

MA 540-59-1

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE



UNIVERSITE SAAD DAHLAB DE BLIDA
FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE CHIMIE

Mémoire pour l'obtention du diplôme de master
En chimie moléculaire
Option : chimie organique

**PREPARATION ET CARACTERISATION DES
NANOPARTICULES A BASE DU CHITOSANE
UTILISEES COMME VECTEURS PHARMACEUTIQUES
DANS LE TRAITEMENT DE CANCER PAR PDT**

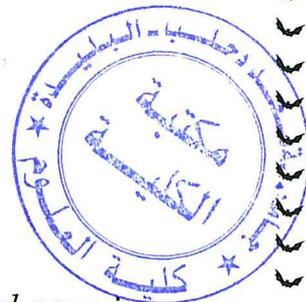
Réalisé par : *LEMHEMA WASSILA*

Soutenu le 07/10/2013, devant le jury :

<i>Mr R.BELAL</i>	<i>professeur</i>	<i>président</i>
<i>Mr M. ZOUIKRI</i>	<i>professeur</i>	<i>examineur</i>
<i>Mr Y.BAL</i>	<i>professeur</i>	<i>responsable de la thèse</i>

MA-540-59-1

Remerciement



En premier lieu, je remercie ALLAH le tout puissant qui me fait de chaque jour des merveilles.

Je remercie le responsable du master chimie moléculaire monsieur le professeur R. BELAL pour sa disponibilité, son aide, et ses conseils avisés.

Je remercie mon promoteur Mr BAL pour les conseils prodigués et l'effort fourni.

Je remercie également les membres de jury d'avoir accepté d'examiner et juge ce travail.

J'adresse également mes remerciements à notre co-promotrice Ben Mihoub Amina pour son effort fournit, sa disponibilité, sa patience et pour sa persévérance dans le suivi.

Je remercie également tous mes enseignants, qui m'ont donnée les bases de la science.

Je remercie toutes les personnes qui mon aidé de près ou de loin à réaliser ce mémoire à en particulier Mr Abbes Samir et Mr Kars et le centre de développement des technologies avancées CDTA.

Je remercie l'ingénieure de laboratoire Melle EL ACHEACHE qui m'a toujours soutenu, aidé et encouragé pendant toute la période de recherche.

Je remercie tous personnes qui ont participé de près ou de loin pour l'accomplissement de mon travail.

Résumé

Le travail présenté dans cette étude et consacré à l'élaboration des nanosphères de chitosane par la méthode de gélation ionotropique en vue de l'encapsulation, la protection et la libération contrôlée du 5.10.15.20-tetrakis(4-hydroxyphenyl) porphyrine (THPP). Celui-ci est un photosensibilisateur utilisé dans la thérapie photodynamique (PDT) du cancer.

Des systèmes particuliers simples à base de chitosan (NP-CS) ou complexes (CS-PEG, CS- β -cyclodextrine, CS- β -CD-PEG) ont été préparés et caractérisés par spectroscopie (FTIR et DRX), microscopie (MEB) et analyse thermique (DSC, TGA).

Les résultats obtenus montrent que les particules de chitosane modifiées par le polyéthylène glycol (PEG) ou lorsque le chitosane est associé à la β -cyclodextrine en tant que molécule de type 'Host guest' peuvent conférer au système de vectorisation des propriétés intéressantes comme un meilleur gonflement et une meilleure stabilité.

Mots clé : Chitosane, polyéthylène glycol, β -cyclodextrine, nanoparticules, vectorisation.

Abstract

The aim of this work is to prepare nanospheres based on chitosan using the ionotropic gelation route in the case of encapsulation, protection and controlled release of m-5.10.15.20-tetrakis(4-hydroxyphenyl) porphyrine (THPP). which is a photosensitizer used in treatment of cancers by PDT.

A simple systems based on chitosan (CS-NP) or blends ones (CS-PEG, CS- β -cyclodextrine, CS- β -CD-PEG) were prepared and characterized by infra-red spectroscopy (IR) , scanning electron microscopy (SEM) and thermal analysis (DSC, TGA).

The obtained results demonstrate that modified chitosan nanoparticles, i.e (blend systems) can confer more interesting properties for targeting systems such as best swelling and stability.

Key words: chitosan, PEG, β -CD, nanoparticles, targeting.

ملخص

العمل المقدم في هذه الدراسة المكرسة لتطوير كريات الكيتوزان النانومترية حسب الطريقة التهليم الشاردي لتلفيف وحمايته والافواج وسيطرة عليه في المخبر للعامل 20.15.10.5 تيتراكس (4 هيدروكسي - فنيل) بورفيرين هذا هو الضيائي المستخدم في العلاج الضوئي بطريقة الديناميكية الضوئية لعلاج السرطان

تم اعداد نظام الجسيمات بسيطة يعتمد علي الكيتوزان (Np-Cs) او المعقدة (Cs -CD β) و(Cs -PEG) و(sCD β -PEG) اعدت وتميزة بجهاز المطياف الاشعاعي (FTIR) المجهرى (SEM) و التحليل الحراري (TGA,DSC) و تبين النتائج ان جزيئات الكيتوزان التي تم تعديلها من قبل البولي ايثيلين جلا يكلول (PEG) او عند ربطهما بسيكلود كستيرين كنوع جزئى "الضيف المضيف" قد تمنع النظام تو جيبها

بعض الخصائص المثيرة للاهتمام افضل انتفاخ و استقرار.

الكلمات المفتاحية :

الكيتوزان , البولي ايثيلين , جلا يكلول , بسيكلود كستيرين , كمية الموجهة , الجسيمات النانومترية

SOMMAIRE

Introduction	
général.....	01
Chapitre I : Revue bibliographie	
I.1 Introduction	03
I.2 Définition de l'encapsulation.....	03
➤ I.2-1 Différents types de nanoparticules.....	03
• I.2-1-1 Liposomes.....	04
• I.2-1-2 Micelles.....	04
• I.2-1-3 Nanoparticules polymériques.....	05
• I.2-1-4 Nanoparticules lipidiques.....	06
• I.2-1-5 Nanoparticules inorganiques.....	07
➤ I.2-2 Les trois générations de nanoparticules.....	07
• I.2-2-1 Première génération.....	07
• I.2-2-2 Seconde génération : les nanoparticules furtives.....	08
• I.2-2-3 Troisième génération : les nanoparticules ciblantes.....	10
I.3 Les nanoparticules du chitosane.....	11
➤ I.3-1 Le Chitosane	11
▪ I.3-1-1 Source et structure du chitosane	12
▪ I.3-1-2 Production du chitosane	12
▪ I.3-1-3 Caractérisation du chitosane	13
▪ I.3-1-4 Propriétés physico-chimiques et biologiques du chitosane	13

- I.3-1-5 Applications du chitosane13
- I.3-1-6 Différentes méthodes de préparation des nanoparticules du chitosane15
- La gélotion ionotropique.....16

Bibliographie

Chapitre II -PREPARATION, CARACTERISATION ET LIBERATION IN VITRO DE LA PORPHYRINE A PARTIR DES NANOSPHERES DU CHITOSANE

Introduction.....	21
II.1 Caractérisation du chitosane par FTIR.....	22
II.2 Préparation des nanoparticules à base du chitosane.....	23
a. Nanoparticules vides (sans principe actif)	23
b. Nanoparticules biocomposites.....	23
c. Nanoparticules chargées du principe actif.....	24
II.3 Caractérisation des nanoparticules à base du chitosane.....	25
II.3-1 Aspect physique	25
➤ Principe de formation des nanoparticules à base du chitosane	25
II.3-2 Caractérisation spectroscopique par FTIR.....	26
➤ Système un : Np.CS.....	26
➤ Système deux : Np.CS-PEG	27
➤ Système trois : Np.CS- β -CD.....	28
➤ Système quatre : Np. CS-PEG- β -CD.....	29
II.3-3 Caractérisation morphologique par MEB	30
➤ Système un : Np.CS.....	31
➤ Système deux : Np.CS-PEG	31
➤ Système trois : Np.CS- β -CD.....	31
➤ Système quatre : Np. CS-PEG- β -CD.....	31

LISTE DES ILLUSTRATIONS ET LES TABLEAUX

Fig.I-1 : Un principe actif encapsulé dans un vecteur	03
Fig.I-2 : Structure du polyoxyéthylène (POE ou PEG) utilisé.....	09
Pour augmente la furtivité des particules	
Fig.I-3 : Evolution des nanoparticules (ici des nano-émulsions).....	11
Première génération : nanoparticule « nue » (à gauche).	
Deuxième génération : nanoparticules furtives (au centre).	
Troisième génération : nanoparticules ciblantes (à droite).	
Fig.I-4 : Réaction chimique de désacétylation de la chitine.	12
Fig. II-1 : Spectre FTIR du chitosane	22
Fig.II-2 : Schémade préparation des nanoparticules à base du CS.....	24
Fig.II-3 : Vue macroscopique des NP (a) : CS, (b) : CS-PEG, (c) :.....	25
CS. β -CD et (d) : CS.PEG. β -CD	
Fig. II-4 : Schéma du principe de formation des Np.CS.....	25
Fig. II-5 : Réticulation ionotropique du chitosane avec le TPP	26
Fig. II-6 : Spectre FTIR du CS (a) et des Np.CS (b)	27
Fig. II-7 : Spectre FTIR du PEG (a) et des Np.CS (b) et Np.CS-PEG (c).....	27
Fig. II-8 : Spectre FTIR de la β -CD (a) et des Np.CS (b) et Np.CS- β -CD (c).....	28
Fig. II-9 : Spectre FTIR de Np.Cs(a), PEG (b), β -CD (c) et Np.CS-PEG- β -CD (c).....	29
Fig.II-10 : Microphotographies MEB des nanoparticules à base du chitosane :	31
(a) : Np.CS, (b) :Np.CS- β -CD, (c) :Np.CS-PEG et (d) :Np.CS-PEG. β -CD	
Fig.II-11 :Thermogramme représentant le flux de chaleur en fonction de	32
la température en °C des Np.CS	
Fig.II-12 :Thermogramme représentant le flux de chaleur en fonction.....	33
de la température en °C des Np.CS-PEG	
Fig.II-13 :Thermogramme représentant le flux de chaleur en fonction.....	33
de la température en °C Np.CS- β -CD	

II.3-4 Caractérisation thermographique par ATG/DSC.....	32
➤ Système un : Np.CS.....	32
➤ Système deux : Np.CS-PEG	33
➤ Système trois : Np.CS- β -CD.....	33
➤ Système quatre : Np. CS-PEG- β -CD.....	34
II.4 Etude de gonflement Np .Cs et Np .Cs /PEG.....	35
➤ Milieu acide	36
➤ En milieu neutre	36
➤ En milieu basique.....	37
II.5 Effet du pH sur la morphologie des nanoparticules CS et CS-PEG réticulées par le TPPS.....	38
a)-Effet du pH sur Np.CS.....	39
b)-Effet du pH sur Np.CS-PEG.....	40
II.6 Etude de la libération prolongée in vitro du principe actif encapsulé dans les nanoparticules du chitosane/ β -CD dans le SGF	42
Conclusion.....	44
BIBLIOGRAPHIE	
Conclusion général	47

LISTE D'ABREVIATION

PA : principe actif

CD : cyclodextrine

β -CD : beta-cyclodextrine

m-THPP : 5,10, 15,20-tetrakis (4-hydroxyphenyl) porphyrine

CS : chitosane

Np -Cs : nanoparticule de chitosane

DA : degré d'acétylation

DD : degré de désacétylation

DSC : differencialscaniningcalorimétry

MEB : microscopies à balayage électronique

PDT : photodynamictherapy

FTIR : spectrophotométrie infrarouge a transformormée de fourrier

PEG : polyéthyleneglycole

TGA : termographimétrie

TPP/TPPS : tripolyphosphate/tripolyphosphate de sodium

SGF : simulatedgastricfluid (fluide gastrique simulé)

UV-visible : spectrophotométrie uv-visible

nm : nanomètre

INTRODUCTION GENERAL

INTRODUCTION GENERAL

On définit le cancer comme une prolifération anarchique et incontrôlée des cellules endommagées. Ce dérèglement s'explique par le fait que cette maladie s'attaque aux gènes régulant la croissance et la différenciation cellulaire.

Les traitements classiques de cette pathologie sont : la chirurgie qui consiste à retirer les parties du corps envahies par les tumeurs; la radiothérapie qui utilise les rayonnements ionisant émis par certains éléments radioactifs pour détruire les cellules anormales ou du moins ralentir leur progression et la chimiothérapie qui implique l'utilisation de produits chimiques ayant un effet direct sur les cellules malades, soit en les détruisant, soit en empêchant leur prolifération.

Malgré leur efficacité, toutes ces techniques présentent de nombreux inconvénients : la chirurgie est en générale trop invalidante pour le malade (même si des progrès sont faits pour diminuer la gêne occasionnée), tandis que la radiothérapie et la chimiothérapie manquent de sélectivité et touchent également les tissus sains.

La thérapie photodynamique (PDT) antitumorale est une technique de traitement basée sur l'association de molécules photosensibilisantes (Ps) capables de se concentrer dans les cellules tumorales et d'une lumière focalisée de longueur d'onde appropriée (dépendante du Ps). La combinaison de ces deux facteurs qui permettra de cibler spécifiquement les tissus tumoraux et de les détruire.

Le dérivé porphyrinique utilisé est hydrophobe, instable, toxique par sa longue durée dans l'organisme. La propriété d'hydrophobie peut être modifiée suite à l'encapsulation de la molécule dans des nanovecteurs hydrophiles. Dans l'objectif d'améliorer l'efficacité des agents actifs, on utilise ce type de supports pour encapsuler les principes actifs et les véhiculer vers leurs cibles.

D'une part, l'encapsulation permet de protéger les principes actifs de la dégradation, dans le cas où ils y sont sensibles. D'autre part, elle peut permettre d'améliorer le ciblage, soit au niveau tissulaire, soit au niveau cellulaire. Ce dernier cas peut être favorisé grâce à la fonctionnalisation chimique de la surface des nanovecteurs, ou tout simplement parce qu'ils seront captés dans les cellules via des mécanismes d'endocytose. Ils pourront ainsi pénétrer dans les cellules et y concentrer les molécules de principe actif alors que, seules, celles-ci ne

INTRODUCTION GENERAL

s'y accumuleraient pas spontanément. En fin, il est possible d'utiliser cette approche de la vectorisation pour contourner des résistances aux médicaments.

Ce présent mémoire comporte les parties suivantes :

- ✓ Une revue bibliographique sur l'encapsulation ; les différents types de nanoparticule ; les trois générations des nanoparticules ; production et caractérisation ainsi que les propriétés et applications de chitosane.
- ✓ Synthèse et caractérisation des nanosphères de différents systèmes à base de chitosane vide et dopées de PA (THPP) et rigidifiées par le tripolyphosphate de sodium (TPPS). Ces systèmes dans leurs variétés complexes comportaient de la β -cyclodextrine et du polyéthylène glycol. Une caractérisation étendue des différents systèmes obtenus par FTIR, MEB, DSC est présentée dans cette partie dédiée à l'expérimentation.

Revue bibliographique

I.1 Introduction

L'adressage des 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, cancéreuse ou d'origine génétique. Dès le début du siècle, Paul Ehrlich rêvait déjà de (Magic Bullet) susceptible d'acheminer un médicament de manière spécifique vers son site d'action. Grâce à la nanotechnologie, ce rêve est devenu près de la réalité par le concept de vectorisation des médicaments [1].

I.2 Définition de l'encapsulation

L'encapsulation peut être définie comme le piégeage d'un composé ou d'un système au sein d'un matériau dispersé en vue de son immobilisation, sa protection, le contrôle de son transfert, sa structuration et sa fonctionnalisation.

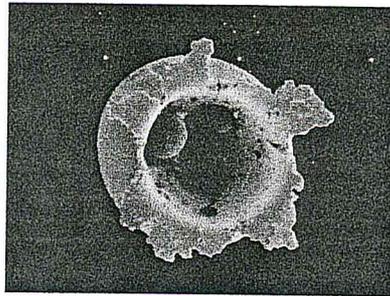


Fig.I-1 : Un principe actif encapsulé dans un vecteur

Dans le domaine pharmaceutique, l'encapsulation présente un intérêt particulier et de nombreuses possibilités d'application. Une des pistes les plus explorées concerne la conception de formes médicamenteuses capables de protéger un principe actif, le véhiculer dans l'organisme jusqu'à son site d'action puis d'y assurer sa libération plus ou moins prolongée. [2]

I.2-1 Différents types de nanoparticules

La composition du cœur des nanoparticules est très variée : il peut s'agir d'assemblages organiques ou inorganiques [3]. Nous allons décrire ici les nanoparticules les plus courantes.

I.2-1-1 Liposomes

Les liposomes [4] sont des vésicules constituées d'une ou plusieurs doubles couches concentriques de phospholipides et de molécules de cholestérol encapsulant un réservoir aqueux. La taille des liposomes varie entre 30 nm et plusieurs micromètres.

Ces particules sont depuis de nombreuses années utilisées comme outils pour la biologie, la biochimie et la médecine en tant que transporteurs de principes actifs thérapeutiques ou d'agents d'imagerie [5]. Leur caractère non toxique et biocompatible font de ces colloïdes des systèmes intéressants pour les applications *in vivo*. Cependant, les liposomes présentent également quelques limitations : ils ont effectivement montré une faible capacité d'encapsulation (notamment pour les molécules lipophiles piégées dans la double couche de phospholipides), une stabilité modérée, une production délicate, et un relargage précoce des principes actifs hydrophiles dans le sang [6].

Les niosomes sont des ensembles supramoléculaires similaires aux liposomes, à la différence que les molécules constituant la double couche ne sont pas des phospholipides mais des surfactants de synthèse (lipides non ioniques) [7]. C'est également le cas des polymersomes, pour lesquels des copolymères bloc (comportant une partie hydrophile et une partie hydrophobe) forment la structure emprisonnant le réservoir aqueux [8-10].

I.2-1-2 Micelles

Les micelles sont des auto-assemblages de molécules amphiphiles qui forment des structures de type cœur-coquille (« core-shell » en anglais) en milieu aqueux. Les micelles se forment lorsque la concentration en surfactants dans le milieu dépasse une valeur seuil nommé concentration micellaire critique. Dans ce cas, les molécules amphiphiles s'auto-assemblent pour regrouper leurs parties hydrophobes et exposer en surface uniquement leurs domaines hydrophiles. Les micelles sont donc des systèmes supramoléculaires qui sont en équilibre avec les molécules amphiphiles en solution [9].

Différents types de micelles ont ainsi été obtenues en fonction des surfactants utilisés. On peut ainsi citer les micelles à base de phospholipides ou de surfactants pegylés, mais ce

sont celles utilisant des copolymères qui concentrent la plus grande partie de la recherche actuelle [11-12]

I.2-1-3 Nanoparticules polymériques

Les premières nanoparticules polymériques développées par Couvreur *et al.* Dans les années 1980 sont à base de polyalkylcyanoacrylates [13]. Différents polymères ont ensuite été utilisés avec succès pour former des nanoparticules, les plus couramment utilisés actuellement étant le poly (acide lactique), le poly (acide glycolique) et leur copolymère le poly (lactide-coglycolide), respectivement abrégés en anglais PLA, PGA et PLGA. Ces polymères ont l'avantage d'avoir une grande biocompatibilité et d'être biodégradables par l'organisme. Ils sont ainsi utilisés depuis de nombreuses années pour fabriquer des dispositifs médicaux et des implants sous-cutanés. Les nanoparticules polymériques offrent de plus une meilleure stabilité que les liposomes, que se soit *in vivo* ou durant le stockage.

Cependant, même si la biocompatibilité des polymères est bonne, ils ne sont pas dénués de toute cytotoxicité une fois structurés sous forme de nanoparticules. De plus, la présence de solvants organiques toxiques résiduels au sein des nanoparticules est également problématique. Enfin, la production de telles nanoparticules est difficilement industrialisable et aboutit généralement à des milieux peu concentrés en particules (~2 %).

Des polymères à base de polypeptides, polynucléotides, ou de polysaccharides sont également employés pour l'obtention de nanoparticules [3]. Parmi les nanoparticules polymériques, on peut également citer l'existence des dendrimères et des nanogels.

Les dendrimères sont des complexes polymériques de taille comprise entre 1 et 10 nm qui, à partir d'un monomère possédant au moins trois sites réactifs et formant le coeur de la particule, se construisent par l'ajout contrôlé de couches successives de monomères [14]. Ces constructions polymériques fortement branchées ont une structure bien contrôlée. Malheureusement la synthèse des dendrimères est délicate.

Quant aux nanogels, ce sont des structures moins courantes constituées de polymères hydrophiles. Contrairement aux nanoparticules polymériques précédemment décrites, leurs chaînes ne sont pas fortement imbriquées les unes dans les autres, ce qui leur confère une flexibilité plus importante. La particule finale, gonflée d'eau, offre ainsi une grande surface spécifique et une importante capacité d'encapsulation [15, 16].

I.2-1-4 Nanoparticules lipidiques

Pour pallier les inconvénients des nanoparticules de polymères (importants résidus de solvants organiques restant après la synthèse, possible cytotoxicité, production à grande échelle de façon reproductible difficile, mauvaise conservation dans le temps) et des liposomes (faible stabilité, processus de fabrication complexe, faible taux d'encapsulation de principes actifs lipophiles cristallisés), de nouvelles nanoparticules structurées autour d'un cœur lipidique ont été décrites.

Ces nanoparticules sont constituées d'un cœur lipidique, généralement à base de triglycérides biodégradables, bioassimilables et non toxiques. Parmi les particules entrant dans cette catégorie, les nanoparticules lipidiques solides ou SLN (pour « Solid Lipid Nanoparticles ») sont les plus étudiées [17-18]. Le cœur de ces particules développées au cours des années 1990 est constitué d'une matrice de lipides qui est solide à température ambiante mais également à la température du corps humain. Cette matrice plus ou moins cristallisée est stabilisée par une couche de surfactants. Les lipides utilisés sont soit des triglycérides hautement purifiés, soit des mélanges de glycérides ou des cires. Ces particules ont une stabilité et une capacité à encapsuler les molécules lipophiles supérieure à celle des liposomes. Elles peuvent de plus être synthétisées en l'absence de solvant organique.

De telles structures présentent cependant les inconvénients suivants : l'augmentation de la taille des particules au cours du temps ; une tendance à gélifier de manière imprévisible ; des transitions polymorphiques inattendues ; et une faible capacité d'encapsulation due à la structure cristalline de la matrice lipidique.

Parmi les nanoparticules lipidiques on trouve également les nanocapsules lipidiques ou LNC (pour « Lipid NanoCapsules »), qui sont constituées d'un cœur lipidique liquide entouré par une coque solide [19, 20]. Les lipoprotéines d'origine naturelle [21] ou synthétique [22] font aussi partie des nanoparticules lipidiques. Enfin, l'ensemble des nanoparticules lipidiques est quelque fois regroupé sous l'appellation de nano-émulsions [23], bien que ce terme soit plus généralement utilisé pour décrire des dispersions d'huile dans l'eau, pour lesquelles les globules de phase dispersée non cristallisée sont stabilisés par une couche de surfactants [24]. Ces systèmes basés sur des cœurs lipidiques non cristallisés ne sont pas concernés par les problèmes de polymorphisme.

I.2-1-5 Nanoparticules inorganiques

Outre les nanoparticules organiques, des nanoparticules inorganiques ont également été développées. Les plus courantes sont les nanoparticules métalliques d'or [25, 26] ou d'argent, les nanoparticules magnétiques [27], les nanoparticules en silice [28] et les nanocristaux semi-conducteurs [29-30].

La majorité des particules magnétiques se base sur l'utilisation d'oxydes de fer superparamagnétiques. Ces particules sont constituées de petites particules de maghémite (Fe_2O_3) ou de magnétite (Fe_3O_4), de quelques nanomètres de diamètre, qui peuvent être encapsulées dans une matrice de silice, de polymère ou de polysaccharide (dextran). Ces particules magnétiques sont désignées par le terme SPIO (« SuperParamagnetic Iron Oxide ») pour celles dont la taille est comprise entre 50 et 500 nm, et USPIO (« Ultra small SuperParamagnetic Iron Oxide ») si leur diamètre est inférieur à 50 nm. Il existe également des nanoparticules d'oxydes de fer monocristallins de moins de 3 nm de diamètre (MION ou « Monocristalline Iron Oxyde Nanoparticles ») encapsulés dans une coque de dextran pour aboutir à une taille d'environ 10 nm.

Parmi les nanoparticules inorganiques largement étudiées, on peut également citer le cas des nanocristaux semi-conducteurs fluorescents, plus connus sous leur dénomination anglaise « Quantum dots » (boîtes quantiques en français). Ces objets mesurant entre 2 et 10 nm de diamètre sont composés d'un cœur cristallin semi-conducteur. Les couples d'éléments les plus couramment utilisés sont les suivants : cadmium/sélénium, cadmium/tellure, indium/arsenic ou indium/phosphore. Ce cœur est généralement recouvert d'une coque de sulfure de zinc afin de passiver la surface tout en stabilisant les propriétés optiques de ces nanoparticules.

I.2-2 Les trois générations de nanoparticules

En vue d'améliorer le comportement biologique des nanoparticules, des modifications de leurs propriétés de surface ont été réalisées, conduisant ainsi à trois générations de nanoparticules.

I.2-2-1 Première génération

La première génération de nanoparticules était constituée de colloïdes stables en milieu aqueux. Outre leurs propriétés thérapeutiques ou diagnostiques intrinsèques, leur

intérêt résidait principalement dans leur capacité à éviter l'élimination et l'excrétion par le système rénal.

En effet, le principal organe d'élimination de l'organisme est le rein, dont le fonctionnement repose sur un principe de filtration à travers des pores de quelques nanomètres seulement. Ainsi, l'encapsulation d'agents d'intérêt de faible poids moléculaire au sein de vecteurs colloïdaux d'une dizaine de nanomètres permet d'éviter leur élimination rénale et de prolonger leur effet. La taille des nanoparticules doit toutefois être suffisamment petite pour qu'elles ne restent pas bloquées dans les plus petits vaisseaux sanguins. Cependant, si la taille des nanoparticules leur permet d'éviter de nombreux pièges « géométriques » de l'organisme, ce seul paramètre ne permet pas une longue circulation dans le compartiment sanguin. Les nanoparticules sont en effet considérées comme des corps étrangers par les défenses immunitaires de l'organisme, et plus précisément par le système réticuloendothélial. A ce titre, elles sont souvent rapidement prises en charge par les macrophages. Afin de pouvoir atteindre la zone d'intérêt, il convient donc d'éviter la phagocytose en leurrant les défenses immunitaires ; on parle alors de furtivité.

I.2-2-2 Seconde génération : les nanoparticules furtives

Comme le souligne Torchilin [4], l'objectif principal des nanoparticules ou nanotransporteurs une fois administrés dans le compartiment sanguin est d'augmenter la durée de vie de l'agent à véhiculer dans la circulation sanguine.

En effet, les mécanismes naturels de métabolisation et d'élimination limitent grandement l'activité thérapeutique ou diagnostique des médicaments ou des agents de contraste injectés tels quels. Non seulement l'élimination de la substance d'intérêt de la circulation sanguine diminue la dose qui va finalement atteindre les tissus ciblés, mais l'accumulation de cette même substance dans les organes d'élimination ou de séquestration (rein, foie, rate ...) peut également entraîner des effets secondaires toxiques au niveau de ces tissus. Dans le cas de l'utilisation d'agent de contraste, ces accumulations peuvent de plus masquer la zone d'intérêt, et donc perturber et fausser la détection.

C'est pourquoi de nouvelles stratégies ont été développées afin d'augmenter la durée de vie des nanoparticules dans le compartiment sanguin. Ces techniques se basent sur la modification chimique de la surface des nano-transporteurs (liposomes, nanoparticules de polymère, émulsions ...).

Revue bibliographique

Le principal mécanisme d'élimination de l'organisme est le système réticuloendothélial. Les particules « étrangères » sont rapidement marquées au cours de leur circulation dans le sang par des protéines désignées par le terme d'opsonines.

Les objets opsonisés sont ensuite phagocytés par les cellules de Kupffer (macrophages du foie), les macrophages de la rate ou des poumons, ou encore par les macrophages circulants.

Afin de limiter ce processus, les particules sont recouvertes d'agent de furtivité, ce qui leur permet d'échapper à la capture par les cellules du système immunitaire en esquivant la fixation des opsonines [31-32]. La grande majorité des agents de furtivité utilisés pour créer une couche protectrice autour des transporteurs, sont des polymères. Le PEG (polyéthylène glycol), ou POE (polyoxyéthylène), est le plus couramment utilisé car il a l'avantage d'être biocompatible, soluble en milieu aqueux, non toxique, et a en outre une faible immunogénicité et antigénicité. Il est de plus autorisé à l'injection chez l'homme par la FDA (« Food and Drug Administration » : organisme autorisant la commercialisation des médicaments sur le territoire des États-Unis d'Amérique).



Fig.I-2 : Structure du polyoxyéthylène (POE ou PEG) utilisé pour augmenter la furtivité des particules.

De nombreux travaux ont été menés pour optimiser le pourcentage de PEG à la surface des particules, ainsi que la taille et la structure des chaînes de polymère [31]. Il ressort globalement de ces études qu'à taille égale, une chaîne ramifiée est plus efficace qu'une chaîne linéaire, mais également qu'en dessous d'une masse molaire de 2000 g/mol, l'amélioration de la durée de vie en circulation n'est que peu marquée. Ces tendances générales sont cependant à nuancer car les résultats obtenus dépendent fortement de la nanoparticule sur laquelle sont fixées les chaînes polyoxyéthylène [31].

L'utilisation de polymères saccharidiques de type dextran pour augmenter la furtivité des particules est également possible, notamment dans le cas des nanoparticules magnétiques utilisées comme agent de contraste pour l'IRM.

L'utilisation d'agents de furtivité a permis l'apparition de ce que l'on nomme la seconde génération de nanoparticules. Ces objets peuvent avoir un temps de séjour dans la circulation sanguine suffisamment important pour relarguer lentement un agent thérapeutique dans le sang, ou pour qu'il se produise une accumulation passive au sein de tissus pour lesquels l'endothélium vasculaire est discontinu.

I.2-2-3 Troisième génération : les nanoparticules ciblantes

Les colloïdes furtifs restent dans la circulation sanguine plus longtemps que les autres nanoparticules. Ils finissent cependant par être extravasés hors du compartiment sanguin, notamment dans les zones où la vascularisation présente d'importantes fenestrations comme le foie ou les zones d'angiogénèse. Ainsi, afin de favoriser l'accumulation des nanoparticules dans un tissu donné, il est indispensable de fonctionnaliser leur surface avec des ligands biologiques qui seront reconnus par les cellules composant le tissu d'intérêt. Les ligands peuvent être des anticorps, des peptides, des saccharides, des oligonucléotides ou d'autres molécules comme le folate [21, 30].

L'ajout de ces ligands à la surface des nanoparticules favorise généralement leur capture par les macrophages. C'est pourquoi il est important d'associer les agents de ciblage aux agents de furtivité afin de contrebalancer cet effet. La formation d'une barrière stérique risque toutefois de masquer les ligands et donc de rendre caduque le ciblage actif. Par conséquent, les agents de ciblage sont éloignés du cœur de la nanoparticule par un bras espaceur (le plus souvent une chaîne polyoxyéthylène) de manière à ce qu'ils évoluent à la surface de la couche de furtivité. L'utilisation des bras espaceurs est également avantageuse dans la mesure où elle offre à l'agent de ciblage une plus grande liberté de mouvement favorisant ainsi sa complexation avec la cible. En effet, il a été montré que le greffage de ligands directement à la surface d'une particule entraîne une diminution importante de la vitesse de complexation, la liberté de mouvement du ligand étant fortement réduite par la particule. La flexibilité du bras espaceur permet alors de redonner suffisamment de liberté de mouvement à l'agent de ciblage afin de maximiser les probabilités de rencontre entre le ligand et le récepteur dans la bonne conformation.

Ainsi, la troisième génération de nanoparticules pour le vivant se caractérise par la présence d'une barrière stérique associée à l'ajout d'agents de ciblage liés à la surface par un bras espaceur

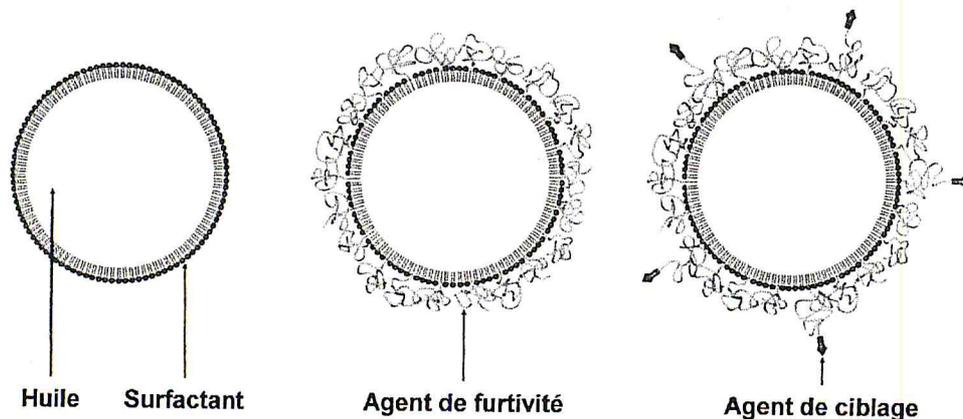


Fig.I-3 : Evolution des nanoparticules (ici des nano-émulsions). Première génération : nanoparticule « nue » (à gauche). Deuxième génération : nanoparticules furtives (au centre). Troisième génération : nanoparticules ciblantes (à droite).

I.3 Les nanoparticules du chitosane

Parmi les hydrogels biodégradables, le chitosane, un polysaccharide versatile, a fait l'objet de plusieurs études pour ses potentiels d'utilisation en biomédical. Son origine naturelle, sa disponibilité sont cout et sa biocompatibilité suscitent l'intérêt de plusieurs chercheurs pour des applications pharmaceutiques.

I.3-1 Le Chitosane

Aujourd'hui, la plupart des polymères sont des matériaux synthétiques mais leur biocompatibilité et leur biodégradabilité sont beaucoup plus limitées que celles des polymères naturels tels que la cellulose, la chitine, le chitosane et leurs dérivés.

Plusieurs études [35,36] ont été consacrées aux polysaccharides hydrosolubles non ioniques modifiés hydrophobes mais très peu traitent des polysaccharides hydrosolubles ioniques modifiés hydrophobes. Cependant le polysaccharide chitosane modifié hydrophobe peut être considéré comme un exemple caractéristique de polysaccharide associatif ionique.

Cependant, avant d'étudier ce polymère, il convient de connaître les principales caractéristiques du polymère précurseur à savoir le chitosane

I.3-1-1 Source et structure du chitosane

Le chitosane est un polysaccharide linéaire formé d'unités D-glucosamines liées entre elles par des liens glycosidiques et de N-acétyl-D-glucosamine. Le chitosane est dérivé de la chitine, le deuxième composant très abondant dans la nature après la cellulose. Elle est la composante principale d'exosquelette des arthropodes (crustacés) ou de l'endosquelette ou de l'endosquelette des céphalopodes (calamars, ...), des cuticules des insectes. Ce polymère se trouve également dans la paroi de la plupart des champignons et dans certaines algues chlorophycées, levures et bactéries [34]. En plus de son rôle dans le maintien de la rigidité de la cellule, elle contribue au contrôle de la pression osmotique.

I.3-1-2 Production du chitosane

Le chitosane est le produit de la désacétylation (enlèvement groupements acétyles) chimique en milieu alcalin ou enzymatique de la chitine (Fig.I-4) Cette dernière subit au préalable une déminéralisation à l'acide chlorhydrique, une déprotéinisation par la soude ou la potasse, et enfin un blanchiment par la présence d'un agent oxydant. En jouant sur la durée du traitement alcalin et sur la température, il est possible d'obtenir différents chitosane à partir d'une même chitine.

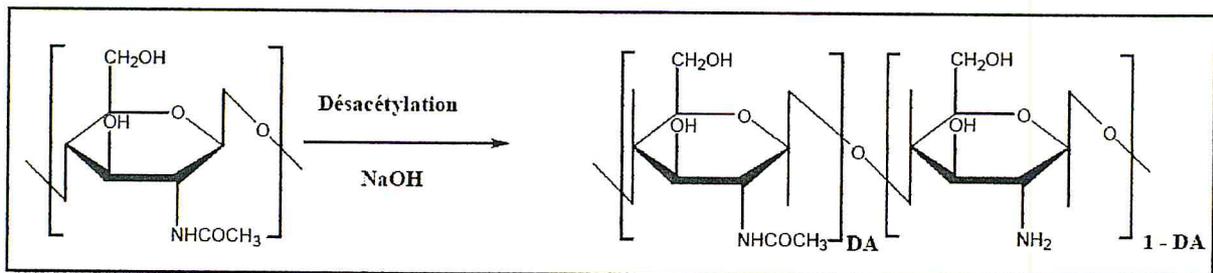


Fig.I-4: Réaction chimique de désacétylation de la chitine.

Le chitosane ne diffère de la chitine que par les groupes amines ($-NH_2$) (Fig.I-4), chargés positivement.

Ces derniers confèrent au chitosane une nature cationique, intéressante dans un milieu acide. Ces groupements sont également responsables de son activité floculant. Le chitosane comporte plus d'un centre réactif, grâce à ses fonctions alcool et amine [35].

I.3-1-3 Caractérisation du chitosane

Le chitosane est caractérisé par son degré de désacétylation, sa viscosité et son poids moléculaire.

Le degré de désacétylation (DD) est le pourcentage molaire de l'élimination des groupements N-acétyle. Ce paramètre (DD) influe sur toutes les propriétés physico-chimiques (masse moléculaire en poids, viscosité, solubilité, ...) du chitosane et apparaît donc comme le plus important. La détermination du DD est l'une des analyses de routine lors de l'extraction de la chitine et la préparation du chitosane. Plusieurs méthodes sont proposées à savoir, le titrage potentiométrique (ou volumétrique), la spectrométrie infrarouge (IR), la spectrophotométrie ultraviolet visible (UV-VIS), l'analyse élémentaire, et la résonance magnétique nucléaire (RMN) [36].

La viscosité du chitosane dépend : de son degré d'acétylation : plus il est désacétylé, plus il y a de groupements amine libres, plus le chitosane est soluble, et plus sa viscosité est importante; de sa concentration, de la température, et le pH.

Le poids moléculaire du chitosane peut être déterminé par HPLC. Toutefois, le viscosimètre demeure une méthode simple et rapide pour connaître le poids moléculaire en utilisant la formule de Marc-Houwink et Sakurada [37].

I.3-1-3 Propriétés physico-chimiques et biologiques du chitosane

Le chitosane se présente sous la forme d'un solide amorphe. C'est l'un des rares poly électrolytes naturels cationiques existant dans la nature. En solution dans un acide dilué, le chitosane se comporte comme un poly cationique de forte densité de charge, en raison de la protonation des groupements $-NH_2$. Le chitosane est biocompatible et biodégradable par les microorganismes possédant des enzymes qu'on appelle chitosanase. Il ne présente aucun comportement antigénique, mais possède un caractère antithrombogène et hémostatique. Il montre des propriétés cicatrisantes remarquables. Le chitosane a également des propriétés inhibitrices sur la croissance de nombreux parasites et infections. Il a de plus des propriétés immunologiques, antitumorales, antibactériennes et antifongiques [37].

I.3-1-4 Applications du chitosane

Compte tenu de sa structure chimique, et en mettant à profit ses diverses propriétés spécifiques, le chitosane trouve des applications importantes dans plusieurs domaines (agriculture, santé, environnement,...). Le chitosane s'avère très efficace pour ses effets hypocholestérolémiants, ses actions anti-ulcère et anti-acide anti-tumorale et immuno-activatrices [35].

Dans le secteur agroalimentaire, deux principales applications du chitosane sont exploitées. En premier lieu, de par ses propriétés floculantes, il permet de séparer les particules colloïdales dispersées dans les résidus des industries de transformation. En second lieu, il est utilisé comme matrice pour l'immobilisation d'enzymes ou de cellules microbiennes, animales et végétales [37].

Les potentiels environnementaux du chitosane ont suscité un grand nombre de recherches dans le traitement d'assainissement des eaux, dans la réduction de la turbidité et dans la stabilisation des hydrocarbures. Le chitosane permet de traiter les eaux (de rinçage ou résiduelles) chargées en métaux lourds et/ou en métaux précieux de différentes sources, induisant à une diminution globale des coûts opérationnels de l'industrie [37].

Les applications les plus souventes du chitosane sont regroupées dans le tableau ci-dessous

Domaine d'exploitation	Application
Potentiel biomédical	Sutures chirurgicales Implants dentaires Peaux artificielles
Agriculture	Reconstructions osseuses Mécanisme défensive Stimule la croissance des plantes Enrobage (protection) Libération de fertilisants de nutriments
Traitement des eaux	Polymère écologique Pouvoirs séquestrant (métaux lourds, colorantsetc) Diminution de la turbidité Diminution des odeurs Bactéricides
Alimentation	Non digestible (diète aux fibres) Hypocholestérolémiant Agent de conservation Stabilisateur

Revue bibliographique

Cosmétique	Antimicrobien Enrobage protecteur (fruits) crèmes Traitement de l'acné Produits hydratants Formulation de dentifrices Formation de shampoings
Biopharmaceutique	Immunostimulants Anti tumoraux Anticoagulants Bactériostatiques Librations contrôlées (matrices)

Tab.I-1 : Applications du chitosane (adapté de Rinaudo, 2006)

I.3-1-5 Différentes méthodes de préparation des nanoparticules du chitosane

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

Technique	Avantages	Inconvénients
Gélation ion tropique	-Formulation douce pour les protéines : pas de solvant organique, milieu aqueux, température faible, -technique simple et rapide	-Difficulté de contrôle de la cinétique de libération
Spray-drying	-large gamme d'application -encapsulation importants et rapide de principe actif	-nécessite une quantité de matière importante → pertes
Double émulsion	-bon contrôle de la cinétique de libération -possibilité d'encapsuler de petites molécules	-efficacité d'encapsulation limitée -utilisation de solvant organique -Phénomène de burst-release
Polymérisation interfaciale	-large gamme de membranes possibles -en fonction des monomères hydrophiles ou hydrophobes -encapsulation élevée d'insuline a l'aide de cyanoacrylates	-large surface de contact huile/eau → dégradation du principe actif fragile -contrôle limité de la réaction -lavages nécessaires → perte de produit
Séparation de phase	-encapsulation de protéines possible -bon contrôle de la taille des particules	-fabrication industrielle limitée -récupération des particules difficile
Coacervation complexe	-condition douces : pas de solvant organique, température ambiante	-gamme de PH limitée -si utilisation de réticulation → toxicité

➤ La gélation ionotropique

Est une méthode basée sur la capacité de réticulation de réticulation des polyélectrolytes en présence de certains ions pour former des hydrogels.

- Avantages

Elle permet une formulation douce et conserve la propriété biologique des de PA à encapsuler. Tous les polyélectrolytes sont hydrosolubles donc l'encapsulation du PA se fait sans utiliser des solvants organiques et de températures élevées. Cette technique est également simple, rapide et non couteuse.

- Limites

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

Bibliographie

- [1] Karine Andrieux, Didier Desmaele, Jean D'Angélo et Patrick Couverture, « 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 claudes bernard Lyon 1 n° 6. 2004.
- [3] Kumar, C., ed. Biological and Pharmaceutical Nanomaterials. Nanotechnologies for life science, ed. C. Kumar. Vol. 2. 2006, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim.
- [4] Torchilin, V.P., Multifunctional nanocarriers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2006. 58(14): p. 1532-1555.
- [5] Gregoriadis, G., Carrier Potential of Liposomes in Biology and Medicine .1. *New England Journal of Medicine*, 1976. 295(13): p. 704-710.
- [6] Pinto-Alphandary, H., A. Andremont, and P. Couvreur, Targeted delivery of antibiotics using liposomes and nanoparticles: research and applications. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2000. 13(3): p. 155-168.
- [7] Mukherjee, B., et al., Sustained release of acyclovir from nano-liposomes and nanoniosomes: An in vitro study. *International Journal of Nanomedicine*, 2007. 2(2): p. 213-225.
- [8] Letchford, K. and H. Burt, A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2007. 65(3): p. 259-269.
- [9] Koo, O.M., I. Rubinstein, and H. Onyuksel, Role of nanotechnology in targeted drug delivery and imaging: a concise review. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2005. 1(3): p. 193-212.
- [10] Ghoroghchian, P.P., Controlling bulk optical properties of emissive polymersomes

- through intramembranous polymer-fluorophore interactions. *Chemistry of Materials*, 2007. 19(6): p. 1309-1318.
- [11] Nasongkla, N., cRGD-functionalized polymer micelles for targeted doxorubicin delivery. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2004. 43(46): p. 6323-6327.
- [12] Sawant, R.M., "SMART" drug delivery systems: Double-targeted pH-responsive pharmaceutical nanocarriers. *Bioconjugate Chemistry*, 2006. 17(4): p. 943-949.
- [13] Couvreur, P., Polycyanoacrylate Nanocapsules as Potential Lysosomotropic Carriers – Preparation, Morphological and Sorptive Properties. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 1979. 31(5): p. 331-332.
- [14] Boas, U. and P.M.H. Heegaard, Dendrimers in drug research. *Chemical Society Reviews*, 2004. 33(1): p. 43-63.
- [15] Vinogradov, S.V., T.K. Bronich, and A.V. Kabanov, Nanosized cationic hydrogels for drug delivery: preparation, properties and interactions with cells. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2002. 54(1): p. 135-147.
- [16] Oh, J.K., The development of microgels/nanogels for drug delivery applications. *Progress in Polymer Science*, 2008. 33(4): p. 448-477.
- [17] Muller, R.H., K. Mader, and S. Gohla, Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2000. 50(1): p. 161-177.
- [18] Wong, H.L., Chemotherapy with anticancer drugs encapsulated in solid lipid nanoparticles. *Adv Drug Deliv Rev*, 2007. 59(6): p. 491-504.
- [19]. Heurtault, B., The influence of lipid nanocapsule composition on their size distribution. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2003. 18(1): p. 55-61.
- [20]. Peltier, S., Enhanced oral paclitaxel bioavailability after administration of paclitaxel-

- loaded lipid nanocapsules. *Pharmaceutical Research*, 2006. 23(6): p. 1243- 1250.
- [21] Chen, J., Ligand Conjugated Low-Density Lipoprotein Nanoparticles for Enhanced Optical Cancer Imaging in Vivo. *J. Am. Chem. Soc.*, 2007. 129(18): p. 5798-5799.
- [22] Nikanjam, M., Synthetic nano-low density lipoprotein as targeted drug delivery vehicle for glioblastoma multiforme. *International Journal of Pharmaceutics*, 2007. 328(1): p. 86-94.
- [23] Anton, N., J.P. Benoit, and P. Saulnier, Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates - A review. *Journal of Controlled Release*, 2008. 128(3): p. 185-199.
- [24] Solans, C., Nano-emulsions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 2005. 10(3-4): p. 102-110.
- [25] Liu, Y.L., Synthesis, stability, and cellular internalization of gold nanoparticles containing mixed peptide-poly(ethylene glycol) monolayers. *Analytical Chemistry*, 2007. 79(6): p. 2221-2229.
- [26] Parak, W.J., Biological applications of colloidal nanocrystals. *Nanotechnology*, 2003. 14(7): p. R15-R27.
- [27] Cheon, J. and J.-H. Lee, Synergistically Integrated Nanoparticles as Multimodal Probes for Nanobiotechnology. *Acc. Chem. Res.*, 2008.
- [28] Yan, J.L., Dye-doped nanoparticles for bioanalysis. *Nano Today*, 2007. 2(3): p. 44-50.
- [29] Michalet, X., Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics. *Science*, 2005. 307(5709): p. 538-544.
- [30] Cai, W.B., Peptide-labeled near-infrared quantum dots for imaging tumor vasculature in living subjects. *Nano Letters*, 2006. 6(4): p. 669-676.
- [31] Moghimi, S.M., A.C. Hunter, and J.C. Murray, Long-circulating and target-specific

- nanoparticles: Theory to practice. *Pharmacological Reviews*, 2001. 53(2): p. 283-318.
- [32] Monfardini, C. and F.M. Veronese, *Stabilization of Substances in Circulation*. *Bioconjugate Chem.*, 1998. 9(4): p. 418-450.
- [33] Mathieu Goutayer . these de doctorat de l'universite pierre et marie curie « Nano-émulsions pour la vectorisation d'agents thérapeutiques ou diagnostiques ; étude de la biodistribution par imagerie de fluorescence in vivo », Decembre 2008.
- [34] Tolaimate A., Desbrieres J., Rhazi M., Alagui A., *Contribution to the preparatio of chitins and chitosans with controlled physico-chemical properti*. *Polym.* (2003)., 44: 7939-7952.
- [35] Shahidi F., Abuzaytoun R. *Chitin, chitosan, and co-products: chemistry, productions, applications, and health effects*. *Adv. Food Nutr. Res.* (2005)., 49: 93-135.
- [36] Onesippe C. *Etude des systèmes polyélectrolytes/Tensioactif en phase aqueuse et l'interface liquide/gaz. Application à l'élaboration de micro – capsules*. Thèse de doctorat, Ecole Doctorale : Science chimiques et physique, Université de Montpellier II, France. (2005).
- [37] Zemmouri H. *Utilisation du chitosane comme agent flocculant dans le traitement des eaux*. Mémoire de Magister, Laboratoire de Biotechnologie Environnementale et Génie des procédés, Ecole Nationale polytechnique, Alger, Algérie (2008).

Partie expérimentale

II- PREPARATION, CARACTERISATION ET LIBERATION IN VITRO DE LA PORPHYRINE A PARTIR DES NANOPARTICULE DU CHITOSANE

Dans l'objectif d'améliorer la stabilité et l'efficacité de la porphyrine, on utilise des nanovecteurs à base du chitosane pour l'encapsuler et la véhiculer vers son site d'action.

Le chitosane (CS) est un polysaccharide très abondant dans la nature. Il est obtenu suite à une desacétylation partielle de la chitine dans un milieu basique [1]. Le CS suscite actuellement beaucoup d'intérêt chez la communauté scientifique comme véhicule pour la livraison des médicaments et cela c'est grâce à ses excellentes propriétés (biodégradable, biocompatible, non toxique et antibactérien ...etc.) [2, 3]. De plus, le CS est chargé positivement ce qui lui permet d'augmenter sa propriété d'absorption [4]. L'intérêt le plus important du CS est sa solubilité dans les solutions d'acides organiques à un pH inférieur à 6.5 et peut donc former facilement des nanoparticules par des agents de réticulation comme le glutaraldehyde [5, 6], tripolyphosphate de sodium [7] et le sel d'acide polyaspartique de sodium [8]. En outre, le CS est un transporteur idéal pour la livraison des médicaments hydrophobes comme la porphyrine.

Le présent travail décrit la préparation et l'évaluation in vitro des systèmes pharmaceutiques nanoparticulaires à base du chitosane. Des nanosphères du chitosane vides et chargées du principe actif ont été préparées par la méthode de la gélation ionotropique en présence du tripolyphosphate de sodium comme agent de réticulation.

Tous les produits utilisés dans cette partie expérimentale sont de qualité analytique de source Aldrich et Fluka, ils ont été utilisés tels qu'ils sont reçus.

Avant de commencer l'étude sur les systèmes préparés, il est utile de commencer par une petite caractérisation structurale par FTIR du chitosane (CS) utilisé.

II.1 Caractérisation du chitosane par FTIR

Le spectre FTIR du chitosane utilisé est donné dans la figure ci-dessous (Fig. II-1)

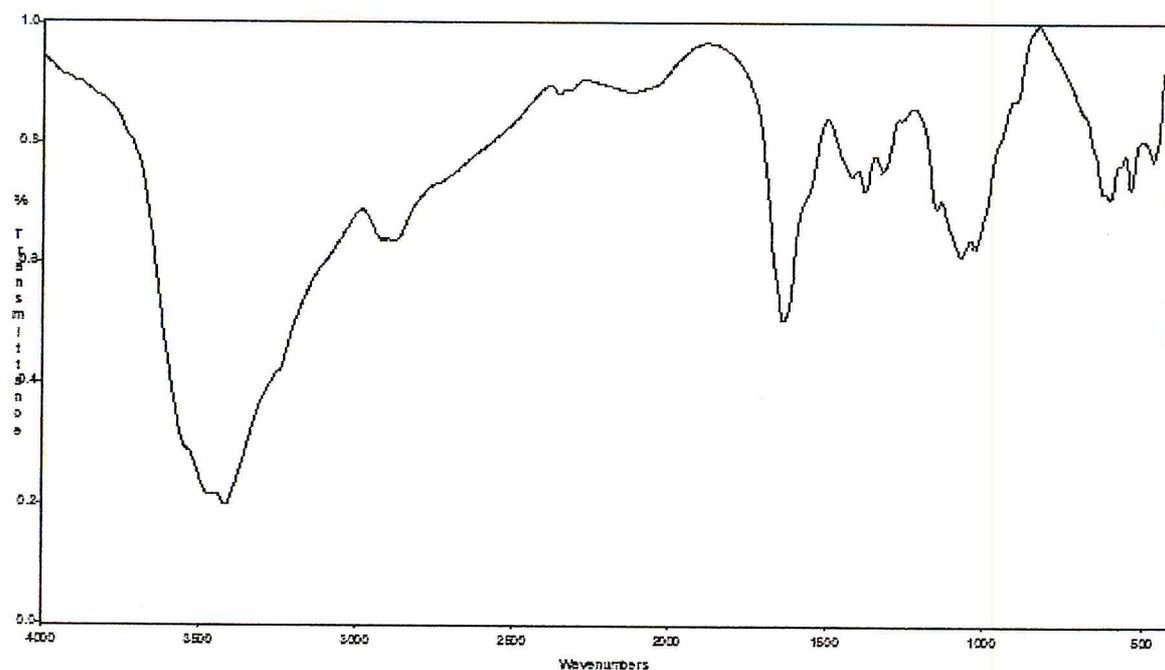


Fig. II-1 : Spectre FTIR du chitosane

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

Tab.II-1 : Groupements caractéristiques du CS utilisé

λ (cm ⁻¹)	Groupement
3500-3100	Elongation -OH
2990-2850	Elongation -CH aliphatique
1650	Amine acétylé de la chitine
1322	Elongation -CO de -CH ₂ OH
1151-1026	R-NH ₂ libre

PARTIE EXPERIMENTALE

➤ Le calcul du degré de desacétylation (DD)

La technique utilisée est la détermination du DD par spectroscopie FTIR. L'échantillon à étudier est préparé selon la méthode des disques du KBr, dont le rapport polymère : KBr est 1 :100 [9].

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

$$DD=100-[(A_{1650}/A_{3450})\times 100/1.33]$$

Où A_{1650} et A_{3450} est l'absorbance du pic 1650 cm^{-1} (caractéristique du groupement amide primaire comme mesure de la quantité du groupement N-acétylé) et celle du pic 3450 cm^{-1} (caractéristique du groupement hydroxyle) respectivement.

Le facteur 1.33 représente la valeur du rapport A_{1650}/A_{3450} dans le cas du chitosane entièrement N-acétylé.

Le DD du chitosane utilisé est :

II.2 Préparation des nanoparticules à base du chitosane

a. Nanoparticules vides (sans principe actif)

Les nanoparticules (Np) à base du chitosane sont préparées par la méthode de la gélation ionotrope. Une solution acide du chitosane dissout dans l'acide acétique est ajoutée goutte à goutte sous agitation à une solution aqueuse du tripolyphosphate de sodium (TPP), à une température ambiante pendant 10 min. En fin, les Np sont collectées par ultracentrifugation puis séchées à température ambiante.

b. Nanoparticules hybrides

Nous avons préparé trois systèmes différents i.e. : chitosane avec le poly éthylène glycol (PEG), chitosane avec la beta cyclodextrine (β -CD) et le chitosane avec le PEG et la β -CD à

PARTIE EXPERIMENTALE

la fois, dont l'abréviation des différents systèmes est comme suit (Np.CS-PEG, Np.CS- β -CD et Np.CS-PEG- β -CD) respectivement. Les trois systèmes sont préparés par la même méthode citée ci-dessus avec quelques modifications.

Np.CS-PEG : Un mélange d'une solution acide du chitosane et une solution aqueuse du PEG est ajouté goutte à goutte à une solution aqueuse du TPP. La suite de la préparation est la même que celle des Np.CS.

Np.CS- β -CD : Un mélange d'une solution acide du chitosane et une solution aqueuse de la β -CD est ajouté goutte à goutte à une solution aqueuse du TPP. La suite de la préparation est la même que celle des Np.CS.

Np.CS-PEG- β -CD : Un mélange d'une solution acide du chitosane et une solution aqueuse de la β -CD et du PEG est ajouté goutte à goutte à une solution aqueuse du TPP. La suite de la préparation est la même que celle des Np.CS.

c. Nanoparticules chargées du principe actif

Il consiste à dissoudre une masse suffisante de la porphyrine dans la solution acide du chitosane sans ou avec les systèmes hybrides et maintenir l'agitation jusqu'à l'obtention d'un mélange homogène. Egoutter le mélange obtenu dans une solution aqueuse du TPP puis collecter les Np.CS chargées par le principe actif par ultracentrifugation. Les Np sont par la suite séchées à l'air libre dans un endroit sombre.

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

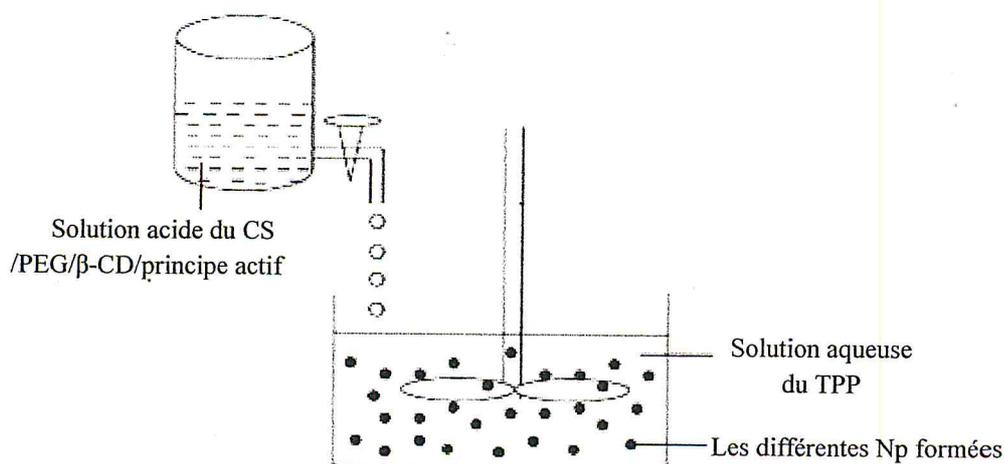


Fig.II-2 : Schéma de la préparation des nanoparticules à base du CS

II.3 Caractérisation des nanoparticules à base du chitosane

II.3-1 Aspect physique :

Les systèmes préparés ont un aspect physique d'un film transparent dans le cas des Np.CS (Fig.II-4-a), opaque blanc dans le cas des NP.CS-PEG (Fig.II-4-b) et un aspect solide blanchâtre cristallin dans le cas des Np.CS- β -CD et Np.CS-PEG- β -CD (Fig.II-4-c et Fig.II-4-d) respectivement. Une vue macroscopique des quatre systèmes est donnée dans la figure ci-dessous (Fig.II-4)

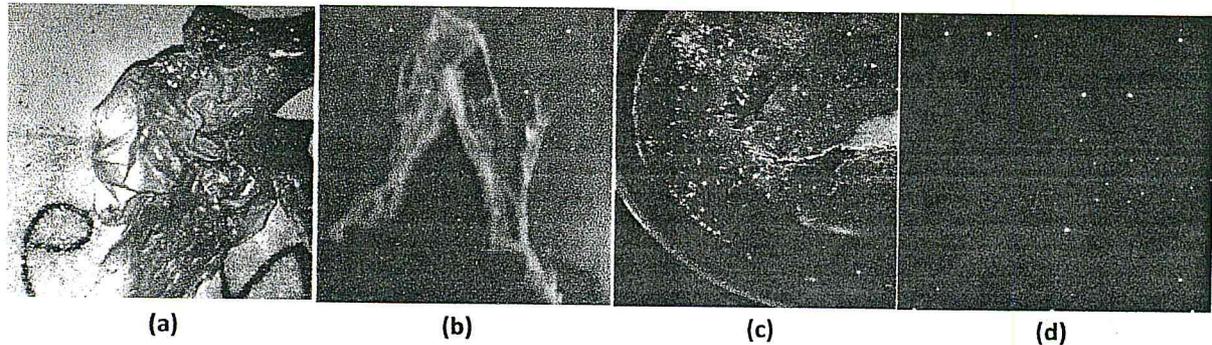


Fig.II-3: Vue macroscopique des NP (a) : CS, (b) : CS-PEG, (c) : CS. β -CD et (d) : CS.PEG. β -CD

➤ Principe de formation des nanoparticules à base du chitosane

Grace à des groupements cationiques aminés du chitosane, des interactions ioniques peuvent se produire entre le chitosane et les molécules chargées négativement tels : les sulfates, les citrates et les phosphates (dans notre cas, nous avons utilisé des ions phosphates aliphatiques). Ces interactions vont donner des hydrogels dont leurs propriétés dépendent de la densité de charge et la taille des agents anioniques, ainsi que du degré de desacétylation du biopolymere [10, 11]

La formation des nanoparticules à base du chitosane en milieu acide pourrait être schématisée comme indiquée dans la Fig. II-5.

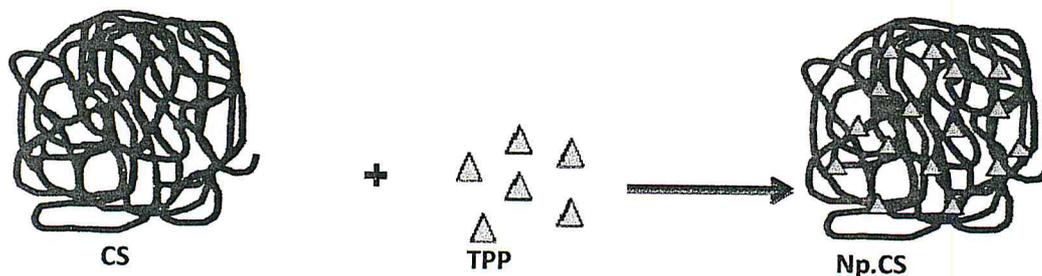


Fig. II-4 : Schéma du principe de formation des Np.CS [12]

PARTIE EXPERIMENTALE

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

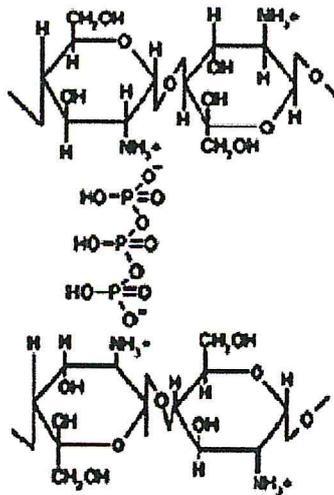


Fig. II-5: Réticulation ionotropique du chitosane avec le TPP

II.3-2 Caractérisation spectroscopique par FTIR

Les spectres FTIR des quatre systèmes préparés sont donnés dans les figures ci-dessous.

➤ Système un : Np.CS

Un élargissement remarquable dans la bande caractéristique à $3400-3450\text{ cm}^{-1}$ attribuée à l'élongation des liaisons NH_2 et $-\text{OH}$ qui pourra être justifiée par l'augmentation du nombre des bandes d'hydrogène (b). Un nouveau pic apparaît à 1565 cm^{-1} attribué au groupement d'ammonium $-(\text{NH}_3^+)$ qui est dû à la protonation des groupements amines primaires du chitosane en milieu acide. De plus, le pic vers 1650 cm^{-1} attribué au groupement amide primaire dans le spectre du CS (a) est déplacé à 1638 cm^{-1} dans le cas des NPs CS/TPP cela pourrait être dû à la réticulation entre la charge positive du $-(\text{NH}_3^+)$ et la charge négative du TPP ($-\text{PO}^-$). Deux autres pics apparaissent dans le spectre FTIR des NPs CS/TPP vers 888.6 cm^{-1} et 1214 cm^{-1} qui sont attribués aux groupements P-OP et P=O du TPP respectivement [13, 14]. Les résultats du spectre FTIR (b) sont conformes avec la vue macroscopique du film du chitosane modifié par le TPP (Fig.II-4- a) et la structure donnée dans la Fig.II-6.

PARTIE EXPERIMENTALE

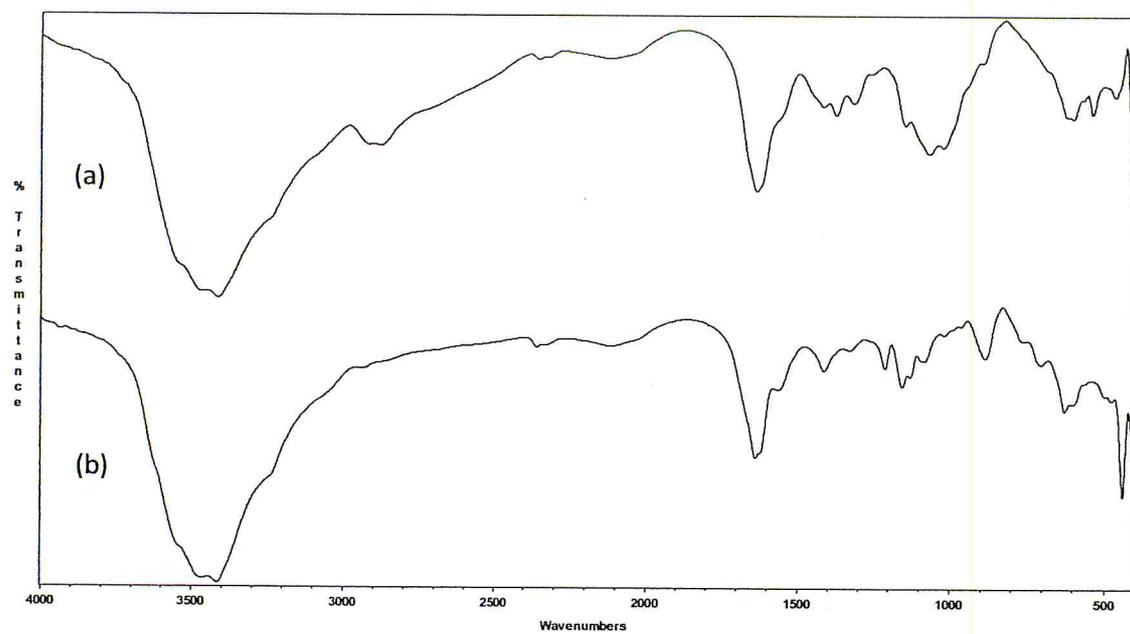


Fig. II-6 : Spectre FTIR du CS (a) et des Np.CS (b)

➤ Systeme deux : Np.CS-PEG

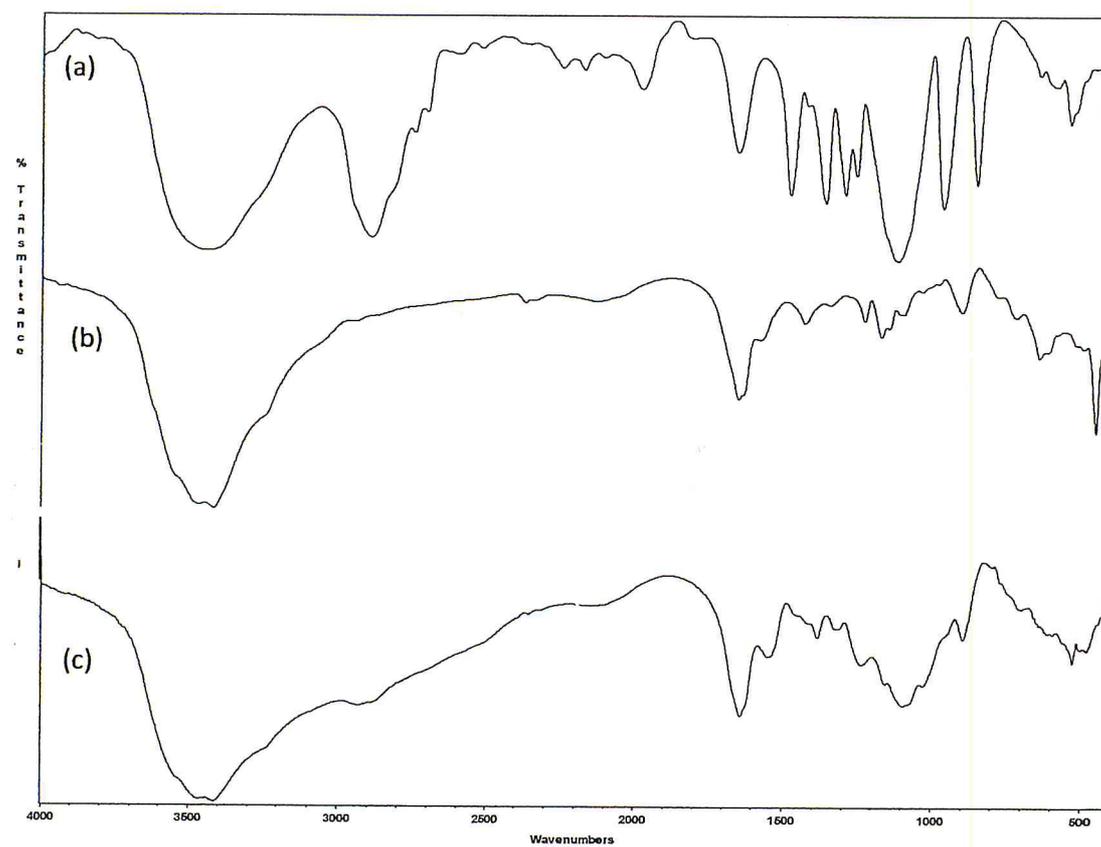


Fig. II-7 : Spectre FTIR du PEG (a) et des Np.CS (b) et Np.CS-PEG (c)

PARTIE EXPERIMENTALE

Le pic caractéristique vers 1110 cm^{-1} dans le spectre du PEG pure (a) est attribué à l'élongation du groupement C-O et le pic vers 2883 cm^{-1} sont attribués à la vibration de déformation du groupement C-H aléphasique.

Deux nouveaux pics apparaissent dans le spectre des Np.CS-PEG vers 1110 cm^{-1} et 2883 cm^{-1} attribués à l'élongation C-O et la vibration de déformation C-H aléphasiques respectivement du PEG. En fin, un déplacement vers les petits nombres d'ondes accompagné par un élargissement observé dans la bande caractéristique du groupement -OH lié au -NH, ce qui suggère la formation de nouvelles liaisons d'hydrogène [15]. Tous ces changements observés donnent une grande évidence qu'il y a une interaction intermoléculaire et une bonne compatibilité entre le chitosane et le PEG.

➤ Système trois : Np.CS- β -CD

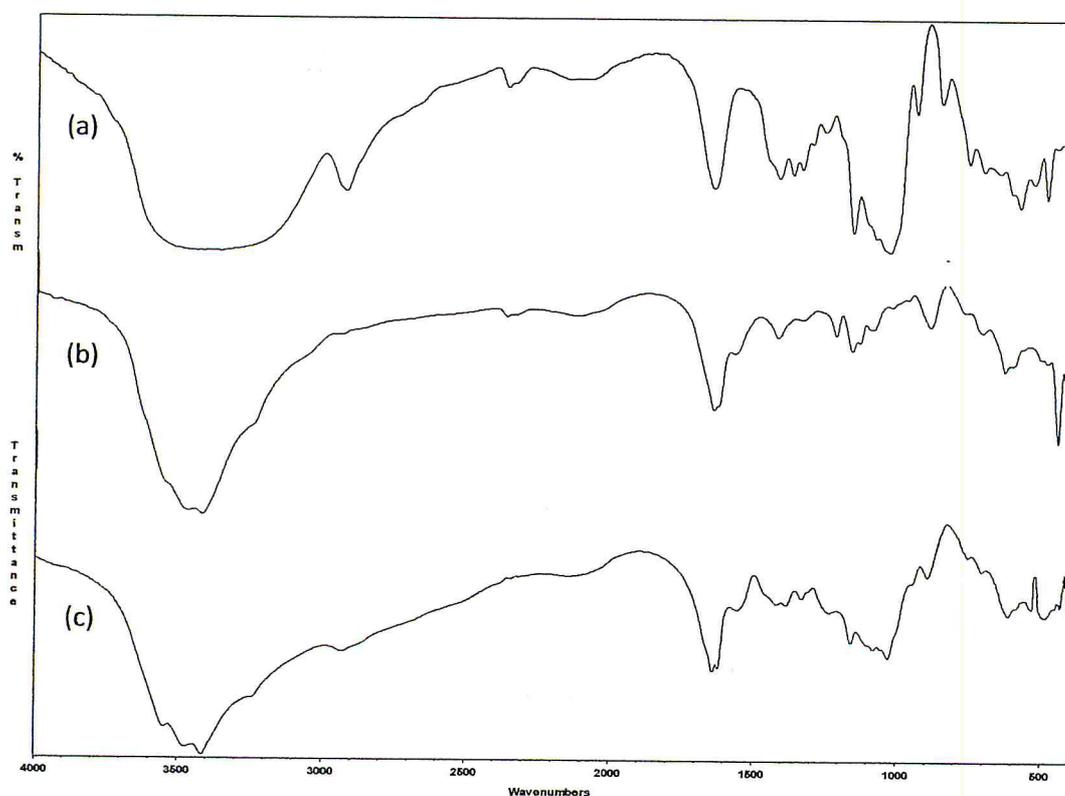


Fig. II-8 : Spectre FTIR de la β -CD(a) et des Np.CS (b) et Np.CS- β -CD (c)

Le spectre FTIR de la β -CD(a) montre deux bandes intenses caractéristiques du groupement -OH et -C-O vers 3380 cm^{-1} et 1032 cm^{-1} respectivement et en fin un pic caractéristique de la liaison α -(1,4) glucopyranose dans la β -CD vers 889 cm^{-1} .

PARTIE EXPERIMENTALE

Deux nouveaux pics observés dans le spectre des Np.CS- β -CD vers 2889 cm^{-1} et vers 1032 cm^{-1} attribués aux groupements -OH et -C-O respectivement et un autre pic vers 890 cm^{-1} attribués à la liaison α -(1,4) glucopyranose respectivement de la β -CD. Ainsi, la bande caractéristique du groupement -OH lié au -NH vers (b) est devenue plus large dans le spectre des Np.CS- β -CD (b) accompagné par un déplacement vers les petits nombres d'ondes, cela indique qu'il y a eu de nouvelles bonds d'hydrogène entre la β -CD et le chitosane [16].

➤ Système quatre : Np. CS-PEG- β -CD

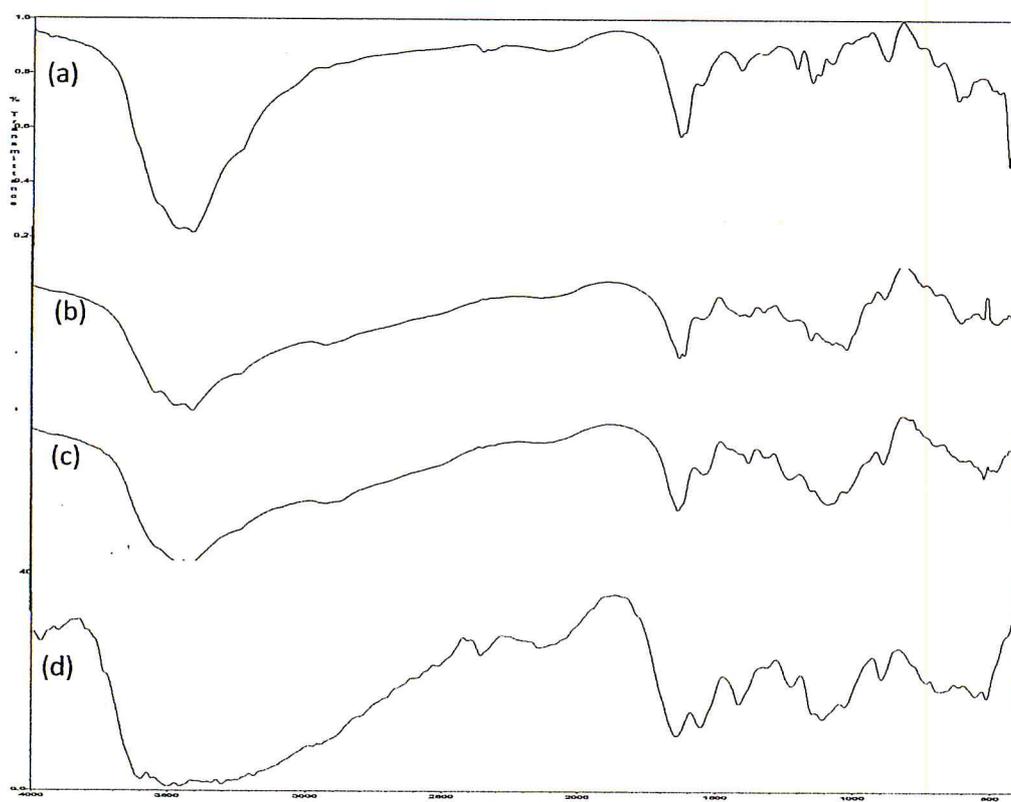


Fig. II-9 : Spectre FTIR de Np.CS (a), β -CD (b), PEG (c) et Np.CS-PEG- β -CD (d)

Le spectre des Np.CS-PEG- β -CD garde les mêmes formes que celle observées dans les Np.CS seules sauf qu'un élargissement remarquable dans la bande caractéristique du groupement -OH lié et -NH vers 3450 cm^{-1} (d) est devenue encore plus large que dans les trois cas précédents (a, b et c) accompagnée par un déplacement vers les grands nombres d'ondes 3550 cm^{-1} , cela indique qu'il y a eu de nouvelles bonds d'hydrogène à cause des réactions entre le PEG, la β -CD et le chitosane [15,16].

II.3-3 Caractérisation morphologique par MEB

Les analyses par microscopie électronique à balayage (MEB) ont été réalisées à l'aide d'un instrument de type JEOL JSM-6360L. Les échantillons à analyser ont subi une métallisation par une mince couche d'or (2nm d'épaisseur). Les microphotographies obtenues sont données dont les figures ci-dessous.

Les micrographies obtenues montrent que tous les systèmes synthétisés ont une surface rugueuse et poreuse de plus des fissures et des feuillets sont observés sur la surface des films des Np.CS et Np.CS.β-CD.

Un agrandissement plus grand sur la surface des systèmes a permis d'observer des petites sphères de tailles différentes sur chacune d'elles.

- Dans le cas du film de Np.CS les nanoparticules sont sous forme de nanosphères agglomérées et de tailles d'environ 300nm.
- Dans le cas du film de Np.CS-PEG les nanoparticules sont sous forme de nanobilles dispersées de tailles d'environ 470 nm.
- Dans le cas du film de Np.CS. β-CD les nanoparticules sont sous forme de nanosphères dispersées de tailles d'environ 170 nm.
- Dans le cas du film de Np.CS-PEG. β-CD les nanoparticules sont sous forme de nanosphères de tailles d'environ 312 nm.

Remarque : on note que dans les agrandissements des micrographies dans le cas où on a introduit le PEG on remarque que la surface des films est plus lisse.

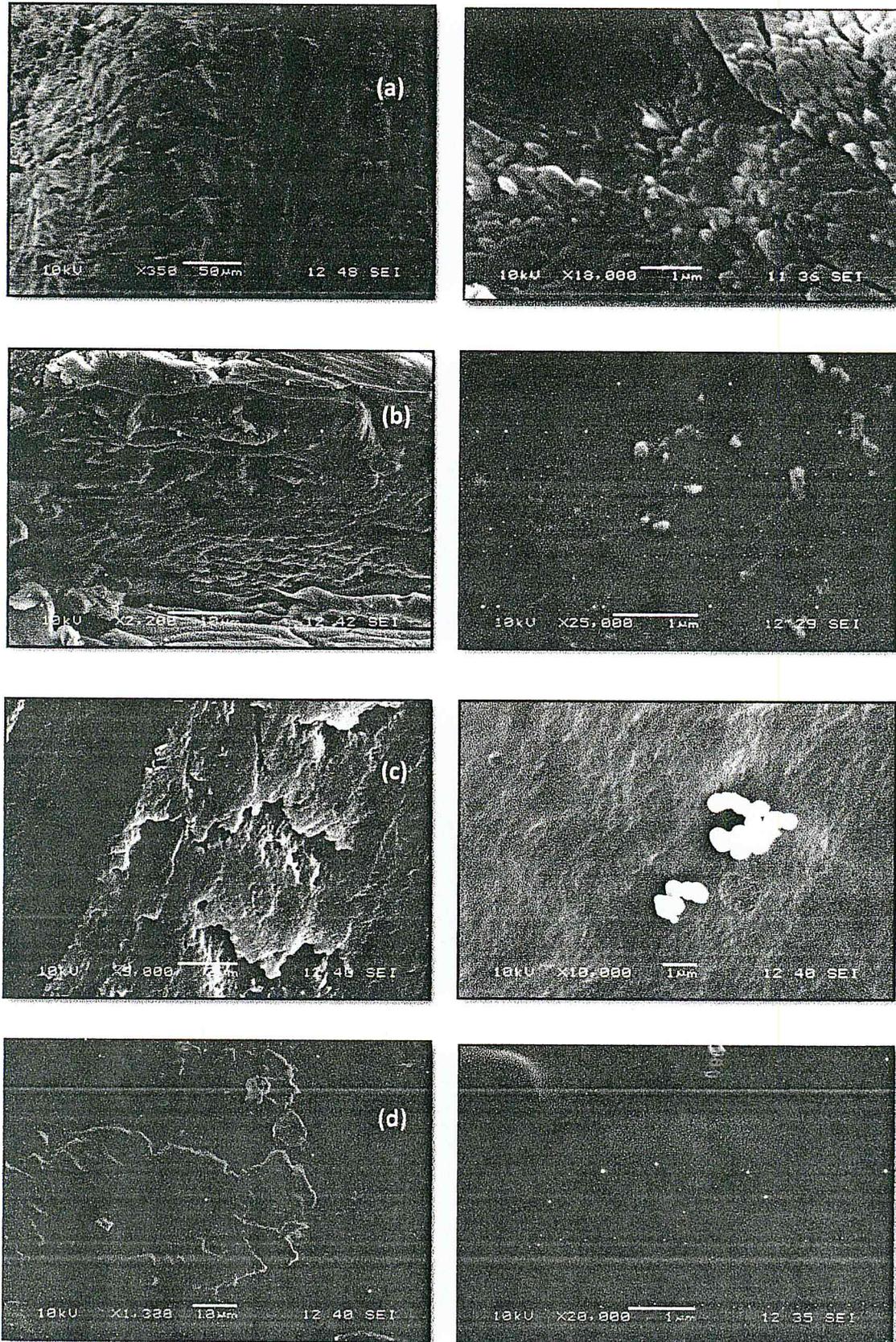


Fig.II-10 : Microphotographies MEB des nanoparticules à base du chitosane :
(a) : Np.CS, (b) :Np.CS- β-CD, (c) :Np.CS-PEG et (d) :Np.CS-PEG. β-CD

PARTIE EXPERIMENTALE

II.3-4 Caractérisation thermographique par ATG/DSC

Afin d'étudier la stabilité thermique et le comportement des différents systèmes que nous avons préparé, une analyse thermique comportant la variation du flux thermique en fonction de la température a été entreprise.

Les courbes ont été enregistrées sur un instrument de type NETZSCH STA 409 PS/PG sous atmosphère d'azote (ml/min):45), en utilisant un creuset en alumine (Al_2O_3) à une vitesse de balayage de 10 °C/min, entre 25 et 550 °C.

Les thermogrammes obtenus sont donnés dans les figures II-12, II-13, II-14 et II-15 qui correspondent aux systèmes Np.CS, Np.CS-PEG, Np.CS- β -CD et Np.CS-PEG- β -CD respectivement.

➤ Le cas des nanoparticule du CS/TPP

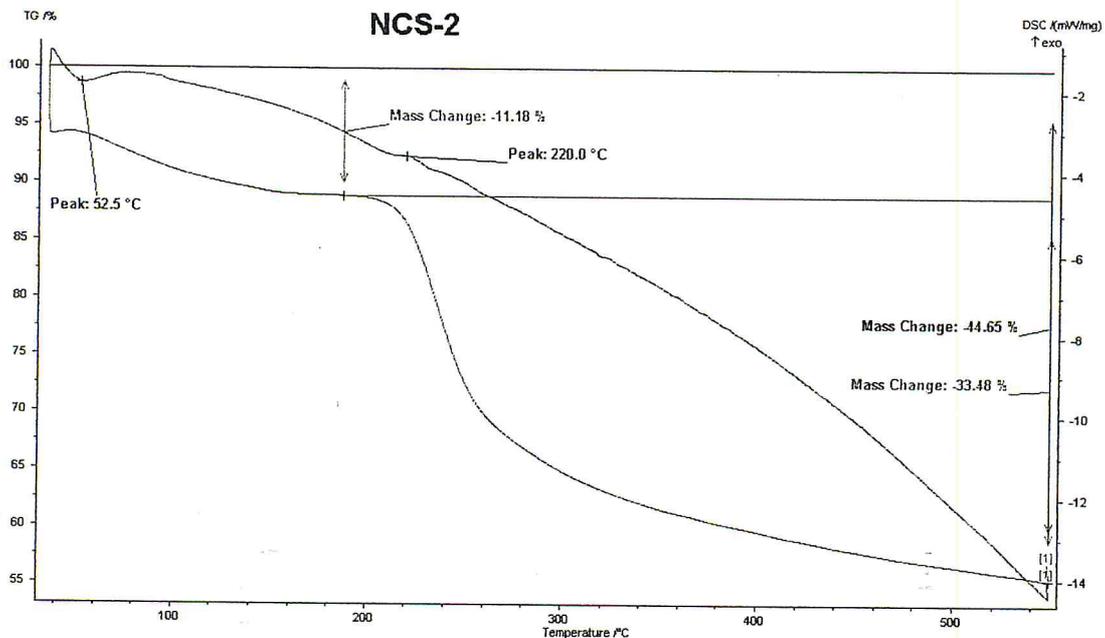


Fig.II-11 : Thermogramme représentant le flux de chaleur en fonction de la température en °C des Np.CS

PARTIE EXPERIMENTALE

➤ Le cas des nanoparticules du CS-PEG/TPP

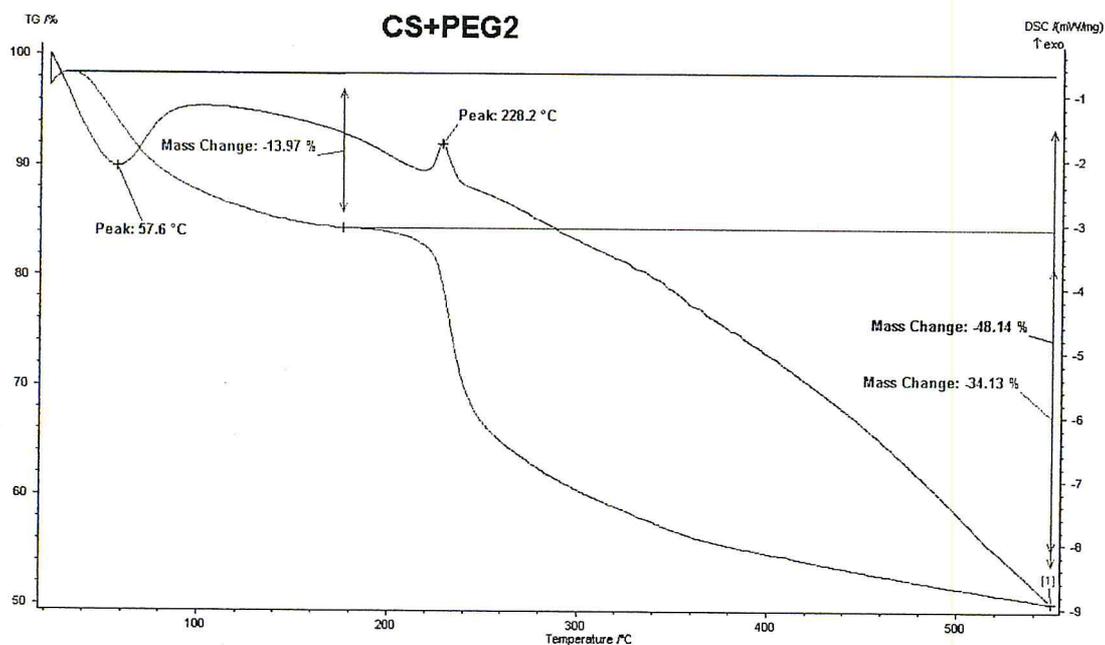


Fig.II-12 : Thermogramme représentant le flux de chaleur en fonction de la température en °C des Np.CS-PEG

➤ Le cas des nanoparticules du Np.CS-β-CD

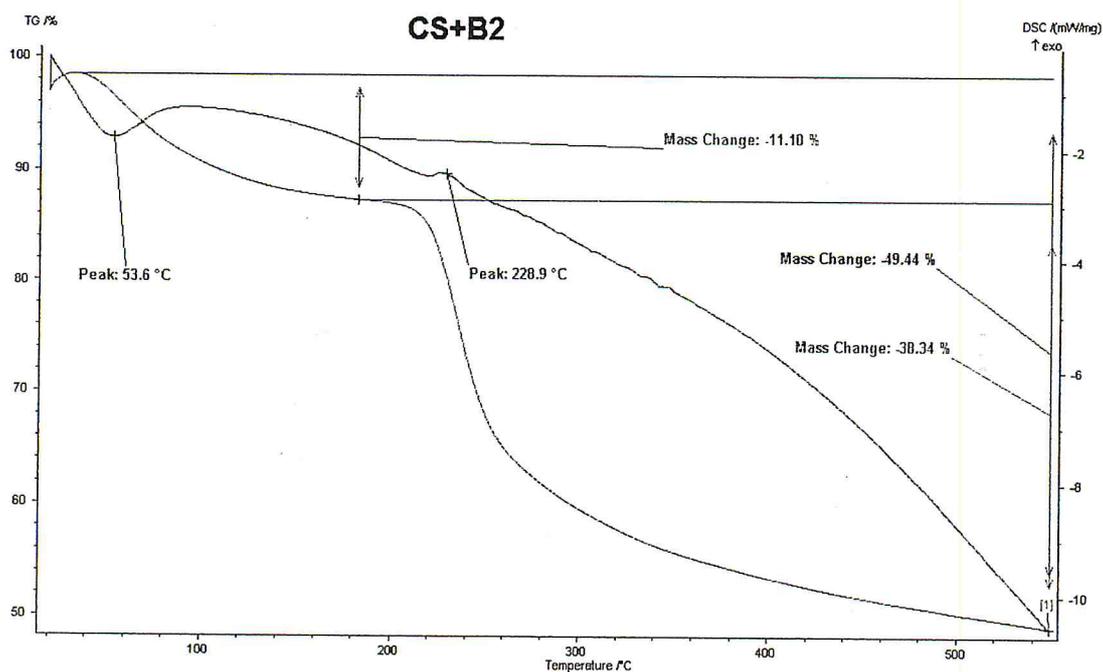


Fig.II-13: Thermogramme représentant le flux de chaleur en fonction de la température en °C Np.CS-β-CD

PARTIE EXPERIMENTALE

➤ *Cas des nanoparticules du CS-PEG-β-CD*

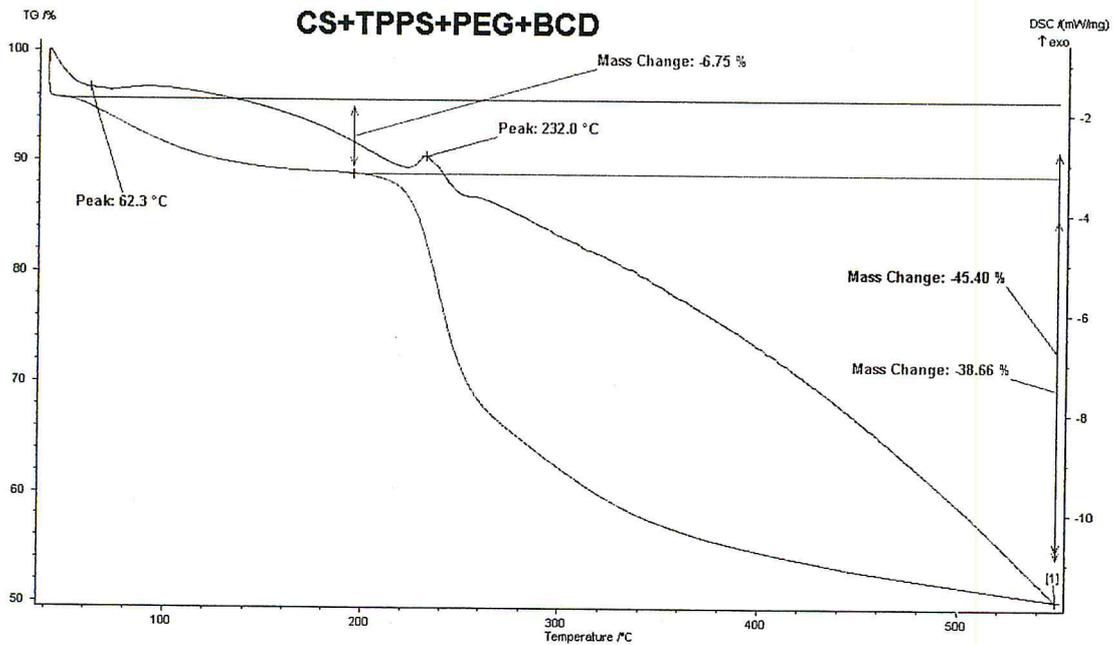


Fig.II-14 : Thermogramme représentant le flux de chaleur en fonction de la température en °C des Np. CS-PEG-β-CD

Le tableau suivant résume les différents phénomènes endothermiques et exothermiques des thermogrammes obtenus.

Tab.II-2 : les différents pics illustrés des thermogrammes des films à base du chitosane

Système	T (°C) du pic endotherme	T (°C) du pic exotherme
Np.CS	52.5	220.0
Np.CS-PEG	57.6	228.2
Np.CS-β-CD	53.6	228.9
Np.CS-PEG-β-CD	62.3	232.0

PARTIE EXPERIMENTALE

Les pics endothermes apparaissent comme conséquence de l'évaporation de l'eau associée ou absorbée dans le polymère ainsi à la dissociation des cristaux du polymère. Par contre les pics exothermes sont dus à la décomposition de la structure polymérique [17].

D'après les résultats obtenus dans les thermogrammes ci-dessus, on peut conclure que le système du chitosane composites (NP.CS.PEG.BETA) est le système le plus stable thermiquement dans les quatre systèmes préparés (il a les températures endothermique et exothermique la plus élevées).

De plus, les intensités des deux pics endo- et exothermique dans le cas des systèmes contenant le PEG sont plus élevées par rapport aux autres systèmes. Ce qui indique que l'ajout du PEG améliore la stabilité thermique des systèmes [18].

Concernant l'analyse TG, il est clairement observé que la perte de masse dans les quatre systèmes se fait par deux étapes. La première perte de masse dans l'intervalle thermique 25-180 °C représente le taux de l'eau évaporée, tandis que la deuxième perte de masse est dans l'intervalle 260 -550 °C est attribuée aux taux de décomposition en matière du système étudié. D'après les résultats obtenus, on peut conclure que le système quatre est le plus stable thermiquement car il a eu une perte de masse inférieure par rapport à celle des autres systèmes. Donc les résultats de l'ATG confirment les résultats de la DSC.

II.4 Etude de gonflement

Les essais de gonflement des films sont faits selon la procédure suivante. Une quantité connue des deux échantillons (Np.CS et Np.CS-PEG) est immergée dans (100ml) de différentes solutions tampon à pH (acide, neutre et basique) et à 25°C. La masse du film gonflé est prise dans des intervalles de temps définis après avoir éliminé l'excès de la solution de sa surface. à chaque fois on remet le film gonflé et séché dans la solution et on refait ça jusqu'à que le taux de gonflement soit stable. Le gonflement des échantillons est calculé en utilisant la formule suivante :

$$SW(g/g) = (W_f - W_0) / W$$

Où le W_f : est la masse du film gonflé et W_0 : est la masse du film non gonflé (sec) [19, 20].

PARTIE EXPERIMENTALE

➤ Milieu acide

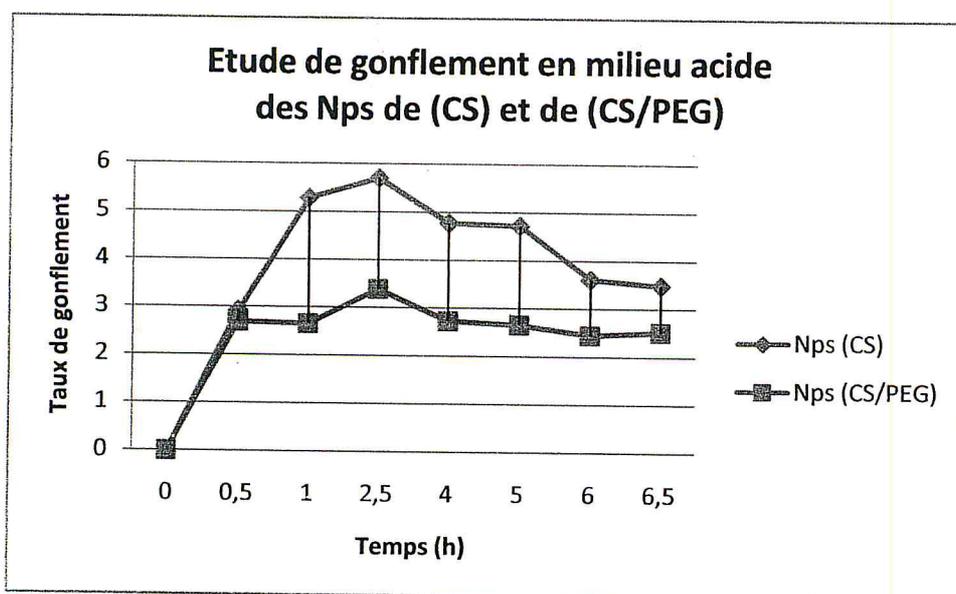


Fig.II-15 :Etude de gonflement en milieu acide des Np.CS et Np.CS/PEG

➤ En milieu neutre

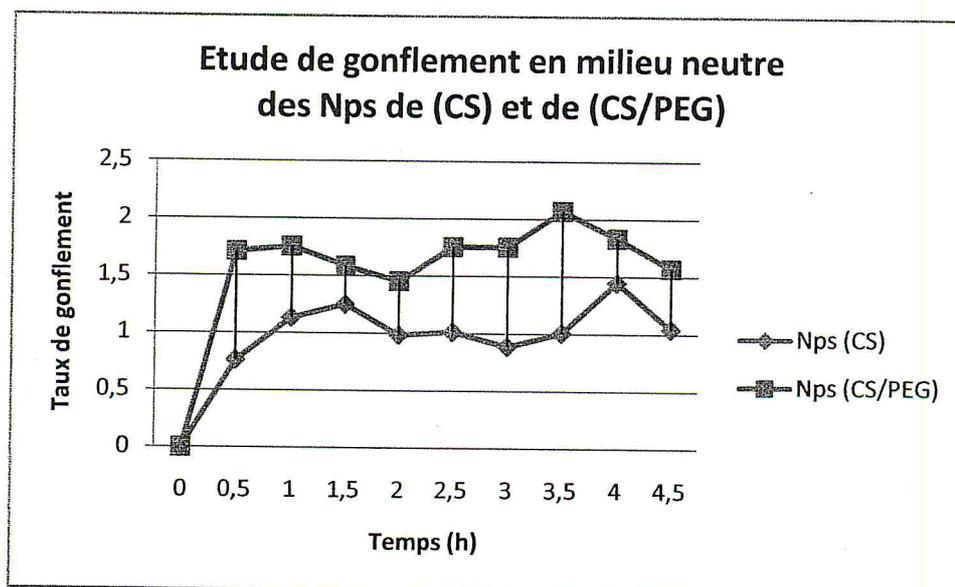


Fig.II-16:Etude de gonflement en milieu neutre des Np.CS et Np.CS/PEG

➤ En milieu basique

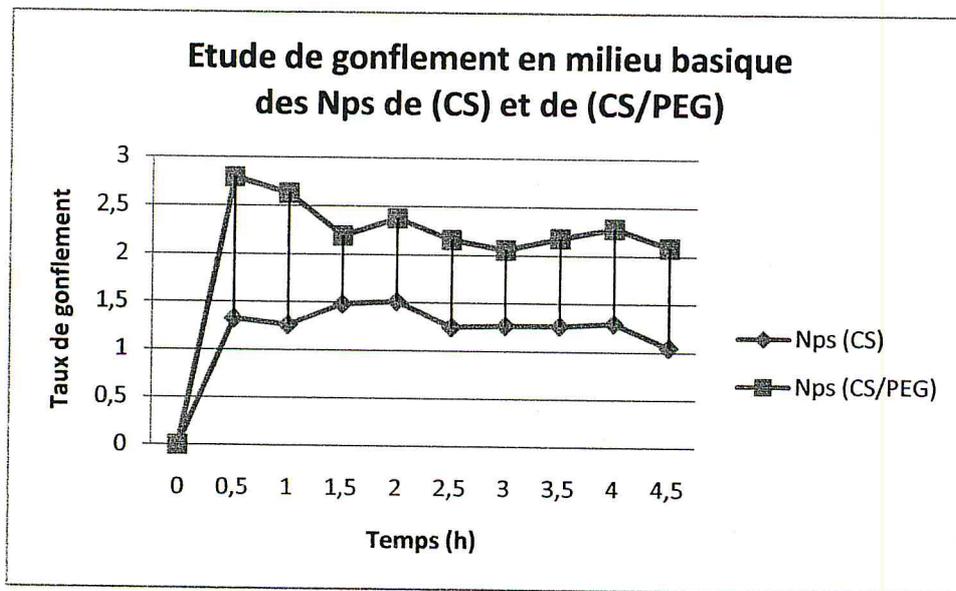


Fig.II-17 :Etude de gonflement en milieu basique des Np.CS et Np.CS/PEG

Selon la littérature, plusieurs facteurs affectent la dissolution ou le gonflement d'un polymère (nature du polymère et du solvant, la flexibilité des chaînes du polymère, masse moléculaire du polymère, composition chimique du polymère, structure cristalline du polymère, le type d'agent de réticulation) [21].

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

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

PARTIE EXPERIMENTALE

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

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

Par contre dans le milieu neutre et alcalin le phénomène s'est inversé, le taux de gonflement dans le réseau polymérique des NP.CS est plus faible que dans le cas de celui des NP.CS.PEG on suggère que cela pourrait être dû à la nature du milieu, i.e : le chitosane est insoluble dans des milieux neutres ou alcalins contrairement au PEG qui est soluble en milieu neutre et milieu basique ce qui favorise la diffusion de l'eau vers les réseaux polymérique contenant le PEG par rapport à ceux qui ne contiennent que le chitosane .

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

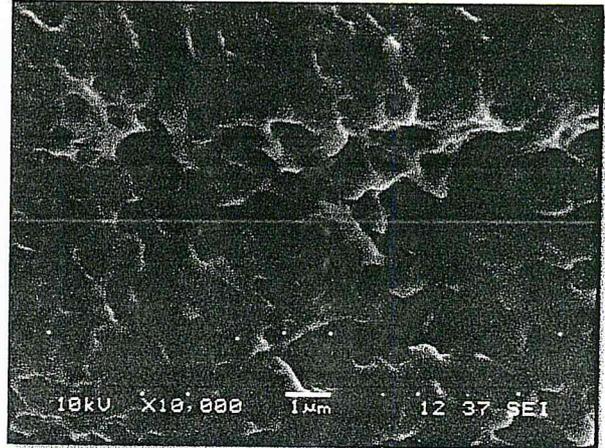
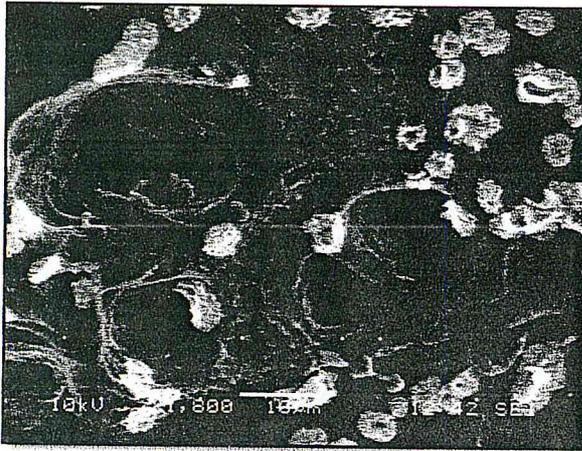
II.5 Effet du pH sur la morphologie des nanoparticules CS et CS-PEG réticulées par le TPPS

Afin d'étudier l'effet du pH sur la forme et la tailles des systèmes étudiés dans la partie (II-4), les mêmes systèmes sont stockés dans les milieux pendant une période un mois. L'analyse par MEB a donné les microphotographies données les figures ci-dessous.

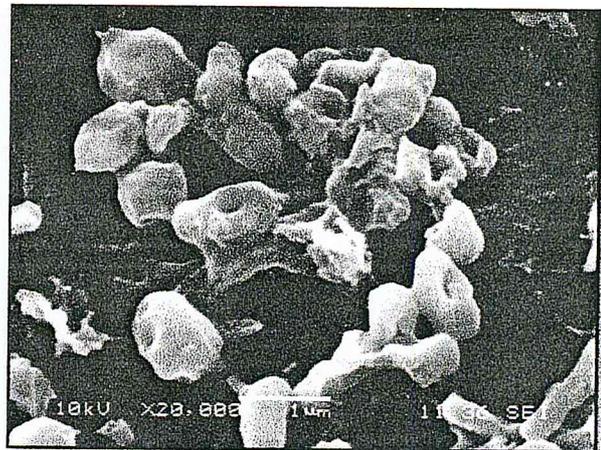
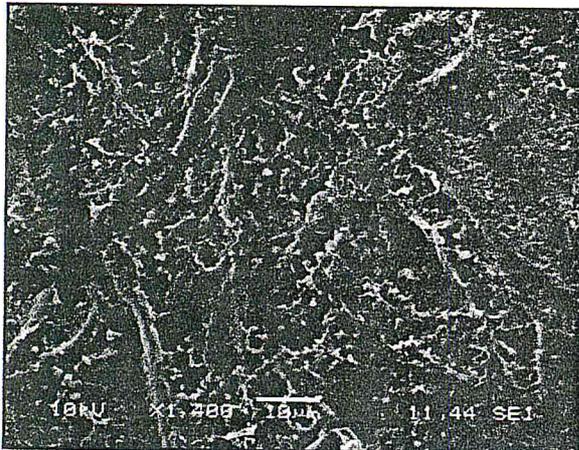
PARTIE EXPERIMENTALE

a) Effet du pH sur Np.CS

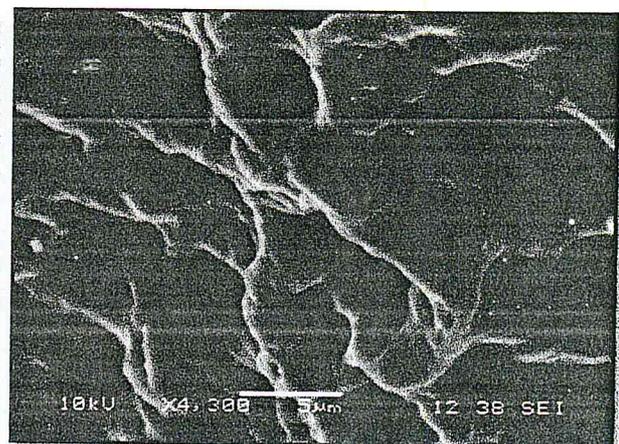
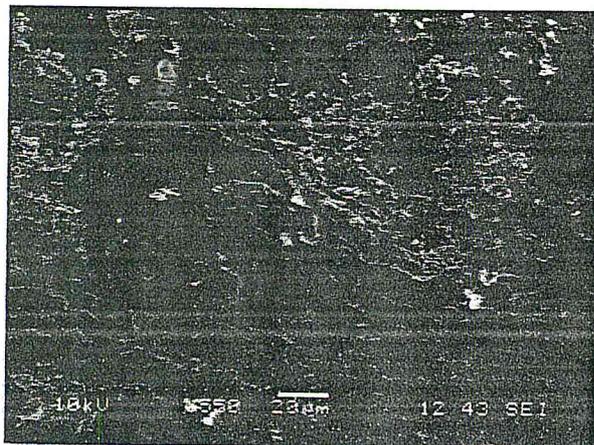
➤ Milieu acide



➤ En milieu neutre



➤ En milieu basique



Comme il est clairement observé sur les microphotographies, le pH des milieux de stockage touche non seulement la forme mais aussi la taille des nanoparticules du chitosane réticulées par TPPS.

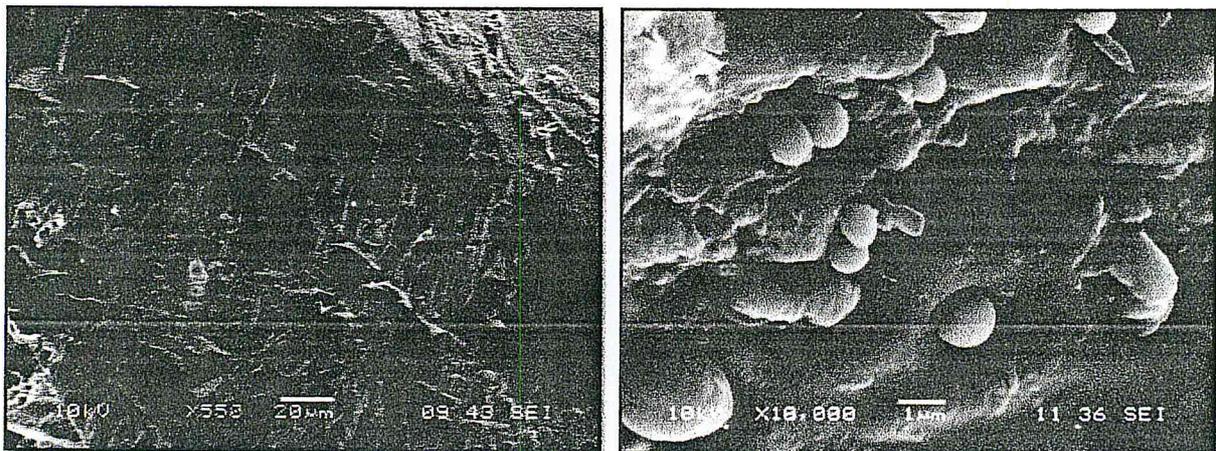
Dans le cas du milieu acide, la surface des films est d'un aspect spongieux avec apparition de nanosphères déposées sur la surface du film de forme d'un globule rouge d'une surface spongieuse et d'une taille de 800 nm et entre ses pores des nanoparticules plus petites de taille de 330nm ont été ainsi observées.

Dans le milieu neutre, la surface du film est plutôt rugueuse sur laquelle de nanoparticules d'une forme d'un globule rouge et d'une surface lisse et de taille de 500-750nm.

En milieu basique, la surface du film est devenue fortement poreuse et d'un aspect spongieux et au sein de ces pores on observe des nanoparticules de forme sphérique de taille d'environ de 380-600 nm.

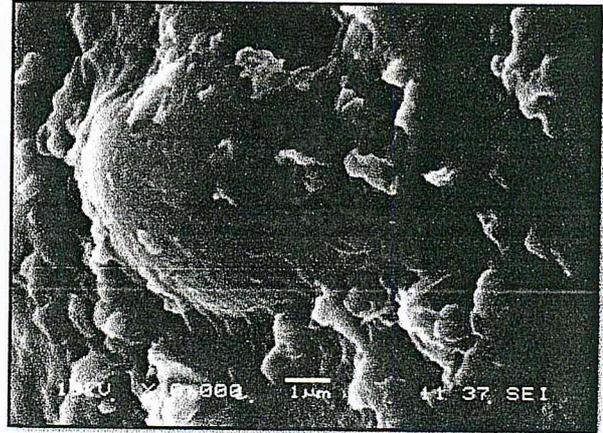
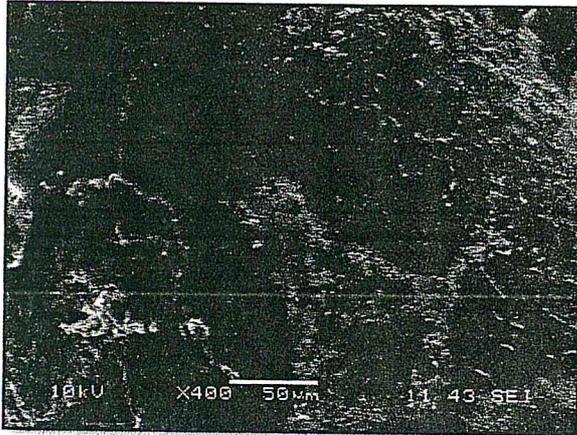
b) Effet du pH sur Np.CS-PEG

➤ En milieu acide

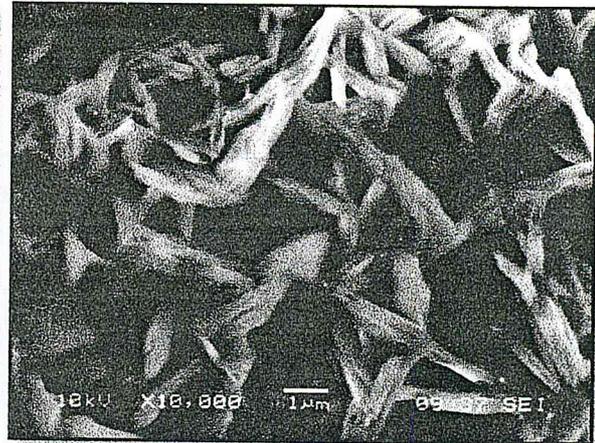
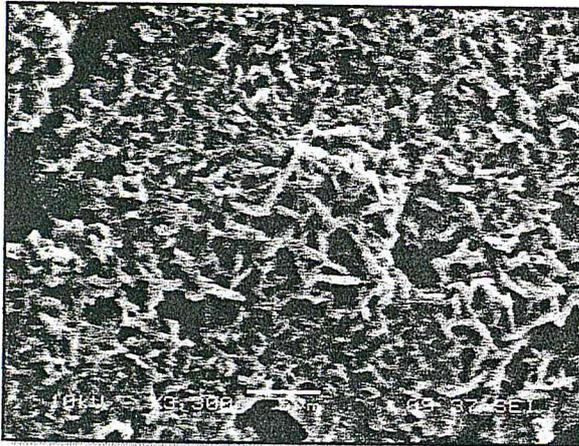


PARTIE EXPERIMENTALE

➤ *En milieu neutre*



➤ *En milieu basique*



Comme il était attendu, le pH avait aussi un effet sur la taille et la forme des nanoparticules du système mélange des Np.CS-PEG.

En milieu acide, la surface du film des nanoparticules est poreuse d'un aspect spongieux au sein de ces pores de petites billes, d'une surface lisse et de taille de 500 nm jusqu'à 2,5µm.

En milieu neutre, la surface du film est plutôt rugueuse sur laquelle des petites particules sont déposées d'une de quelques centaines de nanomètre.

En milieu basique, la surface du film a un aspect rocheux et avec un agrandissement ces roches contiennent des aiguilles d'une longueur de 2-4 µ et de largeur de 300nm et entre ses aiguilles de nanopores sont aussi observés.

PARTIE EXPERIMENTALE

II.6 Etude de la libération prolongée in vitro du principe actif encapsulé dans les nanoparticules du chitosane/ β -CD dans le SGF

Le but de ce test est d'étudier la cinétique de libération de la m-THPP comme agent thérapeutique dans des conditions biomimétiques (simulant les conditions physiologiques gastrique, SGF)

Les nanoparticules formées du chitosane et la β -CD ont été placées dans un récipient, auquel 20 ml de la solution SGF est ajouté. Le récipient fermé est mis dans un incubateur à 37°C. Les prélèvements sont effectués chaque 2h puis 8h, puis chaque 24h.

Les concentrations de m-THPP libéré sont mesurées par une méthode colorimétrique en utilisant la spectrophotométrie UV-visible. Ces tests ont été réalisés au sein du laboratoire de recherches LCPMM au département de chimie, faculté des sciences, université de Blida en utilisant un spectrophotomètre (SHIMADZU 1700). Le dosage est effectué à une longueur d'onde de 421 nm d'après une courbe d'étalonnage préalablement établie, comme il est montré ci-dessous.

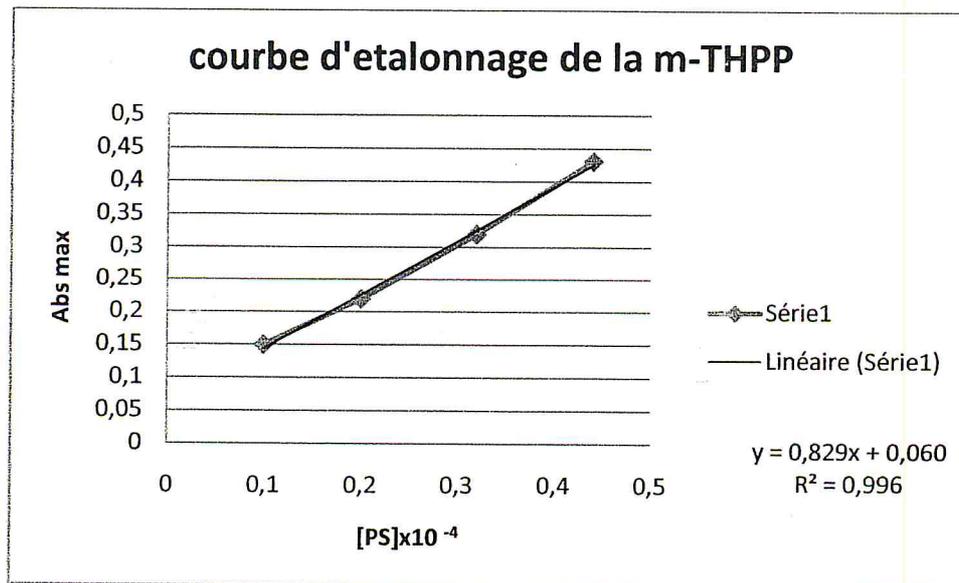


Fig.II-18 la courbe d'étalonnage de la m-THPP à 421 nm

PARTIE EXPERIMENTALE

Le principe actif est dispersé au sein de la matrice polymérique sans être capable d'en sortir. Avec l'entrée du solvant, le polymère solide à l'état vitreux, se gonfle, le polymère passe à l'état caoutchouteux dans ce cas-là il a un aspect d'un gel. Avec la relaxation macromoléculaire associée à la transition à l'état caoutchouteux, le principe actif est alors capable de diffuser vers l'extérieur.

La figure ci-dessous représente la cinétique de libération in vitro du PS en fonction du temps à partir des nanoparticules de CS/ β -CD.

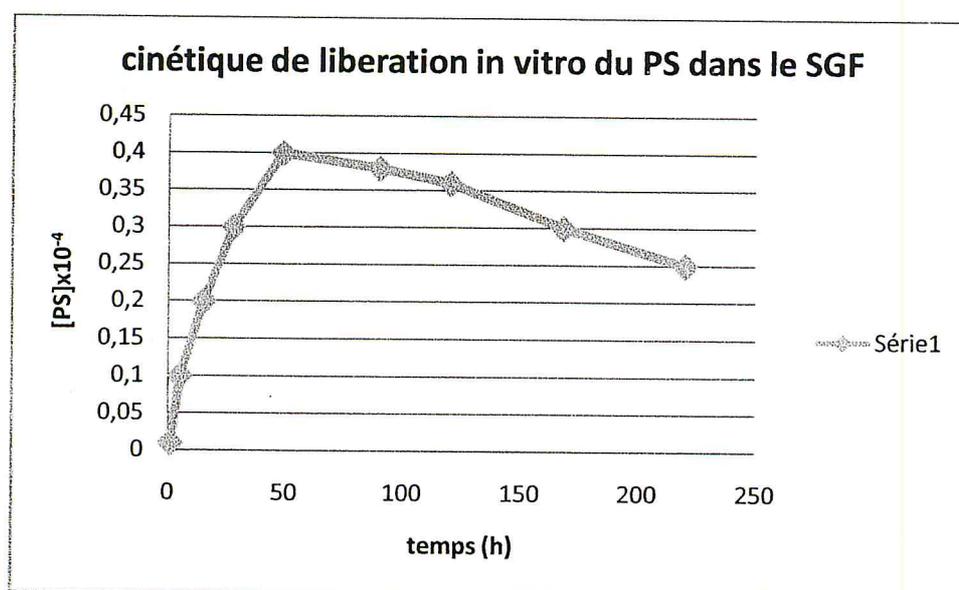


Fig.II-19 cinétique de libération de la m-THPP dans le SGF à partir des nanoparticules du CS/ β -CD réticulées par TPP

D'après les résultats obtenus on peut conclure que les concentrations du PS libérées sont importante dans les premières heures en atteignant la libération maximale avec une concentration de $0,4 \times 10^{-4}$ M après 48 h de stockage dans le SGF. Puis on remarque qu'il y a une diminution de la libération qui persiste jusqu'à la deuxième semaine.

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

Conclusion

Les résultats obtenus montrent que la préparation des films à base du chitosane par gélotion ionotropique est un simple procédé et facilement exécutable à l'échelle industriel, ce processus ne demande pas l'utilisation des produits nocifs ou toxiques et par conséquent la diminution des effets secondaires ce qui attire l'attention de plusieurs chercheurs dans différents domaine.

La réticulation d'un polymère cationique par les ions tripolyphosphate aliphatiques présente une distinction des propriétés physico-chimiques des films à base du chitosane.

Les films du chitosane modifiés par l'ajout des oligosaccharides ou par d'autres polymères ont montrés des propriétés très intéressantes qui leurs permettent d'être utilisés comme des agents de livraison spécifiés.

PARTIE EXPERIMENTALE

BIBLIOGRAPHIE

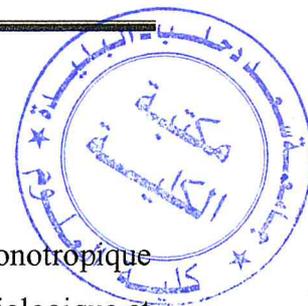
- [1] Subramanian, A., Rau, A. V., & Kaligotla, H. (2006). Surface modification of chitosan for selective surface-protein interaction. *Carbohydrate Polymers*, 66, 321–332.
- [2] Sun, Y., & Wan, A. J. (2007). Preparation of nanoparticles composed of chitosan and its derivatives as delivery systems for macromolecules. *Journal of Applied Polymer Science*, 105, 552–561.
- [3] Tiyaboonchai, W. (2003). Chitosan nanoparticles: A promising system for drug delivery. *Naresuan University Journal*, 11, 51–66.
- [4] Ravi Kumar, M. N. V. (2000). A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and Functional Polymers*, 46, 1–27.
- [5] Chen, S. C., Wu, Y. C., Mi, F. L., Lin, Y. H., Yu, L. C., & Sung, H. W. (2004). A novel pH-sensitive hydrogel composed of N,O-carboxymethyl chitosan and alginate cross-linked by genipin for protein drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 96, 285–300.
- [6] Lin, Y. W., Chen, Q., & Luo, H. B. (2007). Preparation and characterization of N-(2-carboxybenzyl)chitosane as a potential pH-sensitive hydrogel for drug delivery. *Carbohydrate Research*, 342, 87–95.
- [7] Mi, F. L., Shyu, S. S., Chen, C. T., & Lai, J. Y. (2002). Adsorption of indomethacin onto chemically modified chitosan beads. *Polymer*, 43, 757–765.
- [8] Zheng, Y. L., Yang, W., Wang, C. C., Hu, J. H., Fu, S. K., Dong, L., et al. (2007). Nanoparticles based on the complex of chitosan and polyaspartic acid sodium salt: Preparation, characterization and the use for 5-fluorouracil delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 67, 621–631.
- [9] Domszy, J. Q., & Roberts, A. F. G. (1985). Evaluation of infrared spectroscopic techniques for analyzing chitosan. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 186, 1671–1677.
- [10] X.Z. Shu, K.J. Zhul *International journal of pharmaceutics* 233 (2002) 217-225

PARTIE EXPERIMENTALE

- [11] EZZROUG K. (2011). Préparation et caractérisation des microparticules à base de système composite de biopolymère naturel chargés de molécules actives à usage pharmaceutique. Mémoire de magister en génie des procédés ,64.
- [12] BEN MIHOUB A. (2010). 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 de cancer par la thérapie photodynamique PDT. Mémoire de master en chimie moléculaire, 49.
- [13] Xu Y, Du Y. (2003) Effect of molecular structure of chitosan on protein delivery properties of chitosan nanoparticles. *Int J Pharm.*; 250: 215-226.
- [14] Knaul JZ, Hudson SM, Creber KAM. (1992) Improved mechanical properties of chitosan fibers. *J Appl Polym Sci.*; 1721-1731.
- [15] Yu, J. H., Du, Y. M., & Zheng, H. (1999). Blend films of chitosan/gelatin. *Journal of Wuhan University (Nat. Sci. Ed.)*, 45(4), 440–444.
- [16] Y. Wu, W. Yang, C. Wang, J. Hu, S. Fu, *Int. J. Pharmacogn.* 295 (2005) 235–245.
- [17] Yen, M. T.; Yang, J. H.; Mau, J. L. 2009 *Carbohydr. Polym.*, 75, 15–21.
- [18] Lee S J, Kim S S, Lee Y M, (2000). Interpenetrating polymer network hydrogels based on poly(ethylene glycol) macromere and chitosan. *Carbohydrate Polymers*, 41(2): 197–205.
- [19] Rasool, N., Yasin, T., & Akhter, Z. (2008). Synthesis of carboxymethyl-chitosan/acrylic acid hydrogel using silane crosslinker. *e-polymers*, 142, 1–11.
- [20] Reis, A. V., Guilherme, M. R., Moia, T. A., Mattoso, L. H. C., Muniz, E. C., & Tambourgi, E. B. (2008). Synthesis and characterization of a starch-modified hydrogel as potential carrier for drug delivery system. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 46, 2567–2574.
- [21] Tager, A. (1972). *Physical chemistry of polymers* (pp. 331–334). Moscow: Mir Publishers.

Conclusion

CONCLUSION GENERAL



Cette étude comportait des méthodes relativement simples comme la gélation ionotropique pour la préparation de nanoparticules à base de chitosane, biopolymère d'intérêt biologique et pharmacotechnique incontestable. En effet, ces particules sont destinées à la vectorisation d'agents thérapeutiques.

Une libération du principe actif pendant une longue durée a été observée dans un milieu biologique simulé lorsqu'un système composite comportant une matrice de chitosane dopée au polyéthylène glycol et la β -cyclodextrine est utilisé. En effet, dans ce cas le principe actif visé dans cette étude pourrait être encapsulé dans la cavité de la β -cyclodextrine, qui elle, serait par la suite incluse dans la cavité (ou la matrice) polymérique que constitue le système chitosane ou chitosane-polyéthylène glycol.

En outre, il apparaît d'après les analyses morphologiques des particules, que la réticulation par le tripolyphosphate dans tous les systèmes préparés génère une certaine élasticité lorsque on les met dans un milieu biologique de pH variable. Dans une telle situation, la particule chargée peut subir des pressions raisonnables des tissus avoisinants sans être déformée et de la même manière, cette élasticité permet de diminuer le risque de traumatiser les tissus avoisinants par irritation, par friction ou par compression.

Bien que complexes dans leur composition, les systèmes étudiés dans ce travail méritent d'être mieux connus dans leurs propriétés physico-chimiques et leur comportement biologique car ils sont dénués de toute toxicité. On suggère d'entreprendre sur le sujet des travaux supplémentaires en mettant en œuvre des méthodes de caractérisation supplémentaires.