

UNIVERSITE SAAD DAHLAB DE BLIDA

Faculté des Sciences de l'Ingénieur

Département de chimie industrielle.

MEMOIRE DE MAGISTER

Spécialité : Génie des procédés

**PREPARATION ET CARACTERISATION DES MICROPARTICULES
A BASE DE SYSTEME COMPOSITE DE BIOPOLYMERE NATUREL
CHARGES DE MOLECULES ACTIVES A USAGE
PHARMACEUTIQUE.**

par :

EZZEROUG Kaouther

Devant le jury composé de :

Mr.KHELAF, H	Professeur, Université de Blida	Président
Mr. Hanini, S	Professeur, Université de Medéa	Examineur
Mr.Aliouche, D	Professeur, Université de Boumerdes	Examineur
Mr.Djelali ,N	Professeur, Université de Boumerdes	Invité
Mr. BAL, Y	Professeur, Université de Blida	Rapporteur

Blida, Avril 2012

RESUME:

Le travail présenté dans cette étude est consacré à l'élaboration des sphères de chitosane par la méthode de gélification ionotropiques. Ces sphères destinées au transport et à la libération de principes actifs comme l'oxytétracycline sont d'abords rigidifiées par le tripolyphosphate (TPP) ou l'hexamétaphosphate de sodium (HMP) et le glutaraldéhyde. Dans un second temps, des supports biocomposites chitosane/hydroxyapatite sont préparés en tant que nouveau vecteur thérapeutique, notamment lorsqu'on y inclut de la β -cyclodextrine par voie biomimétique. La microscopie électronique à balayage (MEB), la FTIR, la DSC-ATG sont des techniques qui ont été utilisées pour caractériser la morphologie et certaines propriétés structurales des matériaux préparés. Les résultats obtenus montrent l'existence d'une relation évidente entre le phénomène de réticulation du biopolymère ou sa charge par l'hydroxyapatite et les profils de libération de l'oxytétracycline *in-vitro* (milieu gastrique ou intestinal) ou à l'égard de leur action sur les *Staphylococcus aureus*. Cette libération, et action antibactérienne, semble s'accomplir d'après la coexistence de deux phénomènes : la diffusion et l'érosion du support. En outre, il apparaît que le biocomposite chitosane-hydroxyapatite présente des cinétiques de libération plus lente par rapport aux autres systèmes étudiés. L'introduction d'un complexe d'inclusion OTC- β -cyclodextrine dans la matrice minérale du biocomposite rend la libération du principe actif encore plus lente ce qui prédestine de tels vecteurs pour des thérapeutiques d'action retard ou programmée qu'il faudrait, néanmoins, optimiser et mieux spécifier dans le futur.

Mots-clés : chitosane, hydroxyapatite, oxytétracycline, billes, réticulation, cinétique de libération.

ABSTRACT:

The study presented upon here is devoted to the preparation of chitosan spheres by ionotropic gelation method. These spheres used as supports for the transport and the release of active agents such as oxytetracycline are first stiffened by tripolyphosphate (TPP) or sodium hexametaphosphate (HMP) and glutaraldehyde. In a second step, chitosan / hydroxyapatite biocomposites supports are made as a new therapeutic vector, especially when β -cyclodextrin is included in through biomimetic route. The scanning electron microscopy (SEM), FTIR and DSC-TGA are techniques that have been used to characterize the morphology and structural properties of prepared materials. The results obtained show the existence of a clear relationship between the cross-linking of the biopolymer or its load by hydroxyapatite and release profile of oxytetracycline in vitro (simulated gastric or intestinal media) or in respect of thier action on *Staphylococcus aureus*. This release, and antibacterial action, seems to be accomplished according to two phenomena: the diffusion and erosion of support. It appears, also, that with the chitosan-hydroxyapatite biocomposite the release kinetic is slower compared to other studied systems. The introduction of an inclusion complex OTC- β - cyclodextrin in the mineral matrix of the biocomposite makes the release of the active agent much more slower which predestines such vectors in the future for therapeutic action which should be delayed or controlled, after additional optimization and better specification.

Keywords : Chitosan, hydroxyapatite, oxytetracycline, beads, crosslinking, kinetics of release.

الملخص

كرست الدراسة التي قدمت لإعداد كريات الكيتوزان حسب طريقة التهليم الشاردي, و تستخدم هذه الكريات كوسائل النقل العلاجي و إطلاق العناصر النشطة مثل الأوكسيتتراسكلين. في الخطوة الأولى شددت هذه الكريات بواسطة تريبوليفوسفات أو هكساميتافوسفات و غلوترالدهيد. و في الخطوة الثانية يتم دعم الكريات بجزيئات الهيدروكسيدباتيت كنوع جديد من الناقلات العلاجية و خصوصا عندما يتم إدخال بيناسيكلودكسترين بطريقة بيوميستيك. المسح بالمجهر الإلكتروني, DSC, ATG, FTIR هي التقنيات استخدمت لتوصيف الخصائص الهيكلية للمواد المعدة. النتائج المحصل عليها تبين وجود علاقة واضحة بين درجة الربط بين سلاسل متعدد الوحدات أو إدراج هيدروكسيدباتيت و سرعة تحرير العناصر النشطة أو القدرة على مضادة جرثومة *Staphylococcus aureus* (في وسط معدي أو معوي) و يبدو أن هاتين الخاصيتين يتحققان وفقا لظاهرتين الانتشار و تآكل سلاسل متعدد الوحدات و يبدو أيضا أن الكريات المدعمة بالهيدروكسيدباتيت , حركة التحرير تكون أبطأ مما تكون عند المركبات التي شملتها الدراسة. إدراج المركب OTC-BCD داخل المرصوفة المعدنية يؤدي إلى تأخير إضافي لعملية تحرير العناصر النشطة مما يخص استعماله بالحالات العلاجية ذات التحرير البطيء بعد إضافة دراسات معمقة لتحسين المواصفات الخاصة.

الكلمات الرئيسية :

الكيتوزان- هيدروكسيدباتيت- اوكسيتتراسكلين- كريات- تشديد الروابط- سرعة التحرير.

REMERCIEMENT

Au terme de ce travail, je remercie le BON DIEU tout puissant qui m'a donné la force et la volonté d'achever cette réalisation et nous lui rendons grâce.

Je voudrais remercier spécialement mon directeur de thèse le Pr.BAL KHiereddine, malheureusement disparu en Avril 2011, que dieu bénisse son âme, d'avoir encadré ce travail jusqu'à son départ, qui fut un réel choc pour moi et toutes les personnes du groupe de recherche et c'est une grande peine qu'il ne puisse être parmi nous pour célébrer la fin de ce travail. J'espère que ce travail sera à la hauteur de son attente.

Je tiens à remercier monsieur le professeur BAL Youcef, co-directeur de cet mémoire (pendant la dernière année), de toujours avoir pris le temps et d'avoir eu la patience de m'écouter, de me conseiller et de m'encadrer après le décès de son frère monsieur BAL khiereddine, que dieu bénisse son âme.

Pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant de présider cette thèse, j'adresse ma gratitude à monsieur Khellaf, professeur et président du conseil scientifique au département de chimie industrielle université de Blida. Encore merci à l'ensemble de membres de jury pour le soin avec lequel ils ont examiné ce manuscrit et pour la patience de leurs remarques et commentaires.

Ma gratitude va au doyen de la faculté des sciences de l'Université de Blida, Monsieur Benzina, et également à monsieur Bellel qui m'ont autorisé à faire des expériences au laboratoire de chimie supramoléculaire.

Je n'oublie pas de remercier tous les enseignants de la PG du département de chimie industrielle à l'université de Blida.

Je tiens à remercier monsieur Ganif le chef de service analyse microbiologiques au sein du complexe Sidal antibiotical de Médéa et les personnages qui travaillent au sein du laboratoire des analyses physiques au centre de développement des recherches avancées (CDTA), qui ont apporté leur aide à la réalisation de ce modeste travail.

Enfin, je remercie mes parents, mon mari et toutes les personnes, qui de près ou de loin, m'ont aidé à la réalisation de ce travail.

TABLES DES MATIERES

RESUME	1
REMERCIEMENTS	4
TABLE DES MATIERES	5
LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX	7
INTRODUCTION	11
1. L'ENCAPSULATION D'UNE MATIERE ACTIVE	14
1.1. Introduction	14
1.2. Définition de l'encapsulation	14
1.3. Propriétés d'encapsulation des microparticules	18
1.4. Applications et limites des particules à base de polymère	18
1.5. Différent type de microparticules	20
1.6. Procédés d'encapsulation	22
1.7. Les microsphères du chitosane	23
1.8. L'encapsulation par le Chitosane	31
1.9. Préparation des microparticules de chitosane	32
2. LA LIBERATION D'UNE MATIERE ACTIVE	39
2.1. Introduction	39
2.2. La libération contrôlée d'un principe actif	39
2.3. Généralités sur les formes matricielles	41
2.4. Cinétique de libération du principe actif	46

3. PREPARATION, CHARACTERISATION ET LIBERATION IN VITRO DE L'OXYTETRACYCLINE A PARTIR DES SPHERES DU CHITOSANE	53
3.1. caractérisation du chitosane	54
3.2. préparation des sphères du chitosane	55
3.3. caractérisation des sphères de chitosane	56
3.4. Etude de la libération contrôlée <i>in vitro</i> de principe actif encapsulé dans le chitosane	68
3.5. Evaluation de l'activité antibactérienne de l'oxytétracycline	75
3.6. Conclusion	78
4. PREPARATION DES SPHERES BIOCOMPOSITES CHARGEES DU COMPLEXE D'INCLUSION OXYTETRACYCLINE:BETA CYCLODEXTRINE	79
4.1. Préparation biomimétique de l'hydroxyapatite dans le SBF	80
4.2. Caractérisation structurale de l'hydroxyapatite préparée	82
4.3. Préparation des systèmes supramoléculaires	85
4.4. Préparation de l'hydroxyapatite chargé biomimétiquement	90
4.5. Préparation des microsphères biocomposites chargées	93
4.6. Cinétique de libération de l'oxytétracycline à partir des sphères biocomposites	94
4.7. Activité antibactérienne de l'oxytétracycline libérée à partir des microsphères biocomposites	98
4.8. Conclusion	99
CONCLUSION GENERALE	100
APPENDICES	102
REFERENCES	115

LISTE DES ILLUSTRATIONS ET LES TABLEAUX

Figure 1.1:	Les différents types de microparticule.	20
Figure 1.2:	Différents procédés d'encapsulation.	23
Figure 1.3 :	Molécules de la cellulose, de la chitine et du chitosane.	24
Figure 1.4 :	Les microparticules de chitosane.	31
Figure 1.5 :	Les diverses méthodes qui ont été employées pour la préparation des microsphères de chitosane.	32
Figure 2.1:	Représentation des différents profils de libération : immédiate, prolongée et contrôlée d'un principe actif	40
Figure 2.2:	Les systèmes à libération déclenchée et prolongée.	47
Figure 2.3 :	Profils de libération obtenus à partir de différents types de microparticules.	48
Figure 3.1 :	Spectre IR du chitosane.	54
Figure 3.2 :	Les sphères vides et chargées préparées dans différents solution de gélification.	56
Figure 3.3:	Schéma de principe de formation des sphères à base d'un biopolymère.	57
Figure 3.4:	Réticulation ionotropique du chitosane.	58
Figure 3.5 :	Microphotographies MEB des sphères de chitosane.	60
Figure 3.6:	Spectre FTIR des sphères du chitosane.	61
Figure 3.7:	Spectres FTIR des sphères du chitosane réticulées par le glutaraldehyde.	62
Figure 3.8:	Spectre FTIR des sphères composites.	62
Figure 3.9:	Thermogrammes représentant le flux de chaleur en fonction de la température en °C du chitosane réticulé au TPP.	64

Figure 3.10:	Thermogrammes représentant le flux de chaleur en fonction de la température en °C du chitosane réticulé au HMP.	64
Figure 3.11:	Thermogrammes représentant le flux de chaleur en fonction de la température en °C du composite chitosane-HA réticulé au TPP et contenant l'oxytétracycline.	64
Figure 3.12:	Taux de gonflement obtenus relatifs aux différents systèmes au chitosane préparés.	67
Figure 3.13:	la courbe d'étalonnage de l'oxytétracycline à 353nm.	69
Figure 3.14 :	Cinétique de libération de l'oxytétracycline dans le SBF à partir de sphères de chitosane réticulées par l'hexamétaphosphate de sodium.	69
Figure3.15 :	Cinétique de libération de l'oxytétracycline dans le milieu intestinal à partir de sphères de chitosane réticulées par l'hexamétaphosphate.	70
Figure3.16 :	Cinétique de libération de l'oxytétracycline dans le milieu gastrique à partir de sphères de chitosane réticulées par le tripolyphosphate.	70
Figure 3.17 :	Cinétique de libération de l'oxytétracycline dans le milieu intestinal à partir de sphères de chitosane réticulées par le tripolyphosphate.	70
Figure 3.18:	Tracé des courbes linéarisées $\ln(M_t/M_\infty)$ en fonction de $\ln(t)$ des différents systèmes à pH=1,2.	72
Figure 3.19:	Tracé des courbes linéarisées $\ln(M_t/M_\infty)$ en fonction de $\ln(t)$ des différents systèmes à pH=6,8.	72
Figure 3.20 :	Effet antibactérien de l'oxytétracycline libéré des différents systèmes sur la <i>staphylococcus aureus</i> .	76
Figure 3.21:	Antibiogrammes des solutions standards d'oxytétracycline.	77
Figure 4.1:	Organigramme de synthèse de l'HAP.	81
Figure 4.2:	Vue macroscopique de l'HAP/SB synthétisé.	82

Figure 4.3 :	Diffractogramme R-X de l'HAP préparée par voie biomimétique.	82
Figure 4.4 :	Diffractogrammes références d'hydroxyapatite.	83
Figure 4.5 :	Spectre FTIR de l'hydroxyapatite biomimétiquement préparé.	84
Figure 4.6 :	La distribution de la taille des microsphères d'hydroxyapatite.	84
Figure 4.7:	Microphotographies MEB des microparticules d'HAP biomimétique.	85
Figure 4.8:	Structure générale des cyclodextrines.	86
Figure 4.9:	Structure de l'oxytétracycline.	87
Figure 4.10:	Spectre FTIR de l'oxytétracycline.	88
Figure 4.11:	La détermination de la stœchiométrie d'inclusion.	89
Figure 4.12:	Représentation schématique du complexe d'inclusion OTC: β -D.	89
Figure 4.13 :	La courbe double réciproque de formation du complexe d'inclusion.	90
Figure 4.14 :	Organigramme de synthèse des microparticules d'HA chargées.	91
Figure 4.15 :	Mécanisme possible pour la formation de microsphères d'HA.	92
Figure 4.16:	Spectre FTIR de l'hydroxyapatite chargé.	93
Figure 4.17:	Microsphères biocomposites chargées.	93
Figure 4.18 :	Images MEB des particules composites.	94
Figure 4.19 :	Cinétique de libération de l'oxytétracycline dans le milieu gastrique.	95
Figure 4.20 :	Cinétique de libération de l'oxytétracycline dans le milieu intestinal.	95
Figure 4.21 :	Cinétique de libération de la tétracycline à partir des microsphères d'HA revêtues de couches de polymères (PLA/PLGA).	96
Figure 4.22 :	Tracé des courbes linéarisées $\ln(M_t/M_\infty)$ en fonction de $\ln(t)$ des différents systèmes à pH=1,2.	97
Figure 4.23:	Tracé des courbes linéarisées $\ln(M_t/M_\infty)$ en fonction de $\ln(t)$ des différents systèmes à pH=6,8.	97

Figure 4.24 :	Effet antibactérien de l'oxytétracycline libérée des différents systèmes sur la <i>staphylococcus aureus</i> dans le milieu gastrique.	98
Figure 4.25:	Effet antibactérien de l'oxytétracycline libérée des différents systèmes sur la <i>staphylococcus aureus</i> dans le milieu intestinal.	98
Tableau 1.1 :	Classification des vecteurs de médicaments.	17
Tableau 3.1 :	Les principaux pics illustrés des thermogrammes des sphères de chitosane.	65
Tableau 3.2 :	Paramètres caractéristiques de la diffusion dans les différents systèmes dans le milieu gastrique.	73
Tableau 3.3 :	Paramètres caractéristiques de la diffusion dans les différents systèmes dans le milieu intestinale.	73
Tableau 4.1 :	Paramètres caractéristiques de la diffusion dans les différents systèmes.	97

INTRODUCTION :

La délivrance de molécules thérapeutiques vers un organe, un tissu ou une cellule malade constitue aujourd'hui un défi majeur pour le traitement des maladies humaines, notamment infectieuse. L'usage des médicaments sous leurs formes habituelles (comprimés, gélule...etc.) a présenté une efficacité pendant longtemps, mais il a aussi présenté des inconvénients tel que les effets secondaires, la dégradation du principe actif et son élimination rapide à l'intérieur de l'organisme,...etc.

A l'heure actuelle où de nouvelles prospections au niveau de l'organisme et la conception de nouveaux équipements d'analyse ont concouru à la recherche de nouvelles formulations, les micro et nano particules permettent d'une part d'améliorer les conditions des conservations du principe actif et d'autre part d'avoir une concentration précise et utile de ce principe actif au sein de l'organisme et de cibler d'une manière très judicieuse les cellules cibles.

Les systèmes à libération contrôlée de substances actives sont une des applications biomédicales que l'on peut explorer avec des microsphères. En effet, lorsqu'un médicament est conçu sur la base d'une formulation libérant très rapidement le principe actif, il doit être administré à des doses élevées et à des fréquences relativement importantes pour combattre la maladie. Cette pratique entraîne fréquemment des effets indésirables chez le patient et un contrôle inefficace de la pharmacothérapie. Ainsi, le développement de médicaments permettant la libération prolongée et contrôlée des principes actifs, a suscité un vif intérêt durant les 50 dernières années. La principale méthode utilisée pour l'obtention d'une libération contrôlée, a été l'incorporation du principe actif dans des systèmes à base de polymères [1]. Un tel système doit être à la fois un matériau biocompatible, biodégradable, et une matrice ayant la capacité de libérer une molécule suivant un mécanisme défini. De nombreux polymères biodégradables d'origine naturelle ou synthétique, ont été impliqués dans le développement de systèmes à libération contrôlée.

Parmi les biopolymères hydrosolubles disponibles, nous nous intéressés dans ce travail au chitosane qui semble posséder des atouts et certaines propriétés idéales en tant que support ou vecteur pour un principe actif : il est biocompatible, biodégradable, non toxique et peu coûteux. En outre, son aptitude à donner des microcapsules, des microsphères ou des nanoparticules le rend encore plus attractif. Cette conversion peut être conduite selon différentes procédures qu'il est aisé de maîtriser telle que la gélification ionotropique, l'émulsification, ou la coacervation simple et complexe. Ces méthodes offrent de nombreux avantages dans le transport ensuite de la libération de toutes sortes d'agents thérapeutiques.

Dans ce contexte, l'oxytétracycline qui est un antibiotique à large spectre d'activité à l'égard des bactéries de type Gram+ et Gram-, est utilisé en tant qu'agent actif supporté dans des matrices à base de chitosane réticulé par différents agents de comme le glutaraldéhyde, le tripolyphosphate de sodium ou l'hexamétaphosphate de sodium. De plus, et à titre de comparaison, des microsphères biocomposites à base du chitosane et d'hydroxyapatite ont été préparées pour étudier la possibilité de leur utilisation pour l'administration de l'antibiotique par voie gastro-intestinale. Le phénomène d'inclusion de l'OTC dans la β -cyclodextrine, suivie de son introduction dans des microsphères de chitosane est abordé dans la dernière partie de notre étude dans le but de la préparation de nouveau système hybride pour la prolongation de la libération du principe actif.

Notre présent mémoire s'axe sur trois parties principales :

Dans le premier chapitre, une étude bibliographique à propos des matériaux et des méthodes pouvant être utilisés pour la préparation de différentes sortes de supports ou récipients pouvant contenir, transporter et libérer des substances actives dans les sites biologiques ciblés. Une analyse détaillée est ensuite présentée sur le chitosane.

Dans le deuxième chapitre, les mécanismes de libération de substrats à partir des systèmes d'encapsulation sont présentés.

La troisième partie est entièrement dédiée à l'expérimentation conformément à l'objet de notre thématique. Des préparations variées assorties de techniques d'analyse et de caractérisation différentes (FTIR, DRX, SEM, la DSC, ...etc.) sont abordées. Des discussions critiques sont apportées sur l'ensemble de nos résultats à la lumière de la bibliographie disponible.

Chapitre 1 :

L'ENCAPSULATION DE LA MATIERE ACTIVE :

1.1. Introduction :

L'adressage (ou délivrance spécifique) de molécules thérapeutiques vers un organe, un tissu ou une cellule malade constitue aujourd'hui un défi majeur pour le traitement des maladies humaines, notamment infectieuses, cancéreuses ou d'origine génétique. Dès le début du XXe siècle, le savant Paul Ehrlich rêvait déjà de « magic bullet » susceptible d'acheminer un médicament de manière spécifique vers son site d'action. Son rêve est aujourd'hui plus proche de la réalité grâce au développement des nanotechnologies qui ont permis de proposer le concept de vectorisation des médicaments. [1]

1.2. Définition de l'encapsulation:

L'encapsulation regroupe un ensemble de techniques qui permettent d'incorporer un principe actif au sein d'un matériau support, généralement un polymère d'origine naturelle ou synthétique. Le principe actif peut être de nature variable, hydrophobe ou hydrophile, sous forme liquide, solide ou gazeuse, éventuellement en suspension ou en émulsion. Les systèmes formés sont le plus souvent des particules solides complexes de taille variable, mais l'on trouve également des systèmes semi solides et des émulsions. En fonction de la taille en moyenne de la capsule, on distingue également les microparticules (1 μ m à quelques mm) et les nano particules (taille inférieure au 1 μ m). [2]

L'encapsulation présente de nombreux avantages et offre d'importantes possibilités d'application dans différents domaines concernés par la formulation (pharmacie et cosmétiques, industrie alimentaire, chimie, agrochimie...etc.).

L'encapsulation est utilisée d'une part pour protéger un actif sensible et de l'isoler de son environnement immédiat à l'égard de l'action de l'humidité, la chaleur, l'oxygène ou la lumière; et d'autre part, pour modifier la forme, le volume, la densité et faciliter ainsi la manipulation et le stockage en transformant des

liquides en formes solides et en améliorant la coulabilité de solides finement divisés. Une des principales applications reste le contrôle de la libération ultérieure de l'actif pour laquelle deux voies principales sont envisagées : la libération contrôlée ou la libération prolongée dans le temps. [2]

Les matériaux utilisés pour obtenir ces structures en tant que supports sont nombreux et variés (Kreuter, 1994 ; Gombatz et al, 1995) [3]. Nous pouvons distinguer à ce sujet :

- * Les polymères d'origine naturelle : gélatine, alginate de sodium, chitosane, amidon.
- * Les polymères cellulosiques : ethylcellulose, hydroxypropylcellulose, carboxyméthylcellulose, ...etc.
- * Les polymères de synthèse : copolymères acryliques et métacryliques, polyoléfines, copolymères (acrylo-)vinyliques, polycaprolactone, polymères d'acides lactiques et glycoliques.
- * Les lipides et cires minérales : corps gras solides, glycérides, cires (d'abeille, de carnauba...), cires minérales.

Dans le domaine pharmaceutique, l'encapsulation présente un intérêt particulier et de nombreuses possibilités d'application (masquage de goût, libération prolongée, protection, vectorisation). Une des pistes les plus explorées concerne la conception de formes médicamenteuses capables de protéger un principe actif, de le véhiculer dans l'organisme jusqu'à son site d'action puis d'y assurer une libération plus ou moins prolongée. Ces formes sont couramment appelées « vecteurs » et font l'objet de nombreuses recherches depuis une trentaine d'années. La vectorisation consiste à amener le médicament vers la cible à traiter et à créer localement une concentration élevée permettant d'augmenter l'efficacité de médicament tout en diminuant les risques d'effets secondaires par contamination des zones saines. Il s'agit donc de moduler la distribution du médicament dans l'organisme en fonction des propriétés du vecteur auquel il est associé.[2]

Ces vecteurs peuvent être de nature et de structure variables. Classiquement, on distingue trois générations de vecteurs en fonction de leur mode d'action :

➤ *Les vecteurs de première génération :*

Ce sont des microparticules administrées par voie vasculaire à proximité de l'organe à traiter pour libérer le principe actif. Ces microparticules ont été utilisées pour l'encapsulation d'agents anticancéreux et le ciblage des tumeurs selon un mécanisme de chimio-embolisation qui conjugue une oblitération des artères nourricières de la tumeur à une libération de l'agent anti-tumoral. Cependant, depuis une vingtaine d'années, l'intérêt s'est porté sur l'obtention de vecteurs de taille submicronique (dits colloïdaux) permettant de toucher de nouvelles voies d'administration (notamment intraveineuse). [2]

➤ *Les vecteurs de deuxième génération :*

Ce sont des liposomes, des nanosphères ou des nanocapsules de taille inférieure au micromètre. La vectorisation est dite passive quand la distribution du principe actif est imposée par les caractéristiques physico-chimiques et la taille du vecteur. Des résultats intéressants ont été obtenus lors d'administration de vecteurs colloïdaux par voie orale ou intramusculaire. Par voie intraveineuse, le problème principal réside dans la capture de ces particules principalement par le système phagocytaire mononucléé (foie, rate et moelle osseuse). Il est tout à fait remarquable que ce verrou technologique ait pu être contourné grâce à l'application du concept physicochimique de la « répulsion stérique » développé par l'équipe de Gennes dès le début des années 1990. Le recouvrement des vecteurs par des polymères hydrophiles et flexibles, comme les polyéthylènes glycols (PEG), les polysaccharides, les poloxamers et les poloxamines, empêche les protéines, en particulier les opsonines, de s'adsorber à leur surface [2].

➤ *Vecteurs de troisième génération :*

Lorsque les vecteurs de 2^{ème} génération sont décorés de ligands (anticorps, peptides, sucres, acide folique), ils sont alors capables de reconnaître de manière sélective des antigènes ou des récepteurs qui sont hyper-exprimés à la surface

des cellules cibles (cellules cancéreuses, cellules infectées, etc.). La conception de ces vecteurs de 3^{ème} génération nécessite la construction d'édifices supramoléculaires composés :

- 1) d'une particule type liposome ou nanoparticule,
- 2) d'une couche de polymères hydrophiles et flexibles (par exemple, le PEG) pour éviter la reconnaissance hépatospléniques,
- 3) d'un ligand de reconnaissance membranaire à l'extrémité de certaines chaînes de PEG.

Toutefois, le couplage chimique d'un ligand à la surface d'un vecteur particulaire est une opération délicate qui peut parfois altérer les capacités de reconnaissance moléculaire du ligand avec le récepteur en raison de l'encombrement stérique dû à la particule. Dans d'autres cas, certains groupements chimiques indispensables à l'adressage du ligand peuvent être masqués ou impliqués dans la fixation au vecteur. Un autre point important concerne le choix judicieux de la cible biologique (récepteur ou antigène). Celle-ci doit être présente à la surface des cellules pour permettre leur reconnaissance, ensuite internalisée dès qu'elle a été reconnue par son ligand afin de permettre la libération du principe actif associé au vecteur à l'intérieur de la cellule (et non à l'extérieur).[2]

Dans le tableau suivant, les différents supports (vecteurs) pour le transport de substances actives sont présentés.

Génération	1^{ère}	2^{ème}		3^{ème}
Cible	Organes	Tissus		Cellules
Diamètre	> 1 µm	< 1 µm		< 1 µm
Vecteurs	- Microsphères - Microcapsules - Microagrégats	Passifs - Liposomes - Nanosphères - Nanocapsules	Actifs - Liposomes - Nanosphères - Nanocapsules magnétiques ou thermosensibles	- Anticorps monoclonaux - Support moléculaire - Support particulaire - Glycoprotéines
Mécanisme	Embolisation	Capture par le système des phagocytes mononucléés		Reconnaissance spécifique

Tableau I-1 : Classification des vecteurs de médicaments (Benoit et coll., 1986). [4]

1.3. Propriétés d'encapsulation des microparticules :

En fonction de l'application visée, les microparticules sont conçues pour libérer l'espèce, soit de manière déclenchée, soit de manière continue. Les systèmes à libération déclenchée sont généralement des microcapsules formées d'une membrane de faible perméabilité, qui vont libérer brutalement leur contenu par éclatement de cette membrane. La rupture est alors déclenchée, soit par une pression (mécanique ou osmotique), une variation de température, une variation de pH ou encore la dégradation enzymatique de la membrane. Les systèmes à libération continue sont majoritairement des microsphères. Les mécanismes mis en jeu sont, soit la diffusion de l'espèce à travers la matrice, soit la dégradation (érosion) ou dissolution de la matrice ou encore un couplage des deux (Shah et al, 1992).[5]

Les principaux paramètres qui gouvernent les propriétés d'encapsulation de ces systèmes sont :

- les paramètres externes tels que la température (Gao et al, 2005), le pH (Lamprecht et al, 2004; Sauer et al, 2001), la présence d'enzyme dans le milieu continu pouvant dégrader la particule, l'humidité,
- les paramètres intrinsèques à la phase interne tels que la solubilité de l'espèce, sa température d'ébullition et de fusion,...etc.
- les paramètres intrinsèques à la matrice ou à la membrane tels que la taille de la particule (Siepmann et al, 2004; Sansdrap et al, 1993; Berklund et al, 2002; Berklund et al, 2003), l'épaisseur de la membrane, la structure chimique du polymère, sa masse moléculaire (Capan et al, 1999), sa cristallinité et sa porosité (Klose et al, 2006).[5]

1.4. Applications et limites des particules à base de polymère :

1.4.1. Applications :

Les microparticules obtenues à partir de polymères sont donc des systèmes complexes, présentant de nombreux paramètres physicochimiques dont la

maîtrise est essentielle afin de contrôler leurs propriétés d'applications. Elles restent à ce jour encore peu exploitées. Leur application la plus connue reste les papiers copiants à base de carbone, qui utilisent des microcapsules sensibles à la pression. Certains produits thérapeutiques basés sur la technologie des microparticules sont actuellement sur le marché : dans le traitement du cancer de la prostate (Leupron Depot® et Enantone Depot®), de la puberté précoce (Decapeptyl Depot®), de la stérilité (Parlodol LA®).[5]

Administrées par voie orale, les protéines et les peptides sont rapidement dégradés par les enzymes présentes dans les fluides gastriques et intestinaux. Ainsi, les particules polymériques sont actuellement testées pour l'encapsulation et la protection de ces molécules (O'Hagan, 1998; Damgé et al., 1990 ; Carino et al., 2000).[5]

Le temps de circulation des particules à base de polymère peut être augmenté par greffage de groupements PEG à la surface des vecteurs empêchant ainsi l'opsonisation des particules (Mosqueira et al., 2001). Pour des tailles inférieures au micron, après 30 ans de recherche, seul un agent de diagnostic médical utilise cette technologie (Abdoscan®). [5]

1.4.2. Limites :

L'une de leurs principales limites reste les procédés d'obtention de ces systèmes qui nécessitent l'utilisation d'un solvant et de monomères parfois toxiques et difficiles à éliminer (Smith et al, 1986), le chauffage, l'emploi d'acide ou encore une forte agitation mécanique. Ces conditions peuvent être des contraintes limitant l'utilisation de certains principes actifs ou la production à grande échelle. Ainsi, la fabrication de nano et microparticules à base de lipides solides (c'est-à-dire solides à température ambiante), stabilisées par des tensioactifs, s'est avérée une solution intéressante en vue de l'innocuité des composants utilisés. Cependant, ces matériaux présentent une phénoménologie particulière et une stabilité relative limitant leur application. [5]

1.5. Différent type de microparticules :

Les microparticules synthétiques sont des systèmes colloïdaux développés principalement en vue de leur utilisation thérapeutique. Selon la nature des éléments qui les constituent et leur structure, il est possible de distinguer les liposomes, les microsphères, et les microcapsules, comme il est montré dans la figure suivante (Benoit et al; 1986; Andrieux et al ;2003) :

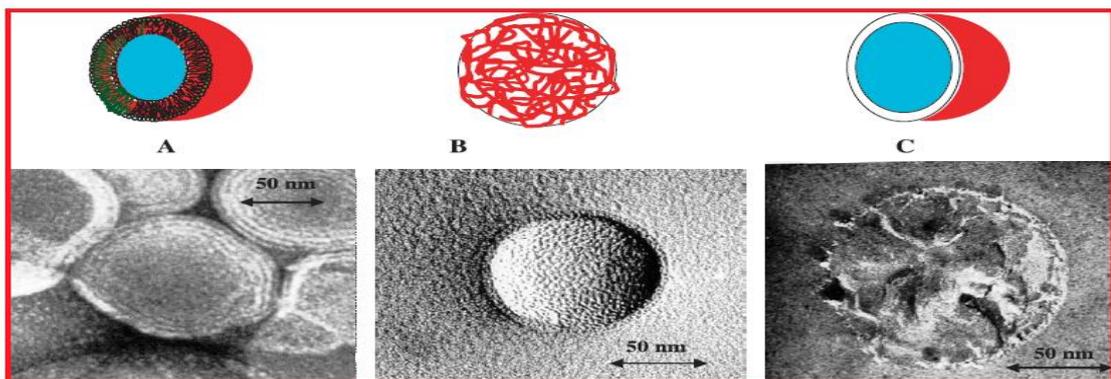


Figure 1.1 : les différents types de microparticule (Les liposomes (A) sont des vésicules formées d'une ou plusieurs bicouches de phospholipides. Les microsphères (B) sont des particules formées d'une matrice de polymères et les microcapsules (C) sont constituées d'un cœur aqueux ou huileux entouré d'une fine membrane polymère. [1]

Les *liposomes* sont de petites vésicules sphériques dont la paroi est constituée par une ou plusieurs bicouches phospholipidiques délimitant une cavité centrale contenant une phase aqueuse. Ils sont apparus il y a quarante ans grâce aux travaux de Bengham et al. (1965) et ont été les premiers à être utilisés comme vecteur de médicaments. Leur diamètre se situe dans un intervalle allant de 20nm à 1µm. ils peuvent véhiculer des principes actifs de nature hydrophile, sous forme dissoute dans la phase aqueuse centrale, ou de nature hydrophobe par insertion de ces molécules dans la bicouche. Les liposomes présentent une bonne biocompatibilité en raison des matières premières qui les composent (phospholipides naturels, stérols, glycérolipides) et peuvent se comporter comme

des formes médicamenteuses à libération contrôlée (Mourtas et al., 2007). Cependant, ces structures vésiculaires sont instables chimiquement (oxydation et hydrolyse des phospholipides) et physiquement (agrégation, fusion et perte du contenu)(Barenholz, 2001).[6]

Les **microcapsules** sont des structures réservoirs et sphériques. Elles sont constituées d'un cœur généralement huileux entouré par une mince paroi de polymère dont l'épaisseur n'excède pas quelques nanomètres. Le principe actif est généralement dissous dans le cœur huileux, mais peut aussi être adsorbé à la surface des microcapsules. Dans cette géométrie, les taux d'encapsulation peuvent être particulièrement élevés : entre 85 et 90%_p de masse de matière active par rapport à la masse de microparticules (Richard et Benoit, 2000).[6]

Les **microsphères** peuvent être appelées billes ou microbilles, suivant le procédé de fabrication. Les microsphères sont souvent décrites comme étant des objets sphériques uniformes du cœur à la surface de taille comprise entre 20 nm et 2000 μm , composées de un ou plusieurs matériaux polymériques. Les microcapsules sont sensiblement similaires aux microsphères, mais elles sont constituées d'une substance cœur comprenant le composé actif et d'une matrice polymère formant une capsule ou paroi (barrière protectrice ou excipient). Les microsphères sont préparées soit à partir de molécules inorganiques et/ou organiques se présentant sous forme de monomères, soit à partir de polymères d'origine naturelle, semi synthétique ou synthétique. Elles sont fabriquées par une large variété de techniques de polymérisation que nous allons détailler par la suite. Ces nombreuses méthodes donnent naissance à des microsphères de taille, forme, texture (porosité et surface spécifique), structure (réseau, rigidité), différentes. Les microsphères préparées peuvent présenter des propriétés spécifiques soit par elles même, ou bien par le jeu d'encapsulation de molécules ou particules présentant ces propriétés (fluorescence, radioactivité ou magnétisme) avec des degrés de porosité variables et des coefficients de diffusion différents.[6]

1.6. Procédés d'encapsulation :

Il existe actuellement plusieurs manières de classer les procédés industriels d'encapsulation. Un ensemble de ces techniques est schématisé dans la figure 1.2. Le classement des méthodes d'encapsulation suit d'habitude différents critères qui sont cités ci-dessous (Richard et Benoît, 2000) [6] :

- L'utilisation ou non de solvant organique,
- La nature du milieu dispersant : liquide, gazeux ou à l'état supercritique,
- L'utilisation de polymères préformés, de lipides ou de monomères,
- Le procédé utilisé pour réaliser la microencapsulation.

Cette dernière manière de classer les procédés industriels est la plus couramment utilisée. Nous distinguons, comme la résume la figure 1.2:

- Les procédés physicochimiques, basés sur la maîtrise de paramètres tels que la solubilité et la précipitation des polymères en fonction de l'ajout d'un agent réticulant, du pH ou de température mais aussi sur la maîtrise des changements d'état (fusion, solidification) des polymères.
- Les procédés chimiques, basés sur la formation *in situ* du matériau enrobant par polycondensation, polymérisation radicalaire, ou polymérisation anionique d'unités monomères. De ce fait, ils se distinguent des méthodes physico-chimiques et mécaniques qui utilisent des matériaux enrobants préformés (polymères, lipides).
- Les procédés mécaniques qui mettent en œuvre des techniques de pulvérisation, de formation de gouttes ou d'extrusion.

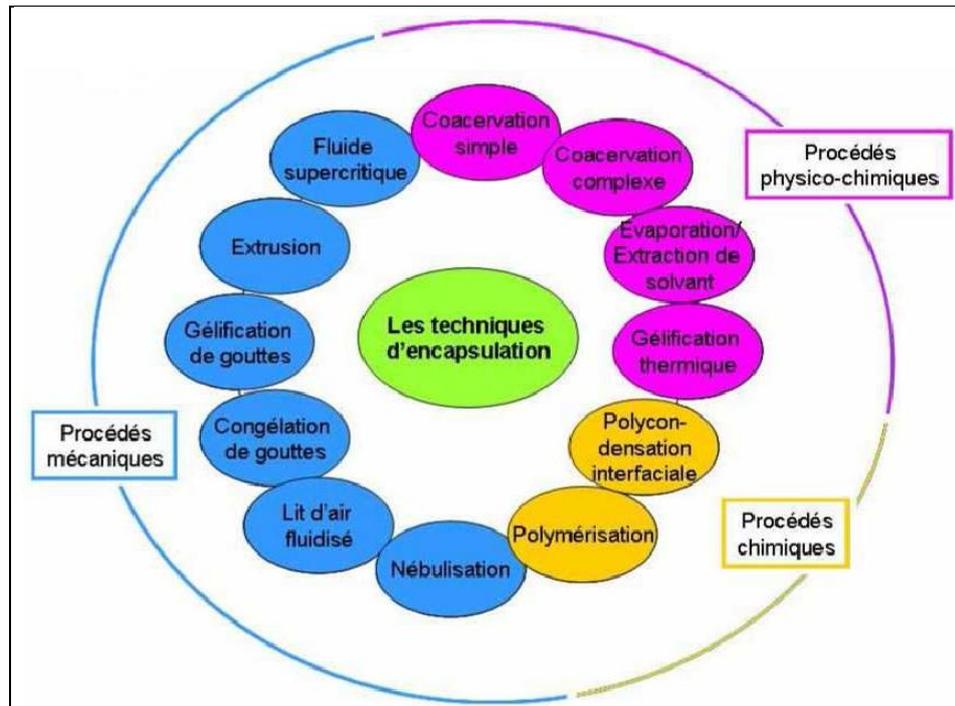


Figure 1.2: Différents procédés d'encapsulation.

Du fait que notre présente étude comporte l'usage d'un polysaccharide d'origine naturelle, le chitosane qui est un dérivé de la chitine, l'analyse bibliographique suivante est dédiée entièrement à la caractérisation de ce biopolymère et aux différentes méthodes de préparation de supports d'encapsulation reposant sur ce matériau.

1.7. Les microsphères du chitosane :

En tant que véhicules médicamenteux, les hydrogels font partie de cette catégorie de polymères et sont dotés de propriétés physico-chimiques permettant d'incorporer ou de lier des substances actives. Ce lien conduit généralement à la formation d'une structure capable de protéger l'agent d'intérêt des conditions et environnement hostiles du vivant. [7]

Parmi les hydrogels biodégradables, le chitosane, un polysaccharide versatile, a fait l'objet de plusieurs études pour ses potentiels d'utilisation en biomédical. Il est plus utilisé dans le domaine alimentaire et exploré comme système de libération de principes actifs. Son origine naturelle, sa disponibilité,

son coût et sa biocompatibilité suscitent l'intérêt de plusieurs chercheurs pour des applications pharmaceutiques.[7]

1.7.1. Définition du chitosane :

Le chitosane est un copolymère linéaire flexible de 2-acétamido-2-déoxy- β -D-glucopyranose et 2-amino-2-déoxy- β -D-glucopyranose liés en β (1-4). C'est un polysaccharide ressemblant à la cellulose. Cette macromolécule est obtenue par N-déacétylation d'un des polymères naturels les plus abondants, la chitine, extraite des carapaces de crustacés tels que les crabes et les crevettes.[8]

Les structures de la chitine, du chitosane et de la cellulose diffèrent uniquement au niveau des groupements en position C-2 : hydroxyle pour la cellulose, acétamide pour la chitine et amine pour le chitosane (figure 1.3)

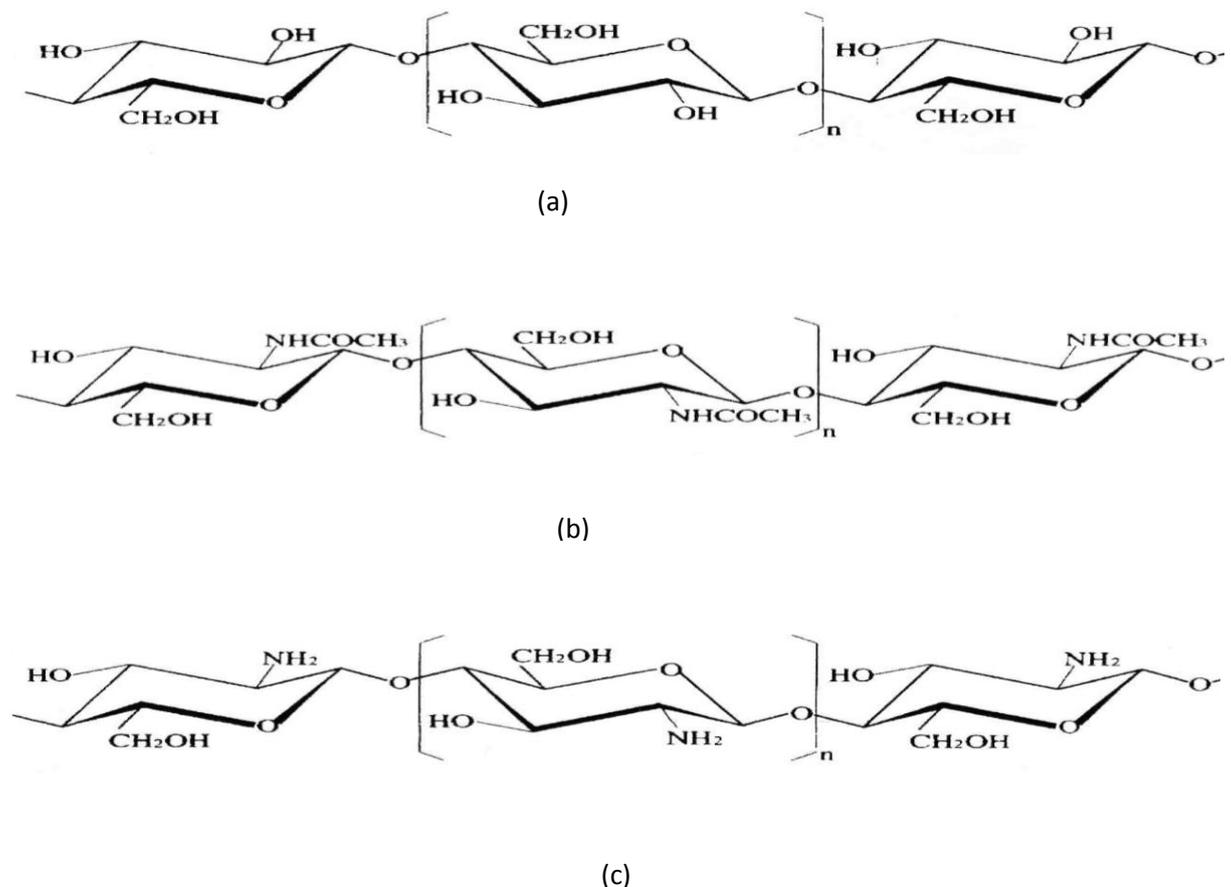


Figure 1.3 : Molécules de la cellulose (a), de la chitine (b) et du chitosane (c).

La chitine (et également le chitosane) est caractérisée par la fraction de groupement N-acétamide résiduels appelée degré d'acétylation, noté DA. Dans le cas du chitosane, on préfère utiliser le pourcentage de désacétylation noté DD, qui correspond à la quantité relative de groupement acétylés retirés à la macromolécule de chitine lors de préparation du chitosane.

Les structures de la chitine et du chitosane sont donc caractérisées par la présence de groupement amine et de groupement acétamide auxquels ils convient d'ajouter la présence de nombreuses fonctions hydroxyle qui confèrent un fort caractère hydrophile notamment au chitosane.

Les polymères de chitine et de chitosane sont également caractérisés par la longueur de leurs chaînes macromoléculaires ou leurs masses moléculaires (MM) exprimé en poids (MM_w) ou en nombre (MM_N). [9]

1.7.2. Histoire de la chitine et du chitosane :

En 1811, Henri Braconnot, directeur du jardin biologique à Nancy, France, isole un produit fibreux à partir de certains champignons. Il observe que cette substance n'est pas soluble dans les solutions aqueuses acides, par exemple l'acide sulfurique.

Une décennie plus tard, la même substance est trouvée dans certains insectes. Ojean en 1823 la nomme « Chitine » (du grec *Khithon* qui signifie enveloppe).

Le chitosane est isolé et identifié pour la première fois sous le nom de « chitine modifiée » en 1859 par C. Rouget qui, après avoir soumis la chitine à un traitement alcalin sous reflux avec une solution concentrée d'hydroxyde de potassium, trouve que le produit ainsi obtenu possède des caractéristiques physico-chimiques bien différentes du polymère naturel dont il est issu. Contrairement à la chitine, ce produit est soluble dans les solutions acides.

Trente-cinq ans plus tard, en 1894, Hoppe-Seyler décrit une procédure permettant d'obtenir, par chauffage à 180°C, la chitine d'origine animale (carapace de crabes, scorpions et araignées). Il trouve un produit soluble dans l'acide

acétique dilué, qu'il n'identifie pas comme étant la « chitine modifiée » découverte par Rouget et crée alors le terme chitosane.

Actuellement, il est connu que la chitine et le chitosane (collectivement appelé les substances chitineuses) sont des sources renouvelables que l'on peut trouver en abondance dans la nature. Ce fait a attiré plus d'intérêt pour le développement de nouvelles applications de ces simples substances. [9]

1.7.3. Source de chitine et chitosane :

La chitine est produite par les insectes (blattes, coléoptères, fourmis), les arachnides (scorpions, araignées), les animaux marins (crabes, crevettes, homards, langoustines, calamars) et les champignons. Dans le règne animal, la chitine est un élément de soutien des téguments de certains invertébrés (insectes, crustacés, mollusques, nématodes).

Le chitosane est une substance très peu rependue dans la nature, elle n'est signalée que dans les exosquelettes de certains insectes et dans les parois cellulaires d'une classe particulière de champignons (les zygomycètes), de bactéries et de levures, il n' y a donc pas de source primaires de chitosane exploitable la production étant assurée par transformation des déchets issus de la pêche. [10]

1.7.4. Caractérisation du chitosane :

❖ Degré de désacétylation :

En pratique, le chitosane et la chitine sont considérés comme des copolymères de même structure chimique globale constitués d'unités N-acétyl-D-glucosamine et D-glucosamine, dont la répartition fixe le DD.

Le paramètre DD est extrêmement important car il influence les propriétés des chaînes macromoléculaires des polymères et leur comportement en solution, à savoir :

- 1) La solubilité du chitosane ;
- 2) La flexibilité des chaînes macromoléculaires ;

- 3) La conformation du polymère ;
- 4) Et donc la viscosité des solutions.

Le DD peut être déterminé par analyse élémentaire (analyse du % d'azote), par titrage potentiométrique ou conductimétrique, par diffraction de RX, par spectrophotométrie FTIR et UV, ou encore par résonance magnétique nucléaire (RMN) liquide ou solide (essentiellement proton ^1H et carbone ^{13}C , voire ^{15}N). La technique infrarouge est la plus adoptée pour une caractérisation rapide et simple, et la technique RMN la plus précise, dès lors que le polymère est parfaitement soluble dans l'eau en présence d'acide chlorhydrique par exemple. [11]

❖ Masse moléculaire :

La seconde caractéristique importante est la masse moléculaire (MM), en masse ou en nombre, ou mieux encore la distribution des masses moléculaires. La détermination de la MM, qui nécessite la mise en solution du polymère, peut se faire par des mesures viscosimétriques ou par chromatographie par perméation de gel (chromatographie d'exclusion stérique) couplée à des techniques de détection comme la mesure de degré de rotation du plan de polarisation de la lumière ou de la diffraction de la lumière. La valeur de la MM d'un chitosane dépend intimement du procédé de fabrication car celui-ci peut induire une dépolymérisation des chaînes macromoléculaires et/ou une dégradation lors de sa production. Les chaînes de chitosane ont des masses très élevées (jusqu'à 1-3MDa dans le cas de produits extraits par des processus contrôlés d'extraction et de désacétylation mais en général, elles sont plus faibles de l'ordre de 100 à 1500KDa ; pour la chitine native, les masses peuvent atteindre plusieurs millions de Daltons).

La MM affecte la solubilité du chitosane et ses propriétés rhéologiques notamment sa viscosité. Elle peut également influencer significativement sur les propriétés du polymère en solution, comme le paramètre DD. Par exemple, la viscosité élevée de la solution peut limiter la possibilité de manipulation des solutions concentrées et d'obtenir des matériaux à forte densité en chitosane. [10]

1.7.5. Propriétés physico-chimiques de chitosane :

Le chitosane est un matériau non poreux ayant des surfaces spécifiques de l'ordre de quelque m^2/g à quelque centaine de m^2/g sous formes physiquement modifiées. C'est un matériau très stable en phase solide (sèche) et il a une conservation quasi infinie. En solution, il est relativement fragile et dégradable. Il possède un degré élevé de réactivité chimique dû à son groupe amine primaire libre qui confère une forte densité de charges positives (transformation de NH_2 en NH_3^+ en milieu acide). [10]

Une autre propriété intéressante du chitosane (et également de la chitine) concerne son aptitude à interagir avec d'autres substances chimiques (ions, molécules, macromolécules) grâce à une structure chimique particulière, qui permet d'entrevoir des capacités à interagir, complexer ou adsorber. Ce comportement est essentiellement attribué :

- Aux propriétés hydrophiles des chaînes macromoléculaires dues à la présence de nombreux groupes hydroxyles des unités glucoses (possibilité de ponts hydrogène et liaisons intra et/ou inter macromoléculaires) ;
- A la présence de groupes fonctionnels (hydroxyle, acétamide et amine) et à leur grande réactivité ;
- A la structure flexible des chaînes de polymère (fonction du pH et de la température).

Le chitosane et la chitine possèdent ainsi des propriétés de rétention d'eau, de chélation d'ions, de complexation et d'adsorption des molécules ou de polymère. Le chitosane montre de plus des propriétés d'adhésion à des surfaces chargées négativement.

Son caractère cationique en milieu acide permet de la fixation des ions comme les colorants anioniques ou les anions métalliques. Cette association sélective avec les espèces anioniques fait du chitosane un excellent agent de floculation dans le traitement des eaux polluées. Il peut aussi former des complexes polyanion-polycation menant à la préparation des membranes. La polycationicité

est d'un grand intérêt puisque les chaînes macromoléculaires de la polyamine sont dotées d'une forte densité de charge positive à l'inverse de la plupart des autres polymères naturels chargés négativement. Cependant, les propriétés du chitosane dépendent fortement du pH. Au-delà d'un pH de 6.5, il précipite et la chaîne macromoléculaire ne comporte plus de groupement ionisé, mais il possède alors de bonnes propriétés chélatantes dues, en particulier au doublet électronique de l'atome d'azote qui devient disponible.

❖ Le chitosane en solution :

Le chitosane se dissout uniquement en milieu acide par protonation des groupes amine présents sur la macromolécule. L'équilibre suivant décrit l'état d'ionisation du polyélectrolyte en solution :



Le pKa du chitosane est approximativement 6,3. Ainsi, lorsque le DD est peu élevé c'est-à dire lorsque les groupements amine sont en petite quantité, le chitosane est peu soluble. En général, on utilise du chitosane avec un DD supérieur à 70 % pour avoir une grande partie soluble.

De même, la conformation des chaînes du polymère en solution et donc la viscosité de ces solutions dépendent du pH et du DD. En effet, ces deux paramètres déterminent la densité de charge sur la chaîne de polymère. Lorsque celle-ci est élevée, les chaînes de polymères sont très étendues et la viscosité est importante. En revanche, lorsque le polymère est peu chargé, les chaînes sont sous forme de pelotes statistiques caractérisées par une faible viscosité. Un certain nombre d'auteurs ont étudié l'effet du pH et du DD sur la viscosité du chitosane en solution [Anthonsen (1993)], [Pa (2001)], [Rinaudo (1999)].[8]

1.7.6. Propriétés biologiques du chitosane:

Plusieurs études sont rapportées, dans la littérature, sur l'usage du chitosane seul ou lié à d'autres polymères synthétiques ou biologiques. Sa biocompatibilité a fait l'objet de plusieurs investigations. Faisant partie des polymères cationiques, le chitosane permettrait la complexation de l'ADN et a le potentiel d'être utilisé en

tant que vecteur non viral pour délivrer des gènes. Cette complexation empêche la dégradation de l'ADN par les ADNases qui sont des enzymes impliquées dans la dégradation de l'ADN (Richardson et al., 1999). De plus, ce dernier a démontré que le chitosane hautement purifié n'est ni toxique, ni hémolytique.

Des fractions de bas poids moléculaire peuvent être administrées en intraveineuse sans engendrer d'accumulation au niveau du foie, ce qui suggère une utilisation en tant que composants pour la libération de gènes.

Les résultats obtenus sur la biocompatibilité sembleraient être liés au degré d'acétylation du chitosane. Hidaka et al. (1999) ont montré que des membranes de chitosane avec un degré de d'acétylation de 35, 30 et 20 % augmentent l'ostéogénèse mais induisent une réaction inflammatoire sévère. Par contre, un degré d'acétylation de 5% induit une réaction inflammatoire moindre et une ostéogénèse plus faible. [7]

❖ Biodégradation :

En général, les polysaccharides sont dégradés par hydrolyse enzymatique. Le chitosane n'échappe pas à ce principe (Hirano et Yagi, 1980). Le chitosane est dégradé par une enzyme spécifique, la chitosanase. L'action de l'enzyme conduit à la production abondante de glucosamine ce qui indique une coupure des liens glycosidiques β -1.4. Des hétéropolysaccharides sont aussi produits consistant en glucosamines et N-acetyl-D-glucosamine (Fukamizo, et al., 1994).

L'utilisation d'agent de réticulation tel que le glutaraldéhyde conduit à une baisse de la biodégradation du chitosane. *In vitro*, le chitosane a montré une libération de 25% seulement de mitoxantrone incorporée après 36 jours. *In vivo*, pas de dégradation significative n'est observée après trois mois d'implantation dans le muscle de rats. Ceci étant dû au durcissement du polymère par la réticulation. (Jameela et Jayakrishnan, 1995).

L'un des moyens qui permettent de contrôler la biodégradation est de varier le degré de substitution. Hirano et al, (1989) ont montré que les dérivés partiellement N-acétylés du chitosane sont plus susceptibles à la digestion par les lysozymes.[7]

1.8. L'encapsulation par le Chitosane :

L'utilisation des microsphères (voir figure 1.4) comme base thérapeutique permet à la libération de principes actifs d'être soigneusement conçu par le choix judicieux d'une formulation préalablement optimisée. En utilisant des technologies innovatrices de microencapsulation, et en variant le rapport de copolymère, le poids moléculaire du polymère, etc., les microsphères peuvent devenir un système de livraison optimal de principe actif qui fournira le profil désiré de dégagement. Les systèmes de microsphères peuvent augmenter la durée et commander la libération des agents bioactifs.

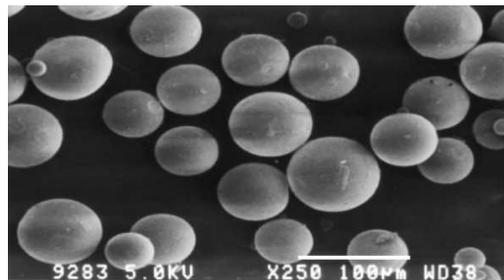


Figure 1.4 : les microparticules de chitosane. [11]

Grâce à leur petite taille, les microsphères ont des grands rapports surface/volume et peuvent être employé pour la libération contrôlée des substances actives insolubles. Actuellement, une recherche étendue est effectuée pour exploiter le chitosane comme un porteur pour atteindre un profil souhaitable à la libération de drogue.

Des microsphères de Chitosane sont employées pour fournir la libération contrôlée d'un certain nombre d'agents thérapeutiques pour améliorer la disponibilité biologique des substances dégradables telles que les protéines ou pour éviter l'augmentation de la dose des substances hydrophiles à travers les couches épithéliales. Ces microsphères sont étudiées pour la livraison parentérale et orale de drogue.

Le Chitosane a été également employé comme porteur potentiel pour des macromolécules pour un profil de libération prolongée et ciblée. On s'attend à ce que des microsphères magnétiques de chitosane utilisées dans la livraison ciblée

soient maintenues aux sites capillaires cibles sous l'influence d'un champ magnétique externe (Gallo et Hassan, 1988). En outre, l'interaction forte entre les microsphères cationiques et les récepteurs glycosaminoglycanes anioniques peut maintenir les microsphères dans la région capillaire (Gallo et Hassan, 1988 ; Hassan et al, 1992). [11]

1.9.Préparation des microparticules de chitosane :

La réaction du chitosane avec des quantités commandées d'anion polyvalent a comme conséquence la réticulation entre les molécules de chitosane. La réticulation peut être réalisée dans les environnements acides, neutres ou de base selon la méthode appliquée. Cette réticulation a été intensivement employée pour la préparation des microsphères de chitosane.

Les processus qui ont été employés pour la préparation des microsphères à base du chitosane sont donnés ci-dessous :

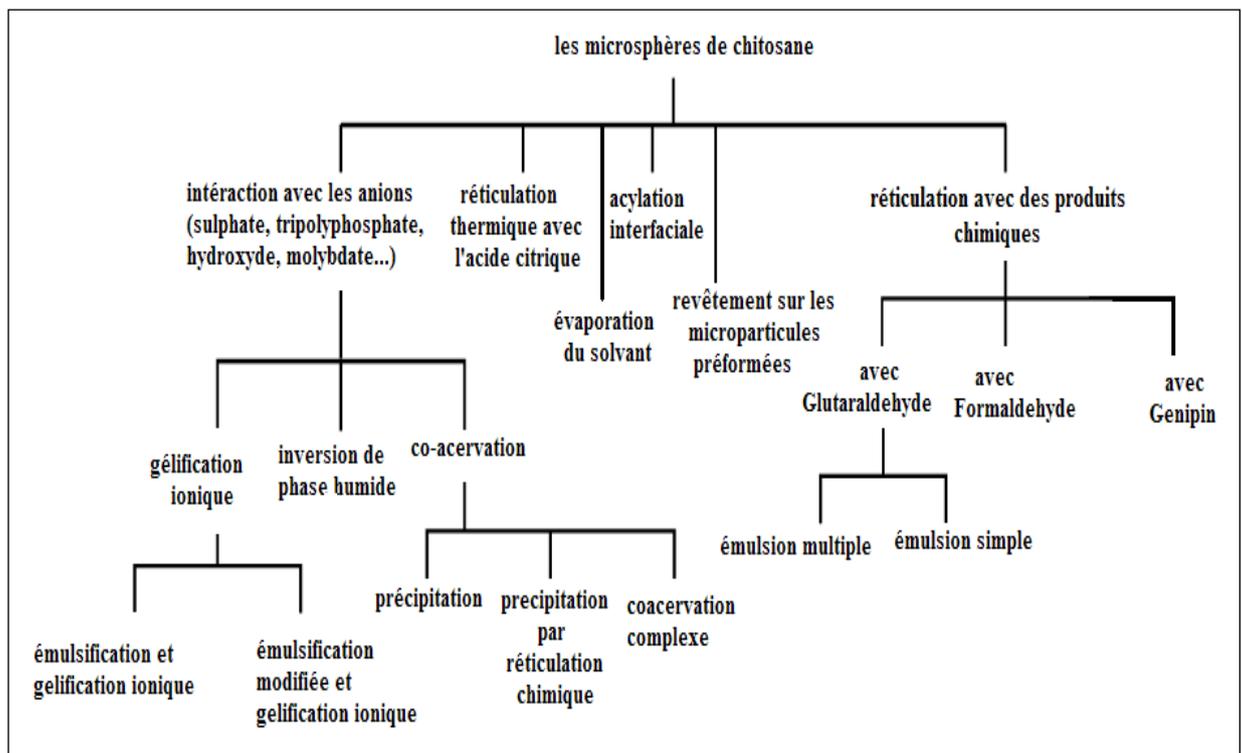


Figure 1.5 : Les diverses méthodes qui ont été employées pour la préparation des microsphères de chitosane. (V.R SINHA et al, 2004).[11]

1.9.1. Interaction avec les anions :

1.9.1.1. Gélification ionique :

Le chitosane peut former des gels physiques par interactions ioniques avec des polyanions de petite ou grande masse molaire (Berger, 2004a, 2004b). Les contre-ions, de petite masse molaire, les plus employés sont le pyrophosphate, le tripolyphosphate (TPP), le tétrapolyphosphate, l'octapolyphosphate, l'hexamétaphosphate, $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ et $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$. Bodmier et Coll, ont été les premiers à étudier la gélification ionotropique du chitosane avec le TPP pour l'encapsulation de médicaments. Le TPP est le polyanion le plus couramment utilisé pour la réticulation ionique du chitosane, comme le calcium pour l'alginate (Aral, 1998), (Lim, 1998). D'autres polyanions de masse molaire élevée sont également utilisés tels que l'acide polyaldéhydecarbonique et le sulfate d'octyle, le sulfate de lauryle, le dioctylsulfosuccinate. Dans ce dernier cas, les interactions hydrophobes qui se mettent en place entre les chaînes alkyle des contre-ions contribuent également au mécanisme de gélification.

Quelle que soit la masse molaire des anions, le processus de gélification est dû à la formation de réticulations ioniques inter- et intramoléculaires (Janes, 2001). Un paramètre important à considérer pour la formation de l'hydrogel est le pH pendant la réaction de réticulation. En effet, si le pH est trop élevé, les charges positives du chitosane sont neutralisées et le système précipite. Afin d'éviter la précipitation du chitosane, le pH de la solution ne doit pas être supérieur à 6.[11]

Une procédure typique de préparation consiste à expulser une solution de chitosane dans l'acide acétique goutte-à-goutte par une aiguille dans différentes concentrations des solutés du tripolyphosphate ou d'un autre anion sous agitation magnétique. Les billes sont enlevées par filtration, lavées avec de l'eau distillée et séchées (Sawayanagi et autres, 1983 ; Kawashima et autres, 1985 a, b ; Nishimura et autres, 1986 ; Bodmeier et autres, 1989a, b ; Bodmeier et Paeratakul, 1989 ; Kim et Rha, 1989a, b ; Shiraishi et autres, 1993 ; Chandy et Sharma, 1991, 1993 ; Blême et autres, 1994 ; Acikgoz et autres, 1995, 1996 ; Sezer et Akbuga, 1995 ; Aydin et Akbuga, 1996). [11]

Dambies et al. (2001) ont préparé des billes de gel de chitosane utilisant le molybdate comme agent de gélification. On a observé que cette nouvelle technique de gélification a mené à une structure différente pendant la coagulation alcaline d'une solution de chitosane. Au lieu d'une morphologie caractérisée par de grands pores ouverts, les billes de gel qu'elles ont produit dans une solution de molybdate, dans les états optima (pH 6 ; la concentration en molybdate, 7 g/l), se sont avérées possédant une structure de double couche correspondre à une couche externe d'épaisseur 100 μm très compacte et à une structure interne de petits pores. [11]

1.9.1.2. Inversion de phase humide :

Dans cette méthode de préparation, la solution de chitosane en acide acétique a été ajoutée dans une solution de tripolyphosphate de sodium par une buse de pulvérisation. Les microsphères formées ont été retenues pour 1h, puis lavées et réticulées avec de 5% d'éthylène-glycol d'éther diglycidyl. En fin, les microsphères ont été lavées et lyophilisées pour former les microsphères poreuses de chitosane (Mi et autres, 1999). Le changement du pH du milieu de coagulation a pu modifier la structure de pore de la microsphère de chitosane. [11]

1.9.1.3. Émulsification et gélification ionique :

Dans cette méthode la phase dispersée, qui se compose d'un soluté de chitosan, est ajoutée à une phase continue non aqueuse (isooctane et surfactant) pour former des émulsions. Hydroxyde de sodium (1N) solution est alors ajouté à différents intervalles menant à la gélification ionique. Les microsphères formées ainsi sont enlevées par filtration, lavées et séchées (Lim et autres, 1997).

Shu et Zhu (2001) ont étudié la possibilité d'interaction de trois genres d'anions (tripolyphosphate, citrate et sulfate) avec le chitosane par titrage turbidimétrique. Les résultats ont indiqué qu'il y a des interactions électrostatiques entre les anions et le chitosane ci-dessus dans une certaine région de la solution pH (1.0-7.5 pour le sulfate/chitosane, 4.5-7.5 pour le citrate/chitosane et 1.9-7.5 pour le tripolyphosphate/chitosane), qui est liée aux caractéristiques normales des anions. Hors de ces régions de pH, aucune microsphère n'a été formée.[11]

Cependant, même dans la région d'interaction de pH, seulement des microparticules irrégulières ont été obtenues dans le cas de l'émulsification conventionnelle et de la méthode gélification ionique, alors que des microsphères sphériques avec des diamètres dans la gamme des dizaines de microns étaient obtenues quand un processus modifié a été utilisé. Le point clé du processus modifié était l'introduction de la gélatine et de permettre au processus de réticulation ionique du chitosane/gélatine sans émulsions d'avoir lieu dans des conditions de coagulation à une basse température. La surface des microsphères réticulées de chitosane/gélatine du sulfate de sodium et les microsphères réticulées de chitosane/gélatine de citrate sodique étaient très lisses, mais de grandes lacunes ont été observées sur la surface des microsphères de tripolyphosphate/chitosane. L'augmentation de la vitesse d'agitation a mené à une diminution de diamètre et à un rétrécissement dans la distribution de grandeurs.[11]

1.9.1.4.Coacervation :

Dans ce processus, le polymère est solubilisé pour former une solution. Ceci est suivi de l'addition d'un corps dissous, qui forme le dérivé insoluble de polymère et précipite le polymère. Ce processus évite l'utilisation des dissolvants organiques toxiques et du glutaraldéhyde utilisés dans les autres méthodes de préparation des microsphères de chitosane.

Berthold et al (1996a) a préparé des microsphères de chitosane chargé de prednisolone phosphate de sodium utilisant le sulfate de sodium comme précipitant. L'addition du sulfate de sodium à la solution du chitosane en acide acétique a eu comme conséquence la diminution de la solubilité du chitosane, menant à la précipitation du chitosane comme dérivé médiocrement soluble.[11]

1.9.1.5.Coacervation-complexe :

L'Alginate de sodium, le carboxyméthylcellulose sodique, le κ -carregeenan et l'acide polyacrylique de sodium peuvent être employés pour la coacervation complexe avec le chitosane pour former des microsphères. Ces microparticules sont constituées par interaction inter-ionique entre les polymères à charges opposées. La formulation des capsules du chitosan-alginate et de

chitosan-κ-carraghénane a été effectuée par l'interaction des solutions mentionnées ci-dessus avec du chlorure de calcium et le chlorure de potassium, respectivement. Les capsules obtenues ont été durcies dans la solution de précipitation avant le lavage et le séchage (Daly et Knorr, 1988; Ohtakara et autres, 1989a, b; Nishioka et autres, 1990; Li et autres, 1991; Pandya et Knorr, 1991; Ohya et autres, 1993).

Chellat et autres (2000) ont préparé des microsphères d'un hydrogel complexe de polyélectrolyte de chitosan et de xanthane après interaction poly-ionique entre les deux polymères. Les résultats ont suggéré une meilleure commande de la cinétique de dégradation quand le chitosane était complexé au xanthane. [11]

1.9.2.Réticulation par des produits chimiques :

1.9.2.1.Émulsion-réticulation :

Dans ce processus, la solution de chitosane (dans l'acide acétique) est ajoutée à la paraffine liquide contenant un agent tensio-actif ayant pour résultat la formation d'une émulsion E/H. Un agent de réticulation de quantité variable est ajouté selon la densité de réticulation priée (Thanoo et autres, 1992; Jameela et Jayakrishnan, 1995; Akbuga et Bergisadi, 1996, 1999; Al-Helw et autres, 1998; Jameela et autres, 1998; Denkbass et autres, 1999).

Les microsphères formées sont filtrées, lavées avec des dissolvants appropriés et séchées. La littérature abonde en rapports où des microsphères de chitosane ont été préparées par la réticulation au glutaraldéhyde. On signale que la réticulation au glutaraldéhyde mène à la formation des microsphères avec la surface rêche qui peut être améliorée en employant le glutaraldéhyde saturé par le toluène (Gohel et autres, 1994).[11]

1.9.2.2.Emulsion multiple :

Les substances actives insolubles dans l'eau sont simplement dispersées dans la solution de chitosane et enfermées par le processus d'émulsion-réticulation. Cette méthode implique la formation de l'émulsion primaire (H/E) (solution non aqueuse du PA dans la solution de chitosane), puis l'addition de l'émulsion

primaire à la phase huileuse externe pour former l'émulsion d'H/E/H a suivi de l'addition du glutaraldéhyde (agent réticulant) et, en fin, l'évaporation du dissolvant organique (Pavanetto et autres, 1996). Les microsphères de Chitosane, préparées par la méthode d'émulsion multiple, ont un bon caractère morphologique et un rendement satisfaisant à la production. [11]

1.9.2.3.Précipitation- Réticulation par des produits chimiques :

Ce processus implique la précipitation du polymère suivi de la réticulation chimique. La précipitation peut être faite par le sulfate de sodium suivi du produit chimique réticulant utilisant le glutaraldéhyde (Berthold et autres, 1996b) ou le formaldéhyde.

Dans une étude réalisée par Aggarwal et al (2001), un soluté du chitosane (3% (poids/volume) dans l'acide acétique à 4% (v/v)) a été ajouté sous agitation moyenne pour obtenir la microsphère humide, qui a été alors filtrée, lavée et finalement séchée à la température ambiante.

Une étude réalisée par EL-Shafy et al (2000), a indiqué que la technique d'émulsification dissolvante (E/H) peut également être employée pour préparer des microsphères utilisant la chaleur en tant qu'agent de réticulation évitant, de ce fait, l'utilisation d'un produit chimique.[11]

1.9.3.Autres méthodes :

En plus de l'utilisation des agents de réticulation cités ci-dessus, d'autres processus de microencapsulation ont été rapportés pour la préparation des microsphères utilisant les propriétés de gélification du chitosane. Ces processus sont décrits dans les sections suivantes.

1.9.3.1.Réticulation thermique :

Orienti et al, (1996) ont préparées des microsphères de chitosane chargées d'indométacines par la réticulation thermique utilisant l'acide citrique. Des solutions de Chitosane de concentration variables ont été préparées, avec un rapport molaire constant du chitosan/ acide citrique. Les solutions ci-dessus de

réticulation de chitosane ont été alors refroidies à 0 °C et ajoutées à l'huile de maïs suivie de la réticulation thermique à 120 °C. [11]

1.9.3.2.Évaporation du solvant :

Cette méthode implique la formation d'une émulsion entre la solution de polymère et une phase continue non-miscible aqueux (H/E) ou non aqueux (E/H). Lim et al (2000) ont étudié la comparaison des microsphères mucoadhesives de l'acide hyaluronique et du glutamate de chitosane et d'une combinaison entre les deux, préparés par la méthode d'évaporation du solvant avec des microcapsules d'acide hyaluronique et de gélatine préparés par coacervation complexe.

Bogataj et al (2000) ont préparé la microsphère par la méthode d'évaporation du solvant utilisant le système paraffine/acétone comme dissolvants. La solution de principe actif (dans l'acétone) a été dispersée dans la solution de chitosane et ce mélange a été émulsionné en paraffine liquide et remuée. La suspension des microsphères a été filtrée, lavée et séchée. [11]

1.9.3.3.Acylation interfaciale :

Des microsphères de Chitosane contenant l'oxytétracycline ont été préparées par les méthodes d'atomisation-durcissement et d'acylation interfaciale (Mi et autres, 1997). L'objectif de cette étude était de préparer des microsphères chargées d'oxytétracycline pour l'administration par voie orale et injectable utilisant le chitosane de différent poids moléculaire (70.000-2.000.000). Par la méthode d'atomisation-durcissement, les microsphères avec des dimensions des particules entre 5 et 30 µm ont pu être obtenues. D'une part, des microsphères de chitosane avec la capacité de prolonger la période de dissolution de l'oxytétracycline dans le milieu de pH faible ont été préparées par la méthode d'acylation interfaciale. Le résultat a indiqué que le dégagement de l'oxytétracycline de diverses microsphères acylés de chitosane a été diminué avec l'augmentation du poids moléculaire du chitosane. [11]

CHAPITRE 2

LA LIBERATION D'UNE MATIERE ACTIVE :

2.1. Introduction:

Pendant les dernières années, le développement de technologie pharmaceutique moderne et la croissance de l'industrie de biotechnologie ont révolutionné l'approche à la découverte et au développement de médicament.

Le développement des systèmes de libération contrôlée de médicaments comporte une approche interdisciplinaire impliquant la contribution de la chimie, de la science des matériaux, de la technologie, de la pharmacologie et d'autres sciences biologiques. [12]

Un système de libération contrôlée de médicament devrait réaliser les avantages suivants [13]:

- Maintenir une concentration thérapeutique optimale de médicament dans le sang avec un minimum de fluctuation.
- Assurer un taux de libération prévisible et reproductible pour une durée prolongée.
- Améliorer l'activité des médicaments de courte demi-vie.
- Offrir une thérapie optimisée avec une meilleure conformité.

2.2. La libération contrôlée d'un principe actif :

Par définition, le rôle d'un système à libération contrôlée est de délivrer la bonne quantité d'un principe actif, au bon endroit et au bon moment. En effet, la voie et le mode d'administration, la durée et le site d'action de l'agent sont autant de facteurs à considérer.

Ils comprennent les systèmes à libération prolongée, à libération retardée et à libération séquentielle. Sous l'expression «forme à libération modifiée» (modified

release dosage forms), on distingue les formes à libération retardée (delayed release dosage forms) qui retardent la libération et les formes à libération ralentie (extended release dosage forms) qui prolongent ou ralentissent la libération. Les formes à libération modifiée sont celles dont la vitesse de libération est modifiée par rapport à la vitesse de libération immédiate ou conventionnelle. [13]

De point de vue pharmacocinétique, avec une formulation conventionnelle, la molécule est libérée immédiatement entraînant un pic sérique élevé voire toxique. Ensuite, la concentration décline plus ou moins rapidement en fonction du point de vue pharmacocinétique (figure 2.1), avec une formulation convenmétabolisme de la molécule, ce qui peut donner lieu à une période d'inefficacité jusqu'à l'administration suivante du médicament. Le seul moyen d'éliminer les pics et les creux des concentrations plasmatiques d'une thérapie conventionnelle, était une perfusion intraveineuse permanente. Par contre un système à libération contrôlée permet de maintenir la concentration sérique d'un principe actif, incluse dans sa marge thérapeutique, sur une longue période et avec une seule administration.[13]

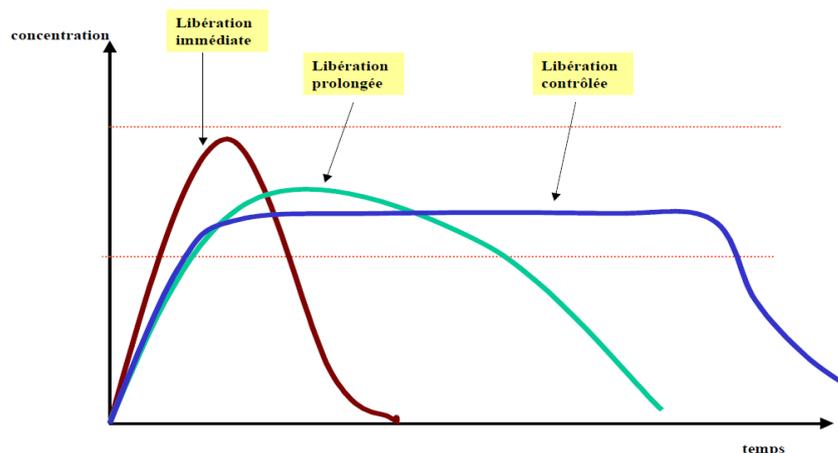


Figure 2.1: Représentation des différents profils de libération : immédiate, prolongée et contrôlée d'un principe actif. [14]

La libération contrôlée d'un médicament se produit quand un polymère (naturel ou synthétique) est judicieusement combiné à un principe actif de façon que ce dernier soit libéré par le polymère dans des conditions préétablies. Cette libération peut être constante, cyclique par l'environnement ou par des événements

externes. Dans tout les cas, le but de la libération contrôlée est double [13], il doit permettre :

- D'augmenter la durée d'action du principe actif en maintenant sa concentration dans l'organisme supérieure à la concentration minimale efficace, le plus longtemps possible.
- De diminuer la toxicité du produit en réduisant la hauteur du pic de concentration dans l'organisme.

2.3.Généralités sur les formes matricielles :

Les matrices sont donc des supports constitués d'excipients physiologiquement tolérés, plus ou moins inertes et formant un réseau destiné à piéger le principe actif d'une manière uniforme et résistant à la désagrégation. Elles sont surtout monolithiques (comprimés, capsules), mais aussi multi-particulaires (granulés, mini-granules, microsphères et mini-comprimés).

Le principe actif peut être dissous à l'état moléculaire ou dispersé à l'état particulaire dans le support matriciel. Il peut y avoir un équilibre entre ces deux états du principe actif dans des proportions dépendant de sa solubilité dans le support matriciel. Les matrices sont caractérisées par la présence d'une dose unique du principe actif, l'effet initial étant obtenu par dissolution rapide du principe actif en surface. Sa libération se fait ensuite par épuisement progressif de la matrice.

En ce qui concerne le comportement des matrices formées en contact avec le milieu, c'est leur résistance à la désagrégation qui semble en premier responsable de la prolongation de la libération du principe actif. Donc un système matriciel ne doit pas se désagréger. Par contre, son volume peut augmenter par gonflement en contact avec le milieu ou peut encore diminuer par érosion en fonction de la nature de l'agent matriciel.

Les matrices peuvent être destinées à toutes les voies principales d'administration. Mais, c'est pour la voie orale qu'elles sont les plus utilisées. Le mode de libération du principe actif à partir de la matrice dépend de sa nature : il

peut intervenir par diffusion, par érosion ou par gonflement. Il arrive aussi que deux mécanismes interviennent simultanément [14].

La classification qui a été le plus souvent citée par plusieurs auteurs, est celle qui est basée sur la nature de l'agent matriciel. Ainsi, les matrices sont classées en trois catégories :

- les matrices inertes ;
- les matrices hydrophiles ;
- les matrices lipidiques.

Brossard (2000) a proposé une classification plus détaillée; elle est basée sur la nature de l'agent matriciel constituant le squelette de la matrice ainsi que sur le comportement de celle-ci au contact du milieu ou des liquides digestifs.[14]

Selon cette classification on peut distinguer trois grandes catégories de matrices :

- Les matrices inertes

- Matrices minérales
- Matrices plastiques

- Les matrices hydrophiles

- Les matrices érodables

- Matrices lipidiques
- Matrices polymériques

2.3.1. Les matrices inertes :

Les matrices inertes, appelées également insolubles ou de façon parfois incorrecte plastiques, sont constituées d'un support insoluble formant un réseau poreux dans lequel est dispersé le principe actif. Elles sont caractérisées par le fait qu'elles ne subissent pas de modification de forme lors du transit gastro-intestinal.

Elles assurent une libération prolongée grâce à leur structure poreuse qui est un élément structurel de la forme galénique (squelette insoluble) et à un mécanisme de libération du principe actif indépendant des conditions extérieures et donc très peu influencé par les variables physiologiques. Il est possible de

moduler la vitesse de libération en changeant simplement la structure poreuse de la matrice.

La libération du principe actif à partir de la matrice se fait d'abord par la libération plus ou moins importante d'une dose initiale de surface ensuite par l'épuisement graduel de la matrice en principe actif.

La libération peut être schématisée en trois étapes :

1. pénétration par capillarité du fluide environnant ou des liquides digestifs à travers la poudre médicamenteuse dispersée dans le réseau poreux de la matrice,
2. dissolution progressive du principe actif,
3. diffusion lente de la solution vers l'extérieur le long des canalicules de la matrice poreuse.

Parmi ces trois étapes qui ont lieu de façon concomitante, la dernière constitue le plus souvent l'étape contrôlant la cinétique de libération comme le décrit Higuchi (1969) pour les matrices dites granulaires ou hétérogènes. [14]

2.3.2. Les matrices minérales :

Les matrices minérales d'emploi assez rare, sont généralement constituées d'un excipient pulvérulent d'origine minérale en forte proportion, le ciment. Ce dernier assure l'inclusion du principe actif par durcissement au cours de la formation de la matrice.

Les matrices minérales sont composées d'au moins deux éléments structurels :

- Un excipient pulvérulent d'origine minérale qui représente l'agent matriciel : il peut s'agir par exemple de sulfate de calcium et de phosphate de calcium anhydres ou de talc. Ils donnent en présence d'eau un hydrate de consistance dure. Des silicates mixtes d'aluminium et de magnésium ainsi que le talc peuvent être également employés ;

- Un liant afin de permettre la formation du squelette de la matrice tel que l'éthylcellulose ou la polyvinylpyrrolidone. Ce liant permet la cohésion de la matrice. [14]

2.3.3. Les matrices plastiques :

Les matrices plastiques sont essentiellement composées de polymères thermoplastiques insolubles qui doivent répondre à des critères plus spécifiques. Ces polymères doivent être totalement inertes, non digestibles et insolubles dans les fluides du tractus gastro-intestinal, non réactifs avec le principe actif et les autres adjuvants.

Ils doivent pouvoir former après compression une structure poreuse, mais cohérente et de plus ne pas présenter de toxicité, notamment celle qui serait liée aux additifs utilisés lors de leur synthèse qui peuvent être extraits en contact des sucs digestifs et qui peuvent ainsi être susceptibles de créer des irritations gastriques. Parmi les polymères utilisés on peut citer l'éthylcellulose, les copolymères méthacryliques (Eudragit insolubles), les chlorures et acétate de polyvinyle...etc.

La vitesse de libération du principe actif à partir des matrices plastiques dépend essentiellement en plus des caractéristiques propres du principe actif, de la mouillabilité du polymère, ainsi que de la porosité et de la tortuosité du support du constituant la matrice. [14]

2.3.4. Les matrices hydrophiles :

Les matrices hydrophiles sont des comprimés à libération prolongée constitués du mélange d'un ou de plusieurs principes actifs avec un agent gélifiant. Elles se distinguent donc des précédentes par le fait qu'elles gonflent après hydratation par les liquides digestifs en raison de la présence du polymère hydrophile doué de propriétés gélifiantes.

Au contact de l'eau ou des liquides digestifs, une fraction du principe actif est rapidement dissoute. Puis le polymère s'hydrate et se gélifie en formant une

couche visqueuse à travers laquelle l'eau continue à pénétrer dans la matrice. Au fur et à mesure du processus d'hydratation, la matrice augmente de dimension et traverse le tractus gastro-intestinal sans se désagréger. La barrière gélifiée formée contrôle la pénétration de l'eau de l'extérieur vers l'intérieur et s'oppose à la libération rapide du principe actif. Le principe actif est libéré par diffusion après sa dissolution. Donc après dissolution du principe actif, celui-ci diffuse à travers la barrière gélifiée vers l'extérieur de la matrice. Au cours du transit gastro-intestinal, comme il a été dit précédemment, la matrice hydratée gonfle progressivement, ne se désagrège pas mais peut s'éroder partiellement.[14]

2.3.5. Les Matrices érodables :

Les matrices érodables se différencient des matrices inertes et hydrophiles par le simple fait qu'elles subissent une certaine érosion lors de leur transit gastro-intestinal. Cette érosion est due à la composition de la matrice, c'est-à-dire la nature de l'agent matriciel qui subit l'action des enzymes et/ou du pH des sucs digestifs.

En fonction de la nature de celui-ci on distingue deux catégories de matrices à érosion lente, ce sont les matrices lipidiques et les matrices polymériques.[14]

2.3.6 . Les matrices lipidiques :

Les matrices lipidiques, improprement appelées matrices hydrophobes ou encore cireuses, sont des matrices constituées de corps gras qui subissent une érosion lente due à l'action de la lipase pancréatique. La libération du principe actif à partir de la matrice dépend de la composition enzymatique des liquides digestifs. La nature des corps gras constituant la matrice, peut aussi avoir une influence sur la vitesse et le lieu de l'érosion.

Les différentes substances lipidiques utilisées sont surtout des glycérides dont certains sont utilisés comme lubrifiants dans la fabrication des comprimés conventionnels, des acides et alcools gras (acide stéarique, alcool stéarylique) et des cires (cires blanche et de carnauba).[14]

2.3.7. Les matrices polymériques :

Les matrices érodables polymériques sont en général composées de polymères de solubilité pH dépendante tels que les polymères gastro-résistants utilisés en enrobage par film. Ils permettent d'obtenir des matrices à érosion lente et peu sensibles aux variations de pH des liquides digestifs.

Les principaux polymères gastro-résistants sont l'acétylphtalate de cellulose, les phtalates de l'hydroxypropylméthylcellulose, les copolymères méthacryliques...etc. Des polymères solubles peuvent également réaliser des matrices érodables (tels que le polyvinylpyrrolidone ou le copolymère de vinylpyrrolidone et d'acétate de vinyle). La libération du principe actif à partir de la matrice érodable résulte à la fois de l'érosion se produisant à la surface du comprimé et de la diffusion du principe actif à l'intérieur de la matrice [14].

2.4.Cinétique de libération du principe actif :

Lorsque l'on considère les interactions matière active/milieu extérieur, les microparticules peuvent être classées en deux catégories : celles qui ne doivent pas libérer leur contenu telles que les microréacteurs contenant des enzymes ou des bactéries, et celles qui sont formulées de façon à libérer la matière active encapsulée.[15]

Dans ce dernier cas, il faut distinguer les systèmes à **libération déclenchée** des systèmes à **libération prolongée** (figure 2.2).

- Les systèmes à **libération déclenchée** sont généralement des microcapsules formées d'une membrane étanche, qui vont libérer brutalement leur contenu par éclatement sous l'effet d'une pression (mécanique ou osmotique) ou par fusion sous l'effet de la température. De nombreux exemples de systèmes sensibles à la pression se rencontrent dans les domaines de la papeterie et de la visserie.
- Les systèmes à **libération prolongée** se distinguent les uns des autres par les mécanismes de libération mis en jeu (diffusion passive, dégradation/dissolution du matériau enrobant, échange d'ions...) et par leur structure (microcapsule ou microsphère) qui va directement influencer sur la

cinétique de libération résultante. Ainsi, pour des microparticules libérant leur contenu selon un mécanisme de diffusion passive à travers le matériau enrobant (lois de Fick), les profils de libération peuvent être très différents (figure 3).

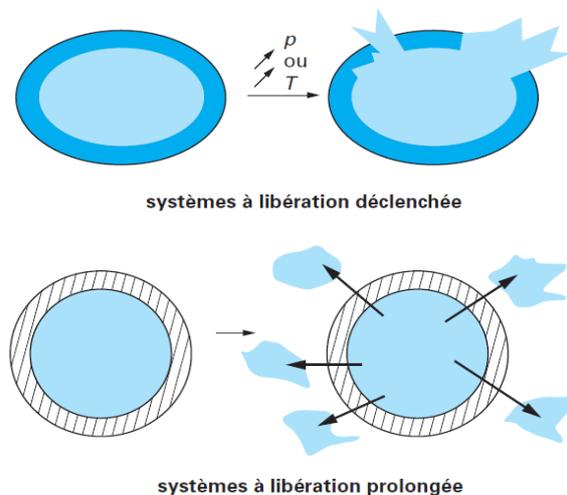


Figure 2.2: les systèmes à libération déclenchée et prolongée. [15]

À partir de microcapsules, on peut obtenir des cinétiques de libération d'ordre 0 ou d'ordre 1 (profils A et D), en fonction de la solubilité dans l'eau de la matière active. Les cinétiques d'ordre 0 peuvent être modifiées dans leur phase initiale : soit la vitesse de libération est exagérément marquée (burst effect) en raison de la présence d'un excès de matière active dans la membrane (profil B), soit un temps de latence précède la libération, temps nécessaire par exemple pour que le principe actif diffuse à travers la membrane, avant d'atteindre le milieu extérieur (profil C). [15]

À partir de microsphères, le phénomène de diffusion de la molécule active à travers une matrice sera décrit par une cinétique obéissant à la loi d'Higuchi (profil E). Dans sa forme simplifiée (modèle planaire), la loi d'Higuchi montre que la quantité libérée de matière active est directement proportionnelle à la racine carrée du temps. Les microparticules à libération prolongée sont très largement utilisées dans les domaines agroalimentaire et pharmaceutique.

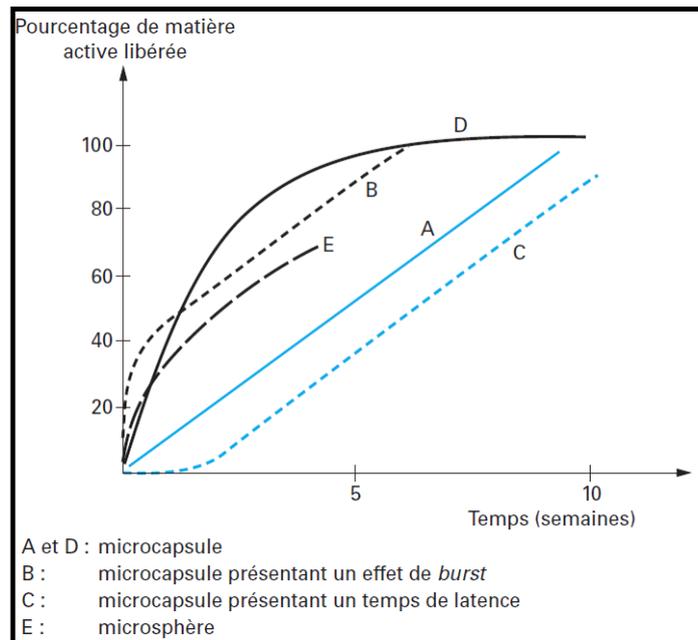


Figure 2.3 : Profils de libération obtenus à partir de différents types de microparticules. [15]

Le but de la libération contrôlée est de délivrer une ou plusieurs molécules à une vitesse spécifiée, pendant une durée donnée. Cette libération peut être massive et rapide (échelle de temps de l'ordre de la seconde) où très progressive (semaine, mois). Ce mode de libération est utilisé dans un certain nombre d'applications notamment dans les parfums, désodorisants, arômes, produits pharmaceutiques, pesticides, lessives, soin de peau...etc. Les cinétiques de libération sont de trois types : cinétique en ordre 0 (c'est la cinétique objectif), cinétique en $t^{1/2}$ (processus diffusif) ou cinétique d'ordre 1 (solubilisation) (Smith et Herbig, 1992).[6]

Les cinétiques de libérations peuvent être modulées par les propriétés des polymères. Ainsi, d'après Baker et Lansdale (1974), un système est d'autant plus perméable que :

- La température de transition vitreuse du polymère utilisée est faible (les élastomères sont plus perméable que les polymères vitreux).
- Le taux de cristallinité du polymère est faible (les cristallites jouent le rôle d'obstacle diffusionnel).
- Le taux de réticulation du polymère est faible.

- Le polymère et l'agent actif sont similaires sur le plan chimique (paramètre de solubilité proche, en première approche).

D'après Smith et Herbig (1992) et Baker et Lansdale (1974) ; les principaux facteurs d'influence sur la cinétique de libération du principe actif sont les suivant [6]:

- Caractéristiques intrinsèques de la membrane polymère (taille et épaisseur, structure chimique, propriétés mécaniques, porosité et cristallinité).
- Caractéristiques externes et du milieu extérieur (pH, humidité et température).
- Caractéristiques intrinsèques de la phase interne (pression de vapeur, paramètres de solubilité, température de fusion et d'évaporation).

2.4.1. Systèmes réservoirs ou microcapsules :

La microcapsule est constituée d'une phase interne contenant la substance à libérer en solution entourée d'une peau dense de polymère. La membrane qui va contrôler la vitesse de libération peut aussi bien être une membrane dense qu'une membrane microporeuse. Il est nécessaire de maintenir les conditions constantes aux interfaces ainsi que l'intégrité du film.[6]

Soit C_{int} et C_{ext} respectivement la concentration à l'intérieur et à l'extérieur des capsules, deux cas se présentent :

- **La concentration en principe actif à l'intérieur de la capsule reste constante : Régime permanent ou stationnaire, $C_{int} \gg C_{ext}$**

Ceci est valable en début de processus, pour un soluté pur une solution interne maintenue saturée. Dans ce cas, la cinétique de libération pour une géométrie sphérique est (Yang et Washington, 2006; Baker et Lonsdale, 1974) :

$$\frac{dM_t}{dt} = 4\pi DK \frac{\Delta c \cdot R_{ext} \cdot R_{int}}{R_{ext} - R_{int}}$$

Où M_t est la masse d'agent actif libérée à t (g), R_{int} le rayon interne (m), R_{ext} le rayon externe (m), DK est la perméabilité ($m^2.s^{-1}$) et Δc la variation de concentration entre l'intérieur et l'extérieur de la capsule.[6]

➤ **La concentration en principe actif à l'intérieur de la capsule varie au cours du temps : Régime non permanent**

Le profil de concentration dans le film va alors décroître au cours du temps selon une cinétique d'ordre 1. Si la perméabilité est constante, la cinétique est de la forme (Baker et Lonsdale, 1974) :

$$\frac{dM_t}{dt} = \frac{C_0 A_S DK}{L} \exp\left(-\frac{A_S DK t}{V_R L}\right)$$

Où M_t est la masse d'agent actif libérée à t (g), V_R le volume du réservoir interne (m^3), A_S la surface développée (m^2), L l'épaisseur caractéristique (m), DK la perméabilité de la membrane ($m^2.s^{-1}$) et C_0 la concentration à l'intérieur de la capsule à $t=0$ ($g.m^{-3}$).[6]

2.4.2.Systèmes matriciels ou microsphères :

Trois de systèmes matriciels peuvent être identifiés :

- Les systèmes matriciels avec agent actif dissous,
- Les systèmes matriciels avec une faible charge d'agent actif dispersé,
- Les matriciels avec une forte charge d'agent actif dispersé.

Dans le cas des systèmes matriciels, l'eau peut intervenir comme une aide à la libération du principe actif. En effet, l'eau peut permettre le gonflement de la matrice de polymère et le principe pourra être libéré de façon beaucoup plus rapide dans le cas de matrice non gonflée.

Par contre, la cinétique de libération est de décroissante au cours du temps, car le chemin diffusionnel augmente pour le principe actif. La cinétique, pour un système matriciel, dépend moins de la dégradation structurelle de la particule comparativement aux microcapsules. [6]

2.4.2.1. Equations relatives aux systèmes dispersés :

Pour les systèmes dispersés contenant moins de 20% d'agent actif, la cinétique est en $t^{1/2}$ tant qu'il reste de l'agent actif non dissous dans la matrice. Il faut tenir compte de l'hétérogénéité de la diffusion. Pour une particule sphérique, nous avons (Baker et Lonsdale, 1974) :

$$\frac{dM_t}{dt} = - \frac{3M_\infty D c_{ms}}{R_{ext}^2 c_\infty} \left(\frac{\left(1 - M_t/M_\infty\right)^{1/3}}{1 - \left(1 - M_t/M_\infty\right)^{1/3}} \right)$$

Avec c_∞ la concentration initiale totale en agent actif dans la matrice (dispersé et dissous) ($g.m^{-3}$), M_t la masse d'agent actif libérée à $t(g)$, R_{ext} le rayon de la microsphère, D le coefficient de diffusion ($m^2.s^{-1}$) et M_∞ la masse totale d'agent actif (g).[6]

Une fois tout l'agent actif dissous, le système se comporte alors comme un système dissous.

2.4.2.2. Equations relatives aux systèmes dissous :

En général, la libération jusqu'à 60% de substance active suit une cinétique en $t^{1/2}$, alors que la libération durant les derniers pourcents suit plutôt une cinétique d'ordre 1. Il est donc possible de distinguer deux tronçons de courbes : un pour $M_t/M_\infty < 0,6$ (temps courts) et un pour $M_t/M_\infty > 0,4$ (temps longs).

M_∞ est ici la masse totale d'agent actif, c'est-à-dire la quantité de départ d'agent actif dans la microsphère et donc la quantité qui serait libérée au bout d'un temps infini. Elle dépend donc la solubilité thermodynamique de la substance active dans la matrice polymère. Les formules permettant d'obtenir la cinétique de l'agent dans le cas d'une microsphères (sphérique) sont (Smith et Herbig, 1992) :

$$\frac{M_t}{M_\infty} < 0,6 \quad \frac{dM_t}{dt} = 3M_\infty \left(\frac{D_{PA}}{R_{ext}^2 \pi t} \right)^{1/2} - \frac{3M_\infty D_{PA}}{R_{ext}^2}$$

$$\frac{M_t}{M_\infty} > 0,4 \quad \frac{dM_t}{dt} = \frac{6M_\infty D_{PA}}{R_{ext}^2} \exp\left(-\frac{\pi^2 D_{PA} t}{R_{ext}^2}\right)$$

Avec M_t la masse d'agent actif libérée à t (g), R_{ext} le rayon de la microsphère (m), D_{PA} le coefficient de diffusion ($m^2.s^{-1}$), M_∞ la masse totale d'agent actif (g). Ces formules correspondent à des approximations numériques de la courbe. L'hypothèse d'un volume infini est faite afin que la condition aux limites reste constante.[6]

CHAPITRE 3

PREPARATION, CARACTERISATION ET LIBERATION IN VITRO DE L'OXYTETRACYCLINE A PARTIR DES SPHERES DU CHITOSANE :

La microencapsulation, permet aux principes actifs d'atteindre dans les meilleures conditions possibles les points cibles où leur efficacité sera maximale. Dans cette perspective de protection et d'aide à la vectorisation, la microencapsulation se présente comme une réponse à la fois logique et performante : elle consiste à encapsuler à l'intérieur d'une enveloppe le contenu que l'on souhaite protéger et dont on veut maîtriser la libération.[16]

Le chitosane est un biopolymère potentiellement utilisable dans le domaine pharmaceutique grâce à ses caractéristiques. Le présent travail décrit la préparation et l'évaluation *in vitro* de systèmes pharmaceutiques microparticulaires à base de chitosan. Des microsphères de chitosane vides et chargées de principe actif ont été préparées par la méthode de la coacervation en suivant deux procédés différents : le procédé du mélange initial et celui de l'absorption.

Avant de commencer les travaux sur le chitosane, il est nécessaire de déterminer les caractéristiques physico-chimiques du chitosane utilisé. Une analyse structurale par FTIR est effectuée.

Tous les autres produits utilisés dans ce travail sont de qualité analytique de source Aldrich et Fluka, ils ont été utilisés tels quels sans aucune purification.

3.1. caractérisation du chitosan :

➤ Analyse structurale :

Le spectre FTIR du chitosane montre une bande d'adsorption importante observée à $1033,8 \text{ cm}^{-1}$ et un pic à 1250 cm^{-1} qui représentent les groupements amines primaires libres. Des pics d'adsorption à $1544,9 \text{ cm}^{-1}$ et en 1654 cm^{-1} représentent les groupements amides primaires et secondaires, qui confirment que le chitosan n'est pas entièrement désacétylé. Un pic d'adsorption à $3452,5 \text{ cm}^{-1}$ représente l'élongation de la liaison $-\text{OH}$. Un pic à $2883,4 \text{ cm}^{-1}$ représente l'élongation de la liaison C-H aliphatique. Un pic à $894,9 \text{ cm}^{-1}$ représente l'élongation de la liaison C-O.

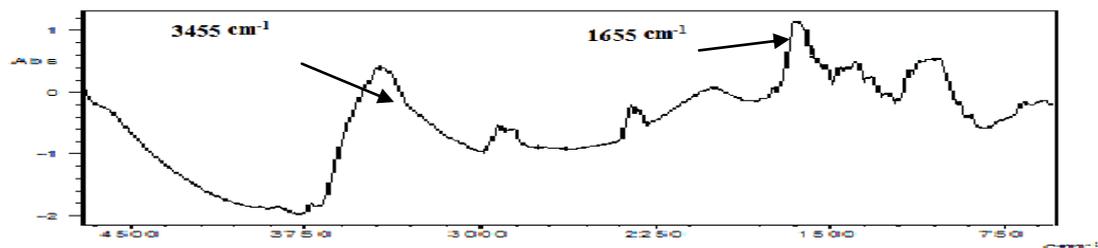


Figure 3.1 : spectre FTIR du chitosane.

➤ Degré de désacétylation :

Diverses méthodes ont été rapportées pour la détermination du degré de désacétylation du chitosan. Le titrage potentiométrique, la spectroscopie infrarouge et la spectrophotométrie UV-Vis sont des méthodes les plus citées [17],[18] et [19]. Les expériences sont réalisées au laboratoire d'analyse physico-chimique du département de chimie industrielle à l'université de Blida en utilisant un spectrophotomètre à transformée de fourrier (FTIR-8900, SHIMADZU).

Des échantillons de Chitosane ont été préparés selon la technique des disques de KBr d'où le rapport polymère : KBr égale à 1 :100. Le polymère et le KBr sont placés dans un four à 80°C pendant 24h avant l'analyse (S.M.Taghizadeh, G Davari ; (2006)). [20]

L'équation de calcul pour la ligne de base est donnée ci-dessous :

$$DD = 100 - [(A_{1655} / A_{3450}) \times 100 / 1.33]$$

Où A_{1655} et A_{3450} étaient l'absorbance à 1655 cm^{-1} de la bande amide primaire pour mesurer le contenu de groupe de N-acétyl et de 3450 cm^{-1} de la bande d'hydroxyle comme norme interne pour corriger l'épaisseur de film ou pour les différences de la concentration de poudre de chitosane. Le facteur « 1.33 » représente la valeur du rapport d' A_{1655} / A_{3450} pour le chitosane entièrement N-acétylé.

Résultat : $A_{1655} = 0.149$; $A_{3450} = 0.335$;

D'où **DD = 66.55%**.

3.2. Préparation des sphères du chitosane :

➤ Microparticules à vide :

Les billes du chitosane sont préparées par la méthode de la coacervation simple. Une solution du chitosane (2% en poids) préparée dans une solution de 1% d'acide acétique a été égouttée, à l'aide d'une seringue, dans différentes solutions de gélification, maintenue à 5°C par un bain de glace, sous agitation continue pendant 45 min. Les microparticules ont été laissées à l'air libre pour sécher.

Les différentes solutions de gélification utilisées sont :

- Tripolyphosphate (TPP) à 10%.
- Hexamétaphosphate de sodium (HMPS) à 10%.

➤ Les sphères réticulées par le glutaraldehyde :

Pour pouvoir augmenter le degré de réticulation des sphères, nous avons ajouté une solution du glutaraldehyde à 1% à la solution de gélification après 15 min de la formation des billes.

➤ Les sphères biocomposites :

La préparation des microsphères biocomposites chitosane/hydroxyapatite vides se font par mélange d'une quantité bien déterminée d'hydroxyapatite avec une solution de 2% en poids du chitosane. Cette solution est ensuite égouttée, à l'aide d'une aiguille d'une seringue, dans différentes solutions de gélification.

➤ Les sphères chargées d'un principe actif :

Il consiste à faire dissoudre une masse d'antibiotique suffisante pour avoir la concentration voulue dans une solution de chitosane préparée préalablement, il faut maintenir sous agitation jusqu'à avoir une solution

homogène. Pour les biocomposites on ajoute une quantité de principe actif déterminée au mélange chitosan/hydroxyapatite.

Nous avons égoutté ces solutions dans une solution de gélification du tripolyphosphate à 10% sur un bain de glace et sous agitation modérée pendant 45 min. Les sphères sont ensuite exposées à l'air libre pour sécher dans un endroit sombre.

3.3. Caractérisation des sphères de chitosane :

3.3.1. Aspect général :

L'examen effectué à l'œil nu montre que les sphères obtenues sont sphériques en apparence avec un diamètre moyen de 2 à 3 mm.

Les figures suivantes représentent les différentes sphères obtenues :

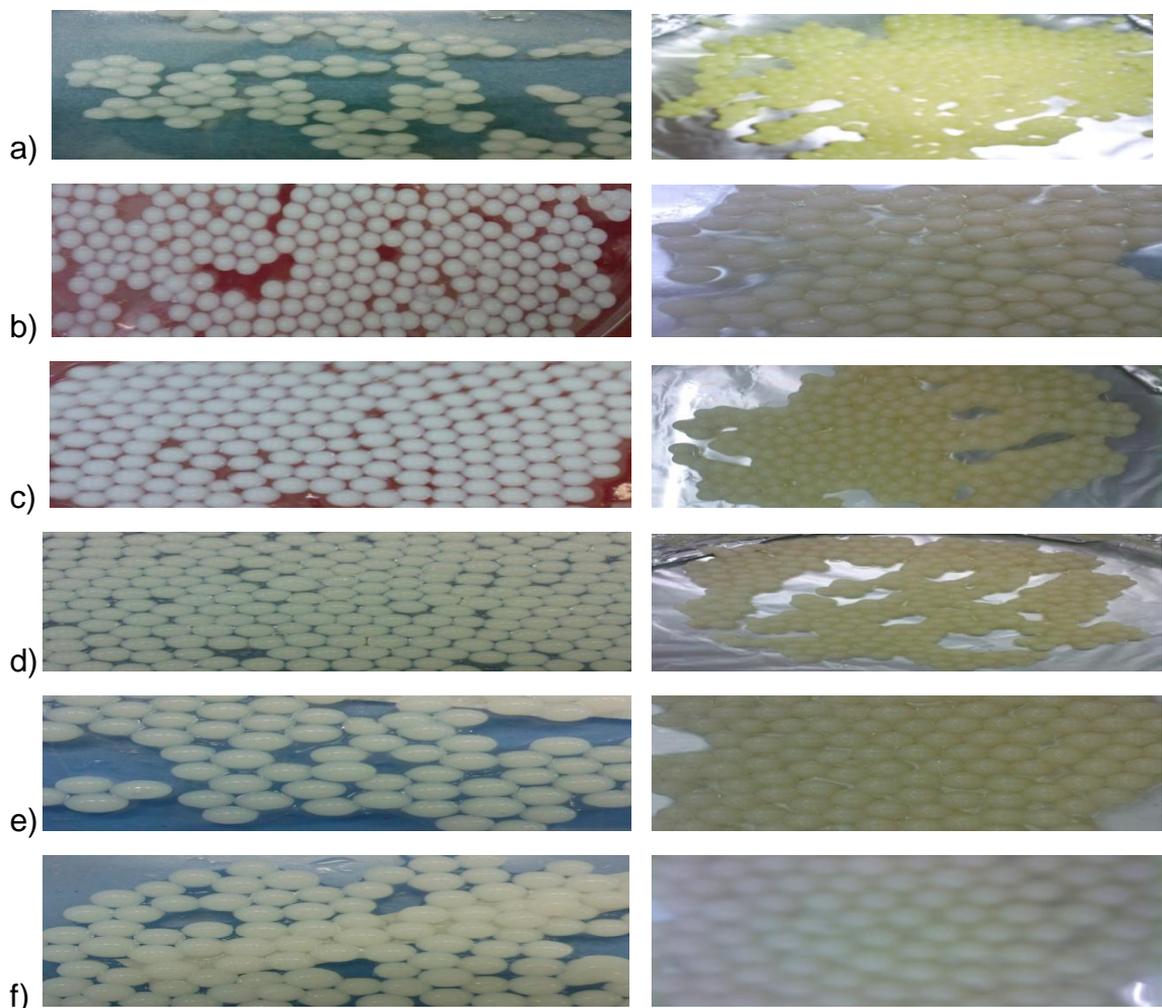


Figure 3-2 : les sphères vides et chargées préparées dans différents solution de gélification (a : CS +TPP à 10% ; b : CS +TPP+GA ; c : CS +HA+TPP; d : CS+HMP à 10% ; e : CS +HMP+GA ; f : CS+HA+HMP).

➤ Principe de formation des microsphères de chitosan :

Les billes ou les sphères sont typiquement formées dans une procédure à deux étapes impliquant dispersion et durcissement. Les méthodes de dispersion se font soit par extrusion sous force gravitationnelle, sous liquide coaxial ou jet d'air, soit par émulsion. De nouvelles méthodes comme la gélification interne couplée à l'émulsion, le pontage interfacial ou la polymérisation interfaciale ont également été proposés. (M. Boissière ;2004).[21]

L'extrusion consiste à faire tomber goutte à goutte la solution polymérique (ou suspension à encapsuler) dans un bain où est réalisée la gélification des gouttes. En général les sphères formées sont sphériques et de taille homogène. Leur taille peut varier selon l'évolution de la technique de 100µm à 3000µm. (M. Boissière ;2004). [21]

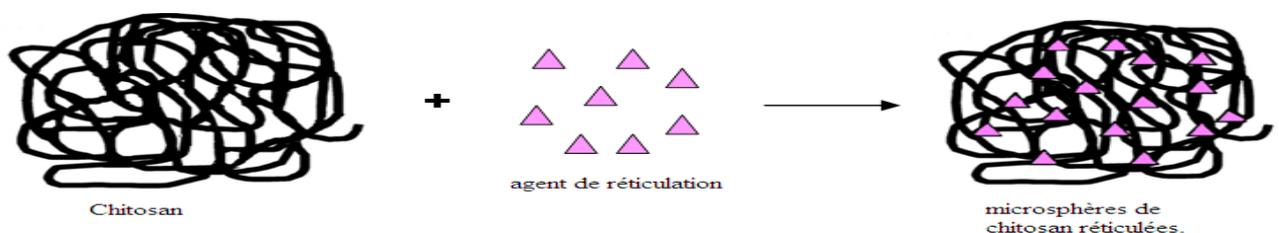


Figure 3.3: schéma de principe de formation des sphères à base d'un biopolymère. [22]

Grâce à des groupes cationiques aminés de chitosane, des interactions ioniques peuvent se produire entre le chitosane et les molécules chargées négativement tel que les sulfates, les citrates et les phosphates (dans notre cas, nous avons utilisé deux types des ions phosphates, aliphatique et cyclique). Ces interactions vont donner des hydrogels avec des propriétés qui dépendent de la

densité de charge et la taille des agents anioniques, ainsi que le degré de désacétylation et la concentration du biopolymère. (X.Z. *Shu*, K.J. *Zhu* ;(2002)).[23]

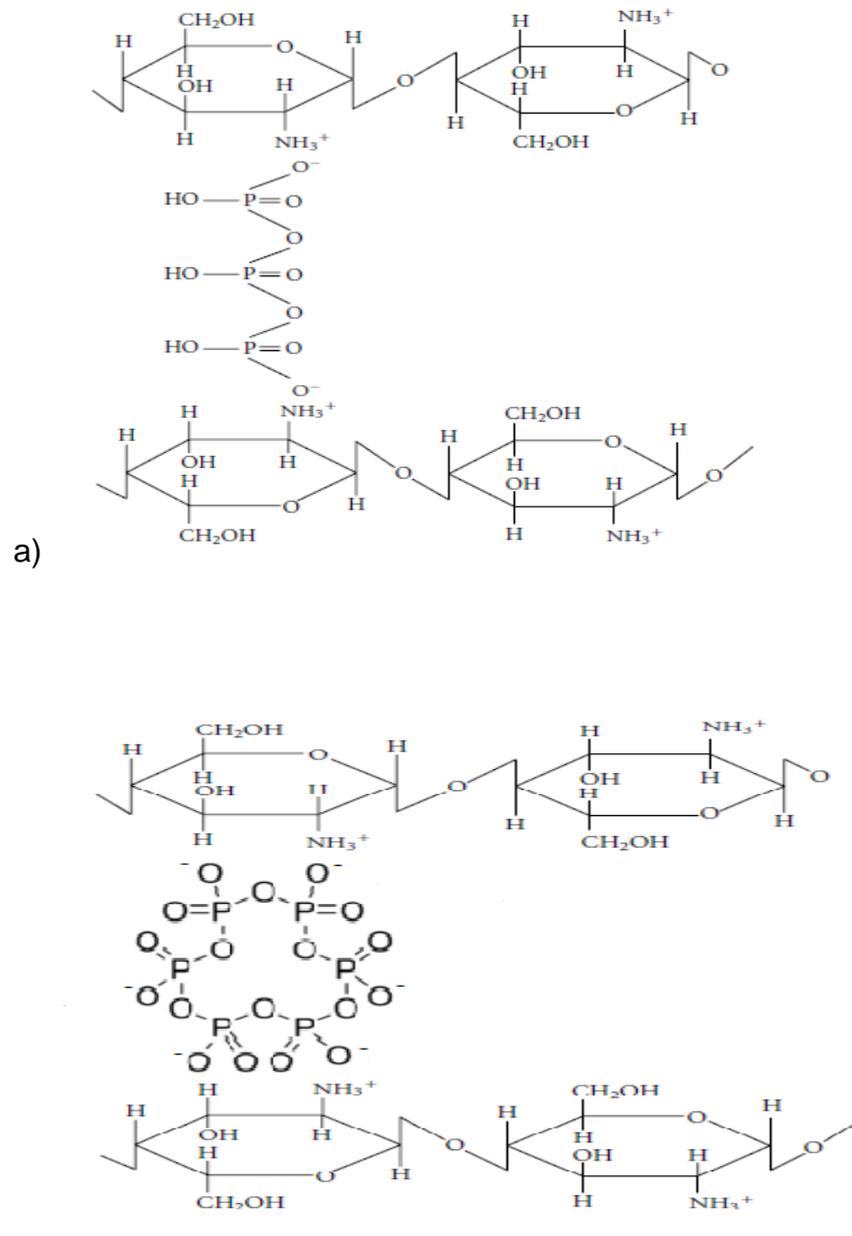


Figure 3.4: Réticulation ionotrope du chitosane avec a) TPP ; b) HMP. [24]

3.3.2. Caractérisation morphologique des sphères préparées :

Les analyses par microscopie électronique (MEB) ont été réalisées à l'aide d'un instrument de type JEOL JSM-6360L au niveau du centre de développement des technologies avancées CDTA, les échantillons ont subi une métallisation par une couche mince d'or (2 nm d'épaisseur). Quelques uns des résultats obtenus sont représentés ci-dessous :

Les microphotographies obtenues montrent que toutes les sphères présentent des surfaces rugueuses et poreuses mais leurs morphologies diffèrent relativement certainement à cause des différents traitements :

- La surface des sphères réticulées par le tripolyphosphate (figure a) devient lisse et rigide sous l'action du glutaraldéhyde (figure c); la taille de ces microsphères se trouve ainsi amoindrie à 500-600 μm à cause de l'augmentation du degré de réticulation, ceci indique une forte densification du matériau.
- La surface des sphères composites (figure e) est plus rugueuse par rapport aux autres particules à cause de l'ajout de l'hydroxyapatite car ce dernier comporte une structure spongieuse.
- Les microsphères réticulées par l'Hexametaphosphate de sodium (figures b et f) présentent une structure lamellaire prononcée qui disparaît sous l'action du glutaraldéhyde (figure d). La structure devient dans ce cas plus dense, rigide et la surface est plus lisse.
- Les microsphères composites, leur structure perd la structure de rose de sable et devient structures lâches et ouverte avec plus de porosité pourrait être attribuable à la baisse densité de réticulation à cause de la présence d'hydroxyapatite.

Ces résultats sont comparables aux travaux de Bhumkar et Pokharkar (2006) qui ont étudié l'effet de réticulation sur la structure des films de chitosane. [24]

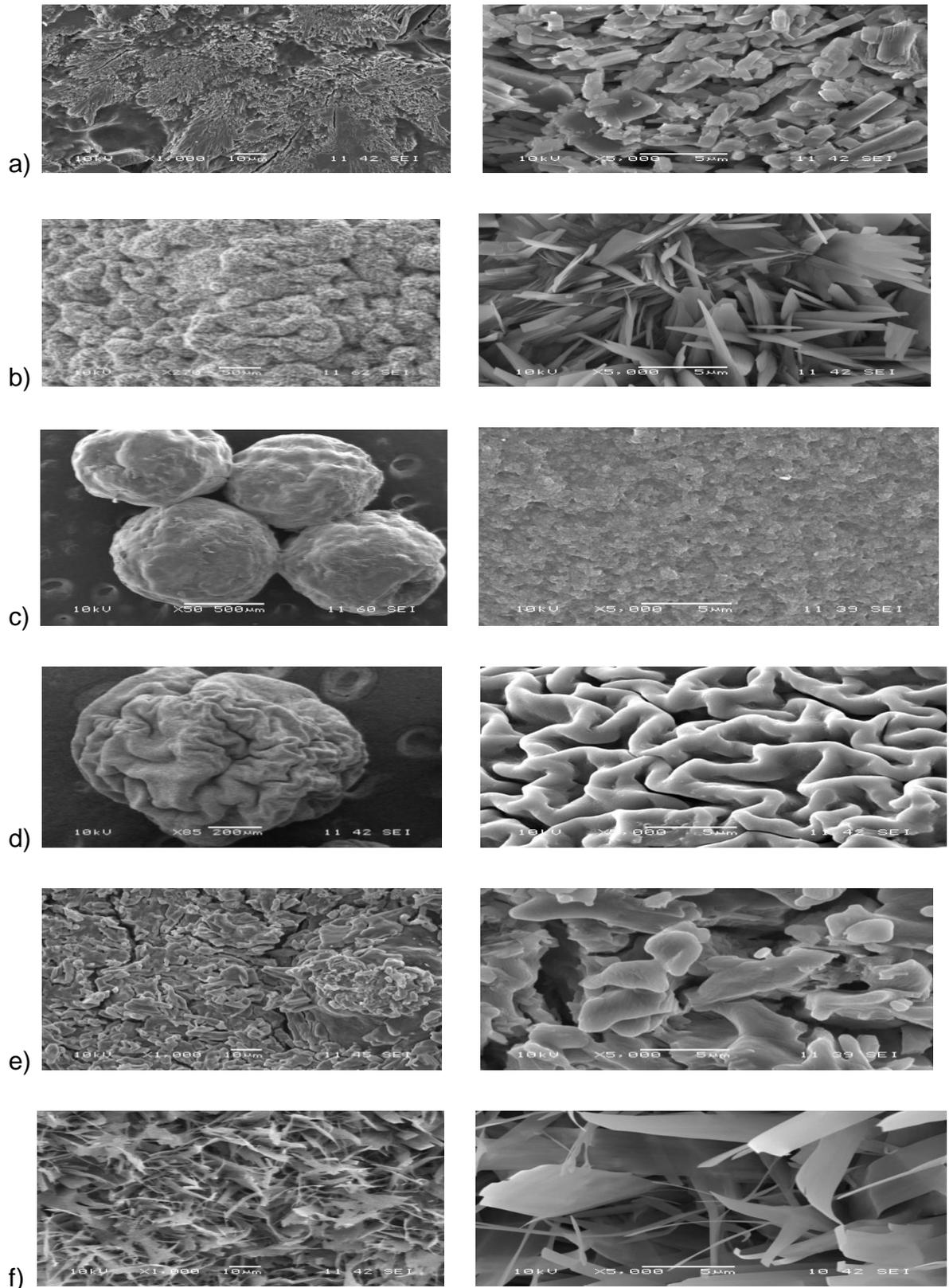


Figure 3.5 : Microphotographies MEB des sphères de chitosane. a : CS/TPP; b : CS/HMP; c : CS/TPP/GA; d : CS/HMP/GA; e : CS/HA/TPP; f : CS/HA/HMP.

3.3.3. Caractérisation spectroscopique par FTIR :

Les spectres FTIR du chitosane réticulé sont présentés dans la figure 3.6. Une bande caractéristique à 3449 cm^{-1} est attribuée à l'élongation des liaisons -NH₂ et-OH et la bande pour l'amide I à 1655 cm^{-1} est observée dans le spectre infrarouge du chitosane seul. Alors que dans les spectres FTIR de chitosane réticulé par TPP le pic de 1655 cm^{-1} diminue et deux nouveaux pics à 1620 et 1593 cm^{-1} apparaissent. Même remarque pour le spectre FTIR du chitosane réticulé par HMP, le pic à 1655 cm^{-1} diminue et l'apparition des deux pics à 1647 cm^{-1} et 1550 cm^{-1} .

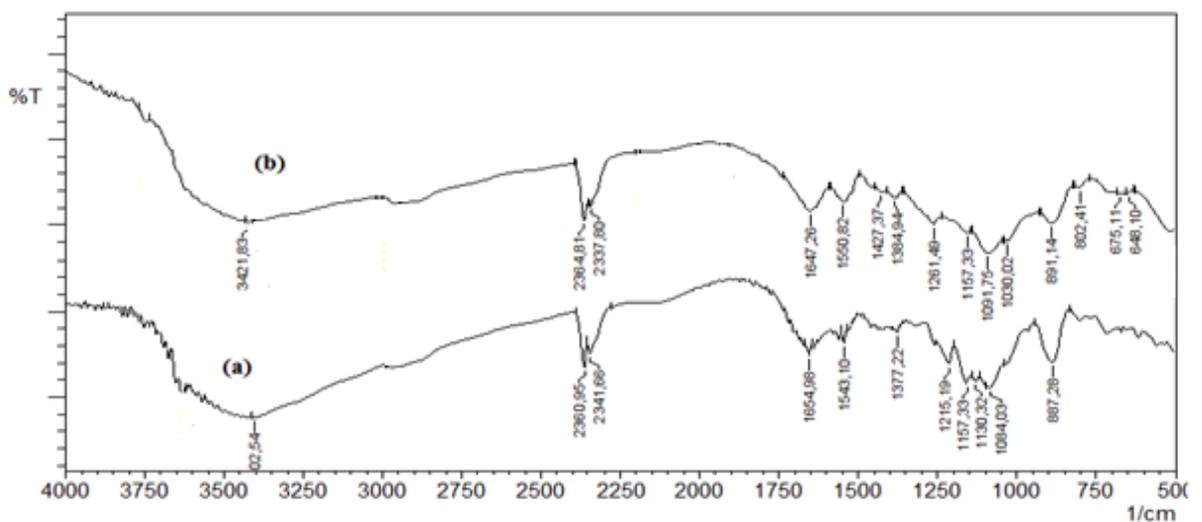


Figure 3.6: spectre FTIR des sphères du chitosane (a : CS/TPP ; b : CS/HMP).

La diminution de la bande pourrait être attribuée à la liaison entre les ions phosphoriques et le groupement ammonium. Le chitosane réticulé par le TPP a également montré un pic pour la liaison P=O à 1157 cm^{-1} (1153 cm^{-1} pour le chitosane réticulé par HMPS). Xu et al, Knaul et al, et Wang et al [25],[26] et [27]. Observaient des résultats similaires dans leurs études sur la formation de nanoparticules de chitosane et le film de chitosane traités avec du phosphate.

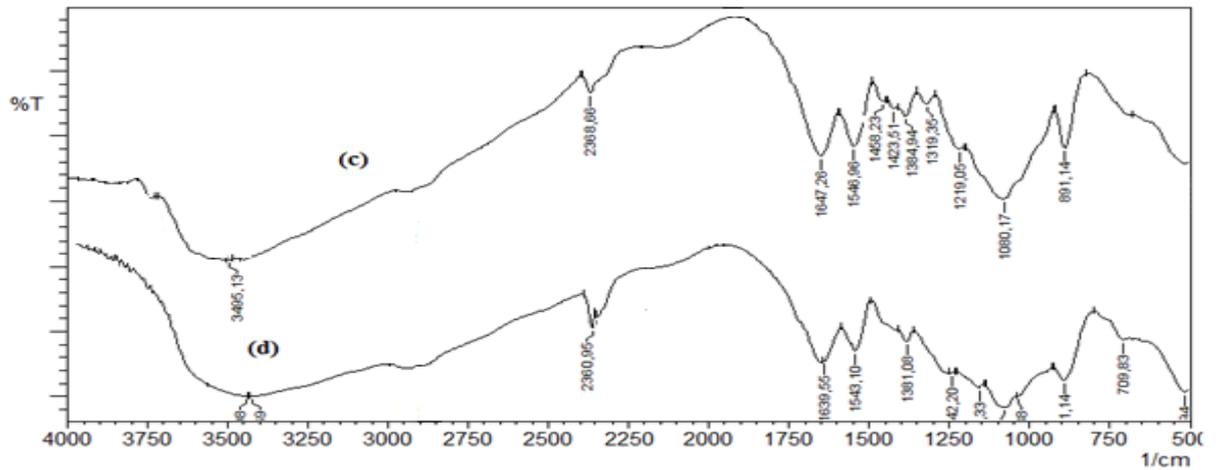


Figure 3.7: Spectres FTIR des sphères du chitosane réticulées par le glutaraldehyde (c : CS/TPP/GA ; d : CS/HMP/GA).

L'analyse FTIR du chitosane réticulés par le glutaraldehyde présente des pics correspondants aux pics caractéristiques du chitosane, en plus des pics à 2368 cm^{-1} correspond à la fonction aldéhyde, le pic de la liaison NH_2 est à 1655 cm^{-1} , qui est observée dans le spectre du chitosane, n'a pas pu être observée dans les deux spectres. Par ailleurs, une bande appartenant à l'imine visible à 1647 et 1546 cm^{-1} (1639 cm^{-1} et 1543 cm^{-1} pour le matériau réticulé par l'Hexametaphosphate), peuvent montrer la réticulation du chitosane par le glutaraldehyde. [28]

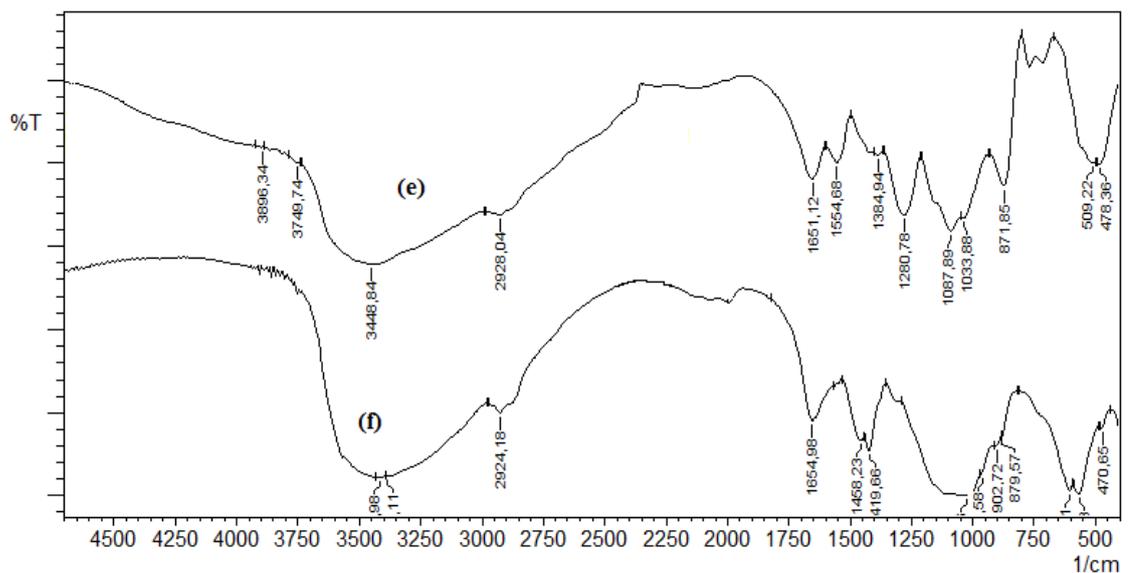


Figure 3.8: Spectre FTIR des sphères composites (e : CS/HA/TPP ; f : CS/HA/HMP).

Les spectres FTIR du composite chitosane/hydroxyapatite (figure 3.8) montrent les absorptions caractéristiques du chitosane et de l'hydroxyapatite. Des bandes d'absorption sont observées à 3448 cm^{-1} et à 3425 cm^{-1} correspondantes aux élongations des liaisons OH^- . Les pics à 605 , 871 et à 879 cm^{-1} sont attribués aux vibrations des liaisons phosphates PO_4 . Les pics 1458 et 1417 cm^{-1} montrent des substitutions aux carbonates CO_3 . Les pics à 1033 et 1280 cm^{-1} représentent des groupements amines. Les pics d'adsorption à 2924 cm^{-1} représentent l'élongation de la liaison C-H aliphatique.

3.3.4. Caractérisation thermographique par ATG/DSC :

Pour étudier la stabilité thermique et le comportement des différents matériaux que nous avons préparés, une analyse thermique comportant la variation du flux thermique en fonction de la température a été entreprise.

En effet, une analyse thermogravimétrique et une analyse différentielle des courbes calorimétriques (TG & DSC) de différents échantillons de chitosane étudiés ont été effectuées au laboratoire LMMC (université MB de Boumerdes). Les courbes ont été enregistrées sur un instrument de type NETZSCH STA 409 PC/PG sous atmosphère d'azote ((ml/min):45), en utilisant un creuset en alumine (Al_2O_3) à une vitesse de balayage de $10\text{ }^\circ\text{C} / \text{min}$, entre 25 à $500\text{ }^\circ\text{C}$.

Les thermogrammes obtenus sont représentés respectivement dans les figures 3.9, 3.10 et 3.11, correspondant respectivement au chitosane réticulé au TPP, au chitosane réticulé au HMP et au composite chitosane-HA réticulé au TPP contenant l'oxytétracycline (OTC).

Le thermogramme DSC du chitosane réticulé au HMP (figure 3.10) semble monotone car il est difficile d'observer des phénomènes thermiques clairs. Ceci peut signifier que la structure est très bien organisée et quasiment cristalline et donc très stable, au moins dans la plage de température testée. Ce constat peut être corrélé avec les courbes thermogravimétriques associées aux différents échantillons analysés.

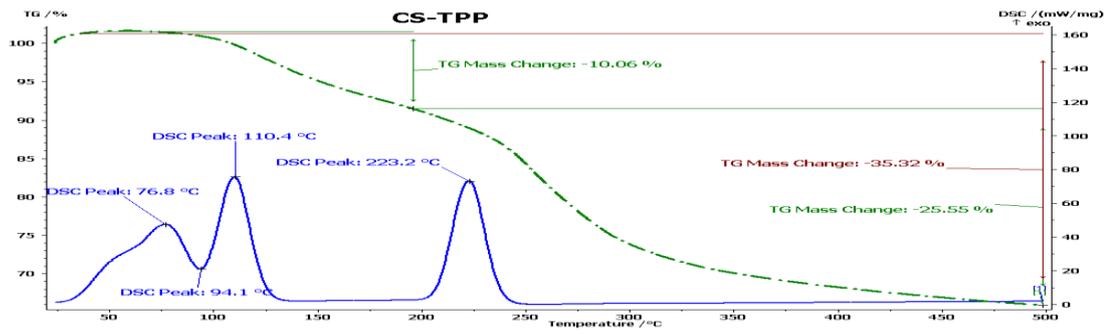


Figure 3.9: Thermogrammes représentant le flux de chaleur en fonction de la température en °C du chitosane réticulé au TPP.

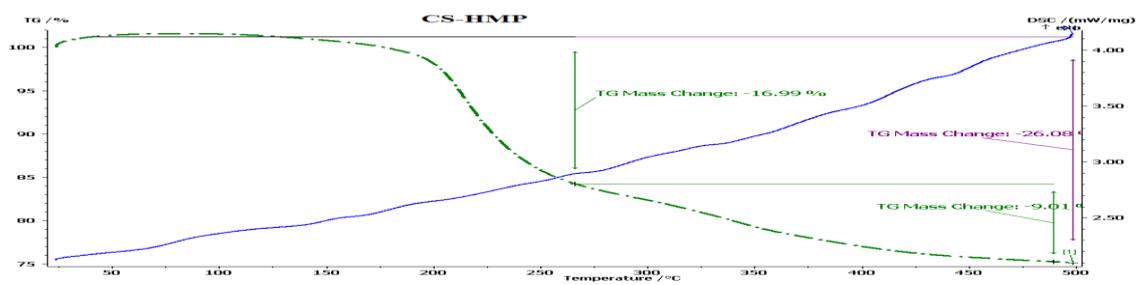


Figure 3.10: Thermogrammes représentant le flux de chaleur en fonction de la température en °C du chitosane réticulé au HMP.

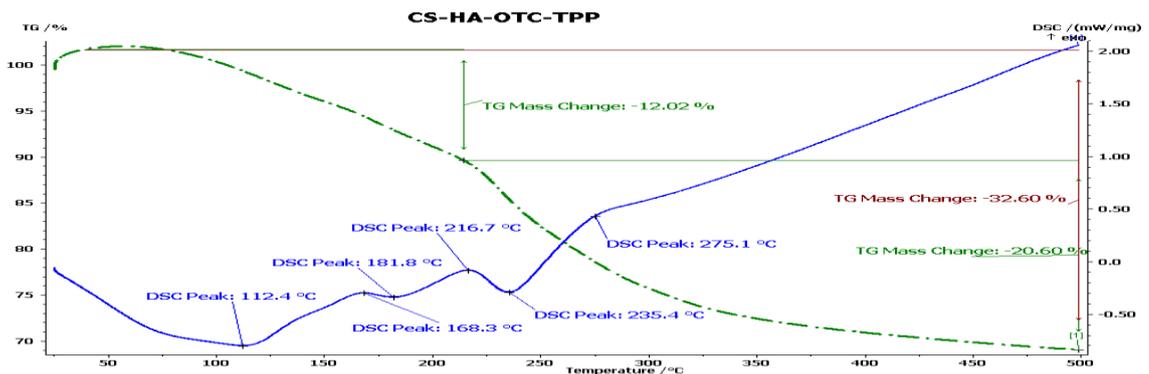


Figure 3.11: Thermogrammes représentant le flux de chaleur en fonction de la température en °C du composite chitosane.HA réticulé au TPP et contenant l'oxytétracycline.

Il est montré que lorsque le chitosane est réticulé au HMP, la perte de masse totale (jusqu'à 500 °C) est de l'ordre de 26,08 %, alors qu'il est nettement supérieur dans les deux autres cas : 35,32% et 32,60% correspondant respectivement au chitosane réticulé au TPP, et au biocomposite chitosane-

hydroxyapatite réticulé au TPP et contenant l'oxytétracycline. Par ailleurs, avec ces deux derniers matériaux, la DSC montrent l'existence d'un certain nombre de phénomènes endothermiques et exothermiques qu'il est possible de résumer dans le tableau suivant :

Composé	CS-TPP	CS-HA-OTC-TPP
Endotherme, T (°C)	94,1	112,4 ; 181,8 ; 235,4
Exotherme, T (°C)	76,8 ; 110,4 ; 223,2	168,4 ; 216,7 ; 275,1

Tableau 3-1 : les principaux pics illustrés des thermogrammes des sphères de chitosane.

D'une manière grossière, comme le montre les courbes TG, il est possible d'observer deux pertes de masses principales ; une perte de masse de l'ordre de 10% à températures inférieures attribuable à la vaporisation de l'humidité préalablement retenue dans la structure poreuse et hydrophile du chitosane réticulé mais, aussi, à celle liée aux structures primaires et supramoléculaires du biomatériau. Ce phénomène se déroule sur une durée plus longue (large pic pour une température centrale de 112,4 °C) dans le cas du système CS-HA-OTC-TPP par rapport au système CS-TPP (pic à 94,1°C) qui montre une meilleure aptitude à l'évaporation de l'eau, certainement à cause d'une plus grande porosité. L'endotherme liées à l'évaporation de l'eau est prévue pour refléter les changements moléculaires mis en place après la réticulation. D'une manière générale, il est bien connu que la réticulation (en nature et taux) modifie la cristallinité du biopolymère ce qui influe directement sur la capacité de rétention en eau (et ensuite sa libération). En effet, d'après l'étude de (Bhumkar et Pokharkar)[24], il semble que la caractérisation du chitosane réticulé TPP par DRX et DSC, fourni la preuve de diminution de la cristallinité et l'augmentation de l'hydrophilie après réticulation. Kittur et coll (2002), en étudiant le comportement thermique de la chitine, du chitosane et de leurs dérivés carboxyméthyle, montrent aussi que l'augmentation de la N-désacétylation et de la carboxyméthylation de chitosane peut conduire à augmenter la capacité de rétention d'eau. [29].

La deuxième perte de poids intervenant à des températures supérieures est normalement due à la décomposition du biopolymère libre et réticulé. En effet, il a été suggéré (Sakurai et al, Zeng et al.) que cette décomposition exothermique apparaît dans la gamme de température comprise entre environ 250 et 350 °C. Ceci étant particulièrement valable lorsque le chitosane se trouve seul. [30]

En outre, il est important de signaler dans la DSC du système CS-HA-OTC-TPP un pic exothermique à 216,7 °C devant correspondre à la décomposition de l'oxytétracycline (215 °C) et un pic endothermique à 181, 8 °C qui pourrait provenir par le processus de dissociation de la liaison hydrogène entre les chaînes de chitosane produite entre NH₂ et-OH des groupes fonctionnels comme il est proposé par Zeng et al. et Chuang et al. [31] et [32]

3.3.5. Test de gonflement :

Le système à gonflement est particulièrement intéressant pour la libération du principe actif parce qu'il laisse diffuser des molécules de masse molaire élevée, il a l'avantage de donner un type de libération indépendant des propriétés du principe actif.

Les tests de gonflement sont effectués dans des conditions simulant les conditions physiologiques dans l'estomac, en utilisant une solution similaire à la bile gastrique (SGF) à pH 1,2, le test est effectué à température 37°C.

La préparation de la solution SGF (simulated gastric fluid) se fait par l'ajout de 7ml de HCl à 2g de NaCl puis dilué jusqu'à 1L (selon la pharmacopée européenne).

Prenant une masse égale à 0,1g pour tous les systèmes, et enregistrer leur masse avec précision à t_0 . Ces échantillons vont être imprégnés dans 20ml de solution de SGF, et peser chaque 2h. Les sphères récupérées doivent être mises sur un papier absorbant pour éliminer l'eau de surface.

Les différentes valeurs relatives aux tests de gonflement dans la SGF sont enregistrées et illustrées par le graphique suivant :

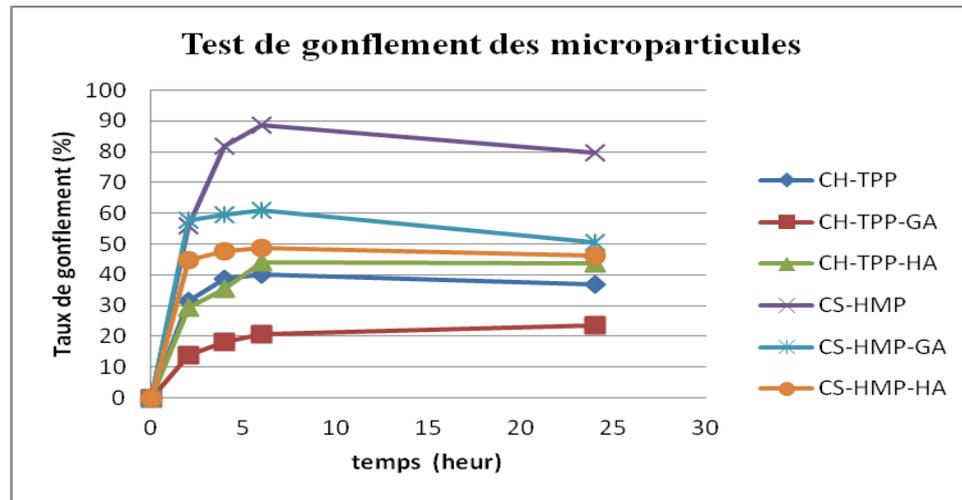


Figure 3.12: Taux de gonflement obtenus relatifs aux différents systèmes au chitosane préparés.

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 (pendant 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 aussi que les capsules réticulées par le HMP présente un taux de gonflement relativement élevé par rapport aux autres systèmes, ce qui signifie que les chaînes de chitosan réticulées par HMP sont moins rigides que les chaînes réticulées par TPP ou par le glutaraldehyde ou bien ceux constituées en biocomposites (chitosan/hydroxyapatite).

Les sphères du chitosane gonflent dans le SGF ce qui provoque un relâchement du réseau polymère 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 capacités de gonflement nous renseignent sur le degré d'absorption de l'eau par l'hydrogel du chitosane. Cette propriété est d'une importance primordiale car elle joue un rôle important dans la biodégradation du polymère et, par conséquent, la libération d'agent actifs quand celui-ci est utilisé comme support véhiculant cet agent.

Après gonflement, les microsphères du chitosane acquièrent une certaine élasticité. Ils peuvent subir des pressions raisonnables des tissus avoisinants sans être déformés tout en continuant à remplir leurs rôles. De la même manière, cette élasticité permet de diminuer le risque de traumatiser les tissus avoisinant par irritation, friction et compression.

3.4. Etude de la libération contrôlée *in vitro* de principe actif encapsulé dans le chitosane :

Le contrôle de la libération par diffusion est le mécanisme le plus répandu parmi les systèmes à libération contrôlée. Le but de ce test est d'étudier la cinétique de la libération de l'oxytétracycline comme agent thérapeutique dans les conditions biomimétiques (simulant les conditions physiologiques gastrique).

Les sphères formées de chitosane ont été placées dans des récipients, auxquels 20 ml de la solution SGF (simulated gastric fluid) sont ajoutés. Les récipients fermés sont mis dans un incubateur dont la température est maintenue à 37°C. Les prélèvements liquides sont effectués chaque 2h jusqu'à 8h, puis chaque 24h.

Les concentrations des solutions de l'oxytétracycline sont mesurées par une méthode colorimétrique en utilisant la spectroscopie UV-Visible. Ces tests ont été réalisés au laboratoire de Méthodes Physique d'Analyse au département de chimie industrielle à l'université de Blida en utilisant un spectrophotomètre (SHIMADZU 1700). Le dosage est effectué à une longueur d'onde de 353 nm d'après une courbe d'étalonnage préalablement établie, comme il est montré ci-dessous :

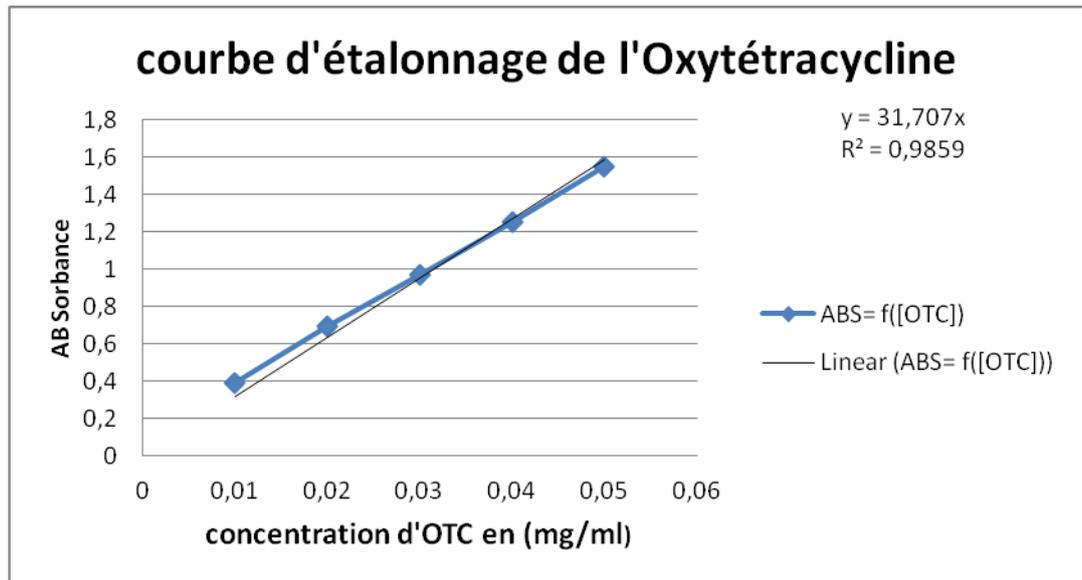


Figure 3.13: la courbe d'étalonnage de l'oxytétracycline à 353nm.

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, gonfle, le polymère passe à l'état caoutchouteux pour ressembler à un gel. Il se crée ainsi un front de séparation gel-solide qui progresse vers le centre du système. Avec la relaxation macromoléculaire associée à la transition à l'état caoutchouteux, le principe actif est alors capable de diffuser vers l'extérieur.

Les figures 3.14, 3.15, 3.16 et 3.17 représentent la cinétique de libération de l'oxytétracycline en fonction du temps à partir des sphères du chitosane préparées par la méthode du mélange initiale:

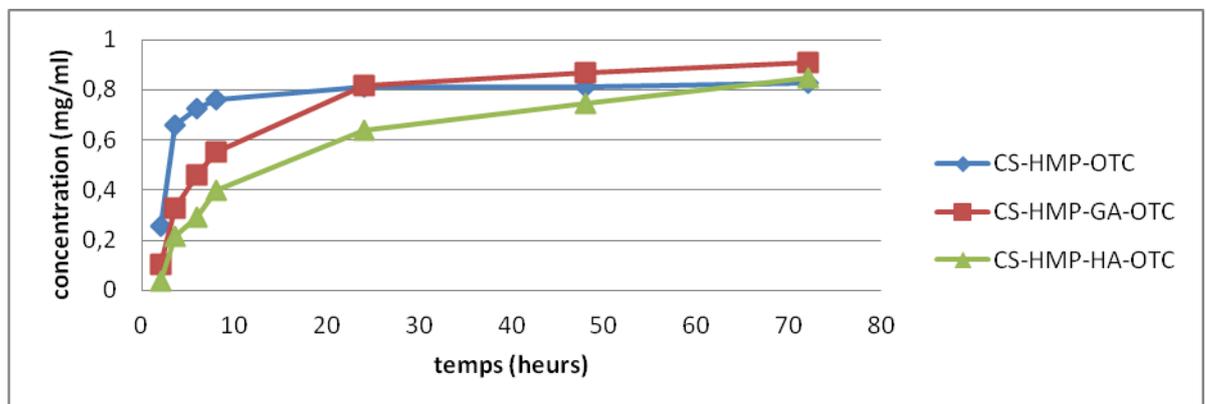


Figure 3.14 : Cinétique de libération de l'oxytétracycline dans le SBF à partir de sphères de chitosane réticulées par l'hexamétaphosphate de sodium.

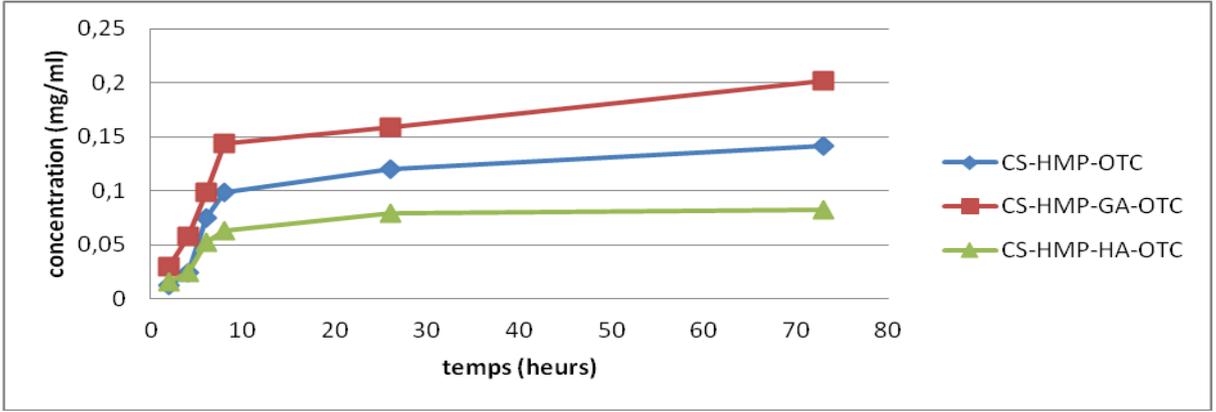


Figure 3.15 : Cinétique de libération de l’oxytétracycline dans le milieu intestinal à partir de sphères de chitosane réticulées par l’hexamétaphosphate.

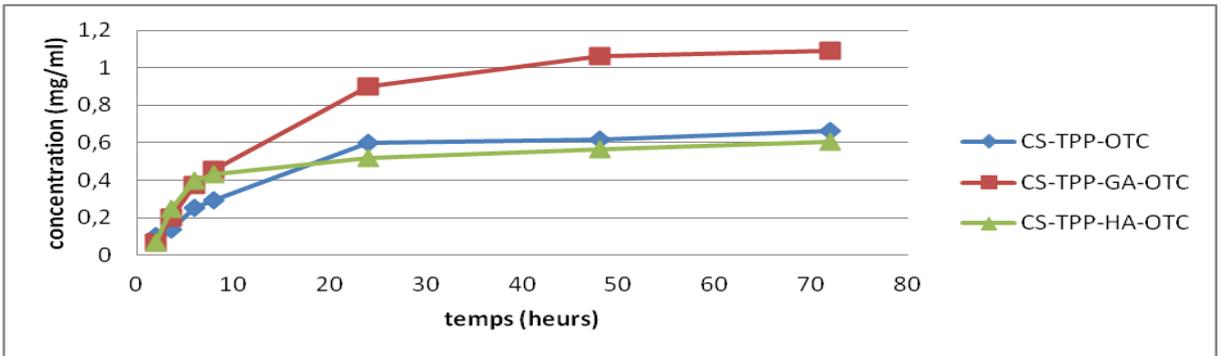


Figure 3.16 : Cinétique de libération de l’oxytétracycline dans le milieu gastrique à partir de sphères de chitosane réticulées par le tripolyphosphate.

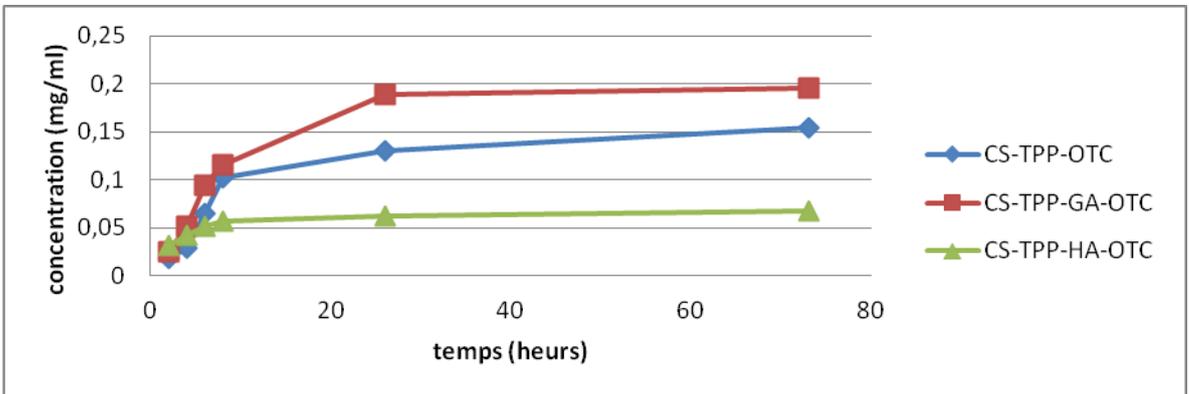


Figure 3.17 : Cinétique de libération de l’oxytétracycline dans le milieu intestinal à partir de sphères de chitosane réticulées par le tripolyphosphate.

D'après les résultats obtenus on peut conclure que les concentrations de l'oxytétracycline libérées sont très importantes dans les premières heures pour tous les systèmes démontré par le taux initial relativement élevé, puis on remarque qu'il y a une diminution de la libération qui persiste jusqu'à le troisième jours.

La première partie représente la libération du principe actif qui existe à la surface des microsphères, d'où la libération rapide et en quantité importante, par contre, la deuxième partie représente le principe actif qui existe au milieu, sa libération est lente et en quantité relativement faible, cela revient au trajet à parcourir à travers la matrice polymérique.

Les sphères réticulées par l'hexametaphosphate atteint les 80% plus rapidement que les microsphères réticulées par le glutaraldehyde qui atteint les 80% au bout de 6h et cela revient certainement au comportement au gonflement qui est très élevé par rapport aux autres systèmes.

3.4.1. Modèle mathématique de la cinétique de la libération du principe actif :

Le mécanisme de libération du médicament a été étudié en ajustant les données de libération de l'oxytétracycline conformément à l'équation de Korsmeyer-Peppas.[33] Cette équation a été utilisée pour expliquer le mécanisme de libération du substrat actif et de comparer les profils de libération. Une approximation de l'équation peut être obtenue en reportant la fraction de médicament libérée contre la racine carrée du temps exprimé par :

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n \dots\dots\dots(3.1)$$

Où M_t / M_∞ est la quantité fractionnaire du médicament libérée au temps t, n est un exposant de diffusion qui indique le mécanisme de libération, et k est une constante caractéristique du système. Les paramètres cinétiques n et k ont été calculés à partir du tracé de $\log (M_t / M_\infty)$ en fonction de $\log t$. Pour les sphères, les valeurs de n compris entre 0,43 et 0,85 sont une indication d'une libération à la fois contrôlée par la diffusion et par le gonflement (transport anormal). Les valeurs supérieures à 0,85 indiquent les cas où les transports ont trait à la relaxation de polymères lors du gonflement du gel. Les valeurs inférieures à 0,43 indiquent que

la libération du médicament à partir de polymère a été due à la diffusion fickienne. La constante de la vitesse de libération a été calculée en ajustant les données expérimentales de libération de médicament dans les modèles de dissolution et de l'ajustement des données de la libération du médicament a été évaluée par régression linéaire.

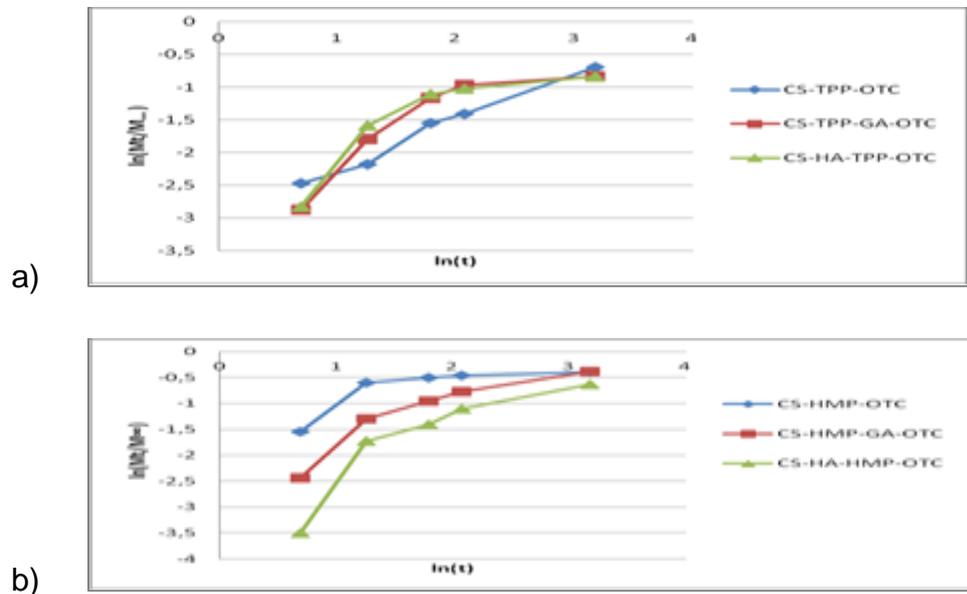


Figure 3.18: Tracé des courbes linéarisées $\ln(M_t/M_\infty)$ en fonction de $\ln(t)$ des différents systèmes à pH=1,2 (a : systèmes réticulés par le TPP ; b : systèmes réticulés par HMP).

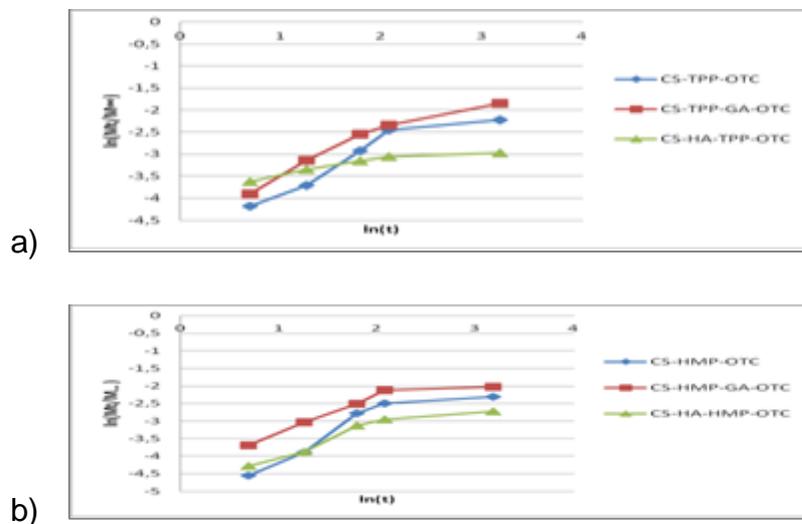


Figure 3.19: Tracé des courbes linéarisées $\ln(M_t/M_\infty)$ en fonction de $\ln(t)$ des différents systèmes à pH=6,8 (a : systèmes réticulés par le TPP ; b : systèmes réticulés par HMP).

Le tracé $\ln(M_t/M_\infty)$ en fonction de $\ln(t)$ pour les microsphères dans le milieu gastrique et intestinale sont illustrés dans les figures 3.18 et 3.19. l'exposant de diffusion et les constantes des différents systèmes sont calculés et représentés dans les tableaux 3.2 et 3.3.

milieu gastrique pH=1,2				
systemes	équations de régression	R ²	n	k
CS-TPP-OTC	$y= 0,737x-2,98$	0,98	0,73	0,0504
CS-TPP-GA-OTC	$y=0,784x-2,92$	0,764	0,78	0,0528
CS-TPP-HA-OTC	$y=0,731x-2,79$	0,72	0,73	0,0612
CS-HMP-OTC	$y=0,39x-1,4$	0,586	0,39	0,245
CS-HMP-GA-OTC	$y=0,763x-2,544$	0,8304	0,76	0,0785
CS-HMP-HA-OTC	$y=1,0414x-3,548$	0,784	1,04	0,287

Tableau3.2 : paramètres caractéristiques de la diffusion dans les différents systèmes dans le milieu gastrique.

milieu intestinale pH=6,8				
système	équation de regression	R ²	n	k
CS-TPP-OTC	$y=0,831x-4,59$	0,881	0,83	0,0101
CS-TPP-GA-OTC	$y=0,8105x-4,214$	0,923	0,81	0,0147
CS-TPP-HA-OTC	$y=0,262x-3,702$	0,858	0,26	0,0246
CS-HMP-OTC	$y=0,656x-4,57$	0,865	0,65	0,0103
CS-HMP-GA-OTC	$y=0,679x-3,898$	0,838	0,67	0,0202
CS-HMP-HA-OTC	$y=0,944x-4,904$	4,904	0,94	0,0074

Tableau3.3 : paramètres caractéristiques de la diffusion dans les différents systèmes dans le milieu intestinale.

D'après les résultats, à pH=1,2 , les systèmes réticulés par le tripolyphosphate présentent des valeurs de n comprises entre 0,48 et 0,85 ce qui verifie la présence des deux phénomènes diffusion et érosion de la matrice polymérique. D'autre part, dans les systèmes réticulés par l'hexametaphosphate, les valeurs de n sont superieures à 0,85 et donc le phénomène dominant est l'érosion de la matrice lors du gonflement, sauf pour le système CS-HMP-OTC, la libération du principe actif est purement diffusionnelle car l'exposant de diffusion est inférieur à 0,48, cela revient, comme il a été déjà mentionné, au taux de gonflement qui est très élevé, par conséquent le trajet de la sortie est favorisé par la quantité importante d'eau absorbée.

A pH=6,8, les systèmes réticulés par le tripolyphosphate, les sphères composites présentent une valeur de n inférieur à 0,48 et donc le transport du principe actif vers l'extérieur est réalisé par diffusion, les autres systèmes ont des valeurs de n comprises entre 0,48 et 0,85 même pour les systèmes réticulés par l'hexametaphosphate sauf pour les sphères composites (CS-HA-HMP-OTC) qui présentent un exposant de diffusion très élevé (près de l'unité), et cela est en accord avec les résultats de la microscopie électronique qui montre la structure lâche et poreuse de ces matériaux, par conséquent, leur structure se détruit complètement lors de son gonflement.

Ces résultats ne sont pas tout à fait en accord avec les travaux de Sokker et al. (2008) sur la cinétique de libération de l'oxytétracycline à partir des microsphères à base de chitosane, et cela est probablement dû aux additifs greffés avec le chitosane tel que la gélatine, le PVA (polyvinyl alcool) et le PAAC (polyacrylique acide) qui peuvent conduire à un comportement différent de la matrice polymérique.[34]

Hui-Juan Liu et al. (2011), ont préparé des billes magnétiques à base de chitosane et d'alginate. Ils suggèrent qu'à pH=1,5 la libération est contrôlée par diffusion fickienne, et à pH=6,5 les deux phénomènes coexistent (diffusion et désintégration de la matrice polymère). [35]

Les figures ci-dessus, montrent bien qu'il y a un certain déphasage entre les deux modèles théorique et empirique, confirmé par le coefficient de corrélation, et cela revient au phénomène de la libération prématurée ou « Burst effect ».

3.4.2.L'influence de la libération prématurée sur le modèle mathématique :

Un des défis uniques faisant face aux systèmes à l'échelle microscopique de livraison des médicaments est le dégagement prématuré, dû au rapport élevé de surface /volume de ces systèmes particuliers. Le dégagement prématuré peut causer des effets nocifs aux patients dans des applications cliniques. Plusieurs causes possibles de dégagement prématuré ont été identifiées comprenant des interactions médicament/matériau, des états de fabrication, et de la géométrie et/ou de la morphologie de l'échantillon. Plusieurs méthodologies ont été

développées pour tenter de diminuer le degré de libération prématurée. Celles-ci incluent l'augmentation de la densité de la réticulation sur la surface de la matrice, en enduisant les couches du médicament libre, en incrustant le contenu des particules en médicament dans une matrice polymère en bloc, et en chargeant ensuite l'agent actif inégalement avec des concentrations plus élevées vers le centre de la matrice.[33]

La prédiction de la libération prématurée est problématique, car le mécanisme exact n'a pas été élucidé. typiquement, la libération contrôlée par diffusion peut être divisée en deux phases: une phase d'irruption rapide et une phase prolongée contrôlée par diffusion. Cette dernière peut être modélisée par la théorie de la diffusion conventionnelle alors que la prévision de la libération initiale prématurée n'est pas facilement réalisable. Les modèles dans ce secteur sont donc très limités. Plusieurs tentatives ont été faites de prévoir la libération prématurée dans les matrices polymères de livraison. Par exemple, le modèle le plus simple utilisé pour décrire l'incidence de la libération prématurée sur des profils de la livraison des substrats actifs est d'ajouter un paramètre supplémentaire, à savoir α , dans l'équation partielle bien connue de la libération.

$$\frac{M_t}{M_{\infty}} = kt^n + \alpha \dots\dots\dots(2)$$

Dans des applications précédentes de cette expression, les données expérimentales de dégagement ont été simplement décalées d'une certaine fraction pour adapter la prévision du modèle. Si aucun dégagement prématuré n'existe, α égale zéro et l'équation est réduite à l'équation partielle originale de libération.[33]

3.5.Evaluation de l'activité antibactérienne de l'oxytétracycline :

Cette étude a pour objectif la comparaison entre l'activité antibactérienne de principe actif libéré des microsphères du chitosane et celle de l'oxytétracycline pure, des échantillons à différentes concentrations ont été préparés et analysés comme un test positif. Pour les sphères, les échantillon sont récupérés par une

libération *in vitro* (dans une solution de SGF et à 37 °C), des prélèvements ont été effectués chaque 2h pendant 8h.

L'activité antibactérienne a été évaluée par la méthode de diffusion sur disque (Bauer *et al.*, 1966), la bactérie utilisée dans le test est *Staphylococcus aureus*. Dans des boîtes à Pétri on met comme un support le milieu deux (Difco™ antibiotic medium 2), et comme milieu de culture le milieu 1 (Difco™ antibiotic Medium 1, base for determination of antibiotic potency) avec la souche à une concentration de 0,5%, les disques utilisés sont stériles et de couleur blanche, avec un diamètre de 6mm. Ces derniers sont émergés dans les solutions de prélèvements et dans les solutions standards. Un extrait est considéré actif lorsqu'on mesure une zone d'inhibition autour du disque d'un diamètre supérieur à 6 mm et à l'intérieur de laquelle aucune croissance bactérienne n'est observée.

L'expérience est réalisée au sien du laboratoire de microbiologie, département de contrôle microbiologique des médicaments groupe SAIDAL antibiotical à Médéa.

Les figures suivantes représentent les zones d'inhibitions obtenues après 24h d'incubation à 37 °C.

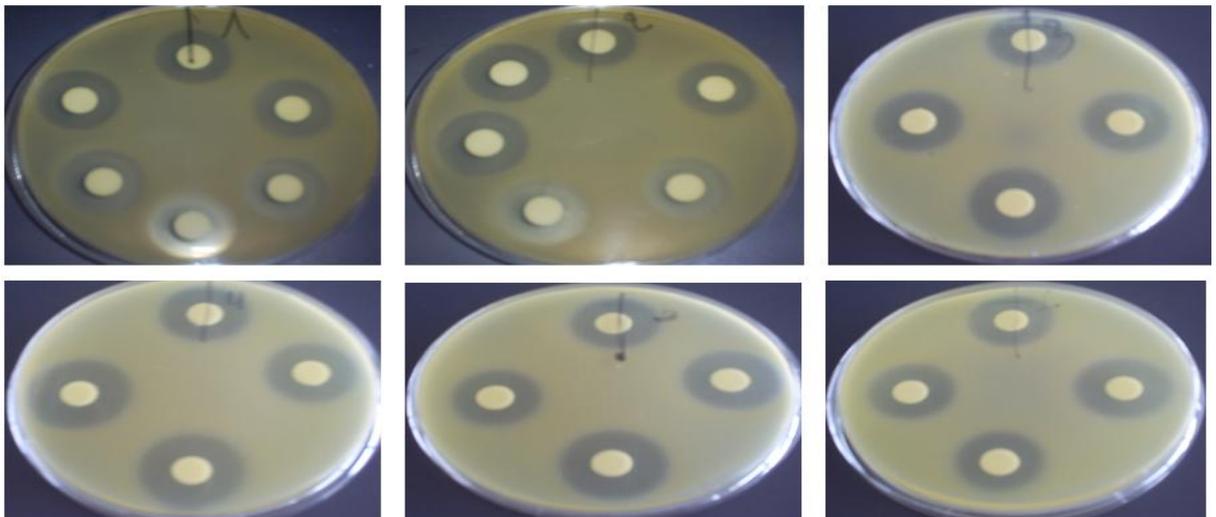


Figure 3.20 : Effet antibactérien de l'oxytétracycline libéré des différents systèmes sur la *staphylococcus aureus* (1-CS-TPP-OTC ; 2-CS-HMP-OTC ; 3-CS-TPP-GA-OTC ; 4-CS-HMP-GA-OTC ; 5-CS-TPP-HA-OTC ; 6-CS-HMP-HA-OTC).



Figure 3-21: Antibiogrammes des solutions standards d'oxytétracycline (1 : 4,0-2,56 $\mu\text{g/ml}$; 2 : 4,0-3,2 $\mu\text{g/ml}$; 3 : 4,0-6,2 $\mu\text{g/ml}$).

Pour l'évaluation d'une éventuelle application médicale, il est important de confirmer la nature du composé libérés des supports. Cela a été confirmé par l'évaluation de son efficacité à inhiber la croissance de *Staphylococcus aureus*.

Les figures 3.20 montrent l'action de l'oxytétracycline sur la souche utilisée, où les zones transparentes qui existent autour les disque signifient le succès du principe actif d'empêcher le développement des germes ; par conséquent, l'activité antibactérienne de l'OTC n'a subit aucun changement décelable.

Selon les résultats des solution standards obtenues, nous avons remarqué que la zone d'inhibition croit avec l'augmentation de la concentration de l'oxytétracycline, ce qui présente le principe de la méthode de dosage par diffusion. Les résultats des échantillons libérés des différents systèmes à des intervalles de temps déterminés présentent une distinction des zones d'inhibitions qui correspond à l'augmentation de la concentration en fonction du temps. Par conséquent, l'effet antibactérien de l'oxytétracycline est assimilable à l'effet du principe actif standard, ce qui nous confirme que la réticulation par différent agents chimiques n'influe pas beaucoup sur les caractéristiques de la molécule active à l'égard du microorganisme ; cela est vrai même avec les microsphères composites.

3.6. Conclusion :

Les résultats obtenus montrent que la préparation des sphères de chitosane par gélation ionotropique est un procédé simple et facilement exécutable à l'échelle industrielle, ce processus ne demande pas l'utilisation des produits nocifs ou toxiques et par conséquent la diminution des effets secondaires ce qui intéresse plusieurs chercheurs dans différent domaine.

La réticulation du polymère cationique par des ions phosphates aliphatique et cyclique présente une distinction des propriétés physico-chimique des billes de chitosane tel que les systèmes réticulés par le tripolyphosphate ont une structure plus rigide, un taux de gonflement relativement faible et leurs cinétique de libération du principe actif ne présente pas de libération prématuré.

La réticulation des sphères de chitosane par le glutaraldehyde a pour objectif l'obtention un taux de réticulation maximale, dans le but de la comparaison de leurs propriétés avec des nouveaux systèmes hybrides, ce sont des systèmes composites où l'introduction d'un matériau minérale augmente la dureté mécanique et diminue la tortuosité des billes ce qui diminue leurs taux de gonflement et par conséquent ils ont une vitesse de libération relativement prolongée.

Les billes de chitosane chargées de l'oxytétracycline destinées à l'administration orale s'hydrolyse rapidement dans le milieu gastrique que dans le milieu intestinale, par conséquent, la libération de principe actif est plus rapide dans le pH=1,2 et atteint le maximum au bout de trois jours, alors que à pH=6,8 les billes peut libérer du principe actif plus que trois jours.

CHAPITRE 4

Préparation des sphères biocomposites chargées du complexe d'inclusion oxytétracycline : bêta-cyclodextrine

Les matériaux hybrides "organique-inorganique" représentent actuellement un sujet d'étude important dans les domaines biomédical et pharmaceutique. Ils font l'objet d'un intérêt immense, en permettant d'allier à la fois certaines propriétés d'un matériau inorganique, et certaines propriétés d'un polymère. Cette symbiose entre deux mondes de la chimie trop longtemps considérés comme antagonistes peut aussi amener à des propriétés complètement nouvelles et ouvre un vaste champ d'investigations pour le chimiste. Les applications de ces matériaux "nouveaux" couvrent des champs aussi variés que les propriétés de résistance mécanique, l'optique, l'électronique et l'ionique du solide et biomatériaux [21].

Parmi ces domaines d'applications, nombreux sont ceux qui sont susceptibles d'utiliser des matériaux hybrides sous forme de microparticules sphériques de taille homogène dans le but de l'encapsulation des principes actifs. [21]

Les matériaux inorganiques de type silicique ou hydroxyde double lamellaire récemment mis au point au laboratoire ont été à l'origine de la formation d'objets hybrides nanostructurés originaux avec une grande affinité vis-à-vis des principes actifs oléophiles.

La morphologie et les interactions aux interfaces des nanostructures hybrides seront caractérisées par des méthodes physico-chimiques usuelles, tandis que les cinétiques de libération seront évaluées selon les normes de la Pharmacopée. [36]

Dans ce chapitre, notre objectif est d'encapsuler le système supramoléculaire OTC : β -CD dans les microsphères (CS/HAP) afin de synthétiser de nouveaux vecteurs hybrides dans le but d'assurer la stabilité et la libération de l'oxytétracycline dans le milieu gastrique et le milieu intestinale.

4.1.Préparation biomimétique de l'hydroxyapatite dans le SBF :

La forme des cristaux Hydroxyapatite (HA) peut affecter de nombreuses de ses caractéristiques, telles que les propriétés de surface, la bioactivité et ainsi de suite. Par conséquent, le contrôle éventuel de la forme de ces cristaux d'HA (aiguilles, sphères, plaques), peut induire des applications spécifiques. L'hydroxyapatite sous forme microsphérique est d'usage plus polyvalent dans des applications biomédicales. [37]

4.1.1. Préparation du liquide physiologique simulé (SBF)

Le SBF est une solution saline, possédant un pH neutre et libre d'enzymes, sa préparation se fait selon le protocole expérimental suivant : [38]

On met une quantité d'eau distillée dans un Erlen-Meyer. On y dissout ensuite des masses définies des réactifs cités ci-dessous afin d'avoir des concentrations ioniques correspondant à celles du plasma sanguin.

NaCl, NaHCO₃, KCl, Na₂HPO₄, MgCl₂, Na₂SO₄, (C₂H₅OH)₃CNH₂.

- On ajoute les réactifs l'un après l'autre du CaCl₂.2H₂O à Na₂SO₄.
- On ajoute (C₂H₅OH)₃CNH₂.
- On neutralise avec HCl jusqu'à pH=7.4.
- On complète le volume jusqu'à 1000 ml.
- On Conserve au réfrigérateur à 5°C dans un flacon en polyéthylène.

4.1.2.Protocole de synthèse de l'HAP :

➤ *Mode Opératoire*

Dans un ballon bicol de 250 ml, on introduit un volume de 100 ml d'une solution de CaCl₂, 0.51M, dans le SBF, on ajoute ensuite à cette solution, goutte à goutte et sous agitation, un volume de 13.4 ml d'une solution de Na₂HPO₄ de 2.29M dans le SBF tout en maintenant le pH à 9. On porte le mélange réactionnel à reflux sous agitation à une T = 37 C° pendant 30 min. Un précipité blanc est récupéré sous

vide puis séché à une température entre 30-37 C°. La procédure peut être décrite selon l'organigramme de la Fig.4.1.

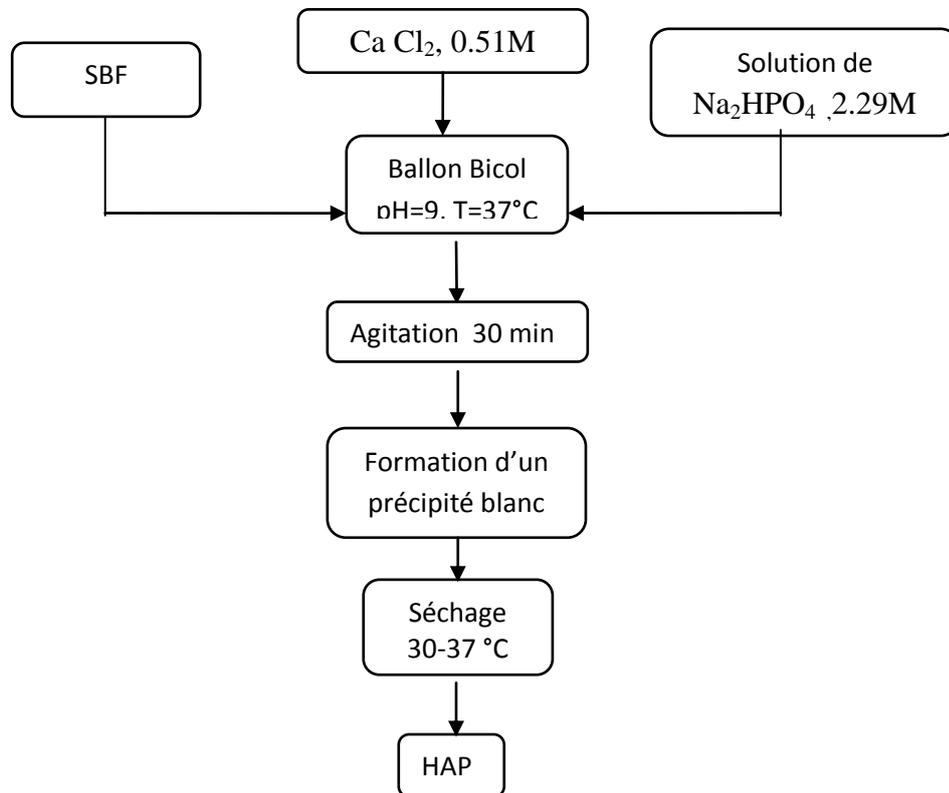
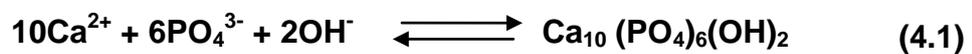


Figure 4.1: Organigramme de synthèse de l'HAP.

La préparation de l'hydroxyapatite peut être décrite par la réaction suivante :



4.1.3. Aspect physique :

L'HAP (figure ci-dessous) se trouve sous forme de poudre, blanche, fine, sans odeur caractéristique.



Figure 4.2: Vue macroscopique de l'HAP synthétisé.

4.2. Caractérisation structurale de l'hydroxyapatite préparée:

4.2.1. Diffraction des rayons X :

La pureté et les niveaux de cristallinité de la poudre HAP ont été mesurés par diffractométrie X (XRD) au sein de centre de recherche nucléaire d'Alger (CRNA), à un pas de $0,05^\circ$ de 2θ et un temps de comptage de 0,5 s. Un tube de Cu-K exploité à 40 kV et 40 mA a été utilisé pour la génération des rayons X. Le spectre obtenu est présenté ci-dessous

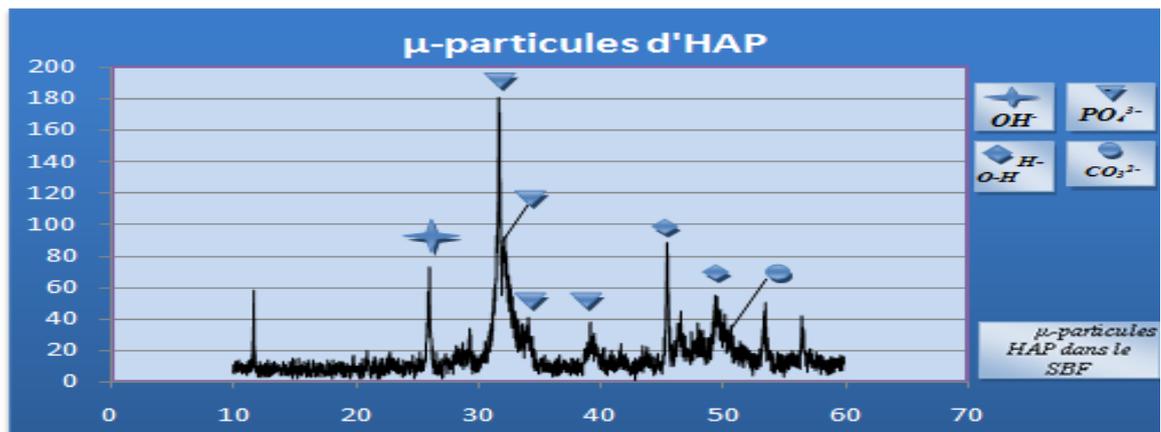


Figure 4.3 : Diffractogramme R-X de l'HAP préparée par voie biomimétique.

Les pics caractéristiques dans l'intervalle $20^\circ < 2\theta < 60^\circ$ de l'HAP sont présentés sur la Figure 4.3. Comme indiqué cette figure, les pics caractéristiques à $2\theta = 26,12^\circ$, 32° et 13° correspondent à la carte de diffraction standard de l'HAP (JCPDS 09-432, [40]) sans autres phases étant détecté. La diminution dans l'intensité du pic $2\theta = 31.73$ indique la diminution dans la cristallinité au niveau de

ce point qui peut être attribuée à la formation des ponts hydroxyles P-OH durant le processus de précipitation.

T. Matsumoto et al. [39] montrent que la cristallinité de HA dépend de la température de sa synthèse de telle manière que les HA synthétisés à basse température possèdent une faible cristallinité. Par ailleurs, la solubilité de l'hydroxyapatite se trouve être élevée lorsqu'elle est synthétisée à basse température. On donne ci-dessous les spectres DRX de l'HA, du phosphate tricalcique et du phosphate tétracalcique.

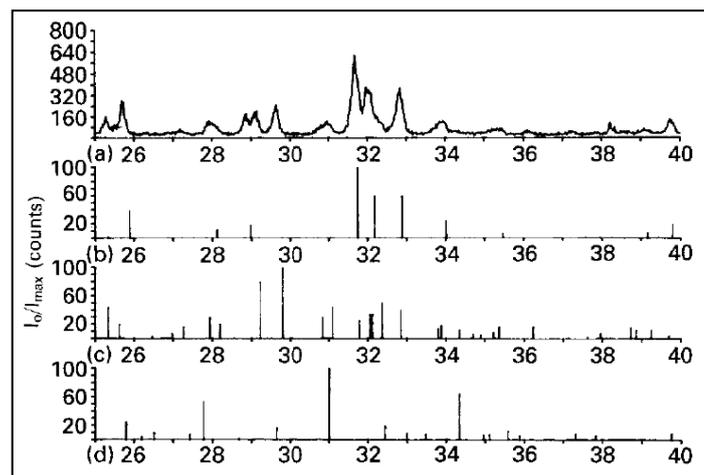


Figure 4.4 : Diffractogrammes de (a) HA calciné (950°C 12h, 1.33×10^{-4} Pa à vide) (b) Ha (JCPDS 9-432), (c) phosphate tétracalcique (JCPDS 25-1137) et du (d) β -phosphate tricalcique (JCPDS 9-169). [40]

4.2.2 Spectroscopie d'absorption infrarouge FTIR:

La caractérisation de la composition chimique de l'hydroxyapatite obtenue est réalisée par spectroscopie FTIR par la méthode des disques de KBr sur une gamme de 400 cm^{-1} à 4000 cm^{-1} . Le spectre est présenté ci-dessous :

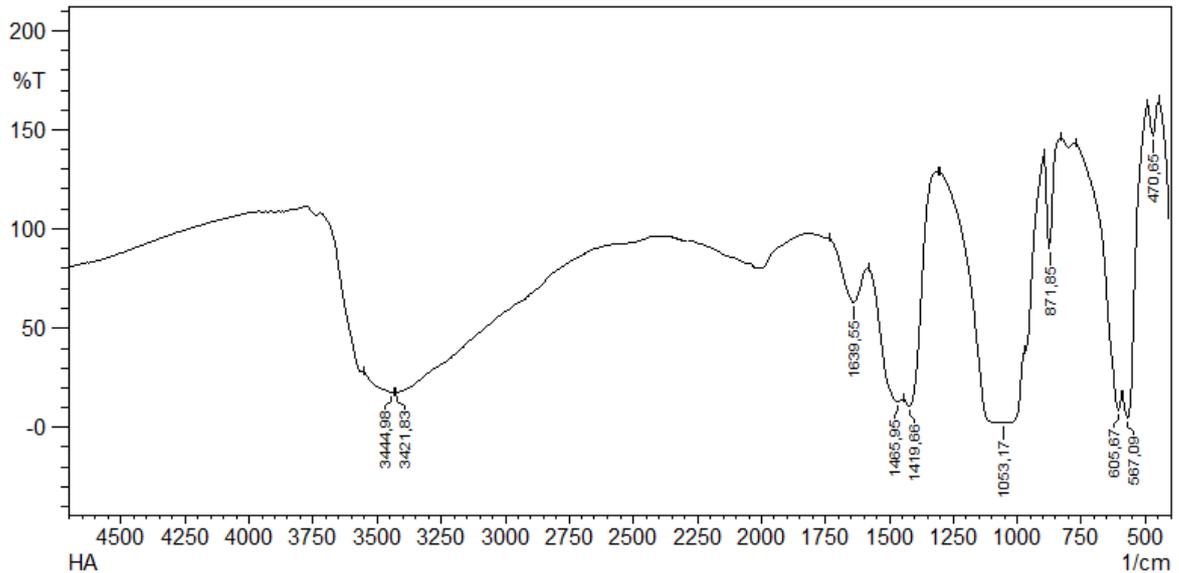


Figure 4.5 : spectre FTIR de l'hydroxyapatite biomimétiquement préparé.

Les bandes larges à 3444 et 1639 cm^{-1} sont attribuées à l'eau adsorbée. Les deux pics vers 1639 cm^{-1} , ils sont attribués à la vibration de déformation du groupement OH^- due à la présence de l'eau associée avec l'HAP. La présence des pics à 1465 1419 et 871 cm^{-1} suggère la présence des ions carbonate CO_3^{2-} (captées de la solution de préparation), et à la fin, les pics vers 1053, 605, 567 et 470 cm^{-1} correspondent aux ions PO_4^{3-} .

4.2.3. Granulométrie laser :

La distribution granulométrique de la poudre HAP/SBF immergée dans l'eau minérale (élément dispersant), a été déterminée par granulométrie laser est présentée sur la Figure 4.6.

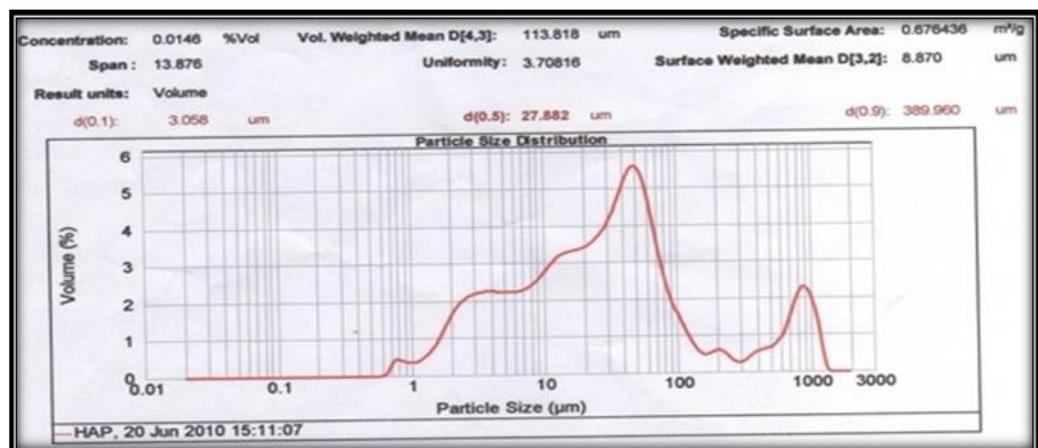


Figure 4.6 : la distribution de la taille des microsphères d'hydroxyapatite.

La courbe Volume (%) = f (taille de la particule (μm)), fait apparaître que les nouvelles microparticules synthétisées ont une surface spécifique $S_s = 0.93 \text{ m}^3/\text{g}$ et des tailles comprises entre 2.4 et 34.8 μm avec une taille moyenne de l'ordre de 10.4 μm .

La distribution de la taille des microsphères n'est pas uniforme, et cela est attribuable à l'agglomération des particules lors de leur filtration sous vide et le séchage. Il semble que le meilleur moyen pour garder des particules libres est d'utiliser la lyophilisation comme moyen de séchage ou l'utilisation d'une solution de collagène ou d'amidon au lieu de la solution SBF. [37]

4.2.4. Observation des microparticules d'HAP par MEB :

La Figure 4.7 représente images obtenues par microscopie électronique à balayage (MEB) avec différents agrandissements de microparticules d'HAP préparées dans le milieu SBF. L'analyse étant faite au sein du centre de recherche nucléaire d'Alger (CRNA).

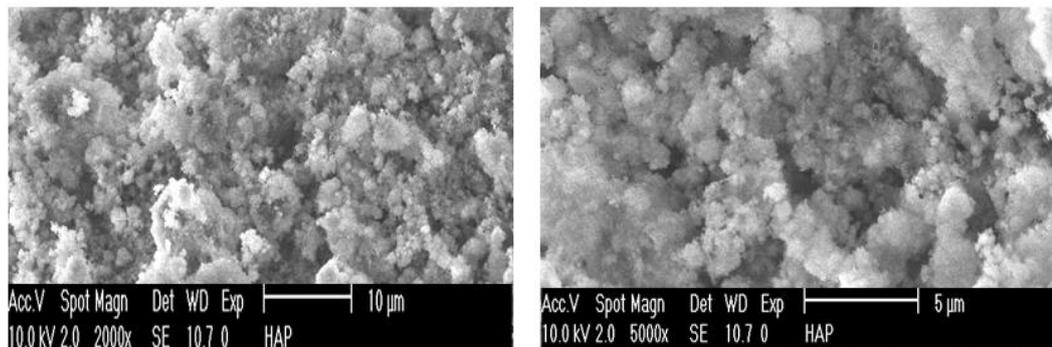


Figure 4.7: Microphotographies MEB des microparticules d'HAP biomimétique.

Les microphotographies des microsphères montrent une structure fortement agglomérée, après agrandissement les particules d'hydroxyapatite apparaissent sphériques avec une structure épongeuse.

4.3. Préparation des systèmes supramoléculaires :

Les cyclodextrines naturelles, qui sont des oligosaccharides cycliques, peuvent être modifiées pour obtenir des dérivés plus solubles ou insolubles dans l'eau. Leur intérêt majeur est l'encapsulation moléculaire de composés hydrophobes au sein de leur cavité pour former un complexe d'inclusion. Cette propriété a été mise

à profit en pharmacie galénique, pour administrer des actifs difficiles à formuler et/ou instables.

Le processus d'inclusion de molécules organiques avec des cyclodextrines (CD) se traduit généralement par une modulation des propriétés physico-chimiques des molécules hôtes, telles que la solubilité accrue, une stabilité chimique améliorée et une toxicité réduite et ainsi de suite. [41]

Les cyclodextrines (CDs) sont issues de la dégradation enzymatique de l'amidon, constitués par l'assemblage de 6 à 12 motifs de glucose reliés par des liaisons α 1-4. Ces molécules ont une forme torique tronconique. De façon très schématique, on peut représenter ces composés sous forme de godet, ou d'abat-jour (figure 4.8).[42]

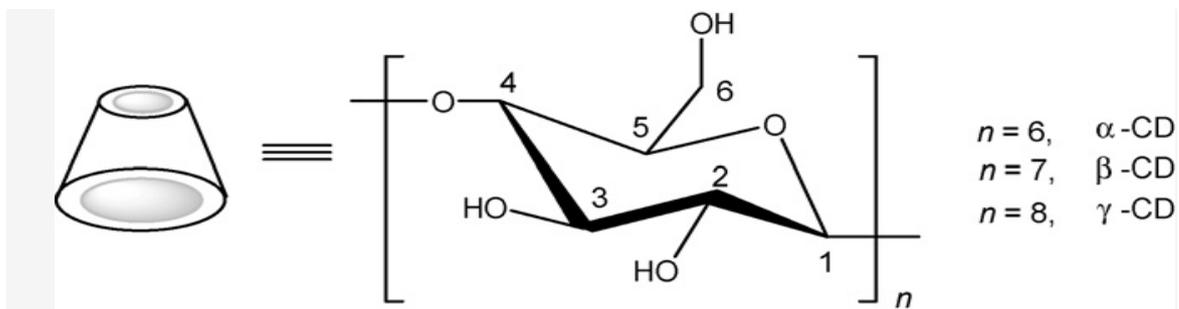


Figure 4.8: structure générale des cyclodextrines. [43]

Les cyclodextrines les plus courantes sont l' α , la β , et la γ -cyclodextrine contenant respectivement 6,7 et 8 unités D-glucopyranosiques. Il existe aussi des cyclodextrines plus grandes (appelées géantes) qui peuvent contenir jusqu'à 14 unités glucopyranosiques.

A cause de la structure tronconique et de la position particulière des hydroxyles, les cyclodextrines sont amphiphiles et possèdent donc deux zones de polarité distincte. L'extérieur de la cavité et les extrémités sont polaires : ceci est dû essentiellement aux hydroxyles et favorise ainsi la solubilisation dans des solvants très polaires. [44]

En revanche, l'intérieur de la cavité, où se trouvent uniquement les oxygènes interglucosidiques, est moins polaire (polarité de type éther) et cette zone est plus hydrophobe (surface de contact avec la molécule invitée). C'est ce caractère

amphiphile qui donne aux CD la faculté de former des complexes supramoléculaires en solution aqueuse avec une molécule invitée relativement hydrophobe. [44]

4.3.1. Inclusion de l'oxytétracycline dans la β -cyclodextrine :

- *Etude structurale de l'oxytétracycline :*

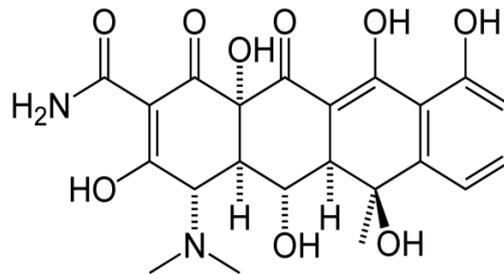


Figure 4.9: Structure de l'oxytétracycline. [45]

Sur le plan structural, l'oxytétracycline se caractérise par les fragments suivants :

- un squelette de base dérivé du naphtacène qui résulte de la condensation en ligne de quatre cycles insaturés à six chaînons,
- une structure très oxygénée comportant notamment un noyau phénol, un enchaînement β -dicétophénolique qui est une structure à doubles liaisons conjuguées comprenant un hydroxyle phénolique et énolique et 2 fonctions cétones ainsi qu'un hydroxyle énolique,
- une fonction amine tertiaire basique (groupement diméthylamine),
- une fonction carboxamide.

Son spectre FTIR (figure 4.10) présente plusieurs modes de vibration, tel que : $\nu(\text{C-N})$ à 3363 cm^{-1} , $\nu(\text{C=O})$ et $\nu(\text{C=C})$ correspondant aux noyaux aromatiques sont entre $1674\text{--}1589 \text{ cm}^{-1}$, les pics à $1459\text{--}1309$ correspondent aux $\delta(\text{OH})$, $\delta(\text{C-C})$ est $\nu(\text{C-C})$ est enfin les bandes entre $1273\text{--}1238 \text{ cm}^{-1}$ correspondant à $\delta(\text{N-H})$ et $\nu(\text{C-N})$.

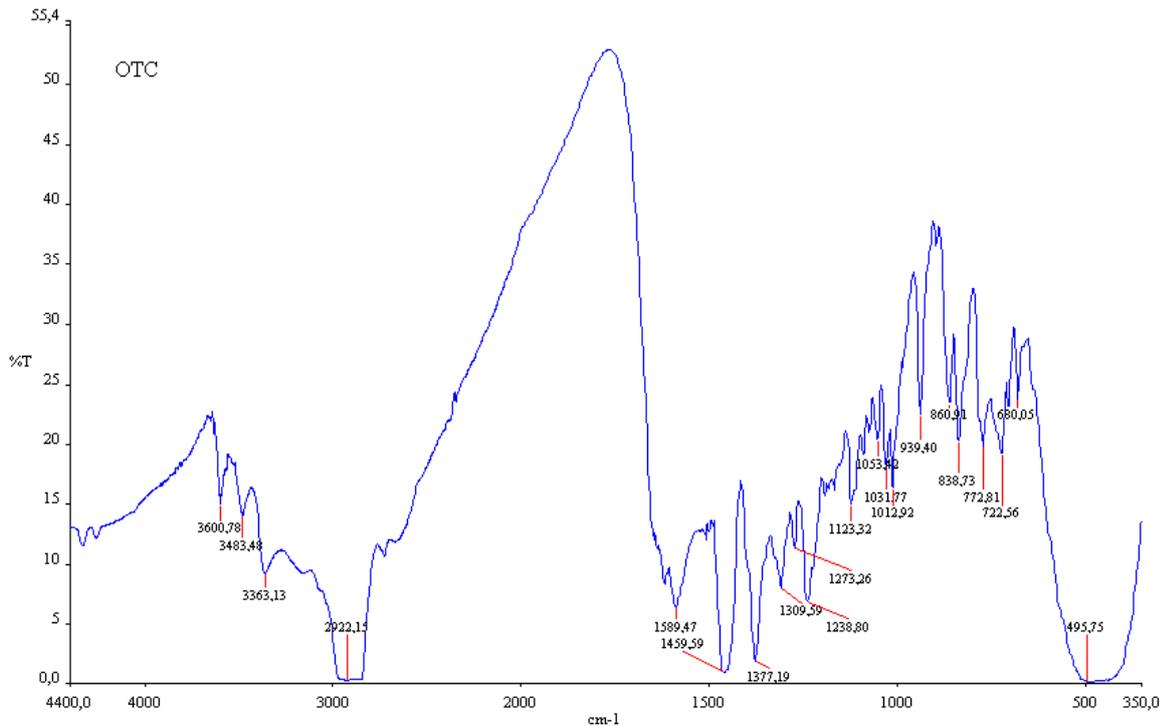


Figure 4.10: spectre FTIR de l'oxytétracycline.

4.3.2. Détermination de la stœchiométrie du complexe d'inclusion OTC : β CD :

Deux solutions équimolaires de β -CD et de l'OTC à 10^{-3} M ont été préparées, et mélangées à différentes fractions tel que la concentration finale du mélange reste constante (10^{-3} M). Après agitation de 24h, Nous avons mesuré l'absorbance des différentes solutions à 353nm, la différence de l'absorbance ΔA entre l'existence et l'absence de la β -CD a été tracée en fonction de rapport molaire r , soit :

$$\Delta A^*[\text{OTC}] = f(r) \dots\dots (4.2) \quad \text{ou} \quad r = \frac{[\text{OTC}]}{[\text{OTC}] + [\beta\text{CD}]} \dots\dots(4.3)$$

Selon la méthode des variations continues, la concentration maximale du complexe doit être dans l'échantillon qui a un rapport molaire correspondant à la stœchiométrie de complexation. Dans la figure 4.11, le maximum des variations des absorbances pour l'oxytétracycline : β -CD est observé à $r = 0.5$, ce qui indique que la stœchiométrie est de 1 :1,

$$r_{\max} = 0.5 = 1/1+n \quad \Rightarrow \quad n=1 ;$$

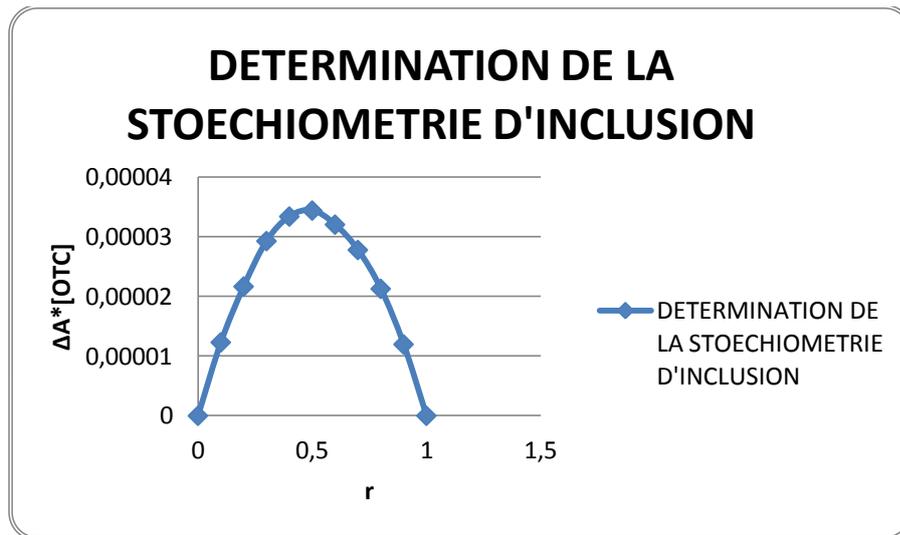


Figure 4.11: la détermination de la stœchiométrie d'inclusion.

Le complexe d'inclusion oxytétracycline : β -cyclodextrine est donc probablement formé selon le processus suivant :

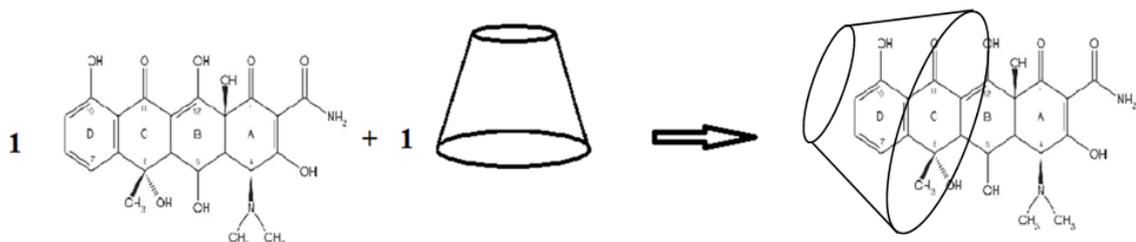


Figure 4.12: Représentation schématique du complexe d'inclusion OTC: β -CD.

4.3.3. Détermination de la constante de formation du complexe d'inclusion :

La constante de formation du complexe d'inclusion caractérise l'affinité entre l'oxytétracycline et la cavité de la β -cyclodextrine. La détermination de cette constante a été réalisée par la méthode de « Scott » (méthode de variation des absorbances).

Nous avons préparé une série de mélange OTC/ β -CD en gardant la concentration de l'OTC faible et constante (10^{-3} mol/l); on fait varier la concentration de β -CD progressivement, puis on mesure les variations d'absorbance en présence et en absence de la β -CD. Le tracé de l'inverse de la différence d'absorbance en fonction de l'inverse de la concentration de la β -CD (figure ci-dessous) nous permet d'avoir une corrélation linéaire dont l'équation est $y = 9 \text{ E-}05 + 7,66$.

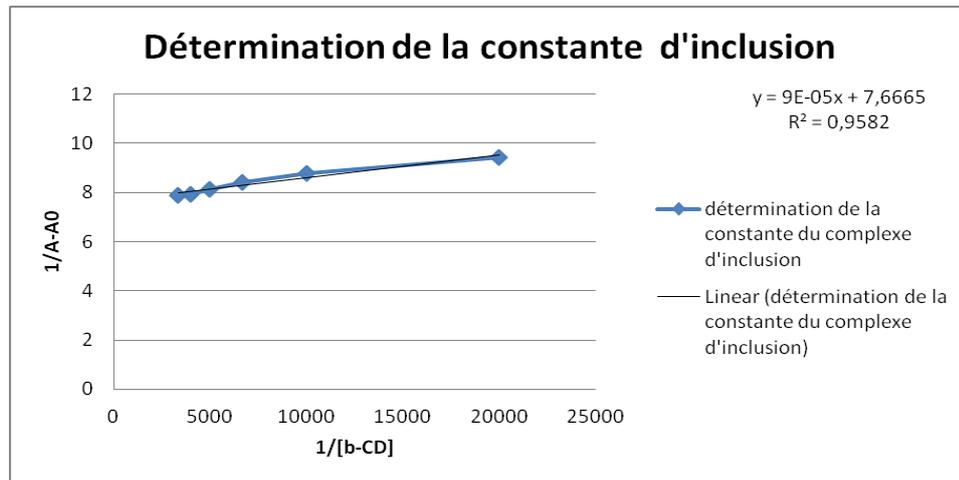


Figure 4.13 : La courbe double réciproque de formation du complexe d'inclusion

Par analogie avec l'équation de Benesei-Hildenbrand [42]:

$$\frac{1}{\Delta A} = \frac{1}{\alpha K_f [\beta-CD]} + \frac{1}{\varepsilon} \quad \dots\dots\dots (4.4)$$

Cette linéarité confirme une inclusion avec stœchiométrie de 1 :1, et avec une constante de formation $K_f = 85,111 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$. Néanmoins, la confirmation d'un tel résultat à l'aide de la RMN serait probante.

4.4. Préparation de l'hydroxyapatite chargé biomimétiquement :

Dans le but de l'encapsulation du complexe d'inclusion préparé, les microsphères d'hydroxyapatite chargées ont été préparées selon le même mécanisme :

Dans un ballon Bicol, on introduit 100ml d'une solution 0.51 M de CaCl_2 , 0,2g du complexe OTC: β -CD en ajoutant goutte à goutte et sous agitation 13,4 ml

d'une solution 2.29 M de K_2HPO_4 , on maintient le pH du milieu réactionnel à $pH=9$ puis on le porte à reflux sous agitation à $T=37^\circ C$ pendant 30 min. On récupère le précipité blanc, sous vide. On sèche ce dernier à $T=30^\circ C$.

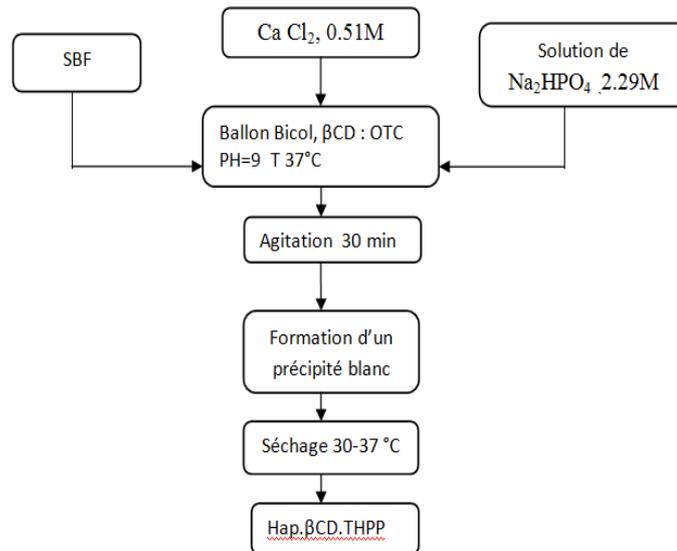


Figure 4.14 : Organigramme de synthèse des microparticules d'HA chargées.

La formation des nouvelles espèces, se fait en deux étapes pouvant être décrites par les relations 4.5 et 4.6 respectivement :

- **Etape (1) :**



- **Etape (2) :**



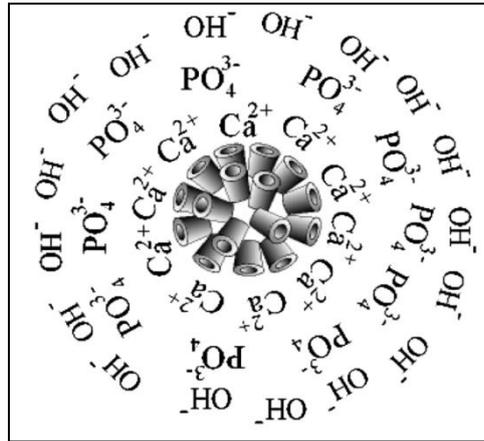


Figure 4.15 : Mécanisme possible pour la formation de microsphères d'HA.[37]

Grâce à la surface hydrophile de β -CD, les hydroxyles qui existent à cette surface, attirent les ions Ca^{2+} , puis les ions PO_4^{3-} et OH^- seront absorbé autour les ions calcium par des interactions électrostatiques pour former un noyau cristallin. Avec l'augmentation du temps de réaction, les noyaux augmentent de volume jusqu'à la formation des particules stables.

Les spectres FTIR des échantillons préparés (figure 4.16) montrent les bandes d'absorption caractéristiques de l'HA : pics à 474, 563, 605 et 1037 cm^{-1} attribués à PO_4^{3-} , pics à 875, 1408 et 1458 cm^{-1} attribués au groupement CO_3^{2-} . La bande autour de 1635 cm^{-1} est à la présence dans l'échantillon de l'eau associée.

Le pic caractéristique de OH^- vers 3446 cm^{-1} est déplacé vers 3352 cm^{-1} ce qui indique qu'il ya une interaction de coordination entre le Ca^{2+} et le complexe d'inclusion plus précisément entre Ca^{2+} et β -CD, ce résultat montre que le groupement OH^- de la β -CD est le site d'interaction major entre la β -CD et Ca^{2+} . Ainsi, il est remarqué que des changements apparaissent sur les pics caractéristiques du PO_4^{3-} d'où la disparition du pic caractéristique du PO_4^{3-} vers 967 cm^{-1} . Les résultats que nous avons produits dans ce travail sont comparables à ceux de Xiao (2008) [37].

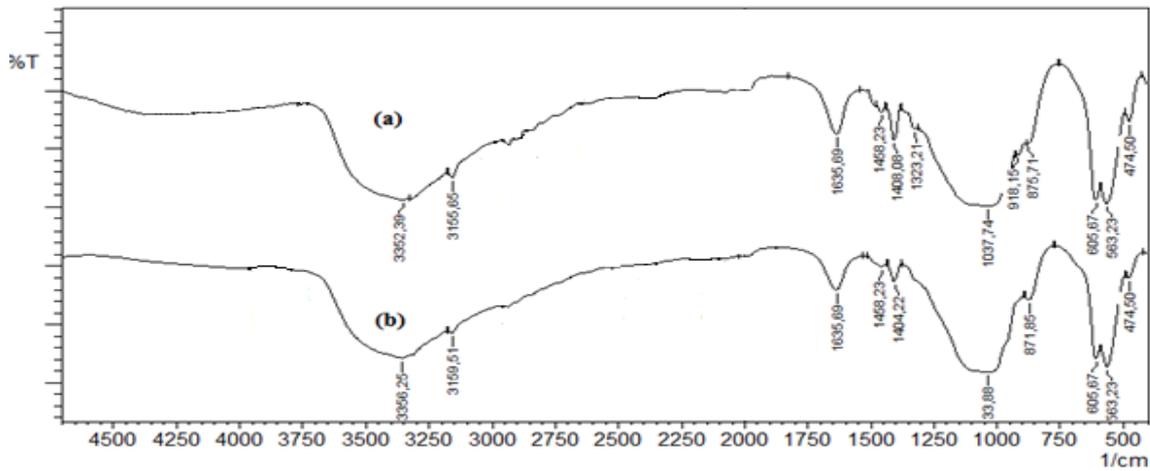


Figure 4.16: spectre FTIR de l'hydroxyapatite chargé (a : HA/Cl ; b :HA/OTC).

4.5.

4. 5.1. Caractérisation des microsphères biocomposites :

Préparation des microsphères biocomposites chargées :

Une solution du chitosane à 2% a été mélangée avec une quantité d'hydroxyapatite chargé d'oxytétracycline : β -CD, puis nous avons injecté ce mélange dans des solutions de réticulations : au tripolyphosphate (10%) et à l'hexametaphosphate de sodium (10%). Après 30 min, les microsphères sont filtrées et rincées puis séchées à l'abri de lumière.

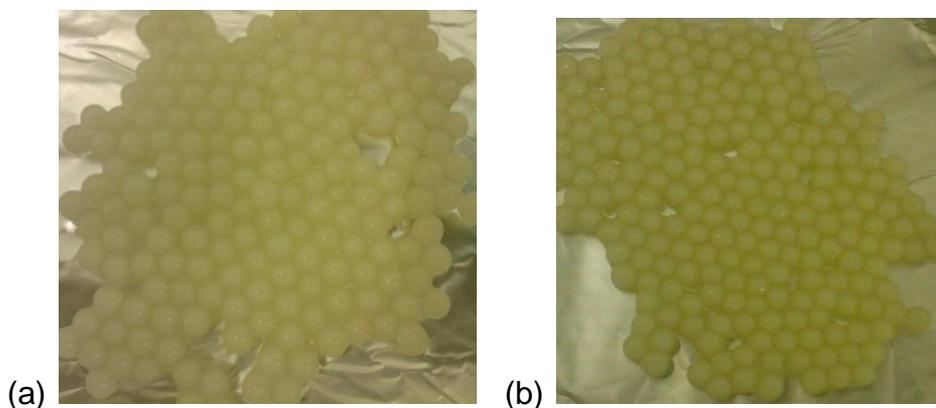


Figure 4.17: Microsphères biocomposites chargées; (a) microsphères réticulés par TPP ; (b) microsphères réticulés par HMP.

4.5.2. Microscopie Electronique à Balayage:

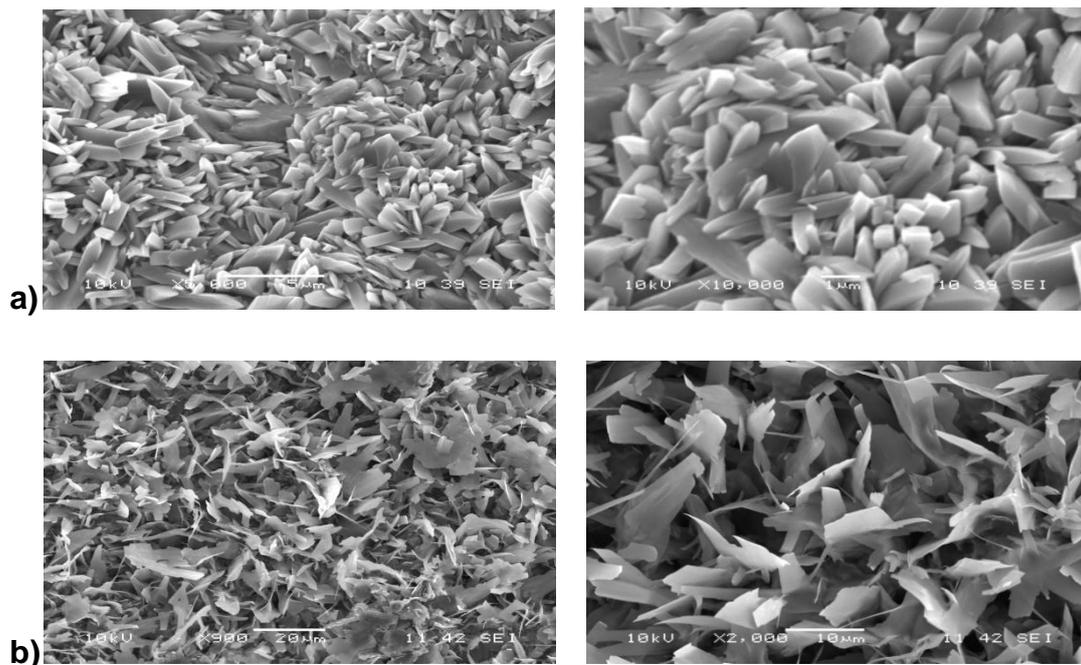


Figure 4.18 : Images MEB des particules composites (a : CS/HA/CI/TPP ; b : CS/HA/CI/HMP).

Les images obtenues par microscopie électronique montrent la structure des sphères composite obtenues. Leur surface est rugueuse, poreuse mais homogène. Les sphères réticulées par TPP ont une structure semi-cristalline par contre les sphères réticulées par HMP ont une structure lâche et fragile et cela revient à la présence des particules d'hydroxyapatite qui peuvent inhiber le processus de réticulation ce qui peut conduire à des structures très poreuse.

4.6.Cinétique de libération de l'oxytétracycline à partir des sphères biocomposites :

Pour obtenir le profil de libération de l'oxytétracycline à partir des sphères composites de chitosane/HA, une quantité de ces sphères a été imprégnée dans 20ml de solution SGF pour le milieu gastrique et 20 ml de solution SIF pour le milieu intestinale à 37°C sous agitation. Les prélèvements ont été effectués chaque 2h pendant 8h puis chaque 24H pendant 3 jours. Les résultats obtenus sont consignés dans les figures 4.20 et 4.21.

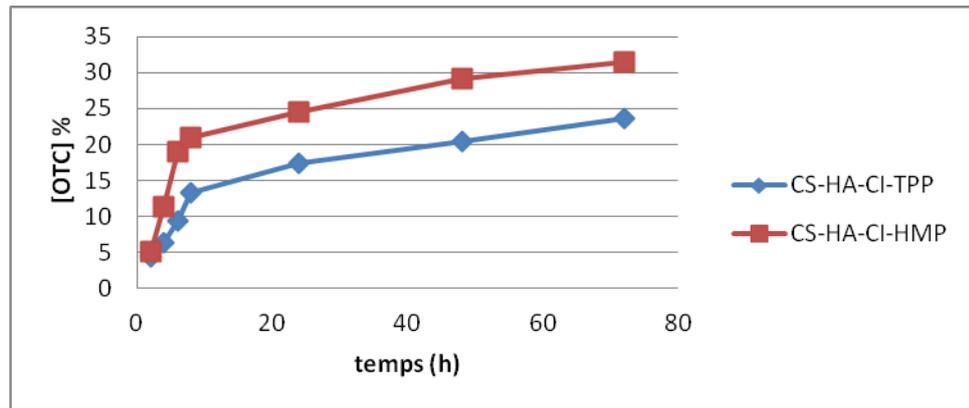


Figure 4.19 : cinétique de libération de l'oxytétracycline dans le milieu gastrique.

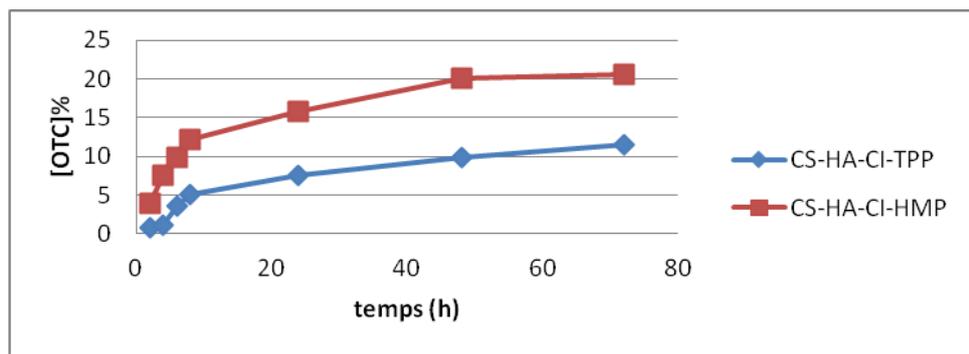


Figure 4.20 : cinétique de libération de l'oxytétracycline dans le milieu intestinal.

D'après ces résultats, nous constatons deux phases de libération; une première relativement rapide qui est due à la libération du principe actif qui se trouve à la surface des sphères, et une deuxième plus lente et prolongée due à la libération de la partie retenue par inclusion.

Les pourcentages de libération après les 72h d'expérience ne dépassent pas les 35% pour le milieu gastrique et les 25% pour le milieu intestinal, cela montre bien que le système biocomposite offre des cinétiques de libération très lentes qu'il est très intéressant d'en approfondir l'étude pour des temps plus lents.

T. Matsumoto et al. [39] ont préparé des microsphères d'hydroxyapatite à différentes températures, ils constatent que leur cristallinité décroît avec la décroissance de température et leur solubilité dans le milieu acide augmente.

Par conséquent, la destruction de la matrice minérale est plus importante dans le milieu acide.

Les travaux de Gbureck et al.[46], consistent à enrober les microsphères d'hydroxyapatite, chargées par différents types d'antibiotiques par adsorption, par une couche de polymère (polylactique acide/polyglycolique acide). Ils ont conclu que la cinétique de libération de l'agent actif dépend de l'épaisseur de la couche de polymère car la libération de principe actif à partir du matrice HA est spontanée et arrive à 90% après 6h. Ils rajoutent que la nature du principe actif influe sur le profil de libération par exemple les tétracyclines forme des complexe stable avec les ions Ca^{++} , par conséquent leurs libération est très lente et dépasse les 3 semaines (figure 4.22) :

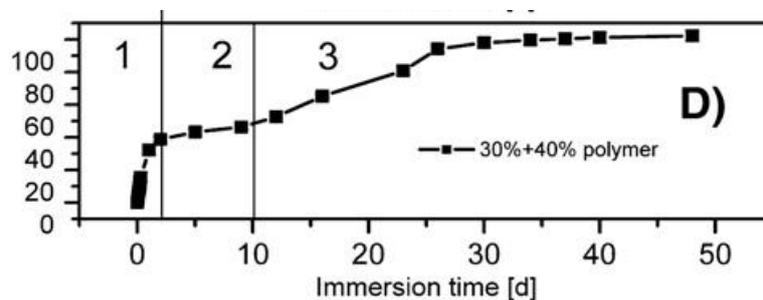


Figure 4.21 : Cinétique de libération de la tétracycline à partir des microsphères d'HA revêtues de couches de polymères (PLA/PLGA), d'après Gbureck et al [46].

Citons aussi l'exemple des travaux de Q. Xu et J.T. Czernuszka, qui ont préparé des microsphères composites hydroxyapatite chargé/PLGA (poly co-glycolique acide) qui présentent un faible taux de chargement et un profil de libération très prolongé arrive à plus qu'un mois.

Par conséquent, les sphères composite présente un moyen de prolongement de la libération du principe actif qui peut retarder son effet thérapeutique ce qui n'est pas valable pour l'administration orale car l'élimination des sphères joue un rôle limitant de leurs utilisation.

Les phénomènes de diffusion qui se produisent lors de la libération ont été corrélés à l'équation de Korsmeyer-Peppas :

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n$$

Le tracé de $\log (M_t/M_\infty)$ en fonction de $\log (\text{temps})$ est représenté sur les figure 4.23 et 4.24 :

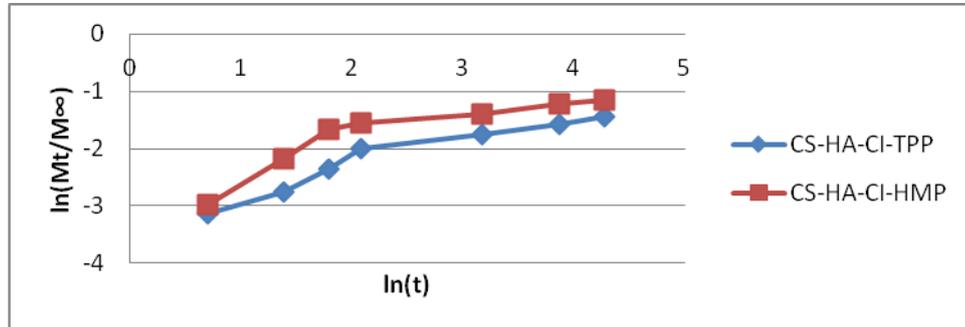


Figure 4.22 : Tracé des courbes linéarisées $\ln(M_t/M_\infty)$ en fonction de $\ln(t)$ des différents systèmes à pH=1,2.

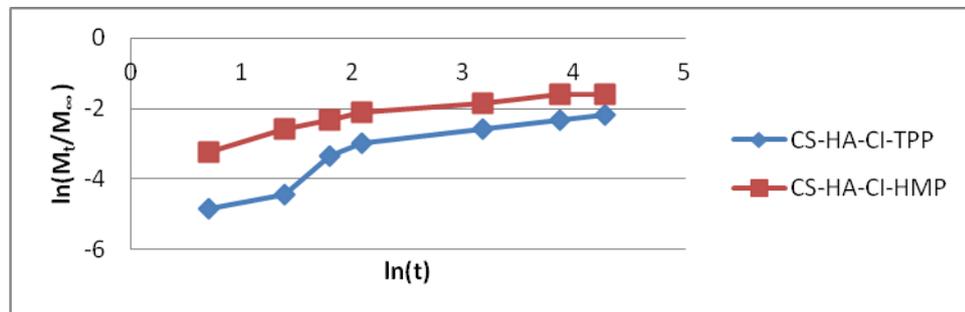


Figure 4.23: Tracé des courbes linéarisées $\ln(M_t/M_\infty)$ en fonction de $\ln(t)$ des différents systèmes à pH=6,8.

Les résultats des grandeurs caractéristiques sont récapitulés dans le tableau suivant :

Milieu gastrique pH=1,2				
système	équation regression	R ²	n	K
CS-HA-CI-TPP	y= 0,455x-3,27	0,92	0,45	0,038
CS-HA-CI-HMP	y=0,425x-2,787	0,78	0,42	0,068
milieu intestinal pH=6,8				
CS-HA-CI-TPP	y=0,73x-5,04	0,875	0,73	0,0064
CS-HA-CI-HMP	y=0,42x-3,22	0,9	0,42	0,039

Tableau 4.1 : paramètres caractéristiques de la diffusion dans les différents systèmes.

D'après les résultats, nous avons conclu que le phénomène qui domine lors de libération du principe actif est la diffusion fickienne, sauf pour les sphères composites réticulées par le TPP testés dans le milieu intestinal, $n=0,73$ donc la libération nécessite l'érosion de la matrice polymère, car à ce pH l'hydroxyapatite n'est pas soluble. Ce qui explique la faible valeur de constante de vitesse. Dans tous les cas, la déviation de la droite empirique du modèle mathématique est dû à la libération prématurée du principe actif qui se trouve à la surfaces des sphères.

4.7. Activité antibactérienne de l'oxytétracycline libérée à partir des microsphères biocomposites :

L'activité antibactérienne du principe actif libéré des microsphères composites a été évaluée par la méthode de diffusion sur agar (méthode de disque), les microsphères ont été imprégnées dans les solutions SGF et SIF à 37°C sous agitation horizontale, les prélèvements ont été effectués chaque 2h pendant 8h.

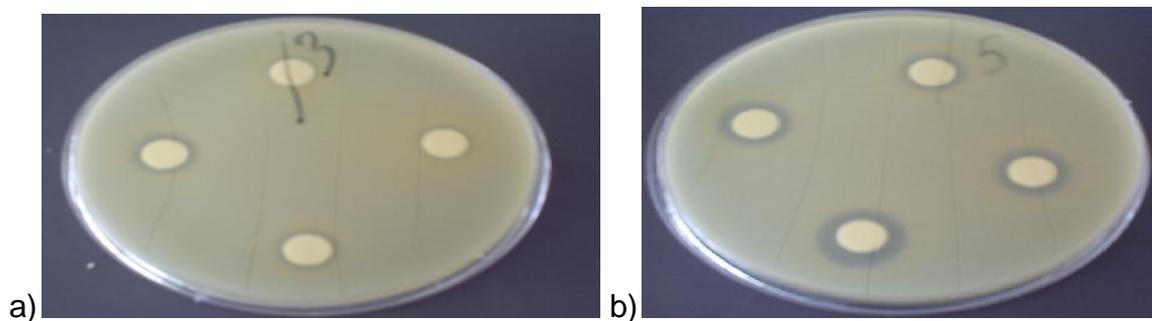


Figure 4.24 : Effet antibactérien de l'oxytétracycline libérée des différents systèmes sur la *staphylococcus aureus* dans le milieu gastrique : (a) CS-HA-OTC : β -CD-TPP; (b) CS-HA-OTC: β -cd-HMP).

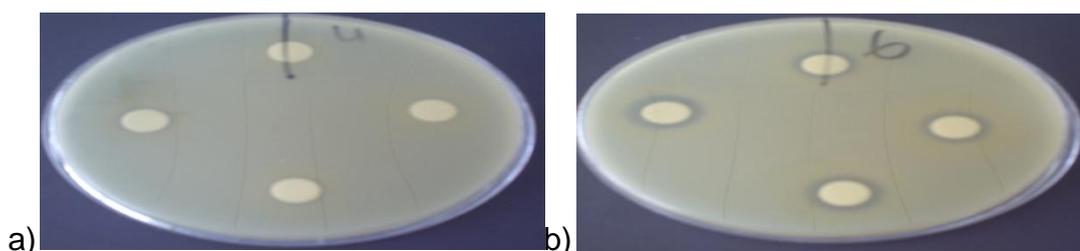


Figure 4.25: Effet antibactérien de l'oxytétracycline libérée des différents systèmes sur la *staphylococcus aureus* dans le milieu intestinal (a) CS-HA-OTC: β CD-TPP; (b) CS-HA-OTC: β -cd-HMP).

Ces images montrent clairement que la libération du principe actif est très lente et que l'effet antibactérien commence à partir du 2^{ème} prélèvement pour les sphères composites réticulées par TPP, et cela est attribuable à la structure du composite. La diffusion à partir de la matrice minérale puis la matrice du polymère fait retarder la libération du principe actif, et cela dépend principalement de la rigidité des deux matrices à la fois. Les systèmes réticulés par le HMP présentent un effet antibactérien plus au moins remarquable, en relation avec une structure relativement lâche et ouverte obtenue dans ce cas.

Dans le milieu gastrique, les deux matrices s'hydrolysent et le système perd sa rigidité plus rapidement que dans le milieu intestinale où le pH=6,8 et par conséquence, la libération du principe actif est très lente et l'effet antibactérien commence à partir de 8h pour les sphères réticulées par TPP. Les sphères réticulées par le HMP montrent un effet plus rapide qui commence dès le premier prélèvement à cause de ses propriétés d'hydratation (taux de gonflement).

4.8. Conclusion :

La préparation des microsphères d'hydroxyapatite dans des conditions similaires aux conditions physiologique conduise à l'obtention d'une matière qui a une affinité avec le corps humain. Nous avons étudié la possibilité de son utilisation dans l'administration orale d'un principe actif. L'encapsulation du principe actif dans des molécules cages tel que la β -cyclodextrine a pour but la protection de son effet thérapeutique qui peut subir un changement ou des interactions avec le milieu de préparation des microsphères. La cinétique de libération du principe actif à partir des sphères composites est très lente et certainement associée à des phénomènes concomitants et successifs complexes (diffusion, gonflement du support, érosion des sphères, ...etc.) qu'il n'est pas facile de maîtriser.

CONCLUSION GENERALE :

Dans ce travail, nous avons pu montrer expérimentalement que l'oxytétracycline en qu'agent thérapeutique peut être portée dans des billes de chitosane différemment conditionnées. En effet, il a été possible de rigidifier la membrane du biopolymère, initialement ayant une consistance de gel, à l'aide d'agents réticulant comme le tripolyphosphate (TPP), l'héxamétaphosphate (HMP) ou le glutaraldéhyde.

L'analyse morphologique par microscopie électronique à balayage aussi bien que les testes de gonflement ont montré que lorsque le TPP est utilisé pour la réticulation des billes de chitosane, la paroi devient plus rigide et moins poreuse ce qui conduit à des gonflements relativement faibles associés à des cinétiques de libération du principe actif (OTC) également lentes. Cette libération semble se faire, d'après nos résultats, conformément à l'association de deux phénomènes : la diffusion à partir de la bille chargée et l'érosion continue de celle-ci dans le fluide environnant.

Dans le cas de la réticulation au HMP, les billes de chitosane préparées présentent une porosité plus marquée, un taux de gonflement plus significatif et, par conséquent, une libération de l'OTC plus rapide qui se fait presque exclusivement par diffusion. Une libération prématurée (burst effect) importante du principe actif est observée dans ce cas.

L'utilisation du glutaraldéhyde comme agent réticulant supplémentaire apporte plus de rigidité au biomatériau et un faible gonflement de la bille est observé. Cependant, il apparaît ici que la libération de l'OTC est plus rapide notamment lorsque le chitosane se trouve traité initialement avec le TPP.

Le gonflement des supports composites préparés, chitosane-hydroxyapatite, a été trouvé faible ce qui a donné une cinétique relativement lente où la diffusion et l'érosion du polymère constituent les processus contrôlant la libération du principe actif. En effet, il apparaît d'après les résultats obtenus que la charge minérale (l'HA) contribue un peu plus au ralentissement de la diffusion de l'OTC à travers la membrane du biopolymère et ce ralentissement est d'autant remarquable que la molécule se trouve être incluse dans la β -cyclodextrine selon une stoechiométrie 1 :1, comme il a été démontré dans un second volet de notre étude.

Du fait que l'oxytétracycline supportée par les billes de chitosane a montré une activité intacte à l'égard de *Staphylococcus aureus* lors de sa libération, il nous semble évident que les systèmes étudiés offrent un potentiel certain en pharmacotechnie qu'il est intéressant d'approfondir et d'optimiser.

APPENDICE A

LES CYCLODEXTRINES.

1. Introduction :

La chimie moléculaire a commencé avec la synthèse de l'urée par Wöhler en 1828. Cette chimie repose en quelque sorte sur les liaisons fortes appelées « covalentes », qui connectent entre eux les atomes formant des molécules. Ainsi, au-delà de la chimie moléculaire, existe-t-il un domaine appelé chimie supramoléculaire avec des associations de deux ou plusieurs espèces chimiques, des complexes et des liaisons intermoléculaires. Ces molécules sont capables de former des complexes moléculaires. Parmi les molécules qui peuvent jouer ces rôles. On peut citer les éthers couronnes, les porphyrines, les cryptâtes, les zéolithes, les clathrates, les cyclophanes et enfin les cyclodextrines.

Les cyclodextrines (CDs) sont très utilisées pour leur capacité de complexation d'une très large gamme de composés organiques. Ainsi, on trouve dans la littérature une multitude d'applications industrielles utilisant les propriétés des complexes d'inclusion telle que : solubilisation, protection physique et chimique, réduction de la volatilité ...etc. [42]

2 .Structure et propriétés des cyclodextrines :

Les cyclodextrines (CDs) sont des oligosaccharides cycliques, issus de la dégradation enzymatique de l'amidon, constitués par l'assemblage de 6 à 12 motifs de glucose reliés par des liaisons α 1-4. Ces molécules ont une forme torique tronconique. De façon très schématique, on peut représenter ces composés sous forme de godet, d'abat-jour (figure).[42]

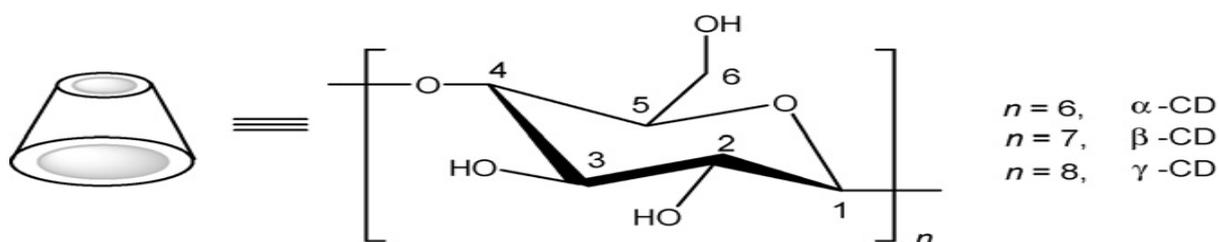


Figure 1: structure générale des cyclodextrines. [43]

Les cyclodextrines les plus courantes sont l' α , la β , et la γ -cyclodextrine contenant respectivement 6,7 et 8 unités D-glucopyranosiques. Il existe aussi des cyclodextrines plus grandes (appelées géantes) qui peuvent contenir jusqu'à 14 unités glucopyranosiques.[44]

Les cyclodextrines possèdent une cavité d'environ 5 à 8 Å de diamètre qui leur permet d'inclure de nombreux composés organiques pour former des complexes d'inclusion à l'état solide ou en solution.

Sur la partie la plus large du cône se trouvent les hydroxyles secondaires (O2 et O3) et sur l'extrémité la plus étroite se trouvent les hydroxyles primaires (O6). Les oxygènes interglucosidiques (O4) sont situés sur l'équateur du cône et dirigés vers l'intérieur de la cavité. Les hydrogènes H1, H2 et H4 sont dirigés vers l'extérieur de la cavité tandis que les hydrogènes H3 et H5 sont orientés vers l'intérieur. Ces derniers sont les seuls pouvant interagir avec un substrat inclus dans la cavité.

A cause de la structure tronconique et de la position particulière des hydroxyles, les cyclodextrines sont amphiphiles et possèdent donc deux zones de polarité distinctes. L'extérieur de la cavité et les extrémités sont polaires : ceci est dû essentiellement aux hydroxyles et favorise ainsi la solubilisation dans des solvants très polaires.

En revanche, l'intérieur de la cavité où se trouvent uniquement les oxygènes interglucosidiques, est moins polaire (polarité de type éther) et cette zone est plus hydrophobe (surface de contact avec la molécule invitée). C'est ce caractère amphiphile qui donne aux CD leur intéressante propriété : former des complexes supramoléculaires en solution aqueuse avec une molécule invitée. Il existe dans la

littérature de nombreux exemples de complexes d'inclusion avec divers arrangements structuraux tels que des stœchiométries host :guest 1 :1 , 1 :2 , 2 :1 et 2 :2. [44]

En général les cyclodextrines et leurs dérivés hydrophiles sont reconnus comme quasiment non-toxiques en administration par voie orale. En effet ces molécules ne diffusent presque pas au travers des membranes biologiques et ne sont pas absorbées lors du transit intestinal. [42]

caractéristiques	α -CD	β -CD	γ -CD
Nombre d'unité glucose	6	7	8
Masse moléculaire (g/mol)	972	1135	1297
Diamètre de la cavité (Å)	4,7-5,2	6,0-6,4	7,5-8,3
Hauteur de tore (Å)	7,9-8,0	7,9-8,0	7,9-8,0
Diamètre de la périphérie (Å)	14,2-15,0	15,0-15,8	17,1-17,9
Volume approximatif de la cavité (Å ³)	174	262	427
Solubilité dans l'eau à 25 °c (g/100 ml)	14,5	1,85	23,2
Nombre de molécules d'eau retenues dans la cavité	6 -7,6	11 - 12	12,3 - 17

Tableau 1 : caractéristiques des trois principales cyclodextrines. [42]

3. Le complexe d'inclusion :

En chimie de coordination, les interactions de coordination entre l'ion central (M^{x+}) et les ligands (molécules ou ions) sont réalisés en formant des composés

de coordination avec certaines stœchiométries et configurations spatiales à l'aide des liaisons de coordination en acceptant ou en donnant des électrons célibataires paires ou des électrons π . Si les interactions de coordination se produisent, la molécule M^{x+} doit avoir des orbitales de valence vides, pour accepter les électrons célibataires ou les électrons π des ligands. Le processus de la formation des composés de coordination en solution aqueuse peut être considéré comme le processus de remplacement des molécules d'eau en coordination avec M^{x+} par des ligands, comme le montre la Fig. 2A. [43]

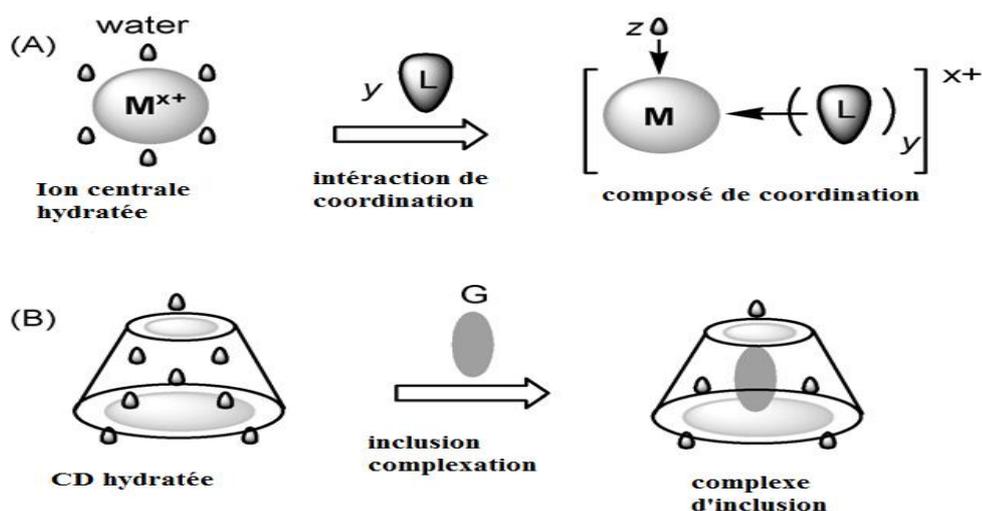
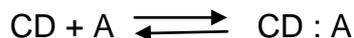


Figure 2: Un schéma illustrant la comparaison entre l'interaction de coordination (A) et de complexation d'inclusion (B). L et G représentent ligand et l'invité, respectivement. [43]

Le mécanisme de formation du complexe n'est régi essentiellement que par un facteur géométrique : le substrat doit avoir une taille compatible avec la cavité de la cyclodextrine. En effet, des molécules trop grosses, pour pénétrer même partiellement, dans la cavité de cyclodextrine ne pourront pas former de complexes stables. Il en est de même pour des molécules trop petites, qui pourront pénétrer dans la cavité, mais les interactions entre ces dernières et la cavité seront trop faibles pour les maintenir à l'intérieur et par conséquent elles en sortiront très rapidement. [42]

La formation du complexe entre la molécule invitée A et la CD, ainsi que la dissociation sont gouvernées par les lois thermodynamiques :



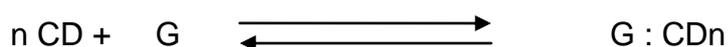
Cet équilibre donnera les constantes de formation (K_{for}) et de dissociation (K_{disso}) du complexe, mesures très importantes pour connaître la stabilité du complexe.[43]

4. Etude des complexes d'inclusion :

L'étude des propriétés physico-chimiques du complexe d'inclusion constitue une large partie de la chimie organique moderne. La première étape consiste à déterminer la stœchiométrie du complexe formé. Ensuite, il faut évaluer la constante d'association qui reflète la force d'interaction entre les deux espèces moléculaires (molécule invitée- molécule cage) et permet de connaître la proportion de la molécule complexée. Un certain nombre d'études physico-chimiques décrites dans la littérature pour déterminer la constante d'association reposent sur les techniques suivantes : RMN, spectroscopie UV-Visible, électrophorèse capillaire, potentiométrie, fluorimétrie, solubilité...etc. Et enfin, la dernière étape consiste à étudier la géométrie du complexe, n'est possible que par RMN. [42]

➤ *Détermination de stœchiométrie (Méthode de JOB) :*

La méthode des variations continues ou méthode de Job est utilisée pour déterminer la stœchiométrie des complexes d'inclusion avec les cyclodextrines[42]. La formation d'un complexe d'inclusion impliquant une molécule du composé à inclure (G) et n cyclodextrines (CD) sera décrite par :



La constante d'association du complexe d'inclusion sera alors décrite par :

$$K_a = \frac{[G:CD_n]}{[G][CD]^n} \dots\dots\dots(1)$$

Avec : $[G : CD_n]$ = concentration en complexe.

$[G]$ et $[CD]$ concentration en G et CD dans le mélange.

Soient $[G]_t$ et $[CD]_t$ les concentrations totales en G et CD dans l'échantillon, on peut écrire les relations suivantes :

$$[G] = [G]_t - n[G : CD_n] \dots\dots\dots(2)$$

$$[CD] = [CD]_t - n[G : CD_n] \dots\dots\dots(3)$$

La méthode des variations continues, ou méthode de job impose deux conditions :

1. Concentrations initiales des solutions mères utilisées identiques ;
2. Mélange les deux solutions à volume constant.

Ceci se traduit par :

$$[G]_t + [CD]_t = M \dots\dots\dots(4)$$

Avec M = la concentration totale de mélange.

$$r = [G]_t / ([G]_t + [CD]_t) \dots\dots\dots(5)$$

Avec r = la proportion molaire de la molécule invitée ($0 < r < 1$).

Les concentrations en espèces libres peuvent alors être déduites des relations suivantes :

$$[G] = rM - [G : CD_n] \dots\dots\dots(6)$$

$$[CD] = M(1 - r) - n[G : CD_n] \dots\dots\dots(7)$$

La concentration en complexe $[G : CD_n]$ est donc une fonction de r et elle passe par un maximum lorsque la dérivée $d[G : CD_n] / dr$ est nulle. La dérivation des équations (1), (6), (7) par rapport à r conduit aux relations suivantes :

$$[CD] \cdot d[G] / dr + n \cdot [G] \cdot d[CD] / dr = 0 \dots\dots\dots(8)$$

$$d[G] / dr = M \dots\dots\dots(9)$$

$$d [CD] = - M \dots\dots\dots(10)$$

Ces trois équations peuvent être combinées en une seule équation :

$$[CD] = n [G] \dots\dots\dots (11)$$

En utilisant les équations (6), (7), (11), on parvient à une solution unique et la concentration maximale en complexe est obtenue pour $r = 1/(1+n)$.

Cette relation ne dépend ni de la constante d'association K_a , ni de la valeur de la concentration M.

Pour l'étude des complexes d'inclusion, on est en échange rapide par rapport au temps d'observation. On peut écrire la relation suivante :

$$P_{(G)obs} \cdot [G]_t = P_{(G)c} \cdot [G :CD_n] + P_{(G)f} \cdot [G] \dots\dots\dots(12)$$

Où $P_{(G) obs}$, P_f , P_c représentent, respectivement, la valeur du paramètre observé et ses valeurs à l'état libre et dans le complexe pur. Dans toutes les études suivantes, on ne considérera que des variations de paramètres observés avec les conventions suivantes :

$$\Delta P_{obs} = P_{obs} - P_f$$

$$\Delta P_c = P_c - P_f$$

L'équation (12) devient :

$$\Delta P_{(G)c} \cdot [G :CD_n] = \Delta P_{(G)obs} \cdot [G]_t \dots\dots\dots(13)$$

$\Delta P_{(G)obs}$, étant proportionnel à $[G :CD_n]$, c'est donc une fonction de r. Le tracé de la fonction $f(r) = \Delta P_{(G)obs} \cdot [G]_t$ doit alors passer par un maximum pour $r = 1/(1+n)$ et permettre de déterminer n. on peut effectuer la même démarche pour le composé [CD] et confirmer ainsi la stœchiométrie.

Cette méthode est appliquée en UV, en fluorescence, en RMN, où le paramètre P est respectivement l'absorbance, l'intensité de fluorescence, ou la variation de déplacement chimique.

➤ *Détermination de la constante d'association :*

La plupart des déterminations de constante d'association (K_a) sont des méthodes graphiques permettant d'avoir une relation linéaire entre P_{obs} et K_a . Différentes représentations graphiques existent, provenant de la même équation initiale qui a été proposée pour la première fois par Benesi et Hildebrand. Cette approche permet de déterminer graphiquement K_a dans le cas d'un complexe de stœchiométrie 1 : 1 et à condition que l'un des deux composés soit en très large excès par rapport à l'autre, c'est-à-dire par exemple $[G]_t \ll [CD]_t$ si G est observée.



$$K_a = \frac{[G:CD]}{[G][CD]} \dots\dots\dots(14)$$

$$[G] = [G]_t - [G : CD] \dots\dots\dots(15)$$

$$[CD] = [CD]_t - [G : CD] \dots\dots\dots(16)$$

$$[G : CD] = \frac{\Delta P_{(G)obs}}{\Delta p_{(G)c}} \cdot [G]_t \dots\dots\dots(17)$$

En combinant ces équations on obtient :

$$\Delta P_{(G)obs} = \frac{K_a[CD]_t \Delta P_{(G)c}}{1 + K_a \cdot [CD]_t} \dots\dots\dots (18)$$

Qui peut aussi s'écrire sous la forme :

$$\frac{1}{\Delta P} = \frac{1}{\Delta P_{(G)c} K_a [CD]_t} + \frac{1}{\Delta P_{(G)c}} \dots\dots\dots(19)$$

Si on trouve la courbe $1/\Delta P_{(G)obs}$ en fonction de $1/[CD]_t$ (souvent appelée courbe double réciproque), on doit obtenir une droite de pente $1/K_a \cdot \Delta P_{(G)c}$ et d'ordonnée à l'origine $1/\Delta P_{(G)c}$.

Cette détermination de la constante d'association par représentation graphique est appliquée avec différentes techniques. La plus ancienne, utilisée par Benesi et

Hildebrand, est la spectroscopie UV-visible. Par cette méthode, le paramètre mesuré est l'absorbance de la molécule invitée seule et en présence de différentes concentrations en CD. La représentation graphique la plus utilisée est la double réciproque avec pour équation :

$$\frac{1}{\Delta A_{obs}} = \frac{1}{\Delta A_c K_a [CD]_t} + \frac{1}{\Delta A_c} \dots\dots\dots(20)$$

La spectroscopie UV-visible étant une technique assez sensible, elle permet de travailler dans des gammes de concentrations faibles, ce qui peut être intéressant pour des produits peu solubles. Il faut que la molécule étudiée absorbe à des longueurs d'ondes différentes de celle des CDs. De plus cette technique ne permet pas de distinguer clairement entre un phénomène d'inclusion ou un type d'interaction.[42]

5. Utilisation des cyclodextrines :

➤ *Utilisation en pharmacologie*

Les cyclodextrines sont fréquemment utilisées comme excipient de formulation dans les médicaments. Elles permettent surtout de transformer des composés liquides en solides (poudres, comprimés) par précipitation des complexes d'inclusion. Les médicaments sont fréquemment des molécules hydrophobes, ce qui peut poser des problèmes d'assimilation par voie orale lors de la digestion. La complexation des principes actifs sert à mieux contrôler leur passage dans le circuit sanguin ou la progressivité de leur diffusion. [45]

➤ *Utilisation en chimie analytique*

Les cyclodextrines sont de plus en plus utilisées en chimie analytique, surtout en HPLC (Chromatographie en phase Liquide Haute Performance), comme greffe sur la phase stationnaire (silice généralement). L'emploi de cyclodextrine sert à changer l'affinité des composés à analyser pour la phase stationnaire, et par conséquent de modifier leur temps de rétention. Une propriété remarquable des

cyclodextrines est qu'en complexant certaines molécules photosensibles, elles exaltent leur capacité de réponse à l'excitation (fluorimétrie surtout). [45]

➤ *Utilisation diverses*

- désodorisation : les cyclodextrines sont utilisées comme agent masquant contre les mauvaises odeurs (la complexation rend les molécules odorantes moins volatiles)
- cosmétique : elles permettent de stabiliser des émulsions et les molécules odorantes ou actives
- textiles spéciaux : elles sont utilisées pour fixer aux tissus des composés actifs (parfums, antibactériens)
- catalyseur de réactions chimiques : en chimie organique, elles permettent de contrôler la régiosélectivité de certaines réactions tout en perfectionnant le rendement, et permettent de travailler avec des molécules hydrophobes en milieu aqueux. [45]

APPENDICE B

LISTE DES SYMBOLES ET DES ABREVIATIONS

A	: l'absorbance.
ADN	: acide desoxy-ribo-nucléique.
A_S	: la surface développée (m^2).
C_0	: la concentration à l'intérieur de la capsule à $t=0$ ($g.m^{-3}$).
CD	: cyclodextrines.
CDTA	: centre de développement des technologies avancées.
C_{ext}	: la concentration de l'agent actif à l'extérieur de la capsule.
C_{int}	: la concentration de l'agent actif à l'intérieur de la capsule.
CRNA	: centre de recherche nucléaire d'Alger.
CS	: chitosane
D	: le coefficient de diffusion ($m^2.s^{-1}$).
DA	: degré d'acétylation.
DD	: degré de désacétylation.
DK	: la perméabilité ($m^2.s^{-1}$).
D_{PA}	: le coefficient de diffusion ($m^2.s^{-1}$).
DSC	: differential scanning calorimétry.
FTIR	: spectre infrarouge à transformé de Fourier.
GA	: glutaraldehyde
HA/HAP	: hydroxyapatite.
HMP/HMPS	: Hexametaphosphate de sodium.
K_f	: constante de formation du complexe d'inclusion.
L	: l'épaisseur caractéristique (m).
M_∞	: la masse totale d'agent actif (g).

MEB	: Microscopie électronique à balayage.
MM	: masse moléculaire du chitosane.
MM _N	: masse moléculaire de polymère exprimé en nombre.
MM _w	: masse moléculaire de polymère exprimé en poids.
M _t	: la masse d'agent actif libérée à l'instant t (g).
OTC	: l'oxytétracycline.
PAAC	: polyacrylique acide.
PBS	: phosphate buffered saline
PEG	: polyéthylène glycol.
PVA	: polyvinyl alcool.
R _{ext}	: le rayon de la microsphère.
R _{ext}	: le rayon externe (m).
R _{int}	: le rayon interne (m).
RMN	: spectre de résonance magnétique nucléaire.
RX /DRX	: spectre de diffraction par rayon X.
SBF	: simulated body fluid.
SGF	: simulated gastric fluid (fluide gastrique simulé)
SIF	: simulated intestinal fluid (fluide intestinal simulé)
TG	: thermogravimétrie.
TPP/TPPS	: tripolyphosphate de sodium.
UV	: spectre ultraviolet.
UV-Vis	: spectre ultraviolet-visible.
V _R	: le volume du réservoir interne (m ³).
a	: constante de l'effet de la libération prématuré.
C _∞	: la concentration initiale totale en agent actif dans la matrice (dispersé et dissous) (g.m ⁻³).
cm	: centimètre.

g	: gramme.
k	: constante de transfert de la matière active.
ml	: millilitre
mm	: millimètre
n	: exposant de diffusion.
nm	: nanomètre
$t^{1/2}$: cinétique de l'ordre 0,5.
β -CD	: béta-cyclodextrine.
ΔA	: la différence de l'absorbance.
Δc	: la variation de concentration entre l'intérieur et l'extérieur de la capsule.
$1/\varepsilon$: l'ordonné à l'origine de la courbe $1/\Delta A = f(1/[\beta\text{-CD}])$.
$2\theta^\circ$: l'angle de diffraction par rayon X.

REFERENCES

1. Karine Andrieux, Didier Desmaële, Jean D'Angélo et Patrick Couvreur, « Nanotechnologies et nouveaux médicaments », actualité chimique novembre-décembre 2003.
2. Fessi H, « l'encapsulation de médicaments version micro et nano », article de magazine « Club 6 » de l'université Claude Bernard Lyon 1 n° 6. 2004.
3. J. Kreuter, Nanoparticles, in: J. Kreuter (Ed.), Colloidal Drug Delivery Systems, Marcel Dekker, New York, 1994, pp. 221–343.
4. UbrichN, « la microencapsulation la nanoencapsulation », Laboratoire Pharmacie Galénique <http://www.galenique.uhp-nancy.fr>
5. Julie GUERY, « Emulsions doubles cristallisables : stabilité, encapsulation et relargage » ; Thèse de doctorat à l'Ecole doctorale de Physique et Chimie des Matériaux, de l'UNIVERSITE PARIS VI,(2006).
6. Rabeau S, « Etude d'un procédé continue de microencapsulation basé sur un micromélangeur », Thèse doctorat de l'institut nationale polytechnique de lorraine, 2009.
7. Chelat F, « biocompatibilité,biodgradabilité et influence de la stérilisation sur le complexe chitosane-xanthane », Institut de génie biomédical école polytechnique de Montréal, (1999).
8. Payet L, « Viscoélasticité et structure de gels à base de chitosane- relation avec les propriétés diffusionelles de macromolécules dans ces biogels » ; Thèse Doctorat université Paris 7, (2005).
9. Kedou M ; « Préparation, caractérisation et application de membranes polymères à base de chitosane » ; Mémoire de magister en science chimique université de Boumerdes,2008.
10. Crini G, Badot P.M, Guibal E ; « Chitine et chitosane : Du biopolymère à l'application », presses universitaires de Franche Comté, université de Franche Comté 2009, ISBN978-84867-294-6 ;

11. V.R. Sinha et al. / *International Journal of Pharmaceutics* 274 (2004) 1–33.
12. Suvakanta D, Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems, *Drug Research*, Vol. 67 No. 3 pp. 217n223, 2010.
13. Cyril D, « Développement d'un implant solide biodégradable à base d'amidon réticulé à teneur élevée en amylose, pour la libération contrôlée d'un principe actif », thèse Doctorat université Montréal, Août 2002.
14. Boudendouna A, « méthodologie de la formulation d'une forme orale solide à libération prolongée » Thèse doctorat de l'université de Toulouse, 2010.
15. Richard J, Benoît J.P, « Microencapsulation », technique d'ingénieur J-2210,2000.
16. Devassine M, « la microencapsulation une nouvelle approche », conférence CARMA Marseille, (13 octobre 2005) :2-10.
17. Y. Zhang et al. / *Carbohydrate Research* 340 (2005) 1914–1917
18. J. Brugnerotto et al. / *Polymer* 42 (2001) 3569±3580
19. X. Jiang et al. / *Carbohydrate Polymers* 54 (2003) 457–463
20. Taghizadeh, Davari, Preparation, characterization, and swelling behavior of *N*-acetylated and deacetylated chitosans. *Carbohydrate Polymer*, **64** (2006), pp. 9–15
21. BoissièreM, Elaboration et caractérisation de microsphères hybrides kappacarraghénane/ silice; thèse doctorat Université Montpellier I (2004).
22. Benmihoub A, Synthèse et caractérisation de nouveaux vecteurs hybrides à base de la beta-cyclodextrine, l'Hydroxyapatite et le Chitosane / 5, 10, 15, 20(4-hydroxyphenyl) porphyrine pour le traitement du cancer par la thérapie photodynamique PDT, thèse master faculté des science université de Blida (2010).
23. X.Z. Shu, K.J. Zhu/ *International Journal of Pharmaceutics* 233 (2002) 217–225.

24. Bhumkar et Pokharkar , AAPS PharmSciTech 2006; 7 (2) Article 50 (Studies on Effect of pH on Cross-linking of Chitosan With Sodium Tripolyphosphate: A Technical Note)(<http://www.aapspharmscitech.org>).
25. Xu Y, Du Y. Effect of molecular structure of chitosan on protein delivery properties of chitosan nanoparticles. *Int J Pharm.* 2003;250:215-226.
26. Knaul JZ, Hudson SM, Creber KAM. Improved mechanical properties of chitosan fibres. *J Appl Polym Sci.* 1999;72:1721-1731.
27. Wang X, Ma J, Wang Y, He B. Structural characterization of phosphorylated chitosan and their applications as effective additives of calcium phosphate cements. *Biomaterials.* 2001;22:2247-2255.
28. Hoffmann B., D. Seitz, A. Mencke, A. Kokott, G. Ziegler ; *J Mater Sci: Mater Med* (2009) 20:1495–1503.
29. Kittur F.S, K.V.H. Prashanth, K.U. Sankar and R.N. Tharanathan, Characterization of chitin, chitosan and their carboxymethyl derivatives by differential scanning calorimetry. *Carbohydrate Polymers*, **49** (2002), pp. 185–193.
30. Sakurai, K.; Maegawa, T.; Takahashi, T. *Polymer.* **2000**, *41*, 7051-7056.
31. Zeng, M.; Fang, Z.; Xu C. *J. Membr. Sci.* **2004**, *230*, 175-181.
32. Chuang, W. Y.; Young, T. H.; Yao, C. H.; Chiu W. Y. *Biomaterials.* **1999**, *20*, 1479-1487.
33. C.-C. Lin, A.T. Metters/ *Advanced Drug Delivery Reviews* 58 (2006) 1379–1408.
34. Sokker .H, A.M Ghaffar, Y.H. Gad, A.S. Aly, Synthesis and characterization of hydrogels based on grafted chitosan for the controlled drug release, *Carbohydr. Polym.* 75 (2009) 222–229.
35. Hui-Juan Liu et al/ *Indian Journal of Novel Drug Delivery* 3(3),Jul-Sep,2011, 176-184.

36. ICG Montpellier, "Matériaux nanostructurés pour la santé", Matériaux Avancés pour la Catalyse et la Santé - UMR 5253.
37. Xiao X.F. et al. / Materials Science and Engineering C 29 (2009) 785–790.
38. Tas A C, "Biomimetic Synthesis of Carbonated Calcium Hydroxyapatite Powders at 37°C with Urea- or Enzyme Urease-containing Synthetic Body Fluids," Patent Pending, No:99/00037, Turkish Patent Institute, Ankara, Turkey, January 11, 1999.
39. Matsumoto T. et al. / Biomaterials 25 (2004) 3807–3812.
40. F. BROSSA JOURNAL OF MATERIALS SCIENCE: MATERIALS IN MEDICINE, 5(1994) 855-857.
41. Hamoudi M. , L. Trichard , J.-L.Grossiord, « Interactions entre les cyclodextrines et les triglycérides : de la stabilisation des émulsions à l'obtention d'un nouveau système galénique appelé « billes » ; 10.1016/j.pharma.2009.08.003.
42. Bakkour, Y ; « Etude par RMN des complexes d'inclusion avec des cyclodextrines native et polymérisées » ; Thèse doctorat en chimie Université des science et technologies de Lille I (2005).
43. L.X. Song et al, « Inclusion complexation, encapsulation interaction and inclusion number in cyclodextrin chemistry ». Coordination Chemistry Reviews 253 (2009) 1276–1284.
44. BONNET, P ; « ETUDE PAR MODELISATION MOLECULAIRE DE DIMERES DE CYCLODEXTRINES ET DE LEURS COMPLEXES D'INCLUSION » ; Thèse doctorat en chimie Université d'Orléans, Universitat Autònoma de Barcelona, (2001).
45. <http://en.wikipedia.org/wiki/Oxytetracycline>.
46. U. Gbureck et al. / Journal of Controlled Release 122 (2007) 173–180.
47. Q. Xu, J.T. Czernuszka / Journal of Controlled Release 127 (2008) 146–153.