REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURE ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE DE MEDEA

FACULTE DES SCIENCES



Mémoire

Présenté pour obtenir le diplôme de **Master**

En chimie
Spécialité : Chimie Pharmaceutique

Par :

BENMOUSSA Imen
HALES Imene

Thème :

Elaboration de microparticules à base de matrices complexes pour la libération prolongée d'un principe actif biologique

Soutenue publiquement le : 29 /05/2019, Devant le jury composé de :

Dr. YAHOUM MADIHA M	Grade : MCB	Etablissement : UYFM	Présidente
Dr. GHERDAOUI DEHBIA	Grade : MAB	Etablissement : UYFM	Examinatrice
Dr. REBOUH SAMIA	Grade : MCA	Etablissement : UYFM	Encadreur
Dr.LEFNAOUI SONIA	Grade : MCA	Etablissement : UYFM	Co-Encadreur

Année universitaire 2018/2019

الملخص
الهدف من هذا العمل هو الكبسلة باستخدام عملية التبلور الأيونية لبروتين نشط (الأنسولين) في مصفوفة بوليميرية قابلة للتحلل من الكابا كاراجينان. وقد سمحت عملية التبلور من الحصول على كبسولات صغيرة بمتوسط حجم 179,85 ميكروميتر . بلغ معدل التغليف 86,41 ميكرون مع تركيز 2,5 ٪ من الكابا كاراجينان. أعطت دراسة حركية تضخم الكبسولة في المعدة والوسائط المعوية معدلات تضخم تصل الى ٪ 23,85 في الوسط المعدي و156,98٪ في الوسط الأمعائي. أظهرت دراسة المستحضرات الصيدلانية الحيوية تحريرا تاما للأنسولين من خلال الكبسولات، خاصة تلك المحضرة من (1,0٪ و1,5٪ من الكابا كاراجينان) في الوسائط المعوية والذي وصل الى 100٪ بعد 4 ساعات. ومع ذلك فقد لوحظ إطلاق محدود في الوسط المعدي بحد أقصى 26٪ في حالة الكبسولات القائمة على (1,0٪ من الكابا كاراجينان). تم العثور على إطلاق بطيء وتدريجي في درجة الحموضة 6,8 للكبسولات التي تحتوي على 2,5٪ من الكابا كاراجينان مع معدلات إطلاق 100٪ للعنصر النشط بعد 8 ساعات. تظهر ملامح الذوبان حركية تحرير ممدد للانسولين من كبسولات الكابا كاراجينان ولا سيما الكبسولات التي تحوي 2,5٪.

الكلمات المفتاحية: أنسولين، كابا كاراجينان، تغليف، تحرير ممدد.

Résumé
L'objectif de ce travail est l'encapsulation selon le procédé de gélification ionotropique d'un principe actif biologique (Insuline) dans une matrice polymérique biodégradable de kappa carraghénane (KC). Le procédé de gélification a permis l'obtention de microcapsules de taille moyenne de 179.85µm. Le taux d'encapsulation a atteint 86.41 % à une concentration de 2.5% en KC. L'étude de la cinétique de gonflement des capsules dans les milieux gastriques (pH=1.2) et intestinal (pH=6.8) a donné des taux de gonflement atteignant 23.85% dans le milieu gastrique et 156.98% dans le milieu intestinal. L'étude biopharmaceutique a montré une libération complète de l'insuline à partir des capsules, spécialement celles préparées à partir de (1.0% et 1.5% de KC) en milieu intestinal atteignant 100% après 4 h. Cependant, une libération limitée a été observée dans le milieu gastrique (pH=1.2) avec un maximum de 26% observé dans le cas des capsules à base de 1.0% de KC. Une libération lente et progressive est retrouvée à pH=6.8, pour les capsules à base de 2.5% de KC avec des taux de libération de 100% du principe actif au bout de 8h. Les profils de dissolution montrent une cinétique de libération prolongée de l'insuline, à partir des capsules de KC, plus particulièrement les capsules à 2.5%.

Mots clés : Insuline, Kappa-carraghénane, encapsulation, libération prolongée.

Abstract:
The objective of this work is the encapsulation using the ionotropic gelling process of a biological active ingredient (insulin) in a biodegradable polymeric matrix of kappa carrageenan (KC). The gelling process has allowed obtaining microcapsules with average size of 179.85 µm. The encapsulation rate has reached 86.41% at a concentration of 2.5% in KC. The study of the capsules swelling kinetics in the gastric (pH=1.2) and intestinal (pH=6.8) media has given swelling rates reaching 23.85% in the gastric medium and 156.98% in the intestinal medium. The biopharmaceutical study has showed a complete release of insulin from the capsules; especially those prepared from (1.0% and 1.5% KC) in intestinal media reaching 100% after 4 hours. However, limited release was observed in the gastric medium (pH=1.2) with a maximum of 26% observed in the case of capsules based on 1.0% of KC A slow and progressive release is found at pH=6.8, for 2.5% KC-based capsules with 100% release rates of the active ingredient after 8 hours. Dissolution profiles show sustained release kinetic of insulin from KC capsules, more particularly 2.5% capsules.

Key words: Insulin, Kappa-carrageenan, encapsulation, sustained release.

Remerciements

En préambule à ce mémoire nous remercions ALLAH qui nous aide et nous donne la patience et le courage durant ces longues années d'étude.

Nous souhaitons adresser nos remerciements les plus sincères aux personnes qui nous ont apporté leur aide et qui ont contribué à l'élaboration de ce mémoire ainsi qu'à la réussite de cette formidable année universitaire.

Ces remerciements vont tout d'abord au corps professoral et administratif de la Faculté des Sciences, Université YAHIA FARES à Médéa, pour la richesse et la qualité de leur enseignement et qui déploient de grands efforts pour assurer à leurs étudiants une formation actualisée.

Les premières personnes que nous tenons à remercier sont nos encadrants : Dr. REBOUH.S, Maitre de Conférence classe A et Dr. LEFNAOUI.S, Maitre de Conférence classe A à l'université de Médéa, pour l'orientation, la confiance, la patience ainsi pour l'inspiration, l'aide et le temps qu'elles ont bien voulu nous consacrer qui ont constitué un apport considérable sans lequel ce travail n'aurait pas pu être mené au bon port. Qu'elles trouvent dans ce travail un hommage vivant à leurs hautes personnalités.

Nos vifs remerciements vont également aux membres du jury Dr. YAHOUM M, Maitre de conférence classe B, à l'université de Médéa et Dr. GHERDAOUI D, Maitre assistant classe B, à l'université de Médéa pour l'intérêt qu'elles ont porté à notre recherche en acceptant d'examiner notre travail et de l'enrichir par leurs propositions.

Je tiens aussi à remercier très chaleureusement Melle. BOUKARA K. pour son accueil, son aide, son attention et sa gentillesse tout au long de notre stage, qui en a fait un moment très plaisant et intéressant.

On n'oublie pas nos parents pour leur contribution, leur soutien et leur patience.

Enfin, nous adressons nos plus sincères remerciements à tous nos proches et amis, qui nous ont toujours encouragées au cours de la réalisation de ce mémoire.

Merci à tous et à toutes.

Dédicace

Je dédie ce travail qui n'aura jamais pu voir le jour sans les soutiens indéfectibles et sans limite de mes chers parents qui ne cessent de me donner avec amour le nécessaire pour que je puisse arriver à ce que je suis aujourd'hui.
Que dieux vous protège et que la réussite soit toujours à ma portée pour que je puisse vous combler de bonheur.

Je dédie aussi ce travail à :
_ Mon cher frère Saleh Abderehmane
_ Mes chères sœurs Fatma zohra & Khawla
_ Ma chère amie Karima .
_ Mes grands-parents.
_ Mes oncles, mes tantes et leur famille.
_ Tous mes cousins et cousines.
_ l'Académie Iqraa
_ Tous mes amis, mes collègues et tous ceux qui m'estiment.

Benmoussa Imen

Dédicace

Toutes les lettres ne sauraient trouver les mots qu'il faut…
Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude,
L'amour, le respect, la reconnaissance…
Aussi, c'est tout simplement que
Je dédie cette thèse …

À Mes Chers Parents
Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour Éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consentie pour mon instruction et mon bien être.
Je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance et j'espère que votre bénédiction m'accompagne toujours.
Que ce modeste travail soit l'exaucement de vos vœux tant formulés, le fruit de vos innombrables sacrifices, bien que je ne vous en acquitterai jamais assez.
Puisse Dieu, le Très Haut, vous accorde santé, bonheur et longue vie et faire en sorte que jamais je ne vous déçoive.

À Ma Chère Sœur Lynda
À Mon frère Sam, Ma belle-sœur et Mes nièces
À Mon Amie Intime Amina
À Mes amies proches : Mon binôme Imen & Houta :
À Mes chères Grand Mères

À La Mémoire De Mon Grand-Père « el hadj Said Hales »

J'aurais tant aimé que vous soyez présents. Que Dieu ait vos âmes dans sa sainte miséricorde

À Mes Oncles, Tantes, Leurs Epoux Et Epouses
A Mes Cousins Cousines
À Mes Amis De Toujours
À Académie iqraa, mes collègues et mes chères élèves

À toutes les personnes *qui ont participé à l'élaboration de ce travail à tous mes collègues et tous ceux que j'ai omis de citer.*

Hales Iméne

Sommaire

Nomenclature

Abréviation

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction générale ……..... *01*

Chapitre I : Diabète et insuline

I.1	INTRODUCTION…….....	***03***
I.2	GENERALITES SUR LE DIABETE……..	***03***
I.2.1	Définition du diabète …….	***03***
I.2.2	Structure du pancréas……...	***05***
I.2.3	différents types de diabète ……	***06***
I.3	L'INSULINE ……...	***06***
I.3.1	Définition……	***06***
I.3.2	La structure chimique de l'insuline …….	***06***
I.3.3	Synthèse de l'insuline à partir de la pré-pro-insuline…….	***07***
I.3.4	Caractéristiques de l'insuline …….	***09***
I.3.5	Rôle physiologique…….	***10***
I.3.5.1	Action sur le métabolisme glucidique……...	***10***
I.3.5.2	Action sur le métabolisme lipidique …….	***11***
I.3.5.3	Action sur le métabolisme protéique ……	***11***
I.3.5.4	Autres actions de l'insuline ……...	***11***
I.3.6	Origine de l'insuline ……..	***12***
I.3.6	Les différents types d'insulines développées par l'industrie pharmaceutique……..	***13***
I.3.7	Voies d'administration de l'insuline…….	***13***
I.3.7.1	La voie orale ……	***14***
I.4	CONCLUSION……	***16***

Chapitre II : L'encapsulation pharmaceutique

II.1	INTRODUCTION …….	***17***
II.2	GENERALITES SUR L'ENCAPSULATION……	***17***
II.2.1	Définition……	***17***
II.2.2	Objectifs de l'encapsulation …….	***17***
II.3	LES MICROPARTICULES ……..……	***18***

II.3.1	Définition ……..	***18***
II.3.2	Type des microparticules …….	***18***
II.3.3	Composition d'une capsule …….	***20***
II.4	Technique d'encapsulation ……..	***20***
II.4.1	procédés d'encapsulation chimique ……	***21***
II.4.2	Procédés d'encapsulation physico-mécanique ……...	***21***
II.4.3	procédés d'encapsulation physico-chimique ……..	***21***
II.5	GENERALITES SUR LES BIOPOLYMERES ……	***23***
II.5.1	Définition……	***23***
II.5.2	Propriétés des biopolymères ……	***23***
II.5.2.1	Biodégradabilité ……...	***24***
II.5.2.2	Biocompatibilité et biorésorbabilité…….	***24***
II.5.3	Différentes familles de biopolymère ……	***25***
II.5.4	Les polysaccharides …….	***26***
II.5.5	Les carraghénane …….	***28***
II.5.5.1	Définition ……...	***28***
II.5.5.2	Obtention des carraghénanes et composition chimique ……	***28***
II.5.5.3	Propriétés physico-chimiques des carraghénanes …….	***30***
II.5.5.4	Utilisation des carraghénanes……..	***31***
II.5.5.5	Les paramètres affectant le processus de gélification des carraghénanes ……	***32***
II.5.5.6	Influence de différents paramètres physico-chimiques sur le comportement des carraghénanes ……	***33***
II.6	CONCLUSION ……..	***34***

Chapitre 3 : Partie Expérimentale

III.1	INTRODUCTION …….	***35***
III.2	MATERIELS ET METHODES ……...	***35***
III.2.1	Matériels …….	***35***
III.2.2	Réactifs et produits chimiques ……..	***36***
III.3	PREFORMULATION ……	***36***
III.3.1	Principe actif : Insuline humain……..……	***36***
III.3.1.1	Identification par FTIR ……..	***37***
III.3.1.2	Dosage de l'insuline par spectroscopie UV-Visible…….	***41***

Sommaire

III.3.2	Le Biopolymère : Kappa carraghénane …..……	***45***
III.3.3	Evaluation des interactions entre l'Insuline et le KC ……...	***51***
III.4	FORMULATIONDES CAPSULES ……...	***53***
III.4.1	Méthode d'encapsulation ……...	***53***
III.4.2	Mode opératoire ……..	***53***
III.4.3	Caractérisation des capsules ……..	***55***
III.4.3.1	Morphologie de capsules humides et sèches ……..	***55***
III.4.3.2	Analyse granulométrique des capsules …….	***56***
III.4.3.3	Etude du gonflement des capsules …….	***59***
III.4.3.3.4	Détermination des taux d'encapsulations …….	***62***
III.4.3.3.5	Etude de la libération in vitro du principe actif à partir des capsules …….	***64***
III.6	CONCLUSION ……	***67***
	Conclusion générale ……..	***69***

Liste des Nomenclatures

Nomenclature	
A	Absorbance
C	Concentration de la substance analysée (en mol/l)
CCr	concentration critique
DO	Densité optique
I	Intensité transmise
I0	Intensité de la lumière incidente
L	Epaisseur traversée (cm).
mg	Masse des capsules à l'état gonflé
mi	Masse des capsules à l'état initial
T	Transmittance
λ	Longueur d'onde
ε	Coefficient d'extinction

Liste des Abréviations

Abréviation	Dénomination
AA	Acide Aminé
ADN	Acide désoxyribonucléique
CEN	Comité Européen de Normalisation
Da	Dalton
DID	Diabète Insulino-Dépendant
DNID	Diabète Non Insulino-Dépendant
DO	Densité Optique
F	Formule
FTIR	Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier
HbAlc	Hémoglobine glyquée
IGF	Insuline like growth factor
KC	Kappa Carraghénane
OMS	Organisation Mondiale de la santé
PA	Principe actif
PEG	Polyéthylène glycoL
PLGA	Poly Lactic-co-Glycolic Acid
PP	Polypeptide pancréatique
PVA	Polyvinyl Alcohol
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
UV-VIS	Ultraviolet-visible

CHAPITRE I : Diabète et insuline

Figure I.1 prévalence du diabète dans le monde en 2014 par géographique et projection en 2035 ..... ***04***

Figure I.2 Schématisation de la structure du pancréas ***05***

Figure I.3 Structure chimique de l'insuline ***07***

Figure I.4 Structure de la pro-insuline ***08***

Figure I.5 Biosynthèse de l'insuline à partir de la pré-pro-insuline ***09***

Figure I.6 Double rôle du pancréas au sein de l'organisme ***10***

Figure I.7 Régulation de la glycémie par l'insuline et le glucagon ***11***

Figure I.8 Production de l'insuline par génie génétique ***12***

Figure I.9 Action hypoglycémiante et durée d'action des différents types d'insulines ... ***13***

Figure I.10 Voies d'administration des médicaments ***14***

CHAPITRE II: L'Encapsulation pharmaceutique

Figure.II.1 Structure d'un liposome ***19***

Figure.II.2 Représentation schématique d'une microcapsule ***19***

Figure.II.3 Représentation schématique d'une microcapsule..... ***20***

Figure.II.4 Principe de la coacervation simple : dispersion du principe actif dans la solution de polymère : (a) formation des gouttelettes de coacervat, (b) dépôt du coacervat, (c) Fusion des gouttelettes de coacervat et formation d'un enrobage continu, (d) Solidification de l'enveloppe(e)..... ***23***

Figure.II.5 Libération contrôlée des principes actifs..... ***25***

Figure.II.6 Formules chimiques de divers polysaccharides..... ***26***

Figure.II.7 Structure chimique des iota et des kappa carraghénanes ***29***

CHAPITRE III: Partie Expérimental

Figure III.1 Structure chimique de l'Insuline humain ***37***

Figure III.2 Pastilleuse sous presse avec application de vide ***39***

Figure III.3 Spectre FTIR de l'insuline (% Absorbance) ***40***

Figure III.4 Spectre FTIR de l'insuline (% transmittance) ***40***

Figure III.5 spectre-uv visible d'insuline dans des solutions tampons à pH 1.2 et pH 6.8. ***42***
Figure III.6 Courbe d'étalonnage de l'insuline à pH 1.2 ..... ***44***
Figure III.7 Courbe d'étalonnage de l'insuline à pH 6.8 ..... ***44***
Figure III.8 Algue rouge desséchées ***45***
Figure III.9 Structure chimique du Kappa Carraghénane (KC) ***45***
Figure III.10 Poudre du kappa carraghénane ***46***
Figure III.11 Vscosimétre rotatif**(brookfield)** ***46***
Figure III.12 Courbe de viscosité en fonction de concentration en KC (%) ***47***
Figure III.13 conductimètre **(a)** pH mètre **(b)** ***48***
Figure III.14 Variation de la conductivité et du pH des solutions de KC ***49***
Figure III.15 Spectre FTIR de KC (% transmittance) ***50***
Figure III.16 Spectre FTIR de KC (% Absorbance) ***50***
Figure III.17 Spectre FTIR du mélange KC / Insuline (% transmittance) ***52***
Figure III.18 **S**pectre FTIR du mélange KC / Insuline (% absorbance) ***52***
Figure III.19 Procédé d'encapsulation de l'Insuline par gelification ionotropique du KC.. ***54***
Figure III.20 Microcapsules après filtration : **(A)** 1% **, (B**) 1.5% **, (C)** 2%, **(D)** 2.5% ***55***
Figure III.21 Microcapsules après séchage : **(A)** 1% **, (B**) 1.5% **, (C)** 2%, **(D)** 2.5% ***56***
Figure III.22 Micromètre digital ***57***
Figure III.23 Dimensions des capsules (avant et après séchage) ***58***
Figure III.24 Cinétique de gonflement des capsules (pH1.2**)** ***60***
Figure III.25 Cinétique de gonflement des capsules (pH6.8**)** ***60***
Figure III.26 Résultats de taux d'encapsulation ***62***
Figure III.27 Taux de gonflement à l'équilibre des capsules..... ***63***
Figure III.28 Test de dissolution SOTAX ***65***
Figure III.29 Cinétique de dissolution in vitro des capsules dans le milieu pH1.2 ..... ***66***
Figure III.30 Cinétique de dissolution in vitro des capsules dans le milieu pH6,8..... ***67***

Liste des tableaux

CHAPITRE I : Diabète et insuline

Tableau I.1 Récapitulatif des avantages et inconvénients des différentes voies D'administration pour l'insuline…….. ***15***

CHAPITRE II : Encapsulation pharmaceutique

Tableau II.1 Origine des polysaccharides…….. ***27***

Tableau 1.2 Propriétés physico-chimiques des carraghénanes…….. ***31***

CHAPITRE III : Partie expérimentale

Tableau III.1 Les matériels utilisé…….. ***35***

Tableau III.2 Caractéristiques des réactifs utilisés…….. ***36***

Tableau III.3 Préparation des dilutions utilisé pour les courbes d'étalonnage (pH 1.2 et pH6.8**)**…….. ***43***

Tableau III.4 Résultats de l'ajustement des courbes d'étalonnage d'insuline…… ***44***

Tableau III.5 Formulation des capsules à base de KC contenant le principe actif « Insuline » …….. ***54***

Tableau III.6 Taille des capsules obtenues à différentes concentrations avant séchage…. ***57***

Tableau III.7 Taille des capsules obtenues à différentes concentrations après séchage…. ***57***

Introduction Générale

La pharmacie galénique moderne a développé des systèmes d'administration susceptibles de promouvoir le passage transmembranaire et/ou intracellulaire vers la cible souhaitée, tout en protégeant le principe actif de la dégradation par les enzymes.

L'administration du principe actif par voie orale a été, généralement la voie la plus commode et la plus utilisée, une fois administré par la bouche, le principe actif passe rapidement à la partie gastro-intestinale. Cette voie présente quelques inconvénients lorsqu'il s'agit d'administrer des principes actifs qui sont caractérisés par une faible biodisponibilité et qui sont peu stables en milieu physiologique.

Pour cela, une nouvelle stratégie thérapeutique a été développée afin d'augmenter la biodisponibilité orale des médicaments de certains principes actifs. Il s'agit de l'encapsulation du principe actif dans des matériaux polymères biodégradables. En général, dans l'industrie pharmaceutique, l'encapsulation vise à réduire la toxicité et les effets secondaires d'un principe actif, à augmenter sa solubilité et/ou sa stabilité et à favoriser une libération dans l'organisme. Elle permet surtout de réduire l'irritation du tractus gastro-intestinal due à des médicaments administrés par voie orale

L'encapsulation est parmi les préparations pharmaceutiques en cours d'élaboration par les grandes firmes médicamenteuses, qui consiste à encapsuler selon un procédé déterminé un principe actif dans une autre matière inactive afin d'améliorer les propriétés de conservation, de présentation et de biodisponibilité

Certains polysaccharides naturellement issus de certaines variétés d'algues rouges, comme les carraghénanes sont utilisés dans l'industrie agroalimentaire et dans le domaine médical, en particulier dans le domaine de la vectorisation de principes actifs. Grace à ses propriétés de biocompatibilité et de biodégradabilité, le kappa carraghénane (KC) est utilisé dans la libération contrôlée des principes actifs encapsulés.

C'est dans ce contexte que s'inscrit la présente étude dont l'objectif principal est la formulation d'un système d'encapsulation du principe actif biologique 'Insuline', à base d'un biopolymère polysaccharide, le KC. La méthode utilisée pour la mise au point de ce système est la gélification ionotropique en présence de chlorure de potassium comme agent de réticulation.

Dans cette optique, ce mémoire est structuré en trois chapitres :

- *Un premier chapitre* regroupant des généralités sur la maladie du diabète (définition, structure du pancréas, les différant types de diabète) et l'insuline (structure, caractéristiques, origine …).
- *Le deuxième chapitre* consiste à présenter l'essentiel de l'encapsulation en pharmacie. Ainsi dans ce chapitre sont cités les différents types de microparticules, les différents procédés et méthodes d'encapsulation ainsi que les objectifs de l'encapsulation. Ce chapitre donne également des généralités sur les biopolymères, spécialement le biopolymère utilisés dans ce présent travail (kappa carraghénane).
- *La partie expérimentale*, présentée dans le chapitre 3 résume l'ensembles des techniques et les résultats expérimentaux réalisés lors de cette étude. Ce chapitre comporte une première partie de préformulation axée sur la caractérisation physico-chimique des matières premières utilisées à savoir le principe actif 'Insuline', ainsi que le kappa-carraghénane. La seconde partie de ce chapitre décrit l'ensemble des méthodes utilisées pour la formulation et la caractérisation des microcapsules. Les résultats expérimentaux obtenus à partir des tests physico-chimiques d'analyses, ainsi que l'interprétation et la discussion de chaque résultat sont donné après chaque méthode de caractérisation.

Enfin, on retrouve l'ensemble des résultats pertinents obtenus lors de cette étude ainsi que quelques perspectives dans une conclusion générale.

Chapitre I

I.1. INTRODUCTION

Le diabète est considéré de nos jours comme une pandémie grandissante. Le nombre de diabétiques est en croissance continuelle.

L'insuline est systématiquement prescrite aux personnes atteintes d'un diabète insulino-dépendant, (le diabétique de type 1) et à de nombreux diabétiques de type 2. Le traitement consiste en des injections pluriquotidiennes d'insuline. Malgré l'efficacité des insulines actuelles et l'amélioration des modes d'administration, l'insulinothérapie reste contraignante. Ainsi, afin d'améliorer la qualité de vie du patient diabétique, l'insulinothérapie doit aujourd'hui être simple d'utilisation, avec une efficacité similaire ou améliorée, et une action plus physiologique.

L'administration de l'insuline par voie orale doit répondre à tous ces critères. L'encapsulation de l'insuline sous un format nano particulaire est l'une des stratégies adoptées pour une protection de l'hormone au niveau digestif. L'amélioration de l'efficacité de ces nanoparticules est en constant développement, afin de garantir une meilleure biodisponibilité de l'insuline **[1].**

I. 2. GENERALITES SUR LE DIABETE

I.2.1. Définition du diabète

Le diabète est une affection métabolique, caractérisée par une hyperglycémie chronique (taux de sucre dans le sang trop élevé) attribuable à un défaut, soit de la sécrétion d'insuline, soit de l'action de l'insuline sur les tissus cibles, soit les deux **[2]**.

Les critères de diagnostic du diabète sont fondés sur des épreuves faites, à partir de sang veineux, avec les méthodes utilisées au laboratoire. Ces critères sont :

- Une glycémie à jeun ≥ 7,0 mmol/l (A jeun c'est-à-dire, aucun apport calorique depuis au moins 8h) ;
- Un taux d'hémoglobine glyquée (HbAlc) ≥ 6.5 % (chez les adultes). Ce taux est mesuré à l'aide d'un test normalisé et validé, en l'absence de facteurs compromettant la fiabilité du taux d'HbAlc et non en cas de diabète de types 1 soupçonné.
- Une glycémie 2 heures après l'ingestion de 75 g de glucose ≥ 11.1 mmol/l ;
- Une glycémie aléatoire ≥ 11,1 mmol/l (Aléatoire c'est-à-dire a tout moment de la journée, sans égard du moment du dernier repas) **[3]**.

Selon l'OMS, la prévalence du diabète en 2014 à l'échelle mondiale était de 9 % chez les adultes âgés de plus de 18 ans avec plus de 387 millions de personnes touchées. L'organisme estime également que plus d'un million et demi de décès dans le monde sont directement liés au diabète dont 80% dans les pays émergents. Le nombre de personnes touchées dans le monde ne cesse de croitre d'année en année. En 2030, le diabète sera la septième cause de mortalité. Il s'agit d'une pathologie silencieuse, cliniquement asymptomatique qui se décline sous plusieurs sous types et dont les complications sont d'autant plus sévères que la prise en charge et faite tardivement **[4] .**

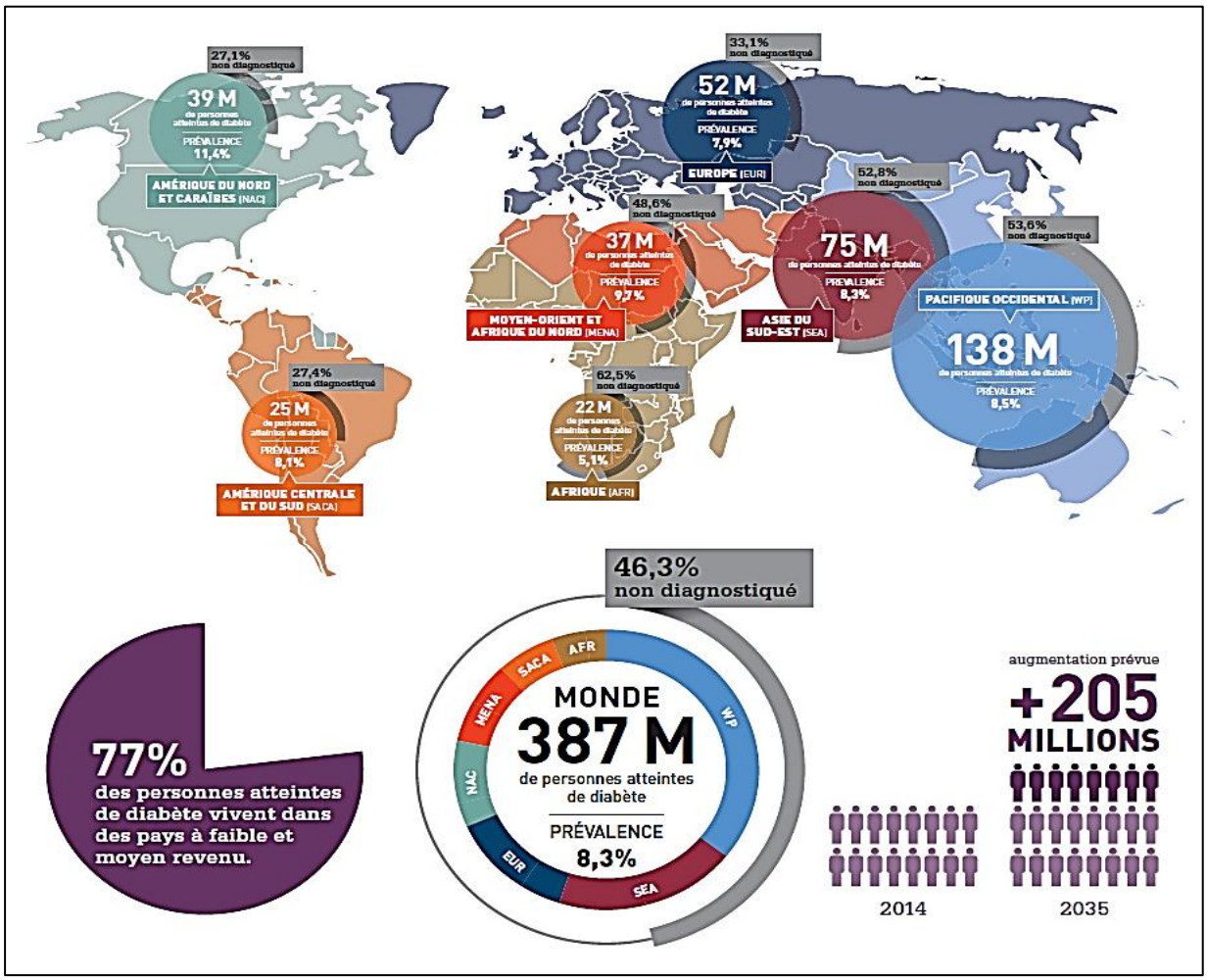


Figure I.1.prévalence du diabète dans le monde en 2014 par géographique et projection en 2035. **[4]**

I.2.2 Structure du pancréas

Le pancréas est une glande mixte richement vascularisée et innervée, composée de tissus exocrines et autocrines. Le pancréas exocrine est composé majoritairement d'acini, regroupement de cellules excrétrices. La fonction principale de ces cellules est la sécrétion d'enzymes tels que les lipases et le trypsinogène qui sont alors transportées dans l'intestin via le réseau de capillaires adjacents.

La partie endocrine est formée par des cellules regroupées en îlots, anciennement appelé îlots de Langerhans. La sécrétion d'hormones et de protéines par ces îlots pancréatiques est assurée par différents types cellulaires : les cellules β, les cellules α, les cellules δ, et les cellules PP d'autant plus sévères que la prise en charge est faite tardivement **[5].**

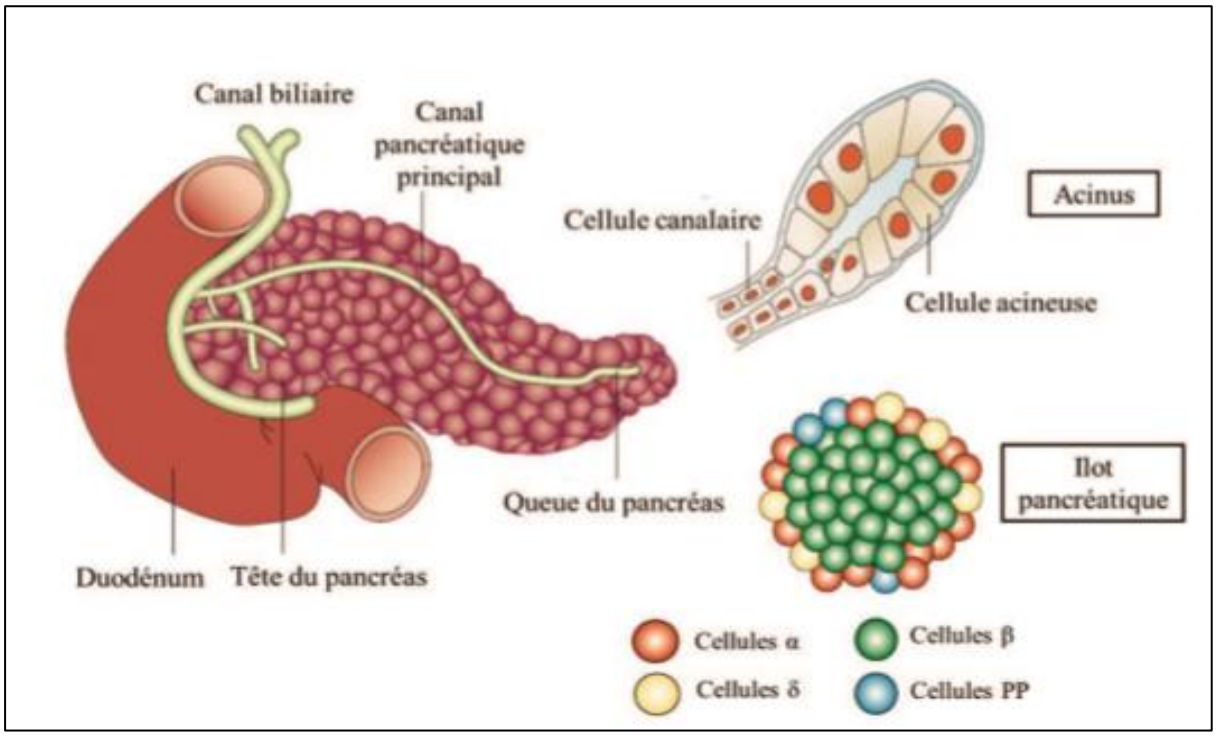


Figure I.2. Schématisation de la structure du pancréas **[5]**

Les cellules β, représentant 60 à 80% des cellules des îlots, assurent la synthèse et la sécrétion d'insuline. Les cellules α, représentant 15 à 20 % des cellules des îlots, sécrètent le glucagon, hormone hyperglycémiante, par le biais de l'augmentation de la glycogénolyse et de la néoglucogenèse. Les cellules δ (5 à 10 %) sécrètent la somatostatine qui inhibe la sécrétion de deux hormones ci-dessus. Et enfin, les cellules PP (< 2%) sécrètent le polypeptide pancréatique (PP) permettant aussi l'inhibition de ces deux hormones **[5].**

I.2.3 différents types de diabète

Il existe différents types de diabètes dans les principaux sont présentées ci-dessous :

- **Diabète type 1** : (connu sous le nom de diabète insulino-dépendant (DID) ou juvénile) est caractérisé par une production insuffisante d'insuline due à une destruction, à plus de 90% des cellules β fabriquant l'insuline .Cette forme de diabète peut affecter l'individu dés sont plus jeune âge et nécessite obligatoirement des injections pluriquotidiennes d'insuline. Le diabète de type 1 idiopathique est caractérisé par l'absence d'auto-anticorps. Il s'agit d'un cadre nosologique mal défini, incluant les diabètes cétosiques du sujet noir originaire d'Afrique sub-saharienne et les diabètes suraigus japonais **[6]**. Cette forme de diabète peut affecter l'individu dès son plus jeune âge et nécessite obligatoirement des injections pluriquotidiennes d'insuline.

- **Diabète type 2** : (également appelé diabète non insulino-dépendant (DNID) ou diabète de la maturité) résulte d'une mauvaise utilisation de l'insuline par l'organisme et surtout attribuable à une insulino-résistance accompagnée d'une carence insulinique relative ou à une anomalie de la sécrétion accompagnée d'une insulino-résistance **[3].** Le diabète de type 2 représente 90% de diabète rencontrée dans le monde. Il est en grande partie le résultat d'une surcharge pondéral et de la sédentarité.

I.3. L'INSULINE

I.3.1. Définition

l'insuline est une hormone hypoglycémiante sécrétée physiologiquement par les cellules β des ilots de Langerhans du pancréas avant d'être déversée dans le sang ou elle régule le taux de sucre et favorise l'utilisation ainsi que la pénétration du glucose dans les cellules. C'est la seule hormone hypoglycémiante qui permet la transformation du glycogène.

I.3.2. La structure chimique de l'insuline

La molécule d'insuline est un polypeptide ayant un poids moléculaire de 5803Da. Elle est constituée de deux chaines peptidiques :

- La chaine A à caractère acide, renferme 21 Acide Aminé (AA) dont le 1er la glycine et le dernier est l'acide β-amido-aspartique (aspargine) .Elle renferme aussi un pont disulfure entre la cystéine 6 et la cystéine 11.
- La chaine B ,à caractère neutre , est constituée de 30(AA) dont le 1er est la phénylalnine et le dernier est la thréonine .

Les deux chaines A et B sont liées entre elle par 2 ponts disulfures A7-B7 et A20-B19 (figure I.3). L'activité hypoglycémiante disparait si les ponts disulfures sont rompus **[6].** La structure spatiale de l'insuline a été décrite par D .HADKING en 1969.

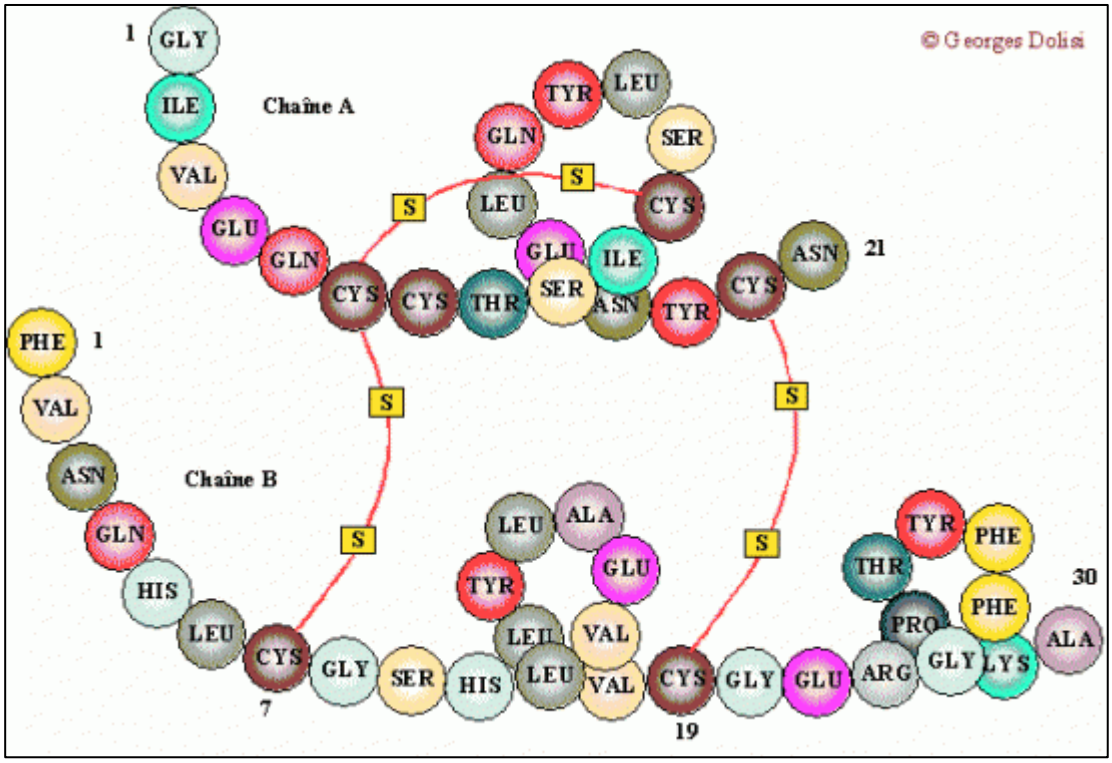


Figure I.3 Structure chimique de l'insuline [7]

I.3.3. Synthèse de l'insuline à partir de la pré-pro-insuline

Dans l'organisme, l'insuline est synthétisée d'abord sous forme d'un précurseur, La pré-pro-insuline par la réticulum endoplasmique des ilots de langerhans , cette molécule est ensuite clivée en pro-insuline (**Figure I.4)** et transportée dans l'appareil de golgi, ou il est stocké dans des granules de sécrétion **[8].**

La pro-insuline est une protéine comportant suivant les espèces 81 à 86 Acide Aminé. Celle de l'homme comporte 86 Acide Aminé. La caractéristique générale de la pro-insuline est liée à la présence du peptide C qui relie les deux chaines A et B de l'insuline.

La pro-insuline a un poids moléculaire de l'ordre de 9000Da .Elle possède une faible activité métabolique .Son rôle essentiel est d'assurer la protection des chaines A et B et entre autre de protéger la molécule d'insuline contre la polymérisation **[7].**

La transformation de la pro-insuline en insuline se déroule dans le réticulum endoplasmique après migration dans le cytoplasme. La pro-insuline est scindée en deux fragments avec perte de quatre acides aminées, donnant ainsi :

- L'insuline (51 Acide Aminé)
- La peptide c (31 Acide Aminé)

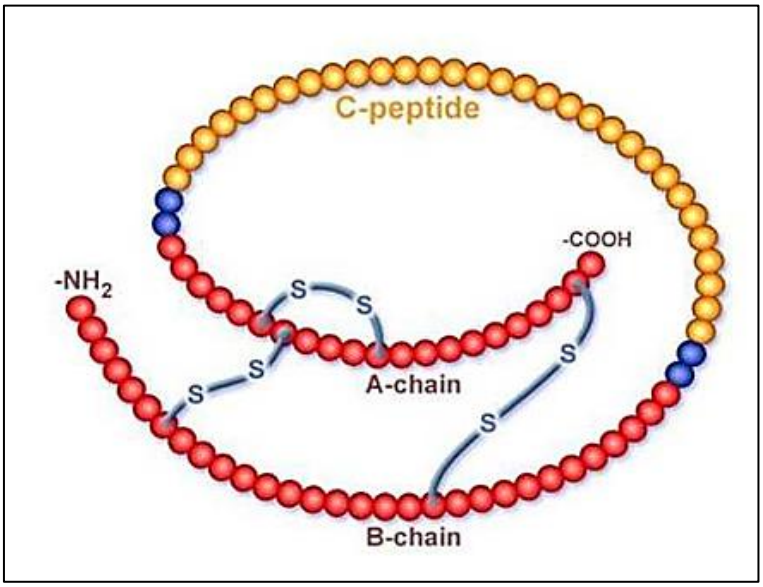


Figure I.4. Structure de la pro-insuline **[8]**

L'insuline et le peptide C sont stockés dans les vésicules avec du zinc. Ils seront secrétés en même temps en quantités équimolaire. La biosynthèse de l'insuline à partir de la pré-pro-insuline est représentée dans (la **Figure I.5**)

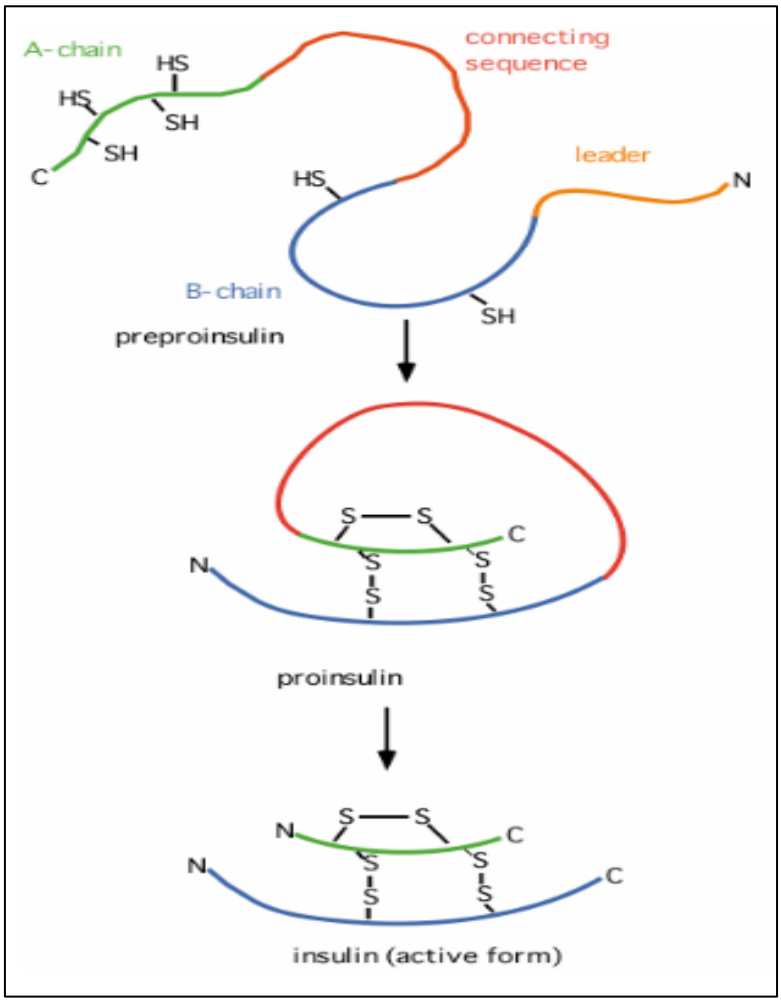


Figure I.5. Biosynthèse de l'insuline à partir de la pré-pro-insuline **[7]**

I.3.4. Caractéristiques de l'insuline :

L'insuline à une tendance à l'auto-agrégation (auto-association) ainsi, l'insuline monomérique se transforme soit en complexe dimérique soit en complexe 22hexamèrique. L'insuline hexamère est constituée de trois dimères associés autour de deux ions Zn^2. La conformation des molécules d'insuline dans l'hexamère peut avoir deux états (T et R) qui correspondent respectivement à une conformation allongée et à aune conformation α hélicoïdale. L'hexamère R est obtenue en présence de phénol ou de méta-crésol qui interagissent à l'interface des dimères en stabilisant les hélices α de la séquence B1-B8. Il a une moindre tendance à la dissociation que la forme T (hexamère T) car le positionnement des hélices α de

la séquence B1-B8 réduit la diffusion du zinc à partir de l'hexamère vers le milieu extérieur **[7].** Sous forme hexamèrique, l'action de l'insuline n'est pas immédiate et dure plusieurs

heures correspondant au temps nécessaire à la dissociation des complexes hexamèriques pour libérer de l'insuline monomérique au niveau de son lieu d'injection habituel, le tissus Sous-Cutanée.

I.3.5. Rôle physiologique

L'insuline possède de nombreuses propriétés pharmacologiques touchant aux métabolismes glucidique, lipidique et protéique.

I.3.5.1. Action sur le métabolisme glucidique

Au niveau du foie, l'insuline :

- Inhibe la dégradation du glycogène en glucose par inhibition du glycogène phosphorylase et de la glucose-6-phosphatase.
- Favorise la synthèse du glycogène par stimulation de la glucokinase et du glycogène synthétase.
- Inhibe la gluconéogenèse par diminution de la quantité d'acides aminés glucoformateurs et inhibition de la phosphoénol pyruvate-carboxykinase. Au niveau des muscles et du tissu adipeux,
- Favorise le transport membranaire du glucose par recrutement notamment du transporteur du glucose du compartiment cellulaire vers la membrane plasmique
- Favorise la conversion du glucose en glycogène et la synthèse d'Acétyl-coenzyme A avec formation d'acide gras et de triglycérides**. [10]**

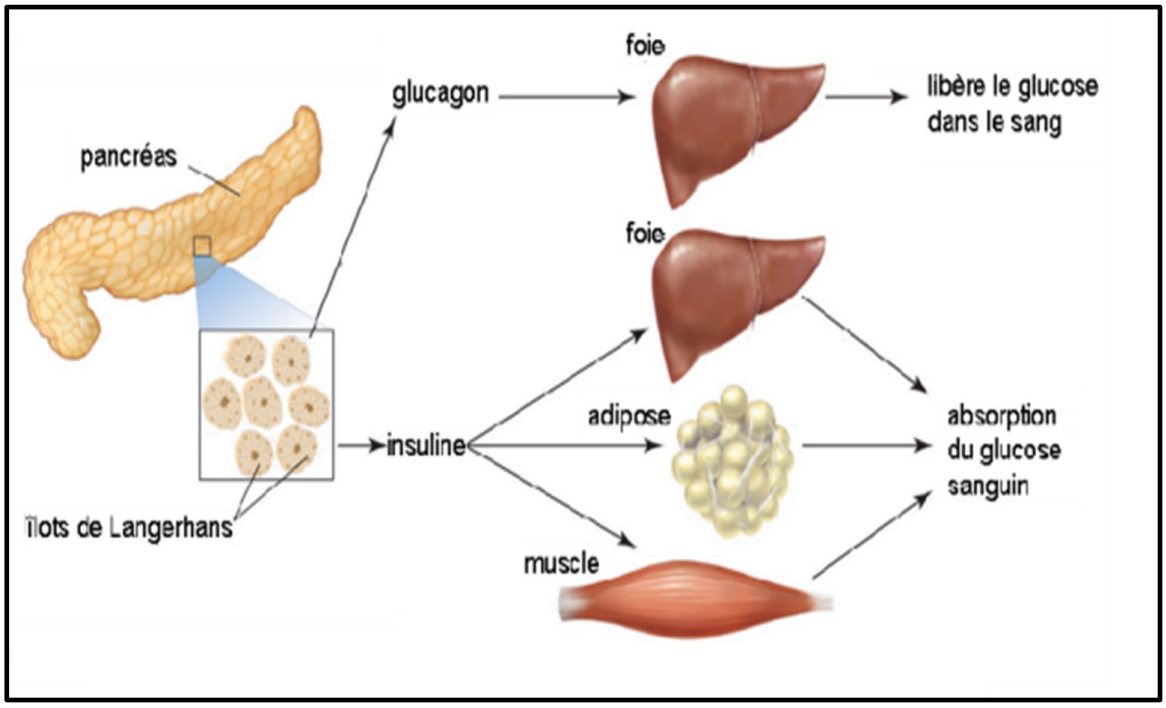


Figure I.6. Double rôle du pancréas au sein de l'organisme **[9]**

I.3.5.2.Action sur le métabolisme lipidique

L'insuline inhibe la lipolyse par son action sur le triglycéride lipase, ce qui conduit à une diminution de la sécrétion d'acide gras et de glycérol. Au niveau des hépatocytes, elle inhibe la cétogenèse et favorise la synthèse de triglycérides. Elle stimule la synthèse de la lipoprotéine lipase au niveau hépatique, ce qui favorise la synthèse lipidique au niveau du tissu adipeux.

I.3.5.3. Action sur le métabolisme protéique

L'insuline possède un effet inhibiteur du catabolisme protéique et une action anabolique par stimulation de la synthèse protéique. A l'état physiologique, elle participe au maintien de l'équilibre azoté. **[10]**

I.3.5.4. Autres actions de l'insuline

L'insuline favorise le passage des ions potassium du milieu extracellulaire vers le milieu intracellulaire et stimule la réabsorption rénale de sodium. Elle possède également des effets sur la croissance. Pendant l'embryogenèse, l'insuline stimule la prolifération des cellules épithéliales de l'intestin humain, au niveau de la bordure en brosse. Elle agit en stimulant la libération de polypeptides impliqués dans les mécanismes d'action de l'hormone de croissance.

Compte tenu de leur affinité pour le récepteur à l'insuline, ces peptides ont été dénommés Insulin like Growth Factor (IGF I et IGF II). Enfin, l'insuline présente un effet inhibiteur la sécrétion de glucagon , qui est une hormone hyperglycémiante. **[10]**

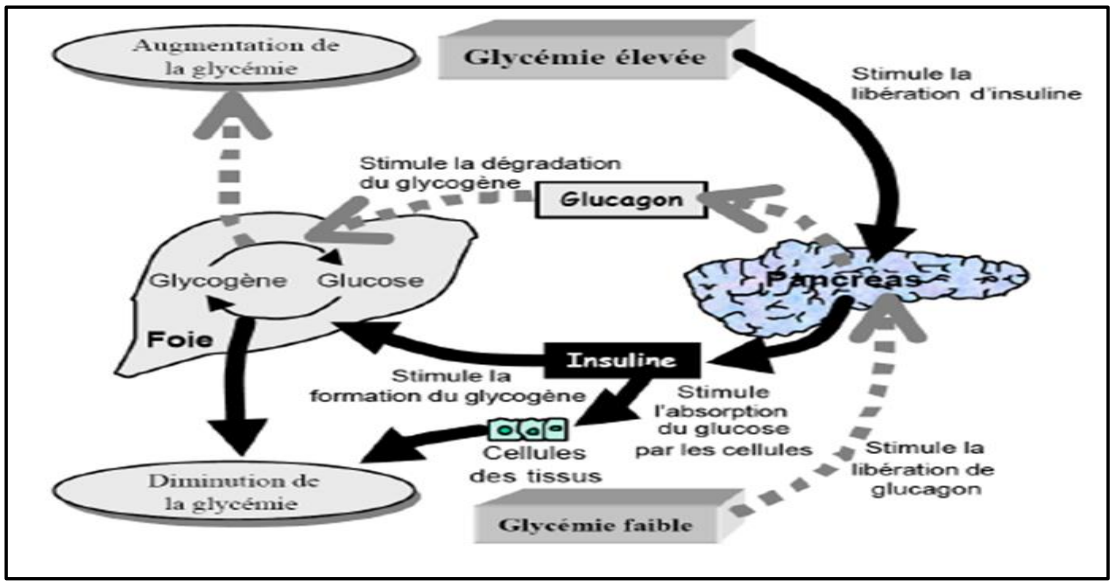


Figure I.7. Régulation de la glycémie par l'insuline et le glucagon **[10]**

I.3.6. Origine de l'insuline

Les personnes atteintes d'un diabète grave doivent s'injecter de l'insuline quotidiennement pour mener une vie normale. Autrefois, l'insuline provenait d'un pancréas de bœuf ou de porc. Depuis les années 80, elle est également produite grâce au génie génétique. Voici une description simplifiée du procédé : On isole le matériel génétique (ADN) de quelques cellules humaines. A l'aide des enzymes de restriction appropriées, on sépare le gène de l'insuline qui sera plus tard introduit dans une bactérie. On prélève alors sur la bactérie un petit anneau de matériel génétique, appelé plasmide, que l'on sectionne à l'aide des mêmes enzymes de restriction à un endroit précis. Le plasmide bactérien et le gène de l'insuline sont alors mis dans une éprouvette, où ils sont « recollés » par des ligases qui soudent les deux morceaux d'ADN ensemble. Finalement, le nouveau plasmide est réintroduit dans la bactérie où il se multiplie. En cas de transfert réussi, la bactérie produit de la protéine sous forme d'insuline humaine grâce au gène supplémentaire de l'insuline. Pour la production de grandes quantités, la multiplication des bactéries se fait dans de grandes cuves appelées fermenteurs. Or, insuline mise à part, nombre d'autres protéines se trouvent à l'intérieur de la bactérie. De cette « soupe protéique », on doit repêcher l'insuline et l'épurer. Après plusieurs étapes de purification, l'insuline est suffisamment propre pour être utilisée dans le traitement du diabète **[11].**

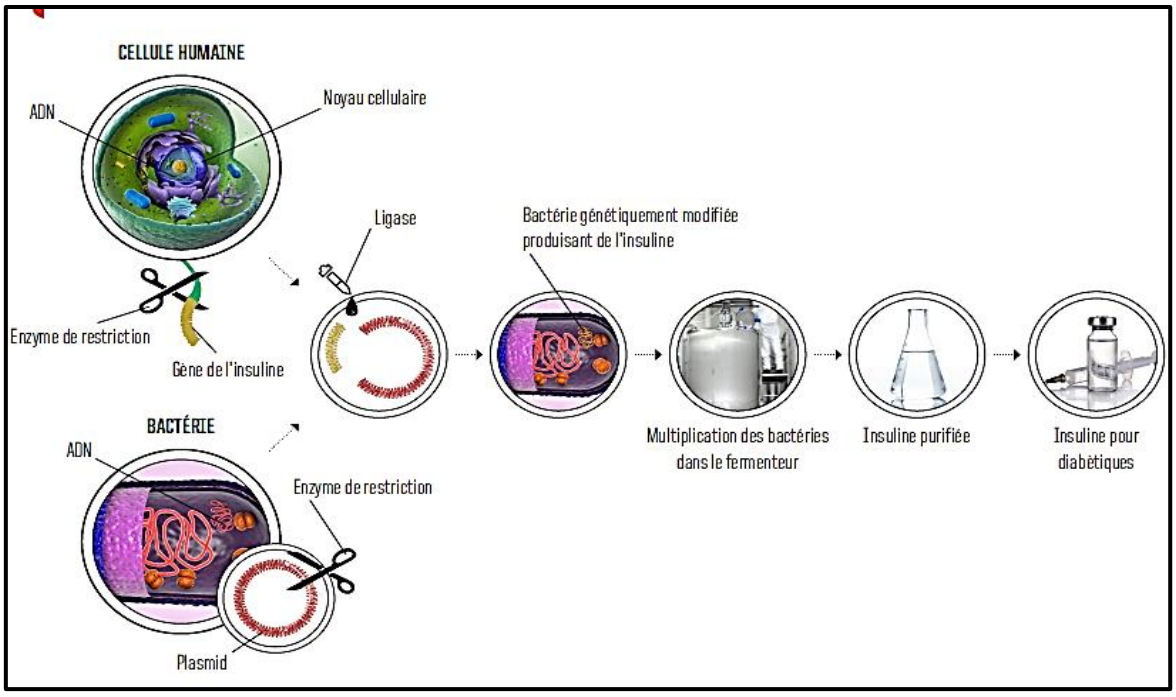


Figure I.8. Production de l'insuline par génie génétique **[12]**

I.3.6. Les différents types d'insulines développées par l'industrie pharmaceutique

Il existe plusieurs types d'insulines qui diffèrent essentiellement par leur rapidité de passage dans la circulation sanguine ainsi que par leur durée d'action. De la protamine et/ou du chlorure de zinc sont ajoutés aux insulines pour prolonger leurs durées d'action ce qui consiste à ralentir leurs résorptions après administration sous-cutanée. De nouvelles formes, issues de modifications de la séquence d'insuline (**figure I.9**), permettent également aujourd'hui de ralentir l'action de l'insuline afin d'améliorer le contrôle de la glycémie : quantité d'insuline constante sur une durée plus longue. **[10]**

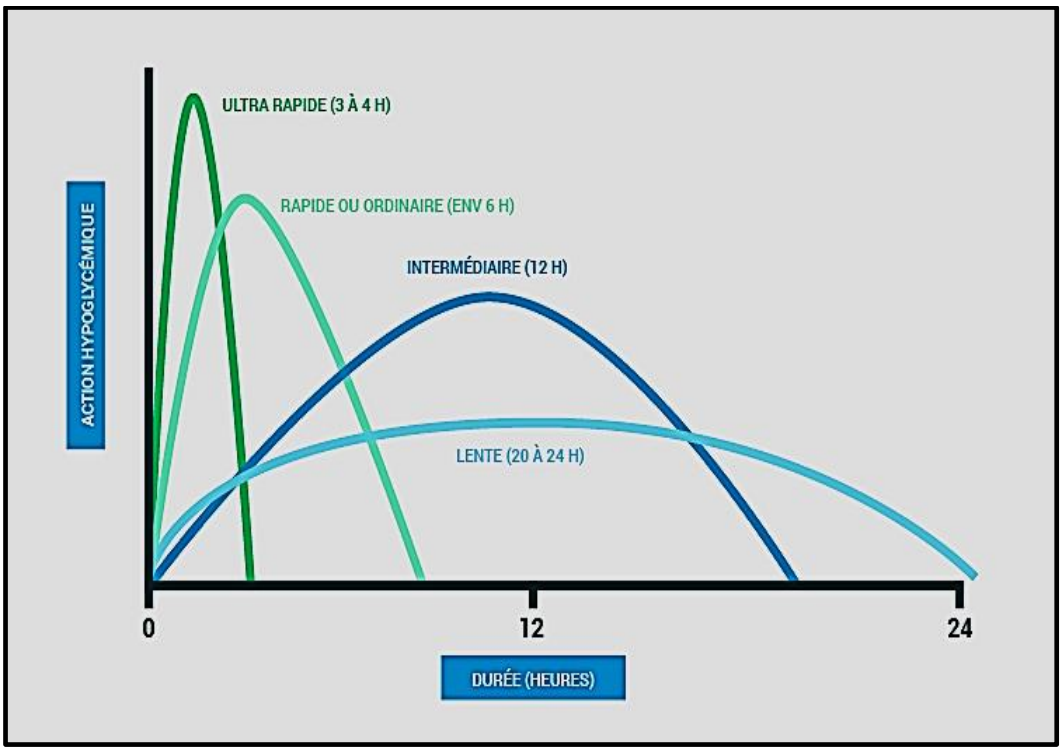


Figure I.9. Action hypoglycémiante et durée d'action des différents types d'insulines **[7]**

I.3.7. Voies d'administration de l'insuline

Après sa découverte en 1921 par Banting et Best, l'insuline s'est présentée comme une réelle valeur ajoutée pour les patients souffrant de diabète. Dès lors, la question de son administration s'est posée et les voies intramusculaires, intraveineuses et sous-cutanées ont été utilisées pour administrer l'insuline. Contraignante pour le mode de vie, l'insulinothérapie par injection n'est pas le traitement le plus confortable pour les patients. En effet, malgré les développements technologiques mis en jeu pour améliorer l'administration de l'insuline (diminution de la taille des aiguilles, stylo injecteurs …), celle-ci demeure contraignante pour le patient et devient par conséquent une limite dans la prise en charge du patient. Des études

ont ainsi été conduites pour développer des méthodes d'administration par voie non-injectable comme les voies sublinguale, nasale, pulmonaire, rectale, transdermique, etc. (**Figure.I.10**) **[13].**

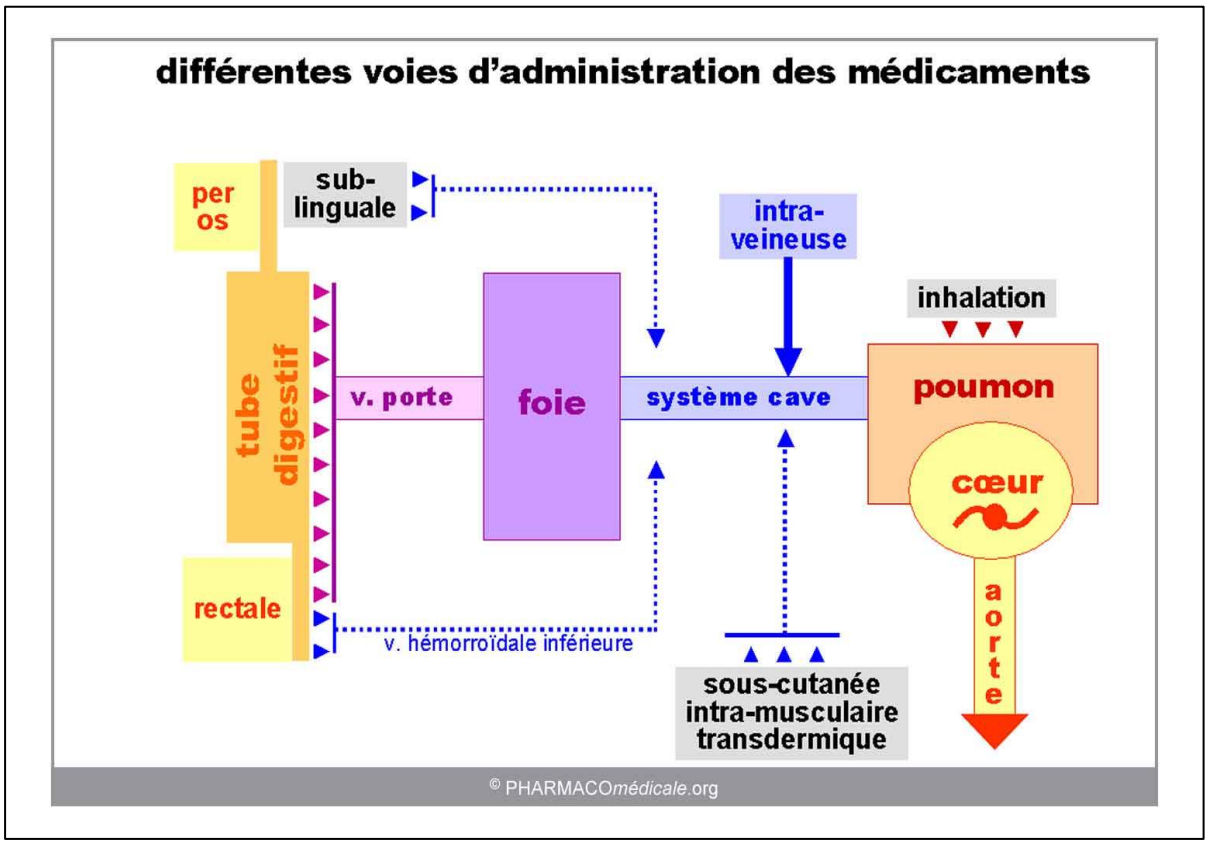


Figure I.10. Voies d'administration des médicaments **[14]**

I.3.7.1. La voie orale

Chez l'individu sain, en état postprandial, le pancréas secrète de l'insuline suite a l'augmentation de la glycémie. L'insuline est alors déversée dans le la veine porte pour rejoindre le foie ou est son premier site d'action. L'injection sous cutanée d'insuline de même que les autres voies d'administration développées (buccale, nasale, pulmonaire, transdermique…) rejoint la circulation générale avant de passer par le foie et échappe donc au métabolisme de premier passage hépatique. L'insuline orale a l'instar des autres voies d'administration présente l'avantage de suivre la voie de sécrétion physiologique de l'insuline en subissant le métabolisme de premier passage hépatique avant d'être distribuée dans tout l'organisme . Ce premier passage hépatique est un point de contrôle avant l'accès à l'organisme des xénobiotiques mais également des substances physiologiques comme par exemple, les sels biliaires ou l'insuline. Pour assurer cette fonction, la totalité du sang issu du tube digestif est drainée par la veine porte. Celui-ci représente près de 80 % du débit sanguin Hépatique.

Ainsi l'insulino-secretion physiologique peut être mimée par une administration par voie orale

Pour développer une insuline orale, il est indispensable de prendre en considération les barrières biologiques que celle-ci doit franchir pour arriver dans la veine porte. De la bouche à la veine porte, l'insuline doit traverser tout le tractus gastro-intestinal. L'estomac est l'organe de digestion du corps humain, l'intestin joue également un rôle primordial dans la digestion et a le rôle d'absorption des nutriments et des molécules thérapeutiques.

L'épithélium intestinal 50 assure aussi la fonction de protection de l'organisme contre l'entrée de toxines et de microorganismes.

A l'heure où l'administration orale d'insuline est potentiellement attirante, cette voie d'administration se développe sans pour autant avoir rencontré de succès jusqu'à présent. De nombreuses stratégies individuelles et combinées ont été développées afin d'augmenter l'absorption d'insuline. Ceux-ci incluent la co-administration d'insuline avec des inhibiteurs d'enzymes et/ou l'utilisation de promoteurs de pénétration, la modification de la stabilité chimique de l'insuline et l'utilisation de composés mucoadhésifs, de liposomes, d'émulsions et systèmes polymériques **[15].**

Tableau I.1 : Récapitulatif des avantages et inconvénients des différentes voies D'administration pour l'insuline **[16]**

Voies d'administration	Avantages	Inconvénients
Voie Buccale	Dégradation limitée (pH neutre, activité enzymatique faible)	Faible perméabilité, faible surface d'absorption
Voie pulmonaire	Grande surface d'échange, alvéoles pulmonaire richement vascularisées	Risque important d'affection respiratoire et de cancer
Voie nasale	Grande surface d'échange, muqueuse richement vascularisées avec une bonne perméabilité	Faible temps de contact (clairance muco-cilliaire)
Voie Rectale	Indépendante du système digestif, présent peu d'activité enzymatique et permet l'évitement (en partie) du métabolisme de premier passage hépatique	Nécessite l'utilisation de promoteurs d'absorption
Voie transdermique	Grande surface d'échange, facile d'accès et permet une libération prolongée du principe actif sans dénaturation de celui-ci.	Faible perméabilité aux molécules hydrophiles
Voie orale	Libération de l'insuline dans le sang sous contrôle hépatique	Présence de nombreuses contraintes chimiques et physiques

I.4. CONCLUSION

L'administration d'insuline par voie orale est aujourd'hui un challenge. Les nombreuses barrières que rencontre l'insuline dans le tractus gastro-intestinal, qu'elles soient physiques ou chimiques, rendent ce mode d'administration quasiment impossible en l'état. Des stratégies de recherche, visant à contourner ces barrières ou à les limiter, sont à l'heure actuelle en voie de développement ou en étude clinique **[1].**

Chapitre II

II.1. INTRODUCTION

L'encapsulation est parmi les préparations pharmaceutiques en cours d'élaboration par les grandes firmes médicamenteuses, qui consiste à encapsuler selon un procédé déterminé un principe actif dans une autre matière inactive afin d'améliorer les propriétés de conservation, de présentation et de biodisponibilité **[17]**.

II.2.GENERALITES SUR L'ENCAPSULATION

II.2.1.Définition

La micro encapsulation regroupe l'ensemble des technologies qui permettent la préparation de microparticules individualisées, constituées d'un matériau enrobant contenant une matière active.

Les microparticules présentent une taille comprise entre 1 µm et 1 mm et contiennent typiquement entre 5 et 90 % (en masse) de matière active.

- ✓ Les matières actives sont d'origines très variées : principes actifs pharmaceutiques, actifs cosmétiques, additifs alimentaires, produits phytosanitaires, essences parfumées, micro-organismes, cellules, ou encore catalyseurs de réaction chimique...
- ✓ Les matériaux enrobant sont des polymères d'origine naturelle ou synthétique, ou des lipides **[17].**
- ✓ La substance encapsulée peut se présenter sous la forme de fines particules de solide divisé, d'un liquide, ou encore d'un composé gazeux **[18]**.
- ✓ Matériaux pour l'encapsulation sont essentiellement :
    - Biopolymères (origine végétale, animale ou bactérienne) :alginate, pectine, chitosane, carraghenane, gomme arabique, dérivés cellulosiques, amidon, gélatine, protéine de lait, gomme de gellane..
    - Cires et matières grasse (origine végétale ou animal) :cires de carnauba, cire de candelila, stéarines, acide stéarique, etc.
    - Tensio-actifs : lecithines, Spans®, Tweens®..
    - Polymères synthétiques : PVA, PEG, PLGA, polyurée, isocyanates, polycaprolactone, polyamide, polyuréthanes, mélamine formaldéhyde **[19].**

II.2.2. Objectifs de l'encapsulation

L'encapsulation peut avoir différents objectifs dont les plus importants sont les suivants :

- **Immobilisation ou isolation :** L'immobilisation résulte souvent du désir de vouloir limiter le contact entre certaines parties d'un système. Par exemple deux réactifs peuvent être séparés par encapsulation et n'entrer en contact que lors de la rupture de la microcapsule .Autre exemple , le piégeage d'un arôme au sein de microcapsule permet soit un effet aromatique prolongé , soit un effet retardé si l'arôme n'est libre que lors de la cuisson par exemple. Par encapsulation, il est aussi possible d'immobiliser des bactéries dans des microsphères afin de favoriser leur culture prolongée au sein de réacteurs en continu en évitant leur perte dans l'effluent.
- **Protection :** De nombreux composés sont fragiles et doivent être protégés de leur milieu environnant. Par exemple, les vitamines ou les acides gras polyinsaturés sont sensibles en entrant en réaction avec beaucoup de cellule biologique.
- **Contrôler la libération d'un composant :** Le but de l'encapsulation n'est généralement pas isoler indéfiniment un composé. Dans la majorité de cas, un profil ou processus de libération bien spécifique est recherché. Par exemple, un médicament sera délivré suivant une cinétique bien définie **[20].**

II.3. LES MICROPARTICULES

II.3.1.Définition

La micro-encapsulation regroupe l'ensemble des techniques permettant l'obtention de particules dans la taille s'échelonne entre un micron et un milimètre contenant une substance active solide, liquide ou gazeuse. Les microparticules ainsi obtenues peuvent être classées en deux catégories selon leur microstructure : les microsphères et les microcapsules **[21]**

La plupart du temps les microparticules ont une forme sphériques ou ovoïde, mais il en existe des formes non régulières. La membrane protectrice des microparticules peut être formée d'une monocouche ou d'une multicouche quelle que soit leur microstructure **[21]**

II.3.2. Type des microparticules

Les microparticules synthétiques sont des systèmes colloïdaux développés principalement en vue de leur utilisation thérapeutique. Selon la nature des éléments qui les constitue et leur structure, il est possible de distinguer les liposomes, les microsphères, et les microcapsules [**22,23**].

- **Les liposomes :** Ce sont de petites vésicules sphériques dont la paroi est constituée par une ou plusieurs bicouches phospholipidiques délimitant une cavité centrale contenant une phase

aqueuse **(Figure.II.1).** Ils sont apparus il ya quarante ans grâce aux travaux de Bengham et al. (1965) et ont été les premières à être utilisés comme vecteur des médicaments **[24].**

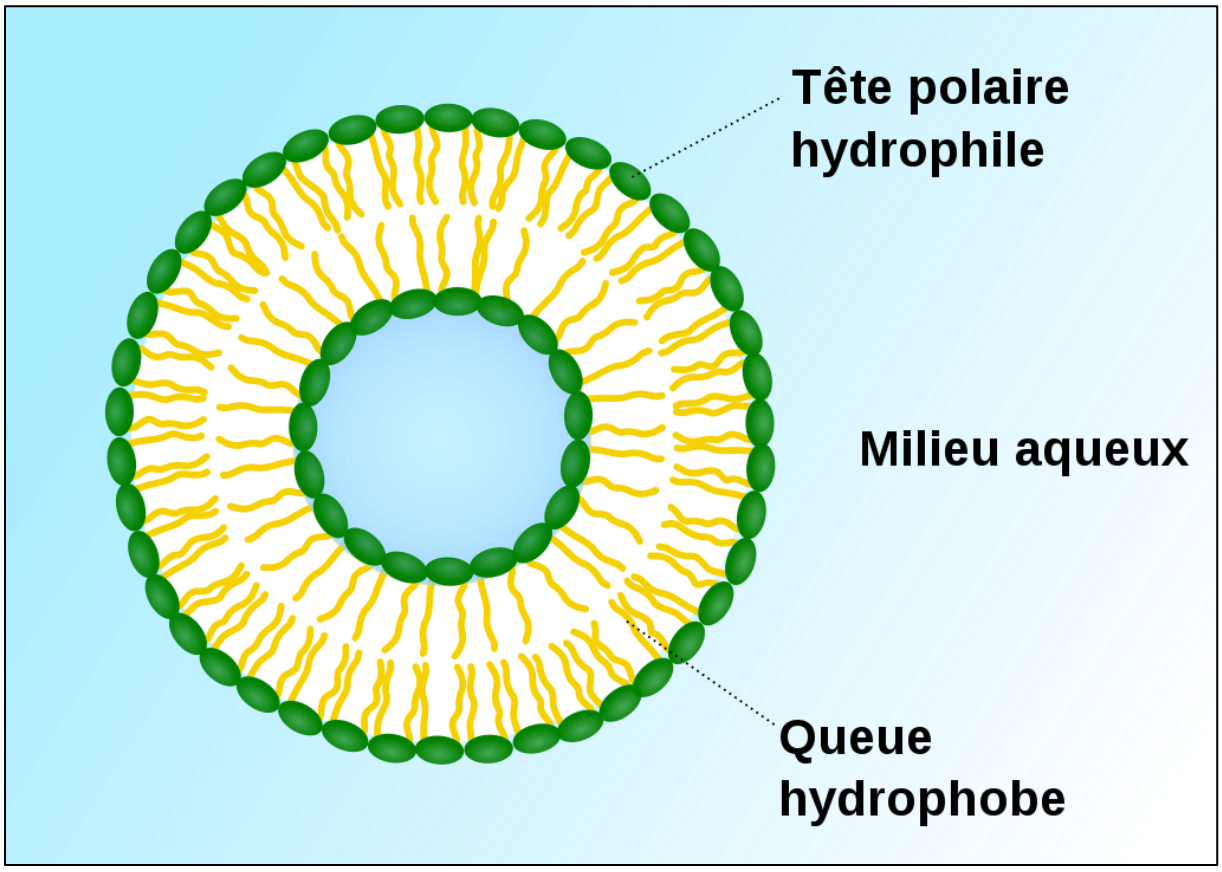


Figure.II.1 Structure d'un liposome **[24]**

➢**Les microcapsules :** Ce sont des structures réservoirs et sphériques. Elles sont constituées d'un cœur généralement huileux entouré par une mince paroi de polymère dont l'épaisseur n'excède pas quelques nanomètres**).** Le principe actif est généralement dissout dans le cœur huileux mais peut aussi être adsorbé à la surface des microcapsules. Dans cette géométrie les taux encapsulation peuvent être particulièrement élevés et atteindre entre 85et 90% de masse de matière active par rapport à la masse de microparticule **[17].**

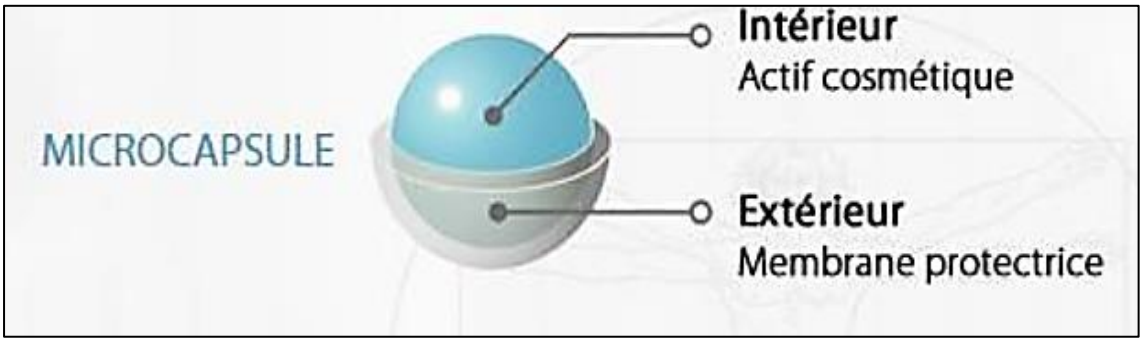


Figure II.2. Représentation schématique d'une microcapsule

- **Les microsphères :** Ce sont des structures matricielles, de forme sphérique, constituées de polymères de préférence biodégradables. Les premières microsphères ont été développées par Birrenbach et speider (1976) en utilisant le polyacrylamide réticulé, un polymère non biodégradable **[25].** Dans le cas de microsphères, le principe actif est soit incorporé à l'intérieur du réseau polymère durant la formation des microsphères (**Figure II.3**).

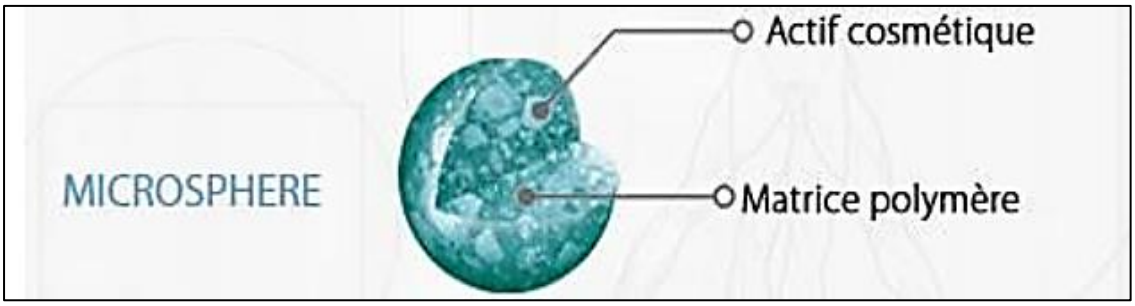


Figure II.3. Représentation schématique d'une microsphère

II.3.3. Composition d'une capsule

Une capsule est constituée d'une enveloppe entourant une substance à transporter (Figure II.1) est composée de deux parties : des substances à encapsuler, comme des cristaux, des solutions ou des émulsions ; et une membrane qui protège les substances à encapsuler et contrôle leur libération. La capsule est souvent mise dans un milieu externe pour conserver ses propriétés chimiques et physiques.**[26]**

II.4. TECHNIQUE D'ENCAPSULATION

Les différentes méthodes de micro encapsulation peuvent être classifiées selon différents critères **[17].** Il existe quatre manières différentes de classer les méthodes d'encapsulation :

- Les procédés peuvent être classés selon l'emploi ou non de solvant organique, certaines techniques telles que la coacervation complexe utilisant des fluides supercritiques.
- La nature du milieu dispersant peut également servir de base à une classification. Il peut être liquide (polycondensation interfaciale, coacervation, …), gazeux (spray drying, enrobage en lit fluidisé, …), ou encore à l'état supercritique (séparation de phase, …).
- La famille à laquelle appartient le composé employé pour obtenir la capsule peut également permettre de classifier les modes d'encapsulation : peuvent être utilisés des polymères préformés (coacervation, …), des lipides (spray congealing, …), ou encore des monomères (polycondensation interfaciale, polymérisation en milieu dispersé, …).

- Enfin, une dernière classification repose sur la nature du principe selon lequel est réalisée la micro encapsulation : on distingue les procédés physico-chimiques des procédés chimiques et mécaniques.

II.4.1. procédés d'encapsulation chimique

Les procédés chimiques sont basés sur la formation in situ du matériau enrobant par polycondensation, polymérisation radicalaire, ou polymérisation (polyaddition) anionique d'unités monomères. Ils se démarquent ainsi des deux classes de procédés décrites précédemment, qui font appel à des agents enrobant préformés, tels que des polymères ou des lipides **[17].**

II.4.2. Procédés d'encapsulation physico-mécanique

Les procédés mécaniques mettent en œuvre des techniques de pulvérisation (spray-drying, spray-coating), de formation de gouttes ou gouttelettes (prilling) et d'extrusion (extrusion /sphéronisation) **[17].**

II.4.3. procédés d'encapsulation physico-chimique

Les procédés physico-chimiques sont basés sur la maîtrise :

- De variations de solubilité et de conditions de précipitation des agents enrobant. Il s'agit, par exemple, de la précipitation contrôlée d'un polymère en solution, par ajout d'un non-solvant ou d'un polymère incompatible (coacervation simple), ou encore par variation de température et de pH de la solution (coacervation complexe).
- De changements d'état (fusion et solidification) des agents enrobant (gélification thermique d'émulsions). Les membranes obtenues peuvent être renforcées par adsorptions successives de poly électrolytes de charges opposées **[17].**

- ***La coacervation :*** La coacervation consiste à provoquer la précipitation d'un polymère ou de plusieurs polymères par séparation de phase. On parle alors respectivement de coacervation simple ou complexe. La coacervation peut être provoquée par un changement des conditions physicochimiques (pH, salinité …). Elle peut être réalisée par exemple à partir d'une émulsion d'huile dans une solution aqueuse de polymères, suivie d'une précipitation des coacervat (par acidification) à la surface des gouttelettes d'huile **[27]**. Il existe deux types de coacervation dont :

a. Coacervation Complexe : La formation de complexes est possible dans un système aqueux ayant deux polymères hydrophiles de charges opposées **[28].** Le procédé de formation de complexes peut être résumé comme suivant :

- Un premier biopolymère (généralement une protéine) est dissout dans l'eau,
- Le Principe actif est mélangé à la solution de biopolymère,
- L'ajout d'un deuxième biopolymère de charge opposé entraîne la neutralisation des charges du premier bio polymère et les complexes se forment.
- La formation de complexes diminue la solubilité des biopolymères dans l'eau, entraînant une séparation de phases avec une phase riche en complexes de biopolymères contenant l'ingrédient actif et une autre phase presque dépourvue de biopolymère mais riche en solvant **[29].** Ce sont ces complexes qui forment la paroi des microcapsules après isolement.

Il faut rappeler que cette formation de coacervat est influencée par plusieurs conditions dont **[30]:**

- ✓ Le pH
- ✓ La force ionique
- ✓ La concentration des polymères totaux
- ✓ La composition des polymères
- ✓ Le rapport des deux polymères

b. Coacervation simple : Une coacervation simple peut se former avec un seul type de biopolymère dans un solvant où le polymère n'est pas soluble ou par addition d'un composé (sels et alcools) ayant une affinité plus élevée pour l'eau **[28].** De cette manière, ce composé entre en compétition avec le polymère en question. Lorsque les polymères perdent la couche d'eau associée à leurs chaînes, il y a formation de coacervat entre les différentes chaînes **[29,30].**

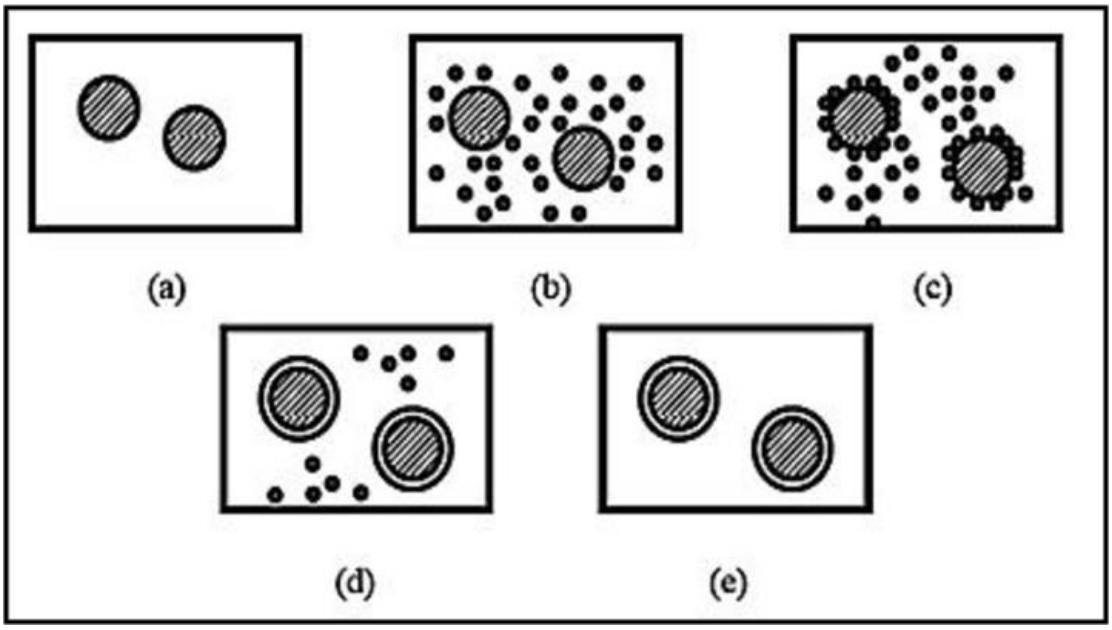


Figure.II.4. Principe de la coacervation simple : dispersion du principe actif dans la solution de polymère : (a) formation des gouttelettes de coacervat, (b) dépôt du coacervat, (c) Fusion des gouttelettes de coacervat et formation d'un enrobage continu, (d) Solidification de l'enveloppe(e) **[31]**

II.5.GENERALITES SUR LES BIOPOLYMERES

II.5.1. Définition

Les biopolymères sont des polymères produits par les systèmes biologiques, c'est-à-dire produits par des êtres vivants (végétaux, algaux, animaux, fongiques, etc.). Ils peuvent également être synthétisés chimiquement à partir des produits d'origine biologique **[32,33]**. Ce sont des macromolécules constituées de plusieurs unités identiques appelées monomères. Le nombre moyen de ces unités dans les macromolécules est le degré de polymérisation. Si ce degré est élevé on parle de hauts polymères, mais lorsqu'il est faible, le polymère est dit oligomère.

II.5.2. Propriétés des biopolymères

Par leurs structures chimiques, les biopolymères présentent des propriétés particulièreset intéressantes pour des applications bien spécifiques dans plusieurs industries (plastique,alimentaire…etc.) **[33].**

II.5.2.1. Biodégradabilité

Le terme « dégradation » désigne de manière générale toutes les altérations chimiques et/ou physiques qu'un matériau est susceptible de subir. Cependant, il est important de différencier les altérations que subit ce matériau au cours de son utilisation, assimilée à un Phénomène de vieillissement non désiré, de celles qu'il subit lorsqu'il est traité en fin d'utilisation afin de le faire disparaître de manière définitive ou partielle (le compostage par exemple).

Selon le Comité Européen de Normalisation (CEN), les notions de « dégradation » et de « matériau dégradable » sont décrites comme suit **[34]** :

« La dégradation est un processus irréversible entraînant un changement significatif dans la structure du matériau ; ce changement est classiquement caractérisé par une perte des propriétés initiales (masse molaire, structure moléculaire, résistance à la traction) et/ou une fragmentation. La dégradation est affectée par les paramètres environnementaux et se déroule en une ou plusieurs étapes. ».

« Un matériau est considéré comme dégradable dans certaines conditions s'il subit une dégradation quelconque déterminée dans un temps donné et selon une méthode de mesure standardisée adaptée ».

Le terme dégradation rassemble donc les phénomènes biotiques et abiotiques que le matériau subit lorsqu'il est placé dans un milieu particulier pour être traité en fin de vie, sans distinction d'origine.

Ces définitions restent trop vagues quant à l'information sur le degré de dérivabilité Que le polymère doit atteindre pour être considéré comme dégradable. D'une manière plus spécifique, le CEN aborde également la notion de « biodégradation » **[34]**, et la définit comme étant : *« Un type de dégradation engendrée par une activité biologique, particulièrement des Attaques enzymatiques, entraînant un changement significatif dans la structure chimique du Matériau ».*

Donc, un matériau est dit biodégradable lorsque sa dégradation résulte d'une action des microorganismes et que les sous-produits sont de l'eau, du dioxyde de carbone et/ou du méthane et de la biomasse.

II.5.2.2. Biocompatibilité et biorésorbabilité

Un matériau biocompatible est un matériau qui est capable d'assurer une fonction avec une réponse appropriée et sans effets indésirables sur l'environnement biologique dans lequel il est appelé à fonctionner. Les biopolymères par leur origine naturelle, remplissent logiquement cette fonction **[35-36]**.

En plus de la biocompatibilité, on recherche également pour des applications médicales spécifiques des matériaux bio résorbables pouvant se décomposer tout naturellement dans l'organisme humain pour être remplacés après par un tissu vivant **[37].** Les biopolymères sont dégradés naturellement dans l'organisme humain par hydrolyse(enzymatique) et libèrent des molécules assimilables et non toxiques. En pharmaceutique, les médicaments à libération contrôlée sont des exemples d'application où la biorésorbabilité des polymères joue un rôle important comme illustrée dans la **figure II.5 [38].**

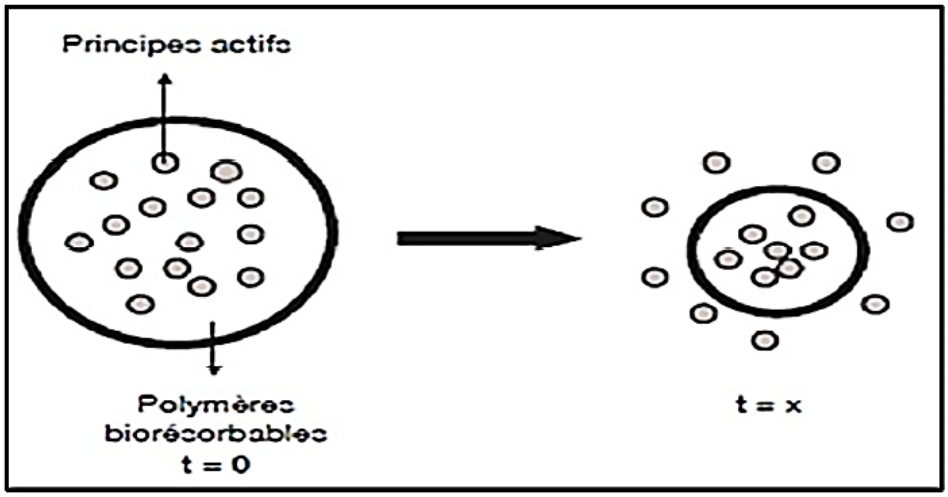


Figure II.5. Libération contrôlée des principes actifs **[38]**

II.5.3. Différentes familles de biopolymère

Les biopolymères d'origine biologique peuvent être classés en trois familles :

- **Polysaccharides :** parmi les polysaccharides, les plus connus sont la cellulose issue de la paroi des plantes, les carraghénanes extraits d'algues rouges et les alginates extraits d'algues brunes, mais aussi le chitosane extrait des carapaces de mollusques **(Figure II.6) [39]**.

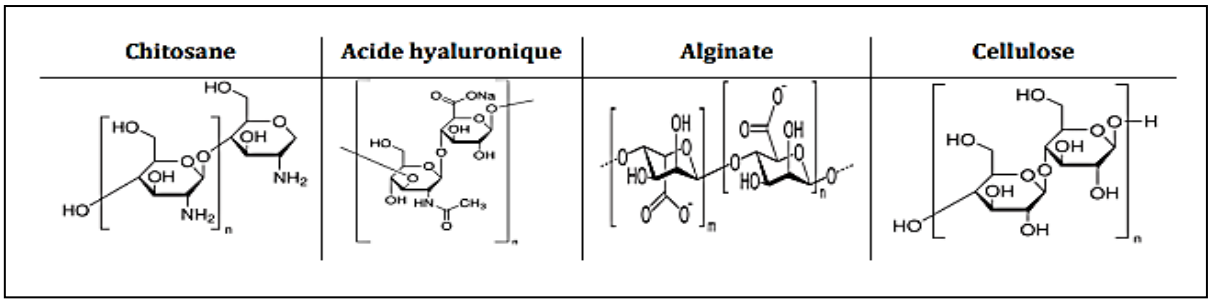


Figure.II.6. Formules chimiques de divers polysaccharides **[40]**

- **Protéines :** ce sont principalement les protéines issues de tissus animaux comme le Collagène, la gélatine, et la lignine ou des produits animaux comme les caséines

et des Protéines issus des plantes oléagineuses (colza, tournesol et soja), ou des protéagineux (pois, Fèveroles), ou encore du son des céréales (gluten du blé).

- **Elastomères hydrocarbonés :** ils sont produits par les plantes comme le caoutchouc naturel.

II.5.4. Les polysaccharides

Les polysaccharides**,** sont des polymères appelés aussi polyosides**,** polyholosides font partie de la famille des glucides ou en langage courant des sucres**.** Ce sont des sucres complexes**,** formés d'un grand nombre (jusqu'à à 500) de molécules simples, soit d'un seul type, soit de plusieurs types de sucres simples liées ensemble**.** Ils constituent une famille très importante de molécules souvent ramifiées et ayant tendance à ne pas prendre de forme particulière **:** on dit qu'ils sont amorphes**.**

Les polysaccharides sont les homologues macromoléculaires des oses simples naturels **;** ils peuvent être modifiés chimiquement pour donner des polymères artificiels **[41].**

Ces sucres peuvent être obtenus à partir de différent sources **:** microbienne**,** animale ou végétale**.** Ils ne sont pas toxiques**,** sont solubles dans l'eau, montrent des interactions favorables avec les cellules et présentent également un faible cout en comparaison avec d'autres polymères naturels**.** Par conséquent**,** les polysaccharides ont été largement étudiés comme structures pour des applications en ingénierie tissulaire ainsi que pour la vectorisation de principes actifs **[40]**.

▪ **Origine :** La plupart des polyosides sont d'origine végétale et relativement peu de polysaccharides d'origine microbienne sont produits commercialement. Pourtant, Linton et ses collaborateurs (1991) **[42]** insistent sur la diversité des polysaccharides produits par les bactéries, et déplorent leur sous-exploitation. En effet, 200 sucres ont été recensés dans leur composition, alors que seulement 25 ont pu être identifiés dans les polysaccharides d'origine végétale.

Il existe dans la nature de nombreuses variétés de polysaccharides répertoriées, auxquelles l'intérêt porté est proportionnel aux propriétés ou applications potentielles. Ces polysaccharides peuvent être d'origine végétale, c'est le cas de l'amidon, de la cellulose, des pectines ou des gommes. Ils peuvent également être issus des algues comme les alginates, les carraghénanes, l'agar ou les fucanes, ou encore être d'origine animale (héparine, chondroïtine), ou microbienne (dextranes, xanthanes). Le **tableau II.1** représente l'origine des polysaccarides **[43].**

Tableau II.1. Origine des polysaccharides **[43]**

Origine des polysaccharides	Polysaccharides
Végétale	Amidon, Cellulose, Pectines, Gommes
Algale	Alginates, Agars, Caarraghénanes, Fucanes
Animale	Héparine, Chondritine
Microbienne	Dextranes, Xanthanes

- **Classification des polysaccharides :** Selon le domaine d'utilisation les polysaccharides sont classés comme suivant **[44]**:

✓ **En chimie :** Ils sont classés en deux catégories

- **Homo-polysaccharides**: polymères d'un même ose
- **Hétero-polysaccharides**: polymères de 2 ou plusieurs types d'oses.

✓ **En biologie :** Ils sont encore classés en deux catégories **:**

- **Polysaccharides de réserve :** la molécule source d'énergie pour les êtres vivants est principalement le glucose, sous forme d'amidon chez les végétaux et de glycogène chez les animaux.
- **Polysaccharides structuraux :** ces carbohydrates participent à la formation des structures organiques, comme la cellulose qui participe à la structure des tissus de soutien chez les végétaux. Chez les animaux, c'est la chitine qui joue ce rôle. Certains polysaccharides entrent dans la composition de la capsule entourant certaines bactéries.

II.5.5. Les carraghénane

II.5.5.1. Définition

Le terme carraghénane désigne une classe de polysaccharides polysulfatés qui constituent la matrice cellulaire de nombreuses espèces d'algues rouges (algues marines de la classe des Rhodophycées). Leur nom dérive de celui du lichen Carageen dont ils furent initialement extraits.

Ces composés présentent la propriété de modifier le comportement rhéologique des milieux aqueux, cette modification de texture pouvant aller du simple épaississement jusqu'à la gélification. Mieux connus des consommateurs européens sous l'appellation E407, les

carraghénanes sont largement utilisés comme agent de texture dans les produits de consommation courante (desserts lactés, sauces) mais aussi dans l'industrie chimique et pharmaceutique pour stabiliser les émulsions ou les dispersions. Mais aussi, du fait de leur biocompatibilité et de leurs capacités de bioadhésion, les carraghénanes susceptibles de former des hydrogels suscitent un grand intérêt dans l'élaboration de systèmes microparticulaires de délivrance de principe actifs. Nous pourrons établir que parmi ces carraghénanes, les kappa carraghénanes présentent un processus de gélification iono- et thermosensible.

Ces caractéristiques en font de bons candidats à la préparation de microsphères par gélification ionotropique. Nous verrons que ce type de carraghénane et la nature des ions présents dans la solution durcissante sont les paramètres clefs de la fabrication de ces microsphères.

II.5.5.2. Obtention des carraghénanes et composition chimique

Les carraghénanes sont essentiellement extraits d'algues de l'espèce Eucheuma. L'extraction s'effectue en deux étapes. La première est une macération à chaud (90°C) à pH basique afin d'améliorer son rendement, de modifier la structure des chaînes précurseurs et d'améliorer les propriétés gélifiantes tout en limitant l'hydrolyse acide. La deuxième étape de l'extraction, qui consiste à séparer les différents types de carraghénanes entre eux, repose sur leurs différences de solubilité dans différents alcools. Après séchage, les échantillons obtenus sont de masse moléculaire élevée (de 105 à 106 D), très polydisperses et de composition variable en fonction de l'espèce et de l'âge de l'algue considérée, du lieu et de la saison de la récolte **[45].**

Les carraghénanes sont des polysaccharides sulfatés linéaires, dont le motif de répétition est un disaccharide constitué de deux résidus galactoses plus ou moins sulfatés, le second présentant ou non un pont 3,6-anhydro **[46].** En fonction de ces deux paramètres, on distingue trois classes de carraghénanes : les kappa (κ), les iota (ι) et les lambda (λ) carraghénanes. Dans la suite de ce travail, nous ne nous intéresserons qu'au kappa carraghénane mais aussi au iota carraghénane qui est présent en tant qu'impureté dans le κ-carraghénane. La structure "idéale" de ces produits a été déterminée par Rees et coll. **[47-48]** qui ont fait la distinction entre ι et κ-carraghénanes **Figure.II.7**

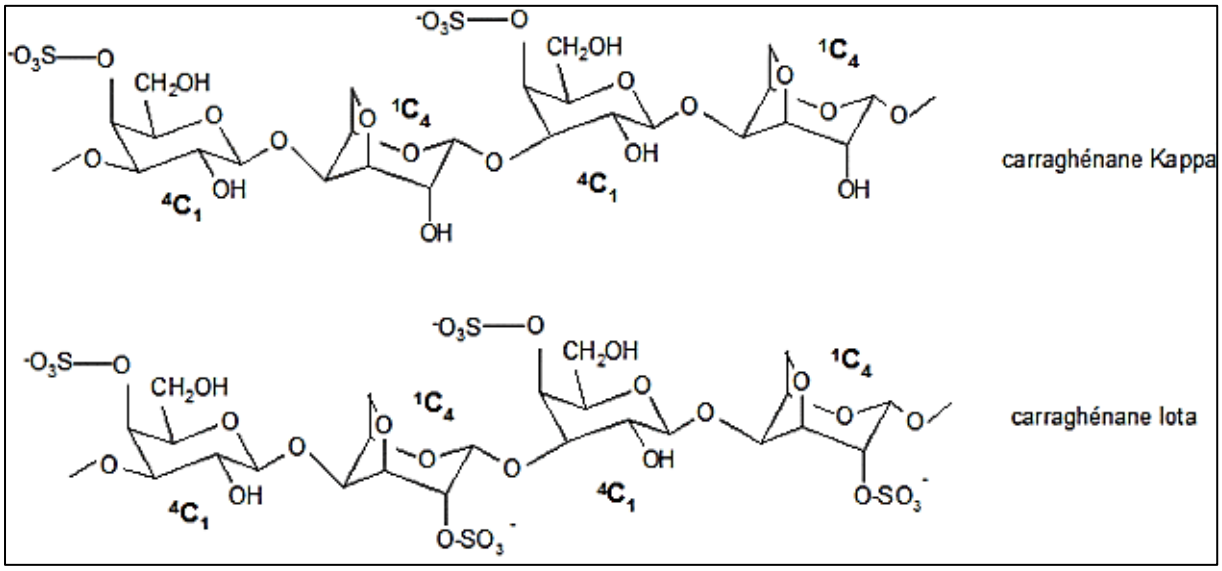


Figure II.7. Structures chimiques des iota et kappa carraghénanes **[49]**

Le kappa carraghénane présente un β-D-galactose-4-sulfate (noté résidu A ou cycle C1) lié en 1,3 et un 3,6-anhydro-α-D-galactose lié en 1,4 (noté résidu B ou cycle 1C) alors que le iota-carraghénane porte un groupement sulfate sur le résidu B.

Cependant, il n'est pas rare que l'enchaînement disaccharidique présente des irrégularités de structure ou de substitution **[51,52]**, entraînant une composition et/ou une conformation différente des chaînes. Ces irrégularités ou défauts peuvent provenir de deux origines :

• D'une part sont présentes dans l'algue deux fractions supplémentaires : mu (μ) et nu (n), précurseurs biologiques des fractions kappa et iota respectivement. Ces précurseurs biologiques ne comportent pas de pont anhydro-galactose; la transformation de l'unité galactose en anhydro-galactose est obtenue par élimination d'un groupement sulfate soit sous l'action d'une enzyme contenue dans l'algue, soit au cours du traitement industriel. Cette transformation peut être incomplète.

• D'autre part, il faut aussi savoir qu'un échantillon de carraghénane n'est jamais pur : à titre d'exemple, un échantillon de kappa-carraghénane contient de 3 à 15% en masse de ι -carraghénane. Cette proportion "d'impuretés" présente dans l'échantillon est un facteur important à prendre en compte. En effet, Landry **[53]** a démontré que la présence dans un extrait de kappa carraghénanes issus d'Eucheuma Cotonii ayant 10% de contamination iota, soit 5% de cycles anhydro-galactose ne représentant pas la structure kappa, suffit à changer certaines

propriétés mécaniques des gels. Quelle que soit son origine, une irrégularité de structure ou de substitution entraîne un changement de conformation de la chaîne qui a pour conséquence une modification de sa flexibilité lorsqu'elle est à l'état désordonné en solution et une interruption de sa structure hélicoïdale à l'état ordonné. La grande densité des groupements sulfate confère aux chaînes de carraghénanes un caractère fortement anionique. La forme acide libre, fragile, est instable et insoluble. Les carraghénanes sont, par conséquent, commercialisés sous forme stable de sels de sodium, de potassium et de calcium (l'un dominant quantitativement). Comme nous le verrons par la suite, ces cations associés ont une grande influence sur les propriétés texturantes ou gélifiantes des carraghénanes. La solubilité des carraghénanes est régie par la présence et le nombre des groupements sulfates, la présence du pont 3,6-anhydro-galactose, la force ionique et le type d'ions en solution. Les kappa-carraghénanes ne sont par conséquent solubles qu'à chaud, à une température d'autant plus élevée que la force ionique est élevée. Les iota-carraghénanes, avec deux sulfates par disaccharide, sont partiellement solubles à froid et totalement à chaud à force ionique modérée. Ces différences de solubilité entre carraghénanes, liées à leur structure chimique, vont de pair avec l'aptitude des chaînes à s'associer entre elles pour former des gels. **[53].**

II.5.5.3. Propriétés physico-chimiques des carraghénanes

A température élevée et en solution, les chaînes de κ-et ι-carraghénanes sont dans un état désordonné sous la forme de bâtonnets semi-rigides. Cet état désordonné est dû à l'agitation thermique. Lorsque la température est abaissée, la transition sol/gel se produit et les carraghénanes passent à un état ordonné sous forme d'hélices. Le gel se forme en présents de cations « gel-promoteur » qui neutralisent les charges négatives des groupements sulfates sur l'hélice et permettent leur association en agrégat **[50].** Les ι-carraghénane forment un gel très élastique en présence de calcium et les κ-carraghénanes forment un gel dur et cassant en présence de potassium.

Tableau 1.2. Propriétés physico-chimiques des carraghénanes **[51].**

	κ carraghénane	ι carraghénane	λ carraghénane
Solubilité dans l'eau	A chaud 60°C	A chaud 60°C	A froid
Formation du gel	En refroidissant Thermoréversible Ionoréversible En présence K^+ Gel rigide, élastique En présence Ca^{2+} Gel ferme, cassant.	En refroidissant Thermoréversible Ionoréversible En présence Ca^{2+} Gel mou, élastique	Pas de gélification
Synérèse	Oui	Non	Non
Thixotropie	Non	Oui	Non
Interaction avec protéines du lait	Gel cassant	Gel élastique	Gel mou
Stabilité : pH neutre ou alcalin pH acide (3,5)	 Stable Stable à l'état gélifié	 Stable Accéléré par la chaleur	 Stable Hydrolyse

Légende :

Gel thermoréversible : gel qui se liquéfie et se reforme en fonction de la température.

Gel ionoréversible : gel qui se liquéfie et se reforme en fonction de la concentration en sels.

Synérèse : phénomène observé lorsque le solvant présent entre les chaînes polysaccharidiques est expulsé et que le gel devient alors de plus en plus rigide.

Thixotropie : le gel peut être cisaillé, devenir liquide et reformer un gel après une période de repos.

Contrairement au κ -carraghénane et ι-carraghénane, le λ-carraghénane ne forme pas de gel en solution. Mais le λ-carraghénane possède des propriétés viscosifiantes et épaississantes élevées. La viscosité des solutions augmente avec la concentration en λ-carraghénane, et décroît en présence de sels et par élévation de la température.

II.5.5.4. Utilisation des carraghénanes

Les propriétés physico-chimiques particulières des carraghénanes sont exploitées industriellement. Les carraghénanes (E407) représentaient, en 1996, 15% du marché des hydrocolloïdes alimentaires. Leurs propriétés gélifiantes, texturantes et épaississantes sont utilisées dans les produits laitiers (flan, crème dessert, glace). Ce sont aussi des agents de suspension dans le lait cacaoté, les vinaigrettes et les jus de fruits avec pulpe.

Les carraghénanes sont aussi employés comme liants et texturants dans des produits cosmétiques (dentifrice, shampoing), et l'industrie chimique et pharmaceutique pour stabiliser les émulsions ou les dispersions.

Les carraghénanes peuvent servir également d'agent d'encapsulation **[53],** parmi ces carraghénanes, les κ -carraghénanes présentent un processus de gélification iono- et thermosensible. Ces caractéristiques en font de bons candidats à la préparation de microsphères par gélification ionotropique. Ce type de carraghénane et la nature des ions présents dans la solution durcissant sont les paramètres clefs de la fabrication de ces microsphères.

II.5.5.5.Les paramètres affectant le processus de gélification des carraghénanes :

- **Influence du temps et de la température :** Dans l'étude des propriétés mécaniques de gel de κ-carraghénane, le facteur cinétique est important dans la formation du gel. Meunier et al, 1999 montrent que le système s'équilibre lentement quand on est proche de la température critique T_c qui est d'environ $25C^0$ et qu'il faut attendre plus de 12 heures pour atteindre l'état final du gel .Ces observations ont également été faites sur des solutions de ι-carraghénane **[54,55].**
- **Influence de la force ionique :** La force du gel augmente avec la force ionique jusqu'à atteindre un plateau, puis diminue **[56,57]**. Il a été montre qu'en présence de certains anions, iodure ou sulfocyanate par exemple, la gélification ne peut pas se produire. Ceci est attribué à une très forte densité de charge des doubles hélices, limitant ainsi leurs agrégations **[58,59].**
- **Influence de pH :** Le pH dans la gamme de 5.5 à 9 ne semble pas influencer les propriétés viscoélastiques des gels d' ι -carraghénane pour une concentration de sel donnée. Pour des pH en dessous de 5.5, l'ι-carraghénane s'hydrolyse et peut perdre sa capacité à gélifier **[59].** Plus le pH est acide, plus l'hydrolyse des chaine de κ-carraghénane et ι-carraghénane augmente avec le temps et la masse moyenne des carraghénanes diminue **[60].** De plus, la dépolymérisation de κ-carraghénane est plus rapide à l'état liquide qu'a l'état gel **[60].** ι-carraghénane semble plus résistant à l'hydrolyse acide que le κ-carraghénane.
- **Influence de la concentration :** Plusieurs auteurs ont montré que le module élastique de gel de κ-carraghénane varie avec le carré de la concentration **[61].**

II.5.5.6. Influence de différents paramètres physico-chimiques sur le comportement des carraghénanes

➢ **Influence de la concentration :** Les carraghénanes possèdent la propriété d'augmenter considérablement la viscosité du milieu à de très faible concentration, inférieure à 1%. Ce comportement est la traduction macroscopique de l'existence d'enchevêtrement macromoléculaire qui apparaît au-delà d'une concentration critique en polymères C_{cr} qui est une fonction inverse de la viscosité intrinsèque **[61].**

$$\boldsymbol{Ccr} = K / [\eta] \qquad \text{(II.1)}$$

Telle que :

Ccr : Concentration critique

K : Constante

ŋ : viscosité intrinsèque

La constante K serait sera de l'ordre de 4 dans le cas de κ-carraghénane.

La rigidité du gel augmente suivant une loi exponentielle avec la concentration en iota carraghénane. Cependant la présence d'impureté de κ-carraghénane non quantifié peut entrainer la formation d'agrégats et fausser les résultats.

➢ **Influence de la température :** Une gélification par diminution de la température d'un système aqueux de iota carraghénane, avec des paliers de température suffisamment longs pour que le système atteigne l'équilibre avant de passer à la température suivante, montre que la rigidité de milieu augmente avec la gélification, d'abord au voisinage de la transition sol-gel puis de plus en plus lentement au fur et à mesure que la température diminue pour tendre vers un plateau **[54].**

La rigidité étant directement liée au niveau de réticulation du système, l'organisation de réseau de carraghénane dépend de la température et pratiquement pas de temps. A une température donnée correspond un degré d'organisation (réticulation) du réseau de carraghénane.

Les valeurs de la température de transition sol-gel **[54],** pour un système aqueux d'iota carraghénane (contenant 0.15M de NaCl) se situe dans le domaine 60-65°C, et de 40-45°C pour κ- carraghénane, ces valeurs dépendant largement de la concentration en ion. A titre d'exemple, dans les résultats décrits par Rochas et ses collaborateurs **[62],** lorsque la concentration en KCl

augmente de 0.1M à 0.4M, la température de transition sol-gel de l'ι-carraghénane augmente de 40 à 64°C.

- **Influence du temps :** Le temps n'a que peu d'influence sur la gélification des carraghénanes **[54].** En effet, les modules élastique et dissipatifs ou visqueux d'un système aqueux de κ -carraghénane semblent atteindre un équilibre au bout d'un temps relativement court à une température inferieure à la température de gélification.

II.6Conclusion :

- ✓ l'encapsulation consiste à enfermer une substance dans une capsule elle consiste à protégé la substance contre des interactions avec le milieu extérieur et de transporter la substance jusqu'à l'endroit où elle sera libérée pour agir.
- ✓ La composition chimique des carraghénanes est bien établie. La succession d'unités répétitives permet la formation d'une hélice droite dans des conditions de température et de solvant appropriées.
- ✓ Il existe cependant des irrégularités ou défauts dans la structure ou la substitution en différents points de la chaîne qui provoquent dans la conformation hélicoïdale des perturbations qui ont une grande importance dans le processus de gélification.
- ✓ Les carraghénanes présentent la capacité de former des gels thermoréversibles avec des domaines de transition sol-gel situés à des températures élevées.
- ✓ Nous venons de voir que le type de carraghénane et la nature des ions présents dans la solution durcissante ainsi que la température sont les paramètres clefs dans l'obtention d'un gel et donc, dans la fabrication de microsphères et que les plus satisfaisantes sur le plan morphologique et le plan mécanique seront obtenues à partir de kappa carraghénane en présence de [KCl] 0,6 M.

Chapitre III

III.1. INTRODUCTION

La partie expérimentale a été réalisée niveau du laboratoire de contrôle qualité de la filiale ANTIBIOTICAL-Saidal de Médéa, ainsi qu'au niveau du laboratoire de la faculté des Sciences (Université de Médéa).

Dans le contexte où s'inscrit notre travail, nous avons tenté d'atteindre un objectif, qui consiste à appliquer le procédé de gélification ionotropique du biopolymère Kappa carraghénane (KC) pour former des microcapsules chargés en principe actif (PA) : l'Insuline.

A cette effet, la partie expérimentale est subdivisée en deux (02) parties :

1. **Préformulation :** Cette partie du travail traite la caractérisation physico-chimique des matières premières utilisées à savoir le KC ainsi que le PA Insuline.
2. **Formulation des capsules :** Cette partie du travail expérimental a pour objectif la mise au point de la méthode d'encapsulation du PA par KC ainsi que la caractérisation physicochimique et biopharmaceutique des capsules obtenues.

III.2 MATERIEL ET METHODES

III.2.1 Matériel

Toutes les manipulations ont été réalisées en utilisant les équipements résumés dans le **Tableau III.1**

Tableau III.1 Matériel utilisé

Matériel	Marques
Balance électrique	METTLER TOLEDO
Agitateur magnétique	VELP SCIENTIFICA
pH-mètre	HANNA
Spectrophotomètre infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)	PERKIN ELMER Spectrum Version 10.03.06
Spectrophotomètre UV visible	PERKIN ELMER
Viscosimètre rotatif	ESCLAB
Dissolutest	SOTAX
Pied de coulisse digital	ABSOLUTE DIGIMATIC
Viscosimètre	WTW

III.2.2. Réactifs et produits chimiques

Les réactifs utilisés au cours de ce présent travail ainsi que leurs principales caractéristiques sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau III.2. Caractéristiques des réactifs utilisés

Produit	Formule chimique	Masse Molaire ($g.mol^{-1}$)	Pureté	Fournisseur
Acide chlorohydrique	HCl	36.46	37%	Honeywell FLUKA
Chlorure de potassium	KCl	74.55	99.6%	VWR CHEMICALS
Dihydrogénophosphate de potassium	KH_2PO_4	136.09	99.9%	VWR CHEMICALS
Hydroxyde de sodium	NaOH	40	99%	PANREAC

III.3 PREFORMULATION

La pré-formulation est la phase initiale du processus de mise au point et de développement pharmaceutique. C'est une étape extrêmement importante qui consiste à l'étude des caractéristiques physico-chimiques et technologiques du principe actif "Insuline", nécessaire pour formuler et développer une forme pharmaceutique stable de microcapsules.

III.3.1 Principe actif : Insuline humain

Selon la pharmacopée , l'insuline humaine est un peptide à 2 chaines ayant la structure de l'hormone antidiabétique produit par le pancréas humain.

- *Dénomination commune internationale :* Insuline humain
- *Formule chimique :* $[C_{257}H_{383}N_{65}O_{77}S_6]$
- *Teneur :* **95.0%** à **105.0%** d'insuline humaine $C_{257}H_{383}N_{65}O_{77}S_6$ plus A 21 désamido-insuline humaine (substance desséchée). Par convention, il a été établi pour l'étiquetage des préparations d'insuline, que 0.0347 mg d'insuline humaine correspond à 1 UI d'insuline.
- *Aspect :* poudre blanche ou sensiblement blanche.

- *Solubilité :* pratiquement insoluble dans l'eau et dans l'éthanol à 96% , l'insuline humaine se dissout dans les acides minéraux dilués et avec décomposition dans les solutions diluées d'hydroxydes alcalins. **[63]**

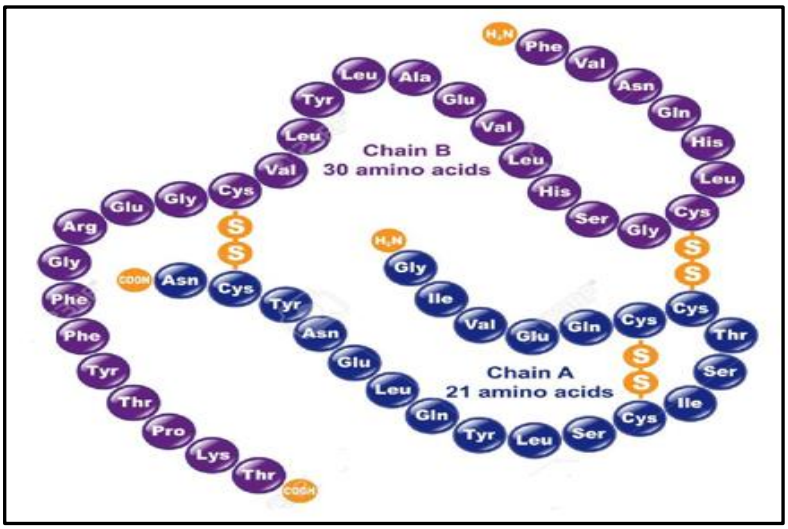


Figure III.1. Structure chimique de l'Insuline humain

III.3.1.1. Identification par FTIR

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier ou spectroscopie IRTF (ou encore FTIR, de l'anglais Fourier Transform InfraRed spectroscopy) est une technique utilisée pour obtenir le spectre d'absorption, d'émission, la photoconductivité ou la diffusion Raman dans l'infrarouge d'un échantillon solide, liquide ou gazeux.

Un spectromètre FTIR permet de collecter simultanément les données spectrales sur un spectre large. Ceci lui confère un avantage significatif sur les spectromètres à dispersion qui ne peuvent mesurer l'intensité que dans une gamme réduite de longueurs d'onde à un instant donné.

La spectroscopie IR est une méthode d'emploi courant, laissée un peu de côté ces dernières années au profit de la RMN, qui permet de déterminer avec une grande précision les structures moléculaires.

Un spectre IR est représenté sur un graphe qui reporte la transmission (T, l'inverse de l'absorption : T = -ln1/A) en fonction du nombre d'onde, l'inverse de la longueur d'onde.

a. Principe de la méthode

Le principe de la spectroscopie par transformée de Fourier est une façon moins intuitive d'obtenir la même information. Plutôt que d'illuminer l'échantillon avec un faisceau de lumière monochromatique, cette technique utilise un faisceau contenant une combinaison de multiples fréquences de la lumière, et on mesure l'absorption par l'échantillon. Le faisceau est ensuite modifié pour contenir une combinaison de fréquences différentes, on mesure de nouveau l'absorption par l'échantillon, et l'opération est répétée de nouveau, de multiples fois. Une fois toutes les données acquises, un ordinateur prend toutes ces données et calcule à rebours pour en déduire l'absorption à chaque longueur d'onde.

Le faisceau décrit ci-dessus est produit à partir d'une source de lumière à large bande, contenant l'ensemble du spectre des longueurs d'onde à mesurer. La lumière passe par un interféromètre de Michelson — un ensemble de miroirs réfléchissants ou semi-réfléchissants dans une certaine configuration, dont l'un est déplacé par un moteur de façon à faire varier le trajet parcouru par la lumière. Au fur et à mesure que le miroir se déplace, chaque longueur d'onde se trouve périodiquement bloquée ou transmise par l'interféromètre, par interférences. Différentes longueurs d'onde sont ainsi modulées à des vitesses différentes, de sorte que, à chaque instant, le faisceau sortant de l'interféromètre possède un spectre différent.

Comme mentionné précédemment, un traitement par ordinateur est nécessaire pour convertir les données brutes («interférogramme », la lumière absorbée en fonction de la position du miroir) en données directement exploitables (lumière absorbée en fonction de la longueur d'onde). Ce procédé requiert un algorithme commun, la transformation de Fourier, qui donne son nom à cette technique.

b. Mode Opératoire

Les techniques diffèrent selon que le composé à étudier est à l'état gazeux, liquide, solide ou en solution. Les spectres FTIR ont été obtenus par les méthodes suivantes :

- Les liquides et les solutions : Si le liquide est peu visqueux et volatil, il est introduit à l'aide d'une seringue adaptable dans une cuve fermée d'épaisseur déterminée.

- Les solide : Parmi les halogénures des métaux alcalins, le KBr est le plus couramment utilisé en tant que dispersif. Il est transparent jusqu'à 300 cm^{-1}.

- La préparation d'une pastille nécessite l'utilisation d'un moule à pastiller appelé aussi pastilleuse. La pastilleuse préalablement nettoyée est assemblée : le cylindre est placé sur son socle et une pastille métallique est introduite avec la face polie vers le haut.
- Une prise d'essai de 1 à 2 mg de la substance à analyser est mélangée avec 100 mg de KBr dans un mortier en agathe. Le mélange est finement broyé.
- Le mélange est mis dans la pastilleuse que l'on étale d'une manière homogène. Avant de compresser la poudre pour fabriquer une pastille, on fait le vide à partir de la connexion latérale pour éliminer toute trace d'eau puis on met l'ensemble sous une pression de 8 tonnes à l'aide d'une presse hydraulique comme on le voit sur la **figure III.2**.
- Avec le spectromètres FTIR, on enregistre le spectre IR de l'échantillon.
- Les spectres d'absorption infrarouge ont été enregistrés à des nombres d'ondes comprises entre 400 et 4000 cm^{-1}, avec une résolution de 8 cm^{-1} et un nombre de scans égal à 128. **[64]**



Figure III.2. Pastilleuse sous presse avec application de vide

c. Résultats et discussion : Les résultats de l'analyse FTIR de l'insuline a permis l'obtention les spectres d'absorbance **(Figure III.3)** et de transmittance **(Figure III.4)** du principe actif. Les fonctions caractéristiques de base de la molécule d'insuline sont représentées par les principaux pics distinctifs suivants :

- Les bandes à 3433.41 cm^{-1} caractérisent une élongation de la fonction N-H libre avec une intensité moyenne.
- Les bandes à 2337.8cm^{-1} sont caractéristiques d'une élongation symétrique de la fonction CH_2 avec une intensité moyenne.

- Les bandes à 1635.69 cm^{-1} dues à une élongation de la fonction C=O a une forte intensité.
- Les bandes de 1465.95 cm^{-1} , 1257 cm^{-1} et 1033.88cm^{-1} sont affectées à l'élongation de la fonction –C-O avec forte intensité .
- Les bandes observées à 563.23cm-^{1} sont attribuées à l'élongation du cycle aromatique.

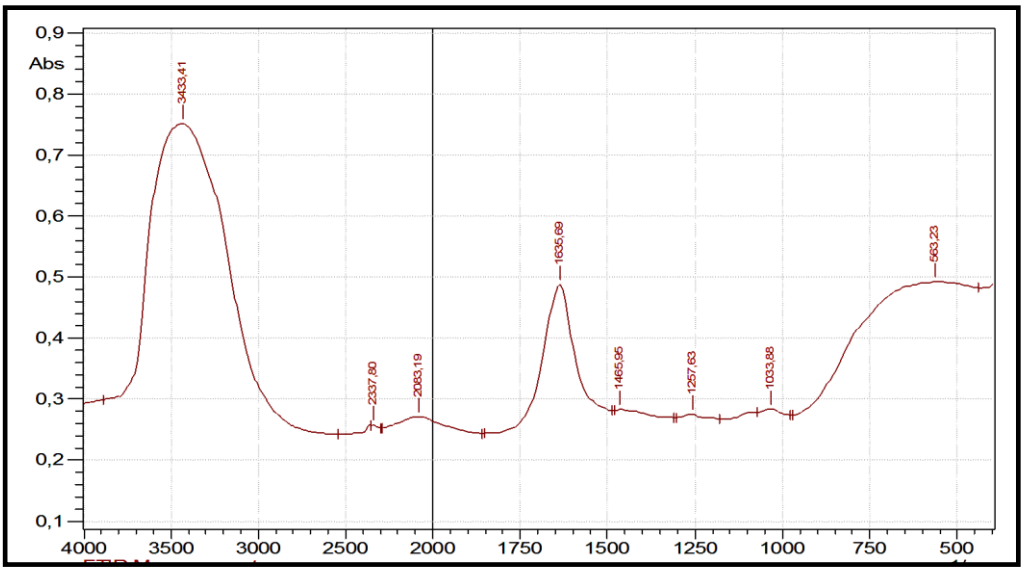


Figure III.3. Spectre FTIR de l'insuline (% Absorbance).

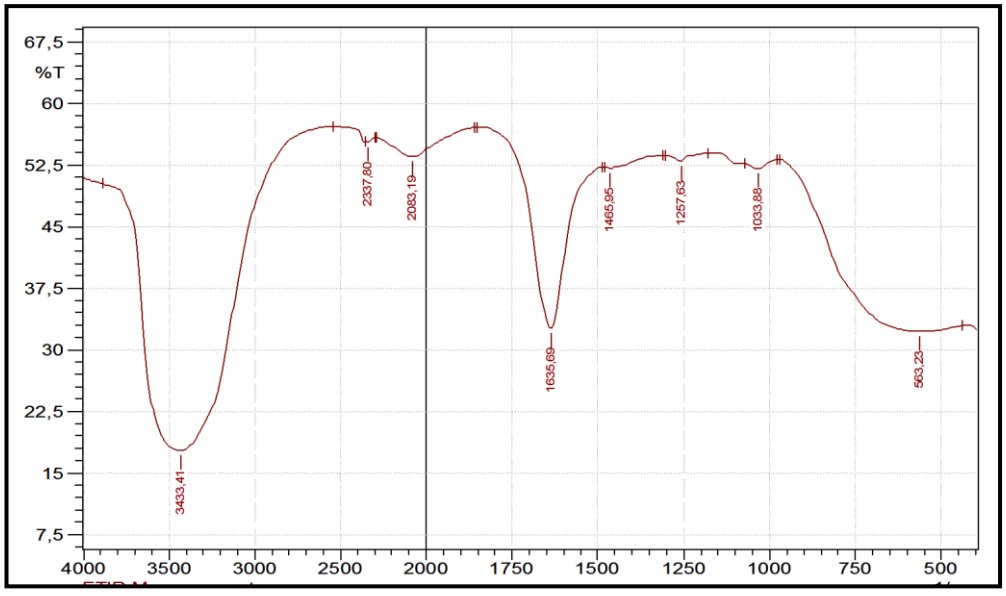


Figure III.4. Spectre FTIR de l'insuline (% transmittance).

III.3.1.2. Dosage de l'insuline par spectroscopie UV-Visible

La spectroscopie UV-Visible permet d'accéder qualitativement à des renseignements quant à la nature des liaisons présentes au sein de l'échantillon mais également de déterminer quantitativement la concentration d'espèces absorbant dans ce domaine spectral. Non destructive et rapide, cette spectroscopie est largement répandue en travaux pratiques de chimie ainsi qu'en analyse chimique ou biochimique.

a. Principe de la spectroscopie UV-VIS *:* La spectrométrie d'absorption moléculaire dans le domaine ultraviolet (UV), de 185 à 380 nm environ, et visible (VIS), de 380 à 800 nm environ, est une technique courante de contrôle et d'analyse de composés chimiques. Elle s'applique à des groupements d'atomes (ex : molécules, ions, polymères) qui absorbent le rayonnement électromagnétique dans le domaine UV-VIS.

L'absorption de la lumière UV-VIS par les molécules se produit, comme pour les atomes, du fait de transitions électroniques entre différents niveaux d'énergie. Un électron à l'état fondamental absorbe des radiations d'une énergie E suffisante pour l'élever à un niveau d'énergie supérieur, l'état excité.

Les longueurs d'onde d'absorption d'une molécule organique dépendent de l'énergie de liaison de ses différents électrons **[65].** La substance à analyser est exposée à une radiation lumineuse de longueur d'onde « λ » déterminée ou variable. Une partie de cette lumière (I_0) est absorbée par cette substance, provoquant de ce fait des changements dans la molécule ; l'autre partie de la lumière est transmise (I). L'absorption de cette radiation est déterminée par la loi de Beer-Lambert donnée par la relation suivante :

$$\mathbf{T} = \frac{\boldsymbol{I}}{\boldsymbol{I_0}} = \boldsymbol{e^{\varepsilon.c.l}} \qquad \text{(III.1)}$$

Avec :

I_0 : intensité de la lumière incidente.

I : intensité transmise.

ε : coefficient d'extinction dépendant de la nature de la substance et de lalongueur d'onde de la radiation.

C : concentration de la substance analysée (en mol/l).

L : épaisseur traversée (en cm).

T : Transmittance.

D = -log T.

D : absorbance (ou densité optique).

b. Choix de la longueur d'onde : Pour augmenter la précision de l'appareil et limiter l'incertitude sur les mesures, on se place à la longueur d'onde pour laquelle le coefficient d'absorption molaire de la substance est maximal dans le domaine 200 - 400 nm. L'étude du spectre ultraviolet de l'insuline (**Figure III.5**) a permis de noter deux maximums (λmax =213.8 nm pour le milieu acide à pH 1.2 et λmax = 214.1 nm pour le milieu basique pH 6.8)**.**

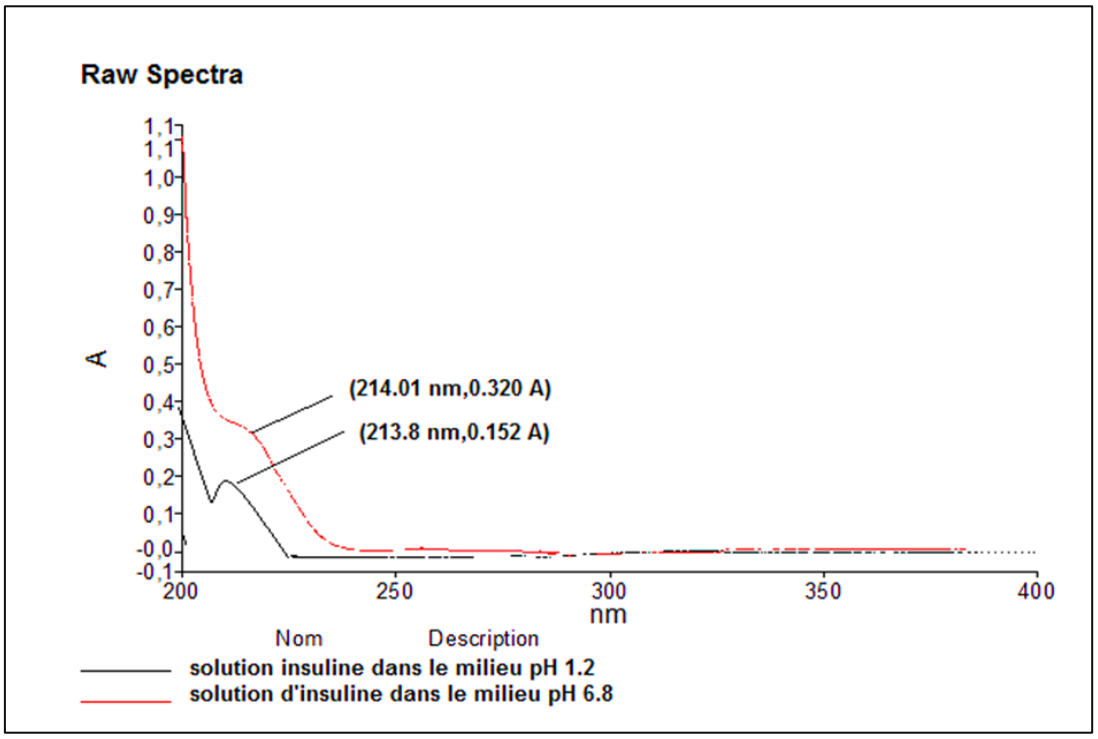


Figure III.5 Spectre UV-Visible d'insuline
Dans les solutions tampons à pH 1.2 et pH 6.8

c. Préparation des solutions tampons

- **Préparation de la solution tampon pH=1,2 à base de KCl 0.2M et HCl 0.2M :**50ml de la solution de chlorure de potassium à 0.2 M sont mélangées avec 85ml de la solution d'acide chlorhydrique à 0.2M, puis on complète à l'eau distillée jusqu'à 200 ml [63]
- **Préparation de solution tampon pH 6.8 à base de KH2PO4 0.2M et NaOH 0.2M :**50ml de la solution de dihydrogénophosphate de potassium à 0.2 M sont mélangées avec 22.4 ml de la solution d'hydroxyde de sodium à 0.2M, puis on complète à l'eau distillée jusqu'à 200 mL.**[63]**

d. Courbe d'étalonnage : les courbes d'étalonnage du principe actif insuline pour les deux milieux (pH 1.2 et pH 6.8) sont déterminées par la lecture des densités optiques des solutions d'insuline à différentes concentrations. Pour cela, les étapes suivantes ont été suivies:

- ***Préparation des solutions mères :*** Une pesée de 0.15mg d'insuline (substance de référence) est dissoute dans une fiole jaugée de 100 ml, complétée jusqu'au trait de jauge avec la solution tampon (de pH 1,2 ou pH 6.8). Ensuite chacune des solutions est mise sous agitation jusqu'à la solubilité totale de l'Insuline.

- ***Préparation des solutions diluées :***

- ***A pH 1,2 (Solution 1) :*** Dans une fiole de 10 ml, prélever 1.5 ml de la solution mère puis compléter jusqu'au trait de jauge à 10 ml avec la solution tampon pH 1.2. Le **Tableau III.3** représente les différentes dilutions de la solution 1.

- **A pH 6.8 (Solution 1):**Dans une fiole de 10 ml, prélever 1.5 ml de la solution mère puis compléter jusqu'au trait de jauge à 10 ml avec la solution tampon pH 6.8. Le **Tableau III.3** représente les différentes dilutions de la solution 1.

Tableau III.3. Préparation des dilutions utilisé pour les courbes d'étalonnage (pH 1.2 et pH6.8)

Solutions	Dilutions
Solution 1	1.5ml de la solution 1 + 8.5 ml de la solution tampon
Solution 2	1.3 ml de la solution 1 + 8.7 ml de la solution tampon
Solution 3	1 ml de la solution 1 + 9 ml de la solution tampon
Solution 4	0.8 ml de la solution 1 + 9.2 ml de la solution tampon
Solution 5	0.5 ml de la solution 1 + 9.5 ml de la solution tampon

- Mesurer la densité optique (DO) pour chaque concentration à λ =214.1 nm et λ=213.8nm
- Tracer la courbe d'étalonnage représentant DO = f(c).
- Les résultats sont représentés dans la **Figure III .6** et la **Figure III.7**.
- Les résultats du dosage de principe actif par spectrophotométrie UV-Vis sont représentés dans le **tableau III.4.**

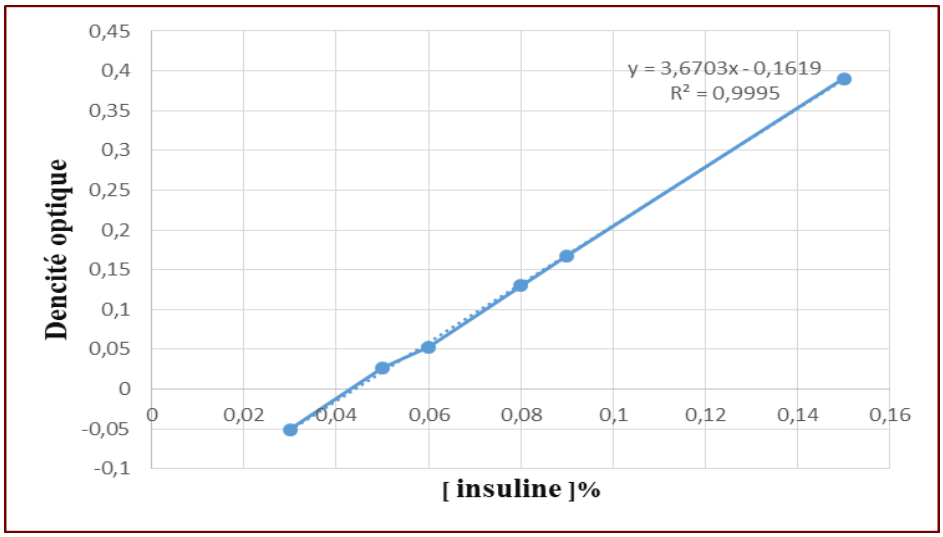


Figure III.6 Courbe d'étalonnage de l'Insuline à pH 1.2

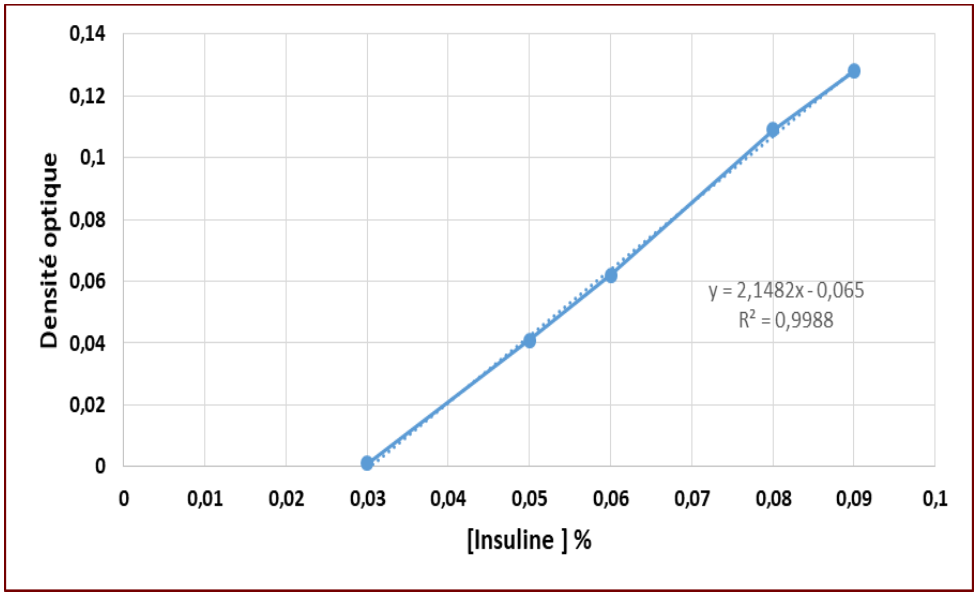


Figure III.7 Courbe d'étalonnage de l'Insuline à pH 6.8

Tableau III.4. Résultats de l'ajustement des courbes d'étalonnage de l'Insuline.

Milieux de dissolution	Longueur d'onde optimale (nm)	Equation de la droite d'étalonnage	Coefficients de corrélation R^2
Milieu Tampon pH 1.2	213.8	3.6703x-0.1619	0.9995
Milieu Tampon pH 6.8	214.01	2.1482x-0.065	0.9988

III.3.2. Le Biopolymère : Kappa carraghénane : Le kappa carraghénane est un épaississant et un gélifiant puissant extrait d'algues rouges desséchées puis broyées pour former une poudre



Figure III.8 Algue rouge desséchées

a. Formule chimique :

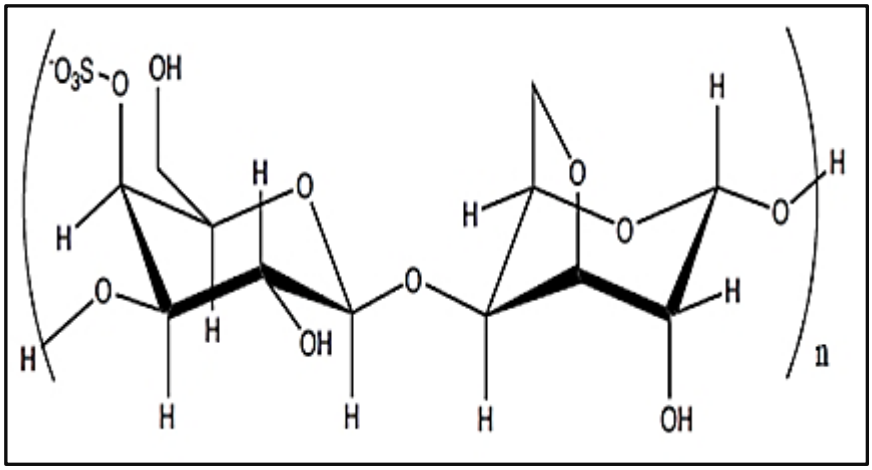


Figure III.9. Structure chimique du Kappa Carraghénane (KC)

- **Dénomination commerciale:** E 407
- **Masse molaire :** 385 000g.mol $^{-1}$
- **Point de fusion :** 65C° à 70C°
- **Aspect :** poudre blanche pratiquement inodore et sans goût, donnant un gel transparent.



Figure III.10 Poudre de kappa carraghénane

a. Détermination du Viscosité : Les mesures de la viscosité des solutions de kappa carraghénane dans l'eau distillée à différentes concentrations (0.5%, 1%, 1.5%, 2%) ont été réalisées par un viscosimètre rotatif (**Figure III.11**), à température ambiante, à une vitesse de cisaillement de 60 tr/min. Ce test consiste à étudier la variation de la viscosité en fonction des différentes concentrations de KC.



Figure III.11 Viscosimètre rotatif **(Brookfield)**

La **Figure III.12** présente la variation de la viscosité apparente en fonction de la concentration de KC. Nous pouvons remarquer une légère augmentation de la viscosité jusqu'à une concentration de KC de 1%, au-delà de cette concentration, l'augmentation de la viscosité devient beaucoup plus prononcée et les solutions deviennent très visqueuses.

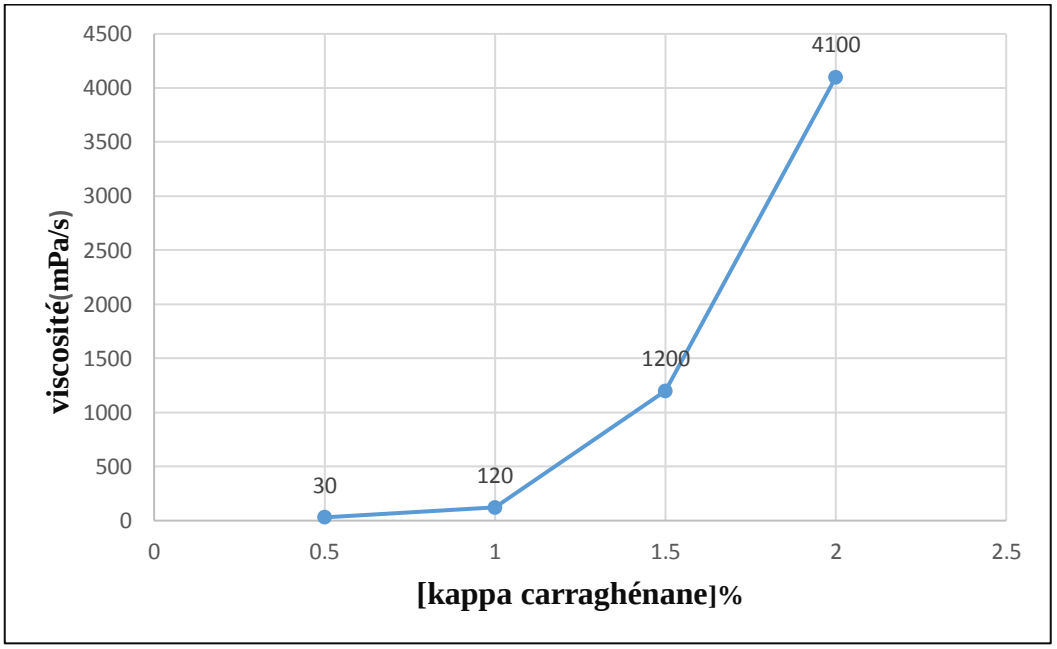


Figure III.12. Courbe de viscosité en fonction de concentration en KC (%)

b. Détermination du pH et de la conductivité

- ***Le pH :*** Le pH (potentiel Hydrogène) permet d'évaluer la concentration de l'ion hydrogène dans une solution. Cette grandeur chimique mesure le caractère acide ou basique d'une solution aqueuse. La détermination potentio-métrique du pH est effectuée par une appareil permettant de mesurer le pH d'une solution, qui se composent d'un boîtier électronique et d'une sonde dotée de deux électrodes (l'une de référence et l'autre à potentiel variable).

- ***La conductivité :*** La conductivité est une grandeur physique qui caractérise l'aptitude d'une substance à conduire le courant. La conductimétrie est la mesure de cette grandeur physique et le conductimètre c'est l'appareil utilisé pour mesurer la conductivité d'une solution.

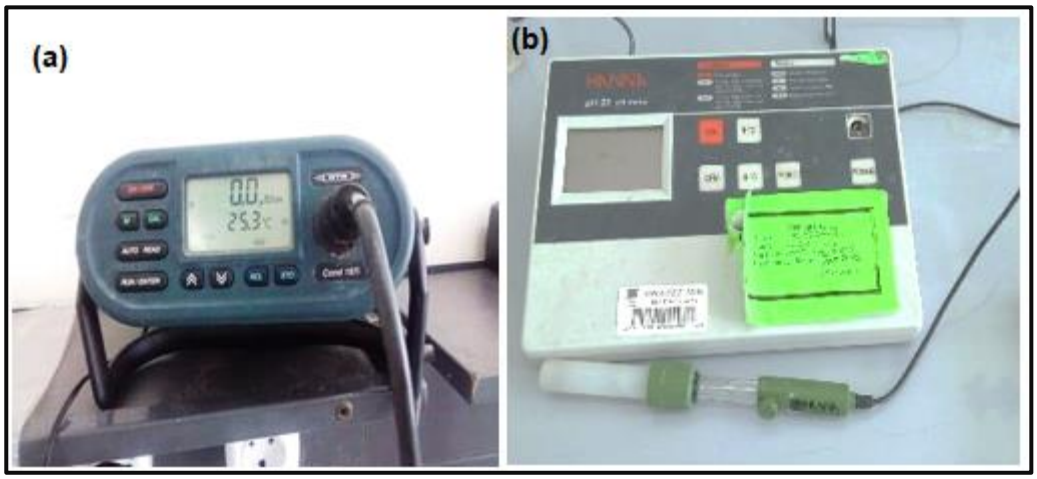


Figure III.13. Appareils : conductimètre **(a)** pH mètre **(b).**

- ***Mode opératoire***

La mesure du pH des solutions de KC dans l'eau distillée à différentes concentrations (0.5%. 1% .1.5%. 2%) est réalisée à température ambiante. Le pH est mesurée à l'aide d'un pH-mètre, selon les étapes suivantes :

- ✓ Rincer l'électrode du pH mètre avec de l'eau distillée.
- ✓ Calibrer l'appareil avec les solutions tampons de pH différents.
- ✓ Rincer l'électrode du pH-mètre avec de l'eau distillée.
- ✓ Plonger l'électrode dans la solution à examiner et effectuer la lecture dans les mêmes conditions que pour les solutions tampons.
- ✓ Lire la valeur du pH indiquée dans l'écran du pH-mètre.
- ✓ Rincer l'électrode et plonger là dans la solution et on répète les mêmes étapes pour les autres solutions.

La mesure de la conductivité des solutions de KC dans l'eau distillée à différentes concentrations (0.5%. 1% .1.5%. 2%) est réalisée à température ambiante, selon les étapes suivantes :

- ✓ Rincer la sonde du conductimètre avec de l'eau distillée.
- ✓ Plonger la sonde dans la solution à examiner et effectuer la lecture dans les mêmes conditions que pour les solutions tampons.
- ✓ Lire la valeur de la conductivité indiquée sur l'écran.

✓ Rincer la sonde et plonger la dans la solution et on répète les mêmes étapes pour les autres solutions.

Les valeurs de pH et conductivité obtenues sont représentées sur la **figure III.14.** On remarque une légère augmentation du pH, variant de 8.27 jusqu'à 9.09 et une augmentation de la conductivité de 1.75mS/cm au 5.53 mS/cm, en augmentant la concentration en KC de 0.5% à 2%.

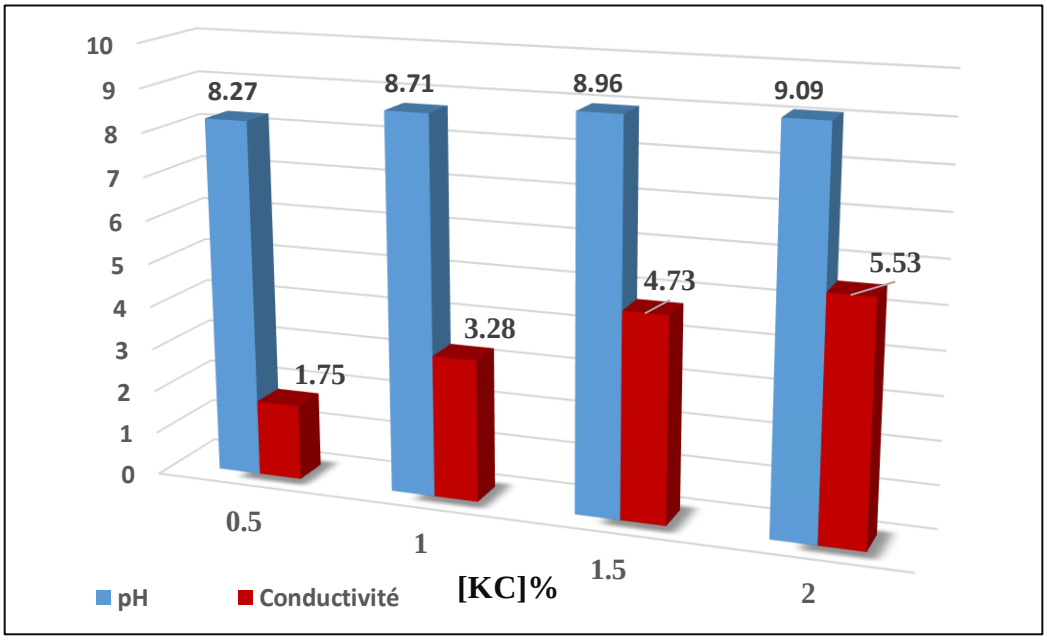


Figure III.14. Variation de la conductivité et du pH des solutions de KC

c. Identification FTIR de KC

Les spectres d'absorption infrarouge ont été enregistrés à des nombres d'ondes comprises entre 400 et 4000 cm^{-1}, avec une résolution de 8 cm^{-1} et un nombre de scans égal à 128. Les résultats sont donnés par la **figures III.15** et la **figure III.16**.

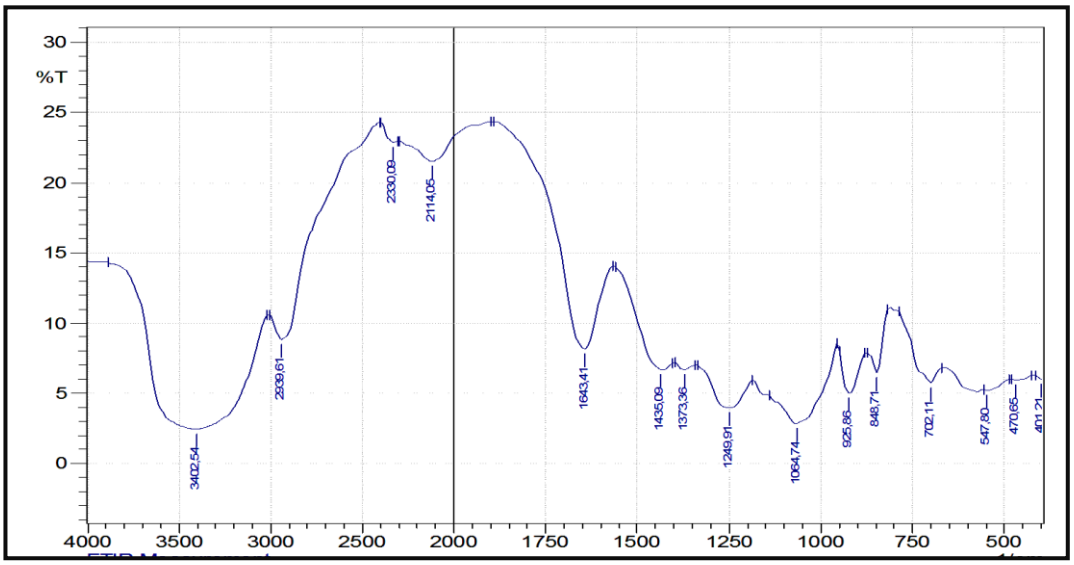


Figure III.15. Spectre FTIR de KC (% transmittance).

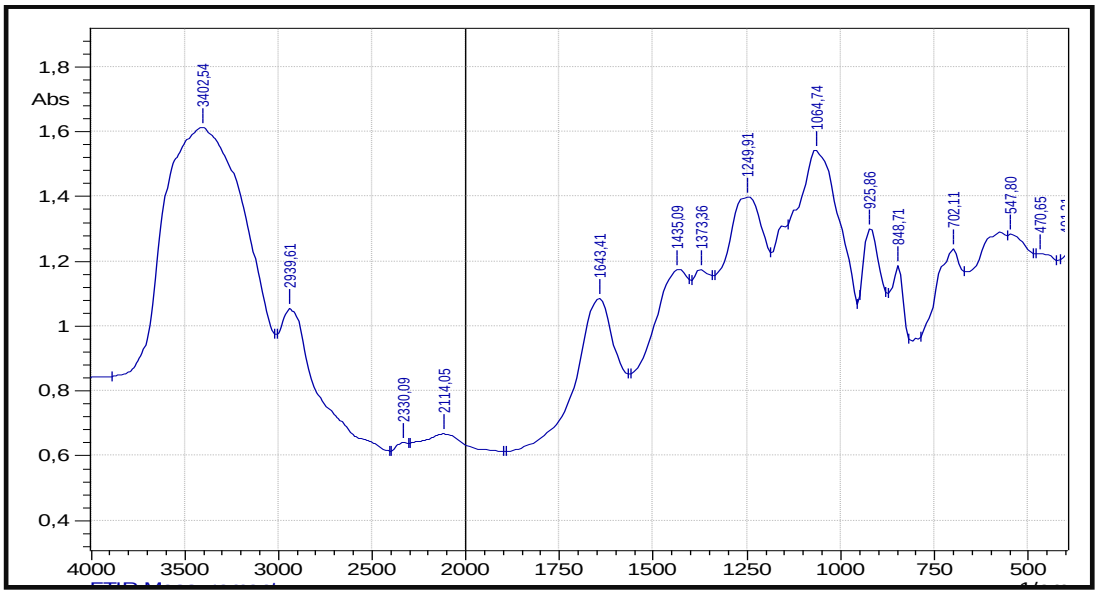


Figure III.16. Spectre FTIR de KC (% Absorbance).

L'analyse des spectres FTIR du KC nous renseigne sur les caractéristiques de base de la molécule de KC.

- Les bandes autour de 1064.74cm^{-1} , 2939.61 cm^{-1} sont liées à l'élongation des groupements C-O et C-H respectivement à une forte intensité .
- Les bandes autour de 3402.54cm^{-1} et 1373.36cm sont liées à l'élongation de groupement OH à une forte intensité .

- La bande à 2330.09cm^{-1} est une élongation symétrique de la fonction CH_2 avec une intensité moyenne
- Les bandes à 2114.05 cm^{-1} et 1249.91 cm^{-1} sont liées à une élongation du groupement C-C à une intensité moyenne à faible .
- La bande à 1643.41cm^{-1} est liée à une élongation de la fonction C=C avec une intensité moyenne ¨
- La bande 1435.09cm^{-1} est liée à une déformation dans le plan asymétrique de la fonction CH_3
- La bandes 925.86 cm^{-1} prouvent l'existence de la fonction « C-O-C » de 3,6 anhydro-D galactose.
- Les bandes 848.71 cm^{-1} sont affectées à l'élongation de la fonction « C_4-O-S » de la fonction chimique SO_4 .
- Les bandes à 702.11cm^{-1} sont affectées à une déformation de la fonction C-H
- Les bandes 547.80cm^{-1} et 470.65cm^{-1} sont affectées à une élongation aromatique.

III.3.3. Evaluation des interactions entre l'Insuline et le KC

Dans cette étude de Préformulation, une analyse par FTIR des spectres du principe actif, de KC et du mélange physique des deux constituants permettra d'évaluer l'inertie du KC en tant qu'excipient vis-à-vis du principe actif. Sachant que cette condition est une exigence de tout excipient en industrie pharmaceutique.

Les **Figures III.17 et III.18** représentent les spectre FTIR de transmittance et d'absorbance du mélange physique KC/ Insuline, respectivement.

Les principaux pics distinctifs sont les suivants :

- Les bandes 3487.42 cm^{-1} et 3336.97 cm^{-1} sont affectées à l'élongation de la fonction N-H libre avec une intensité moyenne
- Les bandes autour de 3402.54cm^{-1} , 1373.36 cm^{-1} et 2499.83 cm^{-1} sont affectées à l'élongation de groupement OH a une forte intensité .
- Les bandes 2083.19cm^{-1} sont affectées à une élongation asymétrique du groupement N=C=S.
- Les bandes à 1427.37 cm^{-1} et 1064.74 cm^{-1} sont affectées à une élongation de la fonction –C-O avec forte intensité
- Les bandes à 635.69cm^{-1} sont affectées à une élongation de la fonctionC=O avec une forte intensité .

- Les bandes 1249.91 cm^{-1} sont affectées à une élongation du groupement C-C à une intensité moyenne à faible .
- La bande 925.86 cm^{-1} prouvent l'existence de laisons C-O-C du 3,6 anhydro-D galactose.
- Les bandes 848.71 cm^{-1} sont affectées à l'élongation de la fonction C_4-O-S.
- Les bandes 516.94cm^{-1} et 408.92cm^{-1} sont affectées à une élongation aromatique.
- Toutes les bandes caractéristiques du principe actif Insuline sont retrouvées dans les spectres FTIR du mélange physique KC/ insuline, ce qui montre l'inertie du KC, et implique son utilisation sans aucun risque d'interaction vis-à-vis du principe actif.

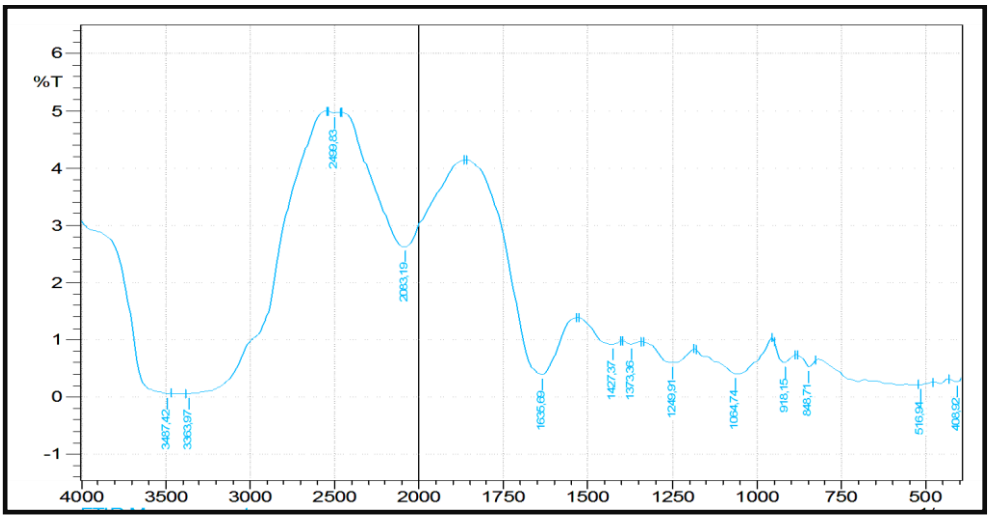


Figure III.17. Spectre FTIR du mélange KC / Insuline (% transmittance)

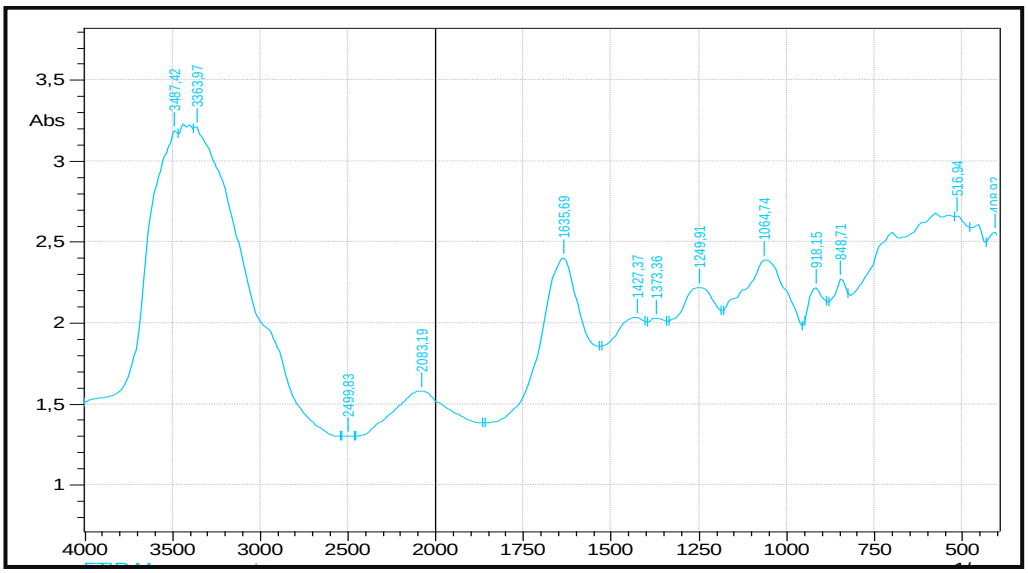


Figure III.18. Spectre FTIR du mélange KC / Insuline (% absorbance)

III.4. FORMULATION DES CAPSULES

III 4.1. Méthode d'encapsulation

Le principe consiste à faire tomber goutte à goutte la solution polymérique dans un bain ou est réalisée la gélification ionotropique des gouttes. Une solution de 0.5 à 2.5% de KC sont chauffée pour être mélangée au principe actif biologique à encapsuler. Le mélange ainsi obtenu est extrudé goutte à goutte dans une solution de KCl à 0.75M **[66].** Les capsules obtenues ont été laissées dans la solution de KCl pendant 30 min, puis filtrés et lavés avec de l'eau distillée et enfin laissés sécher à l'air libre. Les capsules formées sont sphériques et de taille homogène. Leur taille peut varier selon l'évolution de la technique de 100µm à 3000µm.

III 4.2. Mode opératoire

1. Peser des prises d'essais de bio polymère KC correspondant à des concentrations allant de 0.5% à 2 % en biopolymère, et les faire dissoudre dans 10ml d'eau distillée à 60°C.
2. Agiter magnétiquement le mélange à 40 rpm jusqu'à dissolution complète du bio polymère, jusqu'à atteindre 25°C.
3. Introduire une prise d'essai équivalente à 3% du principe actif (Insuline humain), dans la solution de biopolymère sous agitation à 25°C
4. Remplir une seringue de 5ml par la solution obtenue et faire tomber cette solution goutte à goutte à travers l'orifice de la seringue dans un cristallisoir contenant une solution de KCl 0.7M sous agitation et à une température de 35°C **(Figure III.19)**.
5. Le débit d'extrusion influence non seulement la vitesse de formation des microbilles de gel mais aussi leur taille. En effet, lorsque celui-ci diminue, il se forme des gouttes plus volumineuses à la sortie de l'orifice. Le débit d'extrusion a été fixé à 1ml/min.
6. L'agitation lente de la solution de formation est fixée à environ 40 rpm. Celle-ci n'est effectuée que pour assurer un léger brassage de la solution et éviter que les microbilles de gel ne s'agrègent les unes aux autres par contact.
7. La concentration de la solution saline quant à elle doit être suffisante pour provoquer la gélification de la goutte de polymère. La concentration de la solution de KCl a été fixée à 0.7M.
8. Les microcapsules formées sont filtrées et lavées deux fois avec de l'eau distillée.

9. Des microcapsules sont préparées à blanc (sans Insuline) en parallèle pour compléter la caractérisation.
10. Laisser sécher ces microcapsules à l'aire libre pendant 48h.

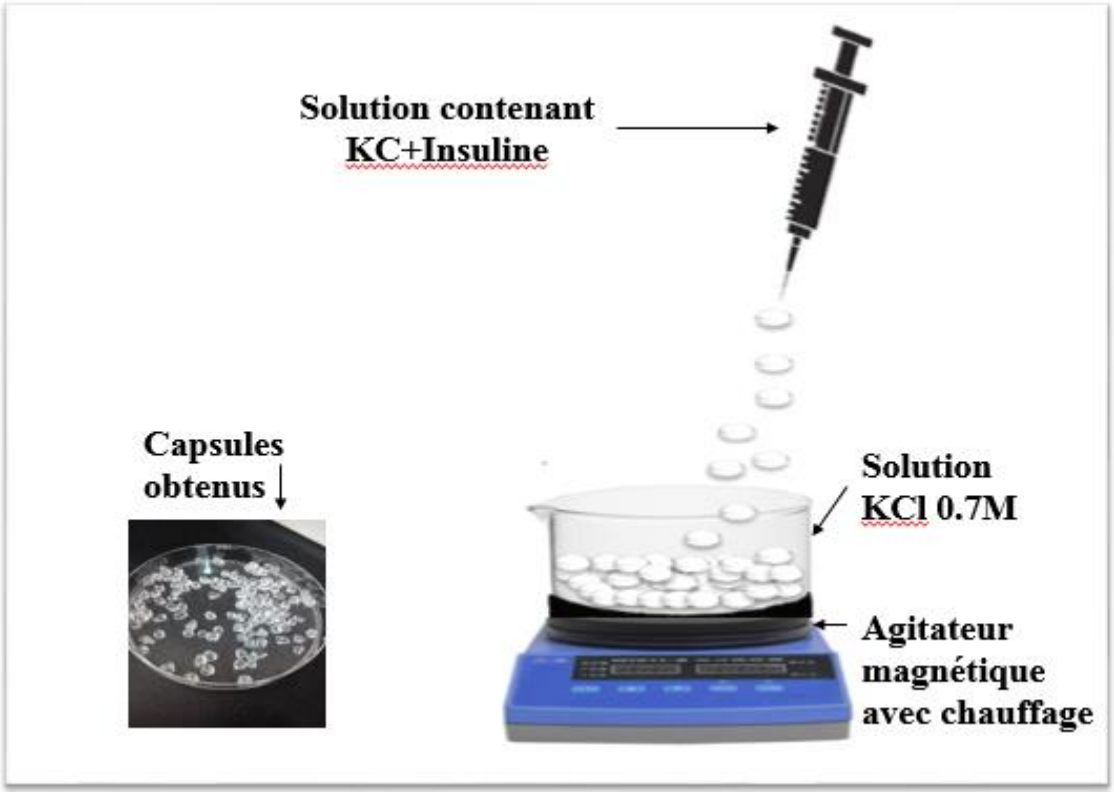


Figure III.19. Procédé d'encapsulation de l'Insuline par gelification ionotropique du KC

Le **Tableau III.5** résume les différentes formulations proposées pour l'étude de l'encapsulation de l'Insuline par le KC par la méthode de gélification ionotropique.

Tableau III.5. Formulation des capsules à base de KC contenant le principe actif « Insuline »

Formulation N°	F0	F1	F2	F3	F4
KC (%)	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5
Insuline (%)	3	3	3	3	3

III.4.3. Caractérisation des capsules

III 4.3.1. Morphologie de capsules humides et sèches

La formulation F0 formulée à partir de concentration en KC de 0.5% n'a pas formée de capsules consistantes après extrusion à partir de la seringue. Pour cela cette formule (F0) ne pourra pas être caractérisée dans le reste de l'étude.

Les capsules obtenues (F1-F4) ont une forme sphérique a l'état humide, mais après le séchage les capsules dépourvues d'eau s'allongent légèrement **(Figure III.20)**.

- Nous observons que les billes avant séchage conservent la morphologie d'une goutte et présente des stries.
- Plus la concentration du KC augmente plus les billes sont grandes.

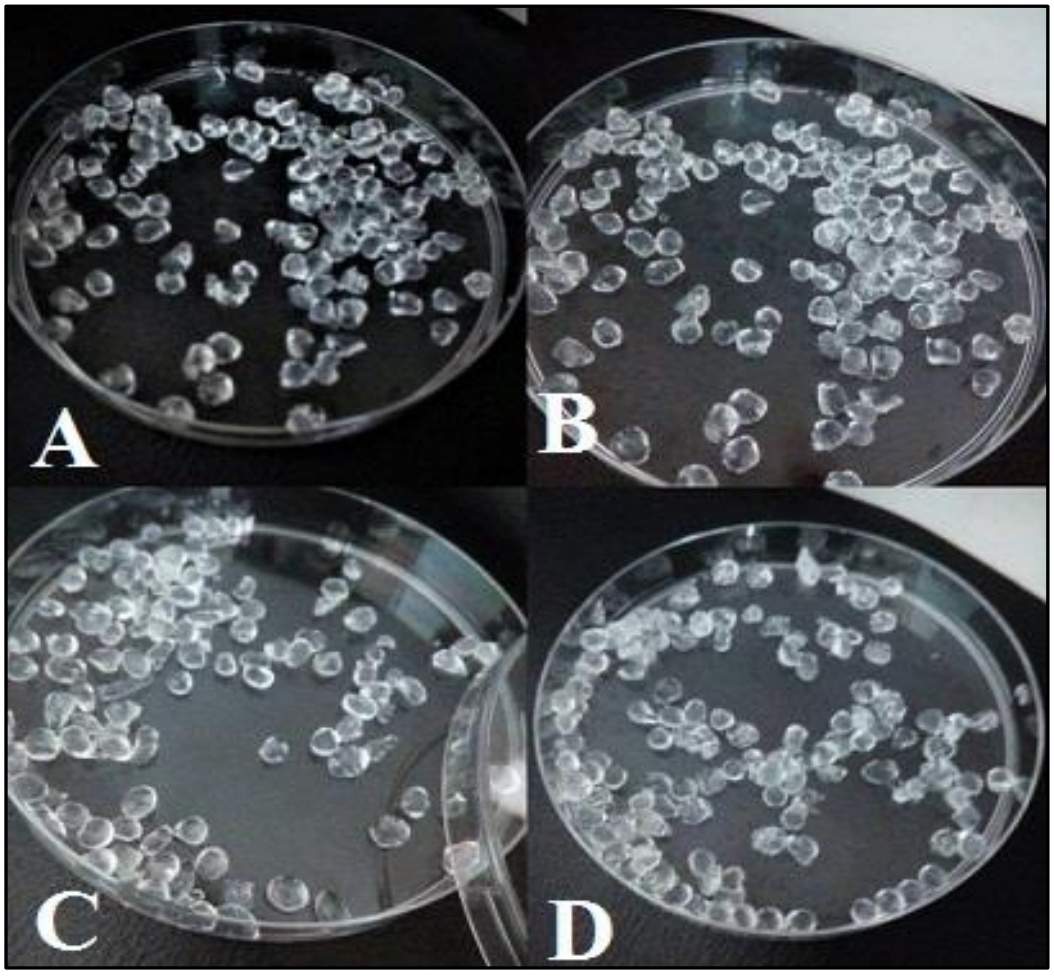


Figure III.20. Microcapsules après filtration : **(A)** 1% **, (B**) 1.5% **, (C)** 2%, **(D)** 2.5%

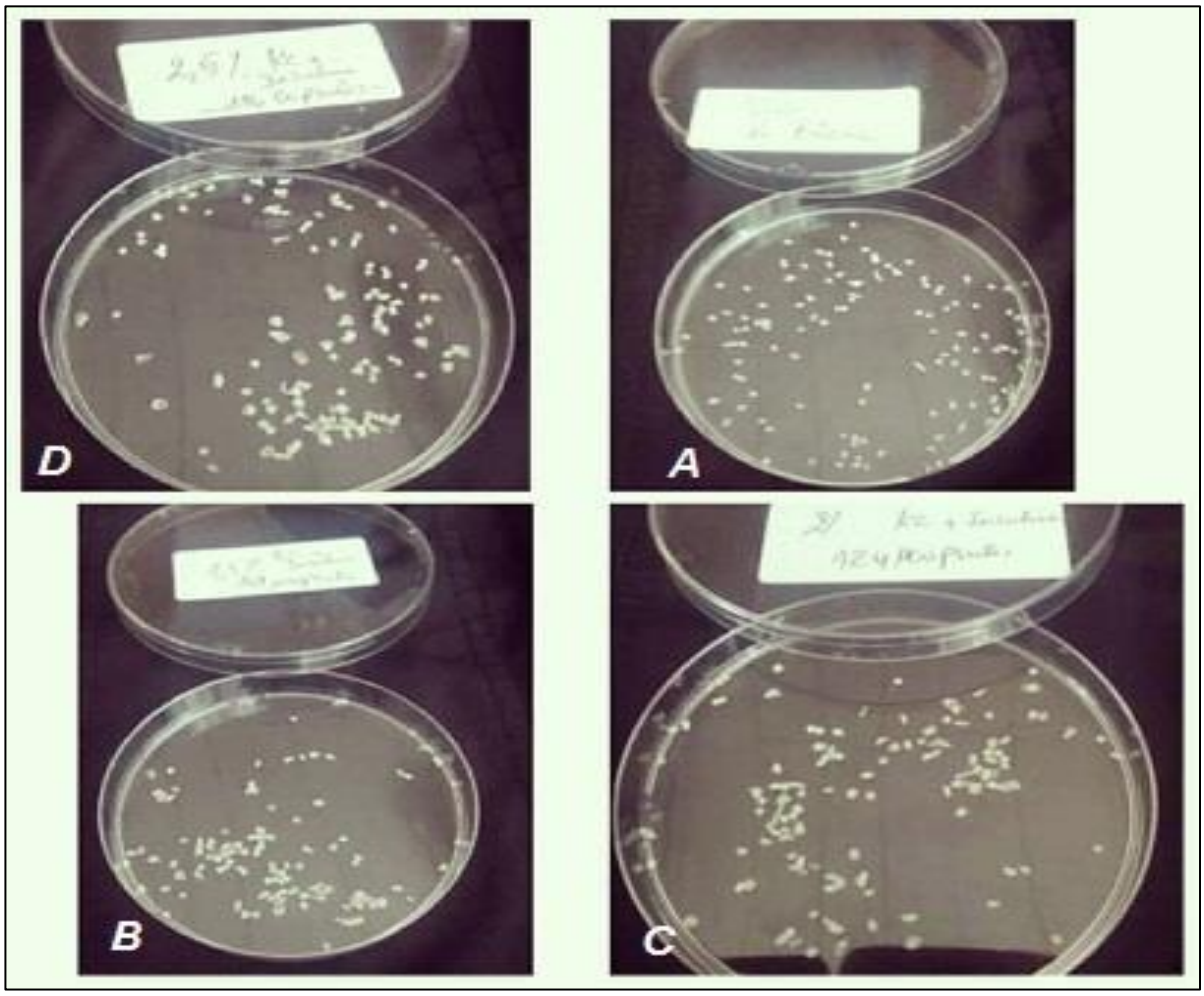


Figure III.21. Microcapsules après séchage : **(A)** 1% **, (B**) 1.5% **, (C)** 2%, **(D)** 2.5%

III 4.3.2. Analyse granulométrique des capsules :

La taille des capsules obtenues est mesurée par un micromètre digital ayant une précision de 0.001mm **[67].** Un choix au hasard de trois (03) séries de capsules contenant 20 capsules à chaque analyse est réalisé.



Figure III.22. Micromètre digital

Les résultats de mesures obtenus sont résumés dans le **Tableau III. 6** et le **Tableau III.7.** La moyenne générale de chaque formule est calculée avec son coefficient de variation.

Tableau III.6. Taille des capsules obtenues à différentes concentrations avant séchage

Formulation N°	Dimensions (µm)			Moyenne générale (µm)
	Série A	Série B	Série C	
F1	264.12	255.22	244.07	254.47 ± 5.58
F2	276.34	296.12	286.95	286.47 ± 4.78
F3	293.88	288.19	307.34	296.47 ± 3.68
F4	305.17	302.22	307.16	304.85 ± 2.64

Tableau III.7. Taille des capsules obtenues à différentes concentrations après séchage

Formulation N°	Dimensions (mm)			Moyenne générale (µm)
	Série A	Série B	Série C	
F1	125.44	132.12	128.66	128.74 ± 4.78
F2	140.34	132.12	133.56	135.34 ± 4.28
F3	155.15	165.33	143.86	154.78 ± 3.87
F4	178.02	185.15	176.38	179.85 ± 3.47

- L'analyse des données montre que la dimension des capsules varie d'une série à l'autre selon la concentration en KC.
- Avant le séchage des capsules, leurs formes sont plus sphériques avec des diamètres allant de 304.85µm pour la concentration la plus élevés en KC (2.5%) et atteint 254.47µm pour la concentration la plus basse en KC (1.0 %).
- Après séchage des capsules, leurs formes sont réduites et devient plus petites et plus ou moins sphériques avec des diamètres allant 179.85µm pour la concentration la plus élevés en KC (2.5 %) à 128.74µm pour la concentration la plus basse en KC (1.0 %).

La **Figure III.23** illustre une étude comparative des dimensions des capsules avant et après leur séchage.

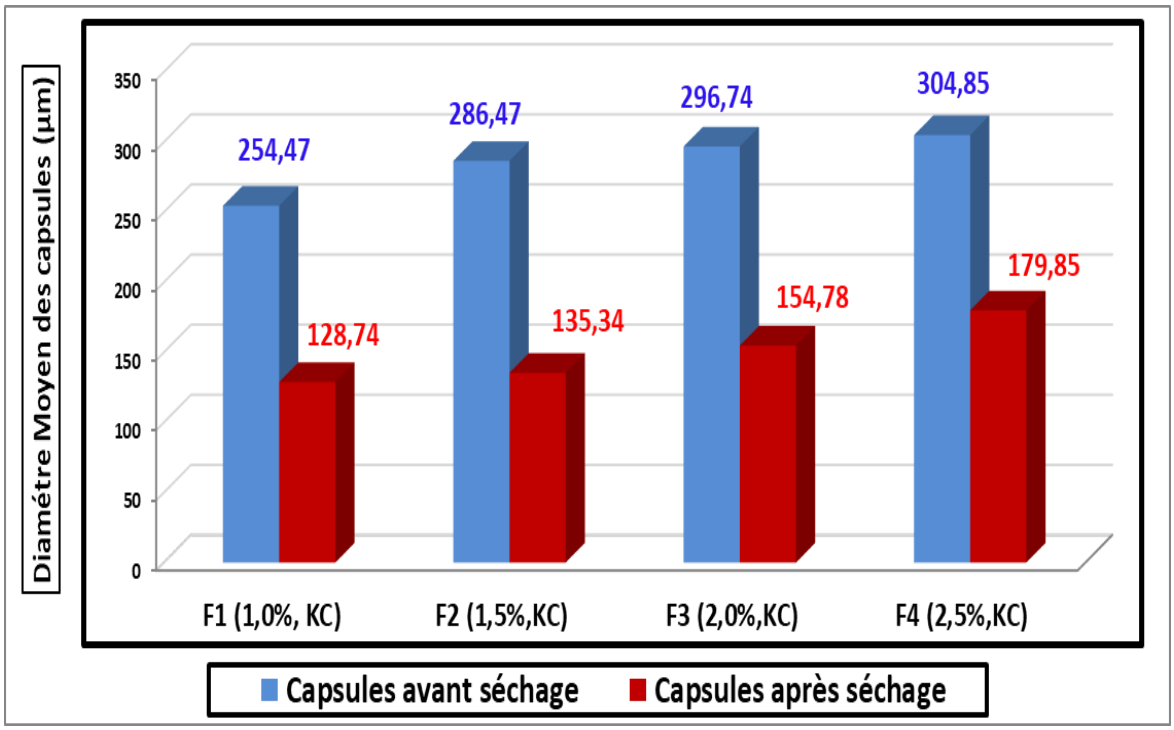


Figure III.23 Dimensions des capsules (avant et après séchage)

Après les résultats obtenus lors des caractérisations précédentes, les 04 formules sont retenues pour les tests de gonflement et de dissolution.

III.4.3.3. Etude du gonflement des capsules

L'étude du gonflement permet d'établir la cinétique de pénétration du milieu de dissolution dans les capsules. Cette étude permet d'établir son taux d'absorption et son augmentation de volume au cours du temps. La technique d'analyse de la cinétique de gonflement est basée sur la gravimétrie **[68].**

Cette méthode consiste à mesurer la quantité de liquide absorbée par les capsules en fonction du temps jusqu'à l'équilibre. Les capsules sont pesées puis placées dans le milieu de dissolution étudié.

Deux milieux de dissolution sont testés :

- ✓ ***Milieu 1 :*** solution tampon pH1.2
- ✓ ***Milieu 2 :*** solution tampon pH6.8

a. Mode opératoire

- Peser environ 50mg de capsules sèche sur une balance analytique de précision.
- Incorporer les capsules soigneusement dans 25ml du milieu de dissolution.
- A des intervalles de temps réguliers, les capsules sont retirées du milieu de dissolution, posés sur du papier absorbant pour enlever l'excès de liquide,
- Peser les capsules obtenues à l'aide d'une balance analytique de précision.

Les taux de gonflement sont calculés par la formule suivante :

$$\textbf{Taux de gonflement}\ (\%) = \frac{\mathbf{m_g - m_i}}{\mathbf{m_i}} \times \mathbf{100} \qquad (\mathbf{III.2})$$

Où m_i est la masse des capsules à l'état initial (au temps t_0) et, $m_g$est la masse des capsules à l'état gonflé (au temps t).

Les résultats du test de gonflement des capsules dans les différents milieux de dissolution sont représentés sur les **Figure 24 et Figure 25.**

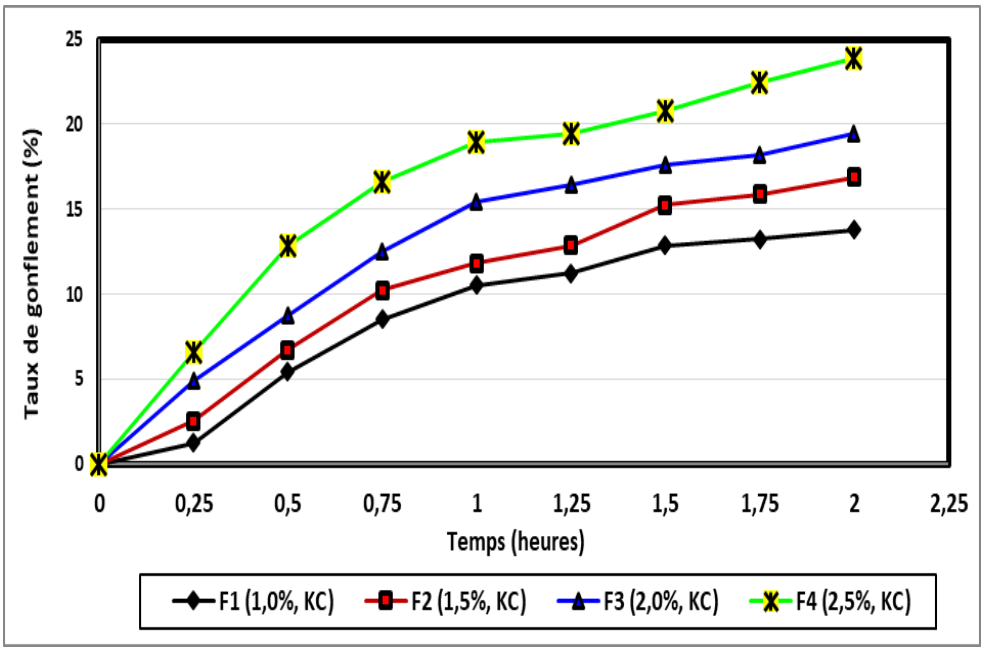


Figure III.24. Cinétique de gonflement des capsules (pH1.2)

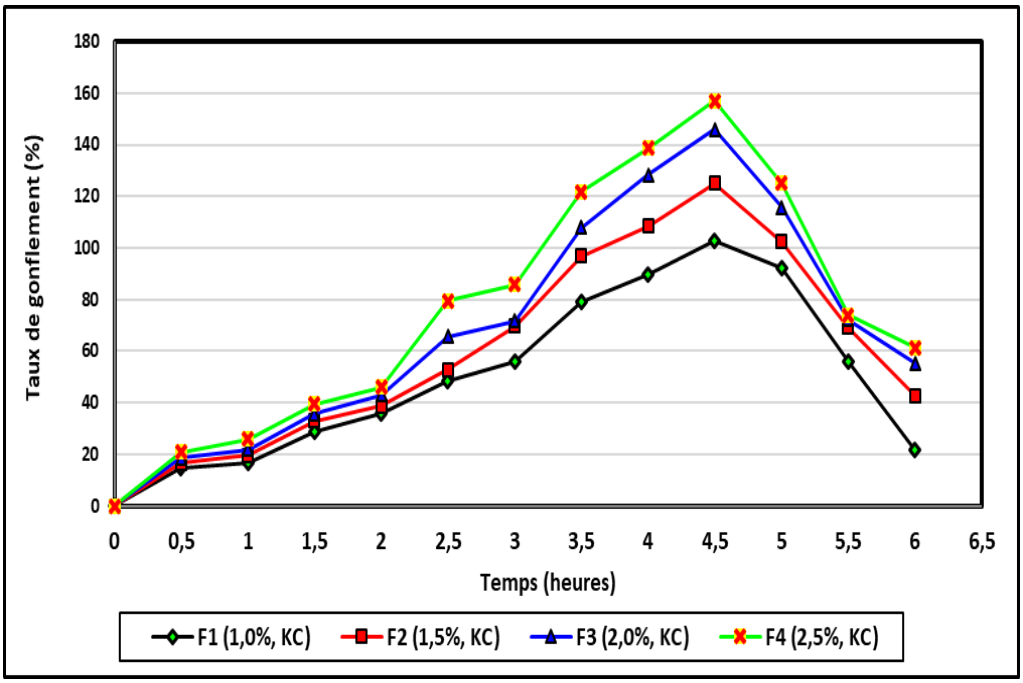


Figure III.25 Cinétique de gonflement des capsules (pH6.8)

- **Résultats et discussion**

Dans un premier temps, nous avons analysé les résultats du taux de gonflement des différentes formules étudiées dans les deux milieux de dissolutions en fonction du temps. L'évolution du taux de gonflement montre une augmentation progressive en fonction du temps, quel que soit les proportions des biopolymères utilisées, mais à des vitesses bien différentes.

Dans le milieu pH 1,2 **Figure III.24**, les taux de gonflement des capsules sont moins importants par rapport au milieu pH6.8 quel que soit la formule étudiée. En effet, le taux de gonflement varie de 24% pour la formule F4 (2.5% de KC) et de 19% pour la formule F3 (2.0% de KC), à 16% pour la formule F2 (1.5%) et 14% pour la formule F1(1.0%)

Le ralentissement de la cinétique de gonflement peut être expliqué par le fait que les groupements sulfates sont sous forme non dissociée à pH 1,2, ceci diminue donc nettement la répulsion électrostatique due à la neutralisation des charges et conduit à un rapprochement des chaines.

A pH6.8, l'augmentation du taux de gonflement est très rapide pour le cas de la formule F4 (2.5% de KC) avec un taux de 160% à 4heures et 30min, alors qu'elle est à 145% pour le cas de la formule F3(2% de KC) et à 125% et 100% pour le cas de F2 et F1(1.5% et 1.0%) respectivement. (**Figure III.25**). Cela dit, une érosion est constatée au bout de 4heures et 30min, due à une dissolution du biopolymère et par conséquent une perte de masse qui augmente avec le temps.

Il est clairement constaté qu'en augmentant la concentration de KC dans le milieu, le nombre de charge négative issue des fonctions sulfate augmente, ce qui entraine une répulsion électrostatique des chaines et donc un gonflement du réseau matriciel. Au niveau microscopique, cela entraine le gonflement des mailles du réseau formant les gels de KC.

La **Figure III.26**donne les taux de gonflement à l'équilibre des capsules dans les deux milieux de dissolution étudiés.

Le KC est un polysaccharide de charge négative. Ces charges sont liées aux groupements sulfates de ce biopolymères. Ces monomères aux différentes concentrations (1.0%,1.5%,2.0%,2.5%) sont sous la forme non dissocié à pH1.2, donc la molécule de KC ne présente pas un taux de gonflement important (13.8%,16.89%,19.47%,23.85%) respectivement à cette zone de pH. Par contre, à pH6.8, les monomères aux différentes concentrations de KC sont la plupart sous la forme ionisée, ceci contribue à l'augmentation de la différence de pression osmotique entre les deux milieux interne des capsules et externe donc le taux de gonflement augmente considérablement, jusqu'à atteindre un état équilibre.

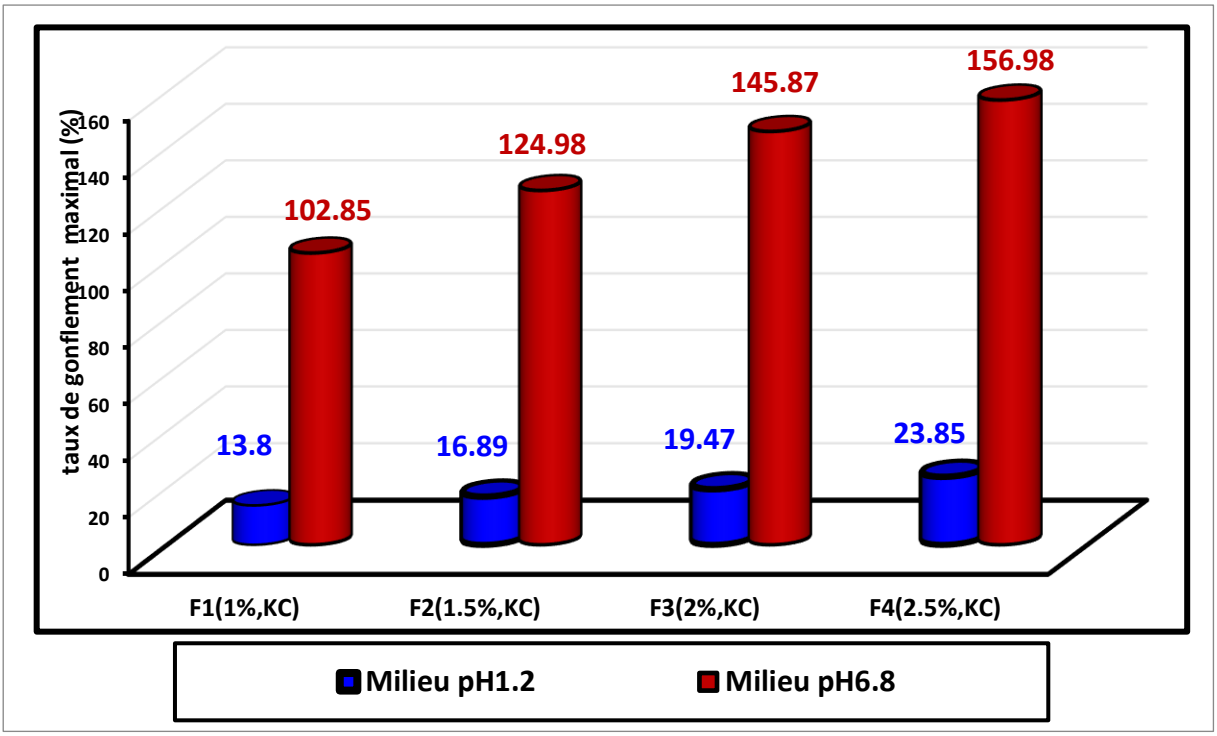


Figure III.26 Taux de gonflement à l'équilibre des capsules.

III.4.3.3.4. Détermination des taux d'encapsulations

La quantité de principe actif (Insuline) introduite dans les capsules est calculée par dosage spectrophotométrie UV-Vis **[69].**

a. Mode opératoire

- Peser précisément 100mg de capsules sèches sur une balance analytique de précision.
- Disperser les capsules dans 100ml de solution tampon pH6.8, sous agitation magnétique à 1000tr/min pendant quatre heures.
- Filtrer la solution obtenue sur filtre en papier
- La solution filtrée est analysée par spectrophotométrie UV-VIS à une longueur d'onde de 214nm.

Le taux d'encapsulation est calculée par la formule (III.3)

$$\text{Taux d'encapsulation} = \frac{Quantité\ de\ principe\ actif\ dosé\ aprés\ encapsulation}{Quantité\ de\ principe\ actif\ réellement\ encapsulée}\ X\ 100 \qquad (III.3)$$

Les résultats du taux d'encapsulation, dans les différentes formules étudiées sont illustrés dans la **Figure III.27.**

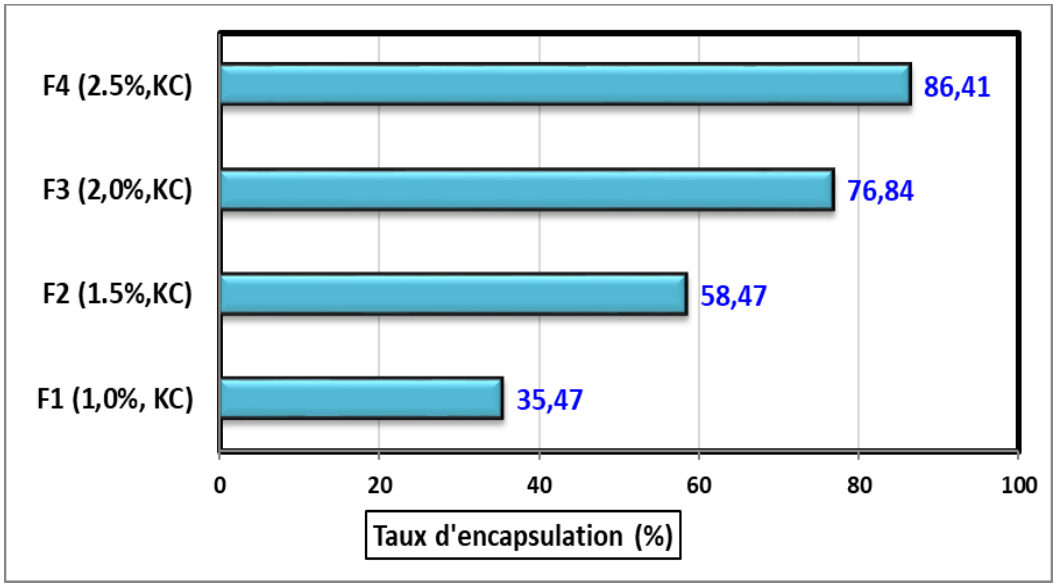


Figure III.27. Taux d'encapsulation de l'Insuline par le KC

a. Résultats et discussion

D'après les résultats obtenus on remarque que les taux d'encapsulation du KC varient entre 35.47% et 86.41%, selon les différentes formules étudiées. On remarque également que le taux d'encapsulation augmente avec la concentration en KC formant les capsules. En effet, lorsque la concentration en KC est de 1% et 1.5% (F1) et (F2) respectivement, le taux d'encapsulation est de 35.47% ,58.47% . Alors que le taux d'encapsulation est de 76.84% lorsque la concentration en KC est de 2% (F3), et atteint un taux maximum de 86.41% lorsque la concentration en KC est de 2.5% (F4).

On remarque que les taux d'encapsulation sont plus importants dans les capsules à base de concentration plus élevée en KC. Ceci peut être interpréter par le fait que le réseau polymérique de KC est plus réticulé, entrainant un durcissement plus rapide des capsules empêchant le principe actif de ressortir et d'être expulser vers le milieu extérieur.

Par contre, les capsules de concentration 1.0 % et 1.5 %, représentées par (F1),(F2) respectivement, présentent de plus faibles taux d'encapsulation , pouvant être dus à la formation de capsules dont la membrane est beaucoup plus fine et donc la présence de pores à la surface

des capsules engendrent la libération précoce de l'insuline et donc un taux d'encapsulation plus faible.

III 4.3.3.5. Etude de la libération in vitro du principe actif à partir des capsules

L'étude de la libération est destinée à déterminer la vitesse de dissolution des principes actifs à partir des formes pharmaceutiques répondant aux normes de la pharmacopée **[69].**

Les informations suivantes sont données pour chaque préparation qui est soumise à l'essai de dissolution in vitro :

- L'appareil à utiliser,
- La composition, le volume et la température du milieu de dissolution,
- La vitesse de rotation ou le débit du milieu de dissolution,
- L'intervalle de temps, la méthode et le volume d'échantillonnage de la solution à examiner ou les conditions d'enregistrement continu,
- La méthode d'analyse,
- La ou les quantités de principes actifs qui doivent se dissoudre dans un intervalle de temps prescrit.

Le choix de l'appareillage est déterminé par les caractéristiques physicochimiques de la forme pharmaceutique. On optera pour l'appareil à panier pour la réalisation de nos essais, étant donné qu'il offre une meilleure libération du principe actif lors de sa diffusion à partir des capsules et ce dans toutes les directions.

Toutes les parties de l'appareil qui peuvent entrer en contact avec l'échantillon ou avec le milieu de dissolution sont chimiquement inertes et n'adsorbent pas la substance à examiner, ne réagissent pas en sa présence et n'influencent pas son comportement.

Toutes les parties métalliques de l'appareil qui peuvent entrer en contact avec l'échantillon ou avec la solution de dissolution doivent être en acier inoxydable approprié ou recouvertes d'un matériau approprié pour garantir que de telles parties ne causent pas de réaction et n'influencent pas l'échantillon ou la solution de dissolution.

Aucun élément de l'appareil ni de l'assemblage dans lequel il est placé n'exerce de mouvement d'agitation ou de vibration important autre que celui de l'élément de rotation à faible régime.

Il est préférable d'utiliser un appareil en verre qui permette l'observation de la préparation à examiner et de l'élément d'agitation pendant l'essai.

Ce test permet d'obtenir les profils de dissolution traduisant la quantité de principe actif libérée en fonction du temps.

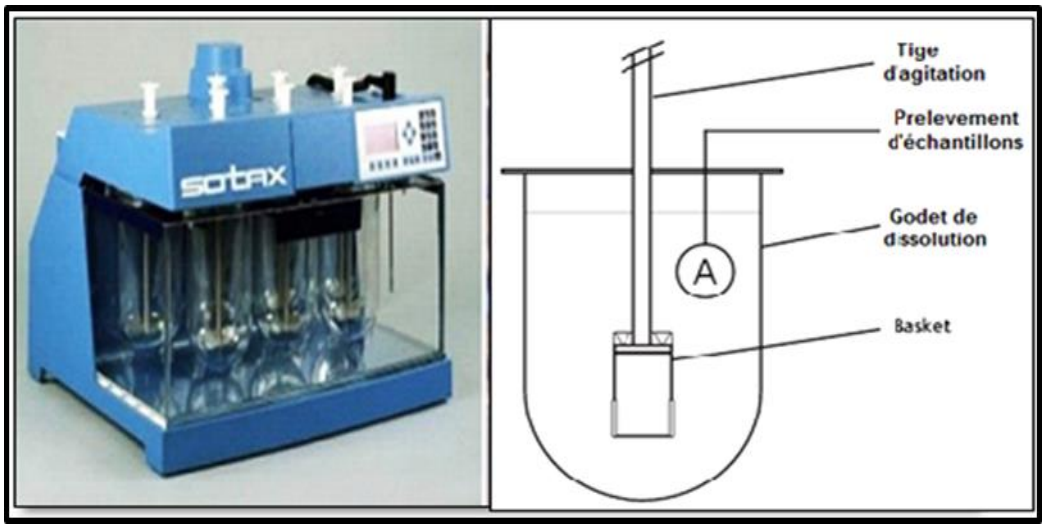


Figure III.28 Test de dissolution SOTAX.

a. *Mode opératoire*

- Introduire dans le récipient du test de dissolution le volume de 900ml du milieu de dissolution étudié (Solution tampon pH1.2 ou Solution tampon pH6.8).
- Equilibrez l'appareil Dissolutest à la température 37±0.5°C.
- Introduire 100mg de capsules dans le dispositif à panier muni d'agitateur.
- Mettre l'appareil en marche à 50 tr /min pendant 8heures.
- Procédez à des prélèvements de 10 ml d'échantillons à des intervalles de temps régulier.
- Effectuer le dosage sur chacun des échantillons prélevés, par spectroscopie UV-VIS à la longueur d'onde correspondant au milieu de dissolution étudié **[68].**
- La dissolution des capsules est réalisée pendant un temps de 02 heures dans le milieu de dissolution pH1.2 (milieu gastrique), et pendant 08 heures dans le milieu de dissolution pH7.4 (milieu intestinale) **[70].**

b. Résultats et discussion

Libération de l'insuline dans le milieu pH1.2

A pH 1,2 (**Figure III.28**), les résultats montrent bien une augmentation des taux de libération du principe actif en fonction du temps avec un profil non linéaire. La vitesse de libération dans ce milieu diminue en augmentant la concentration de KC dans le milieu. Effectivement, Le taux

de libération d'insuline est plus important dans la formule F1 (1.0% de KC) avec un taux de 26% et diminue à 21% , 14% et 9.5% pour les formules F2 (1.5%), F3 (2.0%) et F4 (2.5%) respectivement. Cela est due à la neutralisation des charges le long des chaines de polymère spécialement celles de KC qui forme le réseau hydrogel réticulé et qui contrôle la libération du principe actif.

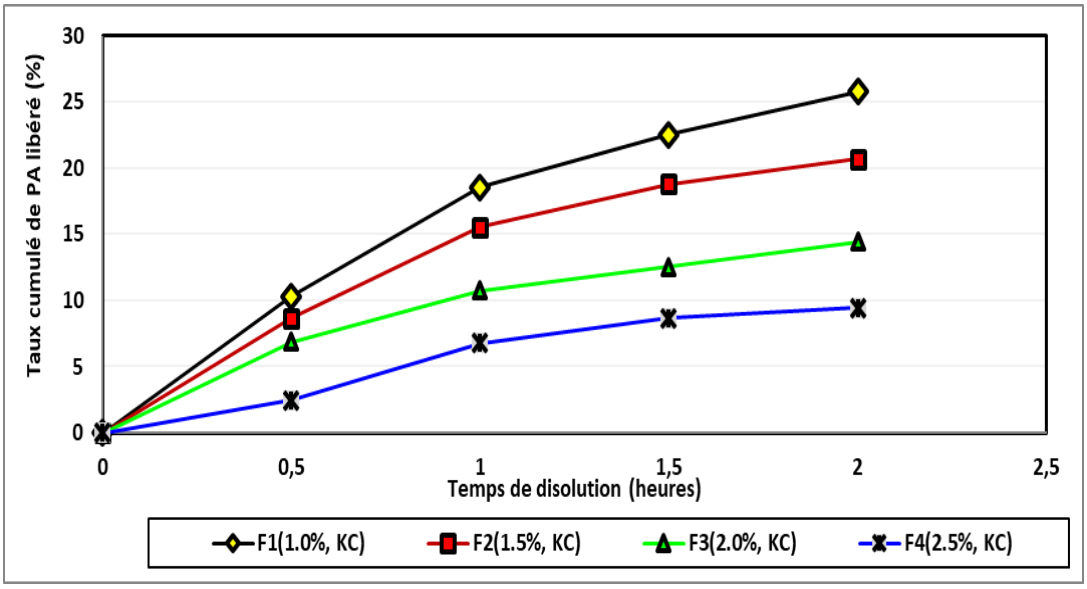


Figure III.29 Cinétique de dissolution in vitro des capsules dans le milieu pH1.2.

- ***Libération de l'insuline dans le milieu pH6.8***

A pH6.8 (**Figure III.29**), Les profils montrent une augmentation du taux de libération de l'insuline en fonction du temps quel que soit la formule de capsules étudiée. Nous pouvons remarquer que la libération la plus rapide du principe actif est attribuée à la formule F1 (1.0%) avec une libération totale 100% au bout de 3heures, par rapport aux F2, F3 et F4 qui présentent des taux de libération de 100% au bout de 4heures, 6heures et 8heures respectivement.

Nous pouvons donc constater que plus la concentration de KC est élevée, plus la libération de l'Insuline est prolongée. Ainsi, le réseau polymérique formant les capsules de KC est plus résistant au milieu de dissolution lorsque la concentration du biopolymère est plus importante. Le gonflement important des capsules à pH 6.8, permet de libérer l'insuline à travers des pores

former à la surface. Ces pores sont plus réduits lorsque le réseau polymérique de KC est plus réticulé et donc plus concentré.

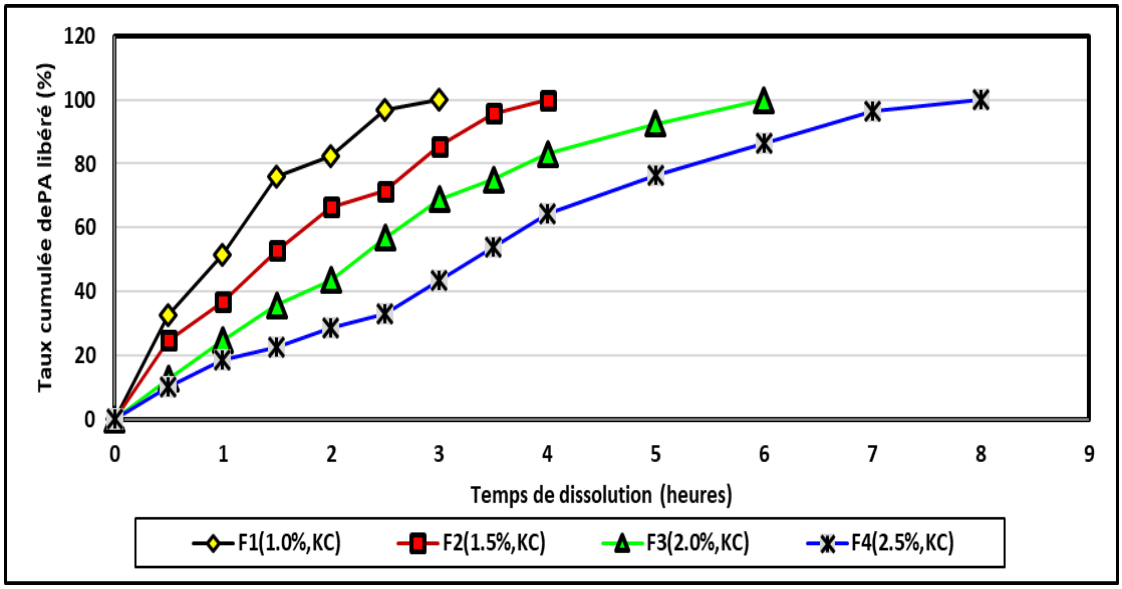


Figure III.30 Cinétique de dissolution in vitro des capsules dans le milieu pH6,8

III 6. CONCLUSION

Lors de cette étude expérimentale, la caractérisation du principe actif Insuline et le biopolymère KC a été mené par différentes méthodes physicochimiques (FTIR, UV-VIS, Viscosimètrie, pH-métrie, Conductimétrie, …).

L'étude de préformulation a permis de mettre au point la méthode de dosage de l'insuline par spectrophotométrie UV-Vis. L'analyse par spectroscopie FTIR a permis d'écarter toute interaction physico-chimique entre le principe actif Insuline et l'excipient d'encapsulation KC. Cela a permis de valider le KC comme excipient inerte vis-à-vis du principe actif utilisé. Les concentrations en KC ont varier entre 0.5% à 2.5%. Mais les tests ont montré qu'a des concentrations de 0.5%, les capsules ne se formaient pas. Pour cela, les concentration en KC utilisées pour former les capsules sont de 1%,1.5%, 2% et 2.5%, correspondant à F1,F2,F3 et F4 respectivement.

La formulation des capsules à base de KC encapsulant l'insuline a été réalisée avec des concentrations en KC allant de 1.0% à 2.5%. Les capsules obtenues sont de tailles moyennes allant de 304.85µm à 254.47µm avant séchage et de 179.85µm à 128.74µm après séchage. Les capsules ont été caractérisées par :

- ✓ Les taux de gonflement des capsules qui augmentent d'une façon progressive en fonction du temps dans les deux milieux de dissolution étudiés (pH1.2 et pH6.8) et pour toutes

les formules de capsules testées, mais les taux de gonflement sont plus importants dans le milieu pH6.8 par rapport au milieu pH1.2.

- ✓ Les taux de gonflement sont plus importants lorsque la concentration en KC augmente.
- ✓ Le dosage de l'insuline encapsulée par spectrophotométrie UV-VIS a permis d'identifier et de quantifier l'insuline encapsulée.
- ✓ Les taux d'encapsulation sont satisfaisants avec un taux optimal de 86.41% correspondant à la formule F4.
- ✓ Une étude de la cinétique de libération de l'insuline dans différent milieux a donné une libération plus rapide pour les capsules à faibles concentrations de KC et une libération prolongée pour les concentrations de 2% et 2.5% de KC correspondant à F3 et F4, respectivement.

Conclusion Générale

L'objectif essentiel de notre travail consiste à la préparation des microcapsules selon le procédé de gélification ionotropique d'un principe actif biologique, qui est l'insuline, dans une matrice polymérique biodégradable à base de KC.

Dans un premier temps, une étude de préformulation portant sur l'identification et la caractérisation du principe actif Insuline et du biopolymère KC a été réalisé. A cet effet, différentes méthodes physicochimiques ont été utilisées (FTIR, UV-VIS, Viscosimètrie, pH-métrie, conductimétrie …).

Dans un second temps, la formulation des capsules à base de KC à l'aide de la méthode de gélification ionotropique à différentes concentrations du biopolymère (allant de 1.0% à 2.5%), incluant l'Insuline a été réalisée. La réticulation du biopolymère a été effectuée grâce à une solution de KCl. Cette méthode a permis l'obtention de capsules de tailles moyennes allant de 254.47µm à 304.85µm avant séchage et de 128.74µm à 179.85µm après séchage.

La caractérisation des capsules a été réalisée du point de vue taux de gonflement, taux d'encapsulation et cinétique de libération du principe actif dans le milieu gastrique (pH 1,2) et le milieu intestinal (pH 6.8).

Les taux de gonflement augmentent d'une façon progressive en fonction du temps dans les deux milieux de dissolution étudiés (pH 1.2 et pH 6.8) et pour toutes les formules de capsules testées mais sont plus importants dans le milieu pH 6.8 par rapport au milieu pH1.2. Il a été également constaté que les taux de gonflement sont plus important lorsque la concentration en KC augmente dans les capsules.

Les taux d'encapsulation des différentes formules (F1-F4) varient entre 35.47% et 86.41%. On remarque également que le taux d'encapsulation augmente avec l'augmentation de la concentration en KC dans les capsules.

A pH 1.2, la libération in vitro de l'insuline indique que les matrices hydrophiles formants les capsules contenant 2% et 2.5% de KC sont plus résistantes à la libération d'insuline par rapport aux capsules contenant 1% et 1.5%. A pH 6.8, les taux maximums de libération d'insuline atteignent une de libération complète pour toutes les formules étudiées (100%) et cela à différents temps de dissolution.

De plus, il a été constaté que plus la concentration de KC est élevée, plus la libération de l'Insuline est prolongée. Ainsi, le réseau polymérique formant les capsules de KC est plus résistant au milieu de dissolution lorsque la concentration du biopolymère est plus importante. Le gonflement important des capsules à pH 6.8, permet de libérer l'Insuline à travers des pores formés à la surface. Ces pores sont plus réduits lorsque le réseau polymérique de KC est plus réticulé et donc plus concentré.

Enfin, nous pouvons conclure que KC est un biopolymère ayant des propriétés très intéressantes pour l'encapsulation des pharmaceutique en vue d'avoir une libération prolongée d'un principe actif biologique. Cette encapsulation est fortement dépendante de la concentration en KC et du milieu de dissolution étudié.

En guise de perspectives de ce travail de recherche, il serait souhaitable de conduire des études plus approfondies sur la cinétique de libération de l'Insuline tout en caractérisant la surface des capsules en utilisant des techniques d'analyse performantes tels que la Microscopie électronique à Balayage (MEB), la Diffraction à rayon X (DRX), l'analyse thermique (DSC,ATG),…etc.

Référence Bibliographique

[1] Guhmann P., (2013)., Délivrance orale d'insuline par double encapsulation., développement et évaluation de l'efficacité et de la sécurité des systèmes entériques et nanoparticulaires., Thèse de doctorat de l'université de Strasbourg.

[2] Fagot c., Romon I., Fosse S., Roudier C., (2010)., Prévalence et incidence du diabète., et mortalité liée en France., Institut de veille sanitaire synthèse épidémiologique.

[3] Goldenberg.R., Punthakee.Z., (2013)., Définition, classification et diagnostic du diabète, du pré diabète et du syndrome métabolique., canadian journal of Diabetes., vol 37:P 369-372.

[4] Atlas du diabète de la Fédération international du diabète., 2014., 6^{éme}édition p11-15.

[5] Edlund H., (2002)., Pancreatic organogenesis developmental mechanisms and implications for therapy., Nature Reviews Genetics., vol. 3., n°7 : P 524-532 .

[6] Young J., (2011)., Endocrinologie, diabétologie et maladies métaboliques., 2nd Ed ., Paris sud 11,France., ELSEVIER / MASSON : P 544., 9782294708138 .

[7] Hadking D., Soc R ., (1972)., Insuline its chemistry and biochemistry., 338:P251-275.

[8] Guilermin M.L., (2004)**.,** Facteurs prédictifs d'une intolérance au glucose après un diabète gestationnel., Thèse Médecine., Université de Genève.

[9] Adeline C., (2010)**.,** Administration orale de l'insuline par double encapsulation : développement du système nanoparticulaire par coacervation complexe insuline / chitosane., thèse de doctorat., université de Strasbourg.

[10] Anwaarath M., Agnike Berengere Oloussokpe., (2014)**.,** Les nouvelle alternatives pour l'administration de l'insuline : Etude des voies d'administration rectale et transdermique., thèse de doctorat en pharmacie de l'université cheikh Anta Diop de Dakar.

[11] Libbey J., (1996)., Structures des proteins., Pathologie et approche thérapeutiques.

[12] Heilse T., (2011)., Insulin degludec has a two flod longer half-life and a more consistent pharmacokinetic profile than insulin glargine., Dibaètes., vol.60, no.1A,P.LB11.

[13] **Henin R.I.,** (2010)., Inhaled insulin—Intrapulmonary, intranasal and other routes of administration: Mechanisms of action. Nutrition., P 26 ,33–39.

[14] **Gomez-Pérez, f.j. Rull,J.A**., (2005)., Insulin therapy :current a ilternatives,archives of Medical Research.36 (3): P 58-272.

[15] Reix N., Parat A., Seyfritz E., Van Der Werf R., Epure V., Ebel N., Danicher L., Marchioni E., Jeandidier N., Pinget M., et al., (2012)., In vitro uptake evaluation in

Caco-2 cells and in 182 vivo results in diabetic rats of insulin-loaded PLGA nanoparticles., International Journal of Pharmaceutics., P 213–220.

[16] Diop M., (2015)., Formulation, développement et validation de systèmes particulaires d'insuline en vue de leur administration par voie orale., Thése de doctorat de l'université DE STRASBOURG : P 50 .

[17] Richard J., Benoit J.P., (2000)., Microencapsulation, Technique de l'Ingenieur., J 2210 :P 1 –20.

[18] Boh B., Sumiga B., (2008)., Microencapsulation Technology and its applications in building construction materials., RMZ Materials and Geoenvironment., Vol. 55, N°3: P 329-344.

[19] Boh B., Vandamme T., Poncelet D ., Subra-Patemault P., (2007)., Dévolppements et applications Industrielles des microcapsules., In Microencapsultion., Edition Tec et Doc., Lavoisier., Paris : P 9-22.

[20] Thies C., Arshady R., (1999)., Ashort history of micro –encapsulation technology ,microspheres , microcapsules and liposomes., preparation & chemical Applications. (ed),citus Books, London., vol.L:P 47-54.

[21] Mazoun KH., Djouat S., (2015)., Formulation des systems de liberation des principes actifs à base des biopolymers., Mise au point et caractérisation d'une forme modifiée à base de biopolymères., Thèse d'un master2 en Génie des procédés.

[22] Andrieux k., Desmaele D., D'angelo j., Couvreur p., (2003)., Nanotechnologie drugs., Actualité chimique : P 135-139.

[23] Benoit J.P., Couvreur P., Devissagu, J.P., (1986)., Ormodulated distribution Fotms .newsystems for drug administration., Journal de pharmacie de Belgique.,41 :P319-329.

[24] Bangham AD., Standish MM., Watkins JC., (1965)., Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids., journal of molecular biology.,13:P238-252.

[25] Ertan I., (1994)., sustained-release dosage form nitrofurantoin part1 preparation of microcapsules and in vitro release kinetics., journal of Microencapsulation., 11:P127-135.

[26] Decker E.A., welss D j.*M C*., (2007)., Emulsion –based deviverysystemes for lipophile thèse de doctorat de l'université de Nantes., centre IFREMER Nantes., bioactive compionements : P 32-20.

[27] Vandamme T., Poncelet D., Subra-Paternault P., (2007)., Microencapsulation des Sciences Aux Technologies., Paris: Éditions Tec & Doc.

[28] Soper J., (1995)., Utilization of Coacervated Flavors., ACS Symposium Séries., 590: P 104-112.

[29] Dziezak JD., (1988)., Microencapsulation and encapsulated ingredients.. Food Technology., 42:P 136-153.

[30] Patwardhan S., Wiley J., (1983)., Das, KG, Microencapsulation., In KG., Das Controlled-releasedtechnology : P 121-141.

[31] Barratt G., (2003)., Colloidal drug carriers: achievements and perspectives., Cellular And Molecular Life Sciences., 60 :P 21-37.

[32] Van de Weghe P., (1994)., Les polymères., Sci Chim Rennes., p1-73.

[32] Mercier J.P., (2000)., Chimie des polymères, http//.www.civil.usherbrooke.Ca/cours /gci/116.Notes cours 5.2, polymères, : P 6.

[33] Rabtafika HN., Paquot M., Dubois P.,(2006)., Les polymères issus du Végétal : Matériaux à propriétés spécifiques pour des applications ciblées en industrie plastique., Biotechnol., Environ.,1053 :P 185-196.

[34] Pagga U., Beimborn D.B., and Yamamoto M., (1996)., Biodegradability and compostability of polymers - Test methods and criteria for evaluation., Journal of Environmental Polymer Degradation., 4(3) : P 173-178.

[35] Calmon-Decriaud A., Bellon-Maurel V., and Silvestre F., (1998)., Standard methods fortesting the aerobic biodegradation of polymeric materials., Review and perspectives,in Blockco polymers Polyelectrolytes Biodegradation : P 207-226.

[36] Lenz R.W., Davis G., (1993)., Biodegradable Polymers., Advances in Polymer Science., Characterization and characteristics of degradable polymer sacks., Materials : P107- 140.

[37] Chen SC., Lu Y., (2004)., Micro and nano-fabrication of biodegradable polymers for drugdelivery., Adv., Drug Delivery Rev., 56 :P 1621–1633.

[38] Auras R., Harte B., Selke S., (2004)., An overview of polylactides as Packaging Materials., Macromol. Biosc 4 : P 835–864.

[39] Nodal R., (2002)., L'industrie française des matériaux composites des enjeux prioritaires pour un développement durable,Etude stratégique Consultant pour le compte de la DiGITIP/SIM.

[40] Ramier J., (2012)., Structures fibreuses tridimensionnelles de biopolymères pour l'ingénierie tissulaire., Thèse de Doctorat., Université paris-Est., France.

[41] Fontanille M., Gnanou Y., (2002)., Chimie et physico-chimie des polymères., 1ère édition, Dunod, France.

[42] Létisse F., (2002)., Quantification des contraintes nutritionnelles et métaboliques associées à la production de gomme xanthane par Xanthomonas campestris., Thèse de Doctorat., Université de Toulouse., France.

[43] Garon-Lardiere S., (2004)., Etude structurale des polysaccharides pariétaux de l'algue rouge Asparagopsisarmata Bonnemaisoniales., Thèse de Doctorat., Université de Bretagne occidentale., France.

[44] Bakri Y., (2006)., Les glucides., Thèse de Magister., Université Mohammed V– Rabat., maroc.

[45] Rees D.A., (1969)., Adv., Carbohydrat., Chem., 24: P 267-332.

[46] Doublier J.L., Thibault J.F., Multon J.-L., (1992)., Axelos M.A.V., Agents épaississants et gélifiants de nature glucidique, Additifs et auxiliaires de fabrication dans les industries agroalimentaires., Lavoisier :P. 373-414.

[47] Mueller G.P., Rees.D.A., (1968)., Trans. Drugs Sea Symposium., University Rhode Island.

[48] Multon J.L., (1992)., Additifs et auxiliaires de fabrication dans les industries alimentaires., Lavoisier., Paris.,P799.

[49] Rees D.A., Williamson F.B., (1970)., Correlation of optical activity with polysaccharide conformation,. Nature., 227: P 390-392.

[50] Rees D.A., (1963)., The carrageenan system of polysaccharides., Part 1., The relation between the kappa and the lambda comportent,., Journal of the Chemical Society :P 1821-1832.

[51] Millane R.P., C.R., Arnott S., Dea I., (1988)., The molecular structure of kappa carrageenan and comparison with iota-carrageenan. Carbohydrate research., 182: P 1-17.

[52] Anderson N.S., Rees D.A., (1973)., X-ray diffraction studies of polysaccharides sulphates -double helix model for kappa and iota carrageenan., Journal of Molecular Biology., 45: P 85-99.

[53] Landry S., Thesis Ph.D., (1987)., Relation entre la structure moléculaire et les propriétés mécaniques des gels de carraghénanes., Thèse Grenoble., University of Grenoble : p 15

[54] Michon C., et al., (1996)., Viscoelastic properties of [iota]-carrageenan/gelatin mixtures.Carbohydrate Polymers.,31(3): P 161-169.

[55] Piculell L., Nilsson S., Muhrbeck P., (1992)., Effects of small amounts of kappa carrageenan on the rheology of aqueous iota-carrageenan., Carbohydrate Polymers.,18(3): P 199-208.

[56] Te Nijenhuis K.., (1981)., Investigation into the ageing process in gels of gelatin/water systems by the measurement of their dynamic moduli., II. Mechanism of the ageing process., Colloids and Polymer Science., 259: P 1017-1026.

[57] Anwari F., Carlozzo.B.J., Chokshi K., (1993)., Clear Liquid Separation in Latex Paintscontaining cellulosic/associative thickener systems., Journal of Coatings technology., 65(825): P 123-134.

[58] Hsu C.S., Block.H.L., (1996)., Electrically induced syneresis phenomena in hydrophilic gels., III pH effects., Proceed Intern Symp Control Rel Bioact. Mater., Controled Release Society., Inc, 23: p. 769-770.

[59] Toncheva G., Panchev I., (1994)., Investigation of syneresis of agar jellies with sorbitol., Food Chem., 49 : P. 29-31.

[60] Nagasaka K., Taneya S., (1996)., Syneresis phenomena of foods 1., Analysis of syneresis rate of agar gel., Nippon Shokuhin Kagaku Kaishi., 43(ll)., p. 1176-1182.

[61] Norton., Morris., and Rees., (1984)., Lyotropic effects of simple anions on the conformation and interactions of kappa-carrageenan., Carbohydrate Research., 134(1): P 89-101.

[62] Rochas C., Landry S., (1987)., Molecular organization of kappa carrageenan in aqueous solution., Carbohydrate Polymers., 7(6): p. 435-447.

[63] Pharmacopée européenne., (2017)., Iinsuline humaine., 9^{éme} édition : P 1941.

[64] Elhadji A., (2016) ., Analyse et contrôle qualité des médicaments et produits de santé à base de produits naturels ., MODULE M1 : Déterminations structurales travaux pratiques de spectroscopie d'absorption dans l'infrarouge.

[65] Rohit Rajendra B., Riyaz Ali M., Osmani., Afrasim Moin., (2014)., Review on Natural Polysaccharide Based Particulate Drug Delivery Systems: An Inimitable Tactic in Novel Drug Delivery Systems., International Journal of Current Pharmaceutical Review and Research,5(4): P138-155.

[66] Belyaeva E., Valle D., Poncelet D., (2004)., Immobilization of [alpha]- chymotrypsin in [kappa]-carrageenan beads prepared with the static mixer., Enzyme and Microbial Technology., 34(2):P 108-113.

[67] Patel YL., (2006)., The effect of drug concentration and curing time on processing andproperties of calcium alginate beads containing Metronidazole by response surface methodology., AAPS Pharm Sci Tech 2006,7(4):P86.

[68] Lannuccelli V., Coppi G., Bernabel MT., Cameroni R., (2009)., Air compartment multiple-unit system for prolonged gastric residence., Part I: Formulation study., Int, Pharm J.,174 :P 47-54.

[69] Lehir A., (2001)., Pharmacie Galénique., Bonne pratique de fabrication des médicaments., 8ème édition., Masson., Paris.

[70] Alistair M S., (1995)., Food polysaccharides and theirs applications., 270 Madison Avenue., NewYork., 10016.1995 :P 139-205.