium.

DA : degré d'acétylation.

DD : degré de désacétylation.

NP-CS : nanoparticule de chitosane.

μ P-CS : microparticules de chitosane.

μ S-CS : microsphères de chitosane.

NP-CS-Doxy : nanoparticule de chitosane avec la Doxycycline.

μ P-CS-Doxy : microparticules de chitosane avec la Doxycycline.

μ S-CS-Doxy : microsphères de chitosane avec la Doxycycline.

FTIR : spectrophotométrie infrarouge a transformée de fourrier.

MEB : microscopies à balayage électronique.

DRX : diffraction des rayons X.

UV-visible : spectrophotométrie uv-visible.

SGF : simulated gastrique fluid (fluide gastrique simulé).

PA : principe actif.

nm : nanomètre.

μ m : micromètre.

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE

		1
CHAPITRE I :	Synthèse Bibliographique	2
I	Introduction	3
I.1	Importance des systèmes nanoparticulaires pour la délivrance de principes actifs	3
I.2	Encapsulation des principes actifs	4
I.2.1	Définition de l'encapsulation	4
I.2.2	Définition des vecteurs pharmaceutiques	4
I.3.3	Les différentes générations de vecteurs pharmaceutiques	5
I.3.4	Les différents types de vecteurs pharmaceutiques	6
I.3	Le Chitosane	7
I.3.1	Propriétés physico-chimiques et les différents domaines d'applications du chitosane	8
I.3.2	Les différentes nanoparticules utilisées comme vecteurs pharmaceutiques	9
I.3.2	La gélation ionotropique	9
I.4	Application des nano/microparticules de chitosane dans la livraison des antibiotiques	10
I.4.1	Exemple d'un antibiotique (la doxycycline)	11
CHAPITRE II :	Préparation, caractérisation des nano/microparticules et microsphères du chitosane	
II.1	Introduction	14
II.2	Caractérisation du chitosane par FTIR	14
II. 2.1	Détermination de DD et DA de chitosane par FTIR	15
II. 2.2	Mesure de la viscosité	16
II.3	Préparation des vecteurs à base du chitosane	17
II.3.1	Préparation des nanoparticules à base du CS	17
II.3.2	Préparation des microparticules à base du CS	18
II.3.3	Préparation des microsphères à base du CS	18
II.4	Caractérisation des nano/microparticules et microsphères à base du	19

Introduction général

Les micro/systèmes d'administration des principes thérapeutiques offrent actuellement plusieurs avantages par rapport aux formes et présentations classiques (comprimés, sirops, ...etc.) : ils peuvent être associés à une efficacité élevée, une réduction de la fluctuation des taux circulants de médicaments, et une amélioration de l'observance des patients [1,2]. Ces particules peuvent être administrées, à titre d'exemple, par voie parentérale, nasale ou pulmonaire sous la forme de poudres ou de suspensions. En outre, grâce à des complexes avec des matériaux polymériques biodégradables et biocompatibles, la libération contrôlée de l'agent thérapeutique contenu dans des microsphères peut être assurée. Parmi les polymères d'utilisation potentielle dans ce domaine, le chitosane est un choix incontestable car il est disponible, pas cher, biocompatible et biodégradable.

L'action bactéricide du chitosane est bien connue et il a été largement étudié particulièrement au cours des dernières années. Le mécanisme de l'effet bactéricide du chitosane a été attribué à une interaction électrostatique entre les NH_3^+ des groupes de CS et les groupes phosphoryle des composants phospholipidiques et lipopolysaccharides (LPS) des membranes de cellules bactériennes, ce qui augmente leur perméabilité et en fin de compte détruit des fonctions vitales en vidant le contenu cellulaire de la bactérie [3].

Une biodisponibilité contrôlée ou régulée d'un principe actif est un sujet de première importance. Il faut noter, par exemple, que les peptides et protéines ont généralement une demi-vie plasmatique très courte, ce qui exige une administration répétée pour maintenir la concentration plasmatique des protéines ou peptides dans la fenêtre thérapeutique. Les raisons de la courte demi-vie plasmatiques des protéines et peptides sont nombreuses [4]: (1) élimination rapide par filtration rénale ; (2) dégradation enzymatique ; (3) capture par le système réticuloendothélial ; (4) faible stabilité en milieu physiologique.

Par conséquent, il apparaît actuellement incontournable de développer des systèmes à libération prolongée «Drug Delivery System » ce qui permet de réguler la libération des peptides ou protéines –ou tout autre agent actif- au cours du temps et donc d'améliorer la tolérance des patients envers le traitement, de diminuer le risque de toxicité et d'augmenter l'efficacité du traitement. Ces spécialités sont développées selon des procédés qui seront présentés dans les premiers chapitres de ce mémoire. Par définition, un système à libération prolongée doit satisfaire aux deux conditions suivantes : (1) inclusion d'un composé qui

permet de moduler les caractéristiques du système comme la vitesse de libération, la durée de libération ou la cible d'action et (2) la durée d'action qui doit être supérieure à 24 heures [5].

Le rôle des nanoparticules comme un véhicule potentiel pour les agents antimicrobiens dans le traitement des infections bactériennes est examiné dans le cadre de la thématique abordée ici. L'activité antimicrobienne à partir de matrices nanoparticulaires encapsulant des agents antimicrobiens in vitro et in vivo devrait être améliorée par rapport aux formes classiques. Cette revue discute systématiquement l'efficacité, les mécanismes, l'influence des facteurs, l'enjeu et les perspectives des nanoparticules biodégradables pour l'administration intracellulaire d'agents antimicrobiens afin d'explorer des stratégies en matière de développement des nanosystèmes plus efficaces capable de surmonter les difficultés dans le traitement des infections intracellulaires [6].

Ce modeste travail est partagé en trois chapitres :

On présentera dans le premier chapitre une synthèse bibliographique sur l'encapsulation, les différents types de nano/microparticule, la production et la caractérisation ainsi que les propriétés et les applications de chitosane.

Le second chapitre est consacré aux différentes procédures expérimentales, à l'analyse des résultats et aux discussions relatives à la préparation et la caractérisation des micro/nanoparticules à base du chitosane vide et chargées de doxycycline, rigidifié par le tripolyphosphate de sodium (TPPS). Une caractérisation étendue des différents produits obtenus par FTIR, MEB, DRX est présentée dans cette étude.

Enfin, le troisième chapitre est consacré à une étude sur la cinétique de libération de l'agent actif -préalablement encapsulé dans les nanoparticules du chitosane- in-vitro dans un fluide biologique simulé, le SGF.

I. Introduction

I.1. Importance des systèmes nanoparticulaires pour la délivrance de principes actifs

Depuis une trentaine d'années, l'intérêt des nanotechnologies dans le domaine biomédical n'a cessé de croître. Cette discipline offre des perspectives uniques pour la délivrance ciblée en imagerie médicale (diagnostic), en thérapie génique et pour l'administration d'agents thérapeutiques [7,9].

Une nanoparticule est un assemblage d'atomes ou de molécules, formant un objet dont les trois dimensions sont à l'échelle nanométrique, c'est-à-dire une particule dont le diamètre nominal est compris entre 1 et 100 nm. A titre de comparaison avec les structures organiques naturelles, les nanoparticules se situent principalement dans la gamme de taille correspondant aux protéines (Figure I.1). [10]

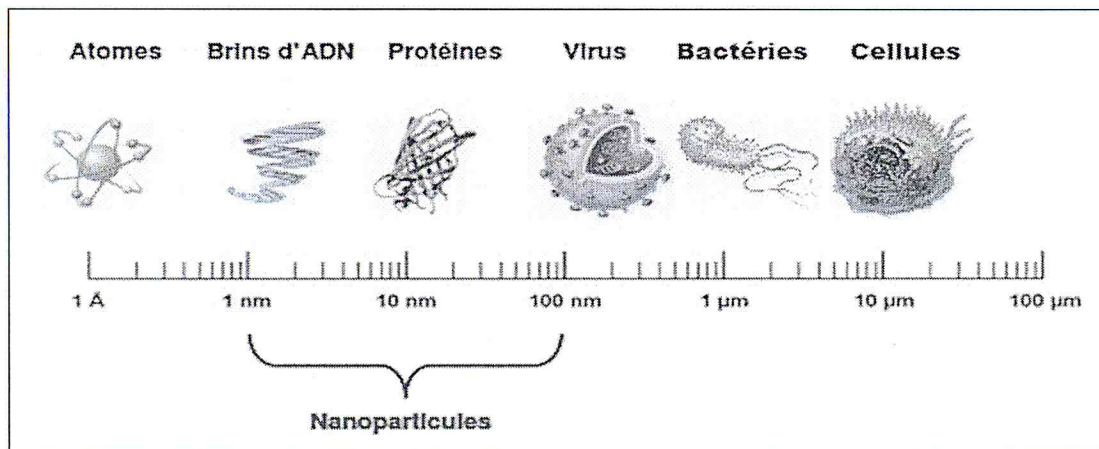


Figure I. 1 : Gamme de tailles des nanoparticules, en comparaison avec les principales structures chimiques et biologiques.[10]

Une nanoparticule est également définie comme ayant « un diamètre suffisamment petit pour que les propriétés physiques et chimiques diffèrent de façon mesurable de celles des matériaux en vrac ».[10]

La faible taille des nanoparticules leur confère des propriétés intéressantes. Elle offre en effet une importante surface spécifique et une grande stabilité. Ces particules ont effectivement l'avantage de former des dispersions qui ne sédimentent pas.

De nouveaux systèmes submicroniques de délivrance (nanoparticules), avec de nouvelles propriétés physico-chimiques (taille, propriété de surface, stabilité dans le milieu biologique...) et de nouveaux matériaux (polymères, lipides, métaux...), sont régulièrement élaborés et testés. Ces systèmes offrent une excellente opportunité pour l'administration de

principes actifs présentant une toxicité importante ou une faible solubilité, voire une instabilité notable in vivo. La toxicité de ces principes actifs est généralement due à leur accumulation indésirable dans les tissus sains, entraînant dans plusieurs cas l'abandon du traitement. Les systèmes submicroniques sont capables non seulement de protéger les molécules actives (molécules chimiques, peptides, protéines, ADN, ARN) de la dégradation mais également de contrôler leur libération dans le temps et dans l'espace.

La conception d'outils submicroniques pour des applications biomédicales (nano-médecine) est un processus très complexe qui nécessite la compréhension et la maîtrise de différents aspects liés aux nanoparticules : aspects chimiques, physico-chimiques, biopharmaceutiques et pharmacologiques. La conception de nano-vecteurs doit nécessairement répondre à deux principaux critères :

- Les matériaux utilisés doivent être biodégradables et biocompatibles. Ils doivent pouvoir être éliminés par l'organisme et ne pas induire de réactions toxiques et/ou inflammatoires. En effet, l'accumulation et le stockage de certains matériaux dans l'organisme pourrait conduire à des effets toxiques pour les cellules, en particulier après administration répétée de ces nano-systèmes.
- Ils doivent assurer l'encapsulation d'agents actifs, leur transport puis leur libération au niveau de la cible biologique.

I.2 Encapsulation des principes actifs

I.2.1 Définition de l'encapsulation

L'encapsulation permet d'une part de protéger le PA de l'environnement qu'il entoure (humidité, oxygène, lumière...) et d'autre part de modifier la forme, le volume, la densité en transformant des liquides en solides finement dispersés. Ainsi, l'une des principales applications de l'encapsulation est de la contrôler ou prolonger dans le temps du PA .

I.2.2 Définition des vecteurs pharmaceutiques

Les vecteurs pharmaceutiques sont des structures capables de véhiculer un principe actif en modifiant sa distribution tissulaire et / ou cellulaire, ou ses interactions avec des cellules cibles.

I.2.3 Les différentes générations de vecteurs pharmaceutiques

On distingue trois générations de vecteur selon leur taille et l'application envisagée.

Vecteurs de première génération (encapsulation du PA)

Vecteurs de deuxième génération (encapsulation du PA + furtivité)

Vecteurs de troisième génération (encapsulation du PA + furtivité + ciblage cellulaire)

a) Les vecteurs de première génération (Agissent sur les organes)

Sont des systèmes colloïdaux (liposomes, Nanocapsules, Nanosphères, Nanoémulsions,...) dont la surface est de nature plutôt hydrophobe sont repérés et capturés par le système immunitaire (macrophages) en quelques minutes. Aussi, le médicament est donc libéré essentiellement dans le foie, la rate, les reins et la moelle osseuse.

b) Les vecteurs de deuxième génération (agissent sur les tissus)

La surface ici est rendue hydrophile par adsorption physique de polymères amphiphiles ou par fixation chimique de polymères hydrophiles afin d'empêcher l'adsorption de protéines plasmiqes (opsonines) qui déclenche la capture de ce corps étranger par les macrophages. Ces nanoparticules à surface hydrophile sont qualifiées de « furtives » et présentent une durée de vie accrue dans l'organisme.

c) Les vecteurs de troisième génération (agissent sur les cellules)

Dans certains cas, il est cependant nécessaire d'utiliser des PA relativement toxiques (lors de traitements anticancéreux par exemple), donc de contrôler les quantités administrées en ciblant précisément les zones à traiter. Pour ce faire, les vecteurs de troisième génération peuvent reconnaître sélectivement des marqueurs spécifiques surexprimés à la surface de cellules cibles grâce à des ligands (anticorps, peptides, sucres,...) fixés à la surface de nanoparticules « furtives ».



Figure 1.2 : Différentes générations de nanoparticules polymériques [11]

I.2.4 Les différents types de vecteurs pharmaceutiques:

Les différents types de particules utilisées comme vecteurs pharmaceutiques sont figurées ci-dessous (Fig.1.3)

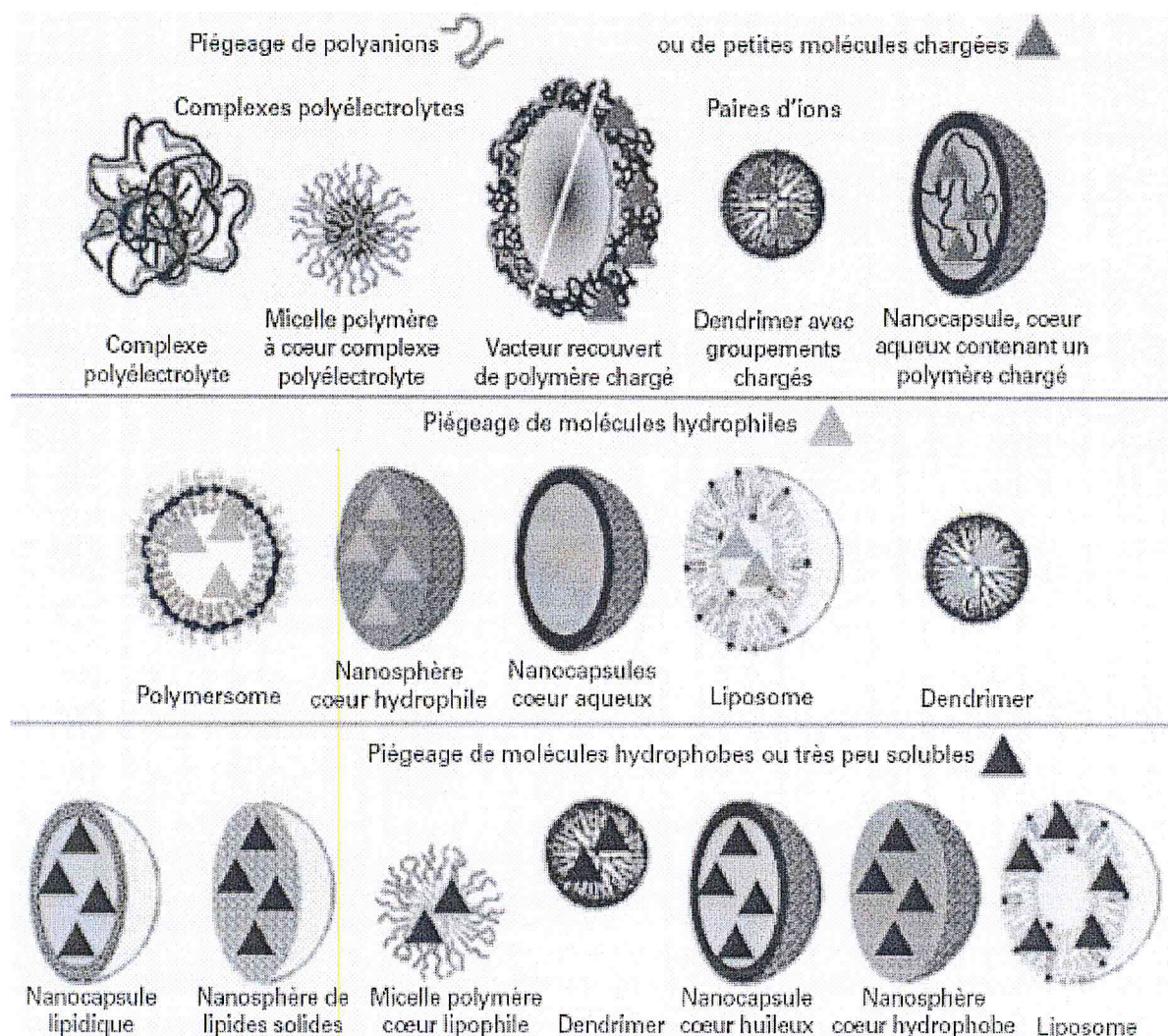


Figure I.3 : Différents types de particules permettant l'encapsulation d'un principe actif [12]

➤ Les liposomes

Vésicule biodégradable composée de deux couches de lipides et d'un compartiment aqueux au centre de la nanoparticule. Lorsque le PA du médicament à stocker sans le liposome est hydrophile, il est placé dans le compartiment aqueux, mais lorsqu'il est lipophile, il est placé dans la bicouche de lipides. Le liposome mesure environ 100 nm ce qui fait de lui un agent 70 fois plus petit qu'un globule rouge [13].

➤ Les nano/microsphères

Les nano/microsphères sont des systèmes matriciels caractérisés par la présence du principe actif dispersé de façon hétérogène ou dissous sous forme de dispersion moléculaire dans une matrice de polymère biodégradable de forme sphérique. Ce principe actif sera libéré lors de la dégradation de nanosphère.

➤ Les nano/microcapsules

Les nano/microcapsules sont des systèmes réservoirs où le principe actif est entouré d'une membrane de polymère biodégradable.

➤ Les micelles

Les micelles sont des agrégats de morphologie sphérique de molécules amphiphiles, généralement des tensioactifs, dont la tête polaire hydrophile est au contact de l'eau tandis que les parties hydrophobes sont regroupées et dirigées vers l'intérieur afin de minimiser leur contact avec l'eau [14].

➤ Les nanoparticules polymériques

Les polymères ont attiré une grande attention pour leur capacité à s'auto-organiser en solution pour former des types variés de nano-objets. Cette capacité à s'organiser est gouvernée par les propriétés physico-chimiques de ces polymères, en particulier la balance hydrophile/hydrophobe.

La plupart des nanoparticules polymériques utilisées en nanomédecine sont biocompatibles et biodégradables, elles sont propices à l'encapsulation et à la délivrance d'une gamme importante de molécules thérapeutiques. Parmi les polymères les plus utilisés pour la formation de nanoparticules, nous pouvons citer les gélatines, le chitosane, les copolymères poly(lactide-glycolides), le poly(lactide), le poly(glycolide) et les poly(cyanoacrylate). Les polymères ont attiré une grande attention pour leur capacité à s'auto-organiser en solution pour former des types variés de nanoobjets. Cette capacité à s'organiser est gouvernée par les propriétés physico-chimiques de ces polymères, en particulier la balance hydrophile/hydrophobe [15,16].

Dans notre travail, on a choisis les nanoparticules polymériques à base de chitosane comme vecteur thérapeutiques pour l'encapsulation de la doxycycline.

I.3 Le Chitosane

Le chitosane est un polysaccharide linéaire formé d'unités D-glucosamines entre elle par des liaisons glycosidiques et de N-acétyl-glucosamine. Le chitosane est un polysaccharide naturel et linéaire obtenu par désacétylation de la chitine qui est le deuxième biopolymère le plus abondant dans la nature après la cellulose [17].

En raison de ses propriétés biologiques favorables, tels qu'un caractère hydrophile, une biodégradabilité, une bonne biocompatibilité et une faible toxicité, le chitosane a beaucoup attiré l'attention au cours des dernières années et a été largement utilisé dans de nombreux domaines, en particulier dans le génie biomédical et dans les formulations pharmaceutiques [18,19].sa structure chimique est donnée dans la figure (Figure I.3).

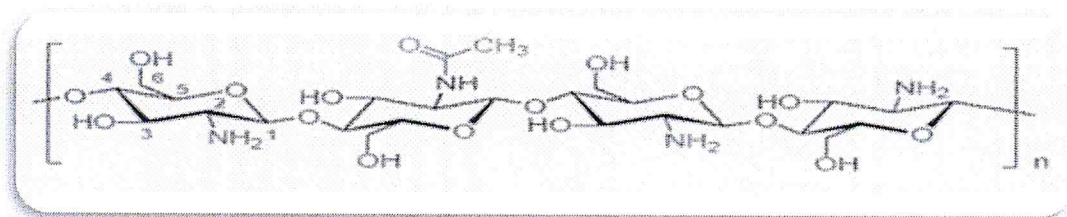


Figure I.3 : Structure chimique du chitosane

Le chitosane a trois types de groupes fonctionnels, un groupement amine et deux groupements hydroxyles en positions C₂, C₃ et C₆ respectivement (Figure I.3). Grâce à ses groupements amines libres, ce composé possède des propriétés très intéressantes. Le chitosane, soluble dans les acides faibles, possède une charge positive alors que la plupart des polysaccharides sont chargés négativement [20].

➤ Production de chitosane

Le chitosane est le produit de la désacétylation (enlèvement des groupements acétyles) chimique en milieu alcalin ou enzymatique de la chitine (Figure I.4) cette dernière subit au préalable une déminéralisation à l'acide chlorhydrique, une déprotéinisation par la soude ou la potasse, enfin un blanchiment par la présence d'un agent oxydant.

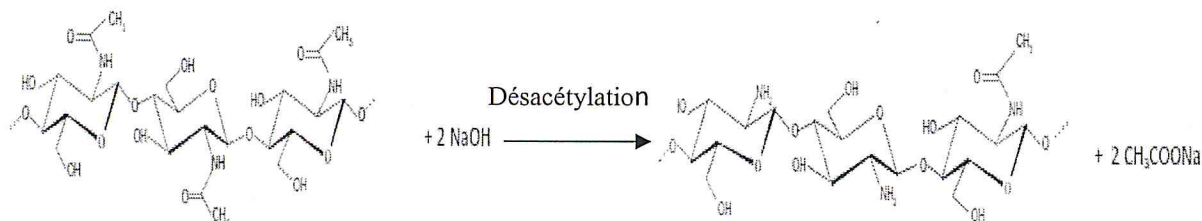


Figure I.4 : Réaction de désacétylation de la chitine (21)

Le chitosane ne diffère de la chitine que par les groupes amines (-NH₂) (Figure I.4).

I.3.1 Propriétés physico-chimiques et les différents domaines d'applications du chitosane

Le tableau ci-dessous regroupe les propriétés physico-chimiques et les différents domaines d'applications du chitosane.

Tableau I.1 : Propriétés du chitosane et ses principales applications [22]

Propriétés	Domaines d'application	Applications
Propriétés chimiques	AGRICULTURE	- Enrobage des semences - Alimentation des volailles - Fertilisant
Polyamine linéaire Réactivité des groupements amino Réactivité des groupements hydroxyle	ALIMENTAIRE	- Additifs alimentaires (liant, émulsifiant, stabilisant) - Clarification des boissons - Anticoagulant
Propriétés polyélectrolytes (en milieu acide) - Polymère cationique - Forte densité de charge - Excellent flocculant - Adhésion à des charges chargées négativement	BIOMEDICAL	- Agent hémostatique - Bactériostatique - Spermicide - Lentille cristalline (ophtalmologie) - Membranes pour dialyse - Capsules pour le relargage des médicaments - Réduction du taux de cholestérol - Peaux artificielles - Pansements - Accélération de la cicatrisation des blessures - Fils de suture chirurgicaux biorésorbables
Propriétés biologiques - Biocompatible - Biodégradable - Non toxique - Bioactif vis-à-vis les plaies - Réduit le niveau de cholestérol - Stimule le système immunitaire	AUTRES Acoustique Biotechnologie Alimentaire Industrie papetière Textile Alimentaire	- Membranes des hauts parleurs - Immobilisation des cellules et des enzymes - Enrobage et films d'emballage - Additifs - Imperméabilisant - Films antimicrobiens
Propriétés chélatantes Propriétés filmogènes Propriétés de rétention d'eau Propriétés antifongiques		

I.3.2 Les différentes nanoparticules utilisées comme vecteurs pharmaceutiques

Les différentes méthodes utilisées dans la préparation des nanoparticules de chitosane sont regroupées dans le tableau ci-dessous.

Technique	Avantages	Inconvénients
Gélation ionotropique	<ul style="list-style-type: none"> *Formulation douce pour les protéines : pas de solvant organique, milieu aqueux, *température faible, *Technique simple et rapide 	<ul style="list-style-type: none"> *Difficulté de contrôle de la cinétique de libération
Spray-drying	<ul style="list-style-type: none"> *Large gamme d'application *Encapsulation importante et rapide de principe actif 	<ul style="list-style-type: none"> *nécessite une quantité de matière importante → pertes
Double émulsion	<ul style="list-style-type: none"> *Bon contrôle de la cinétique de libération *Possibilité d'encapsuler de petites molécules 	<ul style="list-style-type: none"> *efficacité d'encapsulation limitée *utilisation de solvant organique *phénomène de burst-release
Polymérisation interfaciale	<ul style="list-style-type: none"> *Large gamme de membranes possibles *en fonction des monomères hydrophobes *encapsulation élevée d'insuline a aide de cyanoacrylates 	<ul style="list-style-type: none"> *Large surface de contact huile/eau → Dégradation du principe actif fragile *Contrôle limité de la réaction *Lavages nécessaires → Pert de produit
Séparation de phase	<ul style="list-style-type: none"> *Encapsulation de protéines possible *Bon contrôle de la taille des particules 	<ul style="list-style-type: none"> *Fabrication industrielle limitée *Récupération des particules difficile
Coacervation Complexe	<ul style="list-style-type: none"> *Condition douces : pas de solvant organique, température ambiante 	<ul style="list-style-type: none"> *Gamme de PH limitée *Si utilisation de réticulation → toxicité

I.3.3 La gélation ionotropique

La gélation ionotropique est basée sur la capacité de réticulation des polyélectrolytes en présence de certains ions pour former des hydrogels.

➤ Avantages

Cette technique présente l'avantage principal de permettre une formulation douce et de conserver ainsi l'activité biologique des PA. Tous les polyélectrolytes étant hydrosolubles, cela permet d'encapsuler les PA sans utiliser de solvants organiques et de température élevée. Cette technique est également simple, rapide, rentable et industrialisable.

➤ Limites

Le seul problème rencontré dans cette technique, c'est que la libération à partir de la matrice ou de la membrane ne peut pas contrôler la libération du PA sur longue période.

I.4 Application des nano/microparticules de chitosane dans la livraison des antibiotiques

I.4.1 Exemple d'un antibiotique (la doxycycline)

La Doxycycline (DOXY) est un antibiotique à large spectre célèbre, qui est efficace contre les bactéries Gram-positives et les Gram-négatives, des protozoaires et des bactéries anaérobies différents. En tant qu'analogue de la tétracycline, elle peut fonctionner comme un bactériostatique qui est capable d'inhiber la synthèse des protéines bactériennes dans les sites ribosomiques. DOXY présente une longue demi-vie, une haute solubilité dans les lipides, et une très bonne absorption par voie orale. Après avoir été présentée dans la pratique clinique en 1967, DOXY a été fréquemment utilisée dans le traitement des maladies parodontales destructrices telles que la parodontite juvénile et les abcès parodontaux aigus. Elle est utilisée contre l'infection parodontale et pour améliorer la régénération osseuse après les maladies parodontales. En outre, elle est également utilisée pour prévenir l'infection bactérienne liée à l'arthrite septique.

Cependant, il existe quelques inquiétudes sur les effets secondaires possibles tels que les troubles gastro-intestinaux, l'érosion de l'œsophage, et la photosensibilité lorsqu'elle est administré par voie orale. Par conséquent, afin de parvenir à l'infection des tissus profonds à l'intérieur affectés par une concentration efficace du médicament et de contourner les effets secondaires systémiques, la livraison locale contrôlée de la Doxycycline est souhaitable [23]. Une voie possible pour y parvenir est par encapsulation de cette molécule active dans une matrice biodégradable (le chitosane dans notre cas).

Références bibliographiques

- [1] L. Hui, D. Yumin, W. Xiaohui, S. Liping, *Int. J. Food Microbiol.* 95 (2004) 147–155.
- [2] A.B. Vishu Kumar, M.C. Varadaraj, L.R. Gowda, R.N. Tharanathan, *Biochim. Bio-phys. Acta* 1770 (2007) 495–505.
- [3] E.M. Costa, S. Silva, C. Pina, F.K. Tavarria, M.M. Pintado, *Anaerobe* 18 (2012) 305–309.
- [4] M. Benhabiles, R. Salah, H. Lounici, N. Drouiche, M. Goosen, N. Mameri, *Food Hydrocolloids* 29 (2012) 48–56.
- [5] F.X.Malcata, M.E. Pintado, *Int. J. Biol. Macromol.* 50 (2012) 148–152.
- [6] A. Rodríguez-Contreras et al. / *European Polymer Journal* 49 (2013) 3501–3511
- [7] T. L. Doane, C. Burda, *Chem. Soc. Rev.* 41(2012) 2885-2911.
- [8] I. Brigger, C. Dubernet, P. Couvreur, *Adv. Drug Delivery Rev.* 54 (2002) 631-651.
- [9] K. Miyata, N. Nishiyama, K. Kataoka, *Chem. Soc. Rev.* 41 (2012) 2562-2574.
- [10] The Royal Society & The Royal Academy of Engineering. *Nanoscience and nanotechnologies opportunities and uncertainties.* (2004).
- [11] D. Bazile, C. Prud'homme, M. T. Bassoullet, M. Marlard, G. Spenlehauer, M. Veillard, *J. Pharm. Sci.* 84 (1995) 493-498.
- [12] Jaouen, D.. *Chitine, Chitosane et Dérivés.* PhD Thèse en pharmacie, Université d'Angers, Angers (France) (1994).
- [13] Brise C. « Nouvelles association catanioniques d'amphiphiles et de bolaamphiphiles derives de sucre : formulations bioactives d'antihistaminiques en vue de leur administration cutanée ». Thèse de doctorat de l'université de Toulouse (2009).
- [14] G. Gaucher, M. H. Dufresne, V. P. Sant, N. Kang, D. Maysinger, J. C. Leroux, *J. Controlled Release.* 109 (2005) 169-188.
- [15] L. Silvio, R. G. Courteney-Harris, S. Downes, *J. Mater. Sci. - Mater. Med.* 5 (1994) 819-823.
- [16] T. Musumeci, C. A. Ventura, I. Giannone, B. Ruozi, L. Montenegro, R. Pignatello, G. Puglisi, *Int. J. Pharm.* 325 (2006) 172-179.
- [17] A.S. Pedro, E. Cabral-Albuquerque, D. Ferreira, B. Sarmiento, *Chitosan: an option for development of essential oil delivery systems for oral cavity care Carbohydr. Polym.* 76 (2009) 501–508.

Chapitre II : Préparation, caractérisation des nano/microparticules et microsphères du chitosane :

II.1. Introduction

Dans l'objectif d'améliorer la stabilité et l'efficacité de la Doxycycline, on utilise des nano/microvecteurs de première génération à base du chitosane pour l'encapsuler et le véhiculer vers son site d'action.

Le Chitosane a été choisi comme matériau de vectorisation pour la libération contrôlée de doxycycline, puisque il s'agit d'un polymère polycationique unique avec une excellente biocompatibilité et une dégradabilité assurée [1].

Le présent travail décrit la préparation et l'évaluation in vitro des systèmes pharmaceutiques nano/microparticules à base du chitosane. Des nano/microsphères du chitosane vide et chargées du principe actif ont été préparées par la méthode de la gélation ionotropique en présence du tripolyphosphate de sodium comme agent de réticulation. Le chitosane utilisé dans cette partie expérimentale de source ALDRICH, et l'acide acétique de source FLUKA, ils ont été utilisés tels qu'ils sont reçus.

Avant de commencer l'étude expérimentale sur les trois vecteurs (NP-CS, μ P-CS et μ S-CS), il est utile de commencer par une petite caractérisation structurale par FTIR et détermination de poids moléculaire par viscosimètre du chitosane utilisé.

II.2 Caractérisation du chitosane par FTIR

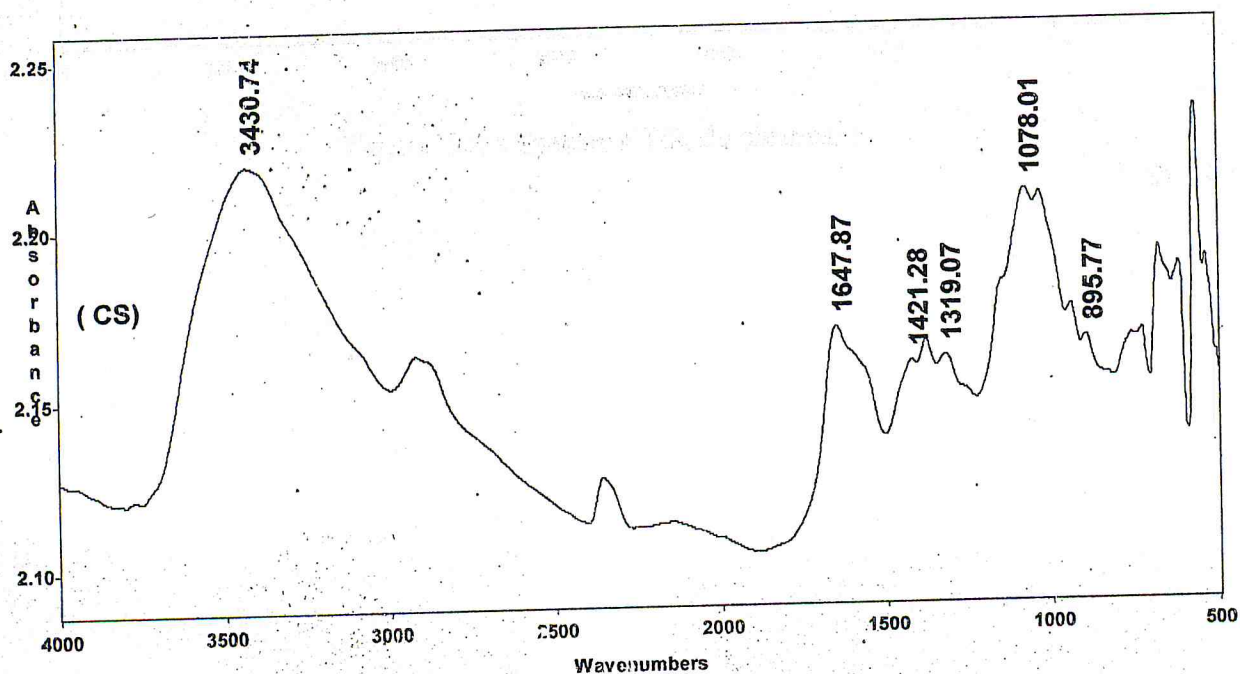


Figure II.1 : Spectre FTIR du chitosane.

Chapitre II : Préparation, caractérisation des nano/microparticules et microsphères du chitosane :

Les pics caractéristiques du CS sont regroupés dans le tableau ci-dessous.

Tableau I : Les groupements caractéristiques du chitosane.

λ (cm^{-1})	Groupement
3430.74	Vibration d'élongation de la liaison N-H et O-H
2918.73	Vibration d'élongation symétrique des liaisons C-H aliphatiques.
1647.87	Vibration de déformation de C=O (Amide I)
1379.81	Vibration de déformation symétrique de la liaison C-H dans les groupements CH ₂ et CH ₃ .
1320.99	Vibration d'élongation -CO de -CH ₂ OH
1423.20	Vibration de déformation de C-H dans le groupement CH ₂
897.70	Liaison glucosidique β (1 \rightarrow 4) et la vibration de déformation de CH.
1032.69-1078.01	Vibration de valence de la liaison C-O-C

II.2.1 Détermination de DD et DA de chitosane par FTIR

La détermination de DD de chitosane par FTIR a été rapporté par plusieurs auteurs, elle est basé sur la comparaison entre l'absorbance d'une bande qui est proportionnelle à la désacétylation (bande de mesure) à l'absorbance d'une autre bande qui est indépendante de la désacétylation (bande de référence).

L'échantillon à étudier est préparé selon la méthode des disques du KBr .dont le rapport polymère : KBr est 1 :150.

L'équation utilisée pour la détermination du DD est donnée ci-dessous [2] :

$$DD = 100 - \left(\frac{A_{1650} / A_{3450}}{1,33} \times 100 \right)$$

Chapitre II : Préparation, caractérisation des nano/microparticules et microsphères du chitosane :

dont :

A_{1650} : l'absorbance du pic 1650 cm^{-1} (Caractéristique groupement amide primaire comme mesure de la quantité du groupement N-acétylé).

A_{3450} : l'absorbance du pic 3450 cm^{-1} (Caractéristique groupement hydroxyle).

1,33 : représente la valeur du rapport dans le cas du chitosane entièrement N-acétylé.

Le DD de chitosane obtenu par FTIR est de l'ordre de **85,1%**, d'où le DA est égal à **14,9%**

$$(DA = 100 \% - DD \% = 14,9\%)$$

II.2.2 Mesure de la viscosité

La viscosité du chitosane est mesurée au sein du laboratoire de recherches LCPMM au département de chimie, faculté des sciences, université de blida en utilisant un viscosimètre de type « AND VIBRO VISCÔMETER SV-10 ».

Pour la mesure de viscosité on prépare une solution de $0,04 \text{ g/dl}$, préparée par la dissolution de $0,02 \text{ g}$ de CS dans une solution de 50% acide acétique à $0,3 \text{ M}$ et 50% d'acétate de sodium à $0,2 \text{ M}$ sous agitation pendant 3 h . Dans une cuve en plastique on met une solution de CS de $0,004 \text{ g/dl}$ et on lit la valeur de la viscosité directement, puis on mesure la viscosité de CS avec différentes concentrations $0,03$; $0,02$; $0,01 \text{ g/dl}$.

Le poids moléculaire viscosimétrique moyen a été calculé en utilisant l'équation de Marc-Houwink [3] :

$$[\eta] = K \cdot M^a$$

$[\eta]$: Viscosité intrinsèque,

M : Le poids moléculaire moyen,

a et K : Les constantes pour un système solvant/soluté donné.

Chapitre II : Préparation, caractérisation des nano/microparticules et microsphères du chitosane :

Avec : $k = 1,81 \times 10^{-3} \text{ dl/g}$ et $a = 0,93$. A partir de la droite $\eta/C = f(C)$ (figure II.2)

La viscosité intrinsèque $[\eta]$ est l'extrapolation à $C=0$ et elle est égale à $1,32 \text{ dl/g}$ soit 132 ml/g , d'où le poids moléculaire viscosimétrique moyen est de $169402,46 \text{ g/mol}$ soit environ $169,40 \text{ KDalton}$.

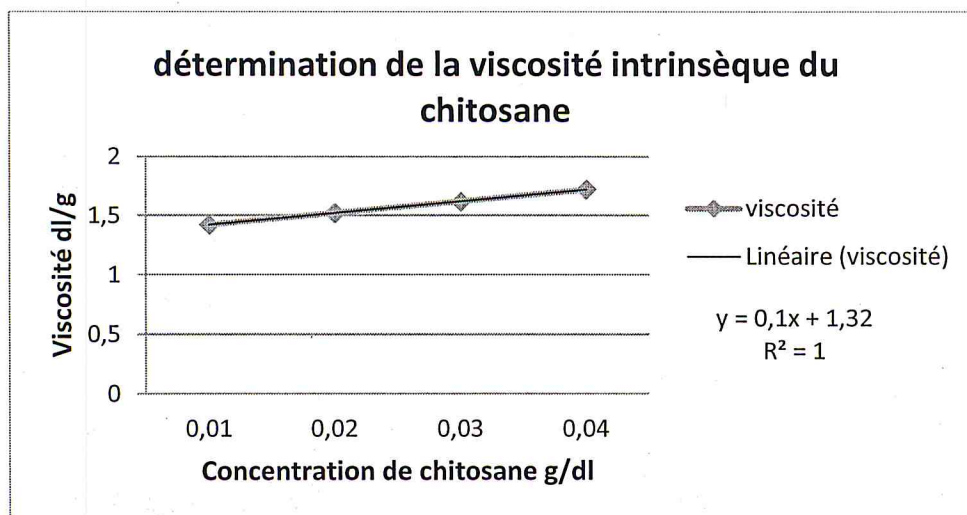


Figure II.2 : détermination de la viscosité intrinsèque du chitosane par la méthode de Huggins.

II.3 Préparation des vecteurs à base du chitosane

II.3.1 Préparation des nanoparticules à base du CS

a. Nanoparticules vides (sans PA)

Les Nanoparticules (NP) à base du chitosane sont préparées par la méthode de la gélification ionotropique. Une solution aqueuse du tripolyphosphate de sodium (TPP) est ajoutée goutte à goutte sous agitation à une solution acide du chitosane dissout dans l'acide acétique (1 %). à une température ambiante pendant 30 min. Les nanoparticules sont collectées par ultracentrifugation puis séchées à l'air libre [4].

b. Nanoparticules chargées du principe actif (doxycycline)

La procédure consiste à ajouter une solution de la Doxycycline, à concentration bien définie, à la solution acide du chitosane, puis rajouter la solution de gélification (TPP), les nanoparticules (NP-CS-Doxy) ont été isolées par centrifugation puis séchées à l'air libre dans un endroit sombre[5].

Chapitre II : Préparation, caractérisation des nano/microparticules et microsphères du chitosane :

Le schéma de la méthode utilisée dans la préparation des systèmes est donné dans la figure ci-dessous.

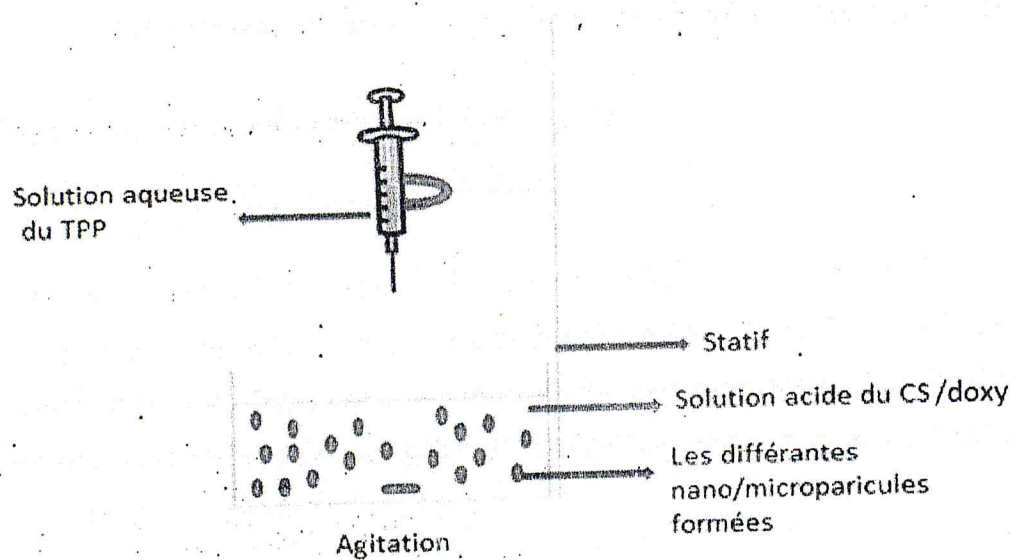


Figure II.3 : schéma de la préparation des nano particules à base de chitosane [6].

II.3.2 Préparation des microparticules à base du CS

a. microparticules vides (sans PA)

Les Nanoparticules (NP) à base de chitosane sont préparées par la méthode de la gélion ionotropique. Une solution aqueuse du tripolyphosphate de sodium (TPP) (1 %) est ajoutée goutte à goutte sous agitation à une solution acide du chitosane dissout dans l'acide acétique (1 %). A une température ambiante pendant 30 min. Les nanoparticules sont collectées par ultracentrifugation puis séchées à l'air libre.

b. microparticules chargées du principe actif (doxycycline)

La préparation est la même que celle des NP-CS-Doxy.

II.3.3 Préparation des microsphères à base du CS

a. Microparticules vides (sans PA)

La préparation des microsphères du chitosane vide consiste à dissoudre le chitosane dans l'acide acétique à 2% en poids, cette solution va être égouttée, à l'aide d'une aiguille d'une seringue, dans la solution de gélification (TPP) à 10% sur un bain de glace et sous

Chapitre II : Préparation, caractérisation des nano/microparticules et microsphères de chitosane :

agitation modérée pendant 45 min .Dans un endroit sombre, les microsphères sont par la suite séchées à l'air libre .

b. Microsphères chargées du principe actif (doxycycline)

La Doxycycline est encapsulée dans des microsphères de chitosane (μ S-CS-Doxy) par la méthode d'équilibre de gonflement. Une solution aqueuse de doxycycline (5 mg/ml) est laissée au contact d'une masse définie de μ S-CS sous agitation modérée pendant 90 minutes, la solution surnageant a été décantée et les sphères résiduelles ont été rassemblées, les microsphères sont par la suite séchées à l'air libre jusqu'à un poids constant.

II.4 Caractérisation des nano/microparticules et microsphères à base du chitosane

II.4.1 Caractérisation des nanoparticules à base du chitosane

II.4.1.1 Aspect physique

Les nanoparticules du chitosane obtenues sont des petites particules blanches opaques, sans odeur caractéristique, suspendues en solution, isolées par centrifugation sous forme de gel. Dans le cas des NP-CS-Doxy est un aspect solide de couleur jaune. Les figures suivantes représentent les NP obtenues.

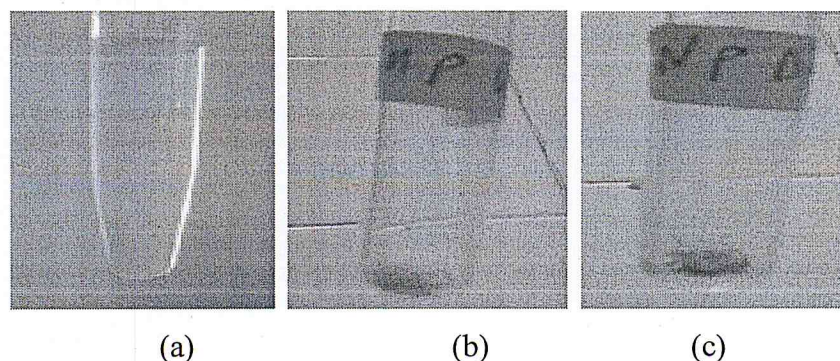


Figure. II.4 : (a) : NP-CS sous forme de gel, (b) : NP-CS sec, (c) : NP-CS-Doxy.

❖ Principe de formation des nanoparticules à base du chitosane

Le tripolyphosphate de sodium (TPP) est un polyanion et peut interagir avec le chitosane cationique par des forces électrostatiques [7]. Dans les solutions acides, $-NH_2$ de la molécule de chitosane est protoné pour former un ion NH_3^+ qui interagit avec le tripolyphosphate anionique par interaction ionique et transformé en gel [8].

La gélification ionotropique est une technique très simple, légère et utilisée couramment pour la préparation de billes de chitosane réticulées, des gels ou des pellicules [9,10].

Chapitre II : Préparation, caractérisation des nano/microparticules et microsphères du chitosane :

La formation des nano/microparticules à base du CS en milieu acide pourrait être schématisée comme indiquée dans la figure II.5.

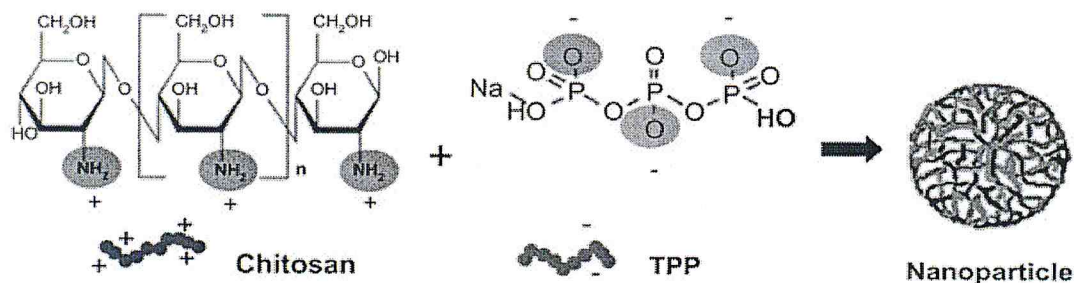


Figure II.5 : schéma du principe de formation des NP-CS [11].

La structure chimique responsable de la formation des nano/microparticules à base du chitosane en présence du TPP en milieu acide est donnée dans la figure ci-dessous.

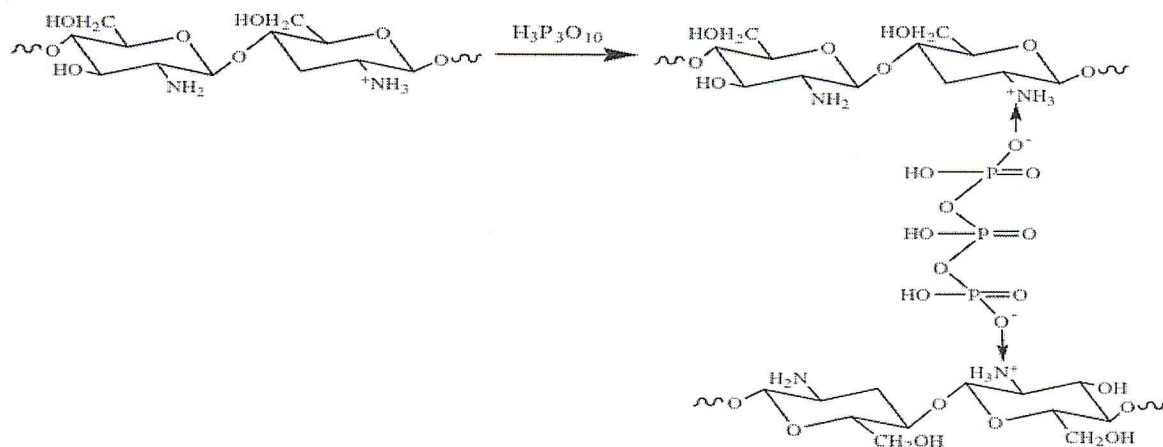


Figure II.6 : réticulation ionotropique du chitosane avec TPP [10].

II.4.1.2 Caractérisation spectroscopique par FTIR

❖ Nanoparticules du CS :

Le spectre FTIR du Nanoparticules du CS est représenté sur la figure II.6 :

Chapitre II : Préparation, caractérisation des nano/microparticules et microsphères du chitosane :

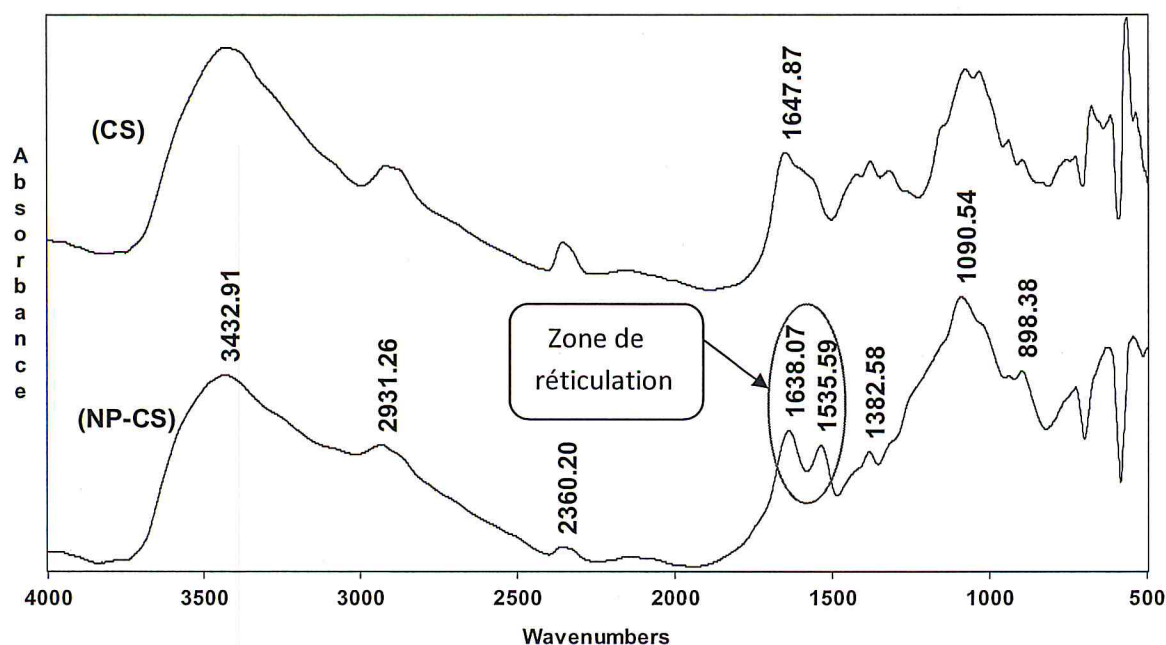


Figure III.7 : spectre FTIR du CS et des nanoparticules.

Un élargissement remarquable dans la bande caractéristique à $3432,91\text{ cm}^{-1}$ attribuée à l'élongation des liaisons NH_2 et $-\text{OH}$ qui pourra être justifiée par l'augmentation du nombre des liaisons d'hydrogène ($-\text{OH}$ du TPP).[12]

On observe un nouveau pic à $1535,6\text{ cm}^{-1}$ attribué au groupement d'ammonium – (NH_3^+) qui est dû à la protonation des groupement amines primaires du chitosane en milieu acide [13].

Le signal enregistré vers $1647,8\text{ cm}^{-1}$ attribué au groupement amide primaire dans le spectre du CS est déplacé à 1638 cm^{-1} dans le cas des NP-CS cela pourrait être dû à la réticulation entre la charge positive du – (NH_3^+) (CS) et la charge négative du –(PO^-) (TPP). Le signal enregistré vers $898,4\text{ cm}^{-1}$ attribué au groupement $\text{P}=\text{O}$ du TPP.[14]

Les résultats du spectre FTIR sont conformes avec la vue macroscopique du film du chitosane modifié par le TPP.

❖ Nanoparticules du CS-Doxy :

Le spectre FTIR du Nanoparticules du CS-Doxy est représenté sur la figure II.8 :

Chapitre II : Préparation, caractérisation des nano/microparticules et microsphères du chitosane :

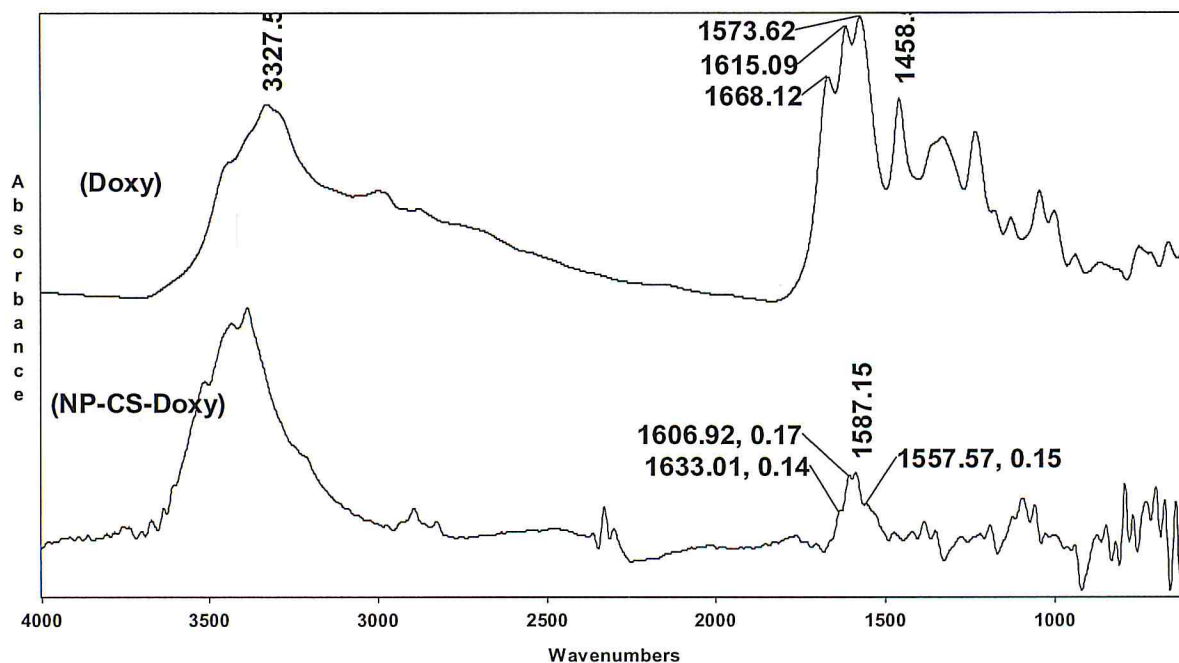


Figure III.8 : Spectre FTIR du Doxy et des nanoparticules du CS-Doxy.

Les pics caractéristiques vers 1458 cm^{-1} dans le spectre du Doxy pure sont attribués à la vibration de déformation du groupement $-\text{CH}_2$ (Amine aromatique $\text{N}(\text{CH}_3)_2$) selon la littérature [15, 16, 17].

Un neutre pic vers 1606 cm^{-1} attribué au groupement $\text{C}=\text{O}$ aromatique. De plus le pic vers 1587 cm^{-1} attribué à la vibration de déformation du groupement $-\text{NH}$ (Amide II).

Deux nouveaux pics observés dans le spectre des NP-CS-Doxy vers 1475 et vers 1606 cm^{-1} attribués aux groupements $-\text{CH}_2$ (Amine II) et $\text{C}=\text{O}$ aromatique respectivement. Ainsi, la bande caractéristique du groupement $-\text{OH}$ liée au $-\text{NH}$ vers 3439 cm^{-1} devenue plus large accompagné par un déplacement vers les grands nombre d'ondes, cela indique qu'il y a eu de nouveaux ponts d'hydrogène entre la Doxy et le support [18].

On observe dans le spectre des NP-CS-Doxy vers 2893 et 1059 cm^{-1} attribués aux $-\text{OH}$ et $-\text{C}-\text{O}$ respectivement et un autre pic vers 1557 cm^{-1} attribué au groupement d'ammonium $-(\text{NH}_3^+)$ qui est dû à la protonation des groupement amines primaires du chitosane en milieu acide.

Chapitre II : Préparation, caractérisation des nano/microparticules et microsphères du chitosane :

La présence des bandes caractéristiques de la Doxy et NP-CS dans le spectre NP-CS-Doxy indique qu'aucune interaction entre le polymère et la Doxy est envisageable, c'est-à-dire l'encapsulation a été réalisé avec succès.

II.4.1.3 Caractérisation morphologique MEB

Les analyse par microscopie électronique à balayage (MEB) ont été réalisés à l'aide d'un instrument de type JEOL JSM-6360L. Les échantillons à analyser ont subi une métallisation par une mince couche d'or (3 nm d'épaisseur). Les microphotographies obtenues sont données dont les figures ci-dessous.

L'information morphologique du film CS-NP a été étudiée par MEB. Comme il est indiqué sur les microphotographies obtenues, les NP-CS préparé par la méthode de gélation ionotropique ont une morphologie d'une rose de sable, la taille varie selon le nombre de feuilles environ 600 nm[19].

Le NP-CS-Doxy apparaît évidemment sous un aspect sphérique (des agrégats) et de taille environ 600 nm, ce qui est totalement différent de celui du CS. Ceci implique le changement morphologique des CS-NP après la réticulation avec le TPP.

Les particules ont une distribution granulométrique étroite avec une taille moyenne de 600 nm. Bien que les particules de forme sphérique soient perçues de manière significative dans l'image SEM, l'interaction inter-particulaire entre eux a été observée. Il peut être expliqué que le raccourcissement des chaînes de CS à forte densité les uns avec les autres en particules. La morphologie a également proposé que le segment attractant inter-particules entre les particules formées à la suite de la liaison hydrogène intra-moléculaire. Il est également connu que la scission de la chaîne de CS a lieu principalement au C-O-C des liaisons glycosidiques; Toutefois, les liaisons hydrogène construites à partir des groupes NHCOCH_3 , NH_2 , et OH sont encore restées [20]. Selon La littérature [21] la liaison hydrogène inter et intra-moléculaire a persisté même après scission de la chaîne principale.

L'Observation morphologique Comme le montre la figure II.9 (a), les nanoparticules de la Doxy encapsulées ont été fabriquées avec succès dans notre étude par la méthode de gélation ionotropique. Les deux nanoparticules ont partagé des caractéristiques similaires de forme sphérique et rose de sable et une surface lisse.

Chapitre II : Préparation, caractérisation des nano/microparticules et microsphères du chitosane :

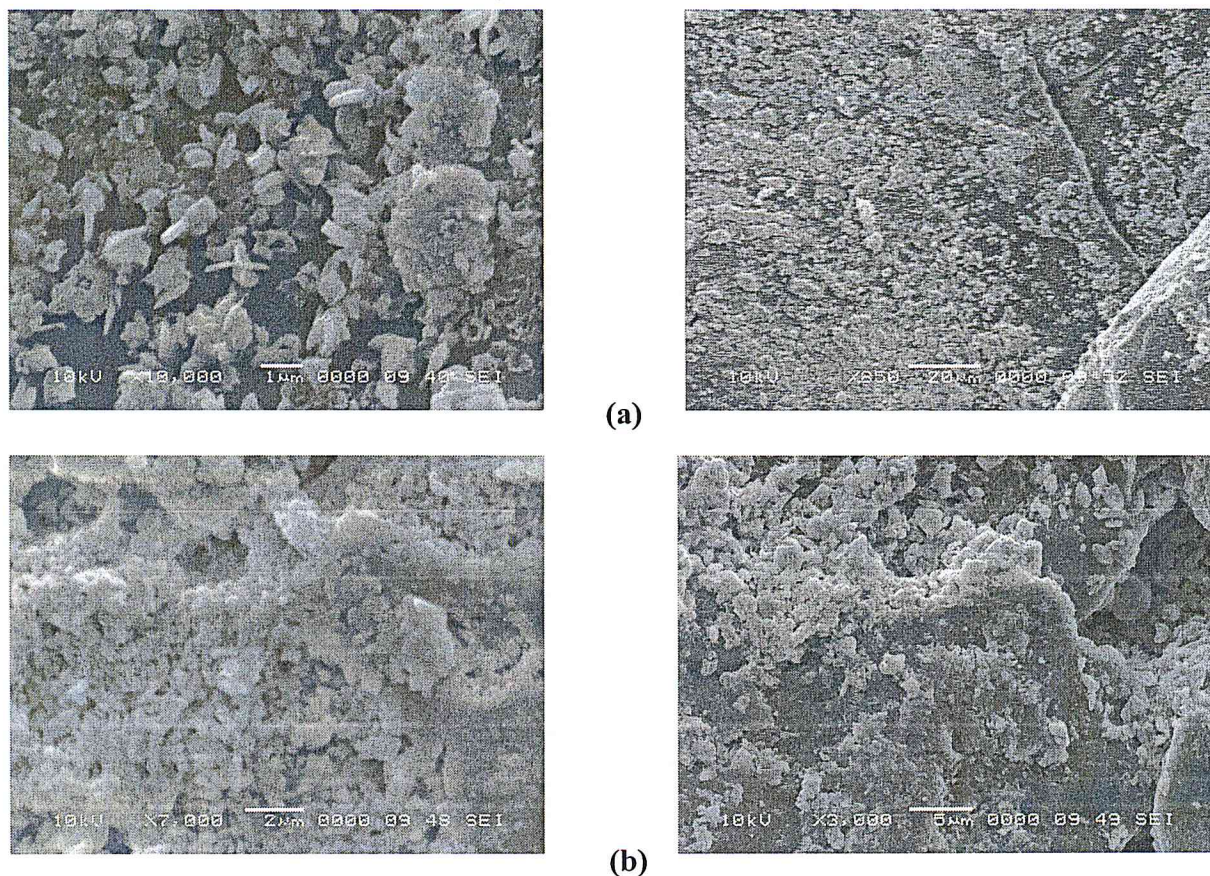


Figure II.9 : Microphotographies MEB des nanoparticules à base du chitosane : (a) NP-CS, (b) NP-CS-Doxy.

II.4.1.4 Caractérisation par diffraction des rayons X

Les niveaux de cristallinité des Nano/microparticules ont été mesurés par diffraction X (DRX) au sein laboratoire de recherches LCPMM au département de chimie, faculté des sciences, université de blida en utilisant un diffractomètre à rayon X de type (BRUKER, PHSER D2) dans l'intervalle d'angle $20 \leq 2\theta \leq 50$.

La Figure II.10 représente les diffractogrammes du Chitosane et les NP-CS préparés par la gélification ionotropique. Les pics caractéristique de Chitosane pur à $2\theta = 10^\circ$, 20° attribués à la structure cristalline de du Chitosane. L'intensité de diffraction de pic ($2\theta = 20^\circ$) indique que l'échantillon est semi-cristallin. De plus, l'intensité de pic ($2\theta = 20^\circ$) des NP-CS diminue et par rapport à celle du Chitosane ce qui indique que la cristallinité diminue. Les NP-CS sont presque amorphe [22].

Chapitre II : Préparation, caractérisation des nano/microparticules et microsphères du chitosane :

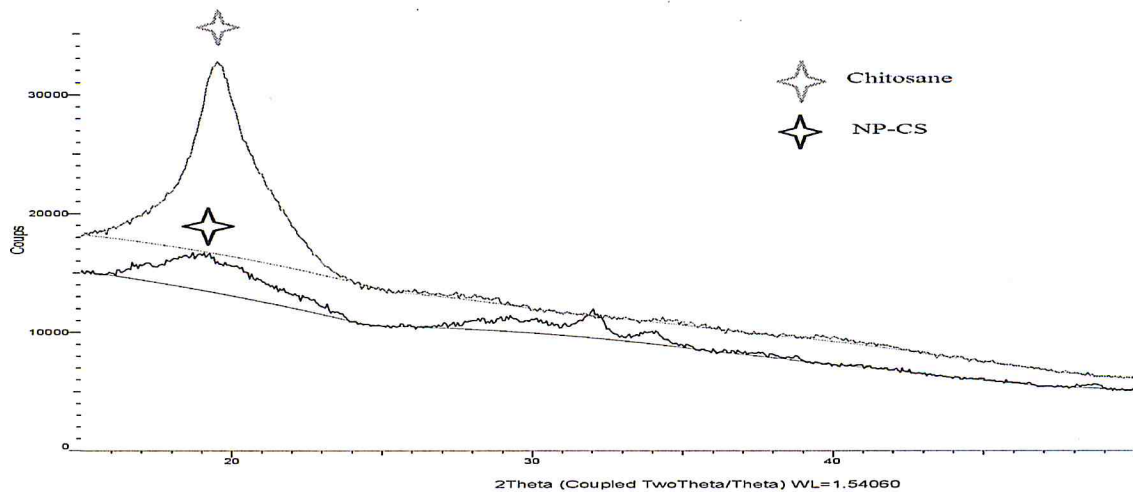


Figure II.10 : Diffractogramme RX des NP-CS et du Chitosane.

Les analyses DRX ont été effectuées à la fois sur des microparticules de chitosane vide et chargé, afin d'évaluer l'influence du processus d'action de la Doxy sur le chitosane. Comme le montre la Figure II.11, le chitosane commercial présente une structure semi-cristalline. En particulier, le chitosane a présenté de pic de diffraction remarquablement nette avec une intensité élevée. Cependant, après l'encapsulation de la Doxy, les nanoparticules du chitosane étaient presque amorphe, Ce résultat est cohérent avec la littérature [23]. Le diffractogramme de différentes formulations ne présentent pas les mêmes pics que Doxy, ce qui indique que Doxy a subi une transition à partir d'un cristallin à un état amorphe, l'intensité de diffraction des rayons X était dépendante de la taille des particules et leur distribution [24].

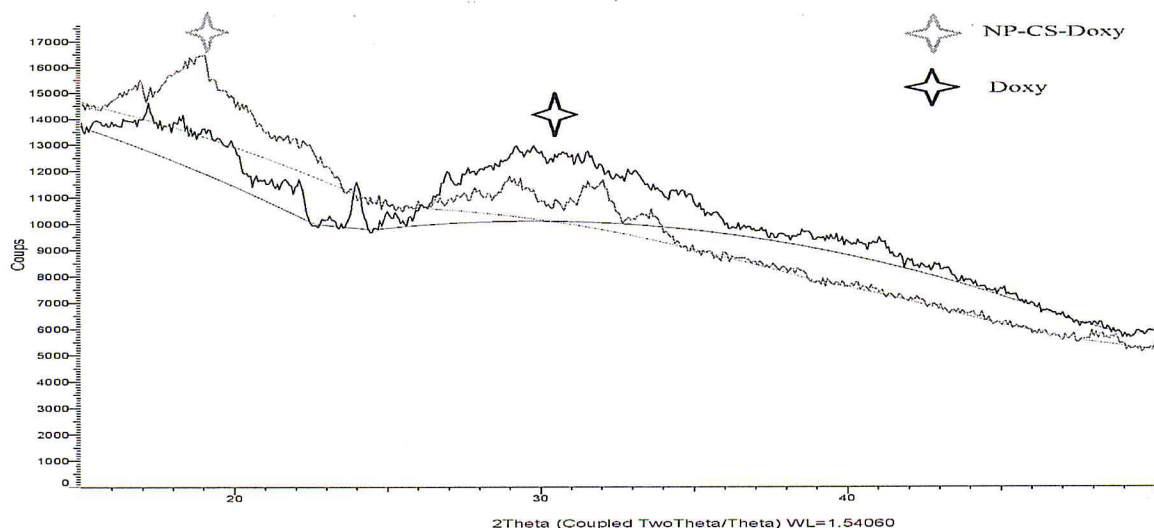


Figure II.11 : Diffractogramme RX des NP-CS-Doxy.

Chapitre II : Préparation, caractérisation des nano/microparticules et microsphères du chitosane :

II.4.2 Caractérisation des microparticules à base du chitosane

II.4.2.1 Aspect physique

Les nanoparticules du chitosane obtenues sont des petites particules blanches opaques, sans odeur caractéristique, suspendues en solution, isolées par centrifugation sous forme de gel.



Figure II.11 : Les microparticules du chitosane sous forme de gel.

II.4.2.2 Caractérisation spectroscopique par FTIR

❖ Microparticules du CS

Le spectre FTIR du Microparticules du CS est représenté sur la figure II.13 :

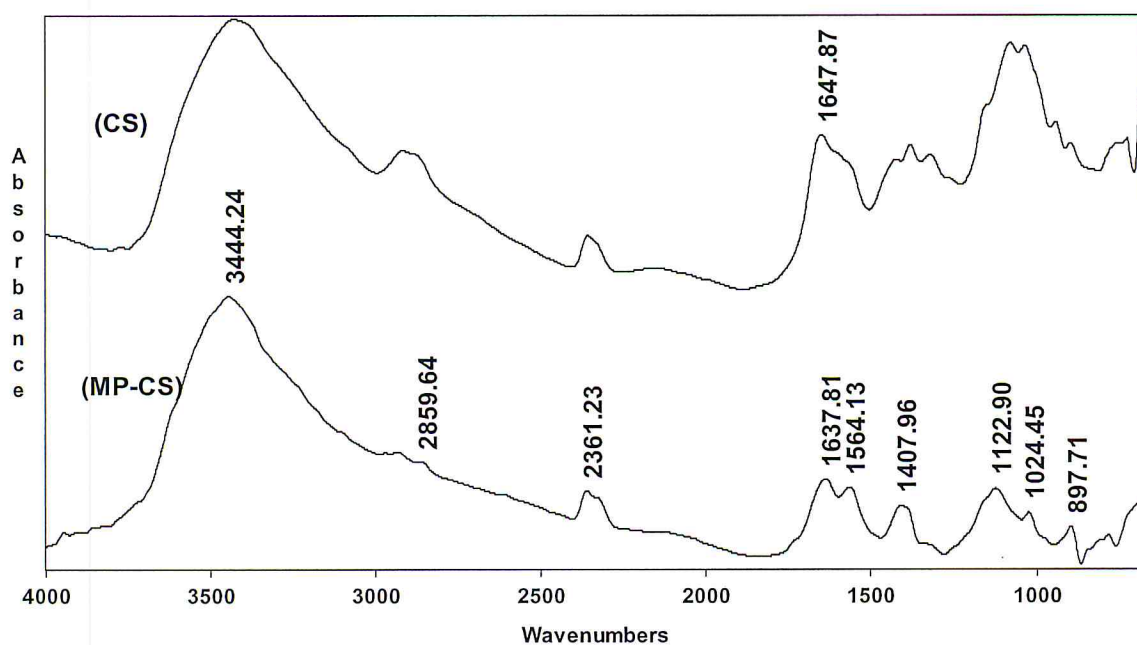


Figure II.12 : Spectre FTIR du CS et des microparticules.

Chapitre II : Préparation, caractérisation des nano/microparticules et microsphères du chitosane :

Un élargissement remarquable dans la bande caractéristique à $3444,2\text{ cm}^{-1}$ attribuée à l'élongation des liaisons NH_2 et $-\text{OH}$ qui pourra être justifiée par l'augmentation du nombre des bandes d'hydrogène ($-\text{OH}$ du TPP).

On observe un nouveau pic à $1564,1\text{ cm}^{-1}$ attribué au groupement d'ammonium $-(\text{NH}_3^+)$ qui est dû à la protonation des groupement amines primaires du chitosane en milieu acide .

Le signal enregistré vers $1647,8\text{ cm}^{-1}$ attribué au groupement amide primaire dans le spectre du CS est déplacé à $1637,8\text{ cm}^{-1}$ dans le cas des $\mu\text{P-CS}$ cela pourrait être dû à la réticulation entre la charge positive du $-(\text{NH}_3^+)$ (CS) et la charge négative du $-(\text{PO}^-)$ (TPP). Le signal enregistré vers $897,7\text{ cm}^{-1}$ attribué au groupement $\text{P}=\text{O}$ du TPP [25].

Les résultats du spectre FTIR sont conformes avec la vue macroscopique du film du chitosane modifié par le TPP.

On observe que les pics de caractérisation du $\mu\text{P-CS}$ et NP-CS , sont presque identiques.

❖ Microparticules du CS-Doxy :

Le spectre FTIR du Microparticules du CS-Doxy est représenté sur la figure II.13 :

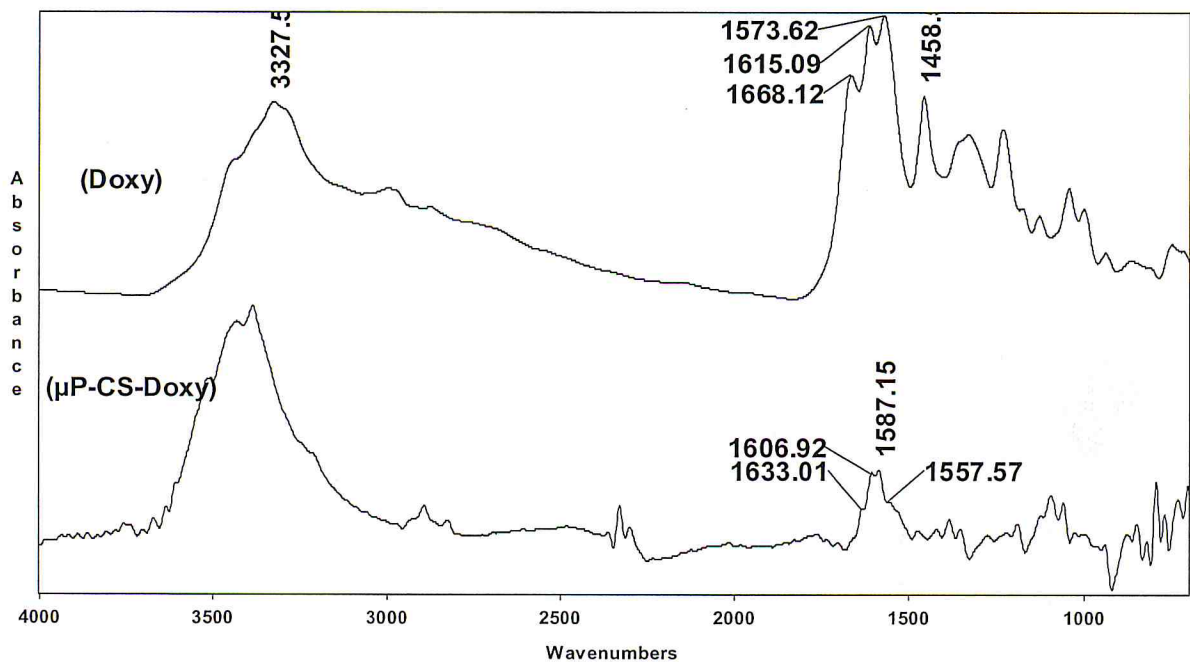


Figure II.13 : Spectre FTIR de la Doxy et des microparticules du CS-Doxy.

Chapitre II : Préparation, caractérisation des nano/microparticules et microsphères du chitosane :

Les pics caractéristiques vers 1458 cm^{-1} dans le spectre du Doxy pure sont attribués à la vibration de déformation du groupement $-\text{CH}_2$ (Amine aromatique $\text{N}(\text{CH}_3)_2$) selon la littérature [15, 16,17].

Un neutre pic vers 1618.3 cm^{-1} attribué au groupement $\text{C}=\text{O}$ aromatique. De plus le pic vers 1532.55 cm^{-1} attribué à la vibration de déformation du groupement $-\text{NH}$ (Amide II).

Deux nouveaux pics observés dans le spectre des $\mu\text{P-CS-Doxy}$ vers 1454.06 et vers 1618.3 cm^{-1} attribués aux groupements $-\text{CH}_2$ (Amine II) et $\text{C}=\text{O}$ aromatique respectivement. Ainsi, une bande caractéristique du groupement $-\text{OH}$ liée au $-\text{NH}$ vers 3469 cm^{-1} devenue plus large accompagné par un déplacement vers les grands nombre d'ondes, cela indique qu'il y a eu de nouveaux ponts d'hydrogène entre la Doxy et le support.

On observe dans le spectre des $\mu\text{P-CS-Doxy}$ vers 2854 et 1066 cm^{-1} attribués aux $-\text{OH}$ et $-\text{C}-\text{O}$ respectivement et un autre pic vers 1532.5 cm^{-1} attribué au groupement d'ammonium (NH_3^+) qui est dû à la protonation des groupement amines primaires du chitosane en milieu acide.

La présence des bandes caractéristiques de la Doxy et $\mu\text{P-CS}$ dans le spectre $\mu\text{P-CS-Doxy}$ indique qu'aucune interaction entre le polymère et la Doxy c'est-à-dire l'encapsulation a été réalisée avec succès.

II.4.2.3 Caractérisation morphologique MEB

Les micrographies obtenues montrent que les microparticules du chitosane ont une surface rugueuse et poreuse. Un agrandissement plus grand sur la surface des $\mu\text{P-CS/Doxy}$ a permis d'observer des petites sphères de tailles différentes entre 2 et $5\text{ }\mu\text{m}$. Les microparticules sont sous forme des microsphères.

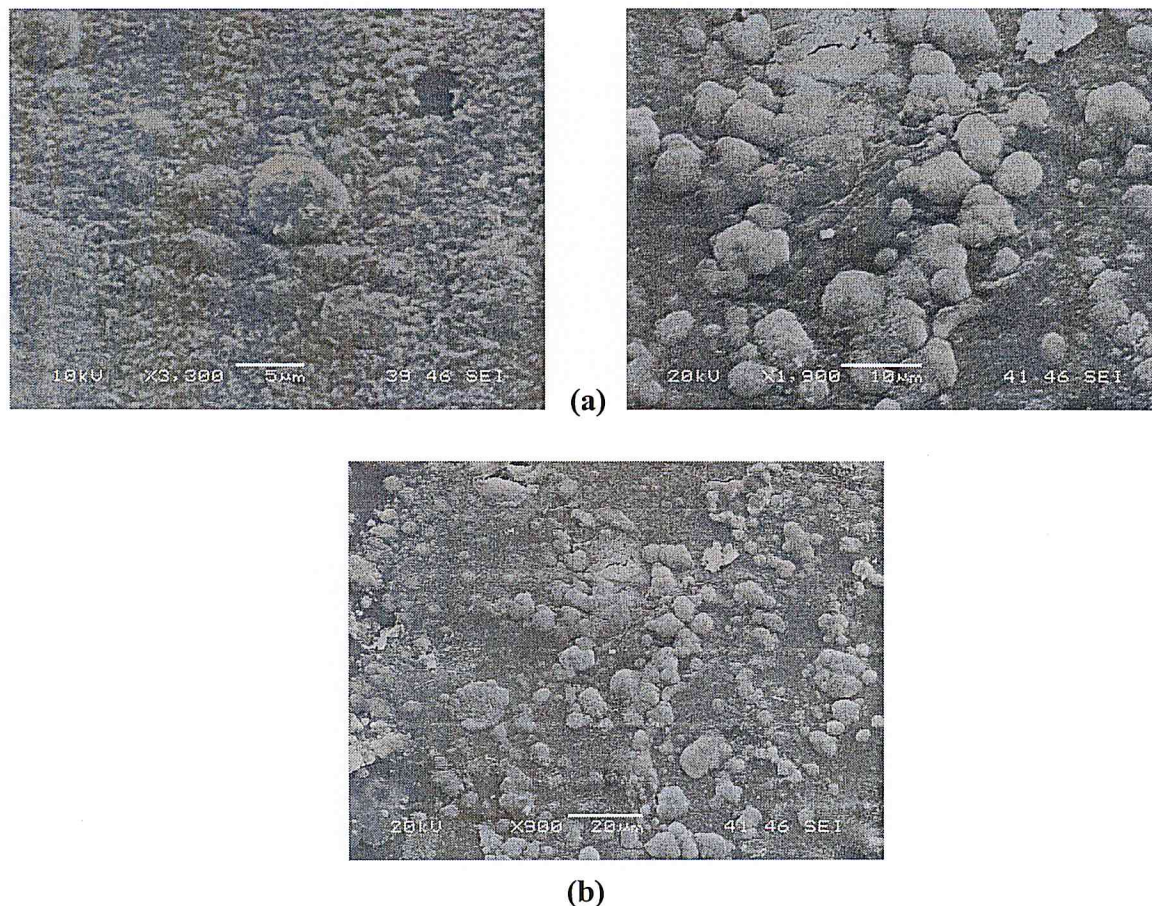


Figure II.15 : Microphotographies des μ P-CS (a), μ P-CS-Doxy (b).

II.4.2.4 Caractérisation par diffraction des rayons X

D'après le diffractogramme ci-dessus (Figure II.16) il apparaît que le chitosane commercial présente une structure semi-cristalline. En particulier, le chitosane a présenté un pic de diffraction remarquablement nette avec une intensité élevée.

Il y a un changement remarquable dans le diffractogramme de chitosane après la réticulation avec TPP. Dans le cas de chitosane on observe un pic intense de réflexion d'environ $2\theta = 20^\circ$ dans le rang de $2\theta = 10$ à 25° . Ce pic est aussi observé dans le diffractogramme des μ P-CS, mais il est plus large et moins intense, en plus il est déplacé vers l'angle $2\theta = 19^\circ$ ce qui signifie que les particules de CS ont un aspect amorphe. Ces observations sont en accord avec ceux publiés dans la littérature [26].

Chapitre II : Préparation, caractérisation des nano/microparticules et microsphères du chitosane :

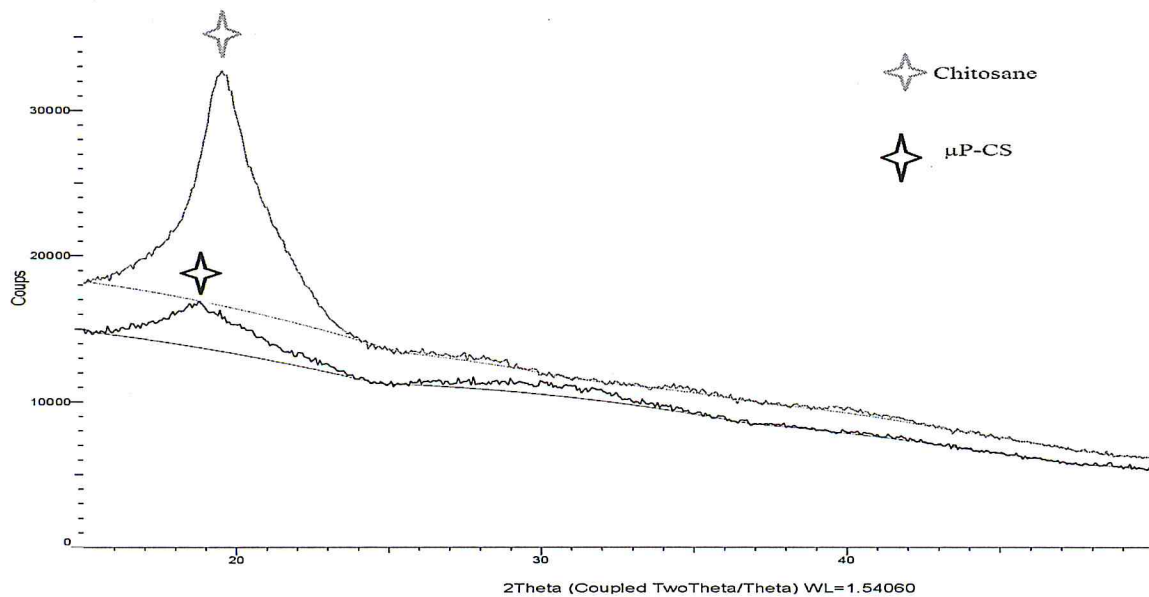


Figure II.16 : Diffractogramme RX du chitosane et μP-CS.

D'après le diffractogramme ci-dessus (Figure II.1) il apparaît que le chitosane a présenté de pic de diffraction remarquablement nette avec une intensité élevée. Cependant, après l'encapsulation de la Doxy, les nanoparticules du chitosane étaient presque amorphes. Le pic moins instance de la diffraction RX à $2\theta = 32^\circ$, est attribué à la structure cristalline de la Doxycycline. Ce qui indique que Doxy a subi une transition à partir d'un cristallin à un état amorphe.

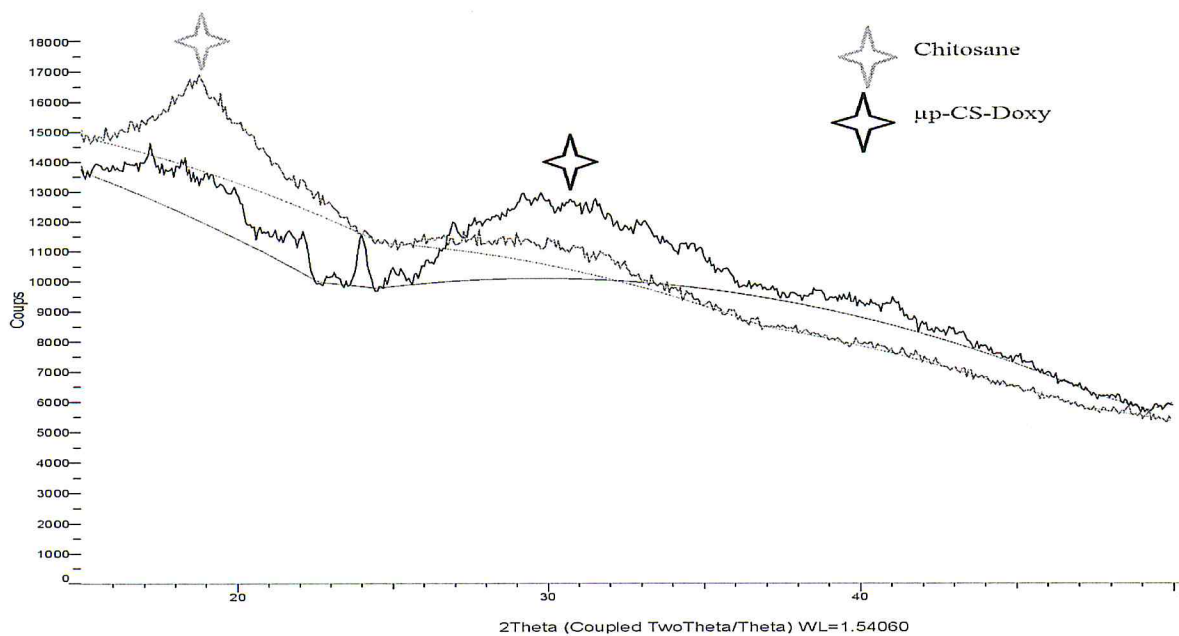


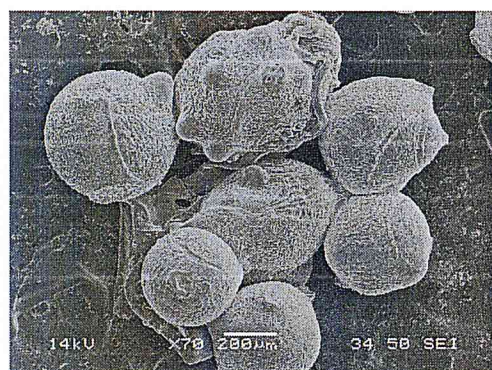
Figure II.17 : Diffractogramme RX des μP-CS-Doxy.

II.4.3 Caractérisation des microsphères à base du chitosane :

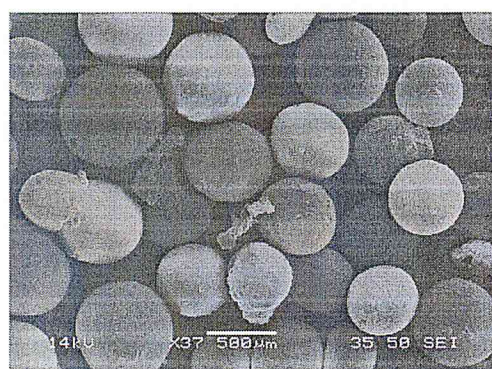
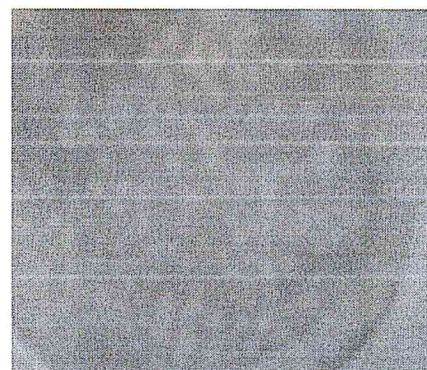
Les microsphères de chitosane préparées en utilisant des agents de réticulation covalentes comme le glutaraldéhyde et le formaldéhyde ont été signalées comme étant toxiques lors de la dégradation. Ainsi, d'autres méthodes de préparation de microsphères comme la gélification ionique utilisant Na_2SO_4 ou Le tripolyphosphate sont effectuées selon la littérature [27].

II.4.3.1 Aspect physique

L'examen effectué à l'œil nu montre que les microparticules de CS obtenues sont sphériques et de couleur marron dans le cas des $\mu\text{S-CS-Doxy}$ est en apparence avec un diamètre moyen de 200 μm à 400 μm . Les figures suivantes représentent les microsphères obtenues :



(a)



(b)

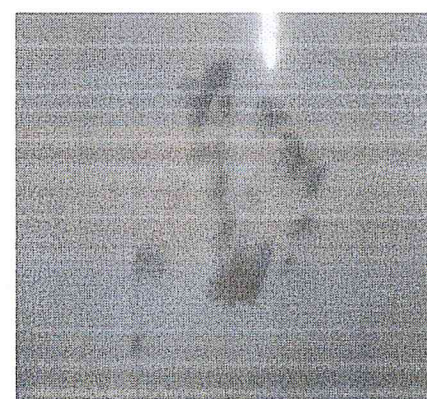


Figure II.16 : Vue macroscopique des microsphères de CS (a), microsphères CS-Doxy (b).

II.4.3.2 Caractérisation spectroscopique par FTIR

❖ Microsphères du CS :

Le spectre FTIR du Microsphères du CS est représenté sur la figure III.17 :

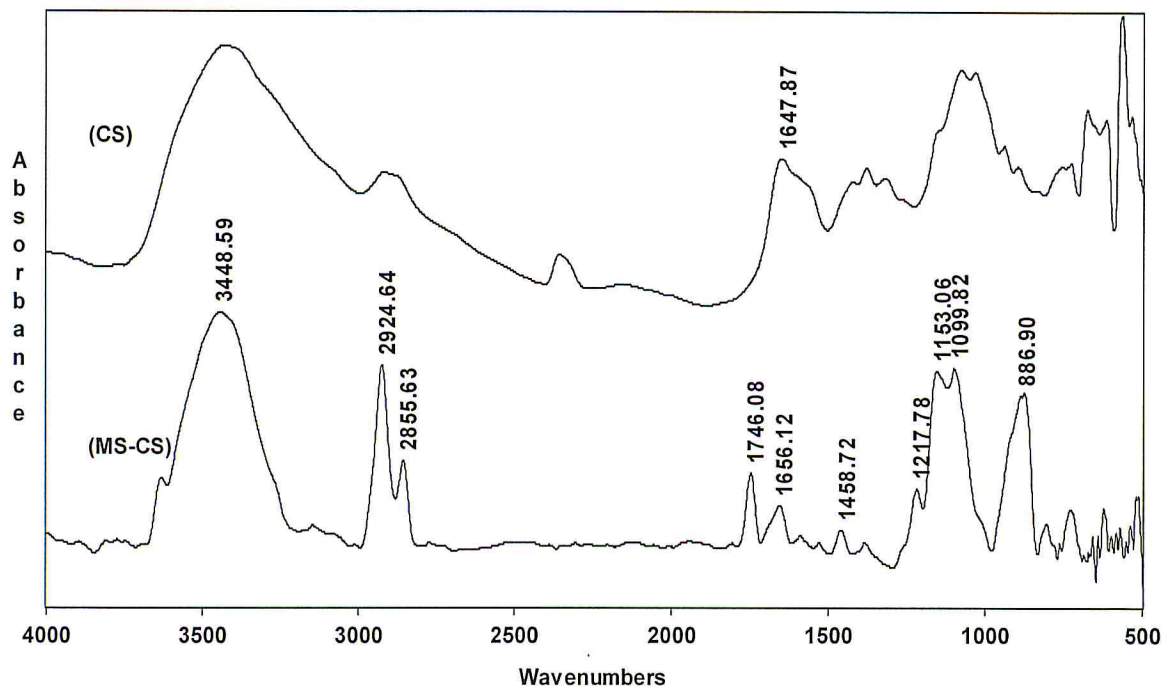


Figure II.17 : Spectre FTIR du CS et des microsphères.

Dans la région 3448 cm^{-1} on observe une bande large de forte intensité, due à la vibration d'élongation -NH et -OH , ainsi que des liaisons hydrogènes (inter et intramoléculaire) des molécules de chitosane [28].

La bande de moyenne intensité à environ 2924 et 2855 cm^{-1} est attribuée aux vibrations d'élongation de la liaison -CH aliphatique.

Les pics caractéristiques à 1656 et 1746 cm^{-1} sont attribués aux groupements amide I et amine (-NH_2), respectivement. Ainsi une bande environ 1099 cm^{-1} est attribué aux vibrations d'élongation symétrique de la liaison C-O-C et les vibrations du squelette C-O étirage [29], qui est caractéristique de la structure de saccharine.

Chapitre II : Préparation, caractérisation des nano/microparticules et microsphères du chitosane :

Le signal enregistré vers 1647 cm^{-1} attribué au groupement amide primaire dans le spectre du CS est déplacé à 1638 cm^{-1} dans le cas des $\mu\text{S-CS}$ cela pourrait être dû à la réticulation entre la charge positive du $-(\text{NH}_3^+)$ (CS) et la charge négative du $-(\text{PO}^-)$ (TPP) . Le signal enregistré vers 886 cm^{-1} attribué au groupement $\text{P}=\text{O}$ du TPP.

❖ Microsphères du CS-Doxy :

Le spectre FTIR du Microsphères du CS-Doxy est représenté sur la figure II.18 :

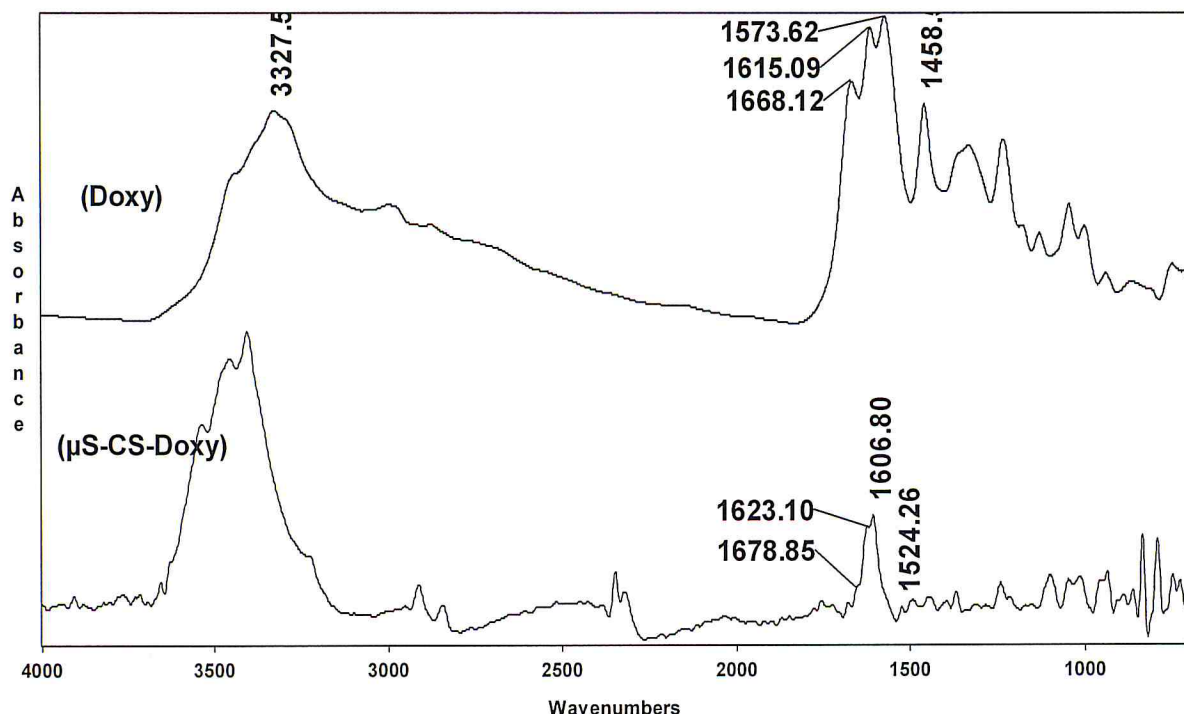


Figure II.18 : Spectre FTIR de la Doxy et des microsphères du CS-Doxy.

Les pics caractéristiques vers 1458 cm^{-1} dans le spectre du Doxy pure sont attribués à la vibration de déformation du groupement $-\text{CH}_2$ (Amine aromatique $\text{N}(\text{CH}_3)_2$) selon la littérature [15, 16,17].

On observe un pic vers 1606.80 cm^{-1} attribué au groupement $\text{C}=\text{O}$ aromatique. De plus le pic vers 152.26 cm^{-1} attribué à la vibration de déformation du groupement $-\text{NH}$ (Amide II).

Deux nouveaux pics observés dans le spectre des $\mu\text{S-CS-Doxy}$ vers 1445.7 et vers 1606.8 cm^{-1} attribués aux groupements $-\text{CH}_2$ (Amine II) et $\text{C}=\text{O}$ aromatique respectivement. Ainsi, une bande caractéristique du groupement $-\text{OH}$ liée au $-\text{NH}$ vers 3454 cm^{-1} devenue

plus large accompagné par un déplacement vers les grands nombre d'ondes, cela indique qu'il y a eu de nouveaux ponts d'hydrogène entre la Doxy et le support.

On observe dans le spectre des $\mu\text{S-CS-Doxy}$ vers 2843 et 1046 cm^{-1} attribués aux $-\text{OH}$ et $-\text{C-O}$ respectivement et un autre pic vers 1524.26 cm^{-1} attribué au groupement d'ammonium (NH_3^+) qui est dû à la protonation des groupement amines primaires du chitosane en milieu acide.

La présence des bandes caractéristiques de la Doxy et $\mu\text{S-CS}$ dans le spectre $\mu\text{S-CS-Doxy}$ indique qu'aucune interaction entre le polymère et la Doxycycline indique que l'encapsulation a été réalisée avec succès.

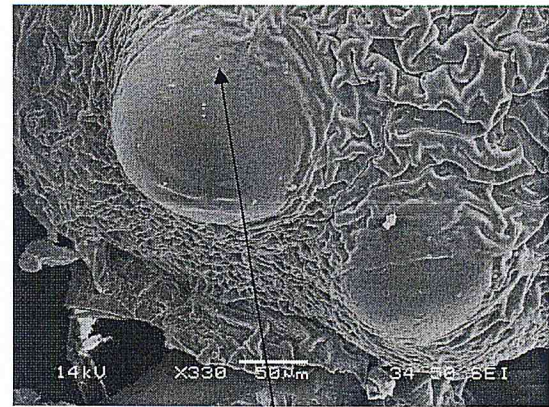
II.4.3.3 Caractérisation morphologique MEB

Les microsphères de chitosane ont présenté les caractéristiques typiques d'une matrice réticulée ioniquement. La Figure II.19 montre les images de microscopie MEB, des sphères de taille(s) uniforme(s) [30]. Les images MEB (Figure II.19 (a) et (c)) confirment l'uniformité et montrent également la nature poreuse des microsphères en raison du réseau d'interconnexion de chitosane. De plus, la surface des microbilles (figure II.6) possède des microcapsules de taille d'environ $50\text{ }\mu\text{m}$, la membrane de microbille contient des pores de taille d'environ $2\text{ }\mu\text{m}$.

La coupe transversale des microbilles (figure II.6 (b)) montre que la microbille contient des microsphères de taille d'environ $4\text{ }\mu\text{m}$ et des ports de taille d'environ $2\text{ }\mu\text{m}$.

L'image au microscope de $\mu\text{S-CS-Doxy}$ (Figure II.19 (d)) indique que les sphères ne perdent pas leur morphologie après piégeage. Les Images MEB confirment en outre que la nature poreuse est conservée après l'encapsulation du médicament.

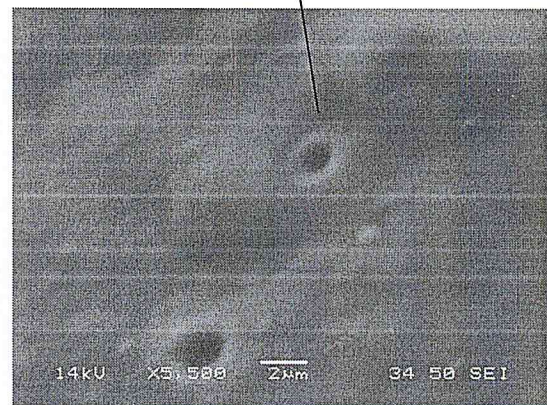
Chapitre II : Préparation, caractérisation des nano/microparticules et microsphères du chitosane :



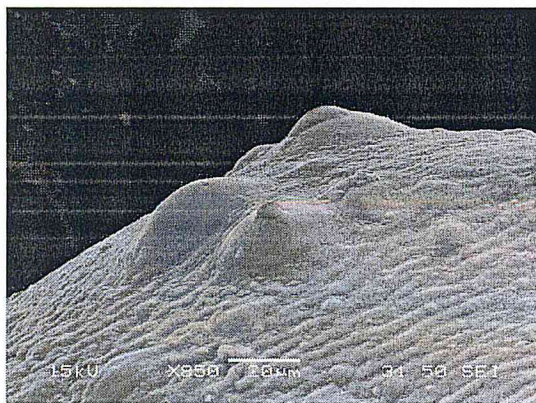
(a)



(b)



(c)



(d)

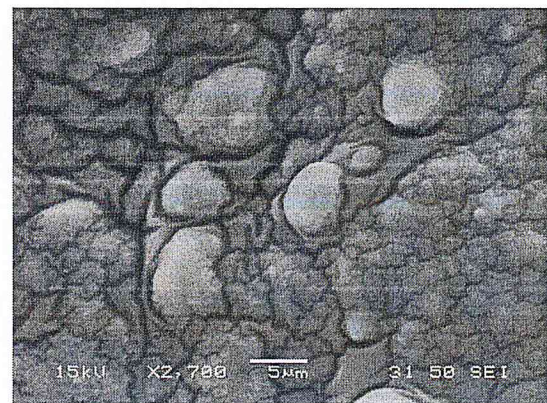


Figure II.19 : Microphotographies des μ S-CS (a), une coupe transversale de la microbille (b), la taille des ports (c), μ S-CS-Doxy.

II.4.4 Etude de gonflement

Les essais de gonflement des films sont faits selon la procédure suivante. Une quantité connue des échantillons (MP-CS et MP-CS-Doxy) est immergée dans (20 ml) de différentes solutions tampon à PH (acide, neutre et basique) et à 25°C. La masse de la microbille gonflée est pris dans des intervalles de temps définis après avoir éliminé l'excès de la solution de sa surface. A chaque fois on remet la microbille gonflée et séché dans la solution et on refait ca jusqu'à que le taux de gonflement soit stable. Le gonflement des échantillons est calculé en utilisant la formule suivante [31]:

$$SW \text{ (g/g)} = \frac{(W_f - W_0)}{W_0}$$

W_f : La masse de la microbille gonflée.

W_0 : La masse de la microbille non gonflée (sec).

❖ En milieu acide (PH =2)

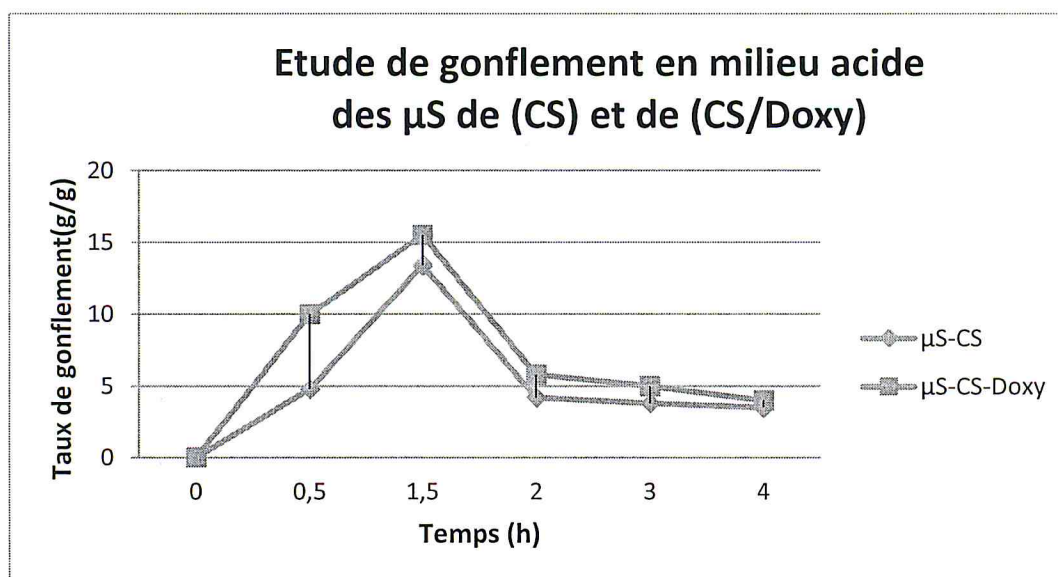
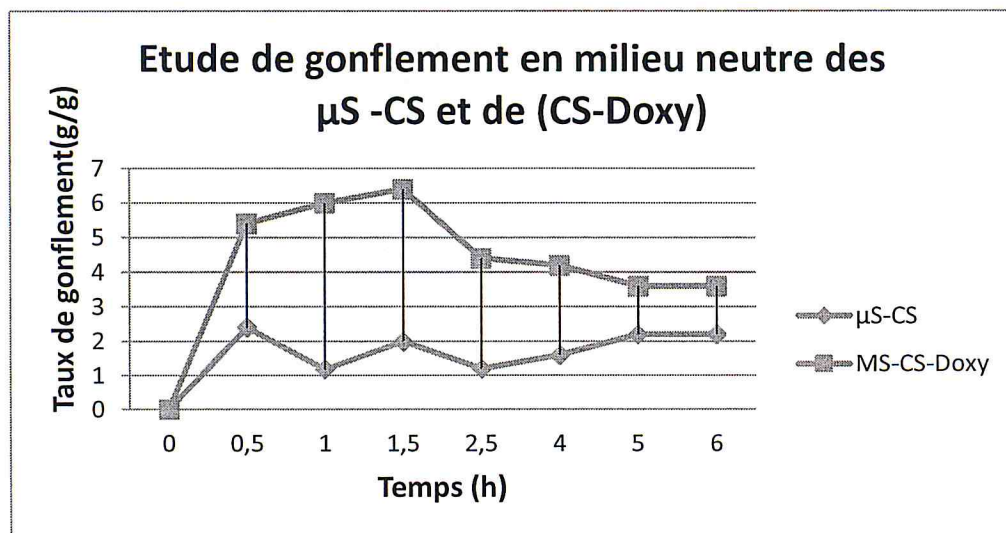


Figure II.21 : Etude de gonflement en milieu acide des μS-CS et de μS-CS-Doxy



❖ En milieu neutre (PH = 7)

Figure II.22 : Etude de gonflement en milieu neutre des μ S-CS et μ S-CS-Doxy

❖ En milieu basique (PH = 8)

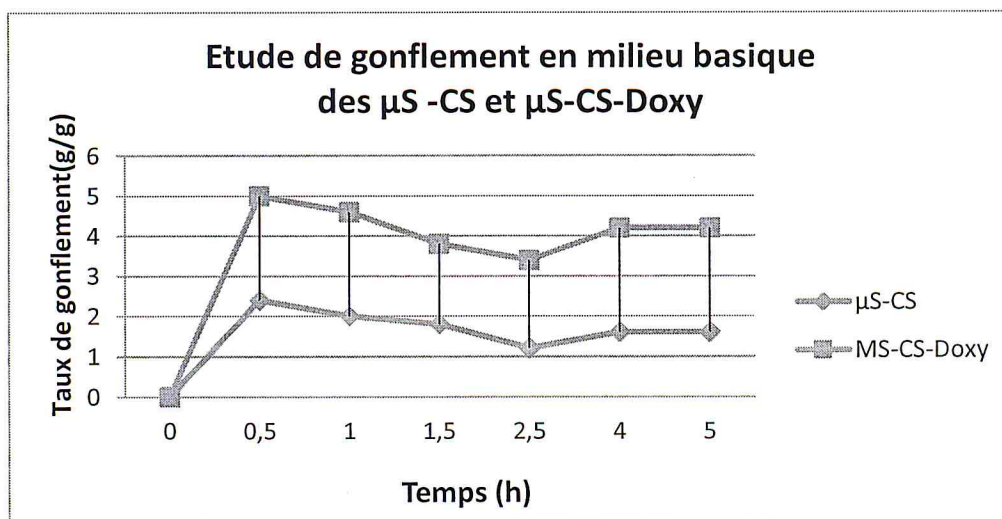


Figure II.23 : Etude de gonflement en milieu basique des μ S-CS et μ S-CS-Doxy

Chapitre II : Préparation, caractérisation des nano/microparticules et microsphères du chitosane :

D'après les résultats obtenus, on remarque deux phases distinctes sur le graphique. La première phase correspond à une absorption d'eau relativement rapide qui conduit à un taux de gonflement maximum dans la première heure. Ce constat nous permet de dire que le chitosane différemment modifié possède un caractère hydrophile. Pendant une deuxième phase, ce taux de gonflement reste constant, le matériau a atteint sa saturation.

On remarque que les microparticules du chitosane et Doxy présentent un taux de gonflement élevé dans un media acide par rapport à celle du CS réticulées par TPP, ce qui signifie que les chaînes du CS-Doxy/TPP sont moins rigides dans un milieu acide grâce à sa grande solubilité en milieu acide que celles du CS réticulées par TPP.

Les microsphères du chitosane se gonflent dans le milieu acide avec un grand taux de gonflement par rapport que dans les autres cas car les forces intermoléculaires sont plus faibles que les forces intramoléculaires ce qui facilite la diffusion de l'eau plus facilement et ce qui provoque, un relâchement au niveau du réseau polymérique permettant ainsi la libération du principe actif par diffusion. Ce mécanisme de libération peut fonctionner dans la majorité des parties du corps où l'eau est un constituant majeur. C'est-à-dire les résultats obtenus nous renseignent sur la capacité d'absorption de l'eau par le réseau polymérique.

Cette propriété est d'une importance primordiale car elle joue un rôle important dans la biodégradation du polymère et, par conséquent, la libération des PA quand celui-ci est utilisé comme support véhiculant cet agent. On pourra conclure des résultats obtenus que le PA soit libéré facilement dans un milieu acide lorsqu'il est encapsulé dans des μ S-CS/TPP.

Après gonflement, les μ S-CS et μ S-CS-Doxy acquièrent une certaine élasticité. Elles peuvent subir des pressions raisonnables des tissus avoisinants sans être déformées tout en continuant à accomplir leurs rôles. De la même manière, cette élasticité permet de diminuer le risque de traumatiser les tissus avoisinant par irritation.

III. Etude de la libération contrôlée in vitro de la doxycycline encapsulé dans les nano/microparticules du chitosane dans le SGF

Le but de ce test est d'étudier la cinétique de libération de la Doxycycline dans des conditions biomimétiques (simulant les conditions physiologiques gastriques, SGF)

Les nano/microparticules formées du chitosane et la Doxycycline ont été placées dans un récipient, auquel 20 ml de la solution SGF est ajouté. Le récipient fermé est mis dans un incubateur à 37 °C. Les prélèvements sont effectués chaque 2 h puis chaque 24 h.

Les concentrations de la Doxycycline libéré sont mesurées par une méthode colorimétrique en utilisant la spectrophotométrie UV-visible. Ces tests ont été réalisés au sein du laboratoire de recherches LCPMM au département de chimie, faculté des sciences, université de blida en utilisant un spectrophotomètre (SHIMADZU 1700). Le dosage est effectué à une longueur d'onde de 267 nm d'après une courbe d'étalonnage préalablement établie, comme il est montré ci-dessous.

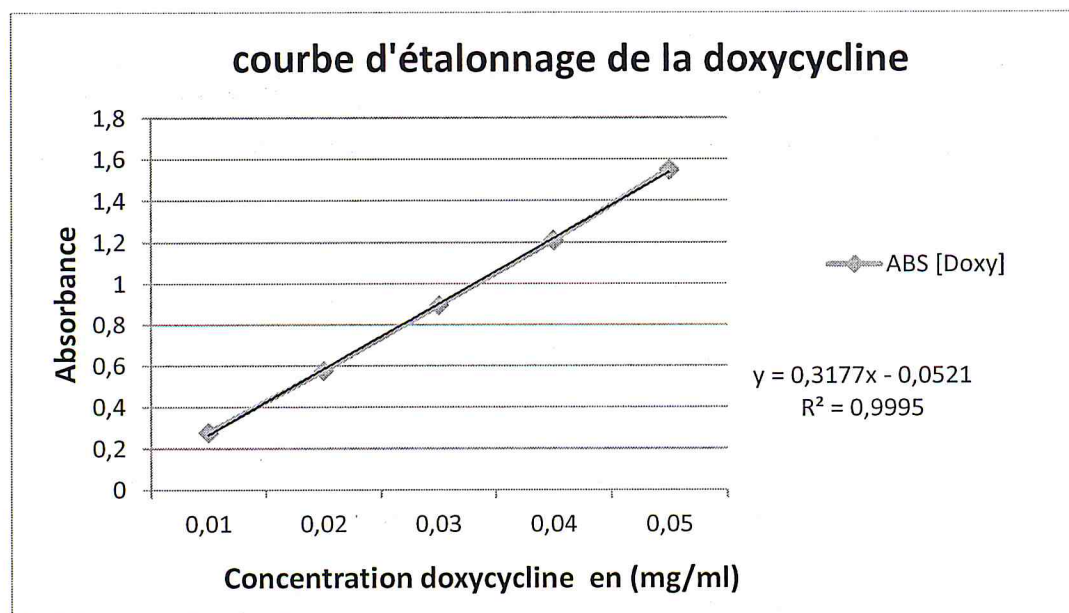


Figure III.1 : La courbe d'étalonnage de doxycycline à 267 nm.

Le principe actif est dispersé au sein de la matrice polymérique sans être capable d'en sortir. Avec l'entrée du solvant, le polymère solide à l'état vitreux, se gonfle, le polymère passe à l'état caoutchouteux, le PA est alors capable de diffuser vers l'extérieur.

La figure ci-dessous représente la cinétique de libération in vitro du DOXY en fonction du temps à partir des nano/microparticules de CS/DOXY.

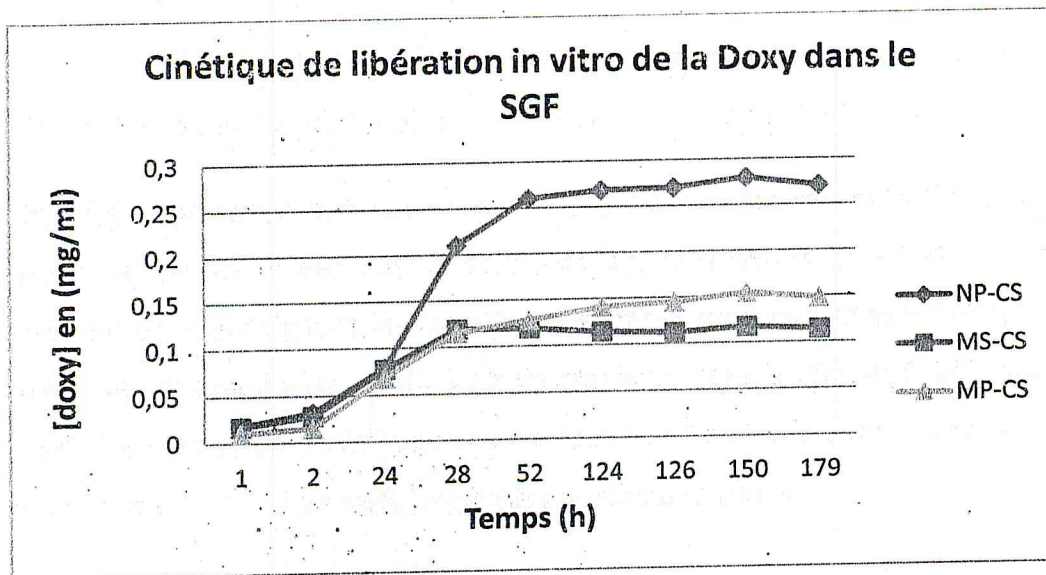


Figure III.2 : Cinétique de libération de la Doxy dans le SGF à partir des nano/microparticules et microsphères du chitosane réticulées par TPP.

D'après les résultats obtenus on peut conclure que les concentrations de la Doxy libérées par les nanoparticules sont importantes par rapport ou les μS et μP dans les premières heures en atteignant la libération maximale avec une concentration de 0,26 mg/ml pour les nanoparticules après 50 h de stockage dans le SGF, et 0,115 mg/ml pour MS-CS après 28 h, et 0,154 mg/ml pour MP-CS après 150 h. Puis on remarque qu'il y a une stabilité de la libération qui persiste jusqu'à la deuxième semaine.

On remarque que les trois vecteurs possèdent la même cinétique de libération pendant le premier jour, mais après 24 h la cinétique de libération du NP-CS elle est très importante que les MS-CS et MP-CS.

La première partie représente la libération du PA qui existe à la surface des Nano/microparticules, d'où la libération rapide et en quantité importante, par contre la deuxième partie représente la libération du PA qui est encapsulé dans les nano/microsphères, sa libération est lente et en quantité relativement faible, cela revient au trajet à parcourir à travers la matrice polymérique.

Références bibliographiques

- [1] Azad, A. K., Sermisintham, N., Chandkrachang, S., & Stevens, W. F. Chitosan membrane as a wound-healing dressing: Characterization and clinical application. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 69 (2004) 216–222.
- [2] Koo, O.M, I.Rubinstein, and H.Onyuksel, Role of nanotechnology in targeted drug delivery and imaging a concise review .*Nanomedicine : Nanotechnology ,Biology and Medicine*, 1(3) (2005) 193-212.
- [3] S.Mekahlia. Le complexe chitosane-cuivre (II) : Synthèse, caractérisation et étude de l'effet de sa structure sur son activité antibactérienne.Mémoire de magister, université saad Dahleb blida (2007).
- [4] A.L. de Pinho Neves et al. Factorial design as tool in chitosan nanoparticles development by Ionic gelation technique *Colloids and Surfaces A: Physicochem.Eng.Aspects* 445 (2014) 34– 39.
- [5] A. Rodríguez-Contreras et al. Methods for the preparation of doxycycline-loaded phb micro- and nano-spheres *European Polymer Journal* 49 (2013) 3501–3511
- [6] M. Dash et al. Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical Applications. *Progress in Polymer Science* 36 (2011) 981–1014.
- [7] Y. Kawashima, T. Handa, H. Takenaka, S.Y. Lin, Y. Ando, Novel method for the preparation of controlled release theophylline granules coated with a polyelectrolyte complex of sodium polyphosphate chitosan, *J. Pharm. Sci.* 74 (1985) 264–268.
- [8] Bernkop-Schnürch, A., & Dünnhaupt, S. Chitosan-based drug delivery systems. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 81 (2012) 463–469.
- [9] P. Calvo, C. Remuñán-López, J.L. Vila-Jato, M.J. Alonso, Novel hydrophilic chitosan–polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers, *J. Appl. Polym. Sci.* 63 (1997) 125–132.
- [10] S. Shenvi et al. Preparation and characterization study of PPEES/chitosan composite membrane crosslinked with tripolyphosphate .*Desalination* 344 (2014) 90–96.

Références bibliographiques

- [11] Q. Xu et al. Prevention of colorectal cancer liver metastasis by exploiting liver immunity via chitosan-TPP/nanoparticles formulated with IL-12 .*Biomaterials* 33 (2012) 3909-3918.
- [12] A.M. Piras et al. Preparation, physical–chemical and biological characterization of Chitosan nanoparticles loaded with lysozyme *International Journal of Biological Macromolecules* 67 (2014) 124–131.
- [13] Zhang, L., &Kosaraju, S. L. Biopolymeric delivery system for controlled release of polyphenolic antioxidants. *European Polymer Journal*, 43(7) (2007) 2956–2966.
- [14] A.R. Dudhani, S.L. Kosaraju. Bioadhesive chitosan nanoparticles: Preparation and characterization *Carbohydrate Polymers* 81 (2010) 243–251
- [15] Mundargi RC, Srirangarajan S, Agnihotri SA, Patil SA, Ravindra S. Development and evaluation of novel biodegradable microspheres based on poly(d,l-lactide-co-glycolide) and poly(-caprolactone) for controlled delivery of doxycycline in the treatment of human periodontal pocket: in vitro and in vivo studies. *J Control Release* 119 (2007) 59–68.
- [16] Misra R, Acharya S, Dilnawaz F, Sahoo SK. Sustained antibacterial activity of doxycycline-loaded poly(d,l-lactide-co-glycolide) and poly(-caprolactone) nanoparticles. *Nanomedicine* 4 (2009) 519–30.
- [17] PatelP, Mundargi RC, Babu VR, Jain D, Rangaswamy. Microencapsulation of doxycycline into poly (lactide-co-glycolide) by spray drying technique: effect of polymer molecular weight on process parameters. *J Appl Polym Sci* ; 108 (2008) 4038–46.
- [18] M.S.Walter, M.J.Frank.bioactive implant surface with electrochemically bound doxycycline promotes bone formation markers in vitro .*Dental Materials* 30 (2014) 200-214
- [19] Appl. Polym.Sci. Pasanphan, W., Rimdusit, P., Choofong, S., Piroonpan, P., Nilsuwankosit, S. (2010) 109, 38-46.
- [20] Fan, F., Yan, W., Xu, Z., Ni, H., mécanisme de formation de mono disperses, de faible poids moléculaire des nanoparticules poids de chitosane par technique de gélification ionique. *Colloïdes Surf., B* 90 (2012) 21-27.

Références bibliographiques

- [21] W. Pasanphan et al. Irradiated chitosan nanoparticle as a water-based antioxidant and reducing agent for a green synthesis of gold nanoplatforms *Radiation Physics and Chemistry* 106 (2015) 360–370.
- [22] Y.-B. Shen et al. Preparation of chitosan microparticles with diverse molecular weights using supercritical fluid assisted atomization introduced by hydrodynamic cavitation mixer. *Powder Technology* 254 (2014) 416–424.
- [23] R. Zeng et al. Preparation, structure, drug release and bioinspired mineralization of chitosan-based nanocomplexes for bone tissue engineering .*Carbohydrate Polymers* 78 (2009) 107–111 .
- [24] E. Reverchon, A. Antonacci, Chitosan microparticles production by supercritical fluiprocessing, *Ind. Eng. Chem. Res.* 45 (2006) 5722–5728.
- [25] G. Ma, D. Yang, Y. Zhou, M. Xiao, J.F. Kennedy, J. Nie, Preparation and characterization of water-soluble N-alkylated chitosan, *Carbohydr. Polym.* 74 (2008) 121–126.
- [26] K. Harish Prashanth, F. Kittur, R. Tharanathan, Solid state structure of chitosan prepared under different N-deacetylating conditions, *Carbohydr. Polym.* 50 (2002) 27–33.
- [27] Clavo, P., Vila-Jato, J. L., & Alonso, M. J. Evaluation of cationic polymer coated nanocapsules as ocular drug carriers. *Journal of Pharmaceutics*, 153 (1997) 41–50.
- [28] Arof, A. K., & Osman, Z. FTIR studies of chitosan acetate based polymer electrolytes. *Electrochimica Acta*, 48 (2003) 993–999.
- [29] Fan, F., Yan, W., Xu, Z., Ni, H., Formation mechanism of monodisperse, low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique. *Colloids Surf, B* 90 (2012) 21–27.
- [30] S. Shanmuganathan et al. Preparation and characterization of chitosan microspheres for doxycycline delivery . *Carbohydrate Polymers* 73 (2008) 201–211.
- [31] Tager, A. *Physical chemistry of polymers* .Moscow: Mir Publishers (1972) 331-334.

Conclusion général

Dans cette étude, des nano et microparticules polymériques à base du chitosane ont été préparées par la méthode de gélation ionotropique en milieu acide et en présence du tripolyphosphate de sodium (TPP) comme agent de réticulation.

L'analyse morphologique par MEB montre que les nano/micro-matériaux préparés ont une forme sphérique et de tailles comprises entre (2 μm - 5 μm) et 500 μm pour $\mu\text{P-CS}$ et μS des microsphères et d'environ 600 nm pour les nanoparticules. Une analyse physico-chimique de ces nano/micro-matériaux par (MEB, DRX et FTIR) suggère que ces derniers peuvent être utilisés comme des vecteurs pharmaceutiques, pour l'encapsulation de la Doxycycline, voir même la libération contrôlée ou prolongée de cette molécule thérapeutique dans des milieux biologiques (in-vivo). Cette pratique peut offrir une meilleure sélectivité vis-à-vis des sites ciblés.

Le matériau support préparé semble pouvoir contenir une quantité plus importante de l'agent antibiotique lorsqu'il se trouve à une échelle nanométrique. En effet, à cette échelle, les particules de chitosane pourraient offrir normalement une surface spécifique -et donc des sites d'attraction- plus important et apte à retenir un nombre élevé de l'agent actif. Par ailleurs, l'analyse spectroscopique par FTIR confirmait le fait que la doxycycline est fixée sur le support polymérique particulaire sans qu'il y ait quelque modification chimique. Ce constat de premier ordre nous permet de dire et d'affirmer que les propriétés thérapeutiques (antibiotiques) de la molécule vont être préservées puisque sa structure primaire est conservée après sa fixation sur les supports préparés.

Les tests de libération de la doxycycline effectués in-vitro dans un fluide biologique simulé montraient que l'agent actif était capable de se libérer de son support microscopique ou nanométrique mais d'une manière relativement lente (plus de 24h). Ces caractéristiques cinétiques ont en fait des avantages incontestables pour assurer ou programmer une libération (et donc une biodisponibilité) contrôlée ou prolongée dans le site ciblé. Cependant, une étude cinétique beaucoup plus étendue est normalement nécessaire pour élucider les différents mécanismes liés à cette libération et pouvoir par la suite en contrôler les facteurs d'influence.