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 :

BOUCHANOUN Fatma Zohra
SOUAG Hiba

Thème :

Evaluation in-vitro des propriétés physicochimiques et biologiques des biopolymères. Application pharmaceutique

Soutenue devant le jury composé de :

Youcef ettoumi Kh.	Grade : MCA	Univ-Médéa	Président
Madani L.	Grade : MCB	Univ-Médéa	Examinateur
Zouambia Y.	Grade : MCA	Univ-Médéa	Encadreur
Maachou H.	Grade : MCA	Univ-Médéa	Co-Encadreur

Année universitaire : 2020/2021

Résumé

Ce présent travail vise l´étude des propriétés physicochimiques et biologiques du pullulane (P) et son application comme système de libération des principes actifs (Amoxicilline (AM) et Pénicilline G (PG)). La caractérisation physicochimique a montré que le taux de cendres du P est de 0.15 %, son taux d'humidité est inférieur à 10 %, son pH_{pzc} est de 6.7, son poids moléculaire est de 52.14 KDa. L'analyse par FTIR a montré la présence des groupements caractéristiques du P notamment –OH, CH_2, C-O-C. La mesure de la tension superficielle a montré que le P ne possède pas des propriétés tensioactives. L'analyse biologique a montré que le P n'a aucune activité antimicrobiènne sur les souches *Staphylococcus aureus, Escherichia coli et Candida sp*. L'élaboration des membranes de P a été effectuée en utilisant le glutaraldéhyde (G) et le tripolyphosphate (TTP) comme agents réticulant. Le principe actif (AM ou PG) a été chargé dans membranes. Le taux de gonflement de la membrane M-P_2G_{25} est supérieur à celui de M-P_3G_{25} par contre les membranes réticulées par TTP ont été dégradées. La libération de AM et PG dans un milieu basique a montré une diffusion rapide du PA durant la première minute. Cependant, la libération dans un milieu acide a montré un retard de libération de 3.5 mn.

Mots Clés : Pullulane, tension de surface, activité antimicrobienne, membrane, principe actif, libération.

Abstract

This present work aims to study the physicochemical and biological properties of pullulan (P) and its application as a release system for active ingredients (Amoxicillin (AM) and Penicillin G (PG)). The physicochemical characterization showed that the ash content of P is 0.15%, its humidity level is less than 10%, its pH_{pzc} is 6.7, its molecular weight is 52.14 KDa. Analysis by FTIR showed the presence of groups characteristic of P, including –OH, CH2, C-O-C. Measurement of the surface tension has shown that P does not have surfactant properties. Biological analysis showed that P has no antimicrobial activity against Staphylococcus aureus, Escherichia coli and Candida sp. Construction of P membranes was performed using glutaraldehyde (G) and tripolyphosphate (TTP) as cross linking agents. The active principle (AM or PG) has been loaded into membranes. The rate of swelling of the M-P2G25 membrane is greater than that of M-P3G25, on the other hand the membranes cross linked by TTP have been degraded. Release of AM and PG in basic medium showed rapid diffusion of PA during the first minute. However, release in acidic medium showed a release delay of 3.5 min.

Keywords: Pullulan, surface tension, antimicrobial activity, membrane, active ingredient, release.

ملخص

يهدف هدا العمل إلى دراسة الخصائص الفزيوكيميائية و البيولوجية للبيليلان, و استعمالاته كنظام لتحرير المواد الفعالة (اموكسسلين (AM)و البنيسيلين (PG)) , دراسة الخصائص الفيزيكيميائية أظهرت أن البليلان يحتوي على 0.15 % من الرماد, و يحتوي على اقل من 10 %من نسبة الرطوبة ,درجة حموضته هي6.7 = pH_{pzc},كتلته المولية KDa M= 52.14,كما ان التحليل بالأشعة تحت الحمراء FTIR اظهر وجود مجموعات الوظيفي : C-O-C,CH_2, OH قياس التوتر السطحي للبيليلان الظهر انه لا يملك أي خاصية تغير التوترالسطحي ,التحاليل البيولوجية أظهرت أن P لا يملك خاصية المضاد الحيوي ضد Escherichia coli,Staphylococcus aureus وCandida sp, . تشكيل اغشية P كان باستعمال glutaraldehyde (G) وtripolyphosphate (TTP) كعوامل ربط . المواد الفعالة ((AM) و(PG)) تم تركيبها في الأغشية . درجة توسع غشاء M-P2G25 اكبر من M-P3G25 , من جهة اخرى الاغشية التي تم تشكيلها ب (TTP) تم تفككها . تحرير AM و PG في وسط قاعدي اظهر ان عبور المادة الفعالة خلال اول دقيقة . بالاحرى في الوسط الحامضي اظهر ان عبورها خلال 3.5 دقيقة

الكلمات المفتاحية :بيليلان ,توتر السطحي ,نشاد المضاد الحيوي ,اغشية, المادة الفعالة,تحرير .

Remerciement

Je remercie toute personne ayant porté un intérêt à ce travail, réalisé au sein du laboratoire de biologie de la faculté des sciences (Université de Médéa),

Je remercie particulièrement Mme YAMINA Zouambia, Professeur à l'université de Médéa, de m'avoir accepté, d'avoir dirigé cette thèse avec beaucoup de responsabilité et de dévouement, et de m'avoir accordé sa confiance.

Je la remercie pour son écoute patiente et ses conseils précieux.

Je remercie Mme HAMIDA Maachou., professeur à l'université de Médéa, pour ses conseils précieux, pour son écoute et son soutien qui ont été indispensables à l'achèvement de ce travail.

Je remercie de tous mon cœur Mr. Nabi I. professeur à l'université de Médéa, et ses étudiantes,

Pour leurs remarques et leur connaissance

Leur aide dans les expériences biologiques

Je remercie énormément Mr Ashek R., et Mme Aarbia W. professeurs à l'université de Médéa, de m'avoir assuré la continuité de ce travail et leur soutien.

Je le remercie aussi pour leurs remarques et leur connaissance en sciences biologiques, qui ont bien participé à ma formation.

Dédicaces

♥ A **ma mère,** ma mère, ma mère…la source de ma force ;

♥ A **mon père…** mon héros;

♥ A mes sœurs Wissam, Rayane et Alla …ma joie;

♥ A mon frère Abd Kader Mohamed Fodil …<les hommes >;

♥ A mes grands parents Mohammed et khokha fodile…le bonheur ;

♥ A mes tantes Aicha et Badria ;

♥ A mes collègues ;

♥ A mon binôme Fatma Zohra Bouchanoun ;

HIBA

Dédicaces

Je tiens c'est avec grand plaisir que je dédie ce modeste travail :

A ma vie, ma source de bonheur et de courage,

A celle qui a resté toujours avec moi soit pour mes maladies chroniques

Et aussi dans mon parcours de mes études et ma poussé de ne jamais perdre de l'espoir

Que dieu te protège et te procure la bonne santé, ma **mère.**

A mon support de ma vie, la source de ma force et la bonne personnalité que j'ai maintenant

Celui qui m'a donné tout ce que j'ai besoin dans ma vie, celui qui a sacrifié pour nous.

Mon père que dieu te protège et te procure la bonne santé.

A ma chère sœur Anfel

Mon grand frère Aimen et mes deux petits frères Abd Elmouhaimen et Abd El rahmen

A docteur Aati qui m'a aidé beaucoup

A ma grande mère qui nous a quittés ça ne fait pas longtemps

A tout ma famille

A mon binôme Hiba que je remercie de m'accompagner au cours de ce travail.

A tous les étudiants diplômés qui nous ont donné l'aide pour la réalisation de ce travail.

FATMA ZOHRA

Sommaire

Remerciement

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction générale 1

Chapitre I : Synthèse bibliographique 3

I.1.Généralités sur les biopolymères 3

I.1.1. Définition des biopolymères 3

I.1.2. Différentes classes des biopolymères 3

I.1.3. Propriétés des biopolymères 4

I.1.4. Principales applications des biopolymères 6

I.2. Pullulane 8

I.2.1. Définition et structure 8

I.2.2. Propriétés physico-chimiques 8

I.2.3. Applications 10

I.2.4. Perspectives 12

I.3. Microencapsulation 12

I.3.1 Définition 13

I.3.2. Classification des produits de la microencapsulation 13

I.3.3. Caractéristique importante des microcapsules 15

I.3.4. Intérêts de la microencapsulation 15

I.3.5. Microréacteurs et systèmes de libération des substances encapsulées 17

I.3.6. Utilisation de la microencapsulation dans le domaine pharmaceutique 18

Chapitre II : Etude expérimentale 21

II.1. Introduction 21

II.2. Matériels et produits 21

II.3. Caractérisation physicochimique du pullulane 22

II.3.1. Taux de cendres 22

II.3.2. Taux d'humidité 23

II.3.3. Détermination du pH du point de charge nulle 24

II.3.4. Caractérisation par la spectroscopie infrarouge 26

II.3.5. Tension superficielle 28

II.3.6. Mesures viscosimétriques, détermination du poids moléculaire 30

II.3.6. Activité antimicrobienne 34

II.3.6.1. Méthode de diffusion sur gélose 34

II.3.6.2. Méthode de dilution en milieu liquide 36

II.4. Elaboration des systèmes de libération de principe actif 40

II.4.2. Préparation des membranes de pullulane 40

II.4.2.12. Test de gonflement 42

II.4.2.3. Test de perte en poids 45

II.5. Application 46

II.5.1. Courbe d'étalonnage 46

II.5.2. Application pharmaceutique 48

II.5.3. Application environnementale 50

Conclusion générale 52

Références bibliographiques

Liste des figures

Chapitre I : synthèse bibliographique

Figure I.1 : Applications des bios polymères en emballage 7

Figure I.2 : Unité répétitive (maltotriose) dans la structure du pullulane 8

Figure I.3 : Morphologie des microparticules 14

Figure I.4 : Structure d'un liposome 14

Figure I.5 : Intérêts de la microencapsulation 15

Figure I. 6 : Microréacteurs et systèmes à libération déclenchée et prolongée 18

Chapitre II : Partie expérimentale

Figure II.1 : Pullulane avant et après calcination 23

Figure II.2 : Variation de pH en fonction du volume ajouté de HCl et de NaOH 26

Figure II.3 : Spectre FTIR du pullulane 28

Figure II.4 : Tensiomètre à anneau de Nouy 29

Figure II.5 : Variation de la tension superficielle en fonction de la concentration 30

Figure II.6 : Viscosimètre capillaire type Ubbelohde 33

Figure II.7 : Variation de la viscosité spécifique en fonction de la concentration 33

Figure II.8 : Test antibiogramme du pullulane 36

Figure II.9 : Variation de DO_{630} avant et après incubation pour *Escherichia coli* 38

Figure II.10 : Variation de DO_{630} avant et après incubation pour *Staphylococcus aureus* 39

Figure II.11 : Variation de DO_{630} avant et après incubation pour *Candidat Sp* 39

Figure II.12 : Etapes de préparation de la membrane de pullulane (M-P_2G_{25}) 41

Figure II.13 : Variation du poids des membranes M-P_3G_{25} en fonction du temps d'immersion 44

Figure II.14 : Variation du poids des membranes M-P_2G_{25} en fonction du temps d'immersion 44

Figure II.15: Taux de gonflement des membranes M-P_3G_{25} et M-P_2G_{25} 45

Figure II.16 : Dégradation de M-P_3TPP_{25} après immersion 45

Figure II.17: Courbe d'étalonnage de PG 48

Figure II.18: Courbe d'étalonnage de l'AM 48

Figure II.19 : Membrane de pullulane chargée de PG (a) et AM (b) 49

Figure II.20: Profil de libération de l'AM 49

Figure II.21: Profil de libération de PG 50

Figure II.22 : Biosorption de l'AM par les différentes membranes 51

Figure II.23 : Biosorption de PG par les différentes membranes 51

Liste des tableaux

Chapitre I : Synthèse bibliographique

Tableau I.1 : Propriétés physico-chimiques du pullulane 9

Tableau I.2 : Différentes applications du pullulane 11

Chapitre II : Partie expérimentale

Tableau II.1 : Matériels et produits 22

Tableau II.2 : Souches bactériennes et fongiques utilisées 34

Tableau II.3 : Composition des différentes préparations du test antimicrobien par la méthode de dilution 38

Tableau II.4: Formulations des membranes de pullulane 40

Tableau II.5 : Etat physique des membranes de pullulane formées 42

Tableau II.6 : Test de dégradation 45

Liste des abréviations

α	Paramètre de Mark-Hou Wink
ADN	L'acide DésoxyriboNucléique
AM	L'ammoxiciline
ARN	L'acide ribonucléique
ASTM	*" American Society for Testing and Materials"*
C	La concentration
cm	Centimètre
C%	Le taux de cendre
Da	Dalton
DO	La densité optique
Dyn	Dyne
EPS	Expolysaccharide
ε	Le coefficient d'extinction spécifique
F	La force
g	Gramme
G	Le Glutaraldéhyde
h	Heure
H%	Le taux d'humidité
[η]	La viscosité intrinsèque
η_{sp}	La viscosité spécifique.
IR	L'Infra-rouge
IRTF	L'Infra-rouge de transformer de fourier
K	Constante de Mark-Hou Wink
l	Longueur de la cuve

m	La masse
M	La Masse molaire
ml	Millilitre
mn	minute
nm	nanomètre
PBAT	Le poly butylène adipate téréphtalate
PBSA	Le poly butylène succinate adipate
PCL	Le caprolactone
PEA	Le poly ester amideles
PG	La pénicilline G
PGA	L'acides polyglycoliques
PHA	Les poly hydroxyalcanoates
PHB	Le poly hydroxy butyrate
PHBV	Les poly hydroxy butyrate-Co-hydroxyvalérate
PLA	L'acide polylactique
PLG	Le poly-Lactide-co-Glycolide
PLGA	L'acide polylactique-co-glycolique
P	Le pullulan
Pzc	*"Point zero charge"*
R^2	Le coefficient de détermination
t	Le temps
TD	Le taux de dégradation
TG	Le taux de gonflement
TS	La tension superficielle
UV	L'ultraviolet
λ	La longueur d'onde

Introduction générale

De nos jours, un intérêt particulier est porté au contrôle de la vitesse et du site de libération des médicaments dans les différentes formes galéniques. La modification des technologies de libération doit être un profit pour le patient. Les mécanismes sont directement impliqués au pH du milieu ainsi qu'au temps de libération.

Les polysaccharides font partie des biopolymères utilisés pour la libération contrôlée d'un principe actif. Généralement caractérisés par des propriétés de gonflement, ils se situent dans la catégorie des hydrogels, des membranes….

Les biopolymères sont généralement obtenus à partir de différentes sources, y compris des animaux (par exemple, polybutylène succinate, acide polylactique, polyhydroxyalcanoates), sources végétales (par exemple, amidon, cellulose, alginate…), produits de fermentation bactérienne (par ex. collagène, chitine, chitosane et pullulane), et un processus de production spécifique (par exemple, la séricine qui est un sous-produit du processus de transformation de la soie).

Ces biomatériaux sont actuellement reconnus comme des matériaux potentiels pour remplacer chimiquement des polymères synthétiques conformément aux initiatives et réglementations en vigueur en matière d'environnement vert [1]. À ce jour, de tels biopolymères ont été largement proposés pour plusieurs applications, telles que les systèmes de délivrance de médicaments, la biomédecine, les hydrogels… [2].

Dans certaines formes galéniques conventionnelles, la période de temps où le principe actif possède tout son potentiel, est très restreinte, ce qui implique des prises de médicaments très fréquents et à des intervalles réguliers pouvant entraîner, dans certains cas des risques d'intoxication. Parfois, la concentration de drogue est très haute, contribuant aux effets secondaires défavorables. A d'autres fois, la concentration est trop basse pour fournir l'avantage thérapeutique. Dans le but de libérer des drogues à un taux constant, on applique des systèmes de libération du PA. Ces systèmes sont à la base des matrices biopolymériques.

Dans cet ordre d'idée, nous nous sommes intéressés dans ce travail à l´étude des propriétés physicochimiques et biologiques d'un biopolymère d'origine microbienne qui est le pullulane et son application dans le domaine pharmaceutique spécifiquement comme système de libération des principes actifs.

Pour ce faire ce manuscrit est structuré en deux parties : une synthèse bibliographique et une étude expérimentale :

1) La première partie bibliographique représentée par un seul chapitre rassemble les données disponibles dans la littérature spécifiques pour :

   - Les biopolymères : définitions, classification, propriétés et application. Une particularité est portée pour le pullulane le biopolymère faisant l'objet de cette étude.
   - La microencapsulation : définition, intérêt, procédés d'encapsulation, application…
   - La libération contrôlée : définition, mécanismes de libération….

2) La deuxième partie est consacrée à l'aspect pratique de ce travail qui regroupe successivement les points suivants :

   - Caractérisation physicochimique et biologique du biopolymère utilisé comme agent encapsulant (Pullulane).
   - Formulation des membranes comme systèmes d'encapsulation de deux antibiotiques.
   - Etude de la cinétique de libération des principes actifs à partir des membranes formulées.

Enfin ce manuscrit est clôturé par une conclusion générale regroupant les principaux résultats obtenus et quelques perspectives.

I.1. Généralités sur les biopolymères

I.1.1. Définition des biopolymères

Un biopolymère est un polymère issu de matières premières d'origine naturelle (végétaux, algaux, animaux, fongiques, etc.). La cellulose et l'amidon par exemple sont des polysaccharides et sont d'origine végétale alors que le (pullulane) P et le xanthane sont d'origine microbienne. Les biopolymères 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, lorsqu'il est faible, le polymère est dit oligomère. Les monomères sont composés d'un petit nombre d'atomes légers, parmi lesquels, on trouve toujours le carbone et l'hydrogène, souvent l'oxygène et l'azote et parfois le chlorure et certains autres éléments. Les biopolymères peuvent être produits par les systèmes biologiques, ou être synthétisés chimiquement à partir des produits d'origine biologique [3,4].

L'une des propriétés les plus intéressantes des biopolymères est la biodégradation. La biodégradation est un processus qui entraîne une modification de la structure chimique d'un matériau plastique, suite à une activité biologique. Les biopolymères peuvent être digérés par des microorganismes définis comme des bactéries, des champignons ou des algues. Les enzymes sécrétées par les microorganismes attaquent les chaines macromoléculaires des matériaux et les décomposent en éléments de masse plus faible et ceci conduit à la production des produits métabolites finaux, tous biodégradables : gaz (H_2O, CO_2), nouvelle biomasse non toxique [5].

I.1.2. Différentes classes des biopolymères

Il existe quatre grandes familles de polymères biodégradables exposées ci-dessous.

I.1.2.1 Polymères issus de ressources fossiles

Les polymères d'origine synthétique sont produits à base de ressources fossiles telles que le pétrole. Le principe général consiste à synthétiser un polymère contenant des liaisons labiles (ester ou amide) facilement dégradables dans un compost spécifique. Ils sont constitués de polyesters aliphatiques tels que le poly caprolactone (PCL), de Co polyesters aliphatiques tels que le poly butylène succinate adipate (PBSA) ou le poly ester amide (PEA) et de copolyesters aromatiques tel que le poly butylène adipate téréphtalate (PBAT) [6].

I.1.2.2. Polymères issus d'agro-ressources

Les polymères issus de ressources renouvelables, aussi appelés agro-matériaux ou biopolymère, sont des macromolécules naturelles compostables et renouvelables. Ils sont issus de plusieurs types d'agro-composés tels que les polysaccharides, les protéines ou les lignines. Ils sont par nature plutôt hydrophiles. La plupart d'entre eux peuvent être mis en œuvre à l'état natif ou plastifié, ou modifiés par des réactions chimiques. Les polysaccharides peuvent être d'origine bactérienne (xanthane…), végétale (cellulose, amidon, pectines, alginates…) ou animale (chitine, chitosane). Les plus courants sont l'amidon et la cellulose, qui sont des macromolécules glucidiques [6].

I.1.2.3. Polymères issus d'origine microbienne

Les polymères d'origine microbienne sont des polyesters synthétisés au cours de la fermentation de matières premières d'origine naturelle et excrétés ou stockés par les microorganismes. Cette famille comprend principalement les poly hydroxyalcanoates(PHA) un homopolymère, le poly hydroxy butyrate (PHB) et différents Co-polyesters tels que les poly hydroxy butyrate-Co-hydroxyvalérate(PHBV) pour lesquels le rapport hydroxyvalérate/hydroxy butyrate est variable [6].

I.1.2.4. Polymères issus des biotechnologies

Ces polymères sont dits issus des biotechnologies car ils sont obtenus par une polycondensation de monomères naturels ou identiques aux naturels. Le plus connu est le PLA (Poly (Acide Lactique)) provenant de la polymérisation de molécules d'acide lactique. Le monomère nécessaire à sa synthèse est obtenu par fermentation bactérienne à partir des ressources renouvelables [6].

I.1.3. Propriétés des biopolymères

De par leur structure chimique, les biopolymères présentent des propriétés particulières et intéressantes pour des applications bien spécifiques en industrie. Les propriétés les plus importantes des biopolymères sont citées ci-dessous.

I.1.3.1. Biodégradabilité

La biodégradabilité est la propriété la plus importante pour caractériser l'impact d'un produit organique sur l'environnement ; la libération du CO_2, H_2O, CH_4 et une biomasse non toxique. La biodégradabilité est un processus naturel de décomposition de la matière

organique. Elle est due à la présence de liaisons facilement clivables comme les liaisons esters ou amides conduisant à la formation de molécules simples et de fragments de plus petite taille [7].

Quatre éléments y concourent : avant tout, les micro-organismes sans lesquels aucune biodégradation ne serait possible, l'humidité, l'oxygène et la température. La durée nécessaire pour une biodégradation totale des matériaux, la bio-assimilation, est importante à considérer, puisqu'en fonction de l'utilisation du matériau, une durée trop courte ou trop longue n'a pas nécessairement d'intérêt [8].

La biodégradabilité peut toutefois, dans certains cas, être très utile sans qu'il y ait compostage, c'est le cas de certaines applications agricoles telles que le paillage par exemple [8].

I.1.3.2. Compostabilité

Le compostage est une mise en œuvre contrôlée et optimisée du processus naturel de biodégradation. Aussi, un matériau biodégradable est par définition, toujours compostable. Une solution compostable offre l'avantage de mieux contrôler le processus, en intervenants sur la quantité d'air, le pourcentage d'humidité et la température. L'optimisation du système permet de réduire la durée de compostage de 6 mois à seulement 45 jours. Ainsi, selon la norme, " American Society for Testing and Materials" (ASTM) un matériau compostable doit être susceptible de subir une décomposition biologique aboutissant à la formation d'un compost [9].

I.1.3.3. 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. En plus de la biocompatibilité, on recherche également pour des applications médicales spécifiques des matériaux biorésorbables pouvant se décomposer tout naturellement dans l'organisme humain pour être remplacés après par un tissu vivant.

Les biopolymères se dégradent naturellement dans l'organisme humain par hydrolyse (enzymatique) et libèrent des molécules assimilable et non toxique [9].

I.1.3.4. Propriétés chimiques

La présence de fonctions chimiques sur les molécules leur confère des propriétés particulières et des facilités à réagir avec d'autres molécules. Leur réactivité est due à la présence des fonctions alcool, acide, amine, ou aldéhyde qui réagissent facilement grâce à leur site nucléophile et électrophile. La présence de certaines insaturations et des groupements hydroxydes sur les chaines alkyles des triglycérides permet leur fonctionnalisation et conduit à la formation de polyuréthanes, polyamides ou polyesters. Dés lors, on peut modifier les propriétés physiques et mécaniques des polymères ainsi que leurs applications [10].

I.1.4. Principales applications des biopolymères

Les biopolymères ont de plus en plus d'applications industrielles dues à une tendance, dans l'industrie, à substituer les polymères dérivés du pétrole dont la réserve n'est pas inépuisable par des composés biodégradables. On les appelle alors des bioplastiques. Quoique cette idée n'est pas nouvelle puisque dès 1930 Ford avait fait appel à des protéines de soja pour produire des pièces intérieures de voiture puis des pièces de carrosserie. Mais, aujourd'hui, un nouvel élan est donné aux bioplastiques du fait des difficultés liées au recyclage de nos déchets toujours plus nombreux, à la nécessité de valoriser les sous-produits agricoles et aux soucis d'approvisionnements pétroliers de plus en plus couteux [11]. Les principales applications des biopolymères sont citées ci-dessous.

I.1.4.1. Médecine et pharmacie

Les premières applications des biopolymères sont médicales d'autant plus que leurs coûts élevés de départ se justifient dans ces applications à haute valeur ajoutée. Leurs propriétés de biocompatibilité et de biorésorbabilité associées à leur résistance mécanique [12] sont très importantes pour assurer les fonctions attendues dans ce domaine [13]. Plusieurs types de biopolymères sont actuellement employés dans le domaine médical. Les polyesters de synthèse tels que les polylactides (PLA), les polyhydroxyalcanoates (PHA) et les polyglycolides (PGA) ainsi que leurs copolymères polylactide-co-glycolide (PLGA) sont connus et utilisés pour les fils de suture et les implants médicaux. Ces biopolymères sont bien tolérés et ne présentent aucune toxicité pour l'organisme [14,15].

D'autres biopolymères tel que la cellulose ou les polyacides aminés conviennent aussi pour les applications médicales [16].

I.1.4.2. Agriculture

En agriculture, la propriété de biodégradabilité des biopolymères est essentielle dans les applications. Dans ce domaine, les films de paillage agricole à base de biopolymère s'imposent progressivement en remplaçant des films fabriqués à l'aide de polymères conventionnels. Les polymères à base d'amidon sont les plus utilisés dans le domaine de l'agriculture. Des travaux d'enlèvement, de nettoyage et de traitement des déchets plastiques sont dès lors indispensables par la suite. Ainsi, les paillis en polymères biodégradables évitent le ramassage et le traitement des déchets. En effet, l'utilisation des polymères biodégradables offre la possibilité de maîtriser la fin de vie de ces matériaux et ainsi de réduire l'impact des déchets sur l'environnement. Par ailleurs, leur biodégradation rapide évite l'incinération habituelle des films de paillage conventionnels, productrice d'éléments toxiques dans l'environnement et augmentant le coût de main d'œuvre.

Les biopolymères peuvent être employés pour confectionner des cordes et des filets de pêche. Ils sont également utilisés comme supports pour les cultures marines [17].

I.1.4.3. Emballage

Le secteur de l'emballage est un autre créneau important pour le marché des polymères biodégradables. Ces derniers apportent une solution aux problèmes de déchets mais nécessitent toute fois la mise en place d'une filière de gestion des déchets adéquate à ce type de produits. Outre leur biodégradabilité, les biopolymères présentent d'autres propriétés intéressantes pour les applications dans le domaine de l'emballage [18]. À part leur fonction première de protection des produits, les biopolymères offrent aux emballages d'autres fonctions grâce à leurs propriétés intrinsèques. On peut citer, par exemple, leur perméabilité à la vapeur d'eau intéressante pour emballer les produits frais comme les fruits et les légumes [19,20]. La figure I.1 montre quelques exemples d'emballage.



Figure I.1 : Applications des biopolymères en emballage **[21]**

I.2. Pullulane

I.2.1. Définition et structure

Le P est un homopolysaccharide extracellulaire, biodégradable, linéaire et hydrosoluble produit par les souches *Aureobasidium Pullulans* qui sont des champignons polymorphes de type levure [21, 22]. Il est composé de maltotrioses : trois unités de glucose liées entre elles par des liaisons glycosidiques α-(1 → 4). Les unités répétitives (maltotrioses) sont reliées par de liaisons α- (1 → 6) [23]. La figure I.2 illustre la structure de l'unité répétitive du P.

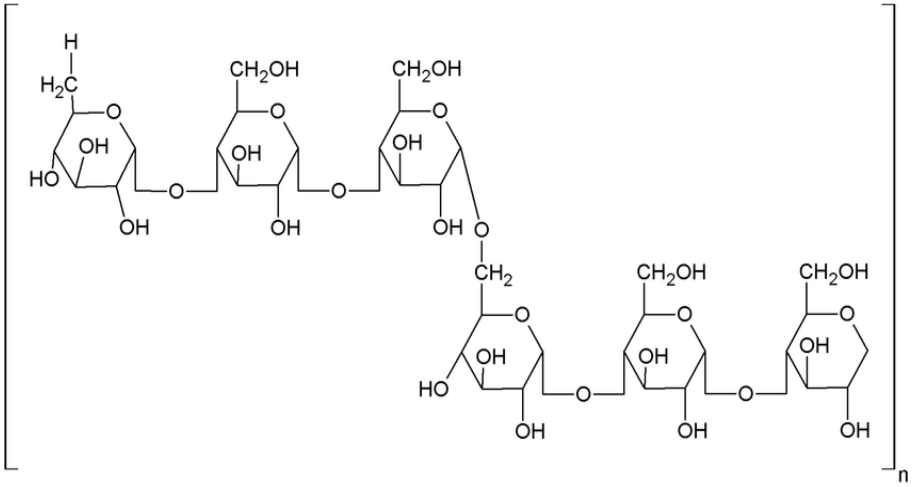


Figure I.2 : Unité répétitive (maltotriose) dans la structure du pullulane

Le P, en tant que levure noire (due à la formation de mélanine), est largement trouvé dans le sol, l'eau, les feuilles des plantes, le bois et différentes surfaces [24].

Les polysaccharides délivrés par des microorganismes qui ont une propriété qui est exceptionnellement utile dans différentes applications mécaniques [25].

I.2.2. Propriétés physicochimiques

Le P présente les caractéristiques suivantes :

- C'est un polysaccharide neutre non ionique et hydrosoluble, son monomère est de formule chimique $(C_6H_{10}O_5)_n$
- Il a une rotation optique de 192° en solution à une concentration de 1 g / dl.
- Il est non toxique, non mutagène, inodore et insipide avec nature comestible, dont la somme de ces propriétés a conduit à l'utilisation généralisée de cet exo

polysaccharide dans les aliments, les produits pharmaceutiques et industries chimiques.

- Un poids moléculaire moyen compris entre 5.10^3 et 2.10^6 Da selon les circonstances de la souche et de la culture [25].
- L'apparition régulière de liaisons α-(1 → 6) dans le P interrompt ce qui sera autrement une chaîne amylase linéaire. On pense que ce modèle de liaison unique est responsable de sa flexibilité structurelle et de sa solubilité, résultant en des caractéristiques distinctes de formation de films et de fibres non présentées par d'autres polysaccharides [26].
- Bien que plus chers que les plastiques, les produits à base de P sont comestibles et biodégradables, et le pullulane non dérivé est hautement soluble dans l'eau 58-60 g⁄ml

De par la présence de trois fonctions hydroxyle par motif anhydroglucose, le pullulane peut être modifié chimiquement. La littérature met en avant divers types de réactions conduisant à des dérivés de pullulane avec des propriétés nouvelles ou améliorées. On peut citer par exemple l'éthérification, l'estérification, la sulfonation, la copolymérisation et bien d'autres [27]. La plupart des réactions chimiques (dérivatisations) sont destinées à réduire sa solubilité dans l'eau ou à introduire un ou des groupements réactifs. La solubilité dans l'eau du P peut être progressivement réduite par estérification ou éthérification. la carboxylation améliore sa solubilité dans l'eau froide. Les perles de P réticulées sont utiles en chromatographie par perméation de gel, et des dérivés poly anioniques et cationiques ont été préparés [28-30]. Les principaux paramètres de qualité sont répertoriés dans le tableau I.1.

Tableau I.1 : Propriétés physico-chimiques du pullulane [28-30]

Paramètres	**Spécification**
Apparence	Blanc / blanc jaunâtre
Solubilité dans l'eau (25 ° C)	Haute
Solubilité dans des solvants organiques	Pauvre ou non Sauf: diméthyformamide et Diméthylsulfoxyde
Polypeptides (%)	Maximum 0,5
pH de la solution	5-7 et stable dans une large plage de valeur
Résidus minéral-cendres (sulfatés,%)	Maximum3
Humidité (perte au séchage, %)	Maximum 6
Viscosité dans les solutions aqueuses	Proportionnel au poids moléculaire du Pullulane
Toxicités	Biodégradable, Biocompatible

I.2.3. Applications

Les polymères microbiens sont connus pour posséder des propriétés physiques utiles, bien qu'actuellement seulement un petit nombre de biopolymère est produit commercialement à grande échelle. Quelques exopolysaccharides (EPS) fongiques ont été signalées jusqu'à présent qu'ils possèdent des applications industrielles attrayantes. Le P, un biopolymère soluble dans l'eau est l'un d'entre eux. De nombreuses applications du P dans l'industrie (alimentaire, pharmaceutique, cosmétique, les produits d'hygiène bucco-dentaire, l'électronique, etc.) ont été prouvés et utilisés. Dans de nombreux secteurs, son application semble se maintenir au fil des ans et se développer pour différents secteurs. Les principales propriétés industrielles intéressantes sont présentées dans le tableau I.2 :

Tableau I.2 : Différentes applications du pullulane [31]

Applications	**Propriétés**
Industrie alimentaire Agent de remplissage à faible viscosité dans les boissons et sauces. Stabilisant dans les formulations de mayonnaise Pâte alimentaire pour faire adhérer les noix aux biscuits ; Agent d'enrobage alimentaire ; Chips décoratifs pour la boulangerie ; Glaçage protecteur directement dans les aliments ; Liant et stabilisant dans les pâtes ; Production de sirops de glucose et de maltose de l'amidon ;	Facilement dissous dans l'eau chaude ou froide Non hygroscopique Non toxique, Non mutagène Inodore Insipide et comestible.
Produits de beauté Additif dans les lotions et shampooings ; Émulsions pour crème anti-âge créant un effet lifting ;	Capacité à former des solutions de basse ou haute viscosité similaire à celle de la gomme arabique.
Pharmaceutique Produits adhésifs pour prothèses ; Compositions cicatrisantes ; Revêtements de pilules ; Produits de soins bucco-dentaires (ex. Films Listerine) ; Joue un rôle en tant qu'agent non toxique pour les vaccins ; Faciliter la délivrance de liposomes ; Agent protecteur pour les vitamines oxydées et les graisses ; Additif dans les aliments pour les patients diabétiques ;	Capacité adhésive ; Agent filmogène (5-60 µm), flexible et soluble dans l'eau, ressemblant à certains polymères synthétiques dérivés du pétrole ; Faible contenu calorique ; Favorise la fonction pré biotique.

I.2.4. Perspectives

Le pullulane est trop cher pour bon nombre de ces utilisations potentielles, y compris celles dans lesquelles il sert de substitut biodégradable aux polymères dérivés du pétrole. Bien que le P soit produit efficacement par fermentation de substrats relativement bon marché, il vaut actuellement environ trois fois le prix du déxtrane, du xanthane et d'autres gommes microbiennes produites par fermentation. Par conséquent, des brevets plus récents ont, de plus en plus, concerné des applications valorisantes du P, en particulier celles liées à la santé humaine. Techniquement, des améliorations dans la production du P, telles que des innovations techniques ou une production de souches améliorée, pourrait réduire le coût de production. L'utilisation des approches génétiques moléculaires pour améliorer la production est actuellement limitée par un manque de connaissances fondamentales sur le pullulane.

Les niveaux de production de pullulane sont assez stables depuis plusieurs années, avec une spécialité applications alimentaires en tant que marché majeur. La commercialisation récente des soins bucco-dentaires à base de pullulane est encourageante pour l'avenir du pullulane, bien que les formulations concurrentes aient apparu. Un autre marché émergeant pourrait être celui des produits pharmaceutiques. L'augmentation de la demande de pullulane pourrait justifier une production accrue, ce qui se traduirait par de nouvelles niches de marché viables pour ce biopolymère unique [28-30].

I.3. Microencapsulation

La préparation des microcapsules remonte aux années 1950 lorsque Green et Schleicher ont produit des colorants microencapsulés, pour la fabrication de copies autocopiants papier. À ce jour, le papier autocopiant est l'un des produits les plus importants utilisant la technologie de micro- encapsulation, et il est toujours un produit de commercialisation. Le développement de papier autocopiant conduit au développement de divers produits de microcapsules dans les années ultérieures [31-33].

La micro-encapsulation a été employée dans un large éventail de domaines allant de la chimie et des produits pharmaceutiques aux cosmétiques et à l'impression. Pour cette raison, un intérêt généralisé s'est développé pour la technologie de microencapsulation [31-33].

I.3.1 Définition

La microencapsulation est une technique par laquelle, les principes actifs solides, liquides ou gazeux sont conditionnés par un deuxième matériau (généralement un polymère ou un biopolymère), ingrédient du milieu environnant, dans le but de protéger le principe actif. Le principe actif est désigné comme matériau de base tandis que le matériau environnant forme la coque [31-33].

La microencapsulation regroupe donc l'ensemble des technologies permettant de préparer des microparticules individualisées dont la taille varie de 1 µm à 1 mm, généralement sphériques ou ovoïdales, et constituées d'un matériau polymère qui enrobe jusqu'à 90 % d'une matière active : parfum, arôme, pigment ou colorant... La micro-encapsulation est omniprésente dans tous les domaines de la formulation : cosmétique, détergence, pharmacie, agroalimentaire, textile, peinture, électronique, imprimerie… [34].

I.3.2. Classification des produits de la microencapsulation

Les produits de la microencapsulation sont classés selon leur taille, leur morphologie et leur nature.

I.3.2.1. Classification selon la taille

Dans cette classification, on distingue :

- Les nanoparticules : microparticules dont le diamètre est de l'ordre du nanomètre. Elles sont à base de polymère généralement biodégradable ; ou un lipide capable de retenir des molécules actives par séquestration ou/et adsorption.
- Les Microparticules : leur taille est de l'ordre de micron [35]

I.3.2.2. Classification selon la morphologie

On distingue :

- Les microcapsules : c'est un système réservoir cœur-membrane. Le cœur est constitué de la substance active et la membrane de l'agent encapsulant qui forme l'enveloppe solide. Deux types de microcapsules peuvent être distingués les monocoques ayant un seul creux (chambre) à l'intérieur de la capsule et les polycoques (Figure II.5, A et C) ayant un certain nombre de chambres de tailles différentes à l'intérieur de la coque. [36]

- Les microsphères : c'est un système matriciel constitué d'un réseau polymère dans lequel la substance active est dispersée à l'état moléculaire [36] (Figure II.5, B).

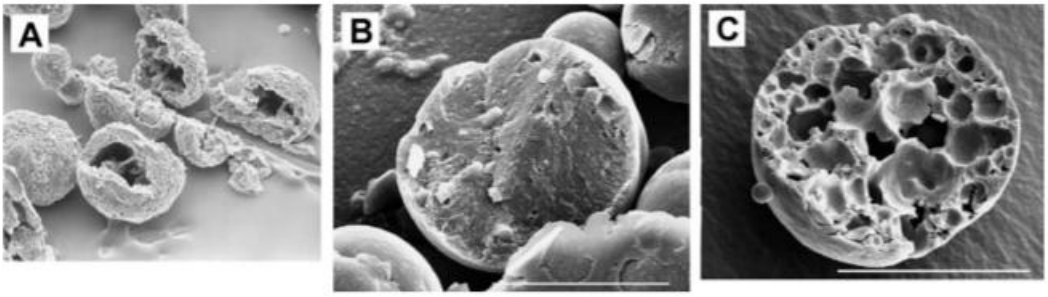


Figure II.3 : Morphologie des microparticules : **[37-39]**

A) microcapsule monocoque ; B) microsphère ; C) microcapsule polycoques

I.3.2.3. Classification selon la nature des microparticules

Dans ce cas, il s'agit des liposomes. Ils font partie de la famille des vésicules et sont constitués d'une ou plusieurs bicouches de phospholipides. Ils ont le principal avantage d'être à la fois non toxiques et biodégradables, du fait de leur composition en phospholipides qui sont des constituants naturels des membranes biologiques.

Les liposomes permettent d'encapsuler aussi bien des molécules hydrophiles dans leur cœur aqueux que des molécules hydrophobes dans leur bicouche. Les liposomes ont été les premiers systèmes utilisés pour la libération des antibiotiques et ils sont constitués d'un cœur hydrophile, une bicouche hydrophobe et une surface hydrophile. La figure (**I.4**) représente la structure d'un liposome [40].

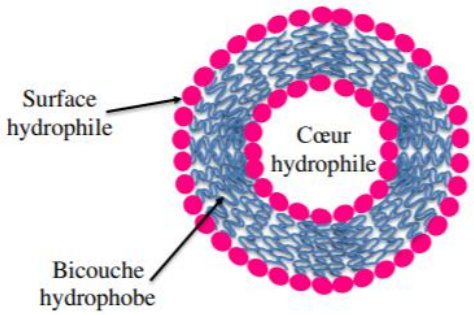


Figure I.4 : Structure d'un liposome [40]

Plusieurs chercheurs se sont basés sur le principe des liposomes pour développer de nouveaux systèmes de libération. Dans le domaine pharmaceutique, les liposomes sont reconnus comme les systèmes d'encapsulation et de libération de PA antibactériennes les plus utilisés. Les liposomes permettent d'assurer une vectorisation ciblée des PA et de réduire leurs éventuelles toxicités **[41]**. Ils permettent également d'éviter l'apparition d'effets secondaires au moment de l'administration sous-cutanée, intradermique ou intramusculaire, que l'on observe avec certains principes actifs irritants. Ainsi, plusieurs produits pharmaceutiques, qui contiennent dans leur formulation des liposomes, sont commercialisés depuis des années **[42]**.

I.3.3. Caractéristique importante des microcapsules

La caractéristique la plus importante des microcapsules est leur taille microscopique qui permet une grande surface, par exemple, la surface totale de 1µm d'une chaine de microcapsules creuses ayant un diamètre de 0,1 µm a été rapportée comme étant d'environ 60 m^2

La surface totale est inversement proportionnelle au diamètre. Cette grande surface est disponible pour les sites d'adsorption et de désorption, réactions chimiques et diffusion [43,44].

I.3.4. Intérêts de la microencapsulation

La microencapsulation des matériaux est utilisée pour assurer que le matériau encapsulé atteigne la zone d'action sans être affecté par l'environnement à travers lequel il passe. La figure (**II.5**) illustre les principaux intérêts de la microencapsulation **[45]**.



Figure I.5 : Intêrets de la microencapsulation

I.3.4.1. Protection du contenu central contre les effets atmosphériques

Le palmitate de vitamine A (largement utilisé comme additif pour l'alimentation animale, en particulier pour poules pondeuses), par exemple, est microencapsulée avec la gélatine pour augmenter la résistance à l'humidité et l'oxygène atmosphérique, et donc améliorer la stabilité. Autres vitamines liposolubles ou insaturées, tel que les acides gras utilisés comme compléments nutritionnels, sont traité de la même manière. Les aliments microencapsulés sont utilisés dans la pisciculture industrielle. Il s'agit essentiellement de mélanges riches en protéines et en matières grasses qui sont micro-encapsulés pour réduire l'oxydation du produit pendant le stockage, et pour retarder le taux de libération dans l'environnement aqueux de la ferme piscicole. Une telle protection augmente considérablement l'alimentation efficacité et le taux de croissance du poisson [45].

I.3.4.2. Réduction des risques pour la santé

Les pesticides sont souvent encapsulés pour réduire le risque pour l'utilisateur. L'antibiotique ampicilline a été microencapsulé pour réduire la possibilité de sensibilisation du personnel de l'usine. L'encapsulation des médicaments (par exemple, le sulfate de fer (II), l'acide acétylsalicylique) réduit l'irritation gastro-intestinale en contrôlant le taux de libération dans le système digestif. Les polymères entériques, par exemple, ne libèrent pas le médicament dans l'environnement à pH bas du l'estomac, mais dans l'intestin. Les troubles gastriques peuvent donc être évités [45].

I.3.4.3. Masquage du goût et de l'odeur

La microencapsulation peut être utilisée pour masquer le goût ou l'odeur désagréable de composés tels que les produits pharmaceutiques. Cependant, le masquage du goût peut également être obtenu à moindre coût en conditionnant les produits pharmaceutiques dans des capsules de gélatine dure, ou en incorporant le composé désagréable dans des comprimés enrobés de sucre ou pelliculés [45].

I.3.4.4. Masquage des propriétés principales

Les propriétés chimiques de matière active encapsulée (par exemple, pH ou propriétés catalytiques) peuvent être masquées jusqu'à ce que leur libération est requis. En outre, les propriétés physico-chimiques des substances peuvent être modifiées [45].

I.3.4.5. Séparation des composants incompatibles pour des raisons fonctionnelles

Un exemple de cette application est l'utilisation de catalyseurs aux radicaux libres microencapsulés (par exemple, le peroxyde de benzoyle) mélangés avec des résines polyester durcissables, qui durcissent dans site au point d'utilisation [45].

I.3.4.6. Systèmes de vectorisation

Ces systèmes peuvent être conçus et adaptés pour l'encapsulation de molécules aussi bien hydrophiles qu'hydrophobes ce qui revient à augmenter virtuellement la solubilité des molécules encapsulées dans le milieu où elles sont destinées à agir [46].

I.3.4.7. Contrôle de la libération de principe actif

La libération de principe actif est contrôlée par le matériau porteur. Divers profils de libération peuvent être obtenus. Un grand nombre d'utilisations réelles ou potentielles des microparticules peuvent se trouvent dans cette catégorie, généralement avec des exigences fonctionnelles supplémentaires [45].

I.3.5. Microréacteurs et systèmes de libération des substances encapsulées

Lorsqu'on considère les interactions matière active/milieu extérieur, les microparticules peuvent être classées en deux catégories : celles qui ne doivent pas libérer leur contenu telles que les microréacteurs contenant des enzymes ou des bactéries, et celles qui sont formulées de façon à libérer la matière active encapsulée. Dans ce dernier cas, il faut distinguer les systèmes à libération déclenchée des systèmes à libération prolongée [47].

I.3.5.1. Systèmes piégés dits microréacteurs

Les microparticules se présentent sous la forme d'un noyau d'adsorbat à l'intérieur duquel leur contenu (enzymes ou catalyseurs) est piégé. Ce noyau est enrobé par une membrane polymère semi-perméable permettant le transfert du substrat du milieu extérieur vers le cœur du microréacteur et vice versa pour le produit (Figure I.6.a). Ces microréacteurs sont particulièrement utilisés dans les bioprocédés impliquant des transformations enzymatiques [47].

I.3.5.2. Systèmes à libération provoquée

Le contenu de la capsule est libéré après rupture de la paroi sous l'effet d'une contrainte physique, chimique ou biologique (Figure I.6.b) [47].

I.3.5.3. Systèmes à libération contrôlée et prolongée

La libération du principe actif peut être contrôlée soit par diffusion passive à travers la paroi, soit par dégradation ou dissolution enzymatique ou chimique lente de la couche polymérique qui devient poreuse et permet la diffusion à travers la paroi (Figure I.6.c). Cela permet notamment de délivrer un médicament progressivement, évitant ainsi une prise quotidienne [47].

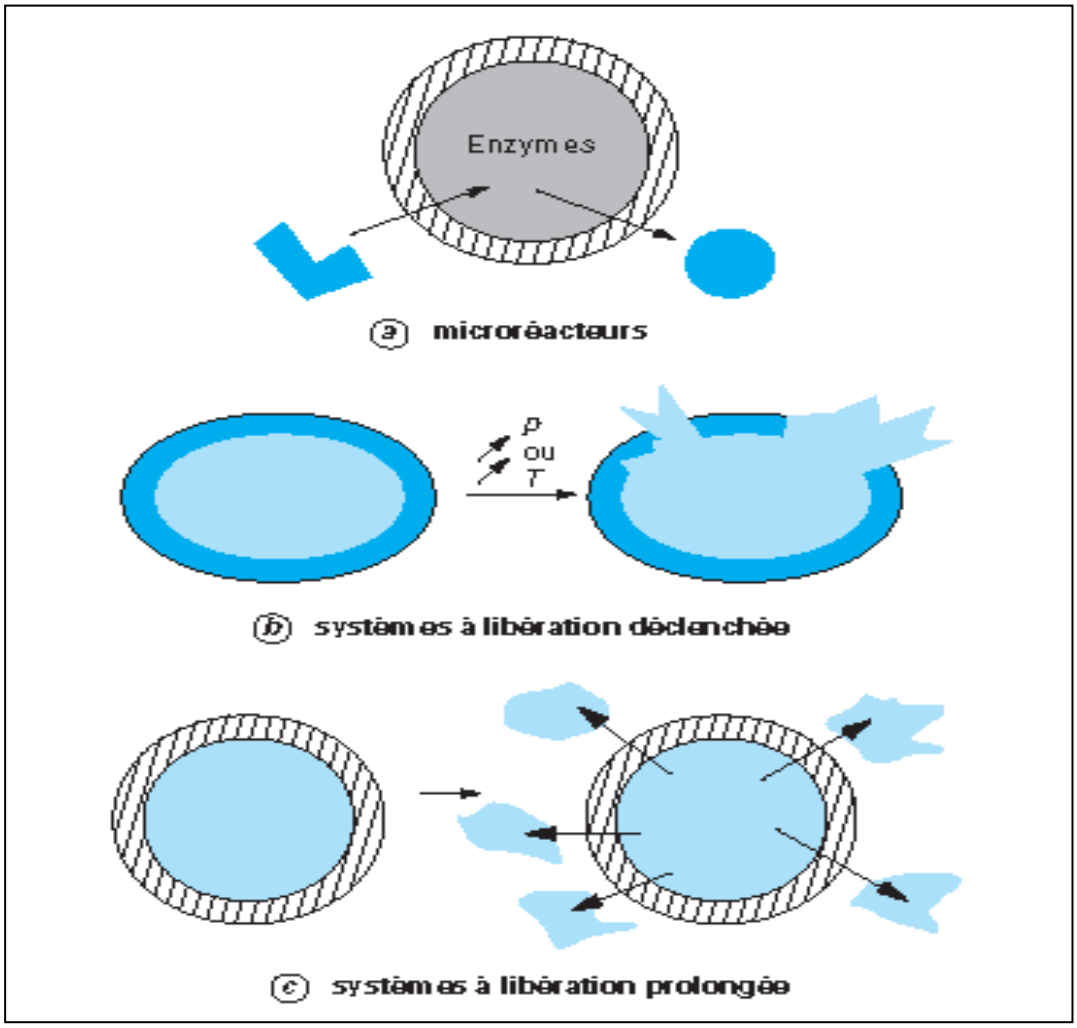


Figure I.6: Microréacteurs et systèmes à libération déclenchée et prolongée

I.3.6. Utilisation de la microencapsulation dans le domaine pharmaceutique

La technologie de microencapsulation a considérablement amélioré la recherche pharmaceutique en termes de dispositifs d'administration de médicaments. Ce domaine interdisciplinaire comprenant la science des polymères et la technologie des émulsions a non seulement couvert l'encapsulation de médicaments, mais aussi des peptides, des

protéines et des molécules thérapeutiques acide Désoxyribose Nucléique et acide ribonucléique (ADN et ARN) pour des études à libération contrôlée. Ceci, à son tour, a amélioré l'efficacité thérapeutique de la molécule avec les avantages de faibles exigences de dosage et avec la capacité d'être délivré au site ciblé sans dégradation enzymatique par des protéines des fluides biologiques. La libération contrôlée du médicament par le biais de microsphères/microcapsules se produit via quatre mécanismes connus, à savoir la diffusion, la dissolution, l'osmose et l'érosion. Le phénomène de libération contrôlée prolongée protège non seulement le médicament de la dégradation, mais protège également le corps des effets toxiques potentiels du médicament **[48]**.

I.3.6.1. Microencapsulation d'agents biologiques, de compléments alimentaires, d'enzymes et d'antibiotiques

Des polymères biodégradables et biocompatibles, tels que l'acide polylactique-co-glycolique (PLGA), ont été utilisés pour encapsuler des agents biologiquement actifs tels que la rispéridone (antipsychotique) **[49].** De même, l'encapsulation de compléments alimentaires, tels que des vitamines et des substances huileuses, a également été réalisée à l'aide de la technologie des émulsions [**50**], ont démontré la microencapsulation de protéine par des nanoparticules de chitosane en utilisant la méthode de pulvérisation-séchage pour une application pulmonaire [51]. Des antibiotiques tels que la minocycline HCl ont également été administrés localement dans la poche parodontale, pour moduler l'inflammation du parodonte, obtenue en incorporant les microsphères contenant l'antibiotique dans une bandelette en polysaccharide de pectine [52, 53].

I.3.6.2. Microencapsulation de médicaments et de gènes anticancéreux

Des molécules bioactives telles que les protéines et l'ADN / ARN, qui sont plus sujettes à la dénaturation, ont également été encapsulées par échange de solvants. De même, l'ADN a été encapsulé sous cisaillement réduit, pour maintenir son intégrité, pour des applications d'administration orale **[54-56]**.

I.3.6.3. Microencapsulation des protéines et des hormones

Une étude, impliquant l'encapsulation de l'insuline, a utilisé des microsphères préparées en utilisant une technique d'émulsion, comprenant un mélange de poly (éthylène glycol) avec un homopolymère acide polylactique PLA et un copolymère Poly-Lactide-co-Glycolide PLG pour une administration d'insuline soutenue de 28 jours **[57]**. Outre

l'utilisation de polymères pour les techniques de microencapsulation, des lipides ont également été utilisés pour encapsuler des protéines, impliquant la technologie des fluides supercritiques. Une étude a démontré l'utilisation de cette technologie en utilisant Dynasan 114 et Gelucire 50-02, pour l'encapsulation d'une protéine modèle, l'albumine sérique bovine **[58].**

I.3.6.4. Microencapsulation de matériaux nano hybrides

D'autres applications de la microencapsulation impliquent l'encapsulation de nanoparticules, ce qui peut offrir de grands avantages dans les applications biomédicales. Par exemple, la micro encapsulation de métaux avec des effets antioxydants peut être protégée de l'internalisation cellulaire tout en conservant leurs propriétés biomimétiques dépendant de la surface. De plus, la microencapsulation peut empêcher une libération initiale éclatée de médicaments thérapeutiques [59 ,60], Par ailleurs, une autre étude a démontré que les nanoparticules lipidiques cationiques encapsulant des médicaments lipophiles pouvaient être microencapsulées dans une membrane polymère anionique, formant des microcapsules via des interactions ioniques. Cette méthode a produit des microbilles sensibles au pH, qui se sont avérées bénéfiques pour l'administration orale de médicaments lipophiles **[61]**.

II.1. Introduction

Cette étude expérimentale, réalisée au sein du laboratoire biologie de la faculté des sciences (Université de Médéa), a été consacrée à l'élaboration des systèmes d'encapsulation des principes actifs à base d'un biopolymère d'origine bactérienne qui est le pullulane.

Pour ce faire, notre étude expérimentale comporte deux grandes parties :

1) La première partie est consacrée à :
   - ❖ La caractérisation physicochimique et biologique du biopolymère.
   - ❖ La formulation des systèmes d'encapsulation sous forme de membranes par la méthode de gélification.
   - ❖ La caractérisation des membranes préparées.
2) La deuxième partie est dédiée à l'utilisation des membranes élaborées pour l'encapsulation d'un principe actif (deux antibiotiques) et l'étude de la cinétique de libération de ces derniers dans différents milieux.

II.2. Matériels et produits

L'ensemble des matériels et produits le long de cette étude expérimentale est regroupé dans le tableau II.1.

Tableau II.1 : Matériels et produits

Matériels	**Produits**
Four à moufle Balance de précision Tensiomètre à anneau de nouy Tube viscosimétrique type ubelhode pH-mètre spectrophotomètre IRTF Etuve Autoclave Bec benzène Agitateur magnétique Spectrophotomètre UV	NaCl HCl NaOH Souches bactériennes et fongiques Milieu Muller Hinton Milieu Sabouraud Tripolyphosphate (TPP) Antibiotiques : Amoxicilline (AM) et pénicilline G (PG) KBr

II.3. Caractérisation physicochimique du pullulane

II.3.1. Taux de cendres

II.3.1.1. Principe

Les cendres totales sont le résidu de composés minéraux qui reste après l'incinération d'un échantillon contenant des substances organiques. Ces minéraux sont considérés comme des impuretés donc elles influencent sur la matière. Plus le taux de cendre est petit, plus la matière est pure [62].

Le résultat est exprimé en pourcentage de teneur en cendres sur sec (masse cendres / masse sèche de la matière) selon l'équation suivante :

$$C\ (\%) = (\ m_f\ /\ m_i) \times 100 \qquad \text{(II.1)}$$

Avec :

C(%) : le taux de cendre en pourcentage

m_i: la masse initiale de l'échantillon avant la calcination.

m_f : la masse finale de l'échantillon après la calcination.

II.3.1.2. Mode opératoire et résultat

Les différentes étapes suivies pour la détermination du taux de cendres du pullulane sont les suivantes :

- ✓ Peser une masse de 1g de pullulane dans une coupelle de poids connu (Figure II.1, A).
- ✓ Mettre l'échantillon dans une four à résistance à 550°C pendant 5 heures.
- ✓ Après refroidissement, peser l'échantillon à nouveau (Figure II.1, B).

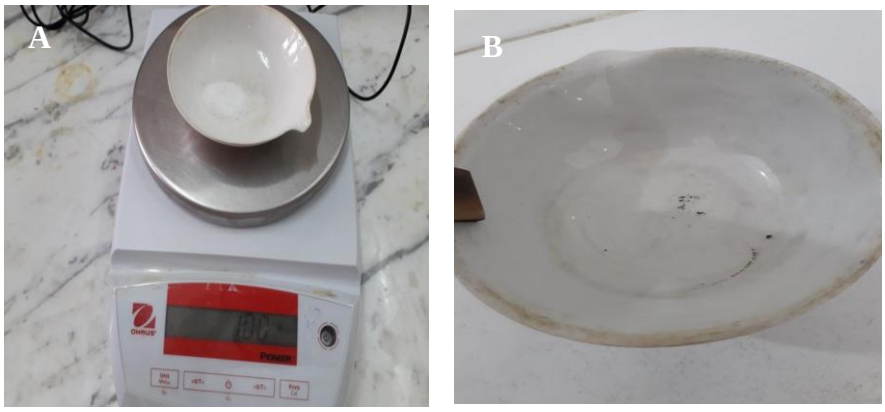


Figure II.1 : Pullulane avant et après calcination

Le taux de cendres déterminé pour le P est de l'ordre de 0.15%. Ce résultat est très faible ce qui montre que le P est riche en matière organique.

II.3.2. Taux d'humidité

Le but est la détermination de la masse d'eau contenue dans la matière à étudier pour connaitre le rapport de cette masse par rapport à la masse totale (taux d'humidité). Le taux d'humidité nous renseigne sur la conservation de la matière, plus il est petit plus la matière est stable et peut être conservée facilement. Si le taux d'humidité est < 10%, la matière est considérée comme stable.

Le chauffage sert à l'évaporation et élimination de l'eau de la substance (il sert à la sécher). La peser de la masse avant et après séchage sert à identifier la masse d'eau existante dans la matière (masse de vapeur libérée au cours du séchage).

Le taux d'humidité, exprimé en pourcentage est calculé par la relation suivante :

$$H\ \% = (m_i - m_f) \times 100 / m_i \qquad (II.2)$$

Avec

H % : le taux d'humidité en pourcentage

m_i : masse initiale de la matière à étudier.

m_f : masse finale de la matière après séchage.

II.3.1.2. Mode opératoire et résultat

Le taux d'humidité a été déterminé comme suit :

- ✓ Peser une masse de 1 g de pullulane dans un verre de montre de poids connu,
- ✓ Mettre l'échantillon dans une étuve à 105°C jusqu'à l'obtention d'une masse constante (≈ 24h).
- ✓ Après refroidissement, peser l'échantillon à nouveau.

Le résultat obtenu montre que la poudre de pullulane utilisée a un caractère hygroscopique avec un taux d'humidité de l'ordre de 9%. Le résultat trouvé est < 10% ce qui permet une bonne conservation de ce produit dans des endroits secs.

II.3.3. Détermination du pH du point de charge nulle

II.3.3.1. Définition et principe

Le point de charge nulle est le pH pour lequel la charge de surface nette de l'adsorbant est égale à zéro. Ce concept a été introduit par une augmentation de l'intérêt du pH de la solution lors de l'adsorption [63]. La raison pour laquelle le pH a attiré beaucoup d'attention est que l'adsorption de certaines substances est très dépendante du pH. La valeur du pH du point de charge zéro (pH_{pzc}) est déterminée par les caractéristiques d'un

adsorbant. Par exemple, la charge de surface de l'adsorbant est décrite par l'ion qui se trouve sur la surface de la structure de particule (adsorbant). Au pH plus bas, les ions hydrogène (protons, H^+) seraient plus adsorbés que les autres cations (adsorbat) de sorte que les autres cations seraient moins adsorbés dans le cas de la particule chargée négativement. D'un autre côté, si la surface est chargée positivement et que le pH est augmenté, les anions seront moins adsorbés à mesure que les ions hydroxyde sont augmentés. Du point de vue de l'adsorbant, si le pH est inférieur à la valeur pH_{pzc}, la charge superficielle de l'adsorbant serait positive de sorte que les anions puissent être adsorbés. Inversement, si le pH est supérieur à la valeur pH_{pzc}, la charge de surface serait négative pour que les cations puissent être adsorbés [64].

II.3.3.2. Protocole expérimental et résultats

La détermination du pH_{pzc} a été réalisée selon le protocole décrit par Bianca et al. [65] résumé comme suit:

- Mettre 0.5 g de P dans 60 ml d'une solution de NaCl (0.1M, pH=7) et laisser 24 h sous agitation magnétique.
- Ajouter de petit volume d'une solution de HCl (0.05 M) et noter le pH après chaque ajout.
- Refaire les deux étapes précédentes en remplaçant la solution de HCl par une solution de NaOH (0.05 M)
- Tracer la courbe pH en fonction du volume de HCl et de NaOH ajouté.
- Le pH_{pzc} est donné par l'intersection de la courbe avec l'axe des ordonnées.

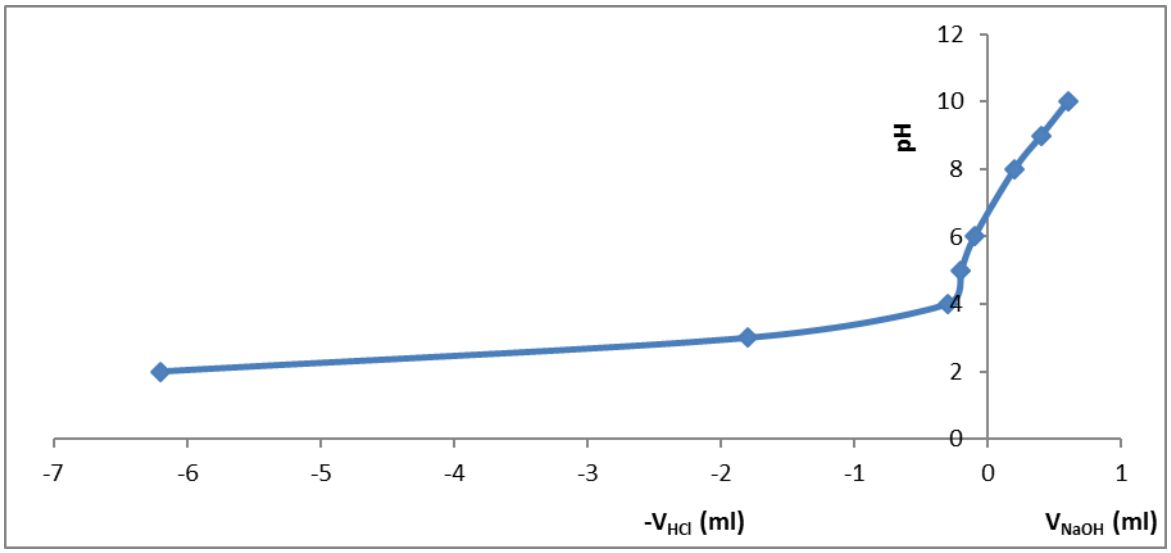


Figure II.2 : Presentation graphique du pH en foction des volumes ajoutés des solutions de NaOH et de HCl

La figure II.2 représente la variation du pH en fonction du volume de HCl et de NaOH ajouté. L'intersection avec l'axe des ordonnées donne une valeur de 6.7 correspondante au pH_{pzc}. A cette valeur de pH, le pullulane prend une charge globale nulle cela veut dire que le pullulane a autant de charges positives que de charges négatives.

II.3.4. Caractérisation par la spectroscopie infrarouge

II.3.4.1. Principe

Le principe de la spectroscopie infrarouge (IR) repose sur l'absorption de la lumière par la plupart des molécules dans la région de l'infrarouge du spectre électromagnétique et en convertissant cette absorption en vibration moléculaire. Cette absorption correspond spécifiquement aux liaisons présentes dans la molécule. Avec un spectromètre, cette absorption du rayonnement infrarouge par le matériau de l'échantillon est mesurée en fonction de la longueur d'onde.

Le résultat est un spectre qui donne une "empreinte chimique" distinctive qui peut être utilisée pour visualiser et identifier des échantillons organiques et inorganiques [66].

La différence entre IR et IRTF

Cela donne un interférogramme, le signal brut, qui représente l'intensité de la lumière en fonction de la position du miroir. Ce signal doit être traité à l'aide de la transformée de Fourier (FT) pour produire le tracé plus familier de l'intensité Infrarouge par rapport au nombre d'ondes. D'où le nom IRTF.

Non seulement l'acquisition de spectres IRTF est beaucoup plus rapide que par les instruments dispersifs conventionnels.

En outre, les spectres montrent un rapport signal/bruit significativement plus élevé et, puisque l'échelle de longueur d'onde est calibrée avec un laser très précis, la précision en longueur d'onde est beaucoup plus élevée [66].

II.3.4.2. Protocole expérimentale et résultat

La caractérisation par la spectroscopie FTIR a été réalisée en utilisant un spectrophotomètre FTIR type Vertex 70 (Brucker). Cet appareil permet une analyse des échantillons (poudres) sans préparation des pastilles et sans aucun ajout. L'échantillon à analyser est déposé directement sur un puit puis analyser. Les spectres d'absorption infrarouge ont été enregistrés dans la gamme de nombres d'onde comprise entre 400 et 4000 cm^{-1}, avec une résolution de 8 cm^{-1} et un nombre de scanne égale à 20.

Le spectre FTIR du pullulane est donné sur la figure II.3.

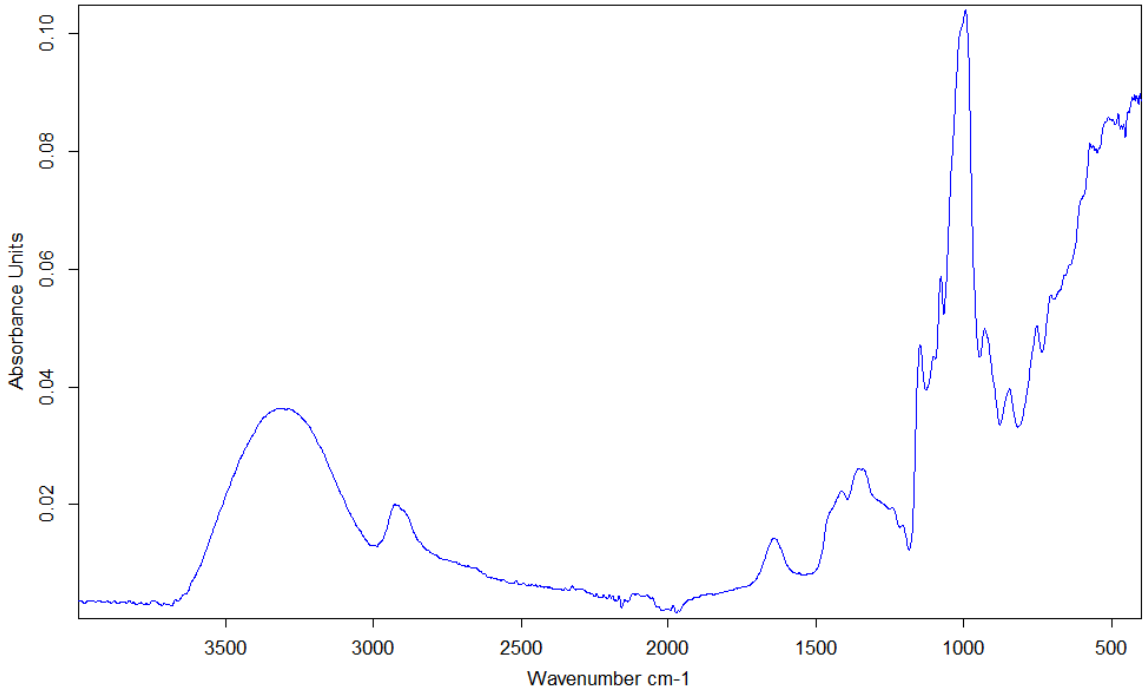


Figure II.3 : Spectre FTIR du pullulane

L'analyse de la figure II.3 montre la présence des principaux pics caractéristiques du pullulane et qui sont :

- 3318 cm^{-1} assigné à la vibration du groupement OH.
- 2928 cm^{-1} correspondant à la liaison CH du groupement CH_2.
- 1643 cm^{-1} correspondant à la bande d'eau.
- 1149 cm^{-1} attribué à la liaison COC du cycle aromatique.

II.3.5. Tension superficielle

II.3.5.1. Principe

La tension superficielle est un phénomène physicochimique lié aux interactions moléculaires d'un fluide. Elle résulte de l'augmentation de l'énergie à l'interface entre deux fluides. Le système tend vers un équilibre qui correspond à la configuration de plus basse énergie, il modifie donc sa géométrie pour diminuer l'aire de cette interface. La force qui maintient le système dans cette configuration est la tension superficielle.

Cette méthode de mesure de tension de surface également dite "méthode par détachement", généralement attribuée à Noüy, consiste à mesurer la force F nécessaire pour détacher un anneau en platine de la surface d'un liquide [67].

II.3.5.2. Protocole expérimental et résultat

La tension superficielle a été déterminée comme suit :

1. Préparer une solution mère de pullulane à 1% ;
2. Faire des dilutions de 1/10 à partir de la solution mère jusqu'à 10^{-6} % ;
3. Stocker les solutions à une température de 4°C pendant 24h ;
4. Mesurer la tension superficielle de chaque solution par un tensiomètre à anneau de Nouy (figure II.3) [68].



Figure II.4 : Tensiomètre à anneau de Nouy

Les résultats de la tension superficielle (TS) des solutions du pullulane à différentes concentrations sont illustrés sur la figure II.5.

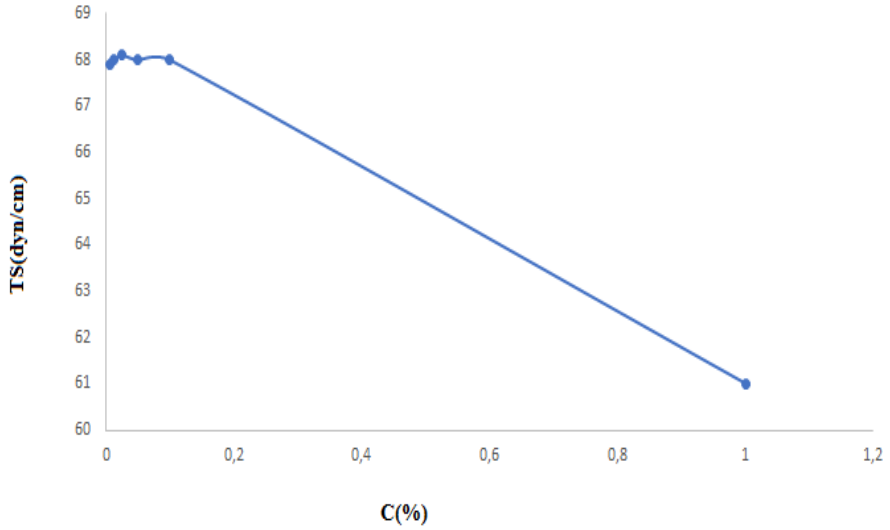


Figure II.5 : Variation de la tension superficielle en fonction de la concentration

L'analyse des résultats de la figure II.5 montre que le P dans la mesure de la gamme de concentration choisie, ne possède pas des propriétés tensioactives remarquables où la tension superficielle est diminuée de 72 dyn/cm pour l'eau distillée à 61 dyn/cm enregistrée pour la solution de P à 1%.

II.3.6. Mesures viscosimétriques, détermination du poids moléculaire

Le poids moléculaire d'un polymère est d'une importance fondamentale dans la synthèse et l'application du polymère. Par exemple, les propriétés mécaniques les plus importantes dépendent et varient considérablement en fonction du poids moléculaire. Les propriétés mécaniques intéressantes et utiles, associées aux polymères, sont une conséquence de leur poids moléculaire élevé [69].

II.3.6.1. Principe

La détermination expérimentale de la viscosité constitue actuellement l'une des techniques les plus répandues et la plus ancienne en chimie macromoléculaire pour caractériser les polymères en solution. Elle donne des informations sur la viscosité, la masse moléculaire moyenne, la géométrie des molécules ou le rayon de giration, le taux de

réticulation des polymères ramifiés ainsi que sur les interactions physico-chimiques entre le polymère et le solvant.

Dans le cas des solutions, la viscosité du solvant peut varier de manière significative selon le type et la concentration du soluté tel que les polymères. De par leur taille, les macromolécules ont un impact très important sur la viscosité du solvant. La viscosité est plus élevée dans les substances dont les forces intermoléculaires sont plus grandes parce que si les molécules sont plus fortement attirées les unes aux autres, elles ne s'écoulent pas entre elles aussi librement. C'est pour cette raison que la viscosité, qui est liée à la forme moléculaire, augmente dans le cas des macromolécules qui peuvent interagir sur une plus grande surface et s'entremêler

Ainsi, si on fait passer la solution à travers un capillaire, cette pelote se comporte comme une sphère, hydrodynamique imperméable, gênant le mouvement d'écoulement des molécules de solvant, ce qui provoque une augmentation de sa viscosité. Par conséquent, la réponse des macromolécules à l'application des forces hydrodynamiques peut renseigner sur leurs volumes et leurs dimensions et donc indirectement sur leurs masses molaires

La viscosité de la solution est liée à la viscosité du solvant pur et à la concentration C (g/cm3) en polymère.

Pour aboutir à la masse molaire moyenne des polymères on doit définir la viscosité intrinsèque (caractéristique du couple polymère-solvant). Quant à la viscosité intrinsèque, elle correspond à l'absence de toute interaction moléculaire de par l'extrapolation à dilution infinie. Elle est directement liée à la nature des polymères

En connaissant, la viscosité intrinsèque, la relation empirique de Mark-Houwink permet de déterminer la masse molaire moyenne viscosimétrique (M) :

$$[\eta]=K\times M^{\alpha} \qquad \text{(II.3)}$$

Où K et α ($0,5 < \alpha < 1$) sont les paramètres de Mark-Hou Wink caractéristiques du couple polymère solvant à une température donnée et [η] la viscosité intrinsèque.

Dans la pratique, la viscosité intrinsèque des solutions macromoléculaires est définie comme étant la limite de la viscosité réduite lorsque la concentration tend vers zéro selon la formule suivante [69].

$$[\eta] = \lim_{c \to 0} \frac{\eta_{sp}}{C} \qquad (2.7)$$

$$\eta_{sp} = \frac{t - t_0}{t_0} \qquad (2.8)$$

Où :

[η] : viscosité intrinsèque (dl/g).

H $_{sp}$: viscosité spécifique.

t et t_0 : temps d'écoulement de la solution et du solvant respectivement (s).

C : concentration du soluté (g/l).

Dans le cas du pullulane, le solvant choisi est le NaCl (1M) [70]. Pour ce système particulier, les constantes k et a ont été établies par Nishinari et al [71], (1991) and Kato et al., (1984) [72], et l'équation II.3 devient :

$$[\mu] = 2,58 \times 10^{-2}.M^{0,66} \text{ ml/g} \qquad \text{(II.4)}$$

II.3.6.2. Protocole expérimental et résultats

Les solutions de pullulane (10^{-3} à 6 10^{-3} g/ml) ont été préparées dans une solution de NaCl (1M) [73]. Les mesures de viscosité ont été effectuées à l'aide d'un viscosimètre capillaire de type Ubbelohde (figure II.6). Le mouvement de cisaillement est engendré en imposant une différence de pression entre les 2 extrémités d'un tube cylindrique de faible section, dans lequel s'écoule la solution. Cet instrument mesure le temps d'écoulement d'un volume défini (13 ml de solution de pullulane) par deux traits de repère. La seule force de pesanteur est responsable de l'écoulement. Le temps d'écoulement du solvant pur a été également mesuré dans les mêmes conditions.

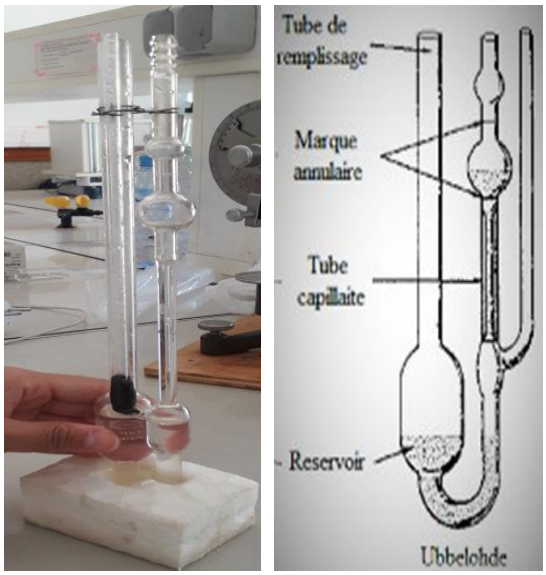


Figure II.6 : Viscosimètre capillaire type Ubbelohde

La représentation graphique regroupant les résultats typiques obtenus après les mesures viscosimétriques réalisées pour toutes les solutions de pullulane préparées sont décrites sur la figure II.7.

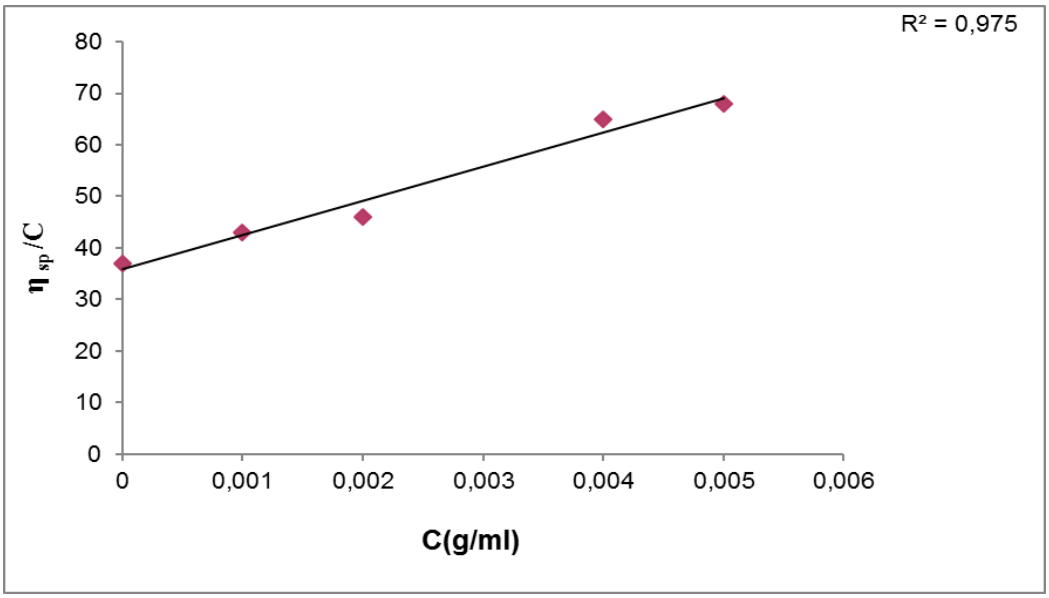


Figure II.7: Variation de la viscosité spécifique en fonction de la concentration

L'examen des résultats présentés sur la figure II.7, nous permet de déduire que le pullulane utilisé est une macromolécule à poids moléculaire élevé de l'ordre de 52.14 KDa.

Ce résultat est inclus dans la marge du poids moléculaire du pullulane donnée dans la littérature (5.10^3 et 2.10^6Da) [25].

II.3.6. Activité antimicrobienne

L'évaluation de l'activité antimicrobienne du pullulane utilisé a été réalisée par deux méthodes : la méthode de diffusion sur gélose (antibiogramme) et la méthode de dilution dans un milieu liquide. Dans cette partie, nous avons testé deux souches bactériennes et une souche fongique. Ces souches sont obtenues du laboratoire de l'établissement public de santé de proximité de Médéa (Tableau II.2).

Tableau II.2. Souches bactériennes et fongiques utilisées

Souches bactériennes	Gram+	*Staphylococcus aureus*
	Gram-	*Escherichia coli*
Souche fongique		*Candida sp*

II.3.6.1. Méthode de diffusion sur gélose

A. Principe

La méthode de diffusion sur gélose (agar) est particulièrement adaptée à l'étude de l'action d'une substance sur la croissance des bactéries et des champignons. Elle permet de déterminer leurs antibiogrammes qui rendent compte de la sensibilité spécifique des différentes espèces bactériennes et fongiques vis-à-vis des substances données. Elle consiste à des boites pétries contenant un milieu gélose convenable, déjà solidifié et inoculé de la souche microbienne testée. L'effet du produit antimicrobien sur la cible (microorganisme) est apprécié par la mesure d'une zone d'inhibition, et en fonction du diamètre d'inhibition la souche du microorganisme sera qualifiée de sensible, d'intermédiaire ou de résistante. Ainsi, dans cette méthode il y a compétition entre la croissance du microorganisme et la diffusion du produit à tester [74].

B. Protocole expérimentale

La méthode de diffusion sur milieu gélosé a été réalisée sur le milieu Muller-Hinton (pour les bactéries) et Sabouraud (pour les levures). Les principales étapes impliquées dans la méthode de diffusion sur gélose sont résumées comme suit [75] :

→ Fondre les deux milieux dans un bain marie à 95°C, puis verser simultanément et aseptiquement une première couche de chaque milieu dans une boîte de Pétri à raison de 15 ml par boîte.

→ Après refroidissement à la température ambiante, ensemencer la suspension de chaque souche ($0.01 < DO_{630} < 0.08$) par la méthode d'écouvillonnage et laisser solidifier sur la paillasse.

→ A l'aide d'une pince stérile, prélever un disque, de 9 mm de diamètre, préalablement stérilisé et l'imbiber de la solution de pullulane (5mg/ml et 7.5 mg/ml).

→ Déposer le disque sur la surface gélosée sèche des boites de Pétri écouvillonnées.

→ Incuber les boites dans une étuve à 37°C pendant 24 heures pour les bactéries et à 28 °C pendant 72 heures pour les levures.

→ Lire les résultats par la mesure de la zone d'inhibition, qui est représentée par une auréole formée autour de chaque disque où aucune croissance n'est observée.

C. Résultats

La lecture du test d'antibiogramme du pullulane porte sur la croissance ou non de l'inoculum se traduisant par l'apparition d'un halo autour du disque mesuré par un pied à coulisse. Les résultats sont exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition et peuvent être symbolisés par des signes (+ ou -) selon la sensibilité des souches vis-à-vis l'agent antimicrobien comme suit [75] :

- Non sensible (-) ou résistante : diamètre < 8mm.
- Sensible (+) : diamètre compris entre 9 à 14 mm.
- Très sensible (++) : diamètre compris entre 15 à 19 mm.

- Extrêmement sensible (+++) : diamètre > 20 mm.

Les résultats du test antimicrobien réalisé par la méthode de diffusion sur gélose sont donnés sur la figure II.8.

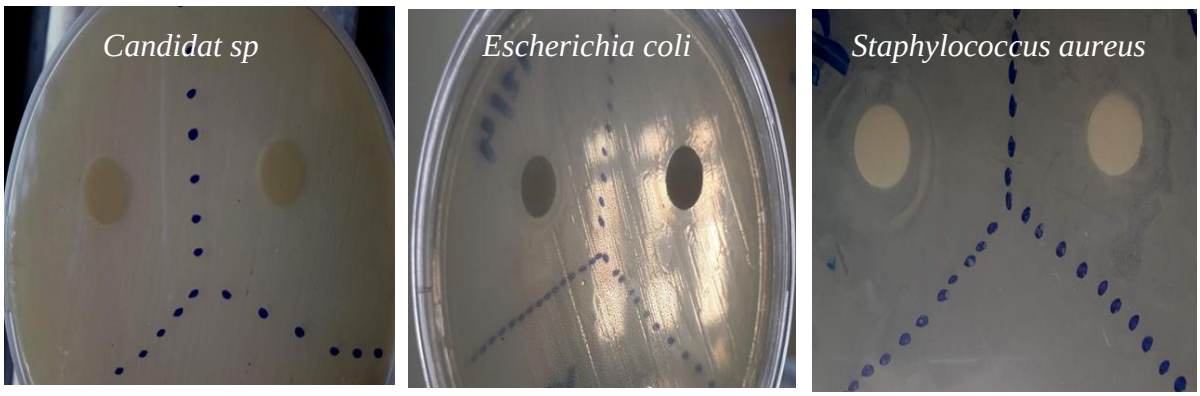


Figure II.8 : Test antibiogramme du pullulane

L'analyse des résultats de la figure II.8 nous a permis de soulever les points suivants :

- Absence de zones transparentes autour des disques et ceci pour toutes les souches testées. Ceci montre que dans la mesure des conditions utilisées, le pullulane n'a pas une activité antimicrobienne.
- Apparition des zones opaques autour des disques pour les souches bactériennes due à la diffusion de la solution du pullulane. De plus, la densité des germes dans cette zone est inférieure à celle observée le long de la boite de Pétri. Ceci nous a conduit de penser d'utiliser la méthode de dilution pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne du pullulane.

II.3.6.2. Méthode de dilution en milieu liquide

A. Principe

La méthode de dilution en milieu liquide consiste à préparer une série du même milieu de culture liquide (en concentration et en volume) contenant la même quantité de germes dans chaque tube, puis inoculer une gamme de concentrations de la substance (solution de pullulane) à tester du même volume. Ensuite, la mesure de la DO_{630} de chaque préparation en utilisant le spectrophotomètre UV est effectuée avant et après incubation. S'il y a une diminution de la DO_{630} en fonction de l'augmentation de la

concentration de la substance étudiée après l'incubation cela veut dire que cette dernière a un effet antimicrobien, si non le contraire.

Des tubes témoins (ou de contrôle) de la croissance microbienne doivent être utilisés :

- Témoin positif (T(+)) : contient le milieu de culture et la suspension microbienne. Ce dernier doit indiquer la croissance des germes après incubation (augmentation de la DO_{630}).
- Témoin négatif : représenté par deux tubes :

  → T1 (-) : contient le milieu de culture et la substance à tester.

  → T2 (-) : contient le milieu de culture seulement.

Pour ces derniers, il faut qu'il n'y aura pas une croissance de germe après l'incubation.

Il est à noter que pour les témoins l'expérience doit être répétée trois fois [74].

B. Protocole expérimentale

Les principales étapes suivies sont :

1. Préparer le milieu de culture (bouillon nutritif) ;
2. Stériliser le matériels et le milieu de culture par autoclave ;
3. Préparer quatre solutions de pullulane de différentes concentrations par la méthode de dilution au 1/10 à partir de la 1^{ière} concentration qui est égale à 3% ;
4. Préparer la suspension bactérienne et fongique dans le bouillon nutritif ;
5. Ajouter un volume approprié de la suspension microbienne aux différentes dilutions de pullulane.
6. Préparer les tubes des témoins positif et négatif.
7. Mesurer la DO_{630} de chaque préparation
8. Incuber les préparations à 37°C pendant 24h pour les bactéries et 28°C à 72h pour la souche fongique.
9. Mesurer la DO_{630} après incubation.

La composition des différentes préparations ainsi que les témoins est indiquée dans le tableau II.3 [74].

Tableau II.3 : Composition des différentes préparations du test antimicrobien par la méthode de dilution

	N° du tube	Composition
Dilutions	1	3ml de suspension (bactérienne ou fongique) +1 ml de solution de P de concentration de 3.10^{0} %
	2	3ml de suspension (bactérienne ou fongique) +1 ml de solution de P de concentration de 3.10^{-1} %
	3	3ml de suspension (bactérienne ou fongique) +1 ml de solution de P de concentration de 3.10^{-2} %
	4	3ml de suspension (bactérienne ou fongique) +1 ml de solution de P de concentration de 3.10^{-3} %
Témoins	T (+)	3 ml de bouillon nutritif + quelques colonies bactériennes ou fongiques : suspension (bactérienne ou fongique)
	T_1 (-)	3 ml de bouillon nutritif + 1 ml de solution de P de concentration de 3 10^{0} %".
	T_2 (-)	3 ml de bouillon nutritif

C. Résultats et discussion

Les principaux résultats obtenus sont représentés par les histogrammes des figures II.9, II.10 et II.11.

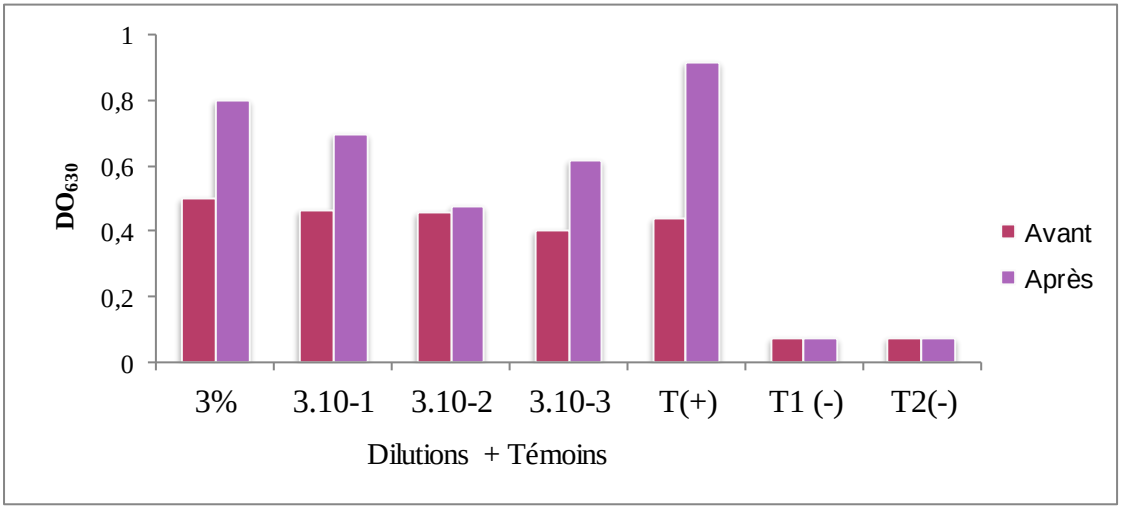


Figure II.9 : Variation de DO_{630} avant et après incubation pour *Escherichia coli*

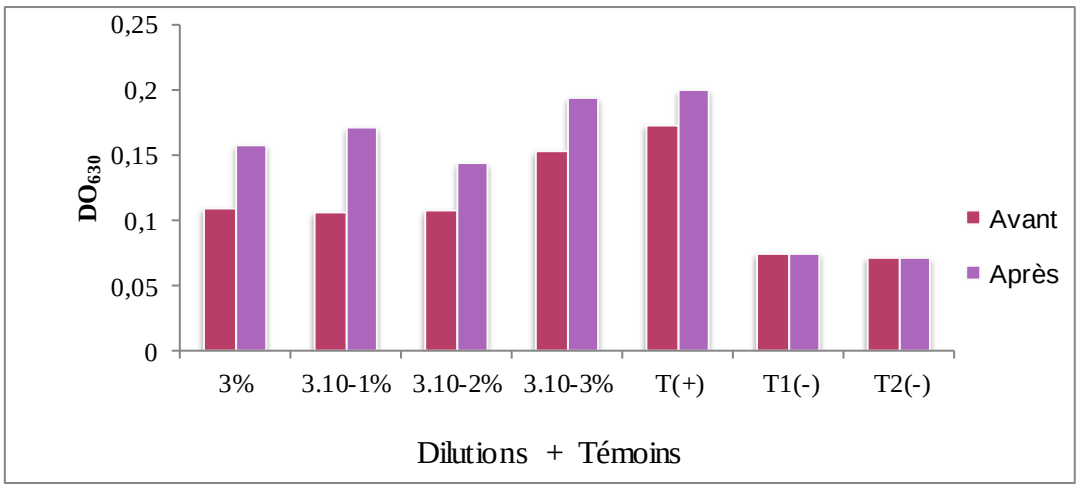


Figure II.10 : Variation de DO_{630} avant et après incubation pour *Staphylococcus aureus*

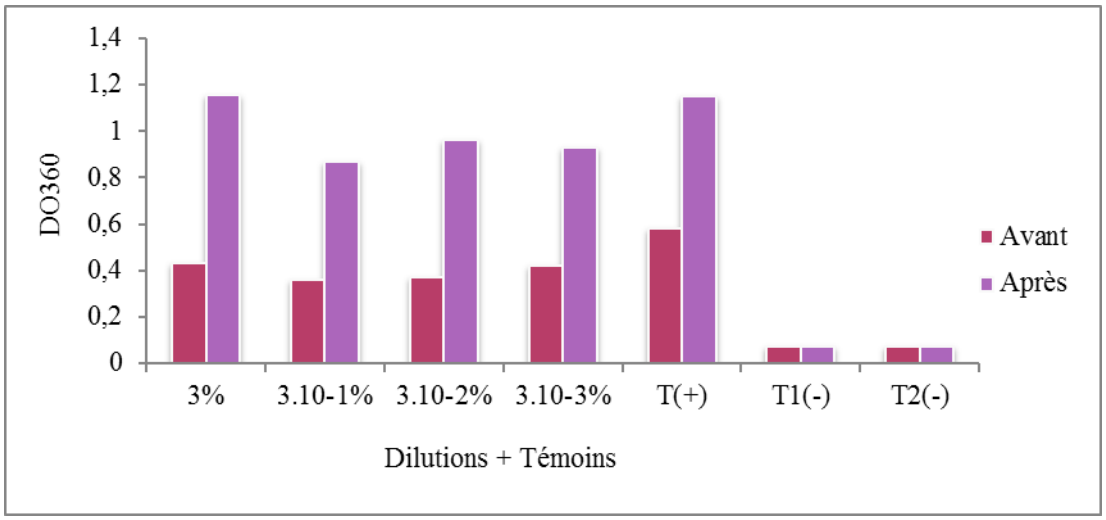


Figure II.11: Variation de DO_{630} avant et après incubation pour *Candidat Sp*

L'analyse de ces dernières montre que pour toutes les concentrations du pullulane choisies, la DO augmente après l'incubation indiquant la croissance des souches microbiennes. Ce résultat confirme le résultat obtenu dans le cas de l'antibiogramme montrant que le pullulane n'a pas une activité antimicrobienne vis-à-vis les souches testées.

II.4. Elaboration des systèmes de libération de principe actif

Dans cette partie, nous nous sommes intéressés à la préparation des systèmes de libération de principes actifs sous forme de membranes à base de pullulane.

II.4.1. Principe

Pour préparer les membranes de pullulane, nous avons choisis la méthode de gélification suivie d'une réticulation. Le principe de cette méthode consiste à étaler un volume connu d'une solution du biopolymère dans une boite Pétri puis la mettre dans une étuve pour évaporer le solvant et obtenir un film de biopolymère. Une fois le contenu de la boite est séché, ajouter un agent réticulant. La réaction entre le biopolymère et le réticulant permet de figer la forme membranaire du film polymérique.

II.4.2. Préparation des membranes de pullulane

La préparation des membranes de pullulane a été effectuée en s'inspirant des travaux antérieurs [76]. Nous avons choisi le glutaraldéhyde (G) et le tripolyphosphate (TPP) comme agent réticulant et nous avons varié la teneur en pullulane et celle en agent réticulant. Le tableau II.4 résume les différentes formulations et les solutions utilisées.

Tableau II.4: Formulations des membranes de pullulane

Formulation	Solutions utilisées		
	P (%)	G (%)	TPP (%)
M-P_2G_{25}	2	25	/
M-P_3G_{25}	3	25	/
M-P_3TPP_{25}	3	/	25
M-P_3TPP_5	3	/	5

Les étapes du protocole expérimentale sont décrites ci-dessous :

- Préparer les solutions aqueuses de pullulane 2 % et 3 % et laisser sous agitation pendant 5 h.
- Préparer les solutions aqueuses de TPP 5 % et 25 %
- Préparer une solution aqueuse de G 25 %

- A un volume de 20 ml de la solution de pullulane (2% ou 3 % selon la formulation), ajouter 1 ml de la solution du réticulant (G 25 % ou TPP 5 % ou TPP 25 % selon la formulation).
- Verser le mélange obtenu dans une boite pétri en verre et bien étaler la solution
- Mettre la boite dans une étuve à 40 °C pendant 24 h puis augmenter la température à 80 °C pendant 24 h.
- Démouler les membranes obtenues, les laver à l'eau distillée et les sécher de nouveau.

Ce protocole est résumé par l'organigramme de la figure II.12

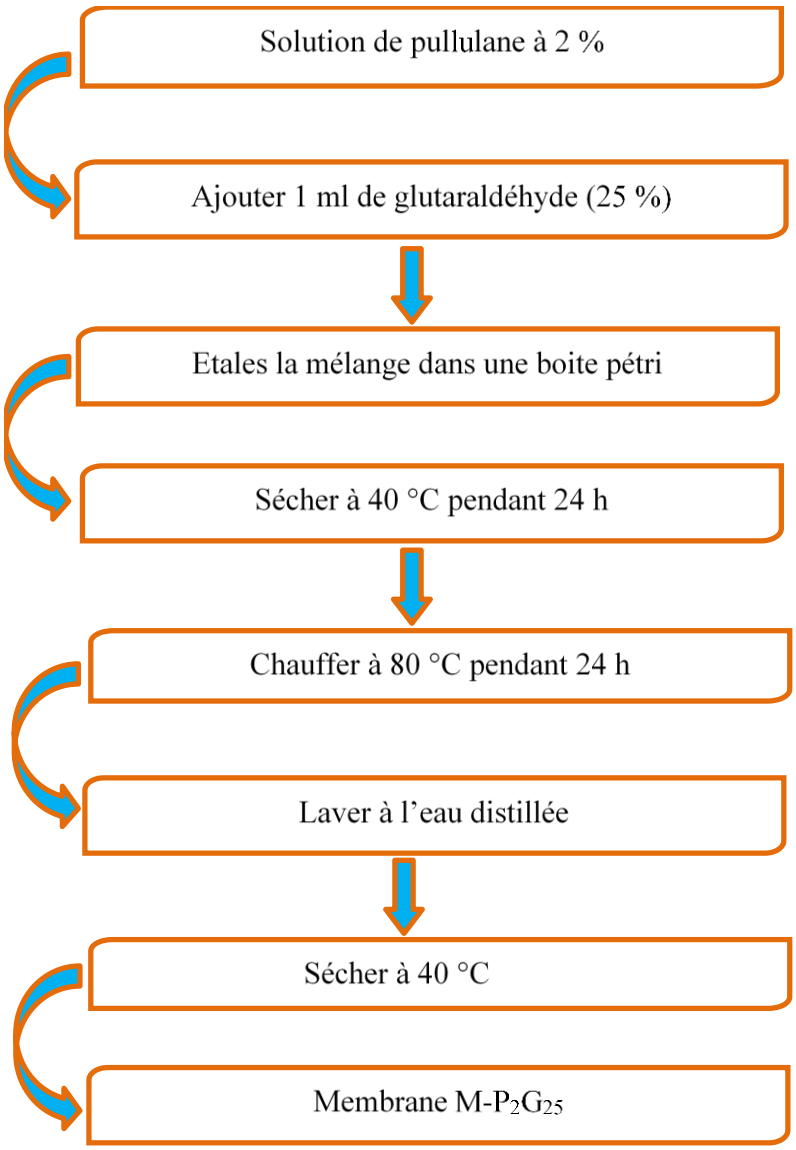


Figure II.12 : Etapes de préparation de la membrane de pullulane (M-P_2G_{25})

II.4.2. Résultats et discussions

II.4.2.1. Aspect général des membranes

Les résultats des différentes formulations sont récapitulés dans le tableau II.5

Tableau II.5 : Etat physique des membranes de pullulane formées

Formulation	Membrane obtenue	Observation
M-P_2G_{25}		• Transparente • Rigide
M-P_3TPP_{25}		• Blanche **et opaque** • Facile à casser
M-P_3G_{25}		• Blanche et transparente • Rigide
M-P_3TPP_5		• Transparente • Très fragile

II.4.2.12. Test de gonflement

Le test de gonflement des différentes membranes élaborées a été réalisé dans deux solutions : acide citrique (pH= 3) et phosphate de sodium disodique (pH=10).

a. Mode opératoire

- Découper un petit carré de chaque membrane et le peser (soit $m_i \approx 0.015$ g);
- Immerger un carré dans un volume de 5 ml de chaque solution (pH = 3, pH= 10) à la température ambiante ;

- Peser le carré à nouveau (m_f) à des intervalles de temps régulier de 5 mn jusqu'au poids constant ;
- Garder le carré pour le test de dégradation.
- Le taux de gonflement (TG) est calculé par la formule (II.5) suivante :

$$TG= (m_f-m_i)/m_i\times 100 \qquad \textbf{(II.5)}$$

Avec :

m_i : masse initiale de la membrane avant immersion en gramme

m_f : masse finale de la membrane après immersion en gramme

b. Résultats et discussion

Les résultats de la variation du poids des membranes de pullulane réticulées par le glutaraldehyde sont présentés dans les figures II.12 et II.13.

Nous remarquons une augmentation rapide du poids des membranes M-P_3G_{25} durant les cinq premières minutes et puis le poids devient quasiment constant. Le taux de gonflement calculé après 20 mn d'immersion est de l'ordre de 329.4 % et 343.75 % dans les deux milieux basique et acide respectivement (Figure II.15)

Concernant les membranes M-P_2G_{25}, le gonflement maximal est retardé de 5 mn par rapport aux membranes M-P_3G_{25}. Le TG calculé après 20 mn d'immersion est de 1256.25 % et 1125 % dans les milieux basique et acide respectivement (Figure II.15).

Par comparaison entre les deux milieux acide et basique, nous pouvons conclure que le pH n'a pas beaucoup d'effet sur le gonflement des membranes réticulées par le glutaraldehyde. Par ailleurs, en fixant le taux du glutaraldehyde, la teneur des membranes en pullulane a une influence significative sur le gonflement. La quantité de G utilisé est suffisante pour réticuler les membranes M-P_2G_{25} et donc former un réseau tridimensionnel apte à piéger l'eau. Tandis que la même quantité de G était insuffisante pour former le même réseau dans le cas des membranes M-P_3G_{25}.

Remarque : La manipulation des membranes M-P_2G_{25} était un peu difficile. Leur pliement a rendu difficile l'élimination de l'excès de l'eau emprisonnée dans les plis ce qui explique les masses trop élevées.

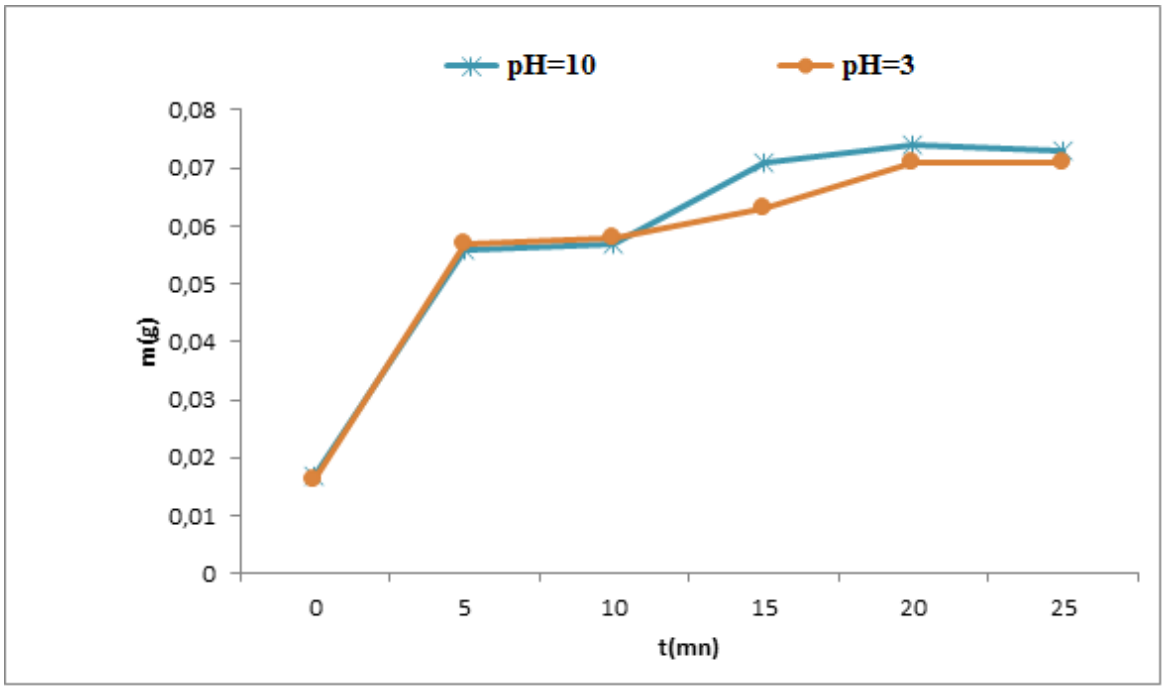


Figure II.13 : Variation du poids des membranes M-P_3G_{25} en fonction du temps d'immersion

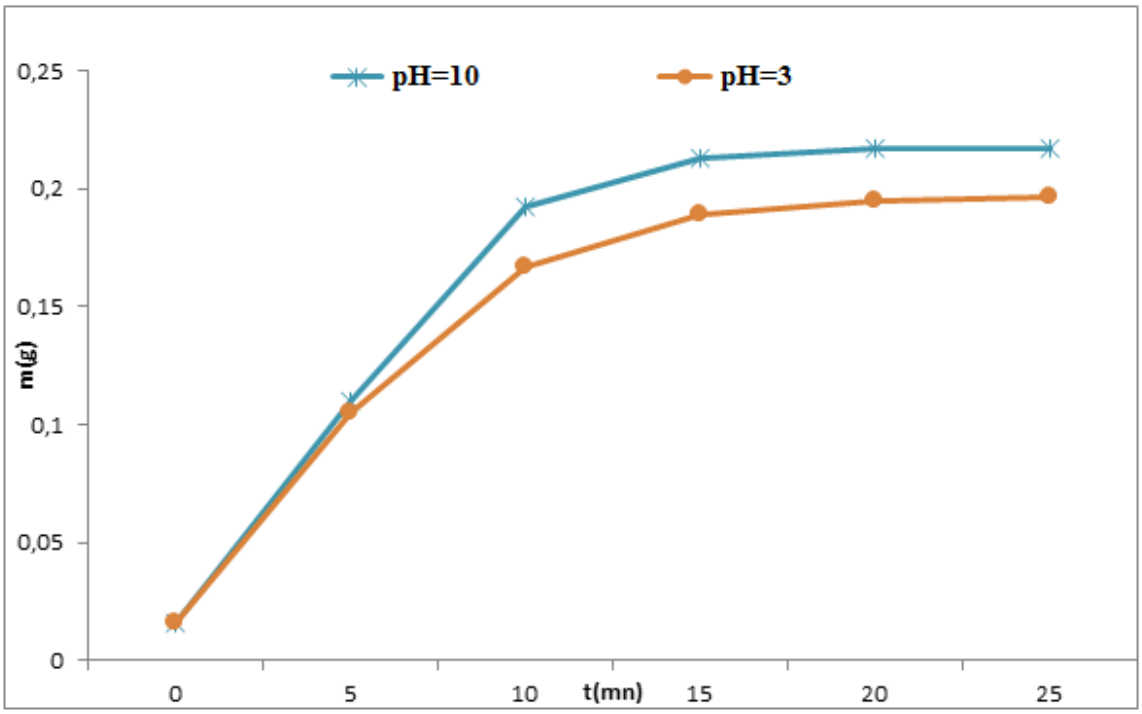


Figure II.14: Variation du poids des membranes M-P_2G_{25} en fonction du temps d'immersion

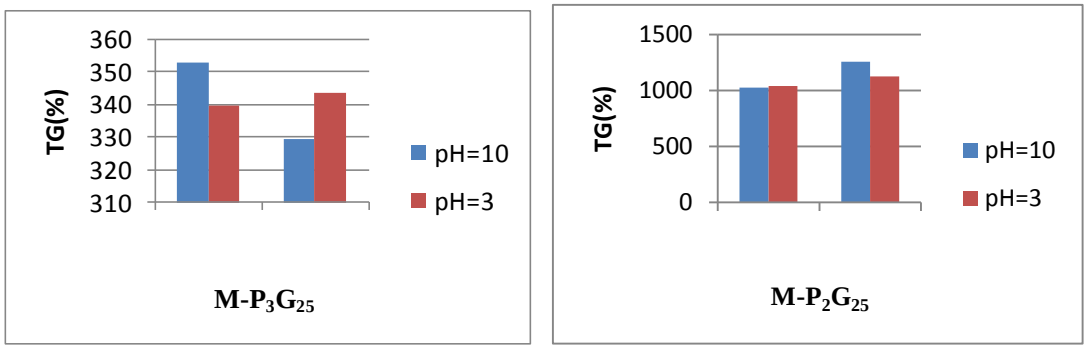


Figure II.15: Taux de gonflement des membranes M-P_3G_{25} et M-P_2G_{25}

D'un autre côté, nous avons remarqué la dégradation des membranes réticulées par le TPP dès le début de l'immersion dans les deux milieux acide et basique. La figure II.16 montre un exemple d'une membrane dégradée.

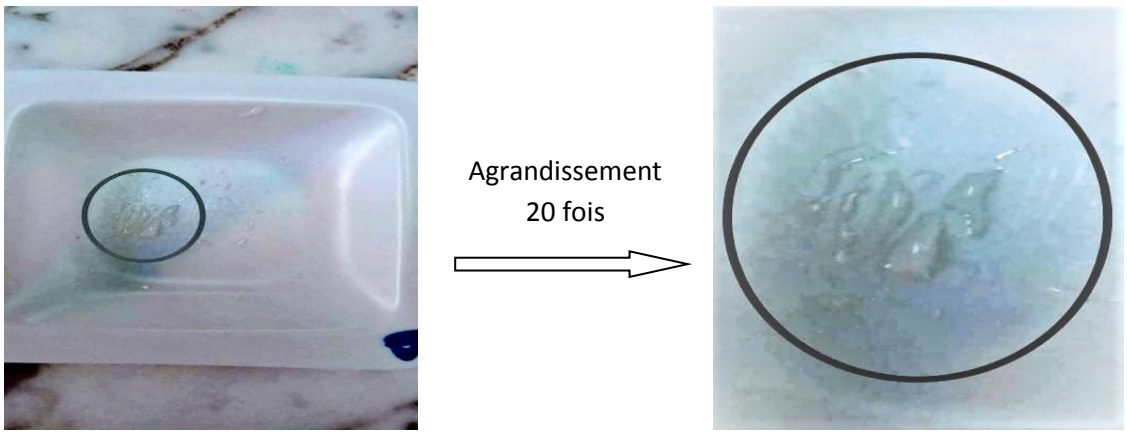


Figure II.16 Dégradation de M-P_3TPP_{25} après immersion

II.4.2.13. Test de perte en poids

A. Mode opératoire

Le test de perte en poids ou le taux de dégradation (TD) nous renseigne sur la dégradation des membranes au cours du contact avec les milieux d'immersion. Pour le déterminer, les membranes obtenues après le test de gonflement sont séchées dans l'étuve à 40°C jusqu'à poids constant. Le TD est calculé en utilisant la formule suivante :

$$TD\ (\%) = \frac{(m_i - m_f)}{m_i} \times 100 \qquad \textbf{(II.6)}$$

Avec :

m_i : masse initiale de la membrane étudiée.

m_f : masse finale de la membrane étudiée sèche (après test de gonflement).

B. Résultats et discussion

Les résultats obtenus sont groupés dans le Tableau II.6

Tableau II .6 : Test de dégradation

Milieu d'immersion	**TD (%)**	
	M-P_2G_{25}	M-P_3G_{25}
Acide (pH = 3)	25	18.75
Basique (pH = 10)	0	23.52

Les résultats du test de dégradation des différentes membranes ont permis de tirer les points suivants :

- Dans le milieu acide, le TD de la membrane M-P_3G_{25} (18.75 %) est légèrement inférieur à celui de la membrane M-P_2G_{25} (25 %).
- Dans le milieu basique, la membrane M-P_2G_{25} montre une bonne stabilité (pas de dégradation, TD=0%) alors que la membrane M-P_3G_{25} a un TD de 23.52 %.

II.5. Application

Dans cette partie, nous nous sommes intéressés à l'utilisation des membranes de pullulane autant que système d'encapsulation. Deux domaines d'utilisation ont été choisis : pharmaceutique et environnementale. L'application pharmaceutique vise l'encapsulation de principes actifs en vue d'une libération prolongée ou ciblée, tandis que l'application environnementale vise la récupération par biosorption des PA. Pour ce faire, nous avons choisi les deux antibiotiques, amoxicilline et pénicilline G, comme principes actifs. Le dosage des deux PA se fait par spectrophotométrie UV-Visible en se basant sur leurs courbes d'étalonnage.

II.5.1. Courbe d'étalonnage

II.5.1.1. Principe de spectrophotométrie UV

Le principe de la spectrométrie d'absorption dans l'ultraviolet repose sur l'absorption du rayonnement par les molécules dans le domaine allant de 190 à 400 nm. Le spectrophotomètre est composé d'une source de lumière et d'une fente qui permet d'isoler

un faisceau quasi monochromatique (pour ne sélectionner qu'une seule longueur d'onde). Dans une cuve, on introduit la solution à tester. Un détecteur placé après la cuve permet de détecter les intensités lumineuses avant et après le passage du faisceau.

Pour des solutions diluées, l'absorbance ou la densité optique est reliée à la concentration de la solution par la relation de Beer - Lamber :

$$DO = \varepsilon \, l \, C \qquad (II.7)$$

Avec :

ε = coefficient d'extinction spécifique.

l = longueur de la cuve.

C = la concentration en solution.

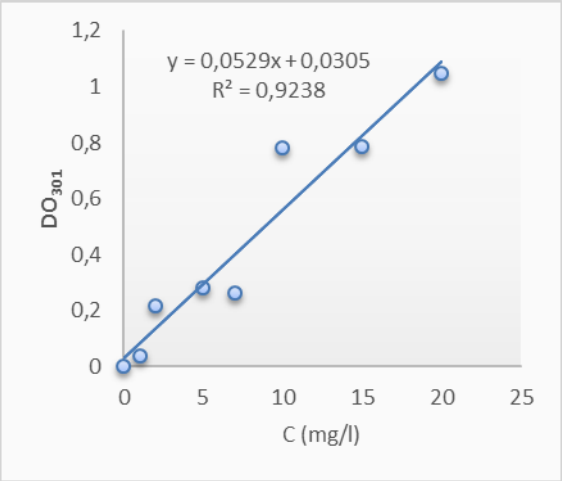
Le dosage par étalonnage repose sur l'utilisation de solutions (appelées solutions étalons) qui contiennent l'espèce chimique à doser en différentes concentrations connues. La concentration de l'espèce chimique influe sur une grandeur physique (par exemple l'absorbance (DO). En effet, il faut utiliser des valeurs qui sont dépendantes de la concentration. On compare ensuite cette grandeur physique de l'échantillon à la même grandeur physique pour une gamme étalon.

II.5.1.2. Mode opératoire

- Préparer des solutions de concentration connues (2 - 20 mg/l) de chacun des PA utilisés (AM et PG).
- Fixer la longueur d'onde maximale du PA (290 nm pour AM et 301 nm pou PG)
- Utiliser le solvant (eau distillée) comme blanc pour tarer le spectrophotomètre
- Mesurer la DO des différentes solutions de chacun des deux PA
- Représenter la DO en fonction de la concentration pour chaque PA
- Déduire l'équation et le coefficient de détermination (R^2) des deux droites obtenues. R^2 est un indicateur qui permet de juger la qualité d'une régression linéaire simple : plus R^2 est proche de 1, et plus la droite représente le maximum de points.

II.5.1.3. Résultats

Les résultats de l'établissement de la courbe d'étalonnage de PG et de AM sont représentés par les figures II.17 et II.18.



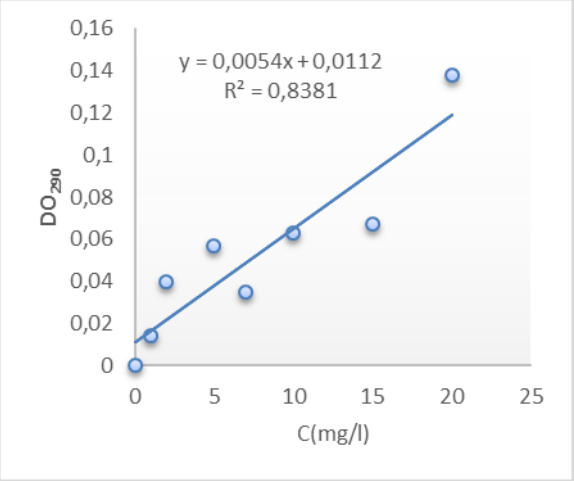


Figure II.17: Courbe d'étalonnage de PG

Figure II.18: Courbe d'étalonnage de l'AM

Les coefficients de détermination des deux courbes sont proches de 1 donc les deux courbes sont retenues pour la suite du travail.

II.5.2. Application pharmaceutique

II.5.2.1. Mode opératoire

En se basant sur les résultats précédents, une série de membranes (M-$P_2G_{15}PA_{0.2}$, M-$P_2G_{20}PA_{0.2}$, M-$P_3G_{25}PA_{0.2}$) de pullulane a été préparée comme décrit précédemment. Le PA (AM ou PG) est solubilisé avec le pullulane avant d'ajouter le glutaraldéhyde. La libération a été effectuée dans deux milieux acide et basique somme suit :

- Préparer les milieux de libération : solution d'acide citrique de pH≈3 et une solution de Na_2HPO_4 de pH≈10.
- Mettre 0.1 g de membrane dans 10 ml de chaque solution.
- Mesurer la DO de chaque solution tous les 0.5 mn à 290 nm pour AM et 301 nm pou PG.
- Déterminer la concentration en AM ou PG via la courbe d'étalonnage

II.5.2.2. Résultats et discussion

La figure II.19 montre un exemple des membranes obtenues. Nous remarquons que la membrane chargée de PG est plus opaque que celle chargée en AM.

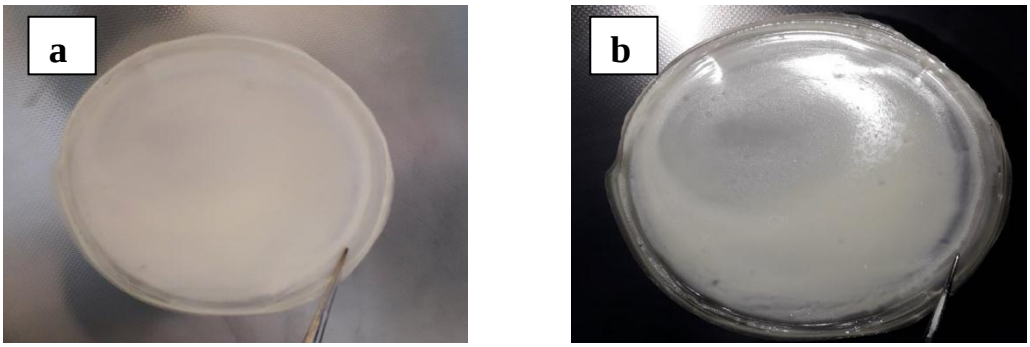


Figure II.19 : Membrane de pullulane chargée de PG (a) et AM (b)

Les résultats de la libération sont représentés par les figures II.19 et II.20 ; La libération dans le milieu basique a montré une diffusion rapide du PA durant la première minute suivie d'un état d'équilibre qui peut être expliqué par la saturation du milieu ou la libération totale du PA. Cependant, la libération dans le milieu acide présente 3 zones :

- Zone 1 (0 à 3.5 mn) : un retard de libération qui peut être expliqué par une affinité élevée des PA vis-à-vis les membranes de pullulane dans le milieu acide.
- Zone 2 (3.5 à 4.5 mn pour AM et 3.5 à 7 mn pour PG): libération rapide du PA
- Zone 3 (>4.5 mn pour AM et >7 mn pour PG) : saturation de la solution ou libération complète du PA.

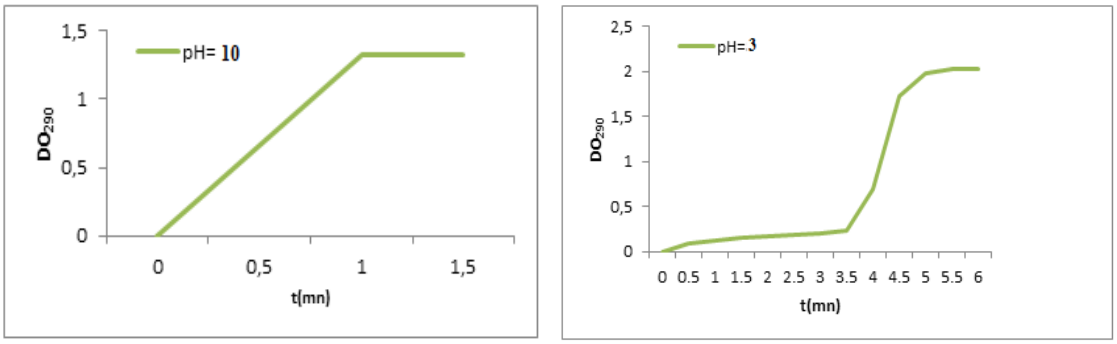


Figure II.20 : Profil de libération de l'AM

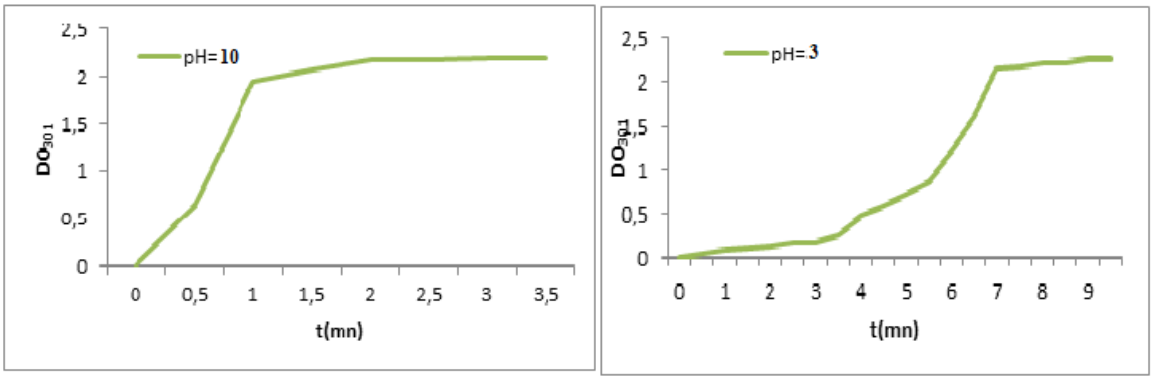


Figure II.21 : Profil de libération de PG

II.5.3. Application environnementale

II.5.3.1. Mode opératoire

Dans ce cas, une série de membranes (M-P_2G_{10}, M-P_2G_{15}, M-P_2G_{20}, M-P_2G_{25} et M-P_3G_{25}) de pullulane a été préparée comme décrit précédemment. La biosorption a été effectuée par immersion des membranes dans les solutions de PA :

- Préparer les solutions de AM et PG 20 mg/l
- Mettre 0.5 g de membrane dans 10 ml de chaque solution
- Mesurer la DO de chaque solution tous les 0.5 mn à 290 nm pour AM et 301 nm pou PG
- Déterminer la concentration résiduelle en AM ou PG via la courbe d'étalonnage

II.5.3.2. Résultats et discussion

Les résultats de la biosorption sont représentés par les figures II.22 et II.23 La biosorption de l'AM a montré :

- Une dégradation des membranes M-P_2G_{25}, M-P_2G_{20} et M-P_2G_{10} après 10, 25 et 35 mn respectivement.
- Une augmentation de la concentration en fonction du temps suite à la solubilisation des membranes dans le milieu. Le pullulane absorbe une quantité de lumière qui va s'additionner à la quantité absorbée par l'AM. Par conséquent, la DO augmente.
- La dégradation des membranes M-P_2G_{15} et M-P_3G_{25} est moins rapide que les autres membranes.

Concernant la biosorption de PG, nous avons remarqué :

- Une absorption rapide de PG durant les cinq premières minutes suivie d'un état d'équilibre. Cet état d'équilibre est perturbé après 20 mn pour M-P_2G_{15} et M-P_2G_{10} suite à leur dégradation dans le milieu.
- La dégradation de M-P_2G_{20} a commencé après 30 mn.
- Les membranes M-P_2G_{25} et M-P_3G_{25} ont donné la meilleure biosorption. Le PG reste emprisonné pour plus de 25 mn après sa biosorption.
- En termes d'efficacité de biosorption, les membranes M-P_2G_{10}, M-P_2G_{25} et M-P_3G_{25} ont montré la meilleure biosorption avec un temps optimal de 10 mn.

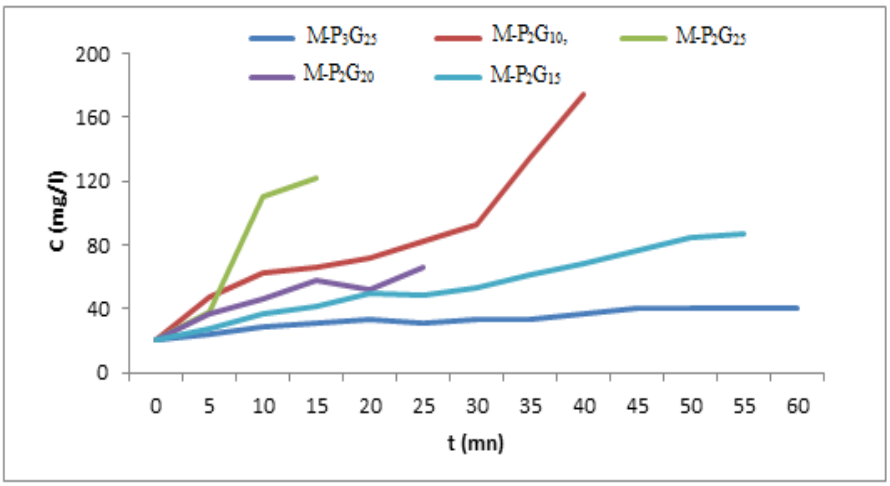


Figure II.22 : Biosorption de l'AM par les différentes membranes

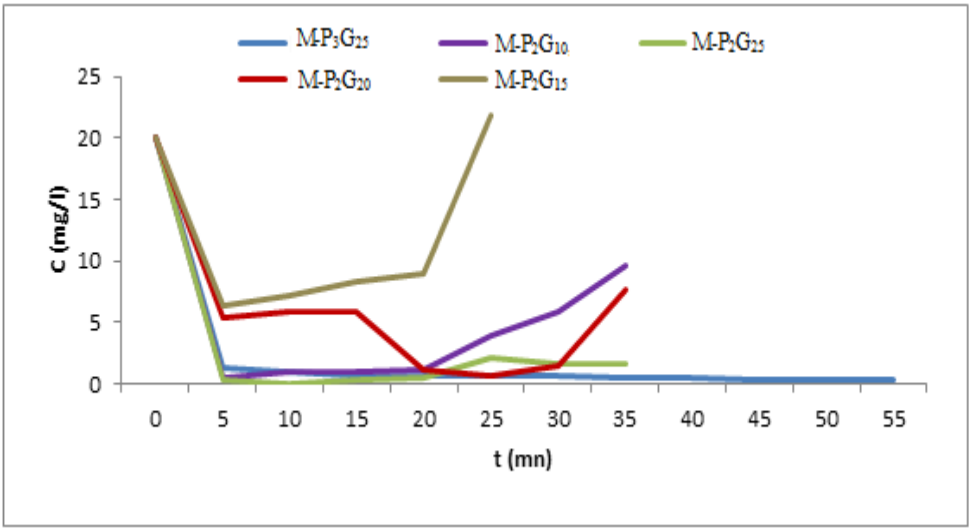


Figure II.23 : Biosorption de PG par les différentes membranes

Conclusion générale

La microencapsulation dans le domaine pharmaceutique est une méthode connue pour protéger les principes actifs du milieu environnant et conférer une libération contrôlée dans les différents milieux biologiques.

Le but de ce travail était l´étude des propriétés physicochimiques et biologiques du pullulane (biopolymère d'origine microbienne) et son application dans le domaine pharmaceutique spécifiquement comme système de libération des principes actifs. Le système de libération était la forme membranaire et les principes actifs choisis étaient deux antibitotiques : Amoxicilline et Pénicilline G.

Pour ce faire, la première partie a été consacrée à la caractérisation physicochimique du pullulane. Les résultats obtenus sont résumés comme suit :

- Le pullulane utilisé a un taux de cendres de 0.15 % ce qui signifie que le P est riche en matière organique,
- Le pullulane a un taux d'humidité inférieur à 10 % permettant une bonne conservation de ce dernier,
- Le poids moléculaire du P est de 52.14 KDa. Ce résultat est inclus dans la marge du poids moléculaire du P donnée dans la littérature (5.10^3 et 2.10^6Da),
- Le P a un pH_{pzc} de 6.7 ce qui indique que à ce pH sa surface a une charge globale nulle.
- L'analyse par FTIR a montré la présence des pics caractéristiques des groupements fonctionnels du P notamment –OH, CH_2, C-O-C.
- La mesure de la tension superficielle a montré que le P ne possède pas des propriétés tensioactives
- L'analyse biologique a montré que le P n'a aucune activité antimicrobiènne sur les souches *Staphylococcus aureus, Escherichia coli et Candida sp*.

La deuxième partie de ce travail a été consacrée à la préparation des systèmes de libérations de PA. Des membranes de P ont été élaborées en utilisant le glutaraldéhyde (G)

et le tripolyphosphate (TTP) comme agents réticulant et l'amoxicilline et la pénicilline G comme PA à encapsuler. La libération des PA a été effectuée dans deux milieux : acide et basique. Les résultats obtenus ont montré que :

- Le taux de gonflement de la membrane M-P_2G_{25} est supérieur à celui de M-P_3G_{25}
- Les membranes réticulées par TTP ont été dégradées complètement.
- La libération de AM et PG dans le milieu basique a montré une diffusion rapide du PA durant la première minute.
- Cependant, la libération dans le milieu acide a montré un retard de libération de 3.5 mn.

Enfin, cette étude nous a permis de tirer les perspectives suivantes :

- Etudier d'autres propriétés physicochimiques de pullulane comme l'activité antioxydante par exemple.
- Fonctionnaliser le pullulane par substitution des groupements hydrophobes et donc leur conférer de nouvelles propriétés.
- Elaborer d'autres formes de systèmes d'encapsulation comme les beads et les hydrogels.

[1] Galiano, F.; Briceño, K.; Marino, T.; Molino, A.; Christensen, K.V.; Figoli, A. Advances in biopolymer-based membrane preparation and applications. J. Membr. Sci. 2018, 564, 562–586.

[2] Honarkar, H.; Barikani, M. Applications of biopolymers I: Chitosan. Monatsh Chem. 2009, 140, 1403–1420.

[3]. A. Ram, Fundamentals of polymer engineering, Ed plenum pression, New York 1997.

[4]. J.P. Mercier, chimie des polymères : synthèse, réaction, dégradation, Ed Lavoisier, paris, 1993.

[5].F. JBILOU, P. DRGRAEVE, I. SEBTI, Synthèses sur les différentes méthodes d'évaluation de la biodégradabilité des polymères à base de ressources renouvelables, Université Claude Bernard Lyon 1, 2014.

[6].S. GAUDIN, Etude de durabilité photo chimique de composites bois-polymères biodégradables, thèse doctorat université Blaise Pascal, le 29 octobre 2008.

[7]. L. AvérousBiodegradablpolymer, 2012.

[8] .O. B. Aimesther, Analyse, extraction et récupération de poly-3- hydroxybutyrate présent dans la biomasse, université de Québec à Montréal, 2008.

[9]. Q.NINA, les bioplastiques, caractéristiques et réglementation, Fiche technique.

[10] .H. Rabetalika, M. Paquot, les polymères issus du végétal : Matériaux à propriété spécifiques pour des applications ciblés en industrie plastique, service, 2008.

[11] N. JARROUX, les biopolymères : différentes familles propriétés et, université d'Evry Val d'Essonne. Le 10 October, 2008.

[12] L. Shen, E. Worrell, M. Patel, Present and future development in plastics from biomass, Biofuels Bioproducts and Biorefining, 4,25-40, 2010.

[13] I. Zembouai, S. Bruzaud, M. Kaci, A. Benhamida, Y-M. Corre, Y. Grohens, Mechanical Recycling of Poly (3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyvalerate)/Polylactide Based Blends J Polym Environ, 22, 449–459, 2014.

[14] Y. M. Corre, S. Bruzaud, J.L. Audic, Y Grohens, Morphology and functional properties of commercial polyhydroxyalkanoates: A comprehensive and comparative study. Polymer Testing , 31,226–235, 2012.

[15] L. Zaidi, M. Kaci, S. Bruzaud, A. Bourmaud, Y. Grohens, Effect of natural weather on the structure and properties of polylactide/Cloisite 30B nanocomposites. Polymer Degradation and Stability, 95, 1751–1758, 2010.

[16]LT. Lim, R. Auras, M. Rubino, Processing technologies for poly (lactic acid).ProgPolymSci, 33,820–852, 2008.

[17] I. Noda, PR. Green, MM. Satkowski, LA. Schechtman, Preparation and propertiesof poly hydroxyl alkanoate copolymers. Bio macromolecules, 6,580–586, 2005.

[18].GQ. Chen, Q. Wu, The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. Biomaterials, 26, 6565–6578, 2005.

[19].J. Lee, S. McCarthy, Biodegradable Poly (lactic acid) Blends with Chemically Modified PolyhydroxyoctanoateThrough Chain Extension. J Polym Environ, 17,240–247, 2009.

[20].Y-M. Corre, S. Bruzaud, J-L Audic, Y. Grohens, Morphology and functional properties ofcommercialpolyhydroxyalkanoates: A comprehensive and comparative study. Polymer Testing, 31,226–2352012.

[21]. https://blogue.cascades.com/2013/08/13/emballages-ecoresponsables-concevoir-mieux-moins.

[22].cheng ,K.C;denirici,A;Catchmark ,j.M,andpuri,V.M.(2010) Modeling of pullulan fermentation by using a color variant strain of Aureobaisidiumpullulans .j food Eng ; 98 (3) ,353 .359.

[23]. Wu,S; chen,J;andPan,S.(2012).optimizatian of fermentation conditions for the productions of pullulan by a new strain of Aureobasidiumpullulans isolated from sea mud and its characterization. Carlohydr . 87(2), 1696-1700.

[24].Cheng,K;C,Denira, A and catchm ark ,J , M, (2011). Pullalan Biosynthesis production and applications .Appl. Microbiol .Biotchnol 92(1) , 29.

[25].Choudhury,A.R.,Saluja,P.,and Prasad ,G.S.(2001).Pullulan production by an osmotolerantAurobasidiumpullulans RBF-4A3 isolated from flowers of caesuliaaxillariscarbohydr ,polym., 83(4) ,1547-1552

[26].Showkat. A. G., Tariq. A. M., Akbar A., and Qing. L.2021. Pullulan: Properties and Applications: In Shakeel Ahmed., SoudararajanAisverya . Pullulan Processing, Properties, and Applications .USA, p.89-113

[27]. Marie-Carole Kouassi. Polysaccharides fonctionnalisés par des composés d'origine naturelle aux propriétés anti oxydantes et antibactériennes. Thèse de doctorat, NormandieUniversité, 2017. France.

[**28**]. J., Catley B. J. Whelan W. Observation on the structure of pullulan. 1971. Archives of biochemistry and biophysics, Vol. 143, pp. 138-142.

[29]. Leathers, L. D. Biotechnological production and applications of pullulan. 2003, Applied Microbiological Biotechnology, Vol. 62, pp. 468-473.

[30]. Ahmed, Enas M. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. 2015, Journal of Advanced research, Vol. 6, pp. 105-121.

[31]. Juan AngelMORENO BALDERRAMA.2 April.2019. PHASE CHANGE MATERIALS ENCAPSULATION IN CROSSLINKED POLYMER-BASED MONOLITHS: Syntheses, characterization and evaluation of pullulan and black liquor based-monoliths for the encapsulation of phase change materials. Thèse de doctorat. ÉCOLE DOCTORALE SPÉCIALITÉ CHIMIE DE POLYMERES. Table 2-10. Main applications of pullulan by type of industrial sector, page 70.

[32]. Mars, G. J. & Scher, H. B. Controlled delivery of crop protecting agents, Wilkens, R.M. (Ed.) Taylor and Francis, London. 1990, 65-90.

[33]. Green, B. K. & Schleicher, L. The National Cash Register Company, Dayton, Ohio. Oil containing microscopic capsules and method of making them. US Patent 2,800,457. 23 July 1957, 11.

[33]. Green, B.K. The National Cash Register Company, Dayton, Ohio. Oil containing microscopic capsules and method of making them. US Patent 2,800,458. 23 July 1957, 7.

[34] Richard J., Benoît J.-P., Microencapsulation, Techniques de l'Ingénieur, Traité génie des procédés, J 2 210, 2000.

[35]J.P.Benoite, S.Briancon , E . Fattal , H . Fessi , P . Legrand , C . Passirani , Sphéroides et forms vectorisées . P . 13 , 23 .

[36] Giraud S., Microencapsulation d'un diisocyanate et d'un phosphate d'ammonium - Application : élaboration d'un système polyuréthane monocomposant à propriété retardatrice de flamme pour l'enduction textile, Thèse, Université Lille 1, 2002, p. 233.

[37] S. Benita: Microencapsulation — Methods and Industrial Applications, Marcel Dekker, New York 1996.

[38] P.B. Deasy: Microencapsulation and Related Processes, Marcel Dekker, New York 1984.

[39] J. Kreuter: Colloidal Drug Delivery Systems, Marcel Dekker, New York 1994.

[40] Alexis, F., Factors affecting the degradation and drug-release mechanism of poly(lactic acid) and poly (lactic acid)-co-(glycolic acid). Polymer International, 2005. 54(1): p. 36-46.

[41] . Szoka, F.C. and M. Tang, Amphotericin B Formulated in Liposomes and Lipid Based Systems: A Review. Journal of Liposome Research, 1993. 3(3): p. 363-375.

[42] Szoka, F.C. and M. Tang, Amphotericin B Formulated in Liposomes and Lipid Based Systems: A Review. Journal of Liposome Research, 1993. 3(3): p. 363-375.

[43]Gutcho, M. M.(Ed). Microcapsules and microencapsulation Techniques, Noyes Data Co., New Jersey, USA. 1976. 13.

[44]Arshady, R. (Ed). Microspheres, microcapsules and liposomes, Citrus Books, London, United Kingdom. 1999.

[45] R. Krumbholz, A. Lamprecht, C.M. Lehr, U. Sch€afer, N. Schirrna, M. Treitz, Microencapsulated unsaturated fatty acids or derivatives with two polymer layers, US Patent 6 234 264 (2001) .

[46] Singh, M.N., K.S.Y. Hemant, M. Ram, and H.G. Shivakumar, Microencapsulation: A promising technique for controlled drug delivery. Research in pharmaceutical sciences, 2010. 5(2): p. 65-77.

[47] Giraud S., Microencapsulation d'un diisocyanate et d'un phosphate d'ammonium - Application : élaboration d'un système polyuréthane monocomposant à propriété retardatrice de flamme pour l'enduction textile, Thèse, Université Lille 1, 2002, p. 233.

[48] M. N. Singh, K. S. Y. Hemant, M. Ram, and H. G. Shivakumar, "Microencapsulation: a promising technique for controlled drug delivery," *Journal of Research in Pharmaceutical Sciences*, vol. 5, no. 2, pp. 65–77, 2010.

[49] J. Mesens, M. E. Rickey, and T. J. Atkins, "Microencapsulated 3-piperidinyl-substituted 1,2-benzisoxazoles 1,2-benzisothiazoles," no.US7118763B2, 2006

[50] V. Babtsov, Y. Shapiro, and E. Kvitnitsky, "Method of microencapsulation," vol. 10, 130, 529, no.US6932984, 2005.

[51] V. Babtsov, Y. Shapiro, and E. Kvitnitsky, "Method of microencapsulation," vol. 10, 130, 529, no.US6932984, 2005.

[52] J. Y. Lee, M. H. Seo, I. J. Choi, J. H. Kim, and C. M. Pai, "Locally administrable, biodegradable and sustained-release pharmaceutical composition for periodontitis and process for preparation thereof," vol. 09/180, 480, no.US006193994B1, 2001.

[53] Y. Y. Yang, H. H. Chia, and T. S. Chung, "Effect of preparation temperature on the characteristics and release profiles of PLGA microspheres containing protein fabricated by double-emulsion solvent extraction/evaporation method," *Journal of Controlled Release*, vol. 69, no. 1, pp. 81–96, 2000.

[54] D. H. Jones, G. H. Farrar, and J. C. S. Clegg, "Method of making microencapsulated DNA for vaccination and gene therapy," vol. 09079400, no.US06270795B1, 2001

[55] M. Ahmad, A. Madni, M. Usman, A. Munir, N. Akhtar, and H. M. Shoaib Khan, "Pharmaceutical micro encapsulation technology for development of controlled release drug delivery systems," *Proceedings of World Academy of Science, Engineering and Technology*, vol. 75, pp. 384–387, 2011.

[56] G. H. Farrar, A. M. Tinsley-Bown, and D. H. Jones, "Encapsulation of bioactive agents," vol. 09/310, 936, no.US6309569, 2003.

[57] P. Caliceti, S. Salmaso, N. Elvassore, and A. Bertucco, "Effective protein release from PEG/PLA nano-particles produced by compressed gas anti-solvent precipitation techniques," *Journal of Controlled Release*, vol. 94, no. 1, pp. 195–205, 2004.

[58] I. Ribeiro Dos Santos, J. Richard, B. Pech, C. Thies, and J. P. Benoit, "Microencapsulation of protein particles within lipids using a novel supercritical fluid process," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 242, no. 1-2, pp. 69–78, 2002.

[59]M. Jelvehgari, J. Barar, H. Valizadeh, and N. Heidari, "Preparation and evaluation of poly (ε-caprolactone) nanoparticles-in-microparticles by W/O/W emulsion method," *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, vol. 13, no. 3, pp. 85–96, 2010.

[60]M. Jelvehgari, J. Barar, H. Valizadeh, B. Delf Loveymi, and M. Ziapour, "Preparation of diclofenac sodium composite microparticles with improved initial release property," *Scientia Iranica*, vol. 17, no. 2, pp. 79–89, 2010.

[61] K. E. Lee, S. H. Cho, H. B. Lee, S. Y. Jeong, and S. H. Yuk, "Microencapsulation of lipid nanoparticles containing lipophilic drug," *Journal of Microencapsulation*, vol. 20, no. 4, pp. 489–496, 2003.

[62] HASSINA et ZINEB.2016.Formulation d'une crème 100% bio a base du chitosane[enligne].université de Blida1.Page38.[consulté le 7/4/2021].<http://di.univblida.dz:8080/jspui/handle/123456789/4894>

[63] . Sposito, Garrison (1998). "Sur les points de charge zéro". Sciences et technologies de l'environnement. 32(19) : 2815-2819.

[64].Définition du terme de point de charge zéro.[consulte le 13⁄07⁄2021].<https://en.wikipedia.org/wiki/Point_of_zero_charge>

[65] . Bianca B. Dagatan, Joel H. Jorolan, Characterization of chitosan as chromium adsorbent, Journal of Scientific Research and Development 3 (5): 229-235, 2016

[66] BRUKER.*Guide de la spectroscopie infrarouge[en ligne].[*consulté le 6/5/2021].< https://www.bruker.com/fr/products-and-solutions/infrared-and-raman/ft-ir-routine-spectrometer/what-is-ft-ir-spectroscopy.html>

[67]Abdelmounaim Safer.*Introduction a la chimie de surfaces[en ligne]*.[consulté le 8/5/2021].< https://www.univ-usto.dz/images/coursenligne/cs_sam.pdf >

[68] Jong Shik Kim1*, In Kyoung Lee2, Bong Sik Yun, A Novel Biosurfactant Produced by Aureobasidium pullulans L3-GPY from a Tiger Lily Wild Flower, Lilium lancifolium Thunb. PLOS ONE | DOI:10.1371/journal.pone.0122917 April 7, 2015.

[69] RACHIDE MEGHABER.2019. MASSES MOLECULAIRES MOYENNES DES POLYMERES[en ligne].univ-oran1.[consulté le 10/5/2021].< https://elearn.univ-oran1.dz/pluginfile.php/56212/course/overviewfiles/Masses%20molaires%20moyennes%20des%20polym%C3%A8res.pdf?forcedownload=1 >

[70] Wolf, B. A. (2007). Polyelectrolytes revisited: Reliable determination of intrinsic viscosities. Macromolecular Rapid Communications, 28, 164-170.

[71] Nishinari, K., Kohyama, K., Williams, P. A., Phillips, G. O., Burchard, W., & Oginoli, K.(1991). Solution properties of pullulan. Macromolecules, 24, 5590-5593.

[72]Kato, T., Katsuki, T., & Takahashi, A. (1984). Static and dynamic solution properties of pullulan in a dilute solution. Macromolecules, 17, 1726-1730

[73]Huggins interaction parameter. Macromolecular Chemistry and Physics, 212, 1932-1940.

[74]A. PHILIPPON. Cours de Bactériologie Générale : ANTIBIOTIQUES IV : ETUDES IN VITRO, L'ANTIBIOGRAMME [en ligne].[consulté le 5/5/2021].<http://www.microbes-edu.org/etudiant/antibio4.html >.

[75] benchaita Hadjer.2014. Etude de l'activité biologique des extraits polysaccharidiques issus l'Astragalus gombo récoltée au Sahara septentrional Est algérien[en ligne].université kasdi merbah Ourgla.Page41.[consulté le le 7/4/2021].

[76] Meriem KEDDOU Elaboration, caractérisation et application de membranes polymeres a base de chitosane. Mémoire Magister, boumerdes 2008.