

République Algérienne démocratique et populaire
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

Université BLIDA 1
Faculté des Sciences
Département de Chimie



Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master

En : Chimie Moléculaire
Option : Chimie Organique

Par : Mlle SOLTANI Rym

Thème :

Préparation, caractérisation et application in vitro de micro/nanoparticules à base de chitosane pour la vectorisation de l'acide salicylique

Soutenu le 03 /11/2015, devant un jury composé de :

Mr M. KARS	Maitre assistant A	USDB	Président
Mr R. AIAD	Maitre assistant A	USDB	Examineur
Mr Y. BAL	Professeur	USDB	Promoteur

Année universitaire : 2014 – 2015

Remerciements

En premier lieu, je tiens à remercier mon promoteur, Monsieur BAL Youcef, professeur à l'USDB qui s'est toujours montré à l'écoute tout au long de la réalisation de ce mémoire, pour son encadrement, ses précieux conseils et son soutien. Un grand merci pour la confiance que vous m'avez accordée et pour vos encouragements continus.

J'adresse mes remerciements les plus sincères à mon co-promoteur, Monsieur BELAL Rachid, Professeur à l'USDB qui m'a accueilli dans son laboratoire de chimie physique moléculaire et macromoléculaire au département de chimie, faculté des sciences de l'Université SAAD DAHLAB de Blida, et m'a exprimé sa confiance en me permettant d'effectuer mon projet de fin d'études, mais aussi pour son encadrement, son apport scientifique et son soutien permanents durant mon Master de recherche ainsi que mon stage. Vous m'avez toujours accueillie avec gentillesse et vous avez toujours pris le temps de répondre à toutes mes questions. Pour toutes ces raisons je vous remercie infiniment.

Je remercie Monsieur KARS Mohamed de m'avoir fait l'honneur de présider le jury de ma thèse et d'avoir accepté de juger ce travail, mais aussi pour la réalisation des analyses par Diffraction des Rayons X.

Mes remerciements vont également à Monsieur AIAD Rachid pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant d'examiner ce travail.

Je tiens à remercier l'ensemble du personnel du Centre de Développement des Technologies Avancées (CDTA), du Centre de Recherche et de Développement de l'Electricité et du Gaz (CREDEG), du Centre de Recherche en Technologie des Semi-conducteurs pour l'Energétique (CRTSE) et de la société de fabrication des tubes plastiques SOTUPLAST (Chlef).

Je remercie également Madame HADJ ZIANE, responsable du laboratoire de génie chimique au département de chimie industrielle, de m'avoir permis d'effectuer les analyses du potentiel zêta, ainsi que Madame BENSASSI d'avoir procédé à l'analyse de mes échantillons.

Je tiens à exprimer ma gratitude envers Monsieur LAOUER et Madame REBAN du Centre de Développement des Technologies Avancées, et Madame Amokrane de l'Institut Algérien de Pétrole pour m'avoir mis en contact avec des personnes qui m'ont permis de réaliser mes analyses physico-chimiques.

Je tiens aussi à remercier tous les ingénieurs de laboratoire du pavillon 5, Mademoiselle BOUDJEMA Amina, Mademoiselle AMARA Meriem, Madame OUZRI Isma et Monsieur CHOUAKRI Aissa, d'avoir assuré la disponibilité du matériel et des produits nécessaires pour travailler, pour leur gentillesse ainsi que leur aide précieuse.

Merci à toute l'équipe du laboratoire de chimie du pavillon 13, Mlle EL ACHEACHE, Madame BENFODIL, et plus particulièrement Monsieur ABBAS Samir et Monsieur LAICHI Yacine.

BENMIHOUB Amina, ma doctorante adorée, je tiens à te remercier sincèrement pour ta gentillesse, ton aide et ton grand cœur.

Un merci spécial à ma copine LOUNICI Faiza pour son aide, sa disponibilité et ses conseils.

J'adresse mes vifs remerciements à une personne particulière, un vrai ami qui m'a apporté conseils et soutien sans faille, un grand merci pour ta présence Malik et ta large contribution à mon travail au quotidien.

A mes amis de promotion avec qui j'ai partagé tant de choses durant ces cinq années d'études, Hala, Soumia, Asma, Zineb, Amina, Nesro, Djamel, Ali et tous les autres. Merci pour tout, j'espère pour vous une bonne continuation professionnelle et personnelle.

Mes derniers remerciements, mais non les moindres, vont bien sûr à ma famille :

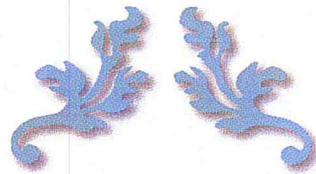
Je remercie chaleureusement ma maman d'avoir cru en moi et de m'avoir toujours soutenue. Ta présence, tes paroles, tes sacrifices et ton aide précieuse m'ont donné la force et le courage d'en arriver jusque-là, tes encouragements m'ont permis de poursuivre mes études et de réussir dans ma vie. Je t'exprime mes tendres et sincères remerciements.

Un grand merci à mes tantes Fadila et Fettouma pour leur soutien, leurs encouragements, leur écoute et leur aide, ainsi qu'à mon oncle Djamel qui a toujours été disponible pour m'aider, m'écouter et me motiver. Merci tout simplement d'être là.

Merci également à mon père pour ses conseils et son aide professionnelle.

Sans oublier mon cher frère Yacine pour ses encouragements, son aide et tous les bons moments que nous partageons ensemble.

A toutes les personnes qui m'ont soutenue de près ou de loin pendant la réalisation de ce travail, j'adresse ma profonde gratitude.



SOMMAIRE



Table des matières

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Résumé

Introduction générale..... 1

PARTIE THEORIQUE

Chapitre I : Le chitosane

Introduction 3

I.1. Découverte de la chitine et du chitosane 3

I.2. Sources du chitosane 5

I.3. Structure chimique et caractéristiques structurales du chitosane 5

I.4. Préparation du chitosane 6

I.5. Caractérisation du chitosane 7

I.5.1. Degré de désacétylation..... 7

I.5.2. Masse moléculaire 8

I.5.3. Solubilité..... 9

I.5.4. Viscosité 9

I.6. Propriétés physico-chimiques et biologiques du chitosane..... 9

I.7. Applications du chitosane 11

Conclusion..... 12

Chapitre II : Les nanoparticules

Introduction 13

II.1. Généralités 13

II.2. Qu'est-ce qu'une nanoparticule ? 15

II.3. Classification des nanoparticules..... 15

II.4. Types de nanoparticules 16

II.4.1. Nanocapsules..... 16

II.4.2. Nanosphères 16

II.4.3. Liposomes	16
II.4.4. Micelles	17
II.4.5. Nanoparticules polymériques	17
II.4.6. Nanoparticules inorganiques	18
II.5. Générations de vecteurs : vers des nanoparticules de plus en plus performantes	19
II.5.1. Première génération.....	19
II.5.2. Deuxième génération.....	20
II.5.3. Troisième génération.....	21
II.6. Critères de choix des nanoparticules	23
II.7. Avantages des nanoparticules	23
II.8. Domaines d'application des nanoparticules	24
Conclusion.....	24
 <i>Chapitre III : Notions sur la vectorisation d'agents thérapeutiques</i>	
Introduction	25
III.1. Qu'est-ce que la vectorisation ?	25
III.2. Critères de vectorisation	25
III.3. Importance de la vectorisation	26
III.4. Qu'est-ce que l'encapsulation ?.....	26
III.5. Pourquoi encapsuler ?.....	27
III.6. Techniques d'encapsulation	27
III.6.1. La gélation ionotrope	27
III.6.2. Le spray-drying	27
III.6.3. L'émulsion	28
III.6.4. La polymérisation interfaciale (polycondensation).....	28
III.6.5. La séparation de phase	28
III.7. Mécanismes de libération des principes actifs.....	30
III.8. Application des micro/nanoparticules à base de chitosane pour la vectorisation de l'acide salicylique	31
III.8.1. Propriétés	31
III.8.2. Toxicité	35
Conclusion.....	36
 Références bibliographiques	

PARTIE EXPERIMENTALE

Chapitre IV : Matériels et méthodes

Introduction	37
IV.1 Préparation des vecteurs à base de chitosane	37
IV.1.1. Microparticules	37
IV.1.2. Nanoparticules	39
IV.2. Caractérisation	39
IV.2.1. Caractérisation du chitosane	39
IV.2.1.1. Caractérisation structurale par Infra-Rouge à Transformée de Fourier	39
IV.2.1.2. Détermination du degré de désacétylation du chitosane par FTIR	40
IV.2.1.3. Mesure de la viscosité et détermination du poids moléculaire viscosimétrique	41
IV.2.2. Caractérisation des vecteurs à base de chitosane	42
IV.2.2.1. Aspect physique	42
IV.2.2.2. Caractérisation spectroscopique par FTIR	42
IV.2.2.3. Caractérisation morphologique par MEB	42
IV.2.2.4. Caractérisation structurale par DRX	43
IV.2.2.5. Caractérisation thermographique par DSC	44
IV.2.2.6. Potentiel zêta et indice de polydispersité	44
IV.2.2.7. Calcul du taux de charge et de l'efficacité d'encapsulation	45
IV.2.2.8. Calcul du rendement	46
IV.3. Etude du gonflement	47
IV.4 Test de fluorescence de l'acide salicylique	47
IV.5. Etude de la cinétique de libération <i>in vitro</i> de l'acide salicylique	48
IV.5.1. Dans le SGF	48
IV.5.2. Dans le PBS	49

Chapitre V : Résultats et discussions

Introduction	50
V.1. Préparation des vecteurs à base de chitosane	50
V.2. Caractérisation	52
V.2.1. Caractérisation du chitosane	52
V.2.1.1. Caractérisation structurale par Infra-Rouge à Transformée de Fourier	52
V.2.1.2. Détermination du degré de désacétylation du chitosane par FTIR	53

V.2.1.3. Mesure de la viscosité et détermination du poids moléculaire viscosimétrique	54
V.2.2. Caractérisation des vecteurs à base de chitosane	55
V.2.2.1. Aspect physique	55
V.2.2.2. Caractérisation spectroscopique par FTIR	56
V.2.2.2.1. Microparticules	56
V.2.2.2.2. Nanoparticules	58
V.2.2.3. Caractérisation morphologique par MEB	61
V.2.2.3.1. Microparticules	61
V.2.2.3.2. Nanoparticules	63
V.2.2.4. Caractérisation structurale par DRX	65
V.2.2.4.1. Microparticules	65
V.2.2.4.2. Nanoparticules	67
V.2.2.5. Caractérisation thermographique par DSC	69
V.2.2.6. Potentiel zêta et indice de polydispersité	73
V.2.2.6.1. Microparticules	74
V.2.2.6.2. Nanoparticules	74
V.2.2.7. Calcul du taux de charge et de l'efficacité d'encapsulation	76
V.2.2.8. Calcul du rendement	77
V.2.2.8.1. Microparticules	77
V.2.2.8.2. Nanoparticules	77
V.3. Etude du gonflement	78
V.3.1. Vecteurs micro et nanoparticulaires vides	78
V.3.2. Vecteurs micro et nanoparticulaires chargés d'acide salicylique	80
V.4. Test de fluorescence de l'acide salicylique	82
V.5 Etude de la cinétique de libération <i>in vitro</i> de l'acide salicylique	83
Comparaison entre les microparticules et les nanoparticules	85
Comparaison entre SGF (pH 1.2) et PBS (pH 7.4)	85
Comparaison entre AS libre et AS encapsulé	86
Conclusion	87
Références	
Conclusion générale	89
Annexes	

Liste des abréviations

% : Pourcentage

° : Degré

°C : Degré Celcius

AN : Application Numérique

AS : Acide Salicylique

AVC : Accident vasculaire cérébral

BHA : Acide betahydroxy

C : Concentration

cm⁻¹ : Centimètre moins un

CS : Chitosane

DA : Degré d'acétylation

DD : Degré de désacétylation

dl/g : Décilitre par gramme

DLS : Diffusion dynamique de la lumière

DRX : Diffraction des Rayons X

DSC : Calorimétrie Différentielle à Balayage

EE : Efficacité d'encapsulation

FTIR : Spectroscopie Infrarouge à Transformé de Fourier

g : Gramme

g/dl : Gramme par décilitre

g/mol : Gramme par mole

h : heures

kV : Kilovolt

M : Molaire

MEB : Microscope Electronique à Balayage

mg : Milligramme

mg/ml : Milligramme par millilitre

min : Minute

mL : Millilitre

ml/g : Millilitre par gramme

MM : Masse moléculaire

mV : Millivolt

M_v : Poids moléculaire viscosimétrique moyen

NB : Nota bene

nm : Nanomètre

NP : Nanoparticule

PA : Principe Actif

PBS : Tampon Phosphate Salin (Phosphate Buffer Saline)

PEG : polyéthylène glycol

pH : Potentiel Hydrogène

SGF : Milieu gastrique simulé (Simulated Gastric Fluid)

TC : Taux de charge

Tg : Température de transition vitreuse

tours/min : Tours par minute

TPP : TriPolyPhosphate

UV : Ultraviolet

μm : Micromètre

μP : Microparticule

λ : Longueur d'onde

τ : Rendement

Liste des figures

PARTIE THEORIQUE

<i>Figure I.1 : Structure de la chitine, du chitosane et de la cellulose</i>	3
<i>Figure I.2 : Procédé de fabrication de la chitine et du chitosane</i>	4
<i>Figure II.1 : Gamme de taille du nanomonde</i>	11
<i>Figure II.2 : Rapport de taille en une nanoparticule, une orange et la terre</i>	11
<i>Figure II.3 : Différents types de nanoparticules</i>	16
<i>Figure II.4 : Schéma d'un nanovecteur de troisième génération ciblant une tumeur</i>	19
<i>Figure II.5 : Différentes générations de nanoparticules</i>	19
<i>Figure III.1 : Evolution de la concentration du médicament dans le sang en fonction du temps avec et sans vectorisation</i>	28
<i>Figure III.2 : Structure de l'acide salicylique</i>	29
<i>Figure III.3 : Diagramme de Jablonski</i>	31

PARTIE EXPERIMENTALE

<i>Figure IV.1 : Bain à ultrasons, Ultracentrifugeuse, PH mètre</i>	35
<i>Figure IV.2 : Spectrophotomètre FTIR</i>	37
<i>Figure IV.3 : Viscosimètre</i>	38
<i>Figure IV.4 : Microscope Electronique à Balayage</i>	40
<i>Figure IV.5 : Diffractomètre à Rayons X</i>	40
<i>Figure IV.6 : Appareil de Calorimétrie Différentielle à Balayage</i>	41
<i>Figure IV.7 : Appareil de mesure du potentiel zêta</i>	42
<i>Figure IV.8 : Bain Cryostat</i>	45
<i>Figure IV.9 : Spectrophotomètre UV</i>	46
<i>Figure V.1: Schéma de formation des micro/nanoparticules</i>	47
<i>Figure V.2: Formation de solution opalescente attribuée à la formation des μP et NP</i> ..	48
<i>Figure V.3 : Principe de formation des micro/nanoparticules</i>	49
<i>Figure V.4: Spectre FTIR du chitosane</i>	49
<i>Figure V.5 : Variation de la viscosité en fonction de la concentration</i>	51

<i>Figure V.6: Vue macroscopique des μP et NP avant séchage, après séchage.....</i>	<i>52</i>
<i>Figure V.7: Spectre FTIR des microparticules vides.....</i>	<i>53</i>
<i>Figure V.8 : Spectre FTIR des microparticules chargées d'acide salicylique.....</i>	<i>54</i>
<i>Figure V.9: Spectre FTIR des nanoparticules vides.....</i>	<i>55</i>
<i>Figure V.10: Spectre FTIR des nanoparticules chargées d'acide salicylique.....</i>	<i>57</i>
<i>Figure V.11: Images MEB de microparticules vides.....</i>	<i>58</i>
<i>Figure V.12 : Images MEB de microparticules chargées d'acide salicylique.....</i>	<i>59</i>
<i>Figure V.13 : Images MEB de nanoparticules vides.....</i>	<i>60</i>
<i>Figure V.14: Images MEB de nanoparticules chargées d'acide salicylique.....</i>	<i>61</i>
<i>Figure V.15: Diffractogramme des microparticules vides.....</i>	<i>62</i>
<i>Figure V.16: Diffractogramme des microparticules chargées.....</i>	<i>63</i>
<i>Figure V.17: Diffractogramme des nanoparticules vides.....</i>	<i>64</i>
<i>Figure V.18: Diffractogramme des nanoparticules chargées.....</i>	<i>65</i>
<i>Figure V.19 : Thermogramme DSC des microparticules vides.....</i>	<i>67</i>
<i>Figure V.20 : Thermogramme DSC des microparticules chargées.....</i>	<i>67</i>
<i>Figure V.21: Thermogramme DSC des nanoparticules vides.....</i>	<i>68</i>
<i>Figure V.22: Thermogramme DSC des nanoparticules chargées.....</i>	<i>68</i>
<i>Figure V.23: Courbe d'étalonnage de l'acide salicylique à 297nm.....</i>	<i>73</i>
<i>Figure V.24 : Etude du gonflement des microparticules vides à pH 1.2 et 7.4.....</i>	<i>75</i>
<i>Figure V.25: Etude du gonflement des nanoparticules vides à pH 1.2 et 7.4.....</i>	<i>76</i>
<i>Figure V.26 : Etude du gonflement des microparticules chargées à pH 1.2 et 7.4.....</i>	<i>77</i>
<i>Figure V.27: Etude du gonflement des nanoparticules chargées à pH 1.2 et 7.4.....</i>	<i>78</i>
<i>Figure V.28 : Fluorescence bleue de l'acide salicylique sous lampe UV.....</i>	<i>79</i>
<i>Figure V.29: Cinétique de libération in vitro de l'acide salicylique à partir des μP et NP dans le SGF.....</i>	<i>80</i>
<i>Figure V.30: Cinétique de libération in vitro de l'AS à partir des μP et NP dans le PBS.....</i>	<i>81</i>
<i>Figure V.31: Libération de l'acide salicylique non encapsulé.....</i>	<i>83</i>

Liste des tableaux

<i>Tableau I.1: Propriétés physico-chimiques et biologiques du chitosane</i>	<i>7</i>
<i>Tableau I.2 : Domaines d'application du chitosane</i>	<i>8</i>
<i>Tableau II.1: Exemples d'utilisation des nanotechnologies.....</i>	<i>21</i>
<i>Tableau III.1: Avantages et inconvénients des techniques d'encapsulation</i>	<i>26</i>
<i>Tableau III.2 : Quelques propriétés physico-chimiques de l'acide salicylique.....</i>	<i>29</i>
<i>Tableau V.1 : Groupements caractéristiques du chitosane</i>	<i>50</i>
<i>Tableau V.2 : Caractéristiques thermiques des systèmes préparés.....</i>	<i>69</i>
<i>Tableau V.3 : Tableau récapitulatif de la taille moyenne, l'indice de polydispersité et le potentiel zêta des quatre systèmes préparés</i>	<i>72</i>
<i>Tableau V.4 : Tableau récapitulatif du taux de charge et de l'efficacité d'encapsulation de l'acide salicylique.....</i>	<i>73</i>

Résumé

Des microparticules et des nanoparticules à base de chitosane vides et chargées d'acide salicylique ont été préparées par la méthode de la gélation ionotropique en utilisant le tripolyphosphate de sodium (TPP) comme agent de réticulation.

Plusieurs techniques analytiques comme la spectroscopie FTIR, la microscopie électronique à balayage (MEB), la diffraction des rayons X (DRX), la calorimétrie différentielle à balayage (DSC) ou l'analyse du potentiel zêta ont été utilisées afin de caractériser ces particules destinées à la vectorisation pharmaceutique. Par ailleurs, une étude sur le taux de gonflement de ces particules en milieu acide et en milieu basique a été entreprise.

Les résultats obtenus ont montré, d'une part, que l'acide salicylique en tant qu'agent actif a été bien retenu dans les systèmes particulaires préparés comme le montrait un test simple de fluorescence sous UV et, d'autre part, que la cinétique de libération *in vitro* dans des milieux biologiques simulés semble plus importante à pH basique et lorsque les nanoparticules sont considérées.

Mots clés : Chitosane – nanoparticules – acide salicylique – encapsulation – cinétique de libération.

Abstract

Chitosan microparticles and nanoparticles loaded with salicylic acid were prepared by ionotropic gelation, using sodium tripolyphosphate (TPP) as a cross-linker agent.

Various methods were used to characterize the micro/nanocarrier used for drug delivery system, such as Fourier-Transform InfraRed spectroscopy (FTIR) - Scanning Electron Microscopy (SEM) – X Ray Diffraction (XRD) – Differential Scanning Calorimetry (DSC) and the measurement of the zeta potential. Besides, a swelling study in both acidic and basic media was performed.

The results obtained from this study show firstly, that salicylic acid was well retained in the microparticles and nanoparticles prepared as an active agent as evidenced by a simple fluorescence under UV test, and secondly, that the *in vitro* kinetic release in simulated biological fluids seems more important at basic pH and when the nanoparticles are considered.

Keywords : Chitosan – nanoparticles – Salicylic acid – encapsulation – kinetic release.

ملخص

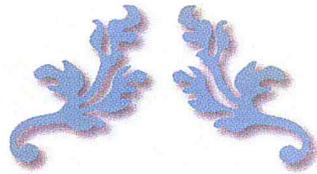
تم إعداد جسيمات مجهرية ونانومترية من الكيتوزان لتغليف مادة حمض السليسيليك حسب طريقة التهليم الشاردي، باستعمال TPP كمادة تشابك.

قصد تحديد خصائص هذه الأشعة المحضرة سابقا، قمنا بإخضاعها لسلسلة من الفحوصات والتحليل، كالتحليل الطيفي بالأشعة تحت الحمراء (FTIR) - تحليل انكسار الأشعة السينية (DRX) - التحليل بالمجهر الإلكتروني الماسح (MEB) و كذلك تحليل (Potentiel zeta).

من ناحية أخرى، قمنا بدراسة انتفاخ الجسيمات المجهرية والنانومترية وذلك في وسط حامضي وآخر قاعدي بالإضافة إلى حساب مدى تغليف حمض السليسيليك.

بينت النتائج المحصل عليها خلال هذه الدراسات أنه تم الاحتفاظ بحمض السليسيليك بشكل جيد من قبل الجسيمات المحضرة، كما من الممكن أن يتضح في فحص بسيط بالأشعة فوق البنفسجية، وأن حركية تحرير حمض السليسيليك في وسطين بيولوجيين مختلفين تبدو أهم في درجة حموضة قاعدية و عند استعمال جسيمات نانومترية، مما يضمن افراج مستدام.

كلمات مفتاحية : كيتوزان – جسيمات نانومترية – حمض الساليسيليك – كبسلة- حركية تحرير



INTRODUCTION GENERALE



Introduction générale

« **There is plenty of room at the bottom** », a dit mystérieusement Richard Feynman en 1959. Cette phrase devenue célèbre dans la communauté scientifique, signifie littéralement « il y a plein de place en bas ». C'est ainsi que ce fameux physicien a suggéré à ses confrères d'explorer le monde de l'infiniment petit.

De nos jours, la science a beaucoup progressé, et à une époque où la tendance est à la miniaturisation, les nanosciences et les nanotechnologies représentent des domaines pour lesquels la recherche est en plein essor. A l'échelle mondiale, les nanotechnologies suscitent de plus en plus d'intérêt et sont en voie de constituer le cœur de la prochaine révolution industrielle.

Cette nouvelle possibilité ouvre une foule de perspectives d'applications révolutionnaires, et trouve de nombreuses applications telles que l'électronique, l'automobile et plus particulièrement la médecine qui se voit déjà bénéficier de l'apport des nanotechnologies et qui reçoit chaque année d'énormes budgets d'investissement en recherche et développement.

En effet, les médicaments classiques ont l'inconvénient de presque tous avoir des effets secondaires sur l'organisme qui peuvent parfois être très contraignants. Seule une petite partie des médicaments atteint l'organe malade, l'autre partie se perd dans le reste du corps et a du mal à franchir les barrières naturelles de l'organisme. Comment peut-on alors limiter significativement les effets secondaires d'un médicament tout en préservant son efficacité, sans pour autant baisser la quantité administrée au patient ?

Afin de pallier ce problème, les chercheurs ont développé un nouveau procédé : la vectorisation d'agent thérapeutique. La vectorisation est un phénomène qui consiste à administrer des médicaments directement à la cellule malade afin d'éviter aux cellules saines d'être affectées, et cela grâce aux nanoparticules. Porté par le nanovecteur, le principe actif est en outre protégé d'une dégradation biologique avant d'atteindre son tissu cible. Il peut enfin être libéré de façon progressive dans le temps.

Les nanoparticules sont donc particulièrement efficaces pour administrer des médicaments. La petite taille et la biocompatibilité de ces dispositifs thérapeutiques les font aisément pénétrer dans l'organisme. Des nanovecteurs de plus en plus élaborés apparaissent et permettent de contourner les problèmes rencontrés à chaque génération de vecteurs. Ces systèmes enrobants sont d'origine lipidique, ou constitués de polymères biocompatibles et biodégradables, tels que le chitosane.

Introduction générale

Le chitosane, un polymère naturel dérivé de la chitine, est l'un des rares polyélectrolytes cationiques existant dans la nature. Il présente des propriétés particulièrement intéressantes qui en font un matériau fréquemment utilisé dans le domaine des biomatériaux : régénération des tissus [1], reconstruction osseuse [2] ou encore vectorisation de molécules actives [3]. Le chitosane est donc un excellent candidat à l'encapsulation de principes actifs à visée thérapeutique, notamment en termes de biocompatibilité.

Ainsi, l'utilisation des nanotechnologies, et notamment de nanoparticules, dans le cadre plus spécifique de la médecine (ce que l'on appelle désormais nanomédecine) connaît actuellement de grands progrès et devrait permettre d'améliorer le diagnostic et le traitement de nombreuses pathologies (cancers, maladies auto-immunes ou infectieuses par exemple). Le nanomonde pourrait bien s'imposer comme LA technologie du XXI^{ème} siècle et le monde entier serait imprégné du nano.

Le premier objectif de ce travail est de préparer –par la méthode de la gélation ionotropique- puis de caractériser des microparticules et des nanoparticules vides à base de chitosane, en utilisant le TPP comme agent de réticulation.

Le second objectif est d'utiliser ces micro/nanoparticules à base de chitosane comme vecteurs de molécules d'intérêt pharmaceutique dans l'organisme, en encapsulant de l'acide salicylique.

Le troisième et dernier objectif est d'étudier la cinétique de libération *in vitro* de l'acide salicylique à partir des micro/nanoparticules préparées ultérieurement, et cela dans deux (02) milieux biomimétiques qui simulent les conditions gastriques et intestinales, respectivement.

Ce manuscrit comporte deux grandes parties :

Une partie théorique consacrée à la revue bibliographique, et qui comporte trois chapitres :

- ✚ Un premier chapitre dont l'objectif est de décrire les principales propriétés et les avantages du chitosane. Après un rappel sur sa source et sa préparation industrielle, nous insisterons sur ses nombreuses propriétés physico-chimiques et biologiques et nous décrirons ses principaux domaines d'application.
- ✚ Le deuxième chapitre est consacré à la description des micro/nanoparticules, leur classification ainsi que leurs diverses applications.

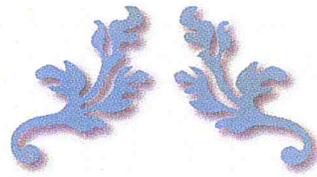
Introduction générale

- ✚ Le troisième et dernier chapitre consiste en un rappel sur l'encapsulation, son importance et ses applications, notamment dans le domaine médical.

Une partie expérimentale organisée en deux chapitres :

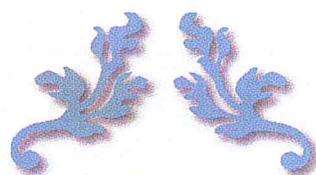
- ✚ Le premier chapitre, intitulé « Matériels et méthodes » présente le matériel d'étude, les protocoles expérimentaux, ainsi que la description des appareillages et techniques d'analyse utilisés au cours de ce travail.
- ✚ Le deuxième chapitre est dédié à la présentation des résultats obtenus, accompagnés de leur interprétation et des discussions portant sur ces résultats.

Enfin, une conclusion générale présentera le bilan de ce travail en reprenant les principaux résultats obtenus, et dressera les perspectives envisagées pour la suite de la recherche.



PARTIE
THEORIQUE





CHAPITRE I

Le chitosane



Introduction

Les polysaccharides sont des polymères composés d'unités de sucre sous leur forme cyclique. Ils sont présents naturellement sous d'innombrables structures et compositions.

Le chitosane est un de ces biopolymères. Il est généralement dérivé de la chitine. Hormis la cellulose, la chitine est le biopolymère le plus abondant sur la Terre.

Ces polymères non-pétroliers et biodégradables [4] sont au cœur des sujets d'étude de plusieurs groupes de recherche.

L'intérêt croissant que suscitent ces substances est dû à plusieurs facteurs : leur disponibilité, leur architecture, leur coût et principalement, le potentiel qu'elles représentent pour une multitude d'applications dans des domaines variés. Pour n'en énumérer que quelques-uns, citons le traitement des eaux, les matériaux, l'agroalimentaire, les biotechnologies, la catalyse chimique et le secteur pharmaceutique [5]. Et du fait que la chitine et le chitosane soient deux biopolymères produits par certains animaux, ils sont donc biodégradables et biorésorbables. Ces deux propriétés sont primordiales à notre époque où la protection de l'environnement joue un rôle important.

La « richesse » du chitosane, notamment son degré de désacétylation à l'origine de son potentiel, additionnée aux propriétés biologiques auparavant mentionnées, en font un polymère particulièrement intéressant pour une multitude d'applications.

I.1. Découverte de la chitine et du chitosane

La chitine a été découverte en 1811 par le Français *Henri Braconnot*, qui a isolé un résidu impur à partir des parois cellulaires des champignons [6]. Il appela cette substance «fungine ». Notons que cette découverte précède l'identification de la cellulose d'environ une trentaine d'années.

En 1823, *Odier* a extrait un composé similaire, mais cette fois à partir de la cuticule de l'exosquelette d'un insecte [7]. En traitant la cuticule de coléoptère par de la potasse à chaud, il a obtenu un produit insoluble qu'il nomma chitine (mot grec qui signifie tunique ou enveloppe). Ce n'est que 36 ans plus tard, en 1859, que *Rouget* remarqua que la chitine modifiée, préparée à partir de chitine traitée par de la potasse à chaud, était soluble dans des solutions aqueuses acides [8]. Cette propriété a alors été utilisée pour distinguer cette nouvelle substance de la chitine.

Chapitre I : Le chitosane

Le nom chitosane a été introduit pour la première fois en 1894 par *Hoppe-Seyler*, mais la découverte du chitosane est néanmoins attribuée à *Rouget* [9].

Bien que la chitine et le chitosane soient connus depuis le 18^{ème} siècle, ce n'est que depuis une trentaine d'années que l'intérêt pour la chitine et le chitosane s'est substantiellement accru avec la parution des premiers ouvrages exclusivement consacrés à ces substances.

Actuellement, ces biopolymères font l'objet de nombreuses recherches, tant sur le plan fondamental que sur le plan appliqué [10], et intéressent de nombreux domaines.

I.2. Sources du chitosane

Le chitosane est dérivé de la chitine, le deuxième polysaccharide naturel le plus abondant dans la nature après la cellulose [11].

La chitine est présente au sein d'une pléiade d'organismes. C'est un composant d'origine naturelle issu de la biomasse. Elle est produite par les insectes (blattes, coléoptères, fourmis), les arachnides (scorpions, araignées) et les animaux marins (crabes, crevettes, homards, langoustines, calamars).

Ce polymère se trouve également dans la paroi de la plupart des champignons et dans certaines algues chlorophycées, levures et bactéries [12].

Cependant, les principales sources industrielles de chitine et de chitosane sont les exosquelettes de crustacés provenant de l'industrie de la transformation du crabe et de la crevette.

I.3. Structure chimique et caractéristiques structurales du chitosane

Le chitosane est un polysaccharide appartenant à la famille des glycosaminoglycanes [13]. C'est un copolymère linéaire à arrangement aléatoire d'unités D-glucosamine et d'unités N-acétyl-D-glucosamine reliées par des liaisons β -(1→4).

Les structures de la chitine, du chitosane et de la cellulose diffèrent uniquement au niveau des groupements en position C-2 : hydroxyle pour la cellulose, acétamide pour la chitine et amine pour le chitosane (**Fig.I.1**). Cette particularité structurale confère au chitosane une plus grande variabilité au niveau des groupes fonctionnels.

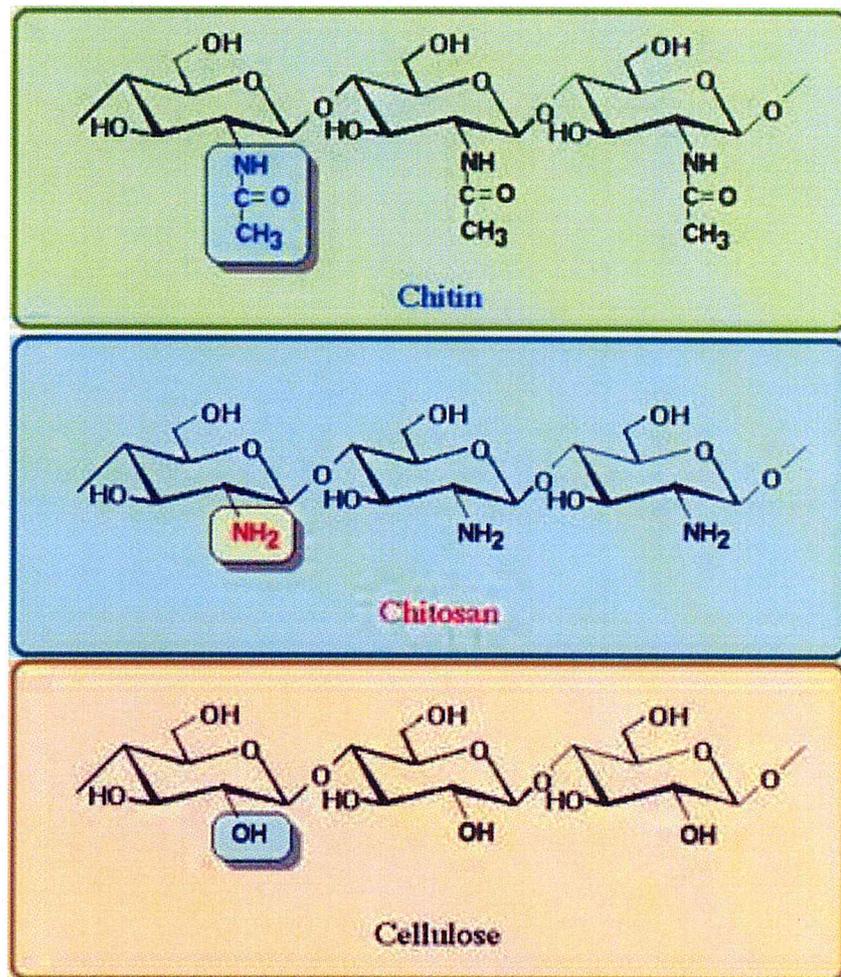


Figure I.1 : Structures de la chitine, du chitosane et de la cellulose

I.4. Préparation du chitosane

Le chitosane est le produit de la désacétylation (enlèvement des groupements acétyles) chimique en milieu alcalin ou enzymatique de la chitine.

Le procédé de fabrication de la chitine et du chitosane est résumé dans la **Figure I.2** [14].

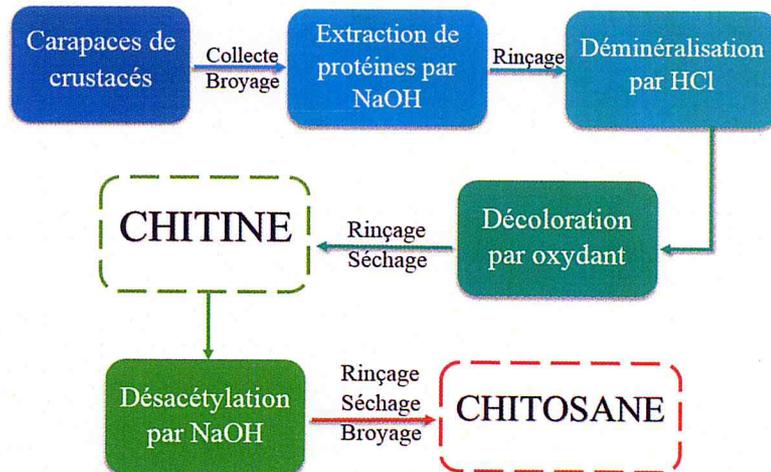


Figure I.2 : Procédé de fabrication de la chitine et du chitosane

Le chitosane obtenu possède généralement un taux de désacétylation voisin de 70-80 %. Il se présente sous la forme d'un solide semi-cristallin ayant une couleur orange brûlé et ne diffère de la chitine que par les groupes amines ($-NH_2$), chargés positivement.

La qualité du chitosane varie selon l'origine de la matière première utilisée (crevettes, crabes, calamars...) et de la procédure expérimentale d'extraction. En effet, il est à noter que les trois étapes d'extraction de la chitine (déprotéinisation, déminéralisation et décoloration) ainsi que l'étape de désacétylation influencent la qualité du produit fini, à savoir le chitosane. Des conditions trop drastiques conduisent à une dégradation physique du biopolymère (avec une chute importante de la masse moléculaire et/ ou une oxydation des extrémités réductrices des chaînes macromoléculaires), alors que des conditions trop douces ne permettent pas une désacétylation suffisante.

I.5. Caractérisation du chitosane

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

I.5.1. Degré de désacétylation

Le degré de Désacétylation (DD) du chitosane est le pourcentage molaire de l'élimination des groupements N-acétyl de la chitine.

Le traitement alcalin de la chitine conduit généralement à une désacétylation partielle. Pour obtenir une désacétylation totale, il conviendrait de procéder à une série de traitements

successifs avec le risque de voir diminuer de manière dramatique la masse moléculaire du polymère.

Le paramètre DD est extrêmement important car il influence les propriétés des chaînes macromoléculaires des polymères et leur comportement en solution [15], à savoir :

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

La réaction de désacétylation étant rarement complète, tous les groupements amines de la chitine ne sont pas hydrolysés ce qui conduit à une distribution aléatoire des motifs. Le terme chitosane s'applique à tout copolymère dont le degré de désacétylation est supérieur à 50%.

Le DD peut être déterminé par analyse élémentaire (analyse du % d'azote), par titrages potentiométriques ou conductimétriques, par diffraction des rayons X, par spectrophotométries infra-rouge à transformée de Fourier et UV, ou encore par résonance magnétique nucléaire (RMN) liquide ou solide (essentiellement proton ^1H et carbone ^{13}C , voire azote ^{15}N) [16].

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

I.5.2. Masse moléculaire

La seconde caractéristique importante est la masse moléculaire (MM). La détermination de la MM, qui nécessite la mise en solution du chitosane peut être déterminée par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC). Toutefois, le viscosimètre demeure une méthode simple et rapide pour connaître le poids moléculaire en utilisant la formule de Marc-Houwink et Sakurada [17].

La MM affecte la solubilité du chitosane et ses propriétés rhéologiques notamment sa viscosité. Elle peut également influencer significativement sur les propriétés du polymère en solution, comme le paramètre DD.

Par exemple, une viscosité élevée peut limiter la possibilité de manipuler des solutions concentrées et d'obtenir des matériaux à forte densité en chitosane. Il s'agit alors de réaliser un compromis entre la rigidité du système (favorisée par des chitosanes de haute masse) et les propriétés rhéologiques de la solution (manipulation aisée pour des polymères de faible masse).

I.5.3. Solubilité

Le chitosane est insoluble dans l'eau, les solvants purs, les solutions alcalines concentrées ou diluées et les acides concentrés, en raison de l'impossibilité d'hydrater le matériau. Il est, par contre, soluble dans la plupart des solutions organiques acides [18]. L'acide le plus couramment utilisé pour préparer une solution de chitosane est l'acide acétique dilué. En général, le chitosane est parfaitement soluble à pH 3-4. En effet, les groupes aminés du chitosane sont protonés à partir de ce pH et le polymère chargé positivement devient soluble.

La valeur du DD influence fortement sa solubilité. Lorsque le DD est peu élevé c'est-à-dire lorsque les groupements amine sont en faible quantité, le chitosane est peu soluble. En général, on utilise du chitosane avec un DD supérieur à 70 % pour augmenter sa solubilité.

I.5.4. Viscosité

Une autre caractéristique importante du chitosane concerne son comportement en solution, et en particulier sa viscosité.

Ce paramètre est déterminé par viscosimétrie. La viscosité va dépendre, non seulement du DD, mais aussi du pH car ces deux paramètres déterminent la densité de charge sur la chaîne de polymère [19]. Lorsque celle-ci est élevée, la conformation des macromolécules est très étendue en raison des phénomènes de répulsion des charges et la viscosité des solutions est alors importante. En revanche, lorsque le polymère est peu chargé, les chaînes macromoléculaires sont sous forme de pelotes statistiques caractérisées par une faible viscosité (phénomènes d'interactions entre les chaînes). Plus le pH est bas, plus la viscosité est donc forte.

La viscosité augmente également avec le DD car plus le polymère est désacétylé, plus la proportion de groupements amines libres est importante et plus il est soluble. Elle augmente aussi avec la concentration et elle est fonction de la MM des chaînes macromoléculaires. Enfin, comme pour les autres polysaccharides, la viscosité chute lorsque la température augmente.

I.6. Propriétés physico-chimiques et biologiques du chitosane

Bien que l'intérêt porté au chitosane ne date réellement que d'une trentaine d'années, les études sur ses applications dans le domaine biomédical ne cessent de se développer, comme le montrent les nombreuses revues publiées chaque année dans la littérature. Ce biopolymère possède d'exceptionnelles propriétés physico-chimiques et biologiques, propriétés à la fois

variées et complémentaires que nous allons résumer dans le tableau suivant :

<p>Propriétés physiques et chimiques</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Structure D-glucosamine rigide et semi-cristalline ; • Amino polysaccharide linéaire et hydrophile + % azote élevé ; • Capacité à former des liaisons hydrogène (pouvoir viscosifiant) ; • Réactivité des groupements amino et hydroxyle ; • Base faible (pKa ~ 6,3) (caractère nucléophile de l'amine) ; • Insoluble dans l'eau et les solvants organiques ; • Soluble dans les solutions acides diluées par protonation des fonctions amines ; • Conductivité ionique ; • Présence de fonction amine le long de la chaîne macromoléculaire → réalisation de réactions chimiques spécifiques à cette fonction (<i>N</i>-alkylation ou la <i>N</i>-carboxylation) ; • Se décompose par chauffage à partir de 185 °C sans fondre.
<p>Propriétés polyélectrolytes en milieu acide</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Polyamine cationique (interactions avec des molécules anioniques) ; • Forte densité de charges positives (transformation de NH₂ en NH₃⁺ en milieu acide) ; • Excellent flocculant ; • Propriétés chélatantes et complexantes ; • Propriétés d'encapsulation.
<p>Propriétés biologiques</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Non-toxique ; • Biodégradable ; • Biocompatible (absorbable) ; • Bioadhésif (muco-adhésivité) ; • Bioactif (activités antimicrobienne et antifongique, agents antiacide, antiulcère et antitumorale, propriétés cicatrisantes, anticoagulantes et anticholestérol).
<p>Autres</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Propriétés de rétention d'eau ; • Propriété d'adhésion à des surfaces chargées négativement ; • Propriétés filmogènes.

Tableau I.1: Propriétés physico-chimiques et biologiques du chitosane [20]

Les propriétés physico-chimiques et biologiques du chitosane ont donné lieu à de nombreuses applications que l'on détaillera dans le paragraphe qui suit.

I.7. Applications du chitosane

Compte tenu de sa structure chimique, et en mettant à profit ses diverses propriétés spécifiques, le chitosane trouve des applications importantes dans plusieurs secteurs. Le tableau ci-dessous résume les divers domaines d'application du chitosane.

Domaine d'application	Exemple
Biomédical et pharmaceutique	Accélération de la cicatrisation des blessures (médecine)
	Agent anticoagulant / agent anti-infectieux, anti-bactérien, anti-fongique (biologie cellulaire)
	Matériau absorbable avec possibilité de contrôle de libération de principes actifs (pharmacie)
	Gels et implants dentaires (dentisterie et chirurgie dentaire)
Cosmétique	Agent épaississant (gélifiant)
	Agent stabilisant (émulsion)
	Crèmes de soins, lotions, shampoings, produits de rinçage
Agroalimentaire	Additifs (liant, émulsifiant, stabilisant, épaississant)
	Activité anti-bactérienne (préservation des aliments)
	Extraction du fer (mauvaise odeur dans les viandes)
Agriculture	Fongicide («bio-pesticide») fertilisant
	Vaccination animale
	Protection des cultures
Traitement des eaux	Chélation de métaux lourds : réduction des métaux toxiques
	Traitement des eaux usées (agent coagulant)
	Traitement des eaux de piscines (agent chélatant)
Autres	Chimie : catalyse / films biodégradables (emballages) / séparations membranaires (filtration)
	Papeterie : additifs pour pâtes à papiers (augmentation de la résistance du papier à la déchirure)
	Textile : agent anti-bactérien et imperméabilisant dans la filière textile - nanomatériaux « intelligents »

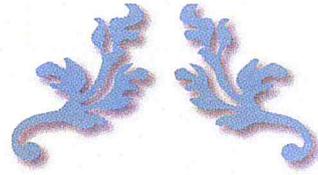
Tableau I.2 : Domaines d'application du chitosane [20]

Conclusion

Le chitosane est un biopolymère d'une importance croissante pour l'industrie et qui a des impacts significatifs sur la recherche et le développement dans des domaines aussi variés que la chimie, la biologie, la santé ou encore la protection de l'environnement.

Ses propriétés exceptionnelles expliquent l'engouement pour cette macromolécule naturelle, considérée il y a encore peu comme déchet. Il s'est avéré que l'utilisation de ce produit d'origine marine, très bon marché, concerne de nombreux secteurs industriels, allant des cosmétiques à l'industrie agroalimentaire, en passant par la pharmacie et l'ingénierie biomédicale. Les perspectives sont variées et nombreuses.

De nouveaux marchés prometteurs sont également susceptibles de s'ouvrir, comme par exemple dans le domaine des biotechnologies, où le chitosane est utilisé pour l'élaboration de vecteurs nanoparticulaires destinés à la livraison d'agent thérapeutique vers une cible précise. D'ailleurs, les nanoparticules feront l'objet de notre étude bibliographique dans le chapitre qui suit, chapitre consacré à leur description, classification et diverses applications.



CHAPITRE II

Les nanoparticules



La taille est le seul paramètre qui différencie les systèmes microparticulaires des systèmes nanoparticulaires. De par leurs propriétés, leurs avantages et les espoirs qu'elles soulèvent, les nanoparticules suscitent l'engouement de grand nombre de scientifiques qui misent l'avenir de notre ère sur cette perspective de développement nouvelle. C'est la raison pour laquelle nous allons nous focaliser que sur les nanoparticules tout au long de ce chapitre.

Introduction

Les **nanotechnologies** et les **nanosciences** sont l'étude, la fabrication et la manipulation de structures, de dispositifs et de systèmes matériels à l'échelle du milliardième de mètre, où les propriétés diffèrent significativement de celles à plus grande échelle [21]. Elles trouvent des applications dans les domaines de la physique, de la chimie et de la biologie.

La nanomédecine (ou nano-biotechnologie) est l'application des nanosciences à la recherche biomédicale. Les propriétés particulières d'interaction des nanoparticules avec le vivant en font des outils extrêmement intéressants pour plusieurs domaines de la recherche fondamentale et clinique, tels que la fabrication des biomatériaux, le diagnostic, l'administration de médicaments, la vaccination, la médecine régénératrice et l'imagerie médicale [22]. Dans tous ces domaines, l'utilisation des nanoparticules connaît un essor croissant et montre des résultats prometteurs. L'émergence des nanosciences est par conséquent une avancée technologique majeure de ces dernières décennies, qui offre des possibilités nouvelles pour de nombreuses applications.

Les nanomédicaments pourraient améliorer la balance bénéfice-risque des médicaments en augmentant leur efficacité et leur biodisponibilité au niveau du tissu ou de l'organe cible, tout en réduisant les doses à administrer et le risque de toxicité. Alors, qu'est qu'une nanoparticule ? De quoi est-elle constituée ? Comment l'utiliser et quels sont ses avantages ? Autant de questions que l'on pourrait se poser, et que l'on a choisi de développer tout au long de ce chapitre.

II.1. Généralités

Depuis quelques années, un des axes principaux de la recherche dans le domaine de l'encapsulation concerne les vecteurs nano et microparticulaires de nature polymérique ou lipidique. Ces systèmes sont nombreux et variés aussi bien dans leur composition que dans leur

Chapitre II : Les nanoparticules

mode d'obtention et les paramètres qui gouvernent leurs propriétés physico-chimiques sont tout aussi nombreux.

La taille de la nanoparticule est sa principale caractéristique, qui couplée à certaines autres caractéristiques chimiques, va permettre aux nanoparticules d'être si uniques, innovantes et révolutionnaires.

Les nanoparticules se situent principalement dans la gamme de taille correspondant aux protéines comme l'illustre la figure ci-dessous :

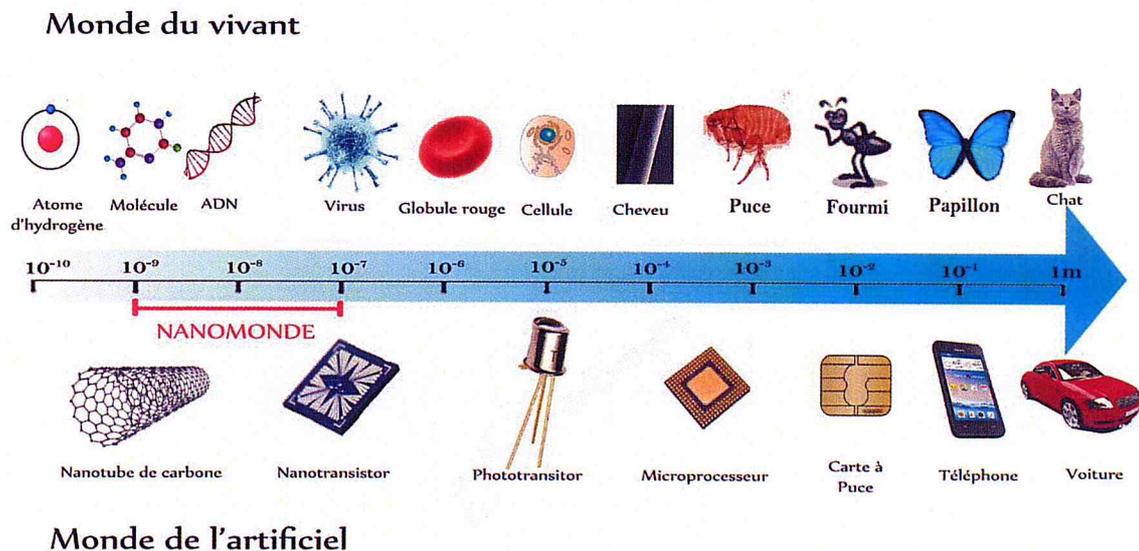


Figure II.1 : Gamme de taille du nanomonde

A titre de comparaison, il existe le même rapport de taille entre une orange et la Terre qu'entre une nanoparticule et une orange (fig. II.2). Cette caractéristique dimensionnelle confère à ces matériaux des comportements particuliers et des propriétés très intéressantes.

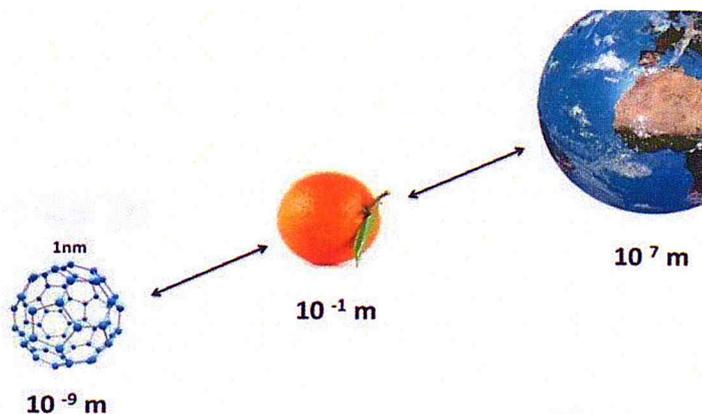


Figure II.2 : Rapport de taille en une nanoparticule, une orange et la Terre

On est donc d'emblée confronté à une échelle de grandeur impressionnante, sur laquelle les chercheurs n'ont commencé à se pencher que ces dernières années. En effet, l'obsession de l'infiniment grand leur a fait oublier que l'infiniment petit existe aussi, et qu'il n'a pas encore été complètement exploré.

II.2. Qu'est-ce qu'une nanoparticule ?

Le préfixe «nano» vient du grec «nannos» qui signifie «nain». Outre cet aspect étymologique, il désigne une échelle de grandeur de l'ordre du milliardième de mètre (10^{-9} m). Conformément à la norme européenne ISO TC 229, une nanoparticule est un objet qui a une taille comprise entre 1 et 100 nm sur au moins une de ses dimensions. [21]

A titre d'exemple, un nanomètre c'est environ 80 000 fois plus fin que l'épaisseur d'un cheveu et 70 fois plus petit qu'un virus.

II.3. Classification

Les nanoparticules sont classées en deux catégories en fonction de leur origine : les nanoparticules naturelles et les nanoparticules anthropiques (produites par l'homme).

- ✚ Les nanoparticules naturelles sont produites dans la nature sans l'intervention de l'homme. Nous y retrouvons par exemple, les cendres volcaniques, les poussières ultrafines, les virus, les débris bactériens et les grains de pollen. L'existence des nanoparticules n'est donc pas relative à notre siècle, synonyme de développement et d'avancées technologiques.
- ✚ Les nanoparticules anthropiques quant à elles sont classées en deux catégories, selon qu'elles soient produites de façon intentionnelle ou non.
 - Les nanoparticules anthropiques non-intentionnelles sont principalement des débris de combustion issus de l'activité humaine. Ce sont par exemple des nanoparticules de diesel provenant de la combustion d'hydrocarbures, ou des cendres issues des combustions ménagères et industrielles.
 - Les nanoparticules anthropiques intentionnelles (synthétiques) sont fabriquées volontairement par l'homme et trouvent leurs intérêts dans de nombreuses applications. [23]

II.4. Types de nanoparticules

En fonction de la nature chimique des nanoparticules, de leur structure, des propriétés physico-chimiques de la matière active et de la matière enrobante, et de la technique utilisée, plusieurs catégories de nanoparticules sont utilisées en vectorisation.

II.4.1. La nanocapsule

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. [23]

II.4.2. La nanosphère

La nanosphère est une nanoparticule constituée d'un polymère enchevêtré formant un réseau, ce polymère étant de préférence biodégradable.

Elle peut être poreuse ou pleine. Cette dernière est une structure nanométrique compacte, de formes généralement sphériques, synthétisée à base de polymères ou de copolymères. La molécule à vectoriser peut être associée à la surface de la nanoparticule déjà formée (adsorption), ou bien incorporée à l'intérieur de la structure polymérique pendant la fabrication de la nanoparticule (encapsulation) [24]. 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.

II.4.3. Le liposome

Les liposomes furent fabriqués pour la première fois en 1965 par *Alec Bangham* et ses collègues alors qu'ils effectuaient des recherches sur les propriétés de la bicouche lipidique de la membrane plasmique. [25]

Il s'agit d'une vésicule biodégradable constituée d'une double couche de phospholipides et d'un compartiment aqueux au centre de la nanoparticule. Lorsque le principe actif à stocker dans le liposome est hydrophile, il est encapsulé dans le compartiment aqueux, mais lorsqu'il est lipophile, il est placé dans la bicouche de lipides.

Chapitre II : Les nanoparticules

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

La structure phospholipidique du liposome est proche de celle de la membrane cellulaire : on dit que le liposome est biomimétique. Cette propriété fait des liposomes des vecteurs biocompatibles et leur permet de fusionner avec la cellule en libérant le principe actif qu'ils contiennent. D'ailleurs, les liposomes sont depuis de nombreuses années, utilisées comme outils pour la biologie, la biochimie et la médecine en tant que transporteurs de principes actifs thérapeutiques ou d'agents d'imagerie. [26]

Cependant, les liposomes présentent également quelques limitations : ils ont effectivement montré une faible capacité d'encapsulation, une stabilité modérée, une production délicate, et un relargage précoce des principes actifs hydrophiles dans le sang. [27]

II.4.4. La micelle

Les micelles sont des auto-assemblages de molécules amphiphiles qui forment des structures de type cœur-coquille (« core-shell » en anglais) d'environ 10 à 100nm. Elles se forment lorsque la concentration en surfactants dans le milieu dépasse une valeur seuil nommée « concentration micellaire critique ». [28]

En solution aqueuse, les molécules amphiphiles s'organisent spontanément et adoptent la conformation structurale la moins coûteuse en énergie, en minimisant les interactions de leurs parties hydrophobes avec l'environnement aqueux.

En milieu organique en revanche, les molécules amphiphiles adoptent le comportement inverse et ce sont les parties hydrophiles qui sont orientées au cœur de la micelle. Ces propriétés des micelles en font des nanoparticules intéressantes car elles sont faciles à préparer et peuvent permettre d'incorporer des molécules aussi bien hydrophiles qu'hydrophobes.

II.4.5. Les nanoparticules polymériques

Les premières nanoparticules polymériques développées par Couvreur *et al.* dans les années 1980 sont à base de polyalkylcyanoacrylates.

Différents polymères ont ensuite été utilisés avec succès pour former des nanoparticules, les plus couramment utilisés actuellement étant le poly(acide lactique), le poly(acide glycolique) et leur copolymère le poly(lactide-coglycolide), respectivement abrégés en anglais PLA, PGA et PLGA. Ces polymères ont l'avantage de présenter une meilleure stabilité que les liposomes, d'avoir une grande biocompatibilité et d'être biodégradables par l'organisme. Ils sont ainsi

Chapitre II : Les nanoparticules

utilisés depuis de nombreuses années pour fabriquer des dispositifs médicaux et des implants sous-cutanés.

Des polymères à base de polypeptides, polynucléotides, ou de polysaccharides sont également employés pour l'obtention de nanoparticules. [29]

Parmi les nanoparticules polymériques, on peut également citer l'existence des dendrimères et des nanogels.

Les dendrimères sont une catégorie émergente de nanoparticules synthétisées pour la première fois au début des années 1980. Ce sont des complexes polymériques de taille comprise entre 1 et 10 nm qui, à partir d'un monomère possédant au moins trois sites réactifs et formant le cœur de la particule, se construisent par l'ajout contrôlé de couches successives de monomères.

Ce sont des nanovecteurs très intéressants, dont le système de branchement permet de faire plusieurs types d'association chimique sur les différents groupes terminaux. Les molécules transportées sont insérées entre les branchements ou associées chimiquement à ceux-ci [30]. Malheureusement la synthèse des dendrimères est délicate.

Quant aux nanogels, ce sont des structures moins courantes constituées de polymères hydrophiles. Contrairement aux nanoparticules polymériques précédemment décrites, leurs chaînes ne sont pas fortement imbriquées les unes dans les autres, ce qui leur confère une flexibilité plus importante. La particule finale, gonflée d'eau, offre ainsi une grande surface spécifique et une importante capacité d'encapsulation. [31]

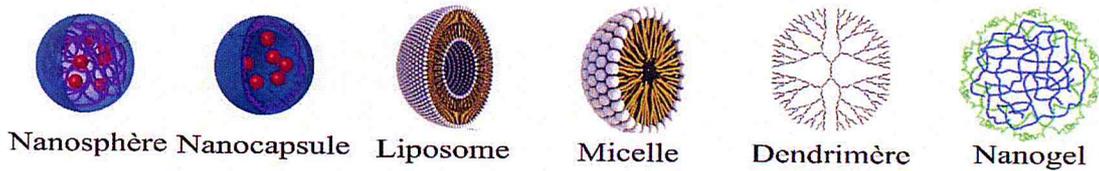
II.4.6. Les nanoparticules inorganiques

Les nanoparticules inorganiques possèdent des propriétés particulières de conductivité, de magnétisme, de biocompatibilité, de réactivité, de résistance, de fluorescence...etc. qui les rendent très intéressantes pour différentes applications y compris le diagnostic et le traitement des maladies.

Parmi les plus étudiées, on retrouve par exemple les nanoparticules d'or pour leur propriétés d'optique, d'électrochimie et de biocompatibilité; les nanoparticules d'argent pour leur propriété antibactérienne; les nanoparticules d'oxyde de fer magnétiques pour leur utilisation en imagerie médicale; les nanoparticules de silice pour leur biocompatibilité et capacité d'interaction avec l'organisme et les nano-cristaux semi-conducteurs dont les plus connus sont les Quantum Dots (boite quantique), très intéressantes pour la stabilité de leur fluorescence.[32]

La figure ci-dessous représente les différents types de nanoparticules cités précédemment :

NANOPARTICULES ORGANIQUES



NANOPARTICULES INORGANIQUES



Figure II.3 : Différents types de nanoparticules

II.5. Générations de vecteurs: vers des nanoparticules de plus en plus performantes

Comme le souligne Torchilin [33], l'objectif principal des nanoparticules une fois administrées dans le compartiment sanguin est d'augmenter la durée de vie de l'agent à véhiculer.

C'est pourquoi, depuis la synthèse des premiers vecteurs dans les années 1970, les technologies de synthèse et de vectorisation n'ont cessé de progresser vers la fabrication de vecteurs nanoparticulaires de plus en plus complexes et intelligents. Ces techniques se basent sur la modification chimique de la surface des nano-transporteurs, conduisant ainsi à trois (03) générations de nanoparticules (**fig.II.5**), que nous allons détailler ci-dessous.

II.5.1. Première génération

Les vecteurs de première génération sont des nanoparticules qui ne contiennent que le principe actif, sans aucune autre substance. Elles sont injectées dans le sang par voie intraveineuse, entraînant alors une réaction de la part des défenses immunitaires de l'organisme qui détectent ce corps étranger et confèrent aux nanovecteurs un marquage du « non-soi », à l'aide de protéines, les opsonines qui se fixent à leur surface (via des interactions hydrophobes fortes) : on dit que ces particules ont un caractère exogène.

Ces vecteurs alors opsonisés continuent leur chemin dans la circulation sanguine. Au niveau du foie, l'épithélium des vaisseaux sanguins est discontinu, c'est à dire que les vaisseaux sanguins sont poreux, il permet donc le passage des nanovecteurs. C'est au niveau de ces entrées que se

Chapitre II : Les nanoparticules

trouvent les cellules de **Küpf**fer, qui sont des macrophages. Le médicament opsonisé se fixe aux récepteurs de ces macrophages, qui les dégradent par phagocytose [23]. Les nanoparticules sont alors détruites, libérant ainsi le médicament.

Cela permet par conséquent d'apporter un principe actif précisément dans le foie sans le libérer dans le reste de l'organisme. De ce fait, et grâce à ces vecteurs, la toxicité vis à vis d'autres organes est réduite.

Les macrophages étant des anticorps du foie, le cancer ainsi que plusieurs maladies du foie peuvent être soignés avec beaucoup d'efficacité. On parle alors de zone prédisposée à être soignée.

La conception de vecteurs de première génération est en général assez simple puisqu'elle ne nécessite pas d'avoir recours à des astuces pour contourner ou tromper les mécanismes de défenses de l'organisme. Cependant, ces vecteurs ont l'inconvénient d'être reconnus par l'organisme comme des corps étrangers. Afin de pouvoir atteindre d'autres zones d'intérêt, il convient d'éviter la phagocytose en leurrant les défenses immunitaires ; on parle alors de furtivité, avec la conception de vecteurs de deuxième génération.

II.5.2. Deuxième génération

On cherche à éviter le blocage des nanovecteurs au niveau du foie de façon à ce qu'ils circulent plus longtemps dans les vaisseaux sanguins et puissent soigner d'autres régions de l'organisme. Pour se faire, il faut stopper l'opsonisation. Ainsi, les vecteurs de deuxième génération sont nés de la nécessité de diriger les médicaments vers des territoires biologiques autres que la sphère hépato-splénique, en introduisant la notion de « furtivité », qui est l'échappement à la vigilance du système immunitaire.

Les vecteurs de deuxième génération sont composés, en plus du principe actif, de polyéthylène glycol ou PEG, d'où le nom "pégylé". Ce polymère synthétique a l'avantage d'être biocompatible, flexible, soluble en milieu aqueux et non toxique [34]. Son but étant de tromper les anticorps pour passer cette première barrière de notre organisme.

Lorsque les vecteurs sont injectés dans le sang, les opsonines ne s'accrochent plus à leur surface. L'organisme ne les reconnaît donc plus comme étrangers et ils ne sont pas captés par les macrophages du foie, l'opsonisation par interactions hydrophobes n'aura pas lieu car les protéines ne peuvent plus absorber la nanoparticule (il y a répulsion stérique), ce qui va

Chapitre II : Les nanoparticules

permettre à cette génération de nanoparticules d'être furtive. Cela diminue significativement leur phagocytose et prolonge notablement leur persistance dans le sang. [35]

L'internalisation qui suivra permettra de dégrader la nanoparticule, et donc de libérer le principe actif dans la cellule malade.

Ces recherches ont débouché à la mise sur le marché de liposomes, Doxil[®], chargés en doxorubicine, un agent anticancéreux qui présente une très forte toxicité cardiaque.

II.5.3. Troisième génération

Les vecteurs de troisième génération intègrent le concept de ciblage actif qui augmente la spécificité pour un site donné. Ce sont en fait des nanoparticules de deuxième génération "décorées" de récepteurs.

Il s'agit dans ce cas, de systèmes relativement complexes comprenant une nanoparticule encapsulant le principe actif, une couche de polymère hydrophile (PEG) qui évite la reconnaissance par les macrophages du foie, et enfin un ligand capable de reconnaître certaines molécules spécifiques de la membrane des cellules malades.

Ces vecteurs fonctionnent selon le modèle de reconnaissance bien connu de type « clé-serrure », où les nanoparticules sont attirées par une seule sorte de marqueur en fonction du ligand greffé.

Prenons l'exemple du cancer, les cellules cibles malades sont porteuses du récepteur à l'**acide folique**. Sur les nanovecteurs va donc être greffé de l'acide folique : cela s'appelle l'adressage moléculaire (**fig.II.4**). En arrivant à proximité d'une tumeur, les nanovecteurs ornés d'acide folique se fixent sélectivement sur les cellules ciblées porteuses du récepteur à l'acide folique. Ils sont ensuite transportés à l'intérieur de la cellule par endocytose. Suite à cette internalisation dans la cellule malade, la nanoparticule va être détruite et le médicament pourra être libéré, la cellule est ainsi tuée ou soignée. On parle de ciblage cellulaire.

A noter que ces ligands utilisés pour piloter les vecteurs et leur contenu vers les cellules peuvent être des anticorps, des peptides, des saccharides, des oligonucléotides ou d'autres molécules comme le folate. [36]

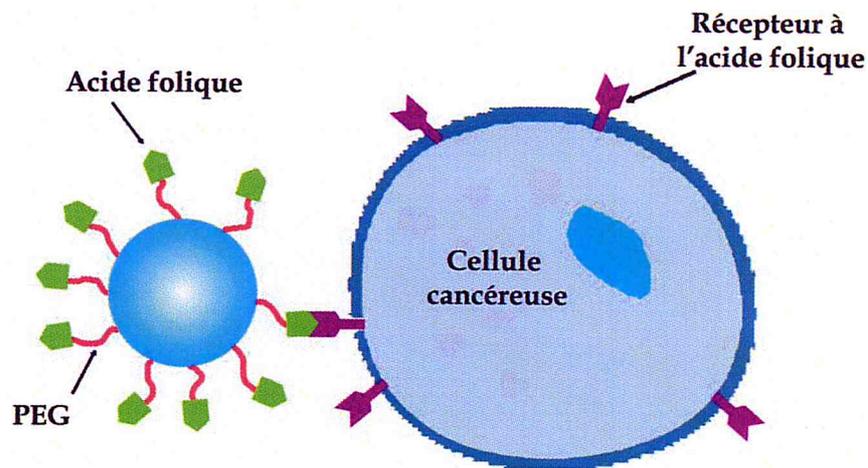


Figure II.4 : Schéma d'un nanovecteur de troisième génération ciblant une tumeur

La troisième génération permet une découverte formidable dans les traitements du cancer, et de nombreux laboratoires lancent des recherches pour développer et commercialiser ces nanomédicaments.

Ainsi, maîtriser grâce à ces vecteurs la distribution spatiale et temporelle de molécules biologiquement actives dans l'organisme est, sans conteste, une application qui, bien qu'à ses débuts, peut contribuer à l'amélioration de la thérapeutique.

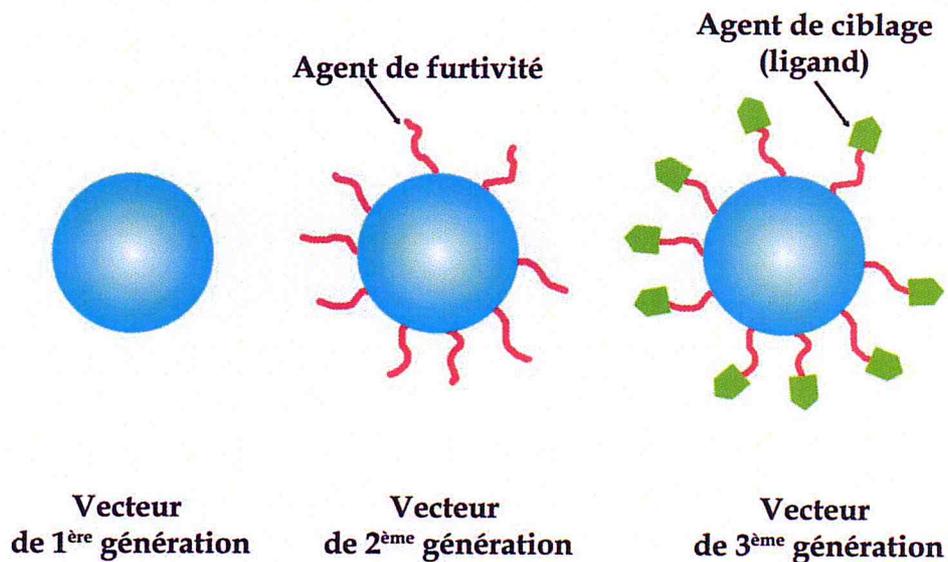


Figure II.5 : Différentes générations de nanoparticules

II.6. Critères de choix des nanoparticules

Les nanovecteurs proposés pour des applications thérapeutiques ou diagnostiques *in vivo* doivent nécessairement répondre à deux principaux critères :

- ✚ Les matériaux qui les constituent doivent être biodégradables (ou éliminés facilement de l'organisme), et ils ne doivent pas induire de réactions toxiques ;
- ✚ Ils doivent pouvoir être chargés en principes actifs et en assurer le transport, puis la libération, au niveau de la cible biologique.

II.7. Avantages des nanoparticules

- ✚ À l'échelle nanométrique les lois de la physique que nous connaissons ne sont plus du tout les mêmes. Les propriétés des matériaux telles que la conductivité, le point de fusion ou l'opacité sont complètement différentes : le cuivre devient élastique, les métaux deviennent isolants et le carbone devient plus dur que l'acier.
- ✚ La faible taille des nanoparticules leur confère des propriétés intéressantes : elle offre en effet une importante surface spécifique et une grande stabilité. En raison de leur très petite taille, les nanoparticules voient une diminution du rapport surface / volume. De ce fait, les nanoparticules peuvent réagir plus avec leur environnement, car pour une même quantité de matière, la surface des nanoparticules est beaucoup plus grande que pour de grosses particules.

Afin de mieux comprendre cette propriété, prenons par exemple un cube de 1 cm de côté. Sa superficie est donc de 6 cm². Découpons ce cube en petits cubes de 1 nm de côté, la somme des surfaces des petits cubes est de 6nm² (soit 6.10⁷ cm² ou encore 6000 m²) une superficie semblable à celle d'un terrain de football, pourtant la quantité de matière reste inchangée.

- ✚ Ces particules ont aussi l'avantage de former des solutions homogènes qui ne sédimentent ou ne crèment pas.
- ✚ Mais ce sont surtout leurs capacités à traverser les membranes cellulaires du corps humain sans les endommager pour atteindre de manière plus directe les zones ciblées et esquiver les défenses immunitaires, ainsi que leur capacité à cibler une population de cellules particulières qui en font des vecteurs prometteurs.

II.8. Domaines d'application des nanoparticules

Les nombreux domaines d'application des nanoparticules sont résumés dans le tableau ci-dessous :

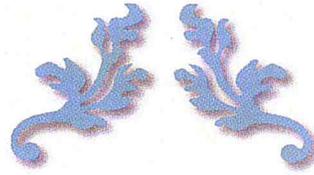
Secteurs d'activité	Exemples d'application
Automobile et aéronautique	Matériaux renforcés et légers, peintures, additifs pour carburant, pneumatique.
Electronique et communication	Cellules solaires, ordinateurs, jeux électroniques, écrans plats.
Chimie et matériaux	Pigment, poudre céramique, catalyseurs multifonctionnels, textile et revêtement antibactérien, isolation thermique.
Pharmaceutique, biomédical, biotechnologie	Vectorisation, vaccins mucosaux, médecine régénératrice.
Energie	Cellules photovoltaïques, matériaux isolants, batteries, photosynthèse artificielle.
Environnement	Traitement des eaux, recyclage, pesticides et fertilisants, dépollution, analyses chimiques.

Tableau II.1: Exemples d'utilisation des nanotechnologies [25]

Conclusion

L'utilisation des nanoparticules connaît un essor croissant et montre des résultats prometteurs dans des domaines divers et variés allant de l'électronique à l'alimentation en passant par la recherche spatiale. Un autre domaine prédominant est l'application des nanotechnologies au domaine médical. Cette nouvelle orientation ouvre des perspectives intéressantes pour la médecine de demain, notamment pour la vectorisation d'agents thérapeutiques. Ces nanoparticules sont alors appelées « nanovecteurs » et sont capables de protéger le principe actif des défenses immunitaires de l'organisme, de l'adresser sélectivement vers le tissu ou la cellule choisis, et d'en contrôler la libération.

C'est ce concept révolutionnaire de vectorisation de principe actif que nous allons détailler dans le chapitre suivant.



CHAPITRE III

Notions sur la vectorisation d'agents thérapeutiques



Chapitre III : Notions sur la vectorisation d'agents thérapeutiques

Introduction

Aucun médicament ne peut exercer une activité thérapeutique si la molécule biologiquement active qu'il renferme n'est pas capable de franchir les barrières biologiques qui séparent le site d'administration du site d'action.

L'adressage de molécules thérapeutiques vers l'organe, le tissu, ou la cellule malade constitue aujourd'hui un défi majeur pour le traitement des maladies humaines, notamment infectieuses, cancéreuses, ou d'origine génétique. Dès le début du vingtième siècle, le chimiste allemand *Paul Ehrlich*, prix Nobel de médecine en 1908, rêvait déjà des « magic bullets » (balles magiques) susceptibles d'acheminer un médicament de manière spécifique vers son site d'action. Plus d'un siècle plus tard, la vision de *Paul Ehrlich* commence à devenir réalité grâce au développement des nanotechnologies qui ont permis de proposer le concept de vectorisation des médicaments (« Nanomédicaments »), et cela grâce à des nanoparticules qui offrent des réponses aux difficultés rencontrées par la thérapie classique, et qui ouvrent des perspectives de traitements innovants.

La vectorisation des médicaments est aujourd'hui un axe important de recherche dans le domaine pharmaceutique. Aujourd'hui, les scientifiques ont développé tout un arsenal de moyens, que ce soit au niveau de la chimie des polymères ou de celle des métaux pour produire de tels systèmes. On estimait en 2009 le marché mondial de la vectorisation pour la santé à 67 milliards de dollars. [37]

III.1. Qu'est-ce que la vectorisation ?

Vectoriser un médicament, c'est utiliser un support nommé "vecteur" pour l'acheminer sur le site malade dans un but thérapeutique. Il va donc de soi que cette action doit s'opérer sans altérer les organes sains ou modifier l'équilibre physiologique du patient.

L'idée est d'associer une molécule thérapeutique à un vecteur colloïdal, agissant comme un «transporteur nanométrique» capable de franchir les barrières biologiques, de protéger la molécule transportée et de la délivrer sous forme biologiquement active dans son site d'action.

III.2. Critères de vectorisation

La conception d'un vecteur doit répondre à un grand nombre de défis à la fois théoriques et pratiques.

✚ Tout d'abord, le vecteur doit être biocompatible, c'est-à-dire toléré par l'organisme.

Chapitre III : Notions sur la vectorisation d'agents thérapeutiques

- ✚ Il doit transporter une molécule d'intérêt en quantité biologiquement efficace et avoir une forte affinité pour les tissus ciblés.
- ✚ Il doit franchir les barrières biologiques et protéger la molécule jusqu'à son site d'action.
- ✚ Enfin, le vecteur ne doit présenter aucune toxicité pour l'organisme.
- ✚ A cela nous rajouterons qu'un vecteur idéal devra permettre de libérer le principe actif de manière chronobiologique, c'est-à-dire en tenant compte de l'état physiologique et du rythme biologique de l'organisme.

III.3. Importance de la vectorisation

La vectorisation de principes thérapeutiques présente plusieurs avantages :

- ✚ Elle permet tout d'abord une protection du principe actif contre son inactivation chimique, enzymatique ou immunologique ;
- ✚ Les profils de libération sont améliorés, en réduisant les fluctuations de concentration en principe actif dans le sang ;
- ✚ L'utilisation des nanoparticules permet de cibler les cellules malades, donc de n'incorporer que la dose qu'il faut, ce qui implique une baisse des risques liés à la toxicité ;
- ✚ Le ciblage des zones à traiter permet également une réduction des effets secondaires des médicaments, tout en augmentant leur efficacité [38].

Depuis l'énoncé de la théorie du « *Magic Bullet* », les recherches sur la vectorisation ont fait des progrès considérables. Aujourd'hui c'est devenu une discipline scientifique à part entière, pluridisciplinaire, qui offre des possibilités nouvelles pour l'administration des médicaments. Afin de vectoriser un médicament et l'acheminer vers son site d'action, les chimistes utilisent une technique de protection du principe actif appelée « encapsulation ».

III.4. Qu'est-ce que l'encapsulation ?

L'encapsulation est une technique de protection des matières sensibles (à l'état solide, liquide ou gazeux) appelées aussi matières actives à l'aide d'une matière enrobante par formation de particules de taille micro/nanométrique. [39]

Ce procédé permet de créer une barrière de protection pour les molécules encapsulées et de contrôler leur relargage dans un milieu donné. Le contenu d'une capsule individualisée est protégé de l'environnement par la matière enrobante et peut être libéré sous l'action de la

Chapitre III : Notions sur la vectorisation d'agents thérapeutiques

température, d'enzymes, du changement de pH du milieu, de l'action mécanique ou simplement par la diffusion à travers la matière enrobante poreuse.

III.5. Pourquoi encapsuler ?

Les principales motivations pour l'encapsulation d'un matériau sont :

- L'augmentation de la stabilité des ingrédients sensibles (protection de la matière encapsulée contre l'oxydation ou des effets de milieu ambiant tels que la chaleur, l'humidité ou le pH) ;
- Le masquage d'odeur, de goût ou d'activité des matériaux encapsulés ;
- La libération contrôlée ou ciblée de composants ;
- La diminution de toxicité des principes actifs.

Dans l'industrie, encapsuler est une volonté et un défi permanent que ce soit pour protéger une espèce face à un milieu agressif ou en contrôler la libération dans le temps.

III.6. Techniques d'encapsulation

De nombreuses techniques permettent l'encapsulation de principes actifs et conduisent à différents types de particules dont les propriétés dépendent du procédé de fabrication.

Parmi ces techniques, les plus fréquemment utilisées sont les suivantes :

III.6.1. La gélation ionotropique

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

Les micro- et nanosphères sont produites via un goutte à goutte d'une solution de l'agent de réticulation dans une solution de polymère et de principe actif. Les ions se répandent alors et forment un réseau tridimensionnel du polymère ioniquement réticulé. [40]

III.6.2. Le spray-drying

La technique de spray-drying est largement utilisée dans le secteur pharmaceutique depuis la fin des années 1970, pour former des systèmes microparticulaires pour la libération contrôlée de principes actifs. Un polymère hydrophile ou hydrophobe est préalablement dissous dans un solvant approprié. Le principe actif peut être soit dissous, soit mis en suspension dans ce même solvant. Le mélange est ensuite pulvérisé à l'aide d'une buse, conduisant à l'obtention de microsphères solides précipitées. Il est parfois nécessaire d'inclure des plastifiants pour

Chapitre III : Notions sur la vectorisation d'agents thérapeutiques

permettre la formation de microcapsules de forme sphérique régulière et de surface lisse, en réduisant la rigidité de chaîne de polymère. [41]

III.6.3. L'émulsion

Des méthodes d'évaporation/extraction de solvants ont largement été utilisées pour préparer des micro/nanosphères chargées de divers principes actifs, notamment hydrophobes. Par exemple, dans le cadre de l'encapsulation de protéines, des émulsions huile/eau (h/e), huile/huile (h/h) ou eau/huile/eau (e/h/e) ont été utilisées.

Selon le nombre d'émulsions produites pendant la préparation des sphères, l'évaporation/extraction de solvant peut être divisée en deux méthodes : émulsion simple et double.

III.6.4. La polymérisation interfaciale (polycondensation)

Deux monomères réactifs (typiquement un dichlorure et une diamine) sont respectivement dissous dans des solvants non miscibles puis mélangés pour former une émulsion huile/eau. L'un des monomères diffuse à l'interface huile/eau, permettant leur réaction pour former la membrane polymérique. Un exemple typique est la formation de microcapsules de polyamide (nylon).

Récemment, des nanoparticules d'insuline ont été préparées en utilisant la technique de polymérisation interfaciale par addition. [42]

III.6.5. La séparation de phase

L'encapsulation par séparation de phase est un procédé comprenant 3 étapes :

- (1) séparation de phase du polymère « de surface » pour former des gouttelettes de coacervats,
- (2) adsorption des gouttelettes à la surface du principe actif,
- (3) solidification des capsules. [43]

Chapitre III : Notions sur la vectorisation d'agents thérapeutiques

Parmi les techniques d'encapsulation décrites ci-dessus, toutes présentent des avantages et des inconvénients résumés dans le tableau ci-dessous :

Méthodes	Avantages	Inconvénients
Gélation ionotropique	<ul style="list-style-type: none"> - Formulation douce → Activité biologique conservée ; - N'utilise pas de solvant organique → toxicité réduite ; - Technique simple et rapide 	<ul style="list-style-type: none"> - Difficulté de contrôle de la cinétique de libération sur une longue période
Spray-Drying	<ul style="list-style-type: none"> - Technique rapide ; - Large gamme d'applications 	<ul style="list-style-type: none"> - Nécessite une grande quantité de matière → coût de revient élevé
Emulsion	<ul style="list-style-type: none"> - Large gamme d'utilisation ; - Favorise l'encapsulation de molécules de petites tailles → libération plus rapide 	<ul style="list-style-type: none"> - Utilisation de solvants organiques → toxicité
Polycondensation	<ul style="list-style-type: none"> - Encapsulation de molécules hydrophiles et hydrophobes ; - Large gamme de membranes polymériques grâce à une combinaison diverse de monomère 	<ul style="list-style-type: none"> - Large surface de contact (interface) huile/eau créée au cours de la réaction ; - Difficulté de contrôler la réaction de polymérisation ; - Plusieurs lavages nécessaires → perte de principe actif hydrosoluble
Séparation de phase	<ul style="list-style-type: none"> - Contrôle efficace de la taille des particules ; - Distribution de taille plus étroite. 	<ul style="list-style-type: none"> - Agrégation des particules ; - Industrialisation difficile.

Tableau III.1 : Avantages et inconvénients des techniques d'encapsulation [44]

Parmi ces techniques, la gélation ionotropique qui présente l'avantage d'être simple et rapide, a été utilisée lors de notre étude. Elle permet une formulation douce et ne nécessite pas de solvant organique. De plus, son utilisation en milieu aqueux en fait une technique de choix pour une application à des fins thérapeutiques, notamment dans les systèmes de livraisons de principe actif.

III.7. Mécanismes de libération des principes actifs

Le souhait de délivrer des principes actifs aisément et efficacement a conduit à l'utilisation de systèmes de délivrance ciblée, à une vitesse déterminée et constante, pendant une durée suffisamment longue.

✚ Microparticules

En fonction de l'application visée, les microparticules sont conçues pour libérer l'espèce, soit de manière déclenchée, soit de manière continue.

- Les systèmes à libération déclenchée sont généralement des microcapsules formées d'une membrane de faible perméabilité, qui vont libérer brutalement leur contenu par éclatement de cette membrane. La rupture est alors déclenchée, soit par une pression (mécanique ou osmotique), une variation de température, une variation de pH ou encore la dégradation enzymatique de la membrane.
- Les systèmes à libération continue sont majoritairement des microsphères. Les mécanismes mis en jeu sont, soit la diffusion de l'espèce à travers la matrice, soit la dégradation (érosion) ou dissolution de la matrice ou encore un couplage des deux. [45]

✚ Nanoparticules

Il existe trois mécanismes fondamentaux qui conduisent à la libération d'un principe actif et qui permettent de contrôler sa vitesse de libération :

• Dégradation du vecteur

Il peut s'agir d'une réelle dégradation du polymère matriciel (hydrolyse par l'eau ou par une enzyme) ou du clivage de liaisons ou d'interactions entre le polymère et le principe actif, qui entraîne sa diffusion hors du système particulaire.

• Diffusion du principe actif

La diffusion du médicament se fait soit au travers des pores, soit entre les chaînes de la membrane polymère (cas des systèmes réservoirs comme les nanocapsules) ou de la matrice macromoléculaire (cas des systèmes matriciels comme les nanosphères). Cette diffusion correspond à la migration du principe actif et à sa libération progressive.

Selon la porosité de la membrane ou de la matrice, la vitesse de libération du principe actif est plus ou moins importante.

Chapitre III : Notions sur la vectorisation d'agents thérapeutiques

- **Gonflement suivi d'une diffusion**

La plus part des matières utilisées dans ces systèmes de libération sont des hydrogels. Lors de l'encapsulation, le principe actif est dissous ou dispersé au sein d'une matrice polymérique sans être capable d'en sortir. Les nanoparticules sont initialement sèches, mais quand elles se déplacent dans le corps, elles absorbent l'eau ou autres fluides corporels et se gonflent, ce qui permet la diffusion du principe actif à travers le réseau gonflé dans le milieu externe.

Le gonflement du polymère peut être déclenché par divers facteurs environnementaux comme le pH, la température, la force ionique ou la nature du polymère.

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

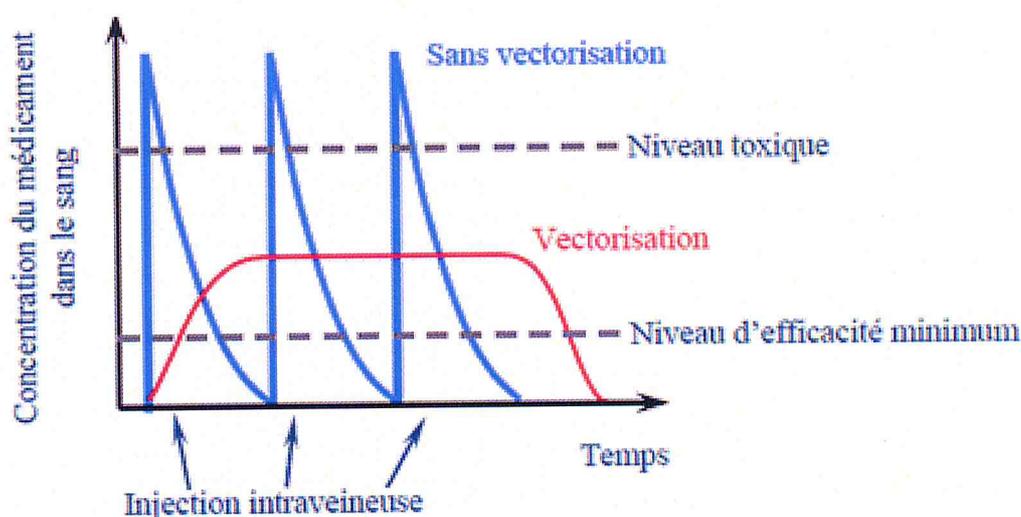


Figure III.1 : Evolution de la concentration du médicament dans le sang en fonction du temps avec et sans vectorisation

Dans la **figure III.1**, on remarque que la vectorisation permettrait de rester dans la fenêtre thérapeutique, à une concentration de principe actif dans l'organisme constante au court du temps.

Par contre, dans le cas de multiples prises régulières de principe actif, la limite de toxicité est parfois presque atteinte mais la concentration du principe actif décroît rapidement, d'où une faible efficacité. Dans ce cas, plusieurs prises sont nécessaires pour atteindre une efficacité sur le long terme.

Chapitre III : Notions sur la vectorisation d'agents thérapeutiques

Les cinétiques de libération de l'espèce encapsulée sont avant tout déterminées par les caractéristiques physico-chimiques du système. Ces caractéristiques sont fonction du type de polymère ou de lipide utilisé mais aussi du processus de fabrication. Plus de 200 types de formulation sont actuellement citées dans la littérature et chacune d'elle influence l'arrangement de la particule mais aussi son taux d'encapsulation. [46]

III.8. Application des micro/nanoparticules à base de chitosane pour la vectorisation de l'acide salicylique

L'acide salicylique ou acide 2-hydroxybenzoïque est un composé organique aromatique, l'un des trois isomères de l'acide hydroxybenzoïque, constitué d'un noyau benzénique substitué par un groupe carboxyle (acide benzoïque) et un groupe hydroxyle (phénol) en position ortho (**fig.III.2**).

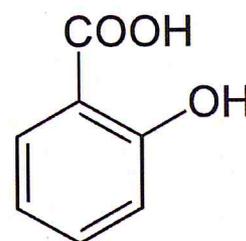


Figure III.2 : Structure de l'acide salicylique

C'est un solide cristallin incolore qu'on trouve naturellement dans certains végétaux, comme la reine-des-prés ou le saule, d'où il tire son nom. On le retrouve notamment dans des fruits, sous forme estérifiée de salicylate de méthyle [47]. Il est utilisé comme médicament et comme précurseur de l'acide acétylsalicylique, plus connu sous le nom de l'aspirine.

III.8.1. Propriétés

Les principales propriétés physico-chimiques de l'acide salicylique sont résumées dans le tableau ci-dessous :

Nom IUPAC	Acide 2-hydroxybenzoïque
Etat physique	Solide
Formule brute	C ₇ H ₆ O ₃
Masse molaire (g/mol)	138
pKa	3
Température de fusion (°C)	159
Solubilité (g/l)	2,3 à 20 °C

Tableau III.2 : Quelques propriétés physico-chimiques de l'acide salicylique

Chapitre III : Notions sur la vectorisation d'agents thérapeutiques

Ingéré en grandes quantités, c'est un produit toxique, mais en quantités moindres il est utilisé comme conservateur alimentaire et antiseptique.

Les propriétés médicales de l'acide salicylique sont connues depuis longtemps. Il a été utilisé pour soulager la douleur, réduire la fièvre et prévenir les attaques cardiaques et les AVC. Il n'est désormais plus utilisé pour son action apaisante (analgésique). Actuellement, dans la lutte contre la fièvre, il est supplanté par d'autres médicaments plus efficaces comme l'aspirine (qui en est un dérivé), ou le paracétamol.

Par ailleurs, on le retrouve dans de nombreux produits en dermatologie en complément d'un autre principe actif. C'est par exemple un ingrédient clé dans de nombreux produits de soins de la peau pour le traitement de l'acné, le psoriasis, les durillons, verrues et la kératose pilaire [48]

L'acide salicylique fait partie de la liste des médicaments essentiels de l'Organisation Mondiale de la Santé (liste mise à jour en avril 2013). [49]

Propriété de fluorescence

Certains composés organiques ou minéraux, liquides ou solides (cristaux moléculaires ou ioniques), qu'ils soient purs ou en solution, émettent de la lumière lorsqu'ils sont excités par des photons du domaine du visible ou du proche ultraviolet, ils absorbent de l'énergie pour la restituer par la suite sous forme d'un rayonnement. Certains molécules, telles que l'acide salicylique, présentent la faculté plus ou moins prononcée de réémettre l'énergie absorbée sous forme de lumière quasi-instantanément à une longueur d'onde plus grande que celle de la lumière d'origine, c'est le phénomène de fluorescence moléculaire.

L'émission de fluorescence

La fluorescence est souvent le privilège des molécules cycliques, rigides et possédant un grand nombre de doubles liaisons conjuguées (liaisons π). Elle est augmentée par la présence de groupes électro-donneurs et diminuée avec les groupes électro-attracteurs. Elle dépend également du pH et du solvant. [50]

La lumière est une onde et donc une forme d'énergie. Quand de la lumière arrive sur un atome, ce dernier peut capter son énergie. L'atome est alors dit « excité » (il possède un surplus d'énergie). L'atome se « désexcite » en libérant cette énergie sous une forme propre à l'atome.

L'émission de fluorescence se produit selon le mécanisme qui suit :

Chapitre III : Notions sur la vectorisation d'agents thérapeutiques

- ✚ Lorsqu'un atome (ou une molécule) absorbe un photon (lumière), il accède à un état électronique excité souvent un état singulet, que l'on note S_0^* (i.e. de la plus haute orbitale moléculaire occupée (HO), généralement de type π , vers la plus basse orbitale moléculaire vide (BV), généralement de type π^*).
- ✚ La molécule passe ainsi d'un état fondamental d'énergie électronique E_0 (au niveau d'énergie vibrationnelle le plus bas) à un état excité d'énergie électronique E_1 (sur un niveau d'énergie vibrationnelle quelconque).
- ✚ Avant de se désexciter, l'atome (ou la molécule) subit une relaxation vibrationnelle, c'est-à-dire qu'il perd un peu d'énergie sous forme de vibration ou de chaleur.
- ✚ Cependant, l'état excité étant temporaire, les électrons ont tendance à reprendre leur position d'origine (état électronique fondamental) en restituant le surplus d'énergie absorbée par l'émission d'un photon de façon très rapide (de l'ordre de la nanoseconde) sous la forme de lumière. Cette lumière est appelée **fluorescence**.

Le photon émis est d'énergie inférieure au photon absorbé car il y a eu une perte d'énergie en vibration. L'inégalité $h\nu_{\text{Fluorescence}} < h\nu_{\text{Absorption}}$ entraîne que $\lambda_{\text{Fluorescence}} > \lambda_{\text{Absorption}}$: le spectre de fluorescence est déplacé vers les grandes longueurs d'onde par rapport au spectre d'absorption. Cette différence est appelée déplacement de Stokes. [50]

Ces processus sont résumés sur le diagramme simplifié de la **figure III.3**, diagramme dit de Jablonski.

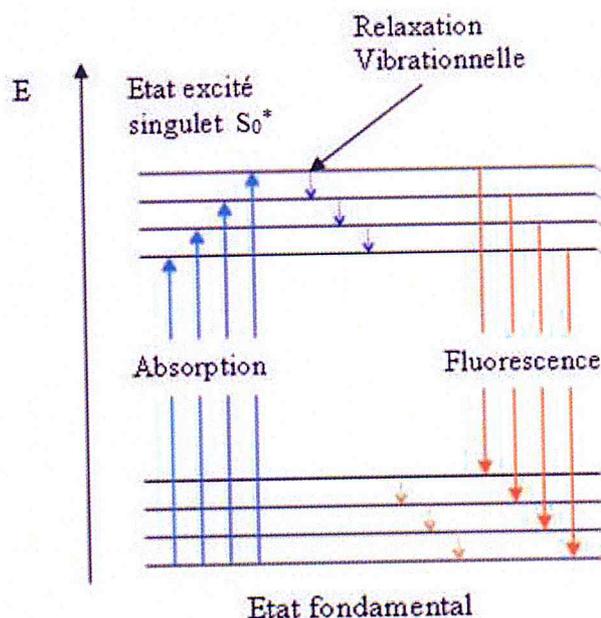


Figure III.3: Diagramme de Jablonski

Chapitre III : Notions sur la vectorisation d'agents thérapeutiques

A noter que la fluorescence résulte de transferts entre états de même multiplicité (même état de spin).

III.8.2. Toxicité

L'acide salicylique est un produit inflammable. Ses vapeurs sont irritantes pour les muqueuses oculaires et respiratoires.

Il présente des effets secondaires aigus et d'autres chroniques :

Effets aigus

- Irritation grave de la peau et des muqueuses ;
- S'il est ingéré en grande quantité, il peut causer une irritation des voies digestives, des nausées et vomissements, des douleurs abdominales, une diarrhée ;
- Ce produit peut être absorbé aux sites de lésions de la peau.

Effets chroniques

- Sensibilisation possible de la peau ;
- Salicylisme possible: maux de tête, vertiges, troubles auditifs, baisse de la vue, confusion mentale, somnolence, sueurs, soif, nausées, vomissements, diarrhée, éruptions cutanées, troubles rénaux, hémorragies gastro-intestinales, œdème pulmonaire, convulsions, coma.

Compte tenu de sa faible solubilité dans l'eau (2 g/l à 20 ° C) et de ses nombreux effets secondaires sur l'organisme, l'utilisation de l'acide salicylique a été limitée. Sa courte demi-vie, sa faible biodisponibilité et une irritation gastrique sévère font de l'acide salicylique un modèle adapté pour l'utilisation dans les systèmes d'administration à libération prolongée de médicaments.

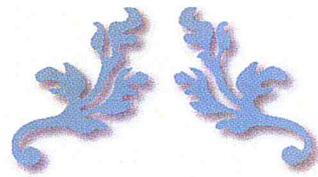
En effet, l'encapsulation de l'acide salicylique au sein de vecteurs pharmaceutiques tels que des liposomes, nanoparticules ou hydrogels, pourrait être une approche potentielle pour minimiser les effets secondaires et réduire la fréquence d'utilisation, offrant ainsi plus de confort au patient.

Chapitre III : Notions sur la vectorisation d'agents thérapeutiques

Conclusion

Lors de nos recherches bibliographiques, nous nous sommes intéressés en premier lieu au chitosane, un matériau biodégradable, qui suscite l'intérêt de plusieurs chercheurs pour des applications pharmaceutiques et qui est, depuis quelques années, très utilisé pour la préparation de nanovecteurs car il a l'avantage d'être d'origine naturelle et biocompatible. Ensuite, nous avons pu approfondir les notions de nanoparticules ou nano-médicaments, afin de mieux expliquer le phénomène d'encapsulation qui utilise une technologie de pointe, la nanotechnologie. Enfin, nous avons cité des notions sur la vectorisation des médicaments qui permet une avancée formidable dans le monde de la médecine, et donné un bref aperçu sur l'acide salicylique, agent thérapeutique utilisé lors de notre étude.

Nous verrons lors de la partie suivante, dédiée à l'expérimentation, comment préparer des microparticules et des nanoparticules à base de chitosane pour la vectorisation de l'acide salicylique. Nous présenterons par la suite une caractérisation étendue des différents systèmes obtenus. Enfin, nous procéderons à des tests de libération *in vitro* du principe actif dans deux milieux biologiquement simulés.



REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES



Références bibliographiques

- [1] Wang, L.H., Khor E, Wee A, Lim LY. “*Chitosan-alginate PEC membrane as a wound dressing: Assessment of incisional wound healing*”. Journal of Biomedical Materials Research, 2002. 63(5): p. 610-618.
- [2] Li, Z.S., Ramay HR, Hauch KD, Xiao D, Zhang M., “*Chitosan-alginate hybrid scaffolds for bone tissue engineering*”. Biomaterials, 2005. 26(18): p. 3919-3928.
- [3] Dutkiewicz, J., Tuora, M, Ciszewski R., “*New forms of chitosan polyelectrolyte complexes. In Advances in Chitin and Chitosan*”, S.P. Brine C , Zikakis J Editor. 1992, Elsevier Applied science: London. p. 496-505.
- [4] Srinivasa, P. C. & R. N. Tharanathan. «*Chitin chitosan - Safe, ecofriendly packaging materials with multiple potential uses.* » Food Reviews International, 2007.23 (1): 53-72.
- [5] Ravi Kumar, M. N. Y.; R. A. A. Muzzarelli, et al. «*Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives*» Chemical Reviews, 2004. 104 (12): 6017-6084.
- [6] Braconnot H. Sur la nature des champignons. Ann ChimPhys79 (1811) 265.
- [7] Odier A. «*Mémoire sur la composition chimique des parties cornées des insectes* ». Mem Soc Hist Nat Paris 1 (1823) 29.
- [8] Rouget C. «*Des substances amylicées dans le tissu des animaux, spécialement les articules (chitine)* ». Compte Rendu 48 (1859).
- [9] Blackwell J. “*Chitin in: Biopolymers*”. Walton AG, Blackwell J, eds. New York: Academic Press (1973) 474.
- [10] Rinaudo M. ProgPolym Sci 31 (2006)603.
- [11] Mathur, N.K. and Narang, C.K., “*Chitin and chitosan, versatile polysaccharides from marine animals*”. Journal of Chemical Education, 1990. 67(11): p. 938.
- [12] Tolaimate A., Desbrieres J., Rhazi M., Alagui A. *Contribution to the preparation of chitins and chitosans with controlled physico-chemical properties*. Polym. 2003. 44: 7939-7952.
- [13] Rauch F, Dornish M. “*Chitosan in: An introduction to biomaterials*”. Guelcher SA, Hollinger JO, eds. CRC press 14 (2006) 249
- [14] Onsoyen E, Skaugrud O. J Chem Technol Biotechnol 49 (1990) 395
- [15] Hudson SM, Jenkins DW. “*Chitin and Chitosan in: EPST*”. Mark H F, ed. New York: Wiley (2003) 569.

Références bibliographiques

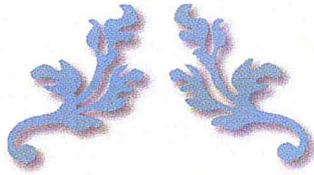
- [16] Focher B, Naggi A, Torri G, Cosani A, Terboje- vich M. Carbohydr Polym 17 (1992)
- [17] Zemouri H. (2008). « *Utilisation du chitosane comme agent flocculant dans le traitement des eaux* ». Mémoire de Magister, Laboratoire de Biotechnologie Environnementale et Génie des procédés, Ecole Nationale polytechnique, Alger, Algérie
- [18] Kurita K. Marine Biotechnol 8 (2006) 203
- [19] Vârum KM, Smidsrod O. “*Structure-properties relationship in chitosans in: Polysaccharides. Structural diversity and functional versatility*”. Dumitriu S, ed. New York: Marcel Dekker 2^a. (2005) 625
- [20] Grégorio Crini, Pierre-Marie Badot, Éric Guibal «*Chitine et Chitosane, du biopolymère à l'application* ». Presses Univ. Franche-compté, 2009
- [21] Warheit, D.B., Sayes, C.M., Reed, K.L., and Swain, K.A. “*Health effects related to nanoparticle exposures: environmental, health and safety considerations for assessing hazards and risks*”. Pharmacol Ther, 2008. 120, 35-42.
- [22] Jabbari, E. “*Targeted delivery with peptidomimetic conjugated self-assembled nanoparticles*”. Pharm Res. 2009. 26, 612-630.
- [23] Hansali, F. « *Synthèse par polymérisation en miniémulsion et caractérisation physico-chimique de nanoparticules de n-butyl cyanoacrylate pour la libération d'un principe actif modèle* ». Thèse de doctorat, 2012, p. 14-18
- [24] C,L Dombu youta. « *Utilisation de nanoparticules pour délivrer des protéines dans les épithéliums respiratoires* ». Caractérisation des mécanismes impliqués. Thèse de doctorat, 2012. p. 21-23
- [25] Bangham, A.D., Standish, M.M., and Watkins, J.C. “*Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids*”. J Mol Biol, 1965. 13, 238-252.
- [26] Gregoriadis, G., “*Carrier Potential of Liposomes in Biology and Medicine*” .1. New England Journal of Medicine, 1976. 295(13): p. 704-710.
- [27] Pinto-Alphandary, H., A. Andremont, and P. Couvreur, “*Targeted delivery of antibiotics using liposomes and nanoparticles: research and applications*”. International Journal of Antimicrobial Agents, 2000. 13(3): p. 155-168.

Références bibliographiques

- [28] Goutayer, M, « *Nano-émulsions pour la vectorisation d'agents thérapeutiques ou diagnostiques ; étude de la biodistribution par imagerie de fluorescence in vivo* ». Thèse de doctorat de l'université Pierre et Marie Curie, 2008. p. 19
- [29] Kumar, C., ed. "*Biological and Pharmaceutical Nanomaterials. Nanotechnologies for life science*", ed. C. Kumar. Vol. 2. 2006, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim.
- [30] Wijagkanalan, W., Kawakami, S., and Hashida, M. "*Designing dendrimers for drug delivery and imaging: pharmacokinetic considerations*". Pharm Res, 2011. 28, 1500-1519
- [31] Oh, J.K., Ray Drumright, Daniel J. Siegwart, Krzysztof Matyjaszewski, "*The development of microgels/nanogels for drug delivery applications*". Progress in Polymer Science, 2008. 33(4): p. 448-477.
- [32] Chaloupka, K., Malam, Y., and Seifalian, A.M. "*Nanosilver as a new generation of nanoproduct in biomedical applications*". Trends Biotechnol, 2010. 28, 580-588
- [33] Torchilin, V.P., Multifunctional nanocarriers. "*Advanced Drug Delivery Reviews*", 2006. 58(14): p. 1532-1555.
- [34] Lee J.H., Lee H.B. et Andrade J.D. "*Blood compatibility of polyethylene oxide surfaces*". Progress in Polymer Science. 20(6), pp.1043-1079
- [35] Romberg, B., Hennink, W.E., and Storm, G. "*Sheddable coatings for long-circulating nanoparticles*". Pharm Res, 2008. 25, 55-71.
- [36] Chen, J, "*Ligand Conjugated Low-Density Lipoprotein Nanoparticles for Enhanced Optical Cancer Imaging in Vivo*". J. Am. Chem. Soc., 2007. 129(18): p.5798-5799.
- [37] Obadia M. A. "*Les nanotechnologies*". Avis et Rapports du Conseil Economique et Social. 2008
- [38] Vauthier, C et Couvreur, P. « *Nanotechnologies pour la thérapeutique et le diagnostic* ». Techniques de l'Ingénieur Doc NM 4010-1 (2008)
- [39] Augustin M.A. and Hemar Y., "*Nano- and micro-structured assemblies for encapsulation of food ingredients*". Chem Soc Rev, 2009, 38, 902-912.
- [40] Burgess, D.J. and Hickey, A.J., "*Microsphere technology and applications*", in Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, J.S.a.J.C. Boylan, Editor. 1994, Marcel Dekker, Inc.: New York, USA. p. 1-29.

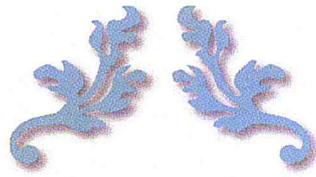
Références bibliographiques

- [41] Wan, L.S.C., Heng, P.W.S., and Chia, C.G.H., "*Plasticizers and Their Effects on Microencapsulation Process by Spray-Drying in an Aqueous System*". *Journal of Microencapsulation*, 1992. 9(1): p. 53-62.
- [42] Watnasirichaikul, S. Nigel M. Davies, Thomas Rades, Ian G. Tucker "*Preparation of Biodegradable Insulin Nanocapsules from Biocompatible Microemulsions*". *Pharmaceutical Research*, 2000. 17(6): p. 684-689.
- [43] Nihant, N., C. Grandfils, R. Jérôme, P. Teyssié, "*Microencapsulation by Coacervation of Poly(Lactide-Co-Glycolide)*" .3. Characterization of the Final Microspheres. *Polymer International*, 1994. 34(3): p.289-299.
- [44] Callet, A. "*Administration orale d'insuline par double encapsulation: développement du système nanoparticulaire par coacervation complexe insuline / chitosane* », Thèse de Doctorat de l'Université de Strasbourg, 2010
- [45] Shah S.S., Cha Y., Pitt C.G.,. "*Poly(glycolic acid-co-D,L-lactic acid): diffusion or degradation controlled drug delivery*", *J. Control. Rel.* 1992, 18, 261-270
- [46] Pinto Reis C., Neufeld R.J., Ribeiro A.J., Veiga F. "*Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug loaded polymeric nanoparticles*", *Nanomedicine: Nanotech., Biology and Medic.*2006 , 2, 8-21
- [47] Giberneau M, Brabé D, *Des fleurs « à sang chaud »*, Pour la Science, Septembre 2007, p 50-56
- [48] Swanson, A., Canty, K., "*Common pediatric skin conditions with protracted courses: a therapeutic update*", *Dermatol.Clinics.*, 31, 239-249 (2013).
- [49] WHO Model List of Essential Medicines, 18th list [archive], avril 2013)
- [50] Michel Aubailly, *Travaux pratiques de base pour une formation expérimentale à la fluorescence moléculaire*, IUT d'Orsay, Université Paris-Sud, 2004



PARTIE
EXPERIMENTALE





CHAPITRE IV

Matériels et méthodes



Introduction

L'acide salicylique est un acide bêtahydroxy (BHA) de formule $C_6H_4(OH)COOH$. C'est un ingrédient actif couramment utilisé dans la formulation topique [1] pour traiter les verrues, l'acné, le psoriasis, etc. [2]. Sa courte demi-vie, sa faible biodisponibilité et une irritation gastrique sévère font de l'acide salicylique un modèle adéquat pour l'utilisation dans les systèmes d'administration de médicaments par voie orale, en utilisant des micro/nanovecteurs à base de chitosane pour l'encapsuler et le véhiculer vers son site d'action.

Dans ce chapitre, nous allons présenter l'aspect technique de notre étude ainsi que les divers méthodes et dispositifs expérimentaux utilisés pour la préparation, la caractérisation et l'application *in vitro* des microparticules et des nanoparticules de chitosane vides et chargées d'acide salicylique, préparées par la technique de la gélation ionotropique, en présence du tripolyphosphate de sodium comme agent de réticulation.

Matériels

Tous les matériaux et réactifs utilisés dans cette étude étaient de qualité analytique, ils ont été utilisés tels que reçus.

Le chitosane (de masse moléculaire élevée) est de marque Fulka, l'acide salicylique et l'acide acétique viennent de chez Panreac et l'hydroxyde de sodium de chez Sigma Aldrich.

Méthodes

IV. Préparation des vecteurs à base de chitosane

IV.1. Microparticules

a. Microparticules vides

Les microparticules de chitosane vides ont été préparées par la méthode de la gélation ionotropique entre le chitosane et l'agent de réticulation TPP.

Une solution de CS (0,1% p/v) a été préparée par dissolution du CS dans de l'acide acétique dilué (1%, v/v) à température ambiante à l'aide d'un bain à ultrasons de type « FALC LBS 2 » (**fig IV.1**), pendant 1h. Le pH de cette solution a été fixé à 4,5 par une solution de soude à 1M. Le pH mètre utilisé pour mesurer la valeur du pH est de marque « OHAUS Starter 2C » (**fig IV.1**)

Chapitre IV : Matériels et méthodes

Les microparticules de CS vides se forment spontanément lorsqu'une solution aqueuse de tripolyphosphate de sodium TPP (0.1% en poids/volume) est ajoutée au mélange goutte à goutte sous agitation (600 tours/min) pendant 1h. Une suspension opaque se forme alors spontanément. Le rapport de masse CS : TPP est de 4 :1.

Les microparticules sont ensuite collectées par une ultracentrifugeuse (12,000 tours/min) de type Nüve NF1200 (**fig IV.1**), pendant 30 min, lavées à l'eau distillée, puis séchées à l'air libre.



Figure IV.1 : Bain à ultrasons (en haut à gauche), Ultracentrifugeuse (en haut à droite), pH mètre (en bas)

b. Microparticules chargées du principe actif (Acide salicylique)

Les microparticules de chitosane chargées d'acide salicylique ont été préparées de la même manière que les microparticules vides, à l'exception qu'une solution d'acide salicylique (0,1% en poids) dissous dans de l'acide acétique à 1% a été mélangée à la solution de CS avec un rapport CS : AS de 5 :1.

La suite de la préparation est la même que celle des microparticules vides.

IV.2. Nanoparticules

a. Nanoparticules vides

La préparation des nanoparticules de chitosane vides est basée sur la méthode de la gélation ionotropique entre le chitosane et l'agent de réticulation TPP.

Une solution de CS (0,2% en poids / volume) a été préparée par dissolution du CS dans de l'acide acétique dilué (1%, v / v) à température ambiante à l'aide d'un bain à ultrasons pendant 1h. Le pH de cette solution a été fixé à 4,5 par une solution de soude à 1M.

Les nanoparticules de CS vides se forment spontanément lorsque une solution aqueuse de tripolyphosphate de sodium TPP (0.1% ; en poids/volume) est ajoutée au mélange goutte à goutte sous agitation (600 tours/min) pendant 1h. Le rapport de masse CS : TPP est de 4 :1.

Les nanoparticules sont ensuite collectées par ultracentrifugation (12,000 tours/min) pendant 30 min, lavées avec de l'eau distillée, puis séchées à l'air libre.

b. Nanoparticules chargées du principe actif (Acide salicylique)

La procédure consiste à dissoudre de l'acide salicylique (0,1% en poids) dans de l'acide acétique à 1% puis de le mélanger à la solution de chitosane (0,2% en poids) préalablement préparée, avec un rapport CS : AS de 5 :1.

La suite de la préparation est la même que celle des nanoparticules vides.

IV.2. Caractérisation

IV.2.1. Caractérisation du chitosane

Avant de débiter le travail expérimental, il était utile de commencer par une caractérisation du biomatériau qui formera la matrice de nos vecteurs pharmaceutiques, à savoir le chitosane.

Le chitosane est caractérisé par trois paramètres importants : son degré de désacétylation, sa viscosité ainsi que son poids moléculaire. Ce sont les principales caractéristiques pouvant influencer sur la formation des micro/nanoparticules de chitosane.

IV.2.1.1. Caractérisation structurale par Infra-Rouge à Transformée de Fourier

L'analyse structurale du chitosane a été effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre de type JASCO FT/IR 4100 (**fig.IV.2**). Le spectre FTIR a été enregistré dans un intervalle de fréquence de 400 à 4000cm⁻¹.

Chapitre IV : Matériels et méthodes

L'échantillon a été préparé par broyage du chitosane commercial avec du KBr puis par compression sous forme de pastille.



Figure IV.2 : Spectrophotomètre FTIR

IV.2.1.2. Détermination du degré de désacétylation du chitosane par FTIR

La détermination du degré de désacétylation (DD) du chitosane par FTIR est la méthode la plus adaptée pour une caractérisation simple, rapide et efficace.

L'analyse a été effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre de type JASCO FT/IR 4100. Le spectre FTIR a été enregistré dans un intervalle de fréquence de 400 à 4000 cm^{-1} .

L'échantillon à analyser est préparé selon la méthode de *Sabnis et Block* [3], où le rapport chitosane : KBr est de 1 :100.

Le degré de désacétylation (DD) de l'échantillon de chitosane a été calculé selon la méthode proposée par *Roberts et Domszy* [4].

L'équation de calcul utilisée est donnée ci-dessous :

$$DD = 100 - [(A_{1655} / A_{3450}) \times 100 / 1,33]$$

Où

A_{1655} : Absorbance du pic 1655 cm^{-1} : Caractérise le groupement amide primaire.

A_{3450} : Absorbance du pic 3450 cm^{-1} : Caractérise le groupement hydroxyle.

1,33 : Valeur du rapport A_{1655} / A_{3450} dans le cas du chitosane entièrement N-acétylé. [4]

IV.2.1.3. Mesure de la viscosité et détermination du poids moléculaire viscosimétrique

a. Mesure de la viscosité

La viscosité du chitosane a été mesurée à l'aide d'un viscosimètre de type «VIBRO VISCOMETER SV-10 » doté d'une capacité allant de 0,3 à 10000 mPa.s. (fig.IV.3)

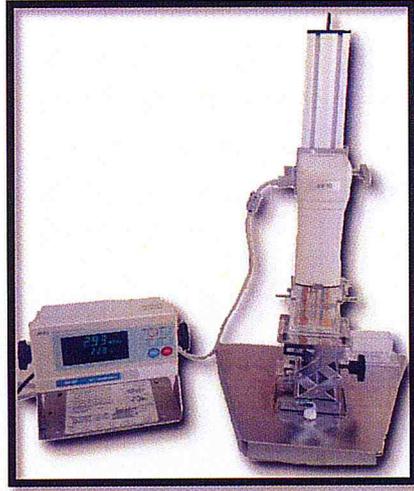


Figure IV.3 : Viscosimètre

La mesure de la viscosité consiste à préparer une solution de chitosane de concentration massique 0,04g/dl. Pour ce faire, on dissout 0.02g de chitosane dans 50mL d'une solution composée de 50% d'acétate de sodium 0.2M et 50% d'acide acétique 0.3M dans un bain à Ultrasons pendant 30min.

La solution à 0.04g/dl est versée dans le port échantillon du viscosimètre et les plaques de capteur en cuivre sont immergées dans le liquide. La valeur de la viscosité réduite est lue directement depuis l'appareil.

On renouvelle l'opération à différentes concentrations 0.03g/dl ; 0.02g/dl et 0.01g/dl en diluant à chaque fois la solution précédente, afin de pouvoir tracer la droite $\eta_{red}/C = f(C)$ et en déduire la valeur de la viscosité intrinsèque. [5]

b. Détermination du poids moléculaire viscosimétrique moyen

Le poids moléculaire viscosimétrique moyen a été calculé en utilisant l'équation de *Mark-Houwink-Sakurada*. Elle permet de relier la viscosité intrinsèque $[\eta]$ au poids moléculaire viscosimétrique moyen M_v , et est donnée ci-dessous :

$$[\eta] = K \times M^\alpha$$

Où :

$[\eta]$: Viscosité intrinsèque

M : Poids moléculaire viscosimétrique moyen du polymère

K et α : Coefficients de *Mark-Houwink-Sakurada* pour un système solvant/polymère donné.

IV.2.2. Caractérisation des vecteurs à base de chitosane

Les méthodes de caractérisation des microparticules (vides et chargées) sont les mêmes que celles des nanoparticules (vides et chargées).

IV.2.2.1. Aspect physique

La détermination de l'aspect physique consiste en un examen visuel des échantillons préparés.

IV.2.2.2. Caractérisation spectroscopique par FTIR

L'analyse structurale des microparticules et des nanoparticules vides et chargées a été effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre de type JASCO FT/IR 4100. Le spectre FTIR a été enregistré dans un intervalle de 400 à 4000 cm^{-1} .

Les échantillons ont été préparés par broyage avec du KBr puis par compression sous forme de pastilles.

IV.2.2.3. Caractérisation morphologique par MEB

La morphologie des microparticules (vides et chargées) et des nanoparticules (vides et chargées) a été observée à l'aide d'un microscope électronique à balayage de type «JOEL JSM-3680 », manipulé à 10kV (**fig IV.4**)

Les particules à analyser sont disposées sur un ruban adhésif double-face puis métallisées avec une fine couche d'or. Afin de visualiser leur structure interne, les micro/nanoparticules sont préalablement broyées à l'aide d'un mortier.

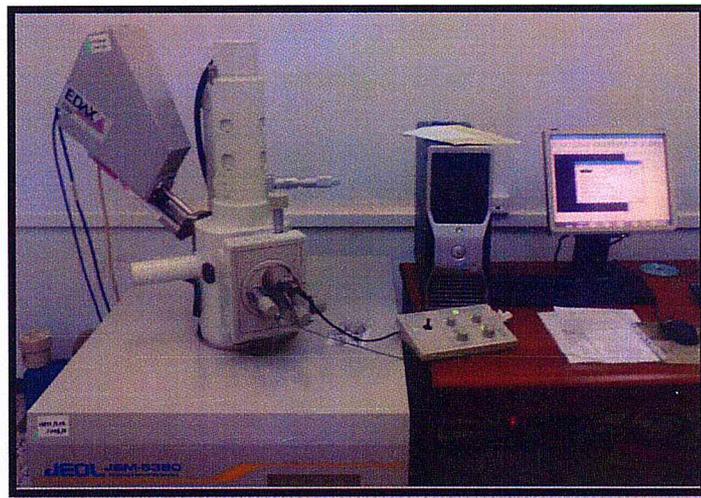


Figure IV.4 : Microscope Electronique à Balayage

IV.2.2.4. Caractérisation structurale par DRX

La cristallinité des microparticules (vides et chargées) et de nanoparticules (vides et chargées) a été déterminée à l'aide d'un diffractomètre à rayons X de type « D8-ADVANCE BRUKER » (fig IV.5).

Les échantillons ont été scannés dans un intervalle d'angle de $5^\circ \leq 2\theta \leq 60^\circ$, à une vitesse de $0,020^\circ$ et en utilisant une anode de Cuivre $K\alpha$.



Figure IV.5 : Diffractomètre à Rayons X

IV.2.2.5. Caractérisation thermographique par DSC

Une analyse thermique comportant la variation du flux en fonction de la température a été réalisée dans le but d'étudier la stabilité thermique et le comportement des microparticules ainsi que des nanoparticules préparées.

Les courbes ont été enregistrées à l'aide d'un appareil de type « NETZSCH DSC 200PC » (**fig IV.6**).

L'échantillon (5mg) a été placé dans un creuset en aluminium et chauffé dans une gamme de température comprise entre 20 et 200°C, à une vitesse de balayage de 10°C/min sous atmosphère d'azote (N₂).

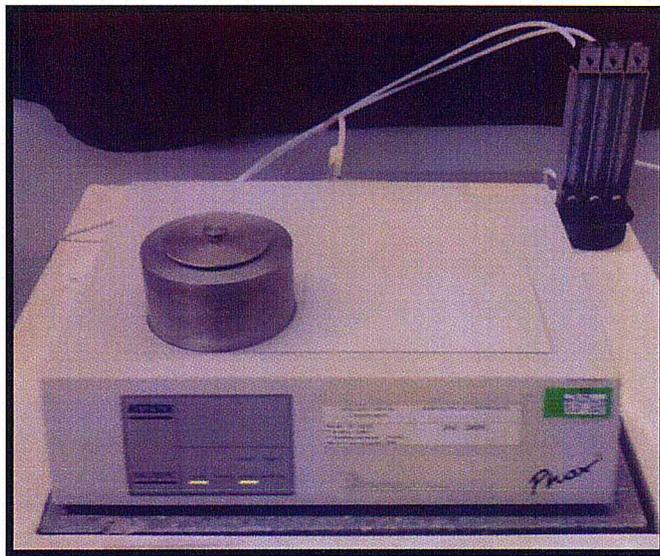


Figure IV.6 : Appareil de Calorimétrie Différentielle à Balayage

IV.2.2.6. Potentiel zêta et indice de polydispersité

Les mesures de la taille moyenne des particules, du potentiel zêta et de l'indice de polydispersité ont été réalisées sur le « HORIBA Scientific nanopartica SZ-100 » (**fig IV.7**), par la technique de la diffusion dynamique de la lumière (DLS), dans une cellule capillaire d'électrophorèse à 25°C.

Pour chaque échantillon, 1mL de la solution avant centrifugation a été mélangé à 1mL d'une solution de chlorure de sodium 10⁻³ M avant mesure.

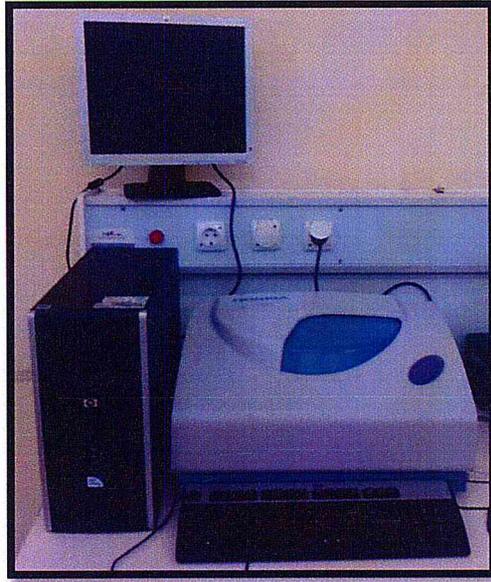


Figure IV.7 : Appareil de mesure du potentiel zêta

IV.2.2.7. Calcul du taux de charge et de l'efficacité d'encapsulation

Avant de procéder au calcul de l'efficacité d'encapsulation (EE) des micro/nanoparticules et de leur taux de charge (TC), il a été nécessaire de tracer une courbe d'étalonnage de l'acide salicylique, établie selon le protocole suivant :

Une solution mère a été préparée en pesant avec précision 10mg d'AS et en les plaçant dans une fiole jaugée de 10ml. Une solution d'acide acétique à 0.1% (v/v) a été utilisée pour compléter la fiole jusqu'au trait de jauge afin d'atteindre une concentration de 1mg/ml.

Une série de dilutions a été préparée à partir de la solution mère, avec des concentrations en AS de 0,01 ; 0,02 ; 0,03 ; 0,04 et 0,05mg/ml respectivement. L'absorbance de chaque solution a été déterminée par spectrophotomètre UV à $\lambda=297\text{nm}$ [6] (**fig IV.9**). La courbe d'étalonnage de l'AS a été tracée et l'équation standard a été utilisée pour des calculs ultérieurs.

Lors de l'évaluation de l'aptitude des particules des biopolymères en tant que systèmes d'encapsulation pour un principe actif spécifique, la capacité de charge et l'efficacité d'encapsulation sont les facteurs d'intérêt les plus importants. Ces deux facteurs exigent la séparation des particules du milieu environnant, généralement par centrifugation des particules en suspension. [7]

Afin de déterminer ces deux paramètres, la solution opaque contenant les micro/nanoparticules en suspension a été soigneusement transférée dans des tubes à centrifuger.

Chapitre IV : Matériels et méthodes

Les micro/nanoparticules ont été séparées de la suspension aqueuse par centrifugation à 10 000 tours/min pendant 30 minutes. Le surnageant a été recueilli et l'absorbance de l'AS non encapsulé a été mesurée par spectrophotomètre UV à $\lambda=297\text{nm}$. La quantité d'AS non encapsulé a été calculée à l'aide de la courbe d'étalonnage préalablement établie.

L'efficacité d'encapsulation (EE) des micro/nanoparticules est définie comme étant la teneur en médicament qui a été piégé dans les nanoparticules. Elle a été calculée en utilisant l'équation suivante [8]:

$$EE (\%) = \frac{T - F}{T} \times 100$$

Le taux de charge de l'acide salicylique a été calculé à partir de l'équation suivante [8] :

$$TC (\%) = \frac{T - F}{M} \times 100$$

Avec :

T : quantité totale d'AS ajouté lors du processus de préparation des micro/nanoparticules

F : quantité d'AS non encapsulé dans le surnageant

M : poids des micro/nanoparticules

IV.2.2.8. Calcul du rendement

Le rendement de la préparation des micro/nanoparticules vides et celui du procédé d'encapsulation a été déterminé par gravimétrie, en comparant le poids de la poudre sèche obtenue (micro/nanoparticules) avec celui des solides initialement impliqués dans le processus de préparation des micro/nanoparticules. [9]

Le rendement de la préparation a été calculé en appliquant les relations suivantes [10]:

IV.2.2.8.1. Microparticules

Vides

$$\tau = \frac{\text{poids des microparticules sèches}}{\text{poids des solides (CS + TPP)}} \times 100$$

Chargées

$$\tau = \frac{\text{poids des microparticules sèches}}{\text{poids des solides (CS + TPP+AS)}} \times 100$$

IV.2.2.8.2. Nanoparticules

✚ Vides

$$\tau = \frac{\text{poids des nanoparticules sèches}}{\text{poids des solides (CS + TPP)}} \times 100$$

✚ Chargées

$$\tau = \frac{\text{poids des nanoparticules sèches}}{\text{poids des solides (CS + TPP+AS)}} \times 100$$

IV.3. Etude du gonflement

L'étude du gonflement des microparticules et nanoparticules de chitosane vides et chargées d'acide salicylique a été effectuée dans 2 médias différents, simulant les conditions gastriques (pH=1,2) et intestinales (pH=7,4), respectivement.

Une quantité pré-pesée (20mg) des échantillons (micro et nanoparticules vides et chargées d'acide salicylique) est immergée dans 30mL de chaque média et analysée à des intervalles de temps précis, pendant 8h, à température ambiante. Les échantillons sont centrifugés pendant 30min dans des tubes de centrifugation pré-pesés. Le poids des micro/nanoparticules humides est déterminé après élimination du surnageant. [11]

Le pourcentage de gonflement des micro/nanoparticules vides et chargées d'acide salicylique a été calculé en utilisant la formule suivante [12] :

$$SW (\%) = \frac{W_w - W_o}{W_o}$$

Avec :

SW(%) : Taux de gonflement

W_w : poids humide de l'échantillon

W_o : poids initial de l'échantillon

IV.4. Test de fluorescence de l'acide salicylique

La solution d'acide salicylique (0,1% en poids) dissous dans de l'acide acétique à 1% (v/v) a été exposée aux rayonnements Ultra-Violet, sous une lampe UV-254 nm BIOBLOCK SCIENTIFIC VL.4.C, afin de pouvoir observer sa fluorescence.

IV.5. Etude de la cinétique de libération *in vitro* de l'acide salicylique

La cinétique de libération *in vitro* de l'acide salicylique a été étudiée dans des conditions biomimétiques dans deux (02) milieux physiologiquement simulés :

- i. Fluide gastrique simulé (Simulated Gastric Fluid en Anglais) (SGF) à pH = 1,2 :
Simulant les conditions physiologiques gastriques.
- ii. Tampon Phosphate Salin (Phosphate Buffer Saline en Anglais) (PBS) à pH = 7,4 :
Simulant les conditions physiologiques intestinales.

IV.5.1. Dans le SGF

20mg des microparticules (respectivement nanoparticules) de chitosane chargées d'acide salicylique ont été introduits dans un ballon bicol contenant 50mL du milieu physiologiquement simulé (SGF) [13] et placé dans un bain cryostat (**fig IV.8**) réglé à 37 ± 1 °C, sous agitation à 100 tours/min pendant une durée de cinq (05) jours.

A des intervalles de temps précis, environ 4mL ont été prélevés du milieu et remplacés par 4mL de la solution SGF.

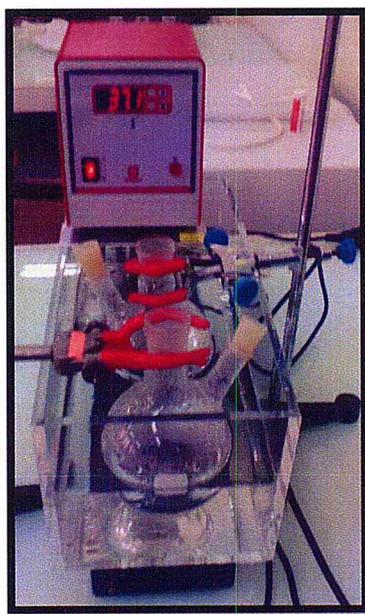


Figure IV.8 : Bain Cryostat

La concentration en acide salicylique des prélèvements effectués a été déterminée par spectrophotomètre UV de type « CARY 50 Scan» (**fig.IV.9**), à une longueur d'onde de 297nm d'après une courbe d'étalonnage établie au préalable.

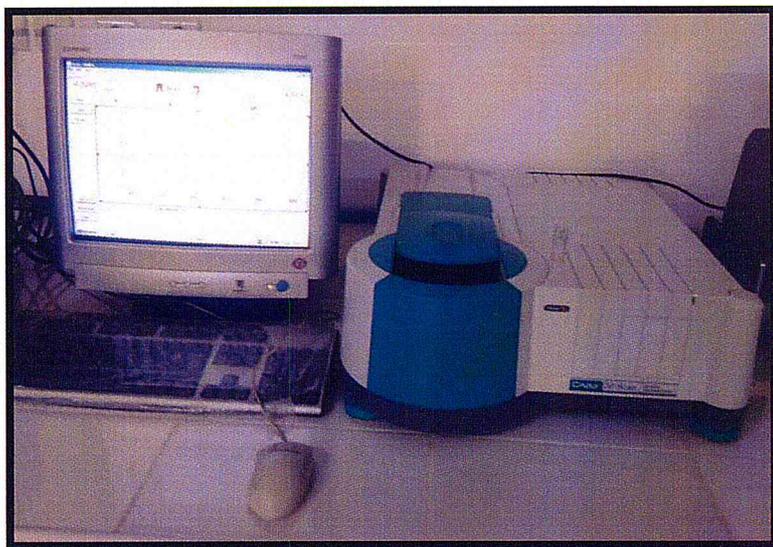
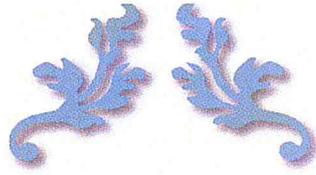


Figure IV.9 : Spectrophotomètre UV

IV.5.2. Dans le PBS [14]

L'opération est la même que celle effectuée dans le SGF.

N.B : le principe de fonctionnement de chaque appareil est donné en annexe.



CHAPITRE V

Résultats et discussions



Introduction

Dans ce chapitre, nous allons présenter les résultats expérimentaux obtenus au cours de notre étude, ainsi que l'interprétation et les discussions portant sur ces résultats.

V.1. Préparation des vecteurs à base de chitosane

Les microparticules et les nanoparticules de chitosane vides et chargées d'acide salicylique ont été préparées par la méthode de la gélation ionotrope selon un processus rapporté par Calvo [15].

Cette technique est basée sur la capacité de réticulation des polyélectrolytes en présence de certains ions pour former des hydrogels. Elle est simple, rapide et n'exige pas l'utilisation de solvants organiques ou de tensio-actifs. De plus, elle présente l'avantage principal de permettre une formulation douce et de conserver ainsi l'activité biologique du principe actif.

L'ajout d'une solution aqueuse de tripolyphosphate de sodium goutte à goutte à l'aide d'une seringue, à une solution acide de chitosane (pH 4,5) sous agitation magnétique pendant 30min et à température ambiante permet la formation des microparticules et des nanoparticules (fig.V.1).

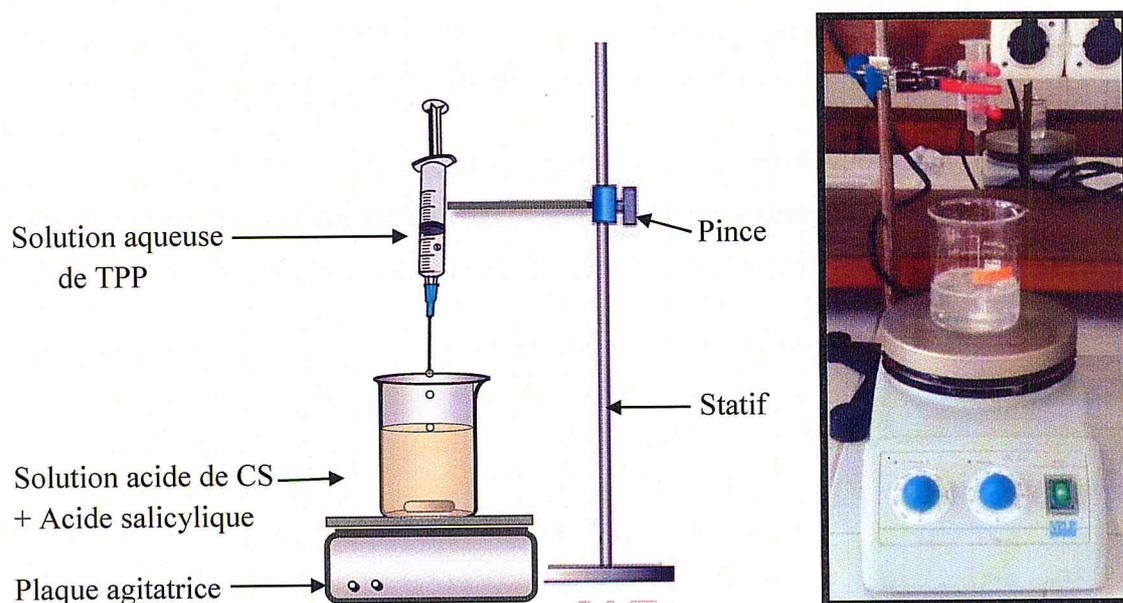


Figure V.1: Schéma de formation des micro/nanoparticules

L'apparition d'une solution opalescente a été attribuée à la formation de nanoparticules selon le rapport de Calvo et al. [16]. (fig.V.2)

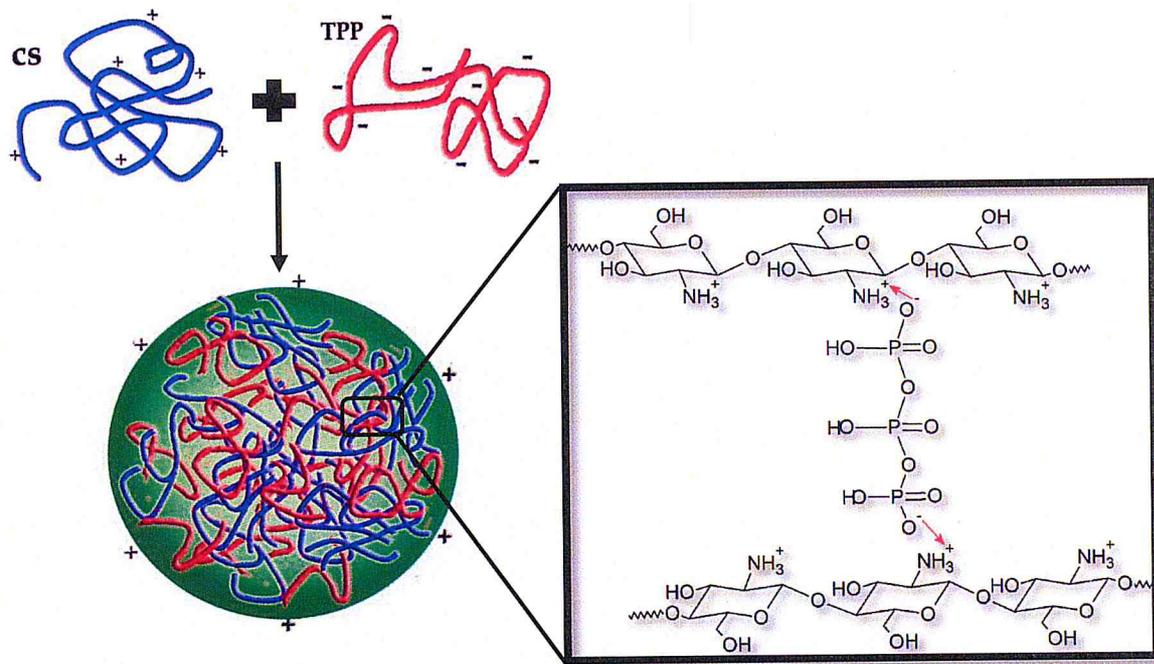


Figure V.3 : Principe de formation des micro/nanoparticules

V.2. Caractérisation

V.2.1. Caractérisation du chitosane

V.2.1.1. Caractérisation structurale par Infra-Rouge à Transformée de Fourier

Le spectre FTIR du chitosane est donné dans la figure ci-dessous :

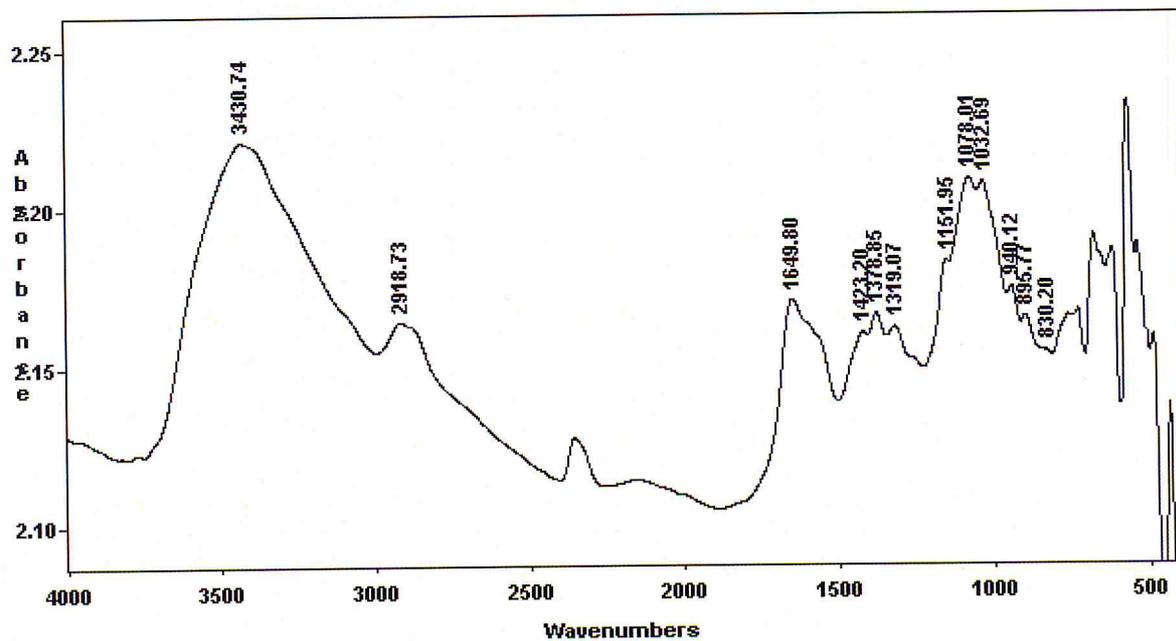


Figure V.4 : Spectre FTIR du chitosane

Les groupements caractéristiques du chitosane sont regroupés dans le tableau suivant :

Fréquence (cm ⁻¹)	Attribution
3430	Vibration d'élongation de la liaison O-H + Vibration d'élongation de la liaison N-H du groupement amine primaire [11]
2918	Vibration d'élongation symétrique de la liaison C-H des groupements CH ₂ et CH ₃ [17]
1649	Vibration d'élongation de la liaison C=O du groupement amide secondaire [18]
1423	Vibration de déformation symétrique de la liaison C-H du groupement CH ₂
1378	Vibration d'élongation de la liaison C-N du groupement amine I [20]
1319	Vibration de déformation symétrique de la liaison C-H du groupement CH ₃
1151	Vibration d'élongation asymétrique de la liaison C-O-C dans la liaison glucosidique β (1-4) [20]
1078	Vibration d'élongation de la liaison C-O [21]
847-939	Vibration d'élongation du cycle pyranosidique

Tableau V.1: Groupements caractéristiques du chitosane

V.2.1.2. Détermination du degré de désacétylation du chitosane par FTIR

La détermination du degré de désacétylation du chitosane est basée sur la comparaison entre l'absorbance d'une bande proportionnelle à la désacétylation (bande de mesure) et l'absorbance d'une autre bande indépendante à la désacétylation (bande de référence).

Le DD du chitosane obtenu par FTIR est de l'ordre de 79%, d'où un DA égal à 21%

$$DA = 100 - DD$$

AN :

$$DA = 100 - 79 = 21\%$$

Chapitre V : Résultats et discussions

V.2.1.3. Mesure de la viscosité et détermination du poids moléculaire viscosimétrique

a. Mesure de la viscosité

La droite qui permet de définir la viscosité intrinsèque du chitosane est donnée ci-dessous :

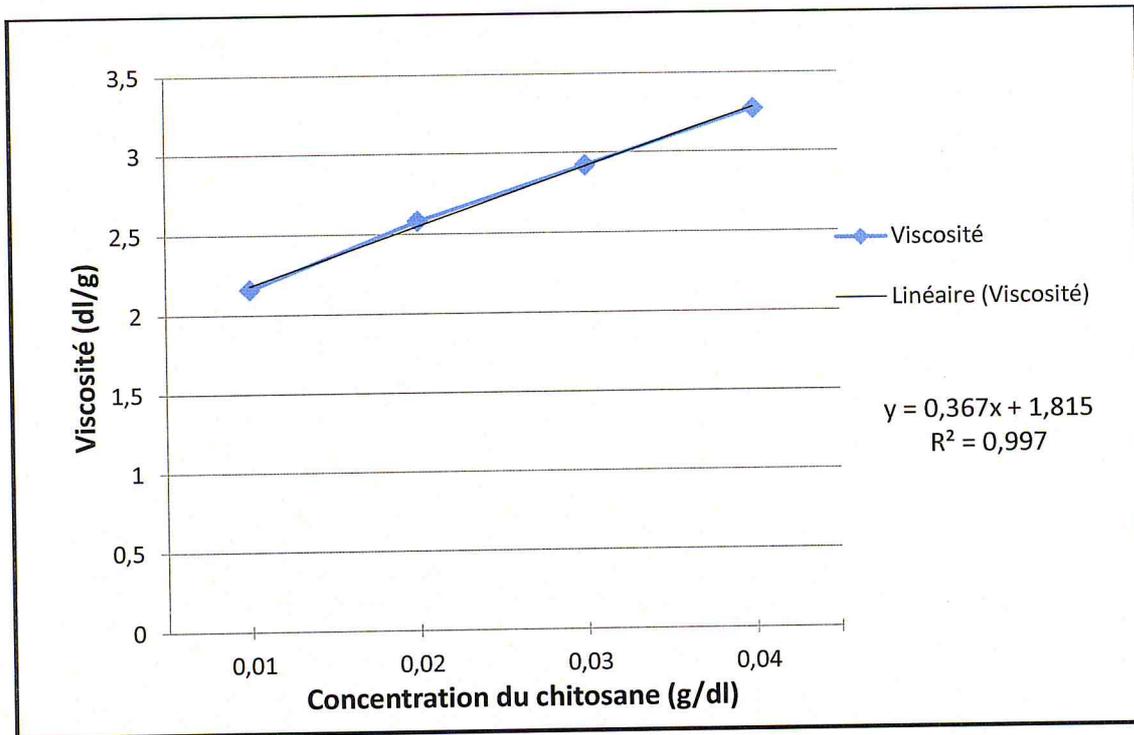


Figure V.5 : Variation de la viscosité en fonction de la concentration

La viscosité intrinsèque $[\eta]$ est l'extrapolation de la droite $\eta/C = f(C)$ à $C=0$.

Elle est égale à **1,81 dl/g** soit **181 ml/g**.

b. Détermination du poids moléculaire viscosimétrique moyen

Le poids moléculaire viscosimétrique moyen a été calculé en utilisant l'équation de *Marc-Houwink-Sakurada* (donnée ci-dessous) puisqu'elle permet de relier la viscosité intrinsèque $[\eta]$ au poids moléculaire viscosimétrique moyen M_v .

$$[\eta] = k \times M^a$$

D'où:

$$M = \left(\frac{[\eta]}{k} \right)^{1/\alpha}$$

AN : $M = 237872,41 \text{ g/mol}$

Avec : $k = 1,81 \times 10^{-3} \text{ dl/g}$ et $\alpha = 0,93$.

Le poids moléculaire viscosimétrique moyen du chitosane est de **237872,41 g/mol**, soit environ **237,87 KDalton**.

V.2.2. Caractérisation des vecteurs à base de chitosane

V.2.2.1. Aspect physique

L'examen effectué à l'œil nu montre que les microparticules et les nanoparticules de chitosane vides et chargées d'acide salicylique obtenues après centrifugation se présentent sous forme de gel opaque, sans odeur caractéristique (fig.V.6)

Après quelques jours de séchage à l'air libre, les micro/nanoparticules ont présenté un aspect de poudre blanche (fig.V.6).

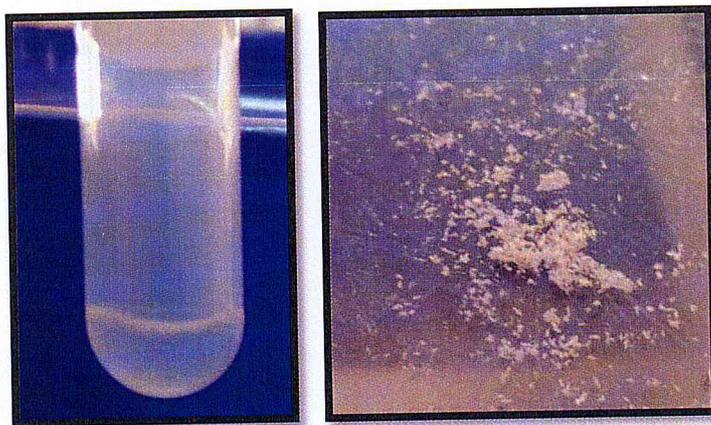


Figure V.6 : Vue macroscopique des microparticules et nanoparticules avant séchage (à gauche), après séchage (à droite)

V.2.2.2. Caractérisation spectroscopique par FTIR

V.2.2.2.1. Microparticules

✚ Microparticules vides

Le spectre FTIR des microparticules vides est donné dans la figure ci-dessous :

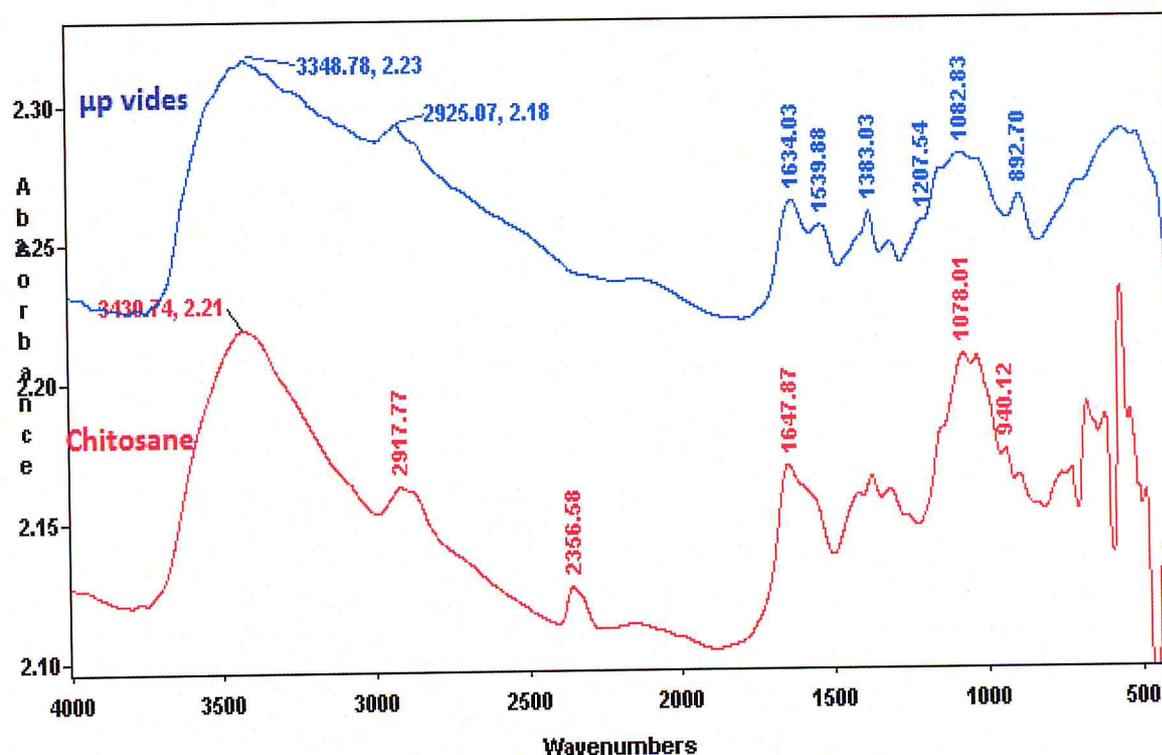


Figure V.7 : Spectre FTIR des microparticules vides

Le changement observé dans le spectre FTIR des microparticules vides comparé au spectre FTIR du CS réside dans l'élargissement et le déplacement de la bande à 3430cm^{-1} , et qui correspond à la vibration d'élongation du groupement OH, vers des longueurs d'ondes plus petites situées à 3348cm^{-1} . Ceci indique l'augmentation du nombre de liaisons hydrogène. [21]

Le pic enregistré à 1647cm^{-1} et attribué au groupement amide dans le spectre du CS est déplacé vers 1634cm^{-1} dans le spectre des microparticules vides, confirmant ainsi l'interaction électrostatique entre la charge positive du groupement amine (NH_3^+) du CS et la charge négative du TPP (PO^-). Ces résultats sont en accord avec ceux publiés dans la littérature. [22]

Un nouveau pic apparaît vers 1539cm^{-1} dans le spectre des microparticules vides, il est dû à la protonation du groupement amine du CS en milieu acide (NH_3^+) [23].

Chapitre V : Résultats et discussions

Deux nouveaux signaux apparaissent vers 1207 cm^{-1} et 892 cm^{-1} . Ils sont attribués à l'élongation des groupements P=O et P-O-P du TPP respectivement [18-19]. Ces résultats indiquent la présence des groupements phosphate dans les microparticules et confirment la réticulation entre le CS et le TPP.

Les pics dans l'intervalle $1100\text{-}850\text{ cm}^{-1}$ et qui caractérisent la nature polysaccharidique du chitosane restent inchangés même après réticulation. On peut déduire que la formation des microparticules s'est effectuée sans la destruction du cycle glycopyranosique.

Le spectre FTIR indique que la préparation des microparticules de chitosane vides par réticulation a été réalisée avec succès.

✚ Microparticules chargées d'acide salicylique

Le spectre FTIR des microparticules chargées d'acide salicylique est donné dans la figure ci-dessous :

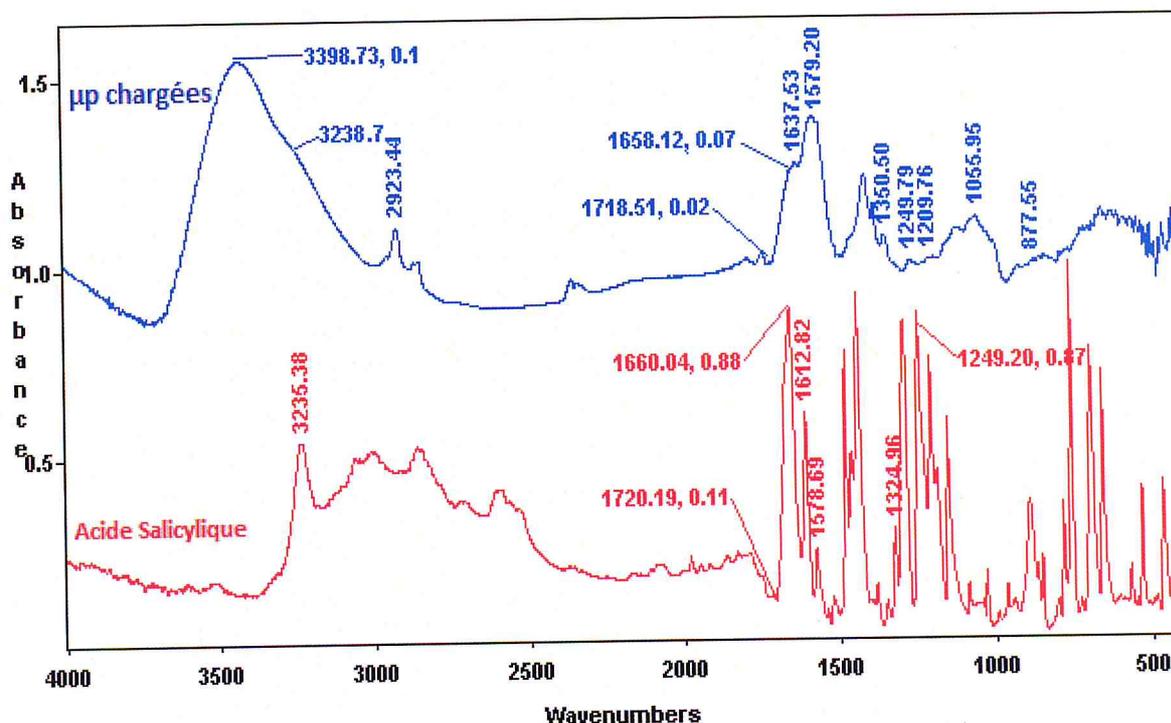


Figure V.8 : Spectre FTIR des microparticules chargées d'acide salicylique

La bande caractéristique du groupement OH devenue plus large et accompagnée d'un déplacement vers 3398 cm^{-1} indique la formation de liaisons hydrogène entre le groupement OH de l'acide salicylique et la matrice de chitosane. [24]

Chapitre V : Résultats et discussions

Le spectre FTIR de l'acide salicylique présente une très forte bande caractéristique à 1660 cm^{-1} attribuée aux vibrations d'élongation du groupement C=O. Les pics à 1578 , 1324 et 1249 cm^{-1} sont affectés aux vibrations d'élongation asymétrique et symétrique du groupement C-O de l'acide carboxylique, et de la vibration d'élongation du groupement phénolique Ph-O, respectivement [25]. Dans le cas des microparticules chargées, le premier pic est légèrement déplacé vers 1658 cm^{-1} , alors que les autres pics restent inchangés. Les résultats obtenus confirment la présence d'acide salicylique dans les microparticules de chitosane. Ces observations concordent avec les résultats des études publiées dans la littérature.

Après encapsulation, le spectre FTIR des microparticules de chitosane chargées d'AS présente des similitudes avec le spectre FTIR des microparticules de chitosane vides. Cependant, de nouveaux pics apparaissent et d'autres sont déplacés vers des longueurs d'ondes plus petites. Ces résultats permettent de conclure que l'acide salicylique a été fixé avec succès.

V.2.2.2.2. Nanoparticules

✚ Nanoparticules vides

Le spectre FTIR des nanoparticules vides est donné dans la figure ci-dessous :

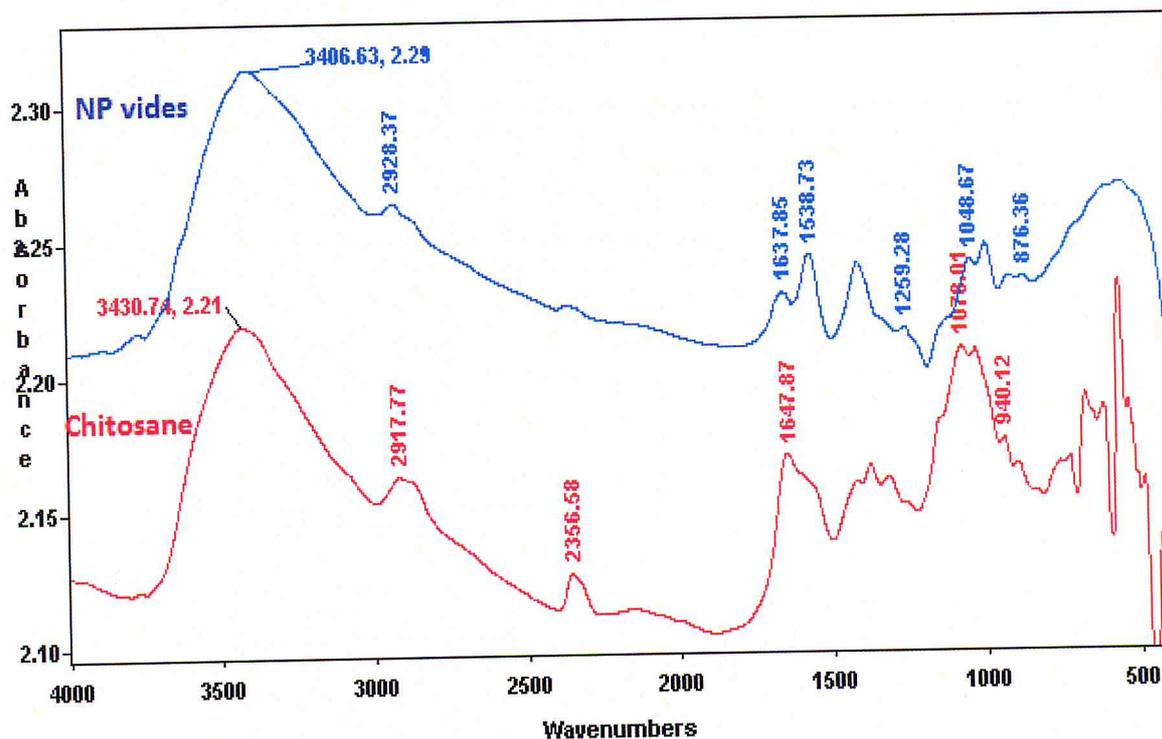


Figure V.9: Spectre FTIR des nanoparticules vides

Chapitre V : Résultats et discussions

Après formation des nanoparticules, la bande du CS à 3430 cm^{-1} qui a été attribuée au groupement OH est déplacée vers 3406 cm^{-1} . Un élargissement et une augmentation de l'intensité relative de la bande ont été observés, indiquant l'augmentation du nombre de liaisons hydrogène. [21]

Le pic enregistré à 1647 cm^{-1} et attribué au groupement amide dans le spectre du CS est déplacé vers 1637 cm^{-1} dans le spectre des nanoparticules vides, confirmant l'interaction électrostatique (réticulation) entre la charge positive du groupement amine (NH_3^+) du CS et la charge négative du TPP (PO^-). Des observations similaires ont été rapportées par d'autres chercheurs [11].

Un nouveau pic apparaît vers 1539 cm^{-1} dans le spectre des microparticules vides, il est dû à la protonation du groupement amine du CS en milieu acide (NH_3^+) [23].

Les deux nouveaux signaux intenses enregistrés vers 1259 cm^{-1} et 876 cm^{-1} sont attribués à l'élongation des groupements P=O et P-O-P du TPP respectivement. [18-19] Ces résultats indiquent la présence des groupements phosphate dans les nanoparticules et confirment la réticulation entre le CS et le TPP.

Les pics dans la fourchette $1100\text{-}850\text{ cm}^{-1}$ et qui indiquent la nature polysaccharidique du chitosane restent inchangés. On peut déduire que la formation des nanoparticules s'est effectuée sans la destruction du cycle glycopyranosique.

Le spectre FTIR indique que la préparation des nanoparticules de chitosane vides par la méthode de la gélation ionotropique a été réalisée avec succès.

✚ Nanoparticules chargées d'acide salicylique

Le spectre FTIR des nanoparticules chargées est donné dans la figure ci-dessous :

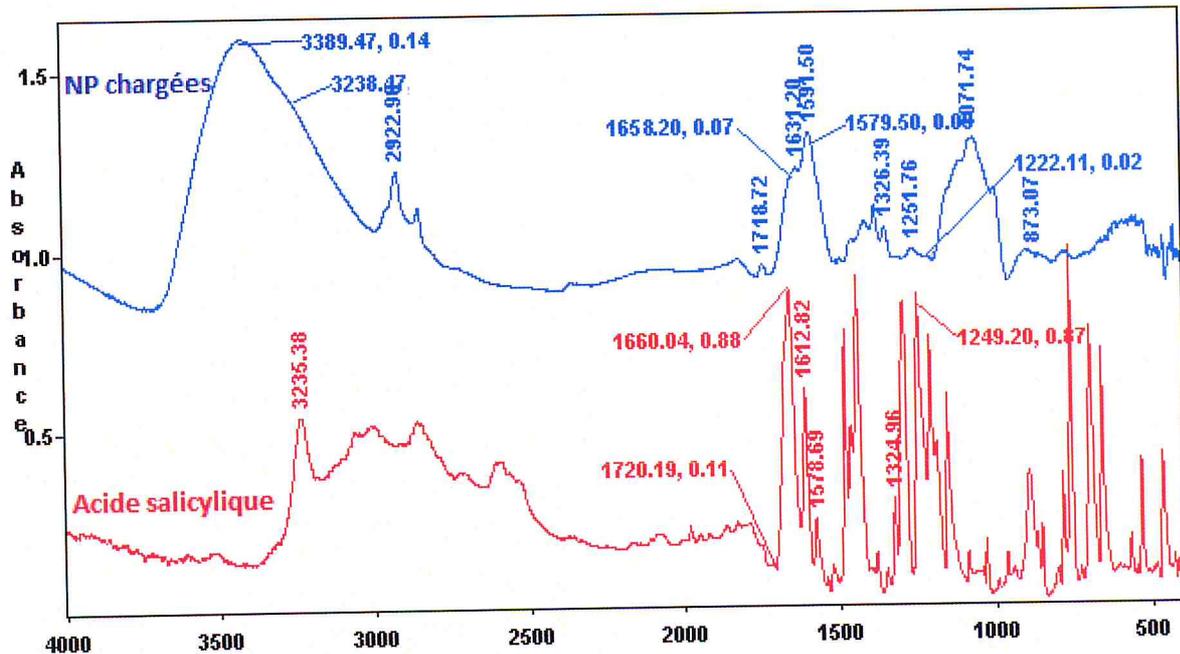


Figure V.10: Spectre FTIR des nanoparticules chargées d'acide salicylique

La bande enregistrée à 3406 cm^{-1} dans le spectre des nanoparticules vides est déplacée vers 3389 cm^{-1} dans le cas des nanoparticules chargées, elle est devenue plus large soulignant la formation de liaisons hydrogène entre le groupement OH de l'acide salicylique et le chitosane. [24]

Le spectre FTIR de l'acide salicylique présente une très forte bande caractéristique à 1660 cm^{-1} attribuée aux vibrations d'élongation du groupement C=O. Les pics à 1578 , 1324 et 1249 cm^{-1} sont affectés aux vibrations d'élongation asymétrique et symétrique du groupement C-O de l'acide carboxylique, et de la vibration d'élongation du groupement phénolique Ph-O, respectivement. [25]. Ces pics sont déplacés vers 1658 , 1579 , 1326 et 1251 cm^{-1} , respectivement dans le spectre des nanoparticules chargées. Les résultats obtenus confirment la présence d'acide salicylique au sein de la structure des nanoparticules. Ces observations concordent avec les résultats des études publiées dans la littérature. [24]

Après encapsulation, le spectre FTIR des nanoparticules de chitosane chargées d'acide salicylique présente des similitudes avec le spectre FTIR des nanoparticules de chitosane vides.

Chapitre V : Résultats et discussions

Cependant, de nouveaux pics apparaissent et d'autres sont déplacés vers des longueurs d'ondes plus petites. Ces résultats permettent de conclure que l'acide salicylique a été fixé avec succès.

V.2.2.3. Caractérisation morphologique par MEB

Les analyses faites par Microscope Electronique à Balayage ont été effectuées sur les microparticules et nanoparticules de chitosane vides et chargées d'acide salicylique dans le but d'évaluer leur surface, leurs caractéristiques morphologiques et de connaître leur taille approximative.

Les particules sont perçues par MEB de manière significative.

V.2.2.3.1. Microparticules

🚦 Microparticules vides

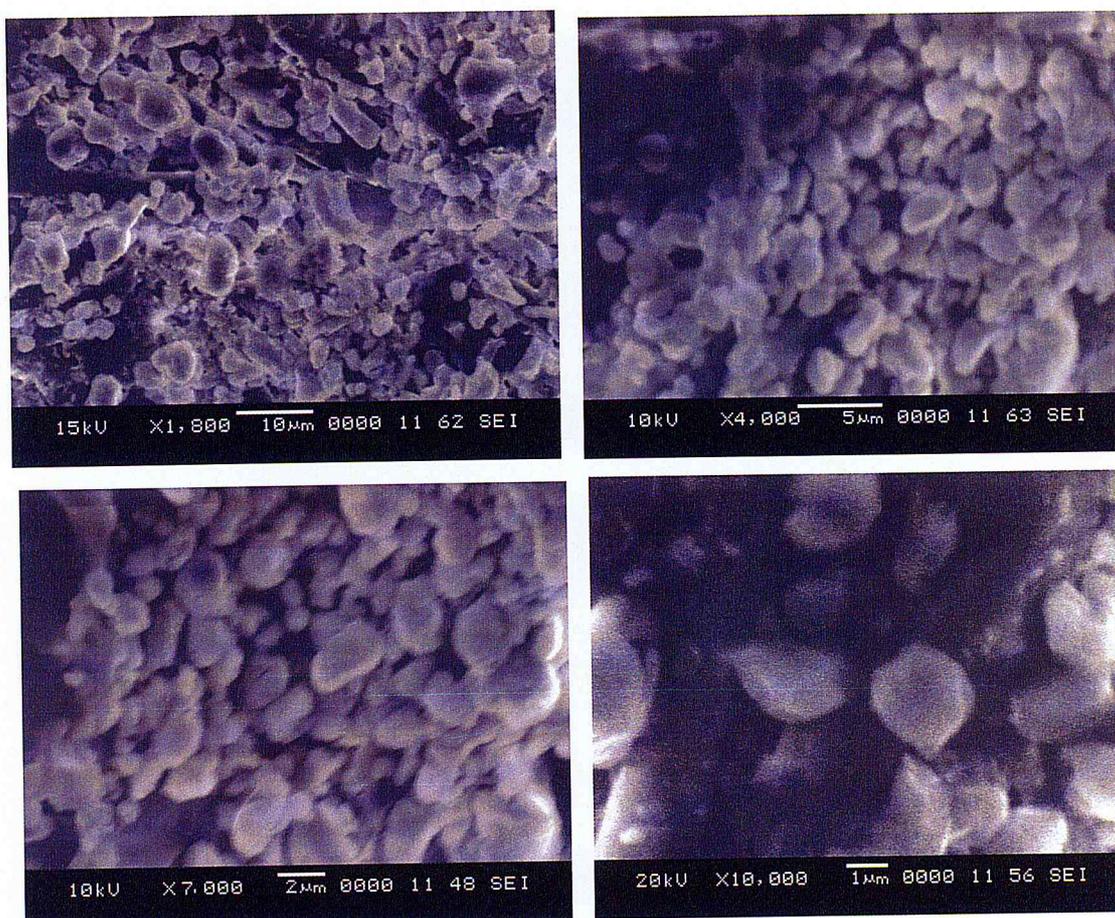


Figure V.11 : Images MEB de microparticules vides

Chapitre V : Résultats et discussions

Les images MEB illustrent la formation de particules à l'échelle microscopique. Un agrandissement de x1800 fait apparaître un assemblage de petites graines de différentes tailles, formant une structure semblable à celle des roses de sable.

L'examen des mêmes espèces avec un agrandissement de x4000 laisse apparaître une architecture rugueuse. Des examens plus approfondis sur ces mêmes particules avec des agrandissements partant de x7000 à x10 000 permettent d'identifier la morphologie sphérique des particules, avec des tailles comprises entre 2 et 6 μm . Ceci confirme le changement morphologique après réticulation par TPP.

✚ Microparticules chargées d'acide salicylique

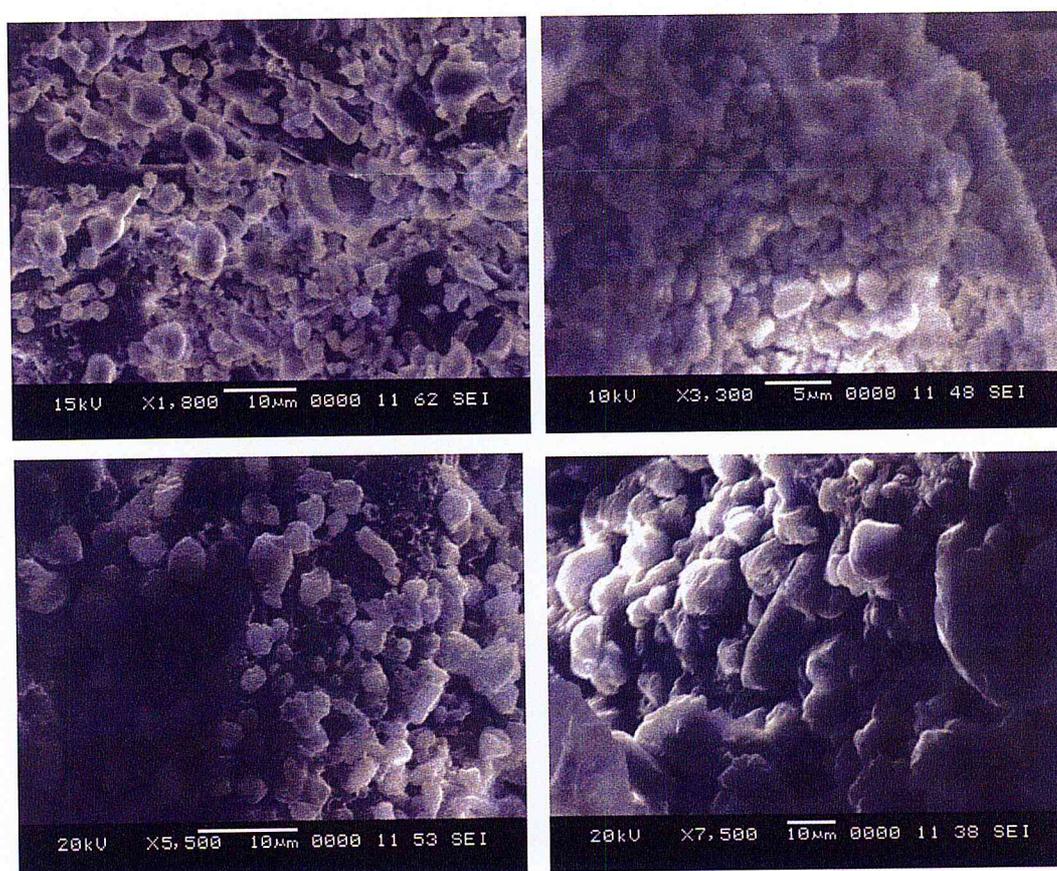


Figure V.12 : Images MEB de microparticules chargées d'acide salicylique

Les images MEB des microparticules chargées d'acide salicylique ont révélé une morphologie en rose de sable. Un agrandissement de x5500 a permis d'observer des particules

Chapitre V : Résultats et discussions

de forme sphérique avec une surface rugueuse, de taille comprise dans un intervalle de 2 à 10 μm .

Le contenu initial d'acide salicylique n'a pas d'influence significative sur la forme et la taille des microparticules.

V.2.2.3.2. Nanoparticules

✚ Nanoparticules vides

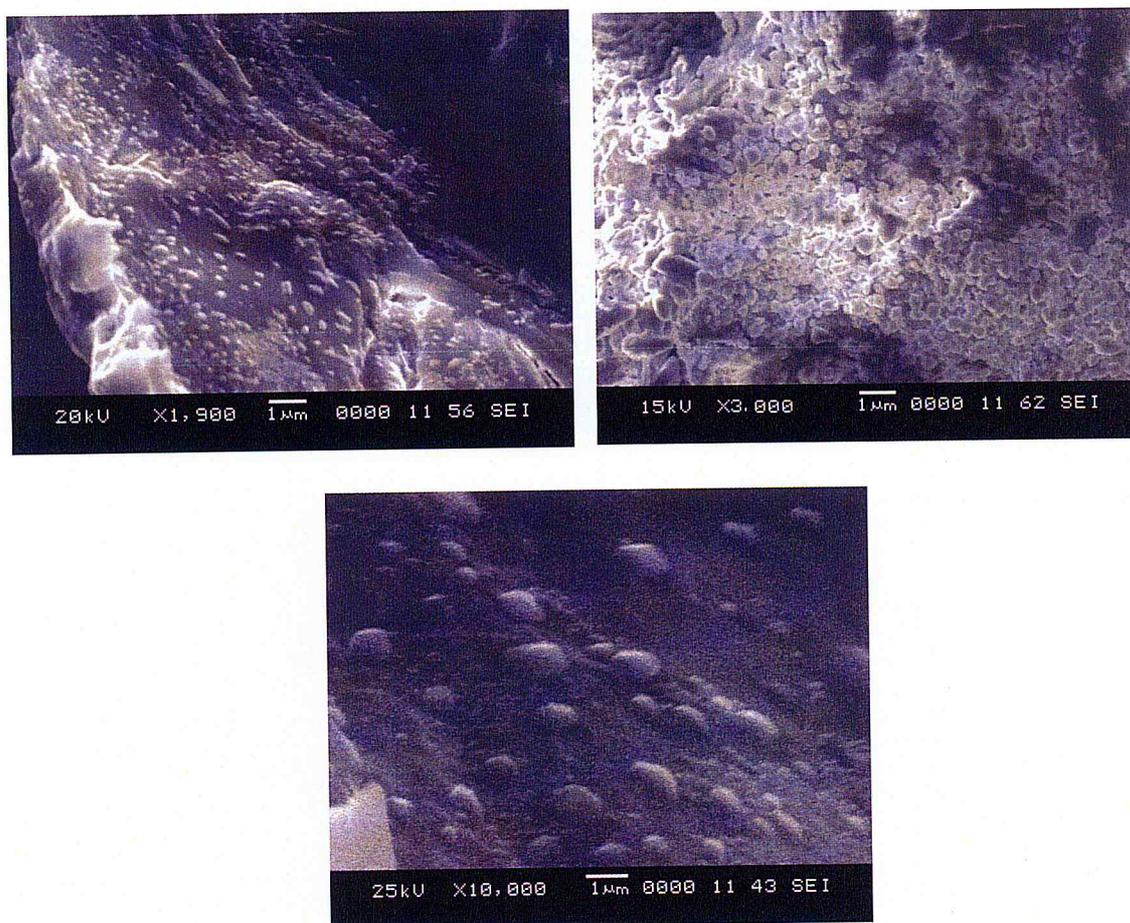


Figure V.13 : Images MEB de nanoparticules vides

Les nanoparticules présentent les caractéristiques typiques d'une matrice réticulée ioniquement. Les images MEB confirment l'uniformité des particules et montrent également leur surface lisse.

La figure ci-dessus montre que les nanoparticules ont une structure de rose de sable, des agrandissements allant de 1900 à 10 000 ont permis de révéler une morphologie très homogène ainsi qu'une forme sphérique. La taille de ces nanoparticules varie de 100 à 200 nm.

✚ Nanoparticules chargées d'acide salicylique

La figure ci-dessous fait apparaître un amas de petites particules de différentes tailles, et de forme sphérique. Des examens plus approfondis sur cet amas de nanoparticules avec différents agrandissements allant de x5000 à x17 000 permettent d'identifier la morphologie sphérique des nanoparticules étudiées avec des tailles comprises entre 100 et 200 nm.

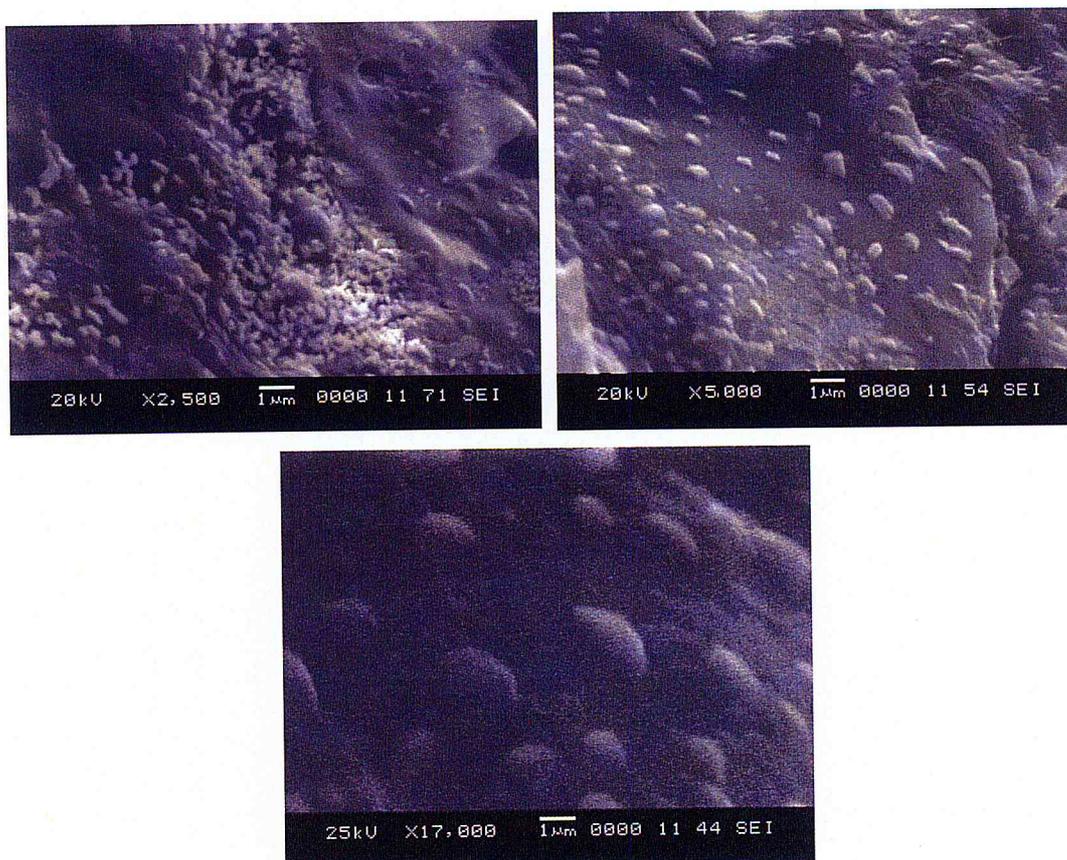


Figure V.14: Images MEB de nanoparticules chargées d'acide salicylique

Les nanoparticules vides et chargées de principe actif ont des caractéristiques similaires. Les images MEB nous ont permis de constater que les particules chargées d'acide salicylique ne perdent pas leur morphologie sphérique après piégeage du principe actif. Ceci confirme en outre que la surface lisse est conservée même après l'encapsulation.

Le contenu initial en principe actif n'a donc pas d'influence significative sur la forme et la taille des nanoparticules préparées.

V.2.2.4. Caractérisation structurale par DRX

V.2.2.4.1. Microparticules

✚ Microparticules vides

La figure ci-dessous représente le diffractogramme de rayons X qui permet de comparer la cristallinité du chitosane avec celle des microparticules vides.

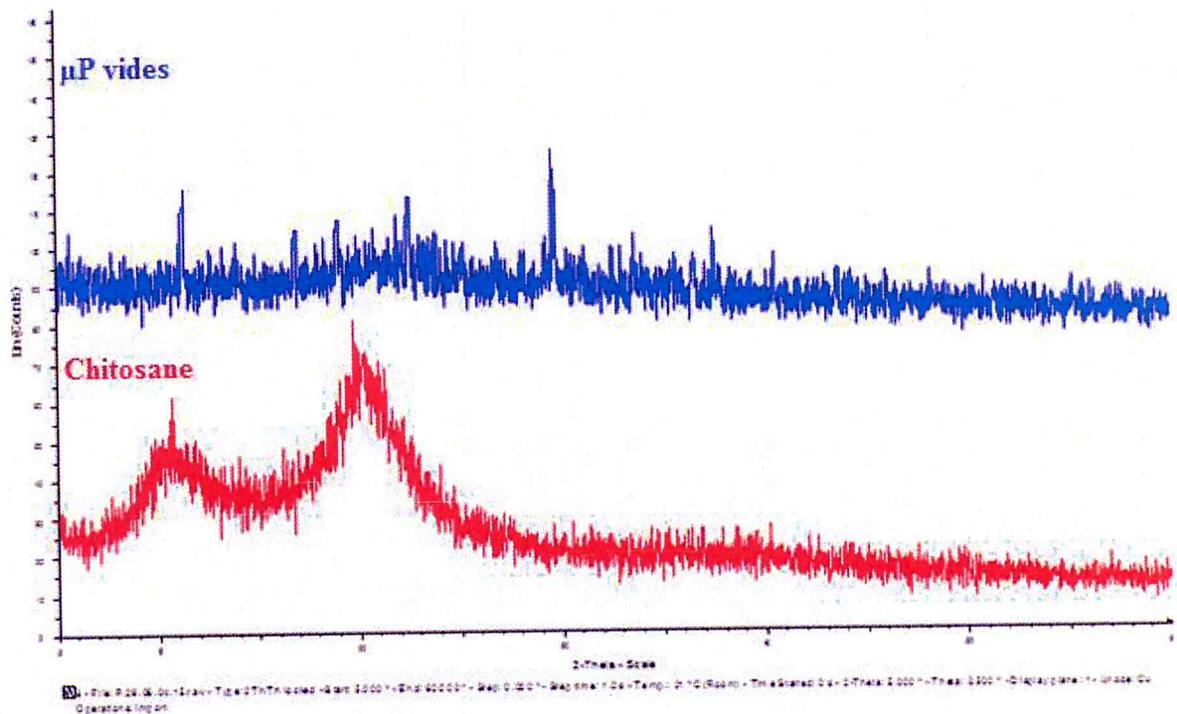


Figure V.15: Diffractogramme des microparticules vides

L'apparition des pics caractéristiques du chitosane à $2\theta=11^\circ$ et $2\theta=20^\circ$ traduit la structure semi-cristalline du polymère. Ces observations sont cohérentes avec la littérature. [24] Ces deux pics sont aussi observés dans le diffractogramme des microparticules vides, mais ils sont devenus moins larges et moins intenses indiquant une diminution de la cristallinité.

La diminution de l'intensité traduit la diminution de la chaîne de polymère avec une structure moins ordonnée. Ce changement est dû à des modifications dans la structure cristalline du chitosane produites par des interactions électrostatiques (réticulations).

Le pic à $2\theta=20^\circ$ est déplacé vers des angles plus petits ($2\theta=19^\circ$) expliquant la formation de liaisons hydrogène durant le processus de préparation des microparticules.

Chapitre V : Résultats et discussions

D'autres pics caractéristiques des microparticules à base de chitosane sont observés, notamment vers la région $2\theta = 17^\circ$; 22.5° et 29.5° . Ces changements sont dus à des modifications dans la structure cristalline du chitosane, qui sont produites par des interactions entre le groupement phosphate du TPP et le groupement amine protoné du chitosane (réticulation). [27]

Tous ces résultats sont en accords avec ceux publiés dans la littérature [28].

✚ Microparticules chargées d'acide salicylique

L'analyse DRX a été effectuée dans l'objectif d'évaluer l'influence du principe actif (acide salicylique) sur les microparticules de chitosane.

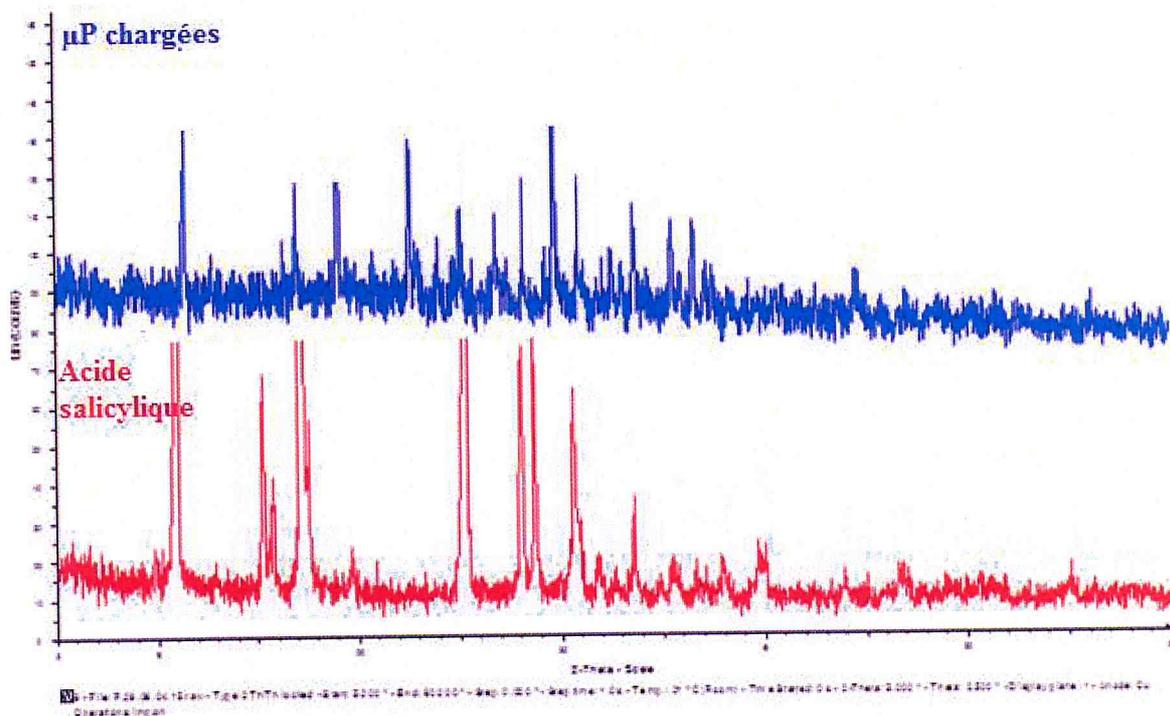


Figure V.16: Diffractogramme des microparticules chargées

Le diffractogramme de l'acide salicylique montre la présence des pics caractéristiques du principe actif à $2\theta = 11^\circ$; 17° ; 25° ; 29° ; 31° et 33.5° . Leur intensité indique une cristallinité élevée [29]. Ces pics spécifiques attribués à la structure cristalline de l'acide salicylique apparaissent dans le spectre des microparticules chargées, ce qui confirme la présence du principe actif. En revanche, ils sont devenus moins intenses indiquant une diminution de la cristallinité de l'acide salicylique lors de son encapsulation.

Chapitre V : Résultats et discussions

Après réticulation, les pics caractéristiques du chitosane sont maintenus dans le diffractogramme des nanoparticules vides. Le pic à $2\theta = 20^\circ$ est déplacé vers des angles plus petits ($2\theta = 19^\circ$). La diminution du pic de chitosane et l'apparition de nouveaux pics moins intenses dans le diffractogramme des nanoparticules indiquent la diminution de la cristallinité du chitosane par la diminution de la chaîne du polymère avec une structure moins ordonnée, et l'augmentation de l'espace entre les chaînes pour une bonne accessibilité des groupements NH_3^+ .

Par ailleurs, de nouveaux pics apparaissent, notamment vers la région $2\theta = 17^\circ$; 22.5° et 29.5° . Ces changements sont la conséquence de modifications dans la structure semi-cristalline du chitosane, qui sont produites par des interactions entre le groupement phosphate du TPP et le groupement amine protoné du chitosane. Ces interactions diminuent la cristallinité résiduelle du polymère, qui augmente la porosité du matériel dû à l'augmentation de la surface spécifique du chitosane, accentuant son pouvoir d'encapsulation.

Ces résultats sont en accord avec ceux publiés dans la littérature [29].

✚ Nanoparticules chargées d'acide salicylique

L'analyse DRX a été effectuée dans l'objectif d'évaluer l'influence du principe actif (acide salicylique) sur les nanoparticules de chitosane.

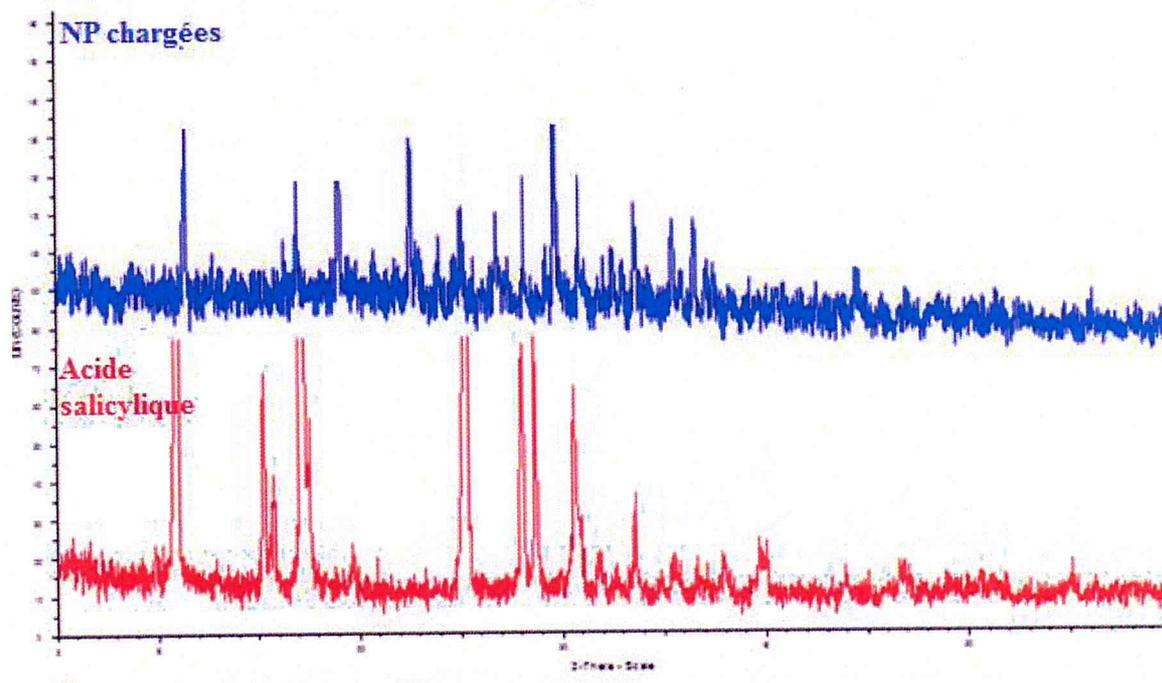


Figure V.18: Diffractogramme des nanoparticules chargées

Chapitre V : Résultats et discussions

Le diffractogramme de l'acide salicylique montre la présence des pics caractéristiques du principe actif à $2\theta = 11^\circ ; 17^\circ ; 25^\circ ; 29^\circ ; 31^\circ$ et 33.5° . Leur intensité indique une cristallinité élevée. [24-29]. Ces pics spécifiques attribués à la structure cristalline de l'acide salicylique apparaissent dans le spectre des nanoparticules chargées, ce qui confirme la présence du principe actif. Cependant, ils sont devenus moins intenses indiquant une diminution de la cristallinité de l'acide salicylique lors de l'encapsulation.

Par ailleurs, le diffractogramme des nanoparticules chargées présente les mêmes pics que celui des nanoparticules vides ($2\theta = 11.5^\circ ; 19^\circ ; 22.5^\circ ; 29.5^\circ$), ils sont cependant plus intenses du fait de la présence de l'acide salicylique.

Ceci confirme en outre que l'incorporation de l'AS n'a pas d'influence significative sur la structure des nanoparticules de chitosane réticulées au TPP. Leur caractère est conservé même après l'encapsulation.

Toutes ces observations sont en accord avec celles publiées dans la littérature. [24]

V.2.2.5. Caractérisation thermographique par DSC

La Calorimétrie différentielle à balayage (DSC) a été réalisée pour comprendre le comportement thermique des microparticules et des nanoparticules vides et chargées d'acide salicylique.

Les thermogrammes des systèmes micro/nanoparticulaires vides et chargés d'acide salicylique sont donnés dans les figures suivantes :

Chapitre V : Résultats et discussions

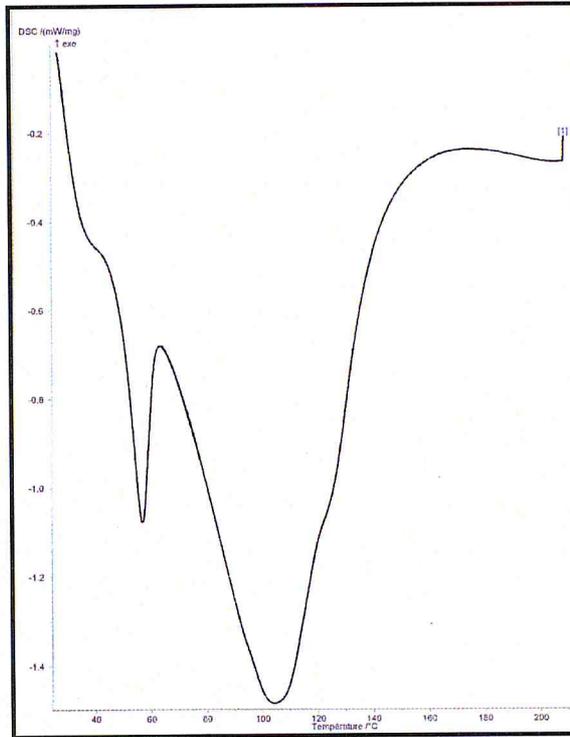


Figure V.19 : Thermogramme DSC des microparticules vides

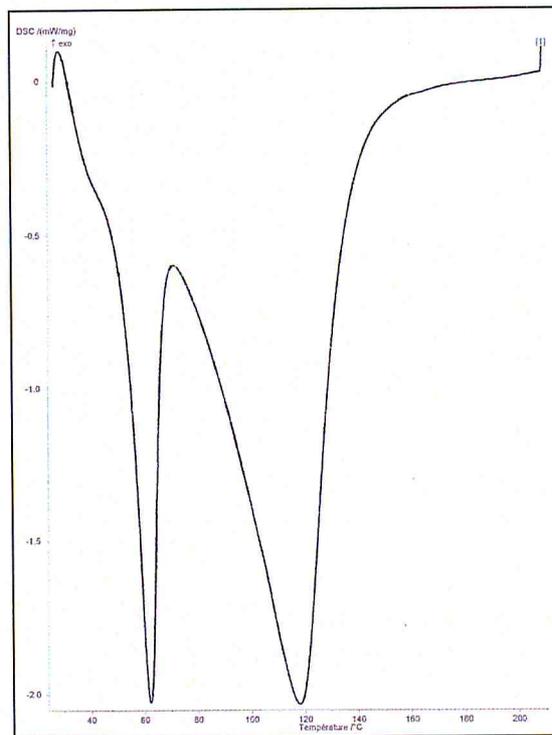


Figure V.20 : Thermogramme DSC des microparticules chargées

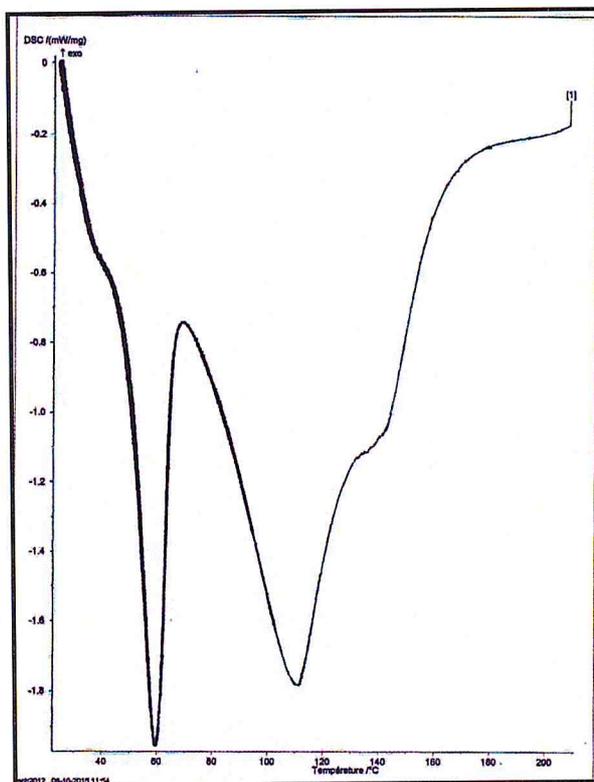


Figure V.21 : Thermogramme DSC des nanoparticules vides

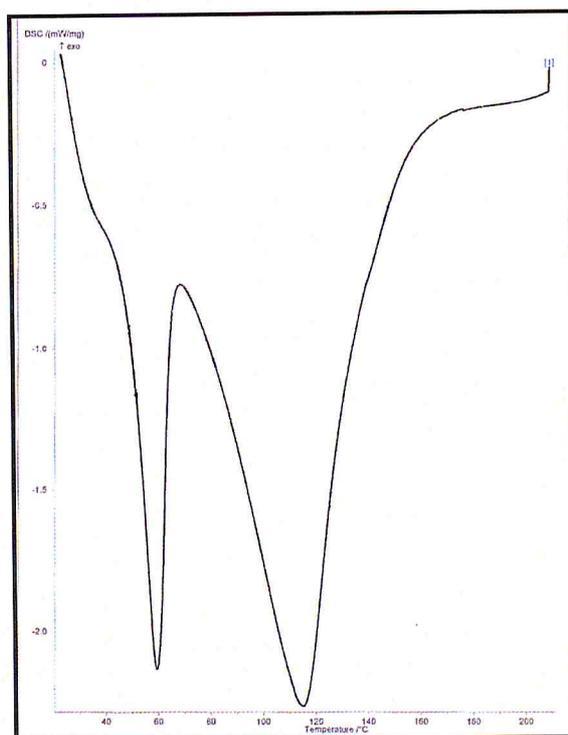


Figure V.22: Thermogramme DSC des nanoparticules chargées

Chapitre V : Résultats et discussions

Les principaux changements thermiques observés sont résumés dans le tableau ci-dessous :

Type de particule	Tg (°C)	pic endotherme I (°C)	pic endotherme II (°C)	Saut thermique (°C)
μ P vides	40	58	104	125
μ P chargées	45	62	116	/
NP vides	44	60	112	135
NP chargées	42	61	118	/

Tableau V.2 : Caractéristiques thermiques des systèmes préparés

D'après les thermogrammes présentés ci-dessus, nous pouvons apporter les remarques suivantes :

- ✚ On pourrait attribuer le saut thermique situé entre 40 et 45°C à une transition vitreuse (Tg) qui survient au niveau structural aussi bien dans les nanoparticules que dans les microparticules, du fait de l'existence de la macromolécule de chitosane réticulée au tripolyphosphate de sodium. *Lazaridou Biliaderis et .al* [26] ont trouvé des Tg allant de -23° à 67 ° C selon la teneur en eau dans les particules.
- ✚ Le premier pic endotherme qui apparaît autour de 60°C est propre aux systèmes micro et nanoparticulaires. Il caractérise la morphologie des microparticules et des nanoparticules de CS réticulées au TPP. On souligne qu'un tel pic n'est pas observé dans le cas du chitosane à l'état de poudre.
- ✚ Les pics endothermes observés entre 105-120°C apparaissent comme conséquence de l'évaporation de l'eau associée ou absorbée dans le polymère, ce qui est souvent observé dans le cas des biomatériaux tels que le chitosane. La largeur du pic montre que le phénomène est lent, traduisant le trajet à parcourir de l'eau superficielle puis de celle retenue à l'intérieur de la particule (mécanisme comprenant deux étapes), au sein de la matrice polymérique.
- ✚ L'apparition d'un phénomène pas très intense, centré autour de 130°C peut être affecté à la désolvation qui survient uniquement dans les particules vides (absence d'AS), ce qui nous pousse à suggérer qu'il est conséquent à une réorganisation structurale qui survient après l'évaporation totale de l'eau. En effet, Les particules subissent une déformation suite à la

Chapitre V : Résultats et discussions

perte d'eau ce qui détruit leur structure stérique et affecte leurs propriétés, telles que la rhéologie, les propriétés de transfert et la Tg.

- ✚ Le décalage des pics endothermes qui est observé dans les thermogrammes des μP et des NP chargées vers des températures légèrement plus élevées peut être justifié par la présence des groupes hydrophiles de l'AS. Ce léger décalage confirme qu'il n'y a pas d'interactions covalentes significatives entre l'AS et le CS après encapsulation et réticulation.

Pour conclure, le système des nanoparticules chargées d'AS est le plus stable thermiquement dans les 4 systèmes préparés, car il présente les températures endothermiques les plus élevées.

Faute de moyens, nous n'avons pas pu pousser l'analyse de la DSC vers des températures plus élevées, afin de pouvoir observer la procédure de décomposition oxydative du chitosane, qui apparaîtrait sous la forme d'un pic exothermique situé vers les 280°C, d'après la littérature [30] et la dégradation de l'acide salicylique, observée autour de 158°C [31].

V.2.2.6. Potentiel zêta et indice de polydispersité

Le potentiel zêta est souvent mesuré pour prédire la stabilité des particules en suspension.

L'intensité de la force de répulsion électrostatique est en effet liée au potentiel zêta : plus les particules ont un potentiel zêta élevé (en valeur absolue), plus elles vont se repousser et moins elles vont avoir tendance à s'agréger.

L'indice de polydispersité représente la distribution de taille d'une population de particules. C'est une mesure de la largeur de la distribution granulométrique.

En pratique, il doit être inférieur à 0.5, ceci étant le témoin d'une population homogène du point de vue de la taille. Une valeur supérieure à 0,5 révèle la présence de plusieurs distributions.

L'indice de polydispersité est un indicateur de l'aggrégation des particules :

- ✚ Si la valeur est supérieure à 0.5, on aura un système polydispersé ;
- ✚ Si elle est plus proche de zéro (inférieure à 0.5), on aura un système monodispersé.

Les systèmes polydispersés ont une plus grande tendance à l'aggrégation que les systèmes monodispersés.

Chapitre V : Résultats et discussions

Dès que le CS et le TPP ont été mélangés ensemble dans un milieu aqueux, les micro/nanoparticules se sont formées spontanément avec une importante charge de surface positive obtenue par la mesure du potentiel zêta.

Tous les échantillons ont présentés un indice de polydispersité inférieur à 0.5 et un potentiel zêta positif qui peut être attribué à la présence de groupes amine protonés du chitosane non liés au TPP, ceci étant une caractéristique commune dans les nanoparticules CS-TPP [32].

V.2.2.6.1. Microparticules

✚ Microparticules vides

Les microparticules de chitosane possèdent un potentiel zêta de +25.1mV, ce qui explique leur surface chargée positivement. Cette charge de surface positive pourrait résulter de la protonation des groupements amino.

En effet, la surface des nanoparticules est fortement cationique à pH 4,5 en raison de la présence de groupes d'ammonium tout au long des chaînes polymériques du chitosane.

✚ Microparticules chargées

Avec le chargement de l'AS, le potentiel zêta a diminué à +22,6 mV. Cette valeur étant proche de 30mV, elle assure la stabilité de toutes les suspensions, puisque la charge de surface empêche les particules de s'agglomérer.

NB : Les particules avec un potentiel zeta (\pm) supérieur à 30mV sont considérées comme stables en suspension en raison de la répulsion de charge entre les particules, qui peut être suffisante pour inhiber l'agrégation et la coalescence. [33]

V.2.2.6.2. Nanoparticules

✚ Nanoparticules vides

Le potentiel zêta des nanoparticules vides est de +28.9mV.

Ce sont les groupes amines résiduels du chitosane qui n'ont pas été liés au TPP qui sont responsables de la valeur positive du potentiel zêta. Il semble qu'une valeur plus élevée conduit à des nanoparticules plus stables. Cette charge positive à la surface des nanoparticules pourrait prévenir le processus d'agglomération.

Chapitre V : Résultats et discussions

✚ Nanoparticules chargées

Le potentiel zêta a diminué légèrement avec l'encapsulation de l'AS, en raison des interactions électrostatiques entre l'amine protoné du chitosane (NH_3^+) et l'AS entraînant une réduction de la charge de surface.

Cependant, même avec une diminution du potentiel zêta, les nanoparticules chargées d'AS sont cationiques, indiquant qu'il y a un excès des groupements amines du chitosane.

Par ailleurs, nous avons constaté que le potentiel zêta des nanoparticules était plus élevé que celui des microparticules. Cela signifie que les NP sont plus stables et plus réticulées que les μP . Il est très probable que ce soit cette réticulation qui leur ai permis de capturer plus d'AS.

Systèmes préparés	Taille moyenne (nm)	Indice de polydispersité	Potentiel zêta (mV)
μP vides	2975.4	0.376	25.1
μP chargées	6277.6	0.492	22.6
NP vides	198	0.263	28.9
NP chargées	271	0.297	26.1

Tableau V.3 : Tableau récapitulatif de la taille moyenne, de l'indice de polydispersité et du potentiel zêta des quatre systèmes préparés

En termes de potentiel zêta, nous pouvons supposer que les valeurs positives rendent ces particules adaptées pour les applications d'acheminement du principe actif vers le site d'action, qui envisagent l'interaction électrostatique entre les cellules négatives de la membrane et les vecteurs cationiques chargés de principe actif.

En ce qui concerne les indices de polydispersité, ils sont tous inférieurs à 0,5 pour les quatre suspensions étudiées, ce qui signifie que la distribution de taille est homogène et unimodale pour chaque préparation.

V.2.2.7. Calcul du taux de charge et de l'efficacité d'encapsulation

La figure ci-dessous représente la courbe d'étalonnage de l'acide salicylique à $\lambda=297\text{nm}$.

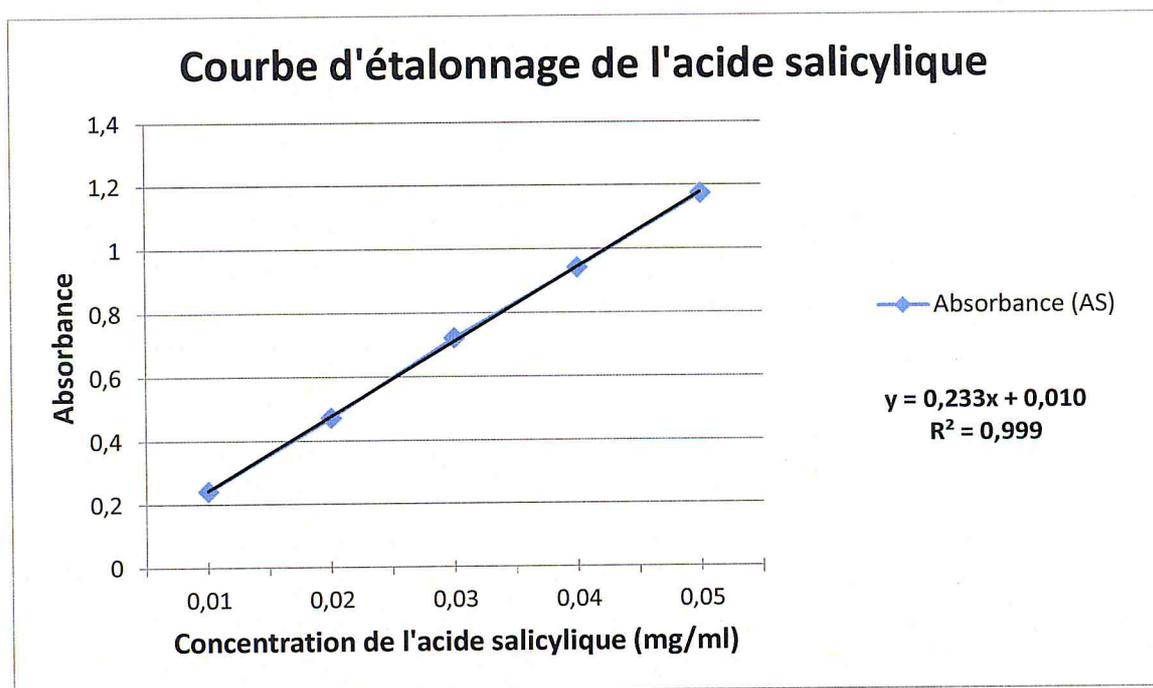


Figure V.23: Courbe d'étalonnage de l'acide salicylique à 297nm

L'efficacité d'encapsulation et la capacité de charge des microparticules et des nanoparticules chargées d'acide salicylique ont été déterminées par spectrophotomètre UV à une longueur d'onde de $\lambda=297\text{nm}$.

Les résultats du calcul sont résumés dans le tableau ci-dessous :

	quantité totale d'AS(mg)	quantité d'AS non encapsulé(mg)	poids des particules (mg)	EE (%)	TC (%)
μp	9	4,94	37	45,06	10,96
Np	9	3,17	34	64,71	17,12

Tableau V.4: Tableau récapitulatif du taux de charge et de l'efficacité d'encapsulation de l'acide salicylique

Les résultats ont révélé une grande efficacité d'encapsulation de l'ordre de 45% et 64%, et un taux de charge de 11% et 17% pour les microparticules et nanoparticules, respectivement.

Chapitre V : Résultats et discussions

Cela signifie que les nanoparticules sont plus réticulées que les microparticules. Ces réticulations ont permis aux nanoparticules de capturer plus d'AS que les microparticules, de par leur plus grande charge de surface, d'où une efficacité d'encapsulation et une capacité de charge plus élevées.

Il a été signalé que le taux de charge des micro/nanoparticules dépend de plusieurs facteurs, comme le poids moléculaire moyen du chitosane, la concentration du chitosane ainsi que celle du principe actif. [34]

V.2.2.8. Calcul du rendement

V.2.2.8.1. Microparticules

✚ Vides

$$\tau = \frac{\text{poids des microparticules sèches}}{\text{poids des solides (CS + TPP)}} \times 100$$

$$\frac{12,5}{(45+15)} \times 100 = 20.83\%$$

✚ Chargées

$$\tau = \frac{\text{poids des microparticules sèches}}{\text{poids des solides (CS + TPP+AS)}} \times 100$$

$$\frac{18}{(45+15+9)} \times 100 = 26.08 \%$$

V.2.2.8.2. Nanoparticules

✚ Vides

$$\tau = \frac{\text{poids des nanoparticules sèches}}{\text{poids des solides (CS + TPP)}} \times 100$$

$$\frac{25}{(90+15)} \times 100 = 23.80\%$$

✚ Chargées

$$\tau = \frac{\text{poids des nanoparticules sèches}}{\text{poids des solides (CS + TPP+AS)}} \times 100$$

$$\frac{34}{(90+15+9)} \times 100 = 29.82 \%$$

Chapitre V : Résultats et discussions

Le rendement d'encapsulation des microparticules est de 26%, alors que celui des nanoparticules est égal à 30%.

La comparaison entre les nanoparticules vides et les nanoparticules chargées d'acide salicylique a révélé que l'incorporation de l'AS a conduit à une augmentation significative du rendement, tel que rapporté ailleurs [37].

V.3. Etude du gonflement

V.3.1. Vecteurs micro et nanoparticulaires vides

Les graphiques qui illustrent le taux de gonflement des microparticules et des nanoparticules vides en fonction du temps sont donnés dans la figure V.24 et la figure V.25, respectivement.

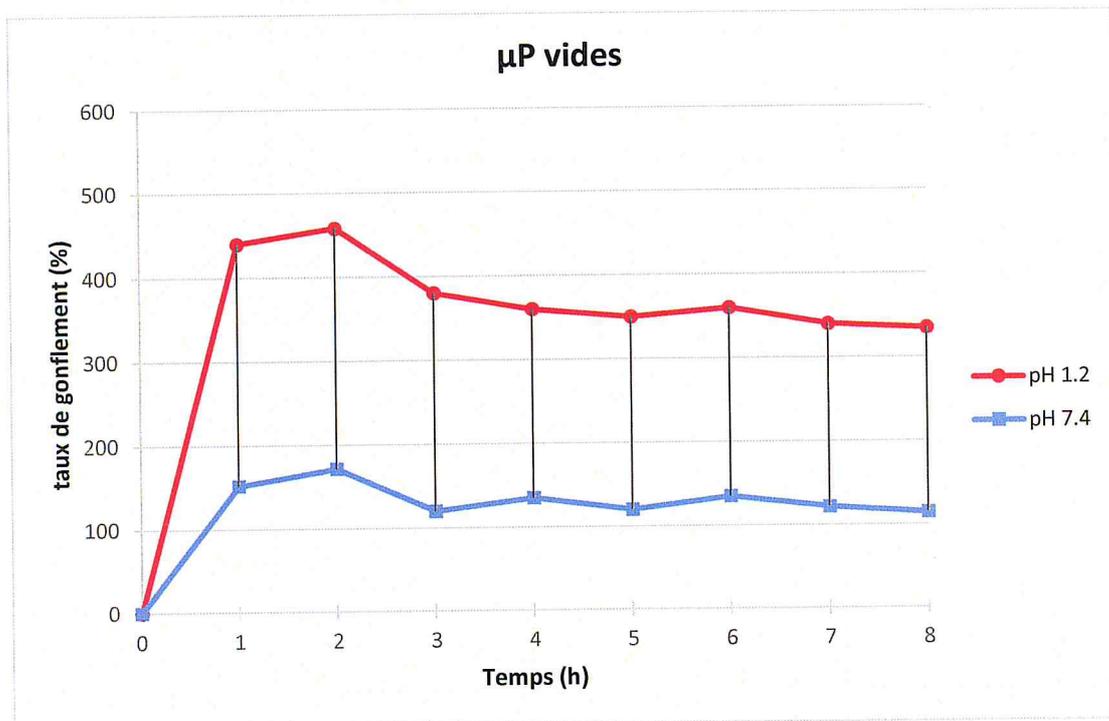


Figure V.24 : Etude du gonflement des microparticules vides à pH 1.2 et 7.4

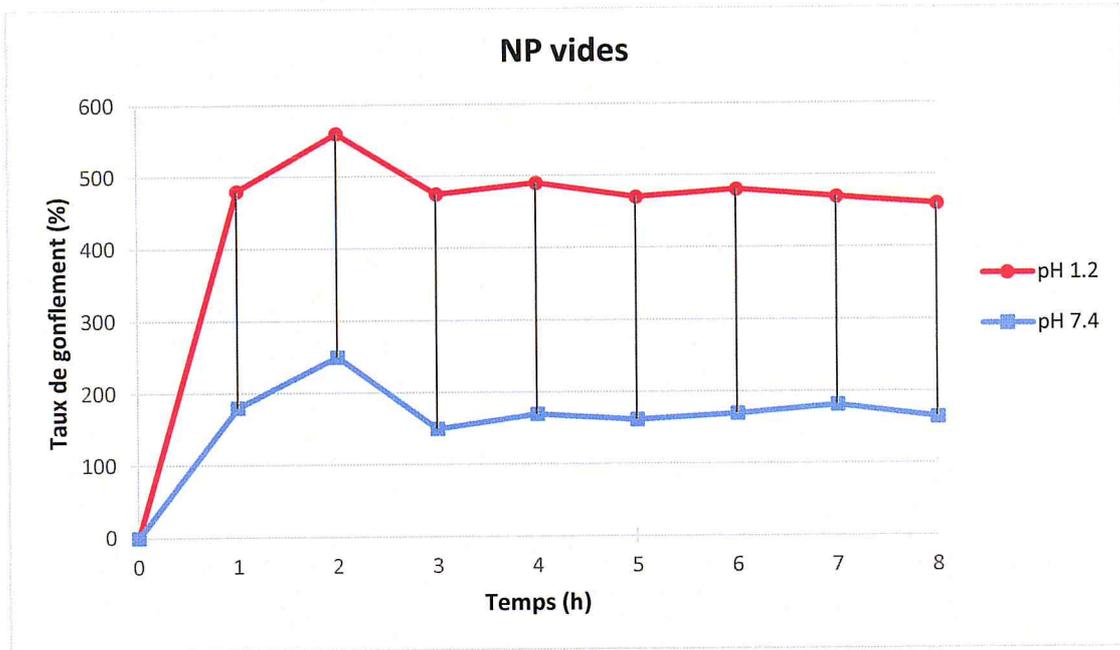


Figure V.25: Etude du gonflement des nanoparticules vides à pH 1.2 et 7.4

D'après les résultats obtenus pour les microparticules et les nanoparticules vides dans un média acide (pH 1.2) et basique (pH 7.4) respectivement, on remarque deux phases distinctes sur le graphique :

Première phase : Elle correspond à une absorption d'eau relativement rapide qui conduit à un taux de gonflement maximal dans la deuxième heure.

Deuxième phase : Pendant cette phase, le taux de gonflement reste constant, le matériau a atteint sa saturation.

Cette étude a aussi démontré que les microparticules de CS avaient un taux de gonflement de 458% et 172 % à pH 1,2 et pH 7,4, respectivement. Alors que les nanoparticules présentaient un taux de gonflement plus élevé, de l'ordre de 560% et 250% à pH 1.2 et pH 7.4, respectivement.

Ce pourcentage est supérieur en milieu acide qu'en milieu basique probablement à cause de la présence de groupements amines chargés positivement sur la surface des particules et qui a favorisé l'entrée de l'eau. [11]. De plus, comme mentionné précédemment, le chitosane est soluble dans un média acide ($\text{pH} < 6.5$), il en va de soi que le taux de gonflement soit plus élevé à pH 1.2 qu'à pH 7.4.

V.3.2. Vecteurs micro et nanoparticulaires chargés d'acide salicylique

L'allure du graphe qui définit le taux de gonflement des microparticules et nanoparticules chargées d'acide salicylique est semblable à celui des micro/nanoparticules vides, que ce soit à pH 1.2 ou pH 7.4 : Il présente une première phase qui correspond à une absorption d'eau relativement rapide conduisant à un taux de gonflement maximal dans la deuxième heure. Suivi d'une deuxième phase pendant laquelle le taux de gonflement reste constant, et où le matériau a atteint sa saturation.

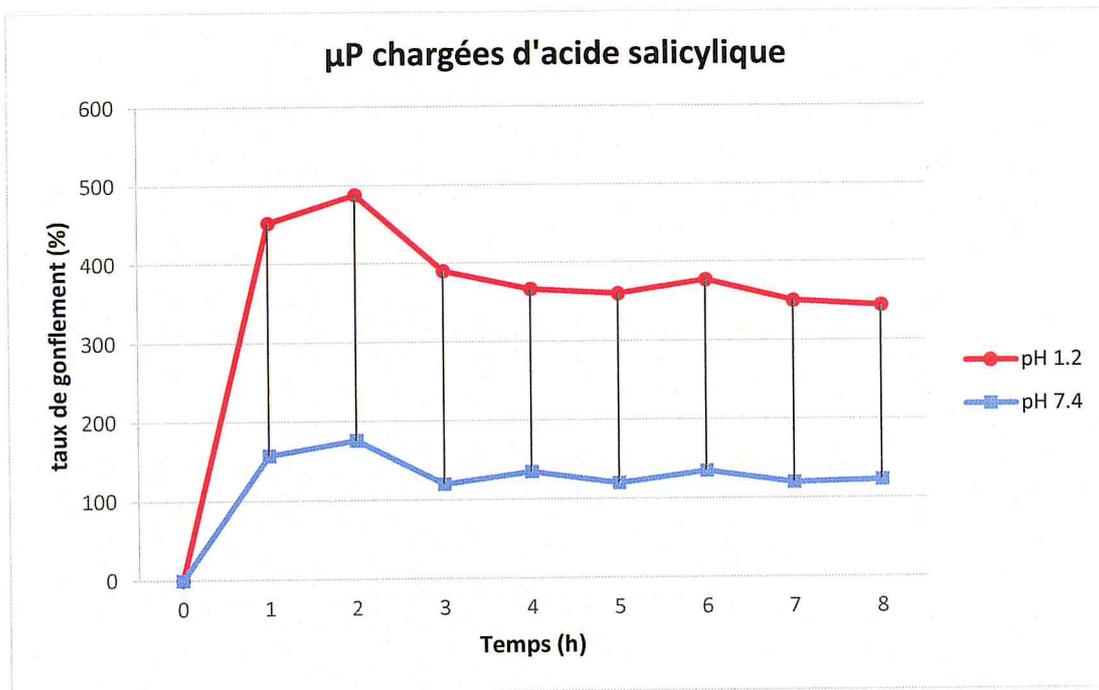


Figure V.26 : Etude du gonflement des microparticules chargées à pH 1.2 et 7.4

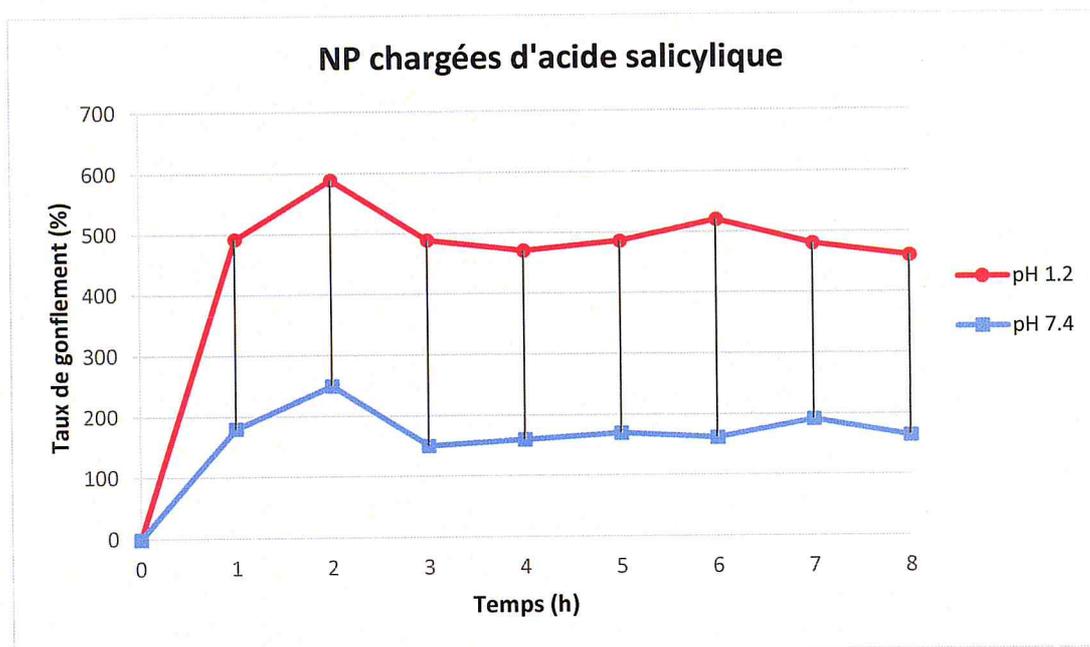


Figure V.27: Etude du gonflement des nanoparticules chargées à pH 1.2 et 7.4

Cependant, on remarque que les micro/nanoparticules chargées d'acide salicylique présentent un taux de gonflement légèrement plus élevé par rapport aux micro/nanoparticules vides. Au bout de 4h, le taux de gonflement a presque atteint l'équilibre, que ce soit à pH 1.2 ou pH 7.4.

Ce pourcentage est supérieur en milieu acide qu'en milieu basique, ce qui signifie que les chaînes de μ P et NP chargées d'acide salicylique sont moins rigides dans un milieu acide par rapport aux chaînes de μ P et NP vides et cela grâce à leur grande solubilité.

Par ailleurs, la présence d'AS -plus soluble en milieu acide qu'en milieu basique- à la surface des vecteurs, affecte le taux de gonflement en augmentant légèrement sa valeur.

On pourra conclure des résultats ci-dessus que le principe actif encapsulé dans des microparticules ou dans des nanoparticules sera libéré plus facilement dans un milieu acide que dans un média basique.

Les résultats obtenus lors de cette étude nous renseignent sur la capacité d'absorption de l'eau par le réseau polymérique. En effet, les forces intermoléculaires sont plus faibles que les forces intramoléculaires ce qui facilite la diffusion de l'eau et qui provoque un relâchement au niveau du réseau polymérique permettant ainsi la libération du principe actif par diffusion. Ce mécanisme de libération peut fonctionner dans la majorité des parties du corps où l'eau est un constituant majeur.

Chapitre V : Résultats et discussions

Après gonflement, les microparticules et les nanoparticules acquièrent une certaine élasticité. Elles peuvent subir des pressions raisonnables des tissus avoisinants (dans l'organisme) sans être déformées tout en continuant à accomplir leurs rôles. Cette élasticité permet également de diminuer le risque de traumatiser les tissus avoisinant par irritation.

La propriété de gonflement est donc d'une importance primordiale car elle joue un rôle important dans la biodégradation du polymère et, par conséquent, la libération du PA encapsulé.

V.4. Test de fluorescence de l'acide salicylique

La solution d'acide salicylique (1mg/ml) dissous dans de l'acide acétique à 1% (v/v), exposée aux rayonnements Ultra-Violets, sous une lampe UV-254 nm présente une fluorescence de coloration bleue, comme le montre la figure ci-dessous :



Figure V.28 : Fluorescence bleue de l'acide salicylique sous lampe UV

L'existence de liaisons hydrogène intramoléculaire forte entre le groupement $C=O$...HO de l'acide salicylique offre la possibilité de transfert de proton intramoléculaire.

L'électron passe de la plus haute orbitale moléculaire occupée vers la plus basse orbitale moléculaire vacante (Accès à un état électronique excité). L'état excité étant temporaire, les électrons ont tendance à reprendre leur position d'origine en restituant le surplus d'énergie absorbée par émission d'un photon de manière très rapide, sous la forme de lumière bleue. C'est le phénomène de fluorescence.

V.5. Etude de la cinétique de libération *in vitro* de l'acide salicylique

La cinétique de libération *in vitro* de l'acide salicylique a été étudiée dans les conditions biomimétiques suivantes :

- Milieu gastrique simulé (SGF pH 1,2)
- Milieu intestinal simulé (tampon phosphate pH 7,4)

La différence entre la libération du principe actif dans le SGF et dans le PBS réside dans le taux de libération de l'acide salicylique au cours du même laps de temps, mais le mécanisme de libération reste identique : L'acide salicylique est dispersé au sein des micro/nanoparticules de chitosane sans pouvoir en sortir. Avec l'entrée du solvant, le polymère de nature solide se gonfle et passe à l'état caoutchouteux, laissant ainsi diffuser le principe actif vers l'extérieur.

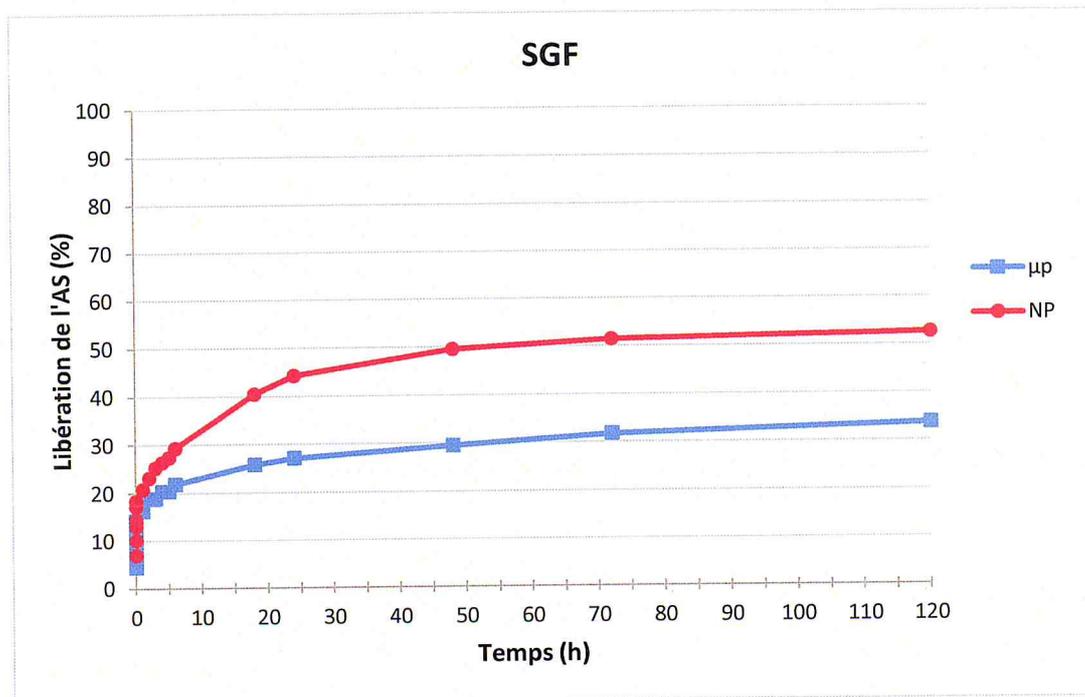


Figure V.29: Cinétique de libération *in vitro* de l'acide salicylique à partir des μ P et NP dans le SGF

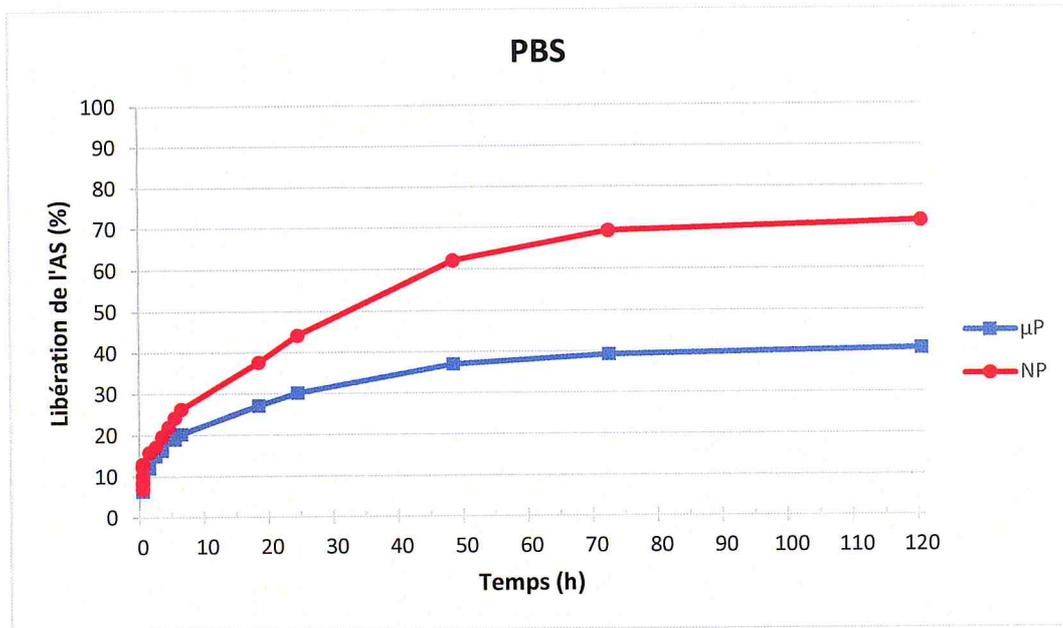


Figure V.30: Cinétique de libération *in vitro* de l'acide salicylique à partir des μP et NP dans le PBS

La figure V.29 et la figure V.30 montrent que le profil de libération *in vitro* de l'acide salicylique se divise en deux phases distinctes :

Première phase : il s'agit d'une période initiale (burst release en Anglais). Ce processus de libération rapide et en quantité importante est dû à la libération de l'acide salicylique présent à proximité ou à la surface des micro/nanoparticules durant leur préparation. Étant donné que la molécule d'acide salicylique soit petite, et que les liaisons entre la matrice polymérique et l'AS accumulé à la surface des micro/nanoparticules ne soient pas assez fortes, les molécules d'AS tendent alors à diffuser facilement dans le milieu extérieur et dans un court laps de temps. [35]

Deuxième phase : il s'agit d'une période d'induction où l'AS est libéré progressivement et graduellement, à vitesse plus lente et de manière régulière.

On remarque qu'il y a une certaine stabilité dans la libération du principe actif. Ceci peut être dû à sa diffusion depuis la matrice polymérique après qu'elle ait gonflé. La quantité relativement faible libérée au cours de cette phase traduit le trajet à parcourir à travers la matrice polymérique.

Par la suite, cette phase est devenue encore plus lente, caractérisée par une libération constante et causée par la dégradation du polymère, où le principe actif dissous a diffusé totalement dans le milieu simulé.

Chapitre V : Résultats et discussions

La diffusion du principe actif lors de la phase initiale suivie de la dégradation de la matrice polymérique ont été suggérées comme étant les deux mécanismes impliqués dans la libération *in vitro* de l'acide salicylique à partir des micro/nanoparticules de chitosane [36].

✚ Comparaison entre les microparticules et les nanoparticules

Observation :

On remarque que les deux vecteurs pharmaceutiques (microparticulaires et nanoparticulaires) possèdent presque la même cinétique de libération pendant les trois (03) premières heures. Par la suite, la libération du principe actif dans les nanoparticules devient plus importante par rapport aux microparticules.

Explication :

La libération du principe actif est plus importante pour les nanoparticules grâce aux réticulations qui leur ont permis de capturer plus d'AS que les microparticules, de par une plus grande charge de surface et une efficacité d'encapsulation élevée.

✚ Comparaison entre la libération de l'AS dans le SGF (pH 1.2) et dans le PBS (pH 7.4)

Observation :

Dans le PBS, un faible burst release d'environ 12% et 15% a été observé pour les μ P et NP respectivement, suivi d'une libération maximale en AS de 40% pour les μ P et 71% pour les NP, au bout de 120h.

Par contre, le profil de libération de l'AS dans le SGF est complètement différent. Un effet de burst release plus élevé a été observé dès les premières minutes du processus de libération de l'acide salicylique où environ 21% et 29% du PA a été libéré depuis les μ P et NP, respectivement. Atteignant la libération maximale avec 33% pour les μ P et 52% pour les NP après 120h de stockage.

Explications :

Ces observations peuvent être décrites par le fait que le principe actif ainsi que le polymère soient tous les deux solubles dans un pH acide (SGF 1.2), par conséquent, une libération plus rapide de l'acide salicylique fut observée. En revanche, le faible taux de libération de l'agent

Chapitre V : Résultats et discussions

thérapeutique dans le PBS peut être décrit par la faible solubilité du principe actif ainsi que le polymère à pH 7,4.

La différence dans la vitesse de libération de l'AS à partir du SGF et du PBS peut être due aux faibles interactions électrostatiques qui existent entre les micro/nanoparticules et le principe actif à pH basique.

Par ailleurs, l'augmentation rapide de la concentration de l'AS dans le SGF est due à la propriété de gonflement du polymère dans un pH acide, qui a été clairement observée lors de l'étude du gonflement.

Lorsque les particules ont été transférées dans un milieu de pH légèrement basique (PBS), la réduction du taux de gonflement du polymère a contribué à la diminution de la concentration de l'AS libéré au cours du temps. [12]

✚ Comparaison entre AS libre et AS encapsulé

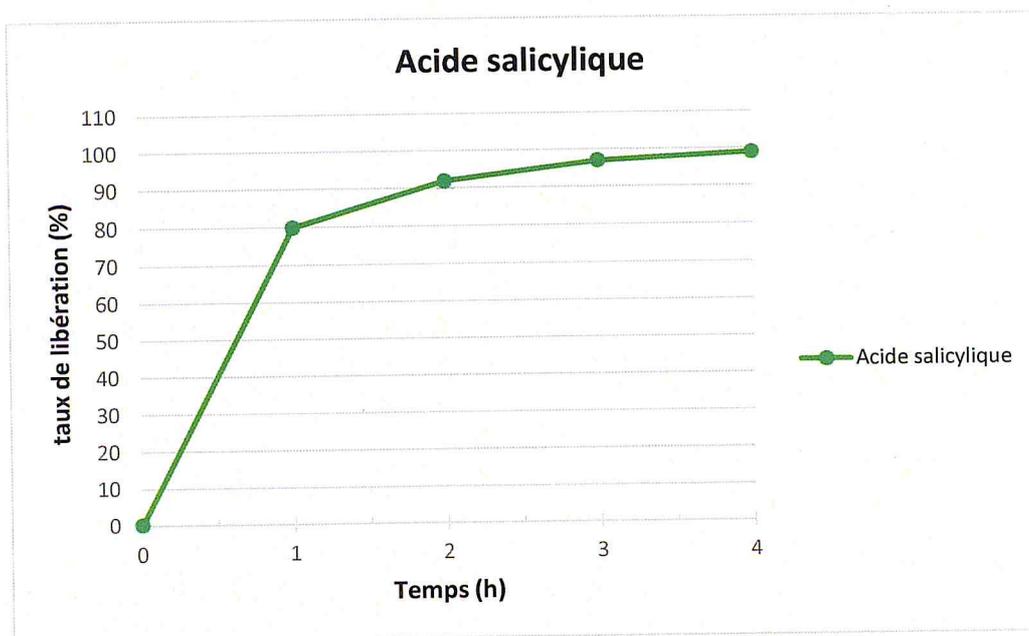


Figure V.31: Libération de l'acide salicylique non encapsulé

La comparaison entre les graphes présentés précédemment et le graphe ci-dessus (Fig.V.31) montre clairement que la libération de l'AS à partir des vecteurs pharmaceutiques est beaucoup plus lente que la libération du médicament non encapsulé, que ce soit dans le SGF ou dans le PBS.

Chapitre V : Résultats et discussions

Cette comparaison rend évident que le piégeage de l'AS dans les nanoparticules peut maintenir et prolonger efficacement la libération du principe actif.

En conclusion, nous pouvons affirmer que la libération prolongée du médicament à partir des nanoparticules est importante, car elle lui permettrait une résidence prolongée dans l'organisme, ce qui augmente sa biodisponibilité et prolonge son effet thérapeutique.

Conclusion

Lors de cette étude, des microparticules et des nanoparticules à base de chitosane contenant de l'acide salicylique ont été préparées avec succès par la méthode de la gélation ionotropique, qui utilise le tripolyphosphate de sodium comme agent de réticulation.

Durant tout le long de la partie expérimentale, nous avons présenté les méthodes utilisées pour la préparation et la caractérisation des vecteurs pharmaceutiques, ainsi que les résultats obtenus pour ensuite établir une comparaison entre les microparticules et les nanoparticules. Ainsi nous avons expliqué comment, à l'aide de nano-médicaments capables de piéger des substances chimiques et de les délivrer en temps voulu, les médecins pourraient soigner une maladie tout en diminuant la dose d'administration, minimiser les effets secondaires liés à la prise du traitement et améliorer la biodisponibilité et la pharmacocinétique de l'agent thérapeutique.

Les principaux résultats que nous pouvons tirer de ce travail sont les suivants :

Les microparticules obtenues étaient de forme sphérique et de taille comprise entre 2 et 7 μm . elles sont caractérisées par un potentiel zêta positif, un taux d'encapsulation de 10.96% et un rendement de 26.08%. L'étude *in vitro* a révélé que 33.84% de l'acide salicylique a été libéré dans le SGF et 40.69% dans le PBS, au bout de 120 heures.

Quant aux nanoparticules, elles étaient de taille plus petite, allant de 198 à 271 nm et ont présenté un taux d'encapsulation de 17.12% et un rendement de 29.82%. Leur étude *in vitro* a montré que 52.67% de l'acide salicylique a été libéré dans le SGF et 71.50% dans le PBS, après 120 heures de réaction.

Par ailleurs, les résultats obtenus ont montré que la concentration du chitosane et du TPP avait un rôle important dans la préparation des vecteurs pharmaceutiques. En effet, lorsque la concentration du chitosane et du TPP était égale, nous avons obtenu des microparticules dont la taille varie de 2 à 7 μm . Par contre, avec une concentration en chitosane deux (02) fois plus

Chapitre V : Résultats et discussions

grande, les particules obtenues étaient à l'échelle nanométrique, de taille comprise entre 150 et 200nm. Ce constat nous a permis de conclure que plus la concentration en chitosane augmentait (sans pour autant dépasser un certain seuil), plus la taille des particules diminuait.

Compte tenu des résultats obtenus, l'étude comparative entre ces deux vecteurs pharmaceutiques suggère qu'il est plus approprié d'utiliser des nanoparticules plutôt que des microparticules dans le système de livraison d'agent thérapeutique comme l'acide salicylique. Son encapsulation pourrait représenter une stratégie prometteuse et une approche potentielle pour minimiser les effets secondaires liés à la prise du médicament, et réduire la fréquence d'administration, offrant ainsi plus de confort au patient.



REFERENCES



Références

- [1] M. Ahuja, A. S. Dhake, S. K. Sharma, and D. K. Majumdar, "Topical ocular delivery of NSAIDs," AAPS Journal, vol. 10, no. 2, pp.229–241, 2008
- [2] Gifani, A.; Taghizadeh, M.; Seifkordi, A.; Ardjmand, M.; 2008, iFirst, 1.
- [3] Sabnis, S. and Block, L. H., "Improved infrared spectroscopic method for the analysis of degree of N-deacetylation of chitosan". Polym Bull., 39:67-71, 1997.
- [4] Domszy, J.G. and Roberts, G.A.F., "Evaluation of infrared spectroscopic techniques for analyzing chitosan". Makromol Chem., 186:1671-1677, 1985.
- [5] Herman L. Waner « The Mark-Houwink-Sakurada Equation for the Viscosity of linear Polyethylene » J.Phys. Chem. Ref. Data. Vol. 14, No. 2, 1985.
- [6] Jingou Ji , Shilei Hao « Preparation, characterization and in vitro release of chitosan nanoparticles loaded with gentamicin and salicylic acid » Carbohydrate Polymers 85 (2011) 803–808
- [7] Iris Julie Joye, David Julian McClements, «Biopolymer-based nanoparticles and microparticles: Fabrication, characterization, and application ». Current Opinion in Colloid & Interface Science 19 (2014) 417–427
- [8] Gan, Q., Wang, T. « Chitosan nanoparticle as protein delivery carrier-systematic examination of fabrication conditions for efficient loading and release ». Colloid Surface B: Biointerfaces 59 (2007) 24–34.
- [9] S. Al-Qadi, A. Grenha, D. Carrión-Recio, « Microencapsulated chitosan nanoparticles for pulmonary protein delivery: In vivo evaluation of insulin-loaded formulations ». Journal of Controlled Release 157 (2012) 383–390
- [10] Susana Rodrigues, Ana M. Rosa da Costa. « Chitosan/carrageenan nanoparticles: Effect of cross-linking with tripolyphosphate and charge ratios », Carbohydrate Polymers 89 (2012) 282– 289
- [11] T. Cerchiara, A. Abruzzo, M. di Cagno, F. Bigucci, « Chitosan based micro- and nanoparticles for colon-targeted delivery of vancomycin prepared by alternative processing methods ». European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 92 (2015) 112–119
- [12] Anitha R. Dudhani, Shantha L. Kosaraju, «Bioadhesive chitosan nanoparticles: Preparation and characterization ». Carbohydrate Polymers 81 (2010) 243–251

Références

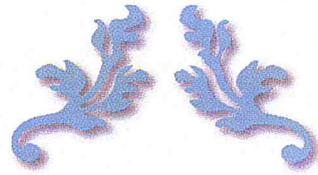
- [13] Graff S, Chaumeil J C, Boy P, Lai-Kuen R, Charrueau C. « *Formulations for protecting the probiotic *Saccharomyces boulardii* from degradation in acidic condition* ». *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2008, 31(2), 266-272.
- [14] Chapin KC, Lauderdale TL. 2003. *Reagents, stains and media: bacteriology*. In Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC. *Manual of clinical microbiology*, 8th edition. American Society for Microbiology, Washington DC, USA.
- [15] Calvo, P., Remunan-Lopez, R., Vila-Jato, C.J.L., Alonso, M.J., 1997. « *Chitosan and chitosan/ethylene oxide-propylene oxide block copolymer nanoparticles as novel carriers for proteins and vaccines* ». *Pharm. Res.* 14, 1431–1436.
- [16] P. Calvo, C. Remunaz-Lopez, J.L. Vila-Jato, M.J. Alonso, « *Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers* », *J. Appl. Polym. Sci.* 63 (1997) 125–132.
- [17] A. Pawak, M. Mucha, « *Thermogravimetric and FTIR studies of chitosan blends* », *Thermochim. Acta* 396 (2003) 153-166.
- [18] Alice Floris, Maria Cristina Meloni, Francesco Lai, « *Cavitation effect on chitosan nanoparticle size: A possible approach to protect drugs from ultrasonic stress* ». *Carbohydrate Polymers* 94 (2013) 619– 625
- [19] S. Vimal, G. Taju, K.S.N. Nambi, S. “*Synthesis and characterization of CS/TPP nanoparticles for oral delivery of gene in fish* ». *Aquaculture* 358–359 (2012) 14–22
- [20] A. Gokce, B. Cengiz. « *Ultrasonication of chitosan nanoparticle suspension: Influence on particle size* », *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 462 (2014) 75–81
- [21] A.M. Piras « *Preparation, physical–chemical and biological characterization of Chitosan nanoparticles loaded with lysozyme*”. *International Journal of Biological Macromolecules* 67 (2014) 124–131.
- [22] John Antonioua, Fei Liua, Hamid Majeed. « *Physicochemical and morphological properties of size-controlled chitosan–tripolyphosphate nanoparticles* », *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 465 (2015) 137–146
- [23] Zhang, L., & Kosaraju, S. L. “*Biopolymeric delivery system for controlled release of polyphenolic antioxidants*”. *European Polymer Journal*, 43(7) (2007) 2956–2966.

Références

- [24] Jingou Ji, Shilei Hao, « *Preparation, characterization and in vitro release of chitosan nanoparticles loaded with gentamicin and salicylic acid* », *Carbohydrate Polymers* 85 (2011) 803–808
- [25] Zujin Yang, Yanxiong Fang, Hongbing Ji, « *Controlled Release and Enhanced Antibacterial Activity of Salicylic Acid by Hydrogen Bonding with Chitosan* », *Chinese Journal of chemical engineering* (2015)
- [26] Lazaridou A, Biliaderis C. *Carbohy. Polym*; 2002, 48, 179-190
- [27] Yoksana, R., Jirawutthiwongchai, J., & Arpo, K. (2010). “*Encapsulation of ascorbyl palmitate in chitosan nanoparticles by oil-in-water emulsion and ionic gelation processes* ». *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 76, 292–297
- [28] Fernando C. Vasconcellos, Gilberto A.S. Goulart, Marisa M. Beppu, « *Production and characterization of chitosan microparticles containing papain for controlled release applications* ». *Powder Technology* 205 (2011) 65–70
- [29] Yuancai Donga, Wai Kiong Nga, Shoucang Shena, « *Scalable ionic gelation synthesis of chitosan nanoparticles for drug delivery in static mixers* ». *Carbohydrate Polymers* 94 (2013) 940–945
- [30] K. Sreenivasan, *Polym. Degrad. Stab.*, **52**, 85 (1996)
- [31] Bouillot, B. « *Approches Thermodynamiques pour la Prédiction de la Solubilité de Molécules d'Intérêt Pharmaceutique* », thèse de doctorat, université de Toulouse, 2011.
- [32] Caroline Casagrande Sipoli, Nathalia Santanaa, Andrea Arruda Martins Shimojoa. « *Scalable production of highly concentrated chitosan/TPP nanoparticles in different pHs and evaluation of the in vitro transfection efficiency* ». *Biochemical Engineering Journal* 94 (2015) 65–73
- [33] S. Al-Qadi, A. Grenha, D. Carrión-Recio, « *Microencapsulated chitosan nanoparticles for pulmonary protein delivery: In vivo evaluation of insulin-loaded formulations* ». *Journal of Controlled Release* 157 (2012) 383–390
- [34] Deng, Q. Y., Zhou, C. R., & Luo, B. H. (2006). *Pharmaceutical Biology*, 44, 336.
- [35] Yangchao Luo, Boce Zhang, Wen-Hsing Cheng, “*Preparation, characterization and evaluation of selenite-loaded chitosan/TPP nanoparticles with or without zein coating*”. *Carbohydrate Polymers* 82 (2010) 942–951

Références

- [36] Zhou, S.B., Deng, X. M., &Li, X.H., (2001), « *Investigation on a novel core-coated microspheres protein delivery system* ». *Journal of controlled release*, 75, 27-36
- [37] Sofia Papadimitriou, Dimitrios Bikiaris, « *Chitosan nanoparticles loaded with dorzolamide and pramipexole* ». *Carbohydrate Polymers* 73 (2008) 44–54



CONCLUSION GENERALE



Conclusion générale

Lors de notre recherche, nous avons pu préparer avec succès des microparticules et des nanoparticules à base de chitosane pour la vectorisation d'un principe actif, l'acide salicylique. Nous avons par la suite caractérisé nos produits par diverses techniques, à savoir FTIR, DRX, MEB, DSC et la mesure du potentiel zêta. Enfin, nous avons étudié la cinétique de libération *in vitro* de l'acide salicylique dans deux milieux biologiquement simulés.

Le chitosane a confirmé au cours de cette étude ses capacités à encapsuler efficacement une matière active hydrophile (acide salicylique). Le vecteur semble pouvoir contenir une quantité plus importante lorsqu'il se trouve à l'échelle nanométrique. En effet, la petite taille des nanoparticules leur confère des propriétés intéressantes : elle offre une importante surface spécifique et une grande stabilité, les nanoparticules peuvent réagir plus avec leur environnement, la rétention du principe actif est donc plus quantitative.

Cette importante surface spécifique offerte à la fixation peut aussi être observée au niveau du phénomène de libération *in vitro* de l'agent thérapeutique où le profil de libération est amélioré grâce à des systèmes de délivrance ciblée, à une vitesse constante et pendant une durée suffisamment longue.

En outre, nous pouvons confirmer grâce aux diverses analyses effectuées, que les vecteurs pharmaceutiques préparés permettent :

- l'encapsulation de l'acide salicylique sans qu'il y ait quelque modification chimique et sans perturber la taille des micro/nanoparticules, ni leur potentiel zêta,
- la conservation de l'activité biologique de l'acide salicylique,
- la protection de l'acide salicylique vis-à-vis du milieu intestinal,
- la libération *in vitro* (possible) de l'acide salicylique.

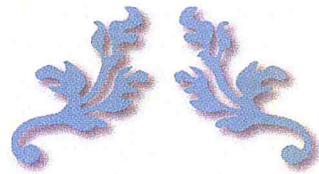
Les nanoparticules semblent être une bonne alternative aux méthodes de traitement classiques, elles permettent d'augmenter de façon significative la délivrance d'agent thérapeutique au sein même de la zone à traiter en limitant sa diffusion dans d'autres tissus, réduisant ainsi la fréquence d'utilisation et les effets secondaires que peuvent engendrer certains médicaments comme l'acide salicylique.

Cependant, on suggère d'entreprendre des travaux supplémentaires sur le sujet, en mettant en œuvre des méthodes de caractérisation plus approfondies et plus développées.

Pour conclure, nous pouvons constater que les nanotechnologies présentent de multiples facettes et potentialités qui permettent d'envisager de nouvelles solutions pour répondre aux

Conclusion générale

défis de la médecine. Elles proposent des moyens innovants pour améliorer à la fois le diagnostic et le traitement de maladies préoccupantes comme le cancer ou la maladie d'Alzheimer et représentent aujourd'hui l'espoir pour des millions de patients à travers le monde d'être soignés. Parmi les recherches, certaines ont abouti et offrent une alternative aux traitements actuels, d'autres projets encore à l'état d'étude ouvriraient les portes d'une médecine nouvelle. Ce que la science nous réserve en matière de découvertes à l'avenir, le « nano » le démultipliera en applications potentielles.



ANNEXES



Annexe I : Infrarouge à transformée de fourrier (FTIR)

L'analyse par infrarouge est une méthode d'analyse structurale qui révèle la nature des liaisons entre atomes dans une molécule. Les composés organiques ont en effet la particularité de posséder des liaisons inter-atomiques qui entrent en vibration sous l'action d'un rayonnement infrarouge à des longueurs d'onde caractéristiques.

Ce phénomène s'accompagne d'une consommation d'énergie lumineuse à la longueur d'onde considérée. L'IRTF permet de mesurer les absorbances d'énergie des liaisons chimiques (fonctions alcool, acides, méthyles...) de tous les composants présents dans les produits analysés et de les corrélés à leurs concentrations, puisque l'intensité de l'absorption est directement proportionnelle à la concentration de la molécule considérée.

I.1. Principe :

Le principe d'analyse est le suivant :

Lorsqu'un rayonnement lumineux de longueur d'onde donnée frappe une molécule du matériau à analyser, il lui communique une certaine quantité d'énergie qui, si elle est voisine de l'énergie de vibration de cette molécule, sera absorbée par cette dernière et on enregistrera une diminution de l'intensité lumineuse réfléchi ou transmise. Les longueurs d'onde qui correspondent au domaine d'énergie de vibration des molécules sont dans le domaine de l'infrarouge entre 2.5 et 25 μm .

Les premiers résultats en infrarouges montraient des interférogrammes dont on ne pouvait tirer des informations précises, grâce à l'avancée technologique et l'arrivée des ordinateurs, la transformée de Fourier a fait son apparition. Son utilité et de transformer par une simple dérivation et des algorithmes définis l'interférogramme en un spectre bien clair qu'on peut exploiter.

La transformée de Fourier permet aussi de limiter le signal au domaine d'étude « 4000 - 400 cm^{-1} ».

I.2. Avantages

La technique FTIR présente de multiples avantages :

- Rapidité de l'analyse : 30 secondes par échantillon.
- Analyse non destructrice.
- Analyse en transmission sur des échantillons relativement épais.

- Coût de l'analyse peu élevé.
- Gamme importante d'appareils robustes pour l'analyse en ligne.
- Possibilités d'analyse de produits toxiques ou dangereux à distance (plus de 100 m en utilisant les fibres optiques).
- Méthode puissante pour l'étude de la liaison hydrogène.

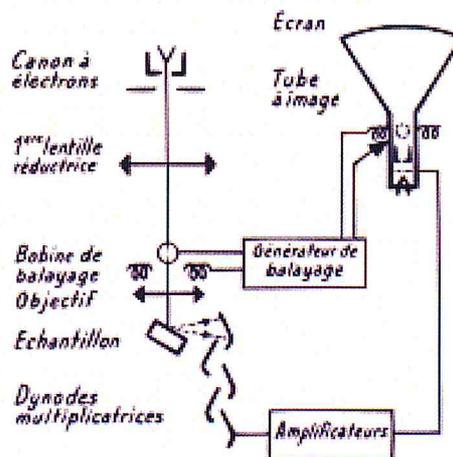
Annexe II : Microscope Electronique à Balayage

II.1. Principe

La microscopie électronique à balayage (MEB) est une technique de microscopie capable de produire des images en haute résolution de la surface d'un échantillon en se basant sur le principe des interactions électrons-matière.

Un faisceau d'électrons très fin (sonde) balaie point par point et ligne après ligne la surface de l'échantillon à analyser. Diverses interactions entre les électrons (primaires) incidents et la matière génèrent des électrons secondaires, de basse énergie qui sont accélérés vers un détecteur d'électrons qui va amplifier le signal. A chaque point d'impact correspond ainsi un signal électrique. Il est ainsi possible, en balayant le faisceau sur l'échantillon, d'obtenir une cartographie de la zone balayée (**fig.VI.1**).

Dans la pratique, les MEB actuels les plus conventionnels, c'est-à-dire équipés de détecteurs d'électrons secondaires permettent d'atteindre une résolution de l'ordre de 20 nm et un grossissement qui peut aller jusqu'à 300 000 fois.



La figure VI.1 : Schéma de principe d'un MEB.

L'utilisation du MEB est courante en biologie, chimie, médecine, géologie, métallurgie ainsi qu'en mécanique. Sa grande commodité d'utilisation, sa souplesse pour visualiser des champs d'extension très variables sur des échantillons massifs et l'étendue de sa profondeur de champ font du MEB un outil indispensable dans l'exploration du monde microscopique.

Annexe III : Diffraction des Rayons X

La cristallographie aux rayons X ou diffractométrie de rayons X est une technique d'analyse fondée sur la diffraction des rayons X sur la matière. La diffraction n'ayant lieu que sur la matière cristalline, on parle aussi de radiocristallographie. Pour les matériaux non-cristallins, on parle de diffusion.

III.1. Méthode

L'échantillon est préparé sous la forme d'une poudre aplanie dans une coupelle, ou bien sous la forme d'une plaquette solide plate, puis bombardé par un faisceau de rayons X monochromatiques et parallèles de longueur d'onde connue, produit grâce à une anticathode de cuivre (Energie du rayonnement : 8047 eV ; Longueur d'onde ($K\alpha$) : 1.5405 Å). Un détecteur fait le tour de l'échantillon pour mesurer l'intensité des rayons X selon la direction. Les rayons X diffusés interfèrent entre eux, l'intensité présente donc des *maxima* dans certaines directions ; on parle de phénomène de «diffraction».

L'intensité détectée est enregistrée en fonction de l'angle de déviation 2θ ("deux-thêta") du faisceau ; la courbe obtenue s'appelle le «diffractogramme».

Les particules étant orientées au hasard, il y aura toujours une famille de plans donnant lieu à la diffraction, de telle sorte que l'on obtiendra simultanément tous les faisceaux susceptibles de diffracter : ces faisceaux forment des cônes de demi-angle au sommet θ .

Pour des raisons pratiques, on fait tourner l'échantillon d'un mouvement uniforme autour d'un axe situé dans son plan (**cercle goniométrique**), permettant ainsi d'augmenter le nombre d'orientations possibles des plans réticulaires.

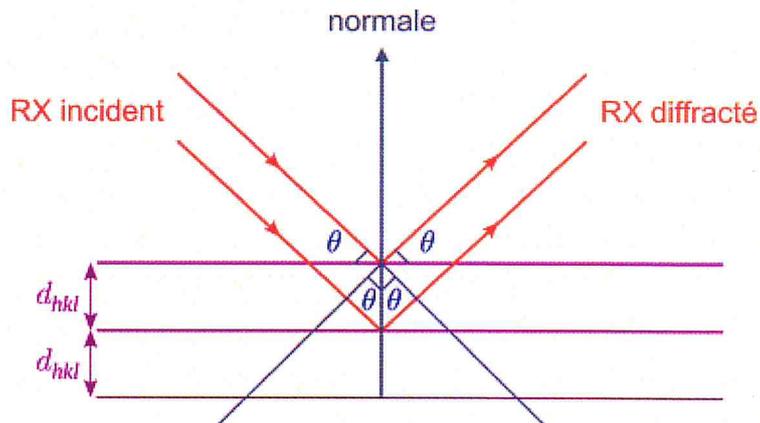


Figure VI.2 : Schéma de diffraction des rayons X

III.2. Champ d'application

La diffractométrie de rayons X est une méthode d'analyse physico-chimique. Elle ne fonctionne que sur la matière cristallisée (minéraux, métaux, céramiques, polymères semi-cristallins, produits organiques cristallisés), mais pas sur la matière amorphe (liquides, polymères amorphes, verres) ; toutefois, la matière amorphe diffuse les rayons X, et elle peut être partiellement cristallisée, la technique peut donc se révéler utile dans ces cas-là.

La DRX permet de reconnaître des produits ayant la même composition chimique brute, mais une forme de cristallisation différente, par exemple de distinguer les différentes silices (qui ont toutes la même formule brute SiO_2 : quartz, cristobalite...), les différents aciers (acier ferritique, austénite...) ou les différentes alumines (qui ont toutes la même formule brute Al_2O_3 : corindon/alumine α , γ , δ , θ ...). Cela sert notamment à vérifier que l'on n'a pas fabriqué une autre molécule de même formule, mais de forme différente.

Annexe IV : Calorimétrie Différentielle à Balayage

La calorimétrie différentielle à balayage (DSC) est une méthode d'analyse thermique dans laquelle la différence de quantité de chaleur nécessaire pour augmenter la température d'un échantillon par rapport à celle d'une référence est mesurée en fonction de la température.

Une faible quantité de l'échantillon à étudier est placé dans une cellule en aluminium qui est scellée hermétiquement. La capsule contenant l'échantillon sera placée dans un des deux récipients de l'appareil ; dans l'autre récipient, une capsule vide sert de référence.

Les analyses sont réalisées sous balayage d'un gaz inerte (par exemple, l'azote) pour éviter toute réaction du matériau à étudier avec l'atmosphère du four.

Une cellule de mesure DSC se compose d'un four et d'un capteur intégré avec des positions définies pour les creusets échantillon et référence. Les surfaces du capteur sont connectées à des thermocouples. Cela permet d'enregistrer aussi bien la différence de température entre l'échantillon et la référence (signal DSC) et la température absolue de l'échantillon ou de la référence.

Elle permet de déterminer les transitions de phase :

- la température de transition vitreuse (T_g) des polymères, des verres métalliques et des liquides ioniques ;
- les températures de fusion et de cristallisation ;
- les enthalpies de réaction, pour connaître les taux de réticulation de certains polymères.

La technique de la DSC se base sur le fait que lors d'une transformation physique, telle qu'une transition de phase, une certaine quantité de chaleur est échangée avec l'échantillon pour être maintenu à la même température que la référence. Le sens de cet échange de chaleur entre l'échantillon et l'équipement dépend de la nature endothermique ou exothermique du processus de transition. Ainsi, par exemple, un solide qui fond va absorber plus de chaleur pour pouvoir augmenter sa température au même rythme que la référence. La fusion est en effet une transition de phase endothermique car elle absorbe la chaleur. De même, l'échantillon peut subir des processus exothermiques, tels que la cristallisation, lorsqu'il transmet de la chaleur au système.

En mesurant la différence de flux de chaleur entre l'échantillon et la référence, un calorimètre différentiel à balayage peut mesurer la quantité de chaleur absorbée ou libérée au cours d'une transition.

La DSC est largement utilisée en milieu industriel en contrôle qualité en raison de son applicabilité dans l'évaluation de la pureté d'échantillons ou dans l'étude du durcissement de polymères.

Annexe V : Potentiel zêta

Le potentiel zêta est souvent mesuré pour prédire la stabilité des particules en suspension. L'intensité de la force de répulsion électrostatique est en effet liée au potentiel zêta : plus les particules ont un potentiel zêta élevé (en valeur absolue), plus elles vont se repousser et moins elles vont avoir tendance à s'agréger.

V.1. Principe

Le potentiel zêta caractérise la charge de surface des colloïdes en solution.

La présence de groupes chargés à la surface d'une particule affecte la distribution ionique dans la région interfaciale entre la particule et le liquide. Il en résulte une augmentation de la concentration en contreions près de la surface de la particule, qui peut être modélisée sous la forme d'une double couche électrostatique.

La couche la plus proche de la particule est composée d'ions de charge opposée à celle de la surface de la particule. Ces ions sont solidement liés à la particule, c'est pourquoi cette couche dite de Stern est aussi nommée couche liée.

La couche de Stern attire à son tour des ions de charge opposée (donc de même charge que la particule). Cette seconde couche appelée couche diffuse ou couche de Gouy contient également des ions de charge identique à celle des ions de la couche liée (**Fig.VI.3**), mais en concentration volumique moindre.

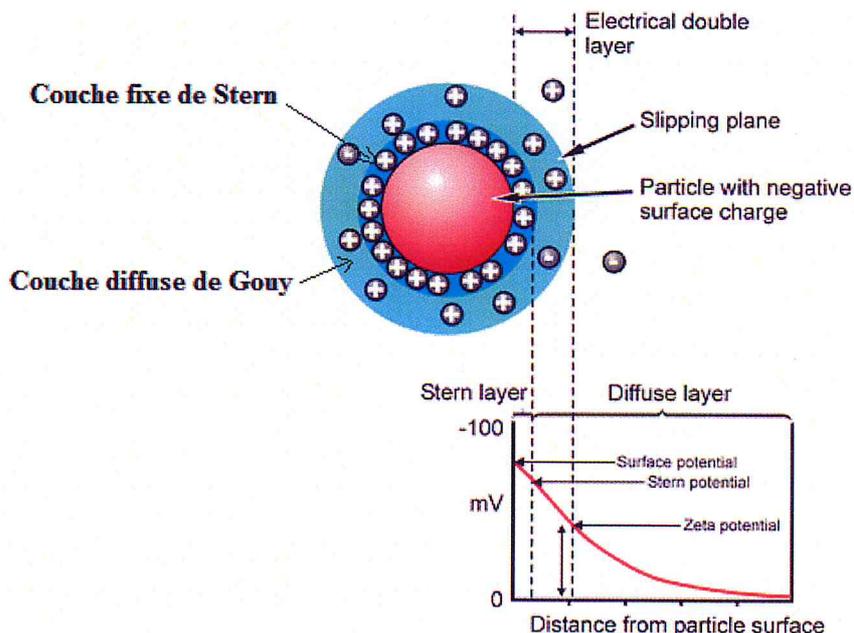


Figure VI.3 : Schéma du potentiel zêta

Quand un champ électrique est appliqué à travers un électrolyte, les particules en suspension qui possèdent une charge électrique sont attirées vers l'électrode de charge opposée, alors que la force de frottement subie par les particules s'oppose à ce mouvement. Lorsque l'équilibre entre ces deux forces est atteint, les particules se déplacent à vitesse constante. Leur vitesse dépend donc du champ électrique, du milieu et de la charge de la particule. Sous l'effet des forces de frottement, la couche d'ions diffuse est arrachée jusqu'à un certain plan appelé plan de cisaillement. Le potentiel mesuré au niveau de ce plan de cisaillement est appelé potentiel zêta (ζ).

Annexe VI : Spectroscopie 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 de la matière, et plus particulièrement de certaines molécules d'absorber des radiations lumineuses de longueur d'onde déterminée, ou d'une plage de longueurs d'ondes judicieusement choisie.

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

VI.1 Loi d'absorption de la lumière - loi de Beer-Lambert

Soit une lumière monochromatique traversant une solution absorbante de concentration C contenue dans une cuve d'épaisseur l . Une partie de ce rayonnement sera absorbée par l'échantillon et une partie sera transmise.

Bouguer, Lambert et Beer ont étudié les relations qui existent entre I_0 et I : l'intensité d'une lumière monochromatique traversant un milieu où elle est absorbée décroît de façon exponentielle :

$$I = I_0 e^{-klC}$$

- * I_0 est l'intensité de la lumière incidente
- * I est l'intensité après passage à travers la cuve contenant la solution (intensité transmise)
- * l est la distance traversée par la lumière (épaisseur de la cuve)
- * C est la concentration des espèces absorbantes
- * k est une constante caractéristique de l'échantillon.

Cette équation peut se réécrire : $\log(I_0/I) = \epsilon l C$.

- * $\log(I_0/I)$ est appelé absorbance (A)
- * ϵ est le coefficient d'extinction molaire : c'est une caractéristique de la substance étudiée à une longueur d'onde donnée.

On obtient alors la relation connue sous le nom de **loi de Beer-Lambert** :

$$A = -\log T = \epsilon l C$$

Avec $T = I/I_0$ est la **transmittance**

Validité de la loi de Beer-Lambert

La loi de Beer-Lambert s'applique pour des radiations monochromatiques et sa validité est bonne lorsqu'on travaille avec des solutions suffisamment diluées pour ne pas modifier les propriétés des molécules (association, complexation ...).

VI.2. Appareillage

L'étude des absorptions nécessite l'utilisation d'un appareil appelé spectromètre. La figure VI.4 représente le schéma de principe d'un spectromètre d'absorption UV- visible double faisceau. Il est constitué des éléments suivants :

- ✚ **Source** : Le rôle de la source est de fournir la radiation lumineuse.
- ✚ **Monochromateur** : Le monochromateur a pour rôle de disperser le rayonnement polychromatique provenant de la source et d'obtenir des radiations monochromatiques. Les monochromateurs les plus utilisés sont composés en général d'une fente d'entrée, d'un dispositif de dispersion comme un prisme ou un réseau et d'une fente de sortie.
- ✚ **Diviseur de faisceau** : La lumière monochromatique qui émerge du monochromateur est séparée en deux faisceaux qui traversent les compartiments de l'échantillon et de la référence.
- ✚ **Détecteur** : Le détecteur est un tube photomultiplicateur qui convertit la lumière reçue en courant. Ce type de détecteurs est de plus en plus remplacé par des photodiodes (semi-conducteurs) plus sensibles. Le détecteur est relié à un enregistreur qui permet de tracer un spectre d'absorption de l'échantillon analysé.

Un compartiment échantillon est inséré sur le trajet optique après ou avant le système dispersif selon la conception du montage.

La solution à étudier doit être placée dans une cellule ou cuve. Les cellules de mesure sont généralement des tubes parallélépipédiques de 1x1 cm de côté et 4 à 5 cm de hauteur. Elles sont en quartz pour le domaine UV-visible.

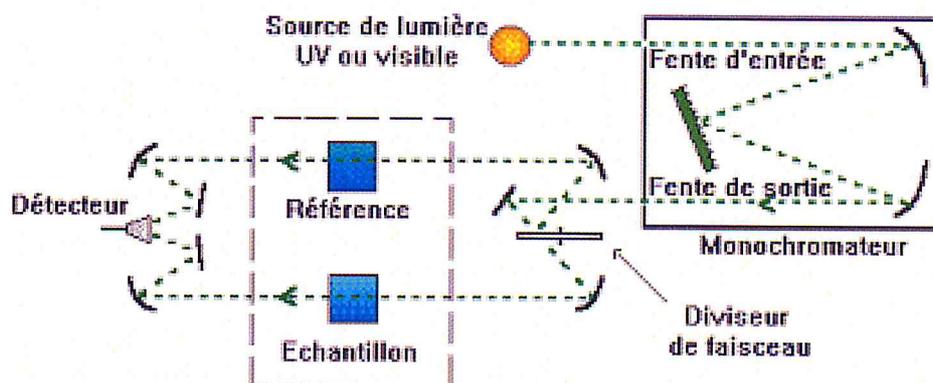


Figure VI.4 : schéma de principe d'un spectromètre d'absorption UV- visible

VI.3. Exemples d'applications :

L'analyse quantitative par la spectrométrie UV-visible est très employée car elle possède un large domaine d'application (Chimie minérale, organique, biochimie).

Comme applications, on peut citer :

- _ Dosage du fer dans l'eau ;
- _ Dosage des molécules actives dans une préparation pharmaceutique ;
- mesures dans des environnements contaminés ;
- mesures de cinétiques de réactions ;