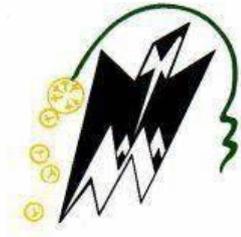


REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE POPULAIRE  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURE ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE  
UNIVERSITE MOULOUD MAMERI TIZI-OUZOU



Faculté de médecine

Département de pharmacie

## **MEMOIRE DE FIN D'ETUDE**

Présenté et soutenu le : 03/ 07/2022

### **THEME**

MISE AU POINT ET OPTIMISATION DES NANOPARTICULES  
POLYMERISEES POUR L'ENCAPSULATION D'UN ANTIBIOTIQUE :  
A PROPOS DU METRONIDAZOLE

Réalisé par

ALLAG Chahinez

ALLAOUA Asma

ABDELKADOUS Rahil

BELARBI Rekia

Encadrée par : Pr .KESSAL.F

Composition du jury :

AYACHI	Nabila	Pr. En Pharmacie galénique	USDB	Présidente de jury
REBIHA	Soumeya	Dr. En chimie minérale	UMMTO	Examinatrice
CHERIFI	Lynda	Dr. En microbiologie	UMMTO	Examinatrice
KESSAL	Fetta	Pr. En Pharmacie galénique	UMMTO	Promotrice

Promotion : 2021-2022

# *Remerciements*

On remercie Dieu de nous avoir donné la santé et la volonté d'entamer et de terminer ce mémoire.

Tout d'abord, ce travail ne serait pas aussi riche et n'aurait pas pu voir le jour sans l'aide et l'encadrement du **Pr.Kessal**, Maitre de conférences classe B en pharmacie galénique. Nous la remercions pour la qualité de son encadrement qui était exceptionnel, pour sa patience, sa rigueur et sa disponibilité durant la préparation de ce mémoire .C'est un grand honneur pour nous d'avoir travaillé sous sa direction.

Nos remerciements vont également aux ingénieures de laboratoire de pharmacie galénique et de toxicologie pour l'aide et l'assistance qu'ils nous ont apportées durant notre travail.

Nous remercions aussi **Mr.Houali**, professeur de microbiologie et biochimie de la faculté des sciences, université Mouloud Mammeri,

**Mr.Aksas** chef de département de génie des procédés de l'université M'hamed Bougara de Boumerdès ainsi que **Mr. Boudinar** du laboratoire de physique et chimie des matériaux de l'UMMTO.

Nous adressons également nos remerciements aux **Dr.Cherifi**, ainsi qu'à **Mme Amroune** pour leurs aides et leurs disponibilités.

Au Pr.maitre de conférences classe A en pharmacie galinique de l'université Saad Dahleb de Blida **Nabila Ayachi**, **Dr.Rebiha Soumeya** maitre assistante en chimie minérale de l'UMMTO et **Dr.Cherifi Lynda** maitre assistante en microbiologie de l'UMMTO qui ont accepté d'examiner ce travail et à toute

personne ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de  
notre mémoire de fin d'étude.

Enfin, nos remerciements vont vers toutes les personnes qui  
nous ont apportés leurs soutiens et conseils pour la réalisation  
de ce mémoire.

## Dédicace

Tout d'abord, je remercie Dieu, le Tout Puissant, qui m'a aidée et permis de suivre ce parcours universitaire et m'a ouvert les portes vers mon avenir.

Ce modeste travail est dédié à

Ma chère maman **Merièmè**, celle qui m'a donné la vie, m'a élevée, qui a tout sacrifié pour que j'aie la chance d'arriver là où je suis. Celle qui a toujours été présente pour moi, qui m'a toujours soutenue et qui m'a toujours poussée vers la réussite. Aucune dédicace ne pourrait exprimer tous les sentiments que je te porte.

Mon cher papa **Mohamed**, mon exemple dans la vie, celui qui nous guide, poussait et encourageait à étudier et à construire notre avenir, aucun mot ne pourrait exprimer mon respect et ma considération que j'ai pour toi.

Ma chère sœur **Sirine**, qui était toujours à mes côtés ; je te remercie d'être là à chaque moment de ma vie et pour la patience, le soutien et le réconfort que tu me donnes.

Mes chères sœurs **Loudjaine**, **Rama** et **Soundous** et mon cher frère **Abdessalem** ; votre présence est une source d'amour, de joie et de bonheur qui m'ont aidée à surmonter les moments difficiles. Je vous adore mes petits.

Ma tante **Hadjer** et **ses enfants**, mes oncles **Ismail** et **Ibrahime**, mes **grandes parents** et toute **ma famille** pour leurs soutiens, conseils et encouragements.

Sans oublier mes amies, **Chahinaz**, **Asma** et **Rekia**, sans qui ce travail n'aurait pu être réalisé. Merci pour votre soutien moral, votre patience et votre compréhension tout au long de ce projet.

A toutes les personnes qui m'ont aidée de près ou de loin je vous remercie et que ce travail traduise ma gratitude envers vous.

**Rahil**

## *Dédicaces*

*J'ai l'honneur et le plaisir de dédier ce modeste travail à :*

*\*\* \*Mes très chers parents à qui j'exprime ma grande gratitude pour leurs éductions, et leurs patiences ;*

*\*\* \*Mes chers frères et toute ma famille ;*

*\*\* \* Mes chers amis avec lesquels j'ai passé de merveilleux moments ;*

*\*\* \*Mes enseignants du primaire jusqu'à l'université qui m'ont tant appris ;*

*\*\* \*Mes amies Rahil rekia et Chahinez*

*\*\* \*Toutes les personnes qui m'ont soutenue et aidée de près ou de loin à réaliser ce travail ;*

*\*\* \*Tous ceux et celles que j'aime et qui me sont chers.*

*Asma*

## *JE DÉDIE CE TRAVAIL :*

*\*\* \*A ma mère, pour son amour, ses encouragements et ses sacrifices.*

*\*\* \*A mon père, pour son soutien, son affection et la confiance qu'il  
m'accordée.*

*\*\* \*A mes sœurs, mes frères et ceux qui ont partagé avec moi tous les moments  
d'émotion lors de la réalisation de ce travail.*

*\*\* \*A mes amies Rahil Asma Chahinez*

*\*\* \*A tous mes amis qui m'ont toujours encouragée, et à qui je souhaite encore  
plus de succès.*

*\*\* \*A tous ceux que j'aime.*

# Dédicace

*Je dédie ce modeste travail à :*

***À mes très chers parents***

*Quoi que je fasse ou je dise, je ne saurais point vous remercier comme il se doit. Votre affection me couvre, votre bienveillance me guide et votre présence à mes côtés a toujours été ma source de force pour affronter les différents obstacles. Que ce travail traduit ma gratitude et mon affection.*

***À mes très chers frères Sami et Ahmed et ma sœur Feriel et ma cousine Imene :***

*Puisse Dieu vous donner santé, bonheur, courage, et surtout réussite.*

***À ma très chère amie Tinkhane***

***À mes amies Asma Rekia et Rahil***

*Je vous dédie ce travail en témoignage de mon profond amour. Puisse Dieu vous préserver et vous accorder santé, longue vie et bonheur.*

***Chahinez***

## Table de matières

1. LISTE DES ABREVIATIONS : .....	i
LISTE DES FIGURES : .....	iii
2. LISTE DES TABLES : .....	v
3. GLOSSAIRE : .....	vi

### **Première partie : Étude bibliographique**

#### **Premier chapitre : De la nanotechnologie à la nanomédecine**

Introduction générale.....	10
1. La nanotechnologie : .....	15
1.1 Histoire de la nanotechnologie : .....	15
1.2 Propriété de la matière à l'échelle nanométrique : .....	16
1.3 Champs d'applications des nanotechnologies : .....	17
2. La nanotechnologie et la santé : .....	17
2.1 Les nanothérapies : .....	17
2.2 La vectorisation : .....	18
2.3 La vaccination : .....	18
2.4 Dispositifs médicaux et systèmes nanotherapeutiques : .....	19
2.5 Les surfaces antimicrobiennes : .....	19
2.6 Le diagnostic et la prédiction .....	20
3. Les inconvénients de nanotechnologie (la nanotoxicité) : .....	20

#### **Deuxième chapitre : les nanoparticules**

1. Les nanoparticules : .....	22
1.1 Les types des nanoparticules : .....	22
1.1.1 Les nanoshells : .....	22
1.1.2 Quantum Dots (QDs) : .....	22
1.1.3 Dendrimères : .....	23
1.1.4 Les nanoparticules lipidiques (NL) : .....	23
1.1.5 Les nanoparticules polymériques : .....	24
1.1.6 Autres types : .....	24
1.2 Les techniques de caractérisation physico-chimique des nanoparticules : .....	25
1. Les nanoparticules polymériques (NPsP) : .....	28

## Troisième chapitre : Les nanoparticules polymériques

1.1	Définition : .....	28
1.2	Pourquoi utilise-t-on les nanoparticules polymériques ? .....	28
1.3	Les types de nanoparticules polymériques les plus utilisées en nanomédecine : .....	29
1.3.1	Les micelles : .....	29
1.3.2	Les nanogels : .....	30
1.3.3	Les polymérosomes : .....	31
1.3.4	Les nanocapsules : .....	32
1.3.5	Les nanosphères : .....	33
2.	Les polymères : .....	34
2.1	Les principaux polymères utilisés pour la synthèse des nanoparticules polymériques : .....	34
2.1.1	Les polymères naturels : .....	34
2.1.2	Les polymères synthétiques : .....	35
3.	Méthodes de préparation des nanoparticules polymériques : .....	35
3.1	Technique d'émulsification : .....	36
3.2	Dispersion de polymère préformée : .....	37
3.2.1	Méthode d'émulsification-évaporation de solvant (SEE) : .....	37
3.2.2	Méthode d'émulsification-diffusion de solvant (SED) : .....	38
3.2.3	Méthode de nanopréciipitation : .....	38
3.2.4	Méthode de relargage ou (Salting out en Anglais) : .....	39
3.2.5	Méthode de dialyse : .....	40
3.2.6	Méthode de fluides supercritiques (SCF) : .....	41
3.3	Polymérisation des monomères : .....	41
3.3.1	Méthode de polymérisation en émulsion : .....	41
3.3.2	Méthode de Polymérisation en mini-émulsion : .....	41
3.3.3	Méthode de micro-émulsion Polymérisation : .....	42
3.3.4	Méthode de Polymérisation interfaciale : .....	42

## Quatrième chapitre : La nanoprecipitation et le métronidazole

1.	La nanoprecipitation : .....	44
1.1	Les nanoparticules en pharmacie : .....	44
1.1.1	Intérêt des nanoparticules : .....	45
1.1.2	Processus de nanoprecipitation : .....	45
1.1.3	Profil de libération in vitro des nanoparticules polymériques : .....	47
1.2	Propriétés des NPs , détermination et influence sur leur performance in vivo : .....	48

1.2.1	Taille, Distribution de taille et Indice de Polydispersité : .....	48
1.2.2	Potentiel zêta : .....	49
1.2.3	Composition de la surface : .....	51
1.2.4	Efficacité d'encapsulation et taux d'encapsulation : .....	52
1.2.5	Les NPs pH-sensibles : .....	52
1.2.6	Les NPs thermosensibles : .....	53
1.2.7	Autres stimuli : .....	53
2.	Les facteurs influençant la formation des nanoparticules : .....	54
2.1	Les matériaux : .....	54
2.2	Méthode de fabrication : .....	54
2.2.1	La méthode a deux étapes : .....	54
2.2.2	Méthode à une seule étape : .....	55
2.3	Facteurs influençant la mise au point des nanoparticules par le procédé de nanoprécipitation : .....	56
2.3.1	La solubilité : .....	56
2.3.2	La vitesse d'injection : .....	56
2.3.3	L'influence du taux d'injection de la phase organique : .....	56
2.3.4	L'effet de volume de la phase aqueuse : .....	57
2.3.5	L'effet de la vitesse d'agitation : .....	57
2.3.6	Méthode d'addition de la phase organique : .....	57
2.3.7	Alcool polyvinylique (PVA) : .....	58
2.3.8	Tween® 80 : .....	59
2.3.9	Alginate de sodium : .....	59
2.3.10	Poloxamer188 : .....	60
	Effet de la température : .....	60
3.	Le métronidazole : .....	61
3.1	Indication du métronidazole : .....	61
3.2	Pharmacodynamique : .....	62
3.3	Le métronidazole dans la nanomédecine : .....	62

## **Deuxième partie : Expérimentale**

	Introduction : .....	65
1.	Matériels : .....	68
1.1	Réactifs et matières premières : .....	68
1.1.1	Alginate de sodium : .....	68

1.1.2	Alcool polyvinylique (PVA-124) : .....	68
1.1.3	Polyéthylène glycol (Ph EUR 6000) (PEG) : .....	69
1.1.4	Polysorbate 80 (Tween 80) : .....	69
1.1.5	Poloxamer 188 (Lutrol <sup>®</sup> F68) : .....	70
1.1.6	Acétone : .....	71
1.1.7	L'acide phosphotungstique : .....	71
1.1.8	Le métronidazole : .....	72
1.2	Matériels utilisés : .....	73
2.	Méthodes : .....	73
2.1	Préparation des nanoparticules d'alginate de sodium : .....	73
2.2	Essais d'orientation : .....	74
2.2.1	Détermination de la concentration de l'alginate de sodium : .....	74
2.2.2	Détermination de la composition en stabilisants : .....	75
2.2.3	Mode d'introduction de la phase organique et procédé de nanoémulsification : .....	75
2.3	Opérations consécutives : .....	75
2.4	Essai proprement dit : .....	78
3.	Méthodes de caractérisations physico-chimiques : .....	80
3.1	Potentiel zêta ; Indice de polydispersité ; Taille des particules .....	80
3.2	Spectrophotométrie UV/visible : .....	82
3.2.1	Principe de la spectrophotométrie UV/visible : .....	82
3.2.2	Préparation des solutions : .....	83
3.2.3	Préparation des échantillons à analyser : .....	83
3.2.4	Détermination de l'efficacité d'encapsulation : .....	83
3.3	La microscopie électronique à transmission : .....	85
3.3.1	Rappel théorique : .....	85
3.3.2	Préparation de l'échantillon : .....	85
3.4	Microscope électronique à balayage : .....	87
3.4.1	Rappel théorique : .....	87
3.4.2	Principe : .....	88
3.4.3	Principe de lyophilisation : .....	88
3.4.4	Les étapes du processus : .....	88
3.5	Etude microbiologique : .....	90
3.5.1	Etapas : .....	91
	Les résultats sont présentés sous formes de tableaux de graphes et de figures. ....	94

1. Optimisation de formulation : .....	94
2. La taille moyenne des particules : .....	94
3. Potentiel zêta : .....	95
4. L'indice de polydispersité (PDI) : .....	95
5. Spectrophotométrie UV/visible : .....	96
5.1 Détermination de l'absorbance du métronidazole : .....	96
5.1.1 Détermination de l'absorbance des trois préparations de nanoparticule chargé de métronidazole : .....	97
5.1.2 Détermination de L'efficacité d'encapsulation : .....	97
6. Etude microbiologique : .....	100
7. La microscopie électronique à balayage (MEB) .....	101
7.1 Les résultats d'analyse : .....	101
Conclusion : .....	111
Référence : .....	113
Annexe : .....	118
Annexe 1 : .....	118

## **1. LISTE DES ABREVIATIONS :**

**DHLA** : Acide dihydrolipoïque.

**CMC** : Concentration micellaire critique

**DLS**: Dynamic Light Scattering.

**FDA**: Food and Drug Administration.

**HLB**: Hydrophilic-Lipophilic Balance.

**IR** : Spectroscopie infrarouge.

**IV** : Voie intraveineuse

**MEB** : Microscopie électronique à balayage.

**MET** : Microscopie électronique à transmission.

**MFA** : Microscopie à Force Atomique.

**MWCO**: Molecular Weight Cut Off.

**NL** : Nanoparticules lipidiques.

**NMP** : Nanoparticules magnétiques.

**NPs** : Nanoparticules.

**NPsP** : Nanoparticules polymériques.

**NTC** : Nanotubes de carbone.

**PCL** : Poly ( $\epsilon$ -caprolactone).

**PGA** : Poly (acide glycolique).

**PLA** : Poly (acide lactique).

**PLGA**: Poly (acide lactide-co-acide glycolide).

**QbD**: Quality-based design.

**QDS** : Quantum Dots.

**RESS** : Expansion rapide des solutions supercritiques.

**SAS** : Précipitation anti-solvant supercritique.

**SCF** : Fluides supercritiques.

**SED** : Émulsification-diffusion de solvant.

**SEE** : Émulsification-évaporation de solvant.

**SLN** : Nanoparticules lipidiques solides.

**SLN** : Solid lipid nanoparticule.

**ZP** : Potentiel zêta..

## LISTE DES FIGURES :

**Figure n°1 :** Micelles polymères.

**Figure n°2 :** Différentes stratégies de formulation des nanogels

**Figure n°3 :** Les polymérosomes « les vésicules polymériques ».

**Figure n°4 :** Différentes structures nanocapsulaires : (a) noyau liquide, (b) matrice polymère et (c) substance active en dispersion moléculaire.

**Figure n°5 :** Différents types de nanoparticules polymériques : (a) nanosphère et (b) nanocapsule.

**Figure n°6 :** Schéma des différents types d'émulsions selon leur taille

**Figure n°7 :** Représentation schématique de la méthode d'émulsification-évaporation de solvant (SEE) pour la production de nanosphères.

**Figure n°8 :** Représentation schématique de la méthode d'émulsification-diffusion de solvant pour la préparation de nanocapsules.

**Figure n°9 :** Montage utilisé pour la préparation de nanocapsules par la méthode de nanoprécipitation

**Figure n°10 :** Représentation schématique du procédé de dialyse pour la préparation de nanosphères.

**Figure n°11 :** Profil de libération in vitro de différentes formulations de nanoparticules à travers une membrane artificielle.

**Figure n°12 :** Potentiel zéta et double couche électrocinétique.

**Figure n°13 :** Structure chimique du métronidazole.

**Figure n°14 :** Les différents essais réalisés pour l'obtention d'une forme optimale.

**Figure n°15 :** Pesée et de dissolution des composants chimiques.

**Figure n°16 :** Introduction de la phase organique (à gauche) et élimination de l'acétone (à droite).

**Figure n°17 :** Filtration (à gauche) et centrifugation (à droite).

**Figure n°18 :** Nanosizer.

**Figure n°19 :** Illustration d'une microgrille de carbone

**Figure n°20:** Les différentes étapes de la préparation de l'échantillon à analyser sur microgrille. .

**Figure n°21 :** Etape de lyophilisation.

**Figure n°22 :** les différentes étapes de préparation notre milieu de culture pour l'incubation.

**Figure n°23 :** Dépôt de disques.

**Figure n°24 :** Courbe d'étalonnage du Métronidazole.

**Figure n°25 :** Résultats des lectures et détermination du diamètre d'inhibition.

**Figure n°26 :** F5 observée par MEB (2500X).

**Figure n°27:** F5 observée par MEB (1000X).

**Figure n°28 :** F5 observée par MEB (500X).

**Figure n°29:** F5' observée par MEB (1000X).

**Figure n°30 :** F5' observée par MEB (2500X).

**Figure n°31:** F5' observée par MEB (5000X).

**Figure n°32 :** F3 observée par MEB (1000X).

**Figure n°33 :** F3 observée par MEB (2500X).

**Figure n°34 :** F3 observée par MEB (5000X).

**Figure n°35 :** F3 (sans filtration) observée par MEB (1000X).

**Figure n°36 :** F3 (sans filtration) observée par MEB (2500X).

**Figure n°37 :** F3 (sans filtration) observée par MEB (5000X).

**Figure n°38 :** F4 (sans filtration) observée par MEB (500X).

**Figure n°39 :** F4 (sans filtration) observée par MEB (1000X).

**Figure n°40 :** F4 (sans filtration) observée par MEB (1000X).

**Figure n°41 :** F4 (sans filtration) observée par MEB (2500X).

## **2. LISTE DES TABLES :**

**Tableau N°1 :** Méthodes principales pour déterminer la taille des Nanoparticules

**Tableau N°2 :** Techniques de préparation des nanoparticules polymériques.

**Tableau N°3 :** Propriétés physico-chimiques du PVA.

**Tableau N°4 :** les propriétés physico-chimiques de PEG.

**Tableau n°5 :** les propriétés physico-chimiques de Tween 80®.

**Tableau N°6 :** les propriétés physico-chimiques de l'acétone.

**Tableau N°7:** Les propriétés physico-chimiques de l'acide phosphtungstique.

**Tableau N°8 :** Différents propriétés de métronidazole.

**Tableau N°9 :** Liste des équipements utilisés.

**Tableau N°10 :** Préparation de la gamme d'étalonnage du métronidazole.

**Tableau N°11 :** Valeurs d'absorbance de la gamme d'étalonnage.

**Tableau N°12 :** Les valeurs des absorbances des trois préparations.

**Tableau N°13 :** Efficacité d'encapsulation de formulations F3, F4 et F5.

**Tableau N°14 :** Les résultats de l'évaluation de l'activité antimicrobienne.

### 3. GLOSSAIRE :

**Amibiase** : Provoquée par l'amibe *Entamoeba histolytica*, parasite spécifique de l'homme. Il s'agit d'un protozoaire qui peut s'entourer d'une fine coque pour former un kyste de quelques microns de diamètre.

**Argent (Ag<sup>+</sup>)** : élément chimique de numéro atomique 47, il interfère en tant qu'agent antimicrobien en interagissant avec la membrane cellulaire bactérienne.

**Argyrisme** : Intoxication par les sels d'argent.

**Bacteroides** : Un genre de bactéries. C'est le groupe le plus important parmi les bacilles Gram négatif anaérobies. Ces germes fécaux constituent une partie importante du microbiote intestinal.

**Chitosane** : Le chitosane est une substance dérivée de la chitine, composant principal de la carapace des insectes et des crustacés. Comme la chitine, le chitosane est une molécule complexe formée de dérivés de sucres, dont la glucosamine. Lorsqu'il est ingéré, le chitosane n'est pas absorbé par l'intestin, il est proposé comme complément alimentaire permettant de perdre du poids et de réduire le taux de cholestérol LDL (« mauvais cholestérol ») dans le sang.

**Colloïde, solution colloïdale** : Sont des mélange (liquide, gel) qui contiennent, en suspension des particules. Ces particules, ou objets colloïdaux, ont une taille supérieure aux molécules qui les constituent (taille supramoléculaire) mais suffisamment petite pour que le mélange demeure homogène.

**Ferrédoxine** : Protéine contenant du fer, présente chez certaines bactéries du sol et dans les chloroplastes des plantes vertes, et à laquelle on attribue le transfert des électrons de l'hydrogène, premier acte chimique de la photosynthèse.

**Flavodoxine** : Une flavoprotéine bactérienne intervenant dans les réactions d'oxydoréduction. La structure des flavodoxines est caractérisée par un feuillet  $\beta$  à cinq brins parallèles entouré d'hélices  $\alpha$  de chaque côté du feuillet. Ces protéines ont été isolées à partir de procaryotes, de cyanobactéries et de certaines algues eucaryotes.

**Fullerènes** : sont le deuxième type de nanoparticules le plus utilisé après celles d'argent, elles sont composées de carbones. Leurs propriétés de structure, conductrices et lubrifiantes font

qu'ils sont utilisés dans plusieurs champs d'activités. Parmi ceux-ci, on retrouve les domaines de la pharmaceutique, des produits cosmétiques, de l'électronique et de la photovoltaïque.

**Fusobacterium** : Un genre de bactérie filamenteuse anaérobie. Elle est gram-, similairement aux Bacteroides. Les Fusobacterium contribuent à plusieurs maladies humaines, y compris les maladies parodontales, le syndrome de Lemierre ou des ulcères cutanés tropicaux et au développement du cancer colorectal.

**Guanosine** : Un nucléoside de la famille des purines. Elle est composée d'une guanine liée à un ribofuranose par une liaison glycosidique  $\beta$ -N9. Elle porte le nom de guanosine (ARN) quand elle est liée à un ribose et de désoxyguanosine quand elle est liée à un désoxyribose (ADN).

*Helicobacter pylori* : est une bactérie qui se développe dans l'estomac, un milieu particulièrement acide. Cette bactérie est responsable d'une infection chronique de l'estomac, touchant la moitié de la population mondiale.

**Hydrophilic-Lipophilic Balance** : Ou HLB, est une grandeur caractéristique d'un tensioactif.

*Laminaria hyperborea* : Une espèce d'algues brunes de la famille des Laminariaceae.

**Les petits ARN interférents (ou siRNA, « Small interfering RNA »)** : sont des petits ARN double brin de 21 à 24 paires de bases. Ils peuvent inhiber l'expression d'un gène en dirigeant la coupure (ou clivage) des ARN qui leur **sont** complémentaires ou en inhibant la traduction d'une séquence génétique spécifique.

**Maladie de Crohn** : Une des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin avec la rectocolite hémorragique. Elle est liée à une hyperactivité du système immunitaire digestif.

**Maladie parodontales** : La maladie parodontale est l'ensemble des maladies qui touchent le parodonte (les tissus autour de la dent), en particulier la gencive et l'os alvéolaire (autour des racines dentaires).

**Mucoadhésion** : décrit les forces d'attraction entre un matériau biologique et du mucus ou une membrane muqueuse.

**Mûrissement d'Ostwald** : Augmentation spontanée de la granulométrie d'un précipité. C'est un phénomène irréversible au cours duquel les plus petites gouttelettes ou les plus petits cristaux en suspension dans une phase continue se dissolvent, tandis que les plus grosses gouttelettes ou les plus gros cristaux croissent.

**Organisme microaérophile** : est un organisme qui a besoin d'oxygène pour survivre à des concentrations inférieures à celle présente dans l'atmosphère (c'est-à-dire inférieure à 21%, généralement 2 à 10%).

**Peptococcus** : Une bactérie à Gram positif de la famille des Peptococcaceae. Les espèces du genre font partie du microbiome humain, en particulier des bactéries qui forment la flore intestinale. Ils font partie de la flore de la bouche, des voies respiratoires supérieures et du gros intestin.

**Peptostreptococcus** : Un genre de bactéries anaérobies, Gram-positives, non sporulées. Les cellules sont petites, sphériques et peuvent apparaître en chaînes courtes, par paires ou individuellement. Ils se déplacent généralement à l'aide de cils.

**Phaeophyceae** : Ou les algues brunes une classe d'algues de l'embranchement des Ochrophyta. Ce sont des algues qui utilisent comme pigment collecteur de lumière principalement de la chlorophylle c combinée à un pigment brun, la fucoxanthine.

**Septicémie** : La septicémie désigne une affection potentiellement mortelle qui correspond à l'infection du sang le plus souvent par une bactérie, parfois un virus ou plus rarement un champignon.

**Rosacée** : une maladie dermatologique fréquente, chronique et gênante. Il s'agit d'une affection qui touche les petits vaisseaux du visage. Elle touche fréquemment les personnes à peau claire et peut avoir des conséquences psychoaffectives importantes.

**Tensioactif** : Une substance modifiant la tension superficielle entre deux surfaces. Les tensioactifs se composent de molécules amphiphiles présentant un côté lipophile (affinité pour les lipides) et un côté hydrophile (affinité pour l'eau).

**Technique de gélification ionique** : est basée sur les interactions ioniques entre les groupes chargés positivement et les groupes chargés négativement de deux agents déférents.

***Trichomonas vaginalis*** : Un parasite de l'être humain appartenant à la famille des protozoaires, espèce flagellés du genre *Trichomonas*, responsable d'infection sexuellement transmissible (IST), le plus souvent bénigne.

**Vaginose bactérienne** : Une infection vaginale qui survient lorsque l'équilibre des bactéries vaginales est rompue.

# *Introduction générale*

## **Introduction générale**

### **Introduction générale**

Les nanosciences et nanotechnologies font depuis plus de vingt ans l'objet de travaux nombreux, au sein et à l'interface de disciplines scientifiques multiples, comme la physique, la chimie, les sciences et technologies de l'information et de la communication (STIC), la biologie, les sciences de l'ingénieur ou les sciences humaines et sociales.

Les recherches sur les nanotechnologies suscitent des espoirs importants en raison des propriétés particulières de la matière à l'échelle nanométrique, qui permettent d'envisager de nouvelles fonctions jusqu'ici inimaginables. Fabriquer, observer et manipuler des nano-objets, étudier et comprendre leurs propriétés et leurs interactions avec leur environnement, en particulier avec le vivant, les modéliser et les simuler, les intégrer dans des systèmes communicants, tels ont été et sont encore les grands défis scientifiques indispensables à relever pour développer des applications nombreuses et considérables, mais de façon maîtrisée et contrôlée.

Les applications des nanotechnologies sont de plus en plus importantes dans la vie de chaque individu, pour l'industrie et le commerce, pour la santé et la société. Aujourd'hui, des travaux de recherche et de développement sont en pleine expansion dans le domaine de l'énergie, de la chimie, des matériaux, de la biologie de la médecine et de l'environnement.

Dans le domaine pharmaceutique, les nanoparticules (nanosphères et nanocapsules) ont largement été utilisées pour la vectorisation des principes actifs. Durant ces dernières décennies, un nombre important de travaux de recherche ont été cités dans la littérature portant essentiellement sur la résolution des problèmes liés à la stabilité, à l'efficacité et à l'administration des molécules actives.

Par ailleurs leurs applications permettent de traiter des maladies bactériennes, virales ou parasitaires, en améliorant l'adressage et le ciblage thérapeutique. C'est l'exemple des nanoparticules de kétoconazole-PLA qui ont permis d'améliorer l'activité antifongique contre les dermatophytes et les espèces de *Candida*, indiquant un outil prometteur pour le développement de stratégies thérapeutiques (E.H, et al. 2020).

L'usage de polymères pour la mise au point de nanoparticules prend de l'ampleur et tend à se généraliser pour les nombreux avantages qu'ils puissent apporter à la structure, à la forme mais également à la stabilité de ces formes. Bien que le procédé de nanoprécipitation fût ancien, il n'en demeure pas moins qu'il reste toujours d'actualité et fait l'intérêt des molécules instables

## Introduction générale

et fragiles. D'autres molécules médicamenteuses se portent candidates afin d'améliorer l'efficacité thérapeutique ou encore maîtriser et ou moduler une cinétique de libération.

Dans notre travail, nous avons réussi à mettre au point un système nanoparticulaire à base de polymères (Alcool polyvinylique et alginate de sodium) en présence de Lutrol® F68, un tensioactif hydrosoluble connu pour ses propriétés stabilisatrices. La méthode par homogénéisation à haute pression et ou sonication se base sur le principe de la nanoprécipitation pour les différents avantages qu'elle offre. A la fin, différentes formules sont préparées et testées par homogénéisation à haute pression en encapsulant le métronidazole (un antibactérien). Les différentes caractérisations physico-chimiques qui consistaient à la détermination de la taille des particules, du potentiel zêta, du taux d'encapsulation, de la microscopie électronique à balayage, sans oublier l'étude de l'activité antimicrobienne nous ont permis de constituer un poulx de résultats et d'en arriver aux conclusions et perspective.

Ce travail est donc divisé en deux parties :

Une partie bibliographique qui commence par des généralités sur les nanotechnologies et présente ensuite les différents champs d'application, les avantages et les inconvénients de ces nouvelles formes pharmaceutiques. En seconde partie, nous décrivons les différents types de nanoparticules, leurs principales méthodes de fabrication et de caractérisation. En troisième partie, nous nous sommes intéressées particulièrement aux nanoparticules polymériques et leurs méthodes d'obtention. Pour terminer, nous parlerons du procédé de nanoprécipitation et des facteurs influençant la mise au point des nanoparticules polymériques par ce procédé de fabrication.

Et une partie expérimentale qui regroupe plusieurs chapitres :

Chapitre 1 : Essais d'orientation et de préformulation, dans lequel les travaux portent essentiellement sur la mise au point des nanoparticules par deux méthodes (sonication et homogénéisation à haute pression) à l'échelle laboratoire afin de tester leur faisabilité. Dans ce chapitre, il s'agit d'établir un arbre décisionnel afin de choisir le meilleur procédé qui vise à obtenir la solution colloïdale désirée sur le plan macroscopique. À ce stade s'effectue le choix de la composition qualitative et quantitative.

Chapitre 2 : Essais proprement dit, durant lequel on exécute la formule qui servira à l'encapsulation du métronidazole, un antibactérien choisi comme molécule modèle dans notre travail.

## **Introduction générale**

Chapitre 3 : Dans ce chapitre seront présentées toutes les méthodes de caractérisations et les résultats obtenus ainsi que leurs interprétations respectives.

Enfin, nous terminons ce travail par une conclusion générale et perspective.

*Première partie*  
*Étude bibliographique*

*Premier Chapitre*  
*De la nanotechnologie à la*  
*nanomédecine*

# Premier Chapitre : De la nanotechnologie à la nanomédecine

## 1. La nanotechnologie :

La nanotechnologie est un domaine scientifique multidisciplinaire prometteur qui peut concerner la médecine, la biologie, la physique, la chimie ou même l'armement, qui traite du développement et de l'utilisation de matériaux pouvant être utilisés pour produire des dispositifs et des produits d'une dimension égale à un milliardième de mètre.

Les nanoparticules et les nanomatériaux ont de nouvelles propriétés qui dépendent de leurs dimensions. Au niveau médical, elles pourraient permettre de créer des prothèses plus performantes ou même de soigner des cancers (Costas 2016).

En science et technologie, le préfixe nano- vient du mot grec *νάνος* = nanos qui signifie quelque chose de très petit. Un nanomètre (nm) équivaut à un milliardième de mètre ( $10^{-9} = 0,000000001$ ) (Costas 2016).

Selon le plan stratégique de la National Nanotechnology Initiative (NNI) de février 2014, la nanotechnologie est la compréhension et le contrôle de la matière à des dimensions d'environ 1 à 100 nm, où des phénomènes uniques permettent de nouvelles applications (Costas 2016).

### 1.1 Histoire de la nanotechnologie :

À l'échelle mondiale, les nanotechnologies suscitent de plus en plus d'intérêt et sont en voie de constituer le cœur de la prochaine révolution industrielle.

Dès 1959, le visionnaire américain Richard Feynman a lancé le défi à la communauté scientifique d'aller au cœur de la matière pour la transformer, molécule par molécule. Mais cela ne pouvait se concrétiser qu'après la découverte du microscope à effet tunnel en 1981 par Gerd Binnig et Heinrich Rohrer. Grâce à cet outil, on pouvait enfin « voir » la matière à l'échelle atomique (dequesnes 2019).

Vers la fin des années 80, les activités de recherche se répartissaient entre la chimie supramoléculaire (auto assemblage de molécules) de Jean Marie Lehn qui reçut le prix Nobel de chimie de 1987. Il travailla sur des molécules « hôtes » présentant des cavités de tailles et de formes bien définies capables de reconnaître et de se lier à de plus petites molécules de formes et de tailles correspondant à celles des cavités, comme une clé est acceptée par une serrure. Ce processus, qui fait intervenir une véritable « reconnaissance moléculaire ».

## Premier Chapitre : De la nanotechnologie à la nanomédecine

Une autre découverte marquante dans ce cheminement est la découverte de la fameuse molécule « fullerène », structure de 60 atomes de carbone. Enfin en 1991, le physicien Sumio Iijima découvre les nanotubes de carbone qui sont un élément incontournable des nanotechnologies.

En 1974, le scientifique japonais Norio Taniguchi utilise pour la 1<sup>ère</sup> fois le terme « nanotechnologie » pour désigner les procédés qui appartiennent à la conception, la fabrication et l'utilisation des structures à l'échelle du nanomètre. En 1990, de minuscules vésicules artificielles appelées liposomes, sont utilisées dans certains produits cosmétiques pour encapsuler des principes actifs. Cette technique sera ensuite appliquée à la médecine pour encapsuler d'autres principes actifs médicamenteux ( Reynouard 2018).

En 1998, aux États-Unis un groupe d'experts crée le « Interagency Working Group on Nanotechnology » (IWGN) qui deviendra plus tard en 2000 le NNI, National Nanotechnology Initiative, ce qui marque le début de l'ère des nanosciences (Feigenbaum, Nsamirizi et Sinclair-Desgagné 2004).

Aujourd'hui, les nanoparticules sont sollicitées par la médecine car elles sont capables de pénétrer dans les cellules humaines et à l'intérieur des organites pour interagir avec l'ADN et les protéines. Ces caractéristiques sont très utiles pour détecter les cancers par exemple. Elles ont aussi le rôle de vecteurs médicamenteux afin de moduler la distribution d'une substance au sein d'un organisme.

### **1.2 Propriété de la matière à l'échelle nanométrique :**

Ce qui rend les nanotechnologies si spéciales tant dans l'étendue des possibilités qu'elles offrent que dans les incertitudes qu'elles suscitent, ce sont les propriétés de la matière à l'échelle nanométrique. Le nanomètre est une grandeur frontière entre deux types de lois physiques : les lois « classiques » dont nous avons l'habitude à l'échelle humaine ou macroscopique, et les lois quantiques, majoritaires à l'échelle des particules élémentaires. Le fait de changer de taille de particules va donc entraîner une modification de leur comportement suivant les lois qui s'appliquent majoritairement, avec des conséquences directes sur leurs propriétés de conductivité électrique, de perméabilité magnétique, de fluorescence, ou leur réactivité chimique en faisant varier le point d'ébullition ou la solubilité, (Claire , et al. 2012) .

Une autre particularité de l'échelle nanométrique est que la surface totale des objets, ainsi que le rapport entre la surface et le volume des objets nanoparticulaires, vont créer une différence

## Premier Chapitre : De la nanotechnologie à la nanomédecine

de réactivité par rapport à l'échelle macroscopique. La proportion d'atomes directement présents en surface d'un matériau est largement supérieure à l'échelle nanométrique : « dans un centimètre cube de matière, un atome sur 10 millions se trouve à la surface, mais dans un nanomètre cube, près de 80 % des atomes se situent à la surface ». Ces atomes affleurant rendent la surface plus réactive grâce aux interactions possibles avec une proportion bien supérieure d'atomes de l'objet (Claire , et al. 2012).

### 1.3 Champs d'applications des nanotechnologies :

La nanotechnologie ou les applications des nanosciences ont pénétré tous les domaines, en ayant un impact positif important sur les champs suivants :

- Nanoélectronique.
- Nanobiotechnologie : avec deux types d'applications thérapeutique et diagnostique.
- Nanoénergies
- Applications dans l'industrie alimentaire : Les principaux domaines d'application des techniques nanotechnologiques dans les aliments sont le changement des caractéristiques des aliments, emballages alimentaires, protection et transformation des aliments.
- Applications dans l'industrie agricole.
- Applications dans l'industrie pétrolière et gazière.
- Nanomédecine : les principaux domaines sont le développement des médicaments (Cardiopathie, Diabète, Maladie du rein, traitement des plaies, traitement antibactérien), diagnostic techniques, réparation cellulaire.

### 2. La nanotechnologie et la santé :

Le champ d'application des nanotechnologies en matière de santé est aussi diversifié, que ce soit dans la perspective de mieux exploiter des principes actifs connus ou pour mettre au point des façons radicalement nouvelles d'aborder le traitement et le diagnostic des pathologies.

Les principales nanotechnologies développées dans le secteur de la santé sont :

#### 2.1 Les nanothérapies :

Les nanothérapies regroupent un large éventail de vecteurs pour atteindre la cible thérapeutique, de dispositifs médicaux, de solutions nouvelles contre les agents infectieux, pour la vaccination,

## Premier Chapitre : De la nanotechnologie à la nanomédecine

et comme outils de recherche et qui tirent profit de multiples champs d'expertise scientifique, de la nanoélectronique à la microfluidique en passant par les biotechnologies.

### **2.2 La vectorisation :**

Les vecteurs, ou systèmes de délivrance médicamenteux sont généralement des nanoparticules dont les caractéristiques permettent un meilleur ciblage et donc une meilleure efficacité, en transportant soit par encapsulation, dispersion, absorption ou conjugaison de principes actifs. Ces dispositifs permettent généralement de donner à ces molécules une meilleure solubilité, et une meilleure adhésion aux surfaces biologiques, améliorant ainsi la biodisponibilité et l'activité pharmacologique (Jawad, et al. 2018). Ces méthodes existaient déjà avant l'avènement des nanoparticules sous la forme de liposomes, micelles polymériques, dendrimères, nanocristaux, ou encore de nanoparticules d'or colloïdal, systèmes déjà utilisés dans les années 1960 et 1970. Mais l'amélioration des techniques de manipulation et de création à l'échelle du nanomètre a grandement permis l'adaptation de ces principes à de nouvelles molécules thérapeutiques et à de nouvelles cibles ainsi que le contournement des voies métaboliques pour promouvoir la durée d'action (Filipponi et Sutherland 2010).

D'autres nanosystèmes font l'objet de nombreuses recherches à cette fin, comme les nanoémulsions, les nanotubes, les nanofibres, les nanocapsules et les hydrogels.

La vectorisation est également utilisée en recherche pour les thérapies à base de petits ARN interférents (siARN) fondées sur les mécanismes de régulation génétique physiologiques et sur la découverte en 1998 des ARN interférents, ces thérapies permettent de dégrader un ARN messager et de bloquer la production de la protéine pour laquelle il code. Le contrôle de la fonction cellulaire ainsi obtenu peut être transmis de cellule en cellule et même à la descendance. Ces siARN font l'objet de recherches pour être utilisés dans « le traitement d'infections virales, de maladies cardiovasculaires, de cancers et de troubles métaboliques » (Filipponi et Sutherland 2010).

### **2.3 La vaccination :**

En matière de vaccination, les nanomatériaux pourraient aider à répondre aux problématiques actuelles en améliorant le profil toxicologique des vaccins grâce à un adressage précis de sous-unités d'antigènes, en augmentant leur immunogénicité. Par exemple, l'association de mastocytes et de chitosan comme adjuvants dans un vaccin contre le virus de l'hépatite B semble prometteuse, notamment pour une administration par voie nasale, tout en évitant

## Premier Chapitre : De la nanotechnologie à la nanomédecine

l'utilisation d'aluminium qui crée un certain nombre de polémiques à l'origine de la défiance actuelle envers les vaccins (dequesnes 2019).

### **2.4 Dispositifs médicaux et systèmes nanothérapeutiques :**

Les membranes nanoporeuses sont utilisées depuis la fin des années 1990 comme filtre de dialyse, car elles permettent une grande sélectivité à un flux important (dequesnes 2019).

Des applications plus complexes sont envisagées actuellement, incluant la séparation et la purification de protéines, la détection de molécules, la purification de mélanges, le retrait de réactifs résiduels, des analyses biochimiques, et la distribution de principes actifs grâce à des membranes électives et contrôlables.

Une autre catégorie de dispositifs médicaux est issue des nanobiotechnologies : les biopiles issues de la recherche en bio-électrochimie, les applications biomédicales de ces piles sont les plus prometteuses (dequesnes 2019).

### **2.5 Les surfaces antimicrobiennes :**

Le développement des microorganismes en surface du matériel médical est un problème majeur, à la fois pour le matériel chirurgical, pour les pansements, ou les dispositifs implantables. Deux types d'approches sont explorés avec les nanomatériaux pour contrer ce problème : soit par la nature du matériau, soit par la nanostructuration de l'objet.

Un agent antimicrobien très connu et utilisé depuis plusieurs siècles en médecine ou pour la conservation des aliments est l'argent, mais son utilisation à répétition notamment par ingestion entraîne une accumulation, qui provoque l'argyrisme (dequesnes 2019).

L'exposition doit être limitée pour éviter cette pathologie, et la quantité d'argent utilisée sur le matériel de soin réduite au strict nécessaire pour obtenir des propriétés antibactériennes et éviter des surcoûts. Cet élément utilisé sous forme de nanoparticules est exploité en couches recouvrant des pansements (la gamme Allevyn Ag de Smith&Nephew<sup>®</sup>, ou les Biatain Alginate/Argent de Coloplast<sup>®</sup>), des outils chirurgicaux et autre matériel hospitalier propre, ou encore sous forme de gel. Il permet alors une protection antibactérienne très efficace sans être fonctionnalisé avec un antibiotique, et des formulations pourraient permettre la guérison de blessures, y compris présentant des bactéries résistantes sans provoquer d'argyrisme (dequesnes 2019).

D'autres applications sont en cours de développement, comme la création en 2016 de dispositifs cornéens artificiels incluant des nanoparticules d'argent stabilisées incorporées à une matrice

## Premier Chapitre : De la nanotechnologie à la nanomédecine

de collagène pour profiter de leurs capacités antibactérienne et anti inflammatoire; l'amélioration de dispositifs implantables, orthopédiques ou dentaires, est une voie explorée par la recherche, notamment pour recouvrir des implants en titane avec des ions argent afin d'éviter l'infection, la réaction inflammatoire et donc les interventions chirurgicales répétées. Cette méthode semble efficace et peu cytotoxique sur les cellules testées (fibroblastes de souris), mais la toxicité in vivo, puis sur l'humain et à long terme sera un élément clé du développement de ce type de revêtement (dequesnes 2019).

### **2.6 Le diagnostic et la prédiction**

La nanomédecine offre de nouvelles possibilités dans ce domaine; des marqueurs plus spécifiques et plus performants pour l'imagerie médicale, des marqueurs spécifiques de types cellulaires ou de molécules, des dispositifs de diagnostic testant plusieurs paramètres simultanément, et des biocapteurs d'une grande précision, dont la combinaison peut servir à intégrer le diagnostic et le traitement en un seul dispositif de « théranostique » qui est la combinaison du diagnostic et de la thérapie, intégrant le suivi de la pathologie durant ou après le traitement (Caster, et al. 2016).

### **3. Les inconvénients de nanotechnologie (la nanotoxicité) :**

Concernant les nanotechnologies et plus particulièrement les nanoparticules, les risques pour la santé seraient donc importants, quelle que soit la voie de pénétration : voies respiratoire, cutanée, digestive ou par inhalation, les particules ultrafines pourraient se retrouver directement au contact du cerveau, par cette dernière voie.

Ainsi, soit directement, soit par nano-diffusion, les nanoparticules se retrouveraient au plus profond des organes (alvéoles pulmonaires) et pourraient migrer vers d'autres sites notamment ceux particulièrement irrigués (foie, cœur, rate). Les personnes manipulant ou en contact avec des nanoparticules doivent être protégées et médicalement suivies afin d'éviter un scénario « type amiante » ( Houdy 2016) .

Pour l'application médicamenteuse ; il est difficile d'énumérer ces risques, car plusieurs années de tests et de résultats cliniques sont nécessaires avant de pouvoir les évaluer pleinement. Par exemple, dans le cas des vaccins Covid-19, nous savons qu'ils fonctionnent bien et nous connaissons les effets à court terme, mais nous ne connaissons pas encore les effets à long terme parce que personne n'a eu le temps d'étudier en profondeur un produit qui est apparu il y a deux ans et demi. Ces risques à long terme doivent faire l'objet d'investigations approfondies.

*Deuxième Chapitre*  
*Les nanoparticules*

## Deuxième Chapitre : Les nanoparticules

### **1. Les nanoparticules :**

Les nanoparticules (NP) sont des structures composées de quelques centaines à quelques milliers d'atomes. Du fait de leur taille (1 à 100 nanomètres), les propriétés physiques et chimiques de ces nano-objets sont différentes de celles des matériaux classiques. Leur champ de développement est extrêmement vaste et inclut la recherche médicale. On peut alors différencier plusieurs types de nanoparticules.

La polyvalence de ces NP est grande car elles peuvent être conçues et modelées pour servir de vecteurs de médicaments (thérapeutique), de sondes d'imagerie (diagnostique), voire les deux à la fois (théranostique) (Chuto et Chaumet-Riffaud 2010).

#### **1.1 Les types des nanoparticules :**

##### **1.1.1 Les nanoshells :**

Ce sont les nouvelles formes modifiées de thérapie ciblée, ayant un noyau de silice et une couche externe métallique. Les propriétés des nanoshells peuvent être modifiées simplement en réglant le rapport noyau/coque (Bhatia 2016).

Ces formes occupent une variété d'applications dans divers domaines tels que la stabilité chimique des colloïdes, l'amélioration des propriétés de luminescence, biocapteurs, administration de médicaments, etc. (Bhatia 2016).

##### **1.1.2 Quantum Dots (QDs) :**

Les QD sont des nanocristaux semi-conducteurs colloïdaux (jusqu'à 2-10 nm), composés d'atomes des groupes II-VI ou III-V du tableau périodique, ayant des propriétés optiques et fluorescentes uniques (Gupta et Kumar 2012).

Les plus couramment utilisés sont le séléniure de cadmium (CdSe), le tellurure de cadmium (CdTe) et arséniure d'indium (InAs). Lors de leur interaction avec le photon, ils sont excités et émettent de l'énergie dans les régions UV-visibles ou proche infrarouge (IR), et peuvent être détectées. En raison de leur petite taille, ils peuvent être utilisés pour le marquage de macromolécules biologiques, telles que les nucléosides et les protéines (Gupta et Kumar 2012).

La cytotoxicité causée par les QD est dose dépendante, et est étroitement liée au type de matériau et ou de la composition de la surface cellulaire. Afin de minimiser la cytotoxicité, les

## Deuxième Chapitre : Les nanoparticules

QD sont encapsulés avec du ZnS et de l'albumine sérique bovine (BSA), qui assurent une protection de surface des QD (Gupta et Kumar 2012).

### **1.1.3 Dendrimères :**

Les dendrimères ont une structure macromoléculaire hyper-ramifiées, monodispersées, tridimensionnelles, ressemblant à l'architecture d'un arbre (Gupta et Kumar 2012).

Les dendrimères sont l'un des plus récents systèmes de transport utilisés pour l'administration de médicaments (Gupta et Kumar 2012).

Généralement, un dendrimère se compose de trois parties principales : un noyau central multifonctionnel, des unités ramifiées et des groupes de surface. La taille particulière des dendrimères, allant de 1 à 100 nm. Les dendrimères agissent comme agents solubilisant pour héberger des médicaments hydrophiles et hydrophobes (Gupta et Kumar 2012).

### **1.1.4 Les nanoparticules lipidiques (NL) :**

Les nanoparticules lipidiques (NL) présentent différentes caractéristiques : ils sont biodégradables et biocompatibles en raison des substances généralement reconnues comme sûres (GRAS) utilisées dans leur préparation. Ils sont très stables, tant sur le plan biologique, dans des milieux ayant un métabolisme enzymatique excessif, que sur le plan physique, pendant leur stockage. Leurs propriétés physico-chimiques pourraient être modulées en fonction des besoins souhaités (Krishnan et Chuturgoon 2020).

Les NL sont réalisées avec des techniques sans solvant et pourraient être stérilisés par autoclavage, ce qui rend leur transposition d'échelle intéressante (Krishnan et Chuturgoon 2020).

Ils sont généralement classés en fonction de leurs techniques de préparation et de leurs propriétés physico-chimiques en niosomes, liposomes et nanoparticules lipidiques solides (NLS), porteurs lipidiques nanostructurés (NCL) (Krishnan et Chuturgoon 2020).

Les applications des liposomes sont restreintes en raison de leur faible capacité d'encapsulation des molécules hydrophiles et de l'exclusion de leur absorption rapide par le système réticulo-endothélial (SRE) (Krishnan et Chuturgoon 2020).

Les nanoparticules lipidiques solides (NLS) sont constituées de lipides dans une dispersion aqueuse préparée en présence d'émulsifiants pour leur stabilisation (Krishnan et Chuturgoon

## Deuxième Chapitre : Les nanoparticules

2020). Les lipides utilisés sont principalement des mélanges de glycérides complexes, des triglycérides ou des cires qui conservent leur forme solide à la fois à la température ambiante et physiologique, renforcés par des tensioactifs appropriés (Krishnan et Chuturgoon 2020).

L'utilisation de lipides et la prévention de l'utilisation de solvants organiques en plus de la possibilité d'obtenir une production à grande échelle sont les principaux avantages des SLN. De plus, ils peuvent améliorer la stabilité des médicaments en les protégeant de l'environnement, en augmentant leur biodisponibilité et en établissant un profil de libération contrôlée de l'agent actif. Le principal avantage du SLN est qu'ils surmontent tous les obstacles physiologiques contrairement à d'autres systèmes médicamenteux (Krishnan et Chuturgoon 2020).

Le SLN pourrait être produit sous forme de poudres qui peut servir à la compression, à la formulation des pellets ou capsules, ce qui facilitera le processus d'administration des médicaments (Krishnan et Chuturgoon 2020).

Les SLNs sont largement utilisés pour encapsuler des ingrédients actifs cosmétiques et des composants alimentaires biologiques. Cependant, les SLNs présentent quelques inconvénients, comme leur tendance à la gélification qui n'est pas prévisible, et le polymorphisme (la structure cristalline des lipides solides peut causer un faible taux d'encapsulation ou une déperdition de dose). C'est ainsi, un autre système connu sous le nom de NLCs porteurs de lipides nanostructurés a été développé (Krishnan et Chuturgoon 2020).

### **1.1.5 Les nanoparticules polymériques :**

Les nanoparticules polymériques ont acquis un grand intérêt en thérapeutique et diagnostique. Elles sont biocompatibles, capables de contourner les barrières biologiques et peuvent être utilisées dans le ciblage (Krishnan et Chuturgoon 2020).

Les nanoparticules polymériques ont été principalement étudiées pour leur taille de particule afin de contrôler les interactions biologiques. Leur taille dépend de leurs applications et est généralement comprise entre 1 et 1000 nm, ce qui affecte fortement la biodistribution et l'absorption cellulaire de ces dernières. Leur forme est une propriété importante qui a un rôle crucial dans le contrôle de l'interface entre ces dernières et les systèmes biologiques (Krishnan et Chuturgoon 2020).

### **1.1.6 Autres types :**

## Deuxième Chapitre : Les nanoparticules

Il existe d'autres types de systèmes nanoparticulaires tels que :

- Les nanoparticules métalliques et inorganiques :

Divers métaux, tels que l'or (Au), le cuivre (Cu) et l'argent (Ag), et des supports inorganiques, tels que la silice ou l'alumine, ont été utilisés pour la préparation de nanoparticules, parmi lesquelles les nanoparticules d'Au sont le plus rapidement utilisées en raison leurs excellentes propriétés optiques et photoélectriques (Gupta et Kumar 2012).

Ces formes présentent certains avantages spécifiques, comme l'inertie et la non-toxicité, une stabilité plus élevée, une facilité de préparation et la possibilité de bioconjugaison et de biomodification avec des groupes fonctionnels SH, disulfure et amine (Gupta et Kumar 2012).

- Nanoparticules magnétiques (NPM) :

Des systèmes d'administration de médicaments nanoparticulaires à ciblage magnétique impliquent la liaison de médicaments avec des NPM, tels que des NPM fer oxydé (Fe) ou magnétite. En raison de leurs tailles contrôlables (allant de 10 à 100 nm) et de leur capacité d'administrer le médicament ou le radionucléotide à proximité d'un site cible, ils fournissent une bonne étendue dans l'administration du médicament. Pour les applications biomédicales, les supports magnétiques doivent être à base d'eau, biocompatible, non toxique et non immunogène (Gupta et Kumar 2012).

- Les nanofibres et nanotubes :

Les nanofibres et les nanotubes sont formés par croissance en phase vapeur de carbone, auto-assemblés à partir d'amphiphiles peptidiques ou électrofilés à partir de la plupart des matériaux polymères. Les nanotubes de carbone (CNT) ont attiré l'attention en nanomédecine, bien qu'il y ait également de sérieuses préoccupations concernant leur sécurité (Gupta et Kumar 2012).

### 1.2 Les techniques de caractérisation physico-chimique des nanoparticules :

Les différentes techniques de caractérisation sont résumées dans le tableau suivant :

Tableau 1 : Méthodes principales pour caractérisation des Nanoparticules (García 2017).

Méthode	Principe	Type d'information	Avantage	Limitation
Microscopie électronique à	Un échantillon ultra mince est traversé par un	Taille, forme et morphologie de la surface,	Haute résolution (<0.1 nm, sub-	Temps, influence de la

## Deuxième Chapitre : Les nanoparticules

<b>transmission (MET)</b>	faisceau d'électrons.	Information sur l'imagerie et la diffraction.	angstrom) pour l'étude des tailles, formes, défauts, structures de la surface des NPs.	préparation de l'échantillon.
<b>Microscopie électronique à balayage (MEB)</b>	Balayage de l'échantillon avec un faisceau d'électrons focalisé.	Taille, forme et morphologie de la surface	Observation directe des NPs, haute résolution (entre 3 et 5 nm).	Informations limitées sur la distribution des tailles et la moyenne réelle de la population.
<b>Diffusion dynamique de la lumière (DLS)</b>	Quand les photons frappent les NPs mobiles, ils changent leur longueur d'onde, ce qui est corrélé à la taille des particules.	Diamètre hydrodynamique.	Rapide et automatique, reproductible, calibration pas nécessaire, versatilité, large gamme de tailles (3 nm – 3µm).	Résolution faible, Ne compte pas les NPs, Limitée aux particules sphériques et aux échantillons homogènes.
<b>Diffusion de la lumière (Light Scattering, LS)</b>	Interaction de l'échantillon avec la lumière.	Taille moyenne, distribution de taille, Indice de Polydispersité.	Bien adapté pour les mesures de routine.	Pas approprié pour des populations très dispersées, fortement influencé par des agrégats.
<b>Microscopie de force atomique (MFA)</b>	Analyse physique d'échantillons au niveau submicronique en utilisant une pointe de sonde atomique.	Analyse de surface.	Résolution ultra-élevée pour l'étude des particules. Imagerie des échantillons non conducteurs.	Pas automatisé, utilisation et préparation de l'échantillon complexe.

*Troisième Chapitre*  
*Les nanoparticules polymériques*

## Troisième Chapitre : Les nanoparticules polymériques

### 1. Les nanoparticules polymériques (NPsP) :

Les nanoparticules polymériques (NPsP) sont l'une des stratégies organiques les plus étudiées dans la nanomédecine. Afin de déterminer le nanosystème idéal pour une livraison plus efficace et ciblée d'applications thérapeutiques, la taille des particules, la morphologie, le choix des matériaux et les techniques de traitement sont tous d'une importance capitale. Le cancer, les troubles neuro-dégénératifs et les maladies cardiovasculaires sont actuellement traités par des médicaments à base de nanoparticules polymériques.

#### 1.1 Définition :

Les nanoparticules polymériques sont des particules colloïdales solides, dont la taille varie de 10 à 1000 nm, constituées de diverses matrices polymériques biocompatibles dans lesquelles le médicament peut être adsorbé, piégé ou lié de manière covalente. De manière similaire aux liposomes, la taille, les propriétés de surface, la composition, la concentration et l'hydrophilie ou l'hydrophobicité des nanoparticules jouent un rôle majeur dans leurs performances in vivo.

Les polymères utilisés dans la synthèse des nanoparticules approuvés par la Food and Drug Administration (FDA) des États-Unis pour l'administration chez les êtres humains sont généralement des polymères synthétiques biodégradables et biocompatibles comme le poly (acide lactique) (PLA), le poly (acide glycolique) (PGA), le poly (lactide-co-glycolide) (PLGA), et Poly ( $\epsilon$ -caprolactone) (PCL) (Gupta et Kumar 2012).

#### 1.2 Pourquoi utilise-t-on les nanoparticules polymériques ?

En dépit de leur potentielle toxicité, les nanoparticules polymériques ont aussi leurs avantages (Rezigue 2020) :

- Les NPs polymériques possèdent une meilleure efficacité et une meilleure absorption par rapport aux voies IV et Orale.
- L'intégration de NPs polymériques dans d'autres fonctions telle que l'ingénierie tissulaire peut être réalisée.
- Les NPs polymériques peuvent transporter le principe actif vers le site cible avec une spécificité d'action, une meilleure stabilité et une action prolongée surtout pour les substances volatiles.

## Troisième Chapitre : Les nanoparticules polymériques

- Ce sont des vecteurs très prometteurs pour la distribution de vaccins, des médicaments anti-tumoraux et des antibiotiques. L'adressage au niveau de la cible dépend du type de polymère avec possibilité d'ajuster la libération de principe actif. Il dépend également de la taille des NPs polymériques.
- La taille des NPs polymériques leur confère cette capacité de passer à travers nombreux types de barrières et capillaires. De plus, ils possèdent une grande surface de contact ce qui améliore la solubilité et donc l'absorption de la molécule active. Ils sont également très stables dans les suspensions en raison de cette petite taille.

### **1.3 Les types de nanoparticules polymériques les plus utilisées en nanomédecine :**

#### **1.3.1 Les micelles :**

Les micelles polymériques représentent une classe distincte de micelles formées de copolymères amphiphiles, de taille nanométrique (<100 nm), avec un noyau hydrophobe et une enveloppe hydrophile (Costas 2016) (Figure N°1).

La couche hydrophile est le constituant principal de l'enveloppe de la micelle et agit comme une interface stabilisante entre le noyau hydrophobe et le milieu extérieur. Les propriétés de l'enveloppe vont donc majoritairement affecter la pharmacocinétique et la biodistribution de la micelle et par conséquent, celle du principe actif incorporé. De façon générale, ses caractéristiques essentielles sont une bonne solubilité aqueuse, sa capacité à créer une stabilisation stérique et sa biocompatibilité (Le Garrec 2006).

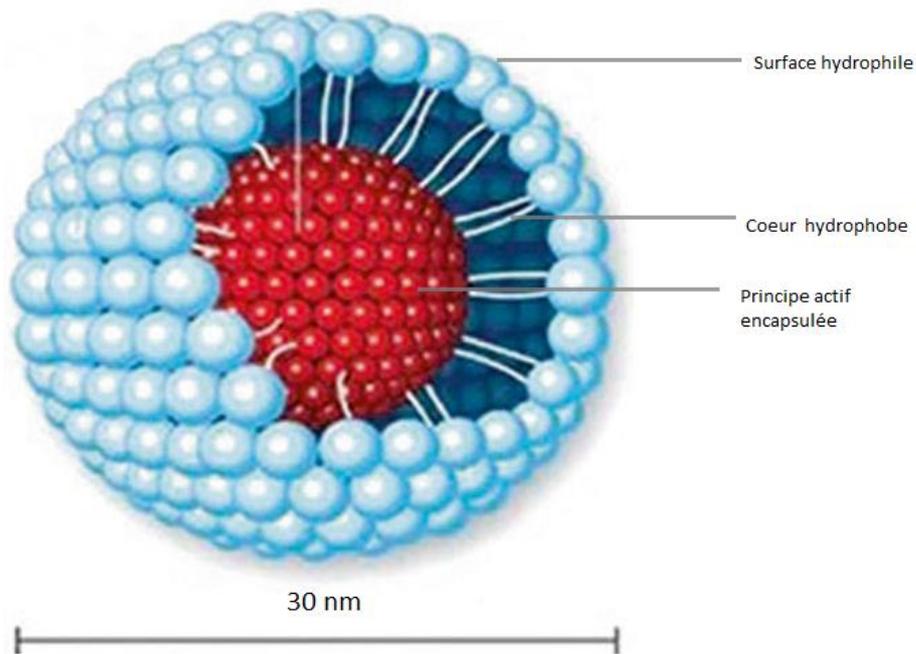


Figure N°1 : Micelles polymères (Costas 2016)

### 1.3.2 Les nanogels :

Ce sont des particules colloïdales constituées d'un réseau tridimensionnel de polymère réticulé gonflé (en mailles) dans un solvant, possédant un diamètre compris entre 10 et 1000 nm (figure N°2).

Les nanogels peuvent protéger et transférer des molécules bioactives et thérapeutiques nucléotides et contrôler leur libération en intégrant des fonctionnalités très familières des groupes qui correspondent à la configuration et des liens biodégradables dans le réseau polymérique. Comme d'autres nanosystèmes, les nanogels peuvent être facilement administrés sous forme des formulations liquides par voie parentérale (Costas 2016).

## Troisième Chapitre : Les nanoparticules polymériques

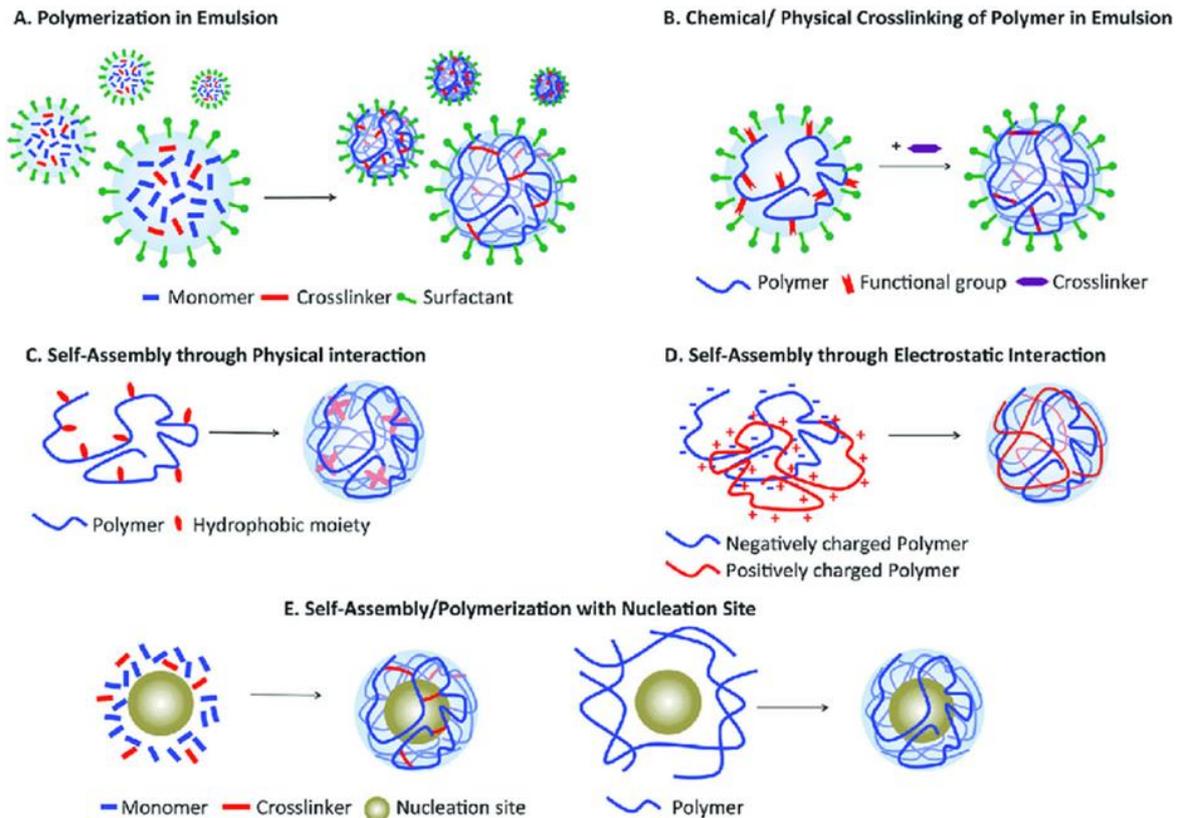


Figure N°2 : Différentes stratégies de formulation des nanogels (Chan et Almutairi 2015).

### 1.3.3 Les polymérosomes :

Les polymérosomes ou les vésicules polymériques, possèdent une structure similaire à celle des liposomes ; de dimension variée entre 10 nm et 10  $\mu\text{m}$  et de forme pseudo-sphérique.

Les polymérosomes sont composées de blocs copolymères amphiphiles qui peuvent s'auto-associer. Ils sont formés d'une membrane polymérique hydrophobe qui entoure une cavité hydrophile (figure N°3), cette structure offre une meilleure stabilité et des propriétés mécaniques, ainsi qu'une modulation de la vitesse de libération et de distribution du principe actif (Costas 2016).

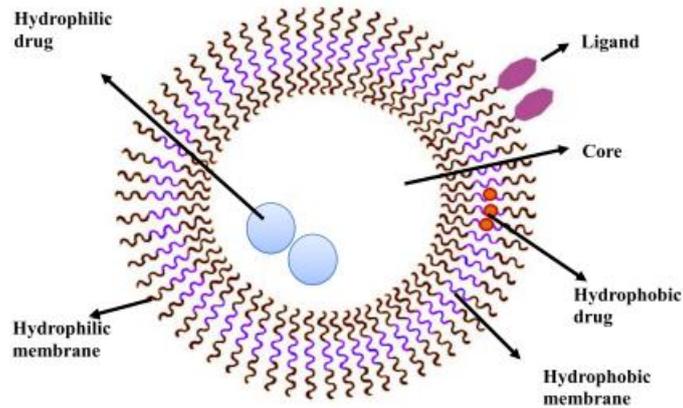


Figure N°3 : Les polymérosomes « les vésicules polymériques » (Sharma, et al. 2020).

### 1.3.4 Les nanocapsules :

Les nanocapsules peuvent être assimilées à des systèmes vésiculaires dans lequel un médicament sous forme liquide, solide ou sous forme de dispersion moléculaire est confiné dans une cavité constituée d'un liquide interne entouré d'une membrane polymérique appelée aussi la coque ou un réservoir. Ce réservoir peut être lipophile ou hydrophobe selon la méthode de préparation et les matières premières utilisées. Les nanocapsules peuvent également transporter la substance active sur leurs surfaces ou internalisée dans la membrane polymérique (Mora-Huertasa, Fessi et Elaissari 2010).

## Troisième Chapitre : Les nanoparticules polymériques

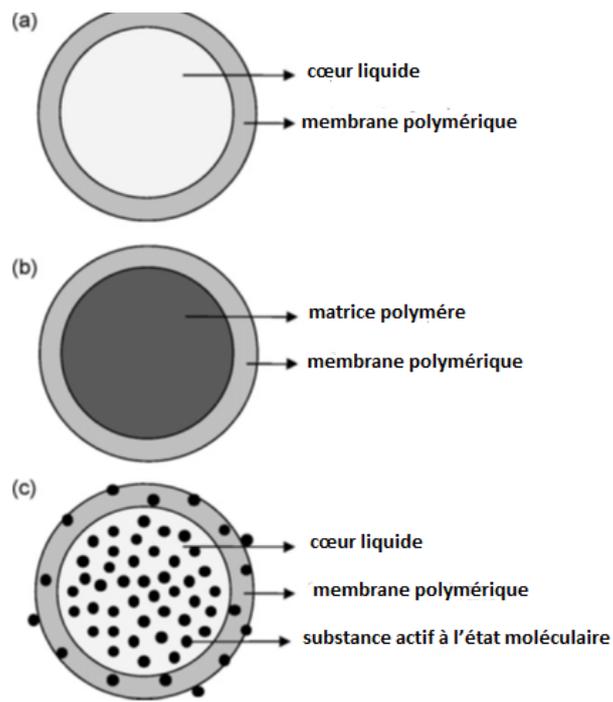


Figure N°4 : Différentes structures de nanoparticules : (a) noyau liquide, (b) matrice polymère et (c) substance active en dispersion moléculaire (Mora-Huertasa, Fessi et Elaïssari 2010).

### 1.3.5 Les nanosphères :

Les nanosphères sont des structures matricielles solides, de forme sphérique, constituées d'un réseau polymérique. Le principe actif est soit incorporé à l'intérieur du réseau polymère durant la formation des nanosphères, soit fixé à leur surface par l'intermédiaire de liaisons de type hydrophobe, électrostatique ou covalente (figure N°5) (Laroui 2018).

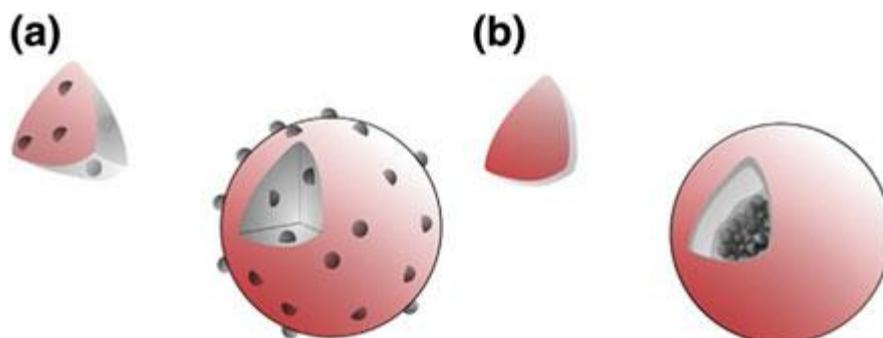


Figure N°5 : Différents types de nanoparticules polymériques : (a) nanosphère et (b) nanocapsule (El-Say et El-Sawy 2017).

## Troisième Chapitre : Les nanoparticules polymériques

### **2. Les polymères :**

Les polymères sont des produits largement utilisés dans l'industrie. Ce sont des substances de masse moléculaire élevée, constituées d'unités répétées appelés les monomères qui sont connectés dans une longue chaîne. Les molécules de polymère peuvent être linéaires ou ramifiées.

Les polymères constitués des mêmes monomères sont appelés les homopolymères ; alors que, les polymères composés de plus d'un type de monomères sont appelés les copolymères.

Le comportement des polymères est directement lié à leur structure chimique. Aussi, leurs capacités dépendent de la façon dont les monomères sont connectés les uns aux autres (Costas 2016).

### **2.1 Les principaux polymères utilisés pour la synthèse des nanoparticules polymériques :**

En considération de l'importance des molécules polymériques dans le domaine chimique et précisément le domaine de l'industrie pharmaceutique ces dernières années, on peut dire que le nombre de polymères qui peuvent être utilisés comme des nanovecteurs dans la distribution médicamenteuse est très limité, par ce qu'il doit être choisi un bon polymère pour obtenir un bon résultat.

Le polymère doit être soumis à plusieurs conditions pour être sélectionné par exemple : le polymère doit être non toxique et non immunogène ; aussi il doit être biodégradable ou avec une demie vie courte (un court temps d'élimination de l'organisme) pour éviter toute possibilité de toxicité suite à une administration répétée à cause du phénomène d'accumulation.

En général, les scientifiques ont divisé les polymères en deux catégories selon leurs origines :

#### **2.1.1 Les polymères naturels :**

Le chitosane, l'alginate de sodium, l'albumine et la gélatine sont les polymères naturels les plus utilisés pour préparer les nanoparticules polymériques (El-Say et El-Sawy 2017).

## Troisième Chapitre : Les nanoparticules polymériques

### 2.1.2 Les polymères synthétiques :

Les polymères les plus largement utilisés pour la synthèse des nanoparticules sont le poly(acide lactique) (PLA) et leurs copolymères, le poly(acide glycolique) (PGA), le poly(lactide-co-glycolide) (PLGA), et Poly( $\epsilon$ -caprolactone) (PCL).

Ces polymères sont connus à la fois pour leur biocompatibilité et leur résorbabilité par les voies naturelles. De plus, la vitesse de dégradation et, par conséquent, la vitesse de libération du médicament peut être modulée en faisant varier le rapport de PLA (hydrophobicité accrue), à PGA (hydrophilie accrue) (Hans et Lowman 2002).

### 3. Méthodes de préparation des nanoparticules polymériques :

Plusieurs méthodes de préparation des nanoparticules polymériques ont été développées. La méthode optimale doit être choisie très soigneusement selon les applications et les propriétés physico-chimiques de la molécule active.

Selon Crucho et al 2017, les méthodes de préparation des nanoparticules polymériques sont classifiées en deux groupes : ceux qui sont basés sur la polymérisation de monomères et ceux préparés à partir des polymères préformés (Crucho et Barros 2017).

Ces méthodes peuvent être aussi classées en deux catégories : Procédures à deux étapes impliquant la préparation d'un système d'émulsification suivi de la formation de nanoparticules dans la deuxième étape du processus ; et des procédures en une seule étape où l'émulsification n'est pas nécessaire pour la formation des nanoparticules.

Comme la taille et le PDI sont des paramètres qui doivent être scrupuleusement contrôlés, de nombreuses techniques ont été développées, basées sur différents principes physiques, pour mesurer la taille de particules inférieures à 1  $\mu\text{m}$ . Ces méthodes sont décrites dans le tableau suivant (Tableau 1).

## Troisième Chapitre : Les nanoparticules polymériques

Tableau N°2 : Techniques de préparation des nanoparticules polymériques (Crucho et Barros 2017).

Polymérisation des monomères	Dispersion de polymère préformé
Emulsion	Emulsion évaporation de solvant (SEE)
Miniémulsion	Emulsion diffusion de solvant (SED)
Microémulsion	Nanoprécipitation
Polymérisation interfaciale	Relargage (salting out)
Polymérisation radicalaire contrôlée/vivante	Dialyse
	La technologie des fluides supercritiques

### 3.1 Technique d'émulsification :

L'émulsion est définie essentiellement comme un mélange hétérogène d'une phase liquide dans une autre totalement ou partiellement non-miscible, grâce à l'utilisation de molécules tensioactives amphiphiles, qui réduisent la tension interfaciale entre les deux liquides afin d'atteindre la stabilité. Les émulsions peuvent être classées selon de leur compositions (huile, eau, tensioactifs) ou morphologies. Généralement, l'émulsion peut être de type huile dans eau (H/E) où la phase huileuse dispersée dans une phase aqueuse, Il s'agit d'une émulsion « directe » ; eau dans huile (E/H) où la phase aqueuse dispersée dans une phase huileuse c'est l'émulsion « inverse » ; elle peut aussi être présente comme émulsions multiples H/E/H ou E/H/E. Selon la taille des particules qui les composent, les émulsions peuvent être classées en macroémulsion, miniémulsion et nanoémulsion (Crucho et Barros 2017).

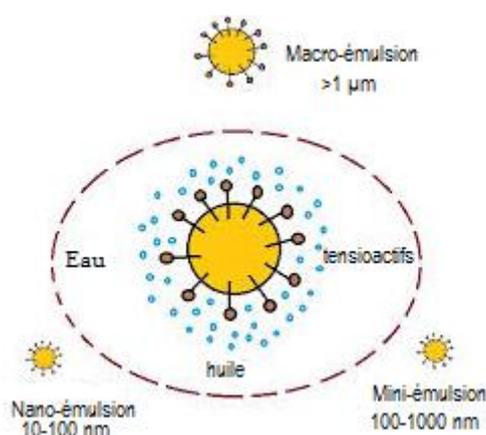


Figure N°6 : Schéma des différents types d'émulsions selon leur taille (Kale et Deore 2017).

## Troisième Chapitre : Les nanoparticules polymériques

### 3.2 Dispersion de polymère préformée :

Plusieurs techniques étaient développées pour la synthèse des nanoparticules NPs :

#### 3.2.1 Méthode d'émulsification-évaporation de solvant (SEE) :

L'évaporation de solvant était la première méthode développée pour préparer des NPsP à partir d'un polymère préformé (Crucho et Barros 2017).

Par cette méthode, le polymère est d'abord dissous dans un solvant volatil. Le chloroforme et le dichlorométhane étaient auparavant utilisés, mais maintenant l'acétate d'éthyle les a remplacés en raison de sa plus grande sécurité. La solution organique résultante est émulsifiée dans la phase aqueuse et le mélange est généralement traité à l'aide d'un tensioactif et d'une homogénéisation ou d'une ultra-sonication à grande vitesse, produisant une dispersion de nanogouttelettes. Une suspension de nanoparticules est formée par évaporation du solvant polymère, qui est autorisé à diffuser à travers la phase continue de l'émulsion. Le solvant est évaporé soit par agitation magnétique continue à température ambiante, ou sous pression réduite, ce qui est un processus lent. Une fois le solvant évaporé, les nanoparticules solidifiées peuvent être lavées et collectées par centrifugation, suivie d'une lyophilisation pour un stockage à long terme (Crucho et Barros 2017).

Dans les techniques traditionnelles, deux méthodes sont utilisées pour former des émulsions, en préparant une émulsion simple comme une émulsion huile dans eau (H/E) ou une double émulsion comme (E/H/E) (Rezigue 2020).

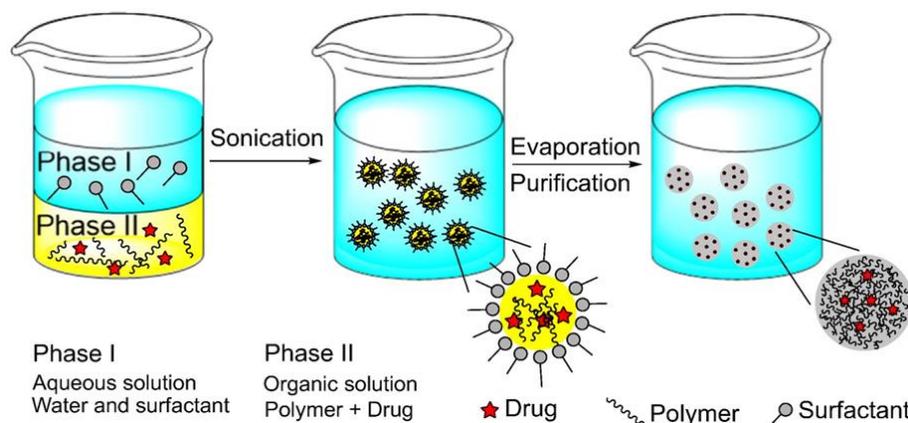


Figure N°7 : Représentation schématique de la méthode d'émulsification-évaporation de solvant (SEE) pour la production de nanosphères (Crucho et Barros 2017).

## Troisième Chapitre : Les nanoparticules polymériques

### 3.2.2 Méthode d'émulsification-diffusion de solvant (SED) :

La méthode d'émulsification-diffusion de solvant (SED) également appelée émulsification-déplacement de solvant était utilisée pour préparer des nanoparticules biodégradables de manière efficace et reproductible (Vauthier et Bouchemal 2008). Elle est la méthode la plus couramment utilisée pour la préparation de nanoparticules lipidiques solides (SLN) et de nanoparticules polymériques (Gupta et Kumar 2012). Elle consiste en la formation d'une émulsion H/E conventionnelle entre un solvant partiellement miscible à l'eau contenant le polymère et le principe actif, ainsi qu'une solution aqueuse, contenant un tensioactif.

Pour réussir le procédé, le solvant du polymère et l'eau sont mutuellement saturés à température ambiante pour assurer l'équilibre thermodynamique initial des deux liquides. La dilution ultérieure avec une grande quantité d'eau induit la diffusion du solvant des gouttelettes dispersées dans la phase externe, entraînant la formation de particules colloïdales. Un tel processus de diffusion est plus modéré que l'évaporation directe du solvant organique des nanogouttelettes. Contrairement aux méthodes basées sur l'évaporation du solvant, dans cette technique, la taille des gouttelettes diminue soudainement en une milliseconde lors de la diffusion du solvant. Généralement, des nanosphères sont produites par cette méthode, mais les nanocapsules peuvent être obtenues simplement par l'ajout d'une petite quantité d'huile, par exemple le miglyol®, dans la phase organique. Dépendamment de son point d'ébullition, le solvant peut être éliminé par évaporation ou par filtration (Crucho et Barros 2017).

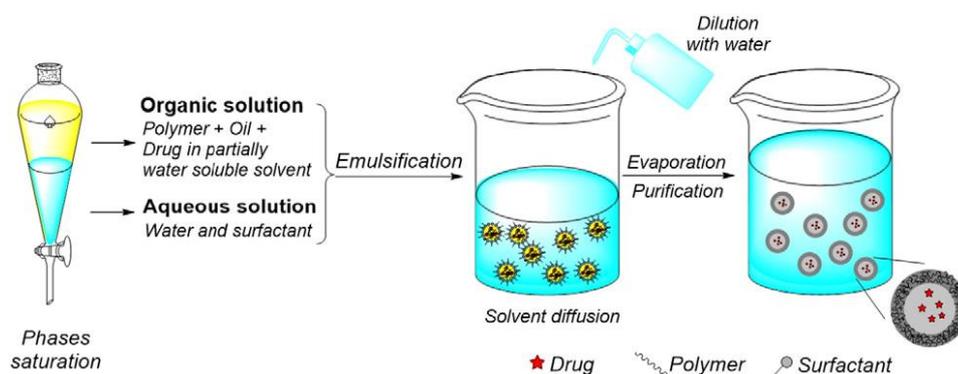


Figure N°8 : Représentation schématique de la méthode d'émulsification-diffusion de solvant pour la préparation de nanocapsules (Crucho et Barros 2017).

### 3.2.3 Méthode de nanopréciipitation :

## Troisième Chapitre : Les nanoparticules polymériques

La méthode de nanopréciipitation est également appelée méthode de déplacement du solvant ou dépôt interfacial (Mora-Huertasa, Fessi et Elaissari 2010). Cette technique consiste en un dépôt interfacial d'un polymère après déplacement d'un solvant semi-polaire (qui doit être miscible à l'eau) d'une solution hydrophobe. La diffusion rapide du solvant vers la phase non solvant provoque une diminution de la tension interfaciale entre les phases solvant et non solvant. L'abaissement de la tension interfaciale provoque une augmentation de la surface et la génération de petites gouttelettes de solvants organiques.

La méthode de nanopréciipitation comprend trois constituants, le polymère, le non-solvant du polymère et le solvant du polymère. Un solvant organique miscible à l'eau principalement de l'acétone est utilisé comme solvant du polymère et est généralement facilement éliminé par évaporation (Rezigue 2020).

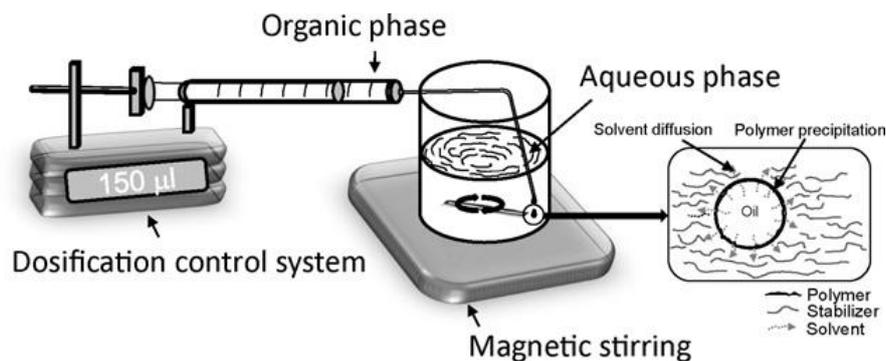


Figure N°9 : Montage utilisé pour la préparation de nanocapsules par la méthode de nanopréciipitation (Mora-Huertasa, Fessi et Elaissari 2010).

### 3.2.4 Méthode de relargage ou (Salting out en Anglais) :

La méthode de relargage est largement utilisée dans l'industrie pharmaceutique en raison de son rendement élevé, de la pureté, de la rapidité et de la simplicité de l'opération. Elle est particulièrement intéressante pour les principes actifs thermolabiles parce qu'elle ne nécessite aucun traitement thermique.

Elle est basée sur le phénomène dans lequel la solubilité d'un non-électrolyte dans l'eau est diminuée lors de l'ajout d'un électrolyte. Bien qu'elle implique une étape d'émulsification, elle évite l'utilisation de tensioactifs et de solvants chlorés. Un polymère stabilisant soluble dans

## Troisième Chapitre : Les nanoparticules polymériques

l'eau est ajouté à une solution saturée d'électrolyte (par exemple, chlorure de sodium, acétate de magnésium ou chlorure de magnésium) pour obtenir un gel visqueux. Ensuite, le polymère et le médicament sont dissous séparément dans un solvant organique. L'acétone est le plus souvent utilisée comme solvant en raison de ses propriétés solubilisantes et de sa séparation bien connue de la solution aqueuse lors du relargage avec des électrolytes. L'ajout de gel visqueux dans la phase organique sous agitation continue provoque un relargage du solvant organique, induisant la formation de nanoparticules en milieu organique-aqueux. Enfin, le solvant et l'électrolyte sont éliminés par filtration tangentielle (Gupta et Kumar 2012).

### 3.2.5 Méthode de dialyse :

Cette méthode donne des petites nanoparticules polymériques avec une distribution étroite (Rezigue 2020). Elle est gouvernée par un mécanisme ressemblant à celui de la technique de nanopréciipitation, mais avec une configuration expérimentale légèrement différente.

Généralement, le polymère est dissous dans un solvant organique, placé à l'intérieur de la membrane de dialyse et dialysé contre un non-solvant (Chebil 2019).

Le déplacement du solvant de l'intérieur de la membrane de dialyse vers le milieu extérieur rend le mélange de moins en moins capable à dissoudre le polymère (figure N°10). De plus, une augmentation de la tension interfaciale entraîne une agrégation du polymère et conduit à la formation d'une suspension colloïdale de nanoparticules (Crucho et Barros 2017).

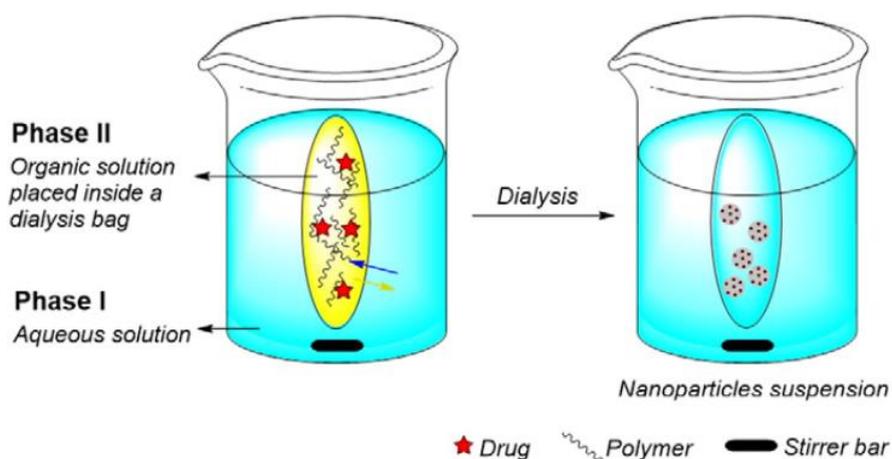


Figure N°10 : Représentation schématique du procédé de dialyse pour la préparation de nanosphères (Crucho et Barros 2017).

## Troisième Chapitre : Les nanoparticules polymériques

### **3.2.6 Méthode de fluides supercritiques (SCF) :**

L'utilisation de fluides supercritiques dans la préparation de nanoparticules polymères permet d'éviter l'usage de solvants organiques impliqués dans les autres méthodes, en raison de leur innocuité environnementale (Rezigue 2020). Le fluide supercritique peut être un liquide ou un gaz et utilisé au-dessus de son point critique thermodynamique de température et de pression. Les SCF les plus utilisés sont le dioxyde de carbone ( $\text{CO}_2$ ) et l'eau. Il y'a deux techniques de SCF : Expansion rapide des solutions supercritiques (RESS) et Précipitation anti-solvant supercritique (SAS) (Gupta et Kumar 2012).

### **3.3 Polymérisation des monomères :**

#### **3.3.1 Méthode de polymérisation en émulsion :**

Cette méthode est largement utilisée pour préparer des nanoparticules polymériques à partir de monomères. L'utilisation d'eau comme milieu de dispersion est un point très avantageux dans ce procédé pour la sécurité et l'excellent contrôle de l'évacuation de la chaleur pendant le processus de polymérisation. Cette méthode repose sur la polymérisation conventionnelle en émulsion et sans tensioactif (El-Say et El-Sawy 2017).

##### **3.3.1.1 Méthode conventionnelle :**

Les constituants utilisés principalement dans cette méthode sont le tensioactif, l'agent initiateur hydrophile, le monomère à faible solubilité aqueuse et l'eau. L'initiation commence lorsque le monomère dissous dans la phase continue, à l'aide du tensioactif employé, interagit avec un radical libre. L'isolement de phase et la formulation des nanoparticules (NPs) peuvent se produire avant ou après le processus de réaction de polymérisation. Après la fin de la réaction, les nanoparticules polymériques (NPsP) ont généralement une taille de 100 nm, avec de nombreuses chaînes polymères intégrées dans chaque nanoparticule (El-Say et El-Sawy 2017).

##### **3.3.1.2 Surfactant-free emulsion polymerization :**

Dans la polymérisation en émulsion sans tensioactif les mécanismes de nucléation sont homogènes et ou de type micellaire. La concentration de monomère utilisée et le degré d'homogénéité de nucléation influencent les caractéristiques des nanoparticules polymériques telles que la taille et la stabilité de ces nanoparticules (El-Say et El-Sawy 2017).

#### **3.3.2 Méthode de Polymérisation en mini-émulsion :**

## Troisième Chapitre : Les nanoparticules polymériques

Les constituants utilisés dans cette technique sont : le mélange de monomères, l'eau, le tensioactif, l'initiateur et le co-stabilisant. Cette méthode utilise un composant de faible poids moléculaire comme co-stabilisant et utilise un mécanisme de cisaillement élevé tel que les ultrasons (Rezigue 2020).

### **3.3.3 Méthode de micro-émulsion Polymérisation :**

Cette méthode consiste à ajouter un amorceur hydrophile à une phase aqueuse de microémulsions thermodynamiquement stabilisées formées de micelles gonflées. A partir de cette forme thermodynamiquement stable, le processus de polymérisation commence et dépend d'une grande quantité de tensioactifs possédant une tension interfaciale proche de zéro (à l'interface huile/eau). Par conséquent, la quantité élevée de tensioactif utilisée se traduit par la couverture totale des particules. Dans la phase initiale, la formation de chaînes polymères se produit uniquement dans certaines gouttelettes car cette initiation ne peut pas se produire dans toutes les micro-gouttelettes (Rezigue 2020).

### **3.3.4 Méthode de Polymérisation interfaciale :**

Cette méthode est largement utilisée pour produire des nanoparticules polymériques. Le procédé consiste à dissoudre l'un des deux monomères réactifs dans l'un des deux phases dispersée et continue, il s'en suit une polymérisation par étapes. La réaction se produit principalement à l'interface des deux phases (Rezigue 2020).

*Quatrième Chapitre*  
*La méthode de*  
*nanoprécipitation et le*  
*Métronidazole*

## Quatrième Chapitre : La méthode de nanopréciptation et le Métronidazole

### 1. La nanopréciptation :

Selon la littérature, plusieurs études comparatives entre les différentes techniques de synthèse des nanoparticules indiquent que la nanopréciptation constitue la meilleure alternative (belati, Allémann et Doelker 2005).

Dans le domaine pharmaceutique, les nanoparticules (nanosphères et nanocapsules) sont largement utilisées pour la vectorisation des principes actifs (Martínez Rivas, et al. 2017).

Durant ces dernières décennies, un nombre important de travaux de recherche portaient essentiellement sur la résolution des problèmes liés à la stabilité, à l'efficacité et à l'administration des molécules actives. Ainsi, ces particules peuvent protéger les principes actifs contre toute dégradation rapide (ou d'agents de dégradations présents dans le milieu de dispersion), contrôler leur profil de libération, augmenter leur absorption ou bien protéger l'organisme contre leurs effets secondaires tels que l'irritation gastro-intestinal (Martínez Rivas, et al. 2017).

Pour obtenir ces particules on a plusieurs méthodes, parmi elles

La technique de nanopréciptation, est reconnue comme une stratégie utile et polyvalente pour piéger des molécules actives aux niveaux submicronique et nanométrique dans des systèmes d'administration de médicaments colloïdaux, brevetée par Fessi et al (Martínez Rivas, et al. 2017). C'est une technique appréciée pour le développement de produits pharmaceutiques principalement en raison de sa simplicité d'exécution.

Les particules obtenues permettent d'optimiser les performances thérapeutiques in vivo du médicament en présentant, par exemple, des comportements de libération contrôlée, une délivrance ciblée et une meilleure stabilité dans les fluides biologiques, ce qui signifie des temps de séjour moyens importants, des demi-vies accrues et un adressage plus efficace des principes actifs vers les différents tissus de l'organisme. Par conséquent, moins de toxicité et des effets secondaires mineurs sont attendus.

#### 1.1 Les nanoparticules en pharmacie :

Une étude réalisée en 2012 sur les produits pharmaceutiques issus des nanotechnologies a identifié 67 nanodispositifs et 33 nanomédicaments mis sur le marché. Par ailleurs, 25 dispositifs et 122 médicaments en cours de développement faisaient l'objet de 789 études cliniques (Martínez Rivas, et al. 2017).

## Quatrième Chapitre : La méthode de nanopréciptation et le Métronidazole

### 1.1.1 Intérêt des nanoparticules :

De nombreuses propriétés pharmacologiques et pharmacocinétiques des principes actifs dits « libres » peuvent être améliorées en modifiant la forme galénique du médicament. Les nanoparticules ont la capacité, en fonction de leur design, de changer la pharmacocinétique du médicament (que cela soit l'administration, la distribution, la métabolisation ou l'élimination dans l'organisme), améliorer sa solubilité ou fonctionner en tant que réservoirs de principe actif (dans le cas des formes à libération prolongée).

Les problèmes pouvant être rencontrés avec un principe actif libre :

- Mauvaise solubilité qui se traduit par un risque de précipitation du principe actif. Une nanocapsule, nanoparticule micellaire ou liposome peut offrir des milieux hydrophiles et hydrophobes, ce qui augmenterait la solubilité du PA.
- Destruction des tissus et organes sains : L'extravasation des médicaments cytotoxiques peut endommager les tissus sains et résulter en leur nécrose. La libération régulée par la nanoparticule réduit ou élimine son extravasation dans les tissus sains.
- Dégradation rapide in-vivo : La molécule de principe actif est modifiée ou dégradée dans l'organisme entraînant une perte de l'activité pharmacologique. La nanoparticule protège le PA de la métabolisation. Des doses plus faibles du PA doivent être administrées.
- Clairance trop élevée : Le principe actif est éliminé trop rapidement par le foie ou les reins, nécessitant des administrations fréquentes ou des doses élevées. La mise en forme nanoparticulaire modifie la pharmacocinétique, ce qui peut ralentir la clairance.

### 1.1.2 Processus de nanopréciptation :

Les systèmes d'administration des médicaments comme les comprimés, gélules et solutions, etc. sont toujours les formes les plus administrées grâce à leurs avantages : contrôle du processus de préparation, facilité et efficacité de manipulation, etc.

En réalité, des progrès majeurs ont été faits, depuis les dernières décennies, vers la préparation de systèmes d'administration de médicaments basés sur le piégeage des principes actifs dans diverses structures. Plusieurs techniques ont également été utilisées pour l'encapsulation telle que l'évaporation de solvant d'émulsion, nanopréciptation, diffusion de solvant d'émulsion, injection d'éthanol, gélification ionique etc. Les principales formes pharmaceutiques préparées

## Quatrième Chapitre : La méthode de nanopréciipitation et le Métronidazole

via ces techniques sont les nanosphères, les nano-capsules, les microsphères, les micro-gélules et les liposomes.

Parmi ces techniques, la nano précipitation semble être la plus simple et la plus reproductible. Ce qui fait d'elle une des approches les plus couramment utilisées pour la préparation des nanoparticules (Martínez Rivas, et al. 2017).

Les avancées récentes en recherche et développement pharmaceutique ont permis de remplacer les formes galéniques conventionnelles qui étaient moins souple et moins sophistiqué par des systèmes nanoparticulaires. La biodisponibilité, la stabilité, le goût et l'odeur pourraient être parmi les limites contournées par ces derniers. En effet, selon le système de classification biopharmaceutique (BCS), 40 % des molécules médicamenteuses actuellement commercialisées sur le marché sont peu solubles alors que 90 % des molécules médicamenteuses en développement sont également classées comme peu solubles (Jordanovska 2015). De ce fait, une modification de la distribution à travers les nanoparticules peut être définie comme une stratégie idéale d'administration de médicaments (Martínez Rivas, et al. 2017).

De plus, l'encapsulation des médicaments pourrait jouer un rôle important dans la protection des principes actifs contre leur dégradation ou obtenir des systèmes à libération contrôlée ou ciblée. La distribution serait alors indépendante des propriétés physico-chimiques du principe actif et dépendante des propriétés du vecteur lui-même.

A travers l'utilisation de polymères biodégradables on peut obtenir un système de distribution biocompatible, facile à administrer, sûr, confortable et inerte. Par ailleurs, la méthode d'encapsulation adéquate doit être sélectionnée en fonction des propriétés hydrophobes ou hydrophiles du principe actif.

Pour résumer, l'encapsulation des médicaments peut être utilisée pour plusieurs raisons telles que :

- Prolongation de la libération du médicament.
- Conception de thérapie ciblée.
- Masquer les propriétés organoleptiques défavorables (goût, odeur, couleur).
- Protection des médicaments sensibles au contenu du tube digestif.
- Assurance de la stabilité des molécules médicamenteuses vis-à-vis des facteurs de dégradation externe tels que l'oxygène, la température, l'humidité.

## Quatrième Chapitre : La méthode de nanopréciipitation et le Métronidazole

- Réduire la vaporisation des matières volatiles.
- Prévention des incompatibilités médicamenteuses.
- Modération de la toxicité.
- Conception de nouvelles formes galéniques.

### 1.1.3 Profil de libération in vitro des nanoparticules polymériques :

La phase de libération in vitro du principe actif à partir de NPs préparées par nanopréciipitation se compose généralement de deux phases : une première phase de « burst release » qui est suivie d'une deuxième phase de libération prolongée.

La première phase est due à la libération de la substance médicamenteuse, qui est adsorbée sur la surface des NPs ou dispersées près de la surface. La deuxième phase est due à la libération de la substance active qui se trouve dans le noyau (Martínez Rivas, et al. 2017).

De nombreux modèles mathématiques ont également été utilisés pour expliquer le mécanisme de libération du médicament. Les modélisations mathématiques les plus utilisées sont le modèle de Higuchi et le modèle de Korsmeyer-Peppas (Martínez Rivas, et al. 2017).

Le modèle de Higuchi exprime pourcentage cumulé de médicament libéré par rapport à la racine carré du temps et il est représenté par l'équation suivante :

$$Q = k\sqrt{t}$$

Où Q est la quantité cumulée absolue de la substance active libérée à temps t et k est la constante reflétant les variables de conception du système.

Le modèle de Higuchi décrit la libération comme un processus de diffusion basé sur la loi de Fick. Par conséquent, lorsque la cinétique de libération correspond à ce modèle, la libération active des particules serait principalement contrôlée par diffusion à travers la matrice polymérique (Puga, et al. 2012).

D'autre part, le modèle de Korsmeyer-Peppas est présenté par l'équation suivante :

$$Q = kt^n$$

Où Q est la quantité cumulée de la substance active libérée aux temps t et n est l'exposant de la libération qui indique le mécanisme de libération du médicament.

## Quatrième Chapitre : La méthode de nanopréciipitation et le Métronidazole

Dans le modèle de Korsmeyer-Peppas, une valeur de  $n = 0,43$  indique que la libération est contrôlée par la diffusion fickienne. Par ailleurs, des valeurs de  $n$  comprises entre  $0,43$  et  $0,85$  impliquent une diffusion non fickienne.

Cependant, si  $n = 0,85$ , cela indique que la libération du médicament n'est régie que par la relaxation de contrainte (Puga, et al. 2012).

C'est l'exemple de la figure n°13 qui démontre un profil de libération in vitro d'une substance encapsulée par la technique de nanopréciipitation.

La figure N°13 montre un profil de libération de médicament in vitro d'un médicament encapsulé par la technique de nanopréciipitation.

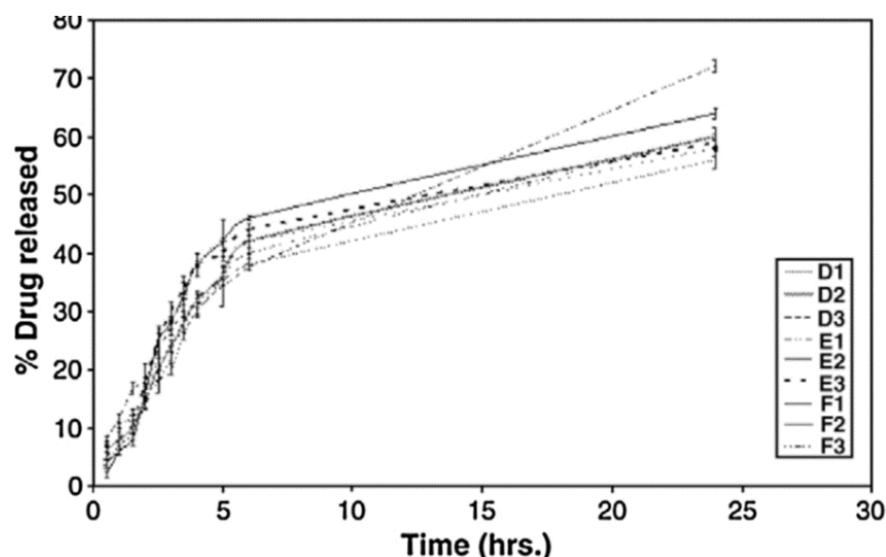


Figure N°11 : Profil de libération in vitro de différentes formulations de nanoparticules à travers une membrane artificielle (Martínez Rivas, et al. 2017).

### 1.2 Propriétés des NPs , détermination et influence sur leur performance in vivo :

#### 1.2.1 Taille, Distribution de taille et Indice de Polydispersité :

La taille des nanoparticules joue un rôle clé dans leur absorption par les tissus et les cellules. Leur taille nanométrique leur permet de s'extravaser à travers l'endothélium dans des sites inflammatoires inaccessibles et tumoraux. La taille assure une accumulation sélective de la substance médicamenteuse dans des sites cibles (García 2017).

## Quatrième Chapitre : La méthode de nanopréciipitation et le Métronidazole

De façon générale, il a été montré que des particules entre 60-200 nm peuvent être internalisées par endocytose, alors que les particules plus grandes (>200 nm) seront éliminées par phagocytoses. Tandis que les plus petites particules (<20 – 30 nm) seront éliminées par filtration rénale (García 2017).

La libération de molécules actives est également affectée par la taille des particules : quand les nanoparticules sont petites, la substance active se trouve plus proche de la surface, donc il est libéré plus rapidement. Par contre, les particules plus grandes peuvent encapsuler plus d'actif médicamenteux et le libérer lentement. Par conséquent, contrôler la taille c'est moduler la vitesse de libération de la molécule active (García 2017).

D'autre part, l'Indice de Polydispersité (PDI) est une mesure de l'hétérogénéité des tailles des particules dans le même lot ou le même échantillon. Dans un procédé de fabrication idéal, toutes les nanoparticules se formeraient au même instant, ce qui assurerait que toutes les particules aient la même taille et la polydispersité serait alors très faible. Néanmoins, dans la plupart des procédés de fabrication, le mélange des phases qui donne lieu à la formation des NPs est un processus relativement lent et non homogène, de sorte que la formation de particules commence à des moments différents d'un point à l'autre dans la même solution, en conséquence, des NPs de différentes tailles se forment, augmentant la polydispersité de l'échantillon finale (García 2017).

Dans une population hétérogène, la variabilité de la taille se traduit par une variabilité des résultats. Par exemple, au moment d'évaluer l'absorption, les particules plus grandes peuvent sédimenter plus rapidement et se déposent sur les cellules, ce qui peut faciliter l'absorption, en générant des résultats biaisés. De plus, une haute polydispersité provoque des instabilités dans l'échantillon en favorisant l'agrégation et la coalescence des particules (Mûrissement d'Ostwald) (García 2017).

### **1.2.2 Potentiel zêta :**

Le Potentiel Zêta est un terme qui désigne le potentiel électrocinétique des systèmes colloïdaux. Ce terme exprime la différence de potentiel entre le milieu de dispersion et la couche stationnaire de fluide qui se déplace avec la particule (figure N°13). Bien que le potentiel zêta ne soit pas égal au potentiel de surface d'une particule, il est souvent le seul chemin disponible pour caractériser les propriétés électriques d'une particule. Cette propriété est fortement

## Quatrième Chapitre : La méthode de nanopréciipitation et le Métronidazole

influencée par la composition chimique de surface de la particule et le milieu dans lequel elle est dispersée (García 2017).

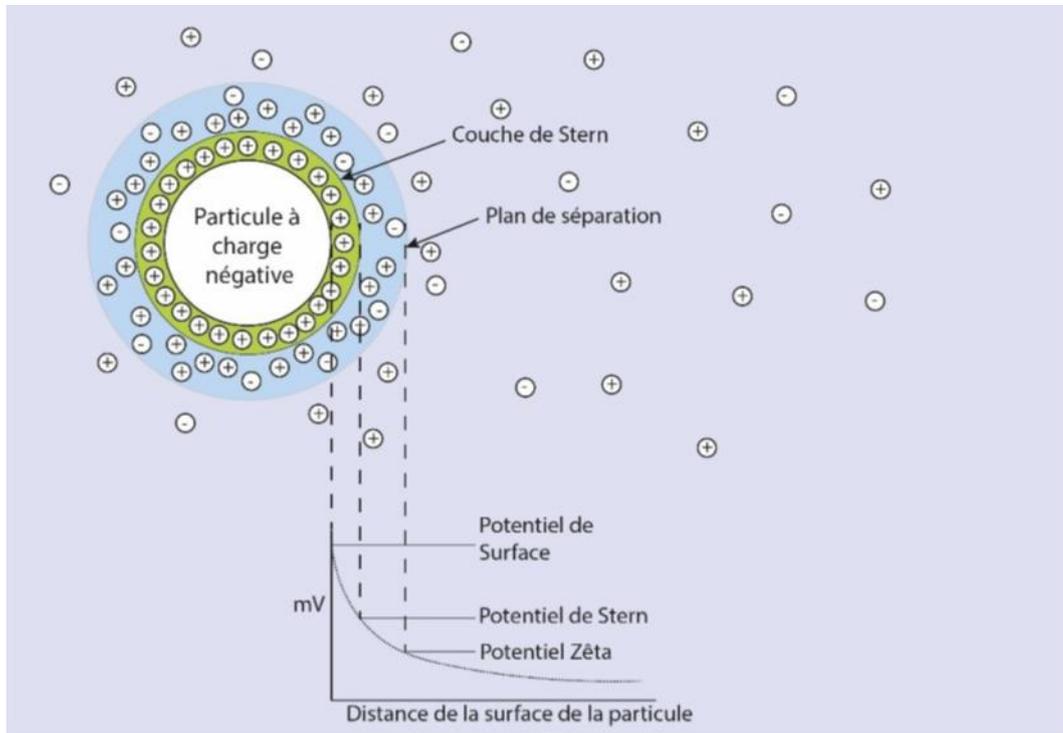


Figure N°12 : Potentiel zêta et double couche électrocinétique (García 2017).

Le Potentiel Zêta peut affecter différentes propriétés des particules : leur stabilité, leur pharmacocinétique ainsi que leur phagocytose et élimination. Les nanoparticules avec un Potentiel Zêta supérieur à  $\pm 30$  mV sont plus stables en suspension, car la répulsion électrostatique empêche l'agrégation des particules. La valeur du potentiel zêta affecte la fixation des NPs à la surface des cellules. En effet, comme les membranes cellulaires sont négativement chargées, les nanoparticules avec une charge superficielle positive peuvent fortement adhérer à la membrane cellulaire et avoir une absorption cellulaire plus élevée (García 2017).

D'autre part, le Potentiel zêta peut affecter aussi l'absorption des NPs par les macrophages, qui se traduit par leur élimination. Il est admis que les NPs chargées négativement sont éliminées plus lentement par rapport aux particules neutres ou positivement chargées. Par exemple, les travaux de recherche de *Xiao et al* sur l'effet de la charge des NPs sur leur bio distribution *in vivo*, a démontré que leur charge négative peut réduire leur élimination par le système réticulo-

## Quatrième Chapitre : La méthode de nanopréciipitation et le Métronidazole

endothélial. Et par voie de conséquence augmenter le temps de résidence vasculaire (García 2017). En revanche, d'autres études indiquent que l'élimination des NPs n'est pas charge dépendante et que le taux d'élimination dépend de la composition intégrale de la surface, notamment des protéines qui s'y absorbent (García 2017).

Pour la détermination du Potentiel Zêta, la méthode la plus utilisée est la mesure de la mobilité électro-phorétique des NPs qui est basée sur la diffusion dynamique de la lumière. Avec cette méthode, la détermination est simple et rapide, néanmoins le résultat est facilement affecté par des conditions externes, comme la viscosité, le pH ou la composition ionique du milieu dans lequel les particules sont dispersées (García 2017).

### 1.2.3 Composition de la surface :

L'opsonisation est le phénomène biologique par lequel une protéine (opsonine) recouvre la surface d'un corps étranger (cellule, bactérie, agent pathogène, nanoparticules). L'opsonisation favorise la phagocytose par les macrophages du système réticuloendothélial. Ce mécanisme de protection est la principale raison pour laquelle les NPs ne parviennent pas au tissu ciblé et sont rapidement éliminées.

Plusieurs méthodes ont été développées pour retarder la reconnaissance par les macrophages et augmenter le temps de résidence dans la circulation sanguine. Beaucoup de ces systèmes utilisent des traitements de surface qui interfèrent avec la liaison des protéines opsonines à la surface de la particule. Le greffage du poly (éthylène glycol) (PEG) semble être la plus efficace en démontrant la sécurité et stabilité (García 2017).

La PEGylation (décoration d'une surface de particule par le greffage covalent, le piégeage ou l'absorption physique de chaînes de PEG) est le procédé privilégié pour conférer des propriétés furtives ou stabilisantes (par effet stérique) aux nanoparticules. Dans le cas des nanoparticules polymériques, les polymères utilisés peuvent être modifiés de façon covalente par des chaînes de PEG dès leur synthèse. Le but de ces chaînes de PEG est de créer une barrière protectrice contre les opsonines (García 2017).

Les chaînes de PEG à la surface d'une NP adoptent une certaine conformation selon leur poids moléculaire et leur espacement, par exemple s'il y a peu de chaînes de PEG sur la surface (faible densité), elles adopteront une conformation dite « champignon » donc une grande partie de la surface sera découverte, facilitant l'adhésion des protéines opsonines à la surface de la particule.

## Quatrième Chapitre : La méthode de nanopréciipitation et le Métronidazole

D'autre part, quand la densité des chaînes de PEG est plus élevée, les chaînes sont forcées à adopter une conformation plus condensée (« brosse » ou « brosse dense ») et de plus haute énergie, créant une force de répulsion contre les opsonines. En plus, comme la surface est complètement couverte par le PEG, il n'y a pas de place pour que les protéines puissent se lier à la partie hydrophobe de la surface des nanoparticules (García 2017).

### **1.2.4 Efficacité d'encapsulation et taux d'encapsulation :**

L'efficacité et le taux d'encapsulation ne sont pas des propriétés des NPs en tant que telles, néanmoins ces paramètres sont essentiels dans le développement pharmaceutique d'une nouvelle nanoformulation. Une nanoformulation optimisée possède une capacité de chargement élevée pour réduire la quantité d'excipient administrée. D'autre part, ce paramètre influe sur la pharmacocinétique et la toxicité du médicament.

L'encapsulation des molécules actives dans les NPs peut s'obtenir de deux manières : soit en incorporant l'actif au moment de la formation des particules, soit en incubant les NPs, déjà fabriquées, dans une solution du principe actif. La méthode la plus efficace est l'incorporation, car elle permet d'encapsuler des quantités plus grandes d'actif médicamenteux, de plus de cette façon la molécule active peut être encapsulée à l'intérieur de la NP et pas seulement à la surface ou proche de la surface de la NP (García 2017).

Les matériaux utilisés pour la fabrication des nanoparticules ont aussi un effet sur l'encapsulation des molécules actives. Par exemple, les polymères diblocs utilisés pour la préparation des NPs, forment des structures sphériques dont l'intérieur est hydrophobe, ce qui ne favorise pas l'encapsulation des molécules hydrophiles (García 2017).

Yoo et al. ont développé une nouvelle méthode d'encapsulation. La molécule d'intérêt est chimiquement conjuguée avec le polymère utilisé pour préparer les NPs. L'efficacité d'encapsulation de la molécule conjuguée a été de 96,6 %, tandis que pour la molécule non conjuguée elle a été de 6,7 %. Cette approche, bien que nécessitant plus d'étapes, pourrait être une option intéressante pour l'encapsulation des molécules hydrophiles (García 2017).

### **1.2.5 Les NPs pH-sensibles :**

Par définition, les polymères pH-sensibles présentent un changement de leur état d'ionisation suite à une variation du pH de la solution dans laquelle ils sont dispersés. Ce changement est permis par la protonation ou la déprotonation d'acides ou de bases faibles présents sur les

## Quatrième Chapitre : La méthode de nanoprecipitation et le Métronidazole

chaînes polymères. Il se traduit par une solubilisation, une précipitation, un gonflement ou une contraction du polymère. Préparés sous la forme de nanoparticules, les polymères pH-sensibles peuvent être utilisés pour des applications en pharmacie. La plupart des polymères pH-sensibles comportent des fonctions acides carboxylique (comme l'acide polyacrylique, l'acide polyméthacrylique ou l'acide polyglutamique) qui acquièrent des charges négatives en milieu basique, ou des fonctions amine (comme le chitosane, la polyaspartamide ou la polyhistidine) qui acquièrent des charges positives en milieu acide. Dans les deux cas, les répulsions électrostatiques entre fonctions ionisées provoquent une augmentation du diamètre des nanoparticules qui favorise la libération du principe actif. Les polymères pH-sensibles peuvent aussi contenir des agents réticulants qui se décomposent à certains pH (pH labiles) (Querette 2019).

### **1.2.6 Les NPs thermosensibles :**

Par définition, les polymères thermosensibles affichent un changement brutal de leurs propriétés physico-chimiques consécutif à une variation de la température. Lorsqu'ils sont préparés sous forme de nanoparticules, les polymères thermosensibles peuvent constituer des systèmes de libération contrôlée de principes actifs médicamenteux dans le corps humain. A une certaine température, les polymères thermosensibles présentent une transition de phase volumique. Dans l'eau, les nanoparticules peuvent se rétracter, gonfler, se solubiliser ou précipiter. Ces changements d'états résultent de l'équilibre entre d'une part les interactions hydrogène intra- et inter-macromoléculaires et d'autre part les interactions hydrogène entre le polymère et l'eau de la phase dispersante. Dans le cas où un principe actif est encapsulé par les nanoparticules, la rupture des liaisons hydrogène intermoléculaires au sein du polymère, causée par le chauffage du système, permet la libération du principe actif (Querette 2019).

### **1.2.7 Autres stimuli :**

Le pH et la température sont deux variables endogènes (c'est-à-dire dont les variations peuvent être provoquées par le corps humain). Un autre stimulus endogène utilisé pour la préparation de nanoparticules sensibles est le potentiel d'oxydoréduction. Des nanoparticules sensibles à des stimuli exogènes (c'est-à-dire provoquées sur le corps humain par un opérateur extérieur) sont aussi développées. Parmi ces stimulations, on peut citer les photons, les ultrasons et les ondes magnétiques ou électriques (Querette 2019).

### **2. Les facteurs influençant la formation des nanoparticules :**

#### **2.1 Les matériaux :**

Les matériaux utilisés pour la fabrication des nanoparticules ont aussi un effet sur l'encapsulation des molécules actives. Par exemple, les polymères di blocs utilisés pour la préparation des NPs, forment des structures sphériques dont l'intérieur est hydrophobe, ce qui ne favorise pas l'encapsulation des molécules hydrophiles. Yoo et al ont développé une nouvelle approche pour encapsuler ces derniers. Dans cette méthode, la molécule d'intérêt est chimiquement conjuguée avec le polymère utilisé pour préparer les NPs. L'efficacité d'encapsulation de la molécule conjuguée a été de 96,6 %, tandis que pour la molécule non conjuguée, elle était de 6,7 %. Cette approche, bien que nécessitant plus d'étapes, pourrait être une option viable pour l'encapsulation des molécules hydrophiles.

Par ailleurs, de nombreux facteurs affectent le procédé de fabrication telle que le choix et la qualité des matériaux, ainsi que le temps total de production et la taille finale du lot. ces facteurs peuvent avoir un impact sur les propriétés du produit final et sur sa performance in vivo.

Pour toutes ces raisons et pour tirer la meilleure partie des nanoformulations, il est nécessaire d'étudier tous les paramètres de la méthode de préparation qui peuvent influencer les propriétés physico-chimiques des nanoparticules.

#### **2.2 Méthode de fabrication :**

Bien qu'il existe de nombreux avantages à l'utilisation des NPs pour la livraison ciblée des molécules actives, il existe seulement peu de formulations à base de nanoparticules, disponibles actuellement sur le marché. Ce nombre limité est dû à la difficulté de production de nanoparticules, car les méthodes utilisées pour leur préparation sont encore en développement. De plus, de nombreux procédés utilisent des solvants organiques dont l'élimination est nécessaire du fait de leur toxicité. Ce qui pose la question de la sélection de la méthode de fabrication la plus appropriée. Actuellement, il existe plusieurs méthodes pour la préparation de NPs, classées en procédés à deux étapes ou à une étape (García 2017).

##### **2.2.1 La méthode à deux étapes :**

## Quatrième Chapitre : La méthode de nanopréciipitation et le Métronidazole

Typiquement, les méthodes à deux étapes impliquent la préparation d'une émulsion pour générer des nanogouttelettes contenant des composants organiques (lipides ou polymères) avec la molécule active dissoute dans une phase organique insoluble dans l'eau. Les nanoparticules sont formées dans la deuxième étape, alors que le solvant organique est éliminé.

En général, les méthodes à deux étapes prennent beaucoup plus de temps pour la fabrication. De plus, elles ont besoin d'un apport énergétique externe comme les méthodes d'émulsification à haute énergie. D'autre part, elles utilisent des solvants organiques hautement toxiques, comme le dichlorométhane, qui doivent être complètement éliminés, ce qui est un procédé difficile. Elles utilisent aussi des surfactants dont il faut contrôler la présence, l'élimination, le dosage et l'éventuelle toxicité. En conséquence, les méthodes à deux étapes ne sont pas très utilisées pour la fabrication de NPs au niveau industriel (García 2017).

### **2.2.2 Méthode à une seule étape :**

Dans ce type de méthodes, il n'est pas nécessaire de former une émulsion avant la formation des nanoparticules, car celles-ci sont formées par la précipitation directe des composants organiques (polymères ou lipides) lors du déplacement du solvant dans lequel ils sont initialement dissous.

Parmi les méthodes à une étape nous trouvons la nanopréciipitation, la dialyse et la désolvation (García 2017).

Dans la nanopréciipitation, la formation des nanoparticules se produit au moment du mélange de la solution organique (polymère dissous dans un solvant organique semi-polaire, soluble dans l'eau) avec la solution aqueuse (eau pure ou des solutions aqueuses à base d'agents stabilisants ou tensioactifs). Lorsque le solvant semi-polaire se mélange avec l'eau, le polymère insoluble dans l'eau précipite en formant les NPs (García 2017).

La dialyse utilise des membranes semi-perméables qui agissent comme une barrière physique qui sépare la phase organique de la phase aqueuse. La dialyse est effectuée contre la solution aqueuse, de sorte que le solvant semi-polaire diffuse vers l'eau à travers des pores de la membrane, en favorisant la précipitation et l'agrégation du polymère pour aboutir à la formation de particules (García 2017).

La troisième méthode de préparation à une étape est basée sur la perte de solubilité du polymère. Elle consiste à ajouter lentement un facteur de désolvation comme des sels, des alcools ou des

## Quatrième Chapitre : La méthode de nanoprécipitation et le Métronidazole

solvants dans la solution du polymère pour provoquer la précipitation. Cette méthode est fréquemment utilisée pour générer des NPs ou à base de protéines telles que l'albumine humaine ou bovine, la gliadine ou la gélatine (García 2017).

### **2.3 Facteurs influençant la mise au point des nanoparticules par le procédé de nanoprécipitation :**

#### **2.3.1 La solubilité :**

La Nanoprécipitation s'effectue en mélangeant une phase organique et une phase aqueuse. Dans la phase organique, le polymère est dissous dans un solvant organique comme l'acétone, l'acétonitrile, le diméthylsulfoxyde (DMSO) ou le tétrahydrofurane (THF). Le solvant choisi doit avoir une haute solubilité dans l'eau, être facilement éliminé et avoir une faible toxicité. La seconde phase se compose d'une phase dans laquelle le polymère n'est pas soluble, par exemple de l'eau, ou des solutions aqueuses de tensioactifs comme le polyvinyl alcool (PVA), Tween 20 ou certains Poloxamers (García 2017).

#### **2.3.2 La vitesse d'injection :**

La vitesse d'injection, dans des conditions appropriées, peut accélérer le mélange des composants (García 2017).

Le rapport volumique entre la phase organique et la phase aqueuse ainsi que la température à laquelle le procédé a lieu, ne modifient pas de manière significative la vitesse de mélange, donc ces facteurs-là ont peu d'influence sur la taille finale des NPs (García 2017).

Récemment, il a été développé un procédé de Nanoprécipitation plus dynamique dans lequel la phase organique et la phase aqueuse sont injectées dans une chambre de mélange où les NPs se forment et sortent en continu jusqu'à la fin du processus de fabrication. Ce procédé est connu comme la Nanoprécipitation en flux continu (Continuous Flow Nanoprecipitation). En fonction de la géométrie et des caractéristiques de la chambre de mélange, la CFN est dite Nanoprécipitation Flash et/ou Nanoprécipitation Microfluidique (García 2017).

#### **2.3.3 L'influence du taux d'injection de la phase organique :**

Pour évaluer le taux d'injection de la phase organique, 4 échantillons avec débit d'injection de la phase organique de 1 ml/h, 5 ml/h, 9 ml/h et 13 ml/h ont été préparés. La taille de toutes les

## Quatrième Chapitre : La méthode de nanopréciipitation et le Métronidazole

particules obtenues a été mesurée afin de connaître l'effet de ce paramètre. Il a été constaté qu'avec l'augmentation du débit d'injection de la phase organique de 1 ml/h à 9 ml/h, la taille des particules a été respectivement diminuée de 195 nm à 189 nm (Waisudin , et al. 2016).

Le potentiel zêta des particules obtenues avec un taux d'injection de phase organique de 1 ml/h, 5 ml/h, 9 ml/h, 13 ml/h a été déterminé. Le potentiel zêta des particules préparées a été modifié de -8,03 à 1 ml/h de débit à -7,77 avec 13 ml/h de débit. Ça pourrait conclure que la variation du taux d'injection de la phase organique ne peut modifier de manière significative le potentiel zêta des particules ( $p < 0,05$ ) (Waisudin , et al. 2016).

### **2.3.4 L'effet de volume de la phase aqueuse :**

Pour évaluer l'impact du volume de la phase aqueuse sur la taille des particules, quatre préparations avec différents volumes de 25 ml, 50 ml, 75 ml et 100 ml d'eau ont été fournies. Dans cette étude, il a été constaté que la taille des particules diminuait significativement de 345 nm à 181 nm ( $p < 0,05$ ). Il se produit une diffusion et la nucléation rapides du solvant miscible à l'eau (Waisudin , et al. 2016).

Pour évaluer l'effet du volume de la phase aqueuse sur le zêta potentiel, il a été constaté pour les quatre préparations qu'avec l'augmentation de la phase aqueuse 25 ml à 100 ml de particules, le potentiel zêta diminuait de manière non significative de -5,46 mV à -7,05 mV ( $p < 0,05$ ) (Waisudin , et al. 2016).

### **2.3.5 L'effet de la vitesse d'agitation :**

Pour étudier l'influence de la vitesse d'agitation sur la taille des particules obtenues, des échantillons sous différentes vitesses d'agitation (75rpm, 150rpm, 300 tr/min et 600 tr/min) ont été réalisés. À 75 trs/min, la taille moyenne des particules était de 211 nm tandis qu'à une vitesse d'agitation de 600 tr/min, elle a été significativement réduite à 172 nm ( $p < 0,05$ ) (Waisudin , et al. 2016).

Néanmoins, la taille des particules pourrait augmenter avec l'augmentation de la vitesse d'agitation au-dessus de laquelle la taille moyenne ne pourra plus varier.

De plus, le potentiel zêta des particules préparées a augmenté de manière non significative avec des vitesses d'agitation plus élevées ( $p < 0,05$ ) (Waisudin , et al. 2016).

### **2.3.6 Méthode d'addition de la phase organique :**

## Quatrième Chapitre : La méthode de nanopréciipitation et le Métronidazole

L'addition de la phase organique goutte-à-goutte est la méthode la plus utilisée. L'injection de la phase organique directement dans la phase aqueuse permet cependant l'obtention de nanoparticules de taille plus faible. Les auteurs supposent que lorsque l'aiguille est immergée dans la phase aqueuse, la goutte de phase organique subit une contrainte de cisaillement causée par l'agitation magnétique (Waisudin , et al. 2016). Le cisaillement de la goutte favorise la diffusion rapide du solvant.

L'addition de la phase aqueuse dans la phase organique permet d'obtenir des nanoparticules de polyméthacrylate de méthyle (PMMA) de même taille que lorsque l'on ajoute la phase organique dans la phase aqueuse, à condition que cet ajout soit effectué au goutte-à-goutte (Waisudin , et al. 2016).

Par ailleurs, plusieurs auteurs ont réalisé des essais de nanopréciipitation, les phases organiques et aqueuses sont agitées dans deux réservoirs distincts puis pompées afin d'être mises en contact dans une intersection en T. En sortie, le mélange est versé dans un troisième réservoir. Ce procédé présente l'avantage d'être exploitable à l'échelle industrielle. La nanopréciipitation dans un mélangeur en T permet d'obtenir des nanoparticules de taille plus faible que la nanopréciipitation classique car le temps de mélange des deux phases (qui conditionne la croissance des particules) est mieux contrôlé. Cependant, la polydispersité en taille des nanosuspensions générées est plus élevée car les deux phases sont soumises à d'importantes turbulences au cours du mélange (Waisudin , et al. 2016).

### **2.3.7 Alcool polyvinylique (PVA) :**

L'effet d'une concentration de PVA comprise entre 2,5 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml et 20 mg/ml a été étudié tandis que la concentration des autres ingrédients de formulation était stable dans toutes les expériences. La taille des particules préparées a été évaluée, il a été constaté que l'augmentation de la quantité de PVA dans la formulation augmentait significativement la taille des particules de 169 nm à 283 nm ( $p < 0,05$ ) (Waisudin , et al. 2016).

Pour souligner l'effet de concentration en PVA sur le potentiel zêta des particules, différentes quantités de PVA ont été utilisé pour la préparation de NPs à base de PCL.

Selon les résultats trouvés, l'augmentation progressive de la concentration de PVA de 2,5 mg/ml à 20,0 mg/ml préparé, diminuerait le potentiel zêta de manière non significative de 7,38 mV à 4,45 mV ( $p < 0,05$ ). Ce changement est lié à l'adsorption du PVA sur la surface des

## Quatrième Chapitre : La méthode de nanopréciipitation et le Métronidazole

nanoparticules à base de PCL qui réduisent les nombres de charges négatives (Waisudin , et al. 2016).

### **2.3.8 Tween® 80 :**

Afin d'avoir une dispersion stable des particules, deux stabilisants qui incluent le PVA et le Tween® 80 ont été utilisés. En fait, l'influence de la concentration des stabilisants utilisés sur la taille des particules a été examinée pour chacun séparément. Pour l'étude de ce paramètre, quatre échantillons avec différentes concentrations de Tween®80 (2,65 mg/ml, 5,3 mg/ml, 10,6 mg/ml et 21,2 mg/ml) ont été préparés. Il a été trouvé que lorsque les concentrations de Tween®80 augmentaient de 2,65 mg/ml jusqu'à 10,6 mg/ml, la taille des particules diminuait progressivement de 224 nm à 185 nm (Waisudin , et al. 2016). La taille des particules préparées pourrait diminuer en raison de l'augmentation de la viscosité de la phase aqueuse par le Tween®80 mais également en raison de la stabilisation rapide des particules lors de l'étape de nucléation. Il convient de garder à l'esprit que cette diminution de la taille des particules allait jusqu'à la concentration de 10,6 mg/ml de Tween®80. Au contraire, si les concentrations de Tween®80 franchissaient cette limite, la taille des particules pourrait inversement augmenter. Ainsi, les résultats obtenus nous permettent de déclarer que des concentrations élevées de Tween®80 améliorant la taille des particules diminuent jusqu'à certaines limites tandis que des concentrations de Tween®80 supérieures à cette limite auraient l'effet inverse sur la taille des particules (Waisudin , et al. 2016).

Pour déterminer la relation entre la concentration de Tween®80 et le potentiel zêta, la même procédure que pour l'étude de la taille des particules a été suivie. Une augmentation des quantités de Tween®80 a conduit à des changements de potentiel zêta insignifiants de 7,95 mV à 6,73 mV ( $p < 0,05$ ) (Waisudin , et al. 2016).

### **2.3.9 Alginate de sodium :**

L'alginate de sodium possède différentes propriétés et peut être classé dans différentes catégorie d'excipients. Il peut servir comme : Agent stabilisant, agent de suspension, agent de viscosité, liant pour comprimés et agent de désintégration pour comprimés et capsules. De ces propriétés, il découle des applications dans la formulation galénique des produits. L'alginate de sodium est notamment utilisé dans la formulation des médicaments destinés à la voie orale ou les topiques. Trois propriétés caractérisent cet excipient : son acidité avec un  $pH=7.2$ , sa solubilité : il est pratiquement insoluble dans l'éthanol, l'éther, le chloroforme, les solvants

## Quatrième Chapitre : La méthode de nanopréciipitation et le Métronidazole

organiques et les solutions acides aqueuses dont le pH est inférieur à 3. En présence d'eau, il forme une solution colloïdale. Sa viscosité varie en fonction de la concentration, de la température, et la présence d'ions métalliques.

L'alginat de sodium doit être conservé dans un endroit fermé hermétiquement, sec et frais car ce produit est hygroscopique. De plus, il ne doit pas être conservé dans un contenant en métal. Cette substance doit être conservée dans un endroit frais car elle perd de sa viscosité en présence de chaleur. Une contamination microbienne peut entraîner une dépolymérisation de l'alginat de sodium conduisant à une diminution de la viscosité. Il est donc nécessaire de conserver ce produit en présence d'un antimicrobien ou de le stériliser (haug et Larsson 1962).

### **2.3.10 Poloxamer188 :**

Dans cette étude a été réalisée par Belletti, et al en 2016, le cholestérol (Chol) a été formulé dans des nanoparticules solides (NPs) stabilisées par l'action d'un tensioactif et sans l'aide d'aucun autre composant de formulation. Les paramètres tels que le type (Solutol HS 15, sel de sodium de l'acide cholique, alcool polyvinylique et Pluronic-F68), une concentration de (0,2 ; 0,5 et 1 % p/v) de tensioactif et la température de travail (ambiante et 45°C), ont été optimisés et tous les échantillons caractérisés en termes de taille, de potentiel zêta, de composition, de comportement thermique et de structure. Les résultats ont démontré que seul le Pluronic-F68 (0,5 % p/v) favorise l'organisation des chaînes Chol en NPs structurées de diamètre moyen inférieur à 400 nm. De plus, nous avons démontré le rôle central de la température de travail sur l'état d'agrégation/l'architecture/la stabilité des tensioactifs des nanoparticules à base de Chol (Belletti, et al. 2016).

A température ambiante, le Pluronic-F68 existe en solution sous forme de bobines individuelles. Dans cette condition, la nanopréciipitation de Chol a formé les NPs les moins stables avec 14,3 % (p/p) de Pluronic-F68 principalement en surface (NP-Chol/0,5). Au contraire, travaillant près de la température micellaire critique (CMT) du tensioactif (45°C), le Chol précipite avec Pluronic-F68 (9,5 % w/w) dans une structure matricielle compacte et stable (NP-Chol/0,5-45) (Belletti, et al. 2016).

Effet de la température :

Le Pluronic-F68 peut s'assembler en micelles en solution aqueuse lorsque la température augmente jusqu'à la température critique des micelles (TCM). Pour le Pluronic-F68, dans une

## Quatrième Chapitre : La méthode de nanopréciipitation et le Métronidazole

plage de concentrations allant jusqu'à 1 %, le TCM est proximalement 45-50°C. Ensuite, nous avons augmenté la température de travail jusqu'à 45°C pour induire le Pluronic-F68 à s'organiser en micelles et à modifier la réorganisation du tensioactif lors de la nanopréciipitation Chol (Belletti, et al. 2016).

### 3. Le métronidazole :

Le Métronidazole de son nom chimique [1-(2-hydroxyéthyl)-2-méthyl5-nitroimidazole], est un antibiotique synthétique dérivé de l'azomycine, un nitroimidazole produit par les genres Actinobacteria et Proteobacteria (Freeman, Klutman et Lamp 1997 ).

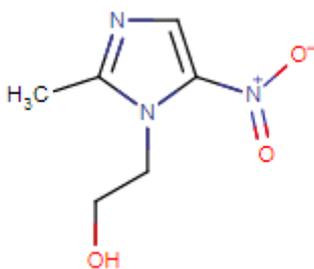


Figure N° 13 : Structure du métronidazole (Drugbank 2022).

#### 3.1 Indication du métronidazole :

Le MTZ est indiqué pour le traitement de la trichomonase confirmée causée par *Trichomonas vaginalis* et les partenaires sexuels du patient, la vaginose bactérienne, certains types d'amibiase et diverses infections anaérobies. Les infections anaérobies peuvent se produire sur la peau et les structures cutanées, l'abdomen, le cœur, les organes reproducteurs, le système nerveux central et le système respiratoire. Certains peuvent également être présents dans la circulation sanguine en cas de septicémie. Les infections courantes traitées par le MTZ sont les infections à Bacteroides, les infections à Clostridium et les infections à Fusobacterium, ainsi que les infections à Peptococcus et Peptostreptococcus. Il est également utilisé dans le traitement de la maladie de Crohn et de la rosacée, comme agent prophylactique après une intervention chirurgicale et dans le traitement de l'infection à *Helicobacter pylori*. Il a également été étudié dans la prévention des naissances prématurées et pour traiter les maladies parodontales (Drugbank 2022).

### **3.2 Pharmacodynamique :**

Le mécanisme d'action du MTZ n'a pas été complètement élucidé. Cependant, sa réduction du groupe nitro par les bactéries anaérobies semble être responsable des effets cytotoxiques et antimicrobiens. Le mécanisme décrit pour ce médicament est résumé ainsi :

Le métronidazole traverse la membrane de la cellule cible par diffusion passive ; ensuite, son groupe nitro est réduit en radicaux nitro par la ferrédoxine ou la flavodoxine. La sélectivité du métronidazole pour les micro-organismes anaérobies ou microaérophiles est due au potentiel redox de leurs composants de transport d'électrons, qui sont responsables de la réduction des groupes nitro et génèrent des métabolites toxiques. Ces métabolites tels que l'acide N-(2-hydroxyéthyl)oxamique et l'acétamide peuvent réagir avec l'ADN et former des adduits avec la guanosine (Ceruelos, et al. 2019).

### **3.3 Le métronidazole dans la nanomédecine :**

Avec le développement remarquable dans le domaine nanométrique et précisément dans la nanomédecine, plusieurs recherches scientifiques étaient menées dans le but de la vectorisation des différents médicaments pour améliorer leurs effets thérapeutiques et réduire leurs effets indésirables. Parmi ces médicaments le métronidazole a également retenu l'attention des chercheurs.

Dans la recherche faite par Binesh et al 2021, des nanoparticules de chitosane assistées par sel contenant du métronidazole (MTZ) étaient préparées par l'utilisation de la technique de gélification ionique en présence de NaCl. Pour étudier l'effet de différentes concentrations de NaCl sur la taille des particules, le potentiel zêta, l'indice de polydispersité (PDI), l'efficacité d'encapsulation (EE %), la stabilité de ces NPs en l'absence/présence de NaCl sur une période de stockage de 6 mois et la libération de médicament à pH = 7,4 ainsi que le mécanisme correspondant (Binesh, Farhadian et Mohammadzadeh 2021).

Autre recherche faite par Sreeharsha et al, dans le but de désigner, optimiser et développer des nanoparticules chargées de MTZ par l'utilisation du concept de quality-based design (QbD), ainsi qu'une méthodologie d'évaluation des risques. Ces NPs ensuite étaient analysées pour déterminer leurs masses volumiques, taille des particules, le pourcentage d'efficacité d'encapsulation (% EE), l'angle de repos et l'indice de compressibilité (Sreeharsha, et al. 2020).

## Quatrième Chapitre : La méthode de nanopréciipitation et le Métronidazole

Par ailleurs, les travaux réalisés par, décrivent la préparation de nanoparticules de chitosane mucoadhésives, contenant du MTZ et destinées à une délivrance ciblée au niveau du côlon. Les NPs de chitosane étaient préparées par la méthode de gélification ionique et leurs propriétés in vitro étaient étudiées (Elzatahry et Mohy Eldin 2008).

Ces dernières années, il y a un intérêt grandissant pour le développement de NPsP contenant le MTZ, surtout par la méthode de nanopréciipitation, pour les différents avantages qu'elle offre tant sur le plan technique que sur le plan biodisponibilité. C'est pour toutes ces raisons que nous avons décidé de développer au sein de notre laboratoire des nanoparticules polymériques à base de polymère biodégradable et biocompatible, contenant une combinaison de tensioactifs hydrophiles dont le HLB est supérieur à 15, qui puissent en présence du PEG et du PVA seuls ou associés, garantir une encapsulation du MTZ et son adressage au niveau de la cible. Il s'agit d'un travail de recherche allant du screening moléculaire aux essais proprement dit, en passant par une caractérisation physicochimique

*Deuxième partie*  
*La Pratique*

## Introduction de la partie pratique

### Introduction :

Le métronidazole (MTZ) est un antibiotique, appartenant à la classe des nitroimidazoles (Drugbank 2022). Il a une activité élevée contre les bactéries anaérobies gram-négatif comme *Bacteroides fragilis* et les bactéries anaérobies gram-positif comme *Clostridium difficile* (Löfmark, Edlund et Nord 2010). Mais il a aussi des propriétés antiparasitaires supplémentaires qui le distinguent de nombreux autres médicaments antibactériens et lui permettant de traiter une grande variété d'infections, ainsi il est fréquemment utilisé pour traiter les infections gastro-intestinales telles que la trichomonase, la giardiase, et l'amibiase qui sont des infections parasitaires (Drugbank 2022). Le mécanisme d'action de cette molécule n'est pas entièrement compris, mais implique l'inhibition de la synthèse de l'ADN et leur rupture en un seul brin par une oxydation, qui est généralement responsable de la destruction des cellules. Cependant, MTZ n'est pas bien adapté à l'administration orale, car il est complètement absorbé et atteint des concentrations plasmatiques maximales après 1 à 2 h (Sreeharsha, et al. 2020), provoque plusieurs effets indésirables tel que les étourdissements, l'anorexie, les convulsions, les palpitations, les allergies cutanées, les problèmes digestifs, les douleurs articulaires et l'essoufflement (Binesh, Farhadian et Mohammadzadeh 2021).

L'une des nouvelles stratégies pour surmonter ces problèmes c'est le système de nanovectorisation. L'utilisation des nanovecteurs de médicaments présente plusieurs avantages tels que l'augmentation de la solubilité et la biodisponibilité du médicament, l'augmentation de leur durée de circulation dans le corps et leur libération contrôlée, ce qui réduit par conséquent la dose requise et les effets secondaires (Binesh, Farhadian et Mohammadzadeh 2021).

Les nanoparticules polymériques sont largement appliquées dans ce système où les polymères naturels sont plus utilisés que les polymères synthétiques en raison de leurs biodégradabilités, leur non toxicité et leur biocompatibilité (Binesh, Farhadian et Mohammadzadeh 2021). Parmi tous les types de polymères, l'Alginate (Alg) extrait de la paroi cellulaire d'algues marines brunes (Phaeophyceae) ou de source bactérienne, comme *Laminaria hyperborea*, est un polymère hydrophile et anionique, soluble dans l'eau et insoluble dans l'éthanol et les solvants organiques et leur dérivé. L'alginate de sodium est lentement soluble dans l'eau froide, ce qui conduit à la formation de solution visqueuse et colloïdale. Cependant, il est insoluble dans l'alcool, dans les solutions hydroalcooliques dont la teneur en alcool est supérieure à 30 % en poids et est également insoluble dans d'autres solvants organiques, tels que, l'acétone, le

## Introduction de la partie pratique

chloroforme, l'éther et dans les acides où le pH de la solution résultante tombe en dessous de 3,0 (Severino, et al. 2019).

L'une des techniques en tendance utilisées pour la préparation de NPs est la nanoprécipitation, une méthode simple, rapide, reproductible et facile à réaliser, développée par Fessi et al. En 1998 ; où deux phases solvant (organique) et non solvant (aqueuse) sont nécessaires. Fondamentalement, la phase organique est composée du PA et de polymère tandis que la phase aqueuse comprend de l'eau et des agents stabilisants. Après l'addition de la phase organique à la phase aqueuse, les NPs peuvent se former spontanément lors de l'évaporation du solvant organique (Badri, et al. 2016).

Les propriétés physicochimiques de ces NPs, telles que la composition, la taille, le potentiel zêta et le taux d'encapsulation, peuvent avoir un impact sur la biodistribution et la pharmacocinétique des médicaments.

Notre étude vise à enquêter la stratégie de nanoprécipitation nécessaire pour formuler des NPsP d'alginate de sodium chargées en MTZ. Pour ce faire, nous avons fait plusieurs essais d'orientation et de préformulation, dans lequel les travaux portent essentiellement sur la mise au point des nanoparticules par deux méthodes (sonication et homogénéisation à haute pression) à l'échelle laboratoire afin de tester leur faisabilité. Nous avons aussi testé l'influence de plusieurs tensioactifs : le Polyéthylène glycol (PEG), Polysorbate (Tween80®), alcool polyvinylique (PVA), poloxamere 188 (Lutrol ® F68), pour établir un arbre décisionnel afin de choisir le meilleur procédé qui vise à obtenir la solution colloïdale désirée sur le plan macroscopique.

Enfin ; les échantillons de NPsP obtenu par les meilleures formulations était analysés en termes de taille, de potentiel zêta, de taux d'encapsulation, de la microscopie électronique à balayage et soumis à un test microbiologique pour sélectionner la formulation la plus prometteuse parmi eux à tester dans autres études futures.

## *Matériels et Méthodes*

## Matériels et Méthodes

### 1. Matériels :

#### 1.1 Réactifs et matières premières :

##### 1.1.1 Alginate de sodium :

L'alginate de sodium est un polysaccharide chargé négativement, biopolymère polyvalent naturel dont la capacité de formation de gel dépend du pH. On l'utilise comme agent stabilisant de faible viscosité, présent sous forme d'une poudre crémeuse inodore de couleur blanche jaunâtre, contient <0.003% des métaux lourds (le plomb) et 0.9% de Chlorure ( $Cl^-$ ), avec une absence totale des bactéries (E. coli et salmonella). Notre produit est certifié par Biochem Chemopharma laboratory (France). (Voir annexe 1)

##### 1.1.2 Alcool polyvinylique (PVA-124) :

L'alcool polyvinylique  $(CH_2CHOH)_6$  est un polymère synthétique dérivé de l'acétate de polyvinyle par hydroxylation partielle ou totale. Le PVA est couramment utilisé dans les dispositifs médicaux en raison de ses caractéristiques de faible adsorption aux protéines, de sa biocompatibilité, de sa solubilité élevée dans l'eau et de sa résistance chimique (Maribel, et al. 2012). Notre produit fourni par Biochem Chemopharma Montréal, Québec, numéro de batch : B9002-89-5-1111-011 et qui a les caractères indiquées ci-dessous (Tableau N°3):

Tableau N°3 : Propriétés physico-chimiques du PVA.

<b>Couleur</b>	<b>Incolore</b>
<b>Odeur</b>	Inodore
<b>Forme</b>	Cristallin
<b>Degrée d'hydrolyse %</b>	Min 95.0
<b>Matière volatile%</b>	Max 5.0
<b>Résidu après l'allumage (comme sulfate) %</b>	Max 0.8

## Matériels et Méthodes

### 1.1.3 Polyéthylène glycol (Ph EUR 6000) (PEG) :

Le polyéthylène glycol de structure chimique  $H-(O-CH_2-CH_2)-OH$  est l'un des polymères biocompatibles les plus utilisés, une molécule simple non toxique, linéaire ou ramifiée soluble dans l'eau et la plupart des solvants organiques (Milton 1992). Le PEG utilisé dans notre expérimentation est un produit allemand fourni par Sigma Aldirich sous la marque Fluka® numéro du lot #BCBJ4113V et dont les propriétés physico-chimiques sont présentées dans le tableau N°4 :

Tableau N°4 : les propriétés physico-chimiques de PEG.

<b>Forme</b>	<b>Poudre</b>
<b>Couleur</b>	Blanc
<b>Pression de vapeur</b>	<0.01mmHg (à 20°C)
<b>Température de fusion</b>	20° à 25°C
<b>Masse molaire</b>	44,05g/mol
<b>Densité</b>	1.125

### 1.1.4 Polysorbate 80 (Tween 80) :

Le Polysorbate 80 est un tensioactif polymérique et émulsifiant non ionique dont la formule brute est  $C_{64}H_{124}O_{26}$ . L'une de ses utilisations importante est dans la réalisation du test de dissolution, qui est nécessaire pour assurer une bonne performance de libération de principes actifs à partir de leurs formulations. Dans les nombreux cas où les ingrédients pharmaceutiques actifs non polaires souffrent d'une faible solubilité dans le range de pH physiologique, les tensioactifs sont nécessaires pour aider à la solubilisation totale de ces ingrédients (Wuelfing, et al. 2006). L'usage du Tween 80® dans notre formulation devient alors une évidence dans notre pratique de promouvoir la libération du métronidazole.

## Matériels et Méthodes

On utilise dans notre étude un produit fabriqué en France par Sigma Aldrich sous le nom commerciale de Tween80®, numéro de Lot : #BCBJ8430V ; avec les propriétés physico-chimiques présentées ci- dessous (tableau N°5) :

Tableau n°5 : les propriétés physico-chimiques de Tween 80®.

<b>Formule chimique</b>	<b>C64H124O26</b>
<b>Forme</b>	Liquide visqueux
<b>Couleur</b>	Ambre
<b>Masse molaire</b>	1310 g/mol
<b>Point d'ébullition</b>	+100°C
<b>Cmc</b>	0.012 mM (20-25°C)
<b>Solubilité</b>	Soluble dans l'eau et d'autres solvants comme éthanol et le méthanol

### 1.1.5 Poloxamer 188 (Lutrol ® F68) :

Le poloxamer 188 ; du groupe de polymères séquencés polyoxyéthylène-polyoxypropylène-polyoxyéthylène (PEO-PPO-PEO), est un tensioactif non ionique et non toxique utilisé comme un agent mouillant, émulsifiant et solubilisant, liant et d'enrobage des comprimés. Il contient 80 % en poids de groupements PEO et un point de fusion bas (52°C). En raison de ces propriétés, il peut être considéré comme un liant hydrophile dans la granulation à l'état soluble (Passerini, et al. 2002).

Le poloxamer 188 est un matériau solide, cireux et fluide ayant une forme sphérique et une couleur blanche. Plus de 90% de ses microparticules ont une granulométrie comprise entre 1000 et 350 µm (Passerini, et al. 2002).

Dans notre travail, nous avons utilisé le poloxamer 188 fourni par laboratoire BASF (The Chemical Company) sous le nom commercial Lutrol® F68 et numéro de Lot : WPCE5650.

## Matériels et Méthodes

### 1.1.6 Acétone :

L'acétone ( $\text{CH}_3\text{COCH}_3$ ) est un liquide transparent, très inflammable et volatil qui dégage une odeur caractéristique, à la fois âcre et aromatique (Acetone 2010).

L'acétone utilisée dans cette étude provient de Janssen Chimica portant le numéro de Lot : 44237/2 avec des propriétés physico-chimiques présentées dans le tableau N°6 ci-dessous :

Tableau N°6 : les propriétés physico-chimiques de l'acétone.

<b>Forme</b>	<b>Liquide</b>
<b>Couleur</b>	Transparent
<b>Point d'ébullition</b>	55.6-56.6 °C
<b>Point de congélation</b>	-17 °C
<b>Masse molaire</b>	58.08
<b>Densité</b>	0.786

### 1.1.7 L'acide phosphotungstique :

L'acide phosphotungstique  $\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$  est non toxique, hydrosoluble et inodore avec un aspect de petits cristaux incolores-grisâtres ou légèrement jaune-verdâtre. Utilisé dans le but d'une coloration négative courante pour l'imagerie par un microscope électronique à transmission (Brenner et Horne 1959). Le tableau suivant présente ses propriétés physico-chimiques :

Tableau N°7 : Les propriétés physico-chimiques de l'acide phosphotungstique.

<b>Formule chimique</b>	<b><math>\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}</math></b>
<b>Forme</b>	Cristaux
<b>Couleur</b>	Incolore-grisâtre

## Matériels et Méthodes

<b>Masse molaire</b>	288.2 g/mol
<b>Point de fusion</b>	89°C

### 1.1.8 Le métronidazole :

Le métronidazole est un antibiotique largement utilisé pour lutter contre nombreuses bactéries et parasites ; de la structure chimique brute  $C_6H_9N_3O_3$  et la masse molaire 171.154 g/mol (Drugbank 2022). Il se présente sous forme de petits cristaux incolores et inodores.

Le MTZ est lié aux protéines plasmatiques à moins de 20 % et subit un métabolisme hépatique par hydroxylation, oxydation et glucuronidation. Il est éliminé avec ses métabolites à 60 à 80 % dans les urines et à 6 à 15 % excrétés dans les fèces. Sa demi-vie est de 6 à 10 heures, la DL50 orale chez le rat est de 5000 mg/kg (Drugbank 2022).

Le MTZ est utilisé comme molécule active modèle dans notre expérimentation. Il nous a été gracieusement fourni par les laboratoires MM de Annaba.

Tableau N°8 : Différents propriétés de métronidazole.

<b>Formule chimique</b>	<b><math>C_6H_9N_3O_3</math></b>
<b>Forme</b>	Cristaux
<b>Couleur</b>	Incolore
<b>Odeur</b>	Inodore
<b>Masse molaire</b>	171.154 g/mol
<b>Distribution</b>	Liée aux protéines <20%
<b>Métabolisme</b>	Hépatique
<b>DL50</b>	5000 mg/kg
<b>Elimination</b>	Urinaire, un peu fécal

## Matériels et Méthodes

### 1.2 Matériels utilisés :

L'ensemble des équipements utilisés pour la formulation et la caractérisation des nanoparticules polymériques sont donnés dans le tableau N°9 suivant :

Tableau N°9 : Liste des équipements utilisés

<b>Equipement</b>	<b>Marque</b>	<b>Intérêt</b>
<b>Balance analytique</b>	KERN	Peser les ingrédients.
<b>Agitateur magnétique chauffant</b>	Stuart SB 162 Et Nahita model 690-1	Assurer l'agitation d'une solution et la dissolution des composants chimiques.
<b>Homogénéisateur</b>	Ultra-turrax	Mélanger efficacement la phase aqueuse et la phase organique.
<b>Centrifugeuse</b>	JOUAN	Séparer les constituants de taille et de masse très variables contenus dans la préparation liquide.
<b>Lyophilisateur</b>	TELSTAR Cryodos Et CHRIST	Pour le séchage des échantillons pour obtenue une poudre.
<b>MEB</b>	GEMINI	Pour analyser la morphologie et l'état de surface de la poudre obtenue.

## 2. Méthodes :

### 2.1 Préparation des nanoparticules d'alginate de sodium :

Les nanoparticules d'alginate de sodium ont été formulées par la méthode de nanoprécipitation qui repose sur le déplacement de solvant. Cette méthode a été décrite pour la première fois par Fessi et al en 1989 ( Bilati, Allemann et Doelker 2004). Au laboratoire de pharmacie galénique de la faculté de médecine de Tizi Ouzou, la méthode a été légèrement modifiée.

## Matériels et Méthodes

La synthèse de ces nanoparticules nécessite à la fois la phase solvant et non solvant. Le mode opératoire est décrit comme suit :

- 1- Le PVA est dissous dans l'eau distillée qui est préalablement chauffée à 80°C puis mélangé avec le Pluronic F68, Tween80, polyéthylène glycol (PEG). Le principe actif « Métronidazole » y est ensuite incorporé. Ce mélange constitue la phase aqueuse.
- 2- Dans un deuxième temps, on dissout l'alginate de sodium dans un mélange d'eau et d'acétone, une phase organique est alors obtenue.
- 3- L'ajout de la phase organique dans la phase aqueuse se fait goutte à goutte à un rythme défini et régulier. Le choix du solvant est basé sur la solubilisation de polymère.
- 4- La préparation est laissée à l'air libre pour l'évaporation totale d'acétone

### 2.2 Essais d'orientation :

Pour fixer les concentrations des polymères utilisés, le mode d'introduction de la phase organique et les étapes consécutives (centrifugation, filtration, etc.), nous avons fait plusieurs essais préliminaires. Les nanoparticules polymériques sont en premier lieu non chargées en métronidazole. L'introduction de ce dernier se fera après validation du procédé.

#### 2.2.1 Détermination de la concentration de l'alginate de sodium :

- **1er essai :**

- Pour la préparation de la phase aqueuse, nous avons chauffé l'eau distillée à une température de 80°C, après on a ajouté 0.04g de PVA à la même température sous agitation magnétique jusqu'à sa dissolution totale, ensuite on a ajouté 0.8g de Lutrol®F68, 0.45g de Tween 80 et enfin 0.4g de PEG. L'ensemble est maintenu sous agitation jusqu'à dissolution totale.
- Pour la phase organique on a mélangé l'eau distillée en présence de 3% (30mg) d'alginate de sodium sous une agitation magnétique jusqu'à sa dissolution complète. Ensuite, nous avons rajouté l'acétone.

- **2èm essai :**

Nous avons gardé les mêmes concentrations exceptées pour l'alginate de sodium qui a été réduit à 2% (20mg).

### 2.2.2 Détermination de la composition en stabilisants :

Pour étudier l'effet de PEG et PVA sur les propriétés de la préparation, nous avons fait les essais suivants :

- Pour les premiers essais nous avons préparé une phase aqueuse sans PVA, avec les mêmes concentrations précédentes.
- Pour le deuxième essai, la phase aqueuse a été préparée sans PEG, avec les mêmes concentrations précédentes.

### 2.2.3 Mode d'introduction de la phase organique et procédé de nanoémulsification :

Pour choisir le mode d'introduction de la phase organique, nous avons fait les trois essais suivants :

- **1er essai :**

Introduction de la phase organique goutte à goutte pendant 10 min à l'aide d'une seringue sous agitation magnétique pendant une heure.

- **2ème essai :**

Introduction de la phase organique goutte à goutte à un débit de 2 ml/min, sous ultrasonication pendant 30 min.

- **3ème essai :**

Introduction de la phase organique goutte à goutte (2 ml/min) sous homogénéisation de 11000 trs/min pendant 10 min

.

### 2.3 Opérations consécutives :

Une fois la préparation finie, cette dernière subit une centrifugation et une purification. Nous avons également fait plusieurs essais :

- La purification consiste en la microfiltration à l'aide de filtres seringues.
- La centrifugation consécutive est directement réalisée sur le filtrat pendant 30 minutes.

## Matériels et Méthodes

- Certaines formulations ont subi des opérations de lavages après chaque centrifugation, à raison de trois lavages intercalaires de 10 minutes.

Les détails des essais d'orientations sont résumés dans le flow chart suivant :

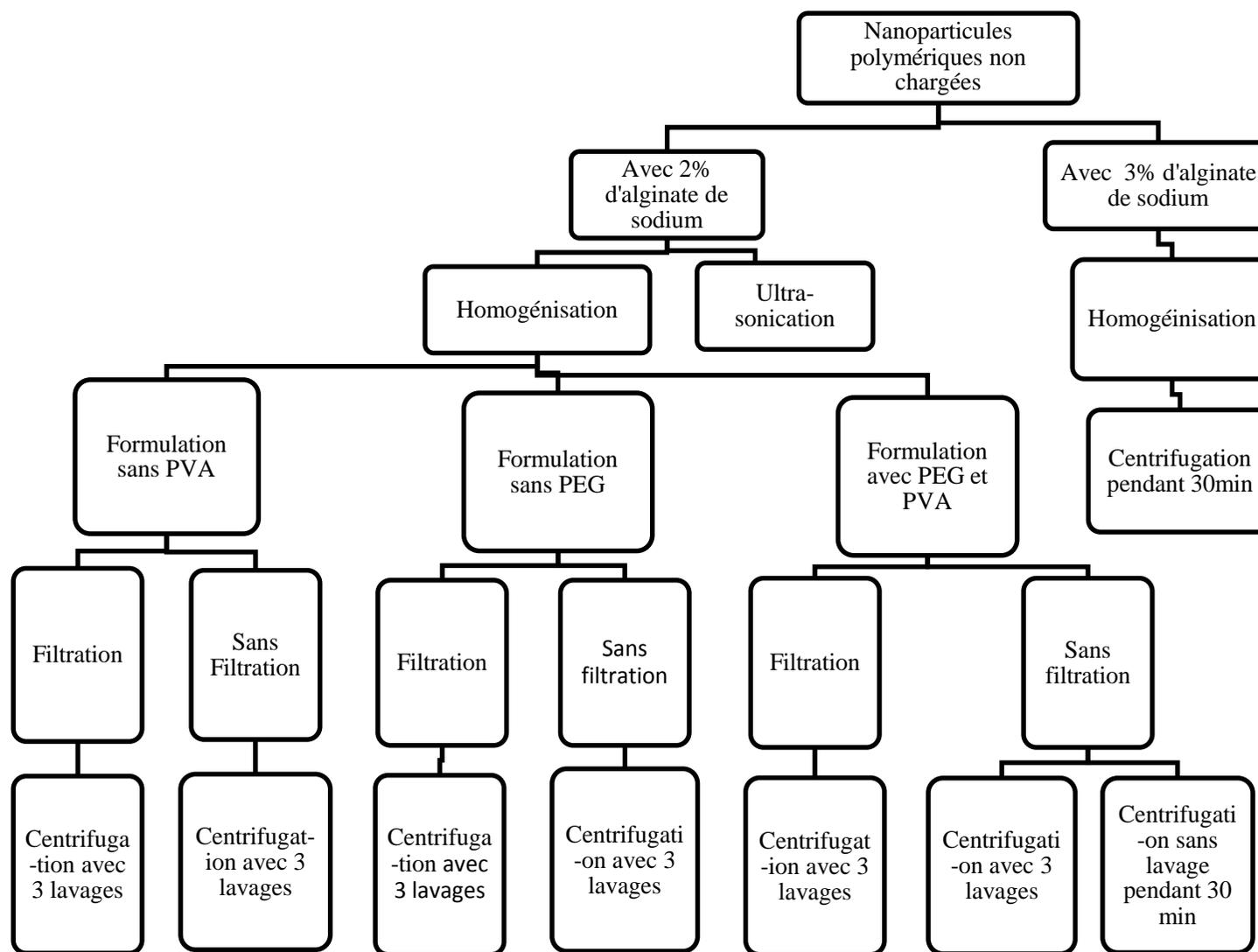


Figure n°14 : Les différents essais réalisés pour l'obtention d'une forme optimale.

## Matériels et Méthodes

### 2.4 Essai proprement dit :

La préparation des formules qui ont donné de meilleurs résultats sur le plan macroscopique :

- **1er essai :**
  - **Préparation de la phase aqueuse :** nous avons chauffé l'eau distillée à température de 80°C, nous y avons ensuite dissous 0.04 mg de PVA sous agitation magnétique à la même température. Quand le PVA est dissous totalement dans l'eau on a ajouté 0.8 mg de Lutrol® F68, 0.45 mg de Tween80® et 0.4 mg de PEG. L'ensemble est maintenu sous agitation jusqu'à dissolution totale. A la fin, 20 mg de Métronidazole y est incorporé.
  - **Préparation de la phase organique :** cette phase a été préparée par dissolution de 0.02 mg d'alginate de sodium dans un mélange d'eau et d'acétone sous agitation magnétique.



Figure n°15 : Pesée et de dissolution des composants chimiques.

- Le mode d'introduction : La phase organique a été ajoutée à la phase aqueuse goutte à goutte 2ml/min et subit une homogénéisation à haute pression de 11000 tr/min.
- La préparation est laissée à l'air libre pour l'évaporation totale de l'acétone.



Figure n°16 : Introduction de la phase organique (à gauche) et élimination de l'acétone (à droite).

- La purification : la préparation est purifiée pour éliminer les résidus à l'aide d'un filtre seringue (0,45  $\mu\text{m}$ ).
- La centrifugation : le filtrat subi une série de lavages après chaque centrifugation, à raison de trois lavages intercalaires de 10 minutes.



Figure n°17 : Filtration (à gauche) et centrifugation (à droite).

## Matériels et Méthodes

- **2ème essai :**

- La phase aqueuse est préparée sans PVA avec les mêmes concentrations de l'essai précédent.
- La préparation obéit au mode opératoire précédent.

- **3ème essai :**

- La phase aqueuse est préparée sans PEG avec les mêmes concentrations du premier essai.
- La préparation obéit au mode opératoire précédent.

### 3. Méthodes de caractérisations physico-chimiques :

#### 3.1 Potentiel zêta ; Indice de polydispersité ; Taille des particules

- **Potentiel zêta :** Le potentiel Zeta est un paramètre qui décrit l'interaction entre une particule et son milieu, permettant ainsi de prédire la stabilité d'une suspension ou d'une émulsion. Un potentiel Zeta à valeur absolue élevée indiquera une stabilité, tandis que des valeurs faibles seront signe d'instabilité (HI-TECH, 2017).

La mesure du potentiel zêta s'effectue sur le Nanosizer, après introduction dans une cellule de mesure transparente, en prenant la précaution d'éliminer toute bulle d'air.

- **Indice de polydispersité :** est une mesure de l'hétérogénéité des tailles des particules dans le même lot ou la même population. Dans un procédé de fabrication idéal, toutes les nanoparticules se formeraient au même instant, ce qui assurerait que toutes les particules aient la même taille et la polydispersité serait très faible. Néanmoins, dans la plupart des procédés de fabrication, le mélange des phases qui donne lieu à la formation des NPs est un processus relativement lent et non homogène, de sorte que la formation de particules commence à des moments différents d'un point à l'autre dans la même solution. En conséquence, des NPs de différentes tailles se forment, augmentant la polydispersité de l'échantillon finale (Singh & W Lillard, 2009).

La mesure de ce paramètre se fait par le même équipement qui mesure le potentiel zêta, sur une cellule en polystyrène. Cette dernière est remplie à un niveau définie et introduite dans l'équipement qui effectue des mesures répétitives et affiche la moyenne des résultats.

## Matériels et Méthodes

- **Taille des particules :** La taille des nanoparticules joue un rôle clé dans leur absorption par les tissus et les cellules. De façon générale, il a été montré que des particules entre 60-200 nm peuvent être internalisées par endocytoses, tandis que les particules plus grandes (>200 nm) seront éliminées par phagocytoses. Les plus petites particules formulées affichaient une taille <20-30nm (Singh & W Lillard, 2009). La libération de molécules actives est également affectée par la taille des particules : quand les nanoparticules sont petites, l'ingrédient actif se trouve plus proche de la surface, donc il est libéré plus rapidement. Par contre, les plus grandes particules peuvent encapsuler efficacement le principe actif et le libérer lentement. Le contrôle de la taille est donc un moyen pour réguler le relargage (Singh & W Lillard, 2009).

Ce paramètre est également mesuré à l'aide du même équipement (Figure n°18). Les mesures sont effectuées à 25°C sur les échantillons suivants :

- F1 : Formule contenant des nanoparticules en suspension dont la composition renferme le PVA et le PEG, n'ayant pas subi de filtration consécutive.
- F2 : Formule contenant des nanoparticules en suspension dont la composition renferme le PVA et le PEG, encapsulant le métronidazole, n'ayant pas subi de filtration consécutive.
- F3 : Formule contenant des nanoparticules en suspension dont la composition contient uniquement le PVA, ayant subi une filtration consécutive.
- F4 : Formule contenant des nanoparticules en suspension dont la composition contient uniquement le PEG, ayant subi une filtration consécutive.
- F5 : Formule contenant des nanoparticules en suspension dont la composition contient le PVA et le PEG, ayant subi une filtration consécutive.

Toutes ces formules contiennent dans leur composition 2% d'alginate et sont préparées selon le procédé précédemment décrit.



Figure n°18 : Nanosizer.

### 3.2 Spectrophotométrie UV/visible :

#### 3.2.1 Principe de la spectrophotométrie UV/visible :

La spectrophotométrie est une méthode analytique quantitative qui consiste à mesurer l'absorbance ou la densité optique d'une substance chimique donnée en solution, plus cette espèce est concentrée, plus elle absorbe la lumière dans les limites de proportionnalité énoncées par la loi de Beer-Lambert.

La densité optique des solutions est déterminée par un spectrophotomètre préalablement étalonné sur une longueur d'onde d'absorption de l'espèce chimique à étudier.

La relation de Beer-Lambert décrit qu'à une longueur d'onde  $\lambda$  donnée, l'absorbance d'une solution est proportionnelle à la concentration des espèces de la solution et à la longueur du trajet optique (distance sur laquelle la lumière traverse la solution).

Pour une solution limpide contenant une seule espèce absorbante, nous avons la formule suivante :

$$A = DO = \varepsilon.C.l$$

## Matériels et Méthodes

$A$  : est l'absorbance ou la densité optique (sans unité) de la solution pour une longueur d'onde  $\lambda$ .

$C$  (en  $\text{mol}\cdot\text{m}^{-3}$ ) : est la concentration de l'espèce absorbante.

$l$  : (en m) est la longueur du trajet optique.

$\varepsilon$  : (en  $\text{mol}^{-1}\cdot\text{m}^2$ ) est le coefficient d'extinction molaire de l'espèce absorbante en solution. Il rend compte de la capacité de cette espèce à absorber la lumière, à la longueur d'onde  $\lambda$  (García, 2017).

### 3.2.2 Préparation des solutions :

Nous avons préparé 06 solutions aqueuses à différentes concentrations de métronidazole. Chaque solution étalon subit une dilution au 1/50 avant chaque lecture. La longueur d'onde d'absorption a été définie à 328 nm.

Tableau N°10 : Préparation de la gamme d'étalonnage du métronidazole.

Concentration	Masse (mg)	Volume (ml)
125%	16.75	20
100%	13.4	20
75%	10	20
50%	16.75	50
25%	17	100
10%	13.6	200

### 3.2.3 Préparation des échantillons à analyser :

La mesure de l'absorbance s'effectue sur les trois formules retenues à la fin des essais d'orientation.

1 ml est prélevé de chaque échantillon et mélangé à l'eau distillée jusqu'au trait de jauge (50 ml). La lecture des absorbances s'effectue à une longueur d'onde de 328 nm.

### 3.2.4 Détermination de l'efficacité d'encapsulation :

## Matériels et Méthodes

L'efficacité d'encapsulation est le rapport entre le métronidazole qui a été encapsulé sur la masse théorique introduire au moment de la formulation et qui représente le 100%.

Après centrifugation, le surnagent est récupéré et analysé. La détermination de l'efficacité d'encapsulation s'effectue par la méthode indirecte en mesurant la quantité du métronidazole non encapsulé.

Pour définir cette valeur, nous avons suivi ces étapes :

1. Calcul de la concentration du métronidazole (100%) :

$$Cm = \frac{m}{v}$$

Où :

m : la masse de métronidazole en mg (13,4mg)

V : le volume de l'eau distillée en ml (20ml)

$$Cm = C \times M ;$$

Où :

C : concentration en métronidazole

M : masse molaire du métronidazole (171,16g /mol)

$$C = \frac{m}{v \times M}$$

Application numérique :

$$C = \frac{13,4}{20} \times 171,16 \times 10^3$$

$$C = 3,9 \times 10^{-3} \text{ mol / l}$$

2. Détermination de l'absorbance de chaque préparation qu'on a faite à l'aide de la spectrophotométrie UV/visible, à 328nm.

## Matériels et Méthodes

3. A partir de la courbe d'étalonnage établie et par extrapolation de l'absorbance de chaque échantillon, nous avons déduit la concentration correspondante.
4. Détermination de la masse du métronidazole libre de chaque préparation à partir de la concentration trouvée, en utilisant la formule suivante :

$$m = C \times V \times M$$

5. Enfin, nous avons déterminé l'efficacité d'encapsulation en appliquant la formule suivante :

$$EE(\%) = \frac{X_1 - m}{X_1} \times 100$$

$X_1$  = Quantité de Met ajoutée (mg).

$m$  = Quantité de Met libre (mg).

### 3.3 La microscopie électronique à transmission :

#### 3.3.1 Rappel théorique :

La Microscopie Electronique à Transmission (MET) permet une analyse morphologique, structurale et chimique des échantillons solides à l'échelle atomique. Cette technique repose sur l'interaction des électrons avec la matière et la détection des électrons ayant traversé l'échantillon ainsi que tous les signaux résultants de l'interaction électrons-matière (Rayons X, photons) permettent d'obtenir des informations sur les propriétés de l'échantillon. Les échantillons doivent être minces (coupe à 80 nm) ou être de taille nanométrique (poudres, filaments, etc.) pour permettre la transmission du faisceau d'électrons. Les échantillons biologiques doivent être bien fixés.

#### 3.3.2 Préparation de l'échantillon :

Dans cette étape, nous avons utilisé des microgrilles à micropores sur film de carbone (Figure n°19).

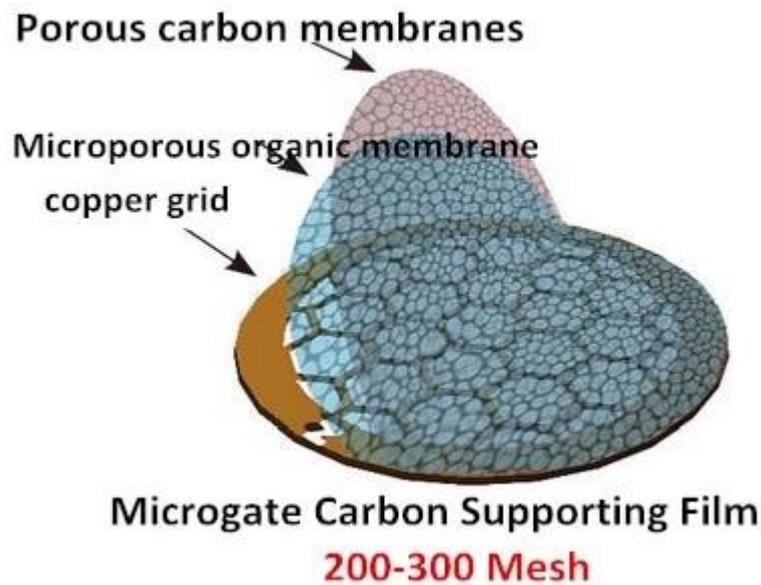


Figure n°19 : Illustration d'une microgrille de carbone

Les micropores sont des trous traversant après le placage de carbone, ce qui permet de réaliser l'observation de l'échantillon sans arrière-plan pour améliorer l'image à contraste élevé de l'échantillon. Le film de carbone à microgrille ordinaire (taille des pores  $\sim 5\mu\text{m}$ ) est principalement utilisé pour l'observation des nanomatériaux, de sorte que les nanoparticules sont au bord du micro-trou, ou les nanomatériaux unidimensionnels sont montés aux deux extrémités du micro-trou, pour réaliser une observation haute résolution des nanostructures.

La préparation de l'échantillon s'effectue par étapes. Elles sont décrites et illustrées dans la Figure n°20.

Les étapes sont les suivantes de gauche à droite :

- 1- Sur une boîte Pétri, déposer 3 gouttes : la première est notre échantillon, la deuxième est l'agent contrastant (acide phosphotungstique) et la dernière c'est de l'eau distillée.
- 2- Prendre une micro grille avec une pince stérile et la plonger dans la première goutte pendant une minute pour que l'échantillon puisse pénétrer dans les micropores.
- 3- L'excès de l'échantillon est éliminé sur papier filtre.

## Matériels et Méthodes

- 4- Immerger une seconde fois la micro grille dans l'acide phosphotungstique pour la coloration pendant maximum 2 minutes.
- 5- Eliminer l'excédent au papier filtre.
- 6- Au final, faire un lavage à l'eau distillée pendant 1 minute.

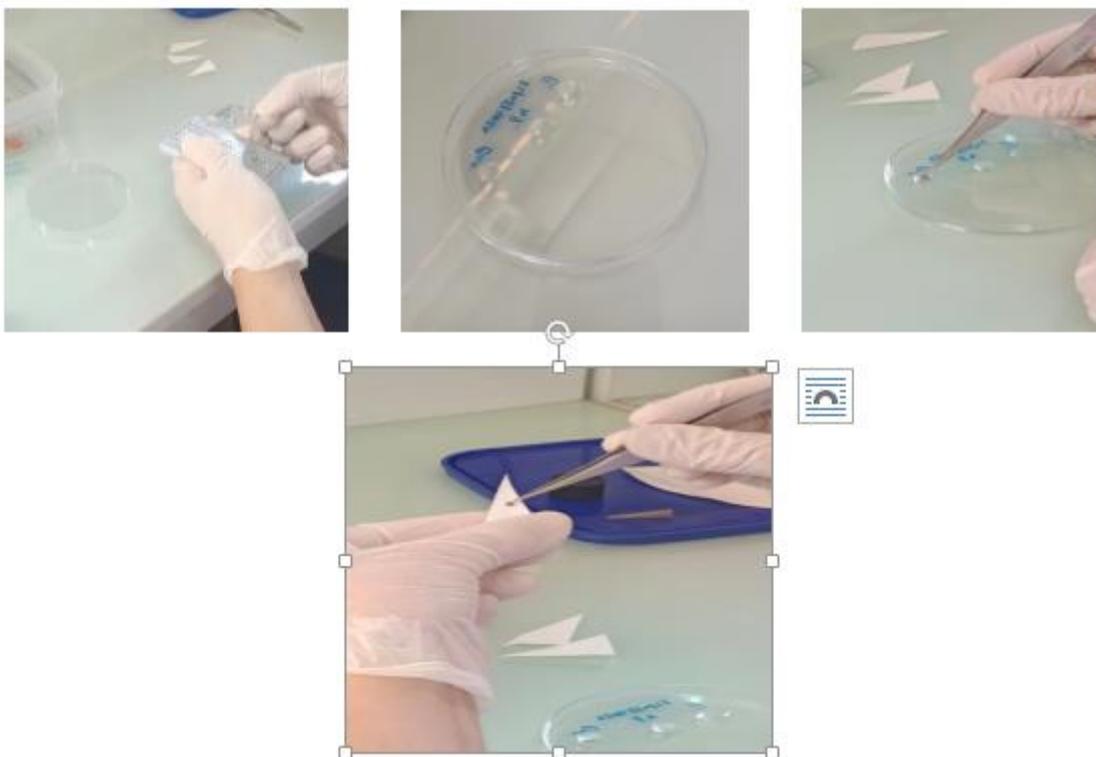


Figure n°20 : Les différentes étapes de la préparation de l'échantillon à analyser sur microgrille.

### 3.4 Microscope électronique à balayage :

#### 3.4.1 Rappel théorique :

La Microscopie Électronique à Balayage est une technique de microscopie électronique qui par balayage de l'échantillon par un faisceau d'électrons est capable de produire des images de la surface d'un échantillon (Kiss & tuth, 2019).

## Matériels et Méthodes

### 3.4.2 Principe :

Dans un Microscope Électronique à Balayage, un faisceau électronique balaye la surface d'un échantillon. L'interaction électron-matière génère alors plusieurs types d'émissions, comme le montre le schéma simplifié ci-contre. Les électrons secondaires permettent d'imager la surface de l'échantillon, avec un contraste topographique. Les électrons rétrodiffusés donnent une image avec un contraste chimique sur une surface plane. Les photons X rendent possible l'analyse chimique en Spectroscopie à Dispersion d'Énergie (EDS).

L'analyse par le microscope électronique à balayage s'est faite sur la lyophilisat obtenu après 24 heures.

### 3.4.3 Principe de lyophilisation :

La cryodéshydratation ou cryodessiccation, également appelée lyophilisation, est principalement utilisée pour éliminer l'eau des produits sensibles (souvent biologiques) sans les endommager. Ils peuvent donc être conservés dans un état qui permet leur stockage permanent, puis être reconstitués en y ajoutant de l'eau.

### 3.4.4 Les étapes du processus :

Les produits lyophilisés comprennent les antibiotiques, les bactéries, les sérums, les vaccins, les substances de diagnostic, les produits contenant des protéines et des biotechnologies, les cellules et les tissus, les produits chimiques.

Le produit à sécher est congelé à la pression atmosphérique. Une phase de séchage initiale appelée séchage primaire permet d'éliminer l'eau (et la glace) par sublimation ; lors de la seconde phase (dessiccation secondaire) elle est éliminée par désorption.

La lyophilisation se fait sous vide. Les conditions dans lesquelles le processus se déroule déterminent la qualité du produit lyophilisé. Certains aspects importants à prendre en considération durant le processus de lyophilisation sont les suivants :

- **Congélation** : la transformation du produit de base par abstraction de la chaleur, afin de créer un état adapté au séchage par sublimation.

## Matériels et Méthodes

- **Séchage primaire** : Au début de la phase de séchage primaire, la sublimation de la glace a lieu sur la surface du produit. Cette surface se rétracte petit à petit dans le produit au cours du processus, et la vapeur qui est ainsi produite doit être acheminée vers les couches extérieures, séchées auparavant. Cela entend que le processus de séchage dépend de la vitesse du transfert et de la suppression de vapeur, mais aussi de la chaleur nécessaire à la sublimation. Cette chaleur est fournie par convection et par conduction thermique et, en moindre mesure, par le rayonnement thermique.

La vapeur d'eau s'écoule de l'intérieur du produit vers l'extérieur, le transfert de chaleur doit aller dans le sens opposé. Les couches de produit séché assurant une faible conductivité thermique, le gradient de température nécessaire au transfert de chaleur augmente largement. Pour éviter d'endommager le produit, la température maximum possible du produit séché ne doit pas être dépassée. À l'opposé, il s'agit de veiller à maintenir la température de sublimation requise tout au long du séchage, de garder l'équilibre de l'alimentation en chaleur à la limite de l'âme de glace et d'éviter la surchauffe de la zone de sublimation. La phase de séchage primaire se poursuit jusqu'à ce que la glace contenue dans le produit ait été sublimée.

- **Séchage secondaire** : Lors de la seconde et dernière phase de séchage, la teneur résiduelle en eau est réduite le plus possible, afin d'assurer que le produit est constamment à un état qui peut être conservé. L'eau liée par l'adsorption de la surface interne du produit doit être éliminée. Pour ce faire, il est souvent nécessaire de contrecarrer les forces capillaires de l'eau. Le système de lyophilisation doit donc être conçu de façon à produire un gradient de pression élevé durant la phase de séchage secondaire (dans la plupart des cas, il n'est pas possible d'augmenter la température sans endommager le produit). Le processus de séchage secondaire doit être contrôlé de façon précise, afin d'éviter que le produit ne sèche excessivement.

## Matériels et Méthodes



Figure n°21 : Etape de lyophilisation.

La lyophilisation est effectuée sur un lyophilisateur de marque TELSTAR Cryodos et CHRIST pendant 24 heures, aussitôt récupéré, aussitôt analysé au MEB.

### 3.5 Etude microbiologique :

La présente étude a été menée pour évaluer l'activité antimicrobienne du métronidazole encapsulé par différentes préparations. Cette étude a été faite sur trois souches bactériennes isolées : *E. Coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* en utilisant la méthode de diffusion sur disques.

L'intérêt étant de définir une concentration minimale inhibitrice vis-à-vis des souches testées pour le développement galénique en perspective.

Pour ce faire nous avons utilisé :

- **Disques stériles** : recevant les différentes formules retenues pour évaluation.
- **Disque antibiotique** : Les disques antibiotiques servent à réaliser des tests de sensibilité antimicrobienne semi-quantitatifs selon la méthode de diffusion en milieu gélosé.
- **Milieu Mueller-Hinton** : La gélose Mueller-Hinton est un milieu standardisé recommandé pour l'étude de la sensibilité aux antibiotiques des bactéries peu exigeantes.

## Matériels et Méthodes

### 3.5.1 Etapes :

- 1- Des disques en papier sont déposés à la surface d'un milieu approprié (milieu Mueller-Hinton) ensemencé au préalable à l'aide d'une anse de culture pure et fraîche de la souche bactérienne préalablement isolée et à tester (Figure n°22).
- 2- On dépose une goutte de 5ul de notre préparation sur son disque correspondant.
- 3- Après incubation pendant 24h à 37°C, les boîtes de Pétri sont examinées et les zones d'inhibition situées autour des disques sont mesurées pour les différents agents microbiens testés, en vue de déterminer la catégorie clinique de sensibilité (résistante, intermédiaire, sensible, etc.). Le diamètre de la zone d'inhibition est proportionnel à la sensibilité de la souche bactérienne testée.

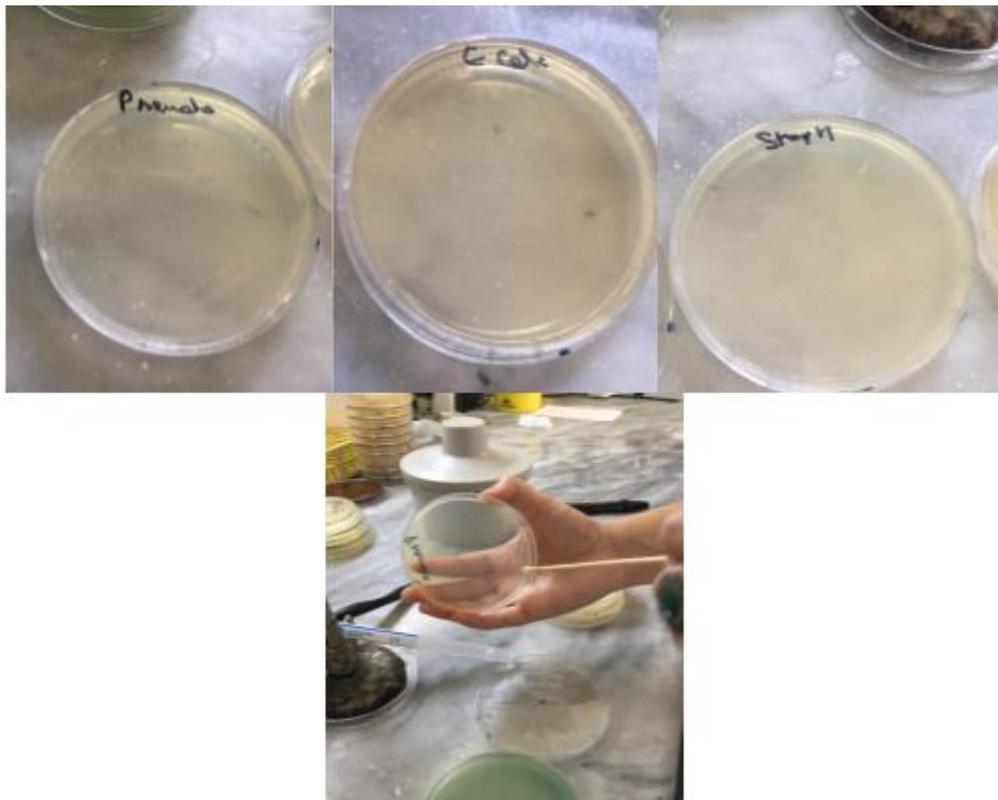


Figure n°22 : Les différentes étapes de préparation des milieux de culture pour incubation.

Les 6 disques utilisés sont imprégnés des formules suivantes (Figure n°23):

- Le 1<sup>er</sup> : préparation avec PEG et PVA.

## Matériels et Méthodes

- Le 2<sup>ème</sup> : préparation sans PEG.
- Le 3<sup>ème</sup> : préparation sans PVA.
- Le 4<sup>ème</sup> : préparation référence.
- Le 5<sup>ème</sup> : témoin négatif (eau distillée).
- Le 6<sup>ème</sup> : (témoin positif) un antibiotique : colistine CL pour les Gram négatif et vancomycine VA pour les Gram positif.



Figure n°23 : Dépôt de disques.

*Résultats et discussion*

## Résultats et discussion

Les résultats sont présentés sous formes de tableaux de graphes et de figures.

### **1. Optimisation de formulation :**

A l'issue des essais d'orientation, les résultats obtenus ont indiqué que la concentration idéale retenue pour l'alginate de sodium était de 2%. En effet, la formule obtenue en présence de 3% présentait un phénomène de désolvatation qui se soldait par l'apparition d'un culot gélatineux. En revanche, en présence de 2% d'alginate de sodium, la solution obtenue est colloïdale.

Aussi, le mode d'introduction de la phase organique, le temps et la méthode de nanoémulsification ont été fixés. Le résultat de l'ajout de la phase organique par ultrasonication était non concluant et aboutissait au phénomène de désolvatation. En contrepartie, nous avons obtenu suite à l'introduction par homogénéisation de la phase organique une solution transparente colloïdale.

Par conséquent, la formulation retenue contiendrait 2% d'alginate de sodium et le procédé est par homogénéisation est celui qui a été validé.

### **2. La taille moyenne des particules :**

Selon la définition des nanoparticules, la taille moyenne des particules doit être comprise entre 1nm et 1000nm.

La moyenne de la taille obtenue des nanoparticules non chargées F1 est de 47.36 nm, tandis que la moyenne de la taille des nanoparticules chargées F2 est de 1302 nm.

En effet, les résultats obtenus indiquent qu'il s'agit bien de nanoparticules polymériques. En revanche, l'encapsulation du métronidazole a engendré une augmentation de la taille moyenne. Ces résultats sont en accord avec la littérature (Tóth et Kiss 2019). L'agencement de la molécule entraîne inévitablement un réaménagement des composants chimiques et une augmentation de la dimension architecturale des NPsP.

D'autre part, les tailles moyennes des particules obtenues pour les formules F3, F4 et F5 sont de 20,83 ; 21,79 ; 23,42 nm, respectivement. Cette différence de taille avec F1 s'explique par le fait que cette dernière n'ayant pas subi de procédé de filtration consécutive, affichent une taille moyenne et une polydispersité élevée.

## Résultats et discussion

Pour confirmer ces résultats, d'autres mesures ont été effectuées pour F3, F4 et F5 avec et sans filtration. Le résultat est unanime. Il y'a bien un effet positif de la filtration sur la taille moyennes des particules (données non exposées).

### **3. Potentiel zêta :**

Les nanoparticules avec un Potentiel Zêta supérieur à  $\pm 30$  mV sont plus stables en suspension, car la répulsion électrostatique empêche l'agrégation des particules (Singh & W Lillard, 2009). Dans la présente étude, le potentiel zêta des nanoparticules non chargées (F1) présentait un potentiel négatif -9 mV (millivolts), tandis que les NPs chargées en métronidazole (F2) ont un potentiel négatif d'environ -10.4 mV.

Le potentiel zêta varie très peu après encapsulation du métronidazole. Il dépend essentiellement de la charge et de la composition du milieu dans lequel baignent les nanoparticules.

D'autre part, les résultats obtenues pour les formules F3, F4 et F5 sont de -7,94 ; -11,9 ; -8,87 mV. Il n'y a pas de grande différence avec les valeurs précédentes. Néanmoins, la formule F4 se démarque des autres avec un potentiel zêta légèrement positif. Notons que dans la composition, il y a présence du PEG, un excellent stabilisant.

Par ailleurs, la filtration n'influence pas sur les valeurs enregistrées et aucune donnée de la littérature ne s'accorde sur ce point.

### **4. L'indice de polydispersité (PDI) :**

Cet indice est sans dimension et mis à l'échelle de telle sorte que les valeurs inférieures à 0,05 soient principalement observées avec des normes hautement monodispersées. Par ailleurs, les valeurs PDI supérieures à 0,7 indiquent que l'échantillon a une distribution granulométrique très large (Danaei et al., 2018).

Le PDI des nanoparticules non chargées (F1) est de 0.825, tandis que le PDI de nanoparticules chargées de métronidazole (F2) est de 0.707.

Cette haute polydispersité est expliquée par la méthode de préparation de nanoparticules qui est un processus relativement lent et non homogène (Singh & W Lillard, 2009). Et qui de plus est effectué sans filtration.

## Résultats et discussion

A ce stade, nous avançons l'hypothèse que l'absence de filtration consécutive favoriserait grandement le phénomène d'agglutination des nanoparticules. Car entre la formule F5 et F1, il y a bien une différence (0,617 contre 0,825). La valeur de PDI de F5 est bonne et indique clairement une monodispersion.

Par ailleurs les valeurs affichées des formules F3, F4 et F5 qui ont subi une filtration consécutive, sont très bonnes : 0,537 ; 0,566 ; 0,617, respectivement. Toutefois, les valeurs de PDI sont beaucoup plus intéressantes lorsque les échantillons ne sont pas filtrés (données non exposées). En revanche, la taille moyenne des particules est augmentée.

A l'issue de la mesure de ces trois paramètres, il est évident qu'une filtration consécutive aux lavages des nanoparticules polymériques obtenus par procédé de nanoprécipitation est préconisé afin d'obtenir des résultats satisfaisants en termes de taille moyenne de nanoparticules, de potentiel zêta et d'indice de polydispersité.

### 5. Spectrophotométrie UV/visible :

#### 5.1 Détermination de l'absorbance du métronidazole :

L'absorbance des différentes concentrations de métronidazole dissoutes dans l'eau distillée à 328 nm, est résumée dans le tableau suivant :

Tableau N°11 : Valeurs d'absorbance de la gamme d'étalonnage.

<b>Concentration%</b>	<b>Absorbance (nm)</b>
<b>125%</b>	0.75
<b>100%</b>	0.69
<b>75%</b>	0.56
<b>50%</b>	0.33
<b>25%</b>	0.21
<b>10%</b>	0.083

On trace l'absorbance en fonction de la concentration du métronidazole (Figure n°24) :

## Résultats et discussion

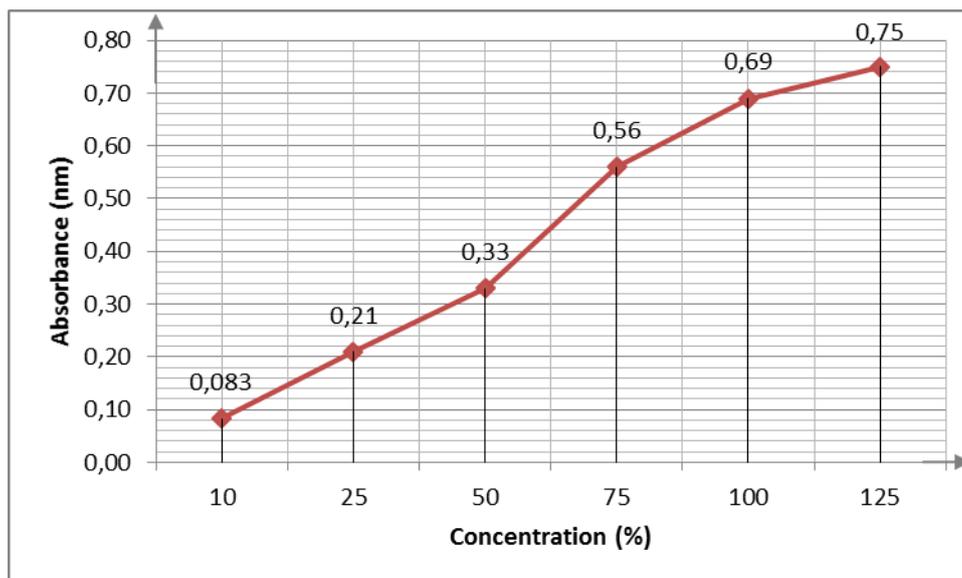


Figure n°24 : Courbe d'étalonnage du Métronidazole.

### 5.2 Détermination de L'efficacité d'encapsulation :

#### 5.1.1 Détermination de l'absorbance des trois préparations de nanoparticule chargé de métronidazole :

L'efficacité d'encapsulation est déterminée en mesurant d'abord l'absorption des échantillons indiqués ci-dessous à 328 nm.

L'absorbance de ces trois préparations est résumé dans le tableau suivant :

Tableau N°12 : Les valeurs des absorbances des trois préparations.

Les préparations	Absorbance (nm)
Préparation avec PVA et PEG (F5)	0.49
Préparation avec le PEG sans PVA (F4)	0.45
Préparation avec le PVA sans PEG (F3)	0.37

#### 5.1.2 Détermination de L'efficacité d'encapsulation :

- **Efficacité d'encapsulation des nanoparticules polymériques chargées en métronidazole préparées avec PEG et PVA :**

1- La concentration théorique du métronidazole à  $3.9 \times 10^{-3} \text{ mol/l}$  qui correspond à 100% de la quantité mise en jeu, affiche une absorbance de **0.49nm**.

## Résultats et discussion

- 2- A partir de la courbe d'étalonnage, la concentration correspondant à cette absorbance est égale à **68,7%**.
- 3- Cette concentration correspond à une quantité en mole/l égale à :

$$100\% \rightarrow 3,9 \times 10^{-3} \text{ mol/l}$$

$$68,7\% \rightarrow 2,67 \times 10^{-3} \text{ mol/l}$$

- 4- A partir de la concentration trouvée, on détermine la quantité du métronidazole libre :

$$m = C \times V \times M$$

$$m = 2,67 \times 10^{-3} \times 0,02 \times 171,16$$

$$m = 9,13 \text{ mg}$$

- 5- À partir de la masse de métronidazole non encapsulé on détermine l'efficacité d'encapsulation :

$$EE = \frac{\text{masse de métronidazole théorique} - \text{la masse de métronidazole non encapsulé}}{\text{la masse de métronidazole théorique}} \times 100$$

$$EE = \frac{20 - 9,13}{20} \times 100$$

$$EE = 54\%$$

- **Efficacité d'encapsulation des nanoparticules polymériques chargées en métronidazole préparées avec PEG et sans PVA :**

- 1- L'absorbance de cette préparation est de **0,45nm**
- 2- A partir de la courbe d'étalonnage, la concentration qui correspond à cette absorbance est égale à **63%**.
- 3- concentration en mol/L :

$$100\% \rightarrow 3,9 \times 10^{-3} \text{ mol/l}$$

$$63\% \rightarrow 2,457 \times 10^{-3} \text{ mol/l}$$

- 4- A partir de la concentration trouvée, on détermine la quantité du métronidazole libre :

$$m = C \times V \times M$$

$$m = 2,457 \times 10^{-3} \times 0,02 \times 171,16$$

$$m = 8,41 \text{ mg}$$

## Résultats et discussion

- 5- À partir de la masse du métronidazole non encapsulé, on calcule l'efficacité d'encapsulation :

$$EE = \frac{\text{masse de métronidazole avant l'encapsulation} - \text{la masse de métronidazole non encapsulé}}{\text{la masse de métronidazole avant l'encapsulation}} \times 100$$

$$EE = \frac{20 - 8,41}{20} \times 100$$

$$EE = 57,9\%$$

- **Efficacité d'encapsulation des nanoparticules polymériques chargées en métronidazole préparées avec PVA et sans PEG :**

- 1- L'absorbance de cette préparation est de **0,37nm**.
- 2- A partir de la courbe d'étalonnage, la concentration qui correspond à cette absorbance est égale à **53%**.
- 3- On obtient une concentration en mol/L :

$$100\% \rightarrow 3,9 \times 10^{-3} \text{ mol/l}$$

$$53\% \rightarrow 2,06 \times 10^{-3} \text{ mol/l}$$

- 4- A partir de la concentration trouvée, on détermine la quantité de métronidazole libre :

$$m = C \times V \times M$$

$$m = 2,06 \times 10^{-3} \times 0,02 \times 171,16$$

$$m = 7,07 \text{ mg}$$

- 5- À partir de la masse de métronidazole non encapsulé on détermine l'efficacité d'encapsulation :

$$EE = \frac{\text{masse de métronidazole avant l'encapsulation} - \text{la masse de métronidazole non encapsulé}}{\text{la masse de métronidazole avant l'encapsulation}} \times 100$$

$$EE = \frac{20 - 7,07}{20} \times 100$$

$$EE = 64,65\%$$

Les résultats du %EE de diverses formulations sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau N°13 : Efficacité d'encapsulation de formulations F3, F4 et F5

## Résultats et discussion

Les préparations	%EE
Préparation avec PVA et PEG (F5)	54
Préparation avec le PEG sans PVA (F4)	57,9
Préparation avec le PVA sans PEG (F3)	64,65

Ces résultats indiquent que les meilleures formulations en termes de pourcentage d'efficacité d'encapsulation, se classent comme suit : F3 > F4 > F5. Toutefois, les valeurs obtenues sont acceptables.

A l'issue des résultats, nous pouvons proposer les trois formules pour l'encapsulation du métronidazole. En revanche, l'association PVA-PEG n'est pas favorable à un taux d'encapsulation des plus élevés.

### 6. Etude microbiologique :

Le tableau N°14 expose les résultats de l'évaluation de l'activité antimicrobienne des formules F3, F4 et F5.

Tableau N°14 : Les résultats de l'évaluation de l'activité antimicrobienne.

Préparation	<i>P.aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>S.aureus</i>
PEG+PVA (F5)	7mm	Résistante	9mm
Sans PEG (F3)	7mm	Résistante	7mm
Sans PVA (F4)	10mm	Résistante	8mm
Référence	Résistante	Résistante	Résistante
Témoin négatif	Résistante	Résistante	Résistante
Témoin positif (Antibiotique)	Sensible à la CL	Sensible à la CL	Sensible à la VA

## Résultats et discussion



Figure n°25: Résultats des lectures et détermination du diamètre d'inhibition.

Les résultats obtenus des antibiogrammes restent peu satisfaisante. En effet, ceci est dû à faible la dose encapsulée. Cette dernière était de 20 mg. Nous supposons que la résistance enregistrée est tributaire à l'effet dose et qu'une augmentation de la dose encapsulée serait souhaitable pour une éventuelle étude supplémentaire nécessaire à la définition de la dose thérapeutique encapsulée.

### 7. La microscopie électronique à balayage (MEB)

Après lyophilisation de nos échantillons, qui est devenu une poudre sèche, une analyse microscopique par « microscope électronique à balayage » a effectué pour déterminer la forme, la taille de distribution et la taille.

#### 7.1 Les résultats d'analyse :

- **Observation sous microscope de la formule F5 lyophilisée.**

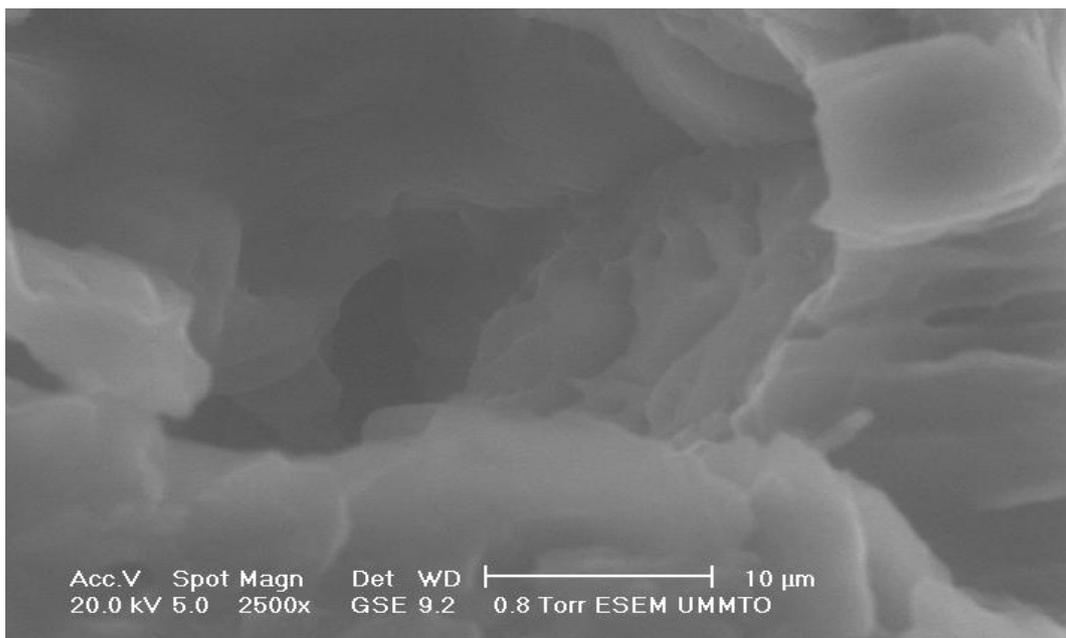


Figure n°26 : F5 observée par MEB (2500X).

## Résultats et discussion

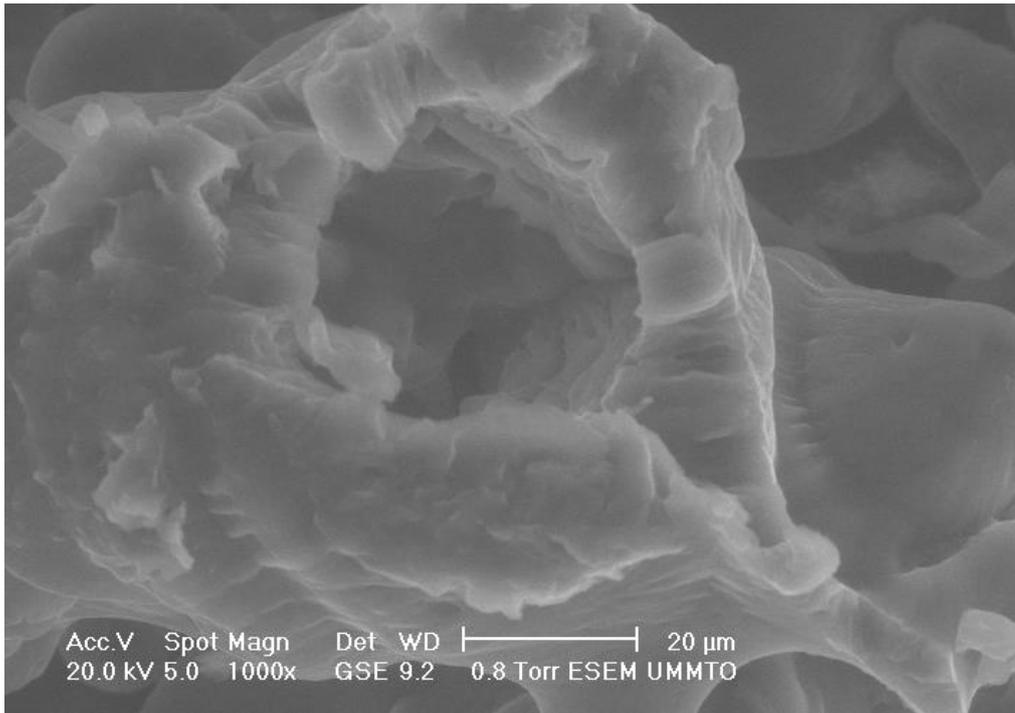


Figure n°27 : F5 observée par MEB (1000X).

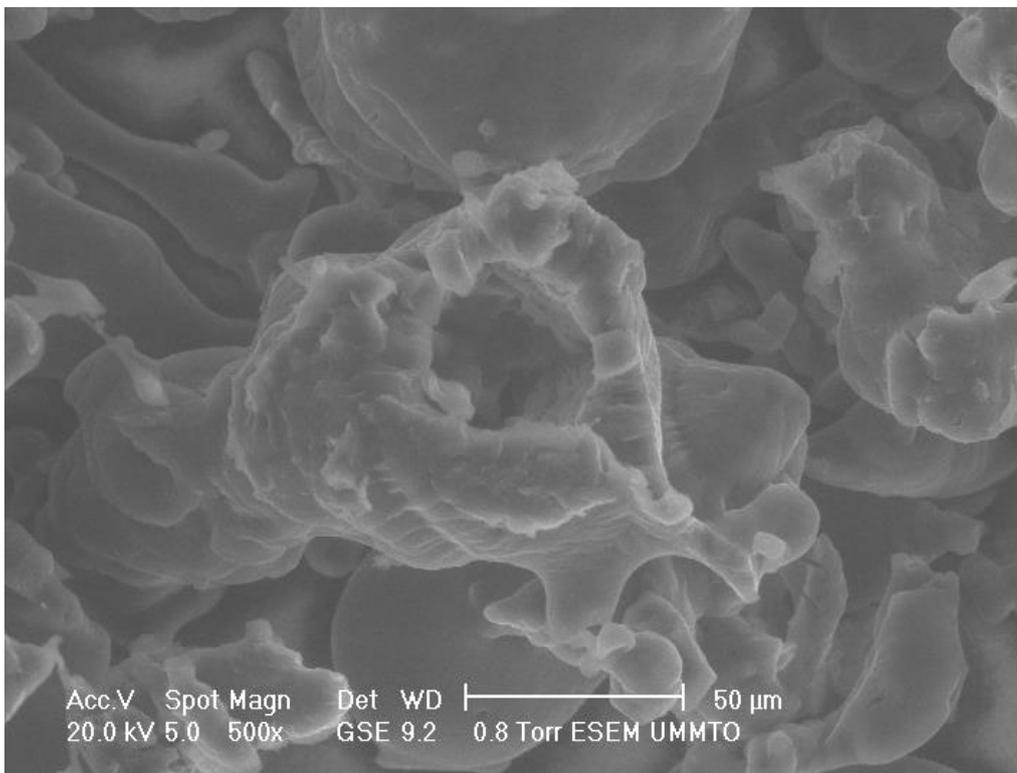


Figure n°28 : F5 observée par MEB (500X).

## Résultats et discussion

- **Observation sous microscope de la formule F5 lyophilisée (obtenue avec 1 seul lavage) F5'**

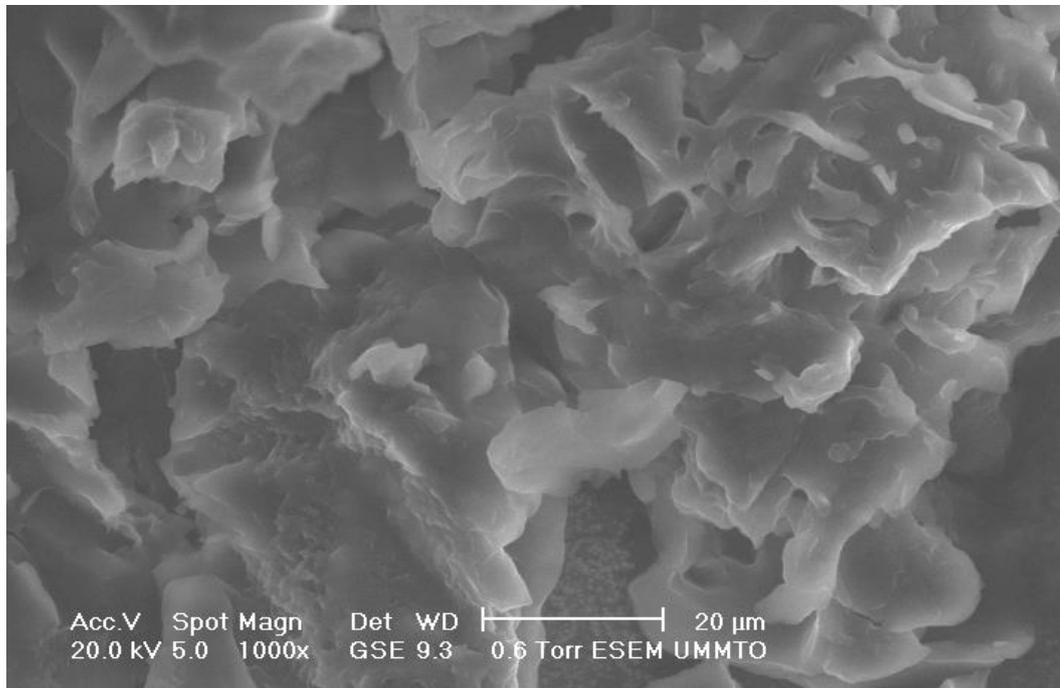


Figure n°29: F5' observée par MEB (1000X).

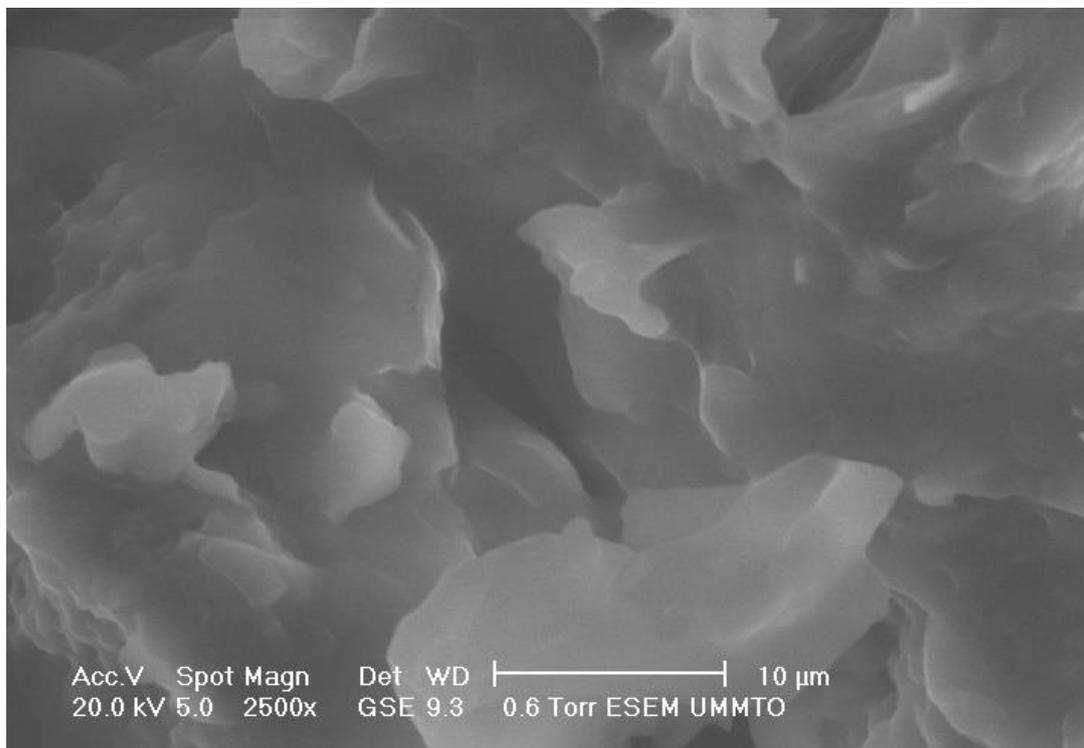


Figure n°30: F5' observée par MEB (2500X).

## Résultats et discussion

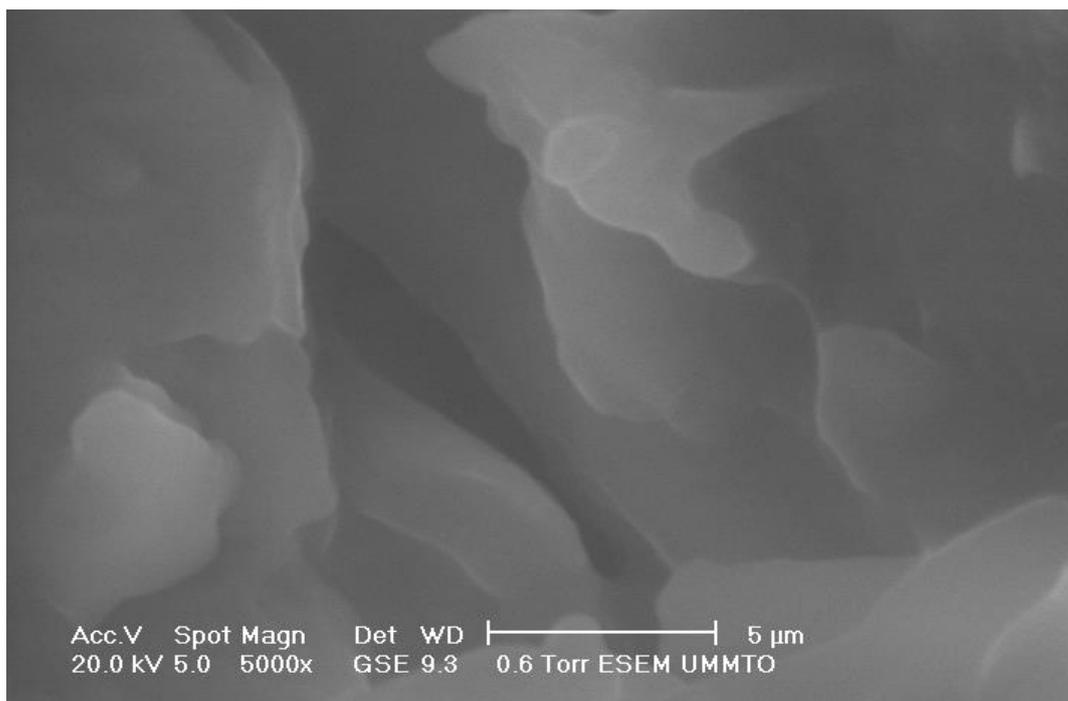


Figure n°31: F5' observée par MEB (5000X).

Les clichés obtenus de la formule 5 ne nous permettent pas de distinguer la présence de nanoparticules polymériques même à différents grossissements.

- **Observation sous microscope de la formule F3 lyophilisée**

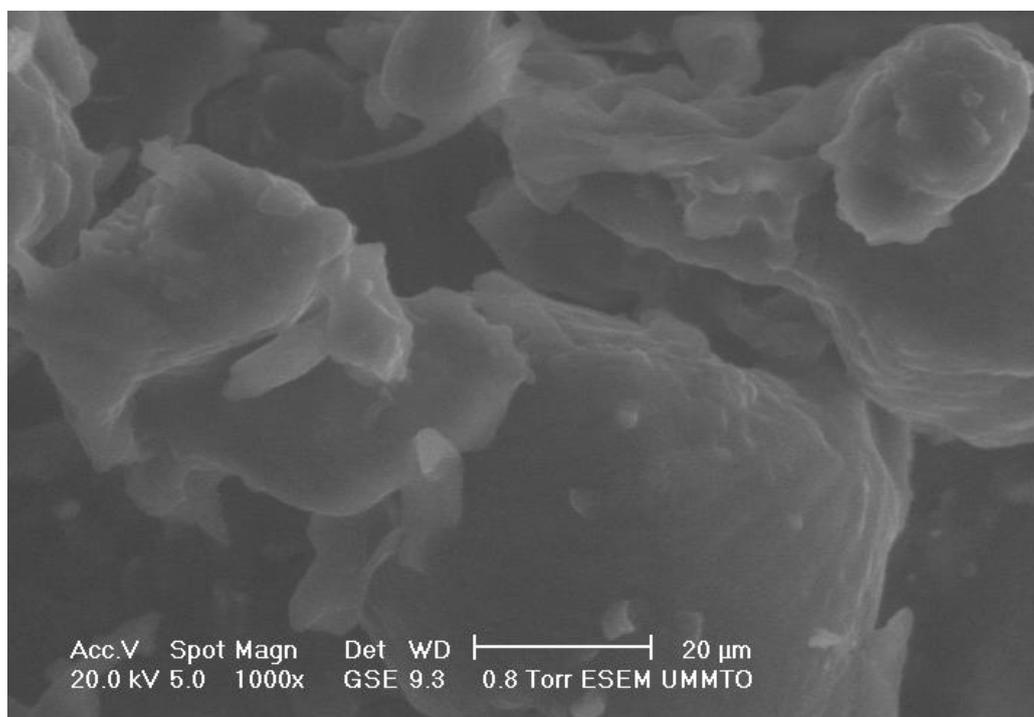


Figure n°32 : F3 observée par MEB (1000X).

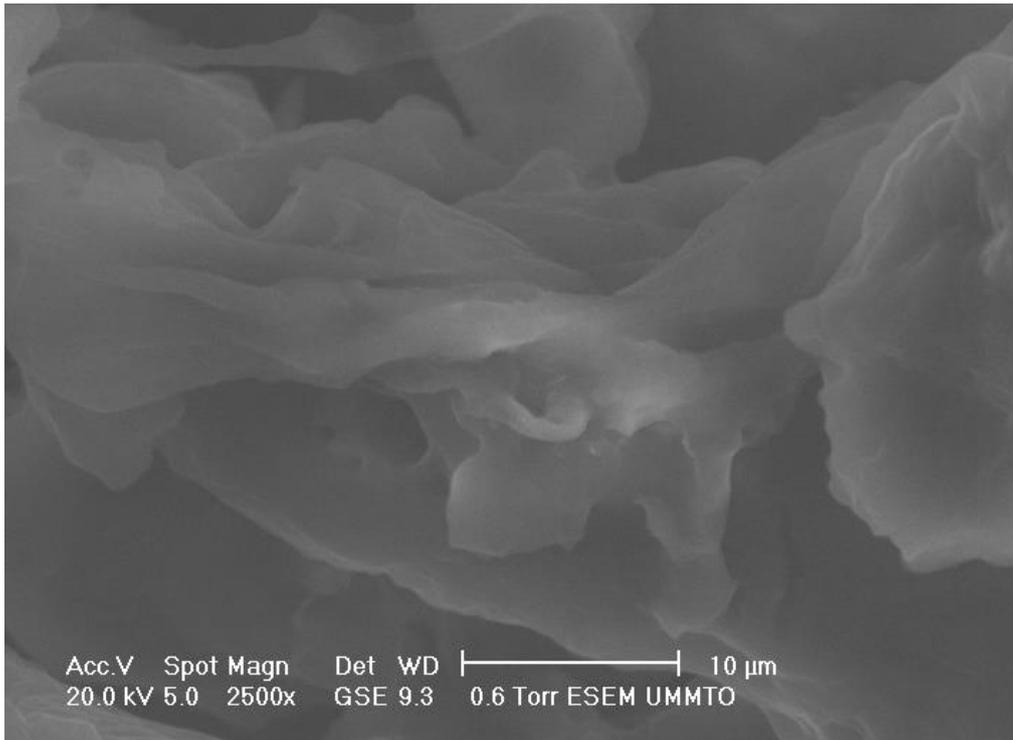


Figure n°33 : F3 observée par MEB (2500X).

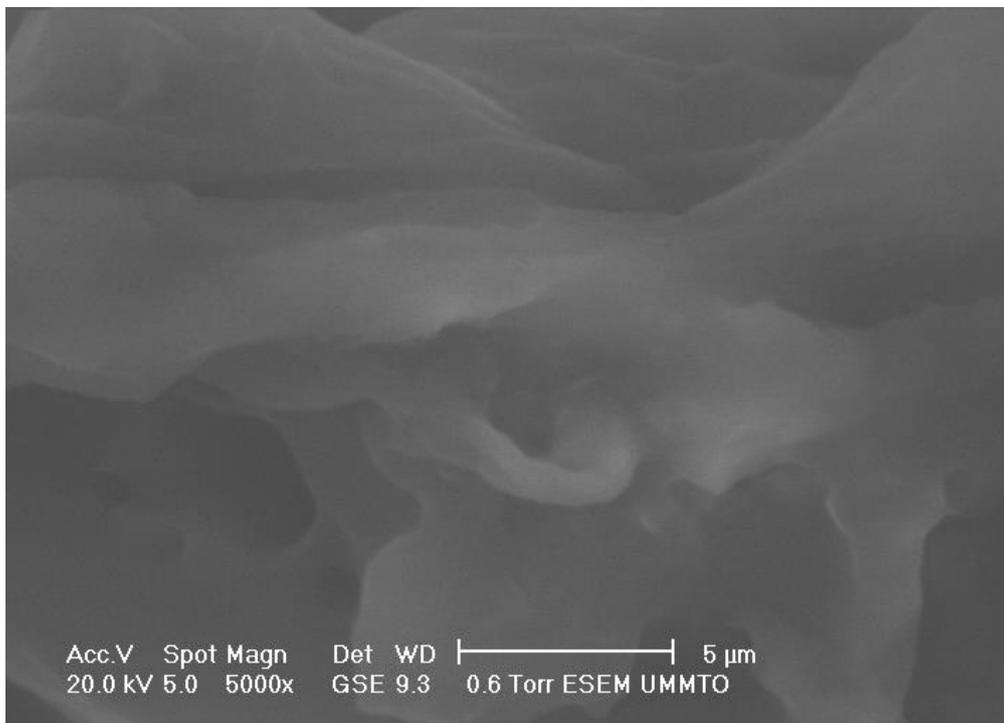


Figure n°34 : F3 observée par MEB (5000X).

- **Observation sous microscope de la formule F3 lyophilisée (sans filtration)**

Résultats et discussion

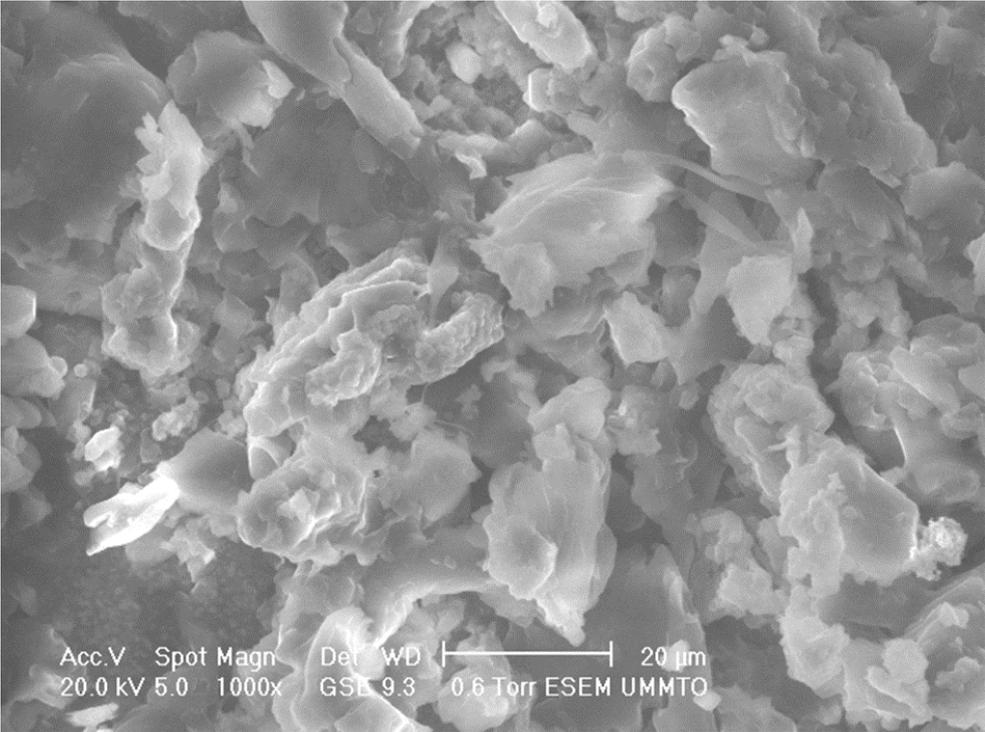


Figure n°35 : F3 (sans filtration) observée par MEB (1000X).

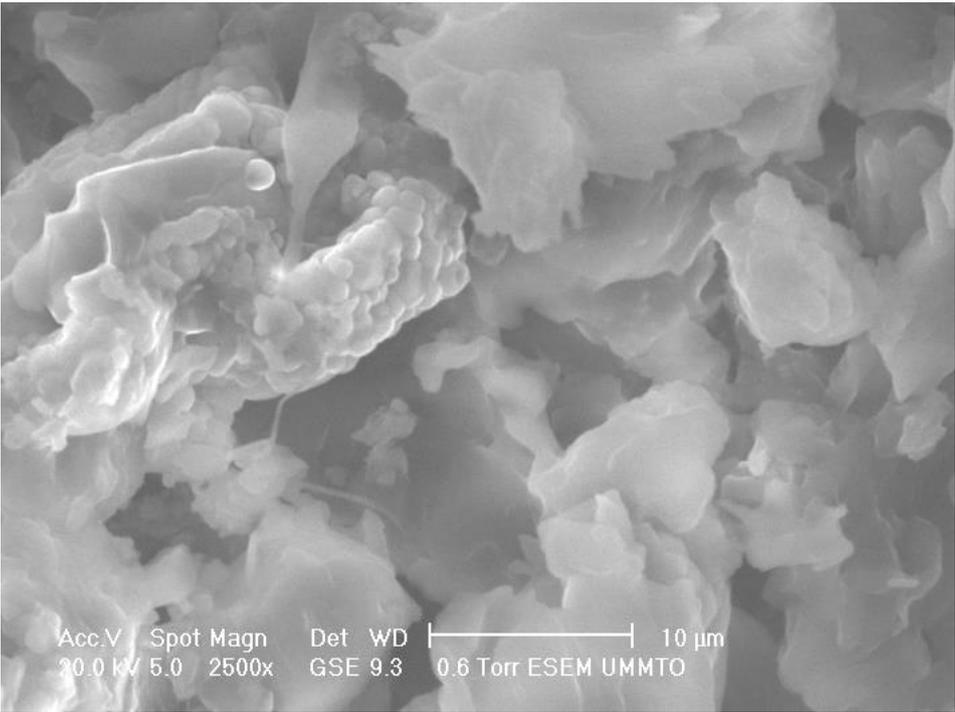


Figure n°36 : F3 (sans filtration) observée par MEB (2500X).

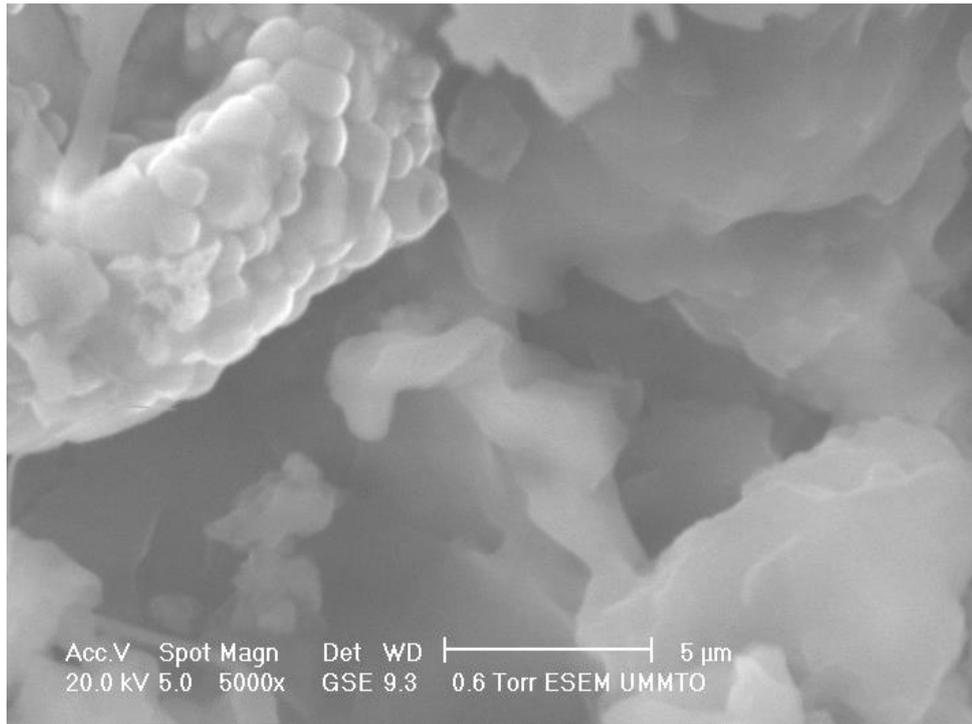
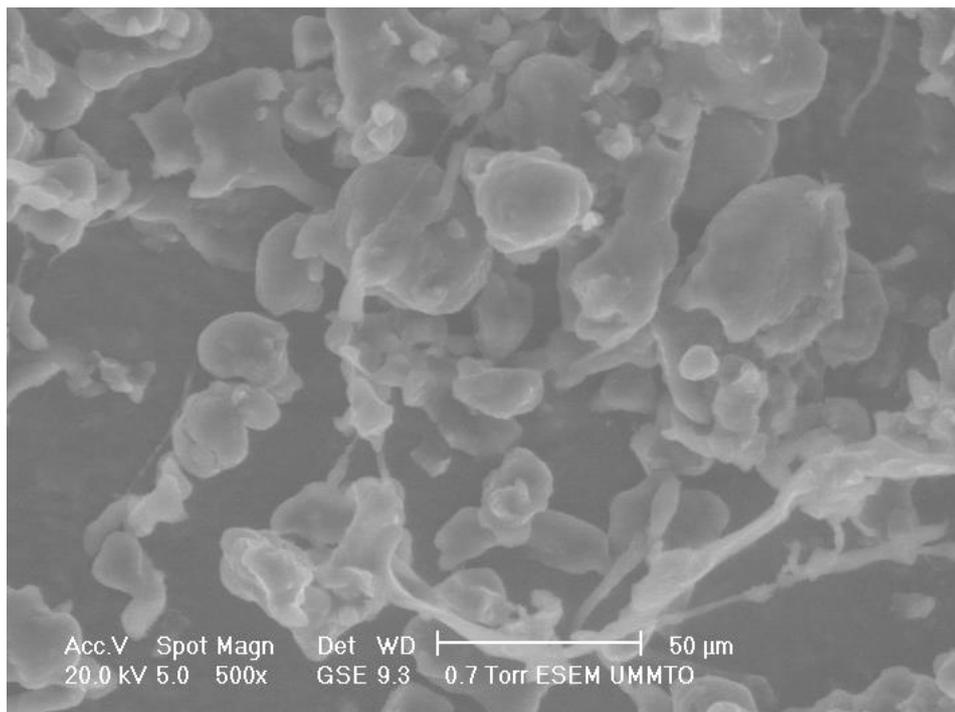


Figure n°37 : F3 (sans filtration) observée par MEB (5000X).

Les clichés de la formule 3 qui sont obtenus sans filtration permettent de distinguer des nanoparticules irrégulières, parfois agglutinées (Figure n°34 et 35). Une accumulation que l'on peut même apprécier dans les figures n°36 et 37. Cette formule ne contient pas de PEG dans sa formulation.

- **Observation sous microscope de la formule F4 lyophilisée (sans filtration)**



## Résultats et discussion

Figure n°38 : F4 (sans filtration) observée par MEB (500X).

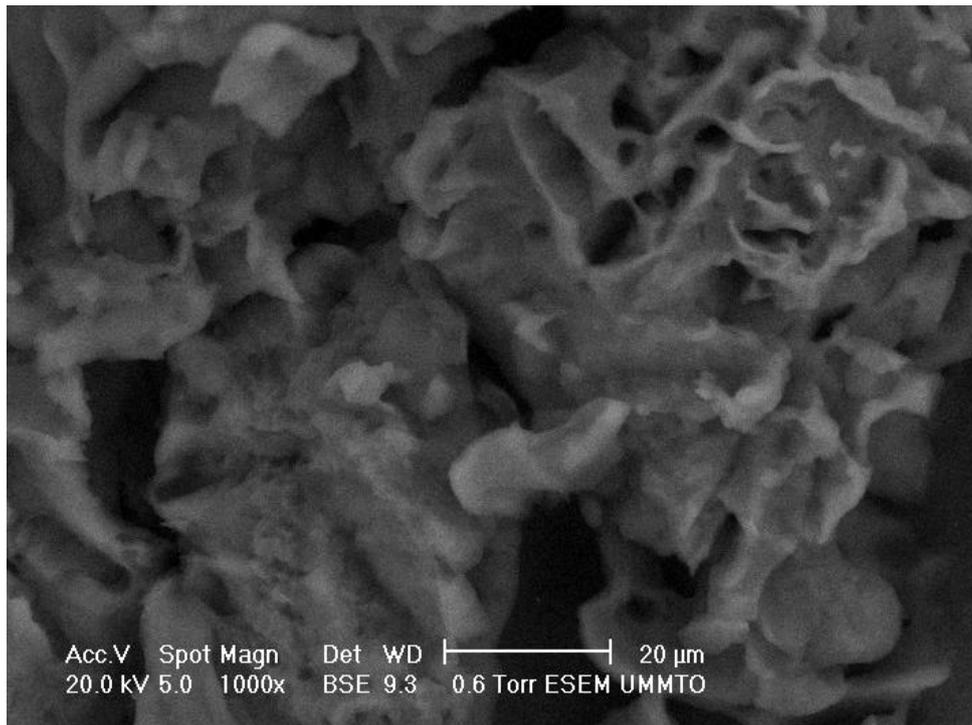


Figure n°39 : F4 (sans filtration) observée par MEB (1000X).

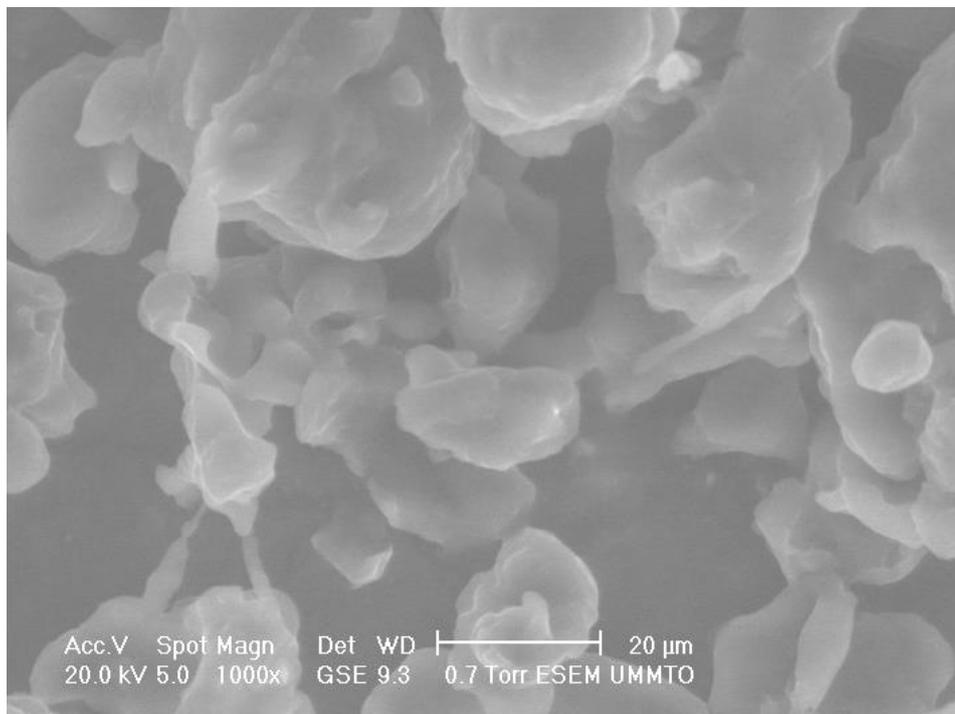


Figure n°40 : F4 (sans filtration) observée par MEB (1000X).

## Résultats et discussion

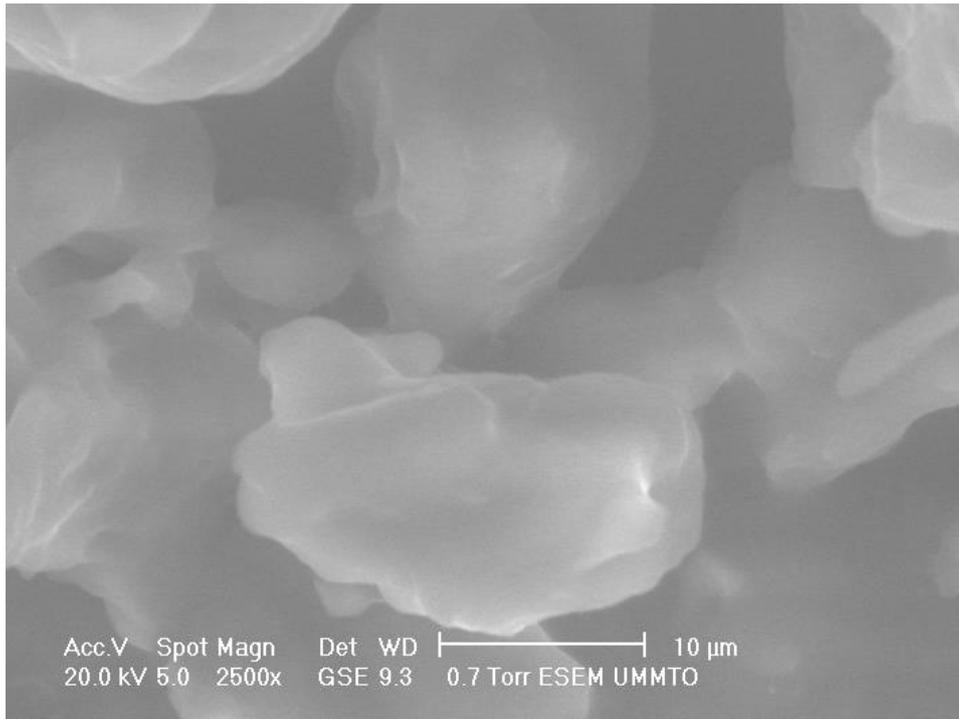


Figure n°41 : F4 (sans filtration) observée par MEB (2500X).

En présence de PEG, la forme des nanoparticules se dessine et tend à s'arrondir (Figure n°38 et 40). Il y'a moins de phénomène d'agglutination contrairement à ce qu'on a pu observer dans la formule F3.

*Conclusion*

## Conclusion

### **Conclusion :**

Dans ce travail, des nanoparticules d'alginate de sodium chargées en métronidazole ont été préparées avec succès par le procédé de nanoprécipitation.

Les méthodes sont nombreuses parmi lesquelles nous avons choisi l'homogénéisation et l'ultrasonication. Les résultats macroscopiques ainsi que les résultats de la caractérisation physico-chimiques ont permis de valider l'homogénéisation pour la production de nanoparticules polymériques dans l'optique d'encapsuler le métronidazole.

Cette méthode est suivie d'opérations consécutives, dont nous avons voulu faire ressortir l'intérêt à travers la mesure du potentiel zêta, de la taille des particules ou encore de l'indice de polydispersité. Pour les formules retenues (F3, F4 et F5), ces paramètres indiquaient des caractéristiques très acceptables.

Dans la formule principale retenue, nous retrouvons différents composants connus pour leur propriétés émulsifiantes, stabilisatrices ou encore solubilisantes. En présence du Tween® 80 et du lutrol® F68, nous avons voulu mettre au point la formule optimale qui garantit la meilleure stabilité, la taille la plus réduite ainsi qu'un bon potentiel zêta et un indice de polydispersité faible.

En effet, d'excellents résultats pour les formules F3, F4 et F5, respectivement en :

- Taille moyenne des particules égale à 20,83 ; 21,79 ; 23,42 (nm) ;
- Indice de polydispersité égal à 0,537 ; 0,566 ; 0,617 ;
- Potentiel zêta égal à -7,94 ; -11,9 ; -8,87 mV.

Des résultats prometteurs en efficacité d'encapsulation qui varient de 64,6 ; 57,9 et 54% (F3, F4 et F5 respectivement) et laissent présager beaucoup d'applications dans l'avenir.

L'analyse de la microscopie électronique à balayage a confirmé la présence de nanoparticules dont la morphologie varie en fonction de la composition et des traitements subis en termes d'opérations consécutives (filtration et lavage). Les résultats obtenus en absence de filtration concordent bien avec les résultats fournis par le Nanosizer qui affiche de meilleures valeurs pour l'indice de polydispersité, ce qui explique les formes obtenues.

## Conclusion

Les résultats de l'évaluation de l'activité antibactérienne ont permis d'envisager en perspective une étude complémentaire de l'effet dose afin de fixer la dose maximale efficace à encapsuler. Additionnellement, il serait intéressant d'observer encore plus en détail les échantillons fixés sur les microgrilles au microscope électronique à transmission et d'apprécier encore plus la taille des NPsP obtenues et leur distribution ainsi que leur état général.

La formule optimale serait donc composée idéalement de PEG, de tween 80 et de pluronic F68. Au final, nous pouvons prétendre d'avoir mis au point des NPsP par le procédé de nanoprécipitation qui offre plusieurs avantages, tels que la simplicité et la faisabilité

## Références

### Référence :

- Bilati, Ugo, Eric Allemann, et Eric Doelker. «Development of a nanoprecipitation method intended for the entrapment of hydrophilic drugs into nanoparticles.» *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2004.
- Houdy, Philippe. «La révolution des nanotechnologies.» *Risques et dangers des nanotechnologie*. 08 Novembre 2016.
- Reynouard, Louis. «La petite histoire des nanotechnologies du médical.» 1 Décembre 2018.
- Acetone*. 3 février 2010.
- Badri, Waisudin , Karim Miladi, Qand Agha Nazari, Hatem Fessia, et Abdelhamid Elaissaria. «Effect of process and formulation parameters on polycaprolactonenanoparticles prepared by solvent displacement.» *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and*, December 2016: 238–244.
- belati, ugo, Eric Allémann, et Eric Doelker. *springer link*. decembre 2005.
- Belletti, D, et al. «EXPLOITING THE VERSATILITY OF CHOLESTEROL IN NANOPARTICLES FORMULATION.» *International Journal of Pharmaceutics*, 2016: 331-340.
- Bhatia, Saurabh . *Natural Polymer Drug Delivery Systems*. Springer, Cham, 2016.
- Binesh, Nafiseh, Nafiseh Farhadian, et Alireza Mohammadzadeh. «Enhanced antibacterial activity of uniform and stable chitosan nanoparticles containing metronidazole against anaerobic bacterium of *Bacteroides fragilis*.» *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 202, n° 111691 (June 2021).
- Brenner, S, et R W Horne. «A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses.» *Biochimica et Biophysica Acta* 34 (1959): 103-110.
- Caster, Joseph, Artish Patel, Tian Zhang, et Andrew Wang. *Investigational nanomedicines in 2016*. JANVIER 2016.
- Ceruelos, A Heràndez, L.C Romero-quezada, J.C Ruvalcaba Ledezma, et L Lopez Contreras. «Therapeutic uses of metronidazole and its side effects: an update.» *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 2019: 397-401.
- Chan, Minnie , et Adah Almutairi. «Nanogels as imaging agents for modalities spanning the electromagnetic spectrum.» *The Royal Society of Chemistry 2016* 3 (September 2015): 21-40.
- Chebil, Asma. «Élaboration de nano- et microparticules pour l'encapsulation et la libération de molécules polyphénoliques ayant des applications dans le traitement de milieux aquatiques.» *HAL*. 29 May 2019. <https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01752245>.
- Chuto, G, et P Chaumet-Riffaud. «Les nanoparticulesNanoparticules.» *Médecine Nucléaire (Elsevier)* 34 (June 2010): 370-376.
- Claire , Dupas, Royer Pascal , Badillo Patrick-Yves , et Braunschweig Bertrand . *Les nanotechnologies :un nouveau paradigme*. 2012.
- Costas , Demetzos. *Pharmaceutical Nanotechnology:Fundamentals and Practical Applications*. Traduit par Parisianou S.A. 2014. Zografou, Athens: Springer Singapore, 2018, 2016.

## Références

- Crucho, Carina I.C, et Maria Teresa Barros. «Polymeric nanoparticles: A study on the preparation variables and.» *Materials Science and Engineering C*, 8 June 2017: 771–784.
- dequesnes, Audrey. «Les nanotechnologies : applications biomédicales et réglementation en Europe.» 19 juin 2019. <https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02333282/document>.
- Drugbank. *Metronidazole*. 24 May 2022. <https://go.drugbank.com/drugs/DB00916>.
- E.H, ENDO, MAKIMORI R.Y, COMPANHONI M.V.P, T.UEDA-NAKAMURA, C.V.NAKAMURA, et B.P.DIAS FILHO. «Ketoconazole-loaded poly-(lactic acid) nanoparticles: Characterization and improvement of antifungal efficacy in vitro against Candida and dermatophytes.» *Available online at ScienceDirect* (Elsevier Masson SAS) 30 (2020).
- El-Say, Khalid M, et Hossam S El-Sawy. «Polymeric nanoparticles: Promising platform for drug delivery.» *International Journal of Pharmaceutics* (Elsevier), August 2017: 75-691.
- Elzatahry, A. A, et M.S Mohy Eldin. «Preparation and characterization of metronidazole-loaded chitosan nanoparticles for drug delivery application.» *POLYMERS FOR ADVANCED TECHNOLOGIES* 19 (August 2008): 1787–1791.
- Feigenbaum, Dina, Albert Nsamirizi, et Bernard Sinclair-Desgagné. «Les nanotechnologies:leurs bénéfiques et leurs risques potentiels.» Septembre 2004. <https://www.cirano.qc.ca/files/publications/2004s-44.pdf>.
- Filipponi, Luisa, et Duncan Sutherland. 16 vols. Denmark: Interdisciplinary Nanoscience Centre (iNANO), 2010.
- Freeman, Collin D, Neil E Klutman, et Kenneth C Lamp. «Metronidazole.» *Drugs*, Nov 1997 : 679-708.
- García, Teresita Rode. «Étude de l'influence de différentes méthodes de fabrication sur l'architecture et les propriétés physico-chimiques des nanoparticules à base de PEG-b-PLA.» *Analyse et Formulation des Médicaments* ». aout 2017.
- Gupta, Swati , et Pankaj Kumar . «Drug Delivery Using Nanocarriers: Indian Perspective.» *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B*, 29 September 2012: 167–206.
- Hans, M.L, et A.M Lowman. «Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting.» *Current Opinion in Solid State and Materials Science* (Elsevier) 6 (August 2002): 319-327.
- haug, arne , et Björn Larsson. «quantitative determination of the uronic acid composition of alginates.» 1962.
- Jawad, Iain, et al. *Research policy and organisation*. Brussels: European union, 2018, 39.
- Jordanovska, Svetlana . «Les nanoparticules dans l'industrie pharmaceutique :comparaison des méthodes de fabrication.» *HAL open science*. 15 Decembre 2015. <https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01243523>.
- Kale, Santosh Nemichand, et Sharada Laxman Deore. «Emulsion Micro Emulsion and Nano Emulsion: A Review.» *Systematic Reviews in Pharmacy*, January-December 2017: 39-47.
- Krishnan, Anand , et Anil Chuturgoon, . *Integrative Nanomedicine for New Therapies*. Springer, 2020.

## Références

- Laroui , Hamed. «Nanosphères polymères à couverture de hyaluronate pour la délivrance ciblée de molécules actives dans le traitement des affections du cartilage.» *Archive ouverte HAL*. 29 mars 2018. <https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01748397>.
- Le Garrec, Dorothee . «Mise au point de micelles polymères pour la formulation.» *papyrus.bib.umontreal.ca*. Juin 2006. [https://papyrus.bib.umontreal.ca/xmlui/bitstream/handle/1866/15655/Le\\_Garrec\\_Dorothee\\_2006\\_these.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://papyrus.bib.umontreal.ca/xmlui/bitstream/handle/1866/15655/Le_Garrec_Dorothee_2006_these.pdf?sequence=1&isAllowed=y).
- Löfmark, Sonja , Charlotta Edlund, et Carl Erik Nord. *Clinical Infectious Diseases* 50 (February 2010): S16–S23.
- Maribel, Maribel I, Steven P Walsh, Zvi Schwartz, et Barbara D Boyan. «A review of polyvinyl alcohol and its uses in cartilage and orthopedic applications.» *Journal of Biomedical Materials Research Part B*, April 2012: 1451–1457.
- Martínez Rivas, Claudia Janeth, et al. «Nanoprecipitation process: From encapsulation to drug delivery.» *International Journal of Pharmaceutics* (e lsevier) 532 (2017): 66–81.
- Milton, J Harris, éd. *Poly(Ethylene Glycol) Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications*. New York: Springer Science & Business Media, 1992.
- Mora-Huertasa, C.E, H Fessi, et A Elaissari. «Pharmaceutical Nanotechnology Polymer-based nanocapsules for drug delivery.» *International Journal of Pharmaceutics* 385 (2010): 113–142.
- Passerini, Nadia, Beatrice Albertini, Marisa L González-Rodríguez, Cristina Cavallari, et Lorenzo Rodriguez. «Preparation and characterisation of ibuprofen–poloxamer 188 granules obtained by melt granulation.» *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, n° 15 (February 2002): 71-78.
- Puga, Ana M, Ana Rey-Rico, Beatriz Magariños, Carmen Alvarez-Lorenzo, et Angel Concheiro. «Hot melt poly-ε-caprolactone/poloxamine implantable matrices for sustained delivery of ciprofloxacin.» *Acta Biomaterialia* (Elsevier ), n° 8 (April 2012): 1507-1518.
- Querette, Thomas . «Développement de nanoparticules de poly(hydroxy)uréthane pH- et thermo-stimulable par nanoprécipitation.» *HAL open science*. 14 Mars 2019. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-02068015>.
- Rezigue, Meriem. «Lipid and Polymeric Nanopartucles: Drug Delivery Application.» Dans *Integrative Nanomedicine for New Therapies, Engineering Materials*,, édité par Anand Krishnan et Anil Chuturgoon, 167-230. Irbid 21163: Springer, 2020.
- Severino, Patricia , Classius F da Silva, Luciana N Andrade, Daniele de Lima Oliveira, Joana Campos, et Eliana B Souto. «Alginate Nanoparticles for Drug Delivery and Targeting.» *Current Pharmaceutical Design*, 1 mars 2019, éd. 2019: 1312-1334.
- Sharma, Abhishek Kumar, et al. «Emerging era of “somes”: polymersomes as versatile drug delivery carrier for cancer diagnostics and therapy.» *Drug Delivery and Translational Research* (Springer) 10, n° 5 (June 2020): 1171–1190.
- Sreeharsha, Nagaraja, et al. «Development of Metronidazole Loaded Chitosan Nanoparticles Using QbD Approach—A Novel and Potential Antibacterial Formulation.» *Pharmaceutics* 12 (Sept 2020).

## Références

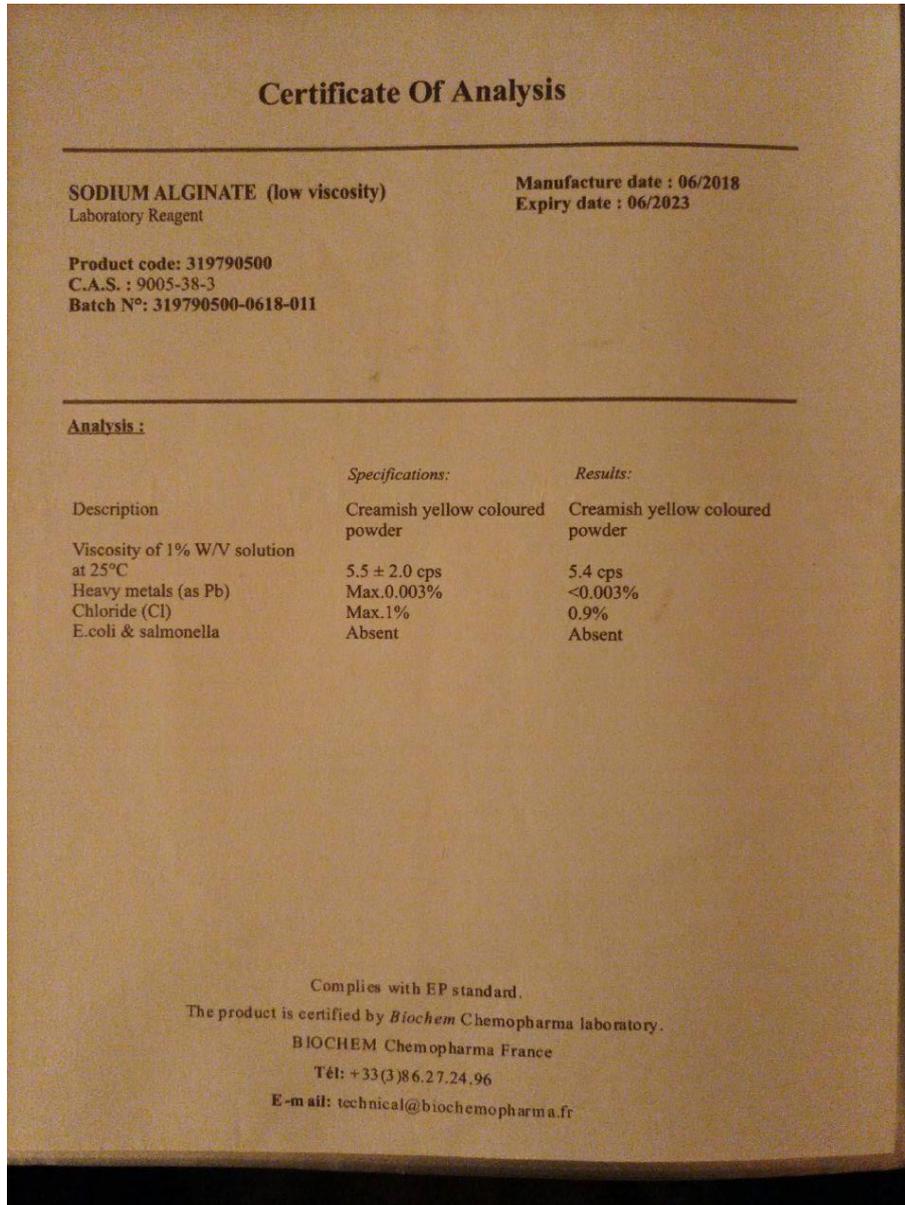
- Tóth, Tünde , et Éva Kiss. «A method for the prediction of drug content of poly(lactic-co-glycolic)acid drug carrier nanoparticles obtained by nanoprecipitation.» *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 2019.
- Vauthier, Christine, et Kawthar Bouchemal. «Methods for the Preparation and Manufacture of Polymeric Nanoparticles.» *Pharmaceutical Research*, (Springer Science + Business Media, LLC) 26, n° 5 (December 2008): 1025–1058.
- Waisudin , Badri , Karim Miladi, Nazari Qand Agha , Hatem Fessi, et Abdelhamid Elaissari. «Effect of process and formulation parameters on polycaprolactone nanoparticles prepared by solvent displacement.» *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2016: 238-244.
- Wuelfing, W Peter , Kathryn Kosuda, Allen C Templeton, Amy Harman, Mark D Mowery, et Robert A Reed. «Polysorbate 80 UV/vis spectral and chromatographic characteristics – defining boundary conditions for use of the surfactant in dissolution analysis.» *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 41 (June 2006): 774-782.

*Annexe*

# Annexe

## Annexe :

### Annexe 1 :



## Résumé

### Résumé :

Dans cette étude, des nanoparticules à base d'alginate de sodium chargées de métronidazole ont été préparées par la méthode de déplacement de solvant ou la nanoprécipitation. L'alginate de sodium a été dissous dans un mélange d'eau et d'acétone et introduite dans un mélange aqueux contenant le poloxamère188 (Lutrol ® F68), le polysorbate (Tween80®), le polyéthylène glycol (PEG), l'alcool polyvinylique (PVA) ou les deux en même temps. Les résultats obtenus pour les formules F3, F4 et F5 indiquent des tailles moyennes de 20,83 ; 21,79 ; 23,42 (nm) ; un Indice de polydispersité égal à 0,537 ; 0,566 ; 0,617 et un Potentiel zêta égal à -7,94 ; -11,9 ; -8,87 mV, respectivement. L'observation au MEB a clairement démontré la présence de nanoparticules dont la morphologie et l'état de surface dépend étroitement de la composition et des traitements consécutifs tels que le nombre de lavage ou la filtration. Ceci vient confirmer les données physicochimiques. De plus, avec des valeurs encourageants en efficacité d'encapsulation, respectivement de 64,6 ; 57,9 et 54%, on peut espérer des applications diverses tant sur le plan ciblage thérapeutique que pour l'exploration diagnostic.

**Les mots clés :** la nanoprécipitation, les nanoparticules polymérique, le métronidazole, l'alginate de sodium.

### Abstract:

In this study, sodium alginate nanoparticles loaded with metronidazole were prepared by the solvent displacement method or nanoprecipitation. Sodium alginate was dissolved in a mixture of water and acetone and introduced into an aqueous mixture containing poloxamer188 (Lutrol ® F68), polysorbate (Tween80®), polyethylene glycol (PEG), polyvinyl alcohol (PVA) or both of them. The results obtained for formulas F3, F4 and F5 indicate average sizes of 20.83; 21.79; 23.42 (nm); Polydispersity Index equal to 0.537; 0.566; 0.617 and Zeta Potential equal to -7.94; -11.9; -8.87 mV, respectively. The SEM observation clearly demonstrated the presence of nanoparticles whose morphology and surface state closely depend on the composition and subsequent treatments such as the number of washes or filtration. This confirms the physicochemical data. Moreover, with encouraging values in encapsulation efficiency, respectively 64.6, 57.9 and 54%, we can hope for various applications in both therapeutic targeting and diagnostic exploration.

## Résumé