



وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة عبد الحميد ابن باديس - مستغانم-
Université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem
كلية العلوم والتكنولوجيا
Faculté des Sciences et de la Technologie

En Convention de Cotutelle Internationale de Thèse

Avec l'Université Technique « Gheorghe Asachi » Iasi. Roumanie

N° D'ordre : D...../2021

THÈSE

Présentée pour obtenir le diplôme de

DOCTORAT EN SCIENCES

Spécialité : Génie des Procédés

Par

Mme. ZANOUNE Kheira

THÈME

**Micro et nanoparticules magnétiques à base de polysaccharides
modifiés pour le transport à cible des médicaments antitumorales**

Soutenue le 2021 à l'Université Abdelhamid Ibn Badis, Mostaganem, Algérie

Devant le jury composé de :

Mr. BELHAKEM Mustapha	Pr, Université de Mostaganem	Président du jury
M ^{me} .DELAITE Christelle	Pr, Université de Mulhouse-France	Examinateur
Mr. ATANASE Leonard	Pr, Université d'Apollonia, Iasi-Roumanie	Examinateur
Mr. POPA Marcel	Pr, Université d'Iasi-Roumanie	Directeur de recherche
Mr. OUAGUED Abdallah	Pr, Université de Chlef	Directeur de recherche
Mr. DJENNAD Mhamed	Pr, Université de Mostaganem	Co directeur de recherche

Remerciements

À Dieu qui m'a donné la force, le courage et la santé pour réaliser ce rêve.

*Ce travail de doctorat entre dans le cadre de la préparation d'une thèse en cotutelle réalisée entre l'Université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem. ALGÉRIE et l'Université Technique « Gheorghe Asachi » Iasi. ROUMANIE au sein du laboratoire de Biomatériaux et composites de la faculté d'Ingénierie Chimique et Protection de l'Environnement d'Iasi, sous la supervision de Monsieur, le **professeur POPA Marcel**. Je le remercie vivement pour m'avoir encadrée, pour ses compétences scientifiques, ses qualités pédagogiques, humaines et pour m'avoir soutenue avec enthousiasme pendant toutes ces années de travail. Je le remercie de m'avoir accordée une entière confiance et surtout beaucoup d'autonomie.*

*Je remercie chaleureusement mon directeur de thèse, Mr: le Professeur **Ouagued Abdellah**, d'avoir accepté de diriger cette thèse. Merci pour ton soutien, tes précieux conseils, et ta disponibilité.*

*Je voudrais remercier sincèrement, Mr le Professeur **DJENNAD M'hamed** Co-encadreur de thèse pour son aide tout au long de notre collaboration ainsi pour leurs conseils et observations.*

*Je tiens également à adresser mes vifs remerciements à Monsieur **BELHAKEM Mostefa**, Professeur à l'université de Mostaganem, pour le grand honneur qu'il me fait en présidant le jury de cette soutenance.*

*Je me fais un devoir d'exprimer mes sentiments de gratitude et de respect à Madame **DELAITE Christelle**, Professeur à l'Université de Haute-Alsace, Mulhouse, France et à Monsieur **ATANASE Leonard Ionut**, Professeur à l'université Apollonia d'Iasi, Roumanie ; pour avoir accepté d'être rapporteurs de ce manuscrit et de juger ce travail.*

*Ce travail de recherche a été rendu possible grâce au financement du Programme Erasmus, je remercie le Professeur **MAHMOUDI Hacene**, ex vice-recteur chargé des relations extérieures à l'université de chlef qui m'avoir offert cette chance de faire mes études en Roumanie.*

*Je tiens tout particulièrement à exprimer mes plus chaleureux remerciements à Madame **MIHAELA Rata Delia**, Docteur à l'université Apollonia d'Iasi, Roumanie, pour ses conseils, son aide, sa disponibilité, surtout sa gentillesse qu'elle m'a exprimée tout au long de la réalisation de cette thèse et toutes ses réponses à mes questions. Je la prie encore une fois de recevoir à travers ce travail mes sincères remerciements.*

*Je souhaite remercier très fort **Dr. SAVIN Corina Lenuța**, un grand merci à tous les membres de laboratoire **Dr. PEPTU Catalina**, **Dr IURCIUC (Tincu) Camelia**, **Dr. Anca Niculina Cadinoiu***

Je remercie ceux qui de loin ou de près m'ont apporté un soutien constant pour venir à bout de ce travail combien exaltant.

J'exprime ma profonde gratitude à toute ma famille : ma mère, mes sœurs, mon frère, ma belle-famille, et mes amis pour votre soutien, votre amour et d'avoir cru en moi.

Un grand merci à mon mari de m'avoir aidée à surmonter les moments difficiles et les moments de doute. Je le remercie pour son soutien et ses encouragements durant ces années. Une tendre pensée pour mes enfants tadjeddine et bahaeddine pour m'avoir donné la force d'aller au terme de ce travail.

Résumé

Le cancer reste l'une des maladies les plus dévastatrices au monde, responsable de plus de 20% de tous les décès, définis comme une prolifération cellulaire anarchique et incontrôlée qui se propage rapidement aux tissus sains. Les systèmes de libérations contrôlées de médicaments offrent de grandes opportunités pour le développement de nouvelles stratégies non invasives pour le traitement des cancers et le principal avantage de ces systèmes est représenté par leur capacité à s'accumuler dans les tumeurs par une perméabilité et un effet de rétention améliorés. Dans le cadre de ce travail de thèse, des systèmes hybrides innovants d'administration de médicaments, à base de polymère contenant à la fois des nanoparticules magnétiques ainsi qu'un médicament antitumoral, ont été développés afin d'améliorer l'efficacité du traitement antitumoral.

Deux axes de recherches ont été explorés : des nanoparticules hybrides magnétiques ; des nanocapsules obtenues par la condensation interfaciale entre le chitosane et le poly (N-vinyl pyrrolidone-anhydride alt-itaconique) et des nanosphères magnétiques à base de chitosane obtenues par double réticulation en émulsion inverse. Les nanoparticules hybrides (nanocapsules et nanosphères) formées sont caractérisées afin d'en déterminer la forme et la taille ; ces particules sont de quelques dizaines à quelques centaines de nanomètres de diamètre. Le MEB a confirmé leur taille nanométrique et leur forme sphérique bien définie. Ces nanocapsules et nanosphères magnétiques ont permis l'encapsulation d'une quantité accrue de 5-fluorouracile (médicament modèle) et ont présenté une libération contrôlée de médicament. Des études *in vitro* ont révélé que les nanocapsules hybrides chargées de médicament étaient capables d'induire un effet cytostatique sur les cellules MCF7 du carcinome du sein, comparable à celui du médicament libre.

Mots clés: nanocapsules hybrides; nanosphères hybrides ; polymères intelligents; nanoparticules magnétiques ; 5-fluorouracile; thérapie antitumorale; carcinome du sein.

Abstract

Cancer remains one of the world's most devastating diseases, responsible for more than 20% of all deaths that is defined as uncontrolled proliferation of cells and rapidly spread to healthy tissues. Controlled drug delivery systems offers great opportunities for the development of new non-invasive strategies for the treatment of cancers and the main advantage of these systems is represented by their capacity to accumulate in tumors by enhanced permeability and retention effect. As part of this thesis work, innovative hybrid drug delivery systems, based on a polymer containing both magnetic nanoparticles as well as an antitumoral drug, was developed in order to improve the efficiency of the antitumoral treatment.

We focused our research on two types of hybrid magnetic nanoparticles: nanocapsules obtained by the interfacial condensation between chitosan and poly(N-vinyl pyrrolidone-*alt*-itaconic anhydride) and magnetic nanospheres based on chitosan obtained by double crosslinking in reverse emulsion. The hybrid nanoparticles (nanocapsules and nanospheres) formed is characterized in order to determine their shape and size; these particles are from a few tens to a few hundred nanometers in diameter. SEM confirmed their nanometric size and their well-defined spherical shape. These nanocapsules and nanospheres allowed the encapsulation of an increased amount of 5-Fluorouracil and presented a controlled drug release. *In vitro* studies have revealed that these drug-loaded hybrid nanocapsules were able to induce a cytostatic effect on breast carcinoma MCF7 cell, comparable to that of free drug.

Keywords: hybrid nanocapsules; hybrid nanospheres; smart polymers; magnetic nanoparticles; 5-Fluorouracil; antitumoral therapy; breast carcinoma.

ملخص

لا يزال السرطان أحد أكثر الأمراض تدميراً وهاكاً في العالم، وهو السبب في وفاة أكثر من 20٪ من جميع الوفيات، ويعمل على تكاثر الخلايا بشكل فوضوي وغير منتظم، والذي ينتشر بسرعة في الأنسجة السليمة. تخلق أنظمة إطلاق الأدوية الخاضعة للرقابة فرصاً كبيرة لتطوير استراتيجيات جديدة غير جراحية لعلاج السرطانات وتتمثل الميزة الرئيسية لهذه الأنظمة في قدرتها على التراكم في الأورام من خلال النفاذية وتأثير الاحتفاظ المحسن. في إطار البحث المقدم في هذه الأطروحة ، تم تطوير أنظمة مبتكرة لتوصيل الأدوية الهجينة ، تعتمد على بوليمر يحتوي في نفس الوقت على كل من الجسيمات النانوية المغناطيسية و كذلك على دواء مضاد للأورام ، من أجل تحسين فعالية العلاج المضاد للأورام. ركزنا في بحثنا هذا على نوعين من الجسيمات النانوية المغناطيسية الهجينة: الكبسولات النانوية التي تم الحصول عليها عن طريق التكتيف البيئي بين الكينوزان والبولي (فينيل بيروليديون- أنهيدريد إيتاكونيك) والكريات النانوية المغناطيسية التي تعتمد على الكينوزان والتي تم الحصول عليها عن طريق الربط المتشابك المزدوج في شكل مستحلب عكسي، الجسيمات النانوية الهجينة (الكبسولات النانوية والكريات النانوية) المتحصل عليها ، قد تم اختبارها وتشخيصها من أجل تحديد شكلها وحجمها بحيث يتراوح قطر هذه الجسيمات من بضع عشرات الى مئات من النانومتر، وأثبتت تقنية المسح المجهر الإلكتروني على تحديد حجمها وشكلها الكروي بشكل جيد ، تمكنت هذه الكبسولات النانوية والكريات النانوية المغناطيسية من تغليف كمية متزايدة من 5-فلورويوراسيل (نموذج دوائي) وسمحت لنا ايضاً بإطلاق منتظم وخاضع للرقابة للدواء المستعمل. كشفت الدراسات المخبرية أن الكبسولات النانوية الهجينة المحملة بالأدوية كانت قادرة على إحداث تأثير تثبيط الخلايا على خلايا سرطان الثدي ، مقارنة ذلك مع نفس الدواء الحر

الكلمات المفتاحية ، الكبسولات النانوية الهجينة ، الكريات النانوية الهجينة ، البوليمرات الذكية ، الجسيمات المغناطيسية ، 5-فلورويوراسيل ، العلاج المضاد للورم ، سرطان الثدي

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction générale 1

Références bibliographiques 6

Partie bibliographique

Chapitre I : Systèmes polymères pour l'inclusion et libération contrôlée/soutenue de principe actif

I.1 Introduction 8

I.2. Généralités sur le cancer 8

I.2.1. Définition 8

I.2.2. Les traitements anticancéreux..... 9

I.2.3. Les effets secondaires 11

I.3. Système de vectorisation 12

I.3.1. Historique 12

I.3.2. Concept général de la vectorisation des principes actifs..... 13

I.3.3. Caractéristiques principales des systèmes de vectorisation 14

I.3.3.1. Le vecteur 14

I.3.3.2. Le principe actif 15

I.3.4. Avantages de la vectorisation de médicaments 15

I.4. Systèmes polymère–médicament pour libération contrôlée de médicament 17

I.4.1. Notions fondamentales 17

I.4.2. Définitions des systèmes 20

I.4.2.1. Systèmes à libération contrôlée..... 20

I.4.2.2. Systèmes à libération prolongée..... 20

I.4.3. Classification de systèmes à libération contrôlée..... 21

I.5. Mécanismes généraux de libération de principes actifs 22

I.5.1. La diffusion 23

I.5.2. Systèmes de libération contrôlée par dégradation/érosion 25

I.5.3. Délivrance en réponse à un stimulus.....	26
1.6. Polymères utilisées pour l’obtention des systèmes de libération de principe actif	29
I.6.1. Les polymères naturels	31
I.6.2. les polymères synthétiques.....	31
I.6.3. Le chitosane	31
I.7. Conclusion	33
Références bibliographiques	34

Chapitre II : Systèmes micro / nanoparticules pour le transport ciblé de médicaments

II.1. Introduction	39
II.2. Les nanosystèmes particuliers pour la nanomédecine	39
II.2.1. L’importance de systèmes nanoparticulaires.....	39
II.2.2. Historique des nanoparticules	41
II.2.3. Définitions	43
II.3. Classification des nanoparticules	44
II.3.1. Les nanoparticules organiques	44
II.3.1.1. Les nanoparticules organiques lipidiques	44
II.3.1.2. Nanoparticules polymériques	47
II.3.1.3. Les méthodes de préparation des nanoparticules polymères	50
II.3.2. Nanoparticules inorganiques.....	53
II.3.2.1. Puits quantiques (quantum dots)	54
II.3.2.2. Les nanoparticules d’or	54
II.3.2.3. Les nanoparticules de silice	54
II.3.2.4. Les nanoparticules à base de carbone	55
II.3.2.5. Nanoparticules magnétique d’oxyde de fer.....	56
II.3.2.5.1. Principaux procédés de synthèse des nanoparticules magnétiques	57
II.3.2.5.2. Applications biomédicales des nanoparticules magnétiques	59
II.3.3. Nanoparticules hybrides.....	61
II.3.4. Stratégies de ciblage.....	63
II.3.4.1. Ciblage passif	63
II.3.4.2. Ciblage actif.....	64

.....	<i>Sommaire</i>
II.3.5.	Les différentes générations des vecteurs des médicaments	65
II.3.5.1.	Vecteurs de première génération	66
II.3.5.2.	Vecteurs de seconde génération	66
II.3.5.3.	Vecteurs de troisième génération	66
II.3.5.4.	Vecteurs de quatrième génération.....	67
II.4.	Nanosystèmes de polymère magnétique.....	68
II.4.1.	Généralités	68
II.4.2.	La morphologies des particules de polymère magnétiques.....	70
II.4.3.	Propriétés magnétiques des nanoparticules.....	71
II.4.3.1.	Principaux types de comportements magnétiques des nanoparticules	71
II.4.3.2.	Cycle d’hystérésis	72
II.5.	Conclusion	73
	Références bibliographiques	74

Partie expérimentale

Chapitre III : Matériel, techniques expérimentales et caractérisation

III.1.	Introduction	84
III.2.	Matériaux et réactifs	84
III.3.	Techniques de synthèses et d’obtentions	89
III.3.1.	Préparation des nanoparticules magnétiques d’oxydes de fer	89
III.3.2.	Préparation de nanocapsules magnétiques à base de chitosane/poly(NVPAI)	90
III.3.3.	Préparation des nanosphères magnétiques à base de chitosane	92
III.4.	Méthodes d’analyses et caractérisation des matériaux obtenus	94
III.4.1.	Caractérisation structurelle par la spectroscopie infrarouge (FTIR)	95
III.4.2.	Caractérisation morphologique	96
III.4.2.1.	Microscopie électronique à balayage MEB	96
III.4.2.2.	Potentiel Zêta et Diamètre	97
III.4.3.	Caractérisation thermique - Analyse thermogravimétrique ATG	98
III.4.4.	Propriétés magnétiques	99

III.4.5. Spectroscopie UV-Visible	100
III.4.6. Etude du gonflement des nanoparticules hybrides dans les solutions aqueuses	101
III.4.7. L'encapsulation du médicament	102
III.4.8. Cinétique de libération de médicament (5-FU)	103
III.4.9. Analyse théorique de la libération de médicaments	104
III.4.10. Test de cytotoxicité in vitro	105
III. 5. Conclusion	106
Références bibliographiques.....	107

Chapitre IV: Synthèse et caractérisation des nanocapsules magnétiques à base de chitosane et de poly(*N* vinylpyrrolidone – *alt* - anhydride itaconique)

IV.1. Introduction	109
IV.2. Obtention des nanoparticules magnétiques	110
IV.3. Obtention des nanocapsules magnétiques à base de Cs/poly(NVPAl) et de magnétite ...	110
IV.4. La structure chimique des nanocapsules magnétiques à base de Cs/poly(NVPAl).....	111
IV.5. Caractérisation des nanocapsules hybrides magnétiques obtenues	113
IV.5.1. Caractérisation structurelle des nanocapsules obtenues par Spectroscopie FTIR.....	113
IV.5.2. Détermination du diamètre moyen	116
IV.5.3. Stabilité des suspensions aqueuses	117
IV.5.4. Morphologie des nanocapsules	118
IV.5.5. Propriétés thermiques des nanocapsules par ATG	119
IV.5.6. Propriétés magnétiques.....	122
IV.6. Étude de gonflement des nanocapsules magnétiques	123
IV.7. Efficacité d'encapsulation de 5-fluorouracile	126
IV.8. Libération de 5-FU par les nanocapsules magnétiques	127
IV.9. Analyse théorique de la libération de médicaments.....	128
IV.10. Test de viabilité	129
IV.11. Conclusion	131
Références bibliographiques	132

Chapitre V: Synthèse et caractérisation des nanosphères magnétiques à base de chitosane

V.1. Introduction	134
V.2. Obtention des nanosphères hybrides à base de chitosane	135
V. 3. Réaction de double réticulation en émulsion inverse	137
V.4. Caractérisation structurale de nanoparticules par FTIR	139
V.5. Caractérisation morphologique des nanoparticules hybrides	141
V.5.1. Microscopie électronique à balayage	141
V.5.2. Diamètre moyen des nanoparticules hybrides	146
V.5.3. Stabilité des suspensions aqueuses	148
V.6. Propriétés thermiques des nanoparticules hybrides par ATG	149
V.7. Propriétés magnétiques des nanosphères	151
V.8. Étude de gonflement des nanoparticules hybrides	153
V.9. L'étude de chargement de 5-Fluorouracil	159
V.10. L'étude de libération in vitro du 5-Fluorouracil par les nanoparticules hybrides	160
V.11. Analyse théorique de la libération de médicaments.....	162
V.11. Conclusion	164
Références bibliographiques	166
Conclusion générale et perspectives	168

Liste des abréviations et des symboles

- A** : Absorbance
- ABS** : Solutions tampons acétate
- AG** : Glutaraldéhyde
- ATG** : Analyses thermogravimétriques.
- CS** : Chitosane.
- DDS** : Système d'administration des médicaments
- DLS** : Diffusion dynamique de la lumière
- E_{ef} %** : L'efficacité d'encapsulation
- EPR** : Enhanced Permeability and Retention
- FBS** : Sérum bovin fœtal
- FTIR** : Spectroscopie infrarouge à Transformée de Fourier
- IRM** : Imagerie par résonance magnétique
- MCF-7** : Viabilité cellulaire
- MEB/SEM**: Microscopie électronique à balayage
- Ms** : la saturation magnétique
- MTDDS** : Système d'administration des médicaments ciblé magnétiquement
- MTT** : test de viabilité cellulaire
- NCM** : Les nanocapsules magnétiques
- NCM** : Nanocapsules magnétiques
- NP** : Les nanoparticules
- NPM** : nanoparticules
- NS** : Les nanosphères
- NSM** : Nanosphères magnétiques
- PA** : Principe actif
- PBS** : Solutions tampons phosphate
- PDT** : photothérapie dynamique
- PEG** : Le poly(éthylène glycol)
- Poly (NVPAl)** : poly (N-vinyl pyrrolidone-anhydride alt-itaconique
- PTT** : thérapie thermique
- Q (%)** : Le degré de gonflement
- R_{ef} %** : L'efficacité de la libération
- SA** : Substance biologiquement active
- SPION** : Les nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques
- TEM** : microscopie électronique à transmission
- TPP** : Tripolyphosphate de sodium
- UV** : Ultraviolet
- VSM** : magnétomètre à l'échantillon vibrant (VSM).
- 5FU** : 5-Fluorouracile
- ζ** : Potentiel zêta
- λ_{max}** : longueur d'onde maximale (nm).

Liste des figures

Figure I.1	Structure simplifiée d'une tumeur cancéreuse.	9
Figure I.2	Evolution de la concentration plasmatique du principe actif en fonction du temps avec ou sans vectorisation.	16
Figure I.3	Profil de relargage de différents systèmes thérapeutiques: A) relargage de formulations conventionnelles, B) multiplication des doses administrées via des formulations conventionnelles, C) systèmes à relargage prolongé dans le temps; D) systèmes à relargage ciblé.	19
Figure I.4	Mécanismes de libération contrôlée de médicaments utilisant différents types de nanotransporteurs.	23
Figure I.5	Libération d'un principe actif à partir d'un système matriciel à libération contrôlée.	24
Figure I.6	Diffusion de principe actif dans un système réservoir	25
Figure I.7	Mécanismes de libération de médicaments à partir d'une matrice polymère, y compris les méthodes contrôlées par diffusion, gonflement et érosion.	25
Figure I.8	Systèmes stimuli-sensibles développés pour les thérapies cancéreuses et mécanismes impliqués dans la libération de la SA.	27
Figure I.9	Libération d'une SA en milieu acide par gonflage d'un nanovecteur à base de polymère pH-sensible.	28
Figure I.10	Structure chimique de chitine et de chitosane.	33
Figure II.1	Représentation de liposomes: (A): les liposomes classiques; (B): liposomes PEGylés / furtifs; (C): liposomes ciblés et (D): liposomes multifonctionnels	45
Figure II.2	Représentation de micelle	46
Figure II.3	Représentation de dendrimères	46
Figure II.4.	Nanosphères polymères contenant une substance active: a) encapsulée à l'intérieur, b) adsorbée en surface, c) accrochée chimiquement à la surface	49
Figure II.5	Représentation d'une nanocapsule	49
Figure II.6	Nanocapsule contenant une substance active: a) encapsulée dans le noyau et la membrane, b) incorporée dans la membrane, c) dans le noyau.	50
Figure II.7	Synthèse de nanocapsules par A- simple émulsion huile dans eau et B- double émulsion W1/O/W2	72

Figure II.8	Nanoparticules inorganiques a) nanoparticules d'oxyde de fer, b) Quantum Dots (QD), c) nanoparticules d'or (AuNPs), d) nanoparticules de silice (SiNanoparticules).	53
Figure II.9	Représentation schématique des nanoparticules à base de carbone (a) fullerène C ₆₀ (b) nanotubes de carbone (c) nanofeuillets de carbone.	55
Figure II.10	Deux approches de synthèse des nanomatériaux	57
Figure II.11	Applications biomédicales des nanoparticules magnétiques d'oxyde de fer	61
Figure II.12	Exemples des différentes architectures de nanoparticules hybrides (bleu : composante inorganique / rouge : composante organique).	62
Figure II.13	Ciblage passif des cellules cancéreuses grâce à l'effet EPR.	64
Figure II.14	Ciblage actif des cellules cancéreuses.	64
Figure II.15	principe de la vectorisation magnétique d'agents anticancéreux, utilisant des vecteurs magnétiques injectables et un champ magnétique externe appliqué au niveau de la tumeur cible.	65
Figure II.16	A) Schéma illustrant l'évolution des nanoparticules (a) 1 ^{er} génération de vecteurs, (b) 2 ^{ème} génération et (c) 3 ^{ème} génération de vecteurs. B) Représentation schématique d'un nanovecteur équipé d'un ligand (anticorps, protéine, petite molécule) capable de reconnaître un récepteur exprimé à la surface de la cellule cible.	67
Figure II.17	Nanoparticule multifonctionnelle.	68
Figure II.18	Morphologies de positionnement des nanoparticules magnétiques par rapport au polymère: a) les nanoparticules magnétiques sont dispersés dans la matrice polymère; b) les NPMs sont adsorbées à la surface des particules de polymère; c) les systèmes de type noyau-coquille; d) le polymère est greffé à la surface des particules magnétiques.	70
Figure II.19	Illustration hypothétique de la réponse magnétique de nanoparticules se trouvant dans un vaisseau allant du nanomètre au micromètre, dans le cas de matériel diamagnétique (DM), paramagnétique (PM), ferromagnétique (FM) et superparamagnétique (SPM)	73
Figure III.1	Structure chimique du chitosane (CS).	85
Figure III.2	La réaction d'obtention du copolymère NVPAl.	86
Figure III.3	Structure chimique de TPP (Na ₅ P ₃ O ₁₀).	86
Figure III.4	Structure chimique de Glutaraldéhyde.	87

Figure III.5	Structure chimique de Tween 80.	87
Figure III.6	Structure chimique de Span 80.	87
Figure III.7	Structure chimique de pluronic F127.	88
Figure III.8	Structure chimique de 5-Flourouracile.	89
Figure III.9	Illustration schématique de préparation des nanocapsules magnétique à base de CS/poly(NVPAI) par condensation interfaciale.	92
Figure III.10	Préparation des nanosphères magnétiques.	94
Figure III.11	Spectromètre Scimitar Digilab FTS 2000 FTIR.	96
Figure III.12	a. Représentation schématique de l'instrument MEB; b. Microscope électronique à balayage HITACHI SU 1510.	97
Figure III.13	Dispositif Zeta Nanosizer Malvern.	98
Figure III.14	Thermogravimètre TA Instrument Q600.	99
Figure III.15	Image d'un magnétomètre à l'échantillon vibrant (VSM).	100
Figure III.16	Spectrophotomètre UV-Vis NanoDrop ND-1000.	101
Figure III.17	Courbe d'étalonnage de 5-FU dans l'eau bidistillé.	103
Figure III.18	Courbe d'étalonnage de 5-FU dans solution PBS (pH=7.4).	104
Figure IV.1	Schéma réactionnel d'obtention des nanocapsules à base de CS / poly(NVPAI) contenant des nanoparticules magnétiques.	112
Figure IV.2	Spectre FT-IR pour la magnétite (M), CN, CNM-1 et CNM-4.	114
Figure IV.3	Courbes de distribution dimensionnelle des nanoparticules magnétiques (M) et des nanocapsules hybrides (CNM).	116
Figure.IV.4	Microscopie électronique à balayage (MEB) pour l'échantillon CNM-5.	118
Figure IV.5	Microscopie électronique en transmission (MET) pour l'échantillon CNM-5.	119
Figure IV.6	Courbes thermogravimétriques pour CN, CNM-1, CNM-4 et CNM-6.	120
Figure IV.7	Les courbes de magnétisation de différents nanocapsules magnétiques (CNM-1, CNM-2, CNM-4 et CNM-5).	123
Figure IV.8	Le degré maximal de gonflement à 24h en solution PBS (pH = 7,4) des nanocapsules magnétiques CNM-1, CNM-2, CNM-3, CNM-4, CNM-5; CNM-6, CNM-7, CNM-8, CN.	124

Figure IV.9	Les courbes de cinétique de gonflement des nanocapsules en conditions alcalines (pH = 7,4) pour les échantillons: a) CN, CNM-1, CNM-2, CNM-3, CNM-4, CNM-5; b) CN, CNM -4, CNM-6, CNM-7, CNM-8.	125
Figure IV.10	Cinétique de libération in vitro de 5-FU à partir de NC magnétiques dans une solution tampon phosphate (pH 7,4), avec un insert zoom de cinétique de libération entre 0 et 30 minutes, pour les échantillons: a). CNM-1, CNM-4 et CNM-5; b). CNM-4, CNM-6, CNM-7 et CNM-8.	127
Figure IV.11	Cinétique de libération expérimentale et courbes théoriques de Korsmeyer-Peppas pour les nanocapsules magnétiques.	129
Figure IV.12	Viabilité des cellules MCF-7 de carcinome du sein humain après 48 heures d'incubation avec des nanocapsules non chargées (CN-2), des nanocapsules chargées en 5-FU (CN-2-5-FU), des nanocapsules magnétiques chargées en 5-FU (CNM-4-5-FU) et 5-FU en fonction de la concentration.	130
Figure.V.1	Illustration schématique de la structure du réseau formé par la double réticulation du chitosane, en incluant les nanoparticules de magnétite.	139
Figure.V.2	Spectres FT-IR comparatifs de CS, Fe ₃ O ₄ , nanoparticules à base de chitosane non magnétiques et nanoparticules hybrides.	140
Figure V.3	Les images de microscopie électronique à balayage (MEB) des nanosphères magnétiques : Fig V.3.a) pour les échantillons NSM-1jusqu'à NSM-5 (différents rapport magnétiques). Fig V.3.b) pour les échantillons NSM-1, NSM-6 et NSM-7 (différentes concentration de CS). Fig V.3.c) pour les échantillons NSM-8 jusqu'à NSM-11(différentes vitesse d'agitation)	145
Figure V.4	Courbes de distribution dimensionnelle : (a) : de NSM-1, NSM-3, NSM-4 et NSM-5 pour différents rapport CS / Fe ₃ O ₄ ; (b) : de NSM-1 et NSM-7 pour différent concentration de polymère (CS); (c) : NSM-1, NSM-10 et NSM-11 pour différents vitesse d'agitation.	147
Figure V.5	Courbes thermogravimétriques des nanosphères magnétiques à base de Cs. (a) : les échantillons NSM-1 et NSM-3. (b) : les échantillons NSM-1 et NSM-6.	150
Figure V.6	Les courbes de magnétisation des nanosphères magnétiques (NSM-1, NSM-2, NSM-4 et NSM-5).	153
Figure V.7	La cinétique de gonflement des nanosphères magnétiques dans différents solution aqueux. (a) Cinétique de l'échantillon NSM-1 dans pH= 3,6, pH = 6,7 et pH = 7,4. (b) Cinétique de l'échantillon NSM-5 dans pH= 3,6, pH = 6,7 et pH = 7,4. (c) Cinétique de gonflement des nanosphères magnétiques NSM-1, NSM-2, NSM-3, NSM-4 et NSM-5 dans ABS (pH= 3,6).	153

Figure V.8	Degré de gonflement maximum à 24 heures des NSs magnétiques en milieu aqueux à différents pH : ABS (pH=3.6), PBS (pH = 7,4) et pH=6,7.	157
Figure V.9	Cinétique de libération in vitro de 5-FU par les nanosphères magnétiques NSM-1, NSM-2 et NSM-3. (a) dans une solution aqueuse de pH 6.7; (b) Dans une solution aqueuse de pH 7.4.	162
Figure V.10	Les courbes théoriques de Korsmeyer-Peppas des nanosphères magnétiques.	164

Liste de tableaux

Tableau I.1	Exemples des agents anticancéreux couramment utilisés en chimiothérapie et leurs effets secondaires.	12
Tableau II.1	Les principales caractéristiques des méthodes les plus courantes de synthèse des nanoparticules d'oxydes de fer.	58
Tableau IV.1	Plan expérimental pour l'obtention des nanocapsules magnétiques.	111
Tableau IV.2	Les bandes d'absorption caractéristiques de: magnétite (M), CN et de CNM.	115
Tableau IV.3	Diamètre moyen des nanocapsules magnétiques.	117
Tableau IV.4.	Valeurs du potentiel zêta des nanocapsules magnétiques dans PBS à pH = 7,4.	117
Tableau IV.5	Les résultats de l'analyse thermogravométrique pour CN, CNM-1 CNM-4 et CNM-6.	122
Tableau IV.6	Valeurs d'efficacité d'encapsulation de 5-FU.	126
Tableau IV.7	Paramètres de Korsmeyer-Peppas.	128
Tableau V.1	Le plan expérimental utilisé pour la préparation des nanosphères magnétiques à base de CS.	137
Tableau.V.2	Les bandes d'absorption caractéristiques de la magnétite (Fe_3O_4), de nanosphères non magnétiques et des nanosphères magnétiques (NSM).	141
Tableau V.3	Le diamètre moyen des nanosphères magnétiques à base de CS.	148
Tableau V.4	Les valeurs de potentiel zêta des nanoparticules hybrides obtenues.	149
Tableau V.5	Les résultats de l'analyse thermogravométrique pour les échantillons NSM-1, NSM-3 et NSM-6.	151
Tableau V.6	L'efficacité de chargement et la quantité de 5-FU chargé g/ g de nanoparticules.	160
Tableau V.7	Paramètres de Korsmeyer-Peppas.	163

Introduction

générale

Introduction générale

Le cancer reste l'une des maladies les plus dévastatrices au monde, responsable de plus de 20% de tous les décès, définis comme une pathologie dégénérative conduisant à une hyper-prolifération cellulaire anarchique et incontrôlée [1]. D'après le Centre international de Recherche sur le Cancer (CIRC), le fardeau mondial du cancer atteint 18,1 millions de nouveaux cas et 9,6 millions de décès en 2018; ces chiffres montrent bien la gravité de cette maladie. Face à ce fléau, la découverte de nouveaux traitements contre le cancer est l'une des priorités de la recherche dans le monde; des efforts considérables sont déployés pour trouver une stratégie de traitement compétente, bien que seul un succès limité a été obtenu à ce jour. La dangerosité d'un cancer et les chances de guérison dépendent principalement du type de cancer, de sa taille, de sa localisation et de son stade d'évolution, plus un cancer est avancé, plus sa complexité de traitement augmente.

Les traitements classiques du cancer comprennent la chirurgie, la chimiothérapie et la radiothérapie ou leur association, généralement celle-ci rencontre une série d'inconvénients tels que: mauvaise biodisponibilité, besoins à doses élevées, effets secondaires indésirables (cytotoxicité, neurotoxicité, néphrotoxicité), faibles indices thérapeutiques, développement d'une résistance multiple aux médicaments, et ciblage non spécifique [2-5]. Malgré la grande gamme de médicaments disponibles sur le marché, il existe encore aujourd'hui de nombreux soins thérapeutiques non satisfaisant. Pour répondre à ces besoins, l'industrie pharmaceutique se doit de développer des médicaments réellement innovants conduisant à une amélioration significative du service médical et au traitement de maladies jusqu'ici sans option thérapeutique. L'application des nanotechnologies à l'oncologie présente de nombreux avantages [6]; elles ouvrent la voie à diverses thérapies permettant d'éliminer les cellules cancéreuses ; l'utilisation de nanoparticules pour le traitement des maladies complexes reste le moyen le plus intelligent pour améliorer les thérapies existantes. Le développement de nouveaux nanoparticules chargés de médicaments (nanoparticules, nanocapsules, liposomes et micelles) peut offrir de grandes opportunités dans le traitement du cancer car elles présentent plusieurs avantages tels que: facilite la distribution intratumorale, protège le principe actif de la dégradation prématurée et permet une libération prolongée et contrôlée de médicaments [2, 7, 8]. Les nanoparticules constituent des supports intéressants, compte tenu de la large palette de propriétés physiques et chimiques qu'elles peuvent offrir. De plus, elles peuvent être couplées entre elles et permettent également une grande variété de fonctionnalisations chimiques de surface. De telles propriétés offrent ainsi une très vaste gamme d'applications

potentielles. Les nanoparticules polymères constituent la principale branche des nanotechnologies utilisable à des fins diagnostiques et thérapeutiques; les polymères sont largement utilisés dans la préparation des systèmes particuliers et occupent une place importante dans ce domaine. Il existe deux types structuraux de nanoparticules polymères: les nanocapsules et les nanosphères; au cours de ce travail, nous nous sommes intéressés à ces deux types. Les nanoparticules avec une forme sphérique et une texture lisse sont considérés comme idéaux pour administrer des agents chimiothérapeutiques sur les tumeurs solides, afin de les transporter facilement à travers le système vasculaire tumoral et dans les cellules tumorales [9].

On voit que les avancées réalisées dans le domaine de l'utilisation des nanotechnologies ont permis de rendre les médicaments plus « intelligents ». Des efforts considérables ont été consacrés au développement de nanotransporteurs multifonctionnels qui délivrent des agents anticancéreux directement aux tissus malades via des stratégies de ciblage sophistiquées [10]. L'intégration de nanomatériaux inorganiques (par exemple des nanoparticules d'or, des nanoparticules magnétiques et des nanotubes de carbone...) dans diverses nanoparticules multifonctionnelles, a démontré un grand potentiel dans la thérapie du cancer [11].

Les systèmes d'administration de médicaments basés sur des nanoparticules magnétiques ont attiré une attention croissante en raison de leurs applications potentielles dans l'imagerie par résonance magnétique, la thérapie photodynamique et l'administration ciblée de médicaments [12]. Les NPs magnétiques sont constitués d'éléments magnétiques, tels que le fer, le nickel, le cobalt, le chrome, le manganèse, le gadolinium et leurs composés chimiques; les NPs magnétiques les plus explorées étant les nanoparticules de ferrite [13]. Ces nanoparticules ont une distribution de taille étroite, une bonne dispersibilité, une bonne biocompatibilité, une faible toxicité et une stabilité chimique élevée dans des conditions physiologiques et sont des candidats prometteurs pour des nanotransporteurs multifonctionnels en raison de leur superparamagnétisme unique et fascinant [14]. Des études antérieures ont montré que l'utilisation de NPs magnétiques comme générateurs de chaleur peut induire une mort cellulaire localisée [15]. S'inspirant de ces découvertes, les chercheurs ont cherché à combiner la chimiothérapie et la thérapie thermique afin de parvenir à un traitement efficace du cancer [16]. L'association de propriétés magnétiques dans des micro- ou nanoparticules présente plusieurs intérêts dans le domaine de la vectorisation. Les propriétés magnétiques de ces matériaux confèrent aux vecteurs une fonctionnalité qui ouvre des

perspectives vers de nouvelles applications thérapeutiques originales, comme le ciblage par guidage magnétique et la magnétocytolyse induite par hyperthermie, et diagnostics, comme le contraste en imagerie par résonance magnétique (IRM).

Les objectifs de ces travaux de thèse ont consisté à développer et étudier de nouvelles nanoparticules biocompatibles de taille nanométrique destinées à être administrées par injection intraveineuse, et ayant pour vocation de véhiculer des agents thérapeutiques et/ou diagnostiques. Ces travaux de recherche proposent deux nouveaux nanosystèmes hybrides magnétiques polymériques pour des thérapies innovantes pour lutter contre le cancer; chacun de ces systèmes présente une particularité intéressante:

➤ La première approche originale proposée dans cette étude était de développer un système hybride innovant utilisant des nanocapsules (NCs) basés sur un polymère naturel [chitosane (CS)] et un polymère synthétique [poly (N-vinyl pyrrolidone-anhydride alt-itaconique) (poly (NVPAl))] contenant à la fois des NPs magnétiques d'oxyde de fer et un médicament modèle antitumoral (5-fluorouracile), afin d'améliorer l'efficacité du traitement antitumoral. Rata et al., [2] ont déjà obtenu avec succès des NCs non magnétiques à base de chitosane et de poly (NVPAl) par condensation interfaciale. L'originalité de ce système repose sur le fait que le copolymère synthétique forme la couche extérieure de la membrane polymérique des NCs. L'encapsulation des NPs magnétiques dans les NCs polymériques peut avoir deux effets bénéfiques: d'une part, les NCs hybrides obtenus peuvent être dirigés notamment à l'aide d'un champ magnétique externe vers la cible et, d'autre part, l'application d'un champ magnétique externe alternatif peut conduire à une augmentation de la température dans les cellules tumorales induisant un effet hyperthermique qui détruira les cellules tumorales.

➤ La deuxième approche est de proposer le développement d'un nanosystème hybride magnétique sous forme de nanosphères magnétiques à base de chitosane contenant le 5-Fluorouracile, un système biocompatible destiné à l'administration intraveineuse et permettant la libération contrôlée de médicament. Ce système peut être utilisé pour les mêmes applications que le premier système de nanocapsules magnétiques. L'originalité de ce travail est le procédé d'obtention des nanosphères magnétiques à base de chitosane. La technique utilisée est la double réticulation (ionique et covalente) en émulsion inverse qui assure la stabilité mécanique du support polymère.

Le chitosane est un polysaccharide linéaire d'unités N-acétyl glucosamine et glucosamine distribuées de manière aléatoire, il reçoit actuellement un grand intérêt pour leurs

applications dans le domaine médical et pharmaceutique en raison de leurs propriétés intéressantes comme, de biodégradation contrôlable, une biocompatibilité, une hydrophilie, une non-toxicité, une non-antigénicité et une activité antimicrobienne [17 - 20]. Le CS a une réactivité élevée et peut être facilement fonctionnalisé en raison de ses groupes hydroxyle et amine trouvés en grand nombre au long de sa chaîne, qui permet la réaction avec différents agents de réticulation [21]. De plus, il a été largement utilisé pour l'administration de médicaments et les applications d'ingénierie tissulaire [22]. Comparés aux polymères naturels, les polymères synthétiques ont une grande pureté, une bonne reproductibilité et peuvent être assurés un long temps de libération de l'agent thérapeutique [23]. Dans la présente étude, un copolymère alterné d'anhydride itaconique avec de la N-vinyl pyrrolidone a été utilisé comme copolymère synthétique utilisé pour la synthèse des NCs magnétiques. Ce copolymère se caractérise par une réactivité élevée dans des conditions douces de températures grâce au cycle anhydride qui s'ouvre facilement sous l'action d'agents nucléophiles, comme le groupement amine du chitosane, sans la présence de catalyseurs supplémentaires.

Les nanoparticules hybrides magnétiques (NCs et NSs) préparées ont été chargées de 5-fluorouracile, ce dernier est une molécule modèle sélectionnée dans le cadre de ce projet de thèse pour leur intéressante propriété anti-tumorale, un médicament anticancéreux à large spectre utilisé depuis environ 40 ans pour traiter le cancer du sein, les cancers de la tête et du cou, le cancer de l'estomac, le cancer du côlon et certains cancers de la peau [24].

La thèse de doctorat intitulée “*Micro et nanoparticules magnétiques à base de polysaccharides pour le transport à cible des médicaments antitumorales*” se compose de deux parties : la partie bibliographique et la partie expérimentale, ils sont architecturés en 5 chapitres, dont les deux premiers chapitres (I et II) présentent un large éventail sur la recherche bibliographique, tandis que les autres chapitres (III, IV et V) présentent les différents résultats expérimentaux de notre travail.

La partie théorique débute par un chapitre de revue de la littérature illustrant d'une part la problématique du cancer et les principales thérapies utilisées actuellement et d'autre part quelques généralités sur les systèmes de vectorisation, systèmes polymère–médicament à libération contrôlée leur classification et leur mécanisme. La dernière partie de ce chapitre est consacrée à la description des polymères utilisés au cours de ce travail.

A la suite de ce chapitre introductif, nous présentons dans le *Chapitre II* des généralités sur les systèmes nanoparticulaires : leurs importances, leurs classifications ainsi que leur application dans le domaine médicale. Notre intérêt se portera particulièrement sur

les nanoparticules polymères (nanosphères et nanocapsules) et sur les nanoparticules magnétiques. Ce chapitre se focalise aussi sur les nanosystèmes de polymère magnétique.

Chapitre III décrit le matériel, les réactifs, et les méthodes de synthèses des différents types de nanoparticules. Les protocoles expérimentaux les techniques de caractérisation physico-chimique et biologique des nanomatériaux utilisées lors de cette thèse sont présentés dans ce chapitre.

Les Chapitres IV rassemble les principaux résultats expérimentaux de : synthèse et caractérisation (structurale, morphologique, gonflement dans les milieux aqueux, capacité de chargement et de libération des principes actifs) des nanocapsules magnétiques à base de poly (N vinylpyrrolidone -*alt*- anhydride itaconique) et de chitosane.

Chapitre V rapporte les résultats originaux obtenus dans la préparation de nanosphères magnétiques à base de de chitosane par la méthode de double réticulation en émulsion inverse et leurs interprétations.

Enfin, ce manuscrit se clôture par une conclusion générale et par l'énumération de quelques perspectives.

Références bibliographiques

- [1] Dellali K. Z.; Rata D. M.; Popa M.; Djennad M.; Ouagued A.; & Gherghel D. Antitumoral Drug: Loaded Hybrid Nanocapsules Based on Chitosan with Potential Effects in Breast Cancer Therapy. *International Journal of Molecular Sciences* **2020**, *21*, 5659.
- [2] Rata D.M.; Chailan J.F.; Peptu C.A.; Costuleanu M.; Popa M. Chitosan: poly(N-vinylpyrrolidone-alt-itaconic anhydride) nanocapsules—a promising alternative for the lung cancer treatment. *Journal of Nanoparticle Research* **2015**, *17*, 316–327.
- [3] Kalantarian P.; Najafabadi A.R.; Haririan I.; Vatanara A.; Yamini Y.; Darabi M.; Gilani K. Preparation of 5-fluorouracil nanoparticles by supercritical antisolvents for pulmonary delivery. *International Journal of Nanomedicine* **2010**, *5*, 763–770.
- [4] Rață D.M.; Cadinoiu A. N.; Atanase L.I.; Bacaita S.E.; Mihalache C.; Daraba O.M.; Gherghel D.; Popa M. “In vitro” behaviour of aptamer-functionalized polymeric nanocapsules loaded with 5-fluorouracil for targeted therapy. *Materials Science and Engineering: C* **2019**, *103* 109828.
- [5] Cadinoiu A.N.; Rata D.M.; Atanase L.I.; Daraba O.M.; Gherghel D.; Vochita G.; Popa M. Aptamer-Functionalized Liposomes as a Potential Treatment for Basal Cell Carcinoma. *Polymers* **2019**, *11*, 1515.
- [6] Jain K.K. Advances in the field of nanooncology. *BMC Medicine* **2010**, *8*, 83
- [7] Ambekar R.S.; Choudhary M.; Kandasubramanian B. Recent Advances in Dendrimer-based Nanoplatfom for Cancer Treatment: A Review. *European Polymer Journal*, **2020**, *126*, 109546.
- [8] Daraba, O.M.; Cadinoiu, A.N.; Rata, D.M.; Atanase, L.I.; Vochita, G. Antitumoral Drug-Loaded Biocompatible Polymeric Nanoparticles Obtained by Non-Aqueous Emulsion Polymerization. *Polymers* **2020**, *12*, 1018.
- [9] Babu A.; Templeton A.K.; Munshi A.; Ramesh R. Nanoparticle-Based Drug Delivery for Therapy of Lung Cancer: Progress and Challenges. *Journal of Nanomaterials* **2013**, 1-11.
- [10] Lin M.M.; Kang Y.J.; Sohn Y.; Kim D.K. Dual targeting strategy of magnetic nanoparticle-loaded and RGD peptide-activated stimuli-sensitive polymeric micelles for delivery of paclitaxel. *Journal of Nanomaterials* **2015**, *17*, 248.
- [11] Zhang M.; Yuan P.; Zhou N.; Su Y.; Shao M.; Chi C. pH-Sensitive N-doped carbon dots–heparin and doxorubicin drug delivery system: preparation and anticancer research. *RSC Advances* **2017**, *7*, 9347-9356.
- [12] Zhang Y.; Zhang Q.; Zhang A.; Pan S.; Cheng J.; Zhi X.; Ding X.; Hong L.; Zi M.; Cui D.; He J. Multifunctional co-loaded magnetic nanocapsules for enhancing targeted MR imaging and in vivo photodynamic therapy. *Nanomedicine-Nanotechnology Biology and Medicine* **2019**, *21*, 102047.
- [13] Elumalai R.; Patil S.; Maliyakkal N.; Rangarajan A.; Kondaiah P.; Raichur A.M. Protamine-carboxymethyl cellulose magnetic nanocapsules for enhanced delivery of anticancer drugs against drug resistant cancers. *Nanomedicine* **2015**, *11*, 969-981.
- [14] Wu S.; Liu X.; He J.; Wang H.; Luo Y.; Gong W.; Li Y.; Huang Y.; Zhong L.; Zhao Y. A Dual Targeting Magnetic Nanoparticle for Human Cancer Detection. *Nanoscale Research Letters* **2019**, *14*, 228.
- [15] Goya G.F.; Grazú V.; Ibarra M.R. Magnetic Nanoparticles for Cancer Therapy. *Current Nanoscience* **2008**, *4*, 11-16.
- [16] Zhao C.; Song X.; Jin W.; Wu F.; Zhang Q.; Zhang M.; Zhou N.; Shen J. Image-guided cancer therapy using aptamer-functionalized cross-linked magnetic-responsive Fe₃O₄@carbon nanoparticles. *Analytica Chimica Acta* **2019**, *1056*, 108-116.

- [17] Aguilar A.; Zein N.; Harmouch E.; Hafdi B.; Bornert F.; Offner D.; Clauss F.; Fioretti F.; Huck O.; Benkirane-Jessel N.; et al. Application of Chitosan in Bone and Dental Engineering. *Molecules* **2019**, *24*, 3009.
- [18] Hossain M. R.; Mallik A. K.; & Rahman M. M. Fundamentals of chitosan for biomedical applications. *Handbook of Chitin and Chitosan*. **2020**, 199–230.
- [19] Islam S.; Bhuiyan M.A.R.; Islam M.N. Chitin and Chitosan: Structure, Properties and Applications in Biomedical Engineering. *J. Polym. Environ.* **2017**, *25*, 854–866.
- [20] Zhao D.; Yu, S.; Sun B.; Gao S.; Guo S.; & Zhao K. Biomedical Applications of Chitosan and Its Derivative Nanoparticles. *Polymers*. **2018** , *10*(4), 462.
- [21] Dellali M.; Iurciuc (Tincu) C.E.; Savin C.L.; Spahis N.; Djennad M.; Popa M. Hydrogel Films Based on Chitosan and Oxidized Carboxymethylcellulose Optimized for the Controlled Release of Curcumin with Applications in Treating Dermatological Conditions. *Molecules* **2021**, *26*, 2185.
- [22] Mohan N.; Mohanan PV.; Sabareeswaran A.; Nair P. Chitosan-hyaluronic acid hydrogel for cartilage repair. *International Journal of Biological Macromolecules* **2017**, *104*, 1936-1945.
- [23] Rață D.M.; Popa M.; Chailan J. F.; Zamfir C.L.; Peptu C. A. Biomaterial properties evaluation of poly(vinyl acetate-alt-maleic anhydride)/chitosan nanocapsules. *Journal of Nanoparticle Research* **2014**, *16*, 2569.
- [24] Balaita L.; Cadinoiu A.N.; Postolachea P.; Safarikovab M.; Popa M. Magnetic polymer particles prepared by double crosslinking in reverse emulsion with potential biomedical applications. *Journal of Optoelectronics and Advanced Materials* **2015**, *17*, 1198-1209.

Partie

bibliographique

Chapitre I

I.1. Introduction

De nombreuses maladies subies par l'homme ont été étudiées pour être combattues. La plupart de ces pathologies sont traitées grâce à l'utilisation de médicaments. Certains de ces médicaments sont des composés chimiques alors que d'autres sont des produits biologiques. Malheureusement, la plupart de ces médicaments peuvent conduire à des effets secondaires indésirables. Face à ces constatations, la recherche s'est orientée vers une autre stratégie : la vectorisation des agents anticancéreux usuels, déjà bien connus, mais non spécifiques. Par conséquent l'adressage ciblé de molécules thérapeutiques vers un site d'action spécifique (un tissu ou une cellule malade) constitue actuellement un défi majeur pour le traitement de maladies cancéreuses et infectieuses [1]. L'élaboration des systèmes complexes de libération nécessitent l'utilisation de matériaux avec des propriétés favorables au contact avec le tissu humain. De nombreuses études dans le domaine montrent l'importance et l'utilité des polymères, mettant en évidence leurs propriétés de biocompatibilité et d'antigénicité, qui font des composés macromoléculaires des candidats idéaux à l'élaboration des matrices pour l'inclusion et la libération des médicaments.

Dans ce chapitre théorique, nous commencerons par une brève introduction sur le cancer, puis, nous présenterons des notions fondamentales sur les systèmes de vectorisation des médicaments, leurs caractéristiques et leurs avantages. Ensuite, nous mentionnerons « Systèmes polymère–médicament à libération contrôlée de médicament » et nous terminerons ce chapitre avec la présentation des polymères les plus fréquemment utilisés.

I.2. Généralités sur le Cancer

I.2.1. Définition

Le cancer est une pathologie dégénérative caractérisée par la prolifération incontrôlable et anarchique de certaines cellules. Sous l'effet de facteurs carcinogènes (virus, irradiation, tabac, polluant, exposition intensive au soleil...), la cellule va voir son capital génétique modifié et perdre certaines de ses caractéristiques, notamment sa capacité d'apoptose, elle tend alors à être « immortelle ». Les cellules cancéreuses se reproduisent à l'infini, la masse tumorale devient de plus en plus importante et au-delà d'une certaine taille, la tumeur va créer son propre réseau vasculaire qui lui permettra de se ravitailler de manière active. Autrement dit, les cellules prolifèrent d'abord localement, puis dans le tissu avoisinant, puis à distance où elles forment des métastases. Le mot cancer ne désigne pas une mais tout un groupe de maladies qui peuvent être très différentes les unes des autres. Il existe plus de

200 types de cancers; chaque type a ses propres caractéristiques [2]; leur point commun étant une prolifération rapide de cellules anormales. À l'origine de près de 10 millions de décès en 2020, le cancer est une des principales causes de mortalité dans le monde [3].

La majorité des cancers se développent sous la forme de tumeurs solides constituées de deux parties distinctes : a) les cellules tumorales ou cellules prolifératives anormales et b) un tissu de soutien non-tumoral, appelé stroma, qui assure les apports nutritifs [4]. Ce dernier comprend le tissu conjonctif, les vaisseaux, les leucocytes et la matrice extracellulaire dans laquelle se situe la vascularisation de la tumeur (Figure I.1).

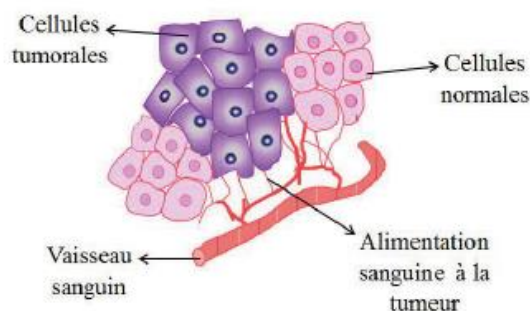


Figure I.1 : Structure simplifiée d'une tumeur cancéreuse.

Un effort important de recherche et développement de la part des milieux académiques et industriels est consacré au diagnostic et au traitement du cancer. Les équipes médicales disposent actuellement de plusieurs types de traitements pour lutter contre le cancer.

I.2.2. Les traitements anticancéreux

Différents traitements ont été développés pour chaque type de cancers, dans le but de déclencher la destruction des cellules cancéreuses et l'arrêt de leur prolifération incontrôlée. Les principales méthodes thérapeutiques sont les suivantes :

- **La chirurgie :** Les actes de chirurgie ont pour objectif l'ablation définitive de la tumeur et de ses extensions ainsi que celle des ganglions affectés. Elle impose souvent d'enlever également une partie du tissu sain ce qui rend cette technique assez dévastatrice. La chirurgie est utilisée dans environ 80 % des cas dans un but diagnostic, curatif, palliatif ou de réparation. Cependant, c'est une technique lourde pour le patient, mais qui s'avère souvent utile pour les petites tumeurs localisées. Lors de cancers métastasés, les médecins feront néanmoins appel à d'autres techniques.

- **La radiothérapie :** Elle consiste à exposer une zone tumorale à des radiations de haute énergie afin de détruire les cellules cancéreuses. Les radiations utilisées sont des rayons X, des rayons gamma ou des particules ionisées (protons). Elles sont souvent produites grâce à des accélérateurs de particules ou des sources radioactives. C'est une technique plus ciblée que la chirurgie et moins destructrice des cellules saines voisines.

- **La chimiothérapie :** Les traitements anticancéreux les plus fréquemment utilisés aujourd'hui sont des chimiothérapies. En effet, c'est une thérapie qui consiste en l'administration de substances chimiques (toxiques) qui vont réduire la croissance des cellules tumorales (blocage de la prolifération des cellules cancéreuses) ou induire leur destruction. Dans le cas d'un cancer métastatique, les traitements locaux comme la radiothérapie ou la chirurgie ne sont plus adaptés, seule la chimiothérapie est capable d'atteindre toutes les cellules malignes et d'assurer leur destruction. Mais les cellules saines environnantes subissent aussi des dommages, à l'origine des effets secondaires.

Pour améliorer l'efficacité du traitement, les thérapies traditionnelles (la chirurgie, la radiothérapie, la chimiothérapie) sont de plus en plus souvent associées à de nouvelles thérapies prescrites en fonction des caractéristiques moléculaires de la tumeur: thérapies ciblées, immunothérapie, hormonothérapie, photothérapie dynamique (PDT), thermothérapie (PTT)...etc

- **Les thérapies ciblées :** Depuis plusieurs années, une nouvelle classe de médicaments est utilisée souvent en association aux chimiothérapies classiques [5]. On parle de traitements cibles puisque contrairement aux chimiothérapies classiques qui limitent la multiplication des cellules, ces thérapies ciblées visent les mécanismes de la cancérisation des cellules. Par conséquent, les effets secondaires sur les cellules saines sont diminués, comme espoir l'obtention d'une meilleure efficacité associée à une toxicité plus limitée. En comparaison aux chimiothérapies classiques, les thérapies ciblées sont bien tolérées par les patients. Une hypertension artérielle modérée peut être fréquente chez les patients et dans quelques cas des problèmes plus importants au niveau sanguin peuvent survenir du fait de l'utilisation des anti-angiogéniques.

Malgré la grande gamme de médicaments disponibles, l'efficacité de la plupart des agents anticancéreux utilisés en chimiothérapie est limitée par leur manque de spécificité. Suite à une administration parentérale [6,7], ces anticancéreux se distribuent en effet dans

l'organisme sans aucune différenciation entre tissus sains et pathologiques, ce qui peut entraîner une toxicité importante et des effets secondaires.

I.2.3. Les effets secondaires

Plusieurs agents anticancéreux sont souvent associés pour obtenir une synergie des effets thérapeutiques. Malheureusement l'administration de toute molécule anticancéreuse s'accompagne de l'apparition d'effets secondaires chez les patients. En effet, certaines cellules cancéreuses peuvent être d'emblée résistantes lors de l'administration des premières cures de chimiothérapie comme dans le cas du mélanome, du cancer du rein et de nombreux sarcomes, ou bien, elles peuvent être chimiosensibles au début du traitement, mais développent par la suite des capacités de résistance au cours de ce traitement. Par exemple le cas des agents alkylants qui provoquent des cancers hématologiques secondaires, qui apparaissent quelques années après le traitement [8]. Les effets peuvent également résulter d'une perturbation de l'homéostasie induite par l'administration de la molécule active, autrement dit être induits indirectement. Ainsi les nausées et vomissements, associés à quasiment tous les traitements chimiothérapeutiques et surgissant chez 70 à 80% des patients, sont liés à de multiples causes (infections, déséquilibre des taux plasmatiques en sels, atteinte de certains centres nerveux centraux, etc). Les effets secondaires les plus courants associés à la chimiothérapie concernent des perturbations du fonctionnement du tractus gastro-intestinal [9] et de celui de l'hématopoïèse [10]. Parmi tous les effets recensés, certains peuvent mettre la vie du patient en danger, en particulier parmi les effets hématologiques et cardiaques [11] ; d'autres se manifestent après l'arrêt du traitement. Les effets indésirables graves induits par les médicaments chimiothérapeutiques sur les tissus et organes sains sont les principales raisons du taux de mortalité élevé des patients cancéreux [12].

Le tableau I.1 présente les anticancéreux les plus couramment utilisés et leurs effets secondaires. Par ailleurs, plusieurs anticancéreux puissants présentent une faible solubilité en milieu aqueux, sont susceptibles de se dégrader en milieu physiologique ou sont éliminés du corps humain avant même d'atteindre l'organe ou le tissu ciblé. Il faut alors en administrer des doses importantes ou diminuer l'intervalle entre deux injections pour obtenir une action thérapeutique appropriée, ce qui augmente encore le risque d'effets indésirables.

Tableau I.1 : Exemples des agents anticancéreux couramment utilisés en chimiothérapie et leurs effets secondaires (d'après Estanqueiro M. et al. [13]).

Médicament	Contraintes pratiques et/ou effets secondaires
Camptothécine	Risque d'anémie, d'alopécie, de nausées, de vomissements, de fatigue, de diarrhée et d'éruptions
Doxorubicine	Effets toxiques sur les cellules à croissance rapide comme celles qui tapissent la bouche et l'intérieur des intestins et sur la moelle osseuse. Affections du cœur et du foie pour des administrations à très forte dose.
Cisplatine	Dose maximale tolérée limitée par néphrotoxicité (mauvais fonctionnement des reins). Risque de problèmes gastro-intestinaux ou visuels.
5-Fluorouracile	Effets toxiques sur la moelle osseuse, le foie, les tissus cardiaques et le tube digestif.
Paclitaxel	Réactions d'hypersensibilité sévères, de néphrotoxicité et neurotoxicité.

A l'heure actuelle, le challenge de la recherche contre le cancer est de pouvoir élaborer des agents anticancéreux capables de lutter contre les phénomènes de résistance tout en entraînant le moins d'effets secondaires possibles. Afin d'épargner la destruction des cellules saines, il faut cibler plus spécifiquement les cellules cancéreuses et développer des médicaments présentant une meilleure sélectivité. La vectorisation des médicaments constitue une voie prometteuse permettant de pallier à ces problèmes [14].

I.3. Système de vectorisation

I.3.1. Historique

L'origine de la vectorisation des principes actifs remonte au milieu des années soixante où un grand nombre de chercheurs ont travaillé pour concevoir les premiers conjugués polymère synthétique-principe actif. Judah Folkman (université d'Harvard), en faisant circuler le sang d'un lapin à travers un tube préalablement exposé à un anesthésiant, provoqua l'endormissement du lapin [15]. Il a constaté donc que le tube pouvait jouer le rôle d'un "réservoir" qui peut permettre de libérer la drogue. Cette notion de réservoir n'est que la première étape nécessaire pour développer des nanovecteur d'agents anticancéreux qui ciblent les tumeurs solides. Une fois la drogue chargée, les nano-vecteurs doivent la transporter à travers la circulation sanguine, atteindre la tumeur et dans les meilleurs des cas, pénétrer les

cellules tumorales et libérer la drogue une fois à l'intérieure [16]. Trois dimensions ont été utilisées pour la vectorisation entre 1970 et 1980, macros puis micros et enfin nanos-objets [16]. Parmi les "macro" vecteurs commercialisés, on trouve le Vaginal Ring® (contenant un contraceptif déposé dans le col de l'utérus) et Ocusert® (contenant la pilocarpine contre le glaucome déposé sur la rétine).

I.3.2. Concept général de la vectorisation des principes actifs

La vectorisation est un ensemble d'approches permettant de transporter une molécule biologiquement active (entité chimique, peptide, protéine, acide nucléique, etc.) en quantité suffisante de son lieu d'administration jusqu'à sa cible thérapeutique (association de système de transport avec des principes actifs). Dans ce cas, les principes actifs sont encapsulés et protégés par un vecteur, puis délivrés de façon contrôlée sur un laps de temps optimal, ce qui conduit à une augmentation de leur efficacité après injection. En conséquence, les concentrations et fréquences d'injection peuvent être diminuées permettant ainsi une meilleure tolérance vis à vis du traitement. Cet adressage peut se faire de manière spécifique ou non, au moyen d'un vecteur hydrophile ou hydrophobe n'exerçant aucune action thérapeutique. Le vecteur permet au principe actif de franchir les barrières biologiques. Ces barrières sont des systèmes très complexes faisant intervenir plusieurs éléments (épithélium, endothélium, membrane cellulaire) et plusieurs composantes (barrières mécaniques ou physico-chimiques et barrières enzymatiques). Ce sont les propriétés du vecteur et non celles du principe actif qui détermineront le sort du système *in vivo* [17].

Actuellement la vectorisation est en plein développement, elle fait partie des nouvelles stratégies de prévention et du traitement de différentes maladies, en particulier le cancer [18]. En effet, la grande majorité de nouveaux principes actifs a des propriétés pharmacocinétiques médiocres avec des caractéristiques physico-chimiques peu favorables au passage des nombreuses barrières dans l'organisme et sont souvent toxiques [19].

Depuis l'énoncé de la théorie du « *Magic Bullet* » [20] par l'immunologue allemand Paul Ehrlich (Prix Nobel 1908), la vectorisation se présente comme l'une des avancées scientifiques majeure et prometteuse dans le domaine des nanotechnologies appliquées à la médecine. En effet, de nombreux vecteurs ont été élaborés, on cite à titre d'exemples, les vecteurs viraux appliqués en thérapie génique. On note également un certain nombre de formulations pour la thérapie anticancéreuse, approuvé par la Food and Drugs Administration (FDA) comme médicaments pour les traitements cliniques :

✓ Doxil®, une formulation nanoparticulaire de liposome encapsulant la doxorubicine pour le traitement du sarcome de Kaposi, puis des cancers du sein et de l'ovaire [21].

✓ Abraxane®, une formulation nanoparticulaire d'albumine couplée au paclitaxel, pour le cancer du sein métastatique [22, 23].

La vectorisation permet de diminuer les effets secondaires ; par exemple, dans le cas du Doxil®, la vectorisation de la doxorubicine sous forme liposome a permis de modifier le volume de distribution de la molécule, le réduisant drastiquement (4 L au lieu de 254 L) [24].

I.3.3. Caractéristiques principales des systèmes de vectorisation

I.3.3.1. Le vecteur

Dans un système de vectorisation, le vecteur est l'élément clé. C'est un objet conçu pour transporter une grande quantité de principes actifs tout en les protégeant et en limitant son activité pendant le trajet vers les zones ciblées. Pour être efficace et utilisable en clinique, le vecteur idéal doit présenter certaines caractéristiques [25, 26]:

- Sa composition doit faire intervenir des composés relativement stables en milieu physiologique, non toxiques pour l'organisme, biocompatibles et biodégradables, de manière à faciliter leur élimination ultérieure;
- Sa taille doit permettre à la fois le transport d'une quantité suffisante de principe actif et sa diffusion à travers certaines barrières physiologiques (barrière de l'endothélium, barrière hémato-encéphalique, organe, tissu, cellule, noyau cellulaire, etc.) pour atteindre la cible;
- Il doit garder le principe encapsulé de façon stable et active, posséder une grande spécificité vis-à-vis des cellules ciblées et rester le plus longtemps possible dans la circulation sanguine pour pouvoir atteindre sa cible;
- Le vecteur doit être suffisamment stable face à toutes les dégradations et interactions avec les biomolécules pendant son transport (notamment les protéines plasmatiques dans le cas d'une administration intraveineuse) et éviter les interactions en dehors de la zone visée;
- Une fois arrivé au niveau de la zone à traiter, il doit délivrer le médicament à proximité ou à l'intérieur des cellules ciblées. Ce processus de libération contrôlée est envisageable grâce aux propriétés de composés associés au vecteur (rupture

enzymatique, liaison réversible, sensibilité à une variation du milieu comme le pH, la température, la force ionique, l'état d'oxydo-réduction);

- Enfin, il doit résister à la stérilisation et être aisément stocké et administré.

I.3.3.2. Le principe actif

Le principe actif encapsulé dans le vecteur est un élément tout aussi important dans le système de vectorisation. Il peut être de différente nature selon le type de thérapie envisagée : s'il s'agit d'un gène (ADN, ARN, siARN...), on parlera de thérapie génique (*Gene Delivery System*). Le gène sera généralement complexé par interactions électrostatiques avec le vecteur bien qu'il puisse être attaché ou encore encapsulé. Si au contraire, nous souhaitons véhiculer un principe actif (peptide, protéine, molécule anticancéreuse...), nous serons alors dans le domaine de la libération contrôlée de médicaments (*Drug Delivery System* : DDS). Dans ce cas, la molécule biologiquement active pourra être complexée, encapsulée ou bien liée de manière covalente par des liaisons facilement clivables.

La réussite des systèmes de vectorisation de médicaments nécessite une collaboration étroite entre plusieurs spécialistes de domaines différents qui sont les chimistes, les galénistes, les physiologues et les pharmacologues [27].

I.3.4. Avantages de la vectorisation de médicaments

La vectorisation de principes actifs est devenue une science très demandée car les systèmes à libérations contrôlées comportent plusieurs avantages comparativement aux systèmes classiques [28, 29]. Les principaux points à retenir sont les suivants :

A. Protection de la molécule encapsulée

Beaucoup de molécules biologiquement actives sont physico-chimiquement et/ou biochimiquement instables dans l'environnement biologique (pH, enzymes, protéines). Leur encapsulation dans des vecteurs assure une protection contre l'inactivation chimique, enzymatique ou immunologique, par conséquent améliore sa stabilité *in vivo*. Ainsi, les caractéristiques pharmacocinétiques du médicament sont optimisées. Ce type de vecteurs est particulièrement intéressant pour la vectorisation des principes actifs de faibles durées de vie *in vivo*.

B. Réduction des effets toxiques potentiels du médicament.

De nombreuses thérapies par voie intraveineuse, en particulier le traitement du cancer, utilisent des molécules toxiques. Pour assurer l'efficacité thérapeutique d'un principe actif, il est néanmoins nécessaire d'injecter une quantité importante de médicament et/ou de répéter l'injection pour obtenir l'efficacité souhaitée, ce qui peut provoquer des effets indésirables liés à la toxicité de la molécule. La libération progressive permet une diminution du nombre d'injections, améliore le confort du patient et assure une concentration optimale du médicament, située au niveau thérapeutique, plus longtemps.

C. Obtention de profils pharmacocinétiques plus favorables.

Augmenter la cinétique de dissolution du principe actif en le présentant sous une forme finement dispersée, et favoriser l'absorption de PA à travers la muqueuse intestinale en contrôlant la libération de celui-ci, ce qui permet de la maintenir dans la zone d'efficacité thérapeutique. Un exemple de cet avantage est illustré schématiquement à la figure I.2 [30,31].

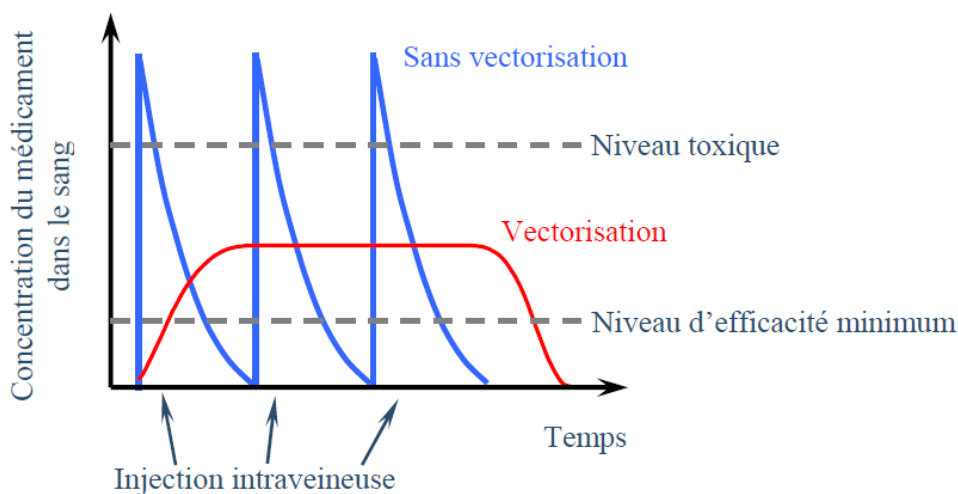


Figure I.2 : Evolution de la concentration plasmatique du principe actif en fonction du temps avec ou sans vectorisation.

En effet, la concentration en médicament doit dépasser le niveau minimum d'efficacité, tout en restant inférieure au niveau toxique. Le contrôle de la vitesse de libération du principe actif encapsulé dans un vecteur particulière peut alors permettre d'assurer une concentration quasi constante, comprise entre ces deux niveaux, pendant une durée bien supérieure à celle obtenue avec une administration classique. Le principe actif encapsulé dans un vecteur pourra être libéré progressivement par dégradation de la particule sous l'effet de

certaines facteurs précis (pH, température, présence de certaines enzymes, magnétisme) ou par diffusion du principe actif. Ceci permet de maintenir la concentration en principe actif dans la fourchette souhaitée.

D. Sélectivité de la libération.

Dans certaines conditions, la vectorisation peut apporter un ciblage du médicament grâce à des ligands à la surface des vecteurs qui sont capables d'interagir avec les récepteurs des cellules ciblées [32]. Ceci permet à la fois de limiter la biodistribution de médicament au sein de l'organisme et de réduire les effets secondaires indésirables au niveau des organes sains. Ainsi, la sélectivité et la spécificité de ces particules vis-à-vis de la cible peuvent permettre d'améliorer l'efficacité du principe actif [27, 33]. Le ciblage des zones à traiter permet également une réduction des effets secondaires des médicaments, tout en augmentant leur efficacité [34].

I.4. Systèmes polymère–médicament pour libération contrôlée de médicament

I.4.1. Notions fondamentales

La recherche dans le domaine des "médicaments du futur" vise à obtenir des systèmes pharmaceutiques, ou des dispositifs d'administration de médicaments, caractérisés par des caractéristiques telles que: libération prolongée de médicaments, libération contrôlée de médicaments dans la quantité et la vitesse souhaitée pour entrer dans l'organisme, le transport de la substance médicinale (vectorisation) vers le lieu d'action pharmacologique, où elle cède en quantité et à la vitesse nécessaires aux processus biologiques ou au traitement de l'état pathologique [35].

L'adressage de molécules d'intérêt thérapeutique vers un tissu cible est un défi majeur à relever dans le domaine de la « *Drug Delivery* ». La plupart des systèmes conventionnels assurent la libération immédiate du médicament, sans avoir à contrôler le taux de libération. Considérons une formulation médicamenteuse conventionnelle de principe actif sous sa forme native. La figure.I.3.A présente les profils de dissolution du principe actif dans le sang en fonction du temps dans le cas d'une administration par voie orale ou intraveineuse. Pour de telles situations, il est difficile de maintenir la concentration nécessaire à la thérapie (dose thérapeutique) sur de longues périodes. Pour atteindre et maintenir des concentrations thérapeutiques efficaces, des doses répétées sont nécessaires, ce qui entraîne des variations importantes des concentrations thérapeutiques, la durée de l'effet thérapeutique dépendant de la fréquence d'administration du médicament et de sa demi-vie ; les possibilités offertes sont

alors soit d'augmenter la concentration administrée (figure.I.3.B) ou de multiplier le nombre d'administrations (figure.I.3.B'). La plupart du temps, ces techniques sont contraignantes pour le patient ; en raison de la présence de ces variations dans les concentrations thérapeutiques du médicament, le niveau de médicament peut tomber en dessous de la concentration efficace minimale (entre deux doses successives) ou dépasser la concentration minimale toxique, entraînant ainsi l'apparition d'effets secondaires indésirables ou l'absence de l'effet thérapeutique souhaité chez le patient [36,37]. De plus l'action thérapeutique est non ciblée et s'adresse aussi bien aux zones lésées qu'aux tissus sains.

Afin de pallier aux limites des formulations conventionnelles, le vingtième siècle a vu naître un intérêt grandissant pour le développement de système à relargage contrôlé. Parmi ceux-ci, on peut citer les systèmes à relargage prolongé de principe actif (*sustained release delivery*) qui parviennent à maintenir sur un laps de temps contrôlé une concentration thérapeutique de principe actif dans le plasma sanguin (figure.I.3.C). Bien que plus confortable pour le patient, ce type de système ne permet toujours pas de cibler l'action du principe actif et, de ce fait, ne limite pas les effets secondaires possibles.

Les efforts de la recherche se tournent alors de plus en plus vers des stratégies de ciblage ou encore « on-site release » thérapie (figure.I.3.D). Le but ici est d'administrer un médicament pouvant vivre suffisamment longtemps dans l'organisme pour atteindre l'organe cible et de contrôler sa délivrance par un stimulus au niveau de la zone lésée. De tels systèmes permettraient alors de maximiser l'efficacité thérapeutique et de minimiser l'attaque de cellules saines situées dans des zones non malades. Ainsi, les efforts de la recherche dans le domaine de la « *Drug Delivery* » se concentrent de plus en plus sur le développement de nano-objets stimuli-sensibles (le pH, le champ magnétique, les ultrasons ou encore la température....).

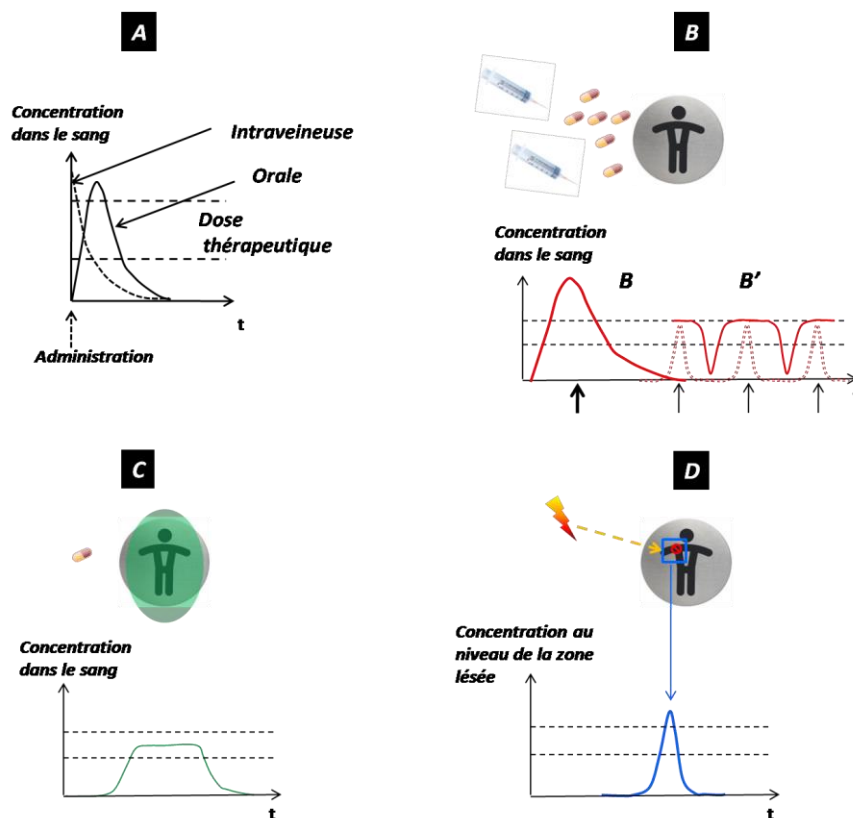


Figure I.3: Profil de relargage de différents systèmes thérapeutiques: **A)** relargage de formulations conventionnelles, **B)** multiplication des doses administrées via des formulations conventionnelles, **C)** systèmes à relargage prolongé dans le temps; **D)** systèmes à relargage ciblé.

Donc; la pharmacothérapie conventionnelle implique généralement l'administration périodique d'un agent thérapeutique qui a été formulé de manière à garantir sa stabilité, son activité et sa biodisponibilité. Par conséquent, le concept de libération contrôlée du médicament a été introduit pour surmonter la limitation de la thérapie conventionnelle et pour maintenir la concentration du médicament dans le sang ou les tissus cibles à une valeur souhaitée aussi longtemps que possible [38]. Ainsi, la libération ciblée de médicaments est l'un des objectifs les plus importants en pharmacologie.

Le profil de libération contrôlée correspondrait au cas du profil idéal recherché (avec une vitesse de libération qui compenserait l'élimination) et présente les avantages suivants :

- la réduction des prises journalières,
- l'accroissement du confort (la compliance) du malade,
- l'amélioration de l'observance du traitement,
- la diminution des effets secondaires indésirables par suppression des pics plasmatiques

Les recherches dans le domaine des systèmes d'administration contrôlée par des médicaments ont principalement porté sur la conception et l'obtention de dispositifs de gestion des principes actifs présentant les propriétés suivantes:

- capacité de libération prolongée de médicaments;
- capacité de libération contrôlée des substances médicamenteuses dans la quantité et la vitesse souhaitées;
- le transport des composés bioactifs sur le site de l'action concernée, suivi de leur libération contrôlée;
- biocompatibilité;
- toxicité réduite, effets secondaires réduits [39,40].

I.4.2. Définitions des systèmes

I.4.2.1. Systèmes à libération contrôlée

La notion de libération contrôlée est apparue dès les années 1930, mais a connu une véritable révolution à partir de 1970. Depuis que les travaux de Langer et Folkman ont démontré au cours des années 1970 l'utilité thérapeutique de la libération contrôlée des médicaments [41], ce concept a eu un impact important dans toutes les branches de la médecine. À cette époque, la Société Alza a introduit le concept de « système thérapeutique » et proposé de nouvelles formes pharmaceutiques. Au cours du temps, la notion s'est précisée : le contrôle (la maîtrise) concerne aujourd'hui non seulement la vitesse, mais aussi le site de la libération du principe actif.

Selon Robinson, ce concept regroupe tout système exerçant un contrôle soit spatial, soit temporel ou bien les deux à la fois sur la libération d'un médicament [42]. L'obtention de systèmes à libération contrôlée est basée sur les principes physico-chimiques et la chimie des polymères qui sont fondamentaux dans les formulations pharmaceutiques ou la production de dispositifs qui contrôlent la pénétration des médicaments dans le corps en fonction du profil médicamenteux souhaité. De manière générale, ces systèmes à libération contrôlée ont une vitesse de libération d'ordre zéro, donc indépendante de la concentration du médicament.

I.4.2.2. Systèmes à libération prolongée

La libération peut être prolongée en retenant le principe actif (PA) au sein d'un système contrôlant sa vitesse de libération. La condition essentielle pour la réalisation d'un système pharmaceutique à action prolongée est liée à l'existence d'un processus de libération

d'une substance biologiquement active à une vitesse plus lente que la vitesse d'absorption dans l'organisme, auquel cas l'étape de libération de la substance active est la vitesse d'absorption. Par conséquent, la formulation d'un système pharmaceutique pour assurer la libération de la substance médicamenteuse à vitesse constante (cinétique d'ordre zéro) se traduira par une absorption à vitesse constante. Une absorption prolongée entraîne des concentrations plasmatiques de médicament prolongées sur une période de temps plus longue, par rapport au cas d'une administration conventionnelle lorsque la concentration du médicament dans le sang augmente rapidement après chaque dose administrée, suivie d'une diminution tout aussi nette. Le PA peut être inclus dans un excipient insoluble dans les liquides de l'organisme qui forme ainsi une matrice à partir de laquelle le PA sera libéré lentement. Cette libération prolongée présente un profil cinétique dit « d'ordre zéro », indépendant du temps et des variables biologiques liées au milieu environnant et est basé sur des phénomènes physiques constants [43, 44].

Le développement de systèmes contrôlés prolongés est devenu, par conséquent, une nécessité évidente de la médecine moderne, du fait que les formes galéniques classiques présentent un certain nombre d'inconvénients. Le but de la libération prolongée est double, il doit permettre :

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

I.4.3. Classification de systèmes à libération contrôlée

Les systèmes à libération contrôlée peuvent être classés selon une série de critères [45]:

➤ **Selon la taille:**

- macro systèmes à libération contrôlée (systèmes de type cuve), auquel cas la libération du principe actif se fait à une vitesse constante "d'ordre zéro";
- micro systèmes à libération contrôlée (systèmes de type matrice), la libération du principe actif est supportée et basée sur des polymères dégradables;
- nano systèmes à libération contrôlée, le médicament est délivré directement à partir du système, la matrice polymère ayant un double rôle: contrôle de la cinétique de libération du composé bioactif et de son transport actif ou passif [46].

➤ **Selon la forme:**

Hydrogels ; Films ; Microparticules, microcapsules ; Nanoparticules, nanocapsules ; Liposomes

➤ **Selon le lieu d'action du principe actif émis:**

- L'ingrédient actif agit sur le lieu de libération
- L'ingrédient actif passe par la circulation générale jusqu'à ce qu'il atteigne le lieu d'action

➤ **Selon le mode d'administration du médicament :**

- Voie orale, voie parentérale, implants, inserts etc.....

➤ **Selon l'interaction entre le médicament et le polymère support :**

- Conjugués polymère-médicament dans lesquelles le médicament est lié chimiquement au support macromoléculaire
- Liaisons physiques entre le médicament et le support (van der Wals, liaisons d'hydrogène etc...)
- Absorption (le médicament est incorporé ou encapsulé)

➤ **Selon la biodégradabilité:**

- Systèmes à libération contrôlée biodégradable (micro / nanoparticules, hydrogels, liposomes)
- Systèmes à libération contrôlée non biodégradable (systèmes implantables)

➤ **Selon le type de vectorisation:**

- Systèmes à libération contrôlée avec vectorisation chimique (sensible au pH)
- Systèmes à libération contrôlée avec vectorisation biochimique (ligands)
- Systèmes à libération contrôlée avec vectorisation thermique (sensible à la chaleur)
- Systèmes à libération contrôlée avec vectorisation magnétique
- Systèmes à libération contrôlée avec vectorisation immunologique

➤ **Selon la manière de stimulation de la libération du médicament :**

- Systèmes pH-sensibles
- Systèmes sensibles à la température (enzymatique, redox etc...)

I.5. Mécanismes généraux de libération de principes actifs

Il existe plusieurs mécanismes fondamentaux qui conduisent à la libération d'un principe actif et qui permettent de contrôler sa vitesse de libération. Les polymères sont généralement utilisés comme systèmes de délivrance de médicament (DDS) car la libération de médicament à partir de ces systèmes est principalement contrôlée par la matrice polymère.

La libération du médicament a lieu à partir des DDS polymères avec différents mécanismes connus sous le nom de méthodes basées sur la diffusion, le gonflement, l'érosion et le stimulus. Plusieurs études ont été menées sur les mécanismes de libération de médicaments dans les nanotransporteurs où la diffusion, la réaction chimique et la libération contrôlée par stimuli sont quelques mécanismes qui peuvent représenter la libération de médicaments dans des nanotransporteurs, comme le montre la figure I.4 [47-49].

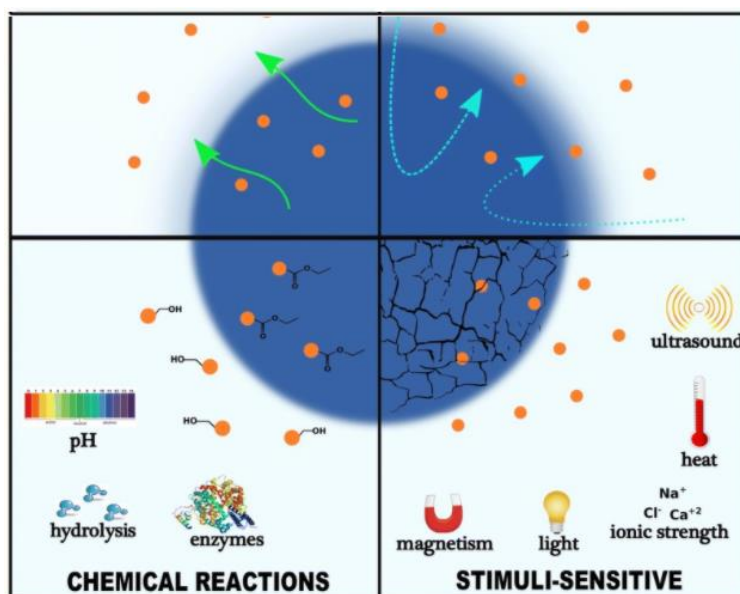


Figure I.4. Mécanismes de libération contrôlée de médicaments utilisant différents types de nanotransporteurs [49].

I.5.1. La diffusion

Le contrôle de la libération par diffusion est le mécanisme le plus répandu parmi les systèmes à libération contrôlée [50]. C'est le processus de libération le plus simple à mettre en œuvre. La force motrice qui détermine la libération est le gradient de concentration entre l'intérieur des vecteurs et le milieu extérieur. Ce phénomène est très sensible à la balance hydrophile / hydrophobe du PA : plus le PA est hydrophile plus sa diffusion sera rapide.

Les systèmes de libération contrôlée par diffusion sont généralement divisés en deux catégories: les réservoirs et les dispositifs matriciels (ou monolithes). Les mécanismes de base de la libération du principe actif de ces deux systèmes sont fondamentalement différents [51].

a) Le système matriciel (monolithique)

Le principe actif est distribué de manière uniforme dans la matrice polymérique pour former un système homogène. Le processus de diffusion commence lorsque le médicament

est libéré de la matrice polymère vers le milieu externe (figure I.5). Dans les systèmes monolithiques, la vitesse de libération dépend de la concentration initiale du médicament dans la matrice polymère. Parce que la libération du principe actif est continue, la vitesse de libération diminue normalement, une fois que la substance active diffuse à l'intérieur du dispositif, elle nécessite donc un temps de diffusion plus long pour la libération [52], [53]. La diminution de la vitesse en fonction du temps s'explique comme suite : Au début, c'est le principe actif proche de la surface qui est libéré avec une courte distance à parcourir pour sortir ; ensuite, c'est le principe actif en profondeur qui prend plus de temps pour sortir à cause d'un plus long trajet tortueux à accomplir à travers la matrice polymère.

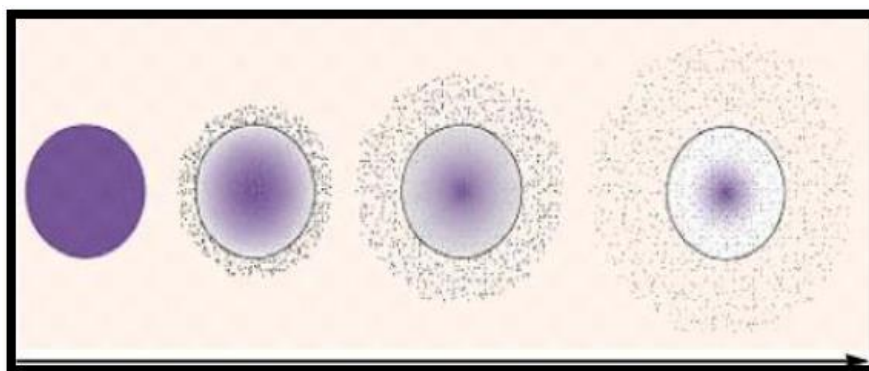


Figure I.5: Libération d'un principe actif à partir d'un système matriciel à libération contrôlée.

La libération du médicament à partir des nanoparticules de chitosane, par exemple, est due soit au gonflement du polymère, soit à la diffusion du médicament à partir de la surface du polymère [54]. Les nanoparticules de chitosane présentent également une libération de médicament dépendant du pH en raison de la solubilité du chitosane [55,56].

b) Le système réservoir (capsule)

Le principe actif situé au centre du système (noyau), entouré d'une membrane polymérique (figure I.6). La diffusion du principe actif s'effectue à travers les chaînes macromoléculaires du polymère quand la membrane est homogène et non poreuse (majorité des cas), ou à travers les pores quand elle est microporeuse. L'épaisseur et la perméabilité de la membrane contrôlent en partie la vitesse de diffusion du principe actif. Ces systèmes ont le grand avantage d'approcher une cinétique de libération d'ordre zéro où la vitesse de diffusion est constante. Ceci s'applique notamment à un système réservoir saturé en principe actif afin

d'obtenir un équilibre en gradient de concentration entre les interfaces interne et externe de la membrane pendant une certaine période [57].

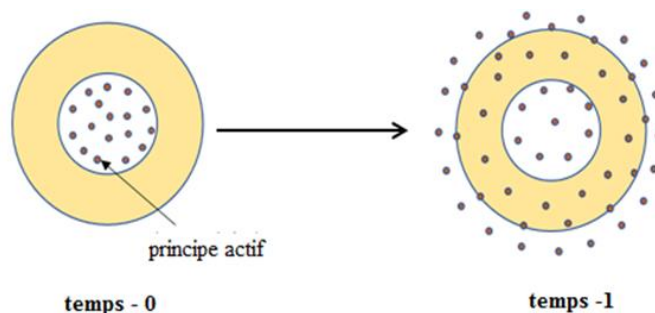


Figure I.6 : Diffusion de principe actif dans un système réservoir.

I.5.2. Systèmes de libération contrôlée par dégradation / érosion

Ce processus est induit par hydrolyse, par dégradation enzymatique ou du clivage de liaisons ou d'interactions entre le polymère et le principe actif, qui entraîne sa diffusion hors du système particulaire. La "dégradation" et l'érosion des polymères sont des facteurs importants pour tous les types de polymères. La dégradation des polymères est la principale voie d'érosion. L'érosion est beaucoup plus complexe que la dégradation, car elle dépend de nombreux autres processus, tels que la dégradation, le gonflement, la dissolution et la diffusion des oligomères et des monomères et les changements morphologiques [58].

Les mécanismes de libérations contrôlées de médicaments à partir d'une matrice polymère, par les méthodes de diffusion, gonflement et érosion sont représentés dans la figure.I.7.

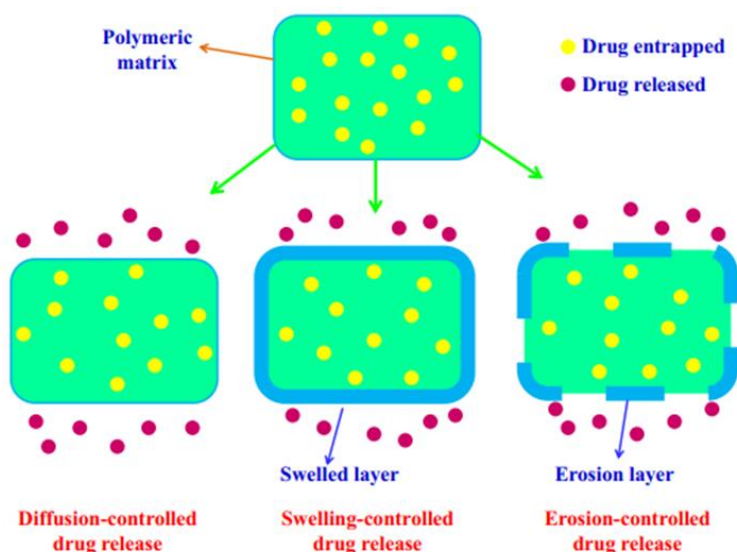


Figure I.7: Mécanismes de libération de médicaments à partir d'une matrice polymère, y compris les méthodes contrôlées par diffusion, gonflement et érosion [59].

I.5.3. Délivrance en réponse à un stimulus

Les études récentes rapportent la mise au point de vecteurs « activables » [60, 61]. Ces systèmes assurent le transport de l'agent bioactif dans l'organisme, et à proximité de la zone affectée, un stimulus permet d'activer l'interaction avec les cellules cibles, ou même de déclencher/d'accélérer la libération de la molécule active.

La précision et l'efficacité des systèmes de libération de molécules (DDS, *Drug Delivery Systems*) peuvent être augmentées si l'on peut déclencher à distance et à volonté la libération des molécules par application d'un stimulus. Dans ce cas, on parle de systèmes de libération de molécules contrôlée à distance (RC-DDS, *Remotely-Controlled Drug Delivery Systems*) [62]. Plusieurs stimuli sont exploités à l'heure actuelle pour améliorer, déclencher et/ou contrôler la libération localisée des principes actifs anticancéreux (Figure I-8). Ces stimuli peuvent être classés en deux grandes catégories :

- ❖ Stimuli physiques ou externes : température, contrainte mécanique, lumière, champs magnétiques et électriques [63- 67] ;
- ❖ Stimuli (bio) chimiques ou internes : température, pH, force ionique, enzymes et potentiel redox [68-70].

L'utilisation de matériaux « intelligents » (polymères ou lipides pH-sensibles) permet de rendre les vecteurs capables de libérer le principe actif qu'ils véhiculent en réponse à un stimulus externe: modification de pH, de température, ou application d'un champ magnétique extracorporel [71]. La Figure I- 8 détaille les mécanismes qui peuvent être impliqués dans la libération de la substance active [70, 72]. Le paragraphe suivant s'attardera sur les systèmes pH-sensibles, le pH étant le stimulus choisi au cours de cette thèse pour favoriser la libération de la SA encapsulée, et puisque les particules obtenues dans ce travail sont magnétiques nous sommes intéressés aux systèmes stimuli-sensibles aux champs magnétique.

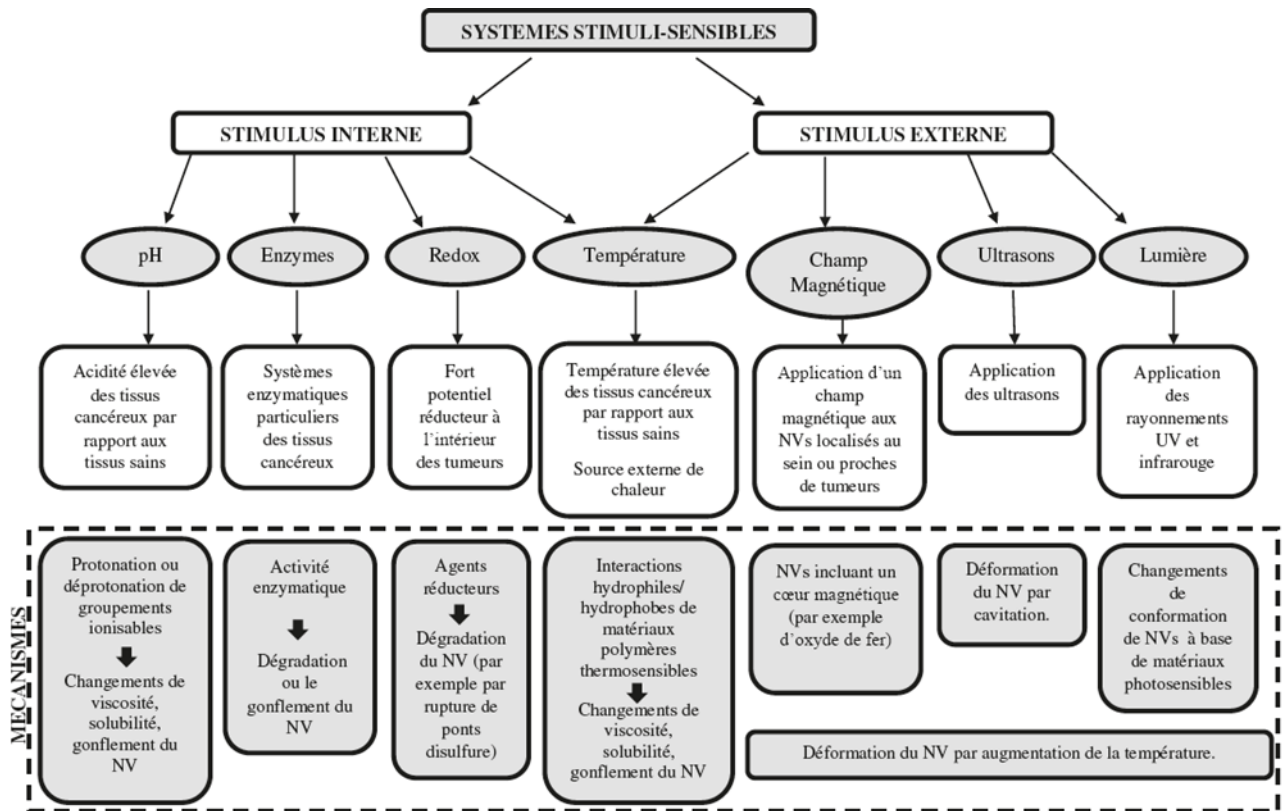


Figure I.8: Systèmes stimuli-sensibles développés pour les thérapies cancéreuses et mécanismes impliqués dans la libération de la SA.

➤ **Les systèmes sensibles à la variation de pH**

Actuellement, le pH est le stimulus le plus étudié pour la conception de vecteurs destinés à la thérapie du cancer. L'environnement extracellulaire d'une tumeur est généralement plus acide (pH variant de 6 à 7) que celui d'un tissu sain (pH = 7,4) [73 - 75]. Des gradients de pH sont également observés au niveau intracellulaire. Ainsi, alors que le cytoplasme des cellules cancéreuses présente un pH proche du pH normal (pH = 7,4), les endosomes et les lysosomes ont un pH beaucoup moins élevé variant de 5 à 6 et de 4 à 5, respectivement [76]. Un vecteur peut être conçu de façon à être stable à pH sanguin et libérer le principe actif en réponse à l'acidification du milieu. Par exemple, l'incorporation de fonctions amine tertiaires ou d'acides carboxyliques dans la structure du polymère permet de conférer au vecteur ce type de sensibilité au pH.

Si $pH > pK_a$, les groupes $-COOH$ se déprotonnent, la formation de charges en surface favorisant l'augmentation de la porosité de la particule [77].

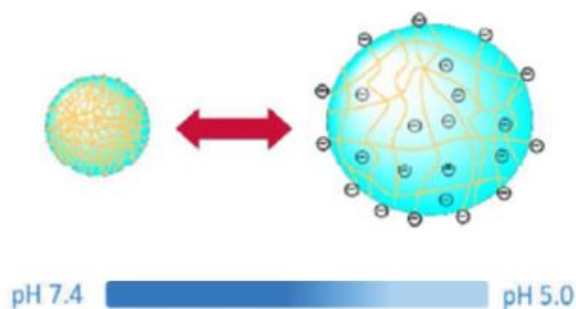


Figure I.9 : Libération d'une SA en milieu acide par gonflage d'un nanovecteur à base de polymère pH-sensible.

➤ Les systèmes thermosensibles

La réponse des matériaux thermosensibles à l'élévation de température induite par des stimuli externes (ultrasons focalisés, champ magnétique, ...) est une stratégie très prometteuse pour la délivrance ciblée de PA.

Les systèmes thermosensibles sont les systèmes les plus étudiés pour la délivrance de médicaments et notamment pour la libération d'agents anticancéreux. L'utilisation de l'hyperthermie locale pour le relargage de médicaments a été proposée pour la première fois par *Yatvin et al.* en 1978 [78]. L'hyperthermie produite par les particules magnétiques sous champ magnétique alternatif est une technique très prometteuse dans la thérapie du cancer [79-81]. Ce concept est basé sur une plus grande sensibilité des cellules tumorales à la chaleur. Ainsi, traiter les régions tumorales à des températures entre 41 °C et 47 °C permet de réduire la viabilité des cellules cancéreuses et d'augmenter leur sensibilité vis-à-vis de la chimiothérapie [82]. Cette élévation de température est due principalement à la dissipation de l'énergie des particules magnétiques induite par l'oscillation des moments magnétiques sous champ alternatif (relaxations de Néel et de Brown). Les particules magnétiques ont la capacité de convertir l'énergie des champs magnétiques hautes fréquences en chaleur. Une caractéristique importante concerne la vitesse d'absorption spécifique de ces champs (SAR pour specific absorption rate). Cette grandeur doit être maximale pour minimiser les doses de NPs magnétiques à accumuler pour produire une élévation de température suffisante. Parmi les nanoparticules thermosensibles les plus utilisées on trouve : les liposomes, les micelles et les poly(Nisopropyl acrylamide)s (PNIPAM). L'augmentation de la température induit le changement structural de ces nanoparticules, c'est ainsi que l'agent actif encapsulé à l'intérieur du nanovecteur est libéré [83]. Des liposomes thermosensibles conjugués à la doxorubicine sont actuellement étudiés en phase II pour le traitement du cancer du sein et les

métastases colorectales, ainsi qu'en phase III pour le traitement du cancer hépatocellulaire [84].

➤ Les systèmes magnéto-sensibles

Les nanoparticules constituées de matériaux magnéto-sensibles permettent d'envisager l'utilisation de systèmes de libération ciblés. En plus d'être détectables par imagerie, sous l'effet d'un champ magnétique, les nanoparticules magnétiques sont capables de se concentrer au niveau de la zone ciblée sous l'action d'un champ magnétique extérieur et d'y libérer l'agent actif. Les nanoparticules de magnétite Fe_3O_4 sont les plus utilisées grâce à leur biocompatibilité et à leurs propriétés magnétiques adaptées à l'application biomédicale [85]. Des chercheurs ont étudié l'encapsulation de nanoparticules d'oxyde de fer et de molécules actives hydrophobes à l'intérieur des micelles. Sous l'application d'un champ magnétique, et par un effet de pression sur la micelle, les nanoparticules d'oxyde de fer permettent la libération des agents actifs [86]. Un médicament à base de nanoparticules d'oxyde de fer et de doxorubicine (MTC-DOX ; MagForce) est entré en phase II d'essais cliniques pour le traitement du cancer du foie et en phase III pour le traitement du carcinome hépatocellulaire avancé. Cependant, même si cette technique présente une option thérapeutique prometteuse, la mise en place de champs magnétiques externes reste complexe. Plusieurs études doivent encore être effectuées afin d'évaluer les meilleures techniques magnétiques appliquées à la délivrance de médicaments dans l'organisme.

1.6. Polymères utilisés pour l'obtention des systèmes de libération de principe actif

Le mot polymère vient du grec « polus » plusieurs, et « meros » partie. Un polymère est formé de macromolécules, organiques ou inorganiques, constituées à leur tour par l'enchaînement répété d'un même motif, le monomère (du grec monos: un seul ou une seule, et meros ; partie), reliés les uns aux autres par des liaisons covalentes. Il se peut former deux sortes de macromolécules: Un homopolymère est un polymère qui comporte des motifs monomères tous identiques. Un copolymère est un polymère qui comporte des motifs monomères de deux ou plus sortes différentes. L'arrangement des différents monomères peut se faire de différentes manières, avec une incidence directe sur leurs propriétés. Ils peuvent être composés selon différentes proportions et disposés en différents blocs qui alternent dans la chaîne. Par exemple, en considérant A et B comme deux monomères constituant un copolymère, on pourrait avoir une structure telle que $-(-A)_n-(-B)_m-(-A)_p-$ (copolymère à bloc), où n , m et p sont les nombres des unités de répétition dans le polymère. Les monomères

peuvent également simplement alterner de manière régulière (- A-B-A-B-A-B-) (copolymère alternant) ou être disposés de manière aléatoire (-A-A-A-B-A-B-B-A-) (copolymère statistique). Enfin, un autre type de polymère, le polymère greffé, est composé d'une chaîne linéaire d'un type de monomères, avec des branches d'autres types de monomères. Les polymères sont présentés comme des plates-formes pour des dispositifs médicaux avancés, des systèmes d'administration de médicaments (DDS) et comme des outils clés pour les nouvelles technologies en médecine régénérative et en génie tissulaire [87].

Pour une utilisation dans des applications humaines, le polymère doit être principalement biocompatible et non toxique, puis fonctionnalisable pour donner les caractéristiques structurelles et fonctionnelles appropriées, de manière à le rendre facilement utilisable, traité et conçu pour obtenir le système souhaité, et être appliquée à l'administration et au ciblage de médicaments et / ou au diagnostic de maladies.

L'importance principale d'un système de libération de médicament est de maintenir les médicaments à des niveaux thérapeutiques optimaux dans le corps pendant le traitement. De nombreuses études dans ce domaine montrent l'importance et l'utilité des polymères, mettant en évidence leurs propriétés de biocompatibilité et d'antigénicité, qui font des composés macromoléculaires des candidats idéaux à l'élaboration des matrices pour l'inclusion et la libération des médicaments. Les avantages les plus importants des biomatériaux polymériques sont la biocompatibilité, la stérilisation, des propriétés mécaniques et physiques adéquates, une excellente aptitude au traitement dans la plupart des cas et une aptitude à la fabrication [88].

Le rôle du polymère n'est pas seulement celui de support pour l'inclusion du médicament, il assure dans le même temps la libération contrôlée/soutenue du principe actif, le maintien constant de sa concentration dans l'organisme à un niveau thérapeutique pour une durée plus longue et dans la majorité des cas il réalise le transport et la protection du principe actif jusqu'à la "cible". Parce que la pharmacocinétique et la pharmacodynamie des médicaments sont influencées significativement par la nature du "transporteur", le choix du système transporteur est d'une importance capitale pour l'efficacité du traitement.

Ils se présentent comme les vecteurs les plus attractifs au vu de leurs nombreuses modulations. En effet, il est possible de modifier les propriétés du polymère selon l'application souhaitée, en changeant sa nature, sa structure, ses fonctions, sa taille...

Les polymères utilisés peuvent être d'origine naturelle ou synthétiques, ces derniers peuvent utiliser des monomères organiques naturels (acide lactique) ou synthétiques (acide acrylique). Dans tous les cas, ils doivent être biocompatibles, non toxiques (absence de réactivité avec le tissu), non immunogènes, non cancérogènes. Ils doivent également pouvoir être (bio)dégradés dans l'organisme et leurs produits de dégradation bien tolérés. S'ils ne sont pas (bio)dégradables, ils doivent pouvoir être éliminés par les voies naturelles après solubilisation dans les fluides biologiques. La structure chimique des polymères joue un rôle essentiel dans leur biodégradation : elle est liée à la stabilité de leurs groupements fonctionnels, leur réactivité, et leur hydrophilie [89].

I.6.1. Les polymères naturels

Les polymères naturels utilisés dans des applications médicales sont principalement de deux catégories: les protéines telles que l'albumine et la gélatine, et les polysaccharides comme le dextrane, l'alginate, le chitosane, ou encore certains dérivés de la cellulose. Cependant, l'utilisation de polymères naturels dans ce domaine présente certaines limites, telles que: propriétés mécaniques médiocres, libération trop rapide des composés bioactifs encapsulés, biodégradation prématurée.

I.6.2. Les polymères synthétiques

Par conséquent, les chercheurs ont porté leur attention sur les polymères synthétiques, en raison de leurs propriétés [90]. En général, les polymères synthétiques sont plus homogènes en composition et ont donc une plus grande pureté que les polymères naturels et leur préparation est plus reproductible et plus faciles à manipuler [91] et peuvent assurer un long temps de libération pour l'agent thérapeutique [92]. Comme : polylactate (PLA), polyglycolate, poly-(lactate-co-glycolate) (PLGA), polycaprolactone (PCL) et Eudragit® sont couramment utilisés. Ils peuvent être biodégradables (polylactate) ou non (Eudragit®).

Compte tenu de la très grande variété des polymères utilisables, nous ne mentionnerons ici que le chitosane (CS) qui est le polymère de base de ce travail.

I.6.3. Le Chitosane

Aujourd'hui, le chitosane (CS) est probablement considéré comme un polysaccharide biofonctionnel avec la croissance et le potentiel les plus notables pour des applications dans divers domaines. Les progrès de la chimie de la chitine et la nécessité de remplacer les

additifs et les polymères non naturels par des polymères fonctionnels à base naturelle ont ouvert de nombreuses nouvelles opportunités pour le CS et ses dérivés [93].

Le chitosane est un polysaccharide dérivé de la chitine, polymère naturel parmi les plus abondants sur la planète avec la cellulose [94,95]. Actuellement, la principale source industrielle de chitine (et de chitosane) provient de la carapace de crustacés (crevettes) et de l'endosquelette de calmars. Le chitosane est un copolymère linéaire flexible de 2-acétamido-2-déoxy- β -D- glucopyranose et 2-amino-2-déoxy- β -D-glucopyranose, il est obtenu par désacétylation de la chitine : la réaction est réalisée en présence de soude concentrée, à haute température (90 °C). L'opération est répétée jusqu'à quatre fois lorsque l'on souhaite obtenir un chitosane totalement désacétylé (DA = 0). Ce traitement relativement agressif entraîne cependant une diminution non négligeable de la masse molaire, et l'obtention de très faibles DA se fait généralement au dépend de la masse molaire. L'utilisation d'atmosphère inerte (N₂) et/ou de borohydrure de sodium permettent de diminuer les réactions secondaires en protégeant le milieu de l'oxygène et en évitant la formation d'espèces réactives [96]. Le DA constitue un critère relativement pertinent pour faire la distinction entre chitine et chitosane, et il est communément admis que :

- pour un DA > 60 %, on parlera de chitine ;
- pour un DA < 60 %, on parlera de chitosane [97].

Possédant trois groupements fonctionnels, un groupement amine et deux groupements hydroxyles en positions C2, C3 et C6 respectivement, la nature cationique du chitosane lui confère une propriété particulière comparée à la majorité des polysaccharides qui sont généralement soit neutres, soit chargés négativement dans un milieu acide. Ce biopolymère est soluble dans des milieux aqueux au-dessous de son Pka (proche de 6,3) et se voit attribuer une charge positive grâce à ses fonctions amines libres. Une particularité rare et qui lui permettra de former des complexes électrostatiques ou des structures multicouches avec d'autres polymères synthétiques ou naturels chargés négativement [98]. La biocompatibilité, la biodégradabilité, le faible pouvoir allergène et la non toxicité du chitosane sont toutes des caractéristiques qui lui permettent d'être utilisées dans diverses applications.

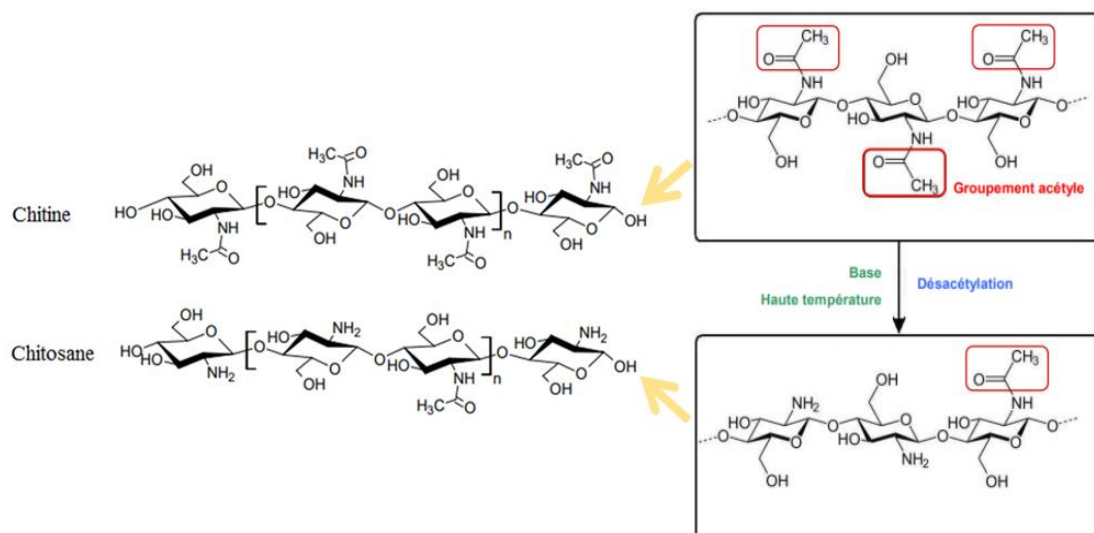


Figure I.10 : Structure chimique de chitine et de chitosane.

La chitine et le chitosane, de même que leurs dérivés, possèdent des propriétés filmogènes leur permettant d'être utilisés sous forme de membranes, solutions, gels ou nanoparticules. Ainsi, ce polymère est biocompatible, biodégradable, bioassimilable (ou métabolisable), antibactérien [99], antifongique, non antigénique et non toxique [100]. Plusieurs travaux ont démontré que le chitosane et ses dérivés présentaient des propriétés bioadhésives [101] qui permettent d'augmenter le temps de contact avec les muqueuses et favorisent l'absorption des macromolécules à travers les muqueuses. Le chitosane, seul ou complexé avec un polymère anionique, est un excellent support pour le transport et le relargage lent de principes actifs médicamenteux [102], donc est un excellent candidat à notre étude. Il est utilisé dans les systèmes d'administration ciblée de médicaments avec plus d'efficacité et moins d'effets secondaires [103, 104]. Il a été trouvé qu'il exerce une activité anticancéreuse avec une toxicité minimale sur les cellules non cancéreuses [105].

I.7. Conclusion

Les technologies actuelles permettent d'obtenir des systèmes de polymères-substance biologiquement active sous différentes formes : les comprimés, les hydrogels sous forme de films ou d'éponges, les inserts sous cutanés, les pansements, solutions injectables, systèmes de particules micro et nanométriques (sphère ou capsules) et conjuguées dans lesquelles le médicament est lié chimiquement soit physiquement au support macromoléculaire. L'utilisation des systèmes nanoparticulaires composés de polymères suscite d'immenses espoirs pour le traitement de maladies graves, notamment les pathologies cancéreuses. Dans les applications thérapeutiques du chitosane comme vecteur de médicament, les micro/nanoparticules sont les structures les plus recherchées.

Références bibliographiques

- [1] Yetisgin A. A.; Cetinel S.; Zuvim M.; Kosar A.; & Kutlu, O. *Therapeutic Nanoparticles and Their Targeted Delivery Applications. Molecules* **2020**, 25(9), 2193.
- [2] El-Sayed A.; Kamel M. *Advances in nanomedical applications: diagnostic, therapeutic, immunization, and vaccine production. Environ Sci Pollut Res* **2020**, 27, 19200–19213.
- [3] Ferlay J.; Ervik M.; Lam F.; Colombet M.; Mery L.; Piñeros M.; et al. *Observatoire mondial du cancer : « Cancer Today »*. Lyon : Centre international de recherche sur le cancer, **2020**.
- [4] Kanapathipillai M.; Brock A.; et Ingber D. E. « Nanoparticle targeting of anti-cancer drugs that alter intracellular signaling or influence the tumor microenvironment », *Advanced Drug Delivery Reviews* **2014**, 79-80, 107-118.
- [5] Lee YT.; Tan YJ.; Oon CE. *Molecular targeted therapy: Treating cancer with specificity. Eur J Pharmacol.* **2018**, 834, 188–96.
- [6] Kadam R.S.; Bourne D.W.; Kompella U.B. *Nano-advantage in enhanced drug delivery with biodegradable nanoparticles: Contribution of reduced clearance. Drug Metab. Dispos* **2012**, 40, 1380–1388.
- [7] Falzone L.; Salomone S.; & Libra M. *Evolution of Cancer Pharmacological Treatments at the Turn of the Third Millennium. Frontiers in Pharmacology*, **2018**, 9.
- [8] Chabner B. A.; Longo D. L.: “Hormonal therapy of breast cancer”. *Cancer chemotherapy and biotherapy: Principles and practice*. L. Williams & Wikins. 5th edition. **2010**. Chapter 35
- [9] Staritz M.; Fellhauer M.: “Pharmacology of cancer chemotherapy drugs”.*Side-effects of cancer chemotherapy on the gastrointestinal tract. Pathophysiology, Prophylaxis and therapy.* **2004**. Chapter 1
- [10] Hoda D.; Daud A.; “Protein kinase inhibitors”. *Cancer management in man: Chemotherapy, biological therapy, hyperthermia and supporting measures*. B. Minev. Springer. **2011**. Chapter 17.
- [11] Oestreicher N. “Costs of adjuvant breast cancer treatments”. *Adjuvant therapy for breast cancer*. M. Castiglione, M. J. Piccart. Springer. **2009**. Part 6.
- [12] Senapati S.; Mahanta A. K.; Kumar S.; & Maiti P. *Controlled drug delivery vehicles for cancer treatment and their performance. Signal Transduction and Targeted Therapy.* **2018**, 3(1).
- [13] Estanqueiro M.; et al. *Nanotechnological carriers for cancer chemotherapy: The state of the art. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2015**, 126, 631–648.
- [14] Couvreur P. « [Drug vectorization or how to modulate tissular and cellular distribution of biologically active compounds] ». *Annales pharmaceutiques françaises* **2001**, 59, 232-238.
- [15] Folkman J.; Long DM. *the use of silicone rubber as a carrier for prolonged drug therapy. J Surg Res.* **1964**, 4: 139-42.
- [16] Hoffman A.S.; *The origins and evolution of “controlled” drug delivery systems. Journal of Controlled Release*, **2008**. 132(3), 153-163.
- [17] Allen T.M.; and P.R. Cullis, *Drug delivery systems: entering the mainstream. Science*, **2004**. 303, 1818-1822.
- [18] Goutayer M. *Nano-émulsions pour la vectorisation d’agents thérapeutiques ou diagnostiques ; étude de la biodistribution par imagerie de fluorescence in vivo.* **2008**, Paris Universitas: Paris.
- [19] Koo O.M.; Rubinstein I.; and Onyuksel H. *Role of nanotechnology in targeted drug delivery and imaging: a concise review. Nanomedicine*, **2005**, 1(3),193-212.
- [20] Winau F.; Westphal O.; and Winau R. *Paul Ehrlich--in search of the magic bullet. Microbes Infect.* **2004**, 6 (8), 786-789.

- [21] Safra T.; Muggia F.; Jeffers S.; Tsao-Wei D. D.; Groshen S.; Lyass O.; Henderson R.; Berry G.; and Gabizon A. Pegylated liposomal doxorubicin (doxil): reduced clinical cardiotoxicity in patients reaching or exceeding cumulative doses of 500 mg/m². *Ann. Oncol.*, **2000**, *11*, 102, 9-1033.
- [22] Shigematsu H.; Kadoya T.; Masumoto N.; Sasada T.; Emi A.; Ohara M.; Kajitani K and Okada M. The efficacy and safety of preoperative chemotherapy with triweekly abraxane and cyclophosphamide followed by 5-fluorouracil, epirubicin, and cyclophosphamide therapy for resectable breast cancer: a multicenter clinical trial. *Clin. Breast Cancer*, **2015**, *15*, 110-116.
- [23] Dranitsaris G.; Yu B.; King J.; Kaura S.; Zhang A. Nab-paclitaxel, docetaxel, or solvent-based paclitaxel in metastatic breast cancer: a cost-utility analysis from a Chinese health care perspective. *Clinicoecon Outcomes Res.* 2015;7:249-256.
- [24] (Chezy) Barenholz Y. Doxil® — The first FDA-approved nano-drug: Lessons learned, *J Control Release*. **2012**, *160*, 117–134.
- [25] Mali S. Delivery systems for gene therapy. *Indian Journal of Human Genetics*, **2013**, *19*(1), 3.
- [26] Emma M.; McErlean Cian M.; McCrudden and Helen O. McCarthy Multifunctional Delivery Systems for Cancer Gene Therapy (2015).
- [27] Zecheru T. New biopolymers with possible use in dentistry and orthopaedics. *Université d'Angers*, **2008**.
- [28] Dellacherie E.; Ruxandra G.; and Q. Patricia. «Les nanosphères "furtives" comme nouvelles formes galéniques injectables: espoirs et réalités». *Medecin/Science*, **2001**, *17*, 619-626.
- [29] Andrieux K.; Desmaele D.; D'Angelo J.; and P. Couvreur. «Nanotechnologies and new drugs». *Actualité Chimique*, **2003**, 135-139.
- [30] Khandare J. principles R.H. structures, and applications of pharmaceutical delivery systems. M. Schäfer-Korting (ed.), *Drug Delivery, Handbook of Experimental Pharmacology*. Springer Verlag Berlin Heidelberg **2010**, *197*, 221-250.
- [31] Coelho J. F.; Ferreira P. C.; Alves P.; Cordeiro R.; Fonseca A. C.; Góis J. R.; & Gil M. H. Drug delivery systems: Advanced technologies potentially applicable in personalized treatments. *EPMA Journal*, **2010**, *1*(1), 164–209.
- [32] Brigger I.; Dubernet C.; and Couvreur P. «Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis». *Advanced Drug Delivery Reviews*, **2002**, *54*(5), 631-651.
- [33] Laroui H. Nanosphères polymères à couverture de hyaluronate pour la délivrance ciblée de molécules actives dans le traitement des affections du cartilage. *Nancy I*. **2007**,
- [34] Vauthier C et Couvreur P. Nanotechnologies pour la thérapeutique et le diagnostic. *Techniques de l'Ingénieur Doc NM 4010-1*, **2008**.
- [35] Brannon-Peppas L.; Blanchette J.O. Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **2004**, *56*, 1649-1659.
- [36] Filippo R.; Giuseppe P.; Maurizio M. Principles of Controlled Drug Release: A Mass Transport Matter," in *Controlled Drug Delivery Systems*, Springer International Publishing, **2016**, 9-3.3
- [37] Shen S.I.; Jasti B. R.; and X.Li. Design of controlled release drug delivery systems. in *Biomedical Engineers' Handbook*, M. Kutz, Ed., New York, McGraw-Hill, Inc., **2002**.
- [38] Li H.; Yang J.; Hu X.; Liang J.; Fan Y.; Zhang X. Superabsorbent polysaccharide hydrogels based on pullulan derivative as antibacterial release wound dressing. *J Biomed Mater Res A*, **2014**, *98*(1), 31-39.
- [39] Shen S.I.; Jasti B. R.; and X.Li. Design of controlled release drug delivery systems. in *Biomedical Engineers' Handbook*, M. Kutz, Ed., New York, McGraw-Hill, Inc., **2002**.
- [40] Peppas L. B.; Blanchette J. O. Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. *Adv. Drug Deliv Rev*, **2004**, *56*, 1649-1659.

- [41] Langer R.; et Folkman I. Polymers for the sustained release of proteins and other macromolecules. *Nature*, **1976**, 263, 797-800.
- [42] Robinson J.; & Jantzen, G. Sustained-and Controlled-Release Drug-Delivery Systems. *Drugs and the Pharmaceutical Sciences*, 2002.
- [43] Juergen Siepmann et Florence Siepmann. Time-Controlled Drug Delivery Systems. *Modern Pharmaceutics, Applications and Advances, Informa Healthcare*, **2009**, 1-22.
- [44] Yie W. Chien et Senshang Lin. Drug Delivery: Controlled Release. *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, Third Edition, Informa Healthcare*, **2006**, 1082-1103.
- [45] Domb J.; Kumar N.; Sheskin T.; Bentolila A.; Slage J.; et Teomin D. Biodegradable polymers as drug delivery systems, *Polymeric biaterials, Marcel Dekker, New York*, **2002** 91-121
- [46] Ratner B. D.; Hoffman A. S.; Schoen F. J.; Lemons J.E.; *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine, Elsevier Academic Press*, **2004**.
- [47] Ding C.; Li Z. A review of drug release mechanisms from nanocarrier systems. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. **2017**, 76, 1440-1453.
- [48] Lee JH.; Yeo Y. Controlled Drug Release from Pharmaceutical Nanocarriers. *Chem Eng Sci*. **2015**;125:75-84.
- [49] Patra J. K.; Das G.; Fraceto L. F.; Campos E. V. R.; Rodriguez-Torres M. del P.; Acosta-Torres L. S.; ... Shin H.-S. Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. *Journal of Nanobiotechnology*, **2018**, 16(1).
- [51] Rossi F.; et al. Controlled Drug Delivery Systems," in *Principles of Controlled Drug Release: A Mass Transport Matter, Springer*, **2016**, 9-33.
- [52] Ummadi S.; Shrivani B.; Raghavendra Rao N. G.; Reddy M. S.; Nayak B. S. Overview on Controlled Release Dosage Form, *Int. J. Pharma Sci*. **2013**, 3(4), 258-269.
- [53] Holowka E.P.; Bhatia S.K. *Drug Delivery: Materials Design and Clinical Perspective. New York, Springer Science+Business Media*, **2014**, 7-62.
- [54] Yuan Z.; Ye Y.; Gao F.; Yuan H.; Lan M.; Lou K.; Wang W. Chitosan-graft- β -cyclodextrin nanoparticles as a carrier for controlled drug release. *Int. J. Pharm*. **2013**, 446, 191–198
- [55] Miladi K.; Sfar S.; Fessi H.; Elaissari A. Enhancement of alendronate encapsulation in chitosan nanoparticles. *J. Drug Deliv. Sci. Technol*. **2015**, 30, 391–396
- [56] Mohamm M.; Syeda J.; Wasan K.; & Wasan E. An Overview of Chitosan Nanoparticles and Its Application in Non-Parenteral Drug Delivery. *Pharmaceutics*, **2017**, 9(4), 53.
- [58] Nazila K.; Basit Y.; Jun W.; Omid F. C. Degradable controlled-release polymers and polymeric nanoparticles: mechanisms of controlling drug release," *Chem. Rev*. **2016**, 116, (4), 2602-266.
- [59] Shariatnia Z.; & Jalali A. M. Chitosan-based hydrogels: Preparation, properties and applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, **2018**, 115, 194–220.
- [60] Shim M.S.; Kwon Y.J. Stimuli-responsive polymers and nanomaterials for gene delivery and imaging applications, *Advanced Drug Delivery Reviews*. **2012**, 64, 1046– 1059.
- [61] Lehner R.; Wang X.; Wolf M.; Hunziker P. Designing switchable nanosystems for medical application, *Journal of Controlled Release*. **2012**, 161, 307–316.
- [62] Li Z.; Ye E.; David; Lakshminarayanan R.; Loh X. J. Recent Advances of Using Hybrid Nanocarriers in Remotely Controlled Therapeutic Delivery. *Small* **2016**, 12 (35), 4782–4806.
- [63] Al-Ahmady Z.; Kostarelos K. Chemical components for the design of temperature-responsive vesicles as cancer therapeutics. *Chem Rev*. **2016**, 116:3883–3918.

- [64] Bai Y.; Xie FY.; Tian W. Controlled self-assembly of thermo-responsive amphiphilic h-shaped polymer for adjustable drug release. *Chin J Polym Sci* **2018**, 36:406–416.
- [65] Zhang Z.; Zhang D.; Wei L.; Wang X.; Xu YL.; Li HW.; Ma M.; Chen B.; Xiao LH. Temperature responsive fluorescent polymer nanoparticles (TRFNPs) for cellular imaging and controlled releasing of drug to living cells. *Coll Surf B* **2017**, 159, 905–912.
- [66] Hervault A.; & Thanh N. T. K. Magnetic nanoparticle-based therapeutic agents for thermo-chemotherapy treatment of cancer. *Nanoscale*, **2014**, 6(20), 11553–11573.
- [67] Guo Y.; Zhang Y.; Ma J.; Li Q.; Li Y.; Zhou X.: ... Zhu, X. Light/magnetic hyperthermia triggered drug released from multi-functional thermo-sensitive magnetoliposomes for precise cancer synergetic theranostics. *Journal of Controlled Release*, **2018**, 272, 145–158.
- [68] Wicki A.; Witzigmann D., Balasubramanian V.; et Huwyler J. Nanomedicine in cancer therapy: Challenges, opportunities, and clinical applications. *Journal of Controlled Release* **2015**, 200, 138-157.
- [69] Bennet D.; et Kim S. Polymer Nanoparticles for Smart Drug Delivery. in *Application of Nanotechnology in Drug Delivery*, A. D. Sezer,(Éd). InTech, **2014**.
- [70] Jhaveri A.; Deshpande P.; et Torchilin V. Stimuli-sensitive nanopreparations for combination cancer therapy . *Journal of Controlled Release* **2014**, 190, 352-370.
- [71] Couvreur P. Les nanotechnologies pour la conception de nouveaux médicaments. *Biologie Aujourd'hui*, **2012**, 206: 237-248.
- [72] Felice B.; Prabhakaran M. P.; Rodríguez A. P.; et Ramakrishna S. Drug delivery vehicles on a nanoengineering perspective. *Materials Science and Engineering: C* **2014**, 41, 178-195.
- [73] Gerweck L. E. Tumor pH controls the in vivo efficacy of weak acid and base chemotherapeutics. *Molecular Cancer Therapeutics* **2006**, 5 (5), 1275-1279.
- [74] Mahoney B. P.; Raghunand N.; Baggett B.; et Gillies R. J. Tumor acidity, ion trapping and chemotherapeutics. *Biochemical Pharmacology* **2003**, 66 (7), 1207–1218.
- [75] Engin K.; Leeper D. B.; Cater J. R.; Thistlethwaite A. J.; Tupchong L.; et McFarlane J. D. Extracellular pH distribution in human tumours. *International Journal of Hyperthermia* **1995**, 11 (2), 211-216.
- [76] Liu J.; Huang Y.; Kumar A.; Tan A.; Jin S.; Mozhi A.; et Liang X.-J. pH-Sensitive nano-systems for drug delivery in cancer therapy. *Biotechnology Advances* **2014**, 32 (4), 693–710.
- [77] Medeiros S. F.; Santos A. M.; Fessi H.; and Elaissari A. Stimuli-responsive magnetic particles for biomedical applications. *International Journal of Pharmaceutics*, **2011**, 403, 139-161.
- [78] Yatvin M.B.; Weinstein J.N.; Dennis W.H.; Blumenthal R. Design of liposomes for enhanced local release of drugs by hyperthermia. *Science* **1978**, 202, 1290- 1293.
- [79] Falk M. H.; and Issels R. D. Hyperthermia in oncology. *International Journal of Hyperthermia*, **2001**, 17, 1-18.
- [80] Jordan A.; Scholz R.; Maier-Hauff K.; Johannsen M.; Wust P.; Nadobny J.; Schirra H.; Schmidt H.; Deger S.; Loening S.; Lanksch W.; and Felix R. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, **2001**, 225, 118-126.
- [81] Duguet E.; Vasseur S.; Mornet S. and. Devoisselle J. M. Magnetic nanoparticles and their applications in medicine. *Nanomedicine*, **2006**, 1, 157-168.
- [82] Laurent S.; Forge D.; Port M.; Roch A.; Robic C.; Vander Elst L.; Muller RN. Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications. *Chemical Reviews*. 2008,108, 2064-2110.
- [83] Kono K.; Nakai R.; Morimoto K.; Takagishi T. Thermosensitive polymer-modified liposomes that release contents around physiological temperature. *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, 1416, 239-250.

- [84] Chang H.I. ; Yeh M.K. Clinical development of liposome-based drugs: formulation, characterization, and therapeutic efficacy. *Int J Nanomedicine*, **2012**;7:49-60.
- [85] Hua M.-Y., Liu H.-L., Yang H.-W., Chen P.Y., Tsai R.Y., Huang C.Y., Tseng I.C., Lyu L.A., Ma C.C., Tang H.J., Yen T.C., Wei K.C. Self-protecting core-shell magnetic nanoparticles for targeted, traceable, long half-life delivery of BCNU to gliomas. *Biomaterials*, **2011**, 32(27):6523-6532.
- [86] Qin J.; Asempah I.; Laurent S.; Fornara A.; Muller R.N; Muhammed M. Injectable Superparamagnetic Ferrogels for Controlled Release of Hydrophobic Drugs. *Advanced Materials*. **2009**, 21, 1354-1357.
- [87] Calori I. R.; Braga G.; Carvalho de Jesus P. da C.; Bi. H.; & Tedesco A. C. Polymer Scaffolds as Drug Delivery Systems. *European Polymer Journal*, **2020**, 109621.
- [88] Samadian H.; Maleki H.; Allahyari Z.; & Jaymand M. Natural polymers-based light-induced hydrogels: Promising biomaterials for biomedical applications. *Coordination Chemistry Reviews*, **2020**, 420, 213432.
- [89] Acemoglu M., Chemistry of polymer biodegradation and implications on parenteral drug delivery. *Int. J. Pharm.*, **2004**, 277 (1–2), 133–9.
- [90] Brannon-Peppas L. Polymers in controlled drug delivery systems. *Medical Plastics and Biomaterials Magazine*, **1997**.
- [91] Lai P.; et al., Overview of the preparation of organic polymeric nanoparticles for drug delivery based on gelatine, chitosan, poly(d,l-lactide-co-glycolic acid) and polyalkylcyanoacrylate. *Colloids Surf B Biointerfaces*, **2014**, 118, 154-63.
- [92] Ra,ță D.M.; Popa M.; Chailan J.F.; Zamfir C.L.; Peptu C.A. Biomaterial properties evaluation of poly(vinyl acetate-alt-maleic anhydride)/chitosan nanocapsules. *J. Nanopart. Res.* **2014**, 16, 2569.
- [93] Brasselet C.; Pierre G.; Dubessay P.; Dols-Lafargue M.; Coulon J.; Maupeu J.; ... Delattre C. Modification of Chitosan for the Generation of Functional Derivatives. *Applied Sciences*, **2019**, 9(7), 1321.
- [98] Cheung R. Ng. T.; Wong J.; & Chan W. Chitosan: An Update on Potential Biomedical and Pharmaceutical Applications. *Marine Drugs*, **2015**, 13(8), 5156–5186.
- [103] Park J. H.; Saravanakumar G.; Kim K.; and Kwon I. C, Targeted delivery of low molecular drugs using chitosan and its derivatives. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **2010**, 62, 28–41.
- [104] Adhikari H. S.; & Yadav P. N. Anticancer Activity of Chitosan, Chitosan Derivatives, and Their Mechanism of Action. *International Journal of Biomaterials*, **2018**, 1–29.
- [105] Wimardhani Y. S.; Suniarti D. F.; Freisleben H. J.; Wanandi S. I.; Siregar N. C.; and Ikeda M.-A. Chitosan exerts anticancer activity through induction of apoptosis and cell cycle arrest in oral cancer cells. *Journal of oral science*, **2014**, 56 (2), 119–126.

Chapitre II

II.1. Introduction

L'utilisation des nanotechnologies à des fins thérapeutiques ou diagnostiques constitue l'un des domaines de recherche les plus actifs à l'heure actuelle. Grâce au développement des nanotechnologies, le magic bullet ou « missile magique » imaginé au début du XX^{ème} siècle par le médecin allemand Paul Ehrlich est devenu réalité [1,2]. Un intérêt très particulier concerne l'utilisation de systèmes nanoparticulaires pour transporter les principes actifs, qui offre des solutions potentielles pour le développement de traitements qui soient plus efficaces et moins toxiques pour le patient. En s'appuyant sur des concepts novateurs en chimie et physico-chimie, ainsi que sur le développement de matériaux innovants, la recherche galénique a permis de concevoir des nanoparticules capables non seulement de protéger le principe actif d'une dégradation précoce mais également d'en contrôler la libération en termes de localisation mais aussi de durée (contrôle spatio-temporel).

Les nanoparticules sont largement utilisées et jouent un rôle important dans de nombreux domaines, tels que la médecine, la biologie, la physique, la chimie et la détection, en raison de leurs propriétés uniques [3]. Elles sont utilisées aussi bien en oncologie que dans d'autres branches de la nanotechnologie biomédicale. L'utilisation de nanoparticules pour le traitement des maladies complexes reste le moyen le plus intelligent pour améliorer les thérapies existantes.

Ce chapitre présente dans un premier temps des généralités sur les systèmes nanoparticulaires, leurs importances, leurs classifications. Notre intérêt portera sur les nanoparticules polymères qui sont divisées en deux groupes principaux (nanosphères et nanocapsules), et sur les nanoparticules magnétiques. Nous insisterons tout particulièrement sur l'application de ces types de particules dans le domaine médicale. Ensuite, nous présenterons les stratégies de ciblage et les différentes générations des vecteurs des médicaments. Les nanosystèmes de polymère magnétique seront l'objet de la dernière partie de ce chapitre.

II.2. Les nanosystèmes particulaires pour la nanomédecine

II.2.1. L'importance de systèmes nanoparticulaires

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

thérapeutiques [4,5]. Le développement des nanotechnologies a permis de proposer le concept de vectorisation des médicaments à l'aide d'outils de taille nanométrique qui sont capables d'acheminer des principes actifs ou des agents de contraste vers leur site d'action.

La nanomédecine et les systèmes d'administration sont relativement des sciences nouvelles mais en développement rapide où des matériaux de l'ordre du nanomètre sont utilisés pour servir d'outils de diagnostic ou libérer des agents thérapeutiques à des sites ciblés spécifiques de manière contrôlée [6].

Au cours des dernières décennies, les nanoparticules (NPs) ont attiré une attention accrue en tant qu'approche innovante pour améliorer l'administration de médicaments. En particulier pour le traitement de maladies telles que les infections et le cancer, les formulations de NP sont prometteuses en tant que nouvelles stratégies [7]. En raison de leurs propriétés physico-chimiques qui facilitent les interactions avec les systèmes biologiques [8], leur structure et leur morphologie qui permettent une absorption cellulaire efficace [9] et la possibilité de fonctionnaliser leur surface [10], formulations nanoparticulaires représentent un outil polyvalent pour améliorer la livraison de toute une variété de cargaisons à leur site d'action préféré. En tant que telles, les NP ont été largement étudiées pour les formulations de vaccins, le traitement du cancer à des fins thérapeutiques géniques, immunothérapies et les diagnostics [5 ,11].

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

- Les matériaux utilisés doivent être biodégradables et biocompatibles. Après l'administration des nanoparticules, ces dernières ne doivent induire ni toxicité ni effets inflammatoires ; de plus, l'organisme doit être capable de les éliminer. En effet, l'accumulation et le stockage de certains matériaux dans l'organisme pourrait conduire à des effets toxiques pour les cellules, en particulier après administration répétée de ces nanosystèmes.
- Ils doivent assurer l'encapsulation d'agents actifs, leur transport puis leur libération au niveau de la cible biologique [12,13].

Les systèmes nanoparticulaires offrent une excellente opportunité pour l'administration de principes actifs présentant une toxicité importante ou une faible solubilité, voire une instabilité notable *in vivo*. Le terme «nanosystème» concerne tous les systèmes d'une taille comprise entre 1 et 1000 nm [14]. Ces systèmes sont capables non seulement de protéger les molécules actives (molécules chimiques, peptides, protéines, ADN, ARN [15,16]) de la dégradation mais également de contrôler leur libération dans le temps et dans l'espace. De la même manière, le guidage d'un agent de contraste vers une région pathologique permet d'améliorer le diagnostic grâce à une meilleure qualité de l'imagerie médicale. En ce sens, les nanoparticules représentent une étape importante dans le transport ciblé de médicaments ayant des effets indésirables réduits.

II.2.2. Historique des nanoparticules

Le concept de délivrance contrôlée d'un médicament a été émis au début du XXème siècle par le médecin allemand Paul Ehrlich, considéré comme le père de la chimiothérapie [17]; c'est-à dire du traitement des maladies par des substances chimiques. Il a inventé en 1907 le premier agent chimiothérapeutique dans le cadre du traitement de la syphilis, le Salvarsan, puis a reçu le prix Nobel en 1908 pour ses recherches sur l'immunologie. Ses travaux sur les colorants lui ont permis de comprendre que l'effet biologique d'un composé chimique dépendait de sa composition, et de la cellule avec laquelle il interagissait. En observant la sélectivité de certains colorants pour certains organes il a émis l'idée d'une « magic bullet », un système qui permettrait d'amener un principe actif sélectivement à la zone à traiter. Il a ainsi relié la chimie à la biologie et la médecine. En effet, Paul Ehrlich cherchait une « magic bullet » permettant d'augmenter l'efficacité du traitement tout en réduisant les nombreux effets secondaires sur l'organisme des chimiothérapies anticancéreuses utilisées à cette époque [18]. Pour ce faire, la majorité des travaux publiés découlant de ce concept utilise des systèmes nanoparticulaires, lipidiques ou polymériques et plus récemment inorganiques. Malgré les nombreux progrès scientifiques en matière de traitements anticancéreux, le développement des nanoparticules (NPs) pour le transport de principes actifs a commencé qu'au début des années 1970, sous l'impulsion du Pr. suisse Peter Speiser à l'ETH Zürich, notamment avec l'aide du Pr. français Patrick Couvreur [19,20].

Un des pionniers de la nanotechnologie était le Professeur Peter Paul Speiser, de l'Institut Fédéral de Technologie à Zurich. A la fin des années 60, son équipe était responsable du développement des premières nanoparticules pharmaceutiques, à utiliser dans

les vaccins et pour la vectorisation du médicament. Dans un premier temps, ils avaient réalisé des nanocapsules contenant des particules virales ou antigéniques, fabriquées par polymérisation en milieu aqueux. Lors de l'administration par voie intraveineuse, ces nanocapsules permettaient d'obtenir une réponse plus forte au vaccin, donc une meilleure immunisation.

Dans les années 1977 et 1978, Richard Oppenheim et Jennifer Marty ont développé des nanoparticules à base d'albumine et gélatine par la méthode de coacervation.

Le début des années 80 est marqué par des recherches sur l'effet du polymère utilisé sur la nanoparticule obtenue. L'acide poly(lactique), ainsi que son copolymère, l'acide poly(lactique-co-glycolique), font partie des polymères les plus importants de l'administration parentérale. Ce type de nanoparticules fût synthétisé pour la première fois en 1981 par Robert Gurny aux Etats-Unis. C'est au début des années 80 que la communauté scientifique a montré les grands avantages de l'utilisation des nanoparticules dans les médicaments anti-cancéreux. Dans beaucoup d'études, une meilleure efficacité, ainsi qu'une toxicité diminuée étaient observées. Plus tard, leurs bénéfices étaient aussi prouvés dans l'amélioration de la biodisponibilité des anti-infectieux et des médicaments de thérapie génique. Une autre découverte importante des années 80-90 fût la préparation de nanoparticules avec des chaînes de poly(éthylène glycol) (PEG) attachés. Les nanoparticules non-enrobées sont rapidement opsonisées et éliminées par les macrophages du système réticulo- endothélial (foie, rate, poumons, moelle osseuse). Par contre, les nanoparticules enrobées en poly(oxy-éthylène)-poly(oxypropylène) (poloxamer 338 et poloxamine 908 respectivement) avaient un temps de circulation sanguine plus long et une métabolisation par le foie diminuée.

Dans les années 90, des chercheurs en Russie ont prouvé que des nanoparticules polymériques, contenant différents principes actifs et enrobées en polysorbate 80 (Tween®80) pouvaient traverser la barrière hémato-encéphalique – ceci est un développement important dans le traitement de tumeurs cérébrales. Les premiers médicaments issus des nanotechnologies apparaissent sur le marché dans les années 2000. Le premier produit commercialisé était l'Abraxane™ (paclitaxel) en 2005 [21]. Aujourd'hui, il y a plus de 60 médicaments actuellement sur le marché, et des centaines qui sont dans les dernières étapes de développement (études cliniques).

II.2.3. Définitions

Les nanosciences représentent l'étude des phénomènes de taille nanométrique dont les propriétés découlent de cette taille. En effet, à cette échelle, la matière présente des particularités qui ne sont plus décrites par la physique classique, mais qui répondent aux lois de la mécanique quantique. **Les nanotechnologies** quant à elles regroupent l'ensemble des techniques permettant de concevoir, produire, caractériser des objets de taille nanométrique et d'en contrôler les paramètres. Les termes **nanostuctures**, ou, plus couramment, **nanoparticules** (NPs) regroupent l'ensemble des constructions nanométriques : **nano-objets**, et **nanomatériaux**. Les **nano-objets** sont les structures élémentaires, de forme et de taille bien définies, soit produits industriellement, soit formés spontanément de façon naturelle ou en tant que sous-produits de l'activité humaine. Les **nanomatériaux** sont composés de nano-objets ou renferment des nano-objets. Les **nanoparticules** ont été définies comme des particules solides ou des systèmes dispersés à une échelle de taille de 10 à 1000 nm [22-24]. Le principal attrait de cette faible taille par rapport aux microparticules est l'utilisation potentielle par voie parentérale, notamment en voie intraveineuse. Les nanoparticules permettent, dans le cas de molécules thérapeutiques, de s'affranchir des problèmes de faible solubilité, d'augmenter leur index thérapeutique ou de réduire leur immunogénécité [25, 26]. À cet égard, les nanoparticules sont les éléments essentiels de la nanotechnologie ; les progrès récents de la nanotechnologie ont prouvés que les nanoparticules acquièrent un grand potentiel dans les applications médicales [27].

Le terme nanoparticule provient du grec : Nano qui signifie « nain ». On appelle donc nanoparticule un objet de taille nanométrique. Le nanomètre (nm), est l'unité de mesure des nanoparticules qui correspond à un milliardième de mètre (10^{-9} m). Le terme de nanoparticule est généralement employé pour des particules de taille inférieure ou égale à 1 μ m. Les nanoparticules sont des solides submicroniques idéales pour encapsuler et vectoriser des principes actifs. Dans l'idéal, ces structures sont biocompatibles. La biocompatibilité est la propriété d'un matériau de remplir sa fonction sans déclencher d'effets indésirables locaux ou systémiques au sein de l'organisme [28,29].

Les nanoparticules peuvent être de nature organique et/ou inorganique, elles existent sous de nombreuses formes, sphérique, tubulaire, en bâtonnets, ellipsoïdale, ou en forme d'étoile [30]. Les différents processus chimiques qui guident la synthèse des nanomatériaux à l'échelle nanométrique peuvent être définis comme de la nanochimie, qui joue un rôle

essentiel dans les propriétés physico-chimiques des nanoparticules. Les nanoparticules ont un rapport surface / volume élevé, généralement une forte énergie de surface, des comportements mécaniques, thermiques, électriques, magnétiques, et optiques uniques. Ces propriétés particulières les rendent adaptables à une large gamme d'applications allant de l'électronique, à l'énergie, aux matériaux composites, à l'imagerie biomédicale, et à la nanomédecine.

En général, par rapport aux particules micrométriques qui ont une taille encore plus grande, les nanoparticules ont une surface spécifique plus grande, les atomes sont plus nombreux à la surface des particules, en outre l'énergie surfacique et la tension superficielle augmentent lorsque la taille des particules diminue. Ces différences donnent des caractéristiques spéciales aux nanoparticules

Après avoir donné une définition des NPs, nous présenterons les différents types de nanoparticules, leurs avantages ainsi que les applications envisagées pour la médecine.

II.3. Classification des nanoparticules

Le développement spectaculaire des nanotechnologies appliquées à la médecine fait qu'il existe une très grande variété de nanoparticules; en fonction de leur nature chimique et de leur structure, plusieurs types sont utilisés en système de vectorisation. Les nanoparticules peuvent être classées en différentes catégories selon leur composition chimique : les nanoparticules organiques, à base de carbone, inorganiques ou hybrides. Le choix du type de nanoparticule va s'effectuer selon l'application envisagée: protection ou relargage de principes actifs, durée de vie du nanomédicament, imagerie.

Dans cette partie, nous décrirons brièvement les différents types de nanoparticules, nous allons décrire les plus courantes. Parmi ces différents types, nous nous intéressons aux nanoparticules polymériques, nanoparticules magnétiques et NPs hybrides.

II.3.1. Les nanoparticules organiques

Il y a deux grandes familles de nanoparticules organiques, celles d'origine lipidique et celle d'origine polymère.

II.3.1.1. Les nanoparticules organiques lipidiques

Les nanoparticules lipidiques ont une place de choix dans leur utilisation comme nanovecteurs de principes actifs [31]. En effet, les lipides rentrent dans la composition de la membrane plasmique.

• **Les liposomes**

Les liposomes sont des vésicules formées d'une ou de plusieurs bicouches lipidiques concentriques, très souvent des phospholipides, et de molécules de cholestérol qui encapsulent un cœur interne aqueux. Les principes actifs hydrophobes ou hydrophiles peuvent se loger respectivement dans les bicouches lipidiques ou le compartiment aqueux. Les liposomes ont été découverts pour la première fois dans les années 1960 par le biophysicien britannique Alec Bangham [32]. Ils ont comme avantage de pouvoir encapsuler des composés polaires et apolaires au niveau du cœur interne aqueux. De plus, ils sont non toxiques, non immunogènes et biocompatibles, ce qui leur permet d'être des systèmes intéressants pour des applications de transport de principes actifs thérapeutiques *in vivo* [33, 34]. Cependant, ce système de vectorisation présente également des limitations telles qu'une faible capacité d'encapsulation, une stabilité colloïdale modérée, un temps de demi-vie plasmatique faible et un relargage précoce des principes actifs hydrophiles dans le sang [33,35].

Les niosomes sont des ensembles supramoléculaires similaires aux liposomes, à la différence que les molécules constituant la double couche ne sont pas des phospholipides mais des surfactants de synthèse (lipides non ioniques) [36]. C'est également le cas des polymersomes, pour lesquels des copolymères bloc (comportant une partie hydrophile et une partie hydrophobe) forment la structure emprisonnant le réservoir aqueux.

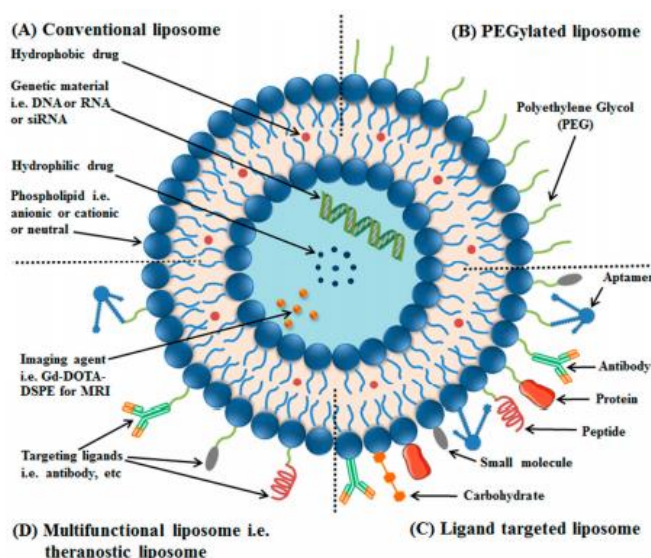


Figure II.1 : Représentation de liposomes: (A): les liposomes classiques; (B): liposomes PEGylés / furtifs; (C) : liposomes ciblés et (D) : liposomes multifonctionnels [37].

- **Les micelles**

Comme les liposomes, la micelle est composée de molécules amphiphiles auto assemblées mais en mono couche cette fois. Elle présente ainsi un cœur hydrophobe et une surface hydrophile [38], sous la forme de cœur-coquille (ou core-shell, en anglais). Différents types de micelles peuvent être obtenues selon le surfactant utilisé [39]: micelles à base de phospholipides ou de surfactants PEGylés, micelles à base de copolymères. Selon Sosnik et al, ces porteurs, malgré leur potentialité, représentent encore une contribution mineur dans le domaine général de la nanomédecine [40], probablement en raison de leur plus faible stabilité par rapport aux autres nanocarriers polymériques et lipidiques [41].

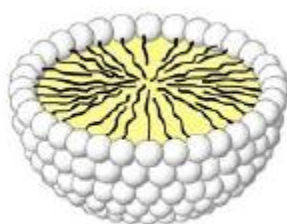


Figure II.2 : Représentation de micelle.

- **Les dendrimères**

Les dendrimères ont été synthétisés pour la première fois en 1978 par F. Vögtle et coll. [42, 43], sont des complexes polymériques fortement branchés, adoptent une forme dite « d'arbres ». À partir d'un monomère possédant des sites réactifs, ils se construisent par l'ajout contrôlé de couches successives de monomères. Les propriétés des dendrimères varient donc en fonction des monomères employés. Ils peuvent arborer des zones hydrophobes ou hydrophiles, chargées ou non, en fonction des caractéristiques souhaitées. La présence par exemple de groupes carboxyliques leur apporte un caractère hydrophile. Les dendrimères sont facilement fonctionnalisables et ils peuvent soit lier les principes actifs de façon covalente, soit les piéger au niveau de leur cœur (figure II.3) [44].

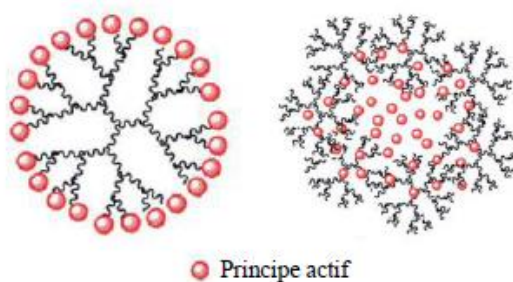


Figure II.3 : Représentation de dendrimères [44].

II.3.1.2. Nanoparticules polymériques

Parmi tous les nanoobjets d'intérêt thérapeutique et diagnostique, les nanoparticules polymères sont à l'heure actuelle les plus étudiées pour leurs nombreux avantages : biocompatibilité, biodégradabilité, versatilité chimique pour l'altération de leurs propriétés physicochimiques. Les nanoparticules polymères se distinguent comme un outil clé pour améliorer la biodisponibilité des médicaments ou l'administration spécifique sur le site d'action [45]. La mise au point de ces nanovecteurs a évolué d'une structure simple vers des assemblages complexes et soigneusement élaborés. Les premières nanoparticules polymériques développées par Couvreur *et al* dans les années 1970 sont à base de polyalkylcyanoacrylates [46] dans le but d'encapsuler des médicaments anticancéreux et/ou des vaccins afin de faciliter leur administration.

Les nanoparticules polymères ont été beaucoup étudiées pour le traitement du cancer. Leur synthèse est peu coûteuse et relativement aisée, et elles présentent l'intérêt d'être biocompatibles et d'augmenter la stabilité des agents pharmaceutiques avec lesquels elles sont couplées [47]. Afin d'éviter l'accumulation des nanoparticules polymériques dans le corps, elles sont le plus souvent constituées de polymères biodégradables. Ces derniers sont soit d'origine naturelle, soit synthétiques. Parmi les polymères naturels [48], on peut citer les polysaccharides [49, 50] comme le chitosane, le dextrane ou l'alginate et les protéines [51, 52] telles que la gélatine ou l'albumine qui sont utilisés pour former des NPs. Concernant les polymères synthétiques biodégradables, les plus couramment utilisés sont les polyesters aliphatiques tels que la poly(ϵ -caprolactone) (PCL) [53], le polylactide aussi appelé poly(acide lactique) (PLA) [54] ou le poly(acide lactique-*coglycolique*) (PLGA) [55], ainsi que les poly(cyanoacrylates d'alkyle) (PACA) [56].

De manière très générale, on définit les nanoparticules polymères comme étant des objets colloïdaux préparées à partir de polymères, sont globalement sphériques et de taille submicronique, c'est-à-dire de dimension inférieure à 1 μm . Les nanoparticules permettent, dans le cas de molécules thérapeutiques, de s'affranchir des problèmes de faible solubilité, d'augmenter leur index thérapeutique ou de réduire leur immunogénéicité [27, 57]. Les nanoparticules polymères permettent d'encapsuler aussi bien de petites molécules pharmaceutiques, hydrophiles ou hydrophobes, que des macromolécules comme les protéines et les acides nucléiques. Elles peuvent relâcher le principe actif encapsulé de manière contrôlée par dissolution, ou par diffusion, en fonction du temps ou des conditions du milieu environnant. Une équipe de Georgia Tech (Virginie) a par exemple développé des

nanoparticules polymères qui se décomposent rapidement par hydrolyse dans un environnement acide qui correspond à celui des tumeurs [58]. Il existe deux types de nanoparticules polymères qui se distinguent essentiellement par leur morphologie : les nanosphères (NSs) et les nanocapsules (NCs) [59]. (Si les nanoparticules polymères représentent un vaste groupe incluant les dendrimères, les micelles et les polymersomes précédemment définis, le terme « nanoparticule polymère » s'adresse surtout aux nanocapsules et aux nanosphères [60]. Comme mentionné auparavant, ces travaux de thèse étaient focalisés sur ce type de nanoparticules sous les deux différentes morphologies (les nanosphères et les nanocapsules).

a) Les nanosphères

Les nanosphères sont des systèmes polymériques colloïdales matricielles ; c'est-à-dire dont la structure est entièrement solide. Elles peuvent être pleines ou poreuses. Les nanosphères pleines sont des structures nanométriques compactes et homogènes dans l'ensemble de la particule, de formes généralement sphériques, synthétisées à base de polymères ou de copolymères. Les premières nanosphères ont été développées en 1976 par Birrenbach et Speiser [61] en utilisant le polyacrylamide réticulé, un polymère non biodégradable. Par la suite, les systèmes (bio)dégradables, à base de poly-(alkyl cyanoacrylate) (PACA), ont été développés par Couvreur et al. dès 1979 [62], qui sont étudiées comme vecteurs de molécules dans différents types d'applications, et notamment la vectorisation de drogues anticancéreuses.

Contrairement aux nanosphères pleines, les nanosphères poreuses ont une structure de mailles plus ou moins serrées dont l'architecture est formée d'une matrice polymérique. Par ailleurs, la présence de pores permet d'incorporer de grandes quantités de principe actif, sans modifier la taille et les propriétés de surfaces de la nanoparticule [63, 64].

Une substance active (SA), qu'elle soit de nature hydrophile ou lipophile, peut y être incorporée sous forme dissoute, dispersée et/ou encore être attachée physiquement (par adsorption par l'intermédiaire de liaisons de type hydrophobe, électrostatique ou covalente) ou chimiquement à leur surface (figure II.4) ; elle est libérée par simple diffusion ou à la suite de la (bio)dégradation du polymère dans l'organisme. Dans ce cas, le polymère doit être biodégradable et la dégradation de la nanoparticule à l'intérieur de l'organisme permet la libération du principe actif. C'est donc un système très intéressant pour la préparation de formulations délivrance prolongée. Les molécules fragiles dont on souhaite les préserver

l'intégrité *in-vivo*, seront préférentiellement encapsulées à l'intérieur de la nanoparticule plutôt qu'adsorbées à sa surface. Au contraire, des molécules qui pourraient perdre leur intégrité au moment de l'encapsulation seront préférentiellement adsorbées après la synthèse des nanoparticules [65-67].

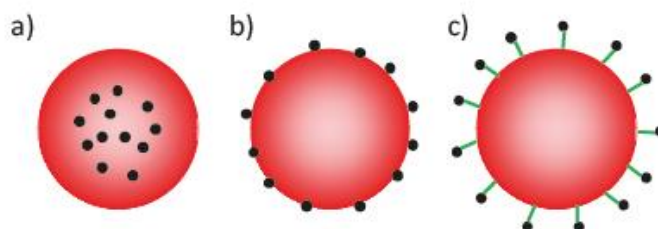


Figure II.4. Nanosphères polymères contenant une substance active: a) encapsulée à l'intérieur, b) adsorbée en surface, c) accrochée chimiquement à la surface.

b) Les nanocapsules

Les nanocapsules sont des particules colloïdales constituées d'un réservoir liquide ou semi-liquide à température ambiante, contenu à l'intérieur d'une enveloppe solide de nature polymérique [68, 69], des diamètres allant de 10 nm à 1000 nm [70]. Ces dernières années, les nanocapsules ont suscitées un fort intérêt dans les applications de délivrance de médicaments, grâce à leur microstructure de coque centrale [71]; le type de polymère et les propriétés de surface influencent: la stabilité de la nanocapsule, le type de molécule transportable et la pharmacocinétique de la formulation. Dans les systèmes nanocapsulaires, les substances actives sont généralement incorporées dans le réservoir, mais elles peuvent aussi être associées de façon covalente ou non à la paroi polymérique, soit à la fois dans la membrane et dans le noyau (figure II.6), en fonction de la solubilité de la substance active [72,73]. Par rapport aux nanosphères polymères le taux d'encapsulation dans les nanocapsules est plus important; le noyau solide / huileux des nanocapsules peut effectivement augmenter l'efficacité de chargement du médicament, tout en réduisant la teneur en matrice polymère des nanoparticules [71,74].

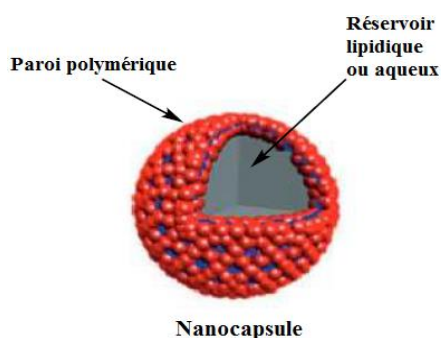


Figure II.5 : Représentation d'une nanocapsule [75].

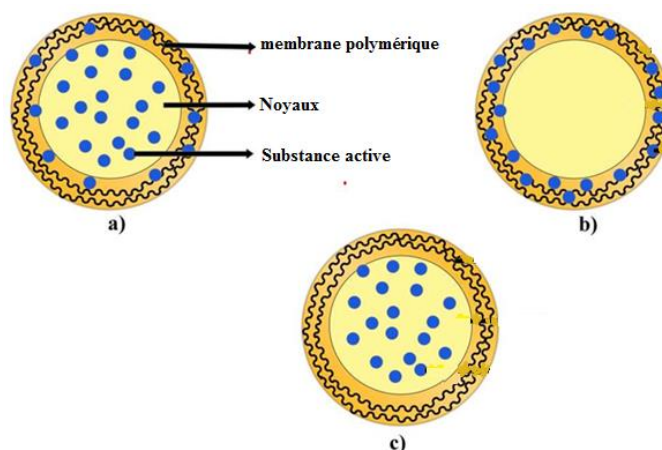


Figure II.6. Nanocapsule contenant une substance active: a) encapsulée dans le noyau et la membrane, b) incorporée dans la membrane, c) dans le noyau.

II.3.1.3. Les méthodes de préparation des nanoparticules polymères

Les techniques de préparation des nanoparticules polymériques sont nombreuses; elles peuvent être regroupées en deux grands procédés [76-78]: Dans le premier, les nanoparticules sont formées par polymérisation de monomères en émulsion ; dans l'autre groupe, les nanoparticules sont préparées à partir de polymères préformés. Ces polymères peuvent être solubles ou insolubles dans l'eau, et ils peuvent être synthétiques, semi-synthétiques (artificiels), ou d'origine naturelle. La plupart des méthodes de synthèse des nanoparticules polymères se déroulent en deux étapes : une étape d'émulsion suivie d'une étape de précipitation, de gélification de polymère ou encore de polymérisation de monomère. En générale, la deuxième étape du processus donne son nom à la méthode [69].

➤ L'obtention des nanoparticules à partir de monomères

L'obtention des nanoparticules, à partir de monomères, peut s'appuyer sur des méthodes de polymérisation ou de polycondensation [79, 80]. La formation de nanoparticules par polymérisation interfaciale se fait généralement en émulsion. Une émulsion est créée entre une phase organique contenant le monomère et une phase aqueuse dispersante. L'une comme l'autre peuvent contenir des tensioactifs. La réaction de polymérisation est initiée par la présence d'un initiateur comme un nucléophile dans le cas des alkylcyanoacrylates [69]. Il se forme alors une couronne polymère à l'interface et la réaction de polymérisation en cascade se propage vers le cœur des gouttelettes.

En contrôlant le temps de réaction, il serait alors théoriquement possible d'obtenir des nanocapsules ou des nanosphères, ce qui n'est pas le cas dans la pratique.

La production de nanoparticules par polycondensation se fait également en émulsion mais dans cette dernière, deux monomères sont nécessaires [81]. Chaque monomère est présent dans l'une des phases. Ces deux monomères réagissent ensemble et polymérisent à l'interface pour conduire à la formation de nanocapsules avec une paroi dont l'épaisseur dépend du temps de réaction. L'incorporation du principe actif peut se faire pendant ou après la synthèse des polymères.

En 1976, cette méthode a été utilisée par Birrenbach et Speiser [61] pour préparer des nanoparticules de polyacrylamide réticulé à partir de l'acrylamide et de N, N'-méthylène bis acrylamide. Puis, Kreuter et Speiser [82] ont fabriqué des particules de PMMA en se basant sur le protocole développé par Birrenbach et Speiser. Ce procédé permet de réaliser la polymérisation du monomère et la formation des nanoparticules en une seule étape. L'emploi des nanoparticules citées précédemment est limité pour des applications en tant que vecteur, car les polymères employés ne sont pas (bio)dégradables. Par conséquent, ils vont s'accumuler dans l'organisme. Pour pallier à ce problème, des nanoparticules bioéliminables à base de PACA ont été développées par Couvreur et al. dès 1979 [62].

➤ **L'obtention des nanoparticules à partir de polymères préformés**

Cette technique présente certains avantages par rapport à la méthode utilisant la polymérisation des monomères, car elle ne nécessite pas d'étape d'élimination des monomères résiduels et des réactifs utilisés pour la synthèse (catalyseur, amorceur, etc...) et les polymères préformés possèdent des propriétés physicochimiques bien définies. De plus, il ne peut pas y avoir de réaction avec le principe actif pendant la préparation des nanoparticules. Ainsi on peut classer les méthodes en deux catégories suivant les étapes mises en jeu. [84, 85].

- Les méthodes directes en une seule étape comme la nanoprécipitation [83] aussi appelée déplacement de solvant ou encore déposition interfaciale ; la nanoprécipitation mise au point par Fessi et ses collègues à la fin des années 1980. Cette méthode est l'une des plus simples, rapides, économiques et plus utilisées pour produire des nanosphères ou des nanocapsules à partir de polymères préformés

- Les méthodes en deux étapes : Ces méthodes nécessitent la préparation d'une émulsion, préalablement à la formation des nanoparticules. Une émulsion est le résultat de la dispersion de gouttelettes d'un solvant A dans une phase continue d'un autre solvant B (non-miscible) ce qui constitue un mélange diphasique liquide-liquide. Les deux solvants ont nécessairement une miscibilité très limitée (voir nulle) entre eux. L'émulsion est thermodynamiquement instable et les phases tendent à revenir à l'équilibre sous l'effet de mécanismes de déstabilisation tels que la floculation, la sédimentation, le crémage ou encore la coalescence [86-88].

Dans ce procédé, la formation des particules polymères peut être provoquée par l'évaporation de solvant organique (émulsioné /vaporation) [89] ou la diffusion de solvant organique vers la phase aqueuse (émulsion/diffusion) [90] ou encore l'ajout d'un agent coacervant (émulsion/coacervation) [91]. Généralement, ces méthodes conduisent à l'obtention de nanosphères, quand elles sont préformées par une simple émulsion O/W. En ajoutant une huile à la solution de polymère, il est possible de former des nanocapsules à coeur lipidique (réservoir huileux). L'obtention de nanocapsules aqueuses est également possible, mais dans ce cas elle se fait par multiples émulsions eau dans huile dans eau (W/O/W) (figure II.7). En général, les nanocapsules créées par multiples émulsions sont plus grosses que celles qui sont créées par les simples émulsions. Ces nanoparticules ont de multiples applications biomédicales, cosmétiques et agroalimentaires [92].

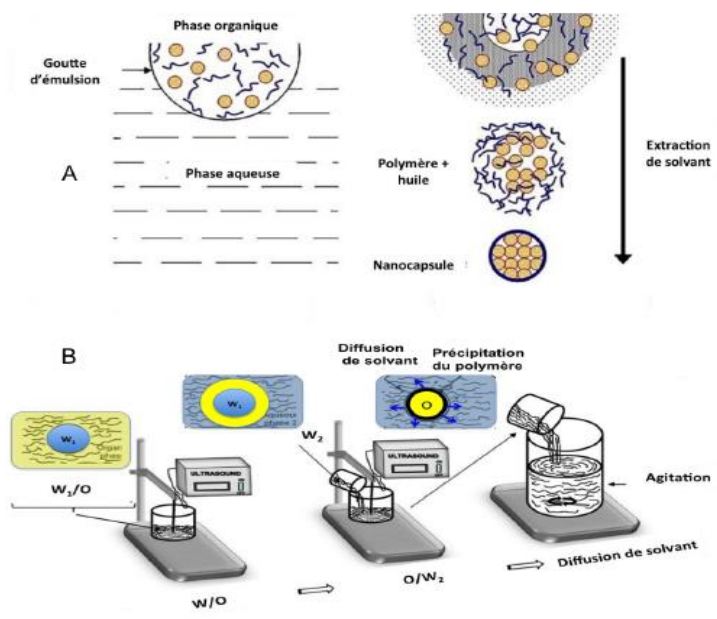


Figure II.7 : Synthèse de nanocapsules par A- simple émulsion huile dans eau et B- double émulsion W1/O/W2 [69].

Le procédé choisi dépend de plusieurs paramètres telles que les propriétés physico-chimiques du polymère utilisé ou monomère, celles de la SA à encapsuler ainsi que de la gamme de tailles d'objets et les applications envisagées [60].

II.3.2. Nanoparticules inorganiques

Outre les nanoparticules organiques, des nanoparticules inorganiques ont été développées également (Figure II-8). Contrairement aux nanoparticules polymères et aux dendrimères qui servent avant tout de « porteur » de substances actives, les nanoparticules inorganiques possèdent en plus, pour la plupart d'entre-elles, les propriétés d'agent d'imagerie et celle d'un agent thérapeutique. Les plus courantes sont les nanoparticules métalliques d'or ou d'argent, les nanoparticules magnétiques, quantum dots, les nanoparticules de silice...[93-96]. Des études récentes ont montré un grand potentiel de ces particules dans la bioimagerie, l'administration de médicaments ciblés et les thérapies contre le cancer [97]. Plusieurs types de nanoparticules inorganiques ont été développés dans un but théranostique [98-100].

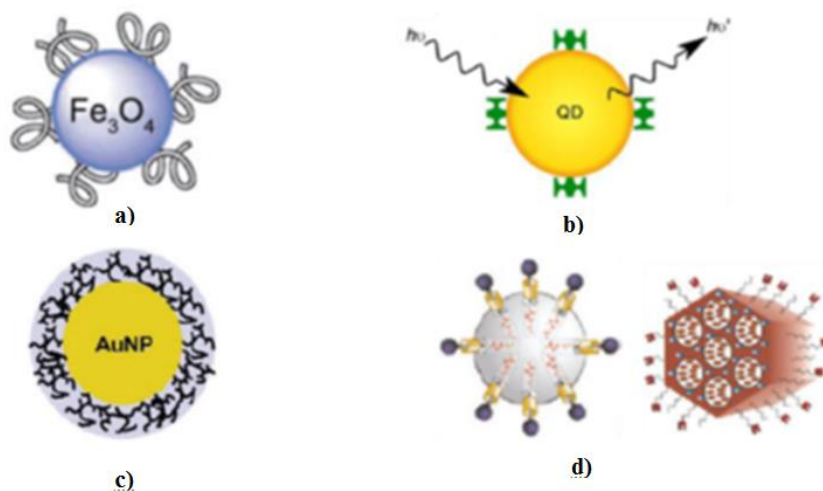


Figure II.8 : Nanoparticules inorganiques a) nanoparticules d'oxyde de fer, b) Quantum Dots (QD), c) nanoparticules d'or (AuNPs), d) nanoparticules de silice (SiNanoparticules).

Les nanoparticules inorganiques ont souvent été élaborées dans le but d'être utilisées pour l'imagerie biomédicale permettant d'être repérées selon leur nature, *via* l'émission de fluorescence (Quantum dots), la microscopie à diffusion de lumière de Rayleigh, l'imagerie par résonance magnétique (IRM) (nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétique SPIONP), l'imagerie tomographique, et l'absorption des rayons X.

II.3.2.1. Puits quantiques (quantum dots)

Parmi les nanoparticules inorganiques largement étudiées, les puits quantiques communément appelés « quantum dots [QD] » [101], ont été découvertes en 1980 par Louis et Brus. Les puits quantiques sont des nanocristaux de semi-conducteurs dont la taille varie de 2 à 10 nm. Leur propriété de fluorescence repose sur un effet de confinement quantique dû au nombre réduit d'atomes dans le cristal. Cette propriété n'est donc pas observée sur le même composé à l'échelle macroscopique. Les quantum dots ont suscité beaucoup d'intérêt dans le domaine de l'imagerie médicale pour leurs propriétés de fluorescence, leur excellente photosensibilité, leur spectre d'émission étroit et ajustable [102].

II.3.2.2. Les nanoparticules d'or

L'avancée rapide des nanotechnologies observée durant cette dernière décennie a permis le développement de différents types de nanoparticules d'or fonctionnalisées pour des applications en thérapie photo-thermique, imagerie moléculaire, bio-détection et en thérapie génétique [103, 104]. Elles peuvent être obtenues dans différentes formes (sphères, bâtonnets, étoiles, cages....) selon les applications souhaitées. Le choix de telle ou telle nanoparticule d'or est important car leur biodistribution est dépendante de leur forme et de leur taille. Les nanoparticules d'or possèdent également de multiples capacités pour des utilisations en oncologie puisque leurs propriétés favorisent la création d'ondes évanescentes de type plasmoniques qui convertit la lumière absorbée en chaleur. Cela permet d'envisager l'utilisation de ces particules pour des applications d'hyperthermie localisée.

II.3.2.3. Les nanoparticules de silice

Depuis plusieurs années, les nanoparticules de silice apparaissent comme des nanovecteurs très prometteurs. En effet, elles ont de nombreux avantages comme d'être stables et de résister à la corrosion dans les milieux physiologiques. Elles sont facilement synthétisables, leur taille peut être contrôlée et elles sont facilement modifiables et fonctionnalisables. De plus, elles peuvent transporter une quantité de principe actif beaucoup plus importante que les nanoparticules organiques [105, 106]. Ces particules représentent ainsi une plateforme d'intérêt pour fixer un large choix de fonction d'imagerie ou thérapeutique et son caractère mésoporeux en fait également un excellent candidat pour la libération contrôlée de médicaments. Dans la littérature, beaucoup d'anti-cancéreux sont encapsulés dans des matrices silicatées, tels que le paclitaxel, la camptothécine, la doxorubicine, le méthotrexate, la colchicine, et l'irinotecan [107-111].

II.3.2.4 Les nanoparticules à base de carbone

La grande diversité de morphologie et de composition des nanoparticules à base de carbone leur confère de grandes propriétés pour les applications médicales [112].

- **Les fullerènes** : sont une famille de composés du carbone dont l'existence a été prédite en 1970 et officiellement prouvée en 1985 [113]. Ces structures peuvent contenir de 28 à 1500 atomes de carbone mais la forme la plus connue est le C₆₀. Cette dernière est sphérique et possède 60 atomes de carbone (figure II.9 (a)). Grâce à leurs caractéristiques physiques, chimiques, propriétés électriques et optiques, les fullerènes et leurs dérivés sont incorporés dans des nouveaux dispositifs ou matériaux [114]. En outre, une modification chimique de la structure va permettre la délivrance ciblée de gènes ou de médicaments.

- **Les nanotubes de carbone** : Découvertes en 1990, sont des feuilles de graphène cylindriques (figure II.9 (b)). Les nanotubes de carbone ont suscité un intérêt particulier dans la communauté scientifique de par leurs propriétés physiques mécaniques, électroniques et chimiques remarquables. Du fait de leur cavité interne et leur grande surface spécifique, les nanotubes de carbone semblent être le vecteur idéal pour la délivrance de médicaments. Les nanotubes peuvent être utilisés comme sonde pour l'imagerie médicale [115].

- **Les nanofeuillets de carbone** : Le graphite est composé d'une série de couches superposées d'un réseau hexagonal d'atomes de carbone dont chaque atome est lié à 3 carbones voisins dans un réseau planaire. Lorsque ces couches sont séparées en monocouche, d'épaisseur de l'ordre du nanomètre, il est possible d'obtenir des feuillettes de graphène (figure II.9 (c)). De même que pour les fullerènes, une fonctionnalisation aisée de ce composé va permettre des applications en théranostic (délivrance de médicaments) [116].

Ces nanoparticules ont été étudiées *in vitro* et *in vivo* et ont montré une cytotoxicité significative, avec un effet important lié à la forme et la taille [117].

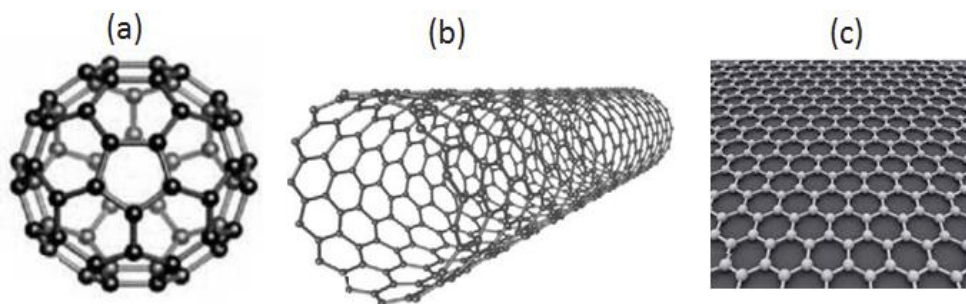


Figure II.9: Représentation schématique des nanoparticules à base de carbone [112]:

(a) fullerène C₆₀ (b) nanotubes de carbone (c) nanofeuillets de carbone.

II.3.2.5. Nanoparticules magnétiques

Les nanoparticules magnétiques sont formées d'un noyau métallique magnétiquement actif (fer essentiellement, mais aussi cobalt, nickel) ; celles à base d'oxydes de fer sont les plus utilisées en médecine. L'intérêt de ce type d'objets réside dans la possibilité d'exercer à distance une force sur ces particules par l'application d'un champ magnétique. Les oxydes de fer sont les matériaux magnétiques les plus connus et les plus étudiés, car ils sont présents dans la nature, ils sont faciles à synthétiser et à faibles coûts. Les particules magnétiques connaissent un formidable essor depuis les années 50, notamment grâce à la découverte par Louis Néel des étonnantes propriétés magnétiques des nanoparticules d'oxyde de fer [118]. Les nanoparticules d'oxyde de fer de taille inférieure ou égale à 20 nm sont caractérisées par un comportement superparamagnétique [119] : lorsqu'elles sont soumises à un champ magnétique extérieur, les nanoparticules peuvent aligner leur moment magnétique dans la direction du champ et lorsque le champ extérieur disparaît, les NPs perdent leur aimantation immédiatement, c'est-à-dire qu'elles ont un temps de relaxation nul.

Les oxydes de fer existent sous différentes formes dans la nature, et les plus communes sont: la magnétite (Fe_3O_4), la maghémite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), et l'hématite ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$). La magnétite est un oxyde de fer noir possédant les propriétés de magnétisme les plus élevées [120-122]. La magnétite est constituée d'un mélange de FerIII et de FerII qui peut s'oxyder avec le temps tandis que les nanoparticules de maghémite présentent l'avantage d'être plus stables chimiquement, car c'est la forme oxydée de la magnétite. Ces deux composés présentent une structure cristalline de type spinelle inverse et leurs propriétés magnétiques sont similaires. La magnétite et la maghémite sont les oxydes de fer les plus couramment utilisés pour les applications biomédicales [123 ,125].

Les nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques désignées par le terme SPION (Super Paramagnetic Iron Oxide Nanoparticles) possèdent des propriétés magnétiques uniques qui font d'elles des matériaux avancés candidats pour la biomédecine, sont biocompatibles et biodégradables ; donc non toxiques. Au cours de la dégradation, les ions Fe libres n'augmentent pas sensiblement la teneur en fer contenu dans le corps et s'incorporent naturellement dans l'hémoglobine. Ils sont alors dégradés par des voies normales de recyclage du fer. Selon Mahmoudi et al., [121], le but ultime de l'utilisation de nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétique en biomédecine est de réduire la souffrance des patients en appliquant des traitements sélectifs où l'efficacité est par l'amélioration de site des

concentrations, tandis que les effets secondaires généraux sont évités; en outre, par exemple la métastase des cellules cancéreuses est limitée.

II.3.2.5.1. Principaux procédés de synthèse des nanoparticules magnétiques

De nombreuses voies de synthèse de nanoparticules dédiées à des applications biomédicales ont été étudiées et sont référencées dans la littérature, dont on peut trouver quelques revues complètes [126-128] ; en résumé, il y a deux sens d'approches : « bottom-up » et « top-down ». L'approche « top-down » consiste à réduire la taille des grosses particules qui ont une dimension supérieure au micromètre (matériau massif) par divers moyens en vue d'obtenir des nanocristaux et en revanche l'approche « bottom-up » qui consiste à obtenir des nanocristaux à partir d'une solution (à partir d'atomes ou molécules) par différents processus (figure II.10). Dans ce paragraphe, nous citons les différentes méthodes de synthèse de nanoparticule à base d'oxyde de fer rencontrées dans la littérature et nous développons que la méthode utilisée dans ce travail « Coprécipitation ».

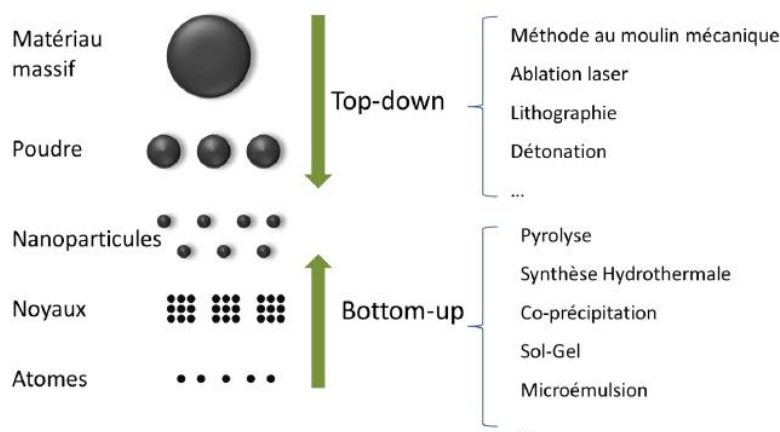


Figure II.10: Deux approches de synthèse des nanomatériaux.

Les nombreuses méthodes de fabrication mises au point à ce jour permettent l'obtention d'une large gamme de nanoparticules en termes de taille, forme, matériaux et donc propriétés magnétiques. Le procédé de fabrication idéal est celui qui permet la fabrication simple, peu coûteuse et à grande échelle de nanoparticules parfaitement monodisperses.

Les particules magnétiques d'oxydes de fer peuvent être obtenues selon différentes voies de synthèse comme la décomposition thermique, microémulsions, méthode Sol-gel, le procédé polyols, hydrothermale, la synthèse sono-chimique, la co-précipitation [129-131].

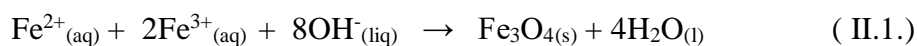
Chaque méthode offre des avantages et des inconvénients qui lui sont propres. Par exemple, la décomposition thermique permet d’obtenir des particules avec une distribution de taille étroite et un grand éventail de tailles possibles, mais utilise des solvants et parfois des complexes toxiques, ainsi que des conditions de travail nécessitant des installations de sécurité. La coprécipitation produit, quant à elle, une grande quantité de particules, déjà dispersées en milieu aqueux. Il est courant qu’une seule synthèse en laboratoire puisse fournir quelques grammes de nanoparticules, chose rare dans le milieu des synthèses colloïdales. Le tableau I.1 récapitule les caractéristiques des procédés de synthèses les plus utilisés.

Tableau II.1 : Les principales caractéristiques des méthodes les plus courantes de synthèse des nanoparticules d’oxydes de fer [132,133].

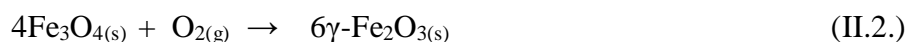
Méthode de synthèse	Conditions	Temps de réaction	Température T (°C)	Solvant	Taille (nm)	Distribution de taille	Contrôle de la morphologie	Rendement
Coprécipitation	Très simple	Minutes	20-90	eau	< 20	Passable	Moyen	élevé
Microémulsion	Complicé	Dizaines de minutes	20-50	eau/ organique	< 50	Relativement étroite	Bon	passable
Polyol	Très simple	Dizaines de minutes	>180	organique	<10	Relativement étroite	très bon	moyen
Hydrothermale	Simple haut pression	Heures	>200	eau eau/éthanol	<1000	Relativement étroite	très bon	moyen
Décomposition thermique	Complicé	Heures	200-350	organique	<40	Très étroite	très bon	élevé

La méthode la plus courante, la plus employée, et également la plus simple pour la production de nanoparticules magnétiques est la technique chimique de co-précipitation, connue sous le nom de procédé Massart [134]. C’est la méthode qui a attiré notre attention, et qui a été retenue dans notre travail pour l’élaboration des nanoparticules magnétiques à base d’oxydes de fer. Elle sera développée en détail dans la suite.

La co-précipitation est la première méthode de synthèse de nanoparticules développée par R. Massart dans les années 80 [134] et encore actuellement la plus utilisée [135-140] par les équipes travaillant sur les nanoparticules d’oxydes de fer magnétiques. Cette méthode de synthèse consiste à ajouter une base comme l’ammoniaque ou l’hydroxyde de sodium à une solution aqueuse saline de Fe²⁺/Fe³⁺ sous atmosphère inerte à température ambiante ou élevée, selon la réaction typique :



Cependant, du fait d'une importante réactivité de surface et de leurs petites tailles, les nanoparticules d'oxyde de fer formées (magnétite) vont pouvoir partiellement s'oxyder en maghémite en présence de dioxygène selon l'équation II.2.



La taille des particules, comprise entre 5 et 20nm, la forme (sphérique, cubique ou hexagonale) et la composition des nanoparticules obtenues dépendent beaucoup des conditions expérimentales comme le type de sels, le ratio $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$, la température, la base utilisée et sa vitesse d'ajout... etc. Une fois les conditions fixées, ce type de synthèse est très reproductible et permet de préparer de façon contrôlée des nanoparticules de différentes tailles et peu disperses. Mais cette méthode présente le désavantage de former des nanoparticules assez polydisperses et qui s'agrègent facilement.

Ces deux principaux défauts : la polydispersité et l'agrégation des nanoparticules obtenues pourraient être limités par la stabilisation des nanoparticules en solution aqueuse. La fonctionnalisation des nanoparticules d'oxyde de fer par un enrobage polymérique ou l'ajout d'un ligand (particules hybrides) représente l'une des techniques utilisables pour éviter leurs inconvénients.

II.3.2.5.2. Applications biomédicales des nanoparticules magnétiques d'oxyde de fer

Grace aux propriétés intéressantes des nanoparticules d'oxyde de fer (biodégradabilité, biocompatibilité et toxicité contrôlée dans le corps humain), la magnétite et la maghémite sont prometteuses pour des applications biomédicales. En fonction du type de champ magnétique employé, les nanoparticules magnétiques peuvent être utilisées dans plusieurs domaines de la médecine, comme illustré figure II.11 :

- Elles sont utilisées en tant qu'agents de contraste pour l'imagerie par résonance magnétique (IRM) en présence d'un champ magnétique permanent d'intensité élevée (0,1 à 7 Teslas) [128, 141-143]. Cette technique d'imagerie médicale permet d'observer les tissus mous du corps. Cependant, dans certains cas, le contraste de l'image est insuffisant pour différencier les zones saines des zones malades, d'où l'utilisation de ces agents de contraste. Par exemple dans le cas du foie, les zones saines absorbent les nanoparticules. Elles apparaissent alors en sombre sur l'image. En revanche, les nanoparticules ne pénètrent pas les

tumeurs, qui apparaissent donc en clair. Les nanoparticules magnétiques sont notamment utilisées en IRM seules ou fonctionnalisées par de ligands de ciblage ou incorporées dans des nanoparticules encapsulant un principe actif pour un suivi d'imagerie [144]. Depuis 1996, un type de nanoparticules d'oxyde de fer est approuvé par la FDA pour des applications en imagerie : Le Feridex® (Bayer) [145].

- Lorsqu'un gradient de champ magnétique est appliqué, les nanoparticules d'oxyde de fer peuvent être utilisées pour un guidage magnétique de substances actives. Dans ce cas, les substances actives peuvent être greffées à la surface des nanoparticules par réaction d'amination ou co-encapsulées avec des oxydes de fer dans des matrices polymères. Les nanoparticules magnétiques superparamagnétiques combinées avec d'autres vecteurs (liposome, polymère, silice) permettent la délivrance de médicaments localement (vectorisation magnétique) et à une cible définie [146-148].

- L'application la plus particulière de ces nanoparticules est l'hyperthermie. Ce type de thérapie a la même finalité que celle présentée précédemment, mais utilise une élévation de la température, entre 42,5 °C et 44 °C, induisant ainsi la destruction des cellules malades. Cela consiste à provoquer, par un champ magnétique alternatif un échauffement local grâce à des nanoparticules situées dans la zone à traiter [125, 128, 143].

L'hyperthermie magnétique semble être une approche thérapeutique prometteuse en système à délivrance de médicaments, mais afin de permettre un passage en clinique, une meilleure compréhension du comportement des NP magnétiques pendant l'effet d'hyperthermie magnétique est nécessaire [149-151]. La modulation des paramètres structuraux tels que la taille, de la composition, de la forme et de l'anisotropie de forme peut être utilisé pour améliorer la performance d'hyperthermie magnétique des SPIONP et permettre des applications *in vivo* efficaces.

- Ces nanoparticules sont également très utilisées dans les traitements anticancéreux par radiothérapie (destruction des cellules tumorales et/ou délivrance de médicaments) par hyperthermie magnétique en présence d'un champ magnétique alternatif d'intensité plus faible (10 – 15 mT).

- Les propriétés des nanoparticules magnétiques ont donné naissance à une nouvelle plateforme d'applications en biomédecine, appelée théranostique du fait que les nanoparticules soient exploitables pour des usages simultanément en diagnostic et en thérapeutique. Elles sont alors qualifiées d'hybrides. La plupart de ces nanoparticules combinent des performances en imagerie avec des performances en traitement du cancer.

Parmi elles on peut citer l'idée d'encapsuler dans un même objet plusieurs nano-objets remplissant des fonctions différentes, comme des nanoparticules magnétiques pour guider l'ensemble via un champ magnétique, des molécules thérapeutiques ainsi que des nanoparticules fluorescentes pour la visualisation de l'objet [152].

Aussi, de nombreuses études sont réalisées à l'heure actuelle sur des nanoparticules d'oxyde de fer [153 ,154] aux propriétés magnétiques intéressantes : ces nanoparticules sont à la fois utilisées en tant qu'agents de contraste pour l'IRM et en tant qu'agents thérapeutiques. Leurs propriétés magnétiques autorisent leur guidage dans le corps par l'action d'un champ magnétique, visant à concentrer les nano-objets dans les zones cibles, puis à réaliser une thérapie par hyperthermie en provoquant leur échauffement sous l'action d'un champ magnétique plus intense.

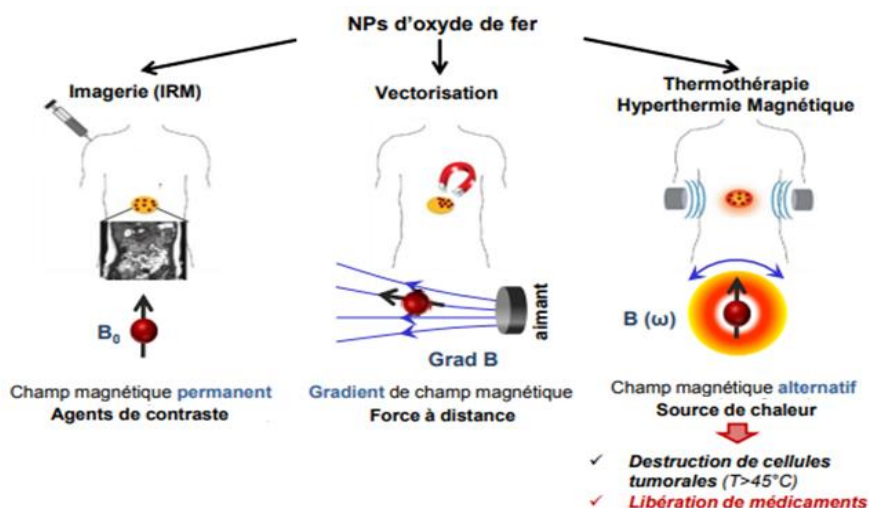


Figure II.11: Applications biomédicales des nanoparticules magnétiques d'oxyde de fer.

Un grand nombre de nanoparticules inorganiques sont étudiées en tant que vecteur de principe actif, mais la plupart d'entre elles nécessitent des modifications chimiques en vue d'une compatibilité biologique accrue ; par exemple enrobage de certaines nanoparticules inorganiques par des polymères biocompatibles, ou sont greffés par PEG en leurs surface, on parle alors de **matériaux hybrides** (inorganique/organique).

II.3.3. Nanoparticules hybrides

Ces nanoparticules sont constituées d'une combinaison d'une nanostructure inorganique avec une nanostructure organique. Les polymères représentent la partie organique et la partie inorganique est constituée de nanoparticules inorganiques, à base d'oxydes

métalliques (SiO_2 , Fe_2O_3 , Fe_3O_4 , TiO_2 , ZnO), de la silice, de quantum dots, de métaux nobles (or, argent) et d'autres métaux (cuivre, zinc, cobalt) et non-métaux (sélénium). Les nanoparticules hybrides combinent les propriétés intrinsèques des différents matériaux, donc est une association à l'échelle nanométrique ou moléculaire de composantes généralement organiques et inorganiques. Leur matrice polymère permet d'encapsuler et de libérer de grandes quantités de substances actives, alors que les nanoparticules inorganiques peuvent générer de la chaleur (NPs d'oxyde de fer, d'or), émettre de la fluorescence (quantum dots).

Parmi les NPs inorganiques les plus utilisées pour le traitement anticancéreux: les quantum dots (QD), les NPs d'or et les oxydes métalliques magnétiques. Toutes ces NPs présentent des propriétés physiques particulièrement intéressantes pour les applications biomédicales. Citons par exemple, les nanoparticules de silice dopées [155] par des chromophores fluorescents utilisés surtout pour des applications en imagerie biologique [156]. Ces nanoparticules présentent une forte intensité d'émission, une solubilité remarquable dans l'eau, une bonne photostabilité et une surface facilement fonctionnalisable.

Les structures multifonctionnelles des nanoparticules peuvent être présentées sous différentes structures: La structure homogène; les nanoparticules de type « cœur-coquille »; les nanoparticules multicouches: la diversité des couches inorganiques et/ou organiques va permettre d'accroître les propriétés des particules. Ces différentes structures des particules sont illustrées dans la figure II.12.

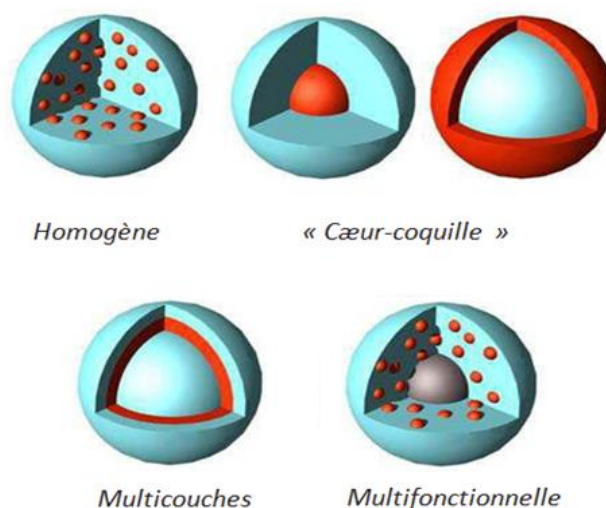


Figure II.12 : Exemples des différentes architectures de nanoparticules hybrides (bleu : composante inorganique / rouge : composante organique).

II.3.4. Stratégies de ciblage

Comme nous venons de le voir, les nanoparticules et la chimie qui y est associée permettent de multiplier les approches pour la délivrance de principes actifs ou le ciblage de certaines zones de l'organisme. Pour ce faire, l'adressage des particules et des éventuelles molécules actives qu'elles véhiculent est primordial. Deux types de cibrages sont possibles : le ciblage passif et le ciblage actif.

II.3.4.1. Ciblage passif

Dans un tissu tumoral, le développement des vaisseaux sanguins croît de manière anarchique, sous le nom d'angiogenèse tumorale. Ce phénomène crée une perméabilité vasculaire significative des vaisseaux sanguins entraînant des anomalies anatomiques et physiopathologiques. Cette porosité des vaisseaux au niveau des jonctions cellulaires endothéliales permet un approvisionnement continu en nutriments et induit une croissance accélérée des cellules tumorales. Ce phénomène engendre une augmentation de la rétention des composés plasmatiques, des macromolécules et des nanoparticules dans les tissus tumoraux. Une déficience du système lymphatique est observée entraînant l'extravasation et l'accumulation dans les tumeurs, cet effet est appelé Enhanced Permeability and Retention (EPR) [157, 158]. La dénomination 'passive' signifie que le vecteur ne développe pas d'interactions particulières avec son environnement et que l'accumulation des NPs au niveau de leur cible se produit uniquement par diffusion. Il existe plusieurs médicaments à base de nanovecteurs commercialisés utilisant ce mode de ciblage, on peut citer par exemple des liposomes chargés en doxorubicine (Doxil®/Caelyx®) [159] ou des nanoparticules d'albumine contenant du paclitaxel (Abraxane®) [160]. L'accumulation de ces vecteurs au sein de tumeurs est assurée par la perméabilité accrue des vaisseaux sanguins grâce à l'effet EPR [161].

Le ciblage passif nécessite l'utilisation de composés stables, non agrégés et présentant un temps de circulation suffisamment long pour conduire à l'accumulation du composé dans les tumeurs. Il nécessite aussi que les composés aient une taille appropriée qui ne dépasse pas la taille de pores des vaisseaux perméabilisés et qui ne soit pas trop petite.

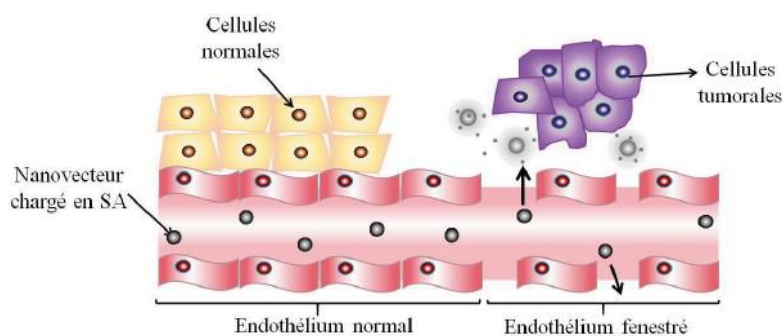


Figure II.13: Ciblage passif des cellules cancéreuses grâce à l’effet EPR.

Le ciblage passif reste insuffisant, une partie non négligeable des molécules anticancéreuses se distribuant dans l’organisme. C’est pourquoi la plupart des nanovecteurs développés récemment ajoutent une stratégie de ciblage actif biochimique et/ou physique à la formulation.

II.3.4.2. Ciblage actif

Il s’agit d’habiller les vecteurs avec une molécule permettant une meilleure reconnaissance des cibles tumorales, notamment des ligands spécifiques de certains récepteurs surexprimés au niveau des cellules tumorales [162]. Ces ligands peuvent aider au ciblage des cellules tumorales, mais aussi faciliter l’entrée des nanovecteurs au sein de ces cellules. La cible biologique des vecteurs doit être accessible et surexprimée à la surface des cellules et à proximité de la circulation sanguine. L’agent de ciblage ou ligand doit posséder une grande sélectivité et une forte affinité pour sa cible biologique [163]. L’exemple le plus connu est l’utilisation de l’acide folique, son récepteur étant très largement surexprimé dans bon nombre de types de cancers.

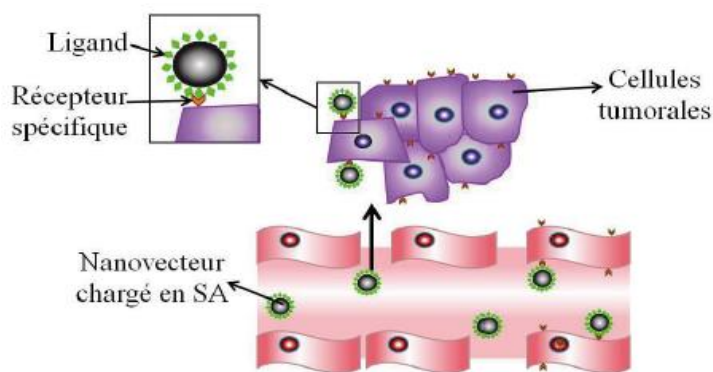


Figure II.14 : Ciblage actif des cellules cancéreuses.

À côté de ce ciblage actif de nature biologique, s'est développé dans les années 70, le concept de ciblage physique, au moyen d'un champ magnétique appliqué au niveau des tumeurs. La vectorisation magnétique repose sur l'utilisation de nanoparticules magnétiques, classiquement à base d'oxydes de fer [164]. Après injection systémique, l'application d'un champ magnétique externe focalisé sur la tumeur permet de retenir les nanovecteurs au niveau de l'environnement tumoral. Il s'agit d'utiliser la force magnétique pour guider mécaniquement un vecteur thérapeutique jusqu'à sa cible. On peut citer, par exemple, les travaux d'Alexiou *et coll.* sur des nanoparticules d'oxyde de fer enrobées par des dérivées saccharidiques [165]. Leur étude a montré qu'un gradient de champ magnétique fort, appliqué au niveau d'une tumeur, permettait l'accumulation préférentielle des nanoparticules. Des images de microscopie électronique en transmission ont confirmé l'accumulation du ferrofluide au niveau des tissus tumoraux. Le principe de ce ciblage actif macroscopique est schématisé par la figure II.15.

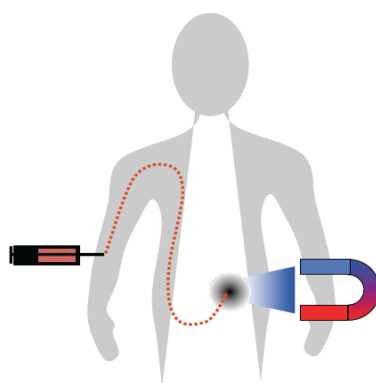


Figure II.15 : principe de la vectorisation magnétique d'agents anticancéreux, utilisant des vecteurs magnétiques injectables et un champ magnétique externe appliqué au niveau de la tumeur cible.

Bien que le concept soit simple, il existe un grand nombre de variables qui compliquent la mise en œuvre de cette technique. Les propriétés physico-chimiques des nanoparticules magnétiques, la force et la géométrie du champ, la profondeur et la vascularisation du tissu à cibler ainsi que le débit sanguin sont autant de paramètres qui influencent fortement l'efficacité de cette méthode.

II.3.5. Les différentes générations des vecteurs des médicaments

Aujourd'hui, on parle de première, de deuxième, de troisième et de quatrième génération de nano-vecteurs en fonction de leur biodistribution *in vivo* [166].

II.3.5.1. Vecteurs de première génération

Cette génération présente des vecteurs chargés en drogue mais sans aucune propriété de furtivité ni de ciblage (vésicules nues); c'est la génération la plus connue et la plus accessible. Ils sont administrés par voie intraveineuse et sont reconnus comme corps étrangers en induisant leur recouvrement par des opsonines plasmatiques. Ces vecteurs seront directement éliminés par endocytose dans les macrophages hépatiques. Leur utilisation reste limitée car ils s'accumulent dans le foie et la rate et ne permet que de retarder l'élimination par voie rénale des principes actifs encapsulés par la nanoparticule. La taille des NPs doit toutefois être suffisamment petite pour qu'elles ne restent pas bloquées dans les plus petits vaisseaux sanguins.

II.3.5.2. Vecteurs de seconde génération

Les mécanismes naturels de métabolisation et d'élimination limitent l'activité thérapeutique et/ou diagnostic des agents injectés par les vecteurs de la première génération. Pour ce faire, il a été nécessaire de développer de nouvelles stratégies afin d'augmenter la durée de vie des nanoparticules dans la circulation sanguine. Cette 2^{ème} génération s'agit d'une modification chimique de la surface des nano-transporteurs par des agents de furtivité, celles-ci pourront s'accumuler dans les tissus tumoraux par l'effet EPR. Le recouvrement des vecteurs est d'origine polymère avec des polymères hydrophiles, tels que le poly(éthylène glycol) (PEG) et des polysaccharides. Cette fonctionnalisation permet de prolonger le temps de demi-vie plasmatique en induisant une augmentation du temps de résidence dans la circulation sanguine générale.

Ainsi, pour faciliter leur accumulation dans un tissu donné, il est indispensable de fonctionnaliser leur surface avec des ligands biologiques qui seront reconnus par les cellules composant le tissu d'intérêt. La 3^{ème} génération de vecteurs fut alors créée.

II.3.5.3. Vecteurs de troisième génération

Les vecteurs de troisième génération sont recouverts de marqueurs de ciblage et de reconnaissance ; leurs surface doit être fonctionnalisée par des ligands biologiques qui seront reconnus par les cellules constituant le tissu d'intérêt. Ces ligands peuvent être des anticorps, des peptides, des saccharides ou d'autres molécules comme l'acide folique. Ce type de recouvrement induit un ciblage actif des vecteurs pour les cellules tumorales possédant des

récepteurs surexprimés. Cette génération de vecteurs permet d'augmenter l'efficacité anti-tumorale en favorisant l'internalisation cellulaire des NP. L'ajout de ligands à la surface favorise généralement leur capture par les macrophages. C'est pourquoi il est important d'associer les agents de ciblage aux agents de furtivité afin de contrebalancer cet effet.

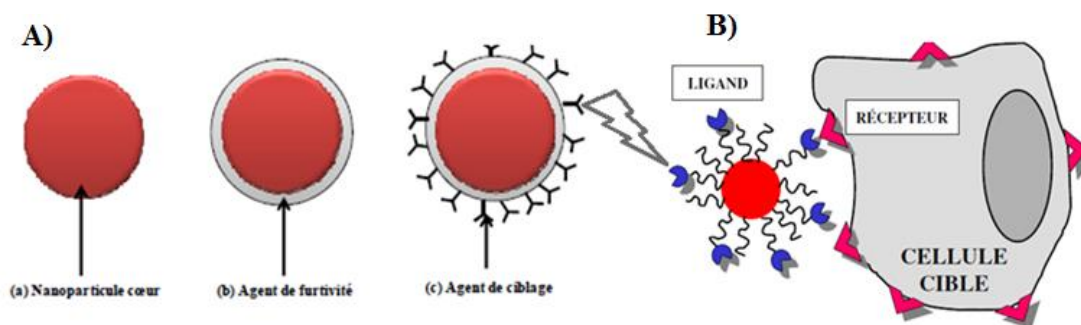


Figure II.16: A) Schéma illustrant l'évolution des nanoparticules (a) 1^{er} génération de vecteurs, (b) 2^{ème} génération et (c) 3^{ème} génération de vecteurs. B) Représentation schématique d'un nanovecteur équipé d'un ligand (anticorps, protéine, petite molécule) capable de reconnaître un récepteur exprimé à la surface de la cellule cible.

II.3.5.4. Vecteurs de quatrième génération

Ces vecteurs de dernière génération sont des vecteurs dits « intelligents » en contrôlant la libération des principes actifs au niveau des tissus tumoraux, sont des vecteurs sensibles à leur environnement. Ces vecteurs améliorent le ciblage et l'efficacité anti-tumorale en empêchant la libération prématurée des anticancéreux encapsulés dans la circulation sanguine. L'incorporation d'agents d'imagerie tels que les agents fluorescents, les agents de contraste, et des éléments radioactifs permet de suivre en temps réel le devenir des nano-objets dans le corps humain. Ces vecteurs, permettent le diagnostic, le ciblage, et la thérapie des cellules tumorales.

Le concept de particules multifonctionnelles, considérées comme idéales, représente un agent injectable combinant diagnostic et thérapie. Ce concept de NP multifonctionnelle décrit par Mauro Ferrari [167] prend en compte toutes les considérations citées précédemment et est illustré dans la figure II.17.

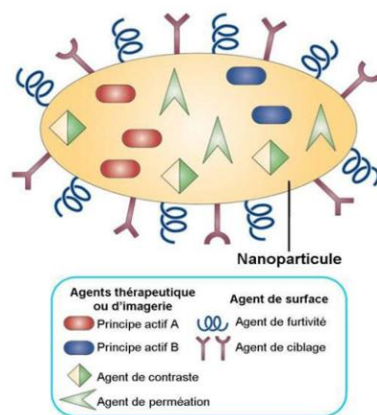


Figure II.17 : Nanoparticule multifonctionnelle [167].

La nanoparticule constitue alors une plateforme d'assemblage sur laquelle viennent s'ajouter des agents de furtivité, des agents de ciblage, des agents de perméation, des agents de contraste et des agents thérapeutiques. Il est ainsi possible d'obtenir un grand nombre de nanoparticules aux propriétés modulables.

Le poly(éthylène glycol) (PEG) est apparu dans un premier temps comme le candidat idéal pour conférer une certaine furtivité aux NVs et avec lui est née une génération d'objets PEGylés, ayant une persistance sanguine plus importante par rapport à leurs homologues non-recouverts [168]. Cependant cette furtivité dépend de l'épaisseur et de la densité du recouvrement en chaînes PEG. De plus, l'absence de groupements réactifs à la surface de ces objets peut rendre difficile le couplage chimique des anticorps ou des ligands spécifiques des tissus tumoraux, essentiel pour améliorer le ciblage des cellules cancéreuses [169].

C'est une des raisons pour lesquelles les polysaccharides ont été considérés comme de bons candidats pour remplacer le PEG à la surface des nanovecteurs. La présence des plusieurs fonctions hydroxyle sur leur dorsale permet en effet d'envisager une modification ultérieure de la surface des vecteurs. De plus, leur biocompatibilité et biodégradabilité en font des biomatériaux de choix pour la vectorisation de principes actifs par voie intraveineuse.

II.4. Nanosystèmes de polymère magnétique

II.4.1. Généralités

De nos jours, les polymères occupent une part très importante dans le domaine médicale, mais, généralement les polymères disponibles ne sont pas suffisants pour répondre aux exigences de ce domaine. Il est alors nécessaire de développer de nouveaux matériaux présentant des propriétés exceptionnelles et avec une grande facilité de mise en œuvre par la

combinaison des propriétés de différents matériaux, qu'ils soient organiques ou inorganiques, pour arriver au produit voulu. C'est dans ce cadre que s'inscrit la synthèse de matériaux hybrides organiques/inorganiques. En effet, l'inclusion de nanoparticules métalliques dans des polymères est connue pour apporter au matériau des propriétés intéressantes; par exemple, la dispersion de nanoparticules métalliques au sein d'une matrice polymère permet d'améliorer ses propriétés mécaniques par rapport au polymère pur. Aussi, l'inclusion des particules magnétiques dans un polymère, avaient pour but de conférer des propriétés magnétiques au matériau final [125]. Les nombreux avantages des nanoparticules polymères et des nanoparticules magnétiques justifient de leurs multiples intérêts pour la communauté scientifique, technologique et médicale.

Les nanoparticules polymères magnétiques sont des systèmes nanoparticulaires hybrides constituées d'une association entre une partie organique de polymères et une partie inorganiques dans laquelle cette partie minérale correspond à des nanoparticules magnétiques. Dans le domaine des systèmes d'administration de médicaments, l'association de propriétés magnétiques dans des micro / nanoparticules présente plusieurs intérêts. Les propriétés magnétiques de ces matériaux confèrent aux vecteurs une fonctionnalité qui ouvre des perspectives vers des nouvelles applications thérapeutiques originales, comme le ciblage par guidage magnétique et la magnétocytolyse induite par hyperthermie, et diagnostics, comme le contraste en imagerie par résonance magnétique (IRM) [170-172]. Le principal avantage offert par ces systèmes est la possibilité de cibler spécifiquement les substances actives dans des tissus ou des organes malades, réduisant ainsi les doses injectées: réduisant les effets secondaires et en les libérant de manière contrôlée, donc ; tout en améliorant l'efficacité globale du diagnostic ou de la thérapie.

L'utilisation directe de nanoparticules magnétiques via le flux sanguin est strictement interdite, en raison de possibilité de l'agglomération de particules qui provoque des embolies [173]. Pour prévenir leur agglomération dans le milieu biologique et leur capture par les cellules du système SPM (système de phagocytoses mononuclées), leur surface peut être recouverte de polymères (PEG, de dextrane, chitosan, PEI (polyéthylèneimine)...) ou des lipides [6]. Pour ce motif, un de nos objectifs a été d'encapsuler les nanoparticules magnétiques à base d'oxyde de fer dans des nanoparticules/nanocapsules de polymère.

La particule hybride composée d'une partie magnétique à base d'oxyde de fer et d'une partie polymérique (biodégradable, biocompatible) offre de meilleures performances. En

effet, la partie magnétique peut orienter l'ensemble vers sa cible au moyen d'un champ magnétique externe, ce qui aide à minimiser les effets secondaires du médicament. Le rôle de la partie polymérique sera la protection, le transport et la libération contrôlée du médicament.

II.4.2. Les morphologies des particules de polymère magnétiques

Les particules de polymère magnétiques à base d'oxyde de fer peuvent être synthétisées en même temps, en parallèle ou encore l'une en présence de l'autre. Il existe donc quatre méthodes de synthèse de particules composites à base d'oxyde de fer :

- a. Assemblage de particules d'oxydes de fer et de polymère préalablement formés ;
- b. Formation d'oxydes de fer en présence de particules de polymère ;
- c. Formation de particules de polymère en présence d'oxydes de fer ;
- d. Formation de polymère et d'oxydes de fer simultanément.

La dernière technique ne sera pas développée car les paramètres permettant de contrôler la morphologie sont trop nombreux.

Ces nanosystèmes hybrides peuvent être synthétisés sous différentes formes. En effet, de nombreuses morphologies différentes sont à distinguer. D'autre part, les nanoparticules magnétiques sont dispersées ou encapsulées dans la matrice polymère, ou peuvent être situées sur la surface des particules polymériques. D'autre part, des particules cœur-coquille sont obtenues dans lesquelles le cœur est constitué d'une unique nanoparticule d'oxyde de fer et la coquille est formée à l'aide d'une membrane polymère ou aussi, le polymère est greffé (par une liaison chimique) à la surface des particules magnétiques.

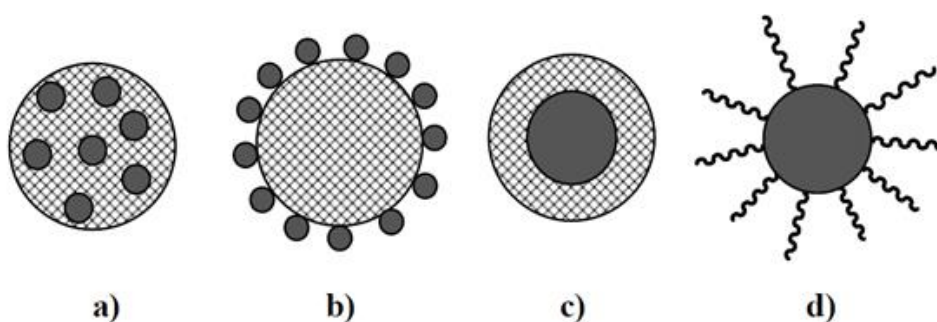


Figure II.18 : Morphologies de positionnement des nanoparticules magnétiques par rapport au polymère: **a)** les nanoparticules magnétiques sont dispersés dans la matrice polymère; **b)** les NPMs sont adsorbées à la surface des particules de polymère; **c)** les systèmes de type noyau-coquille; **d)** le polymère est greffé à la surface des particules magnétiques.

Afin de conférer la propriété magnétique aux nanoparticules polymères par l'incorporation des matériaux sensibles au stimulus magnétique (nanoparticules d'oxyde de fer) au sein des nanoparticules polymères, donc, conférant la sensibilité à l'ensemble de la nanoparticule.

L'exemple le plus abouti concerne la fabrication de nanoparticules sensibles à l'application d'un champ magnétique [127,174], l'un des stimulus les plus étudiés. Initialement développée pour les liposomes magnétiques, pour lesquels des essais cliniques avancés sont en cours [172], cette approche a été appliquée avec succès aux nanoparticules polymères magnétiques. Les nanoparticules polymères sont rendues magnétiques soit en recouvrant un cœur magnétique (constitué par exemple de magnétite, Fe_3O_4 , ou de maghémite, Fe_2O_3) d'une couche polymère, soit en encapsulant, au sein d'un cœur polymère, des nanocristaux magnétiques de quelques nanomètres de diamètre. Si le champ magnétique appliqué est continu, il est ainsi possible de guider ces nanoparticules au plus près de la tumeur, simplement en positionnant un aimant à proximité de celle-ci, permettant alors une accumulation accrue des nanoparticules à ce niveau [175]. Si le champ magnétique est alternatif, ces mêmes nanoparticules vont alors générer de la chaleur dans le milieu environnant et permettre ainsi une hyperthermie sélective des tumeurs, sous réserve de leur accumulation dans celles-ci [176]. Il est également possible de combiner les deux modes d'application du champ magnétique (guidage magnétique puis hyperthermie) afin d'améliorer l'efficacité du traitement.

II.4.3. Propriétés magnétiques des nanoparticules

II.4.3.1 Principaux types de comportements magnétiques des nanoparticules

Un atome libre est dit magnétique s'il porte un moment magnétique permanent qui possède un module constant. Un matériau est formé d'atomes magnétiques ou non magnétiques et l'aimantation du matériau est la résultante de ces moments magnétiques. Les moments magnétiques dépendent de l'environnement magnétique de chaque atome, à savoir la nature et la position des atomes voisins, la température et le champ magnétique appliqué. Les principaux types de comportements magnétiques que l'on peut rencontrer dans la matière sont : le diamagnétisme, le paramagnétisme, le ferromagnétisme et le superparamagnétisme qui nous intéressent plus particulièrement.

- **Le diamagnétisme**

Le diamagnétisme décrit le magnétisme de substances formées d'atomes sans moments magnétiques. L'aimantation M , induite par un champ magnétique appliqué H , est très faible et s'oppose à ce dernier. La susceptibilité magnétique χ , c'est à dire la pente de la courbe d'aimantation $M(H)$ ($\chi = dM/dH$) est négative.

- **Le paramagnétique**

Le paramagnétisme décrit le magnétisme dans un matériau où les moments magnétiques des atomes sont désordonnés et sans corrélation. La susceptibilité paramagnétique χ_p est toujours positive.

- **Le ferromagnétisme**

Certains matériaux possèdent une aimantation spontanée, il s'agit du ferromagnétisme et du superparamagnétisme. L'aimantation spontanée M_0 de certains matériaux peut-être expliquée par la mise en ordre des moments magnétiques ; les matériaux mettent en évidence un comportement collectif des moments magnétiques qui est induit par des interactions entre moments voisins, c'est le ferromagnétisme. Il correspond à un alignement parallèle de tous les spins, au moins en moyenne.

- **Le superparamagnétisme**

En 1949, Néel montra que des petites particules nanométriques pouvaient présenter un état magnétique original dans lequel les moments magnétiques portés par chaque particule se comportent comme les moments magnétiques portés par les atomes d'un matériau paramagnétique. Cet état fut par la suite nommé superparamagnétisme. Le comportement des nanoparticules est alors assimilé à un seul spin "géant". Il s'agit d'un comportement caractéristique des nanoparticules, essentiellement des particules mono domaines.

II.4.3.2. Cycle d'hystérésis

La mesure de l'aimantation du matériau en fonction du champ appliqué permet de déterminer les propriétés magnétiques du matériau. Le cycle d'hystérésis est obtenu en mesurant l'aimantation du matériau sous l'application d'un champ magnétique décroissant puis croissant. Il permet de définir les principaux paramètres qui définissent les propriétés magnétiques des matériaux : **l'aimantation à saturation M_s** est l'aimantation maximale du matériau ($H \rightarrow \infty$), c'est une propriété intrinsèque du matériau, **l'aimantation rémanente**

M_R est l'aimantation résiduelle après coupure du champ appliqué (aimantation quand $H = 0$), et le **champ coercitif H_C** est le champ à appliquer afin de retrouver une aimantation nulle du matériau ($M = 0$), le **champ d'anisotropie H_s** correspond au champ de fermeture du cycle (champ de saturation pour lequel $M = MS$).

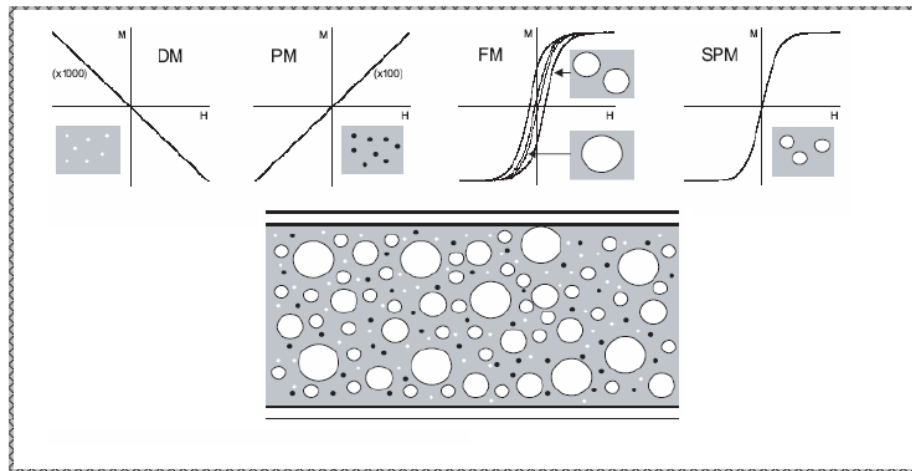


Figure II.19 : Illustration hypothétique de la réponse magnétique de nanoparticules se trouvant dans un vaisseau allant du nanomètre au micromètre, dans le cas de matériel diamagnétique (DM), paramagnétique (PM), ferromagnétique (FM) et superparamagnétique (SPM) (d'après [177]).

II.5. Conclusion

Les nanoparticules d'oxydes de fer possèdent de nombreuses applications, majoritairement dans le domaine biomédical. Pour de telles applications, les particules doivent être encapsulées pour éviter tout relargage. L'encapsulation la plus courante est celle par des polymères, car elle permet l'accès direct à de nombreuses propriétés.

L'utilisation des systèmes nanoparticulaires hybrides composés de polymères et de nanoparticules magnétiques suscite d'immenses espoirs pour le traitement de maladies graves, notamment les pathologies cancéreuses. Au cours des dernières décennies, différents types de nanoparticules polymères ont été développés (simples, « furtives », ciblées, sensibles à un stimulus endogène ou exogène, et prodrogues) dans le but de proposer de nouvelles thérapies anticancéreuses plus efficaces et plus sûres.

Références bibliographiques

- [1] Minru Xiong G.; Venkatraman K.; Venkatraman S. *The magic bullet as cancer therapeutic—has nanotechnology failed to find its mark?. Prog. Biomed. Eng*, **2020**. (2),4, 042004.
- [2] Pai-Dhungat P.V.; Parikh F.; Ehrlich P. (1854-1915). *J Assoc Physicians India*. **2015**;63(3):78-9. PMID: 26540853
- [3] Ramalingam V.; Raja S.; Sundaramahalingam T. S.; and Rajaram R. *Chemical fabrication of graphene oxide nanosheets attenuates biofilm formation of human clinical pathogens. Bioorg. Chem*. **2019**, 83, 326–335.
- [4] Prasad M.; Lambe U. P.; Brar B.; Shah I. J, M.; Ranjan K. Prasad G. *Nanotherapeutics: An insight into healthcare and multi-dimensional applications in medical sector of the modern world. Biomedicine & Pharmacotherapy*. **2018**, 97, 1521–1537.
- [5] Hartshorn C. M.; Bradbury M. S.; Lanza G. M.; Nel A. E.; Rao J.; Wang A. Z. Grodzinski, P. *Nanotechnology Strategies to Advance Outcomes in Clinical Cancer Care. ACS Nano*, **2017**, 12(1), 24–43.
- [6] Patra J. K.; Das G.; Fraceto L. F.; Campos E. V. R.; Rodriguez-Torres M. del P.; Acosta-Torres L. S.; Shin, H.-S. *Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. Journal of Nanobiotechnology*, **2018**, 16(1).
- [7] Senapati S. ; Mahanta AK. ; Kumar S. ; Maiti P. *Controlled drug delivery vehicles for cancer treatment and their performance. Signal Transduct Target Ther* **2018**, 3,7.
- [8] Getts DR.; Shea LD.; Miller SD.; King NJ. *Harnessing nanoparticles for immune modulation. Trends Immunol* **2015**, 36:419-27.
- [9] Du J. ; Zhang YS. ; Hobson D. ; Hydring P. *Nanoparticles for immune system targeting. Drug Discov Today* **2017**;22:1295-30.
- [10] Sussman E. ; Clark M and Shastri VP. *Functionalized polymeric nanoparticles. MRS Proceedings* **2011**; 818: M12.9.1.
- [11] Durán V.; Yasar H.; Becker J.; Thiagarajan D.; Loretz B.; Kalinke U.; Lehr C.M.; *Preferential uptake of chitosan-coated PLGA nanoparticles by primary human antigen presenting cells. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, **2019**; 102073.
- [12] Chowdhury A.; Kunjiappa S.; Panneerselvam T. ; Somasundaram B.; Bhattacharjee C. *Nanotechnology and nanocarrier-based approaches on treatment of degenerative diseases. International Nano Letters*, **2017** ; 7(2), 91–122.
- [13] Wang M.; Thanou M. *Targeting nanoparticles to cancer. Pharmacol. Res*. **2010**, 62, 90-99.
- [14] Fornaguera C.; Garcia-Celma M.J. *Personalized Nanomedicine: A Revolution at the Nanoscale. J. Pers. Med*. **2017**,7,12.
- [15] Pano Costa J.; Carvalho S.; Jesus S.; Soares E.; Marques AP.; Borges O. *Optimization of chitosan-alpha-casein nanoparticles for improved gene delivery: characterization, stability, and transfection efficiency. AAPS Pharm Sci Tech*, **2019**; 20:132.
- [16] Zepeda-Cervantes J.; Cruz-Resendiz A. ; Sampieri A. ; Carreon-Napoles R. ; Sanchez-Betancourt JI. ; Vaca L. *Incorporation of ORF2 from porcine circovirus type 2(PCV2) into genetically encoded nanoparticles as a novel vaccine using a self-aggregating peptide. Vaccine*, **2019** ; 37:1928–1937.
- [17] Strebhardt K.; Ullrich, A. *Paul Ehrlich's magic bullet concept: 100 years of progress. Nature Reviews Cancer*, **2008**, 8(6), 473–480.
- [18] Valent P.; Groner B. ; Schumacher U. ; Superti-Furga G. ; Busslinger M. ; Kralovics R. Sörgel F. *Paul Ehrlich (1854-1915) and His Contributions to the Foundation and Birth of Translational Medicine. Journal of Innate Immunity*, **2016**. 8(2), 111–120.

- [19] Couvreur P. Nanoparticles in drug delivery: Past, present and future. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **2013**, 65(1), 21–23.
- [20] Zhang L. ; Gu F. X. ; Chan J. M. ; Wang A. Z. ; Langer R. S. ; Farokhzad O.C. Nanoparticles in Medicine: Therapeutic Applications and Developments, *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, **2008**, 83, 761-769.
- [21] Kreuter J. Nanoparticles a historical perspective. *Int. J. Pharm.* **2007**, 331(1), 1– 10.
- [22] Steichen SD.; Caldorera-Moore M.; Peppas NA. A review of current nanoparticle and targeting moieties for the delivery of cancer therapeutics. *Eur J Pharm Sci Off J Eur Fed Pharm Sci.* **2013**, 48(3): 416–27.
- [23] Fu C.; Ding C.; Sun X.; Fu A. Curcumin nanocapsules stabilized by bovine serum albumin-capped gold nanoclusters (BSA-AuNCs) for drug delivery and theranosis. *Mater. Sci. Eng. C* **2018**, 87, 149–154.
- [24] Liechty W.B. ; and N.A. Peppas. Expert opinion: Responsive polymer nanoparticles in cancer therapy. *Eur J Pharm Biopharm*, **2012**. 80(2): p. 241-6.
- [25] Chenthamara D. ; Subramaniam S. ; Ramakrishnan S.G. ; Krishnaswamy S.; Essa M.M.; Lin F.H and Qoronfleh M.W. Therapeutic efficacy of nanoparticles and routes of administration. *Chenthamara et al. Biomaterials Research.* **2019**, 23:20.
- [26] Lombardo D.; Kiselev M.A. ; and Maria Teresa Caccamo. Smart Nanoparticles for Drug Delivery Application: Development of Versatile Nanocarrier Platforms in Biotechnology and Nanomedicine. *Journal of Nanomaterials.* **2019**, 26.
- [27] Yetisgin A. A.; Cetinel S.; Zuvin M.; Kosa A. ; Kutlu O. Therapeutic Nanoparticles and Their Targeted Delivery Applications. *Molecules.* **2020**, 25(9), 2193.
- [28] Freire W. P.; Fook M. V. L. ; Barbosa E. F. ; dos S. Araújo C. ; Barbosa R. C. ; Pinheiro Í. M. F. . Biocompatibility of Dental Restorative Materials. *Materials Science Forum.* **2014**, 805,19–25.
- [29] Williams D. F. Specifications for Innovative, Enabling Biomaterials Based on the Principles of Biocompatibility Mechanisms. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology.***2019**, 7.
- [30] Lombardo D.; Kiselev M.A.; Caccamo M.T. "Smart Nanoparticles for Drug Delivery Application: Development of Versatile Nanocarrier Platforms in Biotechnology and Nanomedicine". *Journal of Nanomaterials.* **2019**, 26.
- [31] Caminade A-M. ; Turrin C-O. Dendrimers for drug delivery. *J Mater Chem B.* **2014**, 2(26): 4055–66.
- [32] Bozzuto G. ; Molinari A. Liposomes as nanomedical devices. *International Journal of Nanomedicine.* **2015**, 975.
- [33] Akbarzadeh A.; Rezaei-Sadabady R.; Davaran, S. ; Joo S. W.; Zarghami N.; Hanifepour Y. Nejadi-Koshki K. Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Research Letters*, **2013**. 8(1), 102.
- [34] Daraee H.; Etemadi A.; Kouhi M. ; Alimirzalu S. ; Akbarzadeh A. Application of liposomes in medicine and drug delivery. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, (**2014**). 44(1), 381–391.
- [35] Matalanis A.; Jones O.G.; McClements D.J. ; Structured biopolymer-based delivery systems for encapsulation, protection, and release of lipophilic compounds. *Food Hydrocolloids* **2011**, 25, (8), 1865-1880.
- [36] Bartelds R. ; Nematollahi MH. ; Pols T. ; Stuart M C A. ; Pardakhty A. ; Asadikaram G. ; Niosomes P.B. An alternative for liposomal delivery. *PLOS ONE.* **2018**. 13(4), e0194179.
- [37] Riaz M. ; Riaz M. ; Zhang X. ; Lin C. ; Wong K. ; Chen X. Yang, Z. Surface Functionalization and Targeting Strategies of Liposomes in Solid Tumor Therapy: A Review. *International Journal of Molecular Sciences.* **2018**, 19(1), 195.
- [38] Liechty W.B. ; and N.A. Peppas. Expert opinion: Responsive polymer nanoparticles in cancer therapy. *Eur J Pharm Biopharm*, **2012**, 80(2),241-6.
- [39] Torchilin V.P.; Nanocarriers N. *Pharmaceutical Perspectives. Pharmaceutical Research* **2007**, 24(1), 1-16.

- [40] Sosnik A.; Menaker Raskin M. Polymeric micelles in mucosal drug delivery: Challenges towards clinical translation. *Biotechnology Advances*. **2015**. 33(6), 1380–1392.
- [41] Ghezzi S. ; Pescina S. ; Padula C. ; Santi P. ; Del Favero E. ; Cantù L. ; Nicoli S. Polymeric micelles in drug delivery: An insight of the techniques for their characterization and assessment in biorelevant conditions, *Journal of Controlled Release*. **2021**. 332, 312-336.
- [42] Abbasi E.; Aval S.; Akbarzadeh A ; Milani M. ; Nasrabadi H. ; Joo S. Pashaei-Asl R. Dendrimers: synthesis, applications, and properties. *Nanoscale Research Letters*. **2014**. 9(1), 247.
- [43] Gillani S.S. ; Munawar M.A. ; Khan K.M. ; Chaudhary J.A. Synthesis, characterization and applications of poly-aliphatic amine dendrimers and dendrons. *Journal of the Iranian Chemical Society*. **2020**, 17, 2717–2736.
- [44] Caminade A-M. ; Turrin C-O. Dendrimers for drug delivery. *J Mater Chem B*. 2014, 2(26): 4055–66.
- [45] Begines B.; Ortiz T.; Pérez-Aranda M.; Martínez G; Merinero M.; Argüelles-Arias F.; Alcudia A. Polymeric Nanoparticles for Drug Delivery: Recent Developments and Future Prospects. *Nanomaterials*. **2020**, 10(7), 1403.
- [46] Couvreur P.; Kante B.; Roland M.; Guiot P.; BAuduin P.; Speiser P. Polycyanoacrylate Nanocapsules as Potential Lysosomotropic Carriers Preparation, Morphological and Sorptive Properties. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **1979**. 31(5), 331-332.
- [47] Pérez-Herrero E.; Fernández-Medarde A. Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. **2015**. 93, 52–79.
- [48] Matalanis A.; Jones O.G.; McClements D.J. ; Structured biopolymer-based delivery systems for encapsulation, protection, and release of lipophilic compounds. *Food Hydrocolloids* **2011**, 25 (8), 1865-1880.
- [49] Saravanakumar G.; Jo D. G.; Park J. H. Polysaccharide-Based Nanoparticles: A Versatile Platform for Drug Delivery and Biomedical Imaging. *Current Medicinal Chemistry* **2012**, 19 (19), 3212-3229.
- [50] Liu Z.; Jiao Y.; Wang Y.; Zhou C.; Zhang Z. Polysaccharides-based nanoparticles as drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*. **2008**, 60, (15), 1650-1662.
- [51] Elzoghby A.O.; Samy W.M.; Elgindy N.A. Protein-based nanocarriers as promising drug and gene delivery systems. *Journal of Controlled Release*. **2012**, 161(1), 38-49.
- [52] Elzoghby A. O. Gelatin-based nanoparticles as drug and gene delivery systems: Reviewing three decades of research. *Journal of Controlled Release* **2013**, 172 (3), 1075-1091.
- [53] Dash T. K.; Konkimalla V.B. Poly-E-caprolactone based formulations for drug delivery and tissue engineering: A review. *Journal of Controlled Release*. **2012**, 158, (1), 15-33.
- [54] Chiellini E.; Covolan V.L.; Orsini L.M.; Solaro R. Polymeric nanoparticles based on polylactide and related copolymers. *Macromolecular Symposia*. **2003**, 197(1), 345-354.
- [55] Danhier F.; Ansorena E.; Silva J.M.; Coco R.; Le Breton A.; Preat V. PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications. *Journal of Controlled Release* **2012**, 161, (2), 505-522.
- [56] Nicolas J.; Couvreur P. Synthesis of poly(alkyl cyanoacrylate)-based colloidal nanomedicines. *Wiley Interdisciplinary Reviews-Nanomedicine and Nanobiotechnology* **2009**, 1 (1), 111-127.
- [57] Zhang L. ; Gu F. X. ; Chan J. M. ; Wang A. Z. ; Langer R. S. ; Farokhzad O.C. Nanoparticles in Medicine: Therapeutic Applications and Developments, *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, **2008**, 83, 761-769.
- [58] Heffernan M. J. ; Murthy N. Polyketal Nanoparticles: A New pH-Sensitive Biodegradable Drug Delivery Vehicle. *Bioconjugate Chemistry*. **2005**. 16(6), 1340–1342.
- [59] Lukaszewicz S.; Szczepanowicz K.; Podgorna K.; Blasiak E.; Majeed N.; Ogren S.O.O.; Nowak W.; Warszynski, P.; Dziedzicka-Wasylewska M. Encapsulation of clozapine in polymeric nanocapsules and its biological effects. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2016**, 140, 342–352.

- [60] Rao J.P. ; and Geckeler K.E. *Polymer Nanoparticles: Preparation Techniques and Size-Control Parameters. Progress in Polymer Science.* **2011.** 36, 887-913.
- [61] Birrenbach G. ; and Speider P. *Polymerized micelles and their use as adjuvants in immunology. Journal of Pharmaceutical Sciences,* **1976,** 65(12), 1763-1766.
- [62] Couvreur P. ; Roland M and Speiser P. *Submicroscopic biodegradable particles containing a biologically-active substance .1979, BE 869107.*
- [63] Paillard A. ; Passirani C. ; Saulnier P. ; Kroubi M. ; Garcion E. ; Benoit J.P. ; and Betbeder D. ; *Positively-charged, porous, polysaccharide nanoparticles loaded with anionic molecules behave as 'stealth' cationic nanocarriers. Pharm Res.* **2010.** 27, 126-133.
- [64] Asif M. ; Arayne M.S. ; Sultana N. ; and Hussain F. *Fabrication of nanoparticles within polymeric pores for controlled release of drug. Pak J Pharm Sci.* **2006.** 19, 73-84.
- [65] Suk J.S. ; Xu Q. ; Kim N. ; Hanes J. ; Ensign L. M. *PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery. Advanced Drug Delivery Reviews.* **2016.** 99, 28–51.
- [66] Toub N. ; Malvy C. ; Fattal E. ; Couvreur P. *Innovative nanotechnologies for the delivery of oligonucleotides and siRNA. Biomedicine & Pharmacotherapy.* **2006.** 60(9), 607–620.
- [67] Kuzmov A. ; Minko T. *Nanotechnology approaches for inhalation treatment of lung diseases. Journal of Controlled Release.* **2015,** 219, 500–518.
- [68] Tang Z. ; He C. ; Tian H. Ding J. ; Hsiao B. S. ; Chu B. ; Chen X. *Polymeric nanostructured materials for biomedical applications. Progress in Polymer Science.* **2016,** 60, 86–128.
- [69] Vauthier C. ; and Bouchemal K. *Methods for the preparation and manufacture of polymeric nanoparticles. Pharm Res.* **2009,** 26, 1025-1058.
- [70] Rață D.M.; Cadinoiu A.N.; Atanase L.I.; Bacăița S.E. ; Mihalache C. ; Daraba O.M. ; Popa M. . “*In vitro*” behaviour of aptamer-functionalized polymeric nanocapsules loaded with 5-fluorouracil for targeted therapy. *Materials Science and Engineering: C,* **2019,** 103, 109828.
- [71] Deng S.; Gigliobianco M. R.; Censi R.; & Di Martino P. *Polymeric Nanocapsules as Nanotechnological Alternative for Drug Delivery System: Current Status, Challenges and Opportunities. Nanomaterials.* **2020,** 10(5), 847.
- [72] Mora-Huertasa C.E.; Fessi H.; Elaissari A. *Polymer-based nanocapsules for drug delivery, Int. J. Pharm.* **2010,** 385:113-142.
- [73] Kothamasu P.; Kanumur H.; Ravur N.; Maddu C.; Parasuramrajam R.; Thangavel S. *Nanocapsules: the weapons for novel drug delivery systems, Bioimpacts* **2012,** (2) 71–81.
- [74] Pohlmann A.R.; Weiss V.; Mertins O.; Da Silveira N.P.; Guterres S.S. *Spray-dried indomethacin-loaded polyester nanocapsules and nanospheres: Development, stability evaluation and nanostructure models. Eur. J. Pharm. Sci.* **2002,** 16, 305–312.
- [75] Son K. J.; Yoon H.-J.; Kim J.-H.; Jang W.-D.; Lee Y.; & Koh W.-G. *Photosensitizing Hollow Nanocapsules for Combination Cancer Therapy. Angewandte Chemie International Edition* **2011,** 50(50), 11968–11971.
- [76] Amgoth C.; Phan C.; Banavoth M.; Rompivalasa S.; Tang G. *Polymer Properties: Functionalization and Surface Modified Nanoparticles. In Role of Novel Drug Delivery Vehicles in Nanobiomedicine; IntechOpen: London, UK, 2019.*
- [77] Karabasz A.; Bzowska M.; & Szczepanowicz K. *Biomedical Applications of Multifunctional Polymeric Nanocarriers: A Review of Current Literature. International Journal of Nanomedicine .* **2020.** 15, 8673–8696.
- [78] Zielińska A.; Carreiró F.; Oliveira A. M.; Neves A.; Pires B.; Venkatesh D. N.; ... Souto E. B. *Polymeric Nanoparticles: Production, Characterization, Toxicology and Ecotoxicology. Molecules.* **2020,** 25(16), 3731.

- [79] Hu Y.; Daoud W.; Cheuk K.; & Lin C. Newly Developed Techniques on Polycondensation, Ring-Opening Polymerization and Polymer Modification: Focus on Poly(Lactic Acid). *Materials*, **2016**, 9(3), 133.
- [80] Bouchemal K.; Briançon S.; Fessi H.; Chevalier Y.; Bonnet I.; Perrier E. Simultaneous emulsification and interfacial polycondensation for the preparation of colloidal suspensions of nanocapsules, *Materials Science and Engineering C*, **2006**, 26, 472-480.
- [81] Jönsson J. B.; Müllner M.; Piculell L.; & Karlsson O. J. Emulsion Condensation Polymerization in Dispersed Aqueous Media. *Interfacial Reactions and Nanoparticle Formation. Macromolecules*, **2013**. 46(22), 9104–9113.
- [82] Kreuter J and Speiser P. «In vitro studies of poly(methylmethacrylate) adjuvants». *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **1976**, 65(1624 -1627).
- [83] Pinto Reis C.; Neufeld R. J.; Ribeiro A. J.; & Veiga F. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, **2006**, 2(1), 8–21.
- [84] Miladi K.; Sfar S.; Fessi H.; & Elaissari A. Nanoprecipitation Process: From Particle Preparation to In Vivo Applications. *Polymer Nanoparticles for Nanomedicines*, **2016**, 17–53.
- [85] Mora-Huertas C. E.; Fessi H.; & Elaissari A. Influence of process and formulation parameters on the formation of submicron particles by solvent displacement and emulsification–diffusion methods. *Advances in Colloid and Interface Science*, **2011**, 163(2), 90–122.
- [86] Goodarzi F.; & Zendejboudi S. A Comprehensive Review on Emulsions and Emulsion Stability in Chemical and Energy Industries. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, **2018**, 97(1), 281–309.
- [87] Costa C.; Medronho B.; Filipe A et al. Emulsion Formation and Stabilization by Biomolecules: The Leading Role of Cellulose. *Polymers (Basel)*. **2019**, 11(10), 1570.
- [88] Maphosa Y.; & Jideani V. A Factors Affecting the Stability of Emulsions Stabilised by Biopolymers. *Science and Technology Behind Nanoemulsions*. **2018**.
- [89] Keum C.G.; Noh Y.W.; Baek J.S.; Lim J.H.; Hwang C.J.; Na Y.G.; Shin S.C.; Cho C.W. Practical preparation procedures for docetaxel-loaded nanoparticles using polylactic acid-co-glycolic acid. *International Journal of Nanomedicine* **2011**, 6, 2225–2234.
- [90] Konan Y. N.; Cerny R.; Favet J.; Berton M.; Gurny R.; Allemann E. Preparation and characterization of sterile sub-200 nm meso-tetra(4-hydroxyphenyl)porphyrin-loaded nanoparticles for photodynamic therapy. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2003**, 55(1), 115-124.
- [91] Wilson B.; Ambika T.V.; Dharmesh Kumar Patel R.; Jenita J. L.; Priyadarshini S.R.B. Nanoparticles based on albumin: Preparation, characterization and the use for 5-fluorouracil delivery. *International Journal of Biological Macromolecules* **2012**, 51 (5), 874-878.
- [92] Thakur N.; Garg G.; Sharma P.K.; Kumar N. Nanoemulsions: a review on various pharmaceutical application. *Global J. Pharmacol.* **2012**, 6(3), 222-225.
- [93] Sardoiwala M.N.; Kaundal B.; & Roy Choudhury S. Development of Engineered Nanoparticles Expediting Diagnostic and Therapeutic Applications Across Blood–Brain Barrier. *Handbook of Nanomaterials for Industrial Applications*. **2018**, 696–709.
- [94] Li Z.; Barnes J.C.; Bosoy A.; Stoddart J.F.; Zink J.I. Mesoporous silica nanoparticles in biomedical applications. *Chem Soc Rev*. **2012**;41(7), 2590–605.
- [95] Chenthamara D.; Subramaniam S.; Ramakrishnan S.G. et al. Therapeutic efficacy of nanoparticles and routes of administration. *Biomater Res*. **2019**, 23, 20.
- [96] Luchini A.; & Vitiello G. Understanding the Nano-bio Interfaces: Lipid-Coatings for Inorganic Nanoparticles as Promising Strategy for Biomedical Applications. *Frontiers in Chemistry*. **2019**, 7.

- [97] Nasirzadeh K.; Nazarian S.; Gheibi Hayat S. *Inorganic Nanomaterials: A Brief Overview of the Applications and Developments in Sensing and Drug Delivery*. *Journal of Applied Biotechnology Reports*, **2016**, 3(2), 395-402.
- [98] Ang C.Y.; Tan S.Y.; & Zhao Y. *Recent advances in biocompatible nanocarriers for delivery of chemotherapeutic cargoes towards cancer therapy*. *Organic & Biomolecular Chemistry*. **2014**, 12(27), 4776-4806.
- [99] Bayda S.; Hadla M.; Palazzolo S.; Riello P.; Corona G.; Toffoli G.; Rizzolio F. *Inorganic Nanoparticles for Cancer Therapy: A Transition from Lab to Clinic*. *Curr Med Chem*. **2018**, 25(34), 4269-4303.
- [100] Wang F.; Li C.; Cheng J.; Yuan Z. *Recent Advances on Inorganic Nanoparticle-Based Cancer Therapeutic Agents*. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2016**, 13, 1182.
- [101] Smith AM.; Duan H.; Mohs AM.; Nie S. *Bioconjugated quantum dots for in vivo molecular and cellular imaging*. *Adv Drug Deliv Rev*. **2008**, 60(11), 1226-40.
- [102] Brkić S. *Applicability of Quantum Dots in Biomedical Science. Ionizing Radiation Effects and Applications* **2018**.
- [103] Siddique S.; Chow JCL. *Gold Nanoparticles for Drug Delivery and Cancer Therapy*. *Applied Sciences*. **2020**, 10(11), 3824.
- [104] Amina SJ.; Guo B. *A Review on the Synthesis and Functionalization of Gold Nanoparticles as a Drug Delivery Vehicle*. *Int J Nanomedicine*. **2020**, 15, 9823-9857.
- [105] Chen Y.; Gao Y.; Chen H.; Zeng D.; Li Y.; Zheng Y.; et al. *Engineering Inorganic Nanoemulsions/Nanoliposomes by Fluoride-Silica Chemistry for Efficient Delivery/Co-Delivery of Hydrophobic Agents*. *Adv Funct Mater*. **2012**, 22(8), 1586-97.
- [106] Mehmood A.; Ghafar H.; Yaqoob S.; Gohar U.F.; & Ahmad B. *Mesoporous Silica Nanoparticles: A Review*. *Journal of Developing Drugs*, **2017**, 06(02).
- [107] Liu X. et al. *Irinotecan Delivery by Lipid-Coated Mesoporous Silica Nanoparticles Shows Improved Efficacy and Safety over Liposomes for Pancreatic Cancer*. *ACS Nano*. **2016**, 10, 2702-2715.
- [108] Gu J. et al. *Targeted doxorubicin delivery to liver cancer cells by PEGylated mesoporous silica nanoparticles with a pH-dependent release profile*. *Microporous Mesoporous Mater*. **2012**, 161, 160-167.
- [109] Jia L. et al. *In vitro and in vivo evaluation of paclitaxel-loaded mesoporous silica nanoparticles with three pore sizes*. *Int. J. Pharm* **2013**, 445, 12-19.
- [110] Liu Q. et al. *Delivering hydrophilic and hydrophobic chemotherapeutics simultaneously by magnetic mesoporous silica nanoparticles to inhibit cancer cells*. *Int. J. Nanomedicine* **2012**, 7, 999-1013.
- [111] Shreyash N.; Sonker M.; Bajpai S.; and Tiwary S.K. *Review of the Mechanism of Nanocarriers and Technological Developments in the Field of Nanoparticles for Applications in Cancer Theragnostics*. *ACS Applied Bio Material.s* **2021**, 4 (3), 2307-2334.
- [112] Liu Z.; & Liang, X.-J. *Nano-Carbons as Theranostics*. *Theranostics*, **2012**, 2(3), 235-237.
- [113] Kroto H.; Heath J.; O'Brien S. et al. *C₆₀: Buckminsterfullerene*. *Nature*. **1985**, 318, 162-163.
- [114] Zagal J.H.; Griveau S.; Ozoemena K.I.; Nyokong T.; Bedioui F. *Carbon nanotubes, phthalocyanines and porphyrins: attractive hybrid materials for electrocatalysis and electroanalysis*, *J Nanosci. Nanotechnol*, **2009**, 9 (4), 2201-2214.
- [115] Kotchey GP.; Zhao Y.; Kagan VE.; Star A. *Peroxidase-mediated biodegradation of carbon nanotubes in vitro and in vivo*. *Adv Drug Deliv Rev*. **2013**, 65(15), 1921-1932.
- [116] Shen H.; Zhang L.; Liu M.; Zhang Z. *Biomedical Applications of Graphene*. *Theranostics* **2012**, 2(3), 283-294.

- [117] Panessa-Warren B.J.; et al. Biological cellular response to carbon nanoparticle toxicity. *Journal of Physics: Condensed Matter*, **2006**, 18(33), S2185.
- [118] Prévot M.; Dunlop D. Louis Néel: quarante ans de magnétisme. *Phys. Earth Planet. Inter.* **2001**, 126, 7-10.
- [119] Baumgartner J.; Bertinetti L.; Widdrat M.; Hirt A.M.; & Faivre D. Formation of Magnetite Nanoparticles at Low Temperature: From Superparamagnetic to Stable Single Domain Particles. *PLoS ONE*, **2013**, 8(3), e57070.
- [120] Wallyn J.; Anton N.; Vandamme TF. Synthesis, Principles, and Properties of Magnetite Nanoparticles for In Vivo Imaging Applications-A Review. *Pharmaceutics*. **2019**, 11(11), 601.
- [121] Mahmoudi M.; Sant S.; Wang B.; Laurent S. & Sen T. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs): Development, surface modification and applications in chemotherapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2011**, 63, 24–46.
- [122] Ahmadzadeh M.; Romero C.; & McCloy J. Magnetic analysis of commercial hematite, magnetite, and their mixtures. *AIP Advances*. **2018**, 8(5), 056807.
- [123] Ganapathe L.S.; Mohamed M. A.; Mohamad Yunus R.; & Berhanuddin D.D. Magnetite (Fe₃O₄) Nanoparticles in Biomedical Application: From Synthesis to Surface Functionalisation. *Magnetochemistry*, **2020**, 6(4), 68.
- [124] Vallabani N.V.S.; & Singh, S. Recent advances and future prospects of iron oxide nanoparticles in biomedicine and diagnostics. *3 Biotech*, **2018**, 8(6).
- [125] BĂLĂIȚ L.; POPA M. Hybrid polymer particles with magnetic properties for drug delivery. *Rev. Roum.Chim*, **2012**, 57(12), 1003-1011.
- [126] Ling D. et Hyeon T. Chemical Design of Biocompatible Iron Oxide Nanoparticles for Medical Applications. *Small*, **2013**, 9, 19-10.
- [127] Reddy L.H.; Arias J.L.; Nicolas J et P.Couvreur. Magnetic Nanoparticles: Design and Characterization, Toxicity and Biocompatibility, Pharmaceutical and Biomedical Applications. *Chem. Rev.* **2012**, 112.
- [128] Gupta AK.; Gupta M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials*. **2005**, 26(18), 3995-4021.
- [129] Ali A.; Zafar H.; Zia M.; Ul Haq I.; Phull AR.; Ali JS.; Hussain A. Synthesis, characterization, applications, and challenges of iron oxide nanoparticles. *Nanotechnol Sci Appl*. **2016**, 19,9, 49-67.
- [130] Wu W.; Wu Z.; Yu T.; Jiang C.; Kim WS. Recent progress on magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, surface functional strategies and biomedical applications. *Sci Technol Adv Mater*. **2015**, 28,16(2), 023501.
- [131] Majidi S.; Zeinali Sehrig F.; Farkhani S. M.; Soleymani Goloujeh M.; & Akbarzadeh, A. Current methods for synthesis of magnetic nanoparticles. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, **2014**, 44(2), 722–734.
- [132] Wu W.; He Q.; Jiang C. Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis and surface functionalization strategies. *Nanoscale Res Lett*. **2008**, 2;3(11), 397-415.
- [133] Laurent S.; Forge D.; Port M.; Roch A.; Robic C.; Vander Elst L.; Muller RN. Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications. *Chem Rev*. **2008**, 108(6), 2064-110.
- [134] Massart R. Preparation of aqueous magnetic liquids in alkaline and acidic media. *IEEE Transactions On Magnetics*, **1981**, 17(2) :1247–1248.
- [135] Milosevic I.; Motte L.; Aoun B.; Li T.; Ren Y.; Sun C. & Saboungi, M.-L. Effects of coating spherical iron oxide nanoparticles. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj*. **2017**, 3621–3626.

- [136] Saikia C.; Das M. K.; Ramteke A. & Maji T. K. Effect of crosslinker on drug delivery properties of curcumin loaded starch coated iron oxide nanoparticles. *Int. J. Biol. Macromol*, **2016**, 1121–1132.
- [137] Mazuel F.; Espinosa A.; Luciani N.; Reffay M.; Le Borgne R.; Motte L.; Desboeufs K.; Michel A.; Pellegrino T.; Lalatonne Y. & Wilhelm C. Massive Intracellular Biodegradation of Iron Oxide Nanoparticles Evidenced Magnetically at Single-Endosome and Tissue Levels. *ACS Nano* **2016**, 10, 7627–7638.
- [138] Mascolo M. C.; Pei Y. & Ring, T. A. Room Temperature Co-Precipitation Synthesis of Magnetite Nanoparticles in a Large pH Window with Different Bases. *Materials* **2013**, 6, 5549–5567.
- [139] Fazilati M. Folate decorated magnetite nanoparticles: Synthesis and targeted therapy against ovarian cancer. *Cell Biol. Int.* **2014**, 38, 154–163.
- [140] Ramos Guivar J. A.; Sanches E. A.; Bruns F.; Sadrollahi E.; Morales M. A. López, E. O. & Litterst, F. J. Vacancy ordered γ -Fe₂O₃ nanoparticles functionalized with nanohydroxyapatite: RD, FTIR, TEM, XPS and Mössbauer studies. *Appl. Surf. Sci.* **2016**, 389, 721–734.
- [141] Balaceanu A.; Verkh Y.; Kehren D.; Tillmann W.; Pich A. Thermoresponsive Core- Shell Microgels. Synthesis and Characterisation. *Z. Für Phys. Chem.* **2014**, 228 (2–3).
- [142] Wang J.; Zhang B.; Wang L.; Wang M.; Gao F. One-pot synthesis of water-soluble superparamagnetic iron oxide nanoparticles and their MRI contrast effects in the mouse brains, *Materials Science and Engineering: C* **2015**, 48, 416-423.
- [143] Malekigorji M.; Curtis A. D. M.; Hoskins C. The use of iron oxide nanoparticles for pancreatic cancer therapy, *Journal of Nanomedicine Research*, **2014**, 1(1), 00004-00015.
- [144] Dadfar SM.; Roemhild K.; Drude NL.; von Stillfried S.; Knuchel R.; Kiessling F. et al. Iron oxide nanoparticles: Diagnostic, therapeutic and theranostic applications. *Adv Drug Deliv Rev.* **2019**, 138, 302–25.
- [145] Pierre V.C.; Allen M.J. & Caravan P. Contrast agents for MRI: 30+ years and where are we going?. *J Biol Inorg Chem*, **2014**, 19, 127–131.
- [146] Egodawatte S.; Dominguez S. & Larsen S. C. Solvent effects in the development of a drug delivery system for 5-fluorouracil using magnetic mesoporous silica nanoparticles. *Microporous Mesoporous Mater* **2017**, 237, 108–116.
- [147] Polyak B. et al. Magnetic Nanoparticle-Mediated Targeting of Cell Therapy Reduces In-Stent Stenosis in Injured Arteries. *ACS Nano* **2016**, 10, 9559–9569.
- [148] Cruz P.; Pérez Y. & del Hierro, I. Titanium alkoxides immobilized on magnetic mesoporous silica nanoparticles and their characterization by solid state voltammetry techniques: Application in ring opening polymerization. *Microporous Mesoporous Mater.* **2016**, 240, 227–235.
- [149] Lu F.; Popa A.; Zhou S.; Zhu J.-J. & Samia, A. C. S. Iron oxide-loaded hollow mesoporous silica nanocapsules for controlled drug release and hyperthermia. *Chem. Commun.* **2013**, 49, 1–3.
- [150] Pernia Leal M. et al. Controlled Release of Doxorubicin Loaded within Magnetic Thermo-responsive Nanocarriers under Magnetic and Thermal Actuation in a Microfluidic Channel. *ACS Nano* **2012**, 6, 10535–10545.
- [151] Abenojar E. C.; Wickramasinghe S.; Bas-Concepcion J. & Samia, A. C. S. Structural effects on the magnetic hyperthermia properties of iron oxide nanoparticles. *Prog. Nat. Sci. Mater. Int.* **2016**, 26, 440–448.
- [152] Z.Wu, «RBC micromotors carrying multiple cargos towards potential theranostic applications,» *Nanoscale*, **2015**, 7, 13680.
- [153] Liu G.; et al., Applications and Potential Toxicity of Magnetic Iron Oxide Nanoparticles. *Small*, **2013**, 9(9-10), 1533-1545.
- [154] Cole A.J.; et al., Cancer theranostics: the rise of targeted magnetic nanoparticles. *Trends in Biotechnology*, **2011**, 29(7), 323-332.

- [155] Yao G.; Wang L.; Wu Y.; Smith J.; Xu J.; Zhao W.; Lee E.; Tan W. "FloDots: luminescent nanoparticles." *Anal. Bioanal. Chem.* **2006**, 385, 518.
- [156] Biffi S.; Petrizza L.; Rampazzo E.; Voltan R.; Sgarzi M.; Garrovo C.; Prodi L.; L. Andolfi; Agnoletto C.; Zauli G.; Secchiero P. "Multiple dye-doped NIR-emitting silica nanoparticles for both flow cytometry and in vivo imaging" *RSC Adv.* **2014**, 4, 18278.
- [157] Matsumura, Y. & Maeda, H. A new concept for macromolecular therapies in cancer chemotherapy: mechanism of tumouritropic accumulation of proteins and the antitumour agent SMANCS. *Cancer Res.* **1986**, 6, 6387–6392.
- [158] Allen T. M. *Drug Delivery Systems: Entering the Mainstream.* *Science* (80-.). **2004**, 303, 1818–1822.
- [159] Tejada-Berges T.; Granai C. O.; Gordinier M.; et Gajewski W. « Caelyx/Doxil for the treatment of metastatic ovarian and breast cancer », *Expert Review of Anticancer Therapy* **2002**, 2 (2), 143-150.
- [160] Zhang C.; Awasthi N.; Schwarz M.A.; Hinz S.; Schwarz R.E. Superior antitumor activity of nanoparticle albumin-bound Paclitaxel in experimental gastric cancer, *PLoS ONE.* **2013**, 8, e58037.
- [161] Wicki A.; Witzigmann D.; Balasubramanian V.; et Huwyler J. « Nanomedicine in cancer therapy: Challenges, opportunities, and clinical applications », *Journal of Controlled Release* **2015**, 200, 138-157.
- [162] Altintas I.; Kok R.J.; Schiffelers R.M. Targeting epidermal growth factor receptor in tumors: From conventional monoclonal antibodies via heavy chain-only antibodies to nanobodies, *Eur J Pharm Sci.* **2012**, 45 399–407.
- [163] Marelli U. K.; Rechenmacher F.; Sobahi T. R. A.; Mas-Moruno C. & Kessler, H. Tumor Targeting via Integrin Ligands. *Front. Oncol.* **2013**, 3, 1–12.
- [164] Rosen J.E.; Chan L.; Shieh D.B.; Gu F.X. Iron oxide nanoparticles for targeted cancer imaging and diagnostics, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine.* **2012**, 8, 275–290.
- [165] Alexiou C.; Schmid R. J.; R. Jurgons, Kremer M.; Wanner G.; Bergemann C.; Huenges E.; T. Nawroth, Arnold W. and Parak F. G. *European Biophysics Journal with Biophysics Letters*, **2006**, 35, 446-450.
- [166] Mirza A. Z. & Siddiqui F. A. Nanomedicine and drug delivery: a mini review. *Int. Nano Lett.* **2014**, 4, 94.
- [167] Ferrari M. Cancer nanotechnology: opportunities and challenges. *Nature Reviews Cancer*, **2005**, 5, 161–71.
- [168] Kolate A.; Baradia D.; Patil S.; I. Vhora, Kore G.; et Misra A. « PEG — A versatile conjugating ligand for drugs and drug delivery systems », *Journal of Controlled Release* **2014**, 192, 67–81
- [169] Umut E. « Surface Modification of Nanoparticles Used in Biomedical Applications », in *Modern Surface Engineering Treatments*, M. Aliofkhazraei, (Éd) InTech, 2013.
- [170] Al-Rawi N.N.; Anwer B.A.; Al-Rawi N.H.; Uthman A.T. & Ahmed I.S. Magnetism in drug delivery: The marvels of iron oxides and substituted ferrites nanoparticles. *Saudi Pharmaceutical Journal.* **2020**.
- [171] Shabatina T. I.; Vernaya O. I.; Shabatin V. P.; & Melnikov M. Y. Magnetic Nanoparticles for Biomedical Purposes: Modern Trends and Prospects. *Magnetochemistry*, **2020**, 6(3), 30.
- [172] Chouhan R.S.; Horvat M.; Ahmed J.; Alhokbany N.; Alshehri S.M.; Gandhi S. Magnetic Nanoparticles—A Multifunctional Potential Agent for Diagnosis and Therapy. *Cancers* **2021**, 13, 2213.
- [173] Belessi V.; Zboril R; Tucek J.; Mashlan M., Tzitzios V.; Petridis D. Ferrofluids from magnetic-chitosan hybrids. *chem. Mater.* **2008**, 20, 3298–3305
- [174] Ulbrich K.; Holá K.; Šubr V.; et al. Targeted drug delivery with polymers and magnetic nanoparticles: covalent and noncovalent approaches, release control, and clinical studies. *Chem Rev* **2016** , 116 , 5338-431.
- [175] Hua MY.; Liu HL.; Yang HW.; et al. The effectiveness of a magnetic nanoparticle-based delivery system for BCNU in the treatment of gliomas. *Biomaterials* **2011**, 32, 516-27.

[176] Hervault A. Thanh NTK. Magnetic nanoparticle-based therapeutic agents for thermo-chemotherapy treatment of cancer. *Nanoscale* **2014**, 6, 11553-73.

[177] Pankhurst QA.; Conolly J.; Jones SK and Dobson J. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. Topical review. *J Phys D: Appl Phys* **2003**, 36: 167-181.

Partie

expérimentale

Chapitre III

III.1. Introduction

L'objectif général de ce travail est d'obtenir et de caractériser de nouveaux nanosystèmes hybrides magnétiques sous forme de nanoparticules (nanocapsules et nanosphères) capables de lutter contre le cancer. Ces nanosystèmes hybrides peuvent être utilisés à la fois pour l'encapsulation, le transport et la libération d'agents thérapeutiques grâce aux supports polymères et en tant qu'agents de contraste (imagerie) ou source de chaleur (hyperthermie), grâce aux nanoparticules magnétiques. Ces nouveaux systèmes polymères/magnétiques ont la capacité d'incorporer un principe biologiquement actif (5-Fluorouracile) et des nanoparticules magnétiques d'oxyde de fer, et sont sous forme de :

1. Nanocapsules magnétiques où la partie organique est constituée de deux polymères, un copolymère synthétique de poly((N vinylpyrrolidone – *alt* - anhydride itaconique) et un polymère naturel de chitosane; la partie inorganique est composée de nanoparticules magnétiques d'oxyde de fer.

2. Nanosphères magnétiques à base d'un polymère naturel de chitosane, contenant en même temps les nanoparticules magnétiques et un médicament antitumoral 5-Fluorouracile.

La combinaison d'un médicament anticancéreux et des nanoparticules magnétiques dans des nanoparticules polymériques pourrait être une voie de recherche très intéressante pour le développement des futures thérapies anticancéreuses.

Au cours de ce chapitre nous décrirons les différents matériaux, les techniques expérimentales et les méthodes de caractérisations utilisées tout au long de la thèse. Nous donnerons aussi les conditions expérimentales de chaque synthèse, ainsi que le déroulement des tests biologiques.

III.2. Matériel et réactifs

Le matériel utilisé pour préparer les systèmes nanoparticulaires hybrides magnétiques à libération contrôlée ont été achetés auprès d'entreprises spécialisées.

- **Les polymères utilisés**

Les biomatériaux à base de polymères naturels ou synthétiques sont utilisés dans le domaine biomédical depuis l'antiquité et jouent un rôle important dans le succès du développement de dispositifs médicaux et de systèmes de transport et de libération contrôlée de médicaments. Pour obtenir des nouveaux systèmes nanoparticulaires hybrides qui ont des

structures caractérisées par une très bonne stabilité chimique et mécanique, ainsi que par la bioadhésivité et la biocompatibilité. On a utilisé un polymère naturel (Chitosane) et un polymère synthétique [poly (N vinylpyrrolidone – alt - anhydride itaconique)] ayant des applications potentielles en médecine et en biotechnologie.

- **Le chitosane :**

Actuellement, le chitosane (CS) est l'un des polysaccharides très attrayant pour les applications en médecine et en pharmacie (l'administration de médicaments, les pansements, les implants, les lentilles de contact, l'ingénierie tissulaire et l'encapsulation cellulaire....) [1,2] ; Il est l'un des polymères biodégradables les plus développés avec succès ; parmi les nombreux polymères développés pour formuler des nanoparticules polymères, le CS a suscité une attention considérable grâce à ses propriétés attrayantes [3]: biodégradabilité et biocompatibilité, non-toxicité, muco-adhésivité, la portée de la libération prolongée, possibilité de modifier les propriétés de surface et la portée des nanoparticules cibles vers des organes ou des cellules particuliers et aussi la présence des deux types de groupes fonctionnels offrent la possibilité essentielle de participer à plusieurs réactions chimique qui justifie notre choix à ce polymère. La structure chimique de chitosane est présentée dans la figure III.1.

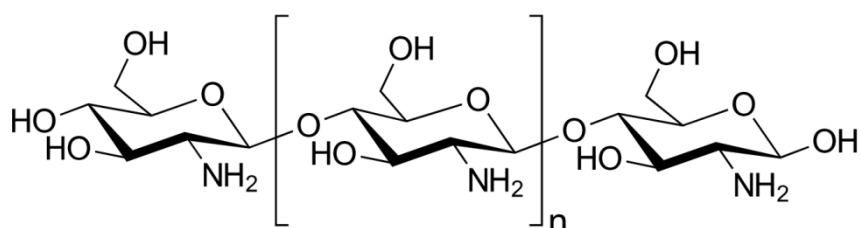


Figure III.1: Structure chimique du chitosane (CS).

- Le chitosane utilisé pour la préparation de nanocapsules magnétiques est de faible poids moléculaire (50,000-190,000 Da) et ayant un degré de désacétylation de 91% (Merck).
- Les nanosphères magnétiques sont préparées à partir de chitosane à faible poids moléculaire avec un degré de désacétylation de 81,5% (CAS 9012-76-4) acheté chez Sigma Aldrich.
- **Poly(N - vinylpyrrolidone – alt - anhydride itaconique) ou poly(NVPAI)**

Le copolymère poly (NVPAI) utilisé pour la préparation de nanocapsules magnétiques a été obtenu par polymérisation radicalaire classique. Ce copolymère a été synthétisé au

laboratoire pour la première fois par Cismaru, L et col [4]. Le procédé de polymérisation en solution/suspension a été réalisé dans de l'acétate d'éthyle en présence d'AIBN (azobisisobutyronitrile) comme initiateur à 70°C pendant 8h. Un mélange d'anhydride itaconique (IA) et de *N*-Vinyl-2-pyrrolidone (NVP) (rapport molaire = 1: 1) a été dissous dans de l'acétate d'éthyle et versé dans un ballon à trois cols équipé d'un condenseur à reflux. Le précipité blanc a été récupéré et versée dans dichlorométhane froid. Le produit a été lavé plusieurs fois au chloroforme afin d'éliminer toute trace de monomères. Enfin, la suspension a été filtrée et séchée sous vide pendant 24 h. La réaction d'obtention du poly(NVPAI) est illustrée dans la figure III.2.

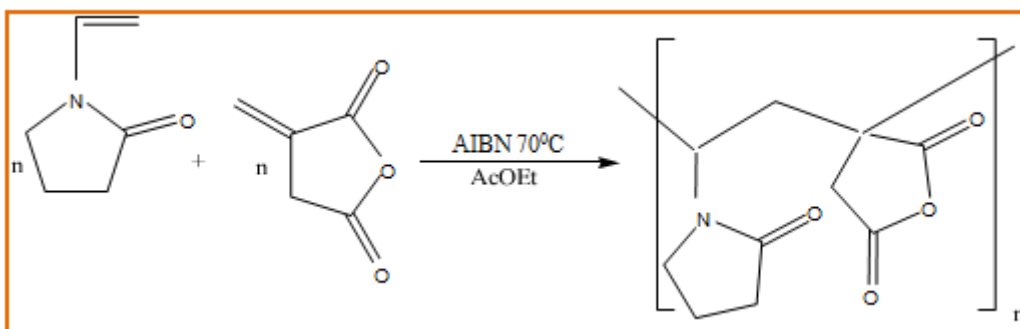


Figure III.2 : La réaction d'obtention du copolymère NVPAI.

Ce copolymère est caractérisé par une réactivité élevée dans des conditions de températures douces sans catalyseurs supplémentaires. Cette propriété est conférée par le cycle d'anhydride qui s'ouvre facilement sous l'action de certains agents nucléophiles comme le groupement amine du chitosane.

❖ **Agents de réticulation:** Les agents de réticulation utilisés pour la préparation de nanosphères magnétiques sont:

- **Un réticulant ionique:** Tripolyphosphate de sodium (TPP) : $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ (CAS 7758-29-4, $M = 367.86 \text{ g/mol}$ Sigma Aldrich, figure III.3)

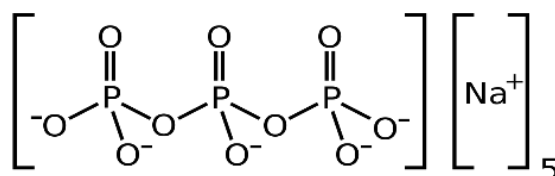


Figure III.3 : structure chimique de TPP ($\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$).

- **Un réticulant covalent:** Glutaraldéhyde (AG) (CAS:111-30-8, figure III.4), $M=100.117\text{g/mol}$, fourni par Sigma Aldrich sous forme de solution aqueuse à 25%; pour être utilisé dans l'émulsion, le Glutaraldéhyde a été extrait d'abord dans de toluène.

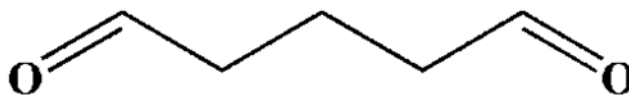


Figure III.4 : structure chimique de Glutaraldéhyde.

❖ **Tensioactifs:**

- **Tween 80**, ($\text{C}_{64}\text{H}_{124}\text{O}_{26}$) ou polysorbate 80: est un surfactant et émulsifiant non ionique pour les phases aqueuses utilisé pour la stabilisation de l'émulsion, avec une masse moléculaire de 1310 g/mol. Dans le cas des présentes synthèses, un produit Merck a été utilisé (lot S5075387 831).

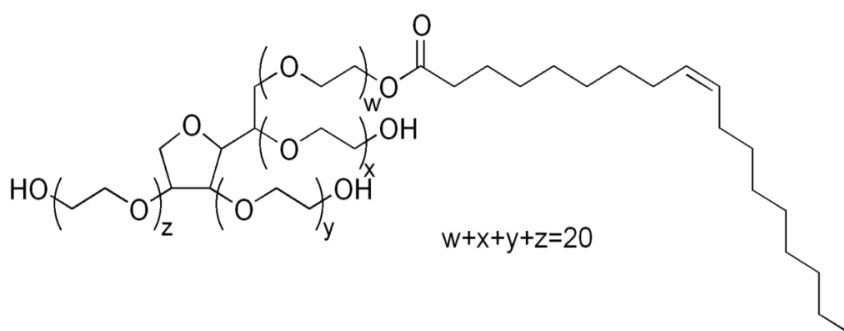


Figure III. 5: Structure chimique de Tween 80.

- **Span 80**, $\text{C}_7\text{H}_{11}\text{O}_6\text{-R}$ ou monooléate de sorbitane c'est un agent émulsifiant, dispersant les phases organiques avec une masse molaire de 428,68 g/mol et point de fusion entre 52-57°C. Un produit Merck (lot S4992423 826) a été utilisé dans notre travail.

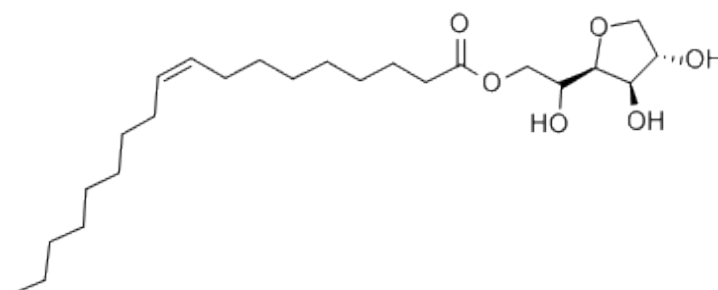


Figure III.6: structure chimique de Span 80.

• **Pluronic F-127:** (Poloxamer 407), l'un des copolymères triblocs Pluronic, peut être utilisé comme matériau biocompatible dans les domaines thérapeutiques et pharmaceutiques [5-8], pluronic F127 est poly(oxyde d'éthylène)(PEO) -poly(oxyde de propylène)(PPO) - poly(oxyde d'éthylène)(PEO) avec une structure chimique $PEO_{99}PPO_{65}PEO_{99}$ et une masse molaire de 12600g/mol, il est utilisé comme tensioactif non ionique pour stabiliser les particules de magnétite [9, 10]. Produit fourni par Merck.

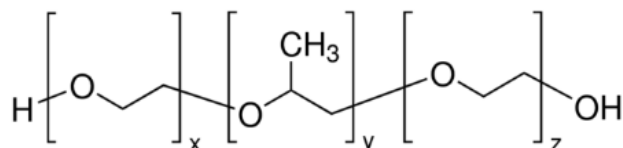


Figure III.7 : Structure chimique de pluronic F127.

❖ **Autres réactifs:**

- Chlorure de fer (II) tetrahydraté ($FeCl_2 \cdot 4H_2O$), $M= 198,81g/mol$, Fluka
- Chlorure de fer (III) $FeCl_3$, $M= 162,21g/mol$, Lachner.
- Hydroxyde de sodium, NaOH (CAS 1310-73-2), $M= 40g/mol$, Lachner
- phosphate de sodium dibasique, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ (CAS 10039-32-4), $M= 358,14g/mol$, chemical company.
- phosphate de sodium monobasique, $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ (CAS 13472-35-0), $M= 156,02g/mol$, chemical company.

❖ **Les solvants**

- Eau distillée ultra pure Milli-Q.
- Acide acétique (n ° CE: 200-580-7), $M = 60,05 g / mol$, Sigma-Aldrich.
- Acétone (n ° CE: 200-662-2), $M = 58,08 g / mol$, Sigma-Aldrich.
- Diméthylsulfoxyde (DMSO), C_2H_6OS , $M= 78,13 g/mol$, Sigma-Aldrich.
- Toluène (CAS 108-88-3, 92.14), $M = 92.14 g / mol$, Lachner.
- hexane (lot K38803574 822), $M = 86,18 g / mol$, Sigma-Aldrich.
- Des solutions de tampon phosphate (PBS) et de tampon citrate (ABS) ont été préparées en laboratoire.
- Dans les processus de préparation et de caractérisation des nanocapsules et des nanoparticules, on utilise l'eau bidistillée obtenue au laboratoire.

❖ **Substance biologiquement actif- 5-Fluorouracile (5-FU)**

Le 5-Fluorouracile (5-FU) est le plus ancien médicament prescrit dans le traitement des cancers digestifs et, actuellement encore, un des médicaments les plus prescrits en oncologie. Le 5-FU est un analogue de la pyridine et appartient à la classe des médicaments « antimétabolismes » ; sa structure chimique est présentée dans la figure III. 8.

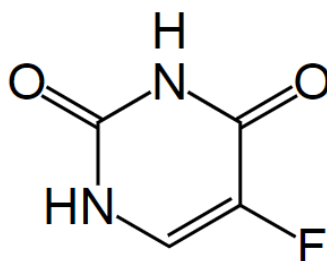


Figure III. 8. Structure chimique de 5-Fluorouracile.

Le 5-Fluorouracile (CAS 51-21-8), de structure brute : $C_4H_3FN_2O_2$, de masse moléculaire $M=130,08g/mol$, Sigma Aldriche

❖ **La lignée cellulaire MCF-7** (Michigan Cancer Foundation–7): est la lignée de cellules tumorales mammaires la plus utilisée dans les laboratoires de recherche sur le cancer du sein. Elle a été acquise à partir d'ATCC®HTB-22D™, Le milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium), la pénicilline et la streptomycine ont été obtenus de Biochrom AG (Allemagne), et le sérum bovin fœtal (FBS) de Sigma Aldrich (Allemagne).

III.3. Techniques de synthèses et d'obtentions

III.3.1. Préparation des nanoparticules magnétiques d'oxydes de fer

Les particules magnétiques permettront de conférer aux matériaux finaux des propriétés magnétiques en présence d'un champ magnétique externe. La synthèse des nanoparticules d'oxyde de fer a été largement étudiée. Les NP magnétiques peuvent être synthétisées par des méthodes chimiques, physiques ou biologiques, mais les méthodes chimiques sont le plus fréquemment utilisées en raison de leur simplicité, de leur manipulation contrôlable et de leur efficacité [11]. Suite à l'étude bibliographique décrite dans la partie précédente, la méthode que nous avons choisie pour formuler les nanoparticules magnétiques est la méthode de Co-précipitation, selon le protocole expérimental décrit par Hritcu et ses collaborateurs. [12], avec de légères modifications. Ce procédé peut être effectué en trois étapes :

Étape n°1 : Co-précipitation : La coprécipitation a été réalisée en milieu basique dans un ballon hermétiquement fermé sous atmosphère inerte (bullage constant de l'azote dans la solution). 0,0275 mol de chlorure de fer (II) tetrahydraté ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) sont dissous dans 84ml d'eau distillé, dans un autre bécher, on dissous 0,055 mol de chlorure de fer (III) FeCl_3 dans 90ml d'eau distillé. Les solutions initiales contenant les ions ferreux et ferriques sont de couleur jaune orangée. Les deux solutions ont été laissées sous agitation magnétique jusqu'à dissolution complète, puis dans chacune de ces solutions on verse de 36ml de solution de Pluronic (F127) d'une concentration de 2%, en tant que tensioactif non ionique. Ensuite, les deux solutions sont mélangées dans un ballon bien fermé de 500 ml et placé dans un bain marie à une température de 70°C sous agitation magnétique ; le mélange obtenu est maintenue sous bullage d'azote pour éviter l'oxydation prématurée du fer (II) en fer (III). Une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium (12,8 g dans 120 ml de H_2O) a été ajoutée goutte à goutte dans le ballon. La germination des nanoparticules de magnétite est déclenchée par l'ajout de solution NaOH, un changement instantané de couleur de la solution intervient, celle-ci devient noire. La réaction de coprécipitation s'est poursuivie pendant 30min.

Étape n°2 : Lavage du précipité: une étape de lavage avec l'eau bidistillée du précipité est très importante et nécessaire pour réduire le pH jusqu'à 7 et pour éliminer toutes les traces de précurseurs n'ayant pas réagi ainsi que tous les produits secondaires. Les nanoparticules de magnétites sont récupérées par la méthode de séparation magnétique à l'aide d'un aimant puissant appliqué sur la paroi du bécher. Chaque fois les nanoparticules ont été remises en suspension dans l'eau bidistillée dégazée et dispersées par la sonication puis, de nouveau séparées par l'aimant; les particules ont été décantées magnétiquement et le surnageant a été aspiré et enlevé ; ce cycle a été répété plusieurs fois jusqu'à l'obtention d'un pH=7.

Étape n°3 : Séchage : le précipité obtenu a été séché à une température de 50 °C sous vide pendant 24-48h, puis, maintenue dans une étuve à 50°C jusqu'à l'obtention d'une masse constante de particules magnétiques. Cette stratégie de synthèse a permis d'obtenir de larges quantités de matière, de l'ordre du gramme.

III.3.2. Préparation de nanocapsules magnétiques à base de chitosane/poly(NVPAI)

La stratégie envisagée pour l'obtention des nanocapsules hybrides à base de chitosane, de de poly (*N* - vinylpyrrolidone – *alt* - anhydride itaconique) et de nanoparticules magnétiques repose sur la condensation interfaciale. Rata, D.M *et al* [13] ont préparé ce type de capsules mais sans magnétite. L'obtention de nanocapsules par la méthode de

condensation interfaciale s'est généralisée ces dernières années car les produits de polycondensation sont essentiellement des polymères biocompatibles avec une certaine biodégradabilité, donc plus adaptés aux applications biomédicales et pharmaceutiques. Ce procédé de préparation de ces types de nanocapsules hybrides est simple, reproductible, utilise des réactifs non toxiques et présente l'avantage d'une efficacité d'encapsulation de médicament accrue par rapport à d'autres types de nanoparticules.

L'expérience commence par la préparation de deux phases différentes, une phase organique à base de copolymère et une phase aqueuse à base de chitosane et magnétite. La phase organique a été préparée par dissolution de 500 mg de copolymère [poly (NVPAI)] dans 15 ml de DMSO sous agitation magnétique ; après dissolution complète du copolymère, un volume de 25 ml d'acétone et également une quantité appropriée de tensioactif Span 80 (2%; p / v) ont été ajoutées sous agitation continue à une température ambiante. Parallèlement, la phase aqueuse a été préparée par dissolution d'une quantité spécifique de CS (150 mg) dans 15 ml d'une solution d'acide acétique à 2% à 65°C sous agitation magnétique et la solution obtenue a été filtrée et portée à température ambiante. Un certain volume de suspension aqueuse de magnétite (différente quantité de magnétite dans 5 ml d'eau distillée) a été ajouté goutte à goutte dans la solution de CS sous agitation continue. La concentration de CS (0,0075 g / ml) a été calculée par rapport au volume total de la phase aqueuse. Un tensioactif non ionique (Tween 80) avec une concentration de 2% (p / v) a été ajouté à la solution formée de CS et de magnétite. L'utilisation des tensioactifs est nécessaire pour assurer la forme sphérique des capsules ainsi que la stabilité de la suspension finale.

La suspension formée a été ultrasoniquée puis ajoutée lentement goutte à goutte dans la solution organique de poly(NVPAI) sous agitation magnétique continue (600 tr/min) à température ambiante. Au bout de 3 heures, la suspension magnétique de NCs a été centrifugée pendant 20 min à 8000 rpm afin de les séparer du surnageant. Finalement, une étape de purification a été nécessaire pour éliminer les réactifs et les tensioactifs qui n'ont pas réagi; les nanocapsules hybrides obtenues ont été purifiées par des lavages répétés plusieurs fois avec de l'eau bidistillée, de l'acétone et de l'hexane et finalement séchées à une température ambiante pendant 24-48 heures jusqu'à l'obtention d'un poids constant.

Les variables qui ont été prise en compte sont : la quantité de magnétite ajoutée à la solution de chitosane et le rapport volumique entre la phase aqueuse et la phase organique (tableau IV.1). Pour ce dernier variable (l'influence du rapport volumique entre les deux phases), la quantité de poly(NVPAI) a été maintenue constante et on a augmenté le volume de

la phase organique et en gardant le même rapport entre le volume de DMSO et l'acétone. Le protocole de synthèse utilisé pour obtenir des nanocapsules magnétiques à base de CS/poly(NVPAI) par condensation interfaciale est résumé dans la figure III.9.

Le rendement des nanocapsules magnétiques obtenues a été calculé selon l'équation (III.1):

$$\text{Rendement de Nanocapsules}(\%) = \frac{\text{quantité de nanocapsules magnétiques obtenues}}{\text{quantité totale de polymères utilisés} + \text{quantité de magnétite}} * 100 \dots\dots\dots (III.1)$$

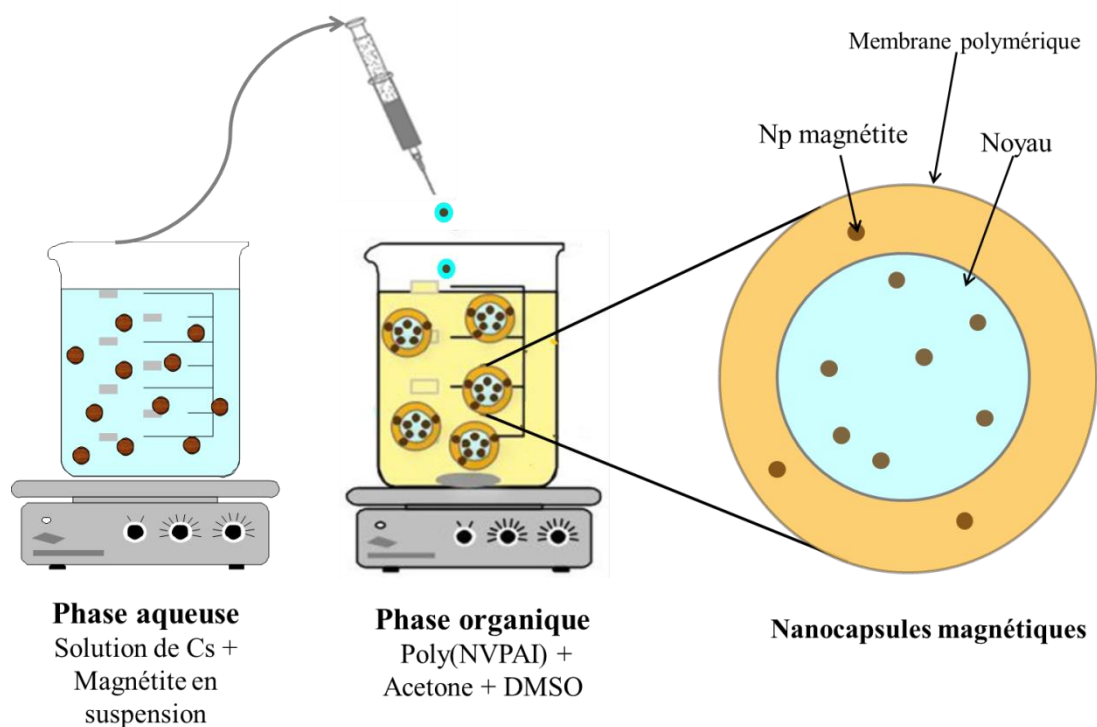


Figure III.9 : Illustration schématique de préparation des nanocapsules magnétique à base de CS/poly(NVPAI) par condensation interfaciale.

La phase aqueuse contenant le chitosane est introduite goutte à goutte à vitesse constante dans la phase organique sous une légère agitation magnétique et température constante. La diffusion de chitosane dans la phase organique provoque la formation spontanée des nanocapsules, par sa réaction avec l'ouverture du cycle d'anhydride du copolymère. Ce protocole permet d'obtenir des nanocapsules polymères contenant des nanoparticules magnétiques d'oxyde de fer.

III.3.3. Préparation des nanosphères magnétiques à base de chitosane

Différentes méthodes ont été utilisées pour préparer des systèmes particulières à base de chitosane. Le choix d'une méthodologie de synthèse particulière dépend de nombreux

facteurs, tels que les exigences de taille, la stabilité thermique et chimique, la stabilité et la toxicité résiduelle du produit.

Des nanoparticules hybrides sous forme de sphères à base de chitosane et de magnétite ont été préparées par le procédé de double réticulation en émulsion inverse (w/o) selon la méthode rapportée par C.A. Peptu et ses collaborateurs [10, 14–16]. Cette technique a été choisie principalement en raison de la nécessité d'obtenir un système à une toxicité réduite qui est l'une des conditions impératives du but final, à savoir son utilisation dans le domaine biomédical. Le système d'émulsion de type eau dans l'huile est hétérogène et a été obtenu par la réalisation des phases constitutives de l'émulsion, suivies de leur émulsification. La technique de double réticulation a été effectuée premièrement par une réticulation ionique des particules suivie d'une réticulation covalente; elle présente l'avantage de réduire le taux de réticulant covalent qui est généralement toxique, comme le glutaraldéhyde, et le remplacer par un réticulant ionique non-toxique (sulfate de sodium, tripolyphosphate par exemple). En effet, l'utilisation d'une réticulation ionique toute seule conduit à l'obtention des particules insuffisamment stables. Par conséquent, il faut garder une quantité minimale de réticulant covalent qui assure la réticulation de 20% des groupements réticulés; le reste, réagit avec le réticulant ionique. Le mode opératoire suivi pour la fabrication des nanosphères magnétiques par le procédé de double réticulation en émulsion inverse se déroule selon les étapes suivantes:

La solution de polymère a été préparée par dissolution d'une quantité spécifique de chitosane (différentes concentrations) dans un volume de 50 ml d'acide acétique à 1% sous agitation magnétique continue; puis, un certain volume de suspension aqueuse de magnétite (différente quantité de magnétite dans 10 ml d'eau distillée) a été ajouté à cette solution et également une quantité appropriée de tensioactif non ionique Tween 80 (2% p / p de la quantité de polymère) a été ajoutée et bien homogénéisée sous agitation continue. Le mélange a été soumis aux ultrasons puis versé goutte à goutte dans 200 ml de toluène, contenant la quantité appropriée de tensioactif, Span 80 (concentration en masse de 2%) sous agitation vigoureuse (une vitesse de rotation élevée) par l'ultraturax. Après le temps de stabilisation de l'émulsion, la solution de réticulant ionique (TPP à 5%) a été versée dans l'émulsion sous une vitesse de rotation de 5000 tours par minute (tr/min) pendant 15 minutes. Ensuite, ce mélange a été transféré dans un réacteur en verre équipé d'un agitateur mécanique où le processus de réticulation ionique s'est poursuivi à une vitesse de 500 tr /min. Au bout d'un temps prédéterminé (45 minutes), la solution de réticulant covalent de glutaraldéhyde (AG) extraite

dans le toluène (C=1,12 mg/ml) a été ajoutée goutte à goutte au récipient du réacteur pour compléter le processus de réticulation pendant 1h, 30min à température ambiante et à une vitesse d'agitation de 500 tr/min. Une fois la réticulation terminée, les particules ont été séparées de l'émulsion par centrifugation à 5000tr/min pendant une heure et la phase de toluène a été éliminée; Les nanoparticules magnétiques décantées ont été purifiées par plusieurs lavages successifs (cycles répétés plusieurs fois) avec de l'eau bidistillée, de l'acétone et de l'hexane pour éliminer tous les tensioactifs et les agents de réticulation en excès; enfin, les nanoparticules hybrides obtenues ont été séchées à partir de n-hexane à température ambiante.

Plusieurs variables ont été prises en considération dans ce système nanoparticulaire hybride, comme le rapport massique de magnétite/chitosane, la vitesse de rotation, la concentration de polymère (CS), le temps de réticulation. La figure III. 10, présente le mode opératoire utilisé pour l'obtention des micro/nanoparticule hybrides à base de Chitosane et magnétite.

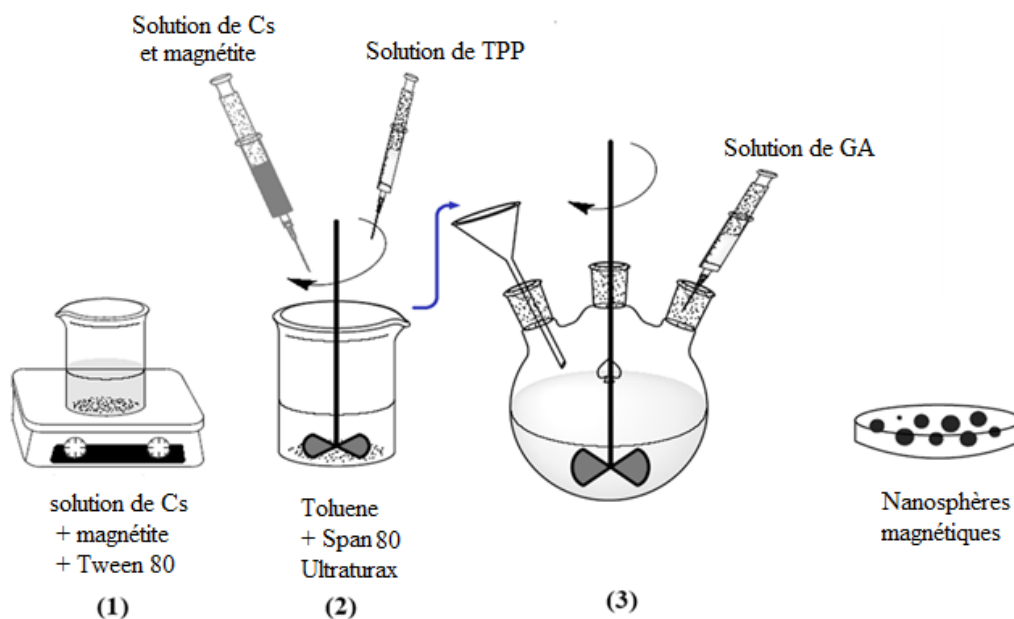


Figure III.10 : préparation des nanosphères magnétiques.

III.4. Méthodes d'analyses et caractérisation des matériaux obtenus

Les nouveaux systèmes nanoparticulaires hybrides sous forme de nanocapsules magnétiques et de nanosphères magnétiques préparées ont été caractérisées selon plusieurs points de vue comme:

- Structurellement par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR);

- Morphologiquement par microscopie électronique à balayage (MEB), potentiel zêta (ζ)
- Thermiquement par analyse thermogravimétrique (ATG) ;
- Propriétés physico-chimiques par l'étude de la capacité de gonflement dans les solutions aqueuses, la capacité de chargement un principe actif (5-FU) et la capacité de libération du médicament ;
- Teste de cytotoxicité.

Les techniques de caractérisation utilisées sont présentées dans les paragraphes suivants :

III.4.1. Caractérisation structurelle par la spectroscopie infrarouge (FTIR)

Ces techniques d'analyse structurale sont utilisées pour enregistrer les bandes d'absorption du rayonnement infrarouge qui conduisent à l'identification des composés moléculaires et de leur structure. Les spectres FT-IR représentent l'absorption d'énergie rayonnante du domaine IR par les molécules, en fonction de la longueur d'onde ou de la fréquence du rayonnement.

Les caractéristiques structurelles de systèmes nanoparticulaires hybrides obtenus ont été étudiées à l'aide des mesures en spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier avec un spectromètre FT-IR. Fournissant des informations tant qualitatives que quantitatives sur les structures synthétisées, la spectroscopie d'absorption infrarouge a conduit à l'identification des groupes fonctionnels et des nouvelles liaisons formées entre les réactifs. Les spectres FT-IR ont été enregistrés avec un spectromètre Digilab Scimitar FTS 2000 FTIR, fonctionnant à une résolution de 2cm^{-1} et dans une gamme de longueurs d'onde comprise entre 400cm^{-1} et 4000cm^{-1} . Afin d'obtenir les pilules de bromure de potassium nécessaires pour enregistrer les spectres FT-IR, les échantillons ont été mélangés et broyés avec du KBr anhydre et le mélange résultant a été pressé pour obtenir un disque mince et presque transparent. La compression du mélange a été réalisée avec une presse hydraulique de 2 tonnes, pendant 1min. Afin d'obtenir les spectres, nous avons travaillé quantitativement, pour chaque pilule pesant 0,03 g d'échantillon et 0,2 g de KBr.



Figura III.11: Spectromètre Scimitar Digilab FTS 2000 FTIR.

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) a été utilisée pour confirmer la formation de nouveaux groupes et pour démontrer la présence de la magnétite dans les nanoparticules hybrides préparés (nanocapsules et nanosphères magnétiques).

III.4.2. Caractérisation morphologique

III.4.2.1. Microscopie électronique à balayage MEB

La microscopie électronique à balayage (MEB) est une méthode de caractérisation morphologique par laquelle la surface d'un matériau est scannée, en utilisant des électrons au lieu de la lumière pour former une certaine image. Ainsi, par cette analyse, le microscope électronique génère un flux d'électrons qui bombardent la surface des échantillons analysés. Grâce à cette interaction, le MEB permet une visualisation claire de la structure générale de l'échantillon, à partir de l'asymétrie de la structure et des micrographies, étant en mesure d'estimer la taille des microparticules, la forme, la disposition et le degré d'agglomération, la porosité et la rugosité de la surface.

Les micrographies MEB des particules hybrides obtenues ont été enregistrées à l'aide d'un microscope électronique à balayage HITACHI SU 1510, Japon (figure III.12). L'analyse des échantillons a impliqué une étape de dépôt des échantillons séchés sur un support métallique, suivie d'une métallisation avec une couche d'or de 6-7 nm d'épaisseur, en utilisant une pulvérisation Cressington 108 avant l'observation.

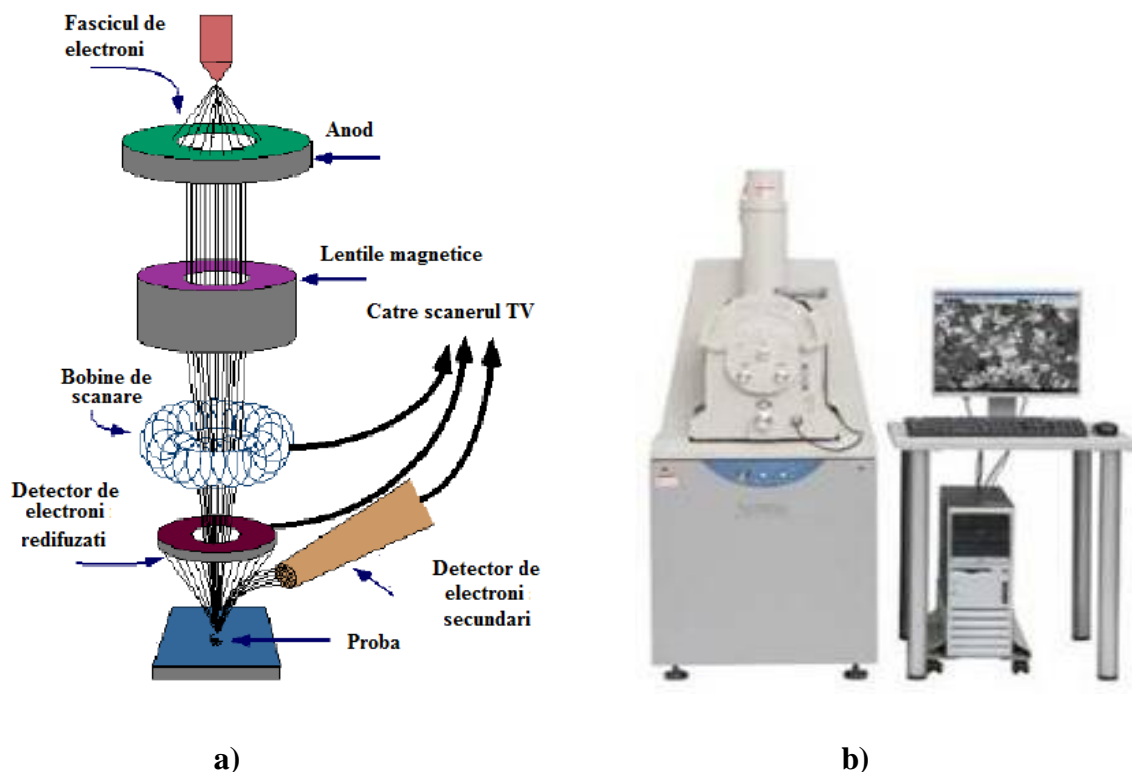


Figure III.12 : a. Représentation schématique de l'instrument MEB; b. Microscope électronique à balayage HITACHI SU 1510.

Le dispositif MEB peut fournir des informations sur la composition chimique de la surface de l'échantillon, car la luminosité de l'image formée par les électrons rétrodiffusés augmente avec le numéro atomique des éléments.

Les NCs magnétiques ont été caractérisées du point de vue morphologique (taille, forme et morphologie de surface) par SEM (Vega Tescan) et TEM. Pour l'observation TEM, une gouttelette de la suspension de capsule dans l'acétone a été déposée sur une grille de cuivre. Les échantillons ont été analysés avec un microscope Philips CM100 équipé d'une caméra Olympus et transférés vers un ordinateur équipé du système Megaview.

Ces deux techniques (MEB et TEM) utilisent un faisceau d'électrons comme source d'irradiation. La différence majeure entre les deux types de ME provient de la nature des électrons détectés; alors que la MET détecte les électrons transmis à travers l'échantillon, la MEB détecte les électrons réfléchis de la surface de l'échantillon.

III.4.2.2. Potentiel Zêta et Diamètre

Le potentiel zêta est une mesure de la capacité de répulsion / attraction de la charge entre les particules et constitue l'un des paramètres fondamentaux connus pour affecter leur stabilité. Il dépend, principalement, de la nature chimique des polymères et du pH du

l'environnement utilisé. Le potentiel zêta permet de prédire la stabilité à long terme d'une nanosuspension. Si les particules ont un potentiel de charge important en valeur absolue, les forces de répulsion sont dans ce cas assez fortes pour vaincre les forces d'attraction de Van der Waals (qui les poussent à flocculer ou à coaguler).

Les déterminations ont été effectuées en mettant en suspension une quantité de particules dans des solutions d'électrolyte de KCl à 0,1mM afin de déterminer leur comportement dans une solution d'électrolyte à force ionique constante. Normalement, les valeurs du potentiel zêta sont considérées comme des valeurs de la stabilité colloïdale du matériau analysé ; entre ± 25 et ± 30 mV, est estimée une bonne stabilité colloïdale, en raison d'une haute barrière d'énergie entre les particules [17]. Le potentiel zêta des particules a été déterminé par électrophorèse dans une solution tampon phosphate (PBS; pH = 7,4).

Le diamètre moyen, la distribution en taille et le potentiel zêta des nanoparticules hybrides (nanocapsules et nanosphères) obtenues ont été réalisés en triple à 25°C à une concentration de 1% (p / v), à l'aide d'un appareil Zeta Nanosizer Malvern (figure III. 13).

Les diamètres moyens ont été déterminés par diffusion dynamique de la lumière (DLS) (Zeta Nanosizer Malvern) sur des échantillons dispersés dans l'acétone anhydre afin d'éviter le gonflement des particules; une gouttelette de Span 80 a été ajoutée pour éviter l'agglomération des particules.



Figure III.13 : Dispositif Zeta Nanosizer Malvern.

III.4.3. Caractérisation thermique - Analyse thermogravimétrique ATG

L'analyse thermogravimétrique est une branche de l'analyse thermique qui étudie les changements de masse d'un matériau en fonction de la température. Cette méthode permet de caractériser la composition des matériaux en mesurant leur masse en fonction de la

température et du temps et elle peut être utilisée pour étudier tout processus physique (comme l'évaporation) ou chimique (comme la dégradation thermique) qui entraîne une perte de masse. Le principe de fonctionnement de cette méthode de caractérisation consiste en l'augmentation progressive de la température et l'enregistrement des variations de masse d'un matériau dans le temps avec l'ordinateur. Les processus de dégradation peuvent avoir lieu dans l'air (dégradation oxydative) ou dans une atmosphère de gaz inerte (N_2 ou He). En combinaison avec la spectroscopie FT-IR ou la spectrométrie de masse, l'analyse thermogravimétrique est une méthode extrêmement utile pour étudier les gaz volatils libérés pendant la dégradation thermique ainsi que pour élucider les mécanismes de dégradation des matériaux complexes. Les thermogrammes d'analyse thermogravimétrique (ATG) ont été obtenus avec un analyseur TA Instrument Q600, en atmosphère d'air (100ml/ min) à une vitesse de chauffe de $10^\circ C \text{ min}^{-1}$, de la température ambiante à $700^\circ C$; les échantillons pesaient de 8 à 10 mg et afin d'obtenir des données comparables, les paramètres de fonctionnement ont été maintenus constants pendant toutes les expériences. Les résultats des analyses thermiques ont été traités avec le logiciel Universal Analysis (V 2.0).



Figure III.14: Thermogravimètre TA Instrument Q600.

III.4.4. Propriétés magnétiques

Pour l'étude de caractérisation magnétique des nanocapsules et des nanosphères hybrides obtenues, un système de magnétomètre à échantillon vibrant-VSM (Vibrating sample Magnetometer) a été utilisé; cette technique nous a permis de déterminer le comportement de magnétisation en fonction du champ magnétique appliqué.

Les échantillons sont connectés par un porte-échantillon à une source de vibration et ils sont placés au milieu des bobines de détection. Un électroaimant entoure l'échantillon et les bobines de détection ; il est utilisé pour faire varier le champ appliqué sur l'échantillon afin de mesurer la variation de l'aimantation en fonction du champ. Le porte-échantillon dans

notre cas permet la rotation de l'échantillon avec une amplitude de 360° par rapport à la direction du champ appliqué. Les mesures ont été effectuées sur des matériaux sous forme de poudre sèche.

Les propriétés magnétiques (l'aimantation à saturation - M_s , l'aimantation rémanente - M_r et la coercivité - H_c) des NCs magnétiques et NSs magnétiques obtenues dans ce travail ont été évaluées par magnétométrie d'échantillon vibrant (MicroMag, VSM - Magnétomètre à échantillon vibrant, modèle 3900, Princeton Measurements Corporation, USA), sur des poudres séchées dans la pièce à température ambiante.



Figure III.15 : Image d'un magnétomètre à l'échantillon vibrant (VSM).

III.4.5. Une spectroscopie UV-Visible

Le spectrophotomètre UV-Vis est un instrument permettant de réaliser des mesures spectrophotométriques. Un spectromètre est un appareil qui permet d'effectuer une mesure spectrométrique de l'absorbance d'une solution à une longueur d'onde donnée ou sur une région donnée du spectre. Selon la loi de Beer-Lambert, l'absorbance d'une solution est proportionnelle à la concentration des substances en solution, à condition de se placer à la longueur d'onde (λ_{max}) à laquelle la substance absorbe les rayons lumineux. C'est pourquoi la longueur d'onde est réglée en fonction de la substance dont on veut connaître la concentration.

Toutes les mesures de l'absorbances pour ces études de thèse ont été effectuées à l'aide d'un spectromètre UV-Vis NanoDrop ND- 1000-USA (figure III.16) avec une grande précision, une plage spectrale de 220 - 750nm, précision: $\lambda \pm 0,003nm$, reproductibilité: $\lambda \pm 0,02 nm$ et optique: double faisceau monochromatique.



Figure III.16 : Spectrophotomètre UV-Vis NanoDrop ND-1000.

III.4.6. Etude du gonflement des nanoparticules hybrides dans les solutions aqueuses

L'étude de gonflement de systèmes nanoparticulaires hybrides (nanocapsules et nanosphères magnétiques) dans des solutions aqueuses a été imposée en raison de leur utilisation potentielle comme supports de médicaments (quand on travaille dans les milieux aqueux physiologiques). Il est bien connu que la capacité de chargement et de libération du médicament est influencée par le degré de gonflement qui est directement corrélé au degré de réticulation. Le degré de gonflement (Q) des particules hybrides préparées a été déterminé par la méthode gravimétrique. Pour les nanocapsules magnétiques l'étude sur le comportement de gonflement a été réalisée en milieu aqueux légèrement basique (PBS, pH = 7,4), qui simule les conditions physiologiques et pour les nanosphères l'étude a été effectuée en milieu acide (ABS, pH=3,6) et en milieu aqueuse d'un pH=6,7 et pH=7,4 selon le protocole expérimental suivant :

Une quantité spécifique (30 mg) de particules hybrides synthétisées (séchées) a été pesée et immergée dans un tube Ependorf contenant une solution aqueuse (PBS ou ABS). La suspension formée a été maintenue à $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ sous agitation magnétique à une vitesse de rotation de 120 tr / min pendant 24 heures. A des intervalles de temps précis, la suspension a été centrifugée, le surnageant a été retiré, l'excès de liquide et les traces d'eau sur les parois du tube ont été éliminés par tamponnage soigneusement avec du papier filtre et l'échantillon gonflé a été pesés. Le processus de gonflement a été surveillé à différents intervalles jusqu'à ce que l'équilibre soit atteint, généralement la cinétique de gonflement a été étudiée sur une période de 24 heures (temps d'équilibre). Les nanoparticules hybrides séchées et gonflées ont été pesées avec une précision de $\pm 0,0001$ g sur une microbalance électronique. Toutes les expériences ont été réalisées en 3 fois et les résultats représentant la moyenne arithmétique de trois déterminations différentes. Le pourcentage de taux de gonflement (Q%) a été exprimé

comme le rapport de la différence de masse de l'échantillon à l'état gonflé et sa masse à l'état sec sur la masse de l'échantillon à l'état sec ; Cette propriété peut être décrite à l'aide de l'équation suivante:

$$Q (\%) = \frac{m_1 - m_0}{m_0} \times 100 \quad \text{.....(III.2)}$$

Où: m_0 - la masse initiale de l'échantillon séché (mg);

m_1 - la masse de l'échantillon gonflé (mg).

III.4.7. L'encapsulation du médicament

Le processus d'inclusion de principes biologiquement actifs dans les nanoparticules a été réalisé par un mécanisme de diffusion à partir de la solution dans laquelle ils ont été immergés. Dans cette étude, le 5-FU a été utilisé comme médicament modèle. Pour évaluer l'efficacité d'encapsulation de médicament choisi dans les systèmes nanoparticulaires hybrides obtenus nous avons suivis les démarches expérimentales suivantes :

Chaque échantillon d'une quantité spécifique de particules (0,03 g) a été pesée avec précision et a été dispersée dans un volume de 1,5 ml de solution aqueuse de médicament avec une concentration de 10 mg / ml de 5-FU. Les suspensions obtenues ont été maintenues sous agitation continue à 120 tr/min à une température $37 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,5^\circ\text{C}$ pendant 24 heures pour achever le processus de diffusion, puis ont été séparés par ultracentrifugation à 8000 tr/min pour les nanocapsules pendant 10min et à 15000 tr/min pour les nanosphères magnétiques pendant 5 minutes (ultracentrifugeuse SIGMA Laborzentrifugen 3-30K). Ensuite, le surnageant a été enlevé, et les particules chargées au 5-FU ont été séchés par le processus de lyophilisation.

La quantité de médicament encapsulée dans les nanocapsules et les nanosphères magnétiques a été calculée par la différence entre la quantité initiale de 5-FU et la quantité de 5-FU dans le surnageant. Les mesures ont été effectuées à l'aide d'un spectromètre UV-VIS Nanodrop ND 1000 à 266 nm, qui permet d'analyser de très petits volumes d'échantillons (0,2 μml). L'efficacité d'encapsulation 5-FU ($E_{ef} \%$) des particules préparées a été calculée comme suit :

$$m_i = m_i - m_s \quad \text{.....(III.3)}$$

$$E_{ef} (\%) = \frac{m_i - m_s}{m_i} \times 100 \quad \text{.....(III.4)}$$

Où, m_i : la quantité encapsulée de 5-FU (mg);
 m_i : la quantité initiale de 5-FU (mg);
 m_s : la quantité de 5-FU dans le surnageant (mg).

Les deux études, de chargement (ou d'inclusion) et de libération nécessitent une courbe d'étalonnage. Pour atteindre cet objectif, nous avons d'abord tracé la courbe d'étalonnage de 5-Fluorouracile (médicament modèle) dans l'eau bidistillée, qui peut être observée dans la Figure III.17. Le 5-FU présente une longueur d'onde d'absorption de 266 nm. La relation de linéarité et l'équation de la régression peuvent s'observer au-dessus de la courbe.

$$Y=5,141x, R^2= 0,9971 \dots\dots\dots(III.5)$$

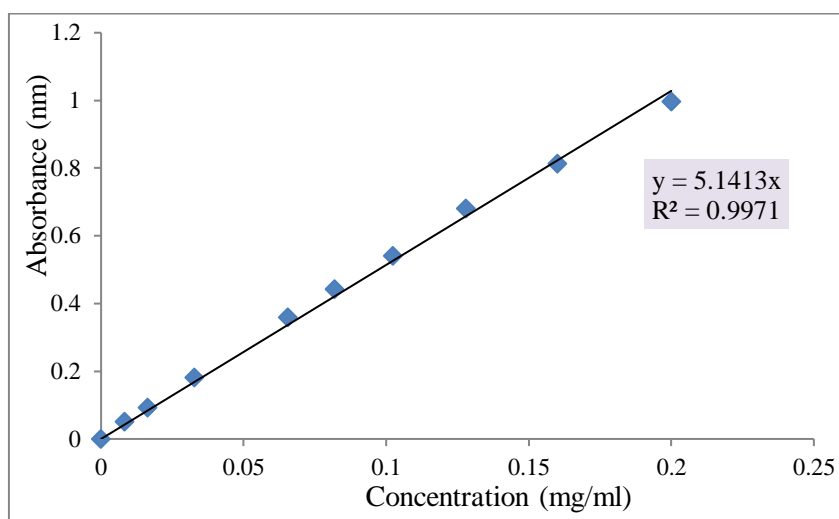


Figure III.17: Courbe d'étalonnage de 5-FU dans l'eau bidistillée.

III.4.8. Cinétique de libération de médicament (5-FU)

Le processus de libération du principe biologiquement actif a été étudié par diffusion dans un milieu de pH= 7,4, similaire au pH sanguin. Les études de libération de médicaments *in vitro* ont été réalisées par la méthode de dialyse.

Chaque échantillon de nanocapsules et de nanosphères magnétiques chargé de 5-FU a été introduit dans une membrane de dialyse, puis, a été immergé individuellement dans des flacons à un volume de 13 ml de PBS à pH = 7,4. Ce système a été plongé dans un bain régulé à 37°C ± 0,5°C sous agitation continue et constante à 120tr/min pendant toute la période de libération. À des intervalles du temps réguliers, un certain volume de solution (1 ml) a été prélevé et remplacé par une solution fraîche (PBS). La quantité de 5-FU libérée dans

le milieu a été déterminée par la mesure de son absorbance avec un spectrophotomètre UV-VIS Nanodrop ND 1000, à une longueur d'onde de 266 nm, sur la base de courbe d'étalonnage d'une solution de 5-FU-PBS. L'efficacité de la libération de 5-FU ($R_{ef}\%$) a été calculée selon de l'équation III.6:

$$R_{ef}(\%) = \frac{m_l}{m_e} * 100 \dots\dots\dots(III.6)$$

Où, m_l : la quantité de 5-FU libérée par les particules (mg);
 m_e : la quantité de 5-FU encapsulée dans les particules (mg).

$$Y = 4,909x, R^2=0,998\dots\dots\dots(III.7)$$

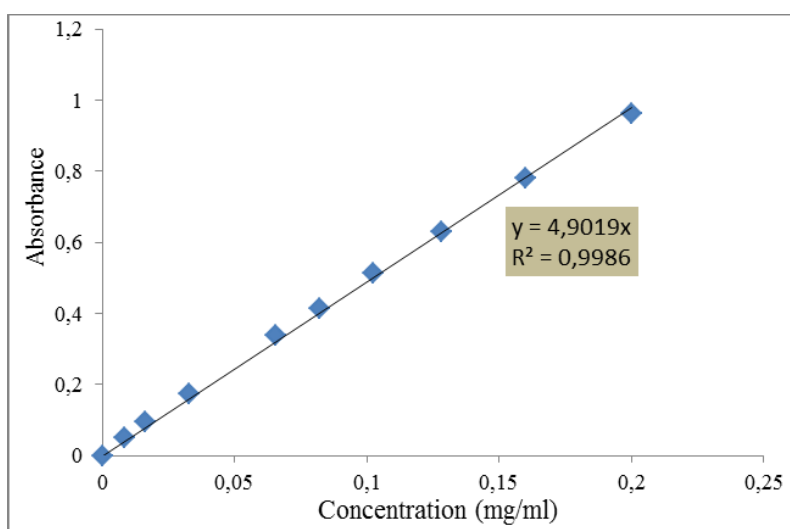


Figure III.18 : Courbe d'étalonnage de 5-FU dans solution PBS (pH=7.4).

III.4.9. Analyse théorique de la libération de médicaments

Le but de l'application des modèles mathématiques est d'étudier les différents phénomènes de libération à partir de différentes formes thérapeutiques. Ces modèles permettent de prédire le comportement et la nature du relargage ainsi que l'effet de la matrice sur la cinétique de libération. Ces modèles permettent aussi d'anticiper les paramètres de relargage les plus importants pour mieux adapter la formulation des cargos polymériques et atteindre le but cinétique escompté. Il existe plusieurs modèles cinétiques de libération disponibles, parmi lesquels d'ordre zéro, de premier ordre, Higuchi, Korsmeyer-Peppas, Hixson-Crowell, Hopfenberg et Weibull sont les plus couramment utilisés pour décrire le profil de libération des systèmes polymères [18-20].

Pour décrire la libération de médicament à partir du système polymère, Korsmeyer et Peppas ont développé une équation semi-empirique en 1983 [21] :

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k t^n \dots\dots\dots (III.8)$$

Où : **t** - est le temps de libération du principe actif; **M_t** : la quantité de médicament libérée à un temps **t**; **M_∞** - la quantité **M₀** de médicament initialement contenue dans la matrice; **K** - la constante de vitesse de libération et **n** l'exposant de libération. La valeur de « n » ne peut être déterminée que sur les premiers 60% de la libération. Peppas a caractérisé les différents mécanismes de libération utilisant cette valeur n, l'équation ci-dessus (III.8) peut être appliquée dans deux situations:

- 1) n = 0,5 indiquant la libération contrôlée de médicament par diffusion
- 2) n = 1,0 indiquant la libération par une cinétique d'ordre zéro déterminée surtout par le gonflement et l'érosion de la matrice polymère.

D'après la valeur de l'exposant n, il est possible d'établir une classification en fonction du type de comportement observé et de la géométrie de la matrice. Selon ce modèle ; lorsque la valeur de n est inférieure ou égale à 0,5 le mécanisme est caractérisé comme une diffusion fickienne; tandis que la valeur n entre 0,5 et 1,0 indiquent un transport anormal (non fickien) (c'est-à-dire des mécanismes de diffusion mixte et de relaxation de chaîne) [21-23] et quand n égale 1,0 indique un transport de cas II (ordre zéro); les valeurs de n supérieures à 1 reflètent ce que l'on appelle le super transport de cas II.

III.4.10. Test de cytotoxicité in vitro

- **Culture de cellules**

Les échantillons ont été testés sur la lignée cellulaire de carcinome mammaire humain MCF-7 (ATCC®HTB-22D™), maintenue dans du milieu de croissance modifié de Dulbecco (DMEM), supplémenté avec 10% de sérum bovin fœtal (FBS), 100 UI/ml de pénicilline, 100 µg/ml de streptomycine, à 37°C, dans une atmosphère humidifiée à 5% de CO₂ dans l'air.

- **Test de viabilité**

L'effet des échantillons de nanocapsules testés sur la viabilité cellulaire a été réalisé par test MTT, selon la méthode décrite par Mosmann [24] et Laville *et al.* [25], et basé sur la capacité des cellules vivantes à convertir le substrat jaune hydrosoluble [3- (4, 5-diméthyl-2-thiazolyl) -2, 5-diphényl-2H-teyrazolium bromure] en violet insoluble formazan. La quantité de formazan est directement proportionnelle au nombre de cellules vivantes [26]. En résumé,

les cellules ont été régulièrement sous-cultivées deux fois par semaine par une procédure trypsine / EDTA, puis comptées et ensemencées en plaques 96 puits (8×10^3 cellules / puits) à 37°C pendant 24 heures. Différentes doses allant de 50 µg/mL à 250 µg/mL de suspensions de NC magnétiques non chargées et chargées en 5-FU ont été ajoutées et incubées avec les cellules MCF-7 pendant 48 heures. Les cellules ont également été traitées avec du 5-FU à des doses correspondantes avec la dose la plus faible et la plus élevée utilisée dans le cas des NC. Par la suite, les cellules ont été soumises au protocole de dosage MTT, en utilisant le lecteur automatique de microplaques Biochrom EZ Read 400, à une longueur d'onde de 570 nm. La viabilité cellulaire a été calculée à l'aide de la formule suivante:

$$\text{Viabilité cellulaire}(\%) = \frac{\text{Absorbance (test)}}{\text{Absorbance (control)}} \times 100 \dots\dots\dots(\text{III.9})$$

- **Analyses statistiques**

Les résultats expérimentaux in vitro sont exprimés sous forme de la moyenne \pm SE (l'erreur type de la moyenne d'analyses distinctes). La différence entre le groupe témoin et les groupes traités a été évaluée grâce au test de Student, avec $p < 0,05$ statistiquement significatif [27].

III.5. Conclusion

Dans ce chapitre, sont exposés les différentes méthodes d'obtention des systèmes hybrides ainsi que leur caractérisation. L'objectif principal étant la mise au point d'obtention de nouveaux systèmes nanoparticulaires hybrides magnétique-médicament utilisé pour le traitement des maladies graves comme le cancer. Ces systèmes particuliers sont sous forme de :

- ✓ Nanocapsules magnétiques à base de chitosane/ poly(NVPAI) et de magnétite obtenues par la méthode de condensation interfaciale.
- ✓ Nanosphères magnétiques à base de chitosane et magnétite obtenues par la méthode de double réticulation en émulsion inverse.

On trouve par la suite toutes les analyses effectuées pour caractériser les nanocapsules et les nanosphères préparées comme : FTIR, MEB, potentiel zeta, DLS, VSM.

Enfin, l'étude de la capacité de gonflement et l'étude d'encapsulation d'un médicament modèle antitumorale (5-Fluorouracile) et sa libération dans les milieux aqueux par les systèmes particuliers hybrides préparés ont été exposés en détail.

Références bibliographiques

- [1] Shariatinia Z. *Pharmaceutical applications of chitosan. Advances in Colloid and Interface Science*. **2018**
- [2] Casadidio C.; Peregrina D. V.; Gigliobianco M. R.; Deng S.; Censi R.; & Di Martino P. *Chitin and Chitosans: Characteristics, Eco-Friendly Processes, and Applications in Cosmetic Science. Marine Drugs*. **2019**, 17(6), 369.
- [3] Naskar S.; Sharma S.; & Koutsu K. *Chitosan-based nanoparticles: An overview of biomedical applications and its preparation. Journal of Drug Delivery Science and Technology*. **2018**
- [4] Cismaru L.; Hamaide T.; Popa M. *Itaconic anhydride based amphiphilic copolymers: synthesis, characterization and stabilization of carboxyl functionalized, PEGylated nanoparticles. Eur Polymer*, **2007** J 43:4843–4851.
- [5] Jang J.; Do C.; Bang J.; Han Y.; & Kim T.-H. *Self-Assembly of Temperature Sensitive Unilamellar Vesicles by a Blend of Block Copolymers in Aqueous Solution. Polymers*. **2019**, 11(1), 63.
- [6] Steve F. *Sutureless Method for Joining Blood Vessels Invented; Stanford University Medical Center Press: Stanford, CA, USA*, **2011**.
- [7] Chang E.I.; Galvez M.G.; Glotzbach J.P.; Hamou C.D.; El-ftesi S.; Rappleye C.T.; Sommer K.M.; Rajadas J.; Abilez O.J.; Fuller G.G.; et al. *Vascular anastomosis using controlled phase transitions in poloxamer gels. Nat. Med*. **2011**, 17, 1147–1152.
- [8] Cogger V.C.; Hilmer S.N.; Sullivan D.; Muller M.; Fraser R.; Le Couteur D.G. *Hyperlipidemia and surfactants: The liver sieve is a link. Atherosclerosis* **2006**, 189, 273–281.
- [9] Nejadnik M. R.; Olsson A. L. J.; Sharma P. K.; van der Mei H. C.; Norde W.; & Busscher H. J. *Adsorption of Pluronic F-127 on Surfaces with Different Hydrophobicities Probed by Quartz Crystal Microbalance with Dissipation. Langmuir*. **2009**, 25(11), 6245–6249.
- [10] Alupeii L.; Peptu C. A.; Lungan A.-M.; Desbrieres J.; Chiscan O.; Radji S.; & Popa M. *New hybrid magnetic nanoparticles based on chitosan-maltose derivative for antitumor drug delivery. International Journal of Biological Macromolecules*. **2016**, 92, 561–572.
- [11] Regina Rodrigues G.; López-Abarrategui C.; de la Serna Gómez I.; Campos Dias S.; Otero-González A.J.; Luiz Franco O. *Antimicrobial magnetic nanoparticles based-therapies for controlling infectious diseases. International Journal of Pharmaceutics* **2019**, 555 356-367.
- [12] Hritcu D.; Popa M.I.; Popa N.; Badescu V.; Balan V. *Preparation and characterization of magnetic chitosan nanospheres. Turkish Journal of Chemistry* **2009**, 33, 785–796.
- [13] Rață, D. M.; Chailan J.-F.; Peptu C. A.; Costuleanu M.; & Popa M. *Chitosan: poly(N-vinylpyrrolidone-alt-itaconic anhydride) nanocapsules—a promising alternative for the lung cancer treatment. Journal of Nanoparticle Research*, **2015**. 17(7).
- [14] Peptu C.A.; Buhus G.; Popa M.; Perichaud A.; Costin D. *Double cross-linked chitosan–gelatin particulate systems for ophthalmic applications, J. Bioact. Compat. Polym*. **2010**, 25 (1) 98–116.
- [15] Jataruiu (Cadinouiu) A.N.; Holban M.N.; Peptu C.A.; Sava A.; Costuleanu M.; Popa M. *Double crosslinked interpenetrated network in nanoparticle form for drug targeting preparation, characterization and biodistribution studies, Int. J. Pharm*. **2012**, 436 (1–2) 66–74.
- [16] Savin C.-L.; Popa M.; Delaite C.; Costulean, M.; Costin D.; & Peptu C. A. *Chitosan grafted-poly(ethylene glycol) methacrylate nanoparticles as carrier for controlled release of bevacizumab. Materials Science and Engineering: C*. **2019**.

- [17] Iurea D. M.; Peptu C. A.; Chailan J.-F.; Carriere P.; & Popa M. Sub-Micronic Capsules Based on Gelatin and Poly(maleic anhydride-alt-vinyl acetate) Obtained by Interfacial Condensation with Potential Biomedical Applications. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, **2013**, 13(6), 3841–3850.
- [18] Bruschi M.L. Mathematical models of drug release, strategies to modify the drug release from pharmaceutical systems. *ResearchGate* **2015**.
- [19] Fallahi-Sambaran M.; Salami-Kalajahi M.; Dehghani E.; Abbasi F. Investigation of different core-shell toward Janus morphologies by variation of surfactant and feeding composition: A study on the kinetics of DOX release. *Colloid Surf. B* **2018**.
- [20] Geraili A.; & Mequanint K. Systematic Studies on Surface Erosion of Photocrosslinked Polyanhydride Tablets and Data Correlation with Release Kinetic Models. *Polymers*, **2020**, 12(5), 1105.
- [21] Korsmeyer R.W.; Gurny R.; Doelker E.; Buri P.; Peppas N.A. Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. *Int. J. Pharm.* **1983**;15:25–35.
- [22] Siepmann J.; Peppas N.A. Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). *Adv Drug Deliv Rev.* **2001**, 48(2-3):139-57.
- [23] Wojcik-Pastuszka D.; Krzak J.; Macikowski B.; Berkowski R.; Osiński B.; & Musiał W. Evaluation of the Release Kinetics of a Pharmacologically Active Substance from Model Intra-Articular Implants Replacing the Cruciate Ligaments of the Knee. *Materials*, **2019**, 12(8), 1202.
- [24] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, **1983**, 65, 55-63.
- [25] Laville N.; Aït-Aïssa S.; Gomez E.; Casellas C.; Porcher J.M. Effects of human pharmaceuticals on cytotoxicity, EROD activity and ROS production in fish hepatocytes. *Toxicology* **2004**, 196, 41-55.
- [26] Stockert J.; A Blázquez-Castro.; Cañete M.; Horobin R.; Villanueva Á. MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. *Acta Histochemica*, **2012**, 114, 785-796.
- [27] Cann A.J. *Maths from scratch for biologists*, Jon Willey & Sons Ltd, New York, **2003**.

Chapitre IV

IV.1. Introduction

Ce chapitre présente une étude approfondie et originale concernant l'obtention, pour la première fois, des nanocapsules hybrides, constitués d'un réseau polymère biocompatible à base de chitosane et de poly (N vinylpyrrolidone – alt - anhydride itaconique) (polyNVPAl) qui forme la paroi des vésicules, et qui contiennent des nanoparticules magnétiques d'oxyde de fer (magnétite) [1]. Ces nanoparticules hybrides confèrent des propriétés magnétiques au matériau obtenu (nanocapsules) telles que : un guidage (vectorisation) magnétique à l'aide d'un aimant permanent vers une cible, ou production de chaleur en présence d'un champ magnétique alternatif (hyperthermie magnétique) puisque, les nanoparticules magnétiques sont capables de transformer une énergie électromagnétique en énergie thermique [2]. Les nanocapsules seront chargées avec un médicament antitumoral, une fois arrivées la cible elles pourront combiner l'effet chimiothérapeutique avec l'hyperthermie, pour une efficacité plus élevée pour le traitement du cancer.

La combinaison des deux polymères de nature différente (naturelle et synthétique) avec des nanoparticules magnétiques par une réaction chimique entre les groupes fonctionnels, basée sur leur condensation interfaciale, conduit à un nouveau matériau dont les propriétés peuvent être supérieures à celles des partenaires individuels. Les deux polymères utilisés dans cette partie sont :

- un polymère naturel «chitosane», un polysaccharide connu par ces propriétés importantes de biodégradation contrôlables, biocompatibilité, hydrophilie, non-toxicité, non-antigénicité, et bonne activité antimicrobienne ; largement utilisé pour administration de médicaments et applications d'ingénierie tissulaire [3].

- un copolymère synthétique [poly (NVPAl)] qui est un copolymère alternatif insoluble dans l'eau mais très soluble dans l'acétone (généralement dans les cétones aliphatiques cycliques ou linéaires), ce qui présente un grand intérêt en raison de sa bonne biocompatibilité et hydrophilie, par rapport aux polymères naturels (les polymères synthétiques ont une grande pureté, une bonne reproductibilité et un long temps de libération de l'agent thérapeutique [4]). De plus, la présence des cycles d'anhydride dans la chaîne principale lui confère une réactivité élevée dans des conditions de réaction douce.

Les nanocapsules sont obtenues par condensation interfaciale, l'avantage de la méthode est qu'elle offre la possibilité de produire des capsules aux propriétés souhaitées pour différentes applications et conduit à la formation rapide de micro/nanocapsules dans des

conditions normales de température et pression [5], sans recourir à un agent de réticulation ou de catalyseurs, qui sont généralement toxiques et difficile à éliminer.

Notre démarche expérimentale dans ce chapitre a consistée dans un premier temps à l'obtention des nanoparticules magnétiques (magnétite) par la méthode de co-précipitation en milieu basique comme décrit dans le chapitre précédent (chapitre III, paragraphe III.3.1), puis la synthèse des nanocapsules hybrides à base de Cs / poly(NVPAl) et de magnétite par la méthode de condensation interfaciale, et finalement l'obtention d'un système polymère-médicament sous forme de nanocapsules magnétiques chargées de 5-Fluorouracile: un médicament antitumoral. Les résultats expérimentaux obtenus, les caractéristiques physico-chimiques et biologiques des capsules hybrides magnétiques obtenues tel que la structure, la morphologie ainsi que les propriétés thermiques, les propriétés magnétiques, comportement de gonflement, l'efficacité de chargement / libération de 5-FU et la cinétique de libération in vitro du principe actif, la cytotoxicité seront discutés en détail dans ce chapitre.

IV.2. Obtention des nanoparticules magnétiques

Avant l'obtention des capsules hybrides, des nanoparticules magnétiques sont préalablement obtenus. Dans ce travail, nous avons choisi de préparer les nanoparticules magnétiques d'oxyde de fer par la méthode de co-précipitation selon le mode opératoire décrit dans le chapitre III sous le paragraphe III.3.1.

Après l'étape de séchage, un précipité noir a été récupéré sous forme de poudre sèche pouvant être attirés fortement et facilement par un aimant permanent ou alternatif. Les nanoparticules magnétiques obtenues ont une concentration de suspension aqueuse finale égale à 5,5% (p / v).

L'un des objectifs de cette étude est d'incorporer ces nanoparticules magnétiques dans des nanocapsules à base de CS / poly (NVPAl) que nous pouvons utiliser comme un système nanoparticulaire hybride de ciblage pour les médicaments antitumoraux et combinant l'effet chimiothérapeutique avec l'effet hyperthermique pour l'augmentation de l'efficacité du traitement antitumoral.

IV.3. Obtention des nanocapsules hybrides magnétiques à base de CS/poly(NVPAl) et de magnétite

Les nanocapsules magnétiques à base de CS / poly(NVPAl) ont été synthétisés par la technique de condensation interfaciale selon les démarches expérimentales détaillées

précédemment dans le paragraphe III.3.2 du chapitre III. Les nanocapsules obtenus sont nommés par les codes CNM. Plusieurs paramètres peuvent faire varier les propriétés physico-chimiques des nanocapsules finaux ; la quantité de magnétite ajoutée à la solution de chitosane et le rapport volumique entre la phase aqueuse et la phase organique ont été utilisés comme des paramètres variables dans ce système nanoparticulaire tout en maintenant les autres paramètres constants. En réponse au gradient de champ magnétique, tous les nanocapsules hybrides magnétiques obtenues vont se déplacer et se concentrer sur la paroi du flacon près de l'aimant, ce qui les rend facilement séparables en milieu de réaction. Le plan expérimental avec les paramètres utilisés pour cette préparation sont présentés dans le tableau IV.1; aussi le rendement des nanocapsules magnétiques obtenus a été présenté dans ce tableau. Des nanocapsules témoin qui ne contiennent pas de la magnétite, ont été aussi préparées en vue de les comparer avec les nanocapsules hybrides.

Tableau IV. 1: Plan expérimental pour l'obtention des nanocapsules magnétiques

Code d'échantillons	Fe ₃ O ₄ / CS (% , w/w)	Rapport volumique Phase aqueuse/ Phase organique (v/v)	Rendement (%)
CN	-	1:2	45
CNM-1	20		38
CNM-2	30		40
CNM-3	40		44
CNM-4	50		53
CNM-5	80		57
CNM-6	50	1:2.5	68
CNM-7		1:3	78
CNM-8		1:3.5	81

Rapport molaire (moles de - NH₂ / moles de cycles d'anhydride) = 0,3/1; concentration de la solution de chitosane = 0,75% (g/100 ml).

IV.4. La structure chimique des nanocapsules magnétiques à base de CS / poly(NVPAI)

L'un des objectifs de cette étude était de préparer les nanocapsules hybrides par l'incorporation des nanoparticules magnétiques dans les NCs à base de CS / poly (NVPAI). La formation de ces capsules est réalisée par une réaction de condensation interfaciale qui se

produit par diffusion des deux polymères, dissous en différentes phases (phase aqueuse et phase organique), vers l'interface. Le contact d'une goutte de solution chitosane qui contient les nanoparticules magnétiques (phase aqueuse) avec la solution de poly(NVPAI) (phase organique) conduit à l'ouverture des cycles anhydride hautement réactif du poly NVPAI sous l'action du groupement amine ($-NH_2$) du chitosane; il en résulte instantanément, une membrane polymère par la formation de ponts amide entre les deux polymères. Cette membrane présente un caractère d'hydrogel prononcé étant donné la forte hydrophilie des deux partenaires de réaction. Une certaine quantité de cycles d'anhydride peut s'hydrolyser au contact de la solution aqueuse de CS, générant de nouveaux groupes carboxyliques $-COOH$ libres placés à l'extérieur de la membrane. La structure chimique des nanocapsules magnétiques obtenus est montrée sur la figure IV.1. La présence de nanoparticules magnétiques a été remarquée à la fois dans le noyau (cœur) des nanocapsules, dans la membrane polymère, qui a un comportement hydrogel et même collé sur la surface de la membrane. En effet, la quantité importante de magnétite s'est localisée au noyau de nanocapsule.

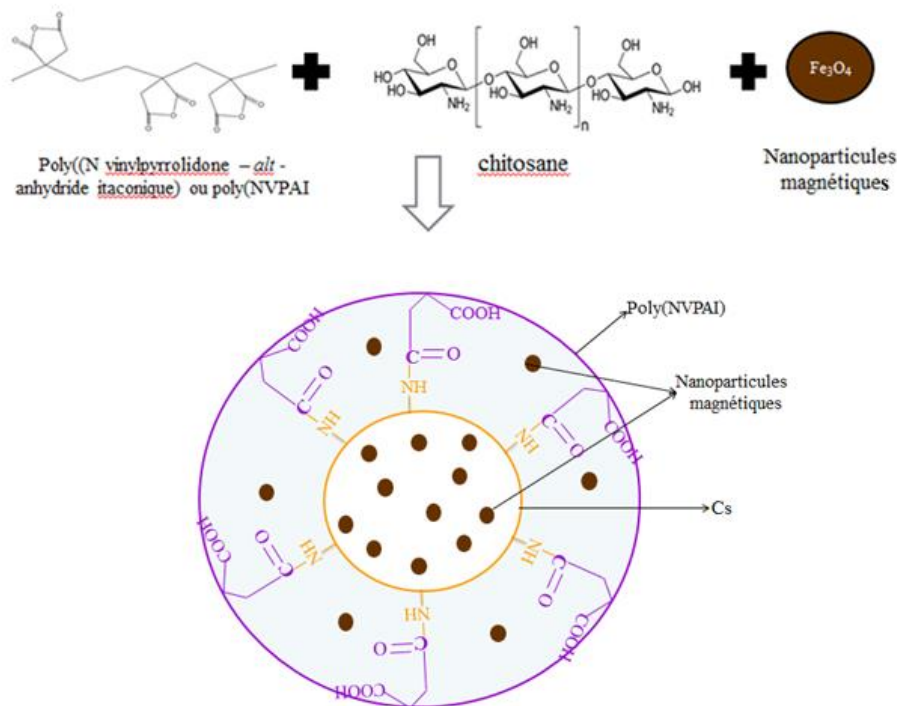


Figure IV.1 : Schéma réactionnel d'obtention des nanocapsules à base de CS / poly(NVPAI) contenant des nanoparticules magnétiques.

IV.5. Caractérisation des nanocapsules hybrides magnétiques obtenues

Grâce à la réaction de condensation interfaciale, des nanocapsules magnétiques ont été élaborés. Leurs caractéristiques sont présentées dans cette partie à savoir : diamètre et polydispersité; morphologie SEM et MET; caractérisation thermique et magnétique, comportement de gonflement, chargement et libération de médicament, potentiel zêta, test de cytotoxicité.

IV.5.1. Caractérisation structurelle des nanocapsules obtenues par Spectroscopie FTIR

Une première caractérisation structurale des nanocapsules magnétiques obtenues a été effectuée par la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR). Les spectres FTIR des échantillons préparés ont confirmés la réticulation entre les chaînes des deux polymères et ont confirmés aussi la présence de matériau magnétique dans les nanocapsules obtenues. Les spectres FTIR de nanoparticules magnétiques (M), des nanocapsules non magnétiques (CN) et des nanocapsules magnétiques (CNM-1, CNM-4) sont présentés dans la figure IV.2. Les nanocapsules non magnétiques (CN) sont des capsules à base de CS / poly(NVPAI) obtenus par le même procédé expérimental utilisé pour la préparation des nanocapsules magnétiques, mais elles ne contiennent pas, évidemment, les nanoparticules de magnétite.

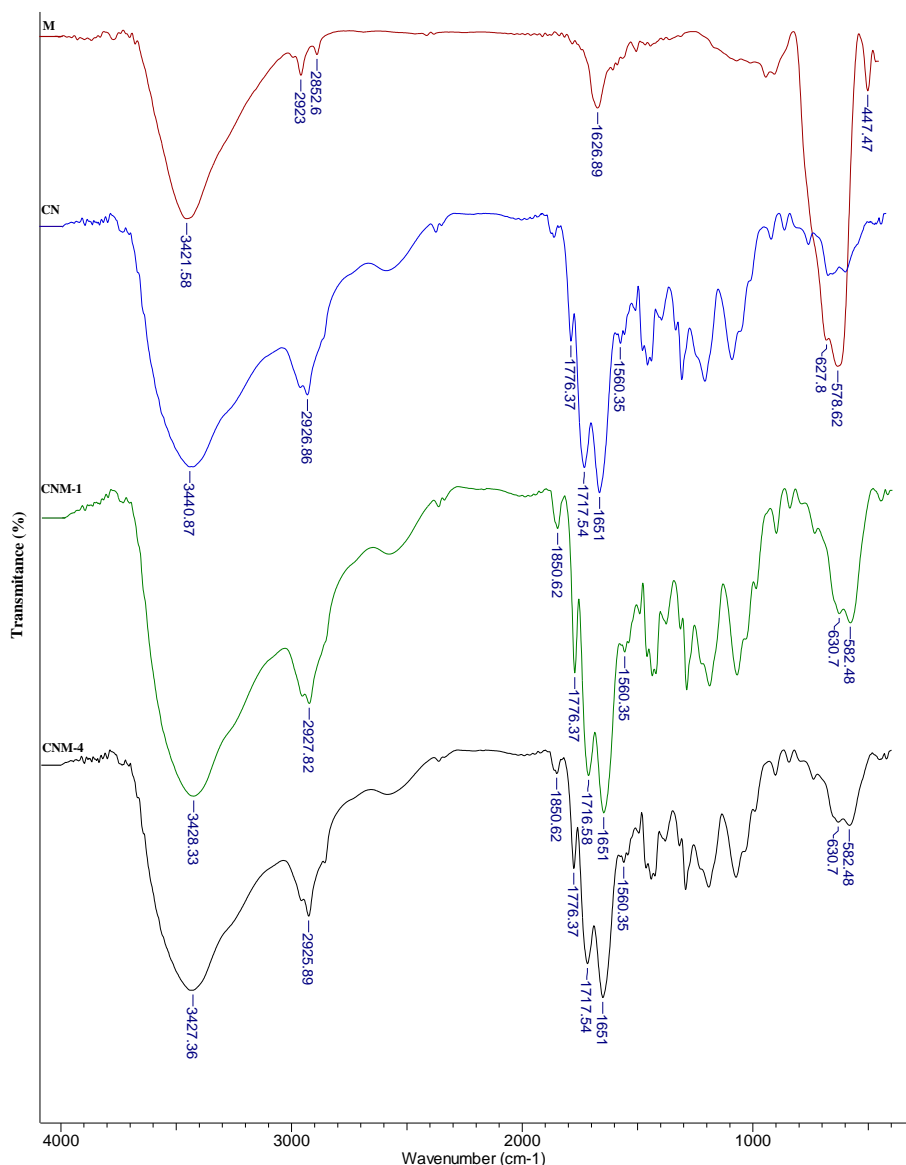


Figure IV.2: Spectre FT-IR pour la magnétite (M), CN, CNM-1 et CNM-4.

CN : nanocapsules non magnétiques et CNM-1, CNM-4 : les nanocapsules magnétiques.

Le spectre FTIR des nanoparticules magnétiques (M) présente des bandes d'absorption caractéristiques à 578 cm^{-1} et 627 cm^{-1} correspondant aux Fe-O et aux limites Fe-O-Fe de la magnétite (Fe_3O_4) [6,7], tandis que les pics à 1626 cm^{-1} et 3421 cm^{-1} sont caractéristiques des groupements hydroxyles liés à la présence d'eau à la surface des particules magnétiques [8,9] ; ces groupement $-\text{OH}$ peuvent être estérifié avec les cycles d'anhydrides de poly(NVPAI) qui explique la présence de certaines nanoparticules magnétiques colées sur la surface des nanocapsules.

Les deux spectres de CNM-1 et CNM-4 possèdent des pics caractéristiques similaires, donc, les nanocapsules magnétiques ont la même structure ; de manière comparable avec le spectre des nanocapsules polymères (CN), nous pouvons voir tous les pics d'absorption de CN dans les spectres de CNM-1 et CNM-4. Tous les pics d'absorption superposés à 3440 cm^{-1} , 3426 cm^{-1} et 3427 cm^{-1} apparus dans les spectres de CN, CNM-1 et CNM-4, sont attribués à la vibration d'étirement du groupe amine secondaire (N-H) ou des groupes hydroxyle (O-H). En outre, les échantillons CN, CNM-1 et CNM-4 montrent l'apparition d'un pic à environ 1776 cm^{-1} qui peut être attribué à la vibration d'étirement du groupe C = O, des groupes anhydride [10]. Les bandes d'absorption à 1717 cm^{-1} et 1716 cm^{-1} sont des pics caractéristiques de la vibration d'étirement du $\text{-C} = \text{O}$ des groupes carboxyliques. Le pic de 1650 cm^{-1} correspond à la liaison carbonyle des groupes amide nouvellement formés par la réaction du copolymère avec le chitosane.

La présence de NP magnétiques dans la composition des NC magnétiques (CNM-1 et CNM-4) a été confirmée par l'apparition du signal de 630 cm^{-1} et 582 cm^{-1} (groupes Fe-O et Fe-O-Fe). Cependant, un décalage entre les pics caractéristiques de la magnétite peut être observé, de 627 à 630 cm^{-1} et de 578 à 582 cm^{-1} , après leur incorporation dans les nanocapsules qui peuvent indiquer la formation d'interactions ioniques entre Fe_3O_4 et la matrice polymérique [11]. L'attribution des principaux pics est présentée dans le tableau IV.2.

Tableau IV.2 : Les bandes d'absorption caractéristiques de: magnétite (M), CN et de CNM

Echantillons	Bande d'absorption (cm^{-1})	Attribution
M	3421,58 627,8 et 578,62	groupements hydroxyles (OH) groupes Fe-O et Fe-O-Fe
CN	3440,78 1776 1717,54 1651	groupe amine secondaire (N-H) groupe C = O, des groupes anhydride groupes carboxyliques $\text{-C} = \text{O}$ groupes amide ($\text{O}=\text{C}-\text{NH}$)
CNM-1 et CNM-4	3428,3 et 3427,89 1776 1717 1651 630,7 et 582,48	groupe amine secondaire (N-H) groupe $\text{-C} = \text{O}$, des groupes anhydride groupes $\text{-C} = \text{O}$ des groupes carboxyliques groupes amide ($\text{O}=\text{C}-\text{NH}$) groupes Fe-O et Fe-O-Fe

IV.5.2. Détermination du diamètre moyen

Parmi les intérêts des systèmes nanoparticulaires est leur taille submicronique qui leur permet d'une part d'être administrés comme des suspensions liquides par voie orale, d'autre part d'être injectés par voie intraveineuse sans risque de provoquer une occlusion vasculaire.

Le diamètre moyen des NP magnétiques est d'environ 14 nm alors que les diamètres moyens des nanocapsules hybrides varient entre 43 et 142 nm (figure IV.3) selon les conditions de préparation (tableau IV.1).

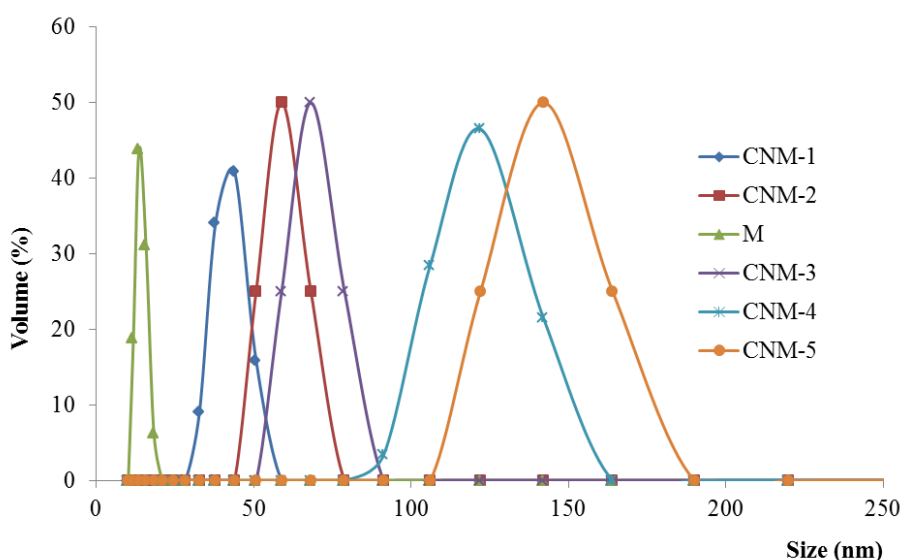


Figure IV.3 : Courbes de distribution dimensionnelle des nanoparticules magnétiques (M) et des nanocapsules hybrides (CNM).

D'après les résultats obtenus, il a été constaté que la taille des nanocapsules magnétiques ainsi que la polydispersité dimensionnelle augmentent avec l'augmentation de la quantité de NP magnétiques. La quantité de magnétite ajoutée à la solution de CS est présentée dans le tableau IV.1.

Cette augmentation de taille peut être attribuée à l'inclusion de magnétite à la fois dans le noyau des NC et dans la membrane polymère qui a conduit à l'augmentation de l'épaisseur de ce dernier et, par conséquent, à l'augmentation du diamètre des nanocapsules. Les courbes de distribution granulométrique ont un caractère monomodal, mais présentent une large polydispersité, en particulier lorsque de grandes quantités de magnétite ont été incorporées.

Les valeurs du diamètre moyens des nanocapsules hybrides magnétiques obtenus sont illustrés dans le tableau IV.3

Tableau IV.3. Diamètre moyen des nanocapsules magnétiques

Échantillons	M	CNM-1	CNM-2	CNM-3	CNM-4	CNM-5
Diamètre moyen (nm)	13,5	43	58	68	122	142

IV.5.3. Stabilité des suspensions aqueuses (Potentiel zêta)

Le potentiel zêta des nanocapsules magnétiques a été déterminé afin d'étudier la stabilité de la dispersion des capsules dans un milieu légèrement alcalin (pH = 7,4), qui imite les conditions physiologiques. Les valeurs du potentiel zêta varient entre -17,7 mV et -20,9 mV et augmentent avec l'augmentation de la quantité de magnétite dans les nanocapsules (tableau IV.4).

Tableau IV.4. Valeurs du potentiel zêta des nanocapsules magnétiques dans PBS à pH = 7,4.

Échantillons	potentiel zeta (mV)	Conductivité (mS/cm)
CNM-1	-17.7	12.5
CNM-2	-18.5	14.1
CNM-3	-19.6	15.4
CNM-4	-19.8	18.7
CNM-5	-20.9	17.6
CNM-6	-17.9	18.2
CNM-7	-19.8	12.2
CNM-8	-20.1	16.9

De plus, il a été constaté que l'augmentation du rapport volumique entre les deux phases (aqueuse et organique) pourrait augmenter les valeurs de potentiel zêta. L'hydrolyse d'une certaine quantité des cycles d'anhydride n'ayant pas réagi conduit à la formation de groupes carboxyliques qui forment des anions carboxylate en milieu alcalin. En conséquence, entre les capsules chargées négativement seront exercées des forces de répulsion électrostatique qui conduiront à une augmentation des valeurs de potentiel zêta et, ainsi, à une stabilité améliorée de la suspension de NCs et une tendance à l'agglomération réduite.

Sur la base des résultats obtenus, nous pouvons conclure que le système de nanocapsules hybride présente une stabilité suffisante en milieu aqueux pour notre application.

IV.5.4. Morphologie des nanocapsules

L'une des principales méthodes de caractérisation des particules du point de vue morphologique est la microscopie électronique à balayage (MEB), à travers laquelle la forme, les dimensions et les caractéristiques de surface des échantillons peuvent être étudiées.

L'image de microscopie électronique à balayage (MEB) de l'échantillon CNM-5 est présentée sur la figure IV.4. D'après cette figure, on observe que les nanocapsules magnétiques présentent une forme sphérique. L'image montre aussi la présence d'un contraste de phase à la surface des composés magnétiques ; cette observation est une preuve directe de l'existence et de l'incorporation de nanoparticules magnétiques dans les nanocapsules même sur leur surface. De plus, les nanocapsules hybrides présentent des valeurs de centaines de nanomètres de diamètre ; ces résultats sont en accord avec les résultats obtenus par l'analyse DLS si on prend en considération le large attrait du pic de distribution granulométrique. Donc, les nanocapsules hybrides obtenus sont adaptés à une injection intraveineuse car leur taille est d'environ quelques dizaines de nanomètres dans la plupart de cas [12-15].

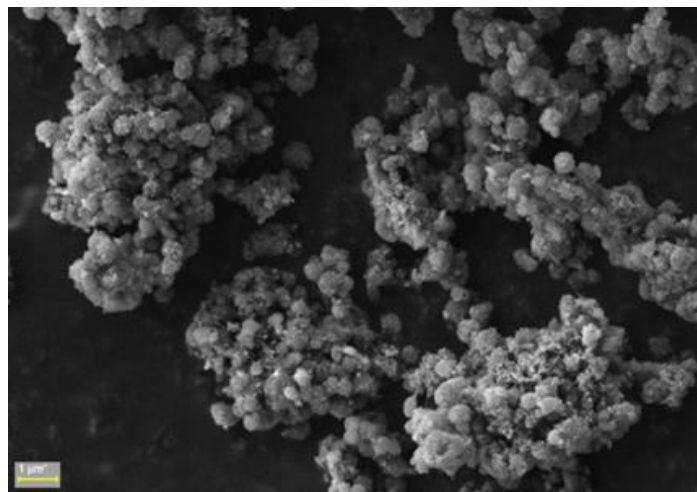


Figure.IV. 4 : Microscopie électronique à balayage (MEB) pour l'échantillon CNM-5.

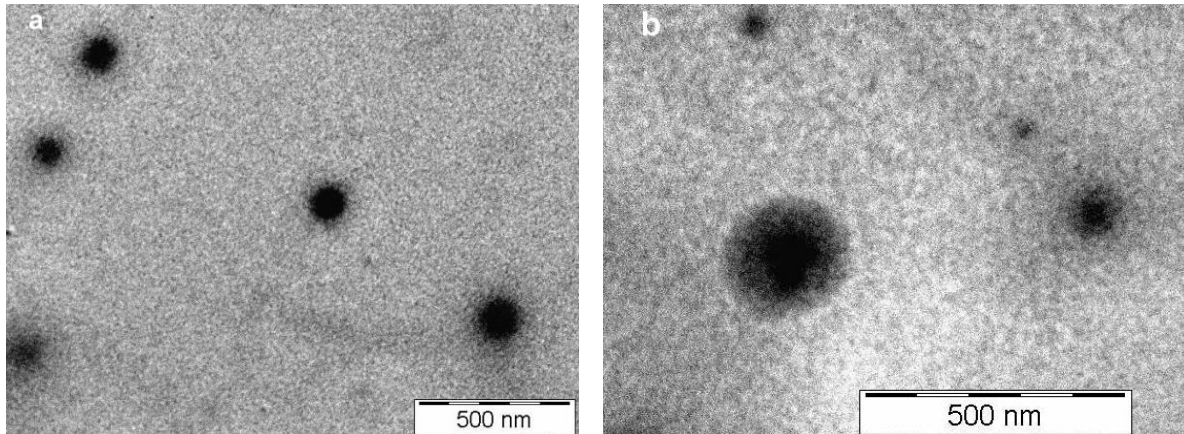


Figure IV.5 : Microscopie électronique en transmission (MET) pour l'échantillon CNM-5.

Sur la base des spectres de microscopie électronique à transmission (TEM) de la figure IV.5, on peut affirmer que les capsules présentent une forme sphérique. Leur structure «noyau-coquille» est évidente, leur noyau étant composé de nanoparticules de magnétite agglomérées. Ce noyau est entouré par la membrane polymère (le plus brillant autour de la capsule), on constate aussi que dans cette membrane et partiellement à l'extérieur de la membrane, on remarque des nanoparticules de magnétite, comme suggéré par la photographie MEB présentée précédemment (figure IV.4). La photographie permet également l'estimation approximative de l'épaisseur de la membrane polymère (environ 20 nm, selon la figure IV.5.b).

IV.5.5. Propriétés thermique des nanocapsules par ATG

L'évaluation des propriétés thermiques des matériaux est requise pour deux raisons:

- Constituer des informations complémentaires sur le type de matériau analysée (mélange, combinaison chimique, etc.);
- Donner des informations sur sa capacité à résister à la stérilisation thermique.

Les courbes thermogravimétriques (ATG) caractéristiques des nanocapsules magnétiques pour les échantillons (CNM-1, CNM-4 et CNM-6) et des nanocapsules non magnétiques (CN) sont présentées dans la figure IV.6 et les résultats du comportement thermique de ces produits sont présentés dans le tableau IV.4.

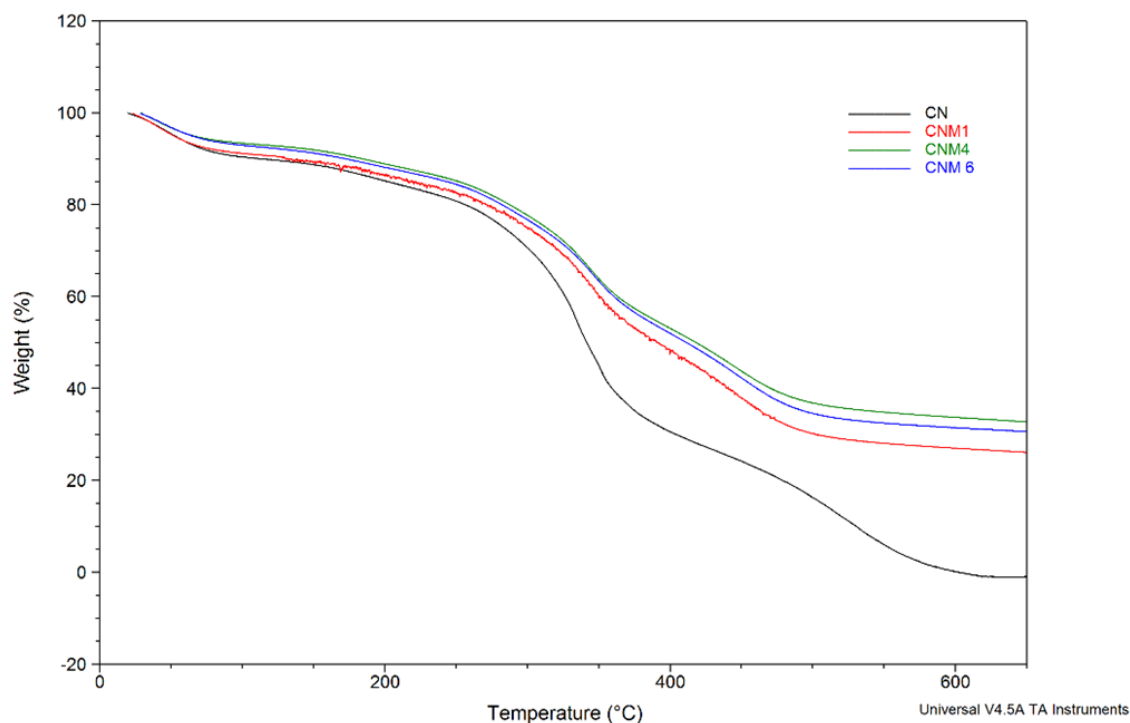


Figure IV.6 : Courbes thermogravimétriques pour CN, CNM-1, CNM-4 et CNM-6.

A partir de cette figure, on observe que toutes les courbes thermiques des capsules préparées présentent trois étapes de dégradation en fonction de la température avec différents pourcentages de perte de masse.

La première étape de dégradation apparaît dans la plage de température de 25-120°C, se caractérise par une perte de masse comprise entre 8 et 10% correspondante à l'évaporation des molécules d'eau libres qui se trouvent toujours dans les nanocapsules malgré l'étape préalable de séchage qui a été effectué à la fin de synthèse des particules. L'eau est liée et interagit fortement avec les chaînes de polymères ou de nanoparticules magnétiques, soit par des liaisons hydrogènes entre l'atome d'hydrogène des molécules d'eau et l'oxygène des chaînes de polymères ou de nanoparticules magnétiques, soit par des interactions hydrophobes. Donc, par conséquent plus difficile à éliminer.

La deuxième étape se produit dans une gamme de température de 120°C à 400°C, la perte de masse au cours de cette étape thermique se situe entre 35 à 40% ; cette perte est très importante (dégradation de la partie majeure) et clairement visible si on compare les thermogrammes des échantillons. Elle correspond à la décomposition des cycles anhydride des unités d'anhydride itaconique et à la décomposition thermique et oxydative du chitosane, ce qui est dû au clivage thermique des liaisons entre les chaînes polymériques.

La dernière étape de dégradation se situe entre 400°C et 650°C avec une perte de poids d'environ 25% correspond à la décomposition complète des matériaux polymères. Une masse non dégradée avec différents pourcentages correspond au matériau magnétique qui se trouve dans les nanocapsules. Il existe une séquence logique de toutes les courbes thermiques :

Par exemple, pour l'échantillon CNM-1 nous avons un pourcentage de masse de 26,9% qui reste à 700 °C, correspondant à la quantité de magnétite qui se trouve dans les capsules hybrides. Le pourcentage restant dans l'échantillon CNM-4 est d'environ 33,2%, par comparaison avec CNM-1, cette différence de pourcentage est liée au rapport massique magnétite/chitosane utilisé initialement dans les conditions expérimentales d'obtention des nanocapsules magnétiques (tableau IV.1). Le pourcentage de masse restant est 31% pour l'échantillon CNM-6, ce dernier contient le même rapport magnétite/chitosane que l'échantillon CNM-4, d'un pourcentage de masse restant 33,2%. Cette petite différence entre ces deux échantillons (CNM-4 et CNM-6) peut être attribuée au changement de phase organique; on remarque que, lorsque la phase organique augmente, la quantité de magnétite incorporée diminue (tableau IV.1).

Dans le cas des nanocapsules non magnétiques (CN), utilisées comme référence, une décomposition complète a été remarquée à environ 600°C avec un résidu de 0%, car ce matériau a été obtenu juste à base de polymères organiques qui ne résiste pas à des températures supérieures à 600°C (une dégradation totale à cette température). En général ; les pertes en masse à une température inférieure à 600°C représentent l'eau qui s'évapore et les produits volatiles qui se forme par la dégradation thermique des polymères organiques utilisés pour la préparation de particules ; le résidu est, pratiquement, le matériau magnétique.

Ces résultats sont en parfait accord avec les résultats trouvés par d'autres études antérieures [16, 17]. Cette étude thermique a montré que les nanocapsules magnétiques sont thermiquement plus stables que les nanocapsules non magnétiques, ainsi, que leur stabilité thermique augmente lorsque la teneur en magnétite augmente. L'attrait des courbes des nanocapsules magnétiques par rapport aux nanocapsules non magnétiques est le même mais il y a un décalage entre les particules magnétiques et non magnétiques qui est dû à la formation d'interactions ioniques entre la magnétite et la matrice polymère comme démontré par l'analyse FTIR, qui a induit à une stabilité thermique accrue des nanocapsules magnétiques. Les étapes de dégradation, la température et le pourcentage de perte de masse correspondant à chaque dégradation pour chaque échantillon sont reportées dans le tableau IV.5.

Tableau IV.5. Les résultats de l'analyse thermogravométrique pour CN, CNM-1 CNM-4 et CNM-6

Échantillons	Étapes de dégradation	Temperature (°C)	Pourcentage de perte de masse (%)
CN	I	100	9.6
	II	392	58
	III	642	32
CNM-1	I	93.7	8.54
	II	383.4	40.05
	III	625	24.49
CNM-4	I	77.88	5.8
	II	374	36
	III	644	25
CNM-6	I	77	6
	II	379	38
	III	646	25

IV.5.6. Propriétés magnétiques

Puisque les nanocapsules synthétisées sont magnétiques, alors nous sommes intéressés à évaluer leurs propriétés magnétiques sous un champ magnétique externe à une température ambiante par un magnétomètre à échantillon vibrant (VSM).

La figure IV.7 représente les courbes de magnétisation pour les échantillons CNM-1, CNM-2, CNM-4 et CNM-5 déterminées par VSM à température ambiante. Ce cycle est en effet parfaitement symétrique autour de l'origine et totalement superposable ; les courbes d'aimantation ne présentent pas d'hystérésis lorsqu'un champ magnétique externe est appliqué pour tous les échantillons analysés. La coercivité (Hc) et la rémanence (Mr) sont toutes les deux nulles, ce qui prouve le super paramagnétisme des nanocapsules magnétiques [18]. Le concept s'explique par le fait que lorsqu'un champ magnétique externe est appliqué, les nanoparticules de magnétite deviennent magnétiques, tout en revenant à l'état non magnétique une fois le champ magnétique arrêté. Cette caractéristique rend possible les applications de nanocapsules magnétiques pour l'administration ciblée de médicaments. Les valeurs de

magnétisation de saturation (M_s) pour chaque échantillon, ont été enregistrés : $M_s = 13,5$ emu / g pour l'échantillon CNM-5, $M_s = 9,9$ emu / g pour l'échantillon CNM-4, $M_s = 5,0$ emu / g pour l'échantillon CNM-2, et $M_s = 4,0$ emu / g pour l'échantillon CNM-1.

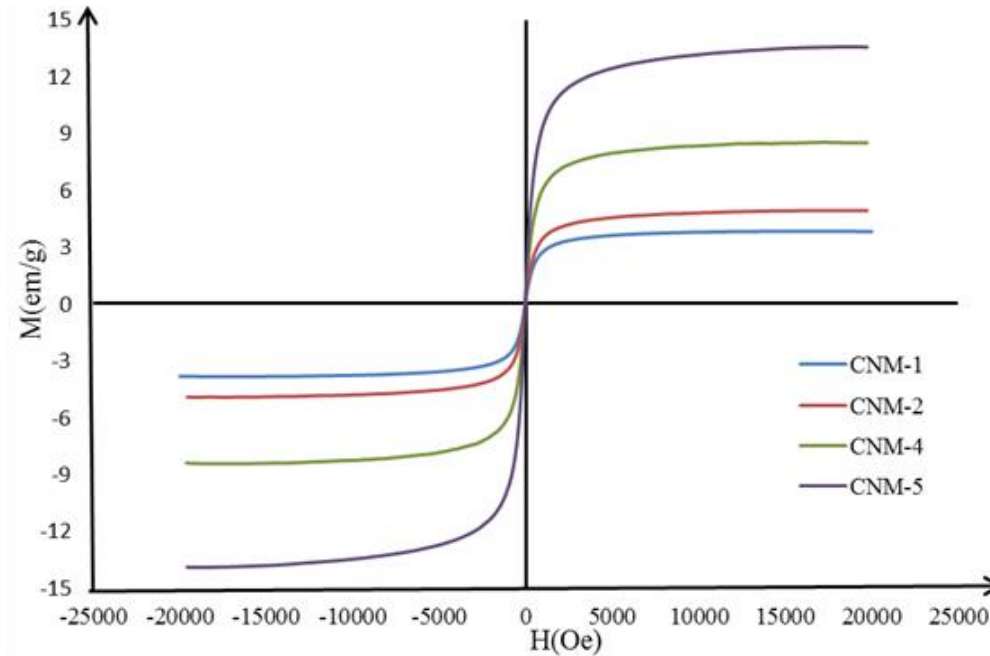


Figure IV.7: Les courbes de magnétisation de différents nanocapsules magnétiques (CNM-1, CNM-2, CNM-4 et CNM-5).

L'analyse comparative des valeurs de l'aimantation à saturation confirme l'idée que les nanoparticules de magnétite ont été incorporées avec succès dans les nanocapsules, ainsi, la magnétisation à saturation des nanocapsules magnétiques dépend du taux de magnétite contenus dans les capsules. La valeur de magnétisation la plus élevée a été enregistrée pour l'échantillon CNM-5, contenant la plus grande quantité de magnétite, et il est apparu que la valeur de la magnétisation diminue lorsque la quantité de Fe_3O_4 diminue.

IV.6. Étude de gonflement des nanocapsules magnétiques

Le comportement de gonflement des nanocapsules magnétiques obtenus a été étudié en milieu légèrement alcalin (pH 7,4) afin d'évaluer leur potentiel à être utilisées comme supports de médicaments (figure IV.8). Le gonflement des nanocapsules est provoqué par la pénétration de l'eau dans le noyau vide jusqu'au remplissage complet ainsi que par le gonflement de la membrane polymère qui a un caractère hydrogel [19]. Evidemment, la quantité d'eau contenue dans la cavité de la capsule dépend, d'une part, de l'élasticité et de

l'épaisseur de membrane, et d'autre part, de la quantité de matériau magnétique dans la capsule.

Les pourcentages de valeurs maximales du degré de gonflement des nanocapsules magnétiques à 24 heures en solution tampon phosphate (pH = 7,4) sont représentés dans la figure IV.8. La figure IV.9 représente la cinétique de gonflement des nanocapsules magnétiques en même milieu aqueux.

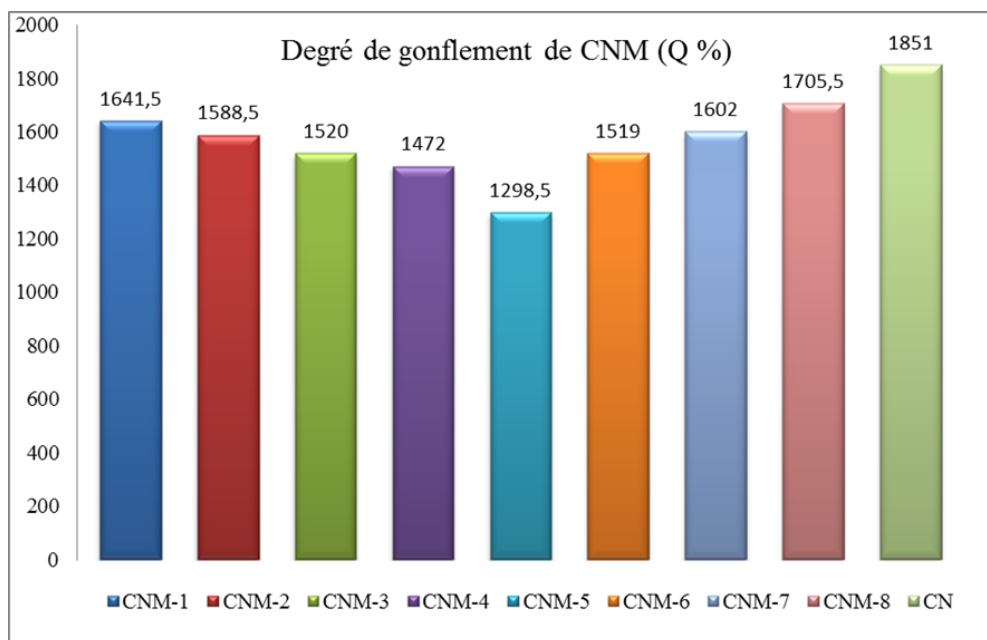


Figure IV.8 : Le degré maximal de gonflement à 24h en solution PBS (pH = 7,4) des nanocapsules magnétiques CNM-1, CNM-2, CNM-3, CNM-4, CNM-5; CNM-6, CNM-7, CNM-8, CN.

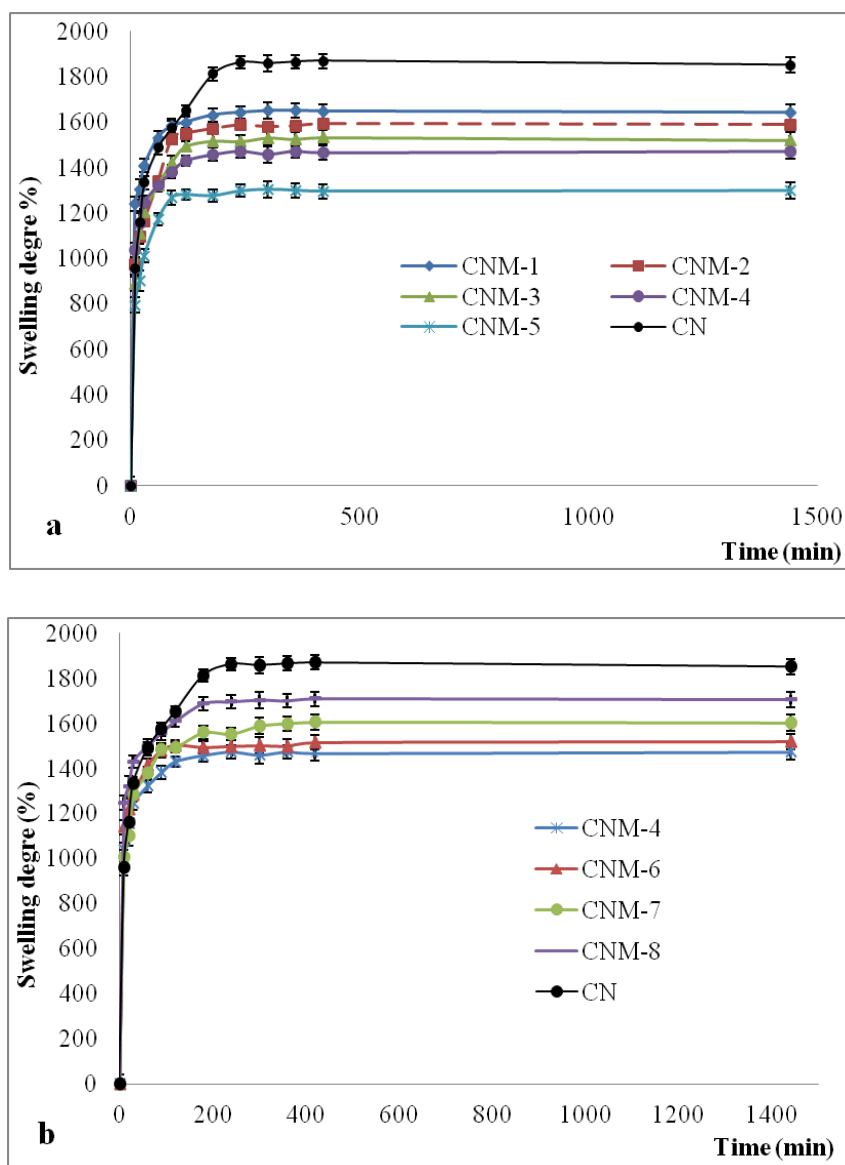


Figure IV.9 : Les courbes de cinétique de gonflement des nanocapsules en conditions alcalines (pH = 7,4) pour les échantillons: **a)** CN, CNM-1, CNM-2, CNM-3, CNM-4, CNM-5; **b)** CN, CNM -4, CNM-6, CNM-7, CNM-8.

Comme on peut le voir sur la figure IV.8, tous les nanocapsules magnétiques présentent un degré de gonflement élevé qui varie entre 1298% et 1705% et qui peuvent être dû à la pénétration de l'eau dans la membrane polymérique et dans le noyau des capsules. En outre, on observe que les nanocapsules non magnétiques présentent un taux de gonflement d'environ 1850% ; ce degré de gonflement est beaucoup plus élevé que dans les capsules magnétiques. Ceci est attribué à l'absence de matériau magnétique dans le noyau des nanocapsules. La taille, la composition et les paramètres de préparation des capsules magnétiques ont un effet visible sur les propriétés de gonflement.

Sur la figure IV.9.a), on peut observer que le degré de gonflement des nanocapsules magnétiques varie entre 1298% et 1640% et diminue avec l'augmentation de la quantité de magnétite incorporée dans les NCs. Ce comportement peut être attribué à la diminution de l'espace à l'intérieur des nanocapsules en raison de l'augmentation de la quantité de magnétite présente dans le système, réduisant ainsi la quantité d'eau pouvant pénétrer dans le noyau de la capsule, et, implicitement, à une diminution du degré de gonflement des nanocapsules.

D'après la figure IV.9.b), on remarque une augmentation du degré de gonflement avec l'augmentation de volume de la phase organique pour la même quantité de magnétite (Tableau IV.1). Ce comportement peut s'expliquer comme suit: quand le volume de la phase organique augmente (dilution de la solution de copolymère), le nombre de macromolécules de poly(NVPAI) qui entre en contact avec une goutte de la solution aqueuse de chitosane diminue progressivement du fait de la dilution de la solution de copolymère et devient de plus en plus petite. En conséquence, la densité de réticulation de la membrane de nanocapsule diminue, et donc le taux de gonflement augmente.

IV.7. Efficacité d'encapsulation de 5-fluorouracile

Ce type de nanocapsules magnétiques a été développé afin d'être utilisé pour le traitement ciblé du cancer. L'efficacité d'encapsulation du 5-FU utilisé comme médicament antitumoral modèle dans des nanocapsules magnétiques est présentée dans le tableau IV.6.

Tableau IV.6 : Valeurs d'efficacité d'encapsulation de 5-FU.

Échantillons	CNM-1	CNM-4	CNM-5	CNM-6	CNM-7	CNM-8
Efficacité d'encapsulation (%)	29	26	22	27	29	32
La quantité de 5-FU (mg)/CNM(mg)	0,218	0,194	0,163	0,201	0,215	0,239

La quantité de médicament retenue par les nanocapsules dépendait du rapport magnétite/polymère. L'efficacité de chargement du médicament diminue avec l'augmentation de la quantité de nanoparticules de magnétite, cet effet étant attendu car l'espace laissé à la disposition du médicament dans le noyau des NCs est réduit avec l'augmentation de la quantité de nanoparticule de magnétite. De plus, l'efficacité de chargement augmente avec l'augmentation de la phase organique; cet effet est dû à la réduction de la densité de réticulation de la membrane des nanocapsules et donc à l'augmentation de sa capacité à inclure un plus grand nombre de molécules médicamenteuses dans le maillage du réseau. Ce

comportement est en accord avec le degré de gonflement des NCs hybrides en milieu PBS, à pH 7,4.

IV.8. Libération de 5-FU par les nanocapsules magnétiques

La cinétique de libération de 5-FU à partir de nanocapsules magnétiques dans un PBS (pH = 7,4) est illustrée dans la figure IV.10.

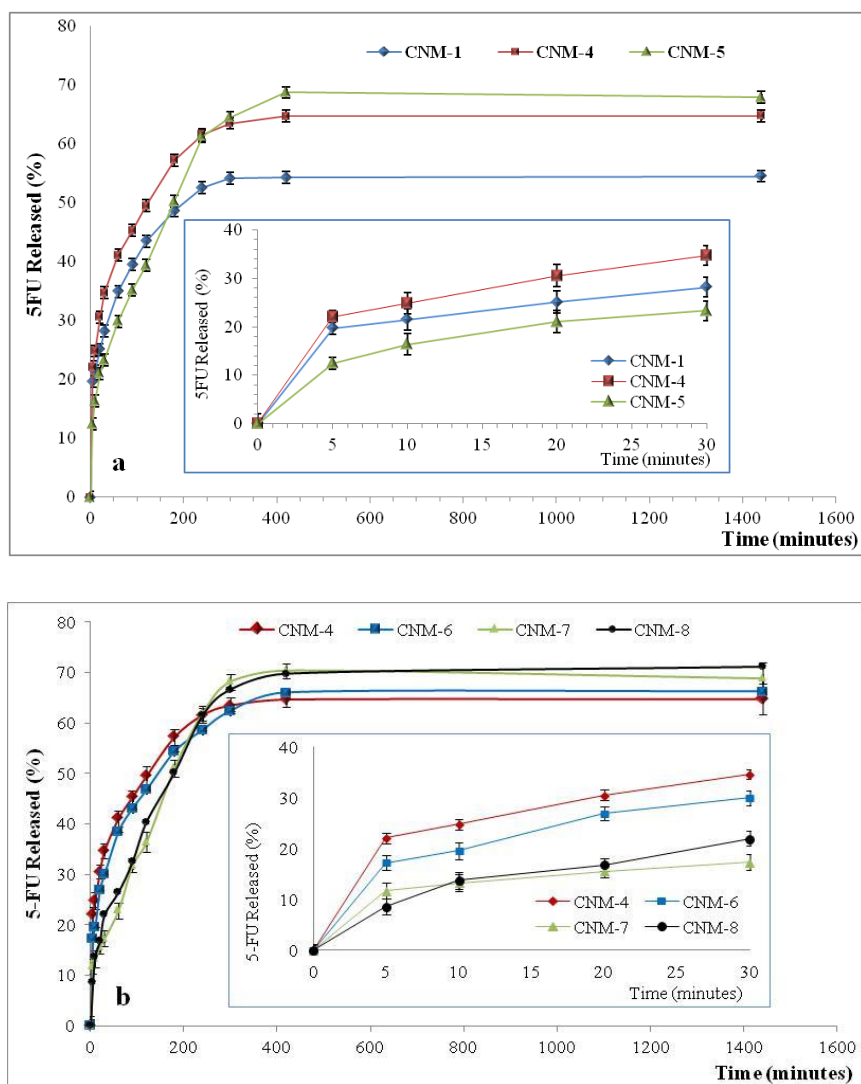


Figure IV.10: Cinétique de libération in vitro de 5-FU à partir de NC magnétiques dans une solution tampon phosphate (pH 7,4), avec un insert zoom de cinétique de libération entre 0 et 30 minutes, pour les échantillons: a). CNM-1, CNM-4 et CNM-5; b). CNM-4, CNM-6, CNM-7 et CNM-8.

La libération du médicament à partir des nanocapsules magnétiques est contrôlée par diffusion de 5-fluorouracile par la membrane polymère et se déroule en deux étapes. La

première phase rapide appelée (effet d'éclatement), dans cette étape un pourcentage d'environ 25 à 35% de 5-fluorouracile a été libéré dans les 10 à 30 premières minutes. Ceci est attribué à la désorption du médicament situé à la surface des nanocapsules. La seconde phase correspond à la diffusion du médicament du noyau interne de nanocapsule vers la phase externe et l'évolution de la libération de 5-fluorouracile est presque linéaire avec une vitesse de libération lente jusqu'à l'équilibre [17]. De plus, il semble que l'augmentation de la quantité de nanoparticules magnétiques conduit à une augmentation de l'efficacité de libération du médicament.

La figure IV.10.b) montre que l'efficacité de libération augmente légèrement avec l'augmentation du volume de la phase organique. Ce comportement est conforme à la fois au degré de gonflement et aux résultats de chargement, et s'explique par le transport/diffusion plus facile du médicament à travers la membrane polymère, qui a une densité de réticulation moindre à un volume élevé de la phase organique. L'efficacité de libération du 5-FU en milieu alcalin se situe entre 52 et 70%.

IV.9. Analyse théorique de la libération de médicaments

Dans notre cas, les paramètres de Korsmeyer et Peppas ont présentées dans le tableau IV.6:

Tableau IV.7. Paramètres de Korsmeyer-Peppas.

Échantillons	CNM-1	CNM-4	CNM-5	CNM-6	CNM-7	CNM-8
k	0,167	0,195	0,112	0,157	0,090	0,094
n	0,184	0,187	0,273	0,220	0,308	0,303

Comme on peut le voir, dans tous les cas les valeurs de « n » indiquent une diffusion fickienne perturbée. De plus, à partir de la représentation graphique (figure IV.11) de la cinétique de libération expérimentale et suivant le modèle de Korsmeyer-Peppas, on peut voir que le meilleur ajustement est dans la première partie de la cinétique de libération, c'est-à-dire dans la phase de gonflement de la libération, où le phénomène dominant est la diffusion fickienne [20].

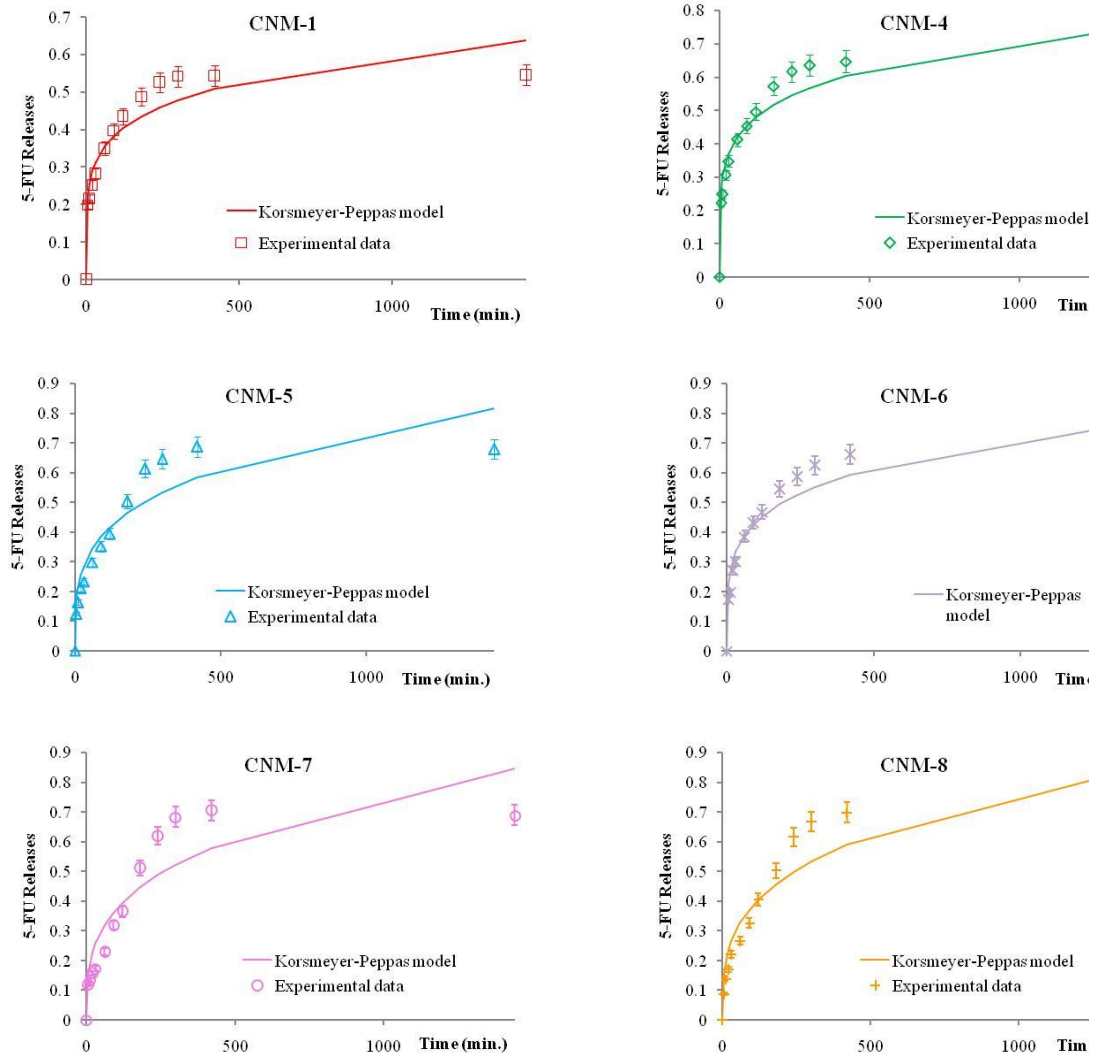


Figure IV.11. Cinétique de libération expérimentale et courbes théoriques de Korsmeyer-Peppas pour les nanocapsules magnétiques.

IV.10. Test de viabilité

Les tests *in vitro* sur la lignée de cellules tumorales MCF-7 ont été réalisés afin d'étudier, d'une part, la biocompatibilité des nanocapsules non chargées et non magnétiques (CN), et d'autre part l'efficacité cytostatique de nanocapsules chargées en 5-FU (CN-5-FU) et de NC hybrides chargées en 5-FU (CNM-4-5-FU). Cet effet cytostatique a été induit par la libération contrôlée de 5-FU des NC chargés de médicament pendant un traitement de 48 heures à des doses allant de 50 à 250 µg / ml, et a été comparé à l'effet du traitement avec du 5-FU libre. Comme le montre la figure IV.12, le traitement de 48 heures avec les nanocapsules non chargées (CN) a entraîné des interférences insignifiantes avec la viabilité cellulaire MCF-7. Ainsi, la viabilité cellulaire atteint, par rapport au contrôle, à la dose la plus

faible utilisée (50 µg / mL) les valeurs de 99,84% et à la dose expérimentale la plus élevée (250 µg / ml) une valeur de 91,39%, correspondant à des valeurs de cytotoxicité de 0,16% et respectivement de 8,61%. Ces valeurs indiquent que les échantillons analysés sont bien tolérés par les cellules MCF-7. Le traitement avec des nanocapsules chargées de 5-FU (CN-5-FU) a été suivi d'une diminution modérée de la viabilité cellulaire, de manière dose-dépendante.

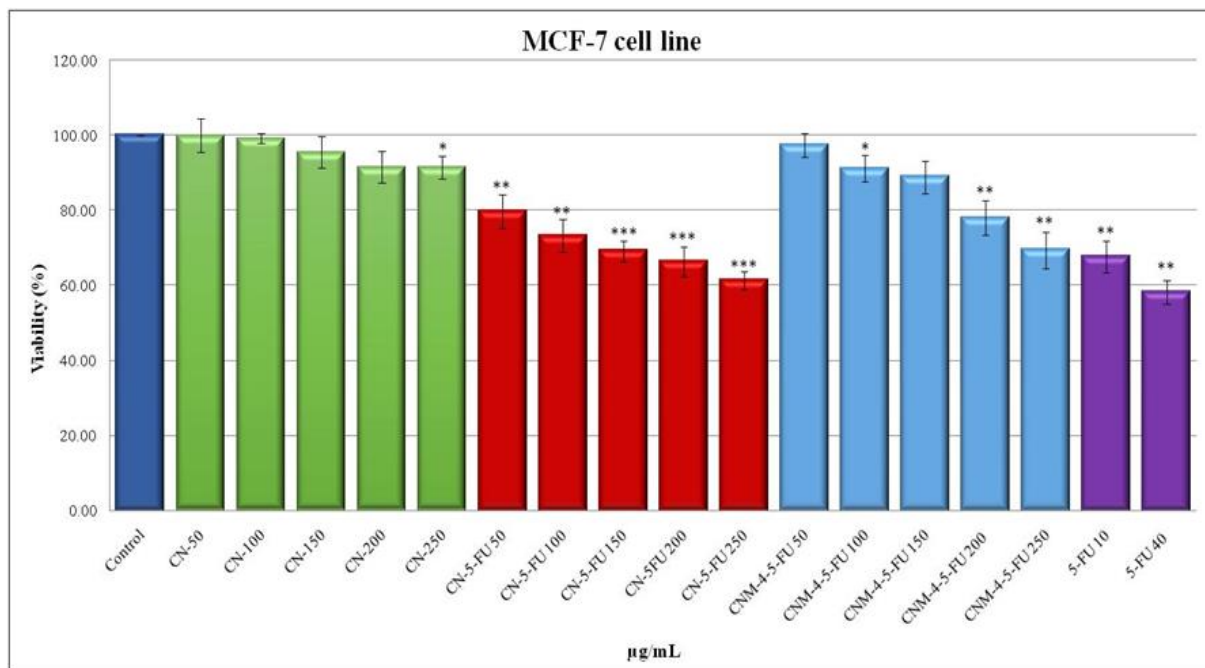


Figure IV.12 : Viabilité des cellules MCF-7 de carcinome du sein humain après 48 heures d'incubation avec des nanocapsules non chargées (CN-2), des nanocapsules chargées en 5-FU (CN-2-5-FU), des nanocapsules magnétiques chargées en 5-FU (CNM-4-5-FU) et 5-FU en fonction de la concentration.

A la dose minimale, une valeur de viabilité cellulaire de 79,7% a été enregistrée, corrélée à un effet cytotoxique de 20,3%. À la dose maximale, la valeur de viabilité cellulaire était de 61,33%, conduisant à une cytotoxicité de 38,67%. Le traitement CNM-4-5-FU a eu pour conséquence un effet cytotoxique plus faible que celui induit par le CN-5-FU, se faisant remarquer une valeur de 30,61%, à la dose la plus élevée. Le traitement de 48 heures avec du 5-FU libre s'est matérialisé par une diminution de la viabilité cellulaire, atteignant à la dose la plus élevée (40 µg / mL) la valeur de 58,24%, corrélée à un effet cytotoxique de 41,76%, presque par la valeur recommandée par programmes de dépistage *in vitro* [21-23].

IV.11. Conclusion

L'approche originale proposée dans cette étude est le développement d'un système hybride innovant utilisant des nanocapsules à base de polymères naturels et synthétiques contenant à la fois des nanoparticules magnétiques et un médicament antitumoral, afin d'améliorer l'efficacité du traitement antitumoral. Les nanoparticules magnétiques possèdent des propriétés extrêmement intéressantes pour la nanomédecine. Les nanocapsules magnétiques pourraient être dirigées avec un champ magnétique externe vers la cible et le mouvement des particules magnétiques pourrait entraîner une augmentation de la température dans les cellules tumorales induisant un effet hyperthermique. Cet effet, combiné à la libération contrôlée du médicament antitumoral (5-fluorouracile) au site de la tumeur, détruira les cellules tumorales. Les nanocapsules hybrides présentent des valeurs de centaines de nanomètres de diamètre et ont une forme sphérique bien définie. L'analyse des propriétés magnétiques a permis de conclure que les particules présentent un superparamagnétisme. Les nanocapsules magnétiques ont permis l'encapsulation d'une quantité accrue de 5-fluorouracile et ont présenté une bonne capacité de libération du médicament.

Références bibliographiques

- [1] Dellali K. Z.; Rata D. M.; Popa M.; Djennad M.; Ouagued, A.; & Gherghel D. Antitumoral Drug: Loaded Hybrid Nanocapsules Based on Chitosan with Potential Effects in Breast Cancer Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, **2020**, 21(16), 5659.
- [2] Fortin J.-P.; Wilhelm C.; Servais J.; Ménager C.; Bacri J.-C.; Gazeau F. Size-Sorted Anionic Iron Oxide Nanomagnets as Colloidal Mediators for Magnetic Hyperthermia. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129 (9), 2628–2635.
- [3] Mohan N.; Mohanan PV.; Sabareeswaran A.; Nair P. Chitosan-hyaluronic acid hydrogel for cartilage repair, *Int. J. Biol. Macromol.* **2017**, 104, 1936-1945.
- [4] Rață D.M.; Popa M.; Chailan J. F.; Zamfir C.L.; Peptu C. A. Biomaterial properties evaluation of poly(vinyl acetate-alt-maleic anhydride)/chitosan nanocapsules, *J. Nanopart. Res.*, **2014**, 16, 2569.
- [5] Gaudin F.; Sintez-Zydowicz N. Poly(urethane-urea) nanocapsules prepared by Interfacial Step Polymerisation in Miniemulsion. The droplet size: a key-factor for the molecular and thermal characteristics of the polymeric membrane of the nanocapsules?, *Colloids Surf. A.* **2011**, 384: 698 - 712.
- [6] Marquez F.; Campo T.; Cotto M.; Polanco R.; Roque R.; Fierro P.; Sanz J.M.; Elizalde E.; Morant C. Synthesis and characterization of monodisperse magnetite hollow microspheres. *Soft Nanoscience Letters* **2011**, 01, 25–32.
- [7] Wei Y.; Han B.; Hu X.; Lin Y.; Wang X.; Deng X. Synthesis of Fe₃O₄ Nanoparticles and their Magnetic Properties. *Procedia Engineering* **2012**, 27, 632–637.
- [8] Yang K.; Peng H.; Wen Y.; Li N. Re-examination of characteristic FTIR spectrum of secondary layer in bilayeroleic acid coated Fe₃O₄ nanoparticles. *Applied Surface Science* **2010**, 256, 3093-3097.
- [9] Cornell RM.; Schwertmann U. *The Iron Oxides: Structure, Properties, Reactions, Occurrences and Uses*; Weinheim: Wiley-VCH Verlag, **2003**.
- [10] Rata D.M.; Chailan J.F.; Peptu C.A.; Costuleanu M.; Popa M. Chitosan: poly(N-vinylpyrrolidone-alt-itaconic anhydride) nanocapsules—a promising alternative for the lung cancer treatment. *Journal of Nanoparticle Research* **2015**, 17, 316–327.
- [11] Khmara I.; Strbak O.; Zavisova V.; Koneracka M.; Kubovcikova M.; Antal I.; Kavecansky V.; Lucanska D.; Dobrota D.; Kopcansky P. Chitosan-stabilized iron oxide nanoparticles for magnetic resonance imaging. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **2019**, 474, 319-325.
- [12] Blanco E.; Shen H.; Ferrari M. Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery. *Nature Biotechnology* **2015**, 33, 941-951.
- [13] Lundy D.J.; Chen K.H.; Toh E.K.W.; Hsieh P.C.H. Distribution of Systemically Administered Nanoparticles Reveals a Size-Dependent Effect Immediately following Cardiac Ischaemia-Reperfusion Injury. *Sci Rep* **2016**, 6, 25613.
- [14] Hubbs A.F.; Mercer R.R.; Benkovic S.A.; Harkema J.; Sriram K.; Schwegler-Berry D.; Goravanahally M.P.; Nurkiewicz T.R.; Castranova V.; Sargent L.M. Nanotoxicology—a pathologist’s perspective. *Toxicol Pathol* **2011**, 39.
- [15] Begines B.; Ortiz T.; Pérez-Aranda M.; Martínez G.; Merinero M.; Argüelles-Arias F.; Alcudia A. Polymeric Nanoparticles for Drug Delivery: Recent Developments and Future Prospects. *Nanomaterials* **2020**, 10, 1403.
- [16] Balaita L.; Chailan J.F.; Nguyen X.H.; Bacaita S.; Popa M. Hybrid chitosan-gelatine magnetic polymer particles for drug release. *Journal of Optoelectronics and Advanced Materials* **2014**, 16, 1463–1471.

- [17] Alupeii L.; Peptu C.A.; Lungu A.M.; Desbrieres J.; Chiscan O.; Radji S.; Popa M. New hybrid magnetic nanoparticles based on chitosan-maltose derivative for antitumor drug delivery. *International Journal of Biological Macromolecules* **2016**, 92, 561–572.
- [18] Arsalani N.; Fattahi H.; Nazarpour M. Synthesis and characterization of PVP-functionalized superparamagnetic Fe₃O₄ nanoparticles as an MRI contrast agent. *Express Polymer Letters* **2010**, 4, 329–338.
- [19] Iurea D.M.; Peptu C.A.; Chailan J.F.; Carriere P.; Popa M. Sub-Micronic Capsules Based on Gelatin and Poly(maleic anhydride-alt-vinylacetate) Obtained by Interfacial Condensation with Potential Biomedical Applications. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* **2013**, 13, 3841–3850.
- [20] Bacaita E. S.; Ciobanu B. C.; Popa M.; Agop M.; & Desbrieres J. Phases in the temporal multiscale evolution of the drug release mechanism in IPN-type chitosan based hydrogels. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2014**, 16(47), 25896–25905.
- [21] Leiter J.; Abbott D.J.; Schepartz S.A. Screening data from the Cancer Chemotherapy National Service Center Screening Laboratories, XXVIII. *Cancer Research* **1965**, 25, 1626-1769
- [22] Dold U. Criteria for the evaluation of cytostatic chemotherapy. *International Journal of Clinical Pharmacy* **1978**, 16, 68-71.
- [23] De Vita Jr VT.: *Cancer: Principles and Practice of Oncology 7th edition*, De Vita Jr. et al. (eds.), Philadelphia, Lippincott. **2004**.

Chapitre V

V.1. Introduction

Les systèmes d'administration de médicaments (DDS) sont un domaine important de la biomédecine basé sur des approches interdisciplinaires combinant la pharmacie, la science des polymères, la chimie analytique, la chimie des bioconjugués et la biologie moléculaire [1]. De nos jours, le système d'administration de médicament ciblé magnétiquement (MTDDS) est l'une des stratégies les plus attrayantes et les plus prometteuses pour administrer le médicament au site spécifié. Par rapport à la technique traditionnelle, les MTDDS sont très efficaces et ont un impact rapide. De plus, ils peuvent réduire la toxicité et les effets secondaires indésirables [2]. Les systèmes de délivrance ciblés détiennent un grand potentiel dans la thérapie du cancer en raison de la libération spécifique de médicament dans les tissus cancéreux. Les nanoparticules magnétiques sont très importantes : elles représentent le composé clé dans ces systèmes d'administrations grâce à leurs propriétés magnétiques ; elles peuvent être ciblées sélectivement sur les tissus spécifiques (cancéreux) en présence d'un champ magnétique. Ces nanoparticules magnétiques ne peuvent être utilisés seuls comme vecteurs de médicaments [3], à cause de leurs instabilités en solutions aqueuse, leurs agrégations et précipitations.

D'un autre côté, les nanoparticules préparées à partir de biopolymères ont été largement utilisées comme vecteurs de médicaments en raison de leurs avantages significatifs pour une administration efficace [4,5]. Parmi ceux-ci, le chitosane est l'un des biopolymères qui peuvent former des nanoparticules aux propriétés uniques [6,7]. Le chitosane reçoit actuellement un grand intérêt pour les applications dans le domaine médical et pharmaceutique en raison de ses propriétés intéressantes comme la biocompatibilité, la biodégradabilité et non toxicité. Il est connu aussi pour d'autres propriétés telles que: analgésiques, mucoadhésivité, hémostatique, antimicrobienne et antioxydant. Le chitosane possède une propriété antitumorale intrinsèque ce qui en fait un vecteur idéal pour le traitement du cancer [8]. Récemment, il y a eu un intérêt substantiel sur les nanoparticules de chitosane car leurs processus de production est simple et sont utilisés comme vecteurs prometteurs pour l'administration de médicaments à libération contrôlée et sont largement exploitées dans l'industrie pharmaceutique [9].

Les nanoparticules hybrides obtenues par l'association des nanoparticules magnétiques avec une matrice de polymère naturel sont prometteuses pour des applications biomédicales avancées : biodétection et bioséparation, diagnostique, imagerie par résonance magnétique, thérapie par hyperthermie et administration contrôlée de médicaments. Le point fort de ces

outils est la combinaison des propriétés magnétiques avec les propriétés du polymère capable de conférer des fonctionnalités nouvelles et spécifiques.

Les formulations les plus demandées et recherchées dans l'utilisation de chitosane comme un vecteur de médicament sont les micro/nanoparticules, et la méthode de préparation des nanoparticules doit être basée sur les propriétés recherchées, comme la taille des particules, la stabilité thermique et chimique, la nature du principe actif, la reproductibilité, une toxicité réduites.....

L'objectif de l'étude présentée dans ce chapitre est l'obtention d'un nanosystème polymère-magnétite-médicament sous forme de nanoparticules hybrides originales chargées de principes biologiquement actifs utilisés pour le traitement de cancer. Ces nanoparticules sont à base d'un polymère naturel (chitosane), biocompatible, sous forme de nanosphères contenant à la fois, des nanoparticules magnétiques d'oxyde de fer (magnétite) dispersées dans leur matrice, et un médicament anti-tumoral - 5-Fluorouracile. Dans la littérature existe des travaux pour ce type de nanoparticules mais l'innovation de notre travail c'est la technique d'obtention de ces particules. On propose, pour la première fois, l'obtention des nanosphères magnétiques à base de CS par la technique de double réticulation (ionique et covalente) en émulsion inverse qui assure la stabilité mécanique du support polymère. Ce nanoporteur a un double effet : d'un côté, l'incorporation de nanoparticules de magnétite dans la matrice polymère réticulée, et d'un autre côté, l'encapsulation d'un médicament anti-tumoral, le 5-Fluorouracile.

La caractérisation des nanosphères magnétiques préparés a été réalisée par analyse spectrale (spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier-FTIR), caractérisation morphologique (microscopie électronique à balayage (MEB), diamètre moyen des particules et zéta potentiel, analyse thermogravimétrique (ATG) et analyse par magnétométrie à échantillon vibrant; on donnera une présentation et une discussion des différents résultats obtenus dans la première partie de ce chapitre. Puis, l'étude du gonflement des sphères hybrides magnétiques dans différents milieux aqueux (pH=7,4, pH= 6,7 et pH= 3,6) sera évaluée. Enfin, des études d'encapsulation et de libération de 5-fluorouracile seront exposées.

V.2. Obtention des nanosphères magnétiques à base de chitosane et de magnétite

Dans cette partie on s'intéressera plus précisément sur la conception et la synthèse de nanosphères magnétiques biocompatibles à base de chitosane permettant l'inclusion des nanoparticules de magnétite et en même temps à l'encapsulation de substance biologiquement

active (SA). Pour cela des nanoparticules magnétiques d'oxyde de fer sont synthétisées. Pour rappel, les voies de synthèses des nanoparticules magnétiques sont nombreuses et les plus courantes sont la coprécipitation, la synthèse solvo- et hydrothermale ou encore la décomposition thermique. Les deux dernières permettent un bon contrôle de la morphologie des nanoparticules obtenues, mais impliquent des procédés lourds et parfois difficilement industrialisables (réacteurs sous pression et hautes températures). C'est pourquoi le choix de la voie de synthèse des nanoparticules de magnétite s'est portée sur la coprécipitation, qui permet une synthèse rapide et dans des conditions douces de température et de pression. Le protocole expérimental que nous avons adopté pour la synthèse des nanoparticules magnétiques d'oxyde fer est décrit dans le chapitre III (paragraphe III.3.1).

Tel que décrit précédemment, la technique de synthèse des nanosphères magnétiques à base de chitosane est le procédé de double réticulation en émulsion inverse. Des agents de réticulation sont nécessaires pour produire des nanoparticules de chitosane ; le tripolyphosphate et le glutaraldéhyde sont des agents de réticulation très couramment utilisés dans la préparation de nanoparticules de chitosane [10]. En effet, la réticulation stabilise le chitosane dans les milieux acides et le rend insoluble. Cette technique est appliquée en deux étapes : la première étape est la réticulation ionique de polymère (CS) qui est réalisée par l'utilisation d'un agent ionique de réticulation, non toxique le tripolyphosphate; la deuxième étape est une réticulation covalente. Dans cette étape, une faible quantité d'un réticulant covalent - la glutaraldéhyde - a été utilisée pour stabiliser la forme et la taille des particules obtenues, donc pour augmenter la stabilité mécanique des particules. Cette méthode nécessite une étape de purification par un lavage des particules par des solvants tels que l'acétone pour l'élimination de l'excès de toluène. Sinon, la phase huileuse retenue dans les nanoparticules peut provoquer une agrégation et altérer leurs propriétés morphologiques. Le lavage à l'acétone et avec de l'eau distillée est nécessaire pour éliminer également l'excès de glutaraldéhyde n'ayant pas réagi.

La double réticulation - covalente et ionique- est adaptée car elle permet la réduction drastique de la quantité de réticulant covalent (le glutaraldéhyde) connu par sa toxicité et son remplacement par un réticulant ionique (le tripolyphosphate). Avec ce procédé, nous attendons, la formation des nanoparticules à base de chitosane grâce à leur groupements fonctionnels (OH et NH₂) qui peuvent interagir avec les deux réticulants. Les nanoparticules magnétiques sont dispersées dans la matrice polymère de chitosane ; l'adsorption des tensioactifs amphiphiles permet une bonne dispersion des particules dans les milieux aqueux,

une protection contre l'oxydation de la surface des nanoparticules et une fonctionnalisation subséquente.

Les nanosphères magnétiques à base de chitosane ont été synthétisées selon le protocole détaillé dans la partie expérimentale du chapitre III (paragraphe III.3.3). De nombreux paramètres exercent une influence notable sur les caractéristiques physicochimiques des nanosphères magnétiques. Les principaux paramètres expérimentaux que nous avons fait varier au sein de ce système sont : le rapport massique entre le polymère et le matériau magnétique (CS / Fe₃O₄), la concentration de la solution de chitosane, la vitesse d'agitation et le rapport molaire entre le chitosane et le réticulant ionique « tripolyphosphate » (NH₂ / TPP), L'influence de chaque paramètre sera étudiée en maintenant tous les autres paramètres constants. Les nanosphères magnétiques obtenues sont nommés par les codes NSM. Les conditions choisies pour cette étude sont présentés dans le tableau V.1.

Tableau V.1 : Le plan expérimental utilisé pour la préparation des nanosphères magnétiques à base de CS

Code d'échantillons	Rapport massique CS / Fe ₃ O ₄ (g/g)	Cs % (g/100ml)	Vitesse d'agitation (tr/min)	Rapport molaire -NH ₂ / TPP	
NSM-1	1/0.5	0.5	15000	1/2	
NSM-2	1/0.7				
NSM-3	1/1				
NSM-4	1/1.2				
NSM-5	1/1.7				
NSM-6	1/0.5	0.3	5000		
NSM-7		0.7			
NSM-8		0.5	9000		
NSM-9			12000		
NSM-10			18000		
NSM-11			15000		1/2,5
NSM-12			1/3		
NSM-13					

Les paramètres maintenus constants pendant toutes les expériences sont: le rapport molaire de -NH₂/GA = 1/0,5 (moles/moles) ; le temps de réticulation ionique égale à 60 minutes et le temps de réticulation covalent de 90 minutes.

V. 3. La structure des nanosphères magnétiques à base de CS obtenues par double réticulation en émulsion inverse

La réaction dans le procédé de double réticulation en émulsion inverse est basée sur la réactivité fonctionnelle du polymère (les fonctions amines, hydroxyles.....) qui vont

interagir avec les groupements fonctionnelles d'agents de réticulation. Le chitosane a la capacité de former des nanoparticules, il est très réactif grâce à ses nombreux groupements amine (-NH₂) et hydroxyle (-OH) situés tout au long de la chaîne macromoléculaire. La réticulation de chitosane consiste à relier leurs chaînes entre elles afin de créer un réseau macromoléculaire tridimensionnel. Les nanoparticules de chitosane réticulées se sont avérées être d'un grand potentiel dans les applications thérapeutiques pour la libération contrôlée de médicaments [11,12]. La formation des nanosphères magnétiques à base de chitosane a été effectuée comme suit :

En milieu faiblement acide, les groupes amines de chitosane s'ionisent et se transforment en cations ammonium qui peuvent interagir avec les anions de la structure du réticulant. Une réaction de réticulation ionique se produit entre le chitosane chargé positivement (NH₃⁺) et le tripolyphosphate chargé négativement (PO⁻), le TPP est attiré électrostatiquement vers les groupes NH₃⁺ de chitosane pour produire des nanoparticules de chitosane réticulées ioniquement. De plus, une réticulation covalente se fait entre les fonctions carbonyle du glutaraldéhyde et les groupes amine du chitosane formant des liaisons de type imine par la réaction de base de Schiff. Le GA réagit avec le polymère principalement sur les couches superficielles des particules réticulées ioniquement ; ces nanoparticules étaient en outre devenues plus durs par la réticulation covalente [12].

En conséquence, la structure du matériau élaboré par double réticulation sera complexe. Les nanoparticules magnétiques dispersées dans la matrice polymère peuvent être localisées au centre ou en surface (les groupes -NH₃⁺ du chitosane sont attirés par -OH de l'oxyde de fer, en formant des liaisons d'hydrogène [13]). La structure du réseau polymère qui contient le matériau magnétique est représentée sur la figure.V.1.

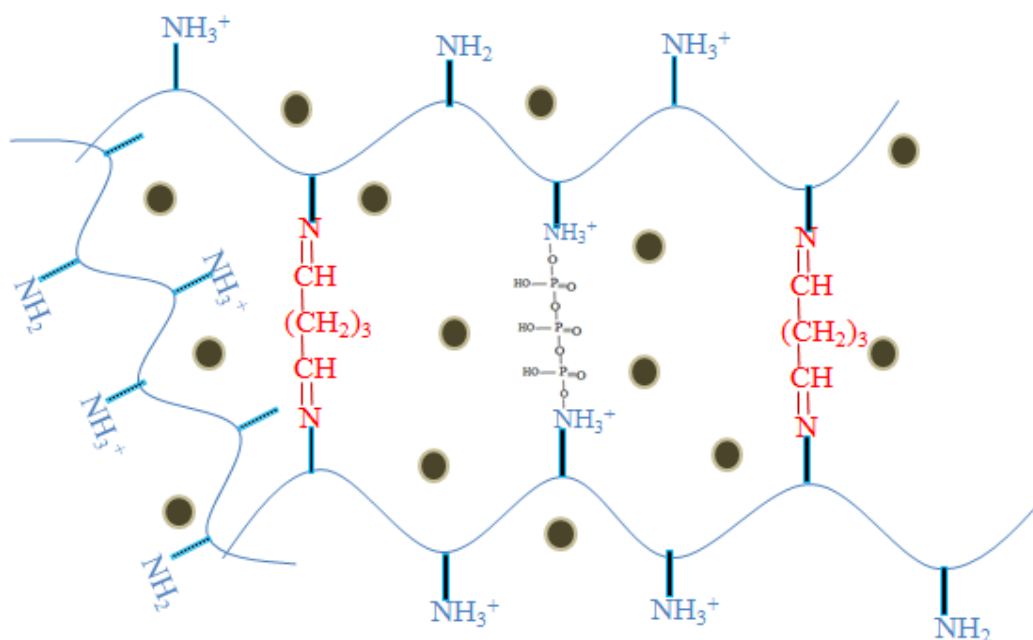


Figure V.1 : Illustration schématique de la structure du réseau formé par la double réticulation du chitosane, en incluant les nanoparticules de magnétite.

Il est important de rappeler que la stratégie choisie pour la préparation des particules constituait le processus de double réticulation en émulsion inverse, implique dans un premier temps un processus de réticulation ionique de 80% des groupements aminés de chitosane, suivi de l'étape de réticulation covalente des groupements amines à environ 20%, afin d'assurer la stabilité mécanique des particules.

V.4. Caractérisation structurale de nanoparticules par FTIR

Pour confirmer la structure du composé attendu, une caractérisation structurale par la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier des nanosphères magnétiques à base de chitosane a été effectuée. La formation du réseau polymère suite à une double réticulation (ionique et covalente) ainsi que la présence du matériau magnétique dans les nanoparticules préparées a été confirmée par cette caractérisation. Les spectres FTIR de chitosane (CS), de nanoparticules magnétiques (Fe_3O_4), des nanosphères non magnétiques (NS) et des nanosphères manétiques (NSM-1, NSM-2, NSM-10) sont présentés dans la figure V.2.

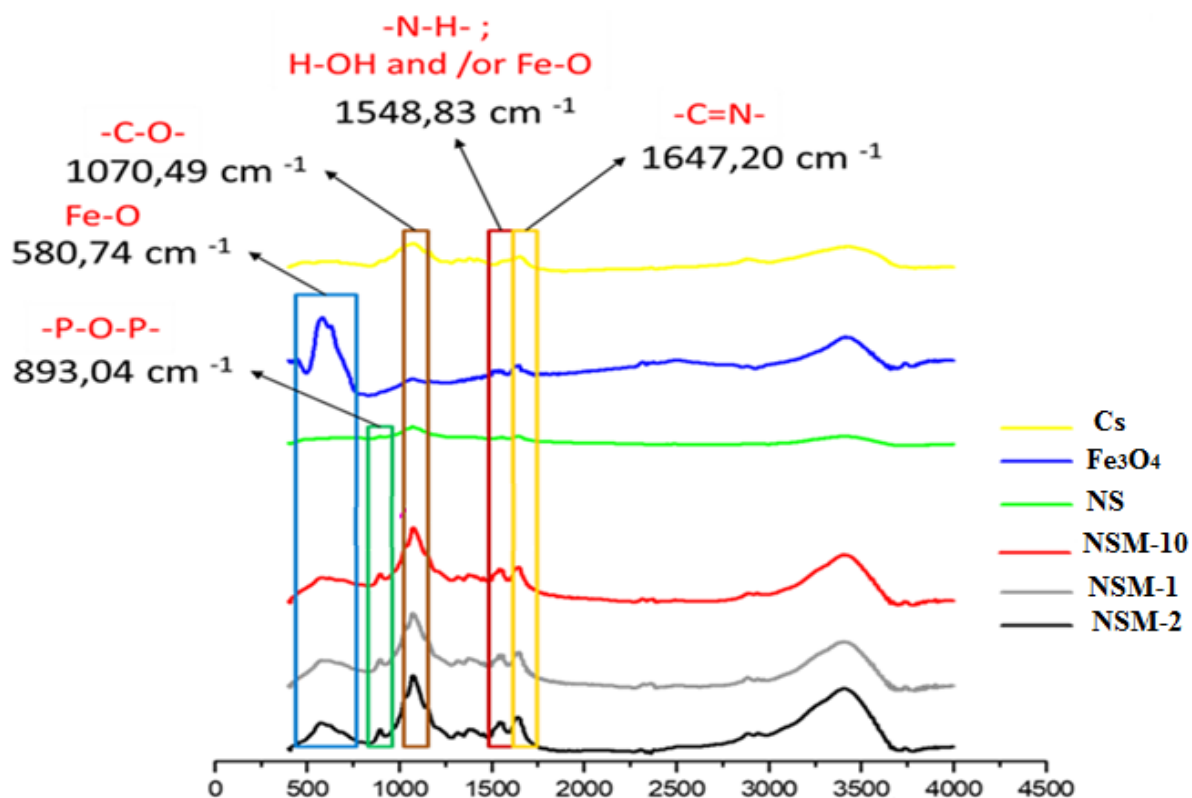


Figure V.2 : Spectres FT-IR comparatifs de CS, Fe₃O₄, nanoparticules à base de chitosane non magnétiques et nanoparticules hybrides.

Les spectres FTIR des nanoparticules des différents composés sont donnés sur la figure V.2. Nous remarquons que tous les pics caractéristiques de chitosane et d'oxyde de fer sont présents dans les spectres des nanosphères magnétiques à base de CS. Bien que les spectres FT-IR enregistrés pour toutes ces nanosphères obtenues ayant un profil similaire avec une légère différence dans les intensités d'adsorption de quelques bandes dû à leur environnement, ces spectres confirment la formation de la structure proposée sur la figure.V.1.

Un pic élargi a été observé autour de 3470 cm⁻¹ dû à l'étirement du groupe OH. Les bandes à 1000-2000 cm⁻¹ sont attribuées respectivement à la structure saccharidique du chitosane. Dans les spectres de nanoparticules hybrides, on trouve : la bande d'absorption à 1647 cm⁻¹, indiquant la vibration d'étirement C = N du groupe imine de la base Schiff; cela dénote une indication claire d'une réticulation covalente entre les groupements amines de chitosane et les groupements carbonyle du glutaraldéhyde. De plus, le signal de bande d'absorption à 893,04 cm⁻¹ spécifique aux liaisons nouvellement formées prouve la réticulation ionique entre les anions de tripolyphosphate (-P-O-P-) et les cations ammonium de chitosane [14].

La présence du matériau magnétique dans la structure des nanoparticules composites est confirmé par la superposition des pics à un signal de 580,74 cm^{-1} correspondant aux limites Fe-O / Fe-O-Fe de la magnétite (Fe_3O_4) [15-17]. Les bandes d'absorptions caractéristiques de chitosane, magnétite, nanosphères non magnétique, et les nanosphères magnétiques sont présentées dans le tableau V.2.

Tableau V.2 : Les bandes d'absorption caractéristiques de la magnétite (Fe_3O_4), de nanosphères non magnétiques et des nanosphères magnétiques (NSM)

Echantillons	Bande d'absorption (cm^{-1})	Attribution
Fe_3O_4	3470	groupements hydroxyles (OH)
	580,74	groupes Fe-O et Fe-O-Fe
CS	3470	NH ₂
	1548	N-H
	1070	C-O
NS	3470	groupe amine secondaire (N-H)
	1647	groupe C = O, des groupes anhydride.
	1548,83	groupes carboxyliques -C = O
	1070	groupes amide
	893,04	P-O-P
NSM	3470	groupe amine secondaire (N-H)
	1647	groupes carboxyliques -C = O
	1548	groupes amide
	1070	C-O
	893,04	P-O-P
	580,74	groupes Fe-O et Fe-O-Fe

V.5. Caractérisation morphologique des nanosphères magnétiques

V.5.1. Microscopie électronique à balayage (MEB)

Une méthode importante de caractérisation des nanosphères magnétiques obtenues est la microscopie électronique à balayage (MEB), qui met en évidence les propriétés morphologiques et dimensionnelles des particules. Compte tenu de l'objectif final des particules, à savoir le traitement de cancer, et la voie d'administration dans l'organisme

(injection intraveineuse) elles doivent avoir des dimensions submicroniques, une polydispersité en taille réduite et une bonne stabilité mécanique et structurelle.

Les images MEB des nanoparticules hybrides montrent les différentes morphologies en fonction des paramètres utilisés dans leurs préparations. En même temps, on peut constater que presque toutes les nanoparticules obtenues ont une forme sphérique très bien définie. Leur taille peut être estimée (photos), et confirmée par analyse des dimensions. On peut constater que tous les diamètres moyens des particules ont des valeurs sous-microniques, donc, ces particules peuvent être considérées comme des nanoparticules. Comme on le constate sur les micrographies MEB, les particules ne sont pas trop agglomérées et agrégées ; elles peuvent être facilement dispersées dans l'eau. Les images MEB des nanosphères magnétiques obtenues sont présentées dans la figure.V.3.

Fig.V.3.a)

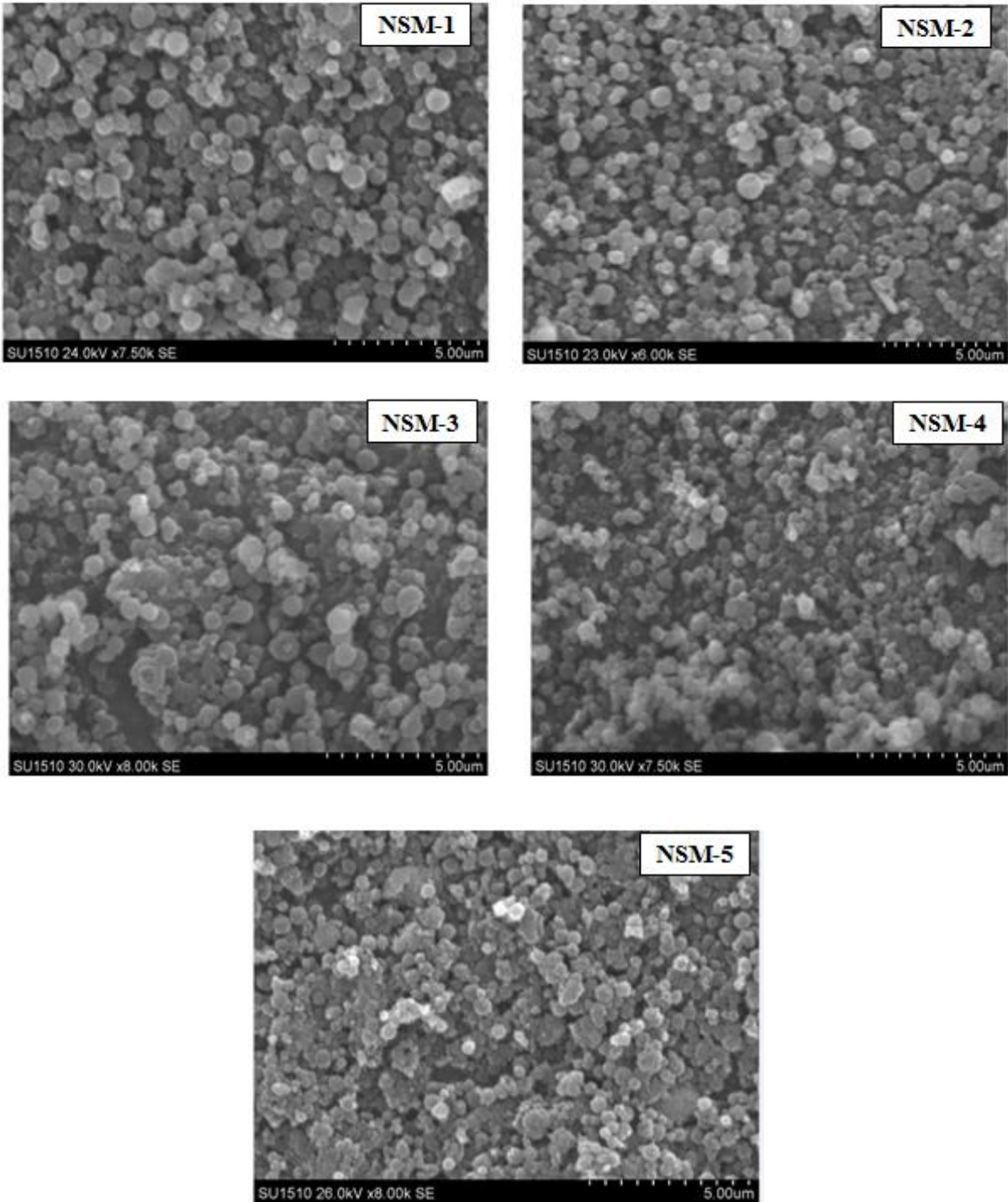


Fig. V.3.b)

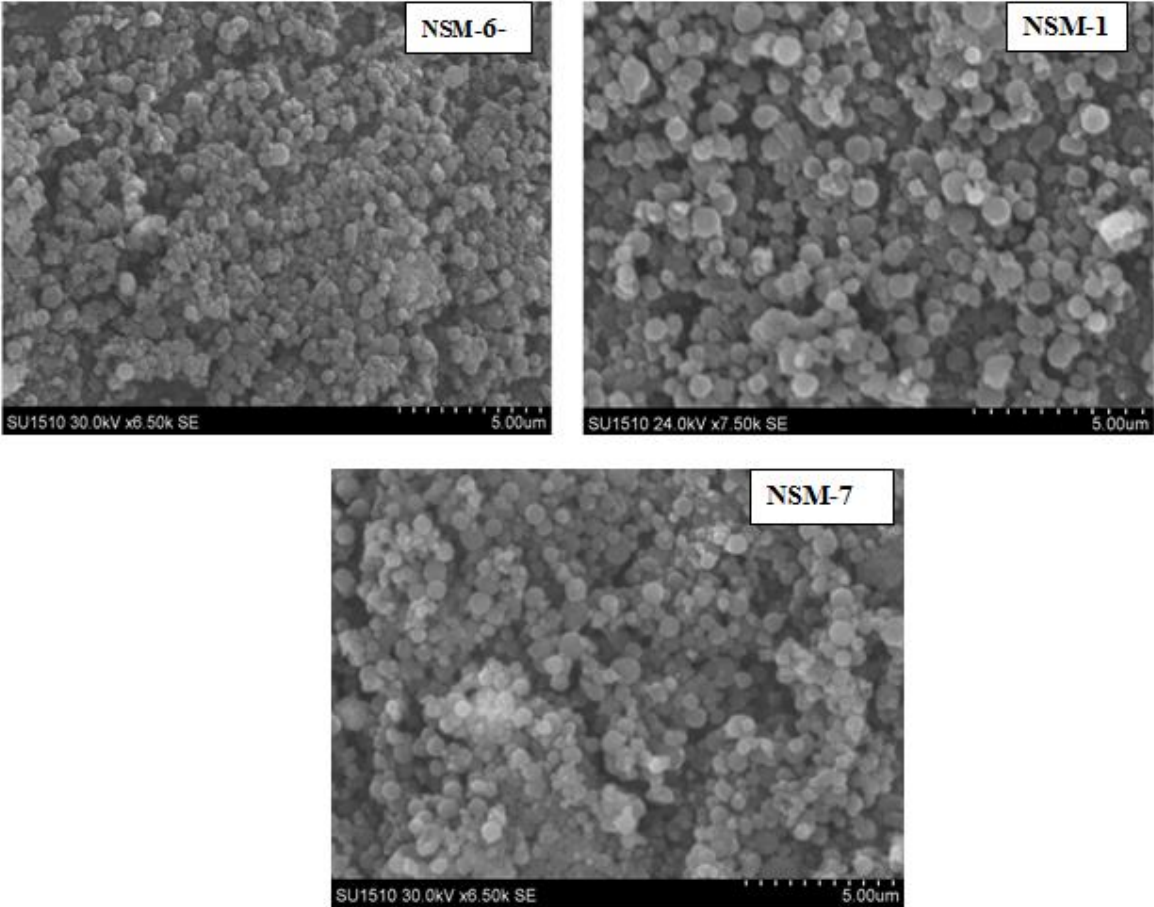


Fig. V.3.c)

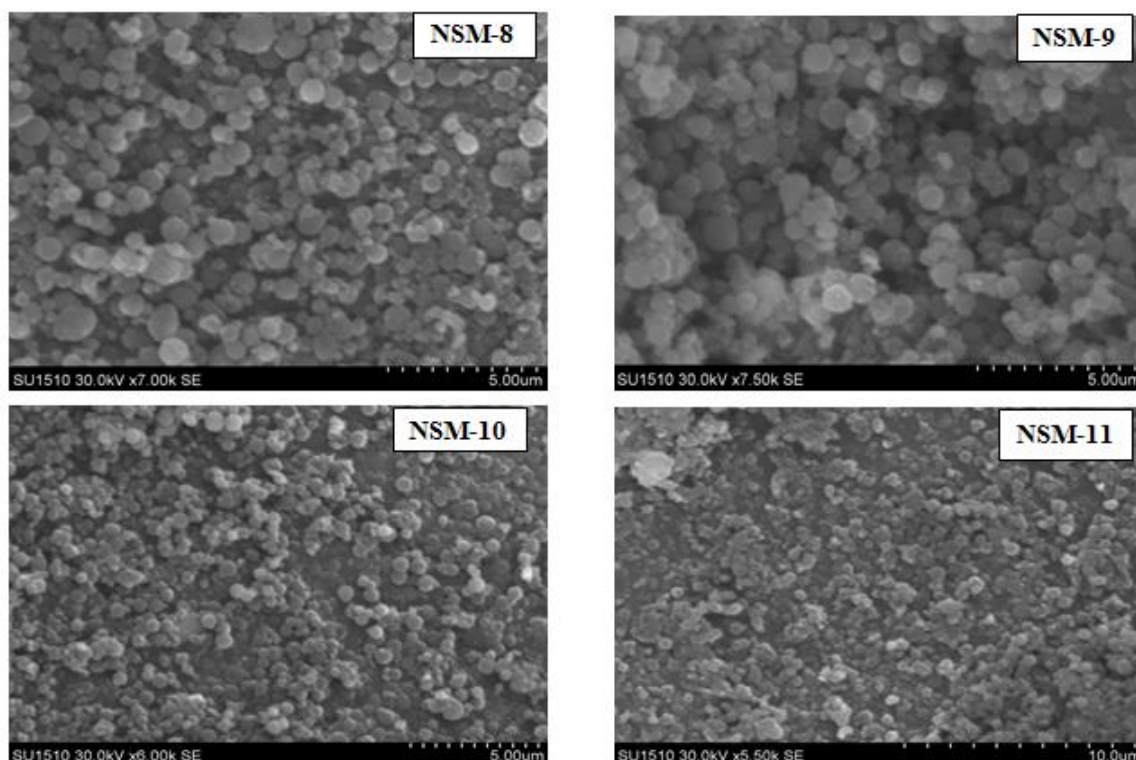


Figure V.3 : les images de microscopie électronique à balayage (MEB) des nanosphères magnétiques :

Fig V.3.a) pour les échantillons NSM-1 jusqu'à NSM-5 (différents rapport magnétiques).

Fig V.3.b) pour les échantillons NSM-1, NSM-6 et NSM-7 (différentes concentration de CS).

Fig V.3.c) pour les échantillons NSM-8 jusqu'à NSM-11 (différentes vitesse d'agitation)

Dans le cas des échantillons NSM-1 jusqu'à NSM-5 (figure V.3.a); nous observons que l'augmentation de la quantité de magnétite (Fe_3O_4) introduites dans les nanosphères au début de leurs préparation a conduit à l'augmentation de la présence des agrégats dans la structure des nanoparticules, cela peut s'expliquer par le fait de la présence de magnétite (un excès) non inclus dans la matrice polymère, qui déstabilise les particules. Nous observons aussi que pour les nanosphères magnétiques qui ont moins de quantité de magnétite surtout dans le cas de NSM-1 et NSM-2 ou on a le rapport de CS / Fe_3O_4 égale à 1/0,5 et 1/0,7, ces particules présentent des formes sphériques bien individualisées sans aucune différence significative dans la forme des particules mais seulement une légère augmentation du diamètre moyen.

En outre, les images MEB des échantillons NSM-6, NSM-1 et NSM-7, concernant les nanoparticules obtenues par l'augmentation de la concentration de solution de chitosane de

0,3%, 0,5% à 0,7% respectivement et en gardant constant le rapport CS/Fe₃O₄ à 1/0,5 et les autres paramètres de préparation, montrent que le diamètre, la polydispersité dimensionnelle et la formes des particules sont influencés par le changement de la concentration de polymère. On peut dire que lorsque la concentration de la solution de polymère augmente, sa viscosité augmente conduisant à des gouttelettes plus grandes dans la phase d'émulsion et à une augmentation de la polydispersité des particules, respectivement, une diminution de la tendance à l'agglomération. Nous pouvons voir dans l'échantillon NSM-6 (figure V.3.b) ou on a dilué la solution de polymère jusqu'à 0,3% une forme des nanoparticules est irrégulière avec l'apparition des agrégats. Ceci peut être interprété par le fait qu'à des dilutions trop élevées de la solution polymère, les ponts de réticulation entre les groupements amines du chitosane et les groupes fonctionnels des réticulants (ionique et covalent) deviennent difficiles à réaliser, en raison d'une faible réticulation.

Le changement de la vitesse d'agitation de 5000tr/min à 1800tr/min (figure V.3.c) est accompagné par une diminution de la taille des particules. La vitesse d'agitation est un paramètre décisif pour établir le diamètre des nanoparticules, avec son augmentation les gouttelettes de la phase aqueuse se dispersant en plus petites gouttes.

V.5.2. Diamètre moyen des nanosphères magnétiques

L'objectif final des nanosphères magnétiques à base de CS obtenues est l'administration sous forme de suspension injectable dans le flux sanguin près des tumeurs, leurs tailles est un facteur très important.

D'après les résultats obtenus on trouve que les valeurs du diamètre moyen des particules obtenues varient entre 190 et 531 nm, avec un diamètre moyen des nanoparticules magnétiques (Fe₃O₄) dont la valeur est d'environ 14 nm (Tableau V.3). Ces valeurs dépendent fortement des paramètres de préparation (la quantité de magnétite utilisée au départ, la concentration de la solution de polymère (CS), la vitesse d'agitation et le rapport molaire CS/TPP utilisé). La Figure.V.4 présente les courbes de distribution granulométriques des échantillons analysés, et la taille moyenne des nanosphères hybrides obtenues est présentée dans le tableau V.3.

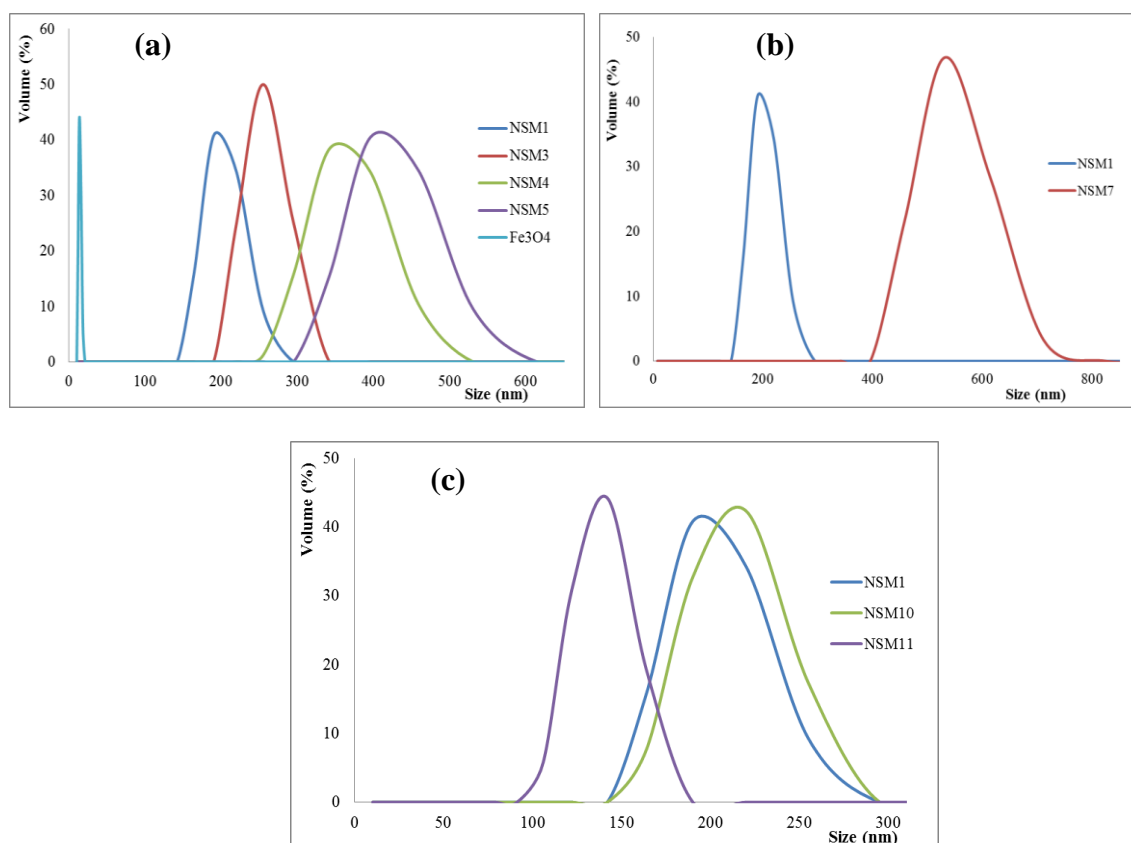


Figure V.4 : Courbes de distribution dimensionnelle :

- (a) :** de NSM-1, NSM-3, NSM-4 et NSM-5 pour différents rapport CS / Fe₃O₄ ;
- (b) :** de NSM-1 et NSM-7 pour différent concentration de polymère (CS);
- (c) :** NSM-1, NSM-10 et NSM-11 pour différents vitesse d'agitation.

Selon la **figure V.4.a**, le rapport massique de CS / Fe₃O₄ utilisé pour la synthèse des nanoparticules hybrides a montré une influence sur le diamètre des particules. On remarque que l'augmentation de la quantité de magnétite utilisée au départ conduit à l'augmentation de diamètre des nanoparticules hybrides ; pour les rapports massiques CS / Fe₃O₄ de 1/0,5, 1/1, 1/1,2 et 1/1,7 on a les diamètres moyens de 190, 255, 396 et 459 nm respectivement. Cette augmentation peut être expliqué par la présence des nanoparticules magnétiques dans et autour (sur la surface) des nanosphères magnétiques ; évidemment, l'augmentation de la quantité de magnétite autour des nanosphères conduit à l'augmentation de leur diamètre.

On observe dans la **figure V.4.b** que l'augmentation de la concentration du chitosane pour l'obtention des nanoparticules hybrides NSM-1 et NSM-7 de 0,5% à 0,7% détermine l'augmentation du diamètre moyen et de la polydispersité, respectivement. L'augmentation de la concentration du mélange initial conduit à une augmentation de la viscosité de la solution

aqueuse de polymère. Cela détermine la formation de plus grosses gouttelettes lors de l'émulsification qui ont ensuite été durcies en présence d'agents de réticulation.

On constate ainsi que le diamètre moyen des particules est considérablement influencé par la vitesse d'agitation : il diminue avec l'augmentation de l'intensité d'agitation (figure V.4.c). L'agitation à une vitesse plus élevée de l'ultraturax implique une énergie plus élevée dissipée dans l'émulsion soumise à agitation, c'est-à-dire un transfert d'énergie plus important qui provoque la rupture de l'émulsion en plus petites gouttelettes, résultant en des particules nanométriques plus petites.

Toutes les courbes de distribution granulométrique des nanosphères magnétiques préparées ont un aspect monomodal ce qui démontre que les nanoparticules hybrides sont de taille homogène et un diamètre nanométrique moyen, en fonction des différents paramètres de préparation. Les résultats obtenus sont conformes aux résultats de l'analyse par microscopie électronique à balayage.

Tableau V.3 : Le diamètre moyen des nanosphères magnétiques à base de CS

Échantillons	Diamètre moyen (nm)	Échantillons	Diamètre moyen (nm)
Fe ₃ O ₄	13,5	NSM-5	459
NSM-1	190	NSM-7	531
NSM-3	255	NSM-10	142
NSM-4	396	NSM-11	220

V.5.3. Stabilité des suspensions aqueuses (Potentiel zêta)

La stabilité des suspensions de nanoparticules hybrides en milieu aqueux a été évaluée par l'intermédiaire du potentiel zêta. Les mesures ont été effectuées en triple, en milieu aqueux; les valeurs trouvées sont présentées dans le tableau V.4 représentant leur moyenne arithmétique. Les résultats obtenus ont été évalués sur la base de l'équation de Smoluchowski et variaient de - 8,15 à -19,7 mV. Les études publiées sur la stabilité des colloïdes affirment que les dispersions colloïdales peuvent être thermodynamiquement instables si elles ne se situent pas dans la plage de 25 à 30 mV [18]. Sur la base des résultats obtenus, nous pouvons conclure que la plupart des systèmes nanoparticulaires hybrides obtenus ne sont pas très stables en milieu aqueux, mais il y a aussi des exceptions. Même si la stabilité de nos systèmes n'est pas très élevée pendant le temps, ils peuvent être utilisés pour

l'administration intraveineuse, si l'injection se fait dans quelques minutes après la préparation de la suspension.

Tableau V.4 : Les valeurs de potentiel zêta des nanoparticules hybrides obtenues.

Échantillons	potentiel zeta (mV) pH=7.4
Fe ₃ O ₄	-25,6
NSM-2	-14,3
NSM-3	-9,37
NSM-5	-19,7
NSM-6	-14,4
NSM-7	-7,05
NSM-8	-8,15
NSM-9	-8,4
NSM-11	-8,65

V.6. Propriétés thermique par ATG

L'analyse thermogravimétrique des nanopères magnétiques a été effectuée afin d'évaluer la teneur en magnétite incorporé dans la matrice polymère en fonction du rapport polymère / magnétite utilisé dans le processus d'obtention et pour simuler le processus de stérilisation thermique dans le cas des matériaux à applications biomédicales.

Pour évaluer la teneur en magnétite dans la matrice polymère, l'étude de la dégradation thermique a été effectuée dans l'intervalle 25°C – 700°C à une vitesse de chauffage de 10°C/min, en atmosphère inerte (N₂) selon le protocole expérimental présenté dans le chapitre III (Matériaux et méthodes). L'analyse thermogravimétrique a été réalisée sur les particules hybrides NSM-1, NSM-3 et NSM-6; L'analyse thermique (Figure V.5) a montré que tous les échantillons présentent trois étapes de dégradation, avec un profil similaire et superposée de perte de masse. Le tableau V.5 récapitule les températures et les pourcentages de perte de masse des différentes étapes de dégradation de nanosphères hybrides (NSM-1, NSM-3 et NSM-6). La quantité résiduelle après chauffage est située dans la plage de 35 à 46%. On peut estimer que la perte de masse dans le processus de dégradation des particules

hybrides est due à la dégradation de polymère et le résidu de particules est composé par le matériau magnétique et le résidu de polymère.

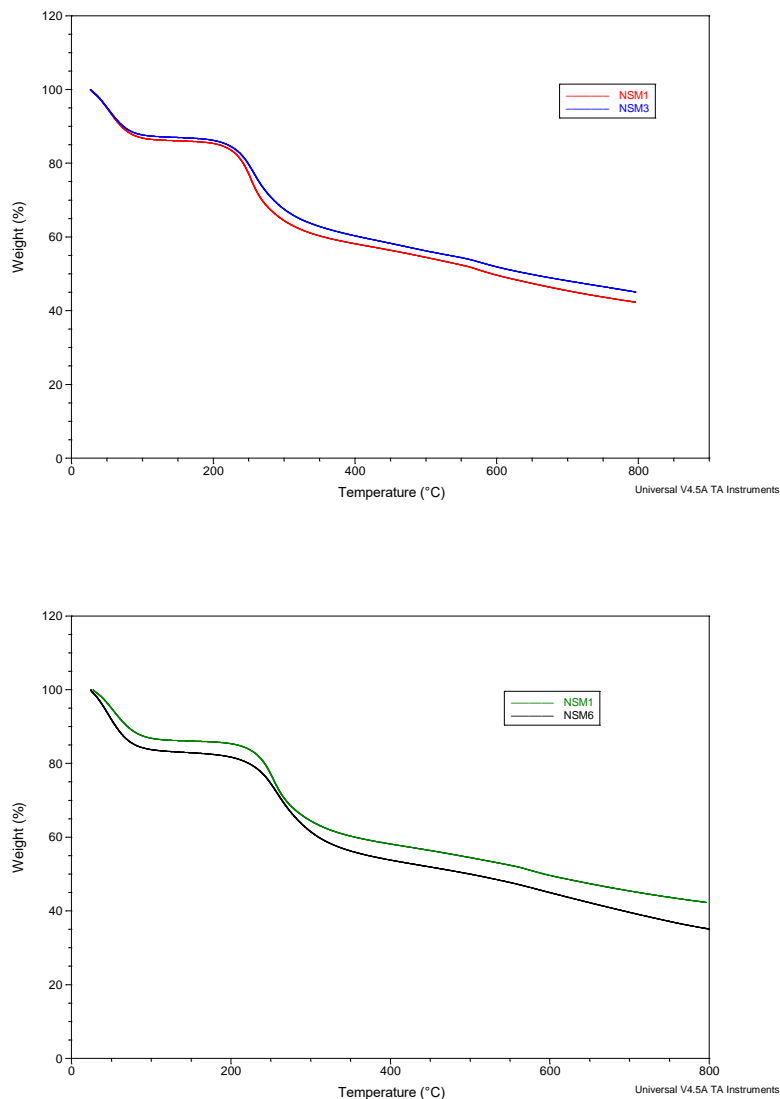


Figure V.5 : Courbes thermogravimétriques des nanosphères magnétiques à base de Cs
(a) : les échantillons NSM-1 et NSM-3. **(b)** : les échantillons NSM-1 et NSM-6.

La première étape de dégradation a lieu dans l'intervalle de température de 25 à 150°C lorsqu'il y a une perte de masse de 12-16% caractéristique de l'élimination de l'eau des particules. La deuxième étape se produit jusqu'à une température de 345°C accompagnée d'une perte de masse de 23–27% qui caractérise le début de la dégradation des particules, ce qui s'explique par la décomposition des cycles saccharidiques et la désintégration des chaînes macromoléculaires du chitosane. La perte de masse de 18 à 21% se situe dans la troisième

étape pour une température entre 450°C et 800 °C, correspond à la dégradation de la matrice polymère. On peut remarquer que la masse résiduelle varie comme prévu: plus la quantité de magnétite (rapport polymère / Fe₃O₄) utilisée dans le mélange initial de préparation augmente, plus le résidu de dégradation augmente (le résidu de magnétite dans NSM-3 est supérieur par rapport à NSM-1).

Donc, la teneur en magnétite des nanoparticules hybrides augmente de manière significative avec l'augmentation de la magnétite dans le mélange initial (tableau V.1). Nous pouvons affirmer que la perte de masse dans le processus de dégradation des particules magnétiques de polymère se produit à la suite de la dégradation du polymère, le résidu total étant composé du matériau magnétique et le résidu polymère [19].

Tableau V.5: Les résultats de l'analyse thermogravimétrique pour les échantillons NSM-1, NSM-3 et NSM-6.

Échantillons	Étapes de dégradation	Temperature (°C)	Pourcentage de perte de masse (%)	Reste %
NSM-1	I	125,6	13,75	42,49
	II	345,06	25,58	
	III	793,39	18,18	
NSM-3	I	122,65	12,76	45,39
	II	329,34	23,13	
	III	785,09	18,72	
CNM-6	I	123,21	16,65	35,29
	II	342,55	26,43	
	III	793,63	21,63	

V.7. Propriétés magnétiques des nanoparticules

La figure V.6 représente les courbes de magnétisation et la magnétisation à saturation (Ms) des nanosphères hybrides obtenues à différent rapport de CS / Fe₃O₄ (échantillons NSM-1, NSM-2, NSM-3 et NSM-5), déterminés par VSM (Vibrating Sample Magnetometer)

à température ambiante. La réponse magnétique est directement proportionnelle à la magnétisation à saturation (MS) du matériau.

On remarque que, dans les quatre cas, les courbes de magnétisation passent par l'origine du système de coordonnées et les courbes d'aimantation croissantes et décroissantes, étant des images miroir. On peut constater que les courbes d'aimantation ne présentent pas d'hystérésis lorsqu'un champ magnétique extérieur est appliqué. La coercivité (H_c) et la rémanence (M_r) sont nulles, ce qui prouve des propriétés superparamagnétiques des nanosphères obtenues [15, 20]. Le concept s'explique par le fait que lorsqu'un champ magnétique extérieur est appliqué, les nanoparticules deviennent magnétiques, tout en revenant à l'état non magnétique une fois le champ magnétique arrêté. La propriété superparamagnétique des nanoparticules hybrides est essentielle pour leur application dans les domaines biomédicaux et de bio-ingénierie, ce qui empêche les nanoparticules de s'agréger et leur permet de se redisperser rapidement lorsque le champ magnétique est supprimé. Cette caractéristique (superparamagnétisme) rend possible les applications des nanoparticules dans l'administration ciblée de médicaments. En rendant possible la prévention de leur comportement «actif» une fois le champ magnétique éteint, les nanoparticules peuvent être excrétées du corps [21]. La présence de propriétés magnétiques permettra le ciblage sélectif des nanotransporteurs vers les tissus cancéreux.

Les valeurs de magnétisation de la saturation (M_s) des nanosphères hybrides obtenues sont : 10,47 emu/g pour l'échantillon NSM-1, NSM-2 (M_s)=11,6 emu/g, NSM-3 (M_s)=15,07 emu/g et pour l'échantillon NSM-5 (M_s)=25,84 emu/g. On constate que la magnétisation de saturation des nanoparticules augmente avec l'augmentation de la quantité de magnétite (rapport CS/ Fe_3O_4) utilisée pour la préparation (composition initial) des nanosphères hybrides (tableau V.1), en effet, tout à fait logique. L'analyse comparative des valeurs de l'aimantation de saturation renforce l'idée que la matrice polymère de chitosane a réussi d'incorporer le matériau magnétique ; ces résultats sont en concordances avec les résultats obtenus par l'analyse thermogravimétrique des nanoparticules hybrides.

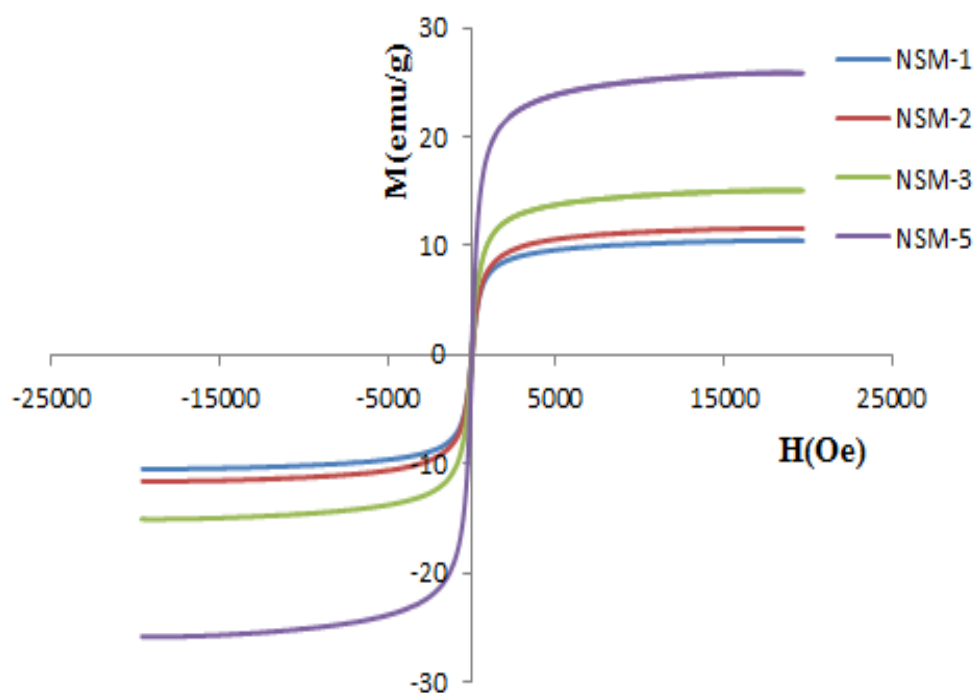


Figure V.6: Les courbes de magnétisation des nanosphères magnétiques (NSM-1, NSM-2, NSM-4 et NSM-5).

V.8. Étude de gonflement des nanosphères magnétiques

Le chargement et la libération de médicaments à partir des nanoparticules hybrides sont réalisés par le processus de diffusion et sont donc également influencés par les propriétés de gonflement des nanoparticules réticulées dans de milieux aqueux. La capacité de rétention de l'eau dans les nanoparticules apparaît en principe à cause de la présence des groupements hydrophiles, dans notre cas les groupements amino et hydroxyl, des chaînes de polymères [22]. Le comportement des nanosphères magnétiques dans des solutions aqueuses étant extrêmement important, nous avons analysé tous les nanosphères obtenues du point de vue du processus de rétention de l'eau. Le gonflement dans les environnements aqueux est influencé par les paramètres de préparation et dépend évidemment de l'architecture interne du réseau polymère nouvellement formé et de nombreux facteurs, tels que l'hydrophilie des matériaux, la quantité de matériau magnétique dans les nanosphères, la densité de réticulation, la force ionique, ainsi que la composition des particules.

Le gonflement des nanosphères a été étudié dans des solutions aqueuses à différentes valeurs du pH (ABS : pH = 3,6, pH = 6,7 et PBS : pH = 7,4) et a été imposé en raison de leur utilisation potentielle en tant que transporteurs de médicaments. La capacité de gonflement des nanoparticules pleines est généralement causée par la pénétration d'eau dans les mailles

de la matrice polymère. La cinétique de gonflement a été étudiée sur une période de 24 heures (temps d'équilibre) pour tous les échantillons. Les courbes cinétiques obtenues lors de l'étude de gonflement des nanosphères magnétiques ont montré un profil identique comme présenté dans la figure V.7 à différent degré de gonflement à chaque point de mesure. A base de ces courbes, la figure V.8 présente les valeurs maximum du degré de gonflement (Q_{max}) obtenues à 24 heures dans les différents milieux aqueux (différent pH). L'étude du comportement de gonflement a conduit à des résultats intéressants, et les valeurs maximum de degré de gonflement obtenues sont en bonne corrélation avec les paramètres du processus d'obtention des nanosphères hybrides.

L'analyse des résultats illustrés dans la figure V.7, montre que les nanosphères gonflent rapidement dans les premières minutes en raison de leur structure morphologique, suivie d'une augmentation lente durant environ 3-4 heures, puis un équilibre s'instaure, de sorte que le maximum est atteint au bout de 24 heures. Pour tous les nanosphères magnétiques, la valeur maximale du taux de gonflement étant atteinte vers 200 minutes (après deux heures environ), dû au caractère fortement hydrophile du chitosane.

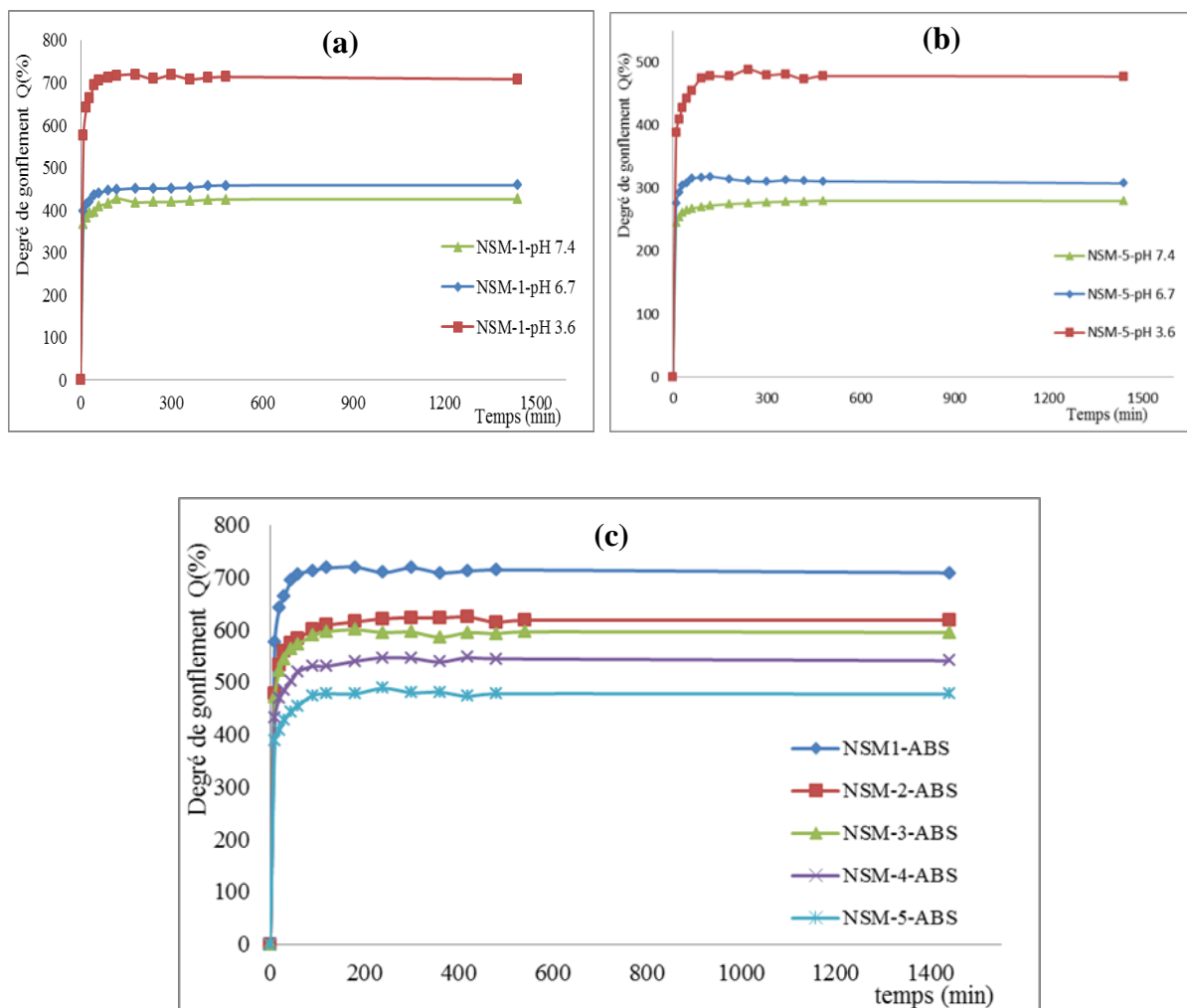


Figure V.7 : La cinétique de gonflement des nanosphères magnétiques dans différents solution aqueux.

(a) Cinétique de l'échantillon NSM-1 dans pH= 3,6, pH = 6,7 et pH = 7,4.

(b) Cinétique de l'échantillon NSM-5 dans pH= 3,6, pH = 6,7 et pH = 7,4.

(c) Cinétique de gonflement des nanosphères magnétiques NSM-1, NSM-2, NSM-3, NSM-4 et NSM-5 dans ABS (pH= 3,6).

Comme prévu, le degré maximum de gonflement (Q_{max}) est influencé par les paramètres de préparation des nanosphères magnétique tel que le taux de magnétite, la concentration de la solution de polymère, la vitesse d'agitation ou le taux de réticulant ionique (fig. V.8 a,b,c). Les valeurs de degré maximum de gonflement dépendent, aussi, de la valeur du pH de la solution aqueuse dans laquelle le processus a été étudié.

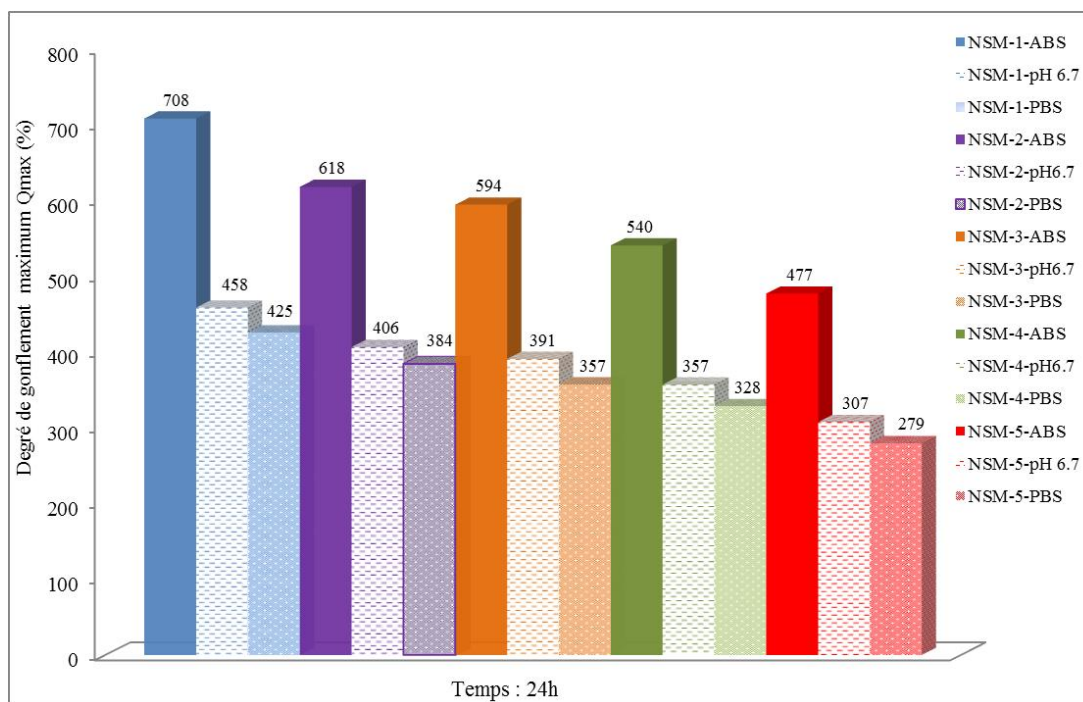


Figure V.8.a : Degré de gonflement maximum des nanosphères magnétiques (NSM-1, NSM-2, NSM-3 NSM-4, NSM-5) obtenues à différent rapport massique de CS / Fe₃O₄.

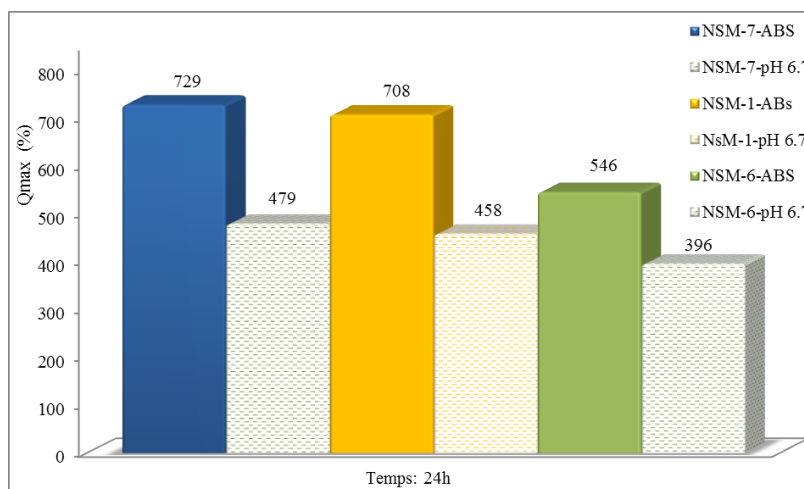


Figure V.8.b : Degré de gonflement maximum des nanosphères magnétiques (NSM-1, NSM-6, NSM-7) obtenues à différentes concentration de CS.

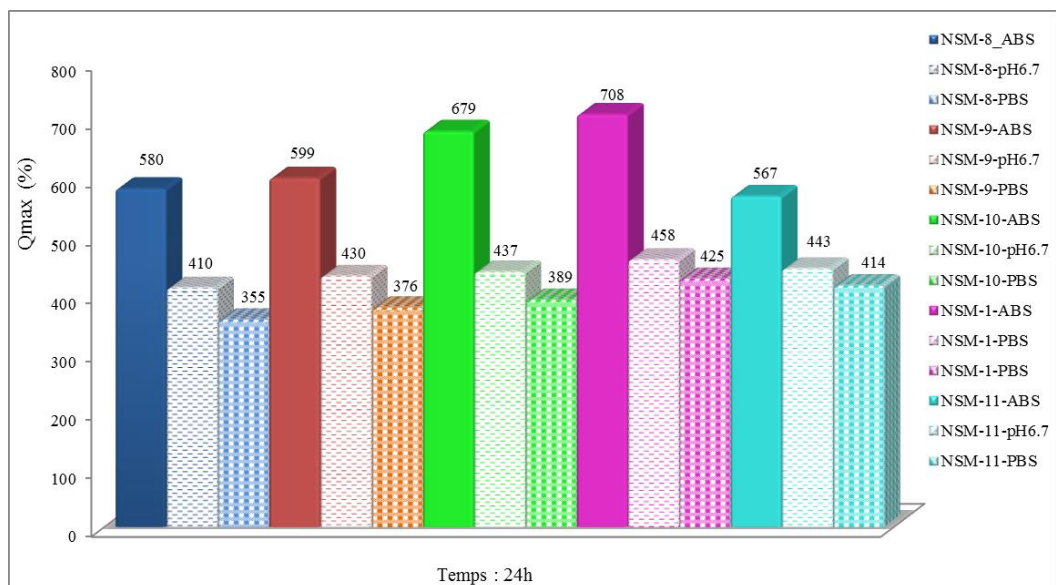


Figure V.8.c : Degré de gonflement maximum des nanosphères magnétiques (NSM-1, NSM-8, NSM-9, NSM-10, NSM-11) obtenues à différent vitesse d’agitation.

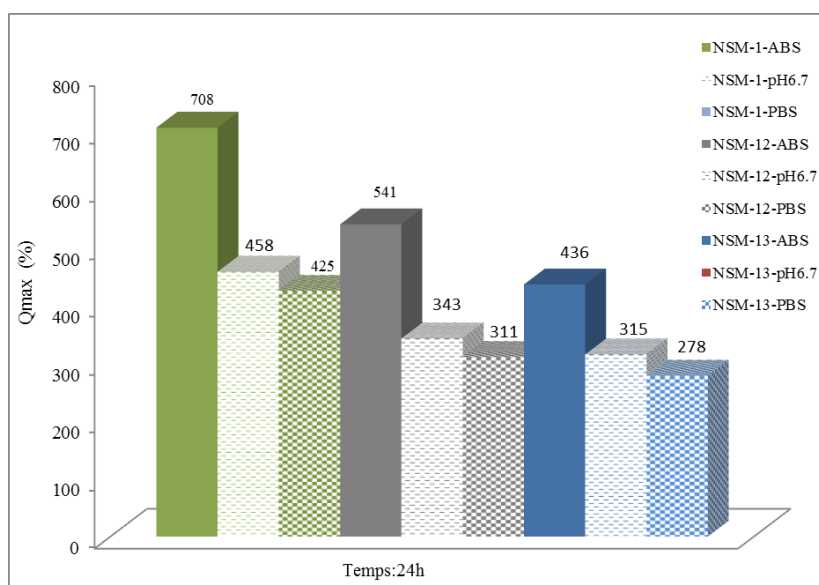


Figure V.8.d : Degré de gonflement maximum des nanosphères magnétiques (NSM-1, NSM-12, NSM-13) obtenues à différent rapport molaire NH₂ / TPP.

Figure V.8 : Degré de gonflement maximum à 24 heures des nanosphères magnétiques en milieu aqueux à différents valeurs du pH : ABS (pH=3.6), PBS (pH = 7,4) et pH=6,7 (Q_{max} (%) : le degré de gonflement maximum).

Après une première analyse des données expérimentales issues de l'étude du degré de gonflement, nous soulignons que: les valeurs du degré de gonflement maximum des nanosphères magnétiques obtenues en solution tampon d'acétate d'ABS (pH = 3,6) sont supérieures à celles enregistrées dans les solutions aqueuses PBS (pH = 7,4) et de pH=6,7 pour tous les paramètres de préparation. En ABS (pH = 3,6), le taux de gonflement est entre 720% et 436%, pour pH=6,7, il se trouve entre 315% et 460% et en PBS (pH = 7,4) il se situe entre 425% et 278%.

Sur la base de ces résultats, on peut dire que dans un milieu acide (pH=3,6), la plupart des groupements amines de chitosane qui n'ont pas participé aux réactions de réticulation ont été protonés, passent en sous forme de cations ammonium ($-NH_3^+$). Les molécules avaient donc une charge nettement positive et le gonflement plus fort peut être causé par la forte répulsion électrostatique qui apparaissent entre les macromolécules et conduisent à une augmentation des espaces entre les mailles du réseau polymérique, c'est-à-dire à une rétention d'eau plus élevée, ce qui entraîne un degré de gonflement plus élevé. Pour des valeurs de pH un peu plus élevées, les groupes amino dans CS sont moins protonés ce qui limite le degré de gonflement. Alors qu'à des valeurs de pH encore plus élevées comme dans les milieux faiblement basique, la plupart des groupes amine du CS sont sous la forme $-NH_2$ (ne sont pas protonés). Dans ce cas il n'existe pas de répulsions, sauf des interactions de type liaisons d'hydrogène, ce qui fait que la quantité d'eau qui pénètre dans le réseau polymère soit plus faible, donc le taux de gonflement plus faible aussi. Cette caractéristique sensible au pH des nanosphères magnétiques peut être utilisée pour le développement de systèmes d'administration de médicaments sensibles au pH.

Du plus, l'influence du taux de magnétite sur le degré de gonflement des nanosphères magnétiques a été confirmé par les résultats obtenus par les échantillons : NSM-1, NSM-2, NSM-3, NSM-4 et NSM-5 présentées sur la figure V.7.c, et la figure V.8.a. Pour les différents milieux (pH=3,6, pH=6,7 et pH=7,4), l'augmentation de la quantité de magnétite initialement introduite dans le milieu réactionnel pour préparer les nanosphères entraîne la diminution de degré de gonflement ; par exemple les valeurs maximum de gonflement sont obtenues par NSM-1 : 708% dans ABS et 425% dans PBS, par contre dans l'échantillon NSM-5 où on a la plus importante quantité de magnétite, les valeurs de degré de gonflement sont 477% , 279% dans ABS et PBS respectivement. Cela peut s'expliquer comme suit; le polymère c'est le matériau qui détermine le gonflement, alors, l'augmentation de la teneur en magnétite

détermine la diminution de la teneur en polymère, en conséquence, la diminution du degré de gonflement.

D'après la figure V.8.b, la diminution de la concentration de la solution de chitosane (0,7%, 0,5% et 0,3%) conduit à une diminution de degré de gonflement. Une explication possible peut être liée au fait que la diminution de la concentration du chitosane résulte une quantité plus faible du polysaccharide dans les gouttes de solution, tandis que la quantité de réticulant reste élevée. Cela signifie qu'on obtient une densité de réticulation plus élevée et un taux de gonflement plus faible.

La figure V.8.c représente le gonflement pour différents pH des nanosphères magnétiques (NSM-1, NSM-8 à NSM-11). Cette figure montre que la vitesse d'agitation a un impact sur les propriétés de gonflement des nanosphère. L'augmentation du taux de gonflement provient de l'augmentation de la vitesse d'agitation de 5000 tr/min (NSM-8), 9000 tr/min (NSM-9), 12000 tr/min (NSM-10) et 15000 tr/min (NSM-1). Au delà de 15000 tr/min, le taux de gonflement diminue comme on le constate pour une vitesse de 18000tr/min. Étant donné que la vitesse d'agitation a pour effet la diminution de la taille des nanoparticules, elles sont plus compactes et donc la quantité d'eau qui pénètre à l'intérieur devient plus faible.

Le rapport molaire de NH_2/TPP constitue aussi un autre paramètre d'influence des caractéristiques des nanosphères magnétiques comme le montre la figure V.8.d. Une telle évolution est logique étant donné que, par la croissance de la quantité d'agent de réticulation ionique (TPP) par rapport à la teneur en polymère utilisé dans le processus de préparation (le mélange initial, tableau V.1), conduit à une diminution du degré de gonflement. On observe aussi que les différences entre les valeurs du degré de gonflement sont plus réduites dans le cas des nanosphères plus réticulés (NSM-13). Cette réduction du gonflement est due à la formation d'un réseau polymère plus rigide avec une densité de réticulation plus élevée. Le même comportement a été constaté par d'autres auteurs [23,24].

V.9. L'étude de chargement de 5-Fluorouracile

Afin de déterminer l'efficacité des différents nanosystèmes obtenus en tant que vecteur de médicament, nous allons donc nous attacher à étudier dans cette partie leur capacité d'encapsulation et de relargage d'un principe biologiquement actif. Ce type de nanosphères magnétiques a été développé pour être utilisé dans la thérapie antitumorale. Pour

cette raison, notre choix est focalisé sur le 5-Fluorouracile comme médicament d'étude qui est utilisé couramment pour traiter le cancer.

Le médicament est retenu et encapsulé dans le réseau de nanoparticules par le même mécanisme de diffusion que les molécules d'eau; et les résultats obtenus confirment que la quantité de 5-FU incluse par diffusion est en bon accord avec le degré de gonflement des nanosphères hybrides dans les milieux aqueux, et avec la composition des nanoparticules. Les auteurs, dans des études précédentes ont rapporté la même chose pour différents réseaux de polymères hydrophiles [25, 26].

La quantité de médicament chargée dans les nanosphères magnétiques (g5-FU/g de nanoparticules) et l'efficacité d'encapsulation de 5-FU sont présentées dans le tableau V.6. La plus grande quantité de médicament chargée dans les nanoparticules a été enregistrée pour les échantillons ayant le plus haut degré de gonflement (NSM-1), et la plus faible quantité de 5-FU chargée est enregistrée pour l'échantillon NSM-3 ; donc, l'efficacité de chargement du médicament et la quantité de 5-FU chargée augmentent avec la diminution de la quantité de nanoparticules de magnétite dans le mélange initial des nanosphères hybrides, mais aussi par la diminution de la densité de réticulation du réseau. L'efficacité d'encapsulation de 5-FU varie entre 26% et de 34,5%.

Tableau V.6 : L'efficacité de chargement et la quantité de 5-FU chargé g/g de nanoparticules.

Échantillons	5-FU chargé g/g nanoparticules	L'efficacité de chargement (%)
NSM-1	4,02	26,82
NSM-2	3,84	25,6
NSM-3	2,91	19,4

V.10. L'étude de libération *in vitro* du 5-Fluorouracile

Les expériences de libération *in vitro* ont été réalisées dans des environnements faiblement alcalins, simulant les conditions sanguines (PBS, pH = 7,4) et dans une solution tampon de pH=6,7. Les résultats de libération de 5-FU exprimés par l'efficacité de libération (pourcentage de 5-FU libéré par rapport à la quantité de 5-FU incluse dans les particules) par les nanosphères magnétiques obtenues NSM-1, NSM-2 et NSM-3 dans les deux milieux sont présentés dans la Figure V.9. L'efficacité de libération du médicament dans les deux milieux varie entre 35% et 60% avec une légère différence : l'efficacité de libération du 5-FU dans un

milieu à pH=6,7 est supérieure que dans le milieu de pH=7,4. La libération de 5-FU par les nanoparticules hybrides se produit par un mécanisme de diffusion de la solution aqueuse par la matrice polymère et est conforme au comportement de gonflement.

Il est évident que le rapport massique chitosane / magnétite a un rôle important sur la libération de 5-FU par les nanoparticules. L'augmentation du taux de magnétite dans le mélange initiale de nanoparticules conduit à une diminution de l'efficacité de libération.

Une autre observation est que le profil de libération du médicament à partir des nanoparticules hybrides présente deux phases: une première étape d'éclatement rapide ("burst" effet) est observée dans les 300 premières minutes suivie d'une deuxième étape lente (une phase de libération prolongée), jusqu'à l'équilibre caractérisée par une libération constante jusqu'à 1440 minutes lorsqu'elle atteint un maximum de la quantité retenue. La phase de libération rapide correspond à la libération de médicament adsorbée à la surface des nanosphères magnétiques ou des molécules encapsulées se trouvant à proximité de l'interface nanoparticule / milieu de libération (dans les couches superficielles des particules). La deuxième étape de libération est attribuée au 5-FU piégé dans la matrice de nanoparticules.

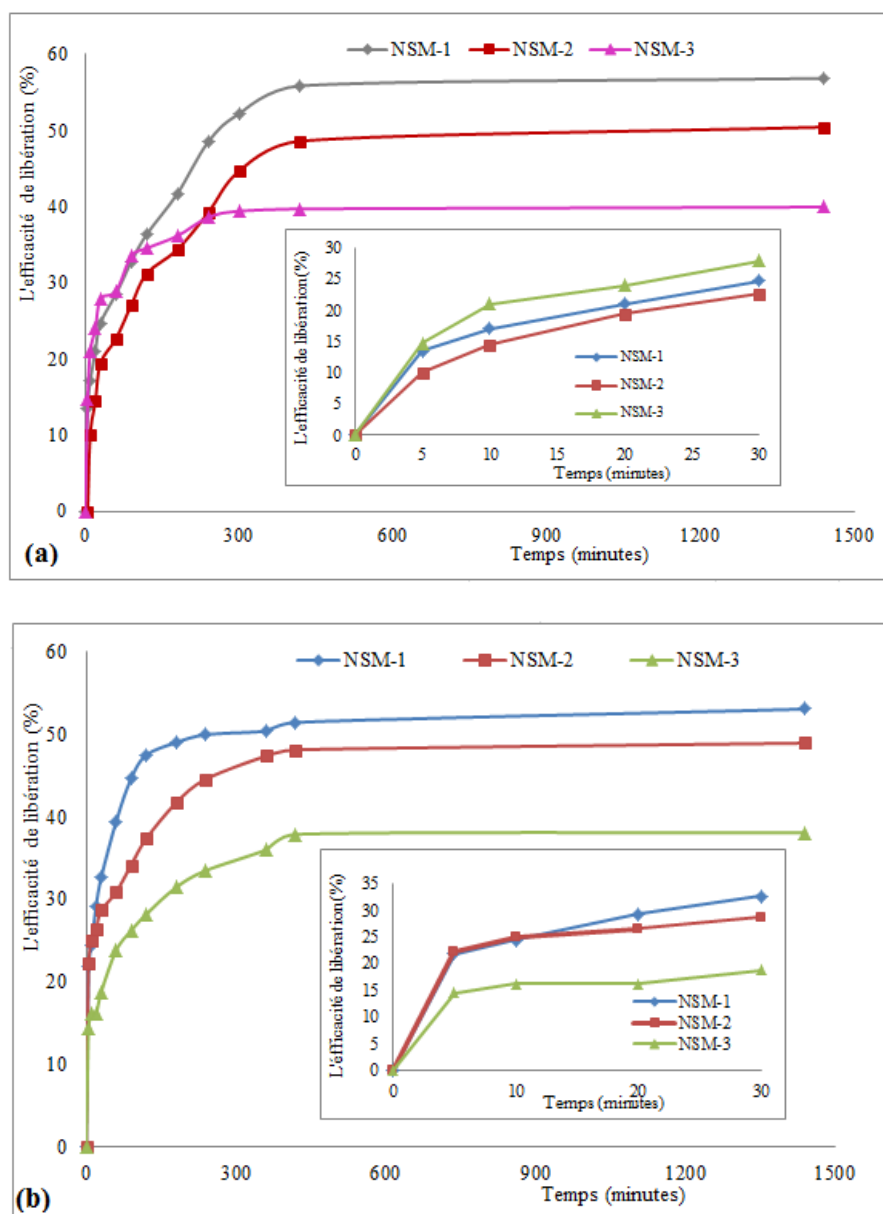


Figure V.9 : Cinétique de libération in vitro de 5-FU par les nanosphères magnétiques NSM-1, NSM-2 et NSM-3. **(a)** dans une solution aqueuse de pH 6.7 ; **(b)** Dans une solution aqueuse de pH 7.4.

V.11. Analyse théorique de la libération de médicaments

Nous utilisons l'équation proposée par Peppas *et al* décrite précédemment (chapitre III, paragraphe III.4.9), par laquelle le calcul de l'exposant caractéristique de libération 'n' nous renseigne sur le type du processus de diffusion. La linéarisation de cette équation (éq III.8) a permis de déterminer les valeurs de l'exposant n pour les différents profils de libération. Les résultats obtenus sont portés sur le tableau V.7.

Tableau V.7: Paramètres de Korsmeyer-Peppas.

Échantillons	Facteur exponentiel (n)	
	pH = 6.7	pH = 7.4
NSM-1	0,3212	0,2085
NSM-2	0,3562	0,1811
NSM-3	0,2084	0,2336

On observe dans ce tableau que toutes les nanosphères magnétiques analysées (NSM-1, NSM-2 et NSM-3) dans les deux milieux (pH=6,7 et pH=7,4) montrent des valeurs du facteur exponentiel de libération « n » inférieures à 0,5 ce qui indique que la libération contrôlée de médicament (5-FU) dans ces systèmes est une diffusion pratiquement fickienne. De plus, à partir de la représentation graphique (figure V.10) de la cinétique de libération obtenue expérimentalement et suivant le modèle de Korsmeyer-Peppas (théoriquement), on peut voir que le meilleur ajustement est dans la première partie de la cinétique de libération, c'est-à-dire dans la phase de gonflement de la libération, où le phénomène dominant est la diffusion fickienne.

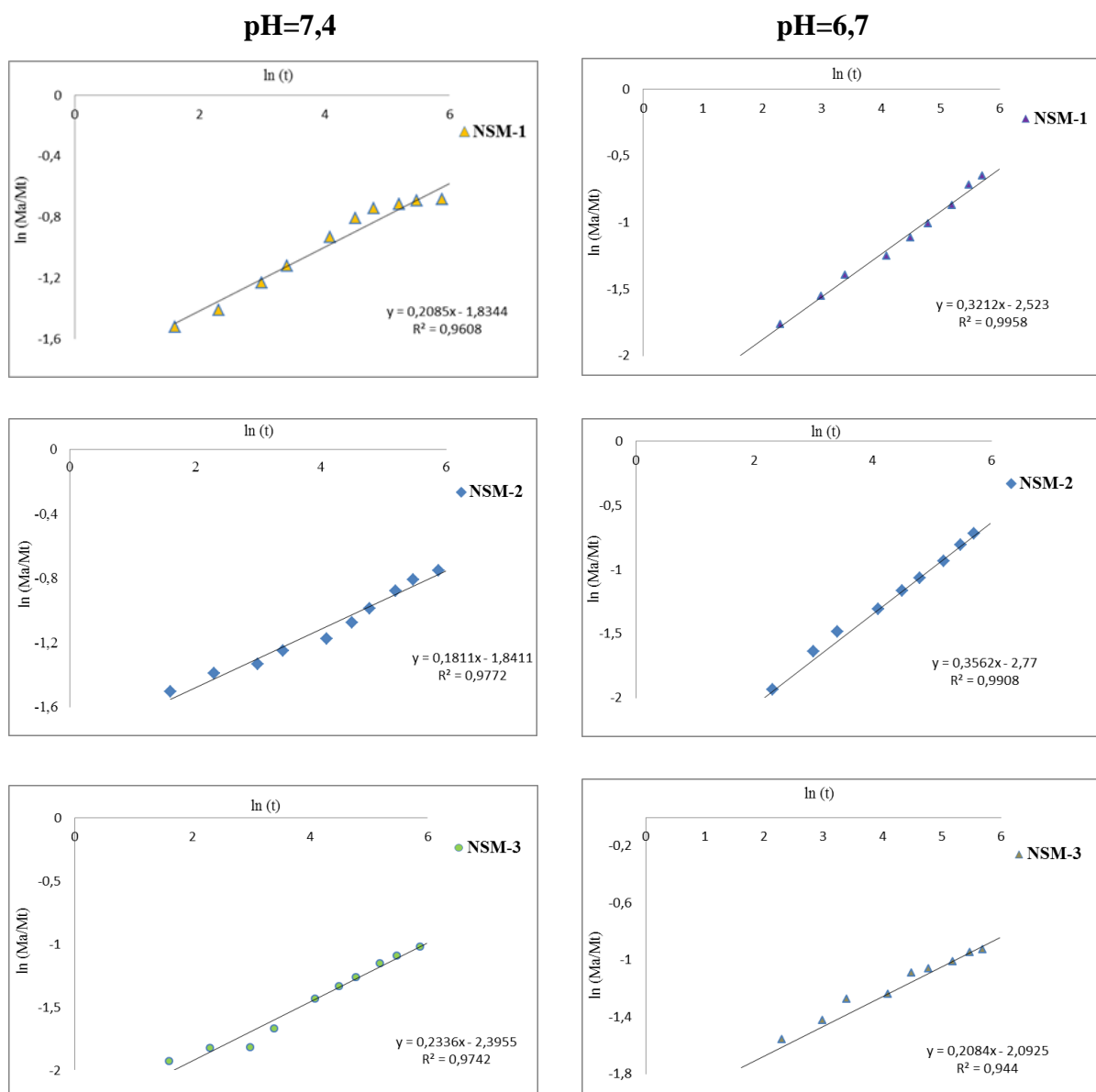


Figure V.10 : Les courbes théoriques de Korsmeyer-Peppas des nanosphères magnétiques.

V.12. Conclusion

Des nouveaux systèmes de nanoparticules magnétiques à base de chitosane ont été obtenus par le procédé de double réticulation en émulsion inverse. Différents paramètres de préparation tel que : la quantité de magnétite utilisé, la concentration initiale en polymère (Cs), la vitesse d'agitation, le rapport molaire de CS/réticulant ionique utilisé ont été étudié. On a constaté que ces paramètres ont une influence sur les propriétés finales des nanosphères hybrides obtenues (le diamètre, la forme, la polydispersité, le degré de gonflement.....).

L'analyse FT-IR a confirmé la formation de nouveaux types de liaisons par le processus de réticulation ionique entre les polyanions (tripolyphosphate) et les cations

ammonium de chitosane et des liaisons de type imine par le processus de réticulation covalente entre les groupes amine du polymère (CS) et les groupes carbonyle de glutaraldéhyde. La présence de matériau magnétique (magnétite) dans la structure des nanosphères magnétiques est aussi confirmée par FTIR.

La caractérisation morphologique par MEB a confirmé l'obtention de nanoparticules hybrides de forme sphérique et de dimensions submicroniques, adaptées à l'administration des particules par injection intraveineuse pour le traitement de cancer.

L'étude du gonflement des nanosphères magnétiques dans les solutions aqueuses a été imposée compte tenu de leur utilisation potentielle comme vecteurs de médicaments. Tous les échantillons analysés ont montré un gonflement rapide, provoqué par la pénétration de l'eau dans la matrice polymère (CS), suivi d'un gonflement plus lent vers l'équilibre. Les résultats obtenus ont montré que le degré de gonflement dans le milieu acide est plus élevé que dans le milieu basique et dépend de paramètres de préparation des nanoparticules.

La capacité d'encapsulation et de libération du médicament modèle -5-fluorouracile - par les nanosphères magnétiques a été étudiée. La libération de 5-FU en milieu aqueux (pH = 7,4 et pH=6,7) montre une libération contrôlée et soutenue par diffusion avec une efficacité de libération entre 35% et 60% en fonction aussi des paramètres d'obtention de nanoparticules.

Références bibliographiques

- [1] Elias F.; Christine V. Drug delivery: nanoparticles. In: Swarbrick J, editor. *Encyclopedia of pharmaceutical technology*. 3rd ed. New York, USA: Taylor & Francis; 2013a.
- [2] Assa F.; Jafarizadeh-Malmiri H.; Ajamein H.; Vaghari H.; Anarjan N.; Ahmadi O.; & Berenjian A. Chitosan magnetic nanoparticles for drug delivery systems. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2016, 37(4), 492–509.
- [3] Elias F.; Christine V. Nanoparticles as drug delivery systems. In: Swarbrick J, editor. *Encyclopedia of pharmaceutical science and technology*. 4th ed. Taylor & Francis; 2013b.
- [4] Gupta KC.; Jabrail FH. Glutaraldehyde and glyoxal cross-linked chitosan microspheres for controlled delivery of centchroman. *Carbohydr Res* (2006). 341:744–56.
- [5] Li P.-W.; Wang G.; Yang Z.-M.; Duan W.; Peng Z., Kong L.-X.; & Wang, Q.-H. Development of drug-loaded chitosan–vanillin nanoparticles and its cytotoxicity against HT-29 cells. *Drug Delivery*, 2014, 23(1), 30–35.
- [6] Rubert ND.; Lorena T.; Montserrat M.; et al. In vitro antitumor activity of methotrexate via pH-sensitive chitosan nanoparticles. *Biomaterials*, 2013, 34:2758–72.
- [7] Bharmoria P.; Singh T.; Kumar A.. Complexation of chitosan with surfactant like ionic liquids: molecular interactions and preparation of chitosan nanoparticles. *J Coll Interface Sci*, 2013, 407:361–9.
- [8] Zou, Y.; Liu, P.; Liu, C.-H.; & Zhi, X.-T. Doxorubicin-loaded mesoporous magnetic nanoparticles to induce apoptosis in breast cancer cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2015, 69, 355–360.
- [9] Tıǧlı Aydın R. S.; & Pulat M. 5-Fluorouracil Encapsulated Chitosan Nanoparticles for pH-Stimulated Drug Delivery: Evaluation of Controlled Release Kinetics. *Journal of Nanomaterials*, 2012, 1–10.
- [10] Gabriel Paulraj M.; Ignacimuthu S.; Gandhi M. R.; Shajahan A.; Ganesan P.; Packiam, S. M.; & Al-Dhabi N. A. Comparative studies of tripolyphosphate and glutaraldehyde cross-linked chitosan-botanical pesticide nanoparticles and their agricultural applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2017, 104.
- [11] Yhee J.Y.; Jeon S.; Yoon H.Y.; Shim M.K.; Min H. Ko, J.; Chang J.H. Na, H.; Han H.; Kim J.O.; Shu M.; Lee H.; Park J.H.; Kim K.; Kwon I.C. Effects of tumor microenvironments on targeted delivery of glycol chitosan nanoparticles, *J. Contr. Release* 2017, 267, 223–231.
- [12] Naskar S.; Sharma S.; & Koutsu K. Chitosan-based nanoparticles: An overview of biomedical applications and its preparation. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 2018.
- [13] Unsoy G.; Yalcin S.; Khodadust R.; Gunduz G.; & Gunduz U. Synthesis optimization and characterization of chitosan-coated iron oxide nanoparticles produced for biomedical applications. *Journal of Nanoparticle Research* 2012, 14(11).
- [14] Corina-Lenuța Savina C.L.; Popa M.; Delaite D.; Costuleanu M.; Costin D.; Peptu C.A. Chitosan grafted-poly(ethylene glycol) methacrylate nanoparticles as carrier for controlled release of bevacizumab. *Materials Science and Engineering: C* 2019.
- [15] Alupeș L.; Peptu C.A.; Lungan A.M.; Desbrieres J.; Chiscan O.; Radji S.; Popa M.; New hybrid magnetic nanoparticles based on chitosan-maltose derivative for antitumor drug delivery, *Int. J. Biol. Macromol* 2016, 92, 561–572.
- [16] Marquez F.; Campo T.; cotto M.; Polanco R.; Roque R.; Fierro P.; Sanz J.M.; Elizalde E.; Morant C. Synthesis and characterization of monodispersemagnetite hollow microspheres, *Soft Nanosci. Lett* 2011, 1, 25–32.
- [17] Khalil TE.; Elhusseiny AF.; Ibrahim NM.; El-Dissouky A. Unexpected effect of magnetic nanoparticles on the performance of aqueous removal of toxic Cr(VI) using modified biopolymer chitosan. *Int J Biol Macromol*. 2021 170:768-779.

- [18] Sarkar N.; Kim I. J. Porous ceramics. *Advanced ceramic processing* **2015**, 55-84.
- [19] Balaita L.; Chailan J.F.; Nguyen X.H.; Bacaita S.; Popa M. Hybridchitosan-gelatine magnetic polymer particles for drug release, *J.Optoelectron. Adv. Mater* **2014**, 16, 1463–1471.
- [20] Arsalani N.; Fattahi H.; Nazarpour M. Synthesis and characterization of PVP-functionalized superparamagnetic Fe₃O₄ nanoparticles as an MRI contrast agent, *Express Polym. Lett* **2010**, 4 329–338.
- [21] Mody V.V.; Cox A.; Shah S.; Singh A.; Bevins W.; Parihar H. Magneticnanoparticle drug delivery systems for targeting tumor, *Appl. Nanosci* **2014**, 4, 385–392.
- [22] Gulrez S.K.H.; Al-Assaf S.; Phillips G.O. Hydrogels: methods of preparation, characterisation and applications. *Progress in Molecular and Environmental Bioengineering – From Analysis and Modeling to Technology Applications*, **2011**, 117–150.
- [23] M. Moise, V. Sunel, M. Holban,, M. Popa, J. Desbrieres, C. Peptu *J Mater Sci*, **2012**, 47, 8223.
- [24] Angadi S. C.; Manjeshwar L. S.; & Aminabhavi T. M. Interpenetrating polymer network blend microspheres of chitosan and hydroxyethyl cellulose for controlled release of isoniazid. *International Journal of Biological Macromolecules*, **2010**, 47(2), 171–179.
- [25] Balaita L.; Cadinoiu A. N.; Postolache P.; Safarikova M.; Popa M. Magnetic polymer particles prepared by double crosslinking in reverse emulsion with potential biomedical applications, *J.Optoelectron. Adv. Mater* **2015**, 17, 1192–1209
- [26] Buhus G.; Popa M.; Peptu C.; Desbrieres J. Hydrogels based on carboxymethylcellulose and poly (vinyl alcohol) for controlled loading and release of chloramphenicol. *Journal of Optoelectronics and Advanced Materials*, **2007**, 9 (11), 3445-3453.

*Conclusion
générale et
perspectives*

Conclusion générale et perspectives

L'objectif principal de ce travail était d'obtenir et de caractériser de nouveaux systèmes hybrides à base de polymère sous forme de nanocapsules et de nanosphères contenant à la fois des nanoparticules magnétiques et un médicament antitumoral pour le transport à cible et la libération contrôlée de médicaments afin d'améliorer l'efficacité du traitement antitumoral.

Les nanoparticules magnétiques (magnétite-Fe₃O₄) ont été préparées par la méthode chimique de Co-précipitation.

Nous avons, pour la première fois, réalisé des nanocapsules magnétiques à base de polymère naturel (chitosane) et synthétique (poly(NVPAI) par condensation interfaciale. Afin d'élucider la relation entre la structure et les propriétés de ce nouveau type de matériaux, nous avons étudié l'influence des différents paramètres de synthèse (le rapport massique de CS / Fe₃O₄, le ratio de la solution aqueuse et organique), à la structure et la morphologie des nanocapsules hybrides et d'autre part aux propriétés magnétiques et thermiques, le degré de gonflement, l'efficacité de chargement / libération de médicament (5-Fluorouracile).

- La spectroscopie infrarouge (FTIR) a confirmé la réaction entre les groupements d'anhydride de polymère synthétique et les groupes amine fonctionnels du polymère naturel par la formation des groupes amide. La présence de matériau magnétique dans ces NC a été aussi confirmée par cette analyse.

- La microscopie électronique (MEB et TEM) a apporté des informations supplémentaires concernant à la forme et la taille des nanocapsules. Toutes les nanocapsules magnétiques sont dans la gamme de taille nanométrique et ont une morphologie sphérique.

- Le diamètre moyen des NC magnétiques dépend de paramètres de synthèse

- l'analyse des propriétés magnétiques (VSM) a montré que les particules obtenues présentent un superparamagnétisme.

- L'étude du gonflement des nanocapsules dans des solutions aqueuses a été imposée en raison de leur utilisation potentielle comme supports de médicaments. Les NC magnétiques présentent un degré de gonflement élevé varie entre 1298% et 1705% qui peuvent être dû à la pénétration de l'eau dans la membrane polymérique et dans le noyau des capsules. Le degré de gonflement diminue avec l'augmentation de la quantité de magnétite incorporée dans les NCs et augmente avec l'augmentation de volume de la phase organique.

- Les NCs hybrides ont permis l'encapsulation d'une quantité accrue de 5-FU et ont présenté une libération contrôlée de médicament

- Les NCs magnétiques chargés en 5-FU présentent une bonne compatibilité avec la lignée cellulaire MCF-7 et un effet cytostatique similaire à celui du 5-FU libre après un traitement de 48 heures.

La synthèse et la caractérisation de système hybride de nanosphères magnétiques à base de chitosane ont montré que ces nanoparticules présentent une réticulation ionique avec tripolyphosphate suivie d'une réticulation covalente par glutaraldehyde en émulsion inverse. La quantité de magnétite utilisée au départ, la concentration de polymère (CS), la vitesse d'agitation et le rapport molaire CS / TPP utilisé sont les paramètres étudiés.

- La caractérisation structurale par spectroscopie FT-IR de nanosphères a confirmé la réalisation des deux types de réticulation (ionique, covalente) par la présence de bandes d'absorption caractéristiques de chacune ; ainsi à confirmé la présence du matériau magnétiques ;

- la caractérisation morphologique par SEM confirme l'obtention de systèmes particuliers de forme sphérique et de dimensions nanométriques, adéquats à l'application visée;

- Les paramètres de préparation ont un impact sur le diamètre moyen des NS magnétiques, ce dernier augmente avec : la diminution de la quantité de magnétite utilisée au départ, l'augmentation de concentration de polymère (CS), et la diminution de la vitesse d'agitation.

- les NSs magnétiques obtenues sont superparamagnétiques d'après l'analyse VSM.
- les nanosphères magnétiques préparées ont démontré un gonflement dans des environnements à pH acide plus élevé que dans les milieux légèrement basique;
- La capacité d'encapsulation du 5-FU par les nanoparticules hybrides et sa libération ont été étudié. La libération contrôlée du 5-FU se produit par un mécanisme de diffusion.

L'ensemble de ce travail a démontré de façon satisfaisante que les nanoparticules hybrides imaginées au début de ce projet ont pu être effectivement obtenues. Les systèmes polymères magnétiques ayant des caractéristiques structurales, morphologiques déterminés, sont tout indiqués pour le transport à cible de principes biologiquement actifs et un potentiel dans les applications médicales très prometteurs.

Les systèmes hybrides obtenus (NCs et NSs) magnétiques pourraient être dirigés avec un champ magnétique externe vers la cible et le mouvement des nanoparticules magnétiques pourrait conduire à une augmentation de la température dans les cellules tumorales induisant un effet hyperthermique. Cet effet, combiné à la libération du médicament antitumoral (5-FU) sur le site tumoral de manière contrôlée, peut détruire les cellules tumorales. Les résultats obtenus sont encourageants et peuvent présenter un réel intérêt dans le domaine médical pour le traitement du cancer du sein puisque ces études préliminaires in vitro constituent un tremplin pour des tests in vivo.