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 Macromoléculaire

Par :

Boukhari Fatma

Belkhir Sabah

Préparation et caractérisation de quelques systèmes encapsulés

Soutenue publiquement le : 22/06/2020, Devant le jury composé de :

Mme. Mimi. N	MCB	UYFM	présidente
Mr. Bitam. S	MCB	UYFM	Examinateur
Mme. BOUCHERITE. N	MCA	UYFM	Encadreur

Année universitaire2019/2020

Remerciements

En premier lieu, nous tenons à remercier DIEU le tout Puissant de nous avoir donné la force et le courage de mener à bien ce modeste travail.

Ce travail ne saurait être aussi riche et n'aurait pas vu le jour sans l'aide et l'encadrement de MmeBoucherit Nabila, nous la remercions beaucoup pour tous ses commentaires et encouragements, son support infini et d'avoir nous donnéde son temps pour la réussite de notre travail.

Nous tenons à exprimer nos vifs remerciements aux membres du jury : Mme MIMI.N et Mr BITAM.S, qui ont pris le temps et le soin pour l'évaluation de ce travail.

Ce travail, réalisé, au niveau du laboratoire pédagogique de la faculté des Sciences de l'Université Yahia Fares de Médéa, où nous exprimons nos remerciements aux personnels membres pour leur aide infini.

Dédicaces

Avec tous mes sentiments, je dédie cet humble travail à:

Chers parents

Ma très chère maman et mon très cher père,

tous mes frères et sœurs, leurs maris et leurs enfants

Toute ma famille et mes proches

Ma chère binôme Sabah

Tous mes enseignants et mon amie spécialité chimie macromoléculaire et pharmaceutique

Tous mes amis qui j'aime en Dieu,

Tous ceux qui les aiment et tous ceux qui ont un statut spécial

Mon cœur.

Fatma

Dédicaces

*Merci Allah qui donne la capacité d'écrire et de réfléchir***.**

Avec toute modestie, je dédie ce travail : A mes parents les deux les plus chères à mon cœur.

**je le dédie à mes sœurs : Karima, Nadjia, Hanane, Samia*

**mon frère : Khaled*

**je le dédie particulièrement à mon binôme Fatma.*

**A mes très chères amies : Khadidja, Ghaida, Merieme, Ghazel, Saida, Sarah, Asma, toutes les coulages*

**je le dédie spécialement : S .M.*

** A tous mes enseignants et mes amis spécialité chimie macromoléculaire et pharmaceutique. À tous ceux qui sont proche de mon cœur et dont je n'ai pas cité le nom.*

Sabah

RESUME

Résumé

L'objectif de ce travail était de préparer et de caractériser les microsphères d'alginate chargé d'un principe actif en utilisant la méthode d'émulsification/gélification interne

.

Eneffet,etàcausedel'épidémieduCoronavirus,cetobjectifaétéchangéd'unepartversuneétudeth éorique approfondie détaillant la méthode d'émulsification/gélification interne. D'autre part, le traitement d'un travail de recherche visant à encapsuler l'insuline dans des microsphères d'alginate a été mis enévidence.

Les résultats obtenus ont montré que la méthode conçue est primordiale pour atteindre les caractéristiques de celles-ci, telles que les propriétés physico-chimiques et biopharmaceutiques.

Parconséquent,l'influencedesparamètresdontdépendlaformulationtelsque:laconcentrationd'é mulsifiant, la vitesse d'agitation et la proportion de la phase aqueuse et ceux dont dépend le procédé à savoir : la concentration d'alginate, le rapport massique Calcium/Alginate et le rapport molaire Acide/Calcium, sur la distribution des tailles des microsphères, l'efficacité d'encapsulation et la libération d'insuline a étéévaluée.

Mots clés : Alginate, Emulsification, Gélification interne, Matière active, Micro encapsulation,Microsphère

Abstract

The aim of this work was to prepare and characterize the alginate microspheres charged with an active ingredient using the emulsification / internal gelation method.

Indeed, and because of the epidemic of the Corona virus, this objective was changed on the one hand towards an in-depth theoretical study detailing the emulsification / internal gelation method. On the other hand, the treatment of a research work aimed at encapsulating insulin in alginate microspheres was highlighted.

The obtained results have shown that the method designed is essential to achieve the Characteristics of these, such as physico-chemicals and biopharmaceuticals properties.

Consequently, the influence of the parameters on which the formulation depends such as: the emulsifier concentration, the stirring speed and the proportion of the aqueous phase and those on which the process depends, namely: the alginate concentration, the Calcium / Alginate mass ratio and the Acid / Calcium molar ratio, on the size distribution of the microspheres, the encapsulation efficiency and the insulin release was evaluated.

Key words: Alginate, emulsification, Internal gelation, Active ingredient, Microencapsulation, Microsphere

ملخص

الهدف من هذا العمل كان إعداد و دراسة خصائص الجسيمات الدقيقة للالجينات المملوءة بمادة فعالة باستخدام طريقة الاستحلاب /الهلامية الداخلية .

في الواقع وبسبب وباء وفيروس كورونا تم تغيير هذا الهدف من ناحية إلى دراسة نظرية معمقة توضح بالتفصيل الطريقة المستهدفة ومن ناحية أخرى قمنا بدراسة ومعالجة بحث تجريبي يهدف إلى تغليف الأنسولين في كريات الالجينات المجهرية الدقيقة .

أظهرت النتائج التى تم الحصول عليها إن الطريقة المتبعة ضرورية لتحقيق خصائص هذه الجسيمات مثل الخصائص الفزيو-كيميائية والبيوصيدلية .

وبالتالي فانه تم دراسة تأثير العوامل التي تعتمد عليها التركيبة مثل تركيز المستحلبات سرعة التحريك ونسبة الجزء المائي والعوامل التي تعتمد عليه العملية وهي تركيز الالجينات النسبة الكتلية الكالسيوم/الالجينات النسبة المولية الحمض /الكالسيوم على توزيع حجم الكريات الدقيقة وكفاءة التغليف وإفراز الأنسولين.

الكلمات الجوهرية آلجينات استحلاب، الهلام الداخلي المادة الفعالة تغليف مجهري كريات مجهري.

SOMMAIRE

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction Générale

Chapitre I :La micro encapsulation

I.1.Introduction	**03**
I.2.Généralité	**03**
I.2.1. Définition	**03**
I.2.2. Objectifs et domaines d'application	**04**
a. L'immobilisation	**04**
b. La protection et la stabilisation	**04**
c. Le contrôle, le déclenchement et le ciblage de la libération d'un composant	**03**
I.3. Caractérisation des microparticules	**04**
I .3.1. Classification	**04**
I.3.2.composition	**07**
I.3.3. Caractérisation	**08**
a. Taille	**08**
b. Structure interne et externe	**08**
c. Quantification de l'actif encapsulé	**09**
d. Cinétique de libération	**10**
I.4. Procèdes de micro encapsulation	**10**
I.4.1. Procédés physico-chimiques	**11**
I.4.2. Procédés chimiques	**11**
I.4.3. Procédés mécaniques	**11**

a. Procédé de nébulisation/séchage	**12**
b. Gélification ou Congélation de gouttes	**12**
c. Extrusion	**13**
I.5. Libération modifiée	**14**
I.5.1. Concept de la libération modifiée	**14**
I.5.2. Mécanisme de la libération modifiée d'une substance active	**14**
I.5.3. Modèles théoriques de la libération modifiée	**15**
a. Diffusion de Fick	**15**
b.Modèles de diffusion non Fickiens	**16**
I.5.4. Paramètres influencent la libération modifiée	**17**

Chapitre II : les bi polymères

II.1. Introduction	**19**
II.2. Définition	**19**
II.3. Différentes familles de biopolymères	**19**
II.3.1. Les polysaccharides	**20**
a. La cellulose	**20**
b. Le chitosane	**21**
c. L'alginate	**23**
II.3.2. Les protéines	**27**
II.3.3. Les bio polymères d'origine microbienne	**27**
II.3.4. Les bio polymères synthétiques	**27**
II.4. Propriétés des bio polymères	**28**
II.4.1. La biodégradabilité	**28**
II.4.2. Biocompatibilités	**29**
II.4.3. Propriétés chimiques	**29**
II.5. Applications des bio polymères	**29**

II.5.1. Applications médicales	**29**
II.5.2. Applications agricoles	**29**
II.5.3.Applications d'emballage	**30**

Chapitre III : Application de l'émulsification/gélification interne

III.1. Introduction	**31**
III.2. Problématique de la recherche	**31**
III.3. Applications del'émulsification/gélification interne	**33**
III.3.1. Principe de la formulation	**33**
a. Préparation de l'émulsion	**33**
b. Préparation des microsphères	**33**
III.3.2. Matières encapsulées	**34**
a. Molécules et micro-organismes biologiques	**34**
b. Principes thérapeutiques	**35**
III.4. Récapitulation du travail de recherche sur l'insuline	**36**
III.4.1. Méthodes expérimentales et techniques de caractérisation	**36**
a. Protocole expérimental d'émulsification-gélification interne	**36**
b. Caractérisation morphologique et granulométrique	**37**
c. Quantification de l'insuline encapsulée	**37**
d. Cinétique de libération de l'insuline	**37**
III.4.2.Résultats	**38**
a.Caractérisation morphologique et granulométrique	**38**
b.Quantification de l'insuline encapsulée	**41**
c.Etude de la libération d'insuline	**41**
III.4.3. Discussions	**43**
a. Optimisation de la formulation	**43**
b. Libération de l'insuline	**44**

Chapitre IV : Partie expérimentale

IV.1. Introduction	**46**
IV.2. Matières premières	**46**
IV.2.1. Principe actif	**46**
IV.2.2. Excipients	**47**
a. Huile d'olive	**47**
b. Alginate de sodium	**47**
c. Chitosane	**47**
d. Span 80	**48**
e. Autres réactifs	**49**
IV.2.3. Matériel	**49**
IV.3. Méthodes expérimentales et techniques de caractérisation	**50**
IV.3.1. Caractérisations spectrales des matières premières	**50**
a. Caractérisation par UV-Vis du PA	**50**
b. Caractérisation par FTIR	**51**
IV.3.2. Préparation des microparticules	**52**
a. Préparation des solutions tampon	**52**
b. Principe du procédé d'émulsifcation	**52**
c. Etapes de préparation des microsphères	**52**
IV.3.3. Caractérisation des microsphères	**54**
a. Analyse par microscopie optique	**54**
b. Analyse granulométrique des particules	**54**
c. Etude du gonflement des particules	**54**
d. Quantification du PA encapsulé	**55**
e. Etude de la cinétique de libération du PA encapsulé	**55**
f. Analyse par FTIR	**56**
IV.4. Présentation de quelques résultats obtenus	**56**
IV.4.1. Formulation des émulsions eau/huile	**56**
IV.4.2. Microsphères obtenues	**57**

Conclusion générale	**59**
Références bibliographiques	

LISTE FIGURES

Liste des figures

Chapitre I :la micro encapsulation

Figure	Page
Figure I.1. Type des microparticules(a)microsphère et (b) microcapsule	**06**
Figure I.2. Types de nanoparticules	**06**
Figure I.3. Structure d'un liposome	**07**
Figure I.4. Morphologies des microcapsules (a) et des microsphères (b) par MEB	**09**
Figure I.5. Mode d'émulsifcation/gélification interne	**13**
Figure I.6. Mode d'émulsif cation/gélification externe	**13**
Figure I.7. Profils de libération obtenus à partir de microparticules.	**15**
Figure. I.8. Profils des cinétiques de libération de PA.	**17**

Chapitre II :les bio polymères

Figure II.1. Les différentes familles de biopolymères	20
Figure II.2.: Structure moléculaire de la cellulose	**21**
Figure II.3:Structure chimique du chitosane	**22**
Figure II.4. Monomères de l'acide D-man uronique (M) : (A) et l'acide L-guluronique (G),	**23**
Figure II.5. Structure de l'alginate de sodium de formule $(C6H7Na1/2O6)_n$	**23**
Figure II.6. Schéma simplifié de la paroi des algues brunes	**24**
Figure II.7. Rétention du calcium par un réseau tridimensionnel de segments poly-M ou poly-G définissant une structure de type "cage	**25**
Figure II.8. Procédé de gélification de gouttes d'alginate et structure atomique d'unebille d'alginate	**26**
Figure II.9. Structure chimique de : PHA : (A), PHB : (B) et PHV : (C)	**27**

Liste des figures

Chapitre III :*Application de l'émulsification/gélification interne*

Figure III.1. Mécanisme de la gélification de l'alginate	**32**
Figure III.2. Morphologie des particules obtenues de la gélification externe : (a) et de la gélification interne (b)	**32**
Figure III.3. Etapes de l'émulsification/gélification interne	**34**
Figure III.4. Distribution de la taille des microsphères aux différentes vitesses d'agitation	**40**
Figure III.5. Microphotographie optique de microsphères d'alginate chargées d'insuline (a) et de blanc (b) (grossissement 200 ×) préparées en utilisant les	**40**
Figure III.6. Vue par MEB de la Morphologie et la taille des microsphères d'alginate chargées d'insuline préparée en utilisant les conditions	**41**
Figure III.7. Profil de libération in vitro d'insuline à partir des microsphères (préparées aux conditions standards) dans les liquides gastro-intestinaux.	**42**

Chapitre IV :partie expérimental

Figure IV.1. Vue microscopique de l'émulsion E/Hà 30% de phase aqueuse	**56**
Figure IV.2. Vue microscopique de l'émulsion E/H à 40% de phase aqueuse	**57**
Figure IV.3. Aspect des microparticules obtenues pour l'essai N°1	**58**
Figure IV.4. Aspect des microparticules obtenues pour l'essai N°2.	**58**

LISTE TABLEAUX

Liste des tableaux

Chapitre I	
Tableau I.1. Applications de la micro encapsulation dans l'industrie	**05**
Tableau I.2 : Principaux procédés de micro encapsulation,	**11**
Chapitre II	
Tableau II.1:Quelques propriétés et applications du chitosane	**22**
Tableau II.2. Principales applications des alginates	**26**
Chapitre III	
Tableau III.1. Représentation de quelques travaux de recherche sur l'émulsification-gélification interne	**35**
Tableau III.2. Variables et niveaux étudiés pour l'encapsulation de l'insuline	**36**
Tableau III.3. Effet des paramètres étudiés sur le taux et l'efficacité d'encapsulation	**39**
Chapitre IV	
Tableau IV.1. Matières premières utilisées.	**46**
Tableau IV.2. Caractéristiques physico-chimiques des huiles d'olives	**47**
Tableau IV.3. Caractéristiques physico-chimiques de l'alginate de sodium (Sigma-Aldrich).	**48**

Liste des tableaux

Tableau IV.4. Caractéristiques physico-chimiques du chitosane utilisé (Sigma-Aldrich)	**48**
Tableau IV.5. Caractéristiques du tensioactif utilisé (Sigma-Aldrich)	**49**
Tableau IV.6. Propriétés physico-chimiques des réactifs utilisés.	**49**
Tableau IV.7. Matérielutilisé.	**50**

ABREVIATIONS ET NOMENCLATUERE

Abréviations et nomenclature

Abréviation	*Signification*	*Unité*
C_t	Concentration massique du principe actif libéré au temps t	g/l
C_∞	Concentration massique du principe actif libéré à la saturation	g/l
CMC	Carboxy Methyl Cellulose	-------
DRX	Diffractomètre à rayon X	-------
DO	Densité optique	-------
EE	Efficacité d'encapsulation	(%)
FTIR	Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier	-------
HPLC	Chromatographie liquide à haute performance	-------
k_0 et k_1	Constantes cinétiques	s^{-1}
k_H	Constante cinétique d'Huguchi	-------
MEB	Microscope électronique à balayage	-------
m_i	Masse initiale	G
m_g	Masse des capsules à l'état gonflé	G
PA	Principe actif	-------
pH	Potentiel d'hydrogène	-------
RE	Rendement d'encapsulation	(%)
TE	Taux d'encapsulation	(%)

TF	Taux de gonflement	(%)
SAB	Sérum albumine bovin	-------
UV-Vis	Ultra Violet –Visible	-------

Symboles grecs

Symbole	***Signification***	***Unité***
β	facteur de sigmoicité	-----
λ	Longueur d'onde	Nm
λ_{max}	Longueur d'onde correspondante à l'absorption maximale	Nm

INTRODUCTION GÉNÉRALE

La micro encapsulation est un procédé par lequel il est possible de produire des microparticules individualisées et constituées d'un matériaurenfermantunematière active à raison de 5à 90% en masse. Le but de l'encapsulation est multiple : elle permet d'immobiliser le principe actif, de le protéger du milieu extérieur, de masquer l'odeur ou bien encore permettre de contrôler de déclencher et /ou de cibler sa libération [1].

Cependant, les procédés classiques de la micro encapsulation des matières bioactives que soient mécaniques, physiques ou chimiques présentent un certain nombre d'inconvénients tels que :la dégradation de ces molécules par effet de la température, de l'agitation mécanique ainsi que par l'effet des solvants organiques [2].

Dans ce contexte, l'encapsulation par la technique d'émulsification/gélification interne a suscité l'intérêt de plusieurs chercheurs en tant que technologie en évolution continue qui non seulement a permis la mise en formulation de nouveaux systèmes de délivrance des médicaments mais aussi aux révolution de l'ingénierie vis-à-vis la thérapie et le diagnostic de nombreuses maladies.

Parmi les avantages que présente cette technique est l'utilisation des biolopolymères biodégradables de nature polysaccharidiques où l'alginate de sodium est le plus utilisé. Ce biopolymère peut être facilement réticulé en matière solide par addition de cations divalents. Vue ces caractéristiques, l'alginate a était très impliqué dans l'encapsulation des protéines, des virus, des hormones, des cellules et de l'ADN plasmique [3].

Dans ce manuscrit, où l'objectif de notre travail a été réorienté (à cause de l'épidémie du Corona Virus) de la préparation et la caractérisation des systèmes micro-particulaires chargés d'un principe actif vers une synthèse bibliographique 'articulant dans le même thème ciblé, nous nous intéressons à mettre en évidence les principaux travaux de recherche visant à encapsuler les matières actives en utilisant la méthode d'émulsification/gélification interne.

Pour ce faire, l'ensemble de notre manuscrit est structuré en quatre chapitres :

Le premier chapitre, consiste à donner, un aperçu sur les notions et les principes théoriques de la micro-encapsulation où les principales méthodes seront détaillées.

Dans le deuxième chapitre, les notions de base, la classification et les applications des biopolymères en particulier l'alginate et le chitosane, seront présentées.

En ce qui concerne le troisième chapitre, nous allons éclaircir d'une manière simple et dirigée, d'une part la méthode de préparation des systèmes micro-sphériques ayant une taille inférieure à 100 µm, il s'agit du procédé : émulsification/gélification interne et d'autre part, une présentation suivie d'une analyse d'un travail de recherche sera mise au point. Celle-ci concerne l'application de la méthode ciblée sur l'encapsulation d'une molécule bioactive à effet thérapeutique, où l'insuline a été choisie comme molécule d'intérêt.

Une partie expérimentale sera réservée dans le quatrième chapitre, à la présentation des propriétés des matières premières, du matériel et des techniques prévues être utilisées en particulier le mode opératoire d'émulsification/gélification interne de l'alginate suivie de l'enrobage au chitosane.

En fin, le manuscrit s'achève par une conclusion générale et les perspectives qui peuvent être envisagées à venir.

CHAPITRE I :

LA MICROENCAPSULATION

I.1. Introduction

Depuis plusieurs décennies la micro encapsulation a concerné les travaux de recherches de domaines vairés, et ceci afin de protéger voire de préserver toutes les propriétés d'une substance active.

Actuellement, de nouveaux procédés se développent en continu, et ceci en fonction des propriétés physiques et chimiques de la matière active, des matériaux d'encapsulation etde l'objectif de l'opération de vectorisation.

Dans le domaine de vectorisation des principes médicamenteux, l'activité immense et le succès clinique des micro-thérapeutiques sont dû au développement de la micro technologie qui s'intéresse à la production des microparticules afin de maintenir des concentrations sériques efficaces d'un point de vue pharmacologique et ce pour une période de temps prolongée.

I.2. Généralités

I.2.1. Définitions

L'encapsulation est l'ensemble des technologies, qui consistent à produire les particules voire des microparticules individualisées constituées d'une matière active contenue dans une autre inactive afin d'améliorer les propriétés de conservation, de présentation et de biodisponibilité [1]. Elles renferment typiquement une teneur entre 5 et 90% (en masse) en substance active comprise.

-*Les substances encapsulées :* peuvent se présenter sous la forme de fines particules de solide divisé, d'un liquide ou encore d'un composé gazeux [2]. Elles sont d'origines très variées : principes actifs pharmaceutiques, actifs cosmétiques, additifs alimentaires, produits phytosanitaires, essences parfumées, micro-organismes, cellules, ou encore des enzymes et des hormones.

a.*Les matériaux inactifs* : sont nombreux et variés, ils peuvent être de nature hydrophile, hydrophobe ou une combinaison des deux, ils doivent être capables de former un film ou un réseau stable et compatible avec la molécule à encapsuler [2].

I.2.2. Objectifs et domines d'application

L'objectif de l'encapsulation est multiple, il concerne :

a. ***L'immobilisation*** **:** appliquée en biotechnologie pour l'immobilisation des enzymes, cellules bactériennes et les hormones. Elle est utilisée en vue de limiter le contactentre l'actif et l'environnement tout en maintenant une activité optimale.

b. ***La protection et la stabilisation :*** de nombreux composés actifs sont fragiles sous certaines contraintes physiques, chimiques et biologiques : tels que les vitamines et les hormones par exemple, l'encapsulation de ces substances permet de les protéger contre la dénaturation s'ils sont exposés à ces contraintes.

c. ***Le contrôle, le déclenchement et le ciblage de la libération d'un composant :*** le but de l'encapsulation ne consiste pas seulement à isoler indéfiniment un composé, dans la majorité des cas, un profil ou processus de libération bien spécifique est recherché [2].

Ainsi, la vectorisation par les systèmes encapsulés permet de cibler l'action des matières actives, qui se traduit d'une part, par l'amélioration de la pénétration cutanée et le masquage du gout de certains actifs libérés dans le système digestif comme l'huile de l'ail et l'ibuprofène. Cependant, à la fin des années 1950, elle apparait la première application industrielle de la micro encapsulation de certains principes analgésiques à libération contrôlée. Puis les recherches dans le domaine de l'encapsulation se sont intensifiées vers de nombreux domaines (dont le tableau I.1 résume les principaux domaines industriels),afin de développer de nouvelles technologies d'encapsulation concernant de nouveaux composés et de proposer de nouveaux matériaux enveloppants, comme par exemple des polymères biocompatibles pour le domaine médical [3].

I.3. Caractérisation des microparticules

I .3.1. Classification

Selon les dimensions et la microstructure interne des systèmes d'encapsulation, ces derniers se devisent en trois groupes : les microparticules, les nanoparticules et les liposomes (figure I.1).

a. ***Les microparticules*** : deux types de microparticules sont observées en fonction de leurs morphologies. Les microsphères, sont des structures matricielles, de forme sphérique, constituées d'un réseau polymérique dans lequel se trouve dissout ou dispersé la substance active [4].

Les microcapsules : dites structure réservoirs, sont constituées d'un cœur d'agent(s) actif(s)entouré (s) d'une mince paroi (ou membrane) de nature polymérique dont l'épaisseur n'excède pas quelques nanomètres. [1]

Tableau I.1. Applications de la micro encapsulation dans l'industrie [3].

Domaine industriel	Exemple de composés encapsulés
Pharmacie et médical	Principes actifs, antibiotiques, contraceptifs, enzymes, vaccins, …
Cosmétique	Parfums, huiles essentielles, anti transpirants, agent bronzants, crèmes solaires, colorants, ...
Alimentaire	Huiles essentielles, graisse, épices, aromes, vitamines, minéraux, enzymes, levures, …
Agriculture	Herbicides, insecticides, engrais, répulsifs, hormones végétales,…
Biotechnologie	Enzymes, microorganismes, cellules, cultures tissulaires, composés nutritionnels,...
Détergents	Adoucissants, agents décolorants, agents moussants, …
Textile	Colorants, pigments, …
Photographie	Pigments, colorants, composés photo-polymérisables, révélateurs pour photographies couleurs, plastifiants,...
Electronique	Cristaux liquides,matériaux semi-conducteurs, adhésifs, agents de séchage, retardateurs de flammes, ...

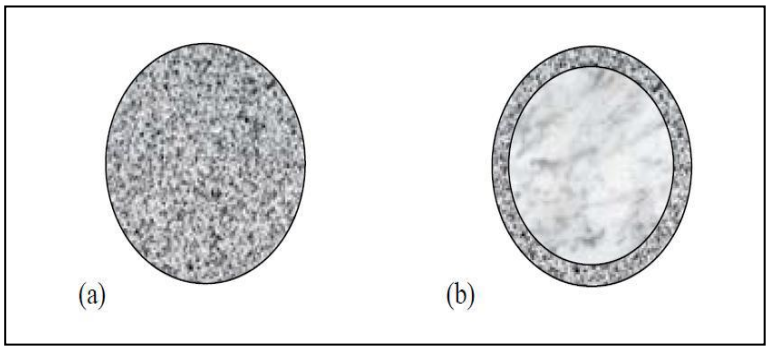


Figure I.1. Type de microparticule : (a)microsphère et (b) microcapsule [4]

***b. Les nanoparticules* :** les nanoparticules sont des systèmes colloïdaux à base de polymères, dont la taille est comprise entre 10 nm à1000 nm. Le principe actif est absorbé à la surface des nanoparticules. Les différent structures des nanoparticules sont présentent sur la figure I.2

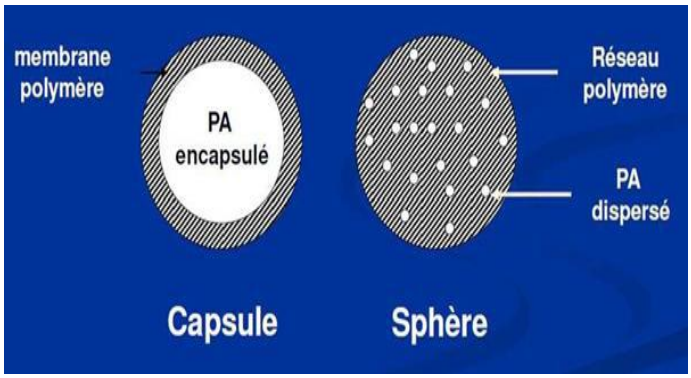


Figure I.2. Types de nanoparticules [4]

c. Les liposomes : ce sont de petites vésicules sphériques (de quelques dizaines à quelques milliers de nm de diamètre) dont la paroi est constituée par une ou plusieurs bicouches phospholipidiques délimitant la cavité centrale qui contient la matière active (figure I .3).

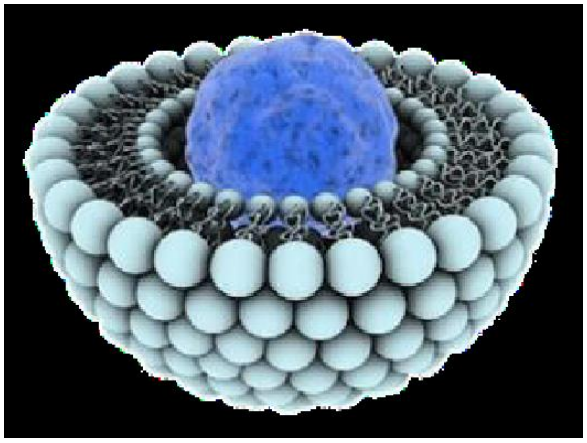


Figure I.3. Structure d'un liposome [4]

I.3.2. Composition [5-8]

Les particules obtenues par encapsulation sont constituées principalement d'une matière active (à encapsuler) et d'un matériau dans lequel cette matière est chargée, d'autres constituants peuvent êtres ainsi additionnés afin d'améliorer les propriétés du système et/ou de lui apporter certaines fonctionnalités.

a. Molécules à encapsuler : sont d'origine très variée, vue l'encapsulation intervient dans quasi-totalité des domaines tant de recherche qu'industriel. Selon l'objectif de l'utilisation, la nature de l'actif(s) et le type de la particule, les ingrédients qui peuvent être isolés et immobiliser sont résumés dans le tableau I.1.

b. *Les matériaux enrobant :* ils sont de nature polymérique dont le choix adéquat du support utilisé dans les procédés de micro encapsulation est primordial que ce soit pour la forme orale ou dermique, à cause de son effet sur les propriétés d'encapsulation voire le profil de libération du principe actif et sur la stabilité des microparticules.

Les polymères d'encapsulation sont d'origine synthétique ou naturelle, ils doivent satisfaire aux exigences suivantes :

- Inertes vis-à-vis la matière active, dont il peut dans certains cas former des liaisons physique ou chimique avec la molécule à encapsuler.
- Présente une forme facile à manipuler.
- Capacité de maintenir la matière active dans le cœur de la particule qui revêtue par la membrane du polymère, ou être dispersée d'une manière homogène dans la matrice polymérique.

- Capacité d'assurer une protection maximale de la matière active contre les conditions environnementales.
- Assurer les bonnes propriétés d'émulsification.

c. Autres additifs : le ciblage des additifs utilisés dépend principalement de la nature de la molécule à encapsuler, et du procédé d'encapsulation utilisé. Parmi les additifs les plus souvent utilisés : les agents tensioactifs, les agents antimicrobiens et les agents réticulant. Dans le cas de l'utilisation d'un principe actif hydrophobe, la stabilisation de l'émulsion, qui précède l'étape de micro encapsulation, est assurée par la présence d'un agent tensioactif (les oléates de sorbitane et les polysorbates). Ces tensioactifs sont ajoutés dans les préparations liquides en faible quantité (de 0.5 % à 5 %).

I.3.3. Caractérisation

a. Taille [4]*:* le terme microparticule est utilisé pour les systèmes sphériques ayant un diamètre compris entre 1 μm et 1000 μm, et dans certaines références cette intervalle est réduit jusqu'à un diamètre maximum de 500 μm.

La quantification des dimensions des microparticules est basée sur l'utilisation des appareils tels que :

- Diffractomètre Laser (à sec ou en solution) : de 1μm à plusieurs millimètres ;
- Diffusion dynamique de la lumière /potentiel zêta: de 1mm à 10μm.

b.Structure interne et externe : cette caractérisation permet de différencier entre les morphologies superficielles et en profondeur des particules produites, donc entre les systèmes matriciel et réservoirs (figure I.4). Cette distinction est garantie par microscopie électronique à balayage et à transmission.

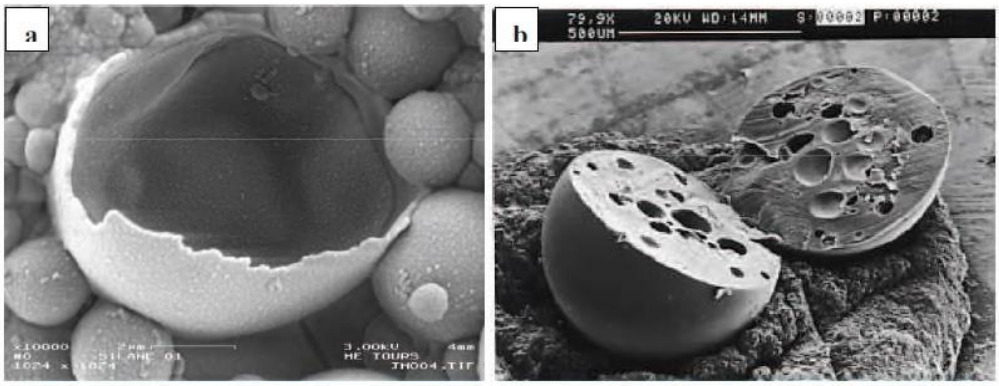


Figure I.4. Morphologies des microcapsules (a) et des microsphères (b) par MEB, [1].

C.Quantification de l'actif encapsulé, [9] ***:*** Du fait de leur structuration, la teneur en principe actif encapsulé peut être très élevée dans les microcapsules, il varie de 85 à 90 % (rapport massique). Celles rencontrées dans les microsphères sont plus faibles, elles sont de l'ordre de 20 à 35 %.

Cependant, la quantification du principe actif au sein d'une préparation encapsulée, est caractérisée par plusieurs grandeurs, il s'agit du rendement d'encapsulation, le taux d'encapsulation et l'efficacité d'encapsulation. Ces grandeurs sont données par les expressions suivantes :

$$Rendement\ d'encapsulation(RE) = \frac{masse_{microsphères\ obtenues\ (g)}}{masse_{(polymère+PA)introduit}(g)} .100 \text{(I.1)}$$

$$Taux\ d'encapsulation(TE) = \frac{masse_{PA\ introduit\ (g)}}{masse_{microparticule}(g)} .100 \qquad \text{(I.2)}$$

$$Efficacité\ d'encapsulation(EE) = \frac{masse_{PA\ encapsulé\ (g)}}{masse_{PA\ introduit}(g)} .100 \text{(I.3)}$$

Ces paramètres d'encapsulation dépendent principalement du procédé impliqués dans l'encapsulation, des réactifs mis en formulation et par conséquents des propriétés des microparticules obtenues. Dans ce cas, ces dernières concernent la membrane d'une microcapsule ou la matrice d'une microsphère qui est caractérisées par :

- La forme.
- la taille et la distribution de taille.

- La porosité.
- Le degré de gonflement.
- Le potentiel zéta.
- La mouillabilité.
- La tortuosité des pores.

Ainsi, Les principaux paramètres qui gèrent les propriétés de ces systèmes sont :

- Les paramètres extérieurs : le pH, la température, l'humidité.
- La solubilité, la température d'ébullition et fusion.
- Les paramètres intrinsèques à membrane : la cristallinité et la porosité de membrane, la structure chimique de polymère, la masse molaire.

d. Cinétique de libération : en fonction de la microstructure interne des microparticules contenant une substance active, ces systèmes peuvent assurés la libération de cette dernière soit immédiatement en atteignant un pic sérique élevé ou progressive selon une cinétique bien déterminée.

- *Système à libération provoquée :* il s'agit des capsules possédant une membrane de faible perméabilité dont le contenu est libéré brutalement par rupture ou éclatement de la rupture est déclenché par une variation de température, de pH, une dégradation enzymatique de la membrane ou une pression mécanique ou osmotique [10].

- *Système à libération contrôlée et prolongée (modifiée) :* dans lesquels le principe actif est libéré par diffusion à travers une membrane ou une matrice perméable qui se dégrade ou se dissout au cours du temps par érosion ou gonflement [11,12].

I.4. Procèdes de micro encapsulation

Les différentes méthodes de micro encapsulation peuvent être classifiées selon différent citres. On distingue trois grandes familles de procédés (tableau I.2) :

Tableau I.2 : Principaux procédés de micro encapsulation, [4]

Procédés	Mode d'encapsulation	Taille des microparticules
Procédés physico-chimiques	-Séparation de phases ou coacervation -Evaporation –extraction de solvant -Gélification thermique d'émulsion	2 -1200 μm 0 ,5 -200μm
Procédés chimiques	-Polycondensation inter faciale -Polymérisation inter faciale -Polymérisation en milieu dispersé	2 -2000μm 2 -2000μm
Procédés mécaniques	-Nébulisation /séchage -Gélification de gouttes -Enrobage en lit fluidisé -Extrusion /sphéronisation	1 -200μm 200 -800μm 35 -5000μm $\geq$ 200μm

I.4.1. Procédés physico-chimiques

Ils sont basés sur la maîtrise de paramètre tel que la solubilité et la précipitation des polymères en fonction de l'ajout d'un non-solvant, du pH ou de la température mais aussi sur la maîtrise des changements d'état (fusion, solidification) des polymères.

I.4.2. Procédés chimiques

Ils sont basés sur la formation in *situ* du matériau enrobant par polycondensation, polymérisation radicalaire, ou polymérisation anionique d'unités monomères. De ce fait, ils se distinguent des méthodes physico-chimiques et mécaniques qui utilisent des matériaux enrobant préformés (polymères, lipides).

I.4.3. Procédés mécaniques

Ils mettent en œuvre des techniques de pulvérisation, de formation de gouttes ou de gouttelettes et d'extrusion.

a. Procédé de nébulisation/séchage

Le procédé de nébulisation/séchage est un procédé continu en une seule étape qui permet de transformer une formulation liquide initiale en une forme micro particulaire sèche. La formulation liquide initiale peut être constituée :

-Soit d'une solution de matière active et de matériau enrobant.

-Soit d'une dispersion de particules solides de matière active dans une solution ou une émulsion de matériau enrobant.

-Soit encore d'une émulsion de matière active dans une solution de matériau enrobant.

Ce procédé comprend les quatre étapes séquentielles suivantes

1. Nébulisation de la formulation liquide initiale pour former un aérosol.
2. Mise en contact de l'aérosol avec un flux d'air, porté à une température contrôlée.
3. Séchage rapide de l'aérosol pour former des microparticules solides.
4. Séparation de la poudre de microparticules et de l'air contenant le solvant vaporisé.

c. ***Gélification ou Congélation de gouttes***

La gélification de goutte est réalisée à partir d'une solution, dispersion ou émulsion de principe actif dans une solution aqueuse de polymères. Ces polymères doivent être capables de former des gels par changement d'un paramètre physique (température) ou chimique (concentration ionique, pH, etc.).

La congélation de gouttes consiste en la solubilisation ou la dispersion du principe actif dans un matériau enrobant à l'état fondu.L'addition d'un émulsifiant favorise la formation et stabilité de l'émulsion. Sa nature et sa concentration influencent la distribution de la taille des gouttelettes. Par conséquent, lorsque la gélification induite est par voie ionique, l'alginate forme une matrice piégeant le composant actif à l'intérieur [13].

- ***Gélification interne :*** Elle consiste en l'addition d'un sel insolubleou partiellement solublede calcium à l'intérieur des gouttelettes de l'émulsion eau dans huile. Quand le pH diminue les ions et Ca^{+2} sont libérés et la gélification se produit [14].

- ***Gélification externe :*** La gélification externe consiste à émulsifier une solution aqueuse d'alginate-matière activedans une phase continue non aqueuse, en ajoutant plus tard au milieu une solution de $CaCl_2$pour induire la gélification des gouttelettes et favoriser la séparation des microsphères [12].

Les figures I.5. et I.6 illustrent le principe des deux modes de gélification.

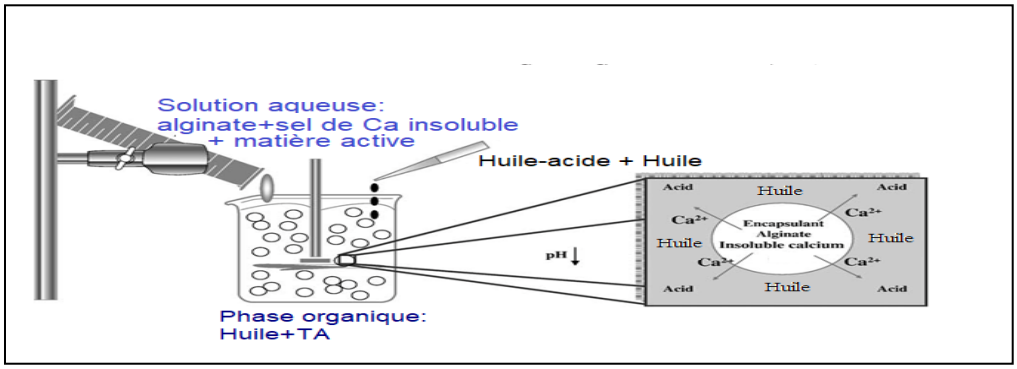


Figure I.5. Principe d'émulsifcation/gélification interne [14].

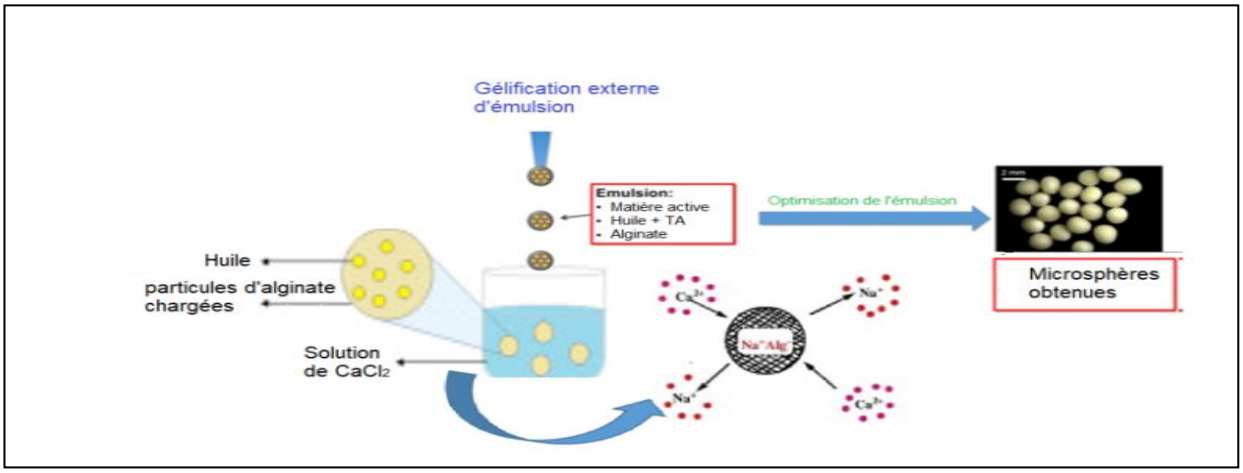


Figure I.6. Principe d'émulsifcation/gélification externe [15].

c.Extrusion

Permet de disperser de manière homogène un PA dans une matrice polymère .Elle peut s'appliqué à des produits en fusion, les polymères utilises doivent être thermoplastique et posséder une température de transition vitreuse après extrusion est refroidi et sectionné de manière régulière.

I.5. Libération modifiée

I.5.1. Concept de la libération modifiée

La libération modifiée nommée aussi ciblée prolongée ou contrôlée, est la libération d'un principe actif de son système galénique d'une manière prolongée et progressive dans le temps une fois il se trouve en contact avec les milieux physiologiques.

Dans le même contexte, un système de libération modifiée, désigne la délivrance de la bonne quantité d'un principe actif au bon endroit et au bon moment.

L'élaboration des systèmes à libération modifiée est essentiellement basée sur deux principes :

- La vitesse de libération de principe actif à partir de la forme galénique cette étape basée à l'absorption et la dissolution, qui dépendent de la voie et du mode d'administration.
- La durée de libération est étalée dans le temps, tout en maintenant la concentration sérique du principe actif, incluse dans sa marge thérapeutique, sur une longue période et avec une seule administration.

I.5.2. Mécanisme de la libération modifiée d'une substance active

La libération d'un principe encapsulé par diffusion est le mécanisme le plus répandu parmi les systèmes à libération prolongée et contrôlée. La libération prolongée d'un PA est essentiellement obtenue par des mécanismes de dissolution, de diffusion, ou par association de ceux-ci [16].

Ainsi, les profils de libération par diffusion passive à travers la membrane ou la matrice polymère (loi de Fick) peuvent êtredifférents (figure I.7). Ceux-ci, sont gouvernés par les propriétés physico-chimiques du système.

Pour les systèmes membranaires, les cinétiques de libération obtenues sont d'ordre 0 ou d'ordre 1 (profils A et D) selon la solubilité de la matière active dans l'eau. La cinétique d'ordre 0 peut êtremodifiée au début de la libération par deux phénomènes :

- Effet de *burst* qui, dû à la présence d'un excès de PA dans la membrane, ce qui augmente la vitesse de libération aux temps courts (profil B).

- Temps de latence : quicorrespond au temps que précède la libération, c'est le temps nécessaire pour que le PA diffuse à travers la membrane avant d'atteindre le milieu extérieur (profil C).

Pour les systèmes matriciels, la cinétique de diffusion du PA obéit généralement à la loi d'Higuchi (profil E).

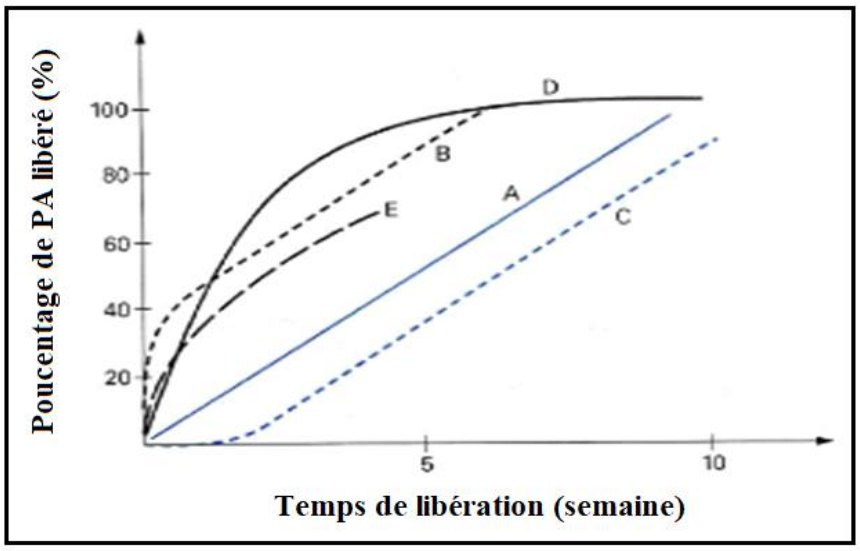


Figure I.7. Profils de libération obtenus à partir de microparticules, (A, D) : microcapsule, (B) : microcapsule avec effet *Brust*, (C) : microcapsule avec temps de latence et (E) : microsphère [1].

I.5.3. Modèles théoriques de la libération modifiée

La libération du principe actif généralement est régit par trois mécanismes : la nature et la concentration du PA, les propriétés structurales du polymère telles que le taux de gonflement et la vitesse de gélification ainsi que son comportement dans les fluides physiologiques.

Les principaux modèles de la libération modifiée obéissent aux lois tels que, (figure I.8) [17] :

a. ***Diffusion de Fick :***Les modèles d'ordre 0 et 1 représentent les meilleurs profils de la cinétique de libération du PA en fonction du temps

(équations I.2 et I.3 respectivement). La diffusion de Fick est basée sur la migration du PA à travers les chaînes macromoléculaires du polymère dû à l'existence d'un gradient de concentration entre la matrice et le milieu extérieur

$$\frac{C_t}{C_\infty} = \frac{M_t}{M_\infty} = -k_0.t \qquad \text{(I.4)}$$

$$\frac{C_t}{C_\infty} = \frac{M_t}{M_\infty} = (1 - e^{-k_1 t}) \qquad \text{(I.5)}$$

b. Modèles de diffusion non Fickiens

La libération prolongée est une diffusion par transport, où le PA s'hydrate puis passe à travers les micropores des chaines polymériques préalablement gonflées par effet du solvant, et enfin diffuse vers le milieu extérieur.

c. Modèle d'Huguchi

Ce modèle décrit la libération des PA solubles et peu solubles incorporés dans les systèmes matriciels. L'équation du modèle s'écrire globalement comme suit :

$$\frac{C_t}{C_\infty} = \frac{M_t}{M_\infty} = k_H.t^{1/2} \qquad \text{(I.6)}$$

d .Modèle de Welbull

L'écart du profil de libération du modèle de Wegner (modèle du 1er ordre) aux premiers temps est dû principalement au ralentissement de relargage, dans ce cas la cinétique de libération est décrite par une équation exponentielle en fonction du temps.

Cette expression est donnée par l'expression suivante :

$$\frac{C_t}{C_\infty}=\frac{M_t}{M_\infty}=(1-e^{\left(\frac{t-t_0}{t_D}\right)^\beta} \quad \text{(I.7)}$$

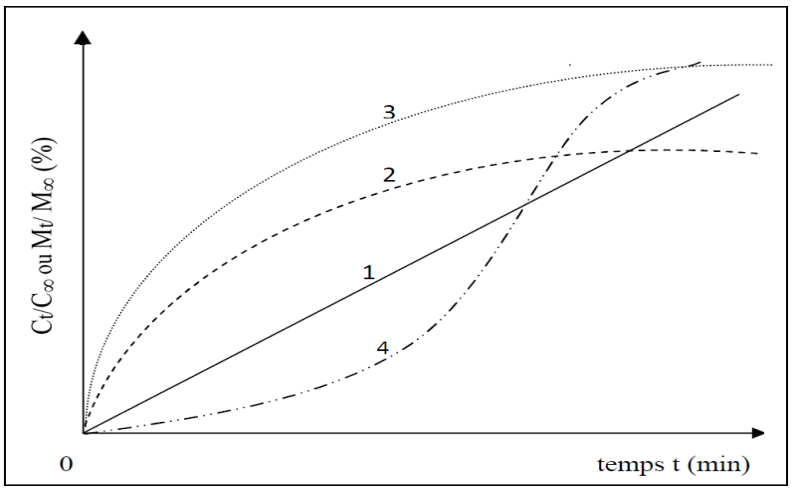


Figure. I.8. Profils des cinétiques de libération de PA, (1) : ordre zéro, (2) : ordre 1 ou Wagner, (3) : Higuchi, (4) : Weibull

I.5.4. Paramètres influencent la libération modifiée

La localisation du PA il dépend du milieu environnant et des caractérisations des particules selon la morphologie et la taille ; les paramètres qui influencent la libération du PA sont:

- Le taux d'encapsulation
- L'interaction chimique entre le PA et le polymère
- La solubilité du PA dans la membrane polymérique
- Les caractéristiques morphologies du système de libération.

CHAPITRE II :

LES

BIOPOLYMÈRES

II.1.Introduction

Les civilisations matérielles reposent sur la consommation massive de ressources fossiles, tels que le pétrole et le gaz, ceci provoque un double risque : leur disparition et la création de vrais problèmes écologiques. A cet égard, le monde de la recherche se consacre toujours à trouver de nouvelles sources susceptibles de remplacer ces combustibles fossiles.

Parmi les nouvelles sources : les bio polymères, où leur développement a subi une accélération intense grâce à leurs caractères biodégradable et biocompatible. Les bio polymères sont considérés comme une bio ressource renouvelable abondante et disponible dans la nature. Ils sont issus exclusivement d'organismes vivants (végétaux, animaux et microorganismes) ou de polymères synthétisés à partir de ressources renouvelables.

En effet, il convient de dresser un aperçu général sur des connaissances actuelles de cette classe de polymères naturels, dont l'attrait s'explique par ses propriétés physico-chimiques et biologiques remarquables ainsi que ses utilisations sous différentes formes dans un contexte d'applications potentielles.

II.2. Définition [18]

Selon l'UIPAC, les bio polymères sont des bio macromolécules synthétisées par des organismes vivants.

Selon l'Agence de l'Environnement et De la Maitrise de l'Energie, les bio polymères sont des polymères naturels issus de ressources renouvelables de plantes, d'algues ou d'animaux.

Les bio polymères peuvent aussi être obtenus par polymérisation des monomèresnaturels et par la fermentation des micro-organismes.

II.3. Différentes familles de bio polymères

Les bio polymères peuvent être divisés en deux principaux types regroupés en 4 familles différentes, (figure II.1).

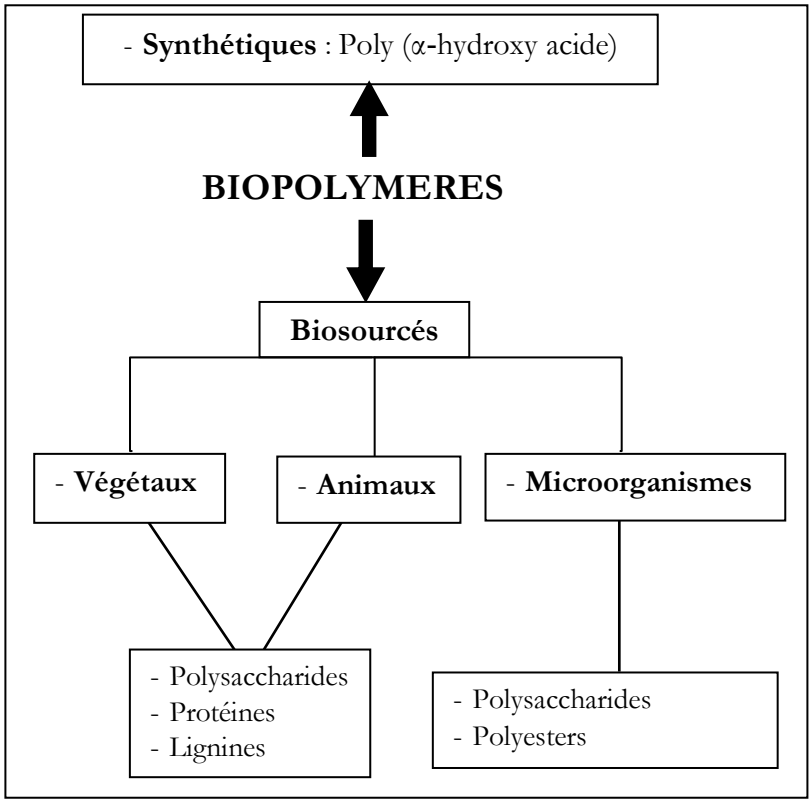


Figure II.1. Les différentes familles de biopolymères.

II.3.1. Les polysaccharides

Ils constituent la famille de biopolymères la plus répandue et la plus utilisée. Ils entrent dans la composition de la plupart des cellules végétales animales et microbiennes. Cette famille englobe majoritairement : la cellulose, l'amidon, la chitine et le chitosane, l'alginate et la pectine. [18]

a. La cellulose

Représentela molécule biologique la plus abondante sur notre planète. Cette macromolécule glucidique est un élément structural de premier ordre pour la grande majorité des parois végétales et c'est l'élément constitutif majeur du bois, elle représente également un constituant majoritaire du coton et des fibres textiles telles que le lin, le chanvre, le jute ou la ramie . La cellulose est un homopolymère linéaire de résidus glucose de configuration D, lié selon une liaison glycosidique β, (1→4) (Figure I.01). La masse molaire de la chaîne de cellulose varie de 5.10^4 à $2,5. 10^6$ g/mol.[18]

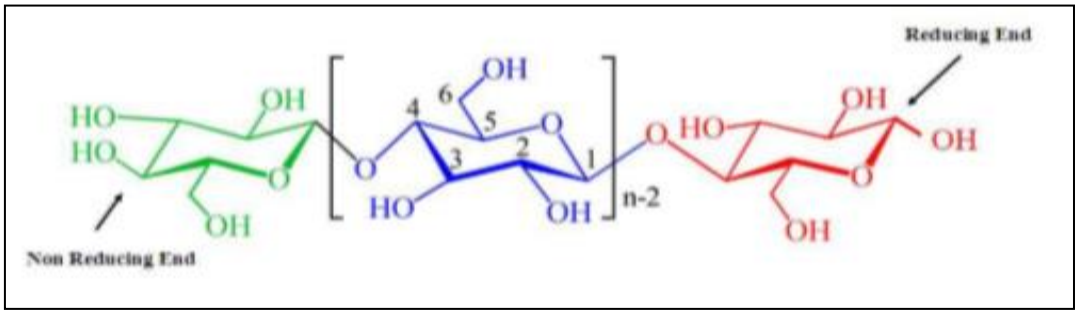


Figure II.2.: Structure moléculaire de la cellulose[18]

A cause des interactions très fortes entre les chaînes, la cellulose native est fortement cristalline et insoluble dans l'eau. Afin d'améliorer sa solubilité dans l'eau et lui conférer des propriétés filmogènes, la cellulose peut être éthérifiée au niveau des fonctions hydroxyles libres pour aboutir à certains dérivés cellulosiques comme carboxyméthyl cellulose (CMC), hydroxypropyl cellulose (HPC), hydroxypropylméthyl cellulose (HPMC), La cellulose est très utilisée pour la formation de films flexibles et transparents, présentant des propriétés barrières à l'humidité et à l'oxygène non négligeables. Nous citons par exemple la cellophane qui domine le marché des emballages transparents. Elle est constituée de cellulose régénérée, obtenue par extrusion d'une dispersion visqueuse alcaline de xanthate de cellulose dans un bain acide. Le film est obtenu après traitement avec un agent plastifiant (glycérol) et séchage.[18]

a. Le chitosane

Le chitosane est peu répandu dans la nature. Il se trouve dans certains champignons, les zygomycètes et dans la paroi abdominale des reines de termites [19]. Il est généralement obtenu par désacétylation chimique en milieu alcaline ou enzymatique de la chitine [20].

Cette dernière subit une déminéralisation à l'acide chlorhydrique, unedépolymérisation par la soude ou la potasse et enfin un blanchiment par la présence d'un agent oxydant [21].

Le chitosane peut être décrit comme étant un copolymère linéaire flexible formé d'unités β (1-4) de N-acétyl D-glucosamine et de D-glucosamine. Le chitosane a trois types de groupement fonctionnels réactifs: les groupements amines sur le carbone C (2), les groupements hydroxyles primaires et secondaires sur le C (3) et le C (6) [22].

Grâce à ses groupements amines libres, ce composé possède des propriétés intéressantes très différentes de celles de la chitine. Le chitosane, soluble dans les acides faibles, possède une

charge positive alors que la plupart des polysaccharides sont chargés négativement [19]. La structure chimiqueduchitosaneestprésent dansla Figure II.3.[23]

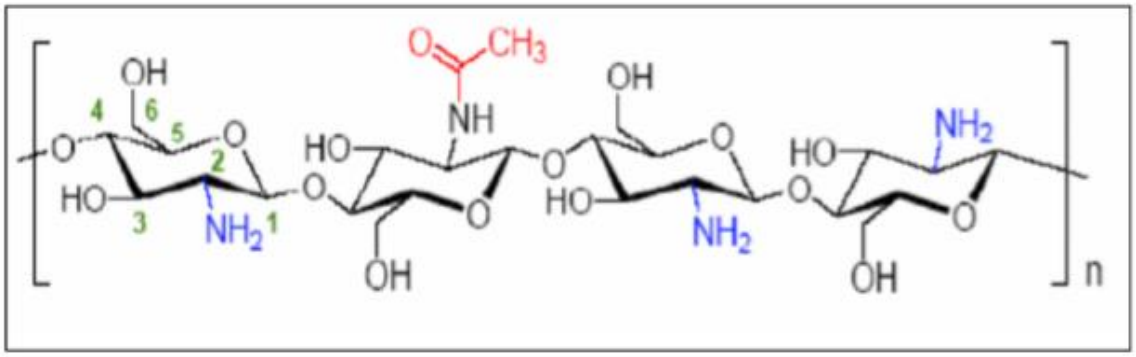


Figure II.3:Structurechimiqueduchitosane [23].

Tableau II.1:Quelquespropriétéset applicationsdu chitosane [24].

Champd'application	**Application**	**Propriétés**
Pharmacie	Encapsulation de médicaments	Matériel absorbable avec possibilité de contrôle de libération de principes actifs(enzyme, médiment)
Clinique	Membrane de dialyse, Pansements	Rétention d'eau, d'ions, stimulation de larégénérationdestissus
Cosmétiques	Crème, shampooing, Démêlant	Rétention de l'humidité, Anti électrostatique, Surfactant
Industrie agroalimentaire	Purées de fruits, de Légumeoude viande	Formationdefilm ,épaississant
Traitementdeseaux	Agent floculant decation	Poly électrolytes;chélationdemétaux

b. L'alginate :

- *Définitions :* Les alginates sont des copolymères c'est à dire polymères issus de la copolymérisation d'au moins deux typesde monomères chimiquement différents non ramifiés : l'acideD-mannuronique (M) et l'acide L-guluronique (G) (figure II.2).

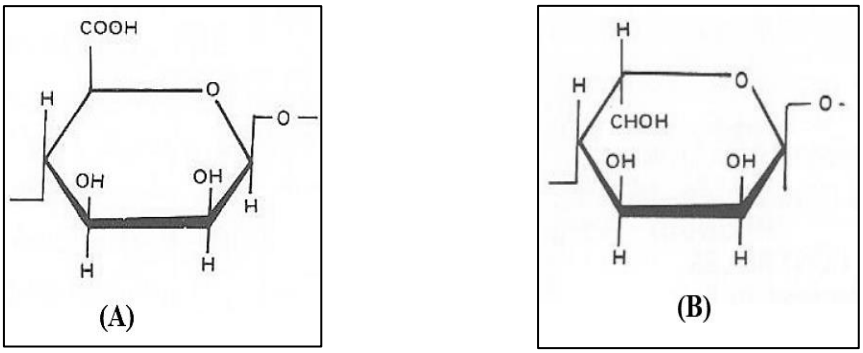


Figure II.4. Monomères de l'acide D-mannuronique (M) : (A) et l'acide L-guluronique (G), [25]

L'alginate est constitué de plusieurs unités de *mannuronate et de guluronate*dont le nombre varie de 100 à 3000. La liaison entre les monomères est de type β(1-4), (figure II.3).

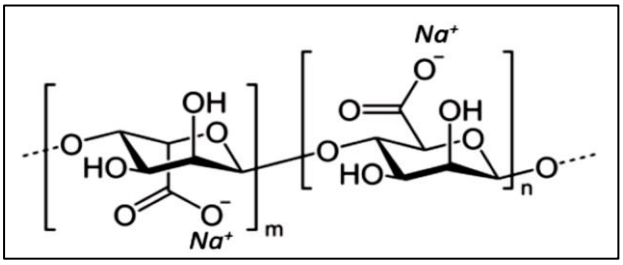


Figure II.5. Structure de l'alginate de sodium de formule $(C_6H_7Na_{1/2}O_6)_n$, [26].

L'alginate peut être synthétisé par deux biosources, les bactéries (*Azobacter vinelendii*et *Pseudomonas aeruginosa*) et essentiellement par les algues brunes. En effet ces dernières en sont constituées pour plus de 40 % de leur poids sec et le produitconstitue le polysaccharide le plus abondant de ces organismes, ils constituentsoitla matrice extracellulaire de ces

organismes ou leur paroiLa figure II.6, schématise la structure principale de la paroi des algues brunes.

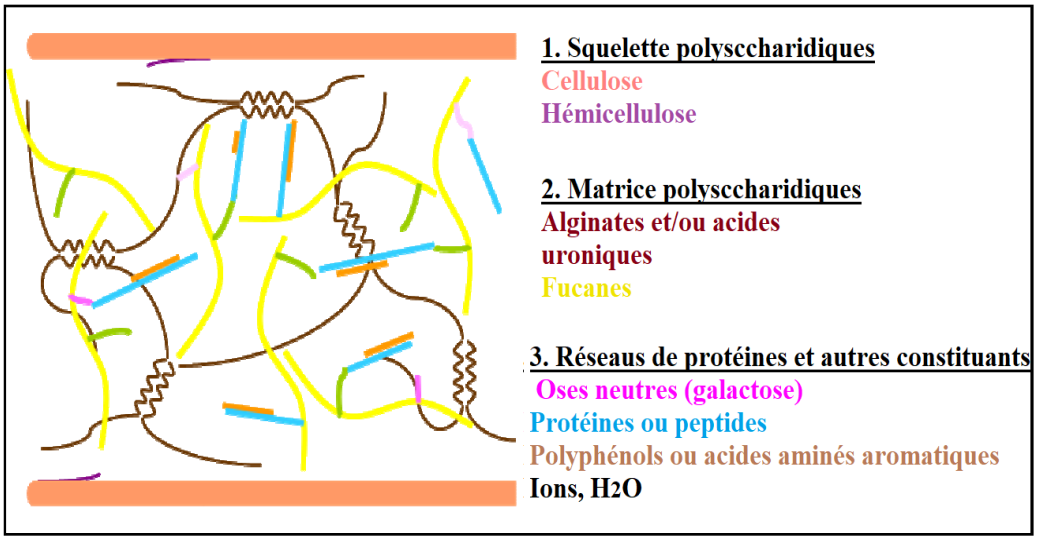


Figure II.6. Schéma simplifié de la paroi des algues brunes [27]

- *Propriétés physico-chimiques* : l'alginatesest classée parmi leshydrocolloïdes car ils dont solubles dans l'eau où ils se dissolvent pour former un gel avecdes propriétés rhéologiques particulières.

Les propriétés physico-chimiques des solutions d'alginates dépendent d'une part de leur structure, c'est-à-dire de la proportion de résidus mannuroniques par rapport aux résidus guluroniques (M/G) ainsi que du nombre et de la longueur des blocs MM, GG et MG, et d'autre part de nature du contre-ion. Les alginates mono valent sont parfaitement solubles dans l'eau car les groupements carboxyliques présents dans les molécules d'alginate sont ionisés, par contre L'addition de cations divalents (Ca^{2+}, Sr^{2+}, Ba^{2+}) provoque la formation d'un gel élastique, où cations sont retenus dans une cage et interagissent avec les fonctions carboxylates et les atomes d'oxygène des fonctions hydroxyles, (figure II.7)[27].

Applications : vu que l'alginate est une substance non toxique, inerte, biodégradable et non immunogène, elle présente doncles caractéristiques requises pour constituer un biomatériau d'excellence

. En effet, les alginates sont employés dans de nombreux domaines, à cause de ses diverses propriétés colloïdales, comme la rétention d'eau, la gélification et la stabilisation des émulsions. Les principales applications des alginates sont résumées dans le tableau II.2.

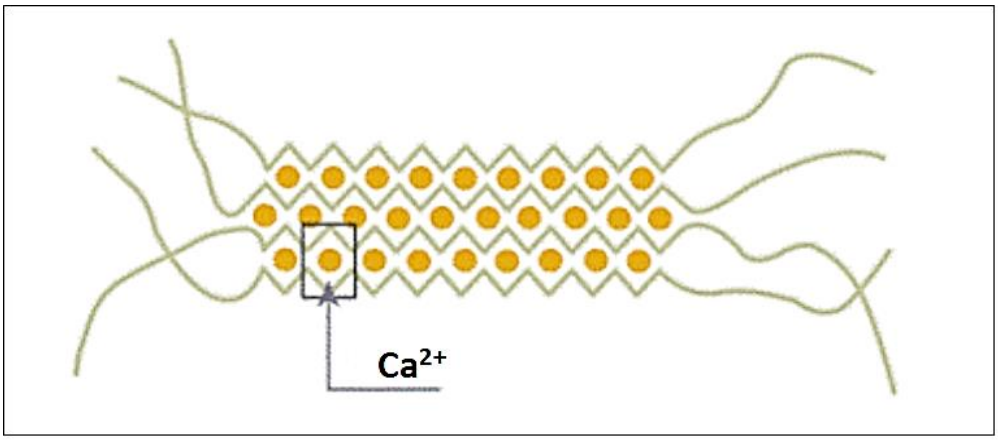


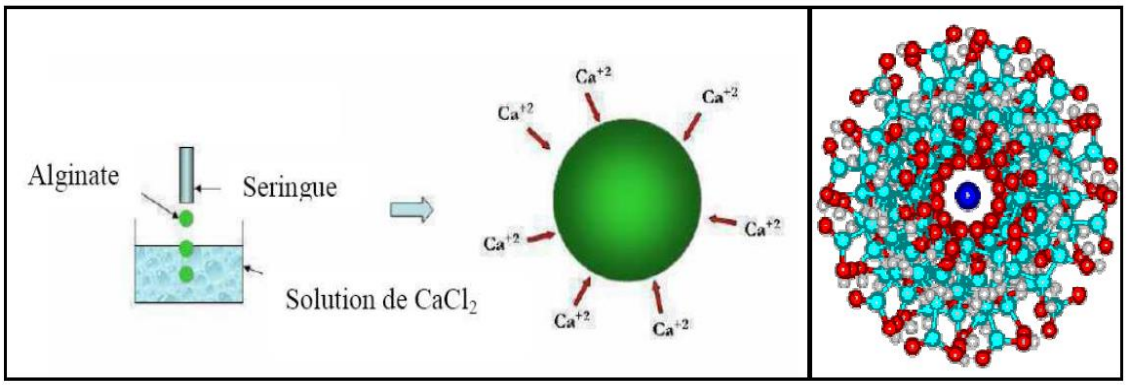
Figure II.7. Rétention du calcium par un réseau tridimensionnel de segments poly-M ou poly-G définissant une structure de type "cage", [27].

Par ailleurs, plusieurs biopolymères sont impliqués dans la micro encapsulation y compris les alginates, ceux-ci peuvent accomplir les critères suivants

- Perméabilité aux gaz
- Caractéristiques chimiques et fonctionnelles
- Emulsifiant naturel :
- Possibilités de modification et de réticulation chimiques.

L'utilisation des alginates dans la micro encapsulation a touché plusieurs domaines, où deux procédés ont été adaptés pour ceci :

- La coacervation complexe
- Gélification des goutes, (figure II.8). [27]



- **Figure II.8.** Procédé de gélification de gouttes d'alginate et structure atomique d'une bille d'alginate, [27]

Tableau II.2. Principales applications des alginates, [27]

Domaine d'application	***Propriété***	***Exemple d'application***
Textile	Amélioration de rhéologie	Fabrication des teintures
Agro-alimentaire	Emulsifiant, gélifiant, Epaississant	Yaourt et crèmes glacées
Médical	- Gélifiant	- Inserts oculaires - Moulage dentaire
	- Modificateur de viscosité	- Remplissage vasculaire
Pharmacie	- Gélifiant, agent cicatrisant - Gélifiant, coagulant - Gélifiant, régulateur de pH	- Pansements cutanés - Pansements hydrostatiques - Pansements gastriques
Pharmaceutique	- Stabilisant, viscosifiant, liant, désintégrant	- Sirops, comprimés, capsules, crèmes, gels.
Ingénierie tissulaire	- Vecteurs de délivrance	- Scaffold[1]
Cosmétique	- Agents adoucissant, filmogène, hydratant	- Préparation des crèmes et des parfums

[1] : Matrices qui servent de support à la reconstruction tissulaire.

II.3.2. Les protéines

Ce sont les constituants de la matière vivante animale, muscle, peau, cheveux, etc. Elles participent aussi aux différents processus de la vie.

Les protéines telles que la caséine du lait ou encore le gluten de blé interviennent dans la formulation d'adhésifs ou peintures et sont à la base de matériaux (rigides ou souples) présentant des propriétés barrières à l'oxygène et au gaz carbonique. Ainsi, la gélatine est également utilisée à la base de nombreux films dont l'utilisation principale est la fabrication de tablettes et de capsules pour l'industrie pharmaceutique. L'inconvénient majeur de l'utilisation des protéines comme matériaux biopolymères résident dans le prix de revient élevé des matériaux résultants [18].

II.3.3. Les biopolymères d'origine microbienne

Il s'agit de biopolymères de la famille des polyesters, produits par voie fermentaire par une grande variété de bactéries en tant que réserve énergétique intracellulaire. Ces biomolécules sont synthétisées à partir des matières premières naturelles telles que les sucres et accumulés sous forme d'inclusions intra cytoplasmiques.

Parmi les bio polyesters les plus connus sont lePoly Hydroxy Alcanoates(PHA), le Poly Hydroxy Butyrate (PHB), et le Poly HydroxyValérate (PHV), (figure II.5)[28].

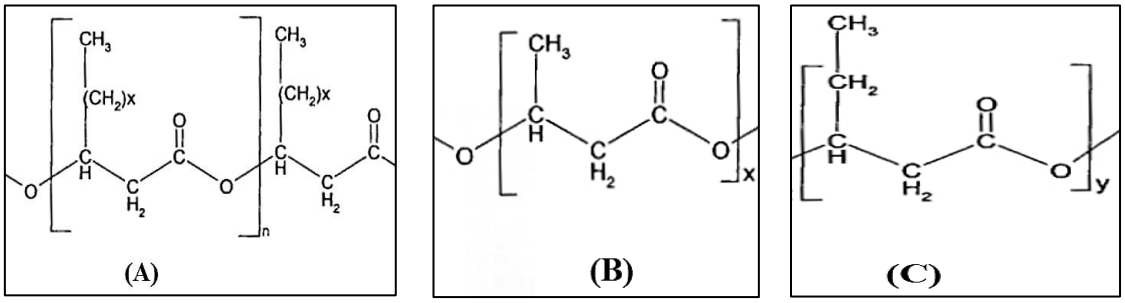


Figure II.9. Structure chimique de : PHA : (A), PHB : (B) et PHV : (C) [28]

II.3.4. Les biopolymères synthétiques [18]

Dits aussi biopolymères chimio synthétiques en raison de leurs mode d'obtention exclusive par voie fermentaire. En effet, Leur synthèse est réalisée par des réactions de polycondensation entre les diacides et les diols ou par polymérisation. Le plus connu des poly α-hydroxy acide est l'acide poly lactique (PLA), il est produit de la polymérisation de l'acide

lactique lui-même issu de fermentation bactérienne de ressources renouvelables ou à partir des sucres ou l'amidon de maïs.

Grâce à ses propriétés de biocompatibilité et de biodégradabilité, le PLA trouve de multiples applications dans le biomédical telles que les fils de sutures bio absorbables et les implants.

Le PLA présente des propriétés applicatives diverses tels qu'une bonne rigidité, de bonnes propriétés optiques en termes de transparence et de brillance, de bonnes propriétés barrière aux graisses, aux huiles et aux arômes, qui lui permettre d'être utilisé dans l'emballage des légumes.

II.4. Propriétés des biopolymères

De par leur structure chimique et leur comportement en solution, les biopolymères présentent des propriétés particulières etintéressantes pour des applications bien spécifiques. Les principales propriétés sont :

II.4.1. La biodégradabilité

La biodégradabilité réside dans la caractérisation de l'impact d'un produitorganique sur l'environnement. C'est un processus naturel dedécomposition de la matière organique. Elle est due à la présence de liaisons facilementclivables comme les liaisons esters ou amides conduisant à la formation de molécules simpleset de fragments de plus petite taille[28].

Le terme biodégradable est réservé au bio polymère qui a la capacité de se dégrader sous l'action de microorganismes. Leurs décompositions chimique et biochimique conduisent à la formation de : CO_2 et d'H_2Oou à la formation de CH_4, CO_2 et d'H_2O(en aérobieouen anaérobie), et/ou aux composés inoffensifs qui sont soit métabolisés soit excrétés par l'organisme [29].

Outre la biodégradabilité, une des propriétés spécifiques des bio polymères est la biorésorbabilité, c'est-à-dire la capacité de décomposition naturelle (hydrolyse enzymatique) dans l'organisme vivant pour formés des molécules de petites taille pour être éliminées. De plus, En pharmaceutique, il est important pour uneadministration *in vivo* que la biodégradation du support intervienne dans un laps de tempscompatible avec l'effet thérapeutique, où les médicaments à libération contrôlée reflètent le caractère biorésorbable des biopolymères, [29].

II.4.2. Biocompatibilité

Un matériau biocompatible est un matériau capable d'assurer une fonction avec une réponse appropriée et sans effets indésirables sur l'environnement biologique dans lequel il doit fonctionner. La réponse biologique d'un matériau dépend de trois facteurs : ses propriétés, la caractéristique de l'hôte et la demande fonctionnelle pour le matériau [18].

II.4.3. Propriétés chimiques

De part de leur structure chimique, les molécules de biopolymèrespossédant des fonctions : alcool, acide, amine ou aldéhyde réagissent facilement avec d'autres molécules. En outre, l'existence de certaines instaurationset des groupements hydroxyles sur les chaîn -alkyles des triglycérides permet leur fonctionnalisation et conduit à la formation depolyuréthanes, polyamides ou polyesters.

II.5. Applications des bio polymères*[30]*

De par leur structure chimique, les biopolymères présentent des propriétés particulières et intéressantes utilisés dans des domaines très variés tels que l'emballage, l'agriculture, la construction, l'automobile, l'électronique et le textile. Ils sont également employés pour des applications à forte valeur ajoutée dans le domaine médical.

Trois grands domaines d'application des bio polymères couvrent :

II.5.1. Application médicales

Les applications médicales des biopolymères ont été développés pour mise en conception des:

- Systèmes à libération contrôlée de substances actives.
- Implants en chirurgie vasculaire et cardiovasculaire.
- Fils chirurgicaux résorbable.

Fils***II.5.2. Application agricoles***

Depuis l'introduction de films plastiques comme films agricoles, l'utilisation de bio polymères en agriculture n'accensé d'augmenter. Les différentes applications sont :

- La libération contrôlée de pesticides et de nutriment
- Le conditionnement de sols
- La protection de grines
- La protection de plants.

.*II.5.3.Applications d'emballage*

Les matériaux d'origine biologique sont des matériaux dérivés de ressources renouvelables et sont utilisés pour des applications dans le domaine alimentaire comme :

- Emballage alimentaire
- Emballages industriels.

CHAPITRE III :

SYNTHÈSE

DES TRAVAUX DE

RECHERCHE

III.1. Introduction

L'alginate et le chitosane sont des biopolymères ayant des applications multiples et variées vue les propriétés physico-chimiques et biologiques intéressantes qu'ils présentent.

Le processus de gélification externe ou interne est l'un des applications impliquées dans l'encapsulation des matières actives (enzymes, hormones, principes thérapeutiques, ...). En effet, une formulation à base de chitosane peut être réalisée par formation des liaisons covalentes tandis qu'avec l'alginate, l'encapsulation est assurée par voie physique par utilisation des cations bivalents tels que : le calcium, le baryum, …
De nombreuses études ont été mises au point pour la micro encapsulation par la combinaison émulsification/gélification en utilisant l'alginate. Cette méthode peut être interne ou externe

Dans la gélification externe, un sel de calcium soluble induit la gélification d'alginate où les gouttelettes de l'émulsion sont converties en particule de différentes dimensions.
Par ailleurs, dans la méthode de gélification interne, une solution aqueuse d'alginate de sodium contenant un sel de calcium insoluble est émulsifié en phase huileuse. Lors de l'ajout d'un acide, les ions calcium sont libérés à l'intérieur des gouttes d'alginate convertissant de l'alginate de sodium en alginate de calcium [31].

III.2. Problématique de la recherche

La technique d'émulsification-gélification est basée sur la formation des gouttelettes contenant le polymère (alginate) dispersées dans une émulsion qui se durcissent lorsqu'ils réagissent avec les ions réticulant (figure III.1). Les particules produites lors de la gélification externe sont hétérogènes en raison que cette dernière a lieu au niveau de la surface avant le noyau, donnant naissance aux particules ayant une surface extérieure rigide et un noyau souple (figure III.2a) [32].

Cependant, la gélification interne conduit en la formation de particule homogènes, de sorte que les particules sont souvent molles et ont tendance à avoir une forte agglomération, pour atteindre une gélification graduelle et contrôlée et un profil de libération plus rapide, (figure III.2b) [31,32].

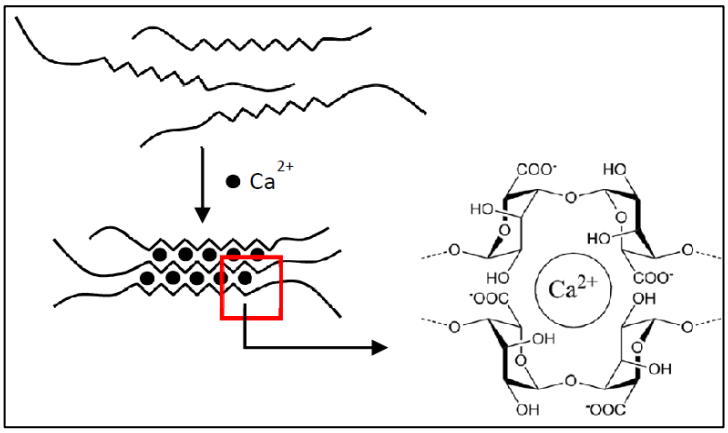


Figure III.1. Mécanisme de la gélification de l'alginate, [33]

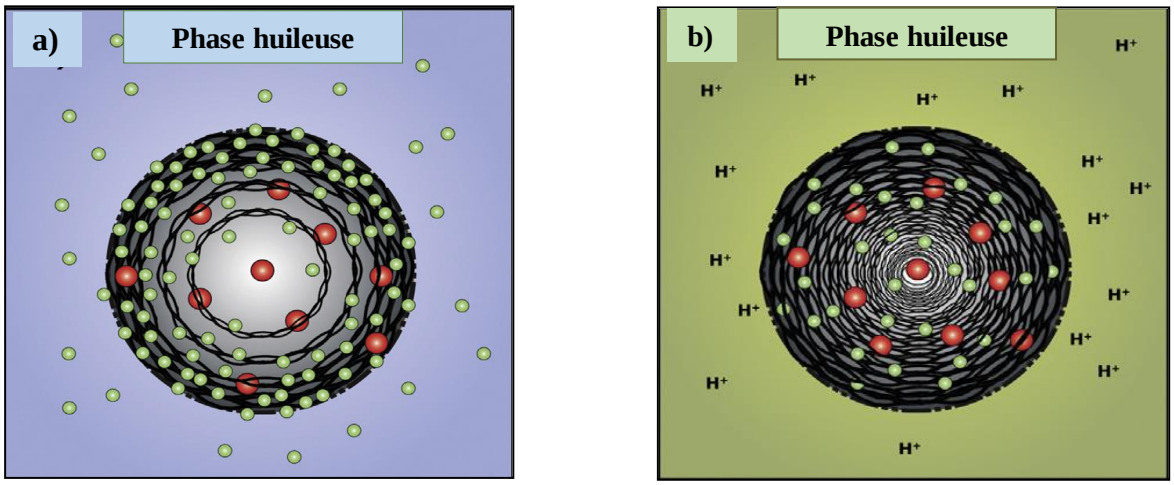


Figure III.2. Morphologie des particules obtenues de la gélification externe : (a) et de la gélification interne (b) [31].

En effet, notre étude s'oriente vers l'application de la méthode de gélification interne, où nous intéressons à synthétiser les principaux travaux de recherche basés sur l'encapsulation des différentes matières actives.

III.3. Applications de l'émulsification/gélification interne

III.3.1. Principe de la formulation

Généralement, cette méthode implique deux étapes : la première est la formulation de l'émulsion eau dans l'huile, où la phase huileuse est composé d'une huile minérale et d'un agent émulsifiant lipophile comme les polysorbates (span 80, span 85, …). La phase aqueuse, est une solution homogène d'alginate contenant le principe actif à encapsuler et le carbonate de calcium.

A l'émulsion formée, est ajoutée une solution acide où les protons assurent la libération de ion Ca^{2+} ce qui implique la gélification des gouttelettes aqueuses en particules matricielles [34].

a. Préparation de l'émulsion

Cette étape consiste à préparer une émulsion huileuse dont l'étude est basée sur l'optimisation de certains paramètres tels que : la composition des phases, la teneur en tensioactif, la teneur de matière à encapsuler et la vitesse d'agitation [34].

b. Préparation des microsphères

Cette étape est basée sur la diminution du pH des gouttelettes afin de solubiliser le carbonate de calcium en produisant les ions Ca^{2+}, le dioxyde de carbone et l'eau. Les ions calcium réticulent les chaines polymériques d'alginate. Dans cette étape, les paramètres dont dépend l'encapsulation sont : la concentration de carbonate de calcium et la concentration d'acide.
La figure III.3, schématise toutes les étapes de la méthode émulsification/gélification interne [33].

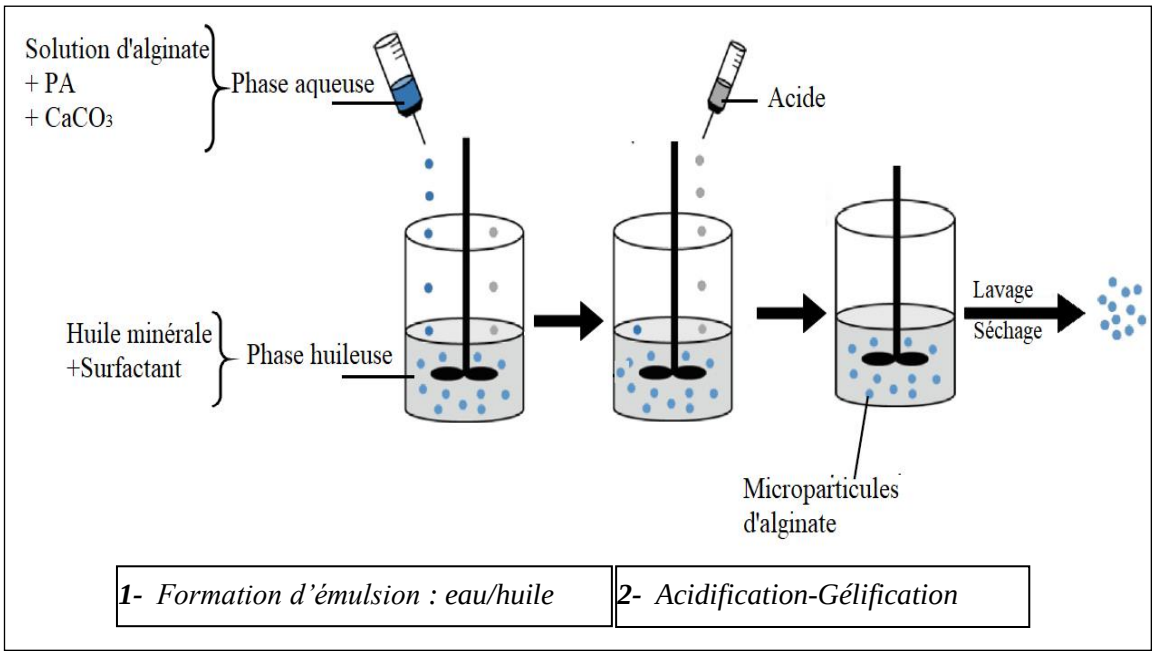


Figure III.3. Etapes de l'émulsification/gélification interne [32].

III.3.2. Matières encapsulées

a. Molécules et micro-organismes biologiques

Que soit dans les particules d'alginates ou de chitosane formées par les méthodes classiques, les molécules de protéines (enzymes ou hormones) sont souvent exposées à la chaleur, à la forte agitation mécanique et à l'exposition aux solvants organiques, ce qui entraine une détérioration moléculaire de la protéine. En effet, l'utilisation de la méthode d'émulsification-gélification, qui est considérée d'une part comme technique d'encapsulation douce et d'autre part une méthode de choix de production des particules de taille déterminée [35].

Cette méthode a fait l'objet de plusieurs recherches ciblées vers l'immobilisation des molécules biologiques telles que : le sérum albumine bovin (SAB), l'insuline, les probiotiques, et l'ADN plasmide. Le tableau III.1 récapitule les différents travaux réalisés.

Tableau III.1. Représentation de quelques travaux de recherche sur l'émulsification-gélification interne.

Molécule ou micro-organisme	***Insuline***	***SAB***	***Ecdysone***	***Levure (Y235)***	***Bifidobacterium BB-12***	***ADN***
Concentration d'alginate (%, m/v)	2	2	2	1.5	1.5	2
Concentration de $CaCO_3$ (%, m/v)	5	0.5	5	N-I	5	0.5
Concentration de matière active (%, m/v)	0.1	25	0.5	N-I	1	0.2
Proportion de la phase huileuse (%, v/v)	70	50	80	50	80.3	N-I
Rapport molaire : acide/Ca^{2+}	3.5	0.26	3.5	N-I	3.5	3
Rendement d'encapsulation (%)	75	62.4	80.5	80	N-I	80
Référence	[35]	[36]	[37]	[38]	[39]	[40]

N-Indiqué : Non désigné.

b. Principes thérapeutiques

L'encapsulation des PA dans les systèmes micro-particulaires utilisant divers biopolymères et différentes techniques a été largement étudiée et ceci dans le but d'améliorer la perméabilité à travers les épithéliums intestinaux et de protéger ces principes contre les enzymes digestives. Comme pour l'encapsulation des matières biologiques, la préparation des microparticules en impliquant la méthode d'émulsification-gélification interne constitue un choix intéressant pour les principes médicamenteux.

Très peu d'études ont été réalisées concernant l'application de cette méthode sur l'encapsulation des principes thérapeutiques, on cite ici celle effectuée sur le diclofenac sodique, [41].

III.4. Récapitulation du travail de recherche sur l'insuline [35]

III.4.1. Méthodes expérimentales et techniques de caractérisation

a. Protocole expérimental d'émulsification-gélification interne

Le travail s'oriente vers l'étude l'encapsulation de l'insuline selon la méthode appliquée par Poncelet et al., [42]. Dans ce cas, l'insuline utilisé est du médicament : Actrapid où il est dilué à 0.1% (m/v).

En effet, les paramètres du procédé de formulation ont été étudiées afin d'optimiser les propriétés des microsphères obtenues et ceci par application de la méthode mono-factorielle. Pour ce faire, les paramètres étudiés sont précisés dans le tableau III.2

Tableau III.2. Variables et niveaux étudiés pour l'encapsulation de l'insuline

Variable	*Vitesse d'agitation (tour/min)*	*Concentration du span 80 (%, m/v)*	*[Ca/alginate] (mg/mg)*	*Proportion de la phase huileuse*	*[Acide/Ca] (mol/mol)*	*[Alginate] (%, m/v)*
Niveaux étudiés	200	0	5 / 6	30	1.5/1	2
	400	0.5	7.3 / 8.7	40	2/1	2.5
	600	1	10 / 16.7	50	3.5/1	3

Un autre paramètre a été pris en considération dans l'étude, c'est la concentration du milieu de dissolution de l'insuline qui est l'acétate de zinc où les rapports molaires Zn/insuline pris sont : 2, 5.5, 9 et 13. Le protocole expérimental appliqué est devisé en trois étapes :

1. Préparation de l'émulsion eau/huile : elle consiste à introduire une phase aqueuse composée d'une solution d'alginate de sodium, de l'insuline et de carbonate dans une phase huileuse constituée de l'huile de paraffine et du span 80. L'homogénéisation est assurée à l'aide d'un agitateur à turbine pendant 15 min.

2. Préparation des microsphères : la gélification des gouttelettes est assurée à l'aide d'un volume de 20 ml d'huile de paraffine contenant de l'acide acétique glacial.

3. Rinçage et séchage des microsphères : le rinçage a été réalisé par une solution tampon acétate (pH 4.5) afin d'éliminer l'huile de paraffine. Ensuite, elles sont refroidies dans un bain d'éthanol (à -40°C) puis lyophilisées à 0°C pendant 48h.

b. Caractérisation morphologique et granulométrique

La morphologie des microsphères préparée a été analysée par microscope optique et par microscope électronique à balayage. Pour la distribution des tailles des microparticules, la granulométrie laser a été appliquée avec une gamme de tailles de 0,1 à 1000µm. Les mesures ont été effectuées en triple pour chaque formulation.

c. Quantification de l'insuline encapsulée

Le protocole expérimental consiste à mettre dans 10 mg des microsphères préalablement séchées dans 10 ml d'une solution tampon d'acide chlorhydrique (pH 1.2) et porté sous agitation magnétique à 100 tr/min pendant 2h. Les microsphères sont ensuite séparées par centrifugation puis mises dans 10 ml d'une solution tampon phosphate (pH 6.8) agitées pendant 1h jusqu'à dissolution. Les solutions sont analysées par chromatographie liquide à haute performance (HPLC).

Les paramètres d'encapsulation de l'insuline concernent l'efficacité et le taux d'encapsulation donnés par les expressions I.2 et I.3.

d. Cinétique de libération de l'insuline

Le mode opératoire du test de libération in *vitro* de l'insuline a été réalisé aux conditions gastro-intestinales.

20 mg de microsphères sont placés dans 20 ml d'une solution tampon d'acide chlorhydrique (pH 1.2) et portées sous agitation magnétique à 100 tr/min pendant 2h.
Ensuite, les microsphères sont transférées par centrifugation dans 20 ml d'une solution tampon phosphate (pH 6.8). 2 ml de cette solution sont prélevés aux intervalles de temps appropriés puis analysés par chromatographie liquide à haute performance (HPLC).

III.4.2. Résultats

a. Caractérisation morphologique et granulométrique

Les diamètres moyens des microsphères obtenues aux différentes conditions sont donnés dans les tableaux III.3.

A partir de ces résultats, la concentration de span 80, la proportion de la phase aqueuse et la vitesse d'agitation influente sur la taille moyenne des microsphères obtenues. Les constations suivantes ont été signalées :

–L'augmentation de la concentration de l'agent émulsifiant influe directement sur la diminution de la taille (288 µm à 53 µm aux teneurs de span 80 allant de 0 à 1%, v/v).

–La vitesse d'agitation a entrainé la diminution de la taille moyenne des microsphères (189 µm à 21.2µm aux vitesses allant de 200 tr/min à 600tr/min). Ainsi, l'effet de la vitesse d'agitation sur la distribution de la taille des microsphères est illustré sur la figure III.4.

–La proportion de la phase interne entraine provoque une diminution du diamètre moyen des microparticules (53µm à 27 µm aux proportions allant de 200 tr/min à 600 tr/min)

–L'augmentation de la concentration d'alginate conduit à une augmentation du diamètre moyen des microsphères (2 % à 3 % aux concentrations allant de 53 µm à 112 µm).

Tableau III.3. Effet des paramètres étudiés sur le taux et l'efficacité d'encapsulation.

Paramètre	***Niveaux***	***Taille moyenne (µm)***	***TE (%, m/m)***	***EE (%, m/m)***
Concentration de span 80 (%)	0	287±169.7	4.17±0.05	75.6±0.8
	0.5	74.2±26.2	4.09 ± 0.04	74.2±0.7
	1	53.0±12.9	4.18 ± 0.10	75.8±1.8
Proportion de la phase aqueuse	30	53.0±12.9	4.18±0.10	75.8±1.8
	40	41.7±26.6	3.89±0.06	70.5±1.1
	50	26.6±6.9	3.63±0.12	65.8±2.2
Vitesse d'agitation	200	188.5±149.0	3.93±0.08	71.3±1.5
	400	53.0±12.9	4.18±0.1	75.8±1.8
	600	21.2±6.5	4.06±0.04	73.6±0.6
Ca/alginate ratio (%, m/m)	5.0	61.9±18.5	3.87±0.20	70.1±3.6
	6.0	61.2±15.0	3.65±0.12	66.2±2.3
	7.3	53.0±12.9	4.18±0.10	75.8±1.8
	8.7	45.6±13.8	3.90±0.02	70.8±0.3
	10.0	55.2±16.2	3.61±0.02	65.5±0.4
	16.7	48.8±11.5	3.60±0.05	65.3±1.0
Acide/Ca (mol/mol)	1.5	55.3±15.9	3.58±0.10	64.9±1.8
	2.0	47.3±11.5	3.96±0.07	71.8±1.3
	3.5	53.0±12.9	4.18±0.10	75.8±1.8
Concentration d'alginate (%	2.0	53.0±12.9	4.18±0.10	75.8±1.8
	2.5	97.1±44.3	3.44±0 .07	77.2±1.5
	3.0	112.2±79.1	2.91±0.10	77.9±2.8
Zn/Insuline	2.0	53.0±12.9	4.18±0.10	75.8±1.8
	5.5	46.4±11.4	4.13±0.07	75.0±1.3
	9.0	46.4±12.9	4.37±0.07	79.2±1.3
	13.0	45.4±12.1	4.09±0.07	74.2±1.4

L'analyse par microscope optique des microsphères chargées d'insuline et vierges (figure III.5) montrent que celles-ci avaient toutes une forme sphérique et aucune agrégation n'a été observée.

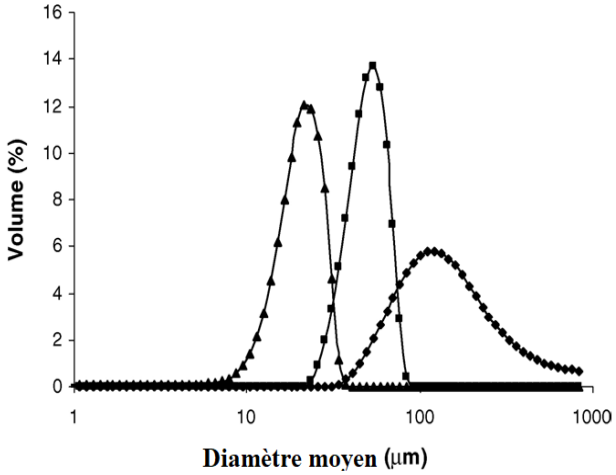


Figure III.4. Distribution de la taille des microsphères aux différentes vitesses d'agitation : (♦) : 200 tr/min, (■) : 400 tr/min, (▲) : 600 tr/min.

Cette constatation a été confirmée par MEB où la surface des microsphères chargées est lisse comporte des tubules ce qui confirme la présence d'insuline (figure III.6).

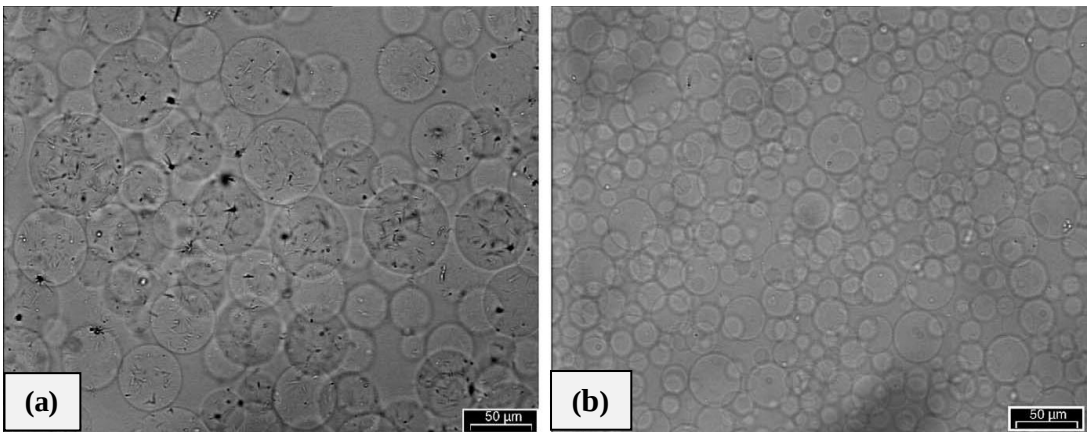


Figure III.5. Microphotographie optique de microsphères d'alginate chargées d'insuline (a) et de blanc (b) (grossissement 200 ×) préparées en utilisant les conditions standard

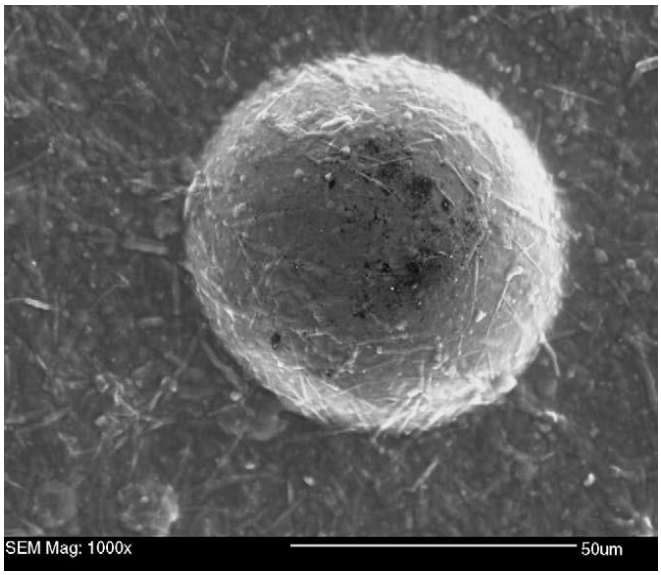


Figure III.6. Vue par MEB de laMorphologie et la taille des microsphères d'alginate chargées d'insuline selon la micrographie SEM (grossissement 1000 ×) préparée en utilisant les conditions standard.

b. Quantification de l'insuline encapsulée

Selon les résultats du tableau III.3, les paramètres suivants provoquent un effet sur les paramètres d'encapsulation :

- L'augmentation de la proportion de la phase aqueuse de 30 %à 50 % provoque une amélioration de l'EE de 10%.

- La variation du rapport molaire Acide/Ca de 1.5 à 3.5 (pour un rapport Ca/alginate de 7.3) conduit à une augmentation de l'EE de 65% à 76 %.

- La variation de la concentration d'alginate de 2 % à 3 % entraine une diminution de taux d'encapsulation de 4.2 % à 2.9 %.

c. Etude de la libération d'insuline

Les résultats de la cinétique de libération de l'insuline encapsulée dans les microsphères d'alginate aux conditions standards sont schématisés sur la figure III.6.

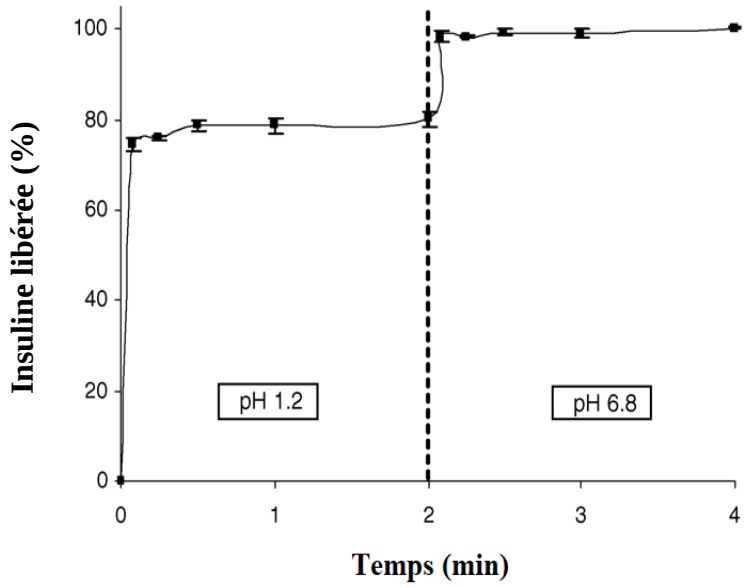


Figure III.7. Profil de libération in *vitro* d'insuline à partir des microsphères (préparées aux conditions standards) dans les liquides gastro-intestinaux.

A pH gastrique, la libération de l'insuline encapsulé est rapide et presque totale, elle atteint 75% dès les premières 5 min, mais au-delà de cette valeur elle devient lente où elle a conduit à un pourcentage de libération totale de 80 % à 2h.

Au passage au pH intestinal, une dissolution rapide et complète des microsphères s'est produit ce qui permet une libération totale et immédiate de l'insuline.

Il est important de noter que l'augmentation de la concentration d'alginate a provoqué une rétention légèrement plus élevée de protéines à pH 1.2. Ainsi, la libération d'insuline en milieu acide a diminué de 81,9 à 77,8 puis à 73,8% lorsque la concentration d'alginate augmente de 2 à 2,5 ensuite à 3% (données non présentées), cependant, une dissolution complète a également été observée après le transfert des microsphères au pH intestinal. Néanmoins, en raison de la viscosité plus élevée de la solution d'alginate, la formulation devient difficile avec des concentrations supérieures à 2,5%.

III.4.3. Discussions

a. Optimisation de la formulation

L'application de la méthode d'émulsification-gélification interne, permis de former des microsphères individualisées, ce phénomène est dû à la nature de l'huile minérale utilisée qui présente une viscosité importante ce qui provoque une diminution de la taille des gouttelettes en diminuant par conséquent la tension inter faciale d'où l'amélioration de la stabilité de l'émulsion.

1. *Effet de l'agent émulsifiant :* sa présence réduit la tension interfaciale entre les deux phases donc le diamètre des microparticules. D'autre part, il n'influe pas fortement sur l'efficacité d'encapsulation, d'où la valeur de 1% a conduit à diamètre minimal des systèmes préparés.

2. *Effet de la vitesse d'agitation :* une forte vitesse d'agitation a contribué à une hétérogénéité de la distribution des tailles (figure III.4), ceci est causé à la répartition des forces turbulentes dans le volume de l'émulsion. Ce qui a permis de choisir une vitesse de 400 tr/min pour préparer de petites microsphères avec une distribution étroite.

3. *Proportion de la phase aqueuse :* une proportion élevée entraine une augmentation de la taille moyenne, ceci est justifié par la fréquence importante des collisions lors de l'émulsification d'où la formation d'agrégats. Cependant, la diminution de la taille moyenne est associée à une diminution des paramètres d'encapsulation de l'insuline. Ceci est expliqué par le fait que la phase huileuse constitue une barrière contre la perte de protéines qui devient plus importante quand la proportion est importante. Donc une teneur de 30% a été choisie pour la formulation standard.

4. *Effet de la concentration d'alginate* : l'augmentation de la concentration d'alginate augmente la viscosité de la phase aqueuse ce qui rends plus difficile de disperser cette dernière dans la phase huileuse. Dans ce cas, une concentration de 2% d'alginate est considérée pour la formulation standard.

5. *Effet du rapport massique Ca/alginate :* lorsque ce rapport est élevé, une légère diminution de la taille des particules est observée, ceci est dû au rétrécissement du gel formé.

D'autre part, le degré de gélification de l'alginate est primordial pour la rétention des protéines à l'intérieur des microsphères, un rapport de 7.3 est choisi pour la formulation standard. Où des valeurs inférieures ou supérieures conduisent respectivement à un faible et un fort rétrécissement du gel.

6. *Effet du rapport molaire acide/Ca :* vu que l'acide assure la libération des cations Ca^{2+}, une quantité suffisante d'acide doit être utilisé pour garantir la dissolution de toute la quantité de carbonate de calcium afin d'assurer la gélification d'alginate. Dans ce cas, un rapport de 3.5 est considéré pour la formulation standard.

7. *Effet du rapport molaire Zn/insuline :* ce rapport n'a pas d'influence sur la distribution de la taille des particules et même sur l'encapsulation de l'insuline. Ceci est justifié par le faite que l'association de l'alginate avec le zinc est plus faible qu'avec le calcium et que les concentrations de zinc utilisées sont faibles. Néanmoins, un rapport molaire de 9 est choisi pour la formulation standard.

A la lumière des résultats obtenus, les microsphères préparées en utilisant les valeurs choisies des différents paramètres étudiés, montrent une distribution uni-modale de taille avec une moyenne de 53µm, une efficacité d'encapsulation de 79% et un taux d'encapsulation de 4.4%, correspondant à une dose de 1.3 UI d'insuline par mg de microsphères. Ce résultat est plus intéressant que ceux obtenus pour l'encapsulation de la même protéine soit dans les microsphères d'alginate enrobées de chitosane [43] ou les liposomes d'alginate-chitosane [44].

b.Libération de l'insuline

A pH 1.2, l'alginate se transforme en acide alginique, mais les microsphères conservent leur structure macroscopique. Ceci a été expliqué par la formation des liaisons hydrogène

avec dissociation des liaisons ioniques qui favorise la libération du médicament par diffusion.

En outre, les monomères d'insuline présentent des zones hydrophobes, qui pourraient interagir avec la phase huileuse où les molécules d'insuline se localisent au niveau de la surface des microsphères ce qui facilite son transfert vers l'extérieur.

A pH 6.8, l'acide alginique est converti en sel soluble d'alginate de sodium et la matrice polymérique est désintégrée en libérant complètement l'insuline non transféré dans la première étape.

CHAPITRE IV :

PARTIE EXPÉRIMENTALE

IV.I. Introduction

Notre travail consiste à encapsuler un PA dans des microsphères en vue de préparer un système à libération modifiée. Pour ce faire nous avons utilisé deux bio polymères très impliquées en industrie pharmaceutique.

L'étude menée vise à atteindre les objectifs suivants :

- Application de l'encapsulation par la combinaison : émulsification puis gélification interne.
- Caractérisations des microsphères obtenues.

Pour ce faire, nous avons utilisé les matières premières, le matériel suivant et nous avons appliqué les méthodes expérimentales suivantes.

IV.2. Matières premières

Les matières premières utilisées sont présentées dans le tableau IV.1

Tableau IV.1. Matières premières utilisées.

Matière première	Rôle
Alginate de sodium	Polymère matriciel
Chitosane	Polymère d'enrobage
Span 80	Agent d'émulsification
Huile d'olive	Phase huileuse
Eau distillée	Véhicule

IV.2.1. Principe actif[45]

C'est une substance chimique qui possède des propriétés thérapeutiques. Cette substance n'est pas obligatoirement chimiquement pure. Elle peut être composée de plusieurs isomères

IV.2.2. Excipients

a. Huile d'olive

Est une variété d'huile alimentaire, à base de matière grasse végétale extraite des olives (fruits d'olives cultivés en oliveraie d'oléiculture) lors de la trituration dans un moulin à huile,
Les caractéristiques physico-chimiques de l'huile d'olive sont résumées sur le tableau IV.2

Tableau IV.2. Caractéristiques physico-chimiques des huiles d'olives [46].

Caractéristique	***Unité***	***Description ouvaleur***
Aspect	---	Trèsfluide
Odeur	---	Sans
Couleur	---	Vert
Gout	---	Intense ou fruit vert
Miscibilité		Non miscible à l'eau
Viscosité	Cp	84
Masse volumique à 20°C	g/cm^3	0.914-0.918

b. Alginate de sodium

L'alginate se présente en poudre ou granulés qui donnent des solutions dont la viscosité varie avec le degré de polymérisation.
Les caractéristiques de l'alginate de sodium utilisé dans cette étude sont présentées dans le tableau IV.3.

c. Chitosane

C'est un polysaccharide qui présente dans la carapace des crustacés et des mollusques. Vue sa les groupements amines que contient la molécule du chitosane, il trouve de nombreuses applications en pharmacologie, cosmétologie, médecine et en traitement des eaux.

Les caractéristiques du chitosane utilisé dans cette étude sont présentées dans le tableau IV.4

Tableau IV.3. Caractéristiques physico-chimiques de l'alginate de sodium (Sigma-Aldrich).

Caractéristique	***Unité***	***Description ouvaleur***
Aspect	---	Poudre blanche-jaunatre.
Odeur	---	Sans
Gout	---	Sans
Solubilité	---	- Insoluble : Ethanol, éther, chloroforme, solvants organiques, solutions aqueuses (pH < 3).
Point de Fusion	°C	> 300
Viscosité (1g/l	Cp	15-25

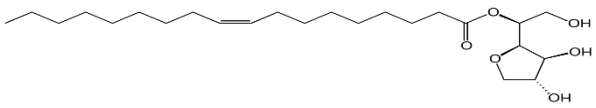
Tableau IV.4. Caractéristiques physico-chimiques du chitosane utilisé (Sigma-Aldrich)

Caractéristique	***Unité***	***Description ouvaleur***
Aspect	---	Poudre amorphe de couleur beige
Odeur	---	Sans odeur
Solubilité		- Insoluble dans l'eau et les solvants organiques. - Soluble dans les acides dilués (comme
Degré de dés-acétylation	%	75-85
Poidsmoléculaire	kDa	190-310
Point de Fusion	°C	
Viscosité à 1% dans l'acide acétique à 1% (25°C)	cps	200-800

a. Span 80

De la famille des esters de sorbitane (classe de tensioactifs non ionique). Il est utilisé comme émulsifiant dans la préparation des émulsions eau dans huile. Les paramètres de ce tensioactifsont décrits dans le tableau IV.5

Tableau IV.5. Caractéristiques du tensioactif utilisé (Sigma-Aldrich)

Caractéristique	***Description ouvaleur***
Nom chimique	Monooléate de sorbitane
Formulechimique	
Masse Molaire	428.62 g/mol
Densité (20°C)	0.986 g/cm^3
HLB	4.3

b. Autres réactifs chimiques

Tous les réactifs chimiques utilisés dans ce travail sont ordonnés dans le tableau IV.6.

Tableau IV.6. Réactifs chimiques utilisés.

Réactif	***Formule***	***Fournisseur***
Acide acétique glacial	$C_2H_4O_2$	KGaA Allemagne
Acide chlorhydrique	HCl	Honeywell FLUKA
Acétate de sodium	$C_2H_3NaO_2$	VWR Chemical
Carbonate de calcium	$CaCO_3$	UNIVR
Chlorure de potassium	KCl	VWR CHEMICALS
Chlorure de calcium	$CaCl_2$	HUMISTORE
Chlorure de sodium	Na Cl	VWR Analarnormapur
Dihydrogénophosphate de potassium	KH_2PO_4	VWR CHMICALS
Dihydrogénophosphate de sodium	NaH_2PO_4	VWR International SAS
Hydrogénophosphate de potassium	$KHPO_4$	VWR Analarnormapur
Tween 80	$C_{64}H_{124}O_{26}$	VWR

IV.2. 3. Matériel

Les manipulations réalisées ont nécessité d'utiliser le matériel détaillé dans le tableau IV.7.

Tableau IV.7. Matériel utilisé.

Matériel	***Marque***
Balance électrique	Sartorius
Agitateur magnétique avec plaque chauffante	SCIENTIFICA
pH-mètre	HANNA
Spectrophotomètre infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)	SHIMADZU
Spectrophotomètre UV-Vis	(UV mini-1240 SHIMADZU)
Microscope optique	OPTIKA
Dissolutest	SOTAX
Conductimètre	WTW
pied à coulisse	ABSOLUTE DIGIMATIC

IV.3. Méthodes expérimentales et techniques de caractérisation

IV.3.1. Caractérisations spectrales des matières premières

Cette partie consiste à caractériser le PA, l'alginate de sodium et le chitosane par UV-Vis et FTIR.

a. Caractérisation par UV-Vis du PA

- ***Principe [47]***

La spectrométrie d'absorption moléculaire dans le domaine ultraviolet, dont l'absorption des longueurs d'ondes allant de 18 à 380nm, et celle du visible de 380 à 800nm, est une technique d'analyse des composés chimiques à partir des groupements d'atomes qui absorbent le rayonnement électromagnétique.

L'absorption de la lumière UV-Vis par les molécules provoquent des transitions électroniques avec différentes d'énergie où les longueurs d'onde d'absorption dépendent de du type de l'électron de la substance analysée.

- ***Mode opératoire***

Il se résume dans la détermination de la longueur d'onde et dans l'établissement de la courbe d'étalonnage.

En premier lieu, le balayage a été effectué pour des solutions aqueuses de PA de 20 mg/l aux pH 1.2, 7 et dans l'eau distillée. La courbe obtenue permet d'identifier la valeur de λ_{max} de la molécule de PA.
En second lieu, et aux longueurs d'onde maximales identifiées, on mesure les DO pour une série de solutions aqueuses préparées aux pH 1.2, 7 et dans l'eau distillée de concentrations allant de 0 à 50 mg/l. Les courbes d'étalonnage obtenues s'expriment par la variation de la DO en fonction de la concentration du PA.

b. Caractérisation par FTIR

- ***Principe [47] :***

La spectroscopie IR est basée sur l'absorption des radiations électromagnétiques qui corresponds à des longueurs d'onde comprises entre 0.78 et 1000 μm, cette bande spectrale est devisée en trois régions : proche IR (12 500 à 4000 cm^{-1}), moyen IR (4000 à 400 cm^{-1}) et IR lointain (400 à 10 cm^{-1}). La région du moyen infrarouge est la plus utile du fait des informations aboutis sur les structures des composés examinés.

La FTIR est une technique d'analyse utilisée pour obtenir les spectres d'absorption ou d'émission où l'échantillon est traversé avec un faisceau de lumière polychromatique ce qui entraine une absorption simultanée aux différents nombres d'onde.La séparation des différentes radiations et la mesure de l'énergie absorbée pour chacune d'elles est réalisée à l'aide d'un système de franges d'interférences. La mesure de l'intensité lumineuse de chaque frange permet de déterminer un interféro-gramme.

- ***Mode opératoire***

Les spectres FTIR ont été obtenus par préparation des pastilles de PA/KBr, alginate de sodium/KBr et chitosane/KBr avec une proportion de 1 %. Tous les échantillons ont été préalablement séchés à l'étuve à 50°C pendant 6h.

La préparation des pastilles a été réalisée par broyage de la substance à analyser en présence du KBr, le mélange est ensuite comprimé sous une pusse (presse). En fin, les pastilles ont été mises pour analyse FTIR où les spectres d'absorption infrarouge ont été enregistrés dans la gamme de nombres d'onde comprise entre 400 et 4000 cm^{-1}.

IV.3.2. Préparation des microparticules

a. Préparation des solutions tampon, [48]

- *Solution tampon acétate pH4.5* : Dans une éprouvette graduée de 1 L, introduire 800 ml d'eau distillée et ajouter 2,99 g de sodium d'acétate puis laisser sous agitation jusqu'à dispersion totale de la poudre.

- *Solution tampon pH 1.2 :* Cette solution se compose de chlorure de potassium et l'acide chlorhydrique (50ml de KCl à 0,2 N+85ml d'HCl à 0,2N) dans 200ml d'eau distillée.
- *Solution tampon pH 7.4 :* Cette solution contient 2.315 g de sodium hydrogenophosphate de sodium anhydre (Na_2HPO_4) et 4.358 g de dihydrogenophosphate de sodium anhydre (NaH_2PO_4) dans 800ml d'eau distillée. Le pH final de la solution est ajusté avec une solution d'acide phosphorique ou une solution de NaOH à 0,1M. Le volume final de la solution est ajusté à1000ml avec l'eau distillée.
- *Solution tampon saline pH=7.4 :* Cette solution contient 2.38g de Na_2HPO_4 .$12H_2O$ (ou l'équivalent de Na_2HPO_4anhydre), 0.19g de KH_2PO_4et 8g de NaCl dans 1000ml l'eau distillée.

b. Principe du procédé d'émulsifcation

Cette expérience consiste à préparer une émulsion eau dans huile en utilisant un agent émulsifiant (Span 80).

Pour ce faire, nous avons préparé des émulsions E/H en faisant varier les concentrations d'alginate, de carbonate de calcium ainsi que la proportion de la phase aqueuse.

c. Etapes de préparation des microsphères

1.Préparation de la solution (S1) d'alginate de sodium et de PA

Cette étape consiste à dissoudre une masse d'alginate de sodium et une masse de PA dans un volume d'eau distillée.

2. Préparation de la suspension de carbonate de Calcium

Une masse de carbonate de calcium est mis en suspension aqueuse afin d'assurer les ions calcium.

3. Préparation de la phase aqueuse(S2)

La phase aqueuse est composée de la solution S1 et de la suspension de carbonate de calcium. Le mélangea été mis sous agitation pendant 15min.

4. Préparation de la phase huileuse

Il s'agit de la solution d'huile d'olive à une teneur de 1.5% de Span 80.

5. Préparation de l'émulsion

Elle consiste à ajouter la phase aqueuse (S1) à la phase huileuse portée sous agitation à 1000 tr/min pendant 15min.

6. Gélification

Elle est assurée par addition graduelle à l'aide d'une pipette, un volume (V) d'acide acétique glacial ($V_{\text{acide acétique glaciale}}$) qui dépend de la masse de $CaCO_3$

7 Lavage et rinçage des microsphères

La phase huileuse a été éliminée et les microsphères obtenues contenues dans la phase aqueuse ont subi deux opérations de lavage et de rinçage :

- La première par une solution de $CaCl_2$(0.05M) à 1% de tween 80 (V = 150ml), où le mélange a été porté sous agitation.
- La deuxième, et après avoir récupérés les microsphères par filtration, elle a été réalisée par une solution tampon acétate pH4.5.

8. Enrobage par chitosane

Cette étape consiste à faire mélanger les microsphères obtenues dans une solution de chitosane à 0.5 % (dans l'acide acétique glacial) contenant le $CaCl_2$ à 0.5%. Le mélange a été porté sous agitation pendant 1h.

En fin, les microsphères ont été filtré puis rincées à l'aide d'une solution de $CaCl_2$ à 0.5%.

9. Séchage

Apres récupération des microsphères, ces dernières ont été portées dans des boites de pétris puis séchées à l'air libre.

IV.4.3. Caractérisation des microsphères

a. Analyse par microscopie optique

La morphologie et la forme des particules prises à l'état humide et à l'état sec a été réalisée à l'aide de microscope optique.

b. Analyse granulométrique des particules

Un choix au hasard de trois séries de particules contenant 20 particules prises à l'état sec et à l'état humide a été réalisé. Puis nous avons mesuré le diamètre moyen à l'aide d'un pied à coulisse.

c. Etude du gonflement des particules

Cette étude permet d'établir son taux d'absorption et l'augmentation de volume des particules au cours du temps. Trois milieux de gonflement ont été testés :

Milieu 1 : solution tampon pH=1.2.

Milieu 2 : solution tampon pH=7.4.

Milieu 3 : eau distillée.

Le mode opératoire consiste à réaliser les étapes suivantes :

- Peser environ 50mg (n fois) de particules sèches sur une balance analytique de précision.
- Incorporer ces particules dans 25ml du milieu de dissolution.

- A des intervalles de temps réguliers (15min pendant la 1erh puis chaque 1h jusqu'à 8h), les particules sont retirées du milieu de dissolution, posées sur du papier absorbant pour enlever l'excès de liquide ;
- Peser les capsules obtenues à l'aide d'une balance analytique de précision.

Le taux de gonflement (TF) a été calculé en utilisant la formule (III.1):

$$TF\ (\%) = \frac{m_0 - m_i}{m_i} \times 100 \qquad \text{(III.1)}$$

Avec

m_0 : Masse initiale de PA

m_g: Masse finale de PA

d. Quantification du PA encapsulé

0.4 g de particules séchées et immergées dans 25ml de solution tampon saline (pH=7.4) dans un flacon ambré. Ce mélange est agité à 200 tr/min pendant 24h.Ensuite, la solution a été centrifugé à 5000tr/min et le surnageant a été recueilli pour calculer la quantité de PA présente dans les billes. Le contenu de PA sera calculé à partir de l'absorbance mesurée à une longueur d'onde d'absorption maximale (λ_{max}) par spectrophotomètre UV-Vis.
Les différents paramètres d'encapsulation ont été calculés en utilisant les expressions (I.1 à I.3).

e.Etude de la cinétique de libération du PA encapsulé

Le mode opératoire du test de dissolution in *vitro* de KF a été réalisé dans un dissolutest. L'expérience consiste à utiliser un godet de 900 ml de milieu de dissolution (pH 1.2 et pH 7.4 et l'eau distillée). Pendant cet essai le dissolutest est réglé à une température de 37 ± 0,5 °C et une agitation de 100 tr/min. Introduire 100 mg de microparticules dans le panier et le placer dans le dissolutest sous agitationendansun intervalle de temps bien déterminé. Prélever 10 ml de milieu de dissolution et filtrer immédiatement d'un filtre seringue de porosité 0,45 µm puis remplacer le même volume prélevéavec le milieu de dissolution pour la reconstitution du volume totale du godet. Les échantillons obtenus sont analysés par spectrophotométrie UV-Vis.

f. Analyse par FTIR

Cette analyse a été réalisée sur les microparticules séchées à l'étuve à 50°C pendant 6h.

IV.4. Présentation de quelques résultats obtenus

IV.4.1. Formulation des émulsions eau/huile

Les émulsions eau dans huile sont formulées par dispersion des gouttelettes de la solution aqueuse contenant l'alginate de sodium et le PA dissout dispersée dans l'huile d'olive contenant le span 80.

Sur ce principe, nous avons réalisé les 8 combinaisons décrites dans le tableau IV.10.

Sur les 8 formulations, nous avons effectué une vue par microscope optique. Les photos des émulsions obtenues sont illustrées sur les figures IV.1 et IV.2.

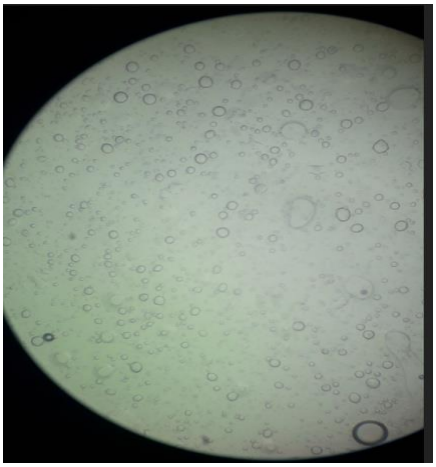


Figure IV.1. Vue microscopique de l'émulsion E/Hà 30% de phase aqueuse ; grossissement :x100.

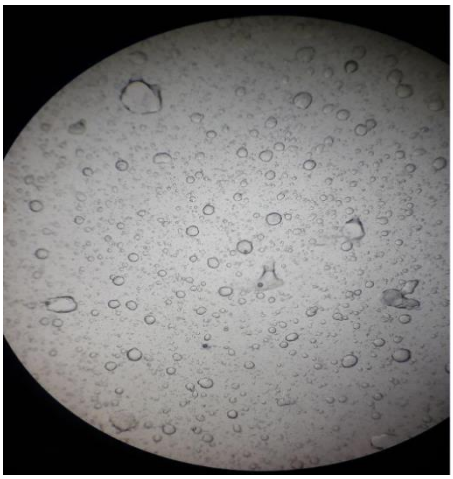


Figure IV.2. Vue microscopique de l'émulsion E/H à 40% de phase aqueuse ; grossissement : x100.

Pour les formulations d'émulsions E/H aux proportions correspondantes, les gouttelettes sont individualisées et possèdent des formes circulaires (pour toutes les concentrations d'alginate de sodium).

IV.4.2. Microsphères obtenues

Pour les deux formulations obtenues, nous avons tenté à optimiser les concentrations de carbonate de calcium et celle de l'acide acétique glacial.

A cette étape, seuls les essais de 1 et2 ont été réalisés et ceci sans passer aux étapes de séparation et de séchage.

Les formulations correspondantes sont illustrées sur les figures IV.3 à IV.4.



Figure IV.3. Aspect des microparticules obtenues pour l'essai N°1.



Figure IV.4. Aspect des microparticules obtenues pour l'essai N°2.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Ce travail rassemble une synthèse bibliographique qui a visé à mettre en détail :

- La microencapsulation, en présentant les types de microparticules et les procédés de leur préparation, les différentes applications mises en point, ainsi que la cinétique de libération des principes encapsulés.
- Les principales classes des biopolymères, vis-à-vis leurs propriétés physico-chimiques et leurs applications potentielles dans les domaines d'intérêt.
- La mise en évidence de la stratégie de préparation des systèmes microsphériques par la méthode émulsification/gelification interne.

En effet, les microsphères d'alginates constituent un biomatériau potentiel dans la mise en encapsulation des matières actives, en raison de la biocompatibilité de l'alginate, de ses propriétés biodégradables ainsi que sa capacité de formation de gel.

Les sels d'alginate sont des molécules naturelles,douéesd'intérêtqui ne cessent d'accroitredepuis leurs découvertes, afin d'aboutir à une industrialisation et une commercialisation mondiale

Outre la propriété principale des alginates, ilspeuvent être dignes des propriétés multiples : stabilisant, agent de suspension, agent de viscosité, liant pour comprimés, agent de désintégration pour comprimés et émulsifiant.

De ce fait, ces molécules peuvent trouver une applicationdans de nombreux domaines, allant de l'industrie textile, l'agro-alimentaire, la médecine, le pharmaceutique à la cosmétologie.

L'industrie pharmaceutique voire biopharmaceutique s'est intéressée à l'ensemble de ces molécules et s'est orienté toujours vers le développement de nouvelles formes à administration préconisée contenant un ou plusieurs matières actives sur la base d'utilisation d'alginate soit seul ou associé à un autre polymère.

Concernant l'émulsification/gélification interne, les microsphères obtenues présentent certaines caractéristiques telles que : la morphologie, la taille, la texture, les paramètres d'encapsulation et la cinétique de libération. Celles-ci dépendent fortement des paramètres de formulation et ceux du procédé.

A la lumière de l'analyse du travail traité qui avait pour objectif l'encapsulation de l'insuline par l'émulsification/gélification interne, les résultats aboutis par le chercheur montrent que

les paramètres dont la qualité des microsphères obtenues sont : la concentration de l'agent émulsifiant, la vitesse d'agitation, et le rapport massique Ca/alginate.

Ainsi, les ions de calcium et la quantité d'acide ne doivent être si insuffisants ni en excès, ce qui a permet de conclure que le degré de gélification de l'alginate est un paramètre fondamental pour la rétention des protéines à l'intérieur des microsphères.

Cependant, à pH gastrique,malgréqu'une libération rapide et élevée de l'insuline a été atteinte, ce milieu n'est pas compatible avec la sensibilité de la protéine à l'attaque enzymatique. D'où la formulation obtenue doit être améliorée par inclusion d'autres polymères avec l'alginate pour empêcher la libération de l'insuline à pH acide.

En perspective, il faut signaler notre objectif qui a était ciblé au début de l'étude était d'une part de préparer des microsphères d'alginate et de chitosane chargées de principe actif par la méthode émulsification/gélification interne et d'autre part, d'étudier les paramètres dont dépend la formulation. Vue que n'avons pas pu arriver à atteindre cet objectif à cause de l'épidémie du Corona virus : Covid 19, on propose de le réaliser à venir.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

[1]Richard. J, Benoit. J, «Micro encapsulation», Technique de l'Ingénieur, J 2210, (2000).

[2]Boh. B, Sumga. B, «Microencapsulation Technology and its applications in buidding construction materials», RMZ Materials and Geoenvironment, vol 55, N°3(2008).

[3] Boukara. K, Boukhari. H, « Caractérisation physico-chimique d'un hydrogel à base d'un bio polymère pour une application pharmaceutique», Mémoire de Master, Université de Médéa (2019).

[4] Arroudj. C, Benameur .H, « Etude d'un procédé de micro encapsulation par émulsification d'un principe actif anti-inflammatoire et caractérisation biopharmaceutique», Mémoire deMaster, Université A. Mira, Bejaia (2016).

[5]M.Fuchs,C.Turchiuli, M.Bohin, M.E.Cuvelier, C.Ordonnaud, M.N.PeyratMaillard "encapsulation of oil in powder using spray drying and fluidised bed agglomeration", Journal of food Engineering, 75, 2006.

[6]S.Leclercq, C.Milo, G.Reineccius,"Effects of Cross –Linking, Capsule Wall Thickness, and compound Hydrophobicity on Aroma Release from Complex CoacervateMicroencapsules"Journal of Agricultural and food Chimistry, 57, 2009.

[7]S.Giraud, « Microencapsultion d'un disocyanate et d'un phosphate d'ammonium-Application élaboration d'un système polyuréthane mono composant à propriété retardatrice de flamme pour l'enduction textile », Thèse de doctorat, Université de Lille ,2002 .

[8]Nesterenko. A, « Etude et fonctionnalisation de protéines végétalesen vue de leur application en micro encapsulation ».Thèse de doctorat, Université de Toulouse ,2012.

[9]Bile.J, « Micro encapsulation d'agent antimicrobien pour le développement de conditionnements primaires fonctionnalisés », Thèse de Doctorat, UniversitéCloud Bernard-Lyon l, (2015).

[10] Bartkowiak.A, Hunkeler.D**, «** Alginate –oligochitosan Microcapsules: A mechanistic study relating membrane and capsule proprieties to reaction condition», Chemistry of Materials, 11(9)(1999).

[11]Yaung. Y,Chung.T.S, « Morphology,drug distribution ,and in vitro release profiles of biodegradable polymeric microspheres containing protein fabricated by double –emulsion solvent extraction /evaporation method", Biomaterials 22(3), (2001).

[12] Shah. S.S, Cha. Y, Pitt?C.G**,«**Poly (Glycolic Acid –Co-DI-Lactic Acid)-Diffusion or Degradation Controlled Drug Delivery», Journal of controlled Release .18(3), (1992).

[13] Soares-LatourÉ.M., « Synthèse de microcapsules biosourcées pour des applicationscosméto-textiles », Université Claude Bernard - Lyon I, 2012

[14]Reis C.P, Neufeld R.J, Ribeiro A.J, Veiga. F, « Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles », Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine 2 (8), 2006

[15] E. Morales, M.Rubilar,C.Burgos-Díaz, F.Acevedo, "M.Penning, C.Shenec,"Alginate/Shellac beads developed by external gelation as a highly efficient Model system for oil encapsulation with intestinal delivery",Food Hydrocolloids, 2016

[16] Félicie.T, « Conception et mise en œuvre d'un procédé intensifie continu de micro encapsulation par polycondensation interraciale», Thèse de Doctorat, Université de Toulouse, (2009).

[17] Khaber.A.M,«Développement pharmaceutique de formes à libération prolongée de tramadol à base de matrice hydrophile : Hydroxy PropylMethyl Cellulose », Mémoire de Magister, Université Ferhat Abbas, Sétif, 2011

[18]Mazouni.M, «Dépollution des eaux usées par un support naturel Chitosane-polyaniline », Mémoirede Master,UniversiteAbou-BekrBelkaid– Tlemcen(2016).

[19]Skjak-braek. G, Anthonsen.T,«Sandford p-Chitin and chitosan Sources, chemistry, biochemistry, physical properties and applications», Elsevier London and New York (1989).

[20]NugrahaE.S, « Développement de films biodégradables à base de chitosane: études du mélange chitosane/PLA, de la plastification et de la comptabilisation», Thèse de Doctorat, Université de Reims, (2006).

[21]Aranaz.I, Mengibar. M, Harris. R, Panos. I, Miralles. B, Acosta. N, Galed. G. Heras. A, « Functional characterization of chitin and chitosan»,Current Chemical Biology, 3, (2009).

[22] Brugnerotto. J, Lizardi. J, Goycoolea. F.M, ArgUelles-Monal. W, Desbrières. J, Rianudo. M«Aninfrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization», Polymer, 42, (2001).

[23]ImzI.S,Ziane.S,«ElaborationetCaractérisationd'unNanocompositeàMatrice Chitosane(CS)», Mémoire de Master, UniversitéA.Mira, Bejaia, (2018).

[24]Shahidi. F,Abuzaytoun. R,« Chitin, chitosan, and co-products: Chemistry, production, applications and health effects»,Advances in Food and Nutrition Research, 49, (2005).

[25]« Hydrocollides : Pectines, Alginates, Gar », Edition Mero-Rousselot-Satia, (1976

[26]François.G.J, « Nanotubes de carbone pour la délivrance transdermique électro-stimulée de substances biologiquement actives », Thèse de Doctorat, Université De Toulouse, (2017).

[27]Vincent.E, « Les Alginates et leurs applications en pharmacie et en ingénierie. Application à la construction d'un biomatériau », Thèse de Doctorat, Université Henri Poincare-Nancy 1, (2010).

[28]N. Mokran, « Préparation et étude du comportement de membranes bio polymères alginate de sodium/chitosane », Mémoire de Magister, Université M'hamedBougara-Boumerdes, 2013.

[29]S.Bouriche, « Encapsulation de la metformine dansdes polymères biodégradables », Mémoire de Magister, Université de Bejaia, 2013

[30] F.Bdaoui**, «**comportement de solution de biopolymères.Application au chitosane, poly (vinyl alcool) et à leurs mélanges», mémoire de magister en Génie des polymères, université M' Hamed.Bougara, Boumerdes ,2011-2012.

[31] J-Y. Leong, W-H. Lam, K-W.Ho, W-P.Voo, M. F-X. Lee, H-P. Lim, S-L. Lim, B-T.Tey, D.Poncelet, E-S. Chan, "Review, Advances in fabricating spherical alginate hydrogels with controlledparticle designs by ionotropic gelation as encapsulation systems", Particuology, (2015)

[32] N. T.ThanhUyen, Z. A. Abdul Hamid, N. X.Thanh Tram, N. Ahmad, "Fabrication of alginate microspheres for drug delivery: A review", International Journal of Biological Macromolecules, 153, (2020).

[33] J. P. Paques, "Formation of Alginate nanospheres", Thèse de Doctorat, Université de Wageningen, (2014).

[34] S. H.Ching, N. Bansal, B. Bhandari, "Alginate gel particles–A review of productiontechniques and physical properties", Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 57(6), (2017).

[35] C. M. Silva, A. J. Ribeiro, I. V.Figueiredo, A. R.Gonc¸alves, F.Veiga, « Alginate microspheres prepared by internal gelation: Development and effect on insulin stability", International Journal of Pharmaceutics, 311, (2006).

[36] G. W. Vandenberg, J. De La Nouè, « Evaluation of protein release from chitosan-alginate microcapsules produced using external or Internal Gelation",Journal of microencapsulation, 18 (4), (2001).

[37] H. Guan, D. Chi, J. Yu, H. Li, "Encapsulated ecdysone by internal gelation of alginate microspheres for controlling its release and photostability », Chemical Engineering Journal, 168, (2011).

[38] H. Song, Ramdas, W. Paul, K.J. DileepW. Yu, M. Gao, X. Liu, X. Ma, "Microencapsulated probiotics using emulsification technique coupled with internal or external gelation process", Carbohydrate Polymers, 96, (2013).

[39] A. T.Holkem, G. C.Raddatz, J. S.Barin, E. M. M. Flores, E. I. Muller, C. F.Codevilla, E. Jacob-Lopes, C. R. F. Grosso, C.Ragagnin de Menezes, "Production of microcapsules containing Bifidobacterium BB-12 by emulsification/internal gelation", LWT - Food Science and Technology 76 (2017)

[40] D. Quong, R. J. Neufeld, G. Skjåk-Bræk, D. Poncelet, "External Versus Internal Source of Calcium During the Gelation of Alginate Beads for DNA Encapsulation", Biotechnology And Bioengineering, 57 (4), (1998)

[41] M. Ahmed, S.Abd El-Rasoul, S. H. Auda,Mohamed, A. Ibrahim, "Emulsification/internal gelation as a method for preparation of diclofenac sodium–sodium alginate microparticles", Saudi Pharmaceutical Journal, 21, (2013).

[42] D. Poncelet, R. Lencki, C. Beaulieu, J.P. Halle, R.J. Neufeld, A. Fournier, « Production of alginate beads by emulsification/internal gelation. I. Methodology". Applied Microbiology and Biotechnology, 38, (1992).

[43] L.R. Moses, K.J. Dillep, C/P. Sharma, "Beta cyclodextrin-insulin encapsulated chitosan/alginate matrix: oral delivery system". Journal of Applied Polymer Science, 75, (2000).

[44] M., Y. Anitha, C.P. Sharma, "Lipoinsulin encapsulated alginate-chitosan capsules: intestinal delivery in
Diabetic rats". Journal of Microencapsulation, 17, (2000).

[45] https//www.futura-sciences.com : consulté le 30/04/2020

[46]https//fr.m.wikipedia.org : consulté le 30/04/2020

[47] Hamon.M, Pellerin.F, Guernet.M, Mahuzeir.G, « Chimie analytique, Méthodes spectrales et analyse organique, tome 3 », Edition Masson, 2ème Edition, Paris, 1990.

[48]Pharmacopée Européenne ,10éme Edition, (2009)