

MA-540-82-BA

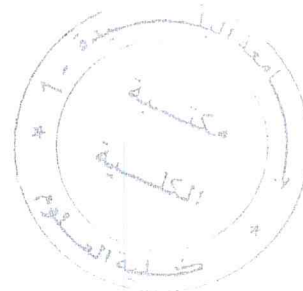
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITÉ SAAD DAHLAB DE BLIDA

FACULTÉ DES SCIENCES

DÉPARTEMENT DE CHIMIE



Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Master

Spécialité :

Chimie moléculaire des complexes métalliques

Option :

Chimie organique

Thème

**Développement de systèmes nano/microparticules à
base de chitosane pour la libération contrôlée**

d'oxytétracycline

RÉALISÉ PAR :

Amrouche Imene Sabrina

DEVANT LE JURY :

Président : R.Aiad

Maitre assistant .U.de Blida

Examineur : M.Zouikri

Maitre de conférence.U.de Blida

Directeur de mémoire :Y.Bal

Professeur. U de Blida

Blida, Octobre 2014

MA-540-82-1

Résumé :

Le développement de nanotechnologie a permis aujourd'hui de proposer l'idée de « vectorisation » des médicaments, dont les vecteurs sont des transporteurs capables de conduire une molécule à pénétrer dans une cellule alors qu'elle n'est pas captée spontanément par cette cellule.

Dans cette étude le chitosane est mélangé avec le TPP pour former un complexe polyélectrolyte de charge opposées grâce à la réticulation qui diminue la tendance du gonflement et améliore les propriétés spécifiques (élongation à la rupture, stabilité thermique).

Le but de ce travail est de synthétiser des micro/nanoparticules de chitosane vides, en suite les charger d'oxytétracycline.

Les systèmes préparés ont été caractérisés par MEB (étude de morphologie) et spectroscopie infrarouge FTIR. Par ailleurs une étude sur la cinétique de libération du principe actif in vitro a été entreprise avec l'aide du spectrophotomètre UV-Visible.

Les résultats obtenus à l'issue de cette étude montrent bien que les particules préparées à base de chitosane peuvent être un moyen potentiel (intéressant) pour le transport ou la vectorisation d'un antibiotique (OTC).

Mots clés : vectorisation, réticulation, chitosane, TPP, microparticules, nanoparticule.

المخلص:

تطوير تكنولوجيا النانو مكننا من اقتراح فكرة " السهم" للدواء، حيث أن هذه الأسهم عبارة عن ناقلات قادرة على قيادة جزيء لدخوله إلى الخلايا، بحيث لا يتم التقاطه بشكل عفوي من قبل هذه الخلية.

في هذه الدراسة يتم خلط مادة الشيتوزان مع مادة TPP لتشكيل مجمع متضاعف الكتروني ذو شحنات معاكسة بفضل التشابك الذي يقلل من ميل الانتفاخ و تحسين بعض الخصائص (الكسر عند الاستطالة، و الاستقرار الحراري)

الغرض من هذا العمل هو صنع ميكرو/نانو جسيمات فارغة من الشيتوزان، و من ثم نشحن الاوكسيتيتراكلين داخل هذه الجسيمات.

تم التأكد من خصائص الأنظمة المصنوعة بواسطة المكركوب الالكتروني بالمسح الضوئي (MEB) (دراسة المورفولوجيا) و التحليل الطيفي (FTIR)، و من جهة اخرى لدراسة حركية تحرير العنصر النشط في المختبر استعملنا التحليل الطيفي بالأشعة فوق البنفسجية (UV)

النتائج المتحصل عليها في هذه الدراسة تؤكد لنا ان الجسيمات المصنوعة بواسطة الشيتوزان تستطيع ان تكون فعالة في توجيه المضادات الحيوية مثل الاوكسيتيتراكلين.

كلمات المفتاح: التوجيه، التشابك، الشيتوزان، ثلاثي بولييرات فوسفات، ميكروجسيمات، نانوجسيمات.

Abstract:

The development of nanotechnology enables the company to offer the idea of "tracing" of drugs, whose vectors are carriers capable of driving a molecule to enter a cell when it is not received by this cell spontaneously.

In this study the chitosan is mixed with TPP to form a polyelectrolyte complex with opposite charge to the crosslinking which reduces the tendency of the swelling and improve specific properties (elongation at break, thermal stability).

The purpose of this work is to synthesize micro / nanoparticles of chitosan vacuum in the following charge of oytetracycline.

The prepared systems were characterized by SEM (study of morphology) and infrared spectroscopy FTIR. In addition, a study on the kinetics of release of the active principle in vitro was between taking with the help of UV-Visible spectrophotometer. The results obtained at the end of this study shows that the particles prepared using chitosan may be a potential average (interesting) for transport or vectorization of an antibiotic (OTC).

Keywords : vectorisation, cross-linking, chitosan, TPP, microparticles, nanoparticles

Remerciements

En terminant mon mémoire de fin d'études, je tiens à remercier en premier lieu le DIEU, le puissant de m'avoir accordé santé et courage pour accomplir ce modeste travail.

J'adresse mes vifs remerciements à tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin à élaborer mon cet ouvrage.

Je désire remercier mon promoteur monsieur Y. Bal pour sa patience, sa disponibilité et surtout ses judicieux conseils, qui ont contribué à alimenter ma réflexion.

Je voudrais exprimer ma reconnaissance envers l'ensemble des jury, pour l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail et pour avoir accepté de l'examiner.

Un chaleureux remerciement à tous mes professeurs qui m'ont enseigné durant mes études à la faculté des sciences.

Je remercie tous mes collègues d'étude, particulièrement celle de ma promotion.

Une grande part de mes remerciements va tout particulièrement à mes parents, qui ont toujours été là pour moi, ainsi mes frères pour leur encouragement.

Sommaire

Résumé

Remerciement

Tables des matières

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Introduction générale.....1

Partie : étude bibliographique

Chapitre I : généralité sur la vectorisation. 3

I.1. Introduction.....4

I.2. Définition de la vectorisation.....4

I.3. Les différentes générations de vecteurs.....5

I.3.1. Les vecteurs de première génération.....5

I.3.2. Les vecteurs de deuxième génération.....6

I.3.3. Les vecteurs de troisième génération.....7

I.4. Avantages de la vectorisation de médicament.....8

I.5. Elément constitutifs des vecteurs.....10

I.5.1. Les caractéristiques requises d'éléments constitutifs des vecteurs.....10

I.5.2. Classification des polymères.....10

I.6. Différents types de micro et nanoparticules.....11

I.6.1. Les microparticules.....11

I.6.2. Les nanoparticules.....12

I.7. Libération contrôlée d'un principe actif.....13

I.7.1. Définition.....13

I.7.2. Paramètres influençant la libération de principe actif.....16

Chapitre II : Chitosane.....17

II.1. Introduction.....	18
II.2. Structure de chitosane.....	18
II.3. Découverte.....	18
II.4. Caractéristique de chitosane.....	19
II.4.1. Degré de désacétylation.....	19
II.4.2. Masse moléculaire.....	20
II.5. Propriétés du chitosane.....	20
II.5.1. La solubilité	21
II.5.2. La viscosité.....	21
II.5.3. La structure cristalline du chitosane.....	22
II.5.4. Propriétés biodégradables.....	22
II.6. Interaction chitosane/TPP.....	23
II.6.1. Complexation.....	23
II.6.2. Effet de la complexation sur la libération de principe actifs à partir d'une matrice à base de chitosane/TPP.....	25
Chapitre III : Les antibiotiques.....	26
III.1. Généralités.....	27
III.2. Découverte des médicaments	27
III.3. Les modes d'action des antibiotiques.....	29
III.4. Critères de classification.....	30
III.5. Classes et familles d'antibiotiques.....	30
III.6. L'oxytetracycline.....	31
Partie : étude expérimental	
Chapitre IV : matériels et méthodes.....	35
IV.1. introduction.....	36
IV.2. caractérisation de chitosane.....	36
IV.2.1. La spectrophotométrie infrarouge à transformée de Fourier.....	36

IV.2.2.La mesure de la viscosité et détermination du poids mmoléculaire.....	36
IV.3.Préparation de microparticules de CS/TPP	37
IV.3.1.Préparation de microparticules CS/TPP vide.....	37
IV.3.2.Microparticules chargées d’oytetracycline.....	38
IV.3.3.Caractérisation des microparticules de CS/TPP et CS/TPP/OTC.....	38
IV.3.3.1.Caractérisation des microparticules par FTIR.....	38
IV.3.3.2.Aspect et morphologie de microparticules par le MEB.....	38
IV.3.3.3Etude de la dégradation thermique des microparticules.....	38
IV.3.3.4.Etude de gonflement.....	39
IV.3.3.5.Etude de la cinétique de libération.....	39
IV.4.Préparation de nanoparticules de CS/TPP et CS/TPP/OTC.....	40
IV.4.1Synthèse de nanoparticules de CS/TPP vide.....	40
IV4.2.Synthèse de nanoparticules de CS/TPP chargées d’OTC.....	41
IV.4.3.Caractérisation de nanoparticules.....	41
IV.4.3.1.Caractérisation par FTIR.....	41
IV.4.3.2.Aspect physique et MEB des nanoparticules.....	41
IV.4.3.3.La libération d’oytétracycline.....	41
Chapitre V : résultats et discissions.....	43
V.1.Caractérisation de chitosane.....	44
V.1.1.La spectroscopie infrarouge FTIR.....	44
V.1.2.La mesure de viscosité et détermination du poids moléculaire.....	44
V.2.Caractérisation de microparticules :.....	45
V.2.1.Par FTIR.....	45
V.2.2.Aspect et morphologie des microparticulespar le MEB.....	47
V.2.3.Etude de la dégradation thermique des microparticules	48
V.2.4.Etude de gonflement	49
V.2.5.Etude de la cinétique de libération du principes actifs.....	50

V.3.Caractérisation de nanoparticules.....	52
V.3.1.Par Spectroscopie infrarougeFTIR.....	52
V.3.2.Aspects physique et morphologie.....	54
V.3.3.Etude de la cinétique de libération.....	55
Conclusion.....	57

Référence

Annexe

Liste des abréviations.

ATG : analyse thermogravimétrique.

CS: chitosane.

DA : degré d'acétylation.

DD : degré de désacétylation.

FTIR : spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier.

g : gramme.

HCl : acide chloridrique

K : coefficient de Mark-Houwink.

M : masse molaire moyenne viscosimètre du polymère.

MEB: microscope électronique à balayage.

mg : milligramme.

MM : masse molaire.

ml : millilitre.

mol : mole.

MW : poids moléculaire.

nm : nanomètre.

OTC: oxytetracycline.

PA: Principe actif.

PBS: tampon phosphate salin.

PEG : poly(éthylène glycol).

PLA : poly(acide lactique).

PLGA : poly(acide lactile-co-glycolique)

RES: système réticulo-endothélial.

RMN : résonance magnétique nucléaire.

TPP: tripolyphosphate.

UV : spectroscopie ultraviolet.

μm : micromètre.

λ : Longueur d'onde.

η : viscosité.

.

Liste des tableaux

Tableau1 : la variation de la valeur du pH, et le pourcentage de protonation dans les motifs glucosamine constamment.....	24
Tableau2 : les différentes familles d'antibiotiques selon leurs modes d'action.....	30
Tableau3 : le tableau ci-dessus indique les paramètres de stabilité et le pourcentage de dégradation dans les expériences.....	50
Tableau4 : Bandes principales IR (cm-1) des nanoparticules CS et CS-PPT.....	53

Liste des figures.

Figure 1 : Génération de vecteurs de médicaments.....	8
Figure 2 : évolution de la concentration plasmatique du principe actif en fonction du temps avec ou sans vectorisation.....	9
Figure 3 : Représentation d'une nanocapsule.....	12
Figure 4 : Représentation d'une nanosphère.....	12
Figure 5 : Représentation d'un liposome.....	13
Figure 6 : représentation des différents profils de libération immédiate, prolongée et contrôlée.....	14
Figure 7 : Anion triphosphate, on a trois charges lorsque le pH est compris entre 3 et 5,5....	23
Figure 8 : formation de complexe à partir des liaisons ioniques entre les ammines chargées libres et les trois charges négatives du TPP.....	24
Figure 9 : les modes d'actions d'antibiotiques.....	29
Figure 10 : molécule d'oxytétracycline sous forme de chlorhydrate.....	32
Figure 11 : molécule d'oxytétracycline sous forme de dihydrate.....	32
Figure 12 : représentation schématique de la préparation de microparticules de CS/TPP par la méthode de coacervation simple.....	35
Figure 13 : variation de la viscosité réduite en fonction de la concentration de chitosane.....	43
Figure 14 : spectre FTIR de CS (a), de TPP (b), et de microparticules CS/TPP (c).....	46
Figure 15 : spectre FTIR d'OTC (A), CS/TPP (b), CS/TPP chargé d'OTC (c).....	47
Figure 16 : aspect des microparticules de CS/TPP.....	48
Figure 17 : image microscopique (MEB) de microparticule.....	48
Figure 18 : courbe de la dégradation thermique de microparticule de CS/TPP.....	49
Figure 19 : la courbe d'étalonnage de l'oxytétracycline à 353 nm.....	50
Figure 20 : Profils de libération obtenus à partir de microparticules de CS/TPP.....	51
Figure 21 : spectre FTIR de chitosane (a), tripolyphosphate(b), nanoparticules de CS/TPP (c).....	52
Figure 22 : spectre infrarouge FTIR de nanoparticules CS/TPP et nanoparticules CS/TPP/OTC.....	53
Figure 23 : aspect physique de nanoparticules.....	54
Figure 24 : image microscopique (MEB) de nanoparticules CS/TPP.....	54
Figure 25 : image MEB de nanoparticules de CS/TPP/OTC.....	55

Figure 26: profils de libération obtenus à partir des nanoparticules de CS/TPP55

Figure 27:représentation schématique d'interaction entre CS/TPP.....56

Toute substance ou compositions possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines ou animales est appelée médicament, ce dernier comporte plusieurs familles thérapeutiques, dont la plus répandue est la famille des antibiotiques.

Par définition un antibiotique est ce qui s'oppose à la vie, et qui est utilisé pour empêcher le développement de bactérie dans le corps humain, mais malheureusement ces antibiotiques ont divers problèmes comme tout médicament. Le premier point concerne les barrières biologiques qui séparent le site d'administration du site d'action ce qui peut conduire à des dégradations inutiles du principe actif. Le deuxième point inquiétant est en relation avec les effets secondaires qui peuvent augmenter lorsque on veut atteindre l'effet thérapeutique on en administre de grandes quantités de principe actif -c'est-à-dire augmenter la dose de celui-ci dans le médicament.

De toute évidence, les techniques actuelles d'administration et d'utilisation d'un médicament ne sont pas toujours très efficaces, pour cette raison les chercheurs continuent à chercher des voies meilleures et c'est ainsi qu'une vision nouvelle est apparue ; il s'agit de la « vectorisation ». Avec ce concept, le principe actif devrait être délivré directement au site affecté (malade) qu'il soit un organe, un tissu ou même la cellule.

Actuellement, la vectorisation fait intervenir des capsules à l'échelle microscopique ou nanométrique qui peuvent être formées spontanément à partir de longues chaînes moléculaires (polymère) d'origine naturelle ou synthétique.

Différentes méthodes ont été utilisées pour préparer des vecteurs à base de chitosane (biopolymère), la sélection de l'une des méthodes dépend de plusieurs facteurs tels que la taille des particules (micro ou nanoparticules), la stabilité chimique et thermique de l'agent actif, de la reproductibilité de la cinétique de libération de celui-ci, de la stabilité du produit final et de la toxicité résiduelle qui lui soit associée. La sélection de la méthode appropriée dépend aussi de la nature de la molécule active ainsi que du type du dispositif de délivrance (microcapsule).

Dans ce travail on s'intéresse au chitosane à cause de sa biocompatibilité ainsi que de sa structure chimique particulière qui permet d'entrevoir des capacités à interagir, de complexer, ou d'adsorber différentes sortes de molécules. On a utilisé le chitosane pour préparer des matrices qui ont pour but l'encapsulation du médicament par la technique de gélification

ionique. Cette méthode a attiré beaucoup d'attention car le processus est relativement simple et ne demandant pas de réactifs pouvant susciter des effets indésirables.

Le mémoire suivant comporte cinq chapitres. Dans les trois premiers nous avons cité de la bibliographie relative à la vectorisation, le chitosane et les antibiotiques. La rédaction des deux autres chapitres portait sur le travail expérimental effectué, notamment concernant la préparation des micro/nanoparticules de chitosane vides ou chargées d'oxytétracycline qui un antibiotique à large spectre, et la caractérisation des systèmes préparés dans la partie résultats et discussions.

Etude
bibliographique

Chapitre I

Généralité sur la vectorisation des médicaments

I.1. Introduction :

En médecine, il ne suffit pas de découvrir une bonne molécule, il faut aussi l'administrer pour qu'elle soit le plus efficace possible tout en ayant le moins d'effets secondaires.

Lors de l'introduction d'un médicament dans l'organisme, le principe actif rencontre des barrières naturelles qui peuvent limiter son efficacité. C'est ainsi que de nombreuses molécules peinent à traverser les membranes cellulaires, car elles sont trop hydrophiles ou ont un poids moléculaire trop élevé. Cela pose problème lorsque la cible d'un médicament se trouve à l'intérieur de la cellule. D'autres molécules, en particulier celles issues de biotechnologies, (peptides, fragments d'ADN...) sont très instables en milieu biologique car elles sont rapidement métabolisées par l'organisme, armé de ses enzymes et de nombreux systèmes de défense (anticorps...).

Par ailleurs, lors de son administration, un médicament est distribué au niveau des différents tissus et cellules en fonction de ses caractéristiques physicochimiques, lesquelles ne sont pas toujours maîtrisées.

Au lieu d'exercer sa fonction thérapeutique de manière ciblée, le médicament peut produire des effets toxiques imprévus, ce qui limite son **index thérapeutique** (qui cause une activité faible ou insuffisante et une toxicité plus importante).

Enfin, on observe de plus en plus de phénomènes de résistance, en particulier envers de nouvelles molécules, qui sont parfois trop spécifiques vis-à-vis d'une voie de signalisation.

Dans l'objectif d'améliorer l'efficacité thérapeutique de ces molécules on utilise des **vecteurs** pour encapsuler les principes actifs et les véhiculer vers leurs cibles biologiques.

I.2. Définition de la vectorisation :

Le concept de vectorisation des médicaments consiste à véhiculer une substance chimique biologiquement active du site d'administration vers le site actif. Cet adressage peut se faire de manière spécifique ou non, au moyen d'un vecteur hydrophile ou hydrophobe n'exerçant aucune action thérapeutique. Le vecteur permet au principe actif de franchir les barrières biologiques. Ces barrières sont des systèmes très complexes faisant intervenir plusieurs éléments (épithélium, endothélium, membrane cellulaire) et plusieurs composantes (barrières

Généralités sur la vectorisation de médicaments

mécaniques ou physico-chimiques et barrières enzymatiques). Ce sont les propriétés du vecteur et non celles du principe actif qui détermineront le sort du système *in vivo*.

Les enjeux de la pharmacie galénique moderne sont donc la mise au point de systèmes d'administration permettant d'assurer un ciblage de la substance active et un traitement moins agressif, une meilleure biodisponibilité, une mise à disposition progressive, et dans certains cas, d'améliorer le passage de différentes barrières naturelles dans l'organisme (barrière physiologique) tout en protégeant le principe actif, notamment face aux nombreuses enzymes de dégradations.

Critères essentiels pour leurs applications : transporter le médicament (vectorisation) à l'endroit où il sera utile donc son site d'action (ciblage)

I.3. Les différentes générations de vecteurs :

L'amélioration des procédés de vectorisation et la compréhension des phénomènes biologiques ont permis de développer différents vecteurs qui peuvent être utilisés en fonction des besoins. Il n'existe pas de vecteur universel, chaque problématique possède sa/ses propres solutions.

Ils peuvent être classés en 3 groupes appelés générations correspondants à l'évolution historique des recherches¹. Cette classification concerne surtout les systèmes colloïdaux de taille submicronique.

I.3.1 Les vecteurs de 1ère génération : Les vecteurs hépato-spléniques :

Ils correspondent à des particules de type liposomes et nanoparticules qui sont 70 fois plus petite que les globules rouges, ces particules sont constituées de polymère tel que le poly(acide lactique) (PLA) ou le poly(acide lactique-co-glycolique) (PLGA) « nu » c'est-à-dire qu'ils ne possèdent pas de groupements fonctionnels spécifiques en surface.

De fait, ces vecteurs sont généralement hydrophobes et présentent sur leur surface des groupements anioniques (carboxylates pour le PLA ou le PLGA).

Une fois injectés par voie intraveineuse, ils vont s'accumuler préférentiellement dans le système réticulo-endothélial (RES)

Dans la circulation sanguine, les liposomes rencontrent des opsonines (protéines cationiques présentes dans le sang) qui vont venir s'adsorber à leur surface par des interactions hydrophobes fortes, les opsonines confèrent aux liposomes un marquage du « non-soi », ils vont alors être reconnus par l'organisme comme des corps étrangers.

Les liposomes ainsi opsonisés pour suivent leur chemin dans la circulation sanguine.

Généralités sur la vectorisation de médicaments

Au niveau du foie, l'épithélium du vaisseau sanguin est discontinu. Autorisant le passage des liposomes, c'est au niveau de ces entrées que se trouvent les cellules de Kupffer. Les macrophages chargés de nettoyer l'organisme des corps étrangers, ces macrophages possèdent des récepteurs à leur surface qui reconnaissent les opsonines. Les liposomes opsonisés vont pouvoir se fixer aux récepteurs des macrophages et être ainsi internalisés. Au sein d'endosomes, par endocytose. Au fur et à mesure de leur avancées dans la cellule, les endosomes fusionnent et leur pH s'acidifie : les liposomes sont alors détruits, libérant le principe actif du médicament dans le macrophage. En fonction de ses caractéristiques physico-chimiques, ce principe actif diffuse à travers la membrane plasmique du macrophage il pourra alors atteindre les cellules hépatiques malade.

La taille des vecteurs est aussi un paramètre important : ils ne doivent pas être trop petits au risque d'être éliminés par les reins dont les pores mesurent quelques nanomètres de diamètre, ni trop gros car ils risqueraient de boucher les plus petits capillaires sanguins.

I.3.2 Les vecteurs de 2^{ème} génération : Les vecteurs furtifs :

L'adsorption des protéines plasmatique sur les vecteurs est un phénomène complexe gouvernée par plusieurs facteurs. L'hydrophobie et la charge des particules sont les principaux paramètres. En effet, de nombreuses études ont conclu, que plus la surface de ces vecteurs est hydrophobe, plus la quantité des protéines adsorbées est grande [1][2]. Les charges peuvent être attractives ou répulsives. Si la densité des charges est supérieure à une certaine limite, elles permettent d'accélérer l'adsorption par interaction électrostatique.

On peut limiter si non bloquer les phénomènes d'opsonisation et de phagocytose (pour avoir une bonne répartition du principe actif dans l'organisme et non une accumulation dans la sphère hépatique), en développant les vecteurs de première génération par modification de la surface de nanoparticules.

Cette étape est importante et consiste en une hydrophilisation de la surface de nanoparticules,

par un polymère amphiphile(ex poly(éthylène glycol) PEG). Ceci se fait le plus souvent par adsorption physique (interactions hydrophobes, liaison hydrogène ou interaction ionique). La fixation chimique de polymères hydrophiles consiste en un greffage de chaînes hydrophiles par liaisons covalentes à la surface des particules. Ce mode de fonctionnalisation est plus stable

De manière générale, l'hydrophilisation par des polymères non ioniques et flexibles permet d'obtenir une couche hydrophile à la surface des particules. On parle alors de « furtivité » des

Généralités sur la vectorisation de médicaments

vecteurs. Les molécules qui recouvrent la surface des particules vont induire un encombrement stérique qui va empêcher la reconnaissance du vecteur comme corps étranger.

Ceci est basé sur les travaux de Pierre Gilles de Gennes (prix Nobel de physique 1991) et son concept de répulsion stérique [3].

1.3.3 Les vecteurs de 3^{ème} génération : Les vecteurs à reconnaissance moléculaire

Les vecteurs de 2^{ème} génération permettent de contrôler la libération du principe actif, de diminuer le nombre de prise en prolongeant la durée de vie du médicament. Par contre, ces vecteurs ne permettent pas d'avoir un ciblage, ce qui est indispensable dans le cas d'utilisation des substances relativement toxiques tels que les agents de chimiothérapie.

Les vecteurs de 3^{ème} génération ont été développés dans l'optique de mettre au point de nanoparticules capables de véhiculer le principe actif jusqu'au site d'action désiré.

Ce concept permet de mettre en place un traitement ciblé avec les notions combinées de furtivité et de ciblage. Ces vecteurs se divisent en deux types : vecteurs de ciblage tissulaire ou cellulaire. Ces vecteurs sont obtenus en greffant sur des vecteurs de 2^{ème} génération des molécules (anticorps, ligands, ...) pouvant reconnaître un marqueur particulier présent à la surface de la cellule ciblée[4]. Une fois dans le corps humain, les particules vont être reconnues par les récepteurs de la membrane cellulaire via la formation d'un complexe ligand-récepteur. Toutefois il existe un équilibre difficile à trouver entre la furtivité nécessaire aux vecteurs pour qu'ils possèdent une durée de vie suffisante pour atteindre leur cible et la reconnaissance voulue. La quantité de ligand présent à la surface des particules doit être suffisante pour favoriser le ciblage, mais si elle est trop importante la furtivité peut être défavorisée surtout si le ligand est hydrophobe et/ou chargé négativement et donc les particules vont être considérées comme des vecteurs de 1^{ère} génération et être opsonisées de l'acide folique[5], des anticorps monoclonaux[6] ou des peptides[7] ont, entre autres, été greffés en surface de particules pour favoriser la reconnaissance avec un type cellulaire particulier.

Le ciblage actif d'un type cellulaire précis est obtenu grâce aux vecteurs de 3^{ème} génération. Il faut donc avoir suffisamment de connaissance des récepteurs présents à la surface des cellules pour favoriser l'accumulation des particules à proximité.

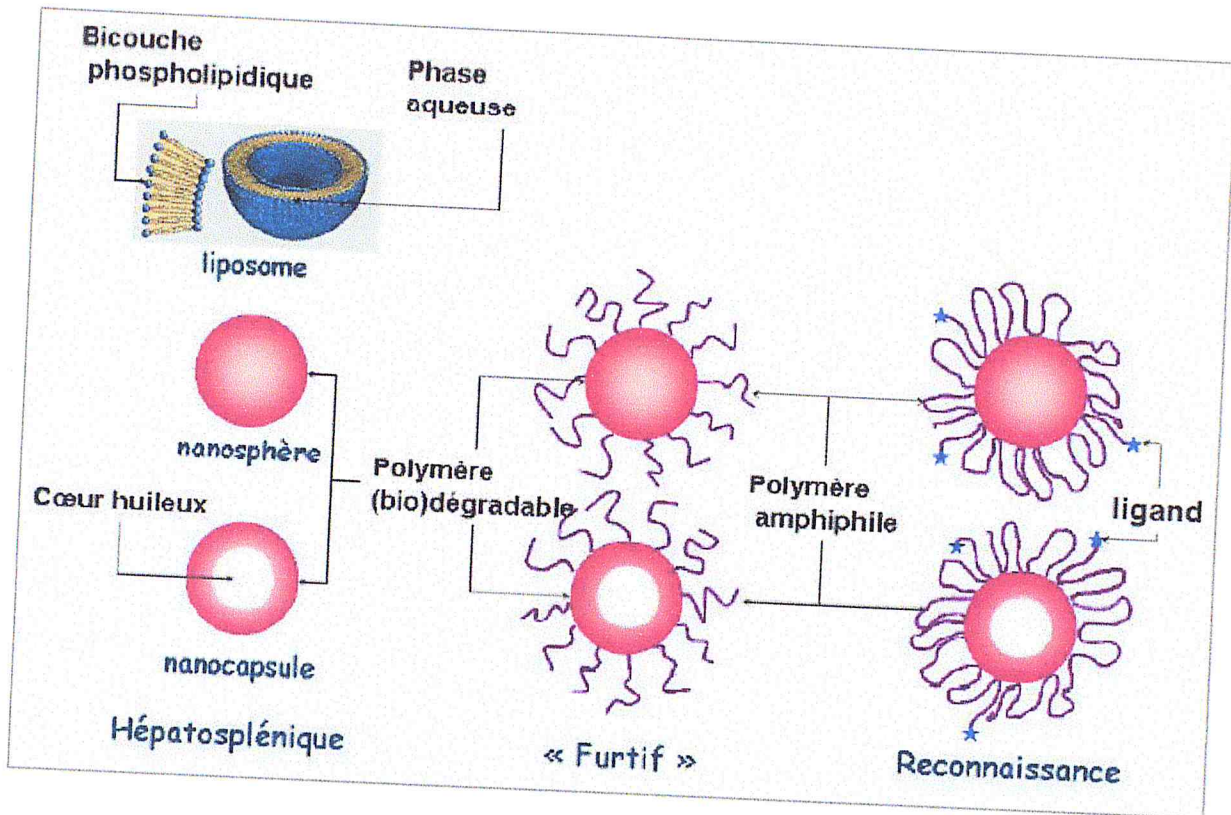


Figure 1 : Génération de vecteurs de médicaments.

I.4 Avantages de la vectorisation de médicaments :

La vectorisation de médicaments présente plusieurs avantages, certains ont été décrits précédemment. Les principaux bénéfices de ce concept sont énumérés ci-dessous :

La protection de la molécule encapsulée : la plupart de molécules biologiquement actives sont instables physico-chimiquement ou biochimiquement dans l'environnement biologique (pH, enzymes, protéines). Leur encapsulation dans des nanoparticules permet de les protéger contre l'inactivation chimique, enzymatique ou immunologique. De cette manière on peut améliorer les propriétés pharmacocinétiques de ces molécules, ce qui est utile si les principes actifs choisis sont à faible durée de vie *in vivo*.

- Réduction des effets secondaires non désirés : de nombreuse thérapie par voie intraveineuse en particulier le traitement du cancer, emploient des molécules toxiques. Alors qu'il est nécessaire d'en injecter des quantités importantes et/ou de répéter les injections pour obtenir un effet thérapeutique, ce qui peut provoquer des effets indésirables liés à la toxicité de la molécule. L'encapsulation de ces principes actifs dans des nanoparticules permet de transporter directement les médicaments vers leur cible. Evitant des phénomènes de métabolisme d'élimination ou de toxicité.

Généralités sur la vectorisation de médicaments

- Amélioration de la pharmacocinétique : Il s'agit de moduler les fluctuations de la concentration en principes actifs dans le corps humain afin qu'elle ne soit ni trop faible ni trop forte. En effet, pour qu'il puisse exercer son rôle, un PA doit être présent en quantité suffisante (au-delà du seuil d'efficacité minimum) sans toutefois dépasser son niveau toxique. Les injections de PAs dans l'organisme conduisent à une présence en quantité importante de celui-ci quelques instants après son administration puis à une diminution rapide de sa concentration, ce qui conduit à répéter les injections. L'emploi de particules permet de délivrer les PAs de manière prolongée, par diffusion ou par dégradation de la matrice, et donc de niveler sa concentration au fil du temps. Cette modification du profil pharmacocinétique est représentée par la figure

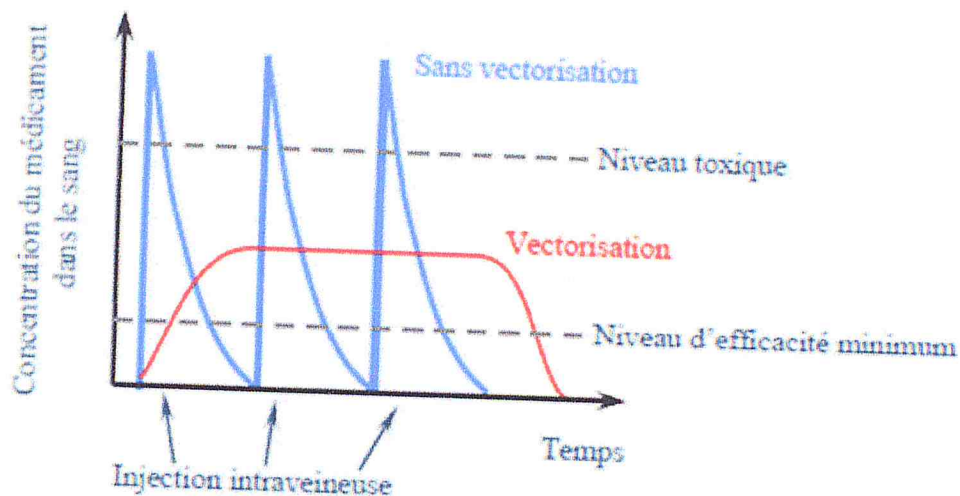


Figure 2 : évolution de la concentration plasmatique du principe actif en fonction du temps avec ou sans vectorisation.

- Ciblage thérapeutique (sélectivité de la libération) : dans certaines conditions, la vectorisation peut apporter un ciblage du médicament grâce à des ligands à la surface des vecteurs qui sont capables d'interagir avec des cellules cibles [8]. Ceci peut limiter la biodistribution des PAs au sein de l'organisme et favoriser l'accumulation des vecteurs à proximité de la zone à traiter donc réduire les effets secondaires indésirables au niveau des organes sains. Ainsi la sélectivité et la spécificité de ces particules vis-à-vis de la cible peuvent permettre d'améliorer l'efficacité du principe actif.

Généralités sur la vectorisation de médicaments

Grâce à cette possibilité de ciblage, le champ d'utilisation des nanoparticules dans le domaine biomédical est très vaste. Citons la délivrance de médicament (traitement ciblé), le transfert de gènes, l'imagerie, la destruction de tumeur (chimique ou hyperthermique).

I.5. Eléments constitutifs des vecteurs (polymères) :

I.5.1. Les caractéristiques requises d'éléments constitutifs des vecteurs :

- **Biocompatibilité** : les polymères qui rentrent dans la composition des vecteurs, doivent être biocompatible, non cancérogènes, non toxiques (absence de réactivité avec le tissu) non immunogènes ainsi que leurs produits de dégradation.
- **Masse molaire** : les polymères doivent présenter une masse molaire ne dépassant pas 60-70 KDa, pour qu'ils puissent passer le filtre glomérulaire, ceci pour les polymères à métabolisme rénal.
- **Élimination par voies naturelles.**

I.5.2. Classification des polymères :

On peut classer ces polymères selon différents critères. La classification la plus judicieuse est de les différencier selon leur origine, ensuite selon la structure chimique.

- **D'origine naturelle :**

les polymères naturels utilisés dans des applications médicales sont principalement de deux catégories, les protéines [9](albumine, gélatine) [10] et les polysaccharides (dextrane, alginate, chitosane, cellulose) [11] les polysaccharides sont les plus utilisés, car en général, ils sont biocompatibles, biodégradables, leurs produits de dégradation sont facilement éliminés par voie naturelle, ils sont également hydrophiles c'est pourquoi ils sont généralement utilisés pour constituer la couche hydrophile des vecteurs furtifs. Parmi les polysaccharides utilisés pour la vectorisation de médicaments, le dextrane est de loin le plus employé.

- **polymère synthétique :**

Dans la vectorisation de médicaments, les polymères synthétiques présentent certains avantages par rapport aux polymères naturels :

Généralités sur la vectorisation de médicaments

- Grâce à la très grande variété de monomères, la composition chimique des polymères et copolymères est largement modulable.
- En utilisant les méthodes de synthèse macromoléculaire appropriées, on peut obtenir le contrôle complet de la taille et de la distribution des masses molaires, on peut également élaborer des architectures définies.
- Par le biais de la chimie des polymères, les propriétés mécaniques, viscoélastique, ou tensioactives peuvent être relativement contrôlées.

Parmi ces polymères, on peut citer les polyesters aliphatiques (PGA, PLA), les dérivés de type méthacrylates (PMMA), le polyalkylcyanoacrylate (PACA) et le polyoxyd'éthylène.

*Les polyesters aliphatiques ont été très largement étudiés pour leur biocompatibilité et leur capacité à être bio-dégradés in vivo.

I.6. Différents types de micro et nanoparticules :

I.6.1. Les microparticules :

- **Les microsphères** sont des systèmes sphériques, ces derniers sont des réseaux macromoléculaires ou lipidiques continus formant des matrices dans lesquelles se trouve la matière active finement dispersée, à l'état de molécules, de fines particules solides ou encore de gouttelettes de solutions (**Richard et Benoit, 2000**).
- **Les microcapsules** sont des systèmes réservoirs composés d'une écorce polymérique piégeant un cœur liquide, solide ou gazeux [13]

Par rapport aux microsphères, ces particules ont une grande capacité d'encapsulation et sont par contre plus fragiles et moins stables.

Les systèmes d'encapsulation ont une distribution de taille qui varie de quelques nanomètres à un millimètre. Les principaux facteurs affectant la taille ainsi que les propriétés physico-chimique (porosité, état de surface, potentiel zêta) des particules, sont des facteurs liés à la formulation et au procédé mis en œuvre.

Selon les applications, les microparticules sont conçues pour libérer de manière déclenchée ou continue l'espèce encapsulée. Généralement, les systèmes à libération déclenchée sont

Généralités sur la vectorisation de médicaments

capables de libérer brutalement leur contenu par éclatement de leur membrane. L'éclatement est alors provoqué par une contrainte du milieu extérieur, pression mécanique ou osmotique, variation de température ou de pH. A l'inverse, les systèmes à libération continue sont réalisés à l'aide de systèmes matriciels dont l'espèce est capable soit de diffuser à travers la matrice (loi de Fick) soit d'être libérée par dégradation ou dissolution de la matrice.

I.6.2. Nanoparticules :

Il ya différentes sortes de nanoparticules :

- **La nanocapsule** : est une nanoparticule de type réservoir. Elle est constituée d'une mince paroi de polymère généralement biodégradable, dont l'épaisseur ne dépasse pas quelques nanomètres, entourant un compartiment huileux ou aqueux qui contient le médicament.

La taille d'une nanocapsule varie entre 100 et 200 nm.

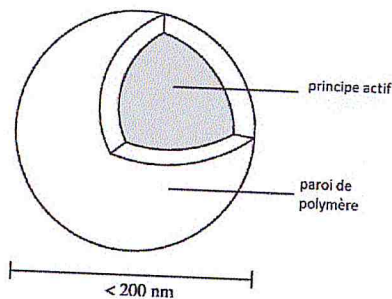


Figure 3 : Représentation d'une nanocapsule

- **La nanosphère** : est une nanoparticule constituée d'un polymère enchevêtré formant un réseau, ce polymère étant de préférence biodégradable. Le médicament est dispersé ou dissous dans la **matrice** polymère. Son principe actif sera libéré par simple diffusion vers l'extérieur ou à la suite de sa biodégradation dans l'organisme.

La taille d'une nanosphère varie entre 100 et 200 nm.

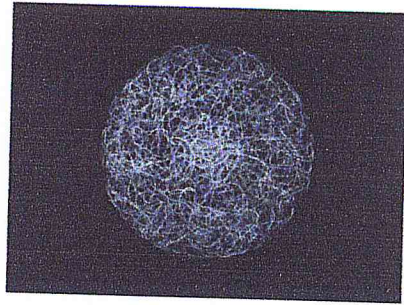


Figure 4 : Représentation d'une nanosphère

- **Les liposomes** : sont des capsules constituées d'un noyau interne aqueux et entourées d'une membrane lipidique. Ils se forment par les propriétés de leur membrane lipidique (en général des phospholipides) dont la molécule bipolaire est formée d'une extrémité hydrophile et une hydrophobe. Ainsi ces capsules organiques peuvent contenir dans leurs noyaux aqueux des molécules pour traiter les cellules malades. On parle alors de vectorisation, c'est-à-dire administrer des médicaments à la cellule malade le tout en évitant de répandre le traitement sur les cellules saines.

La structure phospholipidique du liposome est proche de celle de la membrane de la cellule : on dit que le liposome est biomimétique.

Un liposome est environ 70 fois plus petit qu'un globule rouge. Sa taille varie entre 100 et 300 nm

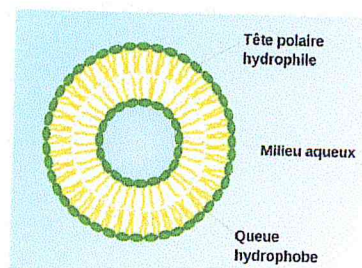


Figure 5 : Représentation d'un liposome

Les liposomes sont déjà développés dans différents secteurs tel la médecine, les cosmétiques. Le CNRS (Centre National de la Recherche Scientifique) a classifié 3 différents types de liposomes: Les liposomes de première génération, Les liposomes de deuxième génération, Les liposomes de troisième génération.

I.7. Libération contrôlée d'un PA :

I.7.1. Définition :

Par définition, le rôle d'un système à libération contrôlée est de délivrer la bonne quantité d'un PA, au bon endroit et au bon moment. La libération contrôlée appelée aussi programmée ou soutenue est une libération prolongée et constante dans le temps ; elle présente un profil qui correspond à une cinétique dite d'ordre zéro [14], indépendante du temps. En pratique les frontières ne sont pas bien définies entre libération prolongée, libération soutenue et libération contrôlée [15].

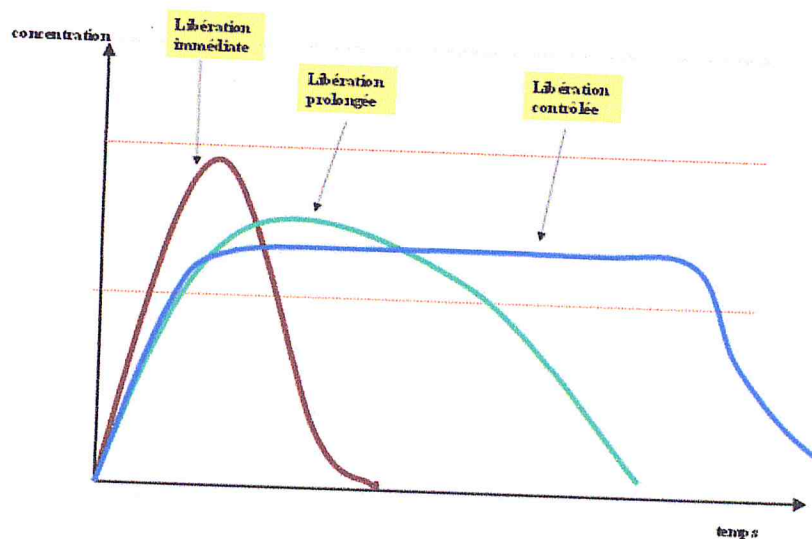


Figure 6: représentation des différents profils de libération immédiate, prolongée et contrôlée.

➤ Mécanismes de la libération contrôlée :

Les systèmes à libération contrôlée possèdent des exigences particulières au (x) matériau(x) impliquée (s), qui sont de nature polymérique sous forme de matériau plein ou d'une membrane (Guery, 2006).

I.7.1.1. **Systèmes à libération déclenchée** : sont généralement des microcapsules formées d'une membrane de faible perméabilité, qui vont libérer brutalement leur contenu.

Les mécanismes de la libération connus dans ce cas sont :

Généralités sur la vectorisation de médicaments

- **Mécanismes de libération par éclatement** : sous l'effet d'une pression (mécanique ou osmotique) ;
- **Mécanismes de libération par fusion** : sous l'effet de la température (Guery, 2006).

I.7.1.2. Systèmes à libération prolongée : sont majoritairement des microsphères (Guery, 2006) Les mécanismes mis en jeu sont :

- **Mécanismes de libération par dégradation** :

La plupart des polymères biodégradables se dégradent par hydrolyse en composés de taille de plus en plus faibles, biologiquement éliminables, dans certains métaboliques.

La dégradation peut s'effectuer selon une hydrolyse en masse, il est uniforme dans toute la matrice polymère ou bien se produire uniquement sur la surface du polymère.

- **Mécanisme de libération par diffusion uniquement** :

La diffusion se produit quand un principe actif traverse le polymère qui forme le système de libération. La diffusion peut se produire à l'échelle macroscopique à travers les pores dans la matrice ou à l'échelle moléculaire par le passage entre les chaînes de polymères (lois de FICK).

- **Mécanismes de libération par gonflement suivi d'une diffusion** :

La compréhension des mécanismes de gonflement des polymères dans l'organisme est importante pour permettre de concevoir la système particulier de libération contrôlée et permet d'expliquer les comportements cinétiques libération. Le PA est dissout ou dispersé au sein d'une matrice polymérique capable d'en sortir.

En premier lieu, le polymère ne subit aucune modification chimique, il n'est pas dégradé, l'eau diffuse simplement à l'intérieur du réseau polymère, le gonfle, ce qui permet aux médicaments piégés à l'intérieur de se libérer.

Les systèmes de libération contrôlés par gonflement sont initialement secs et quand ils sont placés dans le corps, ils absorberont l'eau ou autres fluides du corps et gonfleront. Ces système permettant la diffusion du PA à travers: le réseau gonflé dans l'environnement

Généralités sur la vectorisation de médicaments

externe .La plus part des matières utilisées dans ces système sont les hydrogels (absorbant de l'eau ou autres fluides sans être dissoudre).

La capacité du gonflement de polymère se manifeste quand le gonflement peut être déclenché par un changement de l'environnement entourant le système de la libération. Dépendant du polymère, le changement environnement peut impliquer le pH , la température, ou la force ionique, et le système peut se rétrécir ou gonfler sur un changement de n'importe lequel de ces facteurs environnementaux.

I.7.2. Paramètres influençant la libération d'un PA :

Les paramètres influençant sur la libération du principe actif sont :

- Solubilité du PA dans le milieu de libération et dans la paroi polymérique ;
- Taux d'encapsulation ;
- Interactions chimiques entre le PA et polymère ;
- Caractéristiques morphologique de système de libération (porosité, tortuosité, surface, forme) ;
- Caractéristiques de polymère tel que poids moléculaire (des études récentes montrent que les polymères de faibles poids moléculaires présentent une porosité plus élevée que d'autre, donc une libération plus élevée (**Igor et Mattiasson, 2008**)).

Chapitre II

Le chitosane.

II.1. Introduction :

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.

Le chitosane est très peu répandu dans la nature. Il n'est signalé que dans les exosquelettes de certains insectes comme les reines des termites et dans les parois cellulaires d'une classe particulière de champignons, les zygomycètes. Autrement, le chitosane est obtenu par désacétylation d'un polysaccharide largement répandu, la chitine qui est présente dans la carapace des crabes. Ce polysaccharide a été étudié, entre autres, par Desbrières [16] ou Ravi Kumar [17].

II.2. Structure de chitosane :

Le chitosane est un biopolymère cationique de glucosamine partiellement acétylé, sa structure moléculaire consiste en un enchainement linéaire composé de la distribution aléatoire de 2-acétamido-2-déoxy- β -D-glucopyranose et 2-amino-2-déoxy- β -D-glucopyranose liés en β (1 \rightarrow 4), c'est un polysaccharide tel la cellulose, cette macromolécule est produit par désacétylation chimique (en milieu alcalin) ou enzymatique de la chitine, Elle est la composante principale d'exosquelette des arthropodes (crustacés) ou de l'endosquelette ou de l'endosquelette des céphalopodes (calamards, ...), 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 [18].

Le terme chitosane est donné à tout copolymère, formé d'unités constitutives N-acétyl-D-glucosamine et D-glucosamine, dont le degré d'acétylation est inférieur à 50%.

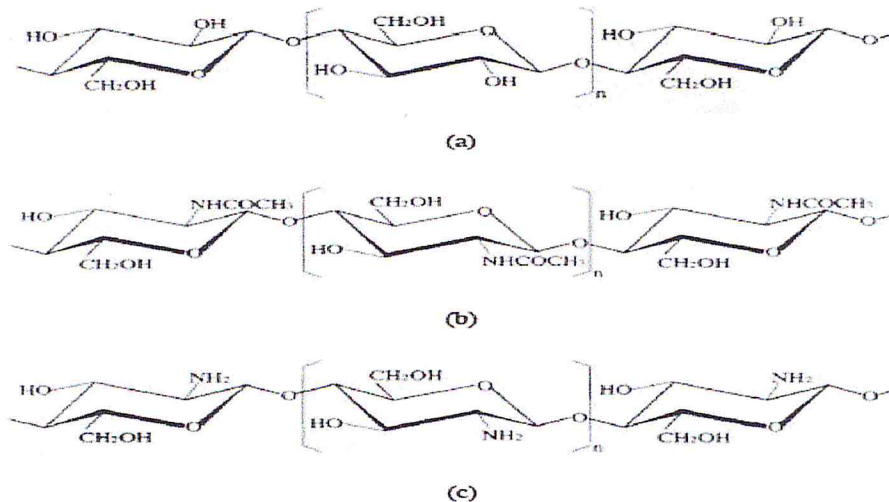


Figure 7 : Molécules de la cellulose (a), de la chitine (b) et du chitosane (c) [Okuyama (2000)]

II.3. Découverte :

La chitine a été découverte en 1811 par le professeur français Henri Baconnot (spécialiste en histoire de la nature) qui a isolé un résidu impur, à partir des parois cellulaires des champignons, il appela cette substance « fungine » en 1823.

Le chitosane a été découvert en 1859 par C. Rouget en traitant la chitine avec du KOH concentré à température élevée, le nom chitosane a été proposé par Hoppe-Seyler en 1894.

Les premiers brevets d'invention en chitine furent obtenus en 1935 par Ricardo sous le nom de chitine, ce n'est que dans les années 1970 que ces polymères ont suscité intérêt [19], quand les gouvernements américain et japonais ont cherché à valoriser ces déchets et ont lancé les premiers programmes de recherche.

Le chitosane est aujourd'hui produit commercialement à partir des déchets provenant de la transformation industrielle de champignons.

II.4. Caractéristiques du chitosane :

II.4.1. Degré de désacétylation :

En pratique la chitine et le chitosane sont considérés comme des copolymères de même structure chimique globale constitués d'unités N-acétyl-glucosamine, dont la répartition fixe le degré de désacétylation DD, ils ne se distinguent que par la valeur du DD. Le paramètre

DD est extrêmement important car il influence les propriétés des chaînes macromoléculaires des polymères et leur comportement en solution [20][21] à savoir :

- La solubilité du chitosane.
- La flexibilité des chaînes macromoléculaires.
- La conformation du polymère.

Et donc la viscosité des solutions.

Le degré désacétylation DD est le pourcentage d'unités désacétylées (unité glucosamine) par rapport au nombre d'unités totales (fraction molaire des unités désacétylées). Il est important de faire la distinction entre le degré d'acétylation DA et le degré de désacétylation DD dont l'un est l'inverse de l'autre, et sont reliés par l'équation suivante :

$$DD = 100 - DA\% \quad \text{equ 1.}$$

On préfère utiliser le % de désacétylation noté DD qui correspond à la quantité relative de groupements acétylés retirés à la macromolécule de chitine lors de la préparation du chitosane, sa structure est donc caractérisée par la présence de groupements amine et de groupements acétamides, auxquels il convient d'ajouter la présence de nombreuses fonctions hydroxyle qui confèrent un fort caractère hydrophile notamment au chitosane .

Le DD peut être déterminé par :

- Analyse élémentaire (analyse du % d'azote).
- Titrages potentiométriques ou conductimétriques.
- Diffraction de RX.
- Spectrophotométries infra-rouge à transformée de Fourier et UV.
- Résonance magnétique nucléaire RMN liquide ou solide.

La technique FTIR est la plus adaptée pour une caractérisation rapide et simple, et la technique RMN la plus précise, dès lors que le polymère est parfaitement soluble dans l'eau deutériée en présence d'acide chlorhydrique par exemple.

II.4.2. La masse moléculaire :

La seconde caractéristique importante est la masse moléculaire, en masse ou en nombre, ou mieux encore la distribution des masses moléculaires [22].

La détermination de la masse moléculaire, 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 du degré de rotation du plan de polarisation de la lumière ou de la diffraction de la lumière.

II.5. Propriétés du chitosane :

Le chitosan est un matériau non poreux ayant des surfaces spécifiques de l'ordre de quelques m^2/g à quelques centaines de m^2/g sous des formes physiquement modifiées. Ce produit est très stable quand il est sèche (en phase solide) et il a une conservation quasi infinie. Il est relativement fragile et se dégrade en phase liquide. Ce biopolymère est très réactif à cause de sa fonction amine primaire libre qui lui confère une forte densité de charges positives (transformation de NH_2 en NH_3^+ en milieu acide). Le chitosane peut 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 absorber. Ce comportement est essentiellement attribué :

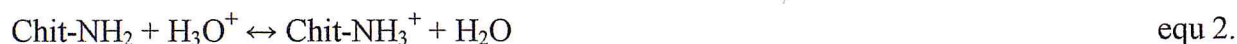
- Aux propriétés hydrophiles des chaînes macromoléculaires dues à la présence de nombreux groupements hydroxyles au niveau des unités glucose (possibilité de ponts hydrogène et de liaisons intra et/ou inter-macromoléculaires),
- A la présence de plusieurs groupes fonctionnels (hydroxyle, acétamide et amine) et à leur grande réactivité,
- Et à la structure flexible des chaînes de polymères qui pourra être modulée en fonction du pH et de la température.

II.5.1. La solubilité :

La détermination de la masse molaire nécessite la mise en solution du polymère, le chitosane est insoluble dans l'eau, les solutions alcalines concentrées ou diluées et dans les solvants organiques les plus courants, il est parfaitement soluble dans des solutions diluées (0,1%-1%) d'acide nitrique et chlorhydrique avec un pH entre 3 et 4, il est aussi soluble dans

les mélanges aqueux contenant par exemple 60% de méthanol ou 40% d'acétone. par chauffage, il se décompose sans fondre à partir de 185°C.

L'équilibre suivant décrit l'état d'ionisation du polyélectrolyte en solution :



pKa

Comme pour tous les polyélectrolytes, le pKa du chitosane dépend plus particulièrement du degré de neutralisation des groupes NH_3^+ auquel il est déterminé.

Il faut noter que la solubilité du chitosane est un paramètre très difficile à contrôler car la valeur du DD influence fortement sa solubilité. En général, on utilise du chitosane avec un DD supérieur à 70% pour augmenter sa solubilité, elle dépend aussi de la force ionique, du pH (pKa=6,3) de la nature de l'acide utilisé et de la distribution des groupes acétyles toute au long de la chaîne macromoléculaire.

D'après Pa et al, les chaînes de chitosane, dont le DD vaut 85%, sont flexibles pour des pH supérieur à 3 c'est le cas dans les applications biomédical.

II.5.2. La viscosité :

La détermination de la masse molaire du chitosan est liée à la détermination de la viscosité de se dernier. Il existe plusieurs méthodes pour déterminer le comportement viscosimétrique d'une solution de polymère, la plus adapter c'est la viscosimétrie capillaire qui consiste à déterminer la viscosité intrinsèque de la solution du chitosane, cette dernière nécessite de connaître les paramètres K et a de la relation de Mark-Houwink :

$$[\eta] = KM_v^a \quad \text{equ 3.}$$

Où M est la masse molaire moyenne viscosimétrique du polymère, k et a sont les coefficients de Mark-Houwink dont les valeurs sont respectivement $1,81 \cdot 10^{-3}$ mg/ml et 0,93 pour des solutions de chitosane préparées dans l'acide acétique. à 20°C. [Robert (1982)]. $[\eta]$ est la viscosité intrinsèque.

Certains problèmes peuvent apparaître lors de la mesure de la viscosité du chitosane. En effet, la présence possible de micro-gels ou d'agrégats favorisés par les liaisons hydrogène et hydrophobes, l'influence du vieillissement des solutions, et des effets électroniques (dus aux charges des groupes amines protonés) induisent des erreurs.

La viscosité du chitosane dépend de :

- Son degré d'acétylation : plus il est désacétylé, plus il y a de groupements amines libres, plus le chitosane est soluble et par conséquent sa viscosité est plus importante.[23]
- Sa concentration : la viscosité augmente en fonction de la concentration.
- La température : elle diminue lorsque la température augmente .[24]
- Le pH : plus il est bas, plus la viscosité est forte.
- Le poids moléculaire : la viscosité augmente en augmentant le poids moléculaire.[25]

II.5.3. La structure cristalline du chitosane:

La structure cristalline (ou structure d'un cristal) donne l'arrangement des atomes dans un cristal. Ces atomes se répètent périodiquement dans l'espace sous l'action des opérations de symétrie du groupe d'espace et forment ainsi la structure cristalline. Elle est complètement décrite par les paramètres de maille du cristal, son réseau de Bravais, son groupe d'espace et la position des atomes dans l'unité asymétrique la maille.

Le chitosane se cristallise dans le système orthombique. Il existe deux types de cristallinité du chitosane différents. Le type 1 du chitosane correspondant à un faible degré de désacétylation (60%) (sel de chitosane) est plus désordonné que le type 2. Celui-ci a un fort degré de désacétylation (90%) (Forme amine libre) [26]

II.5.4. propriétés biologiques :

Le chitosane est biodégradable, bioactif et non toxique, il est biocompatible, c'est-à-dire que sa présence dans un organisme entraîne des réactions inflammatoires et des réactions de rejet très limitées, il est bio-résorbables avec des cinétiques faibles et contrôler.

Le chitosane possède un caractère anthithrombogénique et hémostatique, il montre les propriétés cicatrisantes remarquables, il a également des propriétés inhibitrices sur la croissance de nombreux parasites et infections. Il a de plus de propriétés immunologiques, anti tumorales, antibactériennes, et antifongiques.

II.6. Interaction chitosane / tripolyphosphate :

II.6.1. Complexation :

Les interactions électrostatiques entre un polycation (polyelectrolyte dans ce cas le chitosane) et un polyanion (ion-multi-chargé dans ce cas le tripolyphosphate qui est utilisé

comme agent de pontage), donne naissance à des complexes intermoléculaires hydratés qui mûrissent à produire des gouttelettes coacervat.[27] [28], Il a été constaté que les particules de CS/TPP sont formées sous conditions spécifiques, et des transitions de coacervation spontanées étaient observées dans un ensemble distinct de conditions.

La complexation ionotropique est une méthode douce et ne nécessite pas de solvants organiques ou de réactifs de réticulation toxiques.

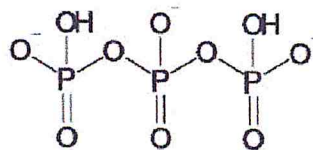


Figure7 : Anion triphosphate, on a trois charges lorsque le pH est compris entre 3 et 5,5.

Deux paramètres importants à considérer dans les interactions entre le TPP et chitosane sont la force ionique et le pH de la solution pendant la réaction de réticulation. La complexation est donc plus efficace lorsque les densités de charge des deux partenaires combinés atteignent un maximum.

En raison de la dépendance au pH, les valeurs de pKa des deux TPP et chitosane doivent être soigneusement prises en considération. Pour le chitosane le pKa des groupes amines est compris entre 4,5 et 8. Par conséquent, il est entièrement chargé positivement en dessous de 4, et totalement neutre au-dessus de 9 (car le degré de protonation de chitosane diminue rapidement à partir de 100% à 0%).[29]

Pendant ce temps, le nombre de charges et les espèces ioniques du TPP sont affectés par le pH de la solution. Dans l'original solution de TPP (pH 9,7), la concentration en ions tripolyphosphoriques ($P_3O_{10}^{5-}$ et $HP_3O_{10}^{4-}$) est élevée, mais la concentration des ions hydroxyde est également présente par conséquent ces ions hydroxydes peuvent réagir avec les groupes amino-protonés (NH_3^+) en raison de leur plus grande mobilité qui produit donc la neutralisation de la charge de la chaîne polymérique [30]. et la valeur minimale pour le TPP de posséder trois charges négatives est pH= 3.

pH	4	5	5,5	6	7	8	9
Degré d'ionisation de chitosane	0,995	0,953	0,863	0,666	0,166	0,020	0,002
Charge négative de TPP	3	3	3,1	3,9	4	4	4,9

Tableau 1 : La variation de la valeur du pH, et le pourcentage de protonation dans les motifs glucosamine constamment

à pH compris entre 4 et 5 les chaînes de chitosane adopte une plus grande conformation et forme un complexe avec le TPP, qui ne fournit pas des liens élastique croisés actifs. dont les liaisons entre les deux molécules peuvent être confirmée par spectroscopie infrarouge.

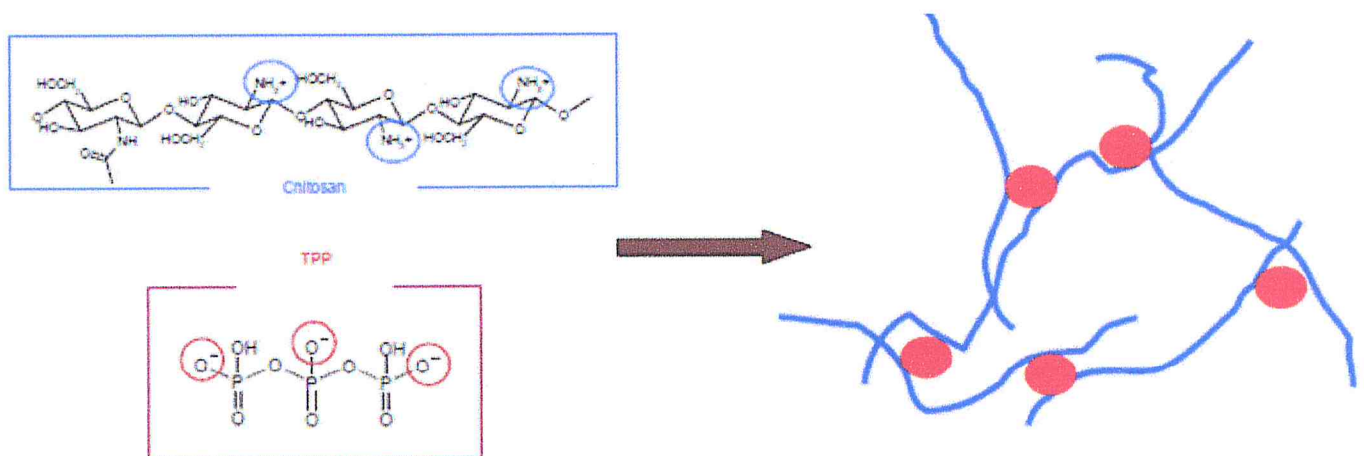


Figure8 : formation de complexe à partir des liaison ionique entre les ammines chargées libres et les trois charges négatives du TPP.

La densité de réticulation est un facteur major pour la stabilité, comportement de gonflement, et libération de médicament.[31]

II.6.2. Effet de la complexation sur la libération des principes actifs à partir d'une matrice à base de chitosane/ TPP :

La libération des principes actifs à partir d'une matrice dépend de : la concentrations de polymère d'agent de réticulation, caractéristiques chimiques (pour le chitosane MW et DD) , la densité de charge des molécules chargées, la viscosité, pH, la force ionique des solutions

dans lesquelles la matrice est immergé, le rapport de mélange [chitosane / PPT] et le degré de réticulation.

L'augmentation de la viscosité implique la formation de maille de chitosane / TPP dense, une densité élevée de réticulation et une faible capacité de gonflement avec une réduction consécutive de libération de médicament.

En outre, en maintenant la MW constante et en augmentant le DD impliquera une augmentation de la capacité de chargement, compacité supérieure et un retard dans la libération.

Ainsi, il a été démontré que le rapport [chitosane / TPP] est inférieur à (2) puisse favoriser le piégeage de macromolécules.

Dans l'étude avec des microparticules, le poids moléculaire élevé (500 g / mol) est choisi afin d'obtenir un niveau élevé de protéine de piégeage et à la réduction de l'effet d'éclatement.

— Chapitre III —

Les antibiotiques.

III.1. Généralités :

On appelle « antibiotique » toute substance chimique, quelle que soit son origine agissant de manière spécifique sur une étape du métabolisme des bactéries (antibiotiques antibactériens) ou des champignons (antibiotiques antifongiques); ces substances sont d'origine naturelle, semi-synthétique, ou synthétique. [32] Ils exercent leur action en des points précis (cible) de certaines des chaînes métaboliques des bactéries; ils provoquent leurs effets à faibles concentrations (mg/l) et relativement lentement (heures).

Les antibiotiques sont soumis dans l'organisme humain à un ensemble de processus d'absorption, de diffusion et d'élimination : pharmacocinétique; cet ensemble de processus confère des caractéristiques pharmacocinétiques (pic sérique, temps de $\frac{1}{2}$ vie, voie d'élimination, etc...) particulières à chacun des antibiotiques.

Un antibiotique a un spectre d'activité théorique (naturel) : avant tout emploi en thérapeutique il est d'une part actif sur un ensemble d'espèces bactériennes (souches sauvages sensibles) et d'autre part inactif sur un certain nombre d'espèces (souches sauvages résistantes); tous les antibiotiques n'ont pas le même spectre d'activité théorique : certains agissent sur un grand nombre d'espèces bactériennes, leur spectre est dit « large »; d'autres agissent sur un nombre restreint d'espèces bactériennes, leur spectre est dit « étroit ». Au cours de leur utilisation les antibiotiques sélectionnent les souches bactériennes qui leur sont résistantes : les unes leur sont naturellement résistantes (souches sauvages résistantes naturelles des espèces naturellement résistantes) et les autres leur sont devenues résistantes secondairement par acquisition de gènes de résistance (souches résistantes acquises) à la suite de modifications de leur génome par mutation ou transfert de gènes; cet effet sélectif modifie le spectre d'activité des antibiotiques : le spectre d'activité théorique d'un antibiotique est remplacé au cours des années par un spectre d'activité actualisé (celui qui est effectif au moment de la prescription)

III.2. Découverte des antibiotiques :

La découverte des antibiotiques a révolutionné l'histoire de la médecine en permettant de traiter de nombreuses maladies bactériennes mortelles comme la tuberculose, la pneumonie, la syphilis ou le tétanos.

Bien que l'on attribue officiellement la découverte des antibiotiques à l'écossais Sir Alexander Fleming, il ne fut pourtant pas le premier à étudier les effets de certaines moisissures et les phénomènes de compétition chez les micro-organismes.

Ainsi, dès 1877, Pasteur et de Joubert constatent l'injection de bactéries du charbon (*Bacillus -anthracis*) chez des animaux empêche le développement de maladies bactériennes.

C'est également à la fin du XIXe siècle, en 1897, que le médecin français Ernest Duchesne a présenté une thèse de doctorat intitulée " Contribution à l'étude de la concurrence vitale chez les micro-organismes : antagonisme entre les moisissures et les microbes".

Il y démontrait déjà l'interaction entre la bactérie *Escherichia coli* et la moisissure *Penicillium glaucum* (de la famille des pénicillines).

Pourtant, il fallut attendre près de trente ans pour que ces propriétés soient redécouvertes par hasard en 1928 par Sir Alexander Fleming.

Le 3 septembre 1928, le docteur Alexander Fleming de retour de vacances s'aperçut que certaines de ses cultures bactériennes dans des boîtes de Petri avaient été contaminées par des colonies de moisissures d'un blanc verdâtre.

Il s'agissait de souches d'un champignon microscopique, le *Penicillium notatum*, qu'utilisait son voisin de paillasse, un jeune mycologue irlandais, Charles J. Latouche.

Fleming s'aperçut qu'autour des colonies de moisissure, le staphylocoque qu'il cultivait ne s'était pas développé. Il émit l'hypothèse qu'une substance sécrétée par le champignon était responsable de ce phénomène et lui donna le nom de **pénicilline**. Il venait de découvrir le premier des antibiotiques.

Alexander Fleming fut le premier à suggérer que la moisissure *Penicillium notatum* synthétisait une substance antibactérienne et à isoler cette substance. Mais il ne fut pas le premier à utiliser ses propriétés et à permettre l'application thérapeutique de la pénicilline.

L'importance de la découverte de Fleming, ses implications et ses utilisations médicales ne furent comprises qu'**au début des années 1940**.

Alexander Fleming travailla pendant plusieurs années à essayer de purifier la pénicilline mais ce furent deux autres chercheurs qui y parvinrent en 1939 : le pharmacologiste **Howard Florey** et le biochimiste **Ernst Chain**.

A partir de 1942, les grandes firmes pharmaceutiques américaines commencèrent à produire de la pénicilline. Vers 1945, ce nouveau médicament était disponible dans toutes les pharmacies du pays.

La même année, Fleming, Florey et Chain reçurent le prix Nobel de médecine pour "la découverte de la pénicilline et ses effets curatifs de nombreuses maladies infectieuses".

Leurs Travaux ont en effet marqué le début des antibiotiques modernes et ont permis de faire un grand pas dans la lutte contre les maladies infectieuses.

On estime que les antibiotiques ont augmenté l'espérance de vie des personnes qui y ont accès d'environ 15 ans.

III.3. Le mode d'action des antibiotiques :

Les antibiotiques peuvent avoir 2 modes d'action:

- Les antibiotiques ayant une action létale (qui tue, qui détruit) sur les bactéries sont dites bactéricides (ou effet bactéricides) ; pour les champignons de telles substances sont fongicides.
- Les antibiotiques ayant une action inhibitrice (qui bloque) sur la croissance des bactéries sont dites bactériostatiques (ou effet bactériostatique) ; pour les champignons elles sont fongistatiques.

Ils peuvent agir sur 4 parties différentes de la structure de la bactérie:

- Sur la paroi bactérienne: inhibition de la synthèse de la paroi. Ces antibiotiques agissent donc sur des cibles extérieures de la cellule (paroi) et ne sont actifs que sur les germes qui sont en croissance. Les cellules au repos ne sont pas perturbées par l'action des antibiotiques et de leurs molécules.

Leur action peut être comparée à celle effectuée sur un ballon de baudruche: si on le presse en son centre, celui ci s'allongera jusqu'à un certain point, mais après il explosera.

De même, les antibiotiques bloquent la synthèse du peptidoglycane, la cellule s'allonge sans faire de paroi et ainsi explose sous l'effet de la pression osmotique interne. Les β -lactamines (une des familles d'antibiotiques que l'on verra plus tard) agissent suivant ce mode d'action.

- Pour d'autres, l'action se fait au niveau de la membrane cytoplasmique,
- Sur l'ARN des ribosomes en inhibant la synthèse des protéines
- Sur l'ADN bactérien en empêchant le métabolisme des acides nucléiques, soit en inhibant leur synthèse.

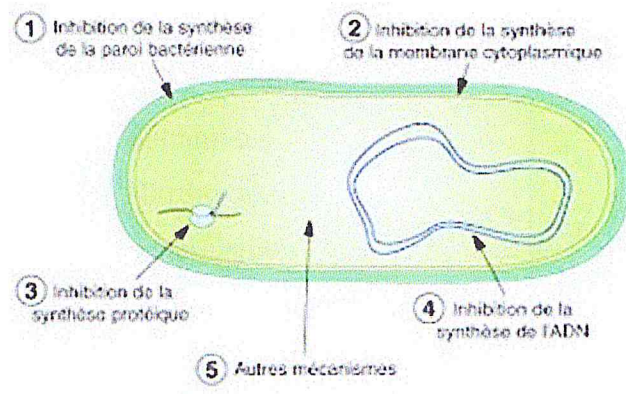


Figure9 : les modes d'actions d'antibiotiques.

III.4. Critères de Classification :

La classification des antibiotiques peut se faire selon :

- Origine : élaboré par un organisme (naturel) ou produit par synthèse (synthétique ou semi synthétique)
- Mode d'action : paroi, membrane cytoplasmique, synthèse des protéines, synthèse des acides nucléiques
- Spectre d'activité : liste des espèces sur lesquelles les antibiotiques sont actifs (spectre étroit ou large)
- Nature chimique : très variable, elle est basée souvent sur une structure de base (ex : cycle β lactame) sur laquelle il y a hémi synthèse.

La classification selon la nature chimique nous permet de classer les antibiotiques en familles (β lactamines, aminosides, tétracyclines.....etc.)

Nous adopterons la classification selon le mode d'action.

III.5. Classes et familles d'antibiotiques :

Il existe de nombreux antibiotiques, qui peuvent être classés en familles selon leurs modes d'action ou leur structure moléculaire :

tétracyclines, dans de l'eau (Milli-Q) sous condition lumineuse ne présente pas d'effet de dégradation en cinq jours (Halling-Sørensen et al., 2002b) et que la lumière n'était donc pas un facteur important de dégradation (Wu et Fassihi, 2005). La photolyse des tétracyclines dépendrait d'autres facteurs dont le pH et le taux initial de renouvellement d'oxygène (Wiebe et Moore, 1977). Des composés du groupe des tétracyclines sont sensibles à l'hydrolyse et aux réactions d'oxydation (Halling-Sørensen et al., 2002a). D'autre part, elles ont une certaine stabilité à travers une large gamme de températures (Budavary ed., 1996). Le maximum d'adsorption dans le sol se trouve à un pH de 4,3 ; elle diminue fortement à des pH au-dessus de 7 (Gu et al., 2007). Il a d'ailleurs été observé que la sorption de l'OTC sur les solides de rivière était plus faible à pH 8,3 qu'à pH 6,1 (Rose et Pedersen, 2005). La sorption peut s'expliquer par l'attraction électrostatique aux charges négatives du sol et/ou par l'échange de cations (Jones et al., 2005). Les antibiotiques peuvent migrer selon leur solubilité et leurs interactions avec la matrice. Du côté environnemental, la sorption des tétracyclines au sol est plus forte à pH acide. Dans un sol acide, la sorption peut diminuer avec la compétition cationique (TerLaak et al., 2006). L'ajout au sol de fumier enrichi en OTC a démontré une plus grande concentration en surface du sol (De Liguoro et al., 2003). Dans une étude environnementale sur les sols fertilisés avec du fumier, des concentrations de tétracyclines (TC) ont été retrouvées dans les couches 0-10 cm (86,2 µg/kg), 10-20 cm (198,7 µg/kg) et 20-30 cm (171,7 µg/kg) (Hamscher et al., 2002). La couche 30-90 cm et les eaux souterraines ne contiennent pas de quantité détectable (Hamscher et al., 2002). La contamination semble restée en surface. Dans le cas de la CTC, la translocation du fumier vers le sol minéral a été démontrée, à de faibles niveaux de concentrations (Aust et al., 2008). Dans les sols riches en matière organique, les tétracyclines sont susceptibles à migrer dans le profil de sol, car il y a une suppression de la sorption avec une plus forte concentration en acides humiques (Gu et Karthikeyan, 2008). Les facteurs influençant la sorption de l'OTC par le sol sont la texture, la capacité d'échange de cations et le contenu en oxydes de fer et d'aluminium (Jones et al., 2005 ; Thiele-Bruhn, 2003).

L'oxytétracycline est une molécule appartenant à la classe des tétracyclines, qui doivent leur nom à leur structure tétracyclique : noyau naphtacène-carboxamide. La 1ère tétracycline fut l'Auréomycine, élaborée par des champignons Actinomycètes : *Streptomyces auréofaciens* et doit son nom au fait qu'à un certain stade de son développement, le champignon donne naissance à un pigment jaune d'or.

On peut distinguer les tétracyclines :

- De première génération, obtenues par des procédés fermentaires : chlortétracycline, oxytétracycline, tétracycline, déméclocycline.
- De deuxième génération, obtenues par héli synthèse à partir des premières : doxycycline, minocycline.

L'oxytétracycline:(4S,4aR,5S,5aR,6S,12aS)-4-diméthyl-amino-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octanhyd ro-3,5,6,10,12,12a-hexahydroxy-6-méthyl-1,11-dioxonaphtacene-2-carboxamide, peut être commercialisée sous 2 formes :

- sous forme de chlorhydrate, de formule : $C_{22}H_{24}N_2O_9, HCl$,

De structure :

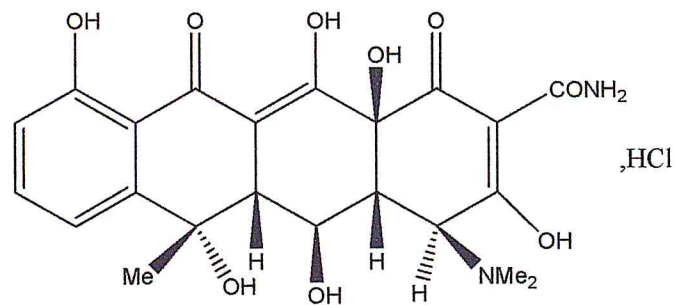


Figure10 : molécule d'oxytétracycline sous forme de chlorhydrate.

- sous forme de dihydrate, de formule : $C_{22}H_{24}N_2O_9, H_2O$

De structure :

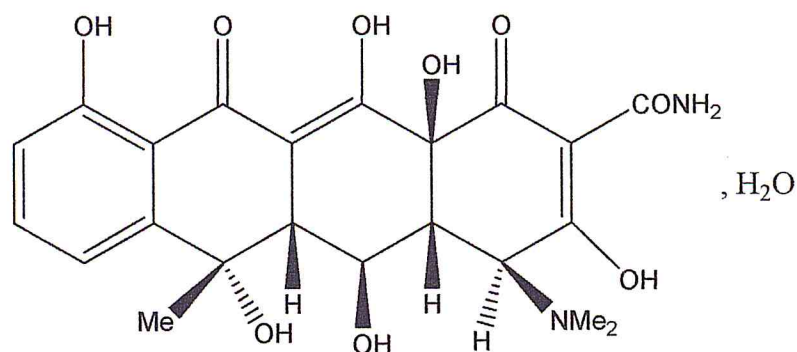


Figure11 : molécule d'oxytétracycline sous forme de dihydrate.

L'oxytétracycline se fixe de manière réversible aux protéines plasmatiques et est largement diffusé. On relève les plus fortes concentrations dans les reins, le foie, la rate et les poumons

(d'où l'importance du respect des délais d'attente). Elle fixe les ions métalliques et peut être de ce fait inactivé dans l'organisme d'où l'idée d'ajouter aux diverses formes des complexants.

L'oxytétracycline diffuse facilement dans le liquide céphalorachidien, elle franchit la barrière placentaire et entre dans la circulation fœtale. L'élimination se fait sous une forme inaltérée, plus de la moitié par voie urinaire.

**Etude
expérimental**

Chapitre IV

Matériel et méthodes.

IV.1. Introduction :

Dans ce travail on a étudié la formation des particules de chitosane, en présence d'un agent réticulant d'origine minérale (TPP tripolyphosphate de sodium). Il a été constaté que les particules sont formées uniquement sous conditions spécifiques. Ces particules ont été utilisées pour encapsuler l'oxytétracycline et contrôler sa libération in vitro. Les systèmes étudiés ont été caractérisés par spectroscopie infrarouge (FTIR) et microscopie électronique (MEB).

IV.2. Caractérisation de chitosane :

La masse molaire et le degré de déacétylation des chaînes de chitosane sont les principales caractéristiques pouvant agir sur la formation de micro/nanoparticules de chitosane.

Il y a plusieurs méthodes pour la caractérisation du chitosane dont les plus simples sont :

- La Spectrophotométrie Infrarouge à Transformée de Fourier (FTIR) pour la détermination de son degré de déacétylation.
- La viscosimétrie capillaire pour connaître le poids moléculaire en utilisant la formule de Mark-Houwink et Sakurada [33].

IV.2.1. La spectrophotométrie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) :

La spectroscopie infrarouge FT-IR est réalisée dans le but de déterminer le DD de chitosane, et cela dépend des bandes de références ; par exemple : la bande caractéristique de OH à 3450 cm^{-1} (Domszy & Roberts, 1985; Moore & Roberts, 1978, 1980), les bandes de C-H à $2870\text{-}2880\text{ cm}^{-1}$ (Dong et al., 2002; Miya et al., 1980; Sannan et al., 1978), les bandes de COC à 1030 cm^{-1} (Peniche, Elvira, & Roman, 1998; Shigemasa et al., 1996a, 1996b), les bandes de CH_2 à 1420 cm^{-1} (Brugnerotto, Desbrie`res, Heux, Mazeau, & Rinaudo, 2001b; Brugnerotto et al., 2001a).[34]

IV.2.2. La mesure de la viscosité et la détermination du poids moléculaire :

Les mesures ont été effectuées pour des solutions de chitosane de différentes concentrations (0,01 g/dl ; 0,015g/dl ; 0,02g/dl ; 0,025g/dl). Les solutions de chitosane sont préparées sous agitation magnétique dans les milieux aqueux 0,1M NaCl / 0,2M CH_3OOH .

On laisse les différents mélanges sous agitation pendant 3h à température ambiante (20°C-22°C), les solutions sont ensuite filtrées à travers un verre fritté de porosité 4 pour se débarrasser des impuretés qui se trouvent en solutions. Au cours de nos mesures on a utilisé un viscosimètre de type « VISCISIMETERS V10 ».

La viscosité intrinsèque de la solution diluée de chitosane est liée à la masse molaire moyenne viscosimétrique du chitosane par l'équation de Mark-Houwink :

$$[\eta] = K M_v^a \quad \text{equ3.}$$

IV.3. Préparation de microparticules de CS/TPP et CS/TPP chargée d'OTC :

IV.3.1. Préparation de microparticules de CS/TPP vide :

Les microparticules de chitosane sont préparées en utilisant la méthode de coacervation simple [35], la solution de chitosane a été préparée par dissolution de 0,1g de polymère dans 5ml de solution de 1% d'acide acétique aqueux qui a été agité pendant 4h pour produire une solution homogène et optiquement transparente (pH=4,1), en parallèle, une solution de TPP à 10% a été préparée dans l'eau distillé. Ensuite, la solution de chitosane (2%) a été égouttée à l'aide d'une seringue dans une solution de réticulation (solution de TPP à 10%), maintenue à 5°C dans un bain de glace, sous agitation continue pendant 45min. La phase surnageante (microparticules) est ensuite lavée par l'eau distillée froide. Les microparticules obtenues sont laissées sécher à l'air libre.

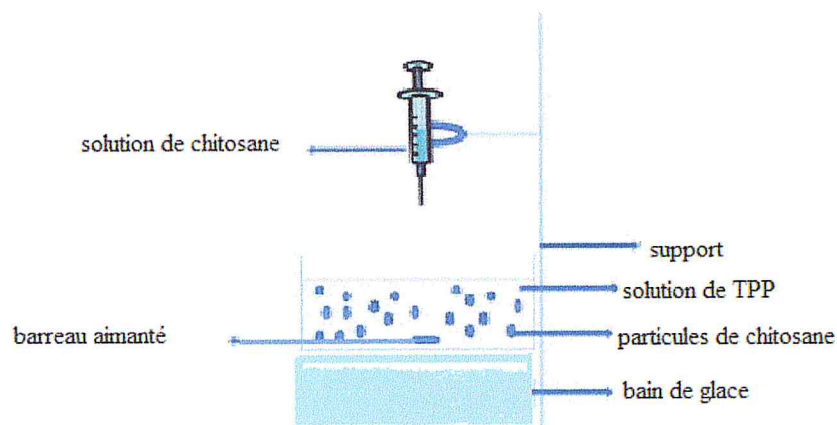


Figure12 : représentation schématique de la préparation de microparticules de CS/TPP par la méthode de coacervation simple.

IV.3.2. Microparticules de CS/TPP chargés d'oxytétracycline :

Pour préparer les microparticules chargés de médicaments, une masse d'OTC ($m=0,005g$) a été dissout dans une solution de chitosane préparée préalablement, il fallait maintenir sous agitation jusqu'à avoir une solution homogène. Ensuite, nous avons égoutté cette solution dans une solution de réticulation du tripolyphosphate à 10% sous agitation modérée pendant 45min dans un bain de glace. Les microparticules sont séchées à l'air libre et à l'abris de la lumière pour éviter une dégradation de l'OTC qui est photosensible

IV.3.3. Caractérisation des microparticules CS/TPP et CS/TPP chargé d'OTC :

IV.3.3.1. Caractérisation de microparticules CS/TPP par FT-IR :

Pour obtenir des informations sur la structure des microparticules nous avons effectué des analyses par FT-IR. Les spectres infrarouge étant discutés par comparaison avec ceux des polymères de départ et du réticulant.

Les spectres FTIR ont été enregistrés en utilisant un spectrophotomètre infrarouge (JASCO FT/IR-4100) à l'aide de pastilles de KBr.

IV.3.3.2. Aspect et morphologie des microparticules CS/TPP par MEB :

Les microparticules sèches obtenues par coacervation simple ont été caractérisées du point de vue morphologique par la microscopie électronique à balayage (MEB).

IV.3.3.3. Étude de la dégradation thermique des microparticules :

L'analyse thermogravimétrique (ATG) constitue un moyen utile pour la caractérisation de quelques produits du point de vue des propriétés thermiques. Cette technique apporte des informations utiles sur la stabilité thermique des produits de réaction, et surtout sur la température à laquelle commence leur décomposition thermique, les phénomènes irréversibles qui affectent leurs propriétés et limitent leur domaine d'utilisation. Dans le cas des biomatériaux, l'ATG est utile pour connaître les conditions de stérilisation (opération qui s'effectue aussi par voie thermique) afin de ne pas affecter leurs propriétés.

L'analyse thermogravimétrique (ATG) a été réalisée dans la gamme de température comprise entre 25 et 400 °C à une vitesse de 10°C min⁻¹ sous atmosphère de N₂ (g) en utilisant un appareil de type TGA-50 (SHIMADZU).

IV.3.3.4. Etude de gonflement :

Les complexes de chitosane/TPP ne sont résistants à des conditions fortement acides, ceux-ci en tendance à gonfler dans une solution de d'acide et de commencer à se dissoudre à un pH inférieur à 2,5. Pour mesurer la capacité de gonflement, les microparticules de CS/TPP sont pesées à l'état sec, et immergées dans des solutions différentes (qui ont des différentes valeurs de pH) de HCl 1M, les billes ont été laissées pendant 72 heures à la température de laboratoire, après sont filtrées et ensuite pesées.

La capacité de gonflement est quantifiée en pourcentage en utilisant l'équation de Gupta et Ravi Kuma (Kuma 2000)

$$S\% = \left(\frac{M_0 - M_t}{M_0} \right) \times 100 \quad \text{equ 4.}$$

S% : pourcentage de gonflement.

M_t : masse de la bille au temps t.

M₀ : masse de la bille sèche au temps t=0.

IV.3.3.5. Etude de la cinétique de libération du principe actif :

Les particules de CS/TPP chargés d' OTC a été dissoutes dans une solution de tampon phosphate salin PBS (pH = 6,8) à température T = 37±0,5°C, dans le but d'étudier la libération de principe actif. A la fin des intervalles de temps prédéterminés (0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8h) des volumes de 2 ml ont été retirés de chaque fiole et filtrés. En parallèle un volume égal sans médicament a été remplacé dans chaque fiole, pour maintenir un volume constant de milieu au cours des essais de libération.

Les échantillons ont été analysés par spectroscopie UV à λ= 353 nm.

L'absorption moléculaire dans le spectre ultraviolet (UV) et visible dépend de la structure électronique de la molécule. L'absorption d'énergie est quantifiée et résulte du passage des

électrons d'orbitales de l'état fondamental vers des orbitales d'un état excité d'énergie supérieur.

Une expression plus adéquate de l'intensité d'absorption est celle dérivée de la loi de Beer-Lambert, qui établit la relation entre l'absorbance, l'épaisseur de l'échantillon et la concentration des espèces absorbantes.

Cette relation s'écrit :

$$A = \log(I_0/I) = \epsilon b C \quad \text{equ 5.}$$

Avec :

A : Absorbance ou densité optique ;

I_0 : Intensité de l'énergie d'irradiation arrivant sur l'échantillon ;

I : Intensité de la radiation qui a traversée l'échantillon ;

ϵ : Constante caractéristique du soluté (coefficient d'absorption moléculaire ou d'extinction molaire : $\text{mol}^{-1} \cdot \text{l. cm}^{-1}$) ;

b : Longueur du chemin optique à travers l'échantillon (cm) ;

C: Concentration du soluté (mol.l^{-1}).

IV.4. Préparation de nanoparticules de CS/TPP et nanoparticules chargé d'OTC :

IV.4.1. Synthèse de nanoparticules de CS/TPP vide :

La solution de chitosane a été préparée par dissolution de 0,5 mg/ml de CS dans une solution de 1% d'acide acétique aqueux à 50°C sous agitation jusqu'à obtention de solution homogène et optiquement transparent (2h) avec un pH= 4.

Ensuite, des volumes de solution de 1mg/ml de TPP ont été ajoutés à des solutions de chitosane (0,5mg/ml) avec des rapports [CS/TPP]= (1,5 ; 2,5) (afin de déterminer les conditions optimales nécessaires à la formation de nanoparticules.), maintenues à 5°C par un bain de glace sous agitation magnétique, le pH des solutions est compris entre 3 et 5.

Les nanoparticules ont été isolées par ultracentrifugation (45000 RPM pendant 15 min), puis lavées par l'eau distillée chaude.

IV.4.2. Synthèses de nanoparticules de CS/TPP chargée d'oxytétracycline:

Pour charger le médicament dans les nanoparticules, une quantité connue d'oxytétracycline dissous dans l'eau (0,05mg/ml) a été ajoutée à une solution de nanoparticules (4ml) en utilisant un bain ultrason (FALC) jusqu'à ce que la solution trouble devient claire.

Les échantillons ont été conservés à température ambiante dans un endroit sombre pendant 4 jours pour l'encapsulation et l'homogénéisation du médicament libre.

Le médicament libre a été piégé à l'intérieur du noyau hydrophobe des nanoparticules.

L'absorbance d'oxytétracycline libre a été déterminée à l'aide de spectrophotomètre (SHIMADZU UV-1201).

IV.4.3. Caractérisation de nanoparticules de CS/TPP et CS/OTC/TPP:

IV.4.3.1. Caractérisation de nanoparticules par FTIR :

Les interactions entre les différentes composantes des systèmes nanoparticulaires ont été analysées par FTIR. Les spectres infrarouges des poudres d'échantillon, à savoir CS, OTC et TPP, et CS / OTC / PPT nanoparticules ont été enregistrés à l'aide d'un spectrophotomètre FTIR (JASCO FT/IR-4100). Avant l'essai, les échantillons ont été doucement moulus avec du KBr et comprimé sous forme de pastille.

IV.4.3.2. Aspect et morphologie des nanoparticules :

Les nanoparticules ont été analysées par le microscope électronique à balayage dans le but de voir leur morphologie.

IV.4.3.3. La libération d'oxytétracycline :

La cinétique de libération de médicament a été étudiée dans un milieu physiologiquement simulé : le tampon phosphate (pH = 7,4) qui imite le pH du sang.

Matériel et méthode

Un volume de 3ml de la solution de nanoparticules été introduire dans une solution de PSB, après des intervalles de temps régulières environ 3ml de cette solution était prélevée (on remplace à chaque fois les 3ml de cette solution par 3 ml de la solution de PBS).

Chapitre V

Résultats et discussions.

V.1. Caractérisation de chitosane :

V.1.5. La spectroscopie infrarouge FTIR :

FTIR est aussi l'une des techniques largement utilisées pour la détermination des taux de désacétylation (DD) de chitosane.

On utilise l'équation de Guinesi et Baxter pour déterminer le DD[36][37] :

$$DD\% = 100 - [(A_{1655} - A_{3450}) \times 155] \quad \text{equ6}$$

- A_{1655} = L'absorbance de la bande amide I.
- A_{3450} = L'absorbance de la bande d'hydroyle.
- ❖ La valeur de DD égale à 83,46%

V.1.2. La mesure de la viscosité et détermination du poids moléculaire :

Selon le solvant employé, le pH, le DD, la concentration de chitosane dissout, la température, les constante a et k ont différentes valeurs. Dans des conditions bien précises, on peut déterminer la masse moléculaire moyenne de chitosane.

La viscosité réduite, η_{red} de la solution diluée de polymère est reliée à la viscosité absolue (η)

$$\eta = \frac{\eta - \eta_s}{\eta_s C} = \frac{t - t_s}{t_s C} \quad \text{equ7.}$$

η_s : est la viscosité du solvant. C : la concentration en polymère.

t : temps d'écoulement d'un volume donné de la solution.

t : temps d'écoulement d'un volume donné du solvant.

Nous avons tracé sur la figure les variations de la viscosité réduite en fonction de la concentration en chitosane :

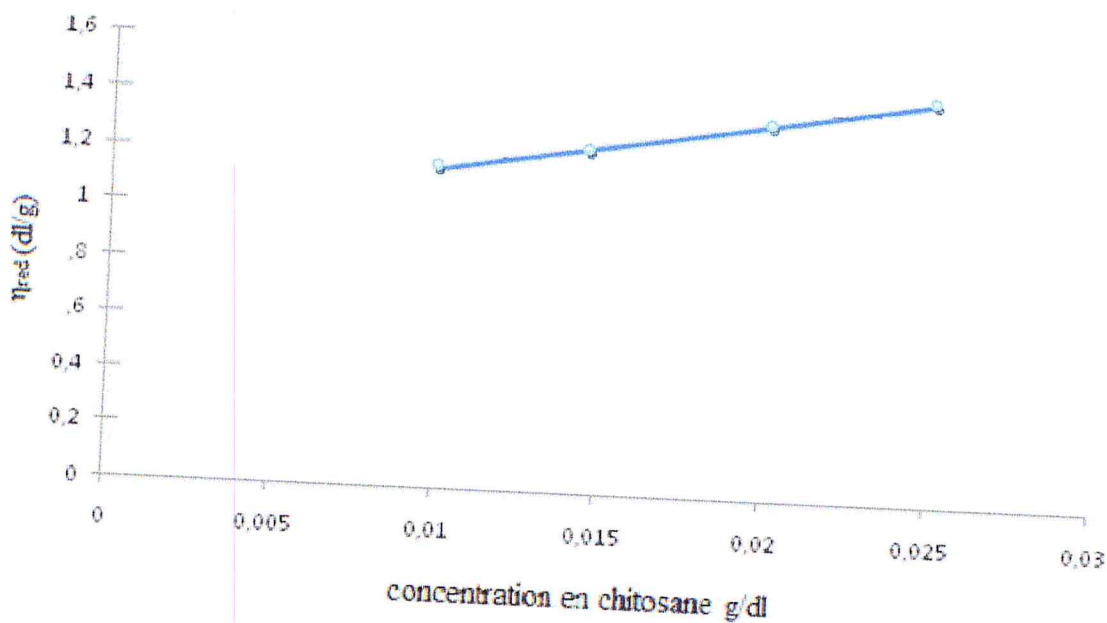


Figure13 : variation de la viscosité réduite en fonction de la concentration de chitosane.

La viscosité intrinsèque $[\eta]$ correspond à l'extrapolation linéaire de la viscosité réduite à concentration nulle.

$[\eta] = 1$ dl/g (ou bien 100dl/g) à $C = 0$ g/dl.

A partir de cette valeur et de l'équation de Mark-Houwink, on peut calculer la masse moléculaire moyenne du chitosane : $M = 127037,5$ g/mol, soit environ 127,0375 KDalton.

V.2. Caractérisation des microparticules de CS/TPP:

V.2.1. par FTIR :

La spectroscopie infrarouge consiste une méthode de choix pour déterminer les groupements chimiques caractéristiques de chitosane et des microparticules, nous pouvons aussi mettre en évidence l'apparition ou la disparition de certaines bandes de façon très significative lors de la formation de complexe (CS/TPP).

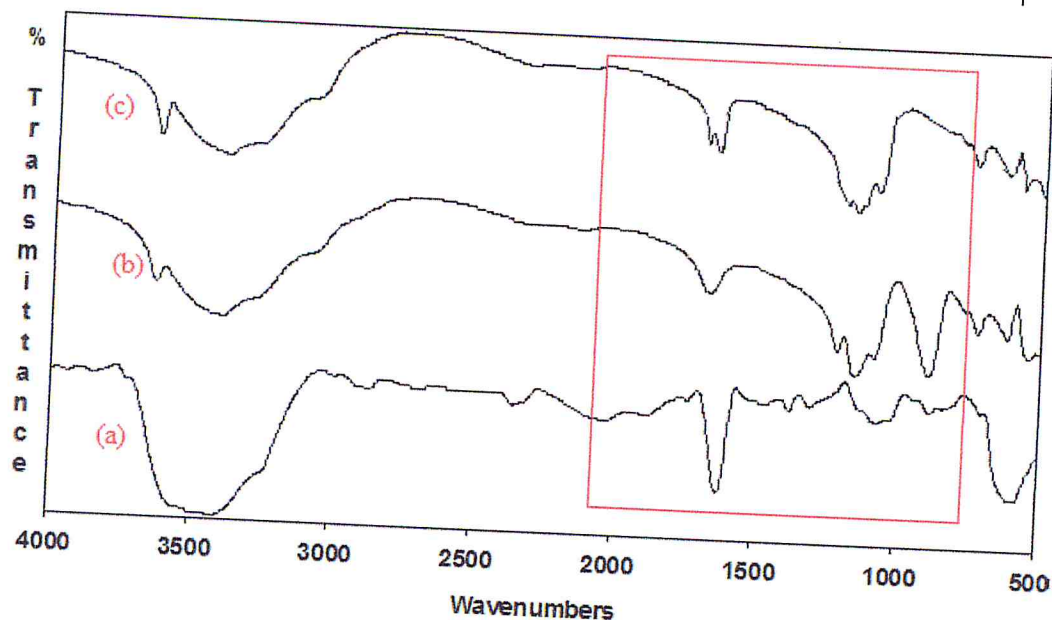


Figure 14 : spectre FTIR de CS (a), de TPP (b), et de microparticules CS/TPP (c).

Le spectre FTIR de chitosane a montré un large pic dans l'intervalle $3485-3419\text{ cm}^{-1}$ attribué à la vibration d'élongation de la liaison O-H, qui se chevauchent dans la même région qu'une vibration de valence de N-H. le pic observé à 2934 cm^{-1} correspond à la vibration d'élongation de CH dans le groupement CH_2 ou CH_3 , les pics à 1386 cm^{-1} et 1410 cm^{-1} ont indiqué la présence de vibration de déformation de la liaison CH respectivement dans les groupements CH_3 et CH_2 . Le pic 1645 cm^{-1} a été associé à la vibration des liaisons carbonyle du groupement amide CONH-R, les vibrations dans l'intervalle $1160-1000\text{ cm}^{-1}$ ont été attribuées à des vibrations de valence de la liaison C-O-C. Le pic 882 cm^{-1} correspond à la vibration de déformation de CH et aussi la liaison glucosidique $\beta(1\rightarrow4)$, le pic 588 cm^{-1} indique la présence de la vibration de déformation des groupements amines. Les pics qui se trouvent dans la fourchette $1160\text{ cm}^{-1} - 892\text{ cm}^{-1}$ indiquent la nature polysaccharidique de polymère.

Le spectre FTIR du tripolyphosphate de sodium (TPP) pur a montré des bandes caractéristiques à 1220 cm^{-1} (PO), 1154 cm^{-1} (vibration d'élongation symétrique et asymétrique des groupements PO_2), 1090 cm^{-1} (vibration d'élongation symétrique et asymétrique des groupes PO_3) et 892 cm^{-1} (POP) [38].

Les principales différences dans les spectres FTIR des particules liées au spectre FTIR du CS brut, se réfèrent aux faibles bandes à 1245 cm^{-1} et 1218 cm^{-1} qui peuvent être attribuées à la vibration d'élongation de PO et la bande à 892 cm^{-1} attribuée à POP. Ces signaux indiquent la

présence de groupes phosphate dans les particules CS/TPP. La bande à 1079 cm^{-1} est attribuée à des liaisons CO d'alcools primaires.

Ces différences sont principalement dues à la complexation entre les molécules de CS et de TPP. La bande à 1645 cm^{-1} qui apparaît sur le spectre de CS, est absente dans le spectre de particules CS/TPP et une nouvelle bande vers 1600 cm^{-1} apparaît et attribuée à NH_3^+ , par conséquent, à partir de cette information spectrale, on peut dire que la réticulation a été efficace par des interactions ioniques entre les groupements chargés négativement des groupes phosphate de TPP et les groupements NH_3^+ des chaînes du CS.

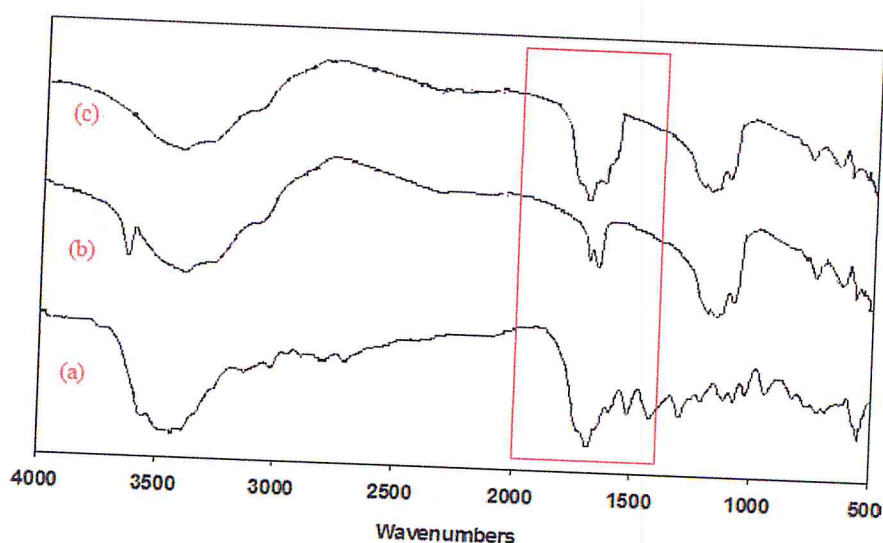


Figure 15: spectre FTIR d'OTC (A), CS/TPP (b), CS/TPP chargé d'OTC (c).

Les microparticules chargées ont montré des pics typiques de l'oxytétracycline correspondant à des vibrations d'amide I et II, dont la bande caractéristique de l'amide I se trouve à 1634 cm^{-1} et la bande de l'amide II à 1553 cm^{-1} , les bandes IR dans la région de 1400 cm^{-1} à 600 cm^{-1} ne correspondent pas des groupes fonctionnels impliqués dans les interactions médicament / microparticules, et se chevauchent avec les pics caractéristiques de TPP.

V.2.2. Aspect et morphologie de microparticules CS/TPP par MEB :

Les microparticules de CS/TPP sont de couleur blanche lorsqu'elles sont vides, et de couleur beige lorsqu'elles sont chargées d'oxytétracycline (car l'OTC est jaune), ces particules sont sans odeur caractéristique, suspendues en solution.

microparticules chargées

microparticules vides

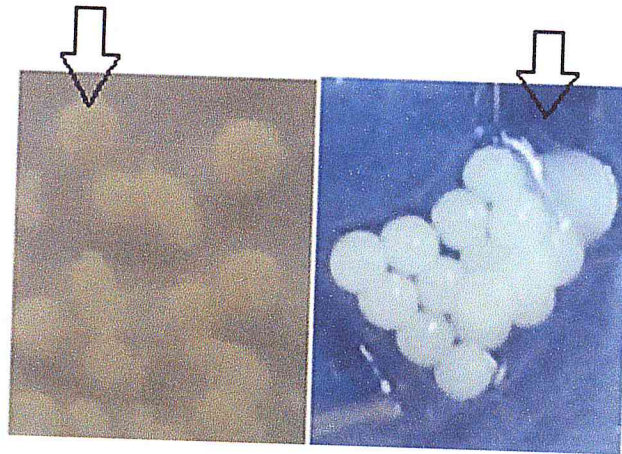


Figure16 : aspect des microparticules de CS/TPP.

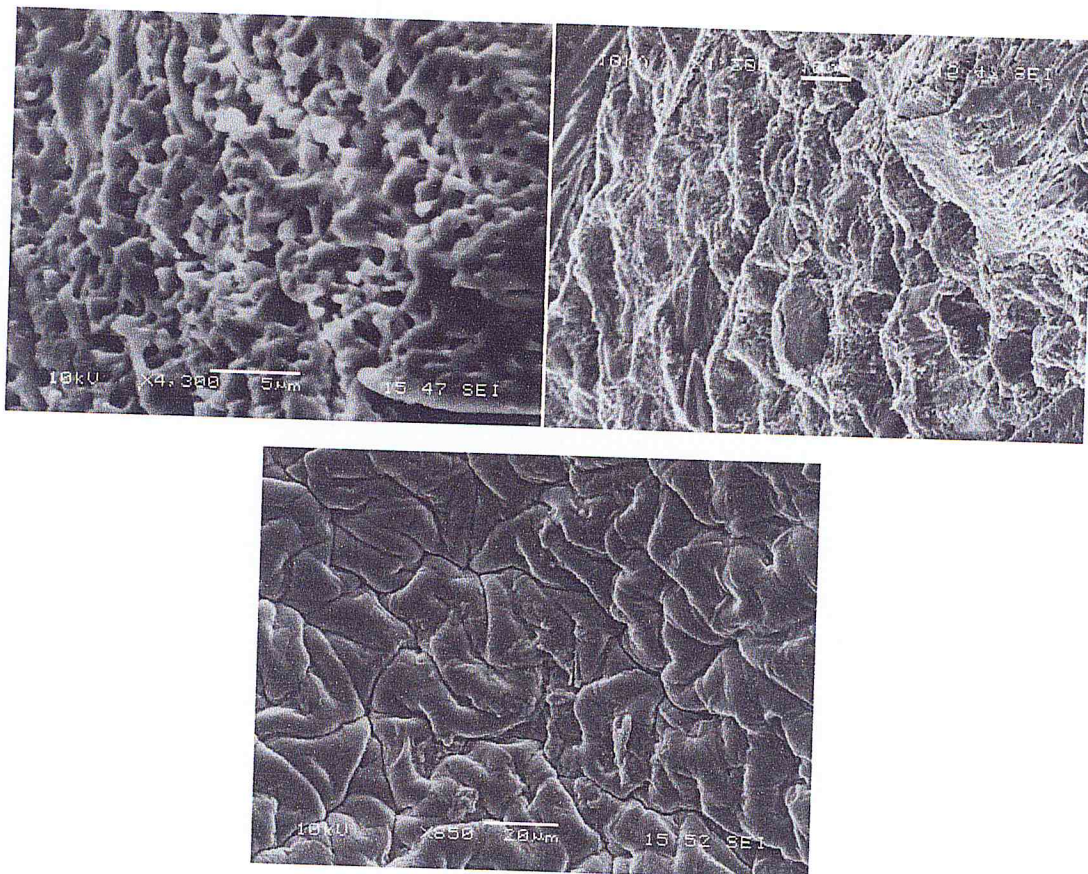


Figure17 : image microscopique (MEB) de microparticule de CS/TPP.

Une imagerie MEB a été réalisée sur la formulation des microsphères de chitosane optimisées dans leurs conditions de préparation pour évaluer leur surface et des caractéristiques

Résultats et discussion

morphologiques transversales, la surface des microparticules est apparue comme rugueuse et poreuse dont la taille moyenne des pores a été trouvée dans l'intervalle 5 à 10 μm .

V.2.3. Étude de la dégradation thermique des microparticules :

On a pu observer le changement de masse en fonction de la température, dont la perte de poids dans la courbe a été attribuée à la perte d'eau et aussi de composés volatils.

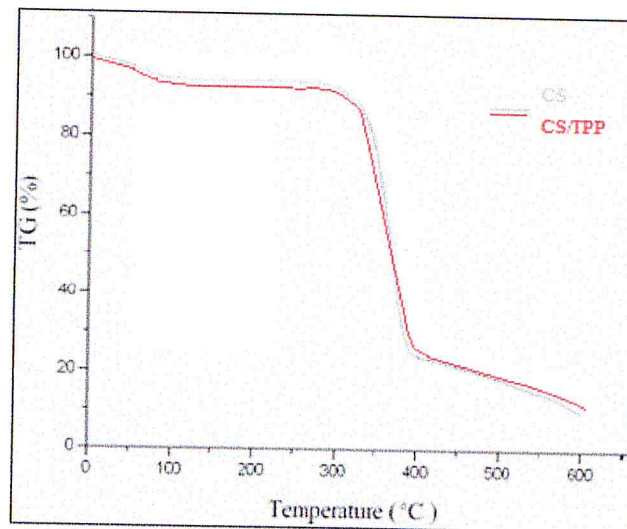


Figure18 : courbe de la dégradation thermique de microparticule de CS/TPP.

On a observé deux courbes, dans chacune de ces courbes il y a deux étapes de perte de poids (changement de la masse en fonction de la température), la première a été attribuée à la perte d'eau (à 100°C) et la deuxième a été attribuée à la perte de composés volatils issus du phénomène complexe de thermodégradation. La perte de poids indique la dégradation thermique du CS et de microparticules de CS/TPP vide.

Des études ont montré que la réticulation du chitosane/TPP augmente l'hydrophilie de la matrice de polymère et donc une meilleure rétention d'eau.

La courbe des microparticules de CS/TPP chargées d'OTC a une résistance thermique entre 0 et 400°C.

L'incorporation d'OTC a diminué la teneur en eau des microparticules à cause des interactions entre CS et OTC, ce qui diminue la densité d'interaction entre les molécules d'eau et les microparticules.

V.2.4. Etude de gonflement :

Le gonflement des microparticules dépendait du milieu de la pénétration, l'hydratation successive, et la dissolution de la matrice. Le gonflement et la dégradation sont sensibles au pH.

Les pourcentages de dégradation sont exprimés dans le tableau suivant :

pH de la solution d'HCl	Masse de bille sèche à t=0 (g)	Masse de bille humide à t=72h (g)	Pourcentage de dégradation (%)
1	0,0244	0,0004	98
2	0,0235	0,0100	57
3	0,0364	0,0296	18
4,5	0,0441	0,0437	1
6	0,0496	0,0462	6

Tableau3 : le tableau ci-dessus indique les paramètres de stabilité et le pourcentage de dégradation dans les expériences.

V.2.5. Etude de la cinétique de libération du principe actif :

La capacité de libération d'OTC à partir des microparticules de CS/TPP a été suivie à l'aide de la spectroscopie UV (SHIMADZU ; UV-1201), pour atteindre cet objectif, nous avons d'abord tracé la courbe d'étalonnage d'OTC, qui peut être observée dans la figure suivante. L'OTC présente une longueur d'onde d'absorption $\lambda = 353$ nm.

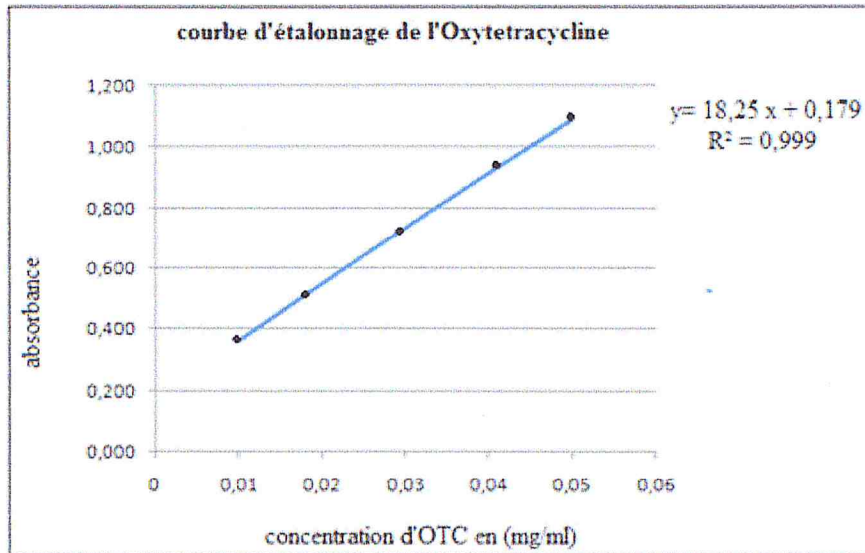


Figure19: la courbe d'étalonnage de l'oxytetracycline à 353 nm.

La courbe d'étalonnage obtenue est une droite dont la pente égale à 18,25 avec un coefficient de corrélation $R = 0,999$. Par la comparaison avec la loi de BEER-LAMBERT, on trouve :

La pente = a (absorptivité)

- Détermination du rendement d'encapsulation :

Pour déterminer le rendement d'encapsulation, il faut appliquer la relation suivante :

$$\text{Rdt} = \frac{\text{masse de PA encapsulé}}{\text{masse de PA à encapsuler}} \times 100. \quad \text{equ8}$$

$$\text{Rdt} = 60\%.$$

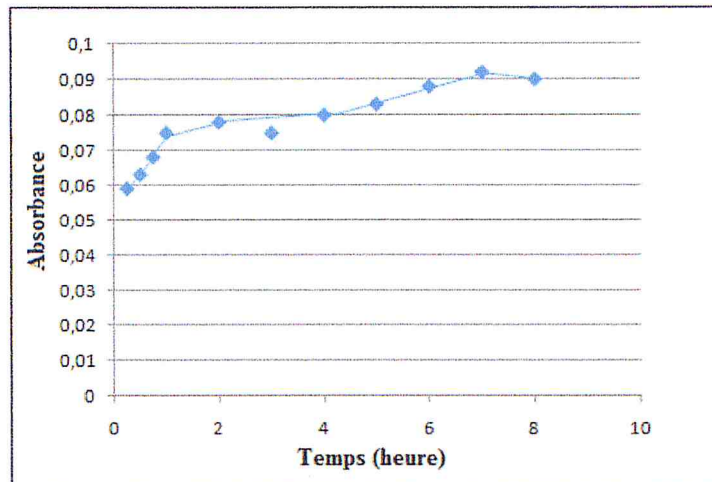


Figure 20: Profils de libération obtenus à partir de microparticules de CS/TPP.

- On remarque que la libération de la première heure est importante, car la libération est favorisée par la différence de concentration en OTC entre le solvant de dissolution (PBS) et le milieu interne (microparticules).
- Dans la fourchette (2-7h) la libération est plus faible que la première partie, ce qui implique l'abaissement de différence de concentration en PA entre les deux.
- A partir de 7h la quantité libérée est faible, car le médicament commence à disparaître dans les microparticules, à cause de la saturation de milieu.

La libération du PA encapsulé dans la matrice polymère suit deux principales étapes : le gonflement qui est assuré par l'entrée du solvant, et la diffusion qui est régie par la loi d'Higuchi. . [39]

La préparation contrôlée de microparticules de CS/TPP est une condition préalable pour la libération contrôlée de médicament. Le pH, la concentration de la solution d'agent de réticulation, MW, la concentration de polymère, et le temps de séchage jouent un rôle important sur la densité de la matrice de CS/TPP.[40]

Lorsque le MW, la concentration de la solution du chitosane, et le temps de séchage augmentent, le comportement de libération de PA diminue de manière significative. Aussi la réduction du pH et l'augmentation de la concentration de TPP ont abouti à une libération lente de PA.

V.3. Caractérisation de nanoparticules :

V.3.1. Par spectroscopie infrarouge FTIR :

Les nanoparticules CS/TPP ont été caractérisées par spectroscopie FTIR et les spectres sont présents sur la figure suivante :

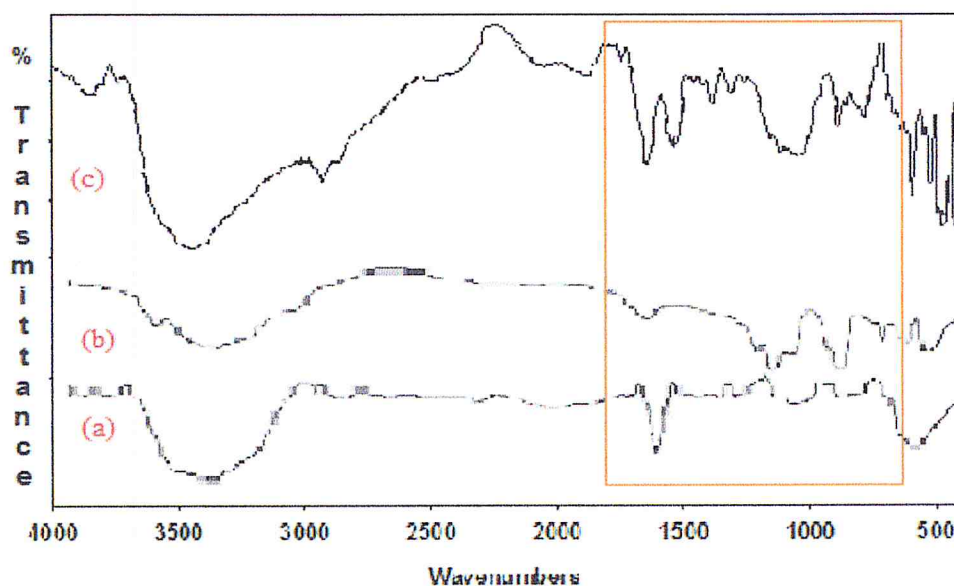


Figure 21 : spectre FTIR de chitosane (a), tripolyphosphate(b), nanoparticules de CS/TPP (c).

La bande 3358cm^{-1} est attribuée à la vibration d'allongement des groupements NH et OH du chitosane, le déplacement de cette bande dans le spectre de nanoparticules est dû à l'augmentation de ponts hydrogène.

Les pics dans l'intervalle 1588cm^{-1} et 1647cm^{-1} dans le spectre de chitosane sont déplacés vers 1643cm^{-1} et 1700cm^{-1} à cause de désacétylation des groupes amine, ce qui confirme la formation de liaison entre le groupement phosphorique du TPP et le groupement ammonium de CS, dont l'effet inter et intramoléculaire est augmenté dans les nanoparticules.

Résultats et discussion

Affectations possibles	Chitosane (ν/cm^{-1})	Nanoparticules de CS/TPP (ν/cm^{-1})
ν O-H	3358	3418
ν C-H	2876	2926
ν CO, amide I	1647	1738
ν N-H amide II	1588	1643
ν C ₃ -O	1421-1150	1383
ν C ₆ -O	1064;994	1074;1023
ν P-O	-	1240
ν P=O	-	1203

Tableau4 : Bandes principales IR (cm^{-1}) des nanoparticules CS et CS-PPT.

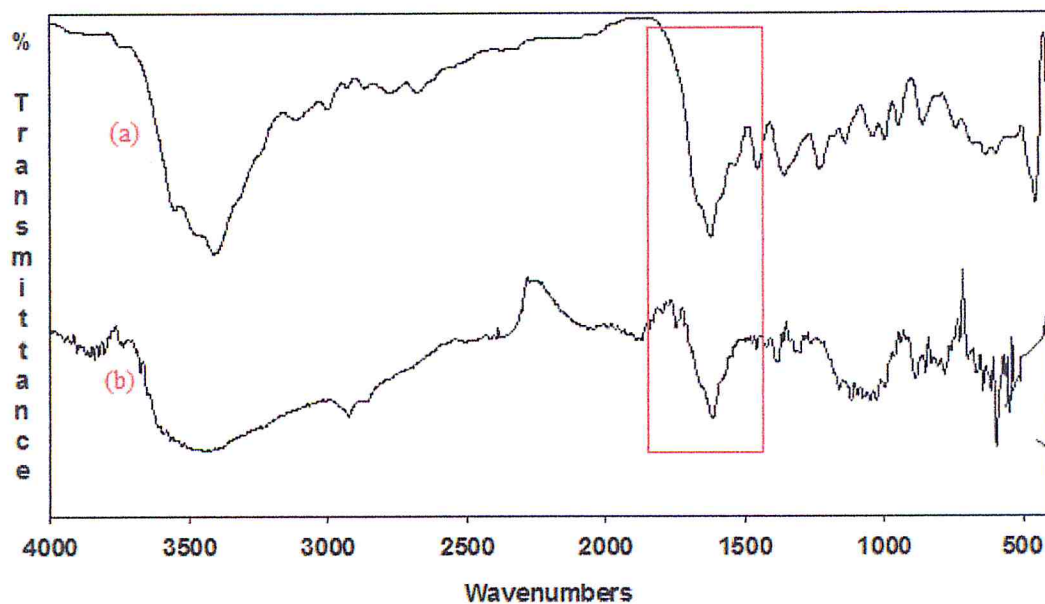


Figure22 : Spectres infrarouge FTIR de nanoparticules CS/TPP et nanoparticules CS/TPP/OTC.

Les nanoparticules chargées ont montré des pics typiques de l'oxytétracycline correspondant à des vibrations d'amide I et II, dont la bande caractéristique.

V.3.2. Aspect physique et morphologie :

Les nanoparticules obtenues sont des fines particules blanches claires, sans odeur caractéristique, suspendues dans la solution après centrifugation



Figure23 : aspect physique de nanoparticules.

Les images MEB dan les figures suivantes nous montre que la morphologie des particules obtenues dépend du rapport [CS/TPP] et la concentration du chitosane.

Quand le rapport [CS/TPP] est inférieur à 2 et [CS] = 0,5mg/ml il n' y avait pas de particules, donc ces échantillons ne sont pas utilisés pour d'autre études dans ce travail.

La figure 24 (b) nous montre que les particules obtenues à partir de [CS/TPP]> 2 et [CS] = 0,5 mg/ml sont des petites particules de tailles environ 1 μ m et apparaissent comme des point dans l'image, ces particules sont de forme irrégulières.

Dans la figure 25 on a observé une augmentation de la taille (de 1 à 3 μ m).

On a conclue que le rapport [CS/TPP] influence sur la taille et la porosité des particules.

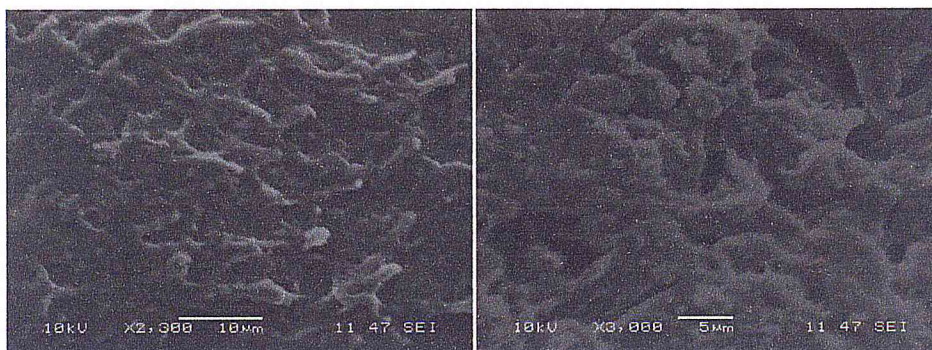


Figure24 : image microscopique (MEB) de nanoparticules CS/TPP.

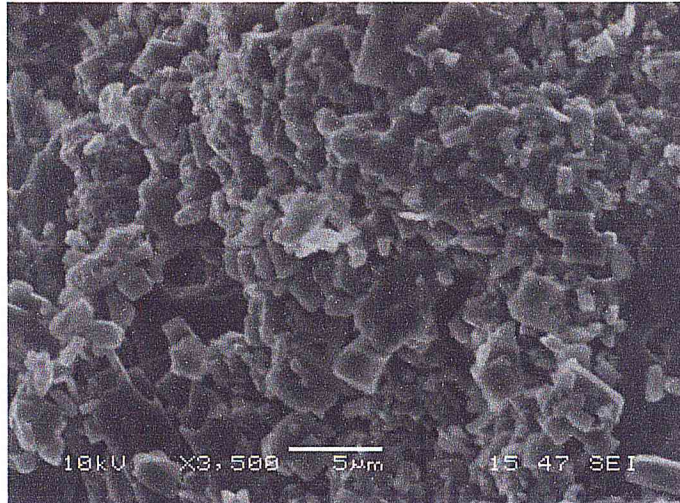


Figure25 : image MEB de nanoparticules de CS/TPP/OTC.

V.3.3. Etude de la cinétique de libération :

Avant d'étudier la cinétique de libération de principe actif, on va déterminer le rendement de piégeage ou d'encapsulation à l'aide de l'absorbance UV.

$$\text{Rdt} = \frac{\text{masse de PA encapsulé}}{\text{masse de PA à encapsuler}} \times 100.$$

$$\text{Rdt} = 45\%$$

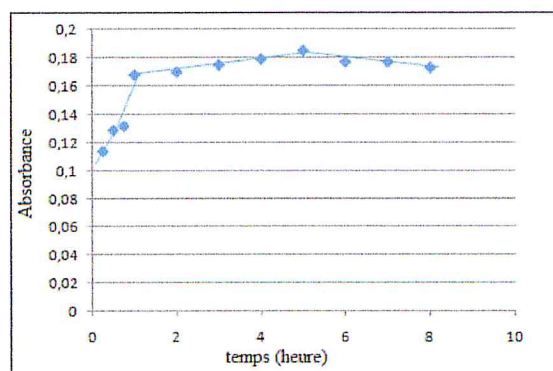


Figure26: profils de libération obtenus à partir des nanoparticules de CS/TPP.

- La première partie : La libération est très importante car elle est favorisée par la différence de concentration en OTC .
- La deuxième partie : La libération est stable car la concentration entre en PA ≈ 0 .

V.4. phénomène d'interaction CS/TPP :

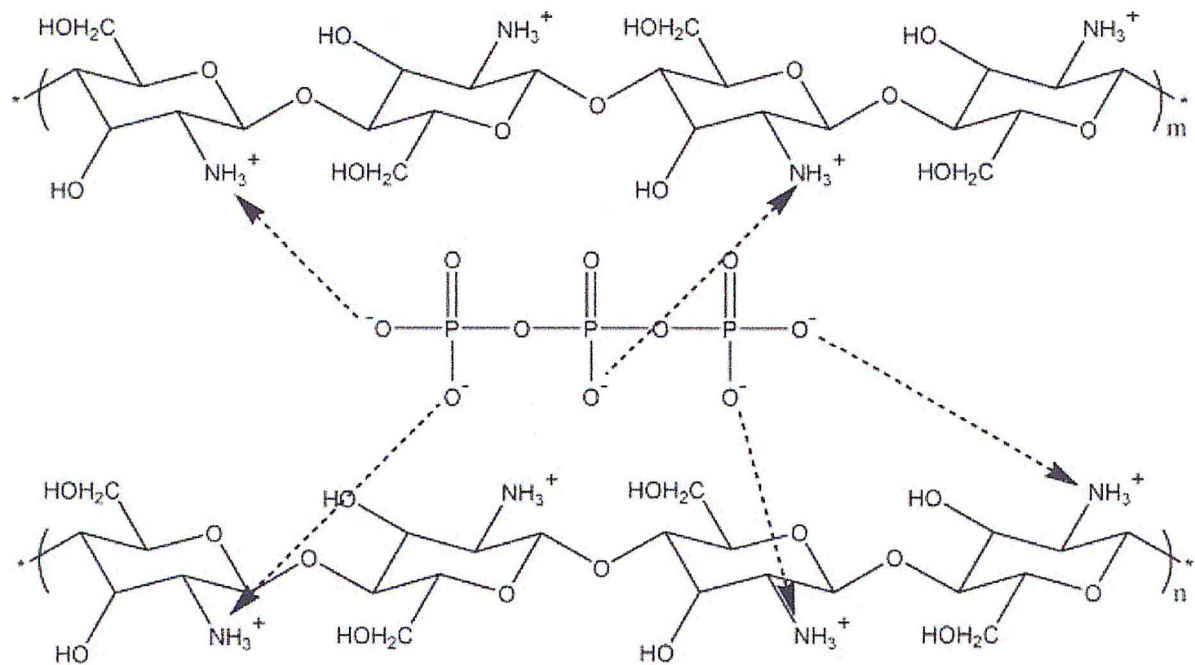


Figure27 : représentation schématique d'interaction entre CS et TPP.

Conclusion

L'objectif de l'ensemble du travail a été le développement des systèmes à base de polymère biodégradable pour la libération du médicament.

Le biopolymère utilisé est le chitosane de structure linéaire composé de distribution aléatoire de 2-acétamide-2-déoxy- β -D-glucopyranose et 2-amino-2-déoxy- β -D-glucopyranose liés en β (1 \rightarrow 4). Le chitosane employé dans ce travail avait un DD = 83,46% et un poids moléculaire MW= 127037,5 g/mol.

La première réalisation dans ce travail a été la caractérisation du chitosane en termes de masse moléculaire moyenne et de degré de déacétylation et la seconde a été la préparation et la caractérisation de micro/nanoparticules à base de chitosane.

Le chitosane est un polyélectrolyte cationique fort qui peut interagir avec les polyanions ex : le TPP par des interactions électrostatiques pour former des particules à l'échelle microscopique de forme presque sphérique.

Plusieurs techniques ont été utilisées pour la caractérisation des matrices synthétisées (FTIR, MEB, ATG, MEB). L'analyse spectroscopique FTIR a été utilisée pour la détermination du DD de chitosane, pour confirmer la formation de liaisons entre le CS et TPP donc la formation de particules de CS/TPP et pour confirmer le chargement de l'oxytétracycline dans les particules.

L'étude du rendement de chargement de médicament et la libération du principe actif ont été faites grâce à la spectroscopie UV. Une courbe d'étalonnage d'OTC a été utilisée pour déterminer les concentrations en principe actif.

Il a été démontré qu'un faible rapport [CS/TPP] ne favorise pas la formation de particules de CS/TPP.

En fin on pu comparer le rendement de chargement de médicament dans les micro/nanoparticules ainsi que la libération de principe actif .

Références

- [1] Blunk.T ; Hochstrasser.D ; Sanchez.J ; Et Al , « colloidal carries for intravenous drug trageting : plasma protein adsorption patterns on surface-modified latex particles evaluated by tow-dimentional polyacrylamide gel electrophoresis » , Electrophorests, 1993, 14(2) ,p 1382-1387.
- [2] Price.M ; Cornelius.R ; Brash.J ; « protein adsorption to polyethylene glycol modified liposomes from fibrinogen solution and from plasma » ; Biochimica et Biophysica acta 2001.
- [3]. Jeon, S. ., Lee, J. ., Andrade, J. . & De Gennes, P. . Protein—surface interactions in the presence of polyethylene oxide: I. Simplified theory. *Journal of Colloid and Interface Science* **142**, 149–158 (1991).
- [4]. Nouvel, C. et al. Biodegradable nanoparticles made from polylactide-grafted dextran copolymers. *Journal of Colloid And Interface Science* **330**, 337–343 (2009).
- [5]. Leonard, M. et al. Chapter 23: Preparation of Polysaccharide-Covered polymeric Nanoparticles by Several Processes Involving Amphiphilic Polysaccharides. *Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Passivation, and Functionalization* (Edition OUP USA, 2008 , ISBN: 978-0841269699)
- [6]. Laroui, H. Nanosphères polymères à couverture de hyaluronate pour la délivrance ciblée de molécules actives dans le traitement des affections du cartilage. (Doctorat de l'Université Nancy 1:2007).
- [7]. <http://bbs.instrument.com.cn/shtml/20081028/1553638/>.
- [8] I.Brigger, C.Dubemet, and P.couvreur; « nanoparticles in cancer therapy and diagnosis ». *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2002, 54(5): p631-651.
- [9] C.Weber, C.Coester, J kreuter, and K.langer, Desolvation process and surface characterisation of protein nanoparticles», *International journal of pharmaceutics*, 2000.194:p91-102.
- [10] Weber.C ; Coester.C ; Krruter, J. ET AL. « Desolvation process ana surfac characterisation of protein nanoparticles », *international journal of pharmaceutics*, (2000) 194 :91-102
- [11]H.Hovagaard, L.Brondsed ; « detran hydrogels for colon-specific drug delivery », *journal of controlled release*, (1995),36(1-2): 256-274.

- [23] W.Wang and D. Xu, viscosity and flow properties of concentrated solutions of chitosan with different degree of deacetylation, *Int.J.Biol.Macromol*, 16(3) (1994) P 149-152.
- [24] B.Pejić , M.Vukčević , M.Kostić , P.Skundrić : biosorption of heavy metal ions from aqueous solutions by short hemp fibers : effect of chemical composition, *J.Hazard. mater.* 164(2009) P146-153.
- [25] G.Berth, H.Dautzenberg et M. G.Peter, physico-chemical characterization of chitosans varying in degree of acetylation. *Carbohydrate polymers*, 36 (1998) P205-218.
- [26] G.Crini, “ Recent developments in polysaccharide-based materials used as adsorbents in wastewater treatment, *Prog.Polym. SCI*.30 (2005) P 38-70.
- [27] P.Calvo, C. Rumunan-Lopez, J.L. Vila-Jato, M.J. Alonso, *J. Appl. Polym. Sci.* 63(1997) P 125.
- [28] H.B. Bohidar, P. Dubin, P. Majhi, C. Tribet, W. Jaeger, *Biomacromolecules* 6(2005) P1573
- [29] Ravi Kumar, M.N.V, “A review of chitin and chitosan applications”. *Reactive and Functional Polymers* (2000) 46 p. 1-27.
- [30] Etienne, O., A. Schneider, C. Taddei, L. Richert, P. Schaaf, J.C. Voegel, C. Egles, and C. Picart, , “Degradability of polysaccharides multilayer films in the oral environment: an in vitro and in vivo study”. *Biomacromolecules*. (2005) 6(2): p. 726-733
- [31] Zeiger, E., B. Gollapudi, and P. Spencer, Genetic toxicity and carcinogenicity studies of glutaraldehyde - a review. *Mutation Research-Reviews in Mutation Research*. (2005)589(2): p. 136-151.
- [32] Camille Delarras, notions sur les antibiotiques, pratique en microbiologie de laboratoire p725, (2014).
- [33] : Zemmouri H, Utilisation du chitosane comme agent flocculant dans le traitement des eaux. Mémoire de Magister, . (2008).

[34] : Mohammad R. Kasai ; “A review of several reported procedures to determine the degree of N-acetylation for chitin and chitosan using infrared spectroscopy” ; Carbohydrate Polymers 71 (2008) p 497–508.

[35]: Ken-ichi Shimokawa, Katsuhiko Saegusa, Yuko Wada, Fumiyoshi Ishii, « Physicochemical properties and controlled drug release of microcapsules prepared by simple coacervation » Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 104 (2013) p1– 4.

[36]: GUINESI, L. S., CAVALHEIRO, E. T. G., The use of DSC curves to determine the acetylation degree of chitin/chitosan samples, Thermochimica Acta 444 (2006) 128.

[37]: BAXTER, M. A., DILLON, K. D., TAYLOR, ROBERTS G. A. F., Improved method for IR determination of the degree of N-acetylation of chitosan. International Journal of Biological Macromolecules 14 (1992) 166.

[38]: F.-L. Mi, S.-S. Shyu, S.-T. Lee, T.-B. Wong, Journal of Polymer Science B 37 (1999) P1551–1564.

[39]= Y.Nafti ; « contribution à l'étude de la cinétique de libération d'un principe actif » ; thèse fin d'étude ; Université Ziane Achour de Djelfa.(2008)

[40] : J.A. Ko^a, H.J. Park^{b*}, S.J. Hwang^c, J.B. Park^d, J.S. Lee^e; “ Preparation and characterization of chitosan microparticles intended for controlled drug delivery” ; International Journal of Pharmaceutics 249 (2002) p165-174.

I. La spectroscopie infrarouge par transformée de Fourier (FTIR) :

Le rayonnement infrarouge (IR) fut découvert en 1800 par Frédéric Wilhelm Herschel, le rayon de l'IR se situe entre la région du spectre visible et les ondes hertziennes (0,8 à 1000 μm). Dont on trouve trois catégories IR proche (12500 à 4000 cm^{-1}), le moyen IR (4000-400 cm^{-1}), et le lointain IR (400-10 cm^{-1}).

Dès 1924 on s'est aperçu que l'énergie du rayonnement IR moyen coïncidait avec celle des mouvements interne de la molécule et sa structure moléculaire est mise en évidence.

L'utilisation de la spectroscopie moyen IR reste adapté pour l'élucidation de la composition moléculaire d'un spectre. Cette technique est liée aux propriétés de vibration des liaisons interatomique.

Un spectromètre FT-IR est un instrument qui acquiert un spectre large bande du proche IR au IR lointain. Contrairement aux instruments dispersifs, comme les monochromateurs ou les spectrographes de réseau, les spectromètres FT-IR collectent simultanément toutes les longueurs d'ondes. Cette caractéristique est appelée l'avantage Multiplex ou de Fellgett. Les spectromètres FT-IR sont souvent simplement appelés FT-IR. Mais pour les puristes, FT-IR (Fourier Transform InfraRed) est une méthode destinée à obtenir un spectre infrarouge en collectant d'abord l'interférogramme d'un signal échantillon à l'aide d'un interféromètre, puis en exécutant une Transformation Fourier (FT) de cet interférogramme afin d'obtenir le spectre. Les spectromètres FT-IR collectent et numérisent l'interférogramme, exécutent la fonction FT et affichent le spectre.

L'analyse par la spectroscopie FTIR s'effectue sur des pastilles de KBr dont on mis 0,01mg de notre échantillon et on ajoute 250 mg de KBr. Le spectre de chaque produit est enregistré à température ambiante dans l'intervalle à la fourchette 400-4000 cm^{-1} .

II. La spectroscopie d'absorption UV-visible :

La spectroscopie d'absorption dans l'UV et le visible est une méthode très commune dans les laboratoires. Elle est basée sur la propriété des molécules d'absorber des radiations lumineuses de longueur d'onde déterminée.

Le domaine UV-visible s'étend environ de 800 à 10 nm.

visible : 800 nm (rouge) - 400 nm

proche-UV : 400 nm - 200 nm

UV-lointain : 200 nm - 10 nm

Dans une molécule, les transitions électroniques UV-visibles mettent en jeu les énergies les plus importantes de la chimie (environ de 13000 à 50000 cm^{-1} soit 160 à 665 $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$). L'ordre de grandeur des énergies mises en jeu est celui des énergies de liaison des molécules et ces rayonnements peuvent parfois provoquer des ruptures de liaisons. Plus généralement, ils provoquent des transitions électroniques entre les différents niveaux d'énergie des molécules.

Le spectre UV permet à la fois l'identification (analyse qualitative), mais dans certaines limites seulement et l'estimation (analyse quantitative) d'un composé.

Les chromophores qui peuvent être détectés par des spectromètres UV-VIS ont toujours des doubles ou triples liaisons ex : (C=C),(C=O),(C≡N). Ainsi, la spectrométrie d'absorption moléculaire UV-VIS permet d'étudier, à l'état gazeux, liquide ou solide, des composés organiques principalement mais aussi des composés inorganiques.

Loi de Beer-Lambert :

La technique d'analyse est souvent utilisée dans un mode quantitatif pour déterminer la concentration d'une entité chimique en solution, car l'absorption est plus ou moins importante selon le nombre de groupements d'atomes placés sur le trajet de la lumière : des lois connues relient cette absorption à ce nombre dans certaines conditions opératoires. Ce sont les lois de LAMBERT et de BEER .

L'absorption de la lumière est directement proportionnelle à la fois à la concentration du milieu absorbant et à l'épaisseur de la cuve où se trouve le milieu.

$$A_{\lambda} = -\log_{10} I/I_0 = \epsilon_{\lambda} \cdot l \cdot C.$$

où I/I_0 est la **transmittance** de la solution (sans unité), A est l'**absorbance** ou densité optique à une longueur d'onde λ (sans unité), ϵ_{λ} est le coefficient d'extinction molaire (en $\text{l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) , l longueur de la cuve (cm) ou trajet lumineux. Il dépend de la longueur d'onde, de la nature chimique de l'entité et de la température.

La relation entre transmittance et concentration n'est pas linéaire (fig.1) mais la relation entre l'absorbance et la concentration est linéaire (fig.2), ce qui est à la base de la plupart des analyses quantitatives.

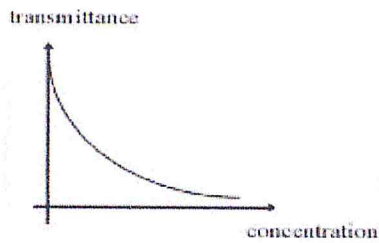


figure 1:Relation entre transmittance et concentration

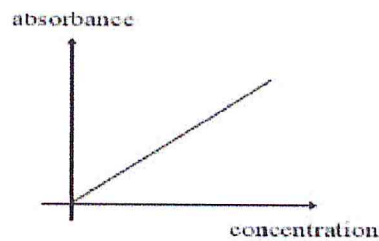


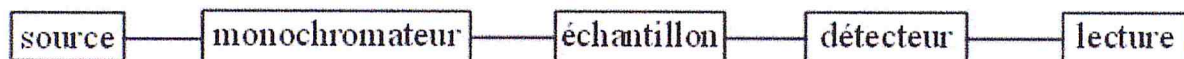
figure2 :Relation entre l'absorbance, et concentration

La simple relation linéaire entre l'absorbance et la concentration et la facilité relative de mesure de la lumière UV-VIS sont donc les raisons pour lesquelles la spectroscopie UV-VIS est à la base d'un grand nombre de méthodes d'analyse quantitative.

- Limites de la loi de BEER-LAMBERT:

- Les mesures ne sont valables que dans une gamme de concentrations très faible, et l'absorbance ne dépasse pas 3.
- Il est important de noter que λ est une fonction de la longueur d'onde et donc que la loi est seulement vraie en lumière monochromatique, c'est une limite liée à l'appareil.

Les spectromètres classiques comprennent les mêmes éléments, qu'ils soient utilisés dans le domaine UV-VIS que dans le domaine IR : une source, un porte-échantillon, un monochromateur, un détecteur, un appareil de lecture. Toutefois, la disposition de ces éléments diffère selon les deux domaines spectraux.



III. Analyse thermogravimétrique ATG :

L'Analyse Thermogravimétrique (ATG) ou thermogravimétrie mesure la variation de masse d'un échantillon lorsqu'il est exposé à une température dans une atmosphère contrôlée.

Principe:

L'analyse thermogravimétrique (ATG) est une technique d'analyse thermique qui consiste en la mesure de la variation de masse d'un échantillon en fonction de la température.

La thermogravimétrie est le fait de quatre acteurs

- l'échantillon
- la masse
- le temps
- l'environnement

L'objectif : caractériser les matériaux par mesure direct de leur variation de masse dans le thermo gramme qui correspond à la dégradation du polymère et donc à la libération de gaz.

Echantillon :

L'échantillon présente généralement une masse comprise entre 6 mg et 1g suivant l'appareil utilisé et le matériau analysé. Dont la plage de température d'essai : 100°C à 950°C.

Appareil :

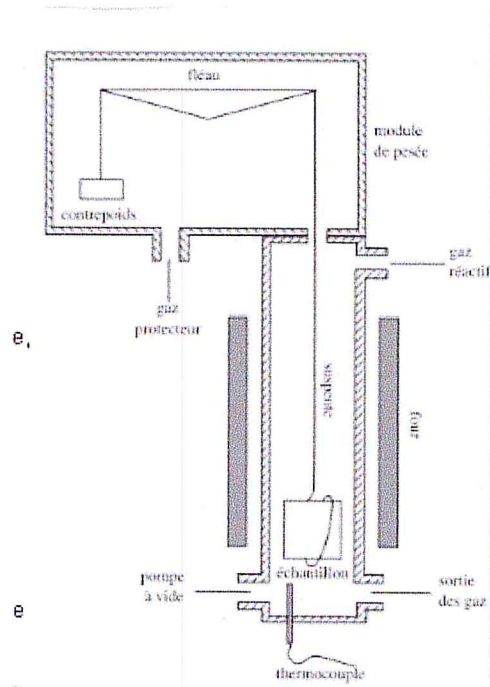


Figure : représentation schématique appareillage d'ATG

- Une enceinte étanche (permettant de contrôler l'atmosphère de l'échantillon),
- Un four permettant de gérer la température,
- Un module de pesée (microbalance),
- Un thermocouple (pour mesurer la température)

La microbalance est normalement sous atmosphère inerte (par exemple diazote ou argon); ce gaz constitue un «couvercle» empêchant le gaz réactif de pénétrer dans l'enceinte du module de pesée, et le gaz doit être moins dense que le gaz réactif.

L'appareil dispose d'un système de refroidissement, habituellement à circulation d'eau, afin de limiter les parties chaudes. Pour accrocher l'échantillon, on utilise une des solutions suivantes: on l'entoure d'un fil de platine; on le perce d'un trou, et on l'accroche à un fil de platine (technique de l'«hameçon»); on le place dans une nacelle, de fil de platine tressé (facilite le flux de gaz) ou d'alumine (plus inerte à haute température), la nacelle étant accrochée à la suspen

Méthode:

L'échantillon (5 à 10 mg) est mis dans un récipient inerte, réfractaire.

Le récipient est fixé à une micro balance. Un thermocouple mesure la température. Le poids est mesuré en fonction de la température ou le temps.

Des températures typiques sont de 900°C. La microbalance est normalement sous atmosphère inerte (Azote) afin d'éviter l'oxydation.

Le résultat de ce test est la réduction du poids par évaporation ou désintégration.

Les changements en poids donnent une idée du taux présent et la température donne une idée de la nature du produit

Application :

- Déterminer la quantité de charge d'un matériau en pourcentage de poids.
- Déterminer la quantité de cendres d'un matériau en pourcentage de poids.
- Caractériser la perte de poids d'un matériau vis-à-vis du temps à une température donnée.
- Quantifier la perte d'eau, de solvant, ou de plastifiant sur une certaine plage de température.
- Examiner les propriétés retardant la combustion d'un matériau.