REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURE ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE DE MEDEA

FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA MATIERE



Mémoire

Présenté pour obtenir le diplôme de **Master**

En chimie

Spécialité : Chimie Pharmaceutique

Par :

KIHELI FELLA

ABDALLAH EL HADJ SELMA

Thème :

Développement d'un système à libération modifiée d'un principe actif à partir de microparticules biopolymériques

Soutenue publiquement le : 09 /2020 , Devant le jury composé de :

Dr.YAHOUM MADIHA	MCB	UYFM	Président
Dr.TURKMAN NAILA	MCB	UYFM	Examinateur
Dr. REBOUH SAMIA	MCA	UYFM	Encadreur
Dr. LAFENAOUI SONIA	MCA	UYFM	Co-Encadreur

Année universitaire 2019 /2020


بسم الله الرحمن الرحيم

الملخص: الهدف من هذا العمل هو الكبسلة باستعمال مركب متعدد الإلكترونية المكون من الجيلاتين والأجار أو الجيلاتين وألجينات الصوديوم. تمت دراسة خصائص المركب عن طريق قياس درجة الحموضة، الناقليةو الإمتصاصية. أظهرت القياسات تركيز أمثل بنسبة 1٪ (وزن / حجم) لـجيلاتين وتركيز أمثل 0.1٪ (وزن / حجم) لاجار واختيار نسبة الحجم (5/5). تظهر الدراسات أن كبسولات الجيلاتين المغلفة بـ 20٪ ألجينات ظلت سليمة لمدة تصل إلى 8 ساعات في SGJ، ومتوسط حجم الجسيمات هو 400.8 ميكرومتر. بلغ عدد الخلايا القابلة للحياة التي تم إطلاقها من الكبسولات الدقيقة ذروته عند 10^{10} وحدة تشكيل/مل في اليوم 35. وأخيرًا لاستغلال نتائج الدراسة التجريبية للنموذج الذكي ANFIS لفهم العلاقة بين عملية الكبسلة الدقيقة ومعلمات الإطلاق والتحلل البيولوجي وصلاحية البكتيريا المغلفة (BaciSub SL-13) .

الكلمات المفتاحية: ألجينات الصوديوم , الأجار , الكبسلة, جيلاتين ,مركب متعدد الإلكترونية.

Résumé : L'objectif de ce travail est l'encapsulation cellulaire à base d'un complexe polyelectrolyte (PEC) formé par gélatine (GE) et Agar (AG) ou gélatine et alginate de sodium (NaALG). Les caractéristiques des PEC formés ont été étudiées par la mesure du pH, de la conductivité et de la turbidité. Les mesures ont montré une concentration optimale de 1 % (P/V) pour GE et une concentration optimale de 0.1% (P/V) pour AG et choisir le rapport volumique de (5/5). Les études montrent que les capsules de gélatine enrobée de 20 % d'alginate est restée intacte jusqu'à 8 h dans le SGJ, et la Taille moyenne de particules est 400,8 µm, Le nombre de cellules viables libérés par les microcapsules ont atteint le maximum de 10^{10} CFU/mL le $35^{ème}$ jour. Et enfin d'exploiter les résultats de l'étude expérimentale par le model intelligent ANFIS pour comprendre la relation entre le processus de microencapsulation et les paramètres de la libération, la biodégradation et la viabilité des bactéries encapsulées (BaciSub SL-13).

Les mots clés : Agar, Alginate de sodium, Complexes électrolytes. Encapsulation , Gélatine.

Abstract: The aim of this work is cell encapsulation based on a polyelectrolyte complex (PEC) formed by gelatin (GE) and Agar (AG) or gelatin and sodium alginate (NaALG).The characteristics of the PECs formed were studied by measuring the pH, conductivity and turbidity. The measurements showed an optimum concentration of 1% (W / V) for GE and an optimum concentration of 0.1% (W / V) for AG and choose the volume ratio of (5/5). The Studies show that gelatin capsules coated with 20% alginate remained intact until 8 h in SGJ. And Average particle size is 400.8 µm. The number of viable cells released by the microcapsules has reached the maximum number of 10^{10} CFU / mL on day 35. And finally to exploit the results of the experimental study with the intelligent ANFIS model to understand the relationship between the microencapsulation process and the parameters of release, biodegradation and viability of encapsulated bacteria (BaciSub SL-13).

Key words : Agar,Alginate de Sodium, encapsulation, Gélatine, polyelectrolyte complexe.

Remerciements

En préambule à ce mémoire, Nous tenons à remercier Dieu tout puissant de nous avoir donné la force le courage et la patience pour mener à terme ce travail.

Nous remercions chaleureusement notre promotrice **Dr. REBOUH-BOUHEDDA. Samia** pour tout l'aide qu'elle nous a apporté, pour ses fructueux conseils, pour sa disponibilité, pour sa patience et pour ses encouragements continuels à finir ce travail.

Nous remercions également notre Co-promotrice **Dr. LEFNAOUI.Sonia** pour le privilège qu'elle nous a fait en acceptant de co-diriger ce travail. Sa gentillesse, sa modestie, sa riche expérience et l'accueil cordial qu'elle nous a toujours réservé, et inspiré, une grande admiration à son égard.

On remercie l'ensemble des membres du jury pour avoir voulu accepter de juger ce travail

Nous remercions tous nos enseignants qui nous ont guidés tout au long de notre vie universitaire.

Nous remercions nos très chers parents, qui ont toujours été là pour nous, nos sœurs, nos amis, et tous nos collègues pour leurs soutiens inconditionnels et leurs encouragements.

Espérant à la fin que notre travail va satisfaire les
membres du jury tout en acceptant leur évaluation qui
nous fait plaisir

Dédicace

Je dédie ce modeste travail en signe de respect, reconnaissance et de remerciement a:

ALLAH,

Le tout puissant, le miséricordieux, nous te rendons grâce en disant Alhamdoulilah !!!

Mes Chers Parents,

Je ne trouverai jamais l'expression forte pour vous exprimer tout mon amour, ma reconnaissance et ma profonde gratitude pour vos sacrifices.

Je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance et j'espère que votre bénédiction m'accompagne toujours.

Puisse Dieu, le tout puissant, pour qu'il vous accorde longue vie et le Très Haut, vous accorder santé, bonheur et faire en sorte que jamais je ne vous déçoive.

Beau-père & belle-mère,

Je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous m'avez apporté depuis mon retour pour terminer mes études, ce qui s'est passé grâce à vous, et j'espère que vous serez toujours une bénédiction pour moi.

Mon cher mari,

Je vous remercie pour tout l'amour que vous m'avez apporté, j'ai toujours été de mon côté et ne m'a jamais apporté de soutien, même lorsque vous m'aidiez parfois à accomplir mon travail.

J'espère que Dieu Tout-Puissant, pour qu'il vous accorde longue vie, vous protégera et me donnera l'occasion de vous remercier.

Mes chères sœurs

Soulef, Ramzia, Fethia et Narimen je vous souhaite un avenir plein de joie

Mes frères

Abdelkader, Yahia et Khaled, Ceux que je considérais tous mes liens dans ma vie ne m'ont jamais laissé tomber, Je vous souhaite un avenir plein de bonheur.

Ma meilleure Promotrice

Dr.Rebouh-Bouhedda. Samia avec qui j'ai passé les meilleurs moments de ce travail, Je vous remercie pour la confiance que vous nous avez accordée et pour tout le soutien que vous nous avez apporté.

Ma chère binôme et ami Selma qu'Allah te protèges.

Les frères et les sœurs de mon mari Lotfi, Amine, Anisa et Hanane

Tous mes enseignants et mes amis de master spécialité Chimie Pharmaceutique.

Fella

Dédicace

Avec toute modestie, je dédie ce travail :

A Mes chers parents

Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour
éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consenti
pour mon instruction et mon bien être.
Je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me portez
depuis mon enfance et j'espère que votre bénédiction m'accompagne toujours

A mes chères sœurs

Samia, wahiba et leurs enfants je vous souhaite un avenir plein de joie

A mes adorables frères

Othman et Abd Rahim Je vous souhaite un avenir plein de bonheur, de réussite et de sérénité.
A tous mes adorables tantes et oncles, cousins et cousines.

A ma meilleure Promotrice

Mm. Rebouh-Bouhedda. Samia. Avec qui j'ai passé les meilleurs moments de ce travail, Je vous remercie pour la confiance que vous nous avez accordée et pour tout le soutien que vous nous avez apporté

A ma chère binôme Fella

A tous mes enseignants et mes amis de master option Chimie Pharmaceutique

A tous ceux qui me sont chers……

selma

Table des Matières

Abréviation ……i
Nomenclature……iii
Liste des figures……v
Liste des tableaux……ix
Introduction générale……1

Chapitre I : Les formes pharmaceutiques Intelligentes

I.1. INTRODUCTION....3
I.2. DEFINITION DU SYSTEME DE DELIVRANCE DU MEDICAMENT....3
I.2.1. LA LIBÉRATION MODIFIÉE....3
I.2.2. FACTEURS À PRENDRE EN COMPTE POUR LA FORMULATION D'UNE FORME À LIBÉRATION MODIFIÉE....3
I.2.3. LIBÉRATION CONTRÔLÉ ET SON MÉCANISME....4
I.2.3.1.1. Système à libération déclenchée....4
I.2.3.1.2. Système à Libération prolongée....4
I.2.4. LIBÉRATION PROLONGÉ ET SON MÉCANISME....5
I.2.4.1. Mécanisme de libération par dégradation....5
I.2.4.2. Mécanisme de libération par diffusion uniquement....5
I.2.4.3. Mécanisme de libération par gonflement suivi d'une diffusion....5
I.3.LES SYSTEMES A LIBERATION PROLONGEE....6
I.3.1. SYSTÈME MATRICIEL....7
I.3.1.1. Les matrices inertes....8
I.3.1.2 Les matrices hydrophiles....8
I.3.1.3. Les matrices érodables....9
I.3.2. SYSTÈME RÉSERVOIR....10
I.4. PARAMETRES INFLUENCANT LA LIBERATION D'UN Pa....10
I.5. CONCLUSION....10

Chapitre II : Les biopolymères dans l'encapsulation

II.1. INTRODUCTION....12
II.2. HISTORIQUE....12

II.3. LA MICROENCAPSULATION 12
II.3.1. Principe et définition 12
II.3.2. Caractérisation des microparticules 13
II.3.2.1. Taille 13
II.3.2.2. Structure interne 13
II.3.2.3. Types des Microparticules 14
II.3.3. Applications 15
II.3.4. Procédés d'encapsulation 15
II.3.4.1. Les procédés mécaniques 15
II.3.4.2. Les procédés chimiques 15
II.3.4.3 Les procédés physico-chimiques 15
II.4. COACERVATION 16
II.4.1. Principe 16
II.4.2. Type de coacervation 17
II.4.2.1. Coacervation simple 17
II.4.2.2. Coacervation complexe 17
II.5. LES BIOPOLYMERES UTILISES EN MICROENCAPSULATION 18
II.5.1. Concept générale 18
II.5.2. Définition de BIOPOLYMÈRES: 18
II.5.3. Les propriétés des biopolymères 18
II.5.3.1. La biodégradabilité 19
II.5.3.2. Biocompatibilité et biorésorbabilité 19
II.5.3.3. Perméabilité à la vapeur d'eau 19
II.5.4. Différentes familles de biopolymères 20
II.5.4.1. Les polysaccharides 20
II.5.4.1.1. Définition et généralité sur les polysacharides 20
II.5.4.1.2. Classification des polysaccharides 21
II.5.4.2. Les polymères étudier 22
II.5.4.2.1. Agar Agar 22
II.5.4.2.1.1. Liste des espèces d'algues à agar – agar 22
II.5.4.2.1.3. Processus d'extraction 23
II.5.4.2.1.4. Propriétés 24
II.5.4.2.2. Gélatine 24
II.5.4.2.2.1. Le point isoélectrique de la gélatine 25
II.5.4.2.2.2. Les caractères 26
II.5.4.2.2.3. Solubilité 26

II.5.4.2.2.4. pH 26
II.5.4.2.2.5. Processus d'extraction 26
II.5.4.3. Les polyélectrolytes 27
II.5.4.3.1. Définition et généralités 27
II.5.4.3.2. Complexes de polyélectrolytes 27
II.6. CONCLUSION 29

Chapitre III : Etudes expérimentale

III.1 INTRODUCTION 30
III.2 PRÉPARATION ET CARACTÉRISATION DES HYDROGELS DE MÉLANGE AGAROSE-GÉLATINE COMME MATRICE D'ENCAPSULATION CELLULAIRE: UNE ÉTUDE IN VITRO 31
III.2.1. Matériel et méthodes 31
III.2.1.1. Produits 31
III.2.1.2. Matériels 31
III.2.1.3. Préparation d'hydrogels d'agarose et de gélatine 31
III.2.2. Étude rhéologique 32
III.2.3. Test de viabilité cellulaire-MTT 32
III.2.3. Évaluation de la stabilité intégrale des hydrogels mélangés 32
III.2.4. Évaluation de la stabilité mécanique des microcapsules 33
III.2.5. Résultats et discussion 33
III.2.5.1. Étude rhéologique 33
III.2.5.2. Viabilité cellulaire, test MTT 34
III.2.5.3. Stabilité intégrale 35
III.2.5.4. Évaluation de la stabilité mécanique 36
III.3 ETUDE DES AGRÉGATS INTERMOLÉCULAIRES GÉLATINE-AGAR DANS LE SURNAGEANT DE SON COACERVAT 37
III.3.1. Matériaux et méthodes 37
III.3.1.1. Produits 37
III.3.1.2. Matériels 37
III.3.1.3. Méthodes 38
III.3.2. Résultats et discussion 39
III.3.2.1. Etudes électrophorétiques 39
III.3.2.2. Études de viscosité 40
III.3.2.3. Études de diffusion de la lumière laser 43

III.3.2.4. Structure moléculaire de la gélatine, de l'agar et du complexe 46
III.3.2.5. Interactions gélatine-gélose 49
III.4 L'ENCAPSULATION DANS DES MICROSPHÈRES DE GÉLATINE ENROBÉES D'ALGINATE AMÉLIORE SURVIE DU PROBIOTIQUE BIFIDOBACTERIUM ADOLESCENTIS 15703T PENDANT L'EXPOSITION À DES CONDITIONS GASTRO-INTESTINALES SIMULÉES 51
III.4.1. Matériels et produits 51
III.4.1.1. Produits 51
III.4.1.3. Matériels 52
III.4.1.4. Préparation des cellules pour la microencapsulation 52
III.4.1.5. Préparation de microsphères avec encapsulé B. adolescentis 15703T 53
III.4.1.6. Dosage de survie de cellules microencapsulés librées et B. adolescentis dans le suc gastrique et intestinal simulé 54
III.4.1.8. Essai de survie et de la stabilité de B. adolescent microencapsulées après séquentiel incubation dans des sucs gastriques et intestinaux simulés 55
III.4.1.9. Stabilité de la gélatine enrobée et non enrobée d'alginate microsphères lors d'une exposition à des gastriques et liquide intestinaux 55
III.4.2. Résultat 55
III.4.2.1. Survie de B. adolescentis libre et encapsulé dans suc gastrique simulé 55
III.4.2.2. Viabilité des cellules libres et encapsulées de B. adolescentis pendant l'incubation séquentielle dans des gastriques et liquide intestinaux. 56
III.4.2.3. Stabilité de la gélatine enrobée et non enrobée d'alginate microsphères lors d'une exposition à des gastriques et liquide intestinaux 56
III.4.3. Discussion 58
III.4.3.1. Comparaison de la survie des cellules libres et encapsulées dans suc gastrique simulé 58
III.4.3.2. Survie des cellules libres et encapsulées de B. adolescentis pendant l'incubation séquentielle dans simulée gastro-intestinale conditions 59
III.5 PRÉPARATION ET CARACTÉRISATION D'ALGINATE – GÉLATINE COMPLEXE POUR LA MICROENCAPSULATION DE BACILLUS SUBTILIS SL-13 PAR ÉMULSIFICATION / GÉLIFICATION INTERNE 60
III.5.1. Matériels et méthodes 60
III.5.1.1. Produits 60
III.5.1.2. Matériels 60
III.5.1.3. Culture de cellules 60
III.5.1.4. Préparation de microparticules 61
III.5.1.5. Analyse de biodégradabilité 61
III.5.1.6. Distribution de taille des microcapsules 62
III.5.1.7. Libération de bactéries viables encapsulées 62
III.5.2.1. Analyse de biodégradabilité 62

III.5.2.2. Répartition des tailles 63
III.5.2.3. Libération bactérienne viable.....64
III.5.3. Modélisation des cinétiques de biodégradation microcapsules et de la libération des cellules Bacillu Stalus SL-13 et de leur viabilité en utilisant l'intelligence artificielle.....65
III.5.3.1. Généralités sur le model intelligent ANFIS 65
III.5.3.2. Configuration de la modélisation par ANFIS.....65
III.5.3.3. Résultats de la modélisation par ANFIS 66
III.5.3.3.1. Modélisation de la biodégradabilité par ANFIS 66
III.5.3.3.2. Modélisation de la cinétique de liberation des bacteries BaciSub SL-13 par ANFIS.67
III.5.3.3.3. Modélisation de la cinétique de viabilité des bacteries BaciSub SL-13 par ANFIS ...68
III.6. ETUDE DU COMPORTEMENT DE L'AGAR (AG) ET DE LA GÉLATINE (GE) EN SOLUTION ET DES PROPRIÉTÉS DU COMPLEXE AG-GE POUR PRÉPARER DES MICROCAPSULES À APPLICATION PHARMACEUTIQUE.....69
III.6.1. Matériel, Réactifs et Produits chimique utilisés.....69
III.6.1.1. Matériel.....69
III.6.1.2. Réactifs et produits chimiques utilisés 69
III.6.2. Biopolymères et leurs analyse par UV/Visible 69
III.6.2.1. Biopolymères.....69
III.6.2.2. Analyse par UV/Visible 70
III.6.3. Préparation de solution phosphate buffer saline (PBS) 71
III.6.4. Optimisation des paramètres de solution à base de Gélatine.....72
III.6.4.1. Préparations 72
III.6.4.2. Résultats et optimisation 72
III.6.5. Optimisation des paramètres de solution à base de Agar-agar.....73
III.6.5.1. Préparations 73
III.6.4.2. Résultats et optimisation 73
III.6.6. Préparation et caractérisation du polyélectrolyte gélatine-agar PEC (GL/AG).....75
III.6.6.1. Préparation.....75
III.6.6.2. Résultats et optimisation 75
III.6.6.2.1. Etude de la variation de pH 76
III.6.6.2.2. Etude de la variation de la conductivité.....76
III.7 CONCLUSION 77
Conclusion générale…… …80
Références

Abréviations

ADEME	Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie
AG	Agar agar
ANFIS	Adaptative Neuro-fuzzy Inference System
CTG	Le grade de toxicité cellulaire
cys	Cystéine
EDC	(1- [3- chlorhydrate de diméthylaminopropyl] -3-éthyl-carbodiimide)
Eq	Équation
GE	Gélatine
HPLC	High performance liquid chromatography
lB	La longueur de Bjerrum
MTT	Méthode de numération des cellules vivante
NaALG	Alginate de sodium
ODc	Densité optique moyenne des témoins
ODe	Densité optique moyenne des échantillons expérimentaux
Pa	Principe active
PA	Polyampholyte
PBS	Solution phosphate buffer saline
PE	Polyélectrolyte
PEC	Un complexe de polyélectrolytes
PECs	Polyélectrolytes complexes en anglais
PS	Solution saline de peptone
RGR	Le pourcentage du taux de croissance relatif
Rh	Les rayons hydrodynamiques
RMSE	La racine de l'erreur carrée moyenne

RNA ou ANN en anglais	Les réseaux de neurones artificiels
SDM	Systèmes de Délivrance des Médicaments
SGJ	Le liquide gastrique simulé
SIJ	Le liquide intestinal simulé
SRM	Le bouillon de Man, Rogosa et Sharpe
UIPAC	Union internationale de chimie pure et appliquée
ULJ	Potentiel de Lennard – Jones
UV	Ultraviolet
UV-Vis	Ultraviolet-visible
ηsp	Viscosité spécifiques

Nomenclatures

C	Concentration
d	Diamètre du la tige
D	La diffusion
$d\eta*$	Dérivé de la viscosité complexe
e	L'électronique la charge
f	Le coefficient de friction de translation
F/F0	Le rapport le facteur de Perrin
Hz	Hertz
I	La forces ionique
kB	La constante de Boltzmann
kH	La constante d'interaction de Huggins
L	Longueur du la tige
pH	Potentiel hydrogène
pKa	Indication de la constante d'acidité
qi	La complémentarité les charges
R0	Une distance caractéristique
R2	Coefficients de corrélation
rc	L'interaction est coupée pour des distances supérieures
T	La température
T a	Température ambient
UC	Un Potentiel de Coulomb
Wg	Le poids de gélatine dans chaque échantillon
Wi	Le poids initial des microcapsules séchées

α	L'expansion de la bobine facteur
ε	La constante diélectrique
εLJ	La force d'interaction à courte portée
ζ	Le potentiel zêta
η	La viscosité
$\eta 0$	La viscosité du solvant
λ	Lambda
$\nu 2$	Volume spécifique partiel du polymère
σ	Diamètre des billes
υ	Viscosité Simha

Chapitre I. Formes pharmaceutique intelligents

Figure I.1. Présentation du profil de libération prolongée……...05
Figure I.2. Principe des systèmes matriciel et réservoir (flèches bleues : pénétration des liquides digestifs ; flèches rouges : diffusion du principe actif)……...06
Figure I.3. Les trois types de systèmes matriciels……...07
Figure I.4. Schéma de la libération à partir d'une matrice inerte……08
Figure I.5. Mécanisme de libération du principe actif à partir d'une matrice hydrophile…...09
Figure I.6. Matrice érodable (libération par érosion du principe actif)……...09

Chapitre II. Les biopolymères dans l'encapsulation

Figure II.1. Comparaison entre microsphère et microcapsule…….....13
Figure II.2. Schéma du procédé de microencapsulation par coacervation complexe……18
Figure II.3. Libération contrôlée des principes actifs……19
Figure II.4. Molécule d'agarose……...22
Figure II.5. Agar d'une algue rouge à une poudre…….23
Figure II.6. Procède industriel d'extraction de la agar –agar…….24
Figure II.7. Molécule de la gélatine …….....25
Figure II.8. Procède industriel d'extraction de la gélatine (A et B) à partir d'os de bœuf et de peau de porc……...27
Figure II.9. Schéma de la libération de contre-ions sur la formation du complexe Polyélectrolyte……..28
Figure II.10. Schéma représentant la formation du complexe de polyélectrolyte……28

Chapitre III.Etude expérimental

FigureIII.1. Courbe de viscosité complexe (a) et premier dérivé de viscosité complexe (b) en fonction de la température (AG50)……....34

Figure III.2. Taux de croissance relatif des cellules CHO basé sur le test MTT (∗∗ indique p <0,05)……35

Figure III.3. Un exemple de microcapsule intacte (à gauche) et endommagée (à droite) est ensuite soumis à une force de cisaillement pendant 24 h……..37

Figure III.4. Données de turbidité (100−% T, T est la transmittance) pour une solution aqueuse à 0,001% (p / v) solution d'agar mesurée à 20 ° C (longueur d'onde = 450 nm). Remarquez l'invariance Influence de la turbidité avec le pH de la solution impliquant le comportement polyélectrolyte de la gélose……39

Figure III.5. Données d'électrophorèse et de turbidité pour une solution aqueuse de gélose à 0,001% (p / v) à différentes forces ioniques en solution. Notez que les profils sont identiques sauf un décalage observable des minimas de 0,03 M. Les données confirment la comportement poly-anionique de l'agar……40

Figure III.6. Viscosité intrinsèque de divers échantillons mesurée à 25 ° C. Remarquez la forte diminution de la viscosité en fonction de la concentration en NaCl impliquant la génération de formes moléculaires symétriques. Voir le texte pour plus de détails. Les lignes pleines sont guidées à l'œil……41

Figure III.7. Variation du paramètre d'interaction de Huggins (kH) en fonction de la force l'ionique de la solution. Pour la gélatine kH reste invariant de la force ionique alors que pour l'agar et le complexe, il montre une forte dépendance. Voir le texte pour détails. Les lignes pleines ne guident que l'œil……42

Figure III.8. Taille de diverses molécules mesurées en termes d'hydrodynamique efficace rayon par DLS pour une gélatine aqueuse à 0,1% (p / v), de l'agar et son complexe en solution en fonction des mesures de force ionique effectuées à 25 ◦C. Remarquez la forte augmentation de la taille effective du complexe due à la polarisation induite interactions électrostatiques. Voir le texte pour plus de détails. Les lignes pleines guident l'œil……..44

Figure III.9. Taille de diverses molécules mesurées en termes de rayon de giration efficace par SLS pour une gélatine aqueuse à 0,1% (p / v), de l'agar et son complexe en solution en fonction des mesures de force ionique effectuées à 25 ◦C. Remarquez la forte augmentation de la taille effective du complexe due à la polarisation induite interactions électrostatiques……..49

Figure.III.10. Rapport relatif de différentes tailles moléculaires pour une gélatine aqueuse à 0,1% (p / v), gélose et son complexe en solution en fonction des mesures de force ionique réalisée à 25 ◦C. Notez la forte variation des valeurs Rh / Rg du complexe. Voir le texte pour plus de détails. Les lignes pleines guident l'œil……..……45

Figure III.11. Rapport axial de diverses molécules pour une gélatine aqueuse à 0,1% (p / v), gélose et son complexe en solution en fonction des mesures de force ionique effectuées à 25 ◦C. Remarquez le changement des valeurs de rapport axial du complexe en fonction de concentration en sel. Voir le texte pour plus de détails. Les lignes pleines guident l'œil……46

Figure III.12. Facteur de Perrin pour diverses molécules pour une gélatine aqueuse à 0,1% (p / v), gélose et son complexe en solution en fonction des mesures de force ionique réalisée à 25 ◦C. Notez le changement dans les valeurs des facteurs de Perrin du complexe en fonction de la concentration en sel. Voir le texte pour plus de détails. Les lignes pleines indiquent l'œil…....46

Figure III.13. Survie de B. adolescentis libre et encapsulé dans la gélatine pendant exposition au suc gastrique simulé (pH 2,0) à 37 ° C Symboles : (●) cellules libres, (○) non revêtues, (▼) recouvertes d'alginate de Ca^{2+} internes et (▽) recouvert d'alginate de Ca^{2+} externe. La survie (%) représente le pourcentage de cellules survivant par rapport à la population initiale. Moyens (n = 8) ± standard écart (n 1)……..55

Figure III.14. Stabilité des microsphères de gélatine revêtues d'alginate lors de l'exposition à des conditions gastro-intestinales simulées. Photographies par microscopie à fluorescence de (a) microsphères entières revêtues d'alginate dans le SGJ (1 h, 37 ^{0}C) et (b) image CLSM de microsphères revêtues d'alginate se désintégrant dans le SIJ (1 h, 37 ^{0}C) après une première incubation dans le SGJ (1 h, 37 ^{0}C). Les barres d'échelle représentent 20 µm……57

Figure III.15. Biodégradation des microcapsules SL-13 préparées avec NaALG et diverses concentrations de GE……62

Figure.III.16. Distribution de taille des microcapsules SL-13 préparées avec NaALG et diverses concentrations de GE……..63

Figure III.17. Comportement de libération des microcapsules SL-13 préparées avec NaALG et diverses concentrations de GE……..64

Figure III.18. Architecture developpé ANFIS……65
Figure III.19. Le taux de biodégradation expérimentale et prédit des microcrocapsules contenant differentes concentration de gélatine (GE)……....66
Figure III.20. Le taux de la libération des cellules BaciSub SL-13 expérimentale et prédit à partir des microcrocapsules contenant différentes concentrations de gélatine (GE)……..67
Figure III.21. le Taux de viabilité expérimental et prédit du BaciSub SL-13 pendant le stockage (Effet de la concentration de gélatine (GE) sur les microcapsules)……..67
Figure III.22. Spectre d'absorption UV de AG……....69
Figure III.23. Spectre d'absorption UV de la gélatine……..70
Figure III.24. Représenter ajustement de pH à 7.4……70
Figure III.25. Représenter l'aspect du solution GL……..72
Figure III.26. Représenter l'aspect du solution AG……..…73
Figure III.27. Aspect du complexe polyélectrolyte à différents ratios (AG/GE)……..74
Figure III.28. Variation de pH en fonction de différents ratios GL/AG……75
Figure III.29. Variation de la conductivité en fonction de différents ratios GL/AG……..76

Chapitre II. Les biopolymères dans l'encapsulation

TableauII.1. Formes principales et terminologie des produits issus de lamicroencapsulation.14

Tableau II.2. Procédés d'encapsulation…….....16

Tableau II.3. Classification des polysaccharides…….....21

Chapitre III. Etude expérimental

Tableau III.1. Classification des échantillons et compositions d'hydrogels…….31

Tableau III.2. Hydrogels de point de mélange de gel basés sur l'étude rhéologique…….34

Tableau III.3. Pourcentage de microcapsules restées intactes……..37

Tableau III.4. Paramètres physiques de divers biopolymères, et leur complexe à 25 ◦C……..42

TableauIII.5. Temps de désintégration de la microsphère (min) et nombre de cellules survivantes (log cfu/ml) pour B. adolescentis libre et encapsulé pendant l'incubation séquentielle (37 C) dans les sucs gastriques (SGJ) et intestinaux (SIJ) simulés…….56

Tableau III.6. Meilleurs résultats en phase d'apprentissage……64

Tableau III.7 Matériels utilisés……67

Tableau III.8. Réactifs et produits chimiques utilisés……..……67

Tableau III.9. Caractéristiques des biopolymères utilisés……....69

Tableau III.10. Aspect des solutions de la gélatine……71

Tableau III.11. Aspect des solutions de l'Agar……...72

Tableau III.12. Principaux paramètres des solutions de complexe polyélectrolyte……...74

Introduction générale

Introduction générale

Le souci principal de la pharmacie, il y a quelques décennies, est de trouver des molécules actives et d'en réduire ses effets indésirables. La chimie organique de synthèse a permis de maitriser ce domaine et d'élargir l'arsenal thérapeutique. Il reste à mettre au point des formes galéniques qui permettent une bonne observance au traitement en diminuant le nombre de prise. Ceci Assure un certain confort au patient et une meilleure biodisponibilité des médicaments. En effet, il est difficile pour le patient de suivre sans erreur ou sans oublie, une prescription comportant 3 ou 4 prises quotidiennes **[1]**.

L'encapsulation est un procédé utilisé pour permettre une libération progressive du produit encapsulé sous l'effet d'une action mécanique, de la chaleur, de radiations ou de la diffusion à travers une membrane poreuse. La capsule joue alors un rôle de réservoir qui isole une substance active du milieu extérieur pour des raisons de stabilité, de toxicité, d'incompatibilité avec le support ou encore d'ergonomie.
Les processus de microencapsulation basés sur la coacervation complexe, développés dans les années 1950, occupent une place importante dans la recherche d'aujourd'hui, car ils peuvent être utilisés pour produire une gamme de micro et nano-capsules d'intérêt pour les industries pharmaceutiques, alimentaires et agricoles. L'effet de la structure du polymère sur la formation des coacervats est étudié pour avoir une meilleure maîtrise de la formation de coacervats complexes **[2]**.

Le phénomène de coacervation se produit dans les systèmes colloïdaux, où les gouttelettes de coacervat (la phase riche en colloïde macromoléculaire) entourant les cœurs des microcapsules dispersées et forment une enveloppe visqueuse autour des microcapsules, qui est alors durcie avec un agent de réticulation **[3]**.

Les biopolymères sont une alternative intéressante aux polymères synthétiques en ce qui concerne leur utilisation en tant que transporteurs pour les applications de libération contrôlée et d'encapsulation. En particulier, la capacité de ces transporteurs à pouvoir emprisonner à la fois des molécules hydrophiles et hydrophobes peut être très prometteuse pour de nombreuses applications.

Les polysaccharides représentent la plus grande famille de matériaux utilisés comme agents d'encapsulation grâce à leurs diverses propriétés telles que leur biocompatibilité et biodégradabilité ainsi que leur faible toxicité et leur pouvoir gélifiant.

C'est dans ce contexte que s'inscrit notre travail, où nous avons tenté d'atteindre l'objectif, qui consiste à utiliser la technique de microencapsulation par la coacervation complexe à base d'un mélange de deux biopolymères différents l'agar et la gélatine pour former des microcapsules comportant un principe actif et cela dans le but de prolonger sa libération dans le temps. Il nous a été proposé d'étudier des travaux antécédents élaborés dans ce même contexte et de choisir l'un de ces travaux pour exploiter ses résultats afin d'utiliser une technique d'intelligence artificielle pour modéliser les cinétiques de libération des cellules bactérienne à pouvoir antifungiques à partir de microcapsules préparés à base de gélatine de sodium et de gélatine et de comparer cette libération avec la libération des même cellules bactériennes à partir des comprimés à libération contrôlée fabriquées aussi à base du même mélange de polymères.

Pour ce faire, ce mémoire est structuré en deux volets :

Le premier est consacré à une étude bibliographique, organisée en deux chapitres :

- Le premier chapitre présente le système de délivrance des médicaments, libération contrôlée puis en détaille la libération prolongée, leurs mécanismes ainsi que les matrices utilisées dans l'élaboration de ces systèmes.
- Le deuxième chapitre traite l'encapsulation par coacervation complexe, définition de biopolymères, leurs classifications, leurs propriétés et quelques détails sur les biopolymères utilisés dans ce travail « agar et gélatine » et il s'achève par un aperçu sur les polyélectrolytes.

Dans le deuxième volet, les essais préliminaires effectués sont présentés et pour valoriser encore le travail, des études de recherche expérimentales sont présentées ayant comme objectif la microencapsultaion des cellules bactériennes en utilisant des biopolymères. Une modélisation par une technique d'intelligence artificiel 'neuro-floue' a été aussi effectuée en exploitant les résultats d'une étude de recherche intitulée : Préparation et caractérisation d'alginate-gélatine complexe pour la microencapsulation de Bacillus subtilis SL-13 par émulsification / gélification interne.

Le manuscrit est à la fin, achevé par une conclusion générale.

Partie théorique

Chapitre 1

Les formes pharmaceutiques Intelligentes

I.1. INTRODUCTION

Les formes à libération contrôlée ou soutenue ont été désignées de différentes façons : nouveaux systèmes thérapeutiques, dispositifs à libération contrôlée, médicaments du futur ou de l'an 2000, formes modernes de délivrance des principes actifs. Ces termes recouvrent l'ensemble de la nouvelle génération des formes galéniques issues de la révolution de la fin des années 1960 qui a fait suite à une profonde évolution liée à l'apport des sciences fondamentales et aux progrès de la technologie.

En effet la pharmacie galénique, a été progressivement « pénétrée » par les progrès des sciences fondamentales d'abord physico-chimiques, puis biologiques. Cette évolution, par le biais des concepts de la biopharmacie a apporté une nouvelle dimension à la pharmacie galénique dont l'aboutissement a été marqué par le développement de nouvelles formes pharmaceutiques capables d'assurer aux médicaments une meilleure maîtrise de la vitesse de libération du principe actif à partir de son support galénique puis de la maîtrise de sa distribution dans l'organisme. Ce qui lui confère l'un ou les deux aspects de contrôle de la libération et/ou de la spécificité du site d'action. **[4][5]**

I.2. DEFINITION DU SYSTEME DE DELIVRANCE DU MEDICAMENT

Il est considéré comme SDM (Système de Délivrance d'un Médicament) : « toute forme ou tout dispositif médical visant à améliorer le ratio bénéfice/risque d'un médicament grâce à la maîtrise de la vitesse, du moment ou du site de libération dans l'organisme, de la substance pharmacologiquement active ».

De plus doit être ajouté à ce domaine, tout système capable de favoriser l'observance des patients. **[4]**

I.2.1. LA LIBÉRATION MODIFIÉE

Une forme à libération modifiée est une préparation dont la vitesse de libération du principe actif est différente de celle d'une forme pharmaceutique à libération conventionnelle destinée à la même voie. **[6]** La modification de la libération peut résulter de caractéristiques voulues (excipients, processus de fabrication...) allant dans le sens de l'allongement de la libération ou de son raccourcissement par rapport à la libération immédiate. **[7]**

I.2.2. FACTEURS À PRENDRE EN COMPTE POUR LA FORMULATION D'UNE FORME À LIBÉRATION MODIFIÉE

Le choix d'une formulation ne se fera donc qu'après avoir pris connaissance des principales propriétés intrinsèques du principe actif considéré pouvant être classés de la façon suivante :

- Propriétés physico-chimiques : solubilité dans l'eau, coefficient de partage, stabilité, pKa, poids moléculaire, polymorphisme ; Paramètres biologiques : liaison aux protéines, dose active, absorption, métabolisme, distribution, durée d'action (laquelle est fonction de la vitesse d'élimination), effets secondaires.
- L'état physiologique et pathologique des patients tout comme le rythme cardiaque qui devra également être pris en considération

Sous l'expression « forme à libération modifiée » on distingue :

I.2.3. LIBÉRATION CONTRÔLÉ ET SON MÉCANISME

La libération contrôlée appelée aussi programmée ou soutenue est une libération prolongée et constante dans le temps ; elle présente un profil qui correspond à une cinétique dite d'ordre zéro **[8][9]**, indépendante du temps **[10]**.

Les systèmes à libération contrôlée possèdent des exigences particulières au(x) matériau(x) impliquée(s), qui sont de nature polymérique sous forme de matériau plein ou d'une membrane

I.2.3.1.1. Système à libération déclenchée

Sont généralement des microcapsules formées d'une membrane de faible perméabilité, qui vont libérer brutalement leur contenu.

Les mécanismes de la libération contrôlé connus dans ce cas sont :

- Mécanismes de libération par éclatement : sous l'effet d'une pression (mécanique ou osmotique) ;
- Mécanismes de libération par fusion : sous l'effet de la température. **[11]**

I.2.3.1.2. Système à Libération prolongée

La libération prolongée d'un principe actif (Pa) est celle pour laquelle la dose unitaire totale est retenue au sein d'un système contrôlant la vitesse de libération. La rétention du principe actif peut être faite par son inclusion dans un excipient insoluble dans les liquides de l'organisme qui forme ainsi une espèce de matrice à partir de laquelle le principe actif sera libéré lentement.

La figure 1 représente le profil de libération prolongée.

La libération prolongée est basée sur deux principes :

- La vitesse de libération du principe actif à partir de la forme galénique est plus lente que dans le cas de libération conventionnelle. Cette étape est préalable aux étapes de dissolution et d'absorption. Elle correspond donc au facteur limitant qui contrôle la dissolution et l'absorption,

- La durée de cette libération est étalée dans le temps. **[8][9]**

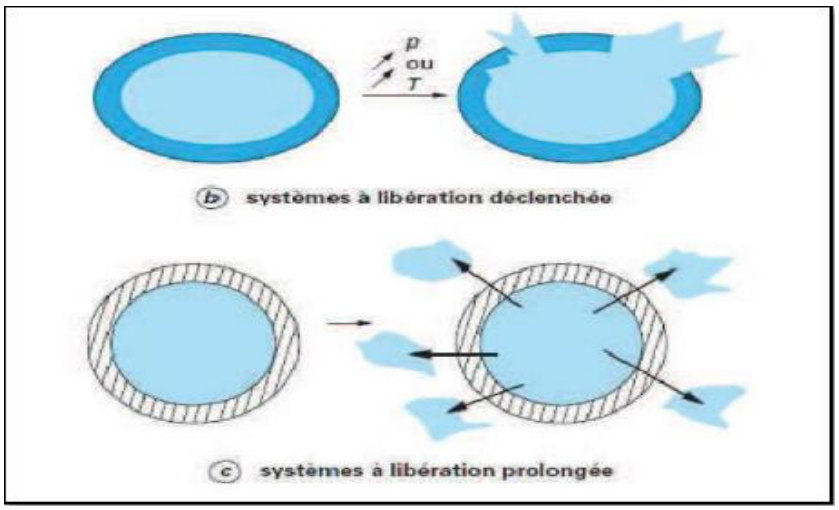


Figure I.1. Présentation du profil de libération prolongée

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

- La réduction des prises journalières,
- L'accroissement du confort du malade,
- L'amélioration de l'observance du traitement,
- La diminution des effets secondaires indésirables par suppression des pics plasmatiques**. [12][13]**

I.2.4. LIBÉRATION PROLONGÉ ET SON MÉCANISME

Les mécanismes de la libération connus dans ce cas sont :

I.2.4.1. Mécanisme de libération par dégradation

La plupart des polymères biodégradables se dégradent par hydrolyse en composés de taille de plus en plus faibles, biologiquement éliminables, dans certains métabolique.

La dégradation peut s'effectuer selon une hydrolyse en masse, il est uniforme dans toute la matrice polymère ou bien se produire uniquement sur la surface du polymère.

I.2.4.2. Mécanisme de libération par diffusion uniquement

La diffusion se produit quand un Pa traverse le polymère qui forme le système de libération. La diffusion peut se produire à l'échelle macroscopique à travers les pores dans la matrice ou à l'échelle moléculaire par le passage entre les chaînes de polymères.

I.2.4.3. Mécanisme de libération par gonflement suivi d'une diffusion

La compréhension des mécanismes de gonflement des polymères est importante pour permettre de concevoir le système particulier de libération contrôlée qui permet d'expliquer les

comportements cinétiques de libération. Le Pa est dissout ou dispersé au sein d'une matrice polymérique capable d'en sortir.

En premier lieu, le polymère ne subit aucune modification chimique, il n'est pas dégradé, l'eau diffuse simplement à l'intérieur du réseau polymère, le gonfle, ce qui permet aux Pa piégés à l'intérieur de se libérer.

La capacité du gonflement de polymère se manifeste quand le gonflement peut être déclenché par un changement de l'environnement entourant le système de la libération.

Dépendant du polymère, le changement environnement peut impliquer le pH, la température, ou la force ionique, et le système peut se rétrécir ou gonfler sur un changement de n'importe lequel de ces facteurs environnementaux

I.3.LES SYSTEMES A LIBERATION PROLONGEE

Il existe de nombreux types de systèmes à libération prolongée, chacun ayant ses exigences particulières au(x) matériau(x) impliqué(s). Ce phénomène provient notamment des progrès faits à la fois dans la synthèse des matériaux aux propriétés toujours plus performantes et dans la connaissance d'un traitement plus adapte à une pathologie spécifique. **[14]**

Les plus répandus sont : système matriciel et système réservoir

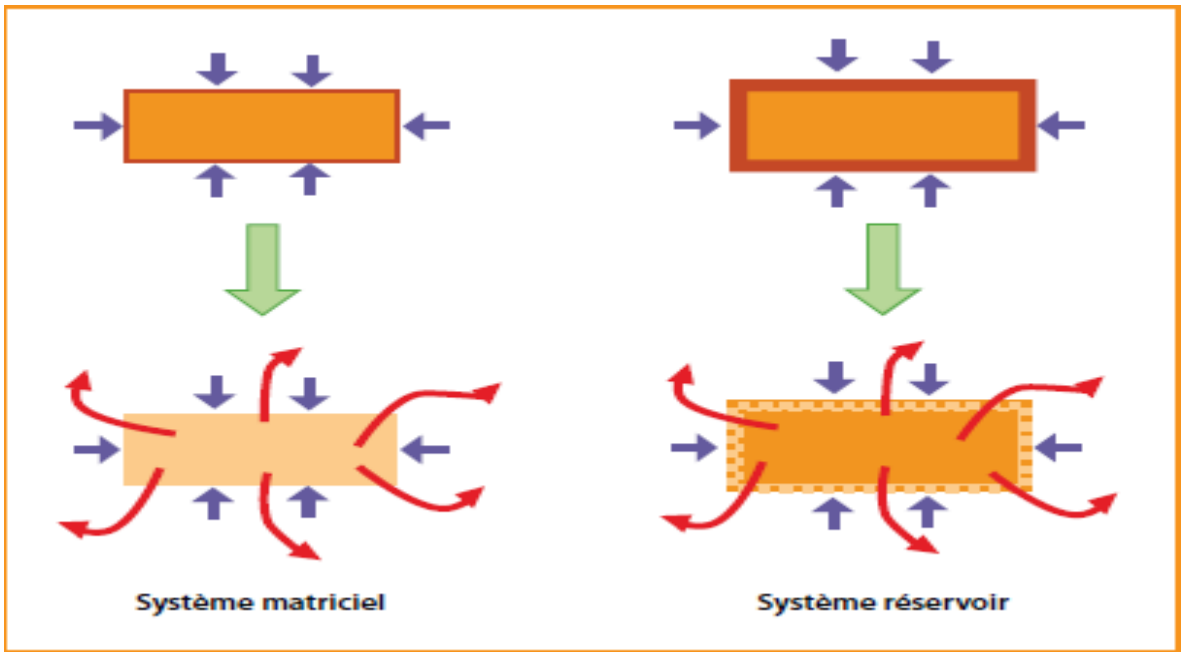


Figure I.2. Principe des systèmes matriciel et réservoir (flèches bleues : pénétration des liquides digestifs ; flèches rouges : diffusion du Pa).[**15**]

I.3.1. SYSTÈME MATRICIEL

Les matrices sont des supports constitués d'excipients physiologiquement tolérés, plus ou moins inertes qui ne se désagrègent pas et forment un réseau piégeant le médicament. Elles sont destinées à prolonger l'action de molécules à demi-vie courte ou à réduire un pic de concentration plasmatique important et précoce qui constitue une source d'effets indésirables**. [16]**

La libération du Pa hors de la matrice se déroule en trois phases :

1. Pénétration des liquides digestifs dans les canalicules de la matrice,
2. Dissolution du principe actif par les liquides digestifs,
3. Diffusion de la solution de principe actif de l'intérieur de la matrice vers la surface des compartiments médicamenteux **[17]**.

Les systèmes matriciels présentent les avantages suivants :

- Fabrication aisée
- Efficaces et moins chers.
- Peuvent être utilisé pour l'administration de composes à haut poids moléculaire
- Assurent une libération prolongée du principe actif et évitent les pics plasmatiques.
- Améliorent l'observance du patient et améliorent l'efficacité du traitement.
- Réduisons-les risquent de toxicité
- Assurent la stabilité du principe actif et le protègent de l'hydrolyse ou d'une quelconque dégradation au niveau du tractus gastrointestinal.
- Minimisent les effets secondaires et les risques de toxicité chronique.
- Améliorent la biodisponibilité du médicament**. [18]**

En fonction du type d'excipient constituant la matrice, il est possible de distinguer trois grandes catégories de systèmes matriciels : les matrices inertes, les matrices hydrophiles et les matrices érodables **(figure I.3).**

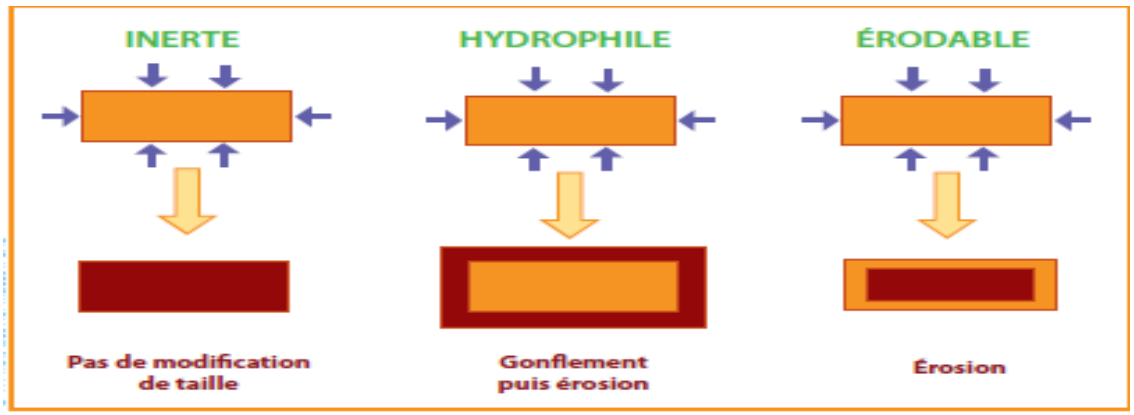


Figure I.3. Les trois types de systèmes matriciels.

I.3.1.1. Les matrices inertes

Les matrices inertes, sont des matrices insolubles, formées par une agglomération de particules polymériques insolubles dans les fluides du tractus gastro-intestinal, non toxiques, et non digestibles. Elles sont composées de supports indéformables qui après dissolution et diffusion du principe actif seront éliminées intactes dans les selles**.**

Selon la nature de l'excipient, on distingue :



Figure I.4. Schéma de la libération à partir d'une matrice inerte

I.3.1.1.1. Les matrices minérales

Elles sont composées d'un excipient minéral.

I.3.1.1. 2. Les matrices plastiques

Elles sont composées d'un polymère thermoplastique **[19]**

La libération du principe actif à partir de la matrice se fait d'abord par la libération plus ou moins importante d'une dose initiale de surface ensuite par l'épuisement graduel de la matrice en principe actif, la libération peut être schématisée en trois étapes :

- Pénétration par capillarité du fluide environnant ou des liquides digestifs à travers la poudre médicamenteuse dispersée dans le réseau poreux de la matrice,
- Dissolution progressive du prince actif,
- Diffusion lente de la solution vers l'extérieur le long des canalicules de la matrice poreuse. **[20][21]**

I.3.1.2 Les matrices hydrophiles

Les matrices hydrophiles sont des comprimés à libération prolongée constitués du mélange d'un ou de plusieurs principes actifs avec un agent gélifiant. Elles se distinguent donc des précédentes par le fait qu'elles gonflent après hydratation par les liquides digestifs en raison de la présence du polymère hydrophile doué de propriétés gélifiantes.

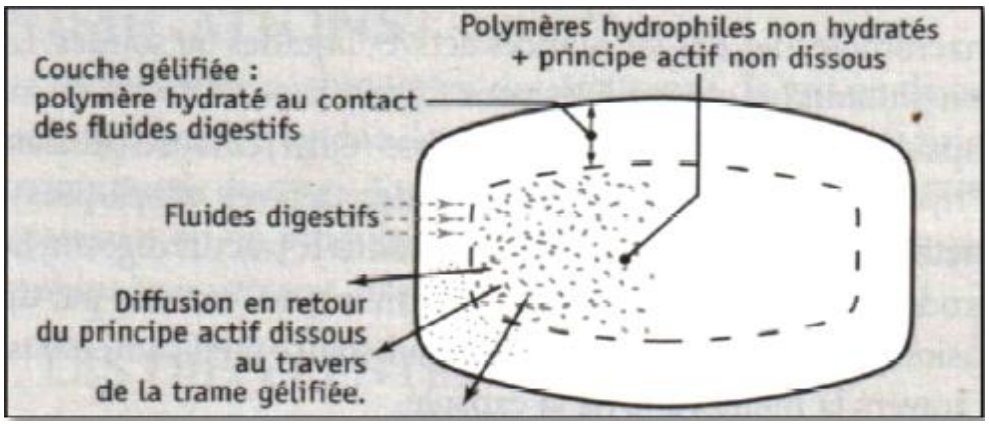


Figure I.5. Mécanisme de libération du principe actif à partir d'une matrice hydrophile

Au contact de l'eau ou des liquides digestifs, une fraction du principe actif est rapidement dissoute. Puis le polymère s'hydrate et se gélifie en formant une couche visqueuse à travers laquelle l'eau continue à pénétrer dans la matrice. Au fur et à mesure du processus d'hydratation, la matrice augmente de dimension et traverse le tractus gastro-intestinal sans se désagréger. La barrière gélifiée formée contrôle la pénétration de l'eau de l'extérieur vers l'intérieur et s'oppose à la libération rapide du Pa. Le principe actif est libéré par diffusion après sa dissolution. Donc après dissolution du Pa, celui-ci diffuse à travers la barrière gélifiée vers l'extérieur de la matrice. Au cours du transit gastro-intestinal, comme il a été dit précédemment, la matrice hydratée gonfle progressivement, ne se désagrège pas mais peut s'éroder partiellement**. [22][23]**

I.3.1.3. Les matrices érodables

Les matrices érodables se différencient des matrices inertes et hydrophiles par le simple fait qu'elles subissent une certaine érosion lors de leur transit gastro-intestinal qui est due à l'action des enzymes et du pH des sucs digestifs sur le produit constituant la matrice **[15].**

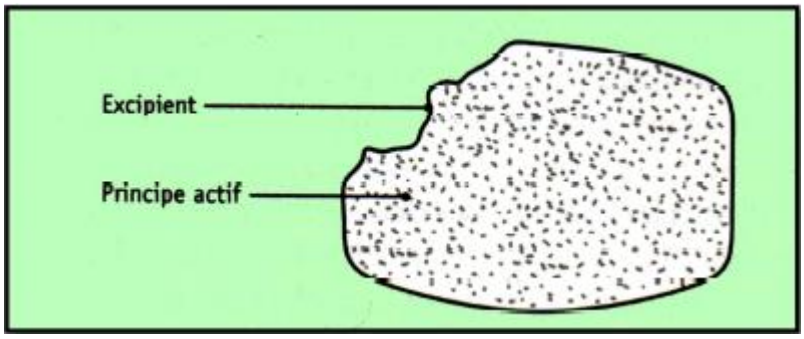


Figure I.6. Matrice érodable (libération par érosion du principe actif)

On distingue deux types de matrices à érosion :

I.3.1.3.1. Les matrices lipidiques ou hydrophobes: constituées de corps gras (glycérides, acides, alcools gras, cire ...) qui s'érodent lentement sous l'action de la lipase pancréatique.

I.3.1.3.2. Les matrices polymériques: composées par un polymère de solubilité pH dépendante (acétophtalate de cellulose, phtalate de l'hydroxypropylméthylcellulose, sels minéraux insolubles polyvinylpyrrolidone, acétate de vinyle).

La libération résulte à la fois de l'érosion se produisant à la surface du comprimé et de diffusion du principe actif à l'extérieur de la matrice**.**

I.3.2. SYSTÈME RÉSERVOIR

Un système réservoir contient une dose unitaire de principe actif dont la libération progressive est contrôlée par la présence d'un film barrière à la surface **(figure I.2).** Cette membrane barrière est composée d'un polymère insoluble (éthylcellulose, acétate de cellulose…) et d'un excipient hydrosoluble (polymère hydrophile ou composé hydrosoluble).

La dissolution de l'excipient hydrosoluble au contact des liquides digestifs crée une porosité dans le film qui permet la diffusion du principe actif dissous vers l'extérieur.

La vitesse de libération est dépendante de la composition et de l'épaisseur du film. À l'issue du tractus digestif, les résidus insolubles du film polymérique sont retrouvés dans les selles.

I.4. PARAMETRES INFLUENCANT LA LIBERATION D'UN Pa

Il est à noter que les paramètres influençant la libération d'un Pa encapsulé sont

Solubilité du Pa dans le milieu de libération et dans la paroi polymérique ;

- Taux d'encapsulation ;
- Interactions chimiques entre le Pa et polymère ;
- Caractéristiques morphologiques de système de libération (porosité, tortuosité, surface, forme)
- Caractéristiques de polymère tel que poids moléculaire (des études récentes montrent que les polymères de faibles poids moléculaires présentent une porosité plus élevée que d'autre, donc une libération plus élevée. **[11]**

I.5. CONCLUSION

Parmi les différentes voies des médicaments, la voie orale est la plus utilisée. Mais elle présente certains inconvénients qui limitent son utilisation :

- Sensibilité de la muqueuse gastrique à certains principes actifs.
- Dégradation de certains principes actifs par les sucs digestifs.

- Conditions de prises parfois très contraignantes, surtout pour les molécules à demi vie brève et à marge thérapeutique étroite.

Pour remédier à ces problèmes, les galénistes ont pu mettre au point des formes pharmaceutiques particulières dites « formes à libération modifiée ». Pour obtenir une libération continue, d'autres systèmes sont utilisés. Ce sont essentiellement les systèmes matriciels. Les formes orales à libération modifiée, ont permis d'éviter les problèmes d'irritation de la muqueuse et de dégradation de certains principes actifs. Elles ont également permis d'améliorer les profils de libération et par conséquent les profils plasmatiques, tout en diminuant le nombre de prises. Ce qui augmente le confort du patient et améliore son observance au traitement. La voie orale n'offre que peu de possibilités en matière de prolongation de la durée d'action. Mais avec la facilité et les différents avantages qu'elle présente, elle restera une voie de choix même dans le futur.

Chapitre2

Les biopolymères dans l'encapsulation

II.1. INTRODUCTION

L'encapsulation est vectrice d'innovations de par ses avantages de protection et de libération contrôlée dans l'espace et dans le temps. Chaque nature physico-chimique d'un actif peut être encapsulée avec succès grâce à plusieurs techniques disponibles et la possibilité de sélectionner différents matériaux enrobant comme par exemple les cires, les protéines, les phospholipides ou encore les polymères. Différentes structures internes de microparticules sont réalisables avec des tailles qui peuvent être variables. La structure externe peut également être modifiée. Enfin, il est possible de choisir la forme physique finale des microparticules obtenues : solution diluée ou concentrée ou encore forme sèche, donc il y a autant de possibilités à prendre en compte. Tous ces paramètres auront un impact sur la cinétique de libération des particules. **[24]**

II.2. HISTORIQUE

La première application basée sur la technologie de l'encapsulation a été commercialisée il y a 60 ans dans le domaine de l'imprimerie. Il s'agit du papier carbone sans carbone aussi appelé papier autocopiant permettant la duplication d'un texte ou d'une figure sous l'effet d'une faible pression **[25]**. Ce produit contient des microparticules de colorant réalisées par coacervation complexe entre la gélatine et la gomme arabique qui se brisent sous l'effet de la pression d'une tête d'imprimante ou d'un stylo.

A la fin des années cinquante la technologie de la microencapsulation fut utilisée dans le domaine pharmaceutique pour les médicaments analgésiques à libération prolongée par exemple, ainsi que pour d'autres applications industrielles telles que les colles **[26]**

II.3. LA MICROENCAPSULATION

II.3.1. PRINCIPE ET DÉFINITION

Le terme microencapsulation regroupe l'ensemble des procédés de fabrication des microcapsules. Cette technique permet d'emprisonner des substances solides, liquides, ou des gaz, dans une membrane constituée d'un polymère ou d'un lipide. On appelle la substance emprisonnée, le matériau cœur, le principe actif, la phase interne, ou encore le matériau couché. Le matériau extérieur est appelé membrane, matériau carapace, mur, ou encore matériau enrobant. La fabrication de microcapsules permet d'isoler le matériau cœur du milieu extérieur et de le protéger contre les variations de température, les rayonnements, les solvants ou l'oxydation. Elle permet également de protéger l'utilisateur si le matériau cœur est toxique. Enfin, cette technologie permet de libérer la substance cœur au moment souhaité, pendant l'utilisation, de manière instantanée ou progressive. Ainsi, une des caractéristiques principales

est la résistance des capsules produites, qui doit être appropriée au procédé de fabrication (pour ne pas casser les microcapsules avant usage) et à l'utilisation envisagée**. [27][28][29][30]**

II.3.2. CARACTÉRISATION DES MICROPARTICULES

II.3.2.1. Taille

Le terme de microparticules est utilisé pour des tailles comprises entre 1µm et 1000µm d'après **[11][31]**réduit l'intervalle de définition des microparticules de 1µm à 500µm. Dans tous les cas, les particules ayant un diamètre inférieur à 1µm appartiennent au domaine des nanoparticules.

II.3.2.2. Structure interne

Deux types de structures internes de microparticules polymériques peuvent être observés :

- Les microsphères qui sont des réseaux matriciels de matériau enrobant dans lequel se trouve dispersé ou dissout le principe actif
- Les microcapsules qui sont des systèmes dits « réservoirs » constitués d'un cœur de principe actif entouré d'une membrane de matériau enrobant [**24]**

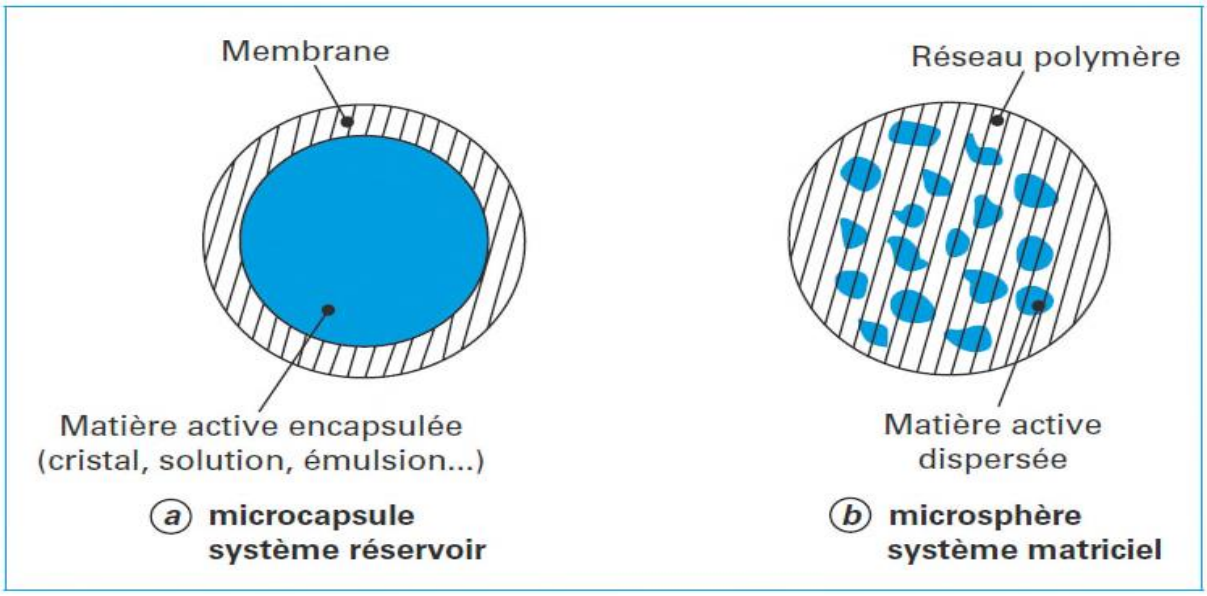


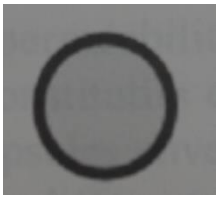
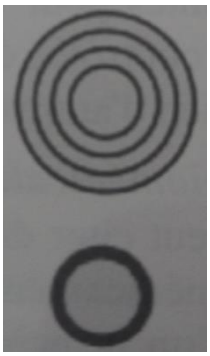
Figure II.1. Comparaison entre microsphère et microcapsule

- Les **matières actives** sont d'origines très variées : principes actifs pharmaceutiques, actifs cosmétiques, additifs alimentaires, produits phytosanitaires, essences parfumées, micro-organismes, cellules, ou encore catalyseurs de réaction chimique...
- Les **matériaux enrobants** sont des polymères d'origine naturelle ou synthétique, ou des lipides **[11].**

II.3.2.3. Types des Microparticules

La microencapsulation peut être réalisée par différents procédés physiques ou chimiques donnat lieu à la formation de capsules de grandeurs et de formes variées suivant la technologie mise en œuvr**[6]** : microcapsules, microsphères ; liposomes ; noisomes ; nanocapsules et nanosphères.

Tableau II.1 Formes principales et terminologie des produits issus de la microencapsulation **[6]**

Terminologies	Description	Taille	Illustration schématique
Microcapsules	Produits d'enrobage d'un noyau liquide à l'aide d'une membrane solide.	**µm**	
Nanocapsules	Même structure que celles des microcapsules mais plus petites	**nm**	
Microsphere ou microparticules	Les cœurs et les membranes sont tous les deux solides. Souvent, il n'y a pas de distinction claire entre elles : la membrane solide fonctionne comme une matrice poreuse dans laquelle les substances actives sont enchâssées.	**µm**	
Nanosphere ou nanoparticules	Même structure que celles des microsphères mais plus petites.	**nm**	
Liposomes	Membrane lipidique souvent constituée de phospholipides et de cholestérol.	**µm**	
Noisomes	Sous-types: unilamelaire (une couche lipidique) et multilamellaire (plusieurs couches lipidiques). Structures similaire aux liposomes mais leurs membrane sont constitué de molécules sont constituées de molécules amphiphiles synthétique (détergents).	**nm**	

II.3.3. APPLICATIONS

Les microcapsules se retrouvent aujourd'hui dans de nombreux produits :

- Papier autocopiant sans carbone
- Papier thermique
- Lingettes nettoyantes
- Encres thermochromiques ou photochromiques
- Encres et vernis olfactifs
- Aspirine
- Lotion d'huile et de parfum.

Cette technologie est donc présente dans de très nombreux secteurs comme l'industrie pharmaceutique (fabrication de médicaments …), l'agroalimentaire (pesticide, masquer des goûts …), la cosmétique (libération d'odeurs …), la chimie, le textile (protection ignifuge, adoucissant) ou encore le BTP (microencapsulation d'adhésif). **[32][33][34][35]**

II.3.4. PROCÉDÉS D'ENCAPSULATION

Il existe de nombreuse méthode d'encapsulation. Pour produire des microparticules qui se différencient les unes des autres par des détails comme la solubilité du polymère formant la paroi, la taille des particules, l'épaisseur et la perméabilité de la paroi et les propriétés physiques. **[**Error! Bookmark not defined.**]**

On peut classer les techniques de microencapsulation suivant plusieurs critères :

- L'utilisation ou non de solvant organique,
- La nature du milieu dispersant : liquide, gazeux ou à l'état supercritique,
- L'utilisation de polymères préformés, de lipides ou de monomères,
- Le procédé utilisé pour réaliser la microencapsulation.

Cette dernière manière de classer les procédés industriels est la plus couramment utilisée.

II.3.4.1. Les procédés mécaniques sont basés sur le séchage ou la solidification de gouttelettes contenant tous les constituants de la future particule.

II.3.4.2. Les procédés chimiques sont caractérisés par un déclenchement simultané de la synthèse de la membrane (ou de la matrice) et de l'encapsulation du principe actif. Les procédés chimiques n'utilisent donc pas de matrices enrobants préformées.

II.3.4.3 Les procédés physico-chimiques sont dépendants : (i) de la solubilité des agents enrobants sous l'effet de variations des conditions physiques (température, pH, ajout d'un non

solvant ou d'un polymère incompatible), (ii) de changements d'état (fusion et solidification) des agents enrobants.**[36]**

Tous ces procédés sont présentés dans le tableau **[37] :**

Tableau II.2 Procédés d'encapsulation

Procédés physico-chimiques	**Procédés mécaniques**	**Procédés chimiques**
Séparation de phases ou Coacervation (simple ou complexe)	Nébulisation / séchage (spray – drying)	Polycondensation interfaciale
Evaporation– extraction de solvant	Enrobage en lit fluidisé (spray – coating)	Polymérisation interfaciale
Emulsification		Polymérisation en milieu dispersé (émulsion, micro. – Émulsion,…) par voie radicalaire ou anionique

II.4. COACERVATION

II.4.1. PRINCIPE

Le terme coacervation provient du latin « acervus », signifiant entassement. Ce terme caractérise le phénomène de désolvatation d'un colloïde en solution **[38]**. Ce procédé d'encapsulation fonctionne de la façon suivante : un matériau cœur est dispersé dans une solution contenant la formulation carapace, sous forme de colloïde. Ce colloïde va alors pouvoir se séparer de la phase où il se trouve, sous forme d'un liquide visqueux appelé coacervat, par modification de sa solubilité. Il en résulte la création de 2 phases au sein de la solution **[39.29.40.**Error! Bookmark not defined.**]** :

- Une phase riche en polymère et pauvre en solvant : le coacervat.
- Une phase pauvre en polymère et riche en solvant : le surnageant

Ce changement de solubilité du colloïde peut être provoqué par différents phénomènes :

- Ajout d'un non solvant
- Addition d'un sel
- Modification de température
- Modification de pH
- Modification de concentration de la solution
- Ajout d'un polymère incompatible.

En fonction de la technique de séparation de phase envisagée, on parle de coacervation simple

ou complexe

II.4.2. TYPE DE COACERVATION

II.4.2.1. Coacervation simple

La coacervation simple est basée sur la désolvatation d'un seul matériau carapace. Cette désolvatation peut être provoquée par différents phénomènes, tels que la variation de température, l'ajout d'un solvant non miscible avec la solution aqueuse contenant le colloïde, ou encore par addition d'un électrolyte. **[38]**

Ce phénomène peut se dérouler en milieu aqueux ou organique. **[**Error! Bookmark not defined.**]**

II.4.2.2. Coacervation complexe

Le terme de coacervation complexe est employé lorsqu'il y a désolvatation simultanée de 2 polyélectrolytes portant des charges opposées. La coacervation complexe peut donc se décrire comme une séparation de phase liquide – liquide résultant de la formation de complexes électrostatiques intramoléculaires entre des macromolécules de charges opposées. Initialement insolubles, ces macromolécules vont floculer et coalescer par interactions électrostatiques pour former des complexes intermoléculaires insolubles, les coacervats. La neutralisation des charges globalement positives d'un des 2 polyélectrolytes par les charges négatives de l'autre va provoquer la désolvatation des macromolécules donc leur coacervation. Le procédé de microencapsulation par coacervation complexe se déroule de la façon suivante **[39]**

(a) Dans un premier temps, l'actif à encapsuler est dispersé dans une solution aqueuse contenant les deux polymères.

(b) Dans un second temps, la coacervation est induite par un ajustement du pH de la solution, de façon à ce que les charges positives du premier polymère équilibrent les charges négatives du second.

(c) L'attraction électrostatique des deux polyélectrolytes provoque l'apparition d'un coacervat mixte.

(d) Dans un troisième temps, les gouttelettes de coacervats ainsi formées viennent s'adsorber à la surface de la matière active et former un enrobage continu.

(e) Finalement, cet enrobage peut être consolidé par réticulation des macromolécules constitutive du coacervat .**[41]**

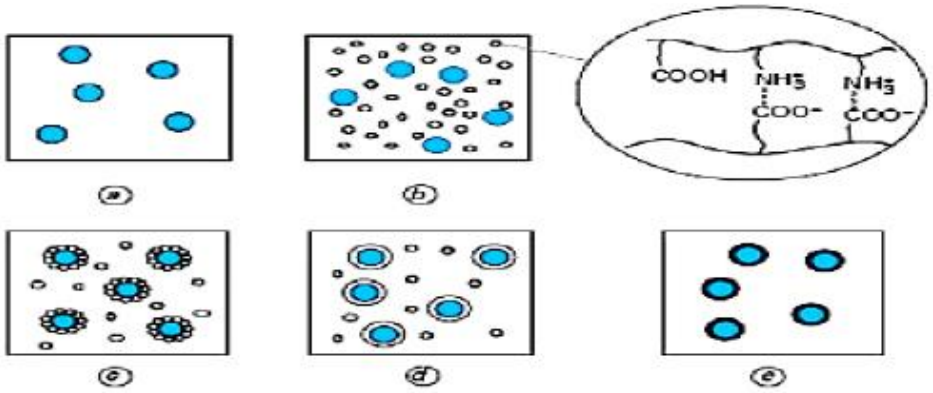


Figure II.2. Schéma du procédé de microencapsulation par coacervation complexe

II.5. LES BIOPOLYMERES UTILISES EN MICROENCAPSULATION

II.5.1. CONCEPT GÉNÉRALE

On appelle polymère une grande molécule constituée d'unités fondamentales appelées monomères (ou motifs monomères) reliées par des liaisons covalentes.

Un monomère est un compose constitue de molécules simples pouvant réagir avec d'autres monomères pour donner un polymère. Contrairement au polymère, un monomère a une faible masse moléculaire.

Le terme macromolécule est souvent utilisé à la place de polymère. Un polymère peut être d'origine naturelle, obtenu par modification chimique d'un polymère naturel ou bien synthétisé par voie chimique ou enzymatique par une réaction de polymérisation. Ces réactions de polymérisation forment des composés de masse moléculaire plus élevée, les polymères ou macromolécules par établissement de liaisons covalentes entre de petites molécules elles-mêmes appelées monomères. [**42**]

II.5.2. DÉFINITION DE BIOPOLYMÈRES:

Selon l'Union internationale de chimie pure et appliquée (UIPAC), Les biopolymères se définissent comme étant des biomacromolécules synthétisées par des organismes vivants. Et selon l'Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie (ADEME), les biopolymères sont des polymères naturels issus de ressources renouvelables de plantes d'algues ou d'animaux. Les biopolymères peuvent aussi être obtenus par polymérisation de monomères naturels et par la fermentation des micro-organismes. **[43]**

II.5.3. LES PROPRIÉTÉS DES BIOPOLYMÈRES

Les biopolymères sont 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 (implants vasculaires, fils de suture, vis et broches, ligaments artificiels…).

II.5.3.1. La biodégradabilité

A ce jour, le terme biodégradable est donné aux polymères d'origine naturelle c'est-à-dire réservé aux biopolymères qui ont la capacité de se dégrader sous l'action de microorganismes. Leurs décompositions moléculaire et chimique conduisent à la formation de CO_2 et d'H_2O en présence d'oxygène (ou à la formation de CH_4, CO_2 et d'H_2O en milieu anaérobie, plus une nouvelle biomasse. [**44**]

II.5.3.2. Biocompatibilité et biorésorbabilité

Un matériau biocompatible est un matériau qui est capable d'assurer une fonction avec une réponse appropriée et sans effets indésirables sur l'environnement biologique dans lequel il est appelé à fonctionner. Les biopolymères par leur origine naturelle, remplissent
logiquement cette fonction et les implants médicaux en matériau inerte comme les céramiques sont de plus en plus remplacées par des polymères d'origine naturelle.**[45]**

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

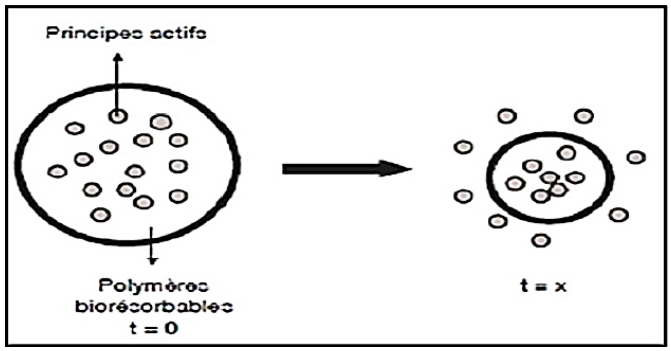


Figure II.3 Libération contrôlée des principes actifs. **[46]**

II.5.3.3. Perméabilité à la vapeur d'eau

La plupart des biopolymères sont hydrophiles, ce qui leur confère des propriétés de perméabilité à la vapeur d'eau. Ces propriétés sont dues notamment à la présence de fonctions polaires hydroxyle et/ou amine qui ont une forte réactivité avec l'eau par formation de ponts

hydrogènes **[46]** ; ce qui leur confère aussi une propriété antistatique. La perméabilité à la vapeur d'eau pourrait être un inconvénient dans certaines applications, notamment pour les emballages alimentaires.

II.5.4. DIFFÉRENTES FAMILLES DE BIOPOLYMÈRES

- **Polysaccharides :** Ce sont des complexes moléculaires formés à partir de l'assemblage de plusieurs monosaccharides. Il y a des polysaccharides à base de pentoses, d'autres à base d'hexoses et aussi des mixtes c'est-à-dire formés d'un mêla d'hexoses.
- **Protéines :** ce sont principalement les protéines issues de tissus animaux comme le collagène la gélatine et la lignine ou des produits animaux comme les caséines et des protéines issues des plantes oléagineuses (colza, tournesol et soja), et des protéagineux (pois, féveroles) du son des céréales (gluten du blé).
- **Elastomères hydrocarbonés** : ils sont produits par les plantes comme caoutchouc naturel.

II.5.4.1. Les polysaccharides

II.5.4.1.1. Définition et généralité sur les polysacharides

Les polysaccharides sont des polymères d'origine naturelle constitués de plusieurs oses liés entre eux par des liaisons osidiques. Ils ont des enchaînements covalents de 20 à plusieurs milliers d'unités monosaccharidiques. Il existe dans la nature de nombreuses variétés de polysaccharides pour lesquels l'intérêt porté est proportionnel aux propriétés et aux applications potentielles. Ces polysaccharides peuvent être d'origine végétale, c'est le cas de l'amidon, de la cellulose, des pectines ou des gommes. Ils peuvent également être issus des algues comme les alginates, les carraghénanes, l'agar ou les fucanes, ou encore être d'origine animale (héparine, chondroïtine), ou microbienne (dextranes, xanthanes).**[47]** on distingue :

o Les homo-polysaccharides dans les quel le même résidu de sucre est répété des centaines ou des milliers de fois, conduisant à des macromolécules de masse moléculaire importante (10^4 à 10^6) et qui portent des noms qui dérivent de leur sucre constitutif.

o Les hétéro-polysaccharides présent deux ou plusieurs types de monosaccharides.[**48**]

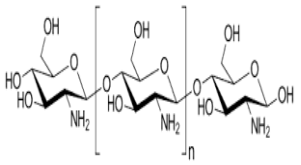
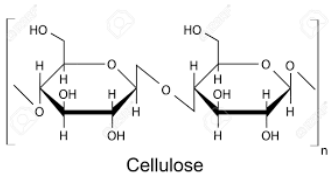
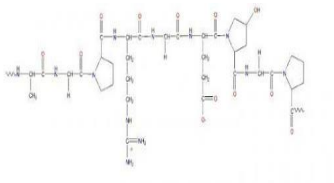
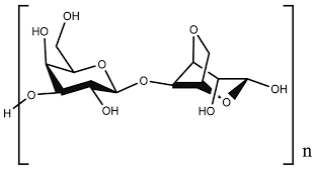
Les polysaccharides sont utilisés comme épaississants, stabilisants, agents de suspension, agents gelifiants, agents filmogènes, agents d'aeration , floculant, liants , émulsifiants, lubrifiants ,et agents texturants et de structuration**.[49][50]**

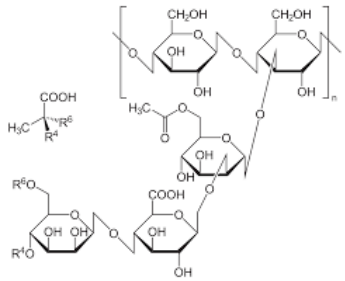
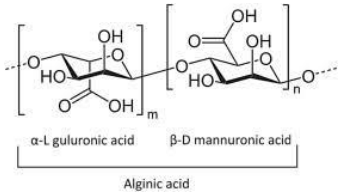
Les polysaccharides sont principalement utilisés pour épaissir de l'eau en gel et sont souvent classé en deux groupes : épaississants et gélifiants. **[51]**

II.5.4.1.2. Classification des polysaccharides

Les polysaccharides sont classés selon leurs charges :

Tableau II.3 Classification des polysaccharides

	Structure/Caractère	Formule brute	Source	Charge
Chitosane	 Se présente sous forme de poudre inodore, sans saveur et de couleur blanche.	**$[C_6H_{11}NO_4]_n$ [52]**	Exosquelette des arthropodes (crustacés) ou de l'endosquelette ou de l'endosquelette des cephalopods (calamards, ...) **[53]**	**Anionique [54]**
Cellulose	 Se présente sous forme de fibres de couleur blanche inodore et sans saveur. Elle est insoluble dans l'eau	**$[C_{12}H_{20}O_{10}]_n$ [55]**		**Neutre**
Gélatine	 La gélatine se présente en poudre plus ou moins fine, en paillettes irrégulières ou en feuilles plus ou moins flexibles, incolores ou jaune pale	**$[C_{102}H_{151039}N_{31}]_n$**	Collagène animal**[56]**	**Cationique [57]** **Amphoteric[58]**
Agar-agar	 se présentant sous forme de poudre blanche	**[C12H18O9]n**	Algues rouges **[59]**	**Anionique[60]**

Xanthane	 se présente en Poudre granulée de couleur blanc cassé	**[C35H49O29]n**	Bacterium Xanthomonas campestris**[61]**	**Anionique[62]**
Acide alginique	 se présente en poudre ou filaments ou encore de granulés de couleur blanc jaunâtre à brune,	**[C6H8O6]n**	Algues brunes en particulier de Laminaria (Azotobacter vinelandii)**[63]**	**Anionique [61]**

II.5.4.2. Les polymères étudier

II.5.4.2.1. Agar Agar

L'agar agar (terme d'origine malaisienne, et indienne) est un gélifiant végétal que l'on peut extraire à partir d'algues rouges appartenant aux familles des Rhodophycées (plus particulièrement de l'espèce gracilaria), principalement cultivées en Afrique du nord, sur les côtes d'Europe du sud, ainsi qu'en Amérique du sud et en Asie. **[64]**

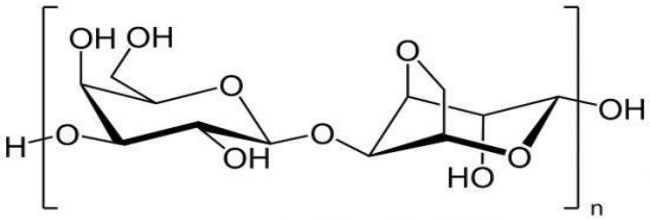


Figure II.4. *Molécule d'agarose* **[64]**

C'est un produit 100% biologique se présentant sous forme de poudre blanche et possédant de nombreuses propriétés et utilisations**.**

II.5.4.2.1.1. Liste des espèces d'algues à agar – agar

- Gelidium

- Gracilaria
- Gracilariopsis
- Gelidiella
- Pterocladia
- Pterocladiella [**65**]

II.5.4.2.1.2. Formule brute $C_{12}H_{18}O_9$

C'est un polymère constitué de deux polysaccharides :

- **La première** des deux molécules est un polymère de galactose (un monosaccharide ou « ose ») appelée l'agarose. Les oses sont liés entre eux par des liaisons covalentes grâce aux ions OH- et H+. L'agarose compose 55 à 65% du polymère et lui donne ses capacités gélifiantes. (C'est son composant actif).
- **La seconde**, l'agaropectine est simplement une autre molécule d'agarose moins « pure », plus complexe, car étant composé de quelques atomes supplémentaires.

L'agar-agar tire ainsi son nom de ce des deux molécules (agarose-agaropectine) **[73]**

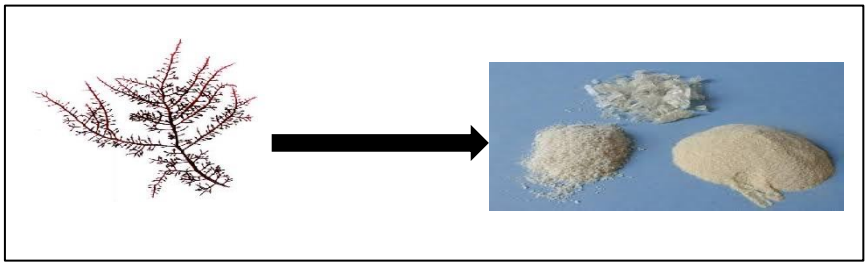


Figure II.5. Agar d'une algue rouge à une poudre

II.5.4.2.1.3. Processus d'extraction

- **Rinçages**

Cette première étape consiste en trois rinçages, le premier à l'eau douce, le deuxième en milieu acide, le troisième en milieu basique. Au cours de ces rinçages, de nombreuses substances sont éliminées dont le pigment rouge. Le végétal prend alors une coloration verte.

- **Dissolution**

Cette deuxième étape est capitale. C'est elle qui permet la dissolution en eau chaude des molécules d'agar. La plante est mise à macérer à 127°C pendant 3h dans de l'eau douce. Il faut éviter que les molécules d'agar se scindent en fragments si courts qu'ils deviendraient soluble dans l'eau froide et ne donneraient plus de gel. Le brassage conduit alors à une bouillie verdâtre.

- **Filtration**

Filtration par gravité.

- **Séchage**

Les molécules d'agar sont ensuite séchées à l'air chaud ou au soleil. Elles sont alors réduites en poudre.[**66**]

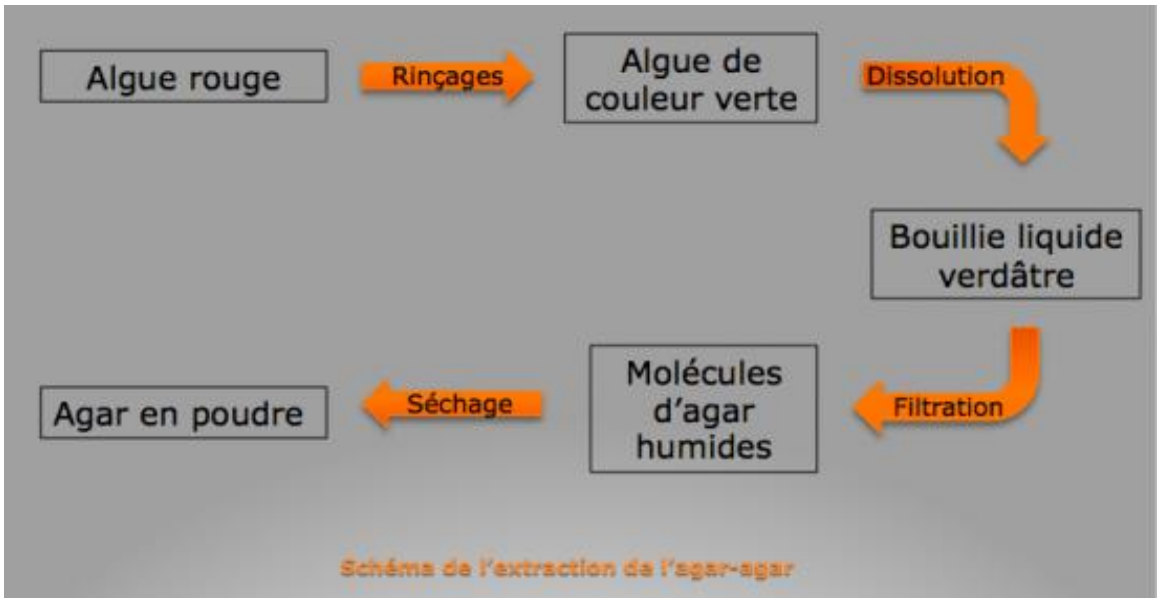


Figure II.6. Procède industriel d'extraction de la agar –agar [**66**]

II.5.4.2.1.4. Propriétés

- On l'utilise donc comme gélifiant, en effet, il est le gélifiant naturel le plus puissant. La gélification s'observe lorsque l'agar agar représente 0.1% de la préparation.
- La préparation d'agar agar se liquéfie au-dessus de 80°C et gélifie en refroidissant (à partir de 35°C jusqu'à 45°C)
- La gélification s'exerce avec un pH compris entre 3.5 et 10 mais le résultat est meilleur lorsque le pH avoisine les 5.5.
- Ces gels obtenus sont légèrement opaques
- Il permet aussi un effet laxatif ainsi qu'un effet acalorique (utilisé lors de régime minceur)
- Une particularité importante : On peut liquéfier puis gélifier de nombreuses fois, (et vis versa) sans pour autant diminuer la qualité du gel (on dit que l'agar agar est thermoréversible). **[64]**

II.5.4.2.2. Gélatine

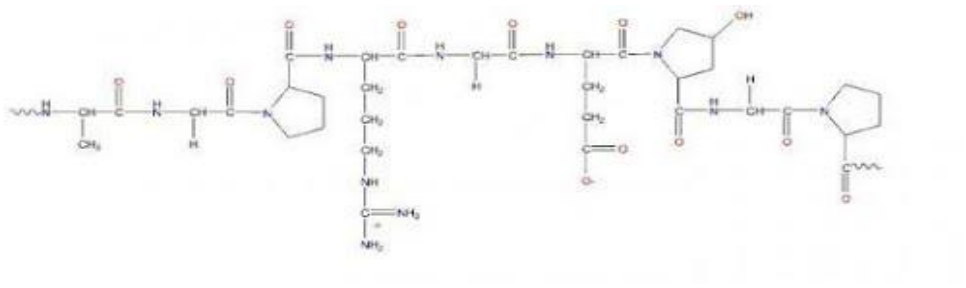


Figure II.7. Molécule de la gélatine

La gélatine est un mélange de nature protéique obtenu par hydrolyse acide partielle (type A) ou hydrolyse alcaline partielle (type B) du collagène animal. Elle peut être constituée par un mélange des deux types. Cette définition explique que le nom de gélatine peut couvrir une gamme de produits aux propriétés différentes. Le collagène provient soit des os, soit de la peau des animaux de boucherie. L'os est composé approximativement de deux tiers de sels minéraux (phosphate tricalcique surtout) et d'un tiers d'osséine constituée elle-même d'élastine, d'ostéomucoïde et de fibres de collagène. Ce sont ces fibres de collagène partiellement hydrolysées qui donnent la gélatine. Dans le cas des peaux, on utilise surtout celle du porc dont la gélatine est plus facilement extractible que celle des bovins. Ces peaux subissent une hydrolyse acide et ne donnent donc que de la gélatine A. Pour la microencapsulation de poudres ou de liquides. La gélatine, stable en atmosphère sèche, doit être conservée à l'abri de l'humidité car, absorbant facilement la vapeur d'eau, elle peut être envahie par des éléments microbiens.

II.5.4.2.2.1. Le point isoélectrique de la gélatine

La différence essentielle se situe dans la valeur du point isoélectrique de la gélatine obtenue. Le point isoélectrique de la gélatine A se trouve entre 8,5 et 9 du fait que le traitement acide conserve les groupements aminés de la glutamine ainsi que ceux des restes aspartiques. Le point isoélectrique de la gélatine B est de l'ordre de 4,8-5 du fait de l'élimination de ces groupements aminés par traitement alcalin. Cela a son importance d'une part, parce qu'au point isoélectrique la solvatation des molécules est à son minimum et qu'il y a alors risque de floculation et d'autre part, parce qu'on ne peut mélanger deux polymères de charges différentes sans risque de précipitation. On ne peut associer notamment les gélatines A et B dont les domaines d'utilisation sont différents :

- La gélatine A n'est utilisable qu'en milieu acide (tartrique par exemple). Elle est incompatible avec la gomme arabique ;

- La gélatine B est utilisable à un pH voisin de la neutralité et est compatible avec la gomme arabique.

II.5.4.2.2.2. Les caractères

La gélatine se présente en poudre plus ou moins fine, en paillettes irrégulières ou en feuilles plus ou moins flexibles, incolores ou jaune pâle. Elle gonfle au contact de l'eau froide et peut ainsi absorber 5 à 10 fois son poids d'eau. Soluble dans l'eau chaude, elle donne une solution colloïdale qui se prend par refroidissement en une gelée pratiquement incolore. Du fait du caractère amphotère de la gélatine, certaines propriétés des solutions aqueuses diluées varient avec le pH : la viscosité passe par un minimum et la turbidité par un maximum au point isoélectrique. La gélatine est également soluble à chaud dans un mélange de glycérine et d'eau, mais insoluble dans la plupart des solvants organiques. **[6]**

II.5.4.2.2.3. Solubilité

La gélatine alimentaire de base gonfle dans l'eau froide. Elle se dissout dans l'eau chaude (80 à 90 °C) et la solution se prend en gelée par refroidissement.

II.5.4.2.2.4. pH

Déterminer le pH sur la solution à 1 p. 100 maintenue à 40 °C. Le pH des solutions colloïdales est compris entre 3 et 4le pH des solutions préparées à partir des produits en poudre ou en grains est compris entre 5 et 7. **[50]**

II.5.4.2.2.5. Processus d'extraction

1. La préparation à partir des os comprend les quatre temps suivants :
2. Dégraissage à l'eau chaude, et non pas à l'aide de solvants, pour les gélatines alimentaires ou pharmaceutiques ;
3. Décalcification par l'acide chlorhydrique dilué : les sels minéraux se dissolvent en laissant l'osséine, matière molle et élastique qui a conservé la forme de l'os ;
4. Elimination de l'élastine et de l'ostéomucoïde qui par hydrolyse donne des acides chondroïtine sulfurique. On y arrive soit par hydrolyse acide (acide sulfurique dilué à froid), soit par hydrolyse alcaline ou « chaulage » (traitement pendant 2 ou 3 mois par un lait de chaux). Ces deux traitements qui conduisent à des gélatines de qualités différentes A et B, sont suivis d'un lavage à l'eau et d'une extraction à l'eau bouillante ;
5. Dessiccation des gélatines qui se présentent en plaques ou en poudres**. [6]**

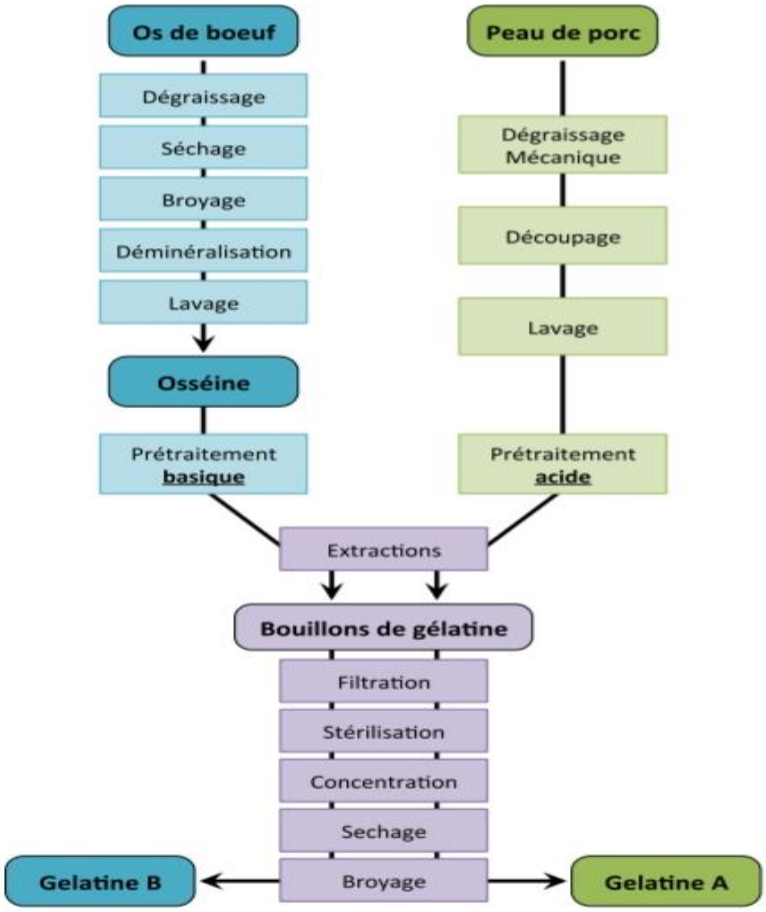


Figure II.8. Procède industriel d'extraction de la gélatine (A et B) à partir d'os de bœuf et de peau de porc

II.5.4.3. Les polyélectrolytes

II.5.4.3.1. Définition et généralités

Une chaine polymère porte des charges électriques est appelé polyélectrolytes. D'un point de vu chimique, les chaines portent des groupements ionisables susceptible de se dissocier dans un solvant polaire. Une solution de polyélectrolytes en solution aqueuse est alors composée : des chaines polymères (chargées à cause de la dissociation), appelé les macroions, et des petits ions libres (contres ions) de charges opposées à celle des macroions. **[67]**

II.5.4.3.2. Complexes de polyélectrolytes

D'après l'IUPAC, un complexe de polyélectrolytes (PEC) est un complexe polymère-polymère neutre composé de macromolécules portant des charges de signes opposés. **[68]**

Les complexes de polyélectrolytes CPEs, (polyélectrolytes complexes PECs en anglais), sont formés par interaction entre des polyanions et polycations conduisant à la libération de contre-ions.

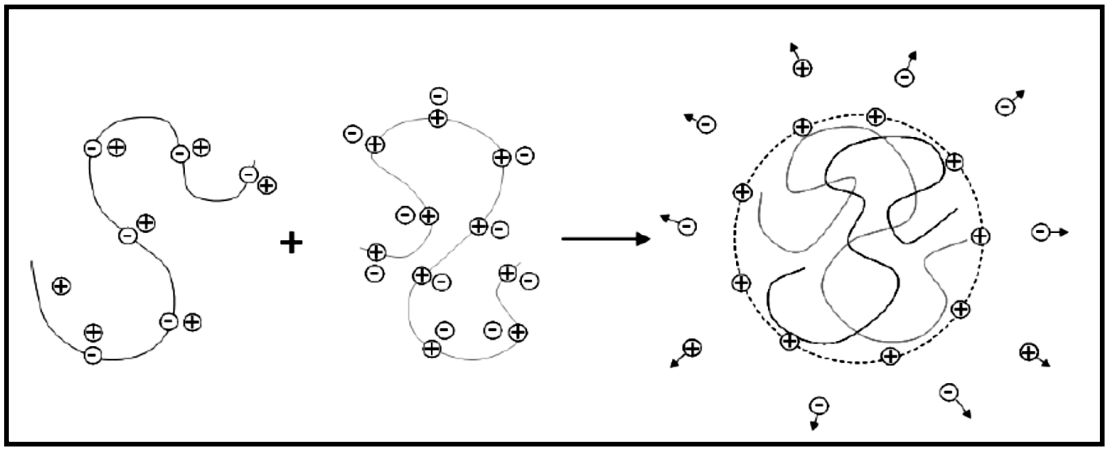


Figure II.9. Schéma de la libération de contre-ions sur la formation du complexe Polyélectrolyte [**69**]

Le terme « structure d'œuf brouillée » (figureII.13) est une description très imaginaire de la morphologie actuelle du complexe [**70**]. Ce qui a été formé juste après le mélange des deux polyélectrolytes. Dans de tels complexes, principalement la compensation aléatoire des charges a été trouvée, et dans la plupart des cas, cette situation changera à peine une fois que le complexe sera formé. [**71**]

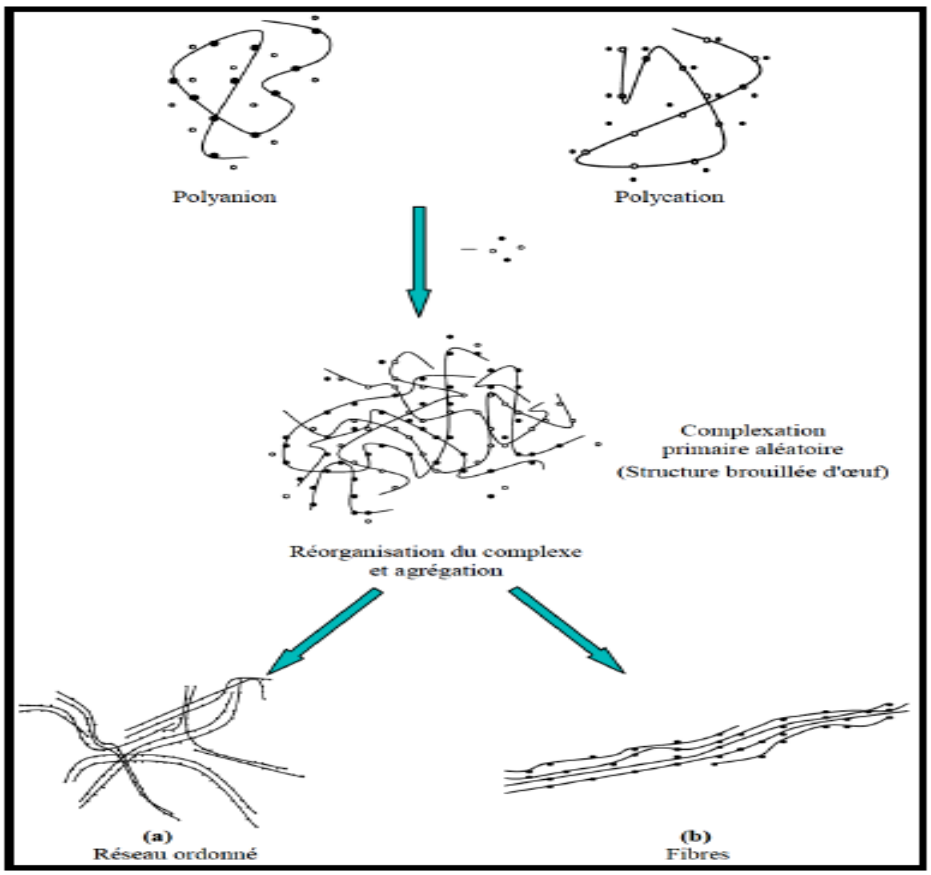


Figure II.10. Schéma représentant la formation du complexe de polyélectrolyte

II.6. CONCLUSION

L'encapsulation a donné naissance ces dernières années a de nombreux produits commerciaux. C'est une technologie très largement utilisée dans l'industrie. Le développement de méthodes d'encapsulation donne naissance à des structures innovantes permettant d'isoler, de protéger et de structurer des substances.

De manière générale, l'encapsulation peut être définie comme le piégeage d'un ou plusieurs objets au sein d'un matériau en vue de son immobilisation, sa protection, le contrôle de son transfert, sa structuration et sa fonctionnalisation. L'encapsulation peut concerner une grande variété de systèmes, allant de molécules simples à des structures plus complexes comme des cellules. Au sein des microcapsules, les composés peuvent être sous forme d'une solution, d'une suspension ou d'une émulsion.

Dans l'industrie pharmaceutique, les microcapsules sont la plupart du temps utilisés comme vecteurs pour la libération contrôlée de médicaments. Dans les industries textiles, les microcapsules permettent d'encapsuler des parfums ou des teintures, ou même des composes ignifuges dans les textiles militaires.

Chapitre3

Etudes expérimentale

III.1 INTRODUCTION

Les formes à libération prolongée ont été développées dans le but de réduire la fréquence des prises médicamenteuses. Pour cela Cette étude se concentre sur la microencapsulation à base d'un complexe de polyélectrolytes de 2 biopolymères (Gélatine-Agar) et (Gélatine-Alginate de sodium). Des travaux de recherche semblables ont été profondément étudiés et choisis comme références de la partie expérimentale que nous n'avons pas abouti à sa réalisation complète. Ces études sont menées afin de permettre une libération de cellules bactériennes (au lieu de principes actifs) contrôlée et prolongée dans le temps en gardant leurs viabilités. Quatre papiers de recherche ont été étudiés dans la matrice utilisé dans la microencapsulation est préparée à base d'un mélange de polymères soit agar-gélatine ou alginate-gélatine.

A cet égard cette partie comporte :

- Préparation et caractérisation des hydrogels d'Agar-gélatine avec différentes proportions pour des applications d'encapsulation cellulaire. Les propriétés mécaniques, rhéologiques et biologiques des hydrogels en mélange ont été déterminées pour fournir la preuve de la capacité des hydrogels **[72].**
- Etudier L'interaction intermoléculaire conduisant à la formation d'agrégats entre (gélatine et l'agar) dans le surnageant du coacervat complexe formé par ces biopolymères **[73]**.
- Développer une méthode pour produire des microsphères de gélatine réticulée à la génipine revêtue d'alginate en utilisant des polymères de qualité alimentaire et pour étudier l'effet de ce revêtement d'alginate sur la survie du probiotique bifidobactéries lors de l'exposition à l'environnement défavorable que l'on trouve dans les segments supérieurs du tractus gastro-intestinal **[74]**.
- Évaluation de la faisabilité de l'utilisation d'alginate de sodium et de concentrations différentes de gélatine pour préparer des microcapsules SL-13 avec les propriétés souhaitées par émulsification / gélification interne **[75]**.
- Modélisation des cinétiques de biodégradation microcapsules et de la libération des cellules Bacillu Stalus SL-13 et de leur viabilité en utilisant l'intelligence artificielle (réalisée afin d'enrichir le travail et dont les résultats sont exploités pour participer à une conférence internationale).
- Etude du comportement de l'agar (AG) et de la gélatine (GE) en solution et des propriétés du complexe AG-GE pour préparer des microcapsules à application pharmaceutique (La partie pratique réalisée par nos propre soin).

III.2 PRÉPARATION ET CARACTÉRISATION DES HYDROGELS DE MÉLANGE AGAROSE-GÉLATINE COMME MATRICE D'ENCAPSULATION CELLULAIRE: UNE ÉTUDE IN VITRO

III.2.1. MATÉRIEL ET MÉTHODES

III.2.1.1. Produits

- La gélatine en poudre (peau de bovin de type A, Aldrich, St. Louis, MO, USA.
- La poudre d'agarose (Boehringer, Ingelheim, Allemagne).
- L'eau distillée.
- Le test MTT (bromure de 3- (3,4-diméthylthiazol-2yl) -2,5-diphényltétrazoliium).
- Des solutions de diméthylsulfoxyde (DMSO (PHARMATON, Suisse, Suisse).
- Test de protéine Bradford.
- PBS.
- Coomassie Brilliant Blue G-250.
- Ethanol.
- L'acide phosphorique.

III.2.1.2. Matériels

- Un rhéomètre dynamique universel (MCR300 SN599139, Paar-Physica, Autriche).
- UV.
- Un lecteur de microplaques (spectra countR).
- Une boîte en polystyrène.
- Un agitateur orbital (Olympus, Japon).

III.2.1.3. Préparation d'hydrogels d'agarose et de gélatine

De la gélatine en poudre, de la poudre d'agarose et de l'eau distillée ont été utilisés pour préparer quatre hydrogels de mélange d'agarose gélatine avec différents pourcentages en poids d'agarose (100%, 75%, 50% et 25%). Les échantillons obtenus ont été appelés respectivement AG100, AG75, AG50 et AG25. Le tableau 1 montre la classification des échantillons et les compositions des quatre hydrogels. Les différents rapports pondéraux d'agarose et de gélatine en poudre ont été dissous dans de l'eau distillée, ce qui a donné 3% de solutions homogènes. Après dissolution et mélange, les gels liquides ont été coulés dans un moule approprié et maintenus à température ambiante (25°C).

Tableau III.1. Classification des échantillons et compositions d'hydrogels

Exemple de code	Gélatine (g)	Agarose (g)	Eau double distillée (ml)
AG100	0,0000	0,0300	10,000
AG75	0,0075	0,0225	10,000

AG50	0,0150	0,0150	10,000
AG25	0,0225	0,0075	10,000

III.2.2. ÉTUDE RHÉOLOGIQUE

Des expériences rhéologiques ont été réalisées avec un rhéomètre dynamique universel pour analyser le comportement thermique des hydrogels et pour déterminer leurs points de gel. **[76]** La géométrie de la plaque parallèle avec un élément Peltier pour le réglage de la température a été réglée pour une déformation de 1% et une fréquence angulaire de 1 Hz. Les solutions préparées ont été placées entre les plaques (95 °C) et recouvertes de silicone pour empêcher le dessèchement. La température est passée de 95 °C à 20 °C. La viscosité complexe ($\eta *$) a été mesurée en continu pendant la variation de température. Bien qu'elle soit proche du point de gel, la viscosité complexe a considérablement augmenté avec la baisse de la température pour les quatre solutions.

III.2.3. TEST DE VIABILITÉ CELLULAIRE-MTT

La cytotoxicité des hydrogels de mélange a été déterminée par le test MTT (méthode de numération des cellules vivante). **[77]** Brièvement, 200 pi de suspension de cellules CHO (25 x 10^3 cellules / ml) ont été chargés dans une plaque de culture cellulaire à 96 puits et cultivés pendant 24 h. Par la suite, les films d'hydrogel minces, de 1 cm de diamètre et de 1 mm d'épaisseur, ont été stérilisés aux UV et placés dans les puits (les puits sans film servaient de contrôle aux puits avec des échantillons de film). Des cellules CHO, à une densité d'environ 25 x 103 cellules / ml, ont été ensemencées sur les films ainsi que sur les puits témoins. Après 72 h d'incubation, les échantillons ont été soigneusement prélevés et incubés dans du milieu agricole contenant 10 µl de solution de MTT pendant 4 h. Ensuite, l'absorbance des solutions de diméthylsulfoxyde a été mesurée à 590 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques. Le pourcentage du taux de croissance relatif (RGR) de toutes les cellules a été calculé en divisant l'absorbance des échantillons par l'absorbance du contrôle à 590 nm. **[78]**

III.2.3. ÉVALUATION DE LA STABILITÉ INTÉGRALE DES HYDROGELS MÉLANGÉS

La stabilité structurelle des hydrogels de mélange a été évaluée en estimant la libération in vitro de molécules de gélatine à partir des hydrogels d'agarose-gélatine à l'aide du test de protéine Bradford. **[79]** Pour préparer la courbe standard (absorption en fonction de la concentration de gélatine), des solutions de gélatine de référence dans du PBS (pH 7,4) ont été préparées à 5 concentrations différentes dans la gamme de 0,05 à 1 g / L. Ensuite, les échantillons de disque d'hydrogel (1 cm de diamètre, 5 mm d'épaisseur) ont été immergés dans 5 ml de PBS (37 ° C,

pH 7,4). Après 24 h, la concentration de la gélatine libérée dans du PBS contenant les hydrogels a été estimée. Brièvement, 10 µl de milieu d'échantillon ont été retirés des échantillons vieillis et mélangés avec 190 µl de réactif Bradford (100 mg de Coomassie Brilliant Blue G-250 dans 50 ml d'éthanol à 95% + 100 ml à 85% (p / v) d'acide phosphorique + 1 litre H2o) et après 10 min, l'absorbance a été mesurée à 570 nm. La gélatine libérée de chaque échantillon d'hydrogel âgé de 24 heures a été estimée. Le pourcentage de gélatine a été déterminé par l'équation 1 :

$$\% \text{ de gélatine libérée} = C / (Wg \times 0{,}2) \times 100 \qquad (1)$$

où C'est la concentration obtenue en comparant l'absorption de l'échantillon à la courbe standard et Wg représente le poids de gélatine dans chaque échantillon.

III.2.4. ÉVALUATION DE LA STABILITÉ MÉCANIQUE DES MICROCAPSULES

La stabilité mécanique des microcapsules d'agarose-gélatine (préparées à partir des échantillons d'hydrogels) a été évaluée en utilisant un essai de rupture par force de cisaillement. Récipient de suspension. Des gouttelettes d'hydrogel chargées de cellules ont été formées par l'effet de traction de la force de vide et de la gravité. Environ 100 microcapsules par puits fabriquées à partir de chaque hydrogel ont été placées dans une boîte en polystyrène à six puits. Les microcapsules ont ensuite été équilibrées pendant 15 min dans 2 ml de PBS. La plaque a ensuite été attachée à un agitateur orbital et agitée à une fréquence de 250 tr / min à 37 ° C. Le pourcentage de microcapsules intactes dans le PBS à différents moments a été compté avec un microscope à contraste de phase inversé

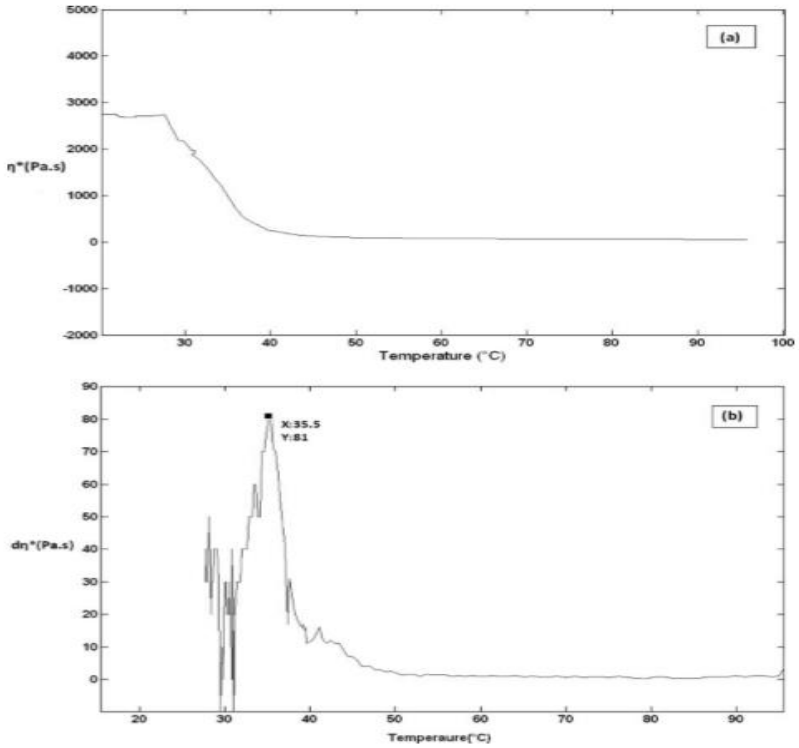
Les résultats sont présentés par moyenne ± écart-type (n = 4). Chaque résultat a été analysé statistiquement par le test de l'échantillon indépendant, en utilisant le logiciel SPSS16.0. La signification statistique a été fixée à $p < 0{,}05$.

III.2.5. RÉSULTATS ET DISCUSSION

III.2.5.1. Étude rhéologique

Les paramètres les plus importants pour les hydrogels thermosensibles en tant que supports d'encapsulation sont le comportement thermique et la température de transition du gel. **[80]** Autourdesol-geltransition la formation de points et de réseaux polymères, la viscosité de la viscosité augmentera considérablement (Fig.III.1a). Pour déterminer plus précisément le point de gélification des hydrogels, le premier dérivé de la viscosité complexe ($d\eta*$) en fonction de la température (T) a été tracé par MATLAB 7.0 (Fig.III.1b). Le pic de la courbe sert de point caractéristique de gélification.

Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau 2. Il est possible que le point d'aide de AG50 et AG75 soit près de la température corporelle (35°C – 37°C), ce qui les rend plus appropriés pour la procédure d'encapsulation. En ajoutant de la gélatine à l'agarose, la viscosité complexe au point de gel est passée de 1,25 × 10^4 (AG100) à 9,34 × 10^2 (AG25). Étant donné que le mélange des cellules dans la solution d'hydrogel doit être effectué à une température supérieure au point de gel, AG50 pourrait être considéré comme plus souhaitable pour l'encapsulation des cellules. Autrement dit, il provoque moins de dommages aux cellules pendant le mélange jusqu'à la prise de l'hydrogel.



FigureIII.1. Courbe de viscosité complexe (a) et premier dérivé de viscosité complexe (b) en fonction de la température (AG50).

Tableau III.2. Hydrogels de point de mélange de gel basés sur l'étude rhéologique

Exemple de code	**AG100**	**AG75**	**AG50**	**AG25**
Point de gel (◦C)	39 ± 0,3	37,1 ± 0,8	35,2 ± 0,5	28 ± 1,5
Viscosité complexe au point de gel (Pa.s)	1,25 ± 0,1 × 10^4	1,75 ± 0,08 × 10^2	1,63 ± 0,1 × 10^2	9,34 ± 0,12 × 10^2

III.2.5.2. Viabilité cellulaire, test MTT

La biocompatibilité est un paramètre important à considérer pour tout biomatériau. Nous avons analysé la viabilité cellulaire sur des hydrogels de mélange de cellules CHO ensemencées sur

des plaques de culture tissulaire via un test MTT. Le RGR des cellules en présence des films a été évalué. **[79]** Le RGR a été calculé via l'équation suivante :

$$RGR = ODe / ODc \times 100 \qquad (2)$$

Où ODe et ODc sont la valeur de densité optique moyenne des échantillons expérimentaux et témoins (boîtes de Pétri négatives standard en polystyrène). Les résultats sont présentés sur la **(figure III.2)**. Fait intéressant, le RGR pour AG50 était considérablement plus élevé que pour le témoin, d'environ 20%, ce qui prouve une excellente viabilité cellulaire. Le grade de toxicité cellulaire (CTG) des échantillons peut être obtenu par la relation entre RGR et CTG selon les relations entre CTG, RGR et toxicité basées sur la norme chinoise [**81**]**.** Le grade de toxicité cellulaire (CTG) des AG100, AG75 et AG25 était de grade 1 (75 <RGR <99) indiquant une non-toxicité. Cependant, sans surprise, l'AG25 avait le RGR le plus bas. Cela pourrait être dû au fait que davantage de dégradation et de gélatine libérée de cet hydrogel perturbaient l'environnement cellulaire.

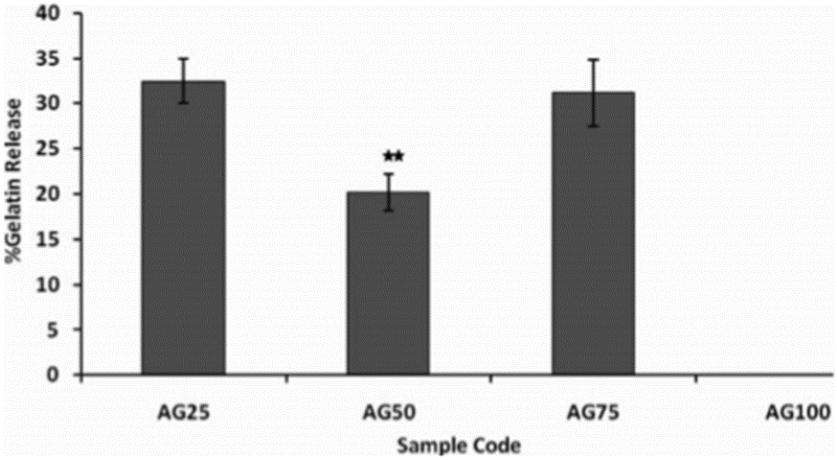


Figure III.2. Taux de croissance relatif des cellules CHO basé sur le test MTT (∗∗ indique p <0,05).

III.2.5.3. Stabilité intégrale

La gélatine subit une gélification physique en diminuant la température. Les gels de gélatine réticulés non chimiquement sont instables dans des conditions physiologiques (37 ° C, pH 7,4) et leurs chaînes se dissolvent dans le milieu [**82].** Le mélange de la gélatine dans l'agarose peut la rendre plus stable. En plus de l'enchevêtrement physique des chaînes d'agarose et de gélatine, la liaison entre ces deux molécules se produit par le biais d'interactions électrostatiques.

L'agarose est un poly-anion alors que pour la gélatine de type A (pH isoélectrique≈9), la charge positive domine dans le pH physiologique 7,4 **[83].** L'interaction ionique introduit une liaison plus intermoléculaire, donc fournit un mélange plus stable des réseaux de polymères et empêche la libération des chaînes de gélatine. Parce que les hydrogels de mélange préparés ont été construits par piégeage de la gélatine dans l'agarose et la présence d'interactions électrostatiques entre leurs chaînes, il semblait essentiel de tester l'intégrité des hydrogels. La libération in vitro de gélatine à partir d'hydrogels d'agarose / gélatine a été évaluée à l'aide du test de protéines de Bradford. Le pourcentage de gélatine libérée après 24 h est illustré dans **(Figure III. 2).** Comme on peut le voir, le rejet le plus faible a été celui de AG50 (20 %), tandis que AG25 et AG75 a démontré des rejets plus élevés, à environ 32 %. Les données montrent qu'une bonne intégrité pourrait être obtenue en utilisant des quantités égales d'agarose et de gélatine. La raison peut être attribuée à un plus grand nombre de liaisons électrostatiques entre les chaînes positives de gélatine et négatives d'agarose, ce qui résulte dans la réduction de la libération de gélatine à travers la matrice du gel.

III.2.5.4. Évaluation de la stabilité mécanique

La stabilité mécanique des microcapsules simplifie leur production et leur gestion dans les applications impliquant l'injection dans le corps et le contact avec les tissus corporels **[84].** Il peut être influencé par la composition du matériau qui, à son tour, dépend des proportions des deux polymères, l'agarose en tant que partie plus dure et la gélatine en tant que partie plus molle. **(Figure III. 3)** représente un échantillon de microcapsules intactes (à gauche) et endommagées (à droite) pour AG50 après avoir été soumis à une force de cisaillement pendant 24 h. Comme résumé dans **(tableau III.3**), AG50 et AG75 ont présenté une résistance mécanique extrêmement élevée (plus de 90% des microcapsules sont restées intactes et ont conservé leur forme). Cependant, le pourcentage de capsules rompues dans AG100 et AG25 était perceptible. Les microcapsules fabriquées à 100% d'agarose (AG100) possédaient la stabilité mécanique la plus faible. Cela est peut-être dû à la fragilité du gel d'agarose. L'ajout de gélatine à un réseau d'agarose jusqu'à 50% fournit une matrice plus élastique, résultant en une plus grande résistance à la force de cisaillement. Aucune différence significative de stabilité n'a été détectée entre AG75 et AG50.

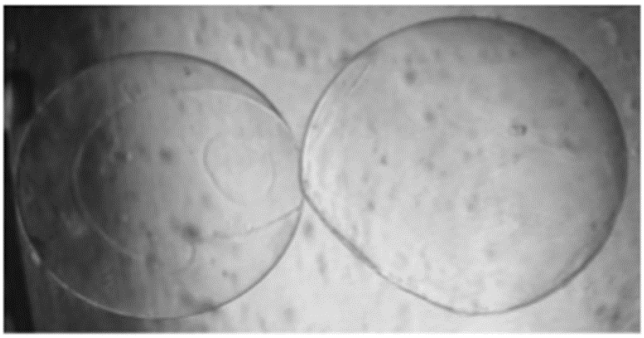


Figure III. 3. Un exemple de microcapsule intacte (à gauche) et endommagée (à droite) est ensuite soumis à une force de cisaillement pendant 24 h.

Tableau III.3. Pourcentage de microcapsules restées intactes

Exemple de code	AG100	AG75	AG50	AG25
Microcapsules intactes%	80,39 ± 2,82	92,86 ± 7,15	94,45 ± 5,56	84,58 ± 1,11

III.3 ETUDE DES AGRÉGATS INTERMOLÉCULAIRES GÉLATINE-AGAR DANS LE SURNAGEANT DE SON COACERVAT

III.3.1. MATÉRIAUX ET MÉTHODES

III.3.1.1. Produits

- La gélatine de type A (extrait de peau de bovin, bloom = 300) obtenu auprès de Sigma Chemicals (USA).
- L'eau désionisée.
- La gélose (extraite des algues rouges Gracilaria edulis prélevé dans le golfe de Mannar au sud-est côté de l'Inde, en utilisant la méthode décrite par Craigie et Leigh) **[85].**

III.3.1.2. Matériels

- Un autoclave.
- Un agitateur magnétique.
- Un turbidimètre (brinkmann-910, brinkmann instruments, usa) fonctionnant à 450 nm.
- Un ph-mètre sensible (précision = ± 0,01).
- Zeecom-2000 (microtec corporation, japon) zeta-sizer.
- Photocor-fc (photocor inc., états-unis).
- Un vibro-viscomètre (Modèle-SV10, Société A et D, Japon).

Remarque : Tous les autres produits chimiques utilisés ont été achetés à Thomas Baker, en Inde. Tous les produits chimiques étaient de qualité analytique.

III.3.1.3. Méthodes

Les échantillons de gélatine ont été utilisé tel que fourni. Le solvant utilisé était de l'eau désionisée, pH (en utilisant HCl 0,1 M ou NaOH 0,1 M) et la force ionique du le solvant a d'abord été réglé conformément aux exigences expérimentales et les solutions de gélatine (0,1%, p / v) ont été préparées par dispersion gélatine dans ce milieu à 60 ◦C.

Les macromolécules étaient laissées s'hydrater complètement ; cela a pris 30 min à 1 h. La gélification de concentration de la gélatine dans l'eau est de ≈2% (p / v), la concentration de la gélatine choisie dans ces expériences a été délibérément maintenue inférieure à celle-ci pour éviter la formation de gels **[86].** L'agar avait les propriétés physiques suivantes : force du gel 100 g / cm2 (gel à 1,5% à 20 ° C) ; température de gélification ≈36 ◦C et température de fusion≈85 ◦C. Solutions d'agar (0,1%, p / v) ont été préparés dans un autoclave en utilisant le même solvant. Tous les deux les solutions d'agar et de gélatine semblaient optiquement transparentes.

En règle générale, 20 ml de chacune des deux solutions mères (agar et de la gélatine, concentration = 0,1%, p / v) a été prise dans un bécher, qui a été maintenu sur un agitateur magnétique, et a été agité à vitesse modérée avec des barres d'agitation tout au long du processus de titrage. L'évolution de la transmittance de la solution a été surveillée en continu utilisant un turbidimètre. Un pH-mètre sensible a surveillé le pH du bécher. Soit diluer acide (HCl 0,1 M) ou base (NaOH 0,1 M) a été prélevé dans une burette et ajouté en gouttes dans le bécher de réaction pour observer la première occurrence de turbidité qui a été mesurée (pHC = 8,5), et le processus a été pour suivi jusqu'à une turbidité maximum a été observé (pH = 5).

La nouvelle augmentation du pH a entraîné le système vers le point de précipitation. Les valeurs de pHC et de Le pH caractérise l'initiation d'un agrégat intermoléculaire formation de complexes agar-gélatine à charge neutralisée. La solution de coacervation a été centrifugée à 5000 tpm pour séparer le coacervatoire du surnageant **[87].** Le surnageant était une solution diluée de complexes gélatine-agar, et nous l'étudions cette phase de ce travail.

Les mesures de mobilité électrophorétique ont été réalisées utilisant Zeecom-2000 qui a permis de mesurer directement la mobilité électrophorétique, et sa distribution.

La cellule électrophorétique était constituée de Téflon (dimensions 140 mm (L) × 40 mm (P) × 60 mm (H)) avec une distance entre les électrodes fixées à 10 cm. Dans tous nos mesure la tension de migration a été fixée à 25mV. L'instrument a été calibré contre des dispersions

colloïdales 10−4M AgI. Des expériences de diffusion dynamique de la lumière ont été réalisées (angle de diffusion = 90◦, longueur d'onde laser = 632,8 nm) sur un 256 canal Photocor-FC qui était exploité en le mode multi-tau (canaux espacés logarithmiquement). L'heure s'étendait sur 8 décennies, c'est-à-dire de 0,5 s à 10 s. Les données analysées à la fois dans la régularisation CONTIN et la distribution discrète modes (multi-exponentiel). Robustesse des résultats a été décidé sur la base de deux critères : la précision d'échantillon à échantillon, et la reproductibilité des données au sein d'un même échantillon. L'intensité de la lumière diffusée a été mesurée à 12 endroits différents et équidistants des angles de l'ordre de 20130◦ en utilisant un moteur pas à pas programmé attachée au goniomètre Photocor-FC. Valeurs du rayon de giration ont été déterminés à partir de parcelles de Guinier dont les détails peuvent être trouvé ailleurs **[88].** Les valeurs de viscosité ont été mesurées à l'aide d'un vibro-viscomètre.

III.3.2. RÉSULTATS ET DISCUSSION

III.3.2.1. Etudes électrophorétiques

Le premier objectif était de déterminer le potentiel zêta (ζ) de gélose et échantillons de gélatine. Une solution d'agar à 0,001% (p / v) a été soumise aux mesures de turbidité et d'électrophorèse en fonction de la force ionique de la solution. Les résultats pour les échantillons d'agar sont illustrés à la **(Figure.III.4)** (turbidité) et **(Figure.III.5)** (ζ). Même s'il y a est une dispersion significative des données **(Figure.III.4)** concernant la turbidité (100−% T, où T est la transmittance) pour certains échantillons, il y a une invariance claire de la turbidité avec le pH de la solution. **(Figure. III.5)** (pH 7) implique que le potentiel zêta est négatif pour toutes les forces ioniques (I) de solutions d'agar. L'image combinée qui a émergé était la gélose était anionique à tous les pH et toutes les forces ioniques, et à quel degré d'ionisation était indépendante du pH.

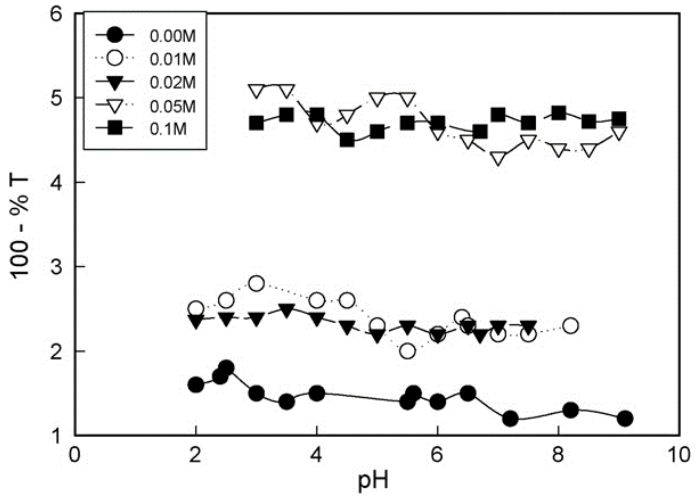


Figure III.4. Données de turbidité (100−% T, T est la transmittance) pour une solution aqueuse à 0,001% (p / v) solution d'agar mesurée à 20 ° C (longueur d'onde = 450 nm).

On remarque l'invariance Influence de la turbidité avec le pH de la solution impliquant le comportement polyélectrolyte de la gélose.

Les données de potentiel zêta pour la gélatine ont montré une dépendance considérable au pH, et pI était situé à ≈9 ± 0,3 (données non présentées).

Ainsi, pour les solutions de gélatine avec un pH <pI, son potentiel zêta était positif et vice versa. Cela a prescrit le protocole de complexation gélatine-gélose. Le charger des agrégats neutralisés de complexes gélatine-gélose se former si ces molécules réagissaient à un pH inférieur à 9.

En fait, les profils de turbidité et de potentiel zêta ont été observés être étroitement identique, comme le montre la **(figure III.5)**. La projection de Debye le potentiel zêta présentait un minimum à I = 0,05 M, alors que là même révélée par la turbidité a été trouvée à I = 0,02 M. la différence pourrait être attribuée aux artefacts de mesure. Pour un polyampholyte à faible densité de charge, comme le potentiel zêta de gélatine peut donner une estimation directe de la charge nette du polymère.

III.3.2.2. Études de viscosité

Les valeurs de viscosité mesurées à différentes concentrations (c) ont été convertis en données de viscosité spécifiques ηsp / c, ce qui était tracé en utilisant l'équation de Huggins **[89]**

$$\frac{\eta sp}{c} = [\eta] + k_H[\eta]^2 c \qquad (1)$$

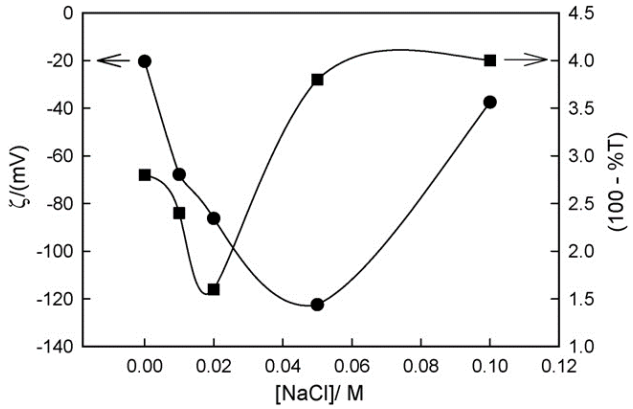


Figure III.5. Données d'électrophorèse et de turbidité pour une solution aqueuse de gélose à 0,001% (p / v) à différentes forces ioniques en solution.

On note que les profils sont identiques sauf un décalage observable des minimas de 0,03 M. Les données confirment la comportement poly-anionique de l'agar

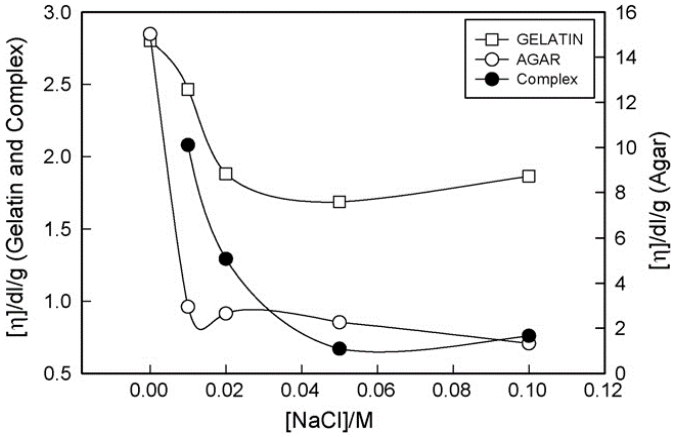


Figure III.6. Viscosité intrinsèque de divers échantillons mesurée à 25 ° C.

On remarque la forte diminution de la viscosité en fonction de la concentration en NaCl impliquant la génération de formes moléculaires symétriques. Voir le texte pour plus de détails. Les lignes pleines sont guidées à l'œil.

Où kH est la constante d'interaction de Huggins. Une voie alternative pour représenter les mêmes données est par l'équation de Kraemer-Fuoss **[84][89]** :

$$\frac{ln\eta rel}{C} = [\eta] + kn\,[\eta]2\;C \qquad (2)$$

L'expansion de Taylor pour de petites valeurs de ηsp donne des équations. (1) et (2) identique à k = (kH -0,5). Ainsi, les deux produiront la même viscosité intrinsèque. Nous avons choisi d'utiliser l'équation de Huggins qui a fourni d'excellents moindres carrés adaptés à l'expérimentation Les données. Les valeurs ainsi obtenues sont représentées sur la figure 3 pour diverses concentrations en sel des échantillons. Le correspondant les valeurs des coefficients d'interaction sont représentées sur la figure4 Intrinsèque la viscosité est liée au paramètre d'incrément de viscosité Simha (υ) à travers le volume spécifique partiel du polymère (ν2) comme **[90]** :

$$[\eta] = \nu 2\upsilon \qquad (3)$$

Le paramètre Simha dépend fortement de la géométrie forme (rapport axial) de la particule. Pour une particule sphérique.

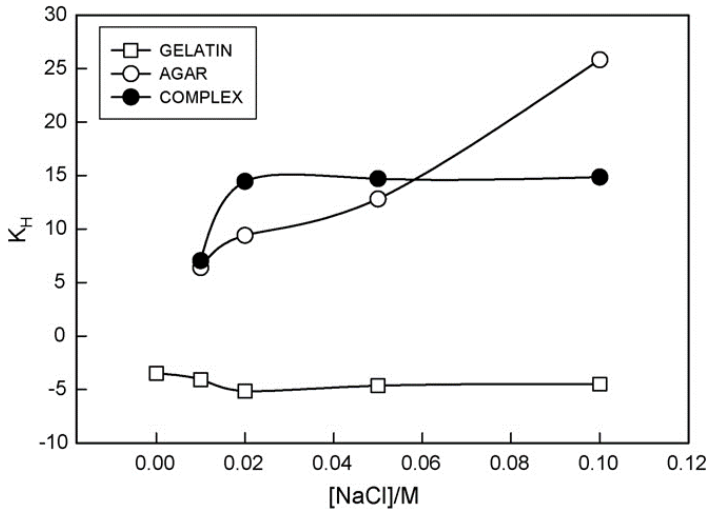


Figure III.7. Variation du paramètre d'interaction de Huggins (kH) en fonction de la force l'ionique de la solution.

Pour la gélatine kH reste invariant de la force ionique alors que pour l'agar et le complexe, il montre une forte dépendance. Voir le texte pour détails. Les lignes pleines ne guident que l'œil.

Table III.4. Paramètres physiques de divers biopolymères, et leur complexe à 25 ◦C

NaCl (M)	Polarized gelatin $\nu_2 = 0.73\ cm^3/g$			Agar $\nu_2 = 0.55\ cm^3/g$			Complex $\nu_2 = 0.65\ cm^3/g$		
	υ	L (nm)	d (nm)	υ	L (nm)	d (nm)	υ	L (nm)	d (nm)
0.00	380 ± 30	160 ± 15	1.7 ± 0.5	–	1128 ± 110	–	–	–	–
0.01	335 ± 25	150 ± 15	1.7 ± 0.5	540 ± 40	1444 ± 120	13 ± 2	232 ± 20	648 ± 50	15 ± 2
0.02	310 ± 25	145 ± 12	1.9 ± 0.5	480 ± 40	1634 ± 130	15 ± 2	199 ± 20	940 ± 60	16 ± 2
0.05	290 ± 20	140 ± 10	2.0 ± 0.5	410 ± 30	1785 ± 140	18 ± 2	103 ± 15	1166 ± 150	24 ± 3
0.1	280 ± 20	150 ± 10	2.0 ± 0.5	240 ± 25	2180 ± 160	30 ± 4	116 ± 18	1397 ± 160	35 ± 4

Il prend une valeur 2,5 et Eq. (3) se réduit au bien connu Équation d'Einstein. Dans l'ellipsoïde de la révolution, ellipsoïde prolate, le rapport axial, p = a / b (a = semi-majeur et b = axe semi-mineur) est lié au paramètre Simha par **[85]**:

$$\upsilon = \frac{p^2}{15(ln2p-1.5)} + \frac{p}{5(ln2p-0.5)} + \frac{14}{15} \qquad (4)$$

En outre, pour une particule en forme de tige de longueur, L d, la tige diamètre, on peut montrer que **[91]** :

$$p=\left(\frac{2}{3}\right)\left(\frac{l}{d}\right) \qquad (5)$$

Les données électrophorétiques présentées sur les **(Figures. III.4 et III.5)** établit l'agar comme un polyélectrolyte anionique fort. La gélatine est un polyampholyte ayant une conformation de bobine aléatoire, mais en présence d'un polyélectrolyte fort une telle conformation peut se transformer en conformation étendue. Dans l'analyse qui suit, nous supposons cet Eq. (5) est applicable à la fois à ces biopolymères et à leur complexe intermoléculaire.

Ainsi, en utilisant les valeurs de volume spécifiques partielles pour la gélatine et gélose de 0,73 et 0,55 ml / g, respectivement, il a été possible de déterminer le rapport axial à partir des paramètres connus de Simha. Celles-ci sont présentés dans le tableau 1. Le volume spécifique partiel du complexe (= 0,65 ml / g) a été déterminé en prenant la moyenne des deux biopolymères formant le complexe.

III.3.2.3. Études de diffusion de la lumière laser

Le logiciel CONTIN génère le temps de relaxation moyen de la fonction de corrélation d'intensité, qui est uniquement liée à Dynamique brownienne des particules diffusantes pour des solutions diluées **[92]**. Les rayons hydrodynamiques efficaces, Rh des particules, à la température T ont été déterminées à partir de la diffusion transrationnelle coefficient, D. Ces

valeurs ont été utilisées dans l'équation d'Einstein, D = kBT / f avec le coefficient de friction de translation, f = 6πη0Rh, où kB est la constante de Boltzmann et la viscosité du solvant est η0. Les valeurs de Rh ainsi déduites sont représentées sur la figure 5. Le rayon de Les valeurs de giration obtenues à partir de la parcelle de Guinier sont présentées sur la figure 6. Pour la gélatine, l'agar et le complexe. Le rapport des rayons, Rh / Rg est un indicateur de la forme des particules (symétrie) qui est tracé sur la **(figure III. 8) [84].** Pour un polymère à bobine aléatoire, il suppose une valeur ~ = 0,665 alors que pour une sphère dure, la même chose est ~ = 1.3.

La longueur du tige, L définie par Eq. (5) peut être déduit des valeurs Rg, pour L>> d, R2g = L2 /12 pour une particule en forme de tige tournant autour l'axe de la tige qui est le moins cher du point de vue énergétique mouvements dans un environnement surpeuplé. Ces valeurs de L sont listées dans le tableau avec les valeurs de diamètre de tige, déduites de Eq. (5).

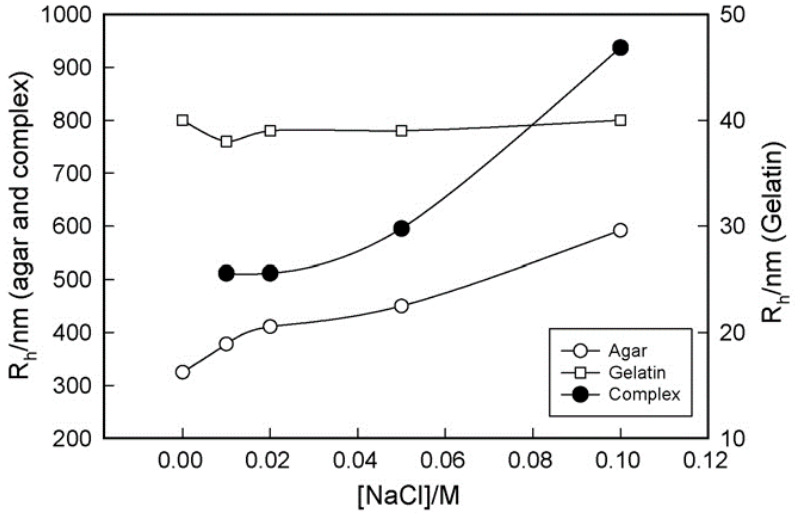


Figure III.8. Taille de diverses molécules mesurées en termes d'hydrodynamique efficace rayon par DLS pour une gélatine aqueuse à 0,1% (p / v), de l'agar et son complexe en solution en fonction des mesures de force ionique effectuées à 25 ◦C.

On remarque la forte augmentation de la taille effective du complexe due à la polarisation induite interactions électrostatiques. Voir le texte pour plus de détails. Les lignes pleines guident l'œil.

Un biopolymères en solution est souvent solvaté à divers degrés qui peut être déterminée à partir des données de diffusivité transrationnelle. Si la particule diffusante était une sphère sèche, elle aura le minimum de traduction coefficient de frottement, disons f_0.

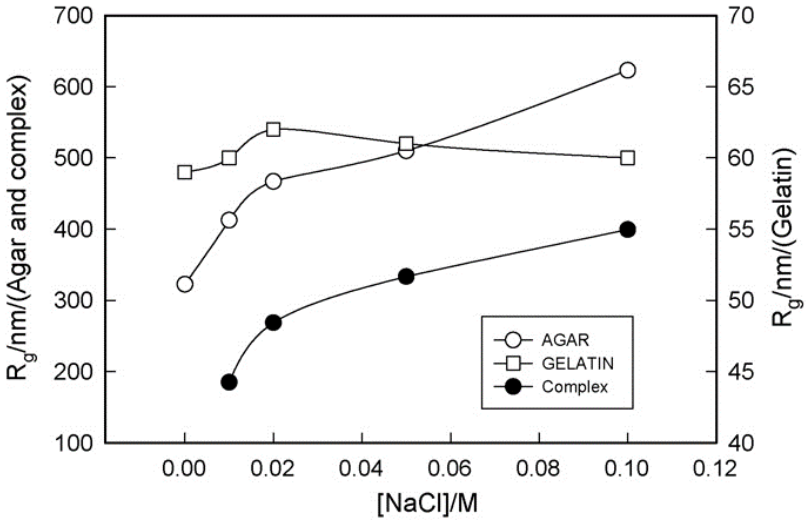


Figure III.9. Taille de diverses molécules mesurées en termes de rayon de giration efficace par SLS pour une gélatine aqueuse à 0,1% (p / v), de l'agar et son complexe en solution en fonction des mesures de force ionique effectuées à 25 ^{0}C.

On remarque la forte augmentation de la taille effective du complexe due à la polarisation induite interactions électrostatiques.

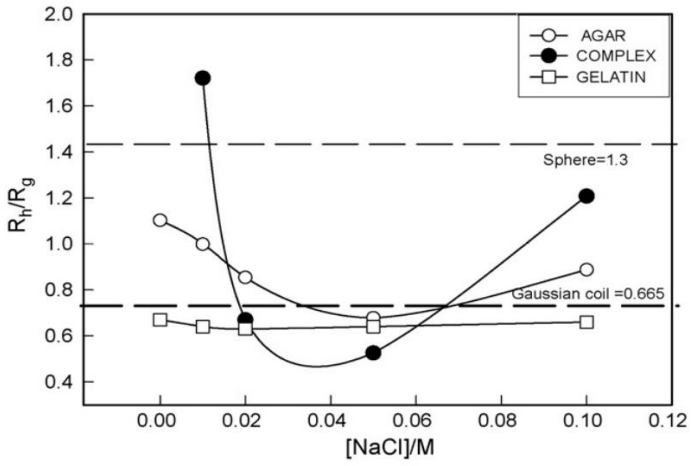


Figure.III.10. Rapport relatif de différentes tailles moléculaires pour une gélatine aqueuse à 0,1% (p / v), gélose et son complexe en solution en fonction des mesures de force ionique réalisée à 25 ◦C.

On note la forte variation des valeurs Rh / Rg du complexe.

Le rapport F/F_0 le facteur de Perrin, dans ce cas, reflétera l'asymétrie des particules et hydratation **[88]**. Simha a montré une excellente corrélation entre le rapport axial, p et le facteur de Perrin **[91].** Le Perrin's facteur pour la gélatine, la gélose et le complexe ont été évalués par l'utilisation de valeurs de rapport axial, et celles-ci sont présentées dans le **(tableau III.4).**

III.3.2.4. Structure moléculaire de la gélatine, de l'agar et du complexe

Le rapport axial et le facteur de Perrin obtenus à partir de la valeur intrinsèque les données de viscosité et de diffusion de la lumière sont représentées sur les **(Figure III.11, et Figure III.12)**. Pour les échantillons de gélatine, il a été observé que les deux paramètres Simha et le facteur de Perrin a diminué de ≈20% car la force ionique de la solution est passée de pas de sel à 0,1MNaCl. La gélatine est un polyampholyte à faible densité de charge ; le rayon hydrodynamique et les valeurs de rayon de giration mesurées sont cohérentes avec celles rapporté dans la littérature **[93,94].** Cependant, en présence d'un polyélectrolyte puissant, la répartition des charges sur la gélatine peut polariser ce qui lui permet de prendre une forme allongée en forme de tige.

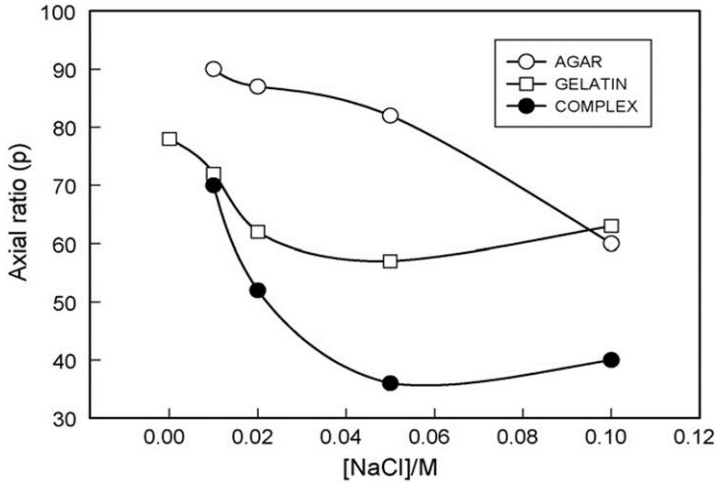


Figure III.11. Rapport axial de diverses molécules pour une gélatine aqueuse à 0,1% (p / v), gélose et son complexe en solution en fonction des mesures de force ionique effectuées à 25 ◦C.

On remarque le changement des valeurs de rapport axial du complexe en fonction de concentration en sel. Voir le texte pour plus de détails. Les lignes pleines guident l'œil.

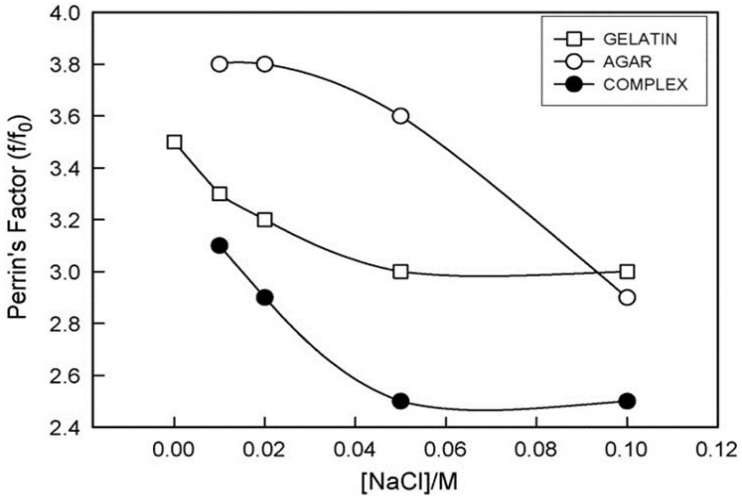


Figure III.12. Facteur de Perrin pour diverses molécules pour une gélatine aqueuse à 0,1% (p / v), gélose et son complexe en solution en fonction des mesures de force ionique réalisée à 25 ◦C.

On note le changement dans les valeurs des facteurs de Perrin du complexe en fonction de la concentration en sel. Voir le texte pour plus de détails. Les lignes pleines indiquent l'œil.

Nous en discuterons en détail dans la section suivante. Les données dans les **(figures III.11, et III.12)** indiquent clairement une réduction de la forme moléculaire l'asymétrie due aux interactions inter et intramoléculaires, mais cela n'est pas trop évident d'après la **(figureIII.10).** Cependant, le facteur de Perrin pourrait le refléter aussi clairement ; dans ce cas, la diminution de f / f0 était

≈20%. La valeur de la longueur de la tige, L, a été établie à 190 ± 10 nm indépendamment de la force ionique de la solution qui est le reflet de l'existence de molécules de gélatine en état de conformation mixte :

Bobine et hélice aléatoires. La gélatine est connue pour avoir une hélice typique longueur ≈200 nm. Les diamètres transversaux de ces les conformations ont été observées à environ 2 nm, contre la diamètre ≈0,35 nm et diamètre à triple hélice ≈1,5 nm rapporté dans la littérature **[94].** Ainsi, le diamètre en coupe observé soutient notre affirmation de la présence du mélange hélice-bobine conformation des molécules de gélatine sous l'expérimentation dominante conditions.

De façon intéressant, les données de **(Figure III. 10)** attribuent une conformation aléatoire de la bobine en gélatine, ce qui implique que la plupart des résidus dans la chaîne de gélatine appartenait à la partie de la bobine. L'Agar est un polyélectrolyte anionique et devrait avoir une conformation allongée en forme de tige avec une grande asymétrie structurelle dans des solutions à faible résistance ionique. **(Figure III. 10)** attribue une telle extension conformation

en molécules d'agar. Ceci est en outre indiqué par grand rapport axial et les valeurs du facteur Perrin qui sont indiquées dans **(Figues. 11 et 12)**. Il est intéressant de noter que le facteur de Perrin a été observé être ≈3,8 à 0,01 M NaCl qui a réduit à ≈3 à 0,1 M NaCl impliquant une réduction substantielle de son extension spatiale due à liaison des ions Na + à une partie importante du squelette poly-anionique. La neutralisation concomitante de charges partielles de certains les segments de poly-anion entraîneront le gain de conformation entropie, et donc à la génération d'une chaîne moins rigide. C'est également reflété dans le comportement dépendant de la force ionique du et le paramètre Simha, tous deux réduits d'autant comme ≈40%. En revanche, les valeurs L et d se sont révélées augmenter avec la force ionique. L'image cohérente qui se dégage d'ici il y a une agrégation intermoléculaire finie de l'agar dans des solutions de force ionique plus élevée. L'électrostatique attrayant interaction entre une paire de gélose à charge partiellement neutralisée les molécules ne peuvent pas être exclues, ce qui donnera une valeur L plus élevée dans expériences. Le diamètre transversal de la molécule était estimé à 13 ± 4 nm, qui est passé à 30 ± 9 nm à mesure que la concentration de sel a été élevée de 0,01 à 0,1 M, ce qui indique formation d'agrégats intermoléculaires décrits ci-dessus.

La forte diminution du rapport axial du complexe agar-gélatine **(Figure III. 10–12)** avec une augmentation de la force ionique indique une formation d'agrégats asymétriques en raison de la forte interaction entre la gélose poly-anionique et les molécules de gélatine polyampholyte.
(**Figure III. 10)** indique clairement qu'à faible concentration de sel, le complexe est très asymétrique, et lorsque la concentration en sel augmente il ressemble à une bobine gaussienne, et se rapproche enfin de la limite de sphère à la concentration de sel = 0,1 M. Par rapport à cela, les molécules de gélatine, en raison de leur conformation mixte, assumer un valeur Rh / Rg ≈0,65 (limite de bobine). La partie aléatoire de la bobine de cette conformation peut être supposé avoir la longueur de persistance≈2 nm rapporté dans la littérature **[94]**. Cette flexibilité permet au hasard segments de bobine pour se lier électro-statiquement à la formation d'agar complexes, mais la queue d'hélice non liée contribuera à donner un diamètre transversal amélioré à ces structures. Ces est clairement visibles à partir des données de diamètre transversal énumérées dans **(Tableau III.4)**.
D'après le diamètre de la section transversale indiqué dans le **(tableau III.4)**, On voit facilement que le rayon en coupe transversale de la gélatine et L'agar s'additionne pour donner le même complexe. C'est une observation intéressante compte tenu du fait que de grandes erreurs statistiques sont impliqués dans l'estimation de divers paramètres de longueur dans ces études.

III.3.2.5. Interactions gélatine-gélose

(Figure III.7) Illustre la variation du paramètre d'interaction de Huggins (kH) en fonction de la force ionique de la solution. Pour la gélatine kH reste invariant de la force ionique alors que pour la gélose, et le complexe il montre une forte dépendance.

Paramètre Huggins explique le gonflement d'une chaîne polymère neutre, aux interactions de volume exclues.

Normalement, kH diminue en la bobine flexible se dilate **[91]**. Pour les polyélectrolytes, il y aura une contribution supplémentaire de gonflement résultant d'intramoléculaire Interactions coulombiennes. Discriminer ces affects n'est pas anodin. Par conséquent, il appelle à une discussion qualitative. Quoi qu'il en soit, il est raisonnable de supposer que kH ~ = f (α3), où α est l'expansion de la bobine facteur. Pour les polymères neutres dans de bons solvants, kH suppose valeurs comprises entre 0,3 et 0,4 qui augmente à ≈1 en tant que conditions thêta sont approchés. Pour les sphères solides non chargées, il a été observé que kH ≈2 **[89,91].** Pour les polyélectrolytes, ces chiffres peut changer considérablement. Pour la gélatine, pas de changement appréciable La valeur kH avec la concentration de NaCl a été remarquée, ce qui implique l'absence de chaîne expansion : pas de changement dans la qualité du solvant. En cas d'agar kH la valeur a été multipliée par quatre à mesure que la concentration de sel augmentait de 0,01 à 0,1 Indiquant une expansion de la chaîne, α≈ (4) 1/3 ≈1,6 fois sa valeur d'origine. Les données Rg montrées sur la figure 6 concordent avec cette conclusion avec une valeur α≈2. Pour le complexe le facteur d'expansion obtenu à partir de la valeur kH était ≈1,4 alors que l'idem des données Rg ≈1.8. Ainsi, le surnageant a fourni une bonne environnement solvant au complexe. Interactions intermoléculaires révélant un comportement amélioré avec l'augmentation de la concentration en sel indique une Interactions coulombiques. Cela nécessite de modéliser les interactions dans un mode alternatif. La cinétique de formation de soluble complexes de polyélectrolyte (PE) et de polyampholyte (PA) molécules est bien documenté dans la littérature **[95,96]**. Normalement, ces complexes sont formés en grande partie en raison de l'intermoléculaire interactions électrostatiques généralement décrites par un Potentiel de Coulomb, UC (rij) = kBT (lBqiqj / rij), où la complémentarité les charges qi et qj sont séparées par une distance de rij à la température T. Le milieu d'interaction contrôle ce potentiel à travers la longueur de Bjerrum, lB = e2 / (εkBT) où l'électronique la charge est donnée par e, et la constante diélectrique est ε. Du Paramètre Huggins, on peut affirmer que l'expérimentation actuelle les observations ne soutiennent pas la dominance de simples électrostatique (comme UC (rij)) ou des interactions hydrophobes dans formation d'un complexe gélatine-gélose. La

possibilité d'attribuer ces interactions avec la liaison hydrogène intermoléculaire peuvent également être exclu du comportement de dépendance à la concentration en sel de kH. Ainsi, nous avons recours à l'interaction attractive induite par la polarisation modèle pour décrire ces phénomènes de complexation **[97]**.

Dans ce modèle, la séquence de charge éteinte du polyampholyte est dérangé en raison de l'attraction coulombique préférentielle entre des segments de PE et PA chargés de façon opposée. Dans la configuration la plus simple, le PA et le PE sont décrits comme des ressorts chaînes où les perles sont chargées. Le positif et les perles chargées négativement peuvent être adaptées pour être localisées soit au hasard ou périodiquement le long du squelette PA. L'accusé les billes (diamètre = σ) sont autorisées à interagir à travers un Potentiel de Lennard – Jones donné par **[98]** :

$$ULJ(r)= 4\varepsilon LJ\ [(\frac{\upsilon}{r})12 -(\frac{\upsilon}{r})6 - (\frac{\upsilon}{r})12 - (\frac{\upsilon}{r})6\ ] \qquad (6)$$

$$\text{Pour } r \leq rc;\ ULJ(r) = 0 \text{ for } r > rc$$

L'interaction est coupée pour des distances supérieures à rc qui est généralement égal à 2,5σ. La force d'interaction à courte portée est εLJ ≈0,35 kBT. Ce choix de εLJ reste vraiment valable pour thêta conditions pour les polymères neutres. Depuis, le PE interagit avec PA provoquant un changement conformationnel (en PA),

Ici R0 définit une distance caractéristique (liaison maximale longueur) à laquelle l'énergie élastique de la liaison devient infinie. Le total du potentiel de liaison est donné par la somme de Uel (r) et ULJ (r). eon et Dobrynin **[97]** ont exécuté Monte-Carlo simulation pour explorer les interactions PE – PA pour une symétrie 32 billes système utilisant le modèle d'interaction induite par la polarisation décrit par les Eq. (5) et (6). Les conclusions tirées étaient révélateurs. La molécule de PA, qui était dans un état compact, étiré le long du contour de la molécule de PE allongée, en raison de l'effet de polarisation créé par le champ électrique du Molécule de PE. La section de la molécule PA ayant la charge opposée à celui de la molécule PE s'est avéré aligner le long de l'Épine dorsale PE tandis que le segment de charge similaire est resté orienté loin faisant un angle avec l'épine dorsale PE. Une telle configuration minimisée l'énergie libre du système. Une autre observation intéressante était la position d'équilibre de l'AP molécule sur chaîne PE ; il a été trouvé à une tapette fine de la molécule PE. Ainsi, la barrière d'énergie d'activation de la molécule de PA à traverser à l'extrémité opposée du PE était a fait valoir qu'il

était beaucoup plus élevé que kBT. Réalisons que le PE – PA l'interaction à température ambiante est un processus basé sur l'énergie libre.

L'alignement mutuel entre le PE et le PA génère un courant électrique moment dipolaire qui montre une dépendance significative vis-à-vis de lB / σ. Diverses conformations géométriques du complexe PE – PA ont été montré énergétiquement favorable. Analysons nos données de diffusion de la lumière dans le cadre travail développé. La molécule de gélatine aurait un effet hydrodynamique rayon≈30 nm et rayon de giration≈50 nm **[93]**. Ainsi, un rayon hydrodynamique> 30 nm (valeurs actuelles ≈40 nm) implique une expansion de la bobine induite par la polarisation de la gélatine molécule par le polyélectrolyte, l'agar. Au-dessus de pI, nous avions une solution sans interaction, et les données DLS ont révélé deux tailles une correspondant à la gélatine (40 nm), et une autre à la gélose (≈300 nm). Comme le pH a été abaissé en dessous de pI, intermoléculaire les interactions ont prévalu et les molécules de gélatine se sont liées à la gélose molécules, augmentant ainsi la taille du complexe de 500 nm à env. 900 nm correspondant à l'augmentation de la concentration en sel de 0,01 à 0,1 M **(Figure III.8).**

Si la molécule de gélatine se propage le long du squelette d'agar, la taille de l'agar ne serait pas changée sensiblement. On observe une augmentation de près de 100% dans la taille des molécules complexes, on peut dire que la molécule de gélatine est liée de manière asymétrique à la gélose, peut être à l'extrémité du squelette PE faisant un angle fini, un peu comme le Jeon et description de la dobrynine **[98].**

III.4 L'ENCAPSULATION DANS DES MICROSPHÈRES DE GÉLATINE ENROBÉES D'ALGINATE AMÉLIORE SURVIE DU PROBIOTIQUE BIFIDOBACTERIUM ADOLESCENTIS 15703T PENDANT L'EXPOSITION À DES CONDITIONS GASTRO-INTESTINALES SIMULÉES

III.4.1. MATÉRIELS ET PRODUITS

III.4.1.1. Produits

- Gélatine (type A, de peau de porc, 300 Bloom),
- Alginique sel de sodium acide (viscosité moyenne),
- Tween 80,
- Span 85,
- Glycérol,
- Chlorhydrate de L-cystéine monohydraté,
- Pancréatine (P-1750) et pepsine (P-7000),

- 5-aminofluorescéine (Qualité HPLC),
- Diphosphorpentoxyde et EDC (1- [3- chlorhydrate de diméthylaminopropyl] -3-éthyl-carbodiimide) ont tous été fournis par Sigma Aldrich Co. (Oakville, ON, Canada).
- Genipin a été obtenu auprès de Challenge Bioproducts Co. Ltd. (CBC, Taiwan, R.O.C.), tandis que le bouillon de Man, Rogosa et Sharpe (MRS), gélose MRS, bile les sels (Oxgall) et la peptone bactériologique ont été fournis par Oxoid Inc. (Nepean, ON, Canada).
- Système Gas Pak Plus (enveloppes de générateurs de gaz et pots anaérobies de BBL),
- -Le 1,4-dioxane et le chlorure de sodium ont été fournis par Fisher Scientifique (Nepean, ON, Canada) et Bifidobacterium adolescentis 15703T a été fourni par American Type Culture Collection (Manassas, VA, États-Unis).
- -L'huile de canola était obtenu auprès de LOBLAWS Inc. (Montre´al, QC, Canada).

III.4.1.3. Matériels

- Caframo Real Torque Digital Stirrer
- Whatman n° 4, papier filtre, Fisher Scientifique
- Vortex
- Homogénéisateur Polytron.
- Membrane (0,45 lm, Nalgene Brand Products, Nalge Co., Rochester, NY, USA
- Microscopie optique
- Microscopie fluerescence

III.4.1.4. Préparation des cellules pour la microencapsulation

Cultures de souches congelées (2 ml, SRM avec 20% v/v de glycérol) de B. adolescentis 15703T ont été inoculés dans 500 ml de MRS bouillon contenant de la L-cystéine stérilisée par filtration (0,5 g l1) et incubé à 37 C pendant 24 h pour obtenir une densité cellulaire d'environ 109-1010 unités formant colonie par ml (cfu/ml). Récolte de cellules a été réalisée par centrifugation à 8000 tours/minute (3578g) pour 10 min à 4 C et après avoir jeté le surnageant de bouillon de culture, le culot cellulaire a été remis en suspension dans une solution saline de peptone (PS, 1 g l1 de peptone, 8,5 g l1 de NaCl) et centrifugé à nouveau dans les mêmes conditions. Les cellules lavées étaient ensuite en suspension dans un total de 10 ml de PS et conservé à 4 ^{0}C jusqu'à l'usage. Des suspensions de cellules fraîches ont été préparées pour chaque expérience et dénombrés par ensemencement en gélose MRS contenant L-cystéine stérilisée par filtration (0,5 g l1, MRS-cys agar). Les plaques ont été incubées en anaérobiose à 37 C pendant trois jours en utilisant le système GasPak Plus

III.4.1.5. Préparation de microsphères avec encapsulé B. adolescentis 15703T

Microsphères de gélatine réticulée à la génipine non enrobée ont été préparés en dissolvant de la poudre de gélatine dans une solution de NaCl (0,5% p/v) à 50 C pour obtenir une concentration finale de gélatine de 13% (p/v) dans les microsphères. Un millilitre de La suspension de cellules lavées a été ajoutée à de la gélatine aqueuse pour obtenir un rapport cellule/polymère en solution de 1:10 et Le mélange aqueux de gélatine cellulaire a ensuite été émulsifié en huile (45 C, rapport de volume entre la phase aqueuse et la phase huileuse de 1:5) contenant 0,5 % de Span 85 (p/p). L'émulsion a été produite en remuant pendant 30 minutes à l'aide d'un Caframo Real Torque Digital Stirrer (Caframo Ltd., Wiarton, ON, Canada) à une vitesse constante (900 tr/min).

La solution Genipin donne une concentration de 1,25 mmol l1 dans les microsphères de gélatine a ensuite été ajoutée et l'émulsion a été laissée en place en remuant pendant la nuit à température ambiante (22 ^{0}C) afin de permettre l'achèvement de la réaction de réticulation génipine-gélatine.

Un mélange de lavage (8,5 g de NaCl, 5 g de Tween 80 dans 1l d'eau) a été ajoutée dans un rapport de 1 :1 à la gélatine aqueuse et les microsphères ont été récoltées avec deux lavages ultérieurs dans une ampoule à décanter pour éliminer la phase huileuse, filtrée (Whatman n° 4, papier filtre, Fisher Scientifique) et stocké dans la PS à 4 ^{0}C jusqu'à ce qu'il soit prêt à être utilisé.

Les procédures pour l'enrobage des microsphères de gélatine par l'Alginate ont été développées à l'aide de deux techniques, à savoir la (a) méthodes de gélification externe et (b) gélification interne ou in situ en utilisant une source de Ca^{2+}.

(a) Pour la méthode de la source externe de Ca^{2+}, les microsphères de gélatine avec des Bacteries encapsulées ont été préparés comme décrit ci-dessus. Dix grammes de microsphères filtrées ont été ajoutés à 40 g d'alginate de viscosité moyenne à 1 % (p/v) et agité à une vitesse initiale de 900 tr/min pour disperser les perles. Les microsphères ont été laissées à l'état d'agitation dans de l'alginate pendant 20 minutes à 600 tours/minute avant d'être filtré, collecté et remis en suspension dans 60 g d'huile contenant 5 g l^{-1} de Tween 80 et 62,5 mmol l^{-1} $CaCl_2$ pendant 20 min pour amorcer la Réticulation Ca^{2+} de la couche périphérique d'alginate.

Vers casser l'émulsion, 40 ml de solution de 0.05 mol l^{l-} de $CaCl_2$ préparée en PS a été ajoutée, suivie d'un transfert vers un entonnoir. Les microsphères revêtues d'alginate réticulé par Ca^{2+} ont été collectées et stockées dans des PS avec 0,05 mol l^{-1} $CaCl_2$ jusqu'à une analyse plus approfondie.

b) Une méthode interne de détermination de la source de Ca^{2+} a été mise au point basé sur une modification **[99]**, une méthode appliquée pour les microsphères à base de protéines de lactosérum enrobées d'alginate.

Ici, la formation de l'enrobage d'alginate Ca^{2+} dépend de la diffusion des ions Ca^{2+} dissous dans l'eau de la gélatine à la surface de la matrice de gélatine pour la réticulation de la couche périphérique d'alginate. Les microsphères de gélatine ont été fabriquées comme décrit ci-dessus, sauf qu'une concentration finale de 0,1 mol l^{-1} $CaCl_2$ a été ajoutée à la phase aqueuse de gélatine. Le produit contenant du Ca^{2+} qui en résulte des microsphères de gélatine ont été récoltées, filtrées et lavés deux fois à l'eau désionisée.

Dix grammes des microsphères ont été pesées dans 40 g de milieu à 1 % (p/v) solution d'alginate de viscosité et dispersée à une vitesse initiale de 900 tr/min suivi d'une agitation pendant 20 min à 600 tr/min. Le site par filtration, les microsphères récupérées ont été à nouveau lavées trois fois avec de l'eau déionisée et ensuite dispersée (900 tr/min) dans 60 ml de PS avec 0,05 mol l^{-1} de $CaCl_2$ et à gauche pour remuer doucement (600 tr/min) pendant 20 min. Les microsphères ont été filtrés, rincés et stockés dans des PS contenant 0,05 mol l1 CaCl2 jusqu'à une analyse plus approfondie.

III.4.1.6. Dosage de survie de cellules microencapsulés librées et B. adolescentis dans le suc gastrique et intestinal simulé

Le liquide gastrique simulé (SGJ) a été préparé en dissolvant de la pepsine dans une solution saline (0,2% NaCl, p/v) à une concentration finale de 0,3 g l^{-1} et en ajustant le pH à 2,0 avec HCl concentré. Le mélange a été filtré de manière stérile à travers une membrane (0,45 lm, Nalgene Brand Products, Nalge Co., Rochester, NY, USA). Les auteurs notent cependant, que la simulation des sucs gastriques pour les études in vitro a tendance à surestimer les pertes de viabilité qui surviendraient in vivo, car il est connu que la présence de composants alimentaires peut élever temporairement le pH gastrique **[100]**. En outre, la consommation de denrées alimentaires avec une teneur en hydrates de carbone peut fournir Bifidobacterium s'efforce avec énergie de surmonter le stress acide en l'utilisation de la pompe ATPase F0F1**. [101] [102]**

Le liquide intestinal simulé (SIJ) a été préparé sur la base la méthode de (Huang et Adams (2004)). La pancréatine et les sels biliaires ont été mis en suspension dans le PB jusqu'à des concentrations finales de 1 g l^{-1} et 4,5 g l^{-1}, respectivement. Le mélange a été ajusté à un pH de 7,4 avec 0,1 mol l^{-1} de NaOH et filtrée de manière stérile.

Les liquides gastriques et intestinaux ont été préparés à l'état frais pour à utiliser le même jour. Suspensions cellulaires lavées de B. adolescentis (0,5 ml) ou 0,5 g de microsphères contenant des bactéries piégées ont été ajoutés à 4,5 ml de SGJ tempéré (37 ^{0}C), bien mélangé par vortex

pendant 10 s et incubé pendant 5, 30, 60 et 120 min à 37 ^{0}C avec l'agitation périodique et la surveillance du pH dans le SGJ.

Les cellules piégées ont été libérées des microsphères par homogénéisation en utilisant un homogénéisateur Polytron et des bactéries survivantes après chaque intervalle de temps déterminé énuméré par le comptage des plaques de coulée dans la gélose MRS-cys à 37 ^{0}C pendant 72 h comme décrit ci-dessus.

III.4.1.8. Essai de survie et de la stabilité de B. adolescent microencapsulées après séquentiel incubation dans des sucs gastriques et intestinaux simulés

Suspensions cellulaires lavées de B. adolescentis (0,5 ml) ou 0,5 g de microsphères contenant des bactéries piégées ont été ajoutés à 4,5 ml de SGJ tempéré (37 ^{0}C), bien mélangé par vortex pendant 10 s et incubé pendant 60 min à 37 ^{0}C. Simulation intestinale du liquide tempéré à 37 ^{0}C a ensuite été ajouté et le pH ajusté à 7,4 avec 0,1 mol l^{-1} de NaOH. Le volume final du mélange a été porté à 10 ml avec un tampon de phosphate et incubé pendant 60, 120 et 240 min à 37 ^{0}C avec des tremblements. Les bactéries qui survivent après des périodes d'agitation séquentielle d'incubation ont été dénombrés par des comptages sur plaque de coulée en Gélose MRS-cys à 37 ^{0}C pendant 72 h comme décrit ci-dessus.

III.4.1.9. Stabilité de la gélatine enrobée et non enrobée d'alginate microsphères lors d'une exposition à des gastriques et liquide intestinaux

La stabilité des microsphères avec des bactéries piégées pendant l'incubation séquentielle a été évaluée en observant la désintégration au microscope optique (grossissement 100) toutes les 5 min. Le temps de la désintégration complète de microsphères a été enregistrée.

Une microscopie à fluorescence et CLSM a également été réalisée sur microsphères enrobées d'alginate, préparées avec l'alginate marqué à la fluorescéine comme décrit ci-dessus, qui avait été exposé à SGJ pendant 1 h et à SIJ pendant 1 h après exposition à SGJ pendant 1 h.

III.4.2. RÉSULTAT

III.4.2.1. Survie de B. adolescentis libre et encapsulé dans suc gastrique simulé

Encapsulation dans des microsphères de gélatine recouvertes d'alginate amélioration significative ($P < 0,05$) de la survie des bifidobactéries **(Fig.III.15).** La survie des cellules après une exposition au SGJ pendant 5 minutes était de 54 %, 20 %, 2 % et 1 % des populations initiales se trouvant dans les microsphères revêtues d'alginate produites par des sources internes de Ca^{2+} , les microsphères de gélatine non enrobées et respectivement des cellules libres. Après

les pertes initiales, les populations de bifidobactéries a diminué au même rythme pour tous les traitements sur la période d'incubation de 2 h **(Fig.III.13)** avec des diminutions de 3,45 log (cfu/ml) pour les cellules libres, 2,55 log (cfu/ml) pour les microsphères non enrobées et 1,21 log (cfu/ml) et 1,75 log (cfu/ml) pour les microsphères enrobées avec de l'alginate réticulé par l'extérieur et l'intérieur Les méthodes de source de Ca^{2+}, respectivement. Le pH moyen de SGJ contenant des cellules libres après 120 min était de 2,1 ± 0,1 alors que Le pH du SGJ contenant des perles encapsulées était de 2,2 ± 0,2.

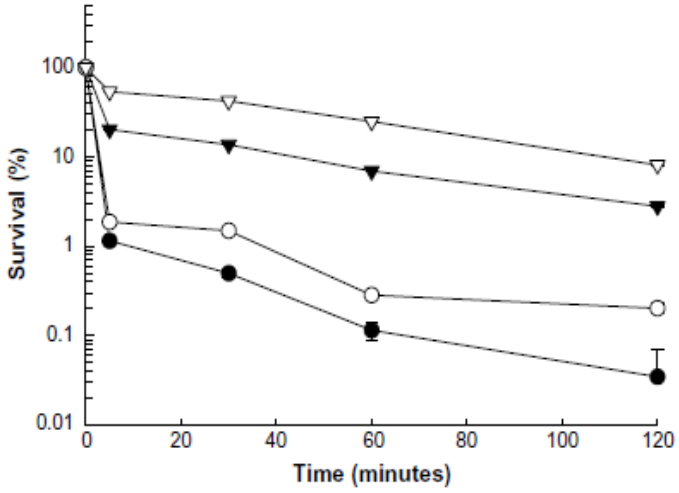


Figure III.13. Survie de B. adolescentis libre et encapsulé dans la gélatine pendant exposition au suc gastrique simulé (pH 2,0) à 37 ° C Symboles : (●) cellules libres, (○) non revêtues, (▼) recouvertes d'alginate de Ca^{2+} internes et (▽) recouvert d'alginate de Ca^{2+} externe. La survie (%) représente le pourcentage de cellules survivant par rapport à la population initiale.

Moyens (n = 8) ± standard écart (n 1).

III.4.2.2. Viabilité des cellules libres et encapsulées de B. adolescentis pendant l'incubation séquentielle dans des gastriques et liquide intestinaux.

Le transfert séquentiel de cellules libres et encapsulées bifidobactéries après 60 minutes d'incubation dans le SGJ a donné une réduction initiale des cellules viables pendant la première heure de l'exposition à l'IJS, mais le nombre de cellules s'est ensuite stabilisé et aucune autre réduction n'a été observée après 120 et 240 min **(tableauIII.5).** Dans l'ensemble, l'exposition séquentielle à SGJ (60 min) suivi de l'ISJ (240 min) ont donné lieu à des ($P < 0,05$) plus grand nombre de B. adolescentis survivant en les microsphères de gélatine enrobées d'alginate 7,35-7,57 log (cfu/ml) que celles obtenues pour les cellules libres et les cellules piégées dans des microsphères de gélatine non enrobées 6,41- 6,71 log (cfu /ml).

III.4.2.3. Stabilité de la gélatine enrobée et non enrobée d'alginate microsphères lors d'une exposition à des gastriques et liquide intestinaux

Temps de désintégration des microsphères de gélatine enrobées d'alginate dans l'ISJ étaient plus longues pour les microsphères produites par la méthode de la source externe de Ca^{2+} (240 min) que pour ceux produite par la méthode de la source interne de Ca2+ (120 min), indiquant une différence dans la couche superficielle d'alginate obtenue par les deux méthodes **(tableauIII.5)**. Microsphères de gélatine non enrobées étaient déjà désintégrés après 45 min dans le SGJ avant d'arriver à l'ISJ.

Tableau III.5 Temps de désintégration de la microsphère (min) et nombre de cellules survivantes (log cfu/ml) pour B. adolescentis libre et encapsulé pendant l'incubation séquentielle (37 C) dans les sucs gastriques (SGJ) et intestinaux (SIJ) simulés.

Traitement	**Temps de désintégration**	**SGJ**		**SIJ**		
		0min	**60min**	**60min**	**120min**	**240min**
Cellules libres		10.41 ± 0.17^{xa}	7.12±0.09^{x}	5.48±0.15^{x}	6.40 ± 0.31^{x}	6.41 ± 0.20^{x}
Non enrobée	-15 ± 5^{b}	9.67±0.35^{y}	7.13±0.27^{x}	6.59±0.04^{x}	6.52 ± 0.04^{x}	6.71 ± 0.08^{y}
Interne Ca^{2+}	120 ± 15	9.60±0.54^{y}	8.00±0.17^{y}	7.11±0.45^{y}	6.82 ± 0.34^{xy}	7.57 ± 0.28^{z}
Externe Ca^{2+}	240 ± 30	9.76±0.09^{y}	8.92±0.78^{y}	7.38±0.15^{y}	7.31 ± 0.40^{y}	7.35 ± 0.41^{z}

(La Figure III.14.a) montre une image au microscope à fluorescence de perles d'alginate-gélatine enrobées après 1 h dans le SGJ et il On peut voir que ce revêtement a été efficace pour rendre les microsphères d'alginate-gélatine résistantes à la dégradation par pepsine dans le suc gastrique acide, ce qui maintient des bactéries probiotiques piégées dans la matrice de gélatine. (**Figure III.14.b)** montre une image CLSM des perles après incubation séquentielle en SIJ pendant 1 h où le revêtement d'alginate, qui a maintenu l'intégrité des microsphères dans le SGJ, est commencé à s'éroder dans les conditions neutres que l'on trouve dans l'intestin grêle avec une désintégration ultérieure de la matrice de gélatine sous-jacente et la libération des bactéries probiotiques **(Fig. III.14.b).**

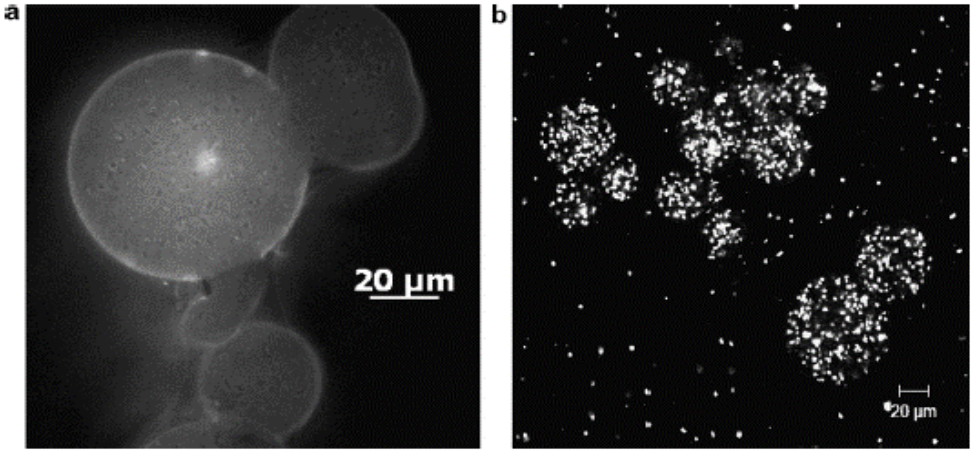


Figure III.14. Stabilité des microsphères de gélatine revêtues d'alginate lors de l'exposition à des conditions gastro-intestinales simulées. Photographies par microscopie à fluorescence de (a) microsphères entières revêtues d'alginate dans le SGJ (1 h, 37 ^{0}C) et (b) image CLSM de microsphères revêtues d'alginate se désintégrant dans le SIJ (1 h, 37 ^{0}C) après une première incubation dans le SGJ (1 h, 37 ^{0}C). Les barres d'échelle représentent 20 µm.

III.4.3. DISCUSSION

III.4.3.1. Comparaison de la survie des cellules libres et encapsulées dans suc gastrique simulé

Selon Smith (1995), les aliments restent dans l'estomac pendant 2 à 4 h pendant que les liquides se vident de l'estomac en seulement 20 minutes environ. Dans le but d'améliorer la survie des bifidobactéries probiotiques pendant l'exposition à le faible pH de l'estomac, nous avons testé l'hypothèse selon laquelle le pouvoir tampon de la gélatine entraînerait une augmentation la survie des cellules encapsulées par rapport aux cellules libres cellules. Encapsulation de bifidobactéries dans de la gélatine non enrobée Les microsphères n'ont amélioré que marginalement la survie des celle des cellules libres **(Figure. III.15),** cependant, la gélatine seule des microsphères étaient structurellement instables dans le SGJ en raison dégradation par la pepsine et complètement désintégré après 45 min **(Tableau III.5)**. Le revêtement d'alginate de 1-2 µm d'épaisseur a empêché la pepsine de la dégradation des microsphères de gélatine et le piégeage dans des microsphères de gélatine intacte de manière significative ($P < 0,05$) amélioration de la survie des bifidobactéries piégées tout au long de la période d'essai de deux heures **(Fig.III.15),** indiquant l'effet tampon protecteur de la gélatine intacte microsphères .ont également signalé que le L'effet tampon des protéines de lactosérum a contribué à une meilleure survie pour les bifidobactéries encapsulées dans un gel mixte d'alginate, pectine et protéines de lactosérum par rapport aux protéines libres lorsqu'elles sont exposées au SGJ à un pH de 2,5.**[103]** ont découvert que des capsules de gélatine chargées d'un cancer et enrobée de 20 %

d'alginate est restée intacte jusqu'à 8 h dans le SGJ alors que les microsphères non enrobées se désintègrent après 15 minutes, leurs microsphères étaient cependant réticulées avec le gluteraldéhyde cytotoxique. La diminution de la population viable de 3,45 unités log pour les cellules B. adolescentis libres était similaire aux résultats obtenus par **[104][105]**qui ont observé des réductions d'environ 3 log cfu/ ml pour les adolescents B. exposés au SGJ (pH 2,0) pendant 2 à 3 h. La force et la structure des hydrogels d'alginate a été démontré que l'augmentation de la durée de gélification a une influence sur les résultats. Et/ou la concentration de Ca2+ en raison de la formation d'un plus grand nombre de liens croisés **[106][107]**. Dans la présente étude, tant le taux de diffusion et la concentration de Ca2+ sont susceptibles d'avoir différait entre les deux méthodes de revêtement, ce qui a entraîné l'apparition de microsphères externes recouvertes d'alginate de source Ca2+ plus forte (plus difficile à homogénéiser et plus longue à la désintégration dans les SGJ/SIJ **(Table III.5)** et plus protectrice aux cellules piégées **(Figure.III.15)**

III.4.3.2. Survie des cellules libres et encapsulées de B. adolescentis pendant l'incubation séquentielle dans simulée gastro-intestinale conditions

Alors que le gel d'alginate inotrope formé par la réticulation du Ca^{2+} des groupes carboxylates est insoluble à faible pH, l'exposition à un pH neutre ou supérieur solubilise l'alginate **[108] [109].** Dans notre étude, ce comportement dépendant du pH du biopolymère a été utilisé pour contrôler la dégradation des microsphères de gélatine enrobées d'alginate et libération de la charge de cellules microencapsulées dans des conditions neutres trouvé dans l'intestin grêle (tableau 1 et figure 2), où le temps de transit des aliments est compris entre 1 à 4 h **[110]**. La réduction continue du nombre de cellules dans l'ISJ, en particulier pendant la première heure d'incubation dans cet environnement peut être attribuée à la sensibilité de B. adolescentis à la bile et pour les cellules piégées, également à l'intégrité physique de la matrice de microsphères. La sensibilité de nombreuses souches de Bifidobacterium spp. Aux concentrations de bile rencontrées dans Le tractus gastro-intestinal humain a été signalé par plusieurs **[111][112][113][114]**. À des cocentrations de bile de 2 %, **[115]** ont observé une diminution de cinq log du nombre de cellules viables de B. adolescentis après 12 h d'incubation à 37 ^{0}C. **[116]** a constaté que le nombre de B. adolescentis a diminué d'environ 2 log cfu / ml après 2 h d'incubation dans la bile à 0,5% (p/v) à 37 ^{0}C. **[117]** ont étudié la viabilité de B. lactis et B. adolescentis pendant l'exposition au stress dû au sel biliaire et a constaté que B. adolescentis était plus susceptible des effets des sels biliaires. Ils ont également observé que les effets sublétaux les lésions causées par les sels biliaires peuvent entraîner une fraction non cultivable de la population. Il est intéressant de noter que le nombre de cellules libres dans l'IJS est passé

de 5,48 5(log ufc/ml) après 60 min à 6,40 log (cfu/ml) après 120 min et est restée stable jusqu'à 240 min, mais cette L'augmentation était très probablement due à la récupération des cellules et non car il n'y avait pas de nutriments disponibles dans les le suc intestinal. Cette observation est en accord avec les précédentes des rapports sur la récupération ultérieure des biens temporairement endommagés les cellules de bifidobactéries après exposition à un pH faible et au sel biliaire **[118].** Nombre plus élevé de cellules survivantes dans la gélatine enrobée d'alginate Les microsphères après incubation dans le SGJ ont contribué à plus de cellules survivant à l'incubation séquentielle en SIJ et a montré que la matrice de microencapsulation était efficace en protégeant les cellules piégées avec des niveaux de survivants de 7,6 et 7,4 (log cfu/ml) par opposition aux niveaux de 6,4-6,7 log cfu/ml trouvé pour les cellules libres et les cellules piégées dans des microsphères de gélatine uniquement après quatre heures d'I.S.J. **[103]** ont galement constaté qu'un B. Bifidobacterium immobilisé initialement population de 10^{10} cellules/g dans un alginate mixte, la pectine et la matrice de protéines de lactosérum pourrait atteindre l'intestin grêle dans de 7,5 cellules log /g et fournissent donc à l'hôte avec un effet bénéfique sur la santé.

III.5 PRÉPARATION ET CARACTÉRISATION D'ALGINATE – GÉLATINE COMPLEXE POUR LA MICROENCAPSULATION DE BACILLUS SUBTILIS SL-13 PAR ÉMULSIFICATION / GÉLIFICATION INTERNE

III.5.1. MATÉRIELS ET MÉTHODES

III.5.1.1. Produits

- Le NaALG et la gélatine ont été achetés auprès de Xilong Chemical Co., Ltd (Guangdong, Chine).
- Des nanoparticules de CaCO3 d'une taille moyenne de 50 nm ont été fournies par Fuchen Chemical Co., Ltd (Tianjin, Chine).
- L'huile de soja a été fournie par Huichang Co., Ltd (Shihezi, Chine).
- L'acide acétique glacial, le Span 80 et le CaCl2 ont été achetés auprès de Hengxing Chemical Co., Ltd (Tianjin, Chine).
- Tous les produits chimiques et réactifs utilisés étaient de qualité analytique

III.5.1.2. Matériels

- Agitateur mécanique (IKA RW20, Allemagne)
- Laser (Microtrac S3500, États-Unis)
- Logiciel intégré (Image Pro Express version 4.0).

III.5.1.3. Culture de cellules

La souche SL-13 utilisée dans cette étude a été précédemment isolée dans la province du Xinjiang Chine. Les SL-13 ont été cultivées dans un milieu liquide d'agar nutritif (NA) (5 g d'extrait de bœuf, 10 g de peptone, 5 g de NaCl, 1000 ml H2O et pH 7,0–7,2) avec agitation à 200 tr / min et à 30 ° C pendant 36 h. Les cellules ont été récoltées en phase stationnaire et déterminées comme 1013 UFC / mL de concentration dans des plaques de gélose NA pour une incubation d'une nuit à 30 ° C par méthode de la plaque à tartiner.

III.5.1.4. Préparation de microparticules

La procédure d'encapsulation a été modifiée comme suit pour l'encapsulation SL-13.**[119]** Solutions de mélange (80 ml) de NaALG (2%) et divers contenus de gélatine (0, 0,5, 1,0, 1,5, 2,0 et 2,5%) ont été stérilisés pour utilisation.

Une portion de 20 ml de surnageant de cellules SL-13 a été dispersé aseptiquement dans des solutions de mélange, et 2 g de CaCO3 ont ensuite été ajoutés pour homogénéiser les solutions. Ensuite, deux fois le volume d'huile de soja (phase continue) contenant 2,5% (p / v). Span 80 a été ajouté dans la solution homogénéisée sous agitation à 1200 tr / min pendant 15 min avec un agitateur mécanique (IKA RW20, Allemagne) pour former une émulsion eau-dans-huile uniforme. Sous agitation continue, 0,5 ml de glace de l'acide acétique a été ajouté dans l'émulsion pour initier la gélification interne.

Après 15 min de sous agitation, les microparticules ont ensuite réagi de manière adéquate en les mélangeant avec un CaCl2 (2%) solution d'agent de réticulation et l'agitation a été interrompue. Des microparticules ont été collectées de la dispersion d'huile par centrifugation. Les billes ont été lavées en utilisant 100 ml de stérile solution saline physiologique (0,9%) par filtration sous vide et stockée à 4 ° C.

III.5.1.5. Analyse de biodégradabilité

Les résultats de biodégradabilité ont été exprimés en pourcentage de perte de poids des billes étude en milieu pédologique NaALG et microcapsules d'alginates de sodium – gélatine (NaALG – GE) ont été placés dans des sacs en nylon à mailles très fines (10–20 μm), 100 mg de microcapsules séchées par sac ont été enterrés à 5 cm sous la surface du sol dans le sol naturel. Le sol était maintenu à température ambiante pendant 45 jours et maintenu l'eau saturée en ajoutant de l'eau distillée arroser si nécessaire.

Les échantillons enterrés ont été prélevés après différentes périodes et lavés dans l'eau distillée, puis ils ont été pesés en poids après les avoir séchés pendant 48 h pour obtenir poids constant. Le pourcentage de biodégradation a été calculé par l'équation (1).

$$\text{Biodégradation } \% = (Wi _ Wt) / W0 * 100 \qquad (1)$$

Où Wi est le poids initial des microcapsules séchées.

III.5.1.6. Distribution de taille des microcapsules

La distribution de taille des microcapsules a été déterminée par un analyseur de taille de particules laser (Microtrac S3500, États-Unis). Le diamètre a été déterminé à l'aide d'un logiciel intégré (Image Pro Express version 4.0).

III.5.1.7. Libération de bactéries viables encapsulées

Les propriétés de libération peuvent être décrites comme la libération bactérienne cumulative viable microcapsules préparées à l'aide de divers matériaux de paroi. Une portion de gramme de microcapsules SL-13 (NaALG et NaALG-GE) a été immergé dans 10 ml de solution physiologique stérile solution saline (0,9%), et maintenue pendant plusieurs jours à température ambiante. Échantillons (0,1 ml) ont été prises à différents intervalles de temps pour déterminer la libération complète de bactéries encapsulées viables par étalement sur gélose NA. Unités formatrices de colonies (UFC / mL) ont été déterminés par étalement sur des plaques de gélose NA et incubation à 30 ° C pendant 48 h.

III.5.2. Résultats

III.5.2.1. Analyse de biodégradabilité

L'effet de la gélatine sur la biodégradabilité des billes a été étudié en faisant varier la gélatine des quantités comprises entre 0 et 2,5%. La biodégradation a été confirmée par l'augmentation de la perte de poids de la matrice de billes avec des temps d'incubation plus longs dans la nature et sous conditions ouvertes. En 45 jours, la perte de masse de 2,5% de billes de gel de gélatine a presque atteint 30% **(Figure III.17).**

La perte de poids peut être causée par la biodégradation des micro-organismes. La masse la perte de billes de gel augmentait avec l'augmentation de la concentration de gélatine. La gélatine est un protéine naturel dérivée du collagène et possède des caractéristiques biocompatibles et biodégradables. Les micro-organismes se développent bien dans le système de dégradation car la gélatine est la principale source biodégradable de carbone et d'azote. Le taux de dégradation de l'encapsulation de matrice est directement lié à l'activité biologique des micro-organismes du sol. **[120]** De plus, le comportement de gonflement des billes indique la vitesse et la facilité de pénétration d'un liquide de la matrice alginate – gélatine comme étape nécessaire à la libération cellulaire des billes, et la biodégradation se traduit par l'évolution de la structure des billes favorise la libération cellulaire. Celles-ci les résultats indiquent éventuellement que la biodégradabilité des billes et la cellule qui en résulte la libération peut être régulée en faisant varier la composition d'alginate et de gélatine de la bille matériaux.

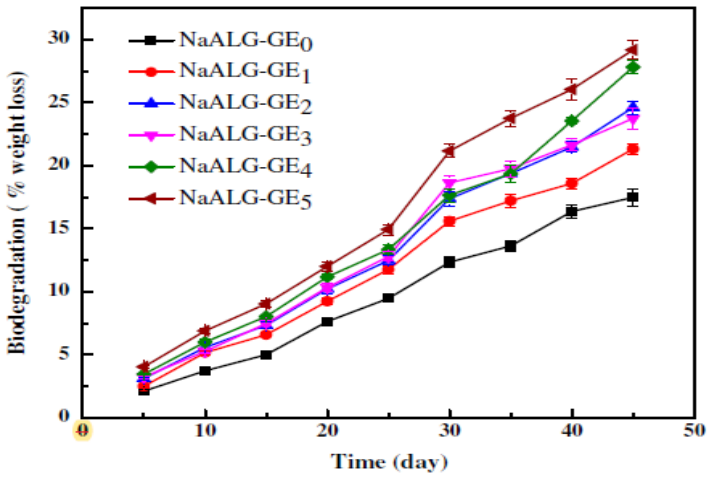


Figure III.15. Cinétique de biodégradation des microcapsules SL-13 préparées avec NaALG et diverses concentrations de GE.

III.5.2.2. Répartition des tailles

L'image de la **(figure III.16)** montre la distribution de taille des billes préparées avec NaALG et différents complexes de gélatine. À 0% de gélatine, le diamètre moyen des particules était de 255,1 µm, et une taille moyenne de particules de 400,8 µm a été obtenue à 2,5% de concentration de gélatine

Apparemment, la taille des particules a tendance à augmenter avec l'augmentation de la concentration de gélatine, et la portée de la distribution granulométrique devient étroite. Avec l'augmentation de la concentration de la gélatine, viscosité et agglomération des solutions de matériau de paroi augmenté pendant le processus d'agitation. Pics à petite zone autour de plusieurs 10 micromètres présentés probablement en raison du tassement par agrégation des particules du $CaCO_3$ qui n'a pas complètement réagi. La distribution de la taille des microcapsules a été rapportée par de nombreux auteurs, mais la taille optimale de la microcapsule dépend de la méthode d'application. Les microcapsules présentent des diamètres allant de 250 à 400 µm. les formulations de microcapsules peuvent être développées sous forme de formulation d'enrobage de semences en suspension, ce qui est propice pour inoculer et maximiser l'efficacité d'utilisation des fongicides microbiens. **[121]**

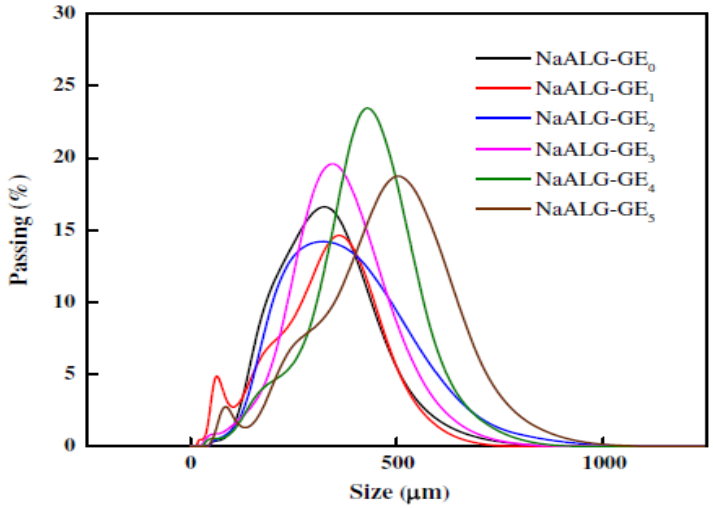


Figure.III.16. Distribution de taille des microcapsules SL-13 préparées avec NaALG et diverses concentrations de GE.

III.5.2.3. Libération bactérienne viable

L'effet de la gélatine sur les cellules viables libérées des billes a été évalué en variant les quantités de l'ordre de 0 à 2,5% pour 0 à 60 jours dans **(la Figure. III.19).** Au cours des 5 à 20 premiers jours, la quantité de cellules viables libérées par les microcapsules a augmenté rapidement, tandis que la tendance à la hausse s'est ralentie entre 20 et 35 jours. Ce résultat peut être dû aux facteurs environnementaux et au début de l'augmentation du taux de mortalité microbienne. Le jour 35, le nombre total de cellules viables peut atteindre 10^{10} UFC / mL. Ensuite, le nombre total des cellules viables commencent à diminuer après ce point, ce qui est peut-être dû au taux de libération des microcapsules étant inférieur au taux de mortalité des micro-organismes. Notez que NaALG – GE présente un taux de libération et une quantité plus élevés en comparaison avec NaALG, qui augmente avec l'augmentation de la concentration de gélatine dans les microcapsules de 5 à 20 jours. La structure de réseau très hydrophile et lâche de la gélatine,

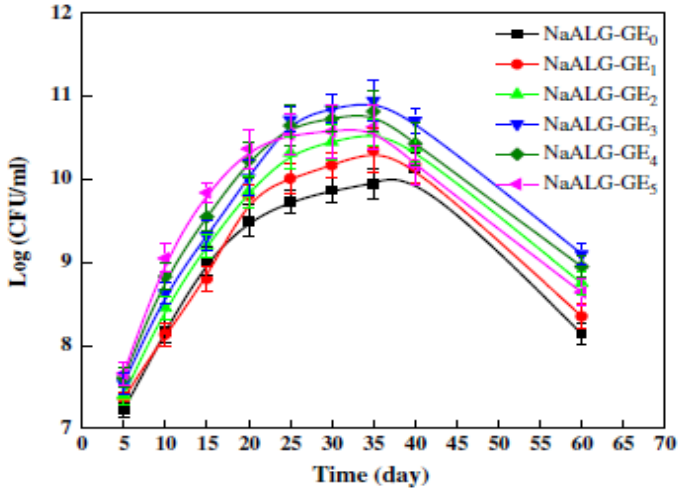


Figure III.19. Profile de libération des microcapsules SL-13 préparées avec NaALG et diverses concentrations de GE.

III.5.3. MODÉLISATION DES CINÉTIQUES DE BIODÉGRADATION MICROCAPSULES ET DE LA LIBÉRATION DES CELLULES BACILLU STALUS SL-13 ET DE LEUR VIABILITÉ EN UTILISANT L'INTELLIGENCE ARTIFICIELLE

L'objectif de cette partie est d'exploiter les résultats de l'étude expérimentale menée par Tu et coll. **[75]** présentée en détail précédemment en section III.4 dans le but de comprendre la relation entre le processus de microencapsulation et les paramètres de la libération et la viabilité des bacteries encapsulées (BaciSub SL-13) ainsi qu'avec la cinétique de biodégradation (désagrégation) des microcapsules.

III.5.3.1. Généralités sur le model intelligent ANFIS

Les réseaux de neurones artificiels (RNA ou ANN en anglais) sont des systèmes non linéaires développés à partir de systèmes neuronaux biologiques et ont démontré leur efficacité et leur cohérence dans une variété de domaines grâce à l'utilisation de la relation entre les ensembles de données d'entrée et de sortie. Ils peuvent être jumelés avec la logique floue pour affiner leurs paramètres. Ainsi le model combiné est appelé : Adaptative Neuro-fuzzy Inference System (ANFIS).

III.5.3.2. Configuration de la modélisation par ANFIS

Tout comme l'a démontré la **(Figure III.18)**, l'ANFIS développé a deux entrées représentant les paramètres de fonctionnement (concentration de gélatine dans les microparticules et le temps de libération) et trois sorties correspondant respectivement à la biodégradation des microcapsules, la libération des cellules BaciSub SL-13 encapsulée et leur viabilité. Pour

identifier les 90% des valeurs de données expérimentales de l'ANFIS sont utilisées, les résultats restants sont utilisés pour évaluer l'architecture de l'ANFIS.

La boîte à outils ANFIS de MATLAB est utilisée afin de vérifier plusieurs méthodes en ajustant le formulaire et la quantité de fonctions d'adhésion d'entrée et la forme de fonction d'appartenance de sortie. De cette raison, les détails des meilleurs résultats obtenus dans le processus d'apprentissage sont présentés au tableau 1. Vingt ensembles de paramètres ont été vérifiés pour les données expérimentales et ne sont pas inclus pour la définition du système ANFIS.

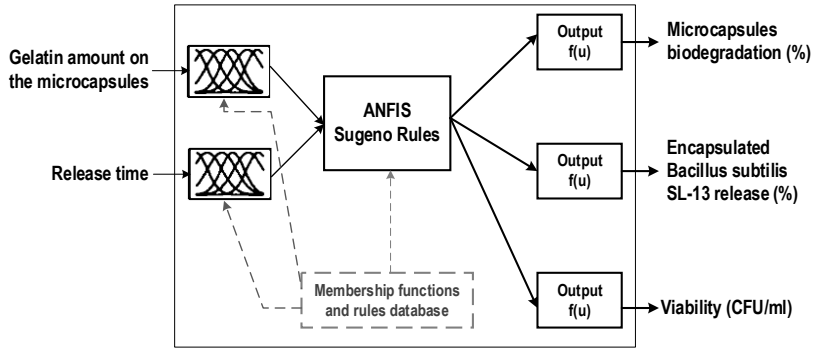


Figure III.18. Architecture ANFIS développée.

Tableau III.6 Best results on the learning phase

Input	Input membership functions		Output membership function	Iterations	RMSE	R2
	Type	Number				
Gelatin Concentration	Bell shape	5	linear	3450	3.26 × 10-4	0.9999
				2600	1.79 × 10-4	0.9999
Time	Bell shape	5		0602	2.50 × 10-4	0.9999

III.5.3.3. Résultats de la modélisation par ANFIS

La conception expérimentale est réalisée en exécutant les permutations des variables dans leur intervalle sélectionné, pour explorer et prédire l'effet des deux paramètres, qui sont le temps et les concentrations de gélatine, dans la biodégradabilité, la libération, et les études de viabilité cinétique. En comparant les données prévues par le modèle neuro-flou avec celles obtenues expérimentalement, la conformité est observée entre les valeurs montrant l'efficacité du modèle intelligent et sa performance dans la prévision des résultats de caractérisation de la libération BaciSub SL-13 à partir de microparticules basées sur l'alginate et les différentes proportions de gélatine.

III.5.3.3.1. Modélisation de la biodégradabilité par ANFIS

Dans cette étude, les quantités de gélatine ont été variées dans la gamme de 0–2,5%, pour explorer l'effet de la gélatine sur la biodégradabilité des microsphères. Comme le montre le tableau, la valeur des coefficients de corrélation obtenus (R2) (R2=0,9999) et les performances du modèle ont été estimées en calculant la racine de l'erreur carrée moyenne (RMSE= 3,26 × 10-4). Selon les résultats donnés à **la Figure III.21.** la conformité entre les valeurs prévues et expérimentales est démontrée, ce qui indique que le modèle ANFIS est efficace et précis.

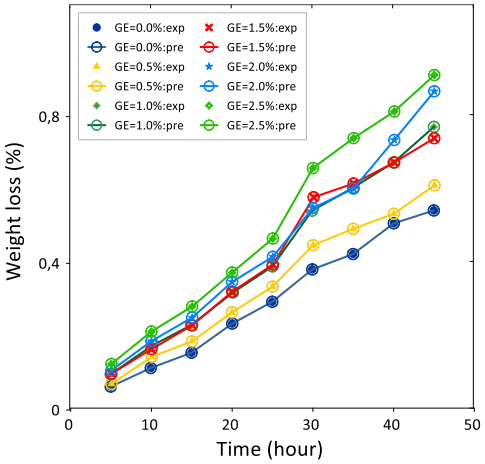


Figure III.19. Le taux de biodégradation expérimentale et prédit des microcrocapsules contenant differentes concentration de gélatine (GE).

III.5.3.3.2. Modélisation de la cinétique de liberation des bacteries BaciSub SL-13 par ANFIS

Les entrées utilisées pour le modèle ANFIS étaient les deux variables indépendantes : les proportions de gélatine et le moment de la libération. Les résultats donnés dans la **(Figure III.20)**. Montrent la comparaison entre les données expérimentales et les valeurs calculées par le modèle ANFIS. La capacité de ce modèle à prédire le profil de libération des bactéries a été confirmée, en atteignant les valeurs optimales des deux facteurs importants, les coefficients de corrélation (R^2=0,9999) et l'erreur (RMSE=1,79 × 10-4).

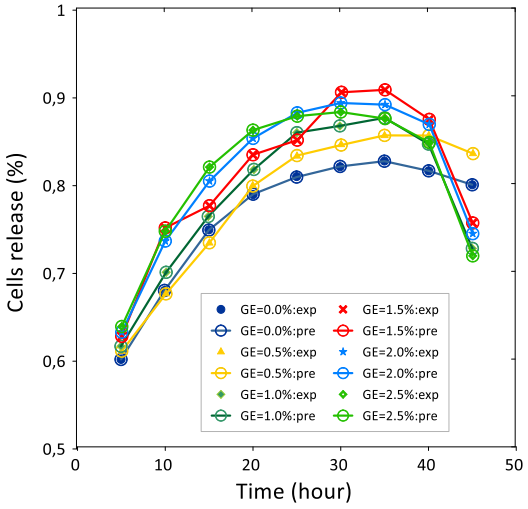


Figure III.22. Le taux de la libération des cellules BaciSub SL-13 expérimentale et prédit à partir des microcrocapsules contenant différentes concentrations de gélatine (GE).

III.5.3.3.3. Modélisation de la cinétique de viabilité des bacteries BaciSub SL-13 par ANFIS

En utilisant le même modèle, l'effet des differentes proportions de gélatine dans les microparticules Alginate–Gélatine sur la viabilité de B. subtilis SL-13 pendant la période de stockage a été modélisé. Comme le montre le résultat de la modélisation présenté dans la **(Figure III.23)**. ANFIS, on peut parfaitement prédire l'impact des concentrations de gélatine et du temps de stockage sur la viabilité de BaciSub SL-13.

Le coefficient de corrélation (R2) et les valeurs moyennes d'erreur carrées de l'étude de viabilité sont résumés dans le **tableauIII.6** comme suit (R2=0,9999) et RMSE de l'ordre de 2,5× 10-4. En fait, le taux de viabilité prévu et expérimental de SL-13 dans les microcapsules à environ 70%. L'efficacité, la précision et les bonnes performances du modèle ANFIS ont été confirmées.

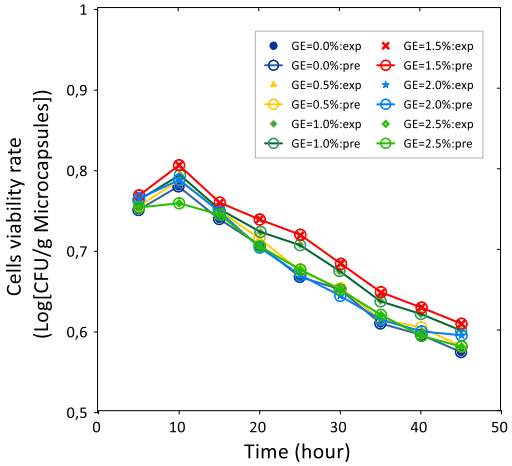


Figure III.23. Experimental and predected BaciSub SL-13 viability rate during storage (Effect of the Gelatin (GE) concentration on the microcapsules)

III.6. ETUDE DU COMPORTEMENT DE L'AGAR (AG) ET DE LA GÉLATINE (GE) EN SOLUTION ET DES PROPRIÉTÉS DU COMPLEXE AG-GE POUR PRÉPARER DES MICROCAPSULES À APPLICATION PHARMACEUTIQUE

Cette partie a été réalisé au niveau du laboratoire de biologie de la faculté des sciences de l'université de Médéa.

III.6.1. MATÉRIEL, RÉACTIFS ET PRODUITS CHIMIQUE UTILISÉS

III.6.1.1. Matériel

Le **(tableau III.7)** Regroupe les matériels et les équipements utilisés dans cette la partie.

Tableau III.7 Matériels utilisés

Appareillage
Balance électronique Agitateur magnétique + plaque chauffante pH mètre Conductimètre Thermomètre Spectrophotomètre UV-Visible Centrifugation / vortex

III.6.1.2. Réactifs et produits chimiques utilisés

(Tableau III.8) représente l'ensemble des produits chimiques utilisés dans cette l'étude, lors des tests de caractérisations physicochimiques, tous les produits étaient disponibles au niveau du laboratoire de biologie de la faculté des sciences (Université de Médéa).

Tableau III.8. Réactifs et produits chimiques utilisés.

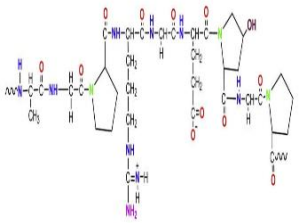
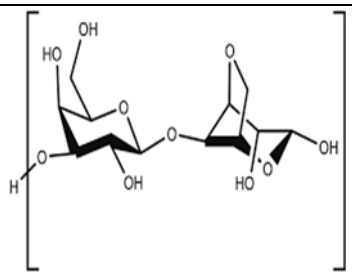
Réactifs	Formule	Quantité	Pureté (%)	Masse molaire(g/mol)
Sodium chloride	**Na Cl**	8.0 g/l	99.5	58.44
Potassium chloride	**K CL**	0.2g/l		74.55
Sodium hydrogen phosphate dihydrate	**Na2 HPO4**	1.44g/l	99.5	177.99
Potassium dihydrogen orthophosphate anhydrous	**KH2 PO4**	0.24g/l	98	136.09
Sodium hydroxide	**NaOH**		98	40

III.6.2. BIOPOLYMÈRES ET LEURS ANALYSE PAR UV/VISIBLE

III.6.2.1. Biopolymères

(Tableau III.9) récapitule les caractéristiques principales des biopolymères utilisés.

Tableau III.9. Caractéristiques des biopolymères utilisés.

Polymères	Structure chimique	Aspect
Gélatine		**Poudre de couleur jaune sable**
Agar-agar		**se présentant sous forme de poudre blanche**

III.6.2.2. Analyse par UV/Visible

L'objectif principal de cette étude est d'établir pour la détermination de la longueur d'onde optimale, afin de déterminer la longueur d'onde optimale d'absorption des biopolymères, un balayage dans le domaine UV-Vis a été effectué sur cette des solutions gélatine - agar qui a préparé avance. Les résultats de cette analyse ont permis l'obtention des pics d'absorptions maximums définis à une longueur d'onde λmax= 200 nm.

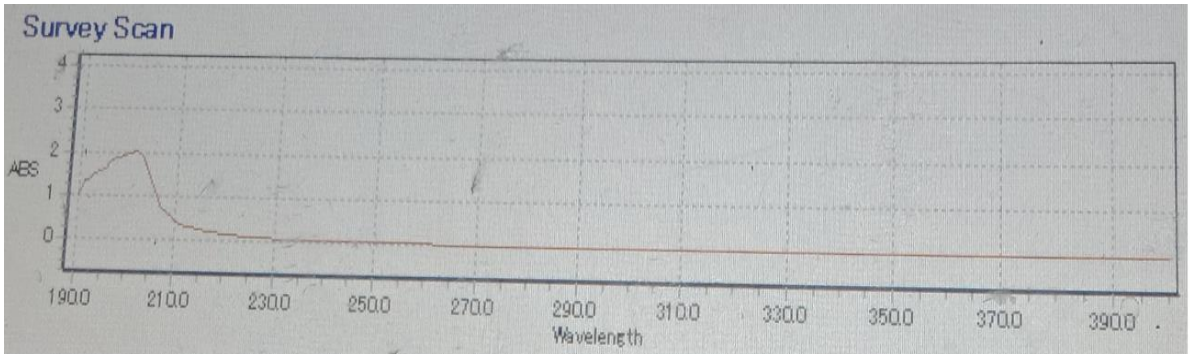


Figure III.24. Spectre d'absorption UV de AG

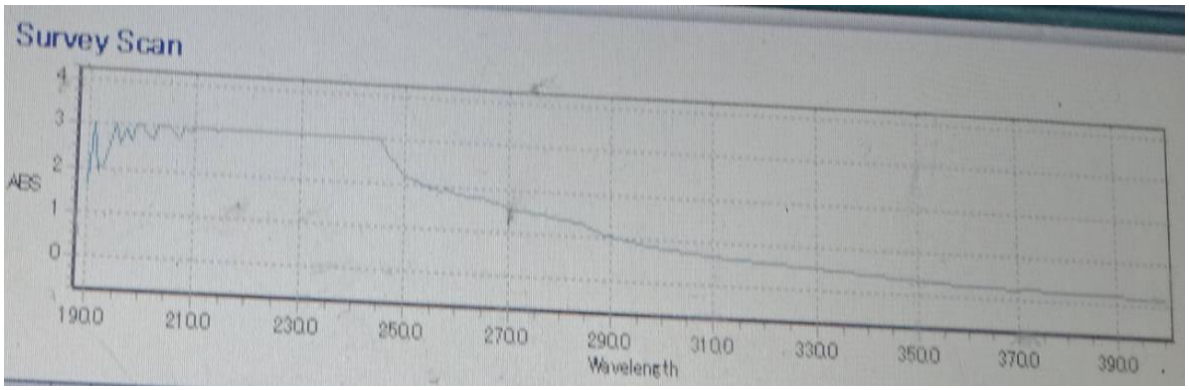


Figure III.25. Spectre d'absorption UV de la gélatine

III.6.3. PRÉPARATION DE SOLUTION PHOSPHATE BUFFER SALINE (PBS)

Pour la préparation on dissoudre les réactifs dans 800 ml d'eau distillée (sous agitation 700 RPM /15 min), puis ajuster le pH à 7.4 et Compléter le volume à 1000 ml avec le même solvant. On mesure pH de l'eau distillée pour conformer le fonctionnement de l'appareil (pH=7.08), puis mesure pH de PBS (pH :6.93).

Pour ajuster le pH à 7.4 on prépare la solution basique (Na OH : 1N).

Tout d'abord on va rechercher m

M Na OH=40 g/l

Eq=1(OH-) ⟹ N=C = 1 mol/g

m= C* V*M

V=100 ml= 0.1 l

m=1 * 0.1*40

m=4 g

Après la préparation de solution (Na OH) 1 N, on à ajuster le pH goutte à goutte jusqu'à 7.4

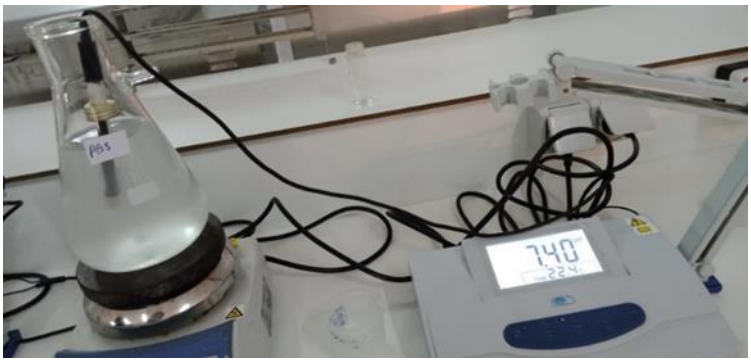




Figure III.26. Représenter ajustement de pH à 7.4

III.6.4. OPTIMISATION DES PARAMÈTRES DE SOLUTION À BASE DE GÉLATINE

III.6.4.1. Préparations

Des solutions à différentes concentrations (0.5 - 2 %) de la gélatine ont été préparées dans différents solvants : eau distillée, PBS (pH=7.4), Les solutions ont été chauffées à une température ambient (T a) (≈20 min) et à une température (T : 60 °C) (≈10 min) sous agitation magnétique, puis elles ont été refroidies à température ambiante.

L'objectif de ces préparations était d'optimiser le solvant, la concentration de la gélatine.

III.6.4.2. Résultats et optimisation

Les résultats de l'évaluation des solutions obtenues sont résumés dans le **Tableau (III.10).**

Tableau III.10. Aspect des solutions de la gélatine

	Solvants			
Concentration de la gélatine (p/v) %	**Eau distillée**		**PBS**	
	(T:amb) (≈20 min)	**(T : 60 °C) (≈10 min)**	**(T:amb) (≈20 min)**	**(T : 60 °C) (≈10 min)**
0.5	Soluble Liquide	Soluble Liquide	Soluble Liquide	Soluble Liquide
0.6	Soluble Liquide	Soluble Liquide	Soluble Liquide	Soluble Liquide
0.7	Soluble Moins visqueux	Soluble Liquide	Soluble Liquide	Soluble Legèrement visqueux
0.8	Soluble Moins visqueux	Soluble Liquide	Soluble Liquide	Soluble Legèrement visqueux
0.9	Soluble Plus visqueux que 0.8%	Soluble Liquide	Soluble Liquide	Soluble Legèrement visqueux
1	Soluble Solution visqueuse (fluide)	Soluble Moins visqueux	Soluble Legèrement visqueux	Soluble Moins visqueux
2	Soluble Gélifié	Soluble Solution visqueuse (fluide)	Soluble Legèrement visqueux	Soluble Solution visqueuse (fluide)

N.B. Afin de remarquer de l'aspect :

Aucun signe de gel n'est apparu avant 10 heures.

Suite aux résultats obtenus, nous avons choisi PBS comme solvant et une concentration optimale de 1 % (P/V).

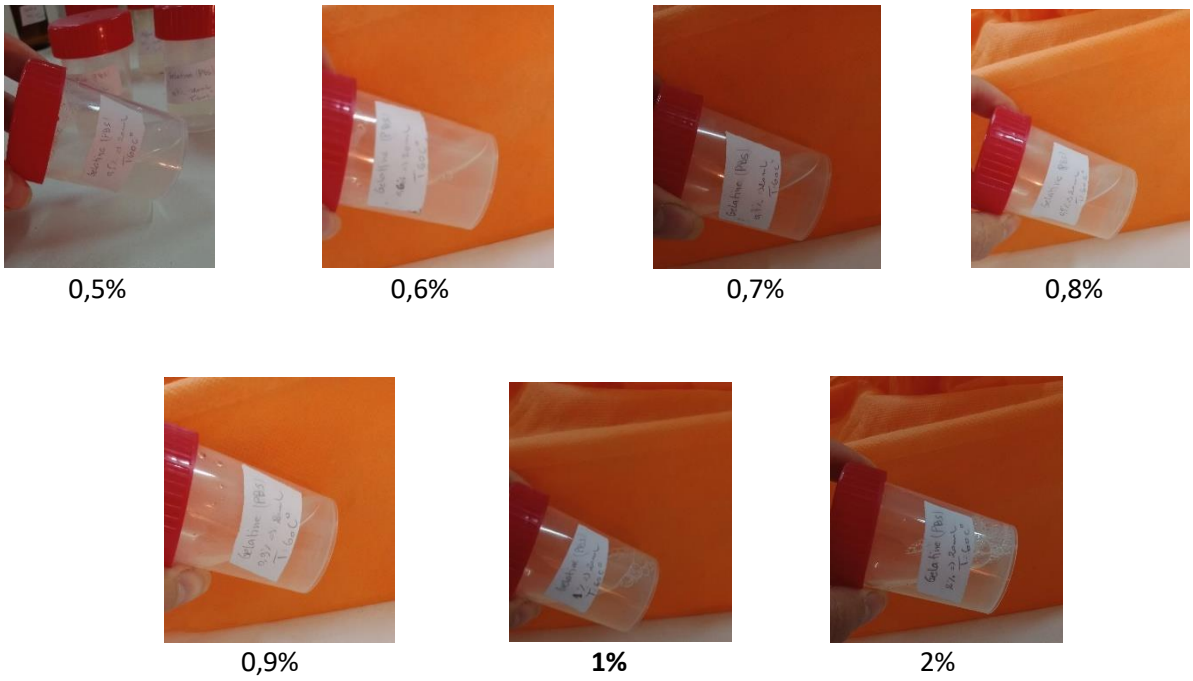


Figure III.28. Représenter l'aspect du solution GL

Ainsi, pour la suite du travail, la préparation d'une solution de la gélatine (1 %) a été réalisée par la solubilisation de 1g de la gélatine dans un volume de 100 mL de PBS, à T=60 °C pendant 10 min sous agitation magnétique. Puis, la solution obtenue a été refroidi à température ambiante.

III.6.5. OPTIMISATION DES PARAMÈTRES DE SOLUTION À BASE DE AGAR-AGAR

III.6.5.1. Préparations

Des solutions à différentes concentrations (0.1 – 0.5 %) de l'Agar ont été préparées dans différents solvants : eau distillée, PBS (pH=7.4), Les solutions ont été chauffées à une température ambient (T a) et à une température (T : 60 °C) sous agitation magnétique, puis elles ont été refroidies à température ambiante.

L'objectif de ces préparations était d'optimiser le solvant, la concentration de l'Agar

III.6.4.2. Résultats et optimisation

Les résultats de l'évaluation des solutions obtenues sont résumés dans le Tableau (III.11).

Tableau III.11. Aspect des solutions de l'Agar

	Solvants			
l'Agar (p/v) %	**Eau distillée**		**PBS**	
	(T:amb)	**(T : 60 °C) (45-50 min)**	**(T:amb)**	**(T : 60 °C) (≈30min)**
0.1	Insoluble (meme sous agitation pendant 2h30min)	Soluble Liquide	Insoluble (meme sous agitation pendant 11h20min)	Soluble Solution visqueuse (fluide)
0.2	/	Soluble plus visqueuse que 0.1% (fluide)	/	Soluble plus visqueuse Gélifiée
0.3	/	Soluble Solution gélifiée	/	Soluble Solution complément gélifiée
0.4	/	Soluble Solution gélifiée	/	Soluble Solution complément gélifiée
0..5	/	Soluble Solution complément gélifiée	/	Soluble Solution complément gélifiée

Autres essais

- Agar 0.1% : chauffé PBS à 80°C puis verse la peser, Agitation max 1600rpm sans chauffage (8 :40-10 :00) jusqu'à T :21.5°C

-solubilisation incomplète

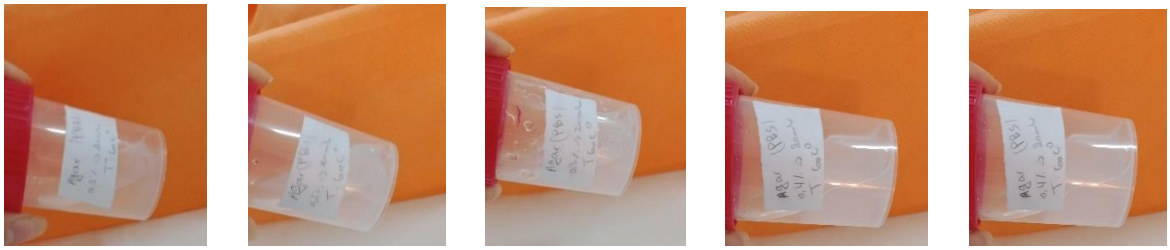
- Agar 0.5% chauffé l'eau distillée à 60°C puis verse la peser.

-solubilisation incomplète

N.B. Afin de remarquer de l'aspect

l'agar montrait s' aspect dès qu'il se refroidissait

Suite aux résultats obtenus, nous avons choisi PBS comme solvant et une concentration optimale de 0.1% (P/V).



0,1% 0,2% 0,3% 0,4% 0,5%

Figure III.29. Représenter l'aspect du solution AG

Ainsi, pour la suite du travail, la préparation d'une solution de l'agar (0.1 %) a été réalisée par la solubilisation de 0.1 g de la gélatine dans un volume de 100 mL de PBS, à T 60 °C pendant (≈30min) min sous agitation magnétique. Puis, la solution obtenue a été refroidi à température ambiante.

III.6.6. PRÉPARATION ET CARACTÉRISATION DU POLYÉLECTROLYTE GÉLATINE-AGAR PEC (GL/AG)

III.6.6.1. Préparation

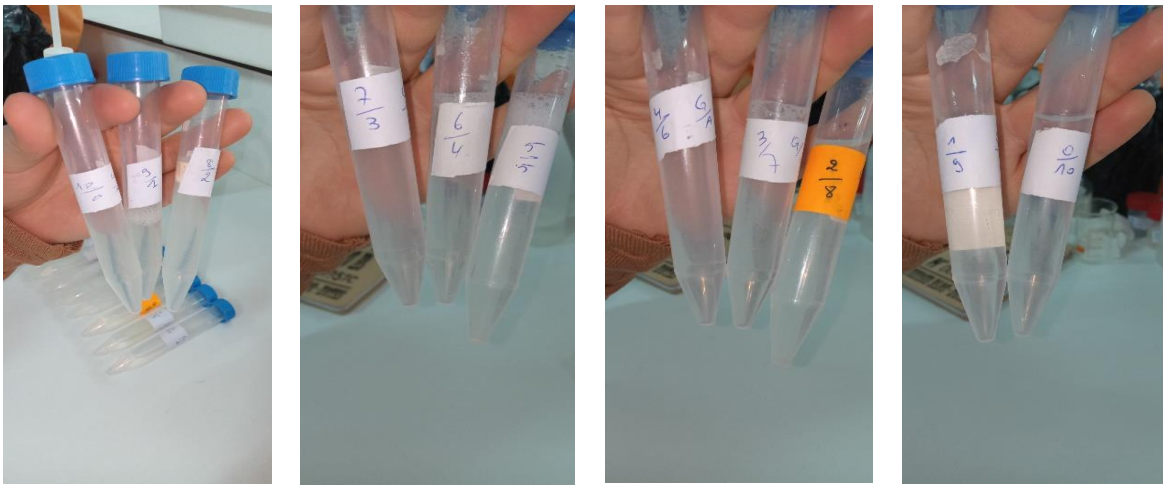
Des mélanges des deux solutions optimisées précédemment (gélatine (1.5 %) et agar (0.1 %)) ont été réalisés à différente proportions de telle façon à obtenir une solution finale de 10 ml **(Tableau III.11).** Les mélanges ont été maintenus sous agitation à l'aide de vortex, pendant 5 min à température ambiante.

Afin de mesurer la conductivité, le pH **(Tableau III.11),** une centrifugation à 60x100 r.p.m a été réalisée pendant 15 min

Les mesures conductimétries et pH-métrique ont été effectués sur le surnageant des mélanges réactionnels à température ambiante.

III.6.6.2. Résultats et optimisation

Les mélanges obtenus **(Figure III.25)** comportent une seule phase, nous n'avons pas remarqué des précipitations.



a b c d

Figure III.30. Aspect du complexe polyélectrolyte à différents ratios (AG/GE)

Les résultats de la conductivité et du pH du surnagent sont rassemblés dans le **(Tableau III.12)**.

Tableau III.12. Principaux paramètres des solutions de complexe polyélectrolyte

N°	Gélatine 1%	Agar 0.1%	Ratio	pH	Conductivité (mS.cm-1)
1	10	0	10/0	7.19	125.7
2	9	1	9/1	7.22	138.8
3	8	2	8/2	7.28	143.8
4	7	3	7/3	7.33	145.7
5	6	4	6/4	7.42	145.9
6	5	5	5/5	7.36	147
7	4	6	4/6	7.44	146.7
8	3	7	3/7	7.51	144.8
9	2	8	2/8	7.58	140.7
10	1	9	1/9	7.68	134.1
11	0	10	0/10	7.81	192.1

Suite à ces résultats, nous allons discuter les paramètres étudiés.

III.6.6.2.1. Etude de la variation de pH

(Figure III.31) représente les résultats obtenus de la variation du pH en fonction de la composition du mélange réactionnel. On remarque une augmentation de pH en fonction de la concentration de l'agar dans le PEC (GL/AG), jusqu'au ratio (5/5) où le pH du mélange prend une valeur minimale de 7.36. Après cette valeur, on remarque une augmentation du pH proportionnelle à la quantité de l'agar ajouté

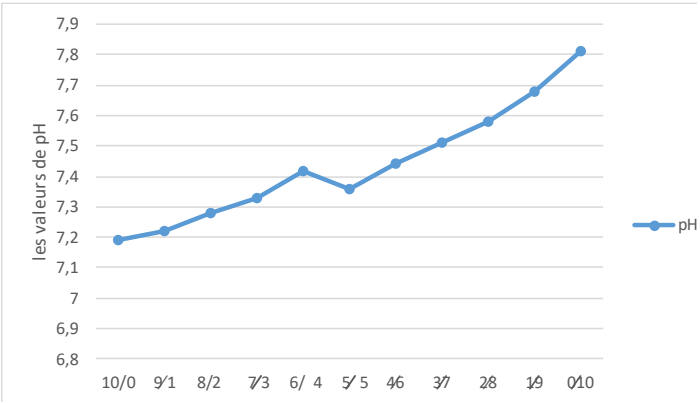


Figure III.31. Variation de pH en fonction de différents ratios GL/AG

III.6.6.2.2. Etude de la variation de la conductivité

La Figure III.32 représente la variation de la conductivité en fonction de la composition du mélange réactionnel. Nous avons remarqué une augmentation de la conductivité avec l'ajout de l'agar, puis à partir du rapport (5/5), cette conductivité diminue en fonction de l'augmentation

de la concentration en AG. Pour expliquer cette variation, nous sommes basés sur l'hypothèse que la conductivité d'une solution est liée à la présence des ions dans la solution et aussi à leurs mobilités. La formation du complexe polyélectrolyte GL/AG est accompagnée par une diminution de la conductivité dans la solution, signe que le PEC se forme avec interactions électrostatiques entre les deux biopolymères de charges opposées. Au-delà du rapport (5/5), la valeur de la conductivité augmente progressivement, donc il y a une augmentation des ions dans la solution.

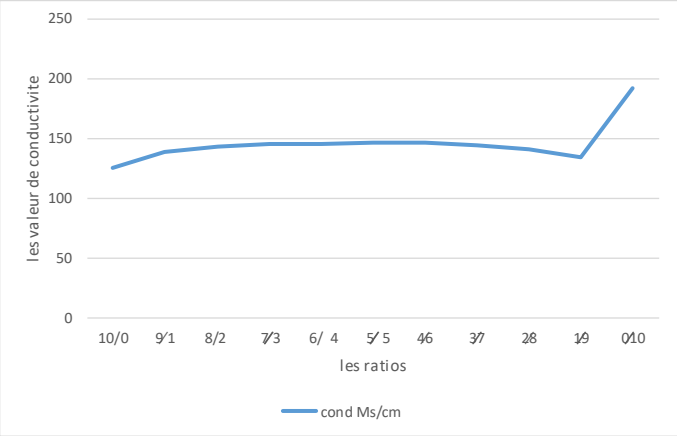


Figure III.32. Variation de la conductivité en fonction de différents ratios GL/AG

III.7 CONCLUSION

Dans cette étude, plusieurs travaux de recherche sur les mélanges d'hydrogels à base d'agarose/gélatine ou de d'alginate/gélatine avec différentes concentrations ont été étudier afin d'évaluer la faisabilité et la potentialité de ces trois polymères pour l'encapsulation cellulaire. Les effets de la composition du mélange sur les propriétés physiques, mécaniques, rhéologiques et biologiques ont été étudiés.

A partir de cette étude approfondie des quatre papiers de recherches on a pu tirer les conclusions suivantes :

Les résultats des tests rhéologiques ont montré que l'AG50 présentait le meilleur point de gélification, près de la température corporelle (35,2°C) et que la libération de gélatine la plus faible a été observée pour AG50. En termes de stabilité mécanique, AG50 et AG75 ont montré une résistance élevée, c'est-à-dire que plus de 90% des microcapsules sont restées intactes.

La modification de la concentration d'agarose dans les hydrogels affecte l'adhésion et la prolifération des cellules. L'AG50 a fourni un meilleur substrat pour la fixation des cellules tandis que l'AG75 peut être plus approprié pour l'ancrage des cellules indépendantes. La

viabilité cellulaire dans les échantillons était supérieure à 90%, presque au-delà de la biocompatibilité. Dans l'ensemble, on pourrait suggérer que AG50 et AG75 sont des candidats possibles pour l'encapsulation cellulaire en fonction du type cellulaire et du tissu de référence.

Les caractéristiques physiques des complexes intermoléculaires solubles de la gélatine-agar présents dans le surnageant ont été caractérisés exclusivement par diffusion de la lumière, l'électrophorèse et la viscosimétrie. Ces complexes se sont avérés être des agrégats intermoléculaires asymétriques formés en raison de des interactions électrostatiques induites par la polarisation. Des études de viscosité sur ces échantillons sont réalisés pour mieux comprendre le problème. Les données de viscosité (η) (non illustré) pour les solutions de gélatine et de gélose peuvent donner une idée sur les interactions. Des solutions d'agar révélées une viscosité (≈1.88mPa s) invariante de pH impliquant un comportement polyélectrolyte. En revanche, la viscosité des solutions de gélatine montre clairement une forte dépendance au pH. Pour des solutions sans interaction (pH> pI≈9), la valeur η reste la même (≈1.23mPa s), et bien inférieur à celui de la solution d'agar. Il faut noter que cet ajout de gélatine était responsable de la réduction de la viscosité de solution d'agar jusqu'à 30%, ainsi, jouant le rôle d'un diluant. Des interactions intermoléculaires s'ensuivent pour pH <pI et η chute de près de 25%. Cela peut être attribué à, la liaison de la gélatine à la gélose, réduisant sa rigidité (en raison de neutralisation de charge partielle de l'agar) et la réduction qui en résulte dans son extension spatiale. Il a été démontré que la viscosité d'une telle solution peut être décrite comme, ηPE ~ (L/d) 5/3. Les données de viscosité indiquent une baisse significative de la valeur de la viscosité de la solution gélatine-agar pour pH <pI; cela confirme immédiatement la diminution du rapport d'aspect du complexe gélatine-gélose avec les interactions qui s'ensuivent.

Après incubation séquentielle en gastrique simulé (1 h) et liquide intestinaux (4 h), le nombre de cellules survivantes était de 7,6 pour les microsphères enrobées d'alginate par la des méthodes externes de source de Ca^{2+} ,7,4 (log cfu/ ml) pour les microsphères enrobées d'alginate par la méthodes internes de source de Ca^{2+} ,6,7 (log cfu/ ml) pour les microsphères enrobées et 6,4 (log cfu/ ml) pour les cellules libres.

Le temps de désintégration des microsphères de gélatine enrobées d'alginate dans l'ISJ était plus long pour les microsphères produites par la méthode de la source externe de Ca^{2+} (240 min) et (120 min) pour ceux produite par la méthode de la source interne de Ca^{2+}

L'épaisseur (1-2 µm) de la couche d'alginate empêche la dégradation des microsphères de gélatine induite par la pepsine dans le suc gastrique simulé (pH 2,0, 2 h), et améliore de la survie des bifidobactéries piégées.

La perte de poids des billes augmente avec l'ajout de gélatine à NaALG ce qui provoque l'augmentation de la biodégradation.

Le diamètre moyen des particules était de 255,1 µm à concentration 0% de gélatine et la taille moyenne de particules de 400,8 µm a été obtenue à 2,5% de concentration de gélatine.

La libération cellulaire a été confirmé par le gonflement des billes qui indique la facilité de pénétration d'un liquide dans la matrice alginate-gélatine. La libération des cellules des microcapsules a augmenté rapidement au cours des 5-20 jours et le nombre total de cellules viables peut atteindre 10^{10} UFC/mL au $35^{ème}$ jour. La biodégradabilité des billes d'hydrogels qui augmente avec le nombre de pores des billes et la structure hydrophile de la matrice aident la libération des cellules Bacillus subtilis SL-13 encapsulées.

La modélisation par la technique neuro-floue a donné des résultats satisfaisants en termes de prédiction de l'impact des paramètres de l'encapsulation sur la biodégradation des microcapsules, la cinétique de libération et la viabilité des cellules Bacillus subtilis SL-13. Les résultats des valeurs moyennes d'erreur carrées de modélisation par les trois modèles intelligents ANFIS sont respectivement ($RMSE=3,26\times10^{-4}$), ($RMSE=1,79\times10^{-4}$), ($RMSE=2,50\times10^{-4}$), et pour les résultats de coefficients de corrélations sont identique pour les 3 paramètres ($R^2=0,9999$).

En ce qui concerne la dernière partie du travail, elle constitue les essais préliminaires réalisés par nos soins afin d'effectuer une caractérisation physicochimique de comportement de la gélatine et de l'agar en solution ainsi du complexes polyélectrolyte formé lors de leur mélange à différentes concentrations. Des mesures de pH, de conductivité et des solutions de PEC à différentes proportions volumiques ont été effectué et selon les résultats obtenus, nous suggérons de choisi le PBS comme solvant et une concentration optimale de 1 % (P/V) pour GEL, une concentration optimale de 0.1% (P/V) pour AG et choisir le rapport volumique de (5/5) vue les résultats obtenus concernant la variation de la conductivité et le pH selon ce rapport.

Conclusion générale

Conclusion générale

L’objectif de ce présent travail était de mettre au point l'encapsulation par la coacervation à base d’un complexe polyélectrolyte de deux mélanges biopolymèriques (GEL/AG) (GEL/ALG). Dû le nombre important de paramètres influants sur le comportement de ces systèmes chargés nous avons sélectionné plusieurs études de recherche pour étudier les propriétés des polyélectrolytes (PEC) formés.

En premier lieu, une étude des caractéristiques physicochimiques des PEC(s) a été effectuée par les mesures de pH, de conductivité et de turbidité des solutions de PEC à différentes proportions volumiques.

Nous avons réalisé des études de viscosité sur ces échantillons pour mieux comprendre le comportement des polymères en solution. Des solutions d'agar révélées une viscosité fixe indépendamment du pH, d'autre part, la viscosité des solutions de gélatine montrent clairement une forte dépendance au pH. Pour des solutions sans interaction, la valeur η reste la même, et bien inférieur à celle de la solution d’agar, il a été remarqué que l'ajout de gélatine était responsable de la réduction de la viscosité de solution d'agar par un pourcentage significatif estimé à 30%, ainsi, travaillant comme un diluant. Des interactions intermoléculaires s'ensuivent pour pH <pI et η chute de près de 25%.

Quatre travaux de recherche pris de la littérature ont été bien étudié afin d’évaluer la faisabilité des expériences d’encapsulation cellulaire par plusieurs techniques et de comprendre les différentes méthodes de caractérisation existantes et au quelle on ne pouvait pas accéder ou réaliser.

Les résultats d’une étude, parmi les études traitées, ont été exploité pour faire une modélisation par une technique intelligente basé sur un modèle combinant les réseaux de neurones artificiels et la logique floue (ANFIS). Le modèle avait comme deux entrées, la concentration de gélatine dans les microparticules et le temps de libération et trois sorties correspondant respectivement à la biodégradation des microcapsules, la libération des cellules BaciSub SL-13 encapsulée et leur viabilité. La modélisation de biodégradation, la cinétique de libération et la viabilité des cellules Bacillus subtilis SL-13 par le modèle intelligent Neuro-floue (ANFIS) a pu simulée parfaitement les résultats expérimentaux trouvés. Les résultats de cette étude de modélisation ont fait l'objet d'une conférence internationale et d'un chapitre dans un livre édité par Springer.

Enfin, nous pouvons conclure que les complexe (GEL-ALG) et (GEL-AGA) sont des biopolymères ayant des propriétés très intéressantes pour l'encapsulation afin d'assurer la libération cellulaire.

Références

REFERENCES

[1]A. Lahnin.(juillet ,2002). « Les formes galéniques orales à libération modifiée », thèse de Doctorat en pharmacie, Université de cheikh anta diop de Dakar

[2] T.Curt, (July/August 2013).oacervation encapsulation procedures», Agro Food Industry Hi Tech – vol. 24(4).

[3] T-f.vandamme, D.poncelet, and P.subra-paternault. (2007)."Microencapsulation: des sciences aux technologies «, Ed.tec &Doc.

[4] F.Puisieux, M.Seiller, and J.P.Devissaguet. (2006). Les systèmes de délivrance des médicaments: un réel progress pour la thérapeutique*. Annales Pharmaceutiques Françaises, 64(4): p. 219-259.

[5] A,Hoffman. (2008). The origins and evolution of "controlled" drug delivery systems. Journal of Controlled Release, 132(3): p. 153-163.

[6] A. Le Hir, J-C.Chaumeil ,and D.Brossard .2011. "Pharmacie galénique: bonne pratiques de fabrication des médicaments", 9 ème édition, Masson, Paris,

[7] PHARMACOPEE EUROPEENNE 6ème édition, DEQM, Editor. 2010.Conseil de l'Europe, Strasbourg.

[8] J.UCHIZONO. Application of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics in the design of Controlled Delivery Systems, in Design of Controlled Release Drug Delivery Systems, Mc Graw Hill. p. 1-39.

[9] P.BURI.1985.Introduction, in Formes Pharmaceutiques nouvelles : Aspects Technologique, Biopharmaceutique et Medical., TEC & DOC Lavoisier: Paris. p. 3-4.

[10] G.Santus, R.Baker and A.Robert. (2001). Pharmaceuticals, Controlled Release of, in Encyclopedia of Physical Science and Technology.Academic Press: p. 791. New York

[11] J.Richard , J.Bentoit .(2013). traité génie des procédé; Techniques de l'Ingénieur.

[12] A. Maroni, L. Zema, M. D. Del Curto, A. Foppoli, et A. Gazzaniga, « Oral colon delivery of insulin with the aid of functional adjuvants », Adv. Drug Deliv. Rev., no 0.

[13] M. Brunner, E. Lackner, P. S. Exler, and all.(janv,2006)« 5-aminosalicylic acid release from a new controlledrelease mesalazine formulation during gastrointestinal transit in healthy volunteers », Aliment. Pharmacol. Ther., vol. 23, no 1, p. 137-144.

[14] J.Hamdani , A.J.Moës , K.Amighi .(2006). Development and in vitro evaluation of a novel floating multiple unit dosage form obtained by melt pelletization, Int. J. Pharm. 322, 96-103.

[15] Marylène V, François P, Hélène G. (2017). Formes à libération prolongée un conseil officinal s'impose. article.France.

[16]R.Denine. (2008). Cours de pharmacie galénique, OPU, Alger, p.233.

[17] Y. Cohen. (1995). "Initiation à la connaissance du médicament", 2 ème édition, Masson, Paris,

[18] L.Lachman, H.A.Lieberman, and L.K.Joseph. (1990). The theory and practice of Industrial pharmacy (3). Edition Verghesh publishing house. p. 346.

[19] E.Levacher. (2006). Méthodes générales d'analyse des formes solides (2). Edition IMT

(Instituts des Matières et des Technologies), France.

[20] D.L.D.Y.e.C .BROSSARD. (1976). Matrices à action prolongée in R Science et techniques Pharmaceutiques. p. 341-345.

[21] J. L. SALOMON, E. DOELKER.(1980) .Formulation des comprimes à liberation prolongee I. Matrices inertes., in Pharm. Acta Helv.. p. 174-182.

[22]L.PSai Cheong Wan, Wan Sia Heng, and L. Fun Wong. (1995). Matrix swelling: A simple model describing extent of swelling of HPMC matrices. International Journal of Pharmaceutics. 116(2): p. 159-168.

[23] S. R. PARAKH, A. V. GOTHOSKAR, and M. T. KARAD. (2003). A novel method for the study of water absorption rates by swellable matrices, in Pharmaceutical Technology. p. 40-48.

[24] J.Bile. (2015). microencapsulation d'agent antimicrobien pour le développement de conditionnements primaires fonctionnalisés .thèse de doctorat. Université de Lyon.

[25] B.KGreen., L.Scheleicher.(1956). Manifold record material, [US2730456].

[26] T.Vandamme , D.Poncelet , and P.Subra-Paternault.(2007). Microencapsulation des sciences aux technologies, TEC & DOC, Paris.

[27] S.Benita. (1996). Microencapsulation - methods and industrial applications, Drugs and the pharmaceutical sciences, vol. 73, p. 1-3.

[28] J.Empereur (2006). Conception de nouveaux papiers autoadhésifs, Thèse de l'INPG, p. 29-31.

[29] C.Thies . (2006). Microencapsulation, Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology 5th edition, vol. 16, p. 438-440.

[30] S.Dixit, A.Goel. (2007). Microencapsulation in textile processing - an overview, Asian Textile Journal, p. 83

[31] C.hies. (1987). Microencapsulation. Encyclopedia Pol. Sci. Eng., 9, 724–745.

[32] Z.Lidert .(2005). Microencapsulation: an overview of the technology landscape, Delivery System Handbook for Personal Care and Cosmetic Products, p.181-190.

[33]B.Truffi B.(2000). Elaboration de nouveaux papiers thermiques, Thèse de l'INPG, p. 119

Références .

[34] N.Gordon .(2002). Application of microencapsulation in textiles, International Journal of Pharmaceutics, 242, p. 55-62

[35] C.P.Champagne. Fustier P. (2007). Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods, Biotechnology, vol.18 (2), p. 184-190

[36] Y.Chevalier. (2006). Microencapsulation d'agent antimicrobien pour le développement de conditionnements primaires fonctionnalisés ,thèse de doctorat, l'universite claude bernard lyon 1.

[37] C.Onesippe. (2005). Etude des systemes polyelectrolyte / tensioactif en phase aqueuse et a l'interface liquide / gaz. thèse de doctorat. universite montpellier II.

[38] N.V.N.Jyothi, Prasanna P.M., Prabha K.S., Ramaiah P.S., Srawan G.Y., Sakarkar S.N., 2010, Microencapsulation techniques - factors influencing encapsulation efficiency, Journal of Microencapsulation, vol. 27 (3), p. 189.

[39] S.Benita. (1996). Microencapsulation - methods and industrial applications, Drugs and the pharmaceutical sciences, vol. 73, p. 3-23

[40] S.Dixit , A.Goel.(2007). Microencapsulation in textile processing, an overview, Asian Textile Journal, p. 84

[41] C.G.Kruif, F.Weinbreck, and R.DeVries. (2004). Complex coacervation of proteins and anionic polysaccharides. Current Opinion in Colloid & Interface Science, 9,340-349.

[42] Ruyter I.E. Monomer systems and polymerization. P: 109-135, 1985

[43] M. Akiyama, T.Tsuge, and Y. Doi, Environmental life cycle comparison of polyhydroxyalkanoates produced from renewable carbon resources by bacterial fermentation, Polym. Degrad. Stab, 80, p 183–194, 2003

[44]JD. Gu. (2003). Microbiological deterioration and degradation of synthetic polymeric materials: recent research advances, Int. Biodeter. Biodegr. 52, p. 69–91.

[45] SC. Chen, Y. Lu. (2004). Micro and nano-fabrication of biodegradable polymers for drug delivery. Adv. Drug Delivery Rev. 56, p.1621–1633.

[46] R. Auras, B. Harte, and S.Selke, (2004).An over view of polylactides as Packaging Materials, Macromol, Biosci, 4, 835-864.

[47]A. Dhahri. (2017).Synthèse et caractérisation de nanocomposites conducteurs à base de «graphène» et de polysaccharides.l'Université Claude Bernard de Lyon et l'Université de Monastir Ecole doctorale « Matériaux » de l'université Lyon1.

[48] D.Robet, B.Vian. (2004). Science de la vie 3eme édition,

[49] RL .,Whistler, JN.,BeMiller .(1993).Industrial Gums, 3eme edition, Academic Press, New York.

[50] M.Glickmam. origines et classification des hydro colloïdes, des hydro colloïdes alimentaires, Florida, P: 1,3-18,1982.

[51]D.A.Rees..La forme des molécules, des polymères glucides. p: 57 ,1967.

[52] L'OIV, Chitosane,COEI-1-CHITOS: 2009,Codex œnologique : Produits utilisés en œnologie (par fiche), Edition 2018

[53] H.ZEMMOURI. (Decembre 2008). Le Chitosane est-il la molécule du siècle? Division Bio-Energie et Environnement, N°14.

[54] Mattheus F.A.Goosen, Applications of Chitan and Chitosan,CRC press.

[55] L'OIV, Cellulose,COEI-1-CELLUL(2002) .Codex œnologique : Produits utilisés en œnologie (par fiche), Edition 2018

[56] A. Le Hir, J-C. Chaumeil ,et D. Brossard,"Pharmacie galénique : bonne pratiques de fabrication des médicaments", 9 ème édition, Masson, Paris, (2011).

[57] M.PAETZOLD , Y.GLORIES. étude de gélatines utilisées en œnologie par mesure de leur charge macromoléculaire, Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin, 24, N° 2, 79-86. Connaissance de la Vigne et du Vin.

[58] S.Reinhard.G.herbert.(2007). gelatine handbook: theory and industrial practice,WILEY-VCH verlag GmbH & co.KGaA, Weinheim.

[59] T.Hervé. Révélations gastronomiques, Éditeur Belin, Original provenant de « la New York Public Library ».

[60] De la chimie dans la cuisine, Gélification, Publié le 6 novembre 2014

[61] M. Elnashar. (July 5th 2011). Biotechnology of Biopolymers, Edited Volume,

[62] P.Jansson, L.Kenne, and B.Lindberg. (1975). Structure of the extracellular polysaccharide fromXanthomonas campestri. Carbohydrate Research, 45, 275-282.

[63] L'OIV, Acide Alginique,COEI-1-ACALGI: 2010, Codex œnologique : Produits utilisés en œnologie (par fiche), Edition (2018).

[64] T.Hervé, Révélations gastronomiques, Éditeur Belin, Original provenant de « la New York Public Library ».

[65] Agar agar, secret minceur des Ja-ponaises,deClea(ISBN978-2-84221-163-9)ÉditionsLa Plage .(2007).

[66]M.Sivieude, M.Delannay. L'agar-agar dans la cuisine moléculaire, Avancées scientifiques et réalisations techniques, Lycée Jules Garnier en Nouvelle-Calédonie.

[67] F.Muller. (2000). Interaction et structure de copolymères neutres-chargés dissymétriques en solution aqueuse.these de doctorat.université de la Rochelle.france.

[68] M.Hess, R.G.Jones, J.Kahovec, and all. (2006). Terminology of Polymers Containing Ionizable or Ionic Groups and of Polymers Containing Ions. Pure and Applied Chemistry ,78 (11), 2067-2074.

[69] C. Ankerfors.(2008).Polyelectrolyte complexes: Their preparation, adsorption behaviour, and effect on paper properties, Stockholm.

[70]A. S. Michaels, Ind. Eng. Chem, 57, 32, 1965.

[71] B. Philipp, H. Dautzenberg, K. J. Linow, J. Kotz and W. Dawydoff, Prog. "Polyelectrolyte complexes - recent developments and open problems « Progress in Polymer Science.14, 91, 1989.

[72] I.Rana, E.Shahriar Hojjati, B.Nafiseh, and all. (2012). Preparation and Characterization of Agarose-Gelatin Blend Hydrogels as a Cell Encapsulation Matrix: An In-Vitro Study, Journal of Macromolecular Science, Part B: Physics, 51:8, 1606-1616.

[73] S.Santinath., H.B.Bohidar, S.Bandyopadhyay. (2003). Polymer and Biophysics Laboratory, School of Physical Sciences, Jawaharlal Nehru University, New Delhi 110016, India. Bandyopadhyay, S., School of Materials Science and Engineering, University of New South Wales, Sydney 2052, Australia. Study of gelatin–agar intermolecular aggregates in the supernatant of its coacervate

[74] N.Annan, ,D. Borza, L. Truelstrup Hansen. (2007). Encapsulation in alginate-coated gelatin microspheres improves survival of the probiotic Bifidobacterium adolescentis 15703T during exposure to simulated gastro-intestinal conditions Food Science Program, Department of Process Engineering and Applied Science, Dalhousie University, 1360 Barrington Street, Halifax, Nova Scotia, Canada.

[75] T.Liang, H.Yanhui He, Y.Hongbing, and all. (2015). Preparation and characterization of alginate–gelatin microencapsulated Bacillus subtilis SL-13 by emulsification/internal gelation, Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition, 26:12, 735-749.

[76] R.Landers, H.Ubner, U.Schmelzeisen, and all. (2002). Rapid prototyping of scaffolds derived from thermoreversible hydrogels and tailored for applications in tissue engineering. Biomaterials, 23, 4437.

[77] H.F.Lu, E.D.Targonsky, M.B.Wheeler, and all. (2007). Thermally induced gelable polymer networks for living cell encapsulation. Biotechnol. Bioengin, 96, 146.

[78] M.Wang,; Y.Li, J.WU, and all. (2008). In vitro and in vivo study to the biocompatibility and biodegradation of hydroxyapatite/poly (vinyl alcohol)/gelatin composite. J. Biomed. Mater. Res. A 85, 418.

[79] V.P.Verma; S.Kar; P.R.Ray, and all .(2007). Fabrication of agar-gelatin hybrid scaffolds using a novel entrapment method for in-vitro tissue engineering applications. Biotechnol. Bioengin, 96, 392.

[80] B.Jeong, S.W.Kim, and Y.H.Bae. (2002). Thermosensitive sol–gel reversible hydrogels. Adv. Drug Delivery Rev, 54, 37.

[81] S.China. (1997). Biological Evaluation of Medical Devices-Part 5: Tests for Cytotoxicity: In vitro methods, GB/T 16886.5-1997.

[82] H.W.Sung, D.M.Huang, W.H.Chang, and all (1999).Evaluation of gelatin hydrogel crosslinked with various crosslinking agents as bioadhesives: In vitro study. J. Biomed. Mater. Res, 46, 520.

[83] S.Santinath Singh, V.K.Aswal, and H.B.Bohidar .(2007). Structural studies of agar-gelatin complex coacervates by small angle neutron scattering, rheology and differential scanning calorimetry. Int. J. Biol. Macromol, 41, 301.

[84] L.Baruch, M.Machluf. (2006). Alginate-chitosan complex coacervation for cell encapsulation: Effect on mechanical properties and on long-term viability. Biopolymers, 82, 570.

[85] J.S.Craigie, C.Leigh, and and J.A.Hellebust. (1978). (Eds.), Handbook of Phycological Methods, Cambridge University Press, Cambridge, p. 109.

[86] A. Veis. (1964). The Macromolecular Chemistry of Gelatin Molecules, Academic Press, New York.

[87] H.B.Bohidar, A.K.Siddhanta, R.Meena, and all. Complex Coacervation of Gelatin and Agar in Aqueous Solutions, Santinath Singh (communicated).

[88]C.R.Cantor, P.R.Schimmel. (1980). Biophysical Chemistry-II, W.H. Freeman, See for example: New York.

[89] C.Tanford. (1967). Physical Chemistry of Macromolecules, John-Wiley, New York.

[90] R.Simha, J.Phys . (1940). Chem. 44 25; Mehl, J.W, Oncley, J.L. , R.Simha. (1940). Science 92 132.

[91] J.H.Bradbury, S.J.Leach. (1970). (Ed.), Physical Principles and Techniques in Protein Chemistry: Part-B, Academic, New York.

[92] H.B.Bohidar, S.Tripathi, J.Kumar, and all. (2002). (Eds.), Handbook of Polyelectrolytes, vol. II, American Scientific Publishers, California.

[93] H.B.Bohidar, S.S Jena, I.Chem,. (1993). Phys 98 ,8970; H.B.Bohidar, S.S.Jena, J.Chem, (1994) .Phys. 100 ,6888.

[94] I.Pezron, M.Djabourov, J.Leblond. (1991). Polymer 32 ,3201; Djabourov, M., Leblond, J, Papon, P., Phys ,J. (1988), France, 49, 319 and 33.

[95] E. Tsuchida, K. Abe. (1982). Inter Macromolecular Complexes, Springer, Heidelberg.

[96] A. Eisenberg, F.E. Bailey. (1986). (Eds.), Coulombic Interactions in Macromolecular Systems, American Chemical Society, Washington, DC, vol. 302.

[97] J.Jeon, V.A.Dobrynin. (2003). Phys. Rev. E 67 ,061803.

[98] R.G.Winkler, P.Reinker, J.Chem. (1997) .Phys. 106 ,2841; H.Schiessel, A.Blummen, J.Chem. (1996) .Phys. 105 ,4250; (c) Grest, G. ,

Murat, M. (1993) . Macromolecules 26, 3108

[99] M.Rosenberg, S.J.Lee. (2004). Water-insoluble, whey protein-based microspheres prepared by an all-aqueous process. Journal of Food Science, 69, E50–E58.

[100] I.Mainville, Y.Arcand, and E.Farnworth. (2005). A dynamic model that stimulates the upper gastro-intestinal tract for the study of probiotics. International Journal of Food Microbiology, 99, 287–296.

[101] B.M.Corcoran, C.Stanton, G.F.Fitzgerald, and all. (2005). Survival of probiotic lactobacilli in acidic environments is enhanced in the presence of metabolizable sugars. Applied and Environmental Microbiology, 71, 3060–3067.

[102] Y.Sanz. (2007). Ecological and functional applications of the acidadaptation ability of Bifidobacterium: A way of selecting improved probiotic strains. International Dairy Journal, 17, 1284–1289.

[103] D.Guérin, J.C.Vuillemard, and M.Subirade. (2003). Protection of bifidobacteria encapsulated in polysaccharide–protein gel beads against gastric juice and bile. Journal of Food Protection, 66, 2076–2084.

[104] W.P.Charteris, P.M.Kelly, L.Morelli, and all. (1998). Development and application of an in vitro methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic Lactobacillus and Bifidobacterium species in the upper human gastrointestinal tract. Journal of Applied Microbiology, 84, 759–768.

[105] L.Truelstrup Hansen, P.Allan-Wojtas, Y.Jin, and all. (2002). Survival of Ca-alginate microencapsulated Bifidobacterium spp. in milk and simulated gastrointestinal conditions. Food Microbiology, 19, 35–45.

[106] R.Bodmeier, J.Wang. (1993). Microencapsulation of drugs with aqueous colloidal polymer dispersions. Journal of Pharmaceutical Sciences, 82, 191–194.

[107] P.Liu, T.R.Krishnan. (1999). Alginate-Pectin-Poly-L-lysine particulate as a potential controlled release formulation. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 51, 141–149.

[108] C.Le-Tien, M.Millette, A.Mateescu, and all . (2004). Modified alginate and chitosan for lactic acid bacteria immobilization. Biotechnology and Applied Biochemistry, 39, 347–354.

[109] H.Tønnesen, J.Karlsen. (2002). Alginate in drug delivery systems. Drug Development and Industrial Pharmacy, 28, 621–630.

[110] T.Smith. (1995). The digestive system. In The human body (pp. 150–173). Collingwood, UK: Ken Fin Books.

[111] K.B.Amor, P.Breeuwer, P.Rombouts, and all. (2002). Multiparametric flow cytometry and cell sorting for the assessment of viable, injured and dead bifidobacterium cells during bile salt stress. Applied and Environmental Microbiology, 68, 5209–5216.

[112] H.S.Chung, Y.B.Kim, S.L.Chun, and all. (1999). Screening and selection of acid and bile resistant bifidobacteria. International Journal of Food Microbiology, 47, 25–32.

[113] W.W.V.Lankaputhra, N.P.Shah. (1997). Improving viability of Lactobacillus acidophilus and bifidobacteria in yogurt using two step fermentation and neutralized mix. Food Australia, 49, 363–366.

[114] A.Picot, C.Lacroix. (2004). Encapsulation of bifidobacteria in whey protein-based microcapsules and survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. International Dairy Journal, 14, 505–515.

[115] P.A.Clark, J.Martin. (1994). Selection of bifidobacteria for use as dietary adjuncts in cultured dairy foods: III – Tolerance to simulated bile concentrations of human small intestines. Cultured Dairy Products Journal, 29, 18–21.

[116] L.Hansen, P.M.Allan-Wojtas, Y.L.Jin, and all. (2002). Survival of Ca-alginate microencapsulated Bifidobacterium spp. in milk and simulated gastrointestinal conditions. Food Microbiology, 19, 35–45.

[117] K.B.Amor, P.Breeuwer, P.Rombouts, and all. (2002). Multiparametric flow cytometry and cell sorting for the assessment of viable, injured and dead bifidobacterium cells during bile salt stress. Applied and Environmental Microbiology, 68, 5209–5216.

[118] A.Picot, C.Lacroix, (2004). Encapsulation of bifidobacteria in whey protein-based microcapsules and survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. International Dairy Journal, 14, 505–515.

[119] M.Martin, F.Lara-Villoslada, M.A.Ruiz , and all.(2013). Effect of unmodified starch on viability of alginate-encapsulated Lactobacillus fermentum CECT5716. LWT-Food Sci. Technol,53:480–486.

[120] M.Schoebitz, M.D.López, and A.Roldán .(2013) .Bioencapsulation of microbial inoculants for better soil–plant fertilization. A review. Agron. Sustainable Dev,33:751–765.

[121] K.V.Phadke, L.S.Manjeshwar, and T.M.Aminabhavi. (2014). Biodegradable polymeric microspheres of gelatin and carboxymethyl guar gum for controlled release of theophylline. Polym. Bull,71:1625–1643.