République Algérienne Démocratique et Populaire.
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique.
UNIVERSITE : Dr. YAHIA FARES- MEDEA

Faculté des Sciences et de la Technologie
Département Génie des Procédés Pharmaceutiques

Mémoire de fin d'étude

Pour l'obtention du diplôme de Master en Génie des Procédés

Option : Bioprocédés Pharmaceutiques

Thème :

Modification et caractérisation d'un biopolymère à usage pharmaceutique

Présenté par :

ÅM^lle^ : Mitidji Amina.

ÅM^lle^ :Titraoui Halima.

Proposé et dirigé par :

Å Pr :Moulai-Mostefa.N

Å M^me^ :Kerrache.S

Année universitaire 2011-2012

Remerciements

Après avoir rendu grâce à ALLAH,lôeternel soutien et prié sur le sceau des prophètes MOHAMMED (PSL).Nos sincères remerciements sont adressés à notre prometteur de thèse, Professeur Moulai-mostefa.N et Mme :Kerrache.S quô on tiens à leur exprimer notre profonde gratitude pour avoir encadré cette thèse et de nous avoir fait lôhonneur de travailler avec eux.

On remercie aussi Monsieur Abbed Belkacemi directeur de département de production et de matières premières au niveau du complexe anibiotical SAIDAL de Médéa pour son aide.

On tiens à exprimer notre profonde gratitude et nos sincères remerciements à Mr Mahmoudi.B directeur des études et des stage à lôINSFP de Médéa et Mr Bouaissa.K pour l'aide précieux au cours de l'élaboration de ce travail.

On voudrais également remercier tous les membres de Hall de technologie et les membres de laboratoire de recherche de lôuniversité de Médéa qui nous ont fort bien accueilli et aider au sein de tous les laboratoires.

Un grand merci à Mr Salhi.S pharmacien pour son aide.

on nôoublie non plus lôensemble des membres et des enseignants du département Génie des Procédés Pharmaceutiques de lôuniversité de Médéa.

On ne peux pas ignorer que la réalisation nôaurait jamais été possible sans la contribution de nombreuses personnes

Enfin, on tiens à remercier toutes les personnes qui ont participé de prés ou de loin pour la réalisation de ce travail.

Mention spéciale a nos camarades de promotion.

Dédicace

A mes parents qui ont sacrifiés leurs vies pour donner sens à la mienne.

A mes sœurs: Fouzia ,Hadjer, Fatima Zohra.

A mes frères: Khaled ,Mahjoub,Madjid.

A ma chère amie sœur et collègue Soumia

A mon binôme Amina et toute sa famille

A tous mes amis

A tous mes collègues de travail

Et à tout ceux que j'aime.

HALIMA

Dédicace

A mes parents qui ont sacrifiés leurs vies pour donner sens à la mienne.

A ma sœur: Amel

A mes frères :Mohammed et Aniss

A mon binôme Halima et toute sa famille

A tous mes amies

A tous mes collègues de travail

Et à tout ceux que j'aime.

AMINA

Sommaire

Introduction

Chapitre I : Les biopolymères.

I.1. Les polymères……..1

I.2. Les biopolymères……..1

I.3. Les polysaccharides…….2

I.4. Les carraghénanes……...2

I.4.1. Composition chimique des carraghénanes…….3

I.4.2. Propriétés physico-chimiques des carraghénanes……5

I.4.3. Activité biologique des carraghénanes……5

I.4.4. Utilisation des carraghénanes……..5

I.4.5. Organisation en double hélices……6

I.4.6. Conformation en solution et transition conformationelle……..6

I.4.7. Mécanisme de gélification……7

I.4.8. Paramètres affectant le processus de gélification des carraghénanes…....7

I.4.9. Principales propriétés de gel de kappa et iota carraghénane…….8

I.4.10. Influence de différents paramètres physico-chimiques sur le comportement des carraghénanes……..8

I.4.11. Propriétés physiologiques des carraghénanes……..10

I .5. Les hydrogels……..10
I.5.1. Définitions…….10
I.5.2. Classification des hydrogels……....11
I.5.2.1. Les gels physiques/réversibles……11
I.5.2.2. Les gels chimiques/ permanents…….11
I.5.2.3. Techniques courantes d'étude des hydrogels……12
I.5.2.4. Application des hydrogels……12
I.6. La réticulation…….12
I.6.1. Définition…….12
I.6.2. La réticulation physique…….13
I.6.3. La Réticulation chimique……13

Chapitre II : La micro-encapsulation

II.1. Définitions...……....14
II.2. Généralités sur la micro-encapsulation……....14
II.2.1. Structure…….....14
II.2. Fonctions…….15
II.3. Nature des matériaux enrobants……...16
II.4. Modes d'action des microparticules……16
II.5. Mécanisme de libération……....17
II.5.1. Libération par diffusion……17
II.5.2. Libération par gonflement suivie d'une diffusion……....17
II.5.3. Libération par dégradation……18
II.6. Procédés de micro encapsulation…….…18

II.6.1 Procédés physico-chimiques……...19

II.6.1.1 Micro-encapsulation en milieu dispersant liquide…….19

II.6.1.2. Emulsion et évaporation-extraction de solvant……...20

II.6.1.3. Micro-encapsulation par gélification de gouttes……..22

II.6.2. Procédés chimiques…….22

II.6.2.1. Polycondensation interfaciale……22

II.6.2.2. Polymérisation en milieu dispersé…….…22

II.6.2.3 Extrusion……..23

II.7. Propriétés d'encapsulation des microparticules…….23

II.8.L'α-AMYLASE…….25

Chapitre III

ETUDE EXPERIMENTALE

III.1.Introduction……26

III.2. Carboxymethylation du Kappa-carraghénane……...……...26

III.2.1.Matériel et réactifs……..27

III.2.2.Mode opératoire……..27

III.3.Résultats et discussion…….....28

III.3.1.Calcul de rendement……....28

III.3.2. Identification par FTIR…….....29

III.3.3. Degré de substitution (DS)……...31

III.3.4. Aspect organoleptique de la poudre CMKC……..33

III.3.5. Caractérisation de la poudre de CMKC……..34

III.3.5.1. Densité vrac……..34

III.3.5.2. Densité réelle……....34

III.3.5.3. Etude de l'activité antibactérienne de CMKC…….....35

III.3.5.4. Capacité d'absorption et de rétention de l'humidité……....38

III.4. Formulation des beads à base de KC et CMKC……....41

III.4.1.L'encapsulation de l'alpha –amylase……....41

III.4.2.Caractérisation des capsules……..43

III.4.2.1. Morphologie de capsules humides et sèches…….....43

III.4.2.2. Etude granulométrique des capsules……...44

III.4.2.3. Caractérisation par FTIR……..44

III.4.3. Dosage de α amylase par la spectrophotométrie UV/ VIS……47

III.4.4. Calcul du Taux d'encapsulation……48

III.4.5. Etude de la cinétique de libération de l'Alpha amylase à partir des beads……49

III.4.5.1. Libération dans un milieu neutre (pH =7)……50

III.4.5.2. Libération dans un milieu acide (pH=2)……50

Conclusion générale.

Annexes.

Référence bibliographiques.

Liste des figures

Chapitre I : Les biopolyméres

Figure I.1. Motifs disaccharidiques de répétition G-D / G-DA des carraghénanesé é .3

Figure I.2. Intercalation des fractions mue et nu dans des fractions de kappa et iota carraghénanesé 4

Figure I.3. Structure chimique de différents types de carraghénaneé é é é é 4

Figure I.4: Enroulement des chaînes de kappa (a) et de iota (b) carraghénanes sous de doubles hélices droites forme d'hélices droitesé é é é é é é é é é é é é é é é 6

Chapitre II : La micro-encapsulation

Figure II.1. Représentation schématique dôune Microsphère et une microcapsuleé é 15

Figure II.2. Libération par diffusioné é é é é é é é é é é é é é é é é é é ..17

Figure II.3. Libération par gonflement suivi dôune diffusioné é é é é é é é é é 18

Figure II.4. Libération par dégradationé é é é é é é é é é é é é é é é ..é ...18

Figure II.5. Principe de la coacervation simpleé é é é é é é é é é é é é é é .20

Figure II.6. Représentation simplifié du la micro encapsulation par émulsion et évaporation-extraction de solvanté 21

FigureII.7. Représentation schématique des différents modes de relargage des microparticulesé 24

Chapitre III : Etude expérimentale

Figure III.1. Réaction de modification de ə-carraghénane par carboxyméthylationé 28

Figure III.2. Rendement de la réaction de carboxyméthylation du KCé é é é é 29

Figure III.3. Spectre FTIR de ə-Carraghénaneé é é é é é é é é é é é é é é ..30

Figure III.4. Spectre FTIR de -ə-Carraghénane carboxyméthyléé é é é é é é ..30

Figure III.5. Degré de substitution du CMKC en fonction du rapport n_{MCA}/ n_{KC}é é .33

Figure III.6. Aspect du biopolymere modifié (CMKC)é é é é é é é é é é é é 34

Figure III.7. Méthode de diffusion en gélose..é é é é é é é é é é é é é 36

Figure III.8. Représentation de la zone dôinhibition (flèche en rouge)é é é é é é .36

Figure III.9. Résultats de la zone dôinhibition pour KC et CMKCé é é é é é ...37

Figure III.10. Capacité dôabsorption et de rétention dôhumidité par le KC et CMKCé 40

Figure III.11. Variation de la capacité dôabsorption et de rétention dôhumidité par le KC, et CMKC en fonction du degré de substitution du KCé é é é é é é é é ...40

Figure III.12. Microcapsules après filtrationé é é é é é é é é é é é é é 42

Figure III.13. Structure des capsules humides et sèches de CMKC et KC. é é é 43

Figure III.14. Spectre FTIR de lôalpha-amylaseé é é é é é é é é é é é é 45

Figure III.15. Spectre FTIR des beads de CMKC chargésé é é é é é é é 46

Figure III.16. Spectre FTIR de mélange alpha-amylase et capsules vidésé é é é é 46

Figure III.17. Gonflement des beads dans le SGFé é é é é é é é é é é é é 48

Figure III.18. Taux dôencapsulation des beads à base de KC et CMKCé é é é é ..49

Figure III.19. Profil de libération de lôAlpha amylase à travers les beads de KC et CMKC à pH =7é 50

Figure III.20. Profil de libération de lôAlpha amylase à travers les beads de KC et CMKC à pH =2é ..51

Figure III.21. Comparaison des profil de libération de lôalpha amylase à travers des beads de CMKC dans différents milieuxé é é é é é é é é é é é é é é é é é 52

Figure III.22. Comparaison des profils de libération de lôalpha amylase à travers des beads de KC dans différents milieuxé ..53

Liste des tableaux

Chapitre III : Etude expérimentale

Tableau III.1. Rendement de différents échantillons de KCé é é é é é é é .28

Tableau III.2. Présentation des résultats de DS pour KC et CMKCé é é é é é 32

Tableau III.3. Résultats de mesure de densité en vrac et densité réelleé é é é é .35

Tableau III.4. Résultats de lôactivité antibactérienne de KC et CMKCé é é é é 38

Tableau III.5. Résultats de la capacité dôabsorption et de rétention dôhumiditéé é 39

Tableau III.6. Taille des microcapsules humides de CMKC et de KCé é é é é ..44

Tableau III.7. Résultats de dosage de lôabsorbance de lôalpha-amylaseé é é é é 48

Tableau III.8. Calcul de taux dôencapsulationé é é é é é é é é é é é é é é 49

Liste des abréviations et des symboles

A : Absorbance.

A : Le montant global des-CH2COOH et-CH2COONa par gramme dœchantillon.

AH : Acide hyaluronique.

Cm : Centimètre.

CMKC : Carboxyméthyle Kappa-carraghénane.

°C : Degré Celsius.

d: Densité réelle.

d_0 : Densité vrac.

DS : Degré de substitution.

E : Energie de radiation.

***E.coli* :** *Echerichia Coli.*

FTIR : Spectrophotomètre Infra-Rouge à Transformée de Fourier (Fourier Transformed InfraRed spectroscopy).

Hz : Hertz.

h : Heures.

KBr : Potassium Bromide.

KC : Kappa-carraghénane.

M : Molarité.

MCA : Acide Mono Chloracétique.

mm : Millimètre

N : Normalité.

nm: nanomètre.

n_{MCA} : Nombre de mole de lôacide monochloracetique.

n_{KC} : Nombre de mole de Kappa-carraghénane.

PA : Principe Actif.

Rα : Capacité d'absorption d'humidité.

Rh : Capacité de rétention d'humidité.

***S.aureus*:** *Staphylococcus Aureus.*

UV/VIS : Spectrophotomètre Ultra violet/ Visible.

µm : Micromètre.

ملخص:

عملنا يتركز على تركيب كاربوكسيميثيل الكاراجينان نوع كابا،عن طريق تفاعل الكاراجينان نوع كابا مع حمض احادي كلور اسيتك و تحديد خصائصه باستعمال القياس الطيفي بالأشعة الحمراء "فوريي". وأجريت أيضا اختبارات أخرى على البوليمر المغير و منها: حساب درجة الاستبدال، قياس الوزن الجزيئ، قياس القدرة على الامتصاص و الاحتفاظ بالرطوبة و كذا النشاط المضاد للبكتيريا. النتائج اكدت وجود الوظيفة الحمضية في الكراجينان كابا الكربوكسيميثيلي وكذا خاصية مضادة لنوعين من البيكتيريا: "اشر يشيا كولي"و "سترابتوكوكوسأوغيوس" بالإضافة إلى خاصية الامتصاص و الاحتفاظ بالرطوبة. لإظهار الاستفادة من استخدام البوليمر الحيوي المغير، تم اجراء دراسة كبسلة الانزيم "الألفا أميلاز" داخل كبسولات صغيرة جدا باستعمال الكاراجينان نوع كابا و كاربوكسيميثيل الكاراجينان نوع كابا، استعمال كاربوكسيميثيل الكاراجينان نوع كابا مكنتنا من الحصول على كرويات صغيرة قاربت فيها نسبة الكبسلة 78%، كما تم اجراء دراسة نسبة تحرير وانتشار الإنزيم من الحبيبات المصنوعة من الكاراجينان نوع كابا و كاربوكسيميثيل الكاراجينان نوع كابا.

Résumé :

Notre travail porte sur la synthèse de carboxyméthyle kappa-carraghénane (CMKC) par la réaction du k-carraghénane (KC) avec l'acide monochloracétique et sa caractérisation par spectroscopie FTIR. D'autres tests ont été également effectués sur le polymère modifié tels que le degré de substitution, le poids moléculaire, la capacité d'absorption d'humidité et de rétention et l'activité antibactérienne. Les résultats ont montré que le CMKC possède des fonctions acides et une bonne activité antibactérienne contre E.Coli et Staphylococcus aureus et la propriété d'absorption de l'humidité et de rétention. Afin de montrer l'avantage d'utiliser le biopolymère modifié, une étude d'encapsulation de l'alpha amylase a été réalisée dans des microsphéres en utilisant soit le KC, soit le CMKC. L'utilisation du CMKC a permis l'obtention des beads de forme sphérique ayant un taux d'encapsulation de l'ordre de 78%. Une étude sur la libération du principe actif à travers les beads formulés avec KC et CMKC a été également réalisée.

Abstract

The aim of this work was the synthesis of carboxymethyl kappa-carrageenan (CMKC) by the reaction of k-carrageenan (KC) with monochloroacetic acid and its characterization by FTIR spectroscopy. Other tests were also carried out on the modified polymer, such as the determination of the degree of substitution, molecular weight, moisture absorption capacity and retention and antibacterial activity. The results showed that CMKC has acidic functions and a good antibacterial activity against Staphylococcus aureus and E. coli and the property of moisture absorption and retention. To show the advantage of using the modified biopolymer, a study of encapsulation of alpha amylase was performed in microspheres using either KC or CMKC. The use of CMKC allowed obtaining beads having a spherical form with a degree of encapsulation of 78%. A study on the release of the active ingredient through the beads formulated with KC and CMKC was also performed.

Les polysaccharides ont été proposés comme les premiers biopolymères qui se sont formés sur la terre. Ces macromolécules sont les éléments structuraux majeurs de la paroi des algues (carraghénane), des plantes (cellulose).

Les polysaccharides sont largement utilisés dans les produits alimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques pour donner une texture appropriée ou pour améliorer la qualité par un épaississement ou gélification.

La modification chimique des polysaccharides est considérée comme un moyen important afin dôaméliorer les propriétés physicochimiques, rhéologiques, ou biopharmaceutiques des biopolymères.

Des tendances récentes et des stratégies dans la recherche sont orientées vers une fonctionnalisation des biopolymères. La plus connue est la carboxyméthylation de polysaccharides qui est une conversion largement étudiée et qui mène au développement de nouveaux biomatériaux avec des applications très prometteuses.

Les réactions de carboxymethylation ont été étudiées pour divers biopolymères tels que lôamidon, le chitosan, le dextrane, ou le carraghénane. Les dérivés obtenus sont des polyélectrolytes qui peuvent être appliqués comme excipients ou adjuvants dans lôindustrie pharmaceutique, alimentaire et/ou cosmétique.

L'encapsulation est un moyen de formulation qui consiste à encapsuler selon un procédé déterminé un principe actif dans une autre matière inactive afin d'améliorer les propriétés de conservation, de présentation et de biodisponibilité.

Récemment, les polysaccharides naturels ont gagné en importance pour lôencapsulation dans des gels. Ces derniers présentent lôavantage de la non-toxicité, la biocompatibilité et la biodégradabilité. Les plus favorables en raison des conditions particulièrement douces de gélification sont les alginates, les chitosans et les carraghénanes.

Une étude des conditions de gélification du kappa-carraghénane dans le cadre de son utilisation en tant que matrice de pré-encapsulation dôenzymes est réalisée. La gélification est obtenue par simple refroidissement ou par contact avec des ions métalliques, mono, di et trivalents, des amines, des dérivés dôacides aminés ou encore des solvants organiques miscibles à lôeau (méthanol, éthanol, acétone). Les gels sont obtenus sous forme de cubes, billes ou de films.

Dans le contexte où s'inscrit notre travail, nous avons tenté d'atteindre l'objectif, qui consiste à appliquer le procédé de gélification d'un bio polymère modifié « CMKC » par

réaction de carboxymethylation. Ce dernier est utilisé pour la formation des microsphères comportant un principe actif "lœnzyme alpha-amylase".

Pour cela on va suivre le plan d'étude suivant :

- Une partie bibliographique divisée en deux chapitres :

- Le premier chapitre comporte des généralités sur les biopolymères et la description détaillée des carraghénanes en particulier;

- Le deuxième chapitre comporte des généralités sur la micro-encapsulation et la libération contrôlée des principes actifs.

- Une partie expérimentale subdivisée en deux (02) parties :

➢ Partie 01 qui traite la modification du biopolymère dite « carboxymethylation du Kappa-carraghénane et sa caractérisation ».

➢ Partie 02 qui a comme objectif « lœncapsulation de lœalpha ï amylase par le Kappa- carraghénane modifié et la caractérisation des microcapsules obtenues».

Les Biopolymères

I.1. Les polymères

On appelle polymère une grande molécule constituée dôunités fondamentales appelées monomères (ou motifs monomères) reliées par des liaisons covalentes [1].

Un monomère est un composé constitué de molécules simples pouvant réagir avec dôautres monomères pour donner un polymère. Contrairement au polymère, un monomère a une faible masse moléculaire [1].

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 composes de masse moléculaire plus élevée ; les polymères ou macromolécules par établissement de liaisons covalentes entre de petites molécules elles-mêmes appelées monomères [1].

Un homopolymère est un polymère qui comporte des motifs monomères tous identiques et un copolymère est un polymère qui comporte des motifs monomères de deux ou plus sortes différentes [1].

I.2. Les biopolymères

Les biopolymères sont des polymères naturels issus de ressources renouvelables de plantes, dôalgues ou dôanimaux. Ces polymères sont regroupés en trois familles principales :

- **Polysaccharides :** parmi les polysaccharides, les plus connus sont la cellulose issue de la paroi des plantes, les carraghénanes extraits d'algues rouges et les alginates extraits d'algues brunes, mais aussi le chitosan extrait des carapaces de mollusques [2].
- **Protéines :** ce sont principalement les protéines issues de tissus animaux comme le collagène, et la gélatine, et la lignine ou des produits animaux comme les caseines et des protéines issus des plantes oleagéneuses (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.

I.3. Les polysaccharides

Les polysaccharides sont des macromolécules constituées dûun très grand nombre de monosaccharides liés entre eux par des liaisons glycosidiques. La longueur de la chaine, le nombre et le type dûunités constitutifs influent sur les propriétés fonctionnelles comme la viscosité, la capacité de rétention dôeau et la réticulation [3]. On distingue :

* Les homo-polysaccharides dans lesquels 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 [4]

* Les hétéro-polysaccharides présentent 2 ou plusieurs types de monosaccharides.

Les polysaccharides peuvent être classés selon leurs origine (animale ou végétale) ; leur nature soit de réserve (comme lôamidon) ou structurale (comme la cellulose) ; la présence dôamidon (polysaccharides non amylacés PNA ou amylacés) ; leurs solubilités dans lôeau ou leurs digestion dans le système gastro-intestinal humain [5,6].

Les polysaccharides sont utilisés comme épaississants, stabilisants, agents de suspension, agents gélifiants, agents filmogènes, agents d'aération, floculants, liants, émulsifiants, lubrifiants, et agents texturants et de structuration [7,8].

Les polysaccharides sont principalement utilisés pour épaissir de l'eau en gel et sont souvent classés en deux groupes : épaississants et gélifiants [9].

I.4. Les carraghénanes

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

Lôextraction des carraghénanes de la paroi de ces algues est réalisée dans lôeau à chaud et en milieu alcalin. Le carraghénane est ensuite filtré à chaud afin dôéliminer les résidus insolubles, notamment la cellulose de la phase squelettique. Le carraghénane peut ensuite être récupéré de la solution par précipitation à lôalcool ou au chlorure de potassium dans certains cas. Environ 80000 tonnes dôalgues rouges sèches sont nécessaires pour produire 20 000 tonnes de carraghénanes [10].

Ces composés présentent la propriété de modifier le comportement rhéologique des milieux aqueux, cette modification de texture pouvant aller du simple épaississement jusqu'à la gélification.

I.4.1. Composition chimique des carraghénanes

Les carraghénanes sont constitués de chaines linéaires sulfatées dont le motif de répétition est un disaccharide constitué de deux résidus galactose, ß-D- galactose et anhydrogalactose liées en ß(1,3) et Ŭ (1,4) [11]. Il existe différentes catégories de carraghénane produit par différente types dôalgues rouges.

En effet les chercheurs ont dôabord pensé quôil existait deux fractions : le lambda et le kappa carraghénane. Plus tard, Rees [12] a démontré lôexistence de cinq fractions.

Ainsi les principales fractions sont appelées Kappa (ə), iota (i), et lambda (ɔ) carraghénane avec deux fractions mineurs µ(mu) et ɜ(nu) comme décrit dans la figure I.3 [12]. Ces fractions diffèrent par :

- Le nombre et la position des groupements sulfates présents sur le digalactane de base.
- La présence dôun certain nombre de motifs 3,6 anhydro galactose liés en 1,4
- La présence de cations fixés sur les groupements sulfates (Na^+, K^+, Ca^{2+})

La présence dôun groupement sulfate confère aux carraghénanes un caractère acide marqué (Figure I.1).

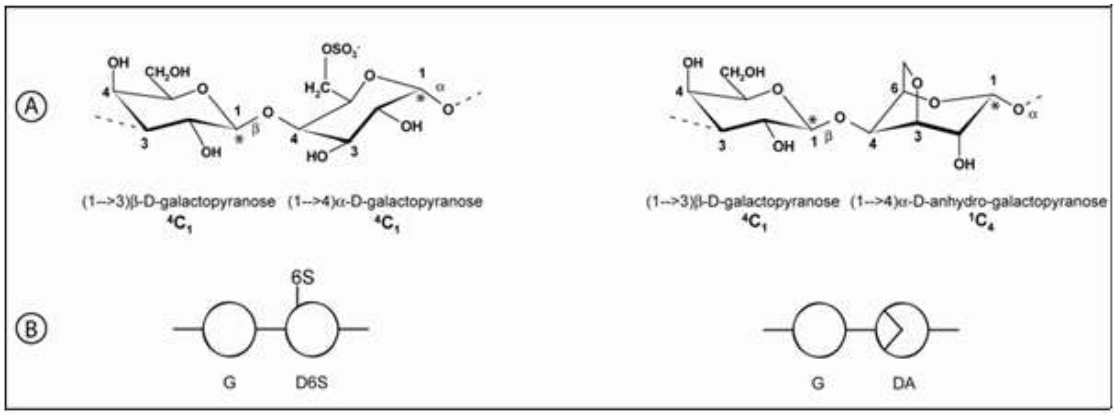


Figure I.1. Motifs disaccharidiques de répétition G-D / G-DA des carraghénanes [10]

Le ɔ-carraghénane est une molécule linéaire composée d'éléments dimères, ß-D-galactose 2- sulfate de conformation C1 (1,4)-Ŭ-D-galactose. Ces dimères sont reliés entre eux par des liaisons 1,3-glycosidiques. Le groupement alcool primaire de Ŭ-D-galactose est estérifié par l'acide sulfurique et les groupements hydroxyles du C_2 des deux galactoses sont également estérifiés dôenviron 70% par l'acide sulfurique. Le ɔ-carraghénane affiche ensuite une teneur sulfates de 32 à 39% [11]. Les carraghénanes ş - et i- sont basés sur les carrabioses, dimères au sein desquels le ß-D-galactose 1,4-glycosidique de conformation C1 est lié de l'Ŭ-D-3,6-anhydrogalactose de conformation 1C. Ces dimères forment des molécules linéaires par des

liaisons 1,3-glycosidiques. La différence entre les deux types de carraghénanes se situe au niveau des sulfates. Dans le ş -carraghénane, le groupement ester sulfate se trouve au C_4 du galactose; la teneur en sulfates oscille entre 25 et 30% [11].

Dans lô-carraghénane, le groupement hydroxyle est de plus estérifié en acide sulfurique au C_2 de l'anhydrogalactose. La teneur en sulfates atteint ici entre 28 et 35%.

Les fractions mu et nu sont formées par un motif ß-D- galactose-4-sulfate de conformation C1, liés en 1,3 et un motif Ŭ-D-galactose -6-sulfate de conformation C_1 lié en 1,4. La différence entre ces deux fractions de carraghénane est la présence des groupements sulfates sur le carbone 2 de galactose liés en 1,4. Ces fractions sont plutôt considérées comme des fractions parasites qui sôintercalent dans une fraction lambda, kappa ou iota (Figure I.2).

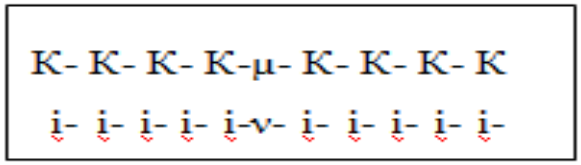


Figure I.2. Intercalations des fractions mue et nu dans des fractions de kappa et iota carraghénanes [11]

La figure I.3 résume les structures chimiques de différents types de carraghénanes.

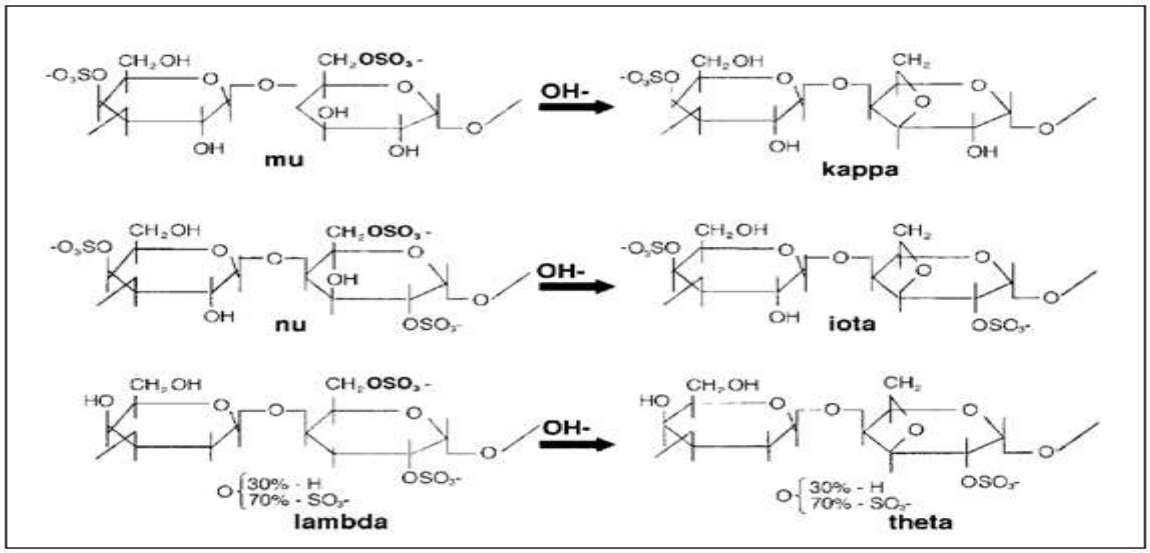


Figure I.3. Structure chimique de différents types de carraghénanes [12]

Le poids moléculaire et la polydispersité dôun carraghénane peuvent être mesurés, avec des résultats comparables, par des expériences de pression osmotique, de sédimentation ou de diffusion de la lumière [13]. Les poids moléculaires moyens Mw obtenus pour les carraghénanes, dans un état désorganisé, sont dans une gamme de 300-400 kDa pour les k- et ɘ-carraghénanes [14-15], et de 600 kDa pour le ɔ-carraghénane.

I.4.2. Propriétés physico-chimiques des carraghénanes

A température élevée et en solution, les chaînes de ə-et i-carraghénanes sont dans un état désordonné sous la forme de bâtonnets semi-rigides. Cet état désordonné est dû à lôagitation thermique. Lorsque la température est abaissée, la transition sol/gel se produit et les carraghénanes passent à un état ordonné sous forme dôhélices. Le gel se forme en présence de cations « gel-promoteur » qui neutralisent les charges négatives des groupements sulfates sur lôhélice et permettent leur association en agrégat [16,17]. Les i-carraghénane forment un gel très élastique en présence de calcium et les ə-carraghénanes forment un gel dur et cassant en présence de potassium.

Contrairement au k-carraghénane et i-carraghénane, le ɔ-carraghénane ne forme pas de gel en solution. Mais le ɔ-carraghénane possède des propriétés viscosifiantes et épaississantes élevées. La viscosité des solutions augmente avec la concentration en ɔ-carraghénane, et décroît en présence de sels et par élévation de la température [16,17].

I.4.3. Activité biologique des carraghénanes

Les principales activités biologiques des carraghénanes sont des propriétés anticoagulantes [18,19], anti tumorales [20], et antivirales. Les propriétés antivirales des carraghénanes sôexpliqueraient par un blocage de lôabsorption des virus (HIV, hépatite) à la surface des cellules [21]. Lôiota carraghénane est le plus promotteur vis-à-vis du HIVpour une protection des muqueuses et est passé en test clinique [22]. Lôactivité antivirale des carraghénanes contre lôherpès augmenteraient avec le poids moléculaire et le taux de sulfatation. Les ɔ-, µ- et ɜ-carraghénanes seraient donc les plus performants [23,24].

I.4.4. Utilisation des carraghénanes

Les propriétés physico-chimiques particulières des carraghénanes sont exploitées industriellement. Les carraghénanes (E407) représentaient, en 1996 [10], 15% du marché des hydrocolloïdes alimentaires. Leurs propriétés gélifiantes, texturantes et épaississantes sont utilisées dans les produits laitiers (flan, crème dessert, glace). Ce sont aussi des agents de suspension dans le lait cacaoté, les vinaigrettes et les jus de fruits avec pulpe.

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

Les carraghénanes peuvent servir également dôagent dœncapsulation [25], parmi ces carraghénanes, les kappa- carraghénanes présentent un processus de gélification iono- et thermosensible. Ces caractéristiques en font de bons candidats à la préparation de microsphères par gélification ionotropique. Ce type de carraghénane et la nature des ions présents dans la solution durcissant sont les paramètres clefs de la fabrication de ces microsphères.

I.4.5. Organisation en double hélices

Les premières études de diffraction des rayons X réalisé sur des films obtenus par déshydratation de gels de kappa et iota carraghénanes ont mis en évidence la présence de cristallites [26] sur des bases similaires, Anderson et al. [27] ont proposé un modèle de double hélice pour i-carraghénane avec un arrangement coaxiale de double hélice.

Deux chaines identiques triples ayant un pas de 2.6nm sont parallèles et décalées de1.3nm. Dans cette structure, deux liaisons hydrogènes intermoléculaires sont formées par unité di saccharidique. Plus récemment, Millane et al. [28] ont proposé un modèle pour ə-carraghénane à partir de données de diffraction des rayons X.

Ce modèle relativement proche de celui de lô-carraghénane se différencie par une excentration des deux chaines dôun angle de 28^0 et une translation de 0.1nm [28].

Ces structures sont inscrites dans la structure primaire du polymère, les liaisons *trans* entre les résidus 3,6 anhydro-Ŭ-D galactose et ɓ-D-galactose-4-sulfate constituant lôamorce dôune formation dœhélice.

La formation des hélices est initiée par la présence de cations qui vont former des liaisons de coordination avec les groupements sulfates. Elles sont par ailleurs stabilisées par la présence de molécules dôeau, qui forment des liaisons hydrogène entre les doubles hélices [29].

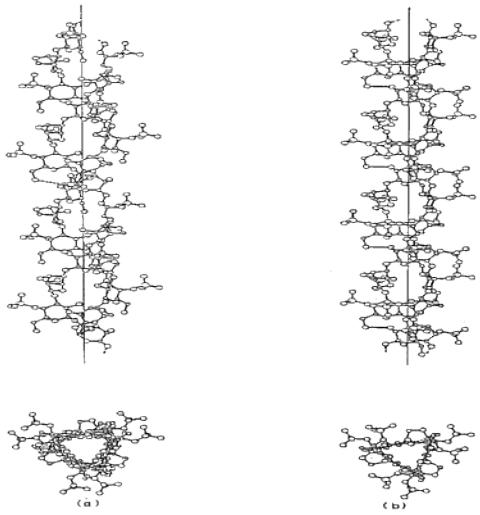


Figure I.4: Enroulement des chaînes de kappa (a) et de iota (b) carraghénanes sous de doubles hélices droites forme d'hélices droites [28].

I.4.6. Conformation en solution et transition conformationelle

Les propriétés de ə-carraghénane et ɘ-carraghénane ont fait lôobjet de nombreux travaux [30-31]. Elles dépendent à la fois de la température et de lôenvironnement ionique (présence de sels, concentration). En solution (à chaud), les carraghénanes se comportent comme des pelotes statistiques dont le degré dôexpansion dépend de degré de sulfatation et de lôenvironnement ionique en raison de son caractère poly électrolyte. Au refroidissement, ils adoptent une conformation hélicoïdale. La température de transition pelote-hélice qui dépend de la nature de cation (K^+, Ca^{++} é) et de la force ionique peut être observée par des mesures de polarimétrie [11], de conductivité [32,33,34], de diffusion de la lumière et dôanalyse enthalpique différentielle [16,35,36].

I.4.7. Mécanismes de gélification

La présence dôunité Ŭ-D-galactopyranose 6-sulfate et Ŭ-D-galactopyranose 2,6 sulfate interrompt la stéréorégularité de la chaine. Cette interruption limite la taille des hélices et oblige chaque chaine à sôassocier en double hélice avec deux autres chaines voisines conduisant ainsi à la formation dôun gel, côest-à-dire dôun réseau tridimensionnel [37].

La gélification du ə-carraghénane a fait lôobjet de nombreux travaux, pour plus de détail, il est possible de se référer aux revues bibliographiques [11,17].

Les premières études de Rees [12] basées sur des expériences de diffraction des rayons X sur des films dôi-carraghénane avaient abouti à un premier modèle de gélification des carraghénanes en une seule étape (pelote/double hélice). Morris et al. [16] ont proposé par la suite pour le ə-carraghénane un mécanisme impliquant deux étapes distinctes et permettent de prendre en compte les spécificités ioniques [16]. La première est la transition pelote-hélice et la seconde est lôagrégation des hélices qui conduit à la gélification [38,39,40].

Les deux modèles de gélification des carraghénanes sont :

- Le modèle de Morris et al. [16], montre que le carraghénane à lôétat ordonné a une conformation de double hélice. Puis ces doubles hélices sôassocient entre elles par le biais des cations spécifiques [11].
- Le modèle de Smidsrod [41] propose également une transition en structure ordonnée, mais en simple hélice.

I.4.8. Paramètres affectant le processus de gélification des carraghénanes

➢ **Influence du temps et de la température :** Dans l'étude des propriétés mécaniques de gel de ə-carraghénane, le facteur cinétique est important dans la formation du gel. Meunier et al. [38] montrent que le système s'équilibre lentement quand on est proche de la température critique T_c qui est d'environ $25C^0$ et qu'il faut attendre plus de 12 heures pour atteindre l'état final du gel [39]. Ces observations ont également été faites sur des solutions de i-carraghénane [42,43].

➢ **Influence de la force ionique :** La force du gel augmente avec la force ionique jusqu'à atteindre un plateau, puis diminue [44-45]. Il a été montre qu'en présence de certains anions, iodure ou sulfocyanate par exemple, la gélification ne peut pas se produire. Ceci est attribué à une très forte densité de charge des doubles hélices, limitant ainsi leurs agrégations [46, 14,47].

➢ **Influence de pH :** Le pH dans la gamme de 5.5 à 9 ne semble pas influencer les propriétés viscoélastiques des gels d'ι-carraghénane pour une concentration de sel donnée. Pour des pH en dessous de 5.5, l'ι-carraghénane s'hydrolyse et peut perdre sa capacité à gélifier [42]. Plus le pH est acide, plus l'hydrolyse des chaine de ə-carraghénane et i-carraghénane augmente avec le temps et la masse moyenne des carraghénanes diminue [48]. De plus, la dépolymérisation de ə-carraghénane est plus rapide à l'état liquide qu'à l'état gel [48]. i-carraghénane semble plus résistant à l'hydrolyse acide que le ə-carraghénane.

➢ **Influence de la concentration:** Plusieurs auteurs ont montré que le module élastique de gel de ə-carraghénane varie avec le carré de la concentration [49,39].

I.4.9. Principales propriétés de gel de kappa et iota carraghénane

La présence de répulsions électrostatiques entre les groupements sulfate situés à l'extérieur de la double hélice limite, dans le cas de iota carraghénane, la formation des agrégats et explique la bonne élasticité du gel ainsi que l'absence de synérèse.

Dans le cas des kapp-carraghénanes il peut y avoir agrégation, en raison de l'absence des groupements sulfates à l'extérieur des doubles hélices, ce qui permet d'expliquer que les gels obtenus soient plus fermes et cassants et présentent rapidement un phénomène de synérèse [37].

I.4.10. Influence de différents paramètres physico-chimiques sur le comportement des carraghénanes

➢ **Influence de la concentration :** Les carraghénanes possèdent la propriété d'augmenter considérablement la viscosité du milieu à de très faible concentration, inférieur à 1%. Ce comportement est la traduction macroscopique de l'existence d'enchevêtrement macromoléculaire qui apparaît au-delà d'une concentration critique en polymères C_{cr} qui est une fonction inverse de la viscosité intrinsèque [49].

$C_{cr} = K / [\eta]$

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

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

➢ **Influence de la température :** Une gélification par diminution de la température d'un système aqueux de iota carraghénane, avec des paliers de température suffisamment longs pour que le système atteigne l'équilibre avant de passer à la température suivante, montre que la rigidité de milieu augmente avec la gélification, d'abord au voisinage de la transition sol-gel puis de plus en plus lentement au fur et à mesure que la température diminue pour tendre vers un plateau [43]. La rigidité étant directement liée au niveau de réticulation du système, l'organisation de réseau de carraghénane dépend de la température et pratiquement pas de temps. A une température donnée correspond un degré d'organisation (réticulation) du réseau de carraghénane.Les valeurs de la température de transition sol-gel [42], pour un système aqueux d'iota carraghénane (contenant 0.15M de NaCl) se situe dans le domaine 60-65^{0}C, et de 40-45^{0}C pour kappa carraghénane, ces valeurs dépendant largement de la concentration en ion. A titre d'exemple, dans les résultats décrits par Rochas et ses collaborateurs [50], lorsque la concentration en KCl augmente de 0.1M à 0.4M, la température de transition sol-gel de l'iota carraghénane augmente de 40 à 64^{0}C.

➢ **Influence des ions sur la trans-conformation :** L'état ionique du carraghénane ainsi que l'environnement ionique dans lequel il se trouve déterminent ses propriétés conformationnelles. Rochas [35] a mis en évidence par polarimétrie et par des mesures de conductivité que les différents cations étudiés peuvent être classés en trois catégories en fonction de leur efficacité à promouvoir et à stabiliser la formation d'hélice [34] :

- Les cations monovalents non-spécifiques : $Li^+ < Na^+ < N(CH_3)_4^+$
- Les cations divalents : $Co^{2+} < Zn^{2+} < Mg^{2+} < Sr^{2+} < Ca^{2+} < Ba^{2+}$
- Les cations monovalent spécifiques : $NH_4^+ < K^+ < Cs^+ < Rb^+$
- Les cations monovalents spécifiques sont très efficaces pour la formation d'hélices.

Pour les cations monovalents non spécifiques et les cations divalents, l'efficacité de stabilisation des hélices varie peu. Par exemple, il est constaté que les « petits» ions comme Na^+ et Li^+ ou très gros comme $(CH_3)_4N^+$ ne favorisent pas l'établissement d'une conformation ordonnée. Ils sont seulement capables de former des liaisons ioniques avec les groupements sulfate sans néanmoins former liaisons électrostatiques avec les atomes d'oxygène présents sur le résidu anhydrogalactose.

I.4.11. Propriétés physiologiques des carraghénanes

➢ **Toxicité**

La dose journalière admissible est de 75mg/kg. Les carraghénanes aux doses utilisées dans les industries agro-alimentaires ne présentent pas d'effet toxique comme l'ont montré de nombreux travaux [51,52]. De plus, les carraghénanes dégradés sont des substances à effet ulcérogène au niveau du côlon, même à doses modérées.

➢ **Devenir dans l'appareil digestif**

Hydrolyse des carraghénanes : Dans l'estomac où le pH est très acide, de faibles hydrolyses pourraient se produire. Toutefois, des expériences d'hydrolyse in vitro avec des enzymes de suc gastrique à pH 1,2 et à 37^0C ont montré dans le cas des carraghénanes, qu'après 3 heures, l'hydrolyse des liaisons glycosidiques est inférieure à 0,1%. Certains auteurs ont montré que la dégradation des carraghénanes se situe entre 0 et 20 % [53,54].

Absorption des carraghénanes : Si les carraghénanes ne sont pas dégradés, ils ne peuvent être absorbés intacts. Chez certains animaux tels que le singe, le chien, le porc, le rat et la souris, il semble que les carraghénanes ne soient pas absorbés Houck et Bayana [56] ont récupéré 100% des carraghénanes dans les féces des chiens. D'autres études ont également montré un taux de récupération d'environ 90 à 100 % chez le rat [53,55,56].

I .5. Les hydrogels

I.5.1. Définitions

L'hydrogel terme décrit les structures de réseau en trois dimensions obtenus à partir d'une classe de polymères synthétiques et / ou naturel qui peut absorber et retenir une quantité

importante d'eau [57]. Sa principale caractéristique est sa capacité à gonfler en présence dœau et se contracter lorsque celle-ci sœévapore. Cette propriété est, bien entendu, liée à la nature et la densité des chaines constituant le réseau.

Le réseau est formé par la réticulation des chaines de polymère entre elle par liaisons covalentes, liaisons hydrogènes, interaction de Van der Waals ou physiques [58].

Les hydrogels forment une matrice qui protège le principe actif de la dégradation et de lœinactivation, certains hydrogels sont sensibles aux conditions environnementales et répondent à des stimuli aussi variés que la température, le pH et le champ électrique. Ces stimuli entrainent lœhydrogel dans une transition réversible de phase sol-gel [59].

I.5.2. Classification des hydrogels

I.5.2.1. Les gels physiques/réversibles

Ils sont appelés réversibles ou physiques lorsque les réseaux sont maintenus ensemble par enchevêtrements moléculaires, ou les forces secondaires, y compris ionique, liaison hydrogène ou des interactions hydrophobes. Dans les gels réticulés physiquement, la dissolution est empêchée par des interactions physiques, qui existent entre les différentes chaînes de polymères [60]. Toutes ces interactions sont réversibles, et peuvent être perturbées par changements dans les conditions physiques ou de l'application de la contrainte [57]. Les hydrogels physiques peuvent se former par interaction ionique entre un polysaccharide chargé et des ions le plus souvent divalents de charge opposée.

De nombreuses solutions aqueuses de polymères naturels forment une phase gélifiée quand la température diminue et se solubilisent au chauffage. Cœest le cas de la gélatine (protéine préparée par hydrolyse partielle du collagène) et de polysaccharides tels que lœagarose, le carrhagénane et le gellane.

I.5.2.2. Les gels chimiques permanents

Ils sont appelés permanents ou chimiques les gels qui sont obtenus par polymérisation de macro monomère, préparés par greffage chimique dœun monomère sur le squelette polysaccharidique, ou réticulé de manière covalente [60].

Ces gels chimiques sont des réseaux réticulés de manière covalente. Ils ne se dissolvent ni dans lœeau, ni dans les solvants organiques, à moins que les liaisons chimiques ne soient rompues. Seul leur taux de gonflement peut varier en fonction du milieu dans lequel ils se trouvent. Ils atteignent un état de gonflement d'équilibre qui dépend du paramètre d'interaction polymère-eau et la densité de réticulation [57].

I.5.2.3. Techniques courantes d'étude des hydrogels

Les différentes techniques d'étude des hydrogels permettent d'accéder à divers niveaux dans l'échelle spatio-temporelle de l'organisation des chaines :

- **Le niveau moléculaire** ou sont étudiés les phénomènes de trans conformation pelote hélice et de formation des zones de jonction.
- **Le niveau macromoléculaire** ou est étudié l'organisation spatiale des chaines reliées entre elles notamment par les zones de jonction, la création d'amas de plus en plus importants au cours de la formation du gel et la structure du réseau,
- **Le niveau supramoléculaire** ou sont étudies les propriétés globales des systèmes avant, pendant et après la transition sol-gel [61].

I.5.2.4. Applications des hydrogels

Les hydrogels ce sont de nombreux polymères synthétiques présents avec leur utilisation finale, principalement dans l'ingénierie tissulaire, les produits pharmaceutiques ainsi que le domaine biomédical [61]. En raison de leur capacité d'absorption d'eau élevée et de la biocompatibilité, ils ont été utilisés en pansement, administration de médicaments, de l'agriculture, des serviettes hygiéniques ainsi que systèmes transcutanée, matériaux dentaires, des implants, systèmes injectables polymériques, les applications ophtalmiques de type hybride (organes des cellules vivantes encapsulées) [57, 62,63].

I.6. La réticulation

I.6.1. Définition

La réticulation correspond à la formation d'un ou de plusieurs réseaux tridimensionnels, par voie chimique ou physique. Des liaisons entre les chaînes macromoléculaires sont créées. Les structures réticulées sont généralement préparées à partir de pré polymères linéaires ou ramifiés de faible masse molaire (issus d'une polymérisation partielle), réticulés sous l'action de la chaleur en présence d'un catalyseur/durcisseur.

Les polysaccharides réticulés ont été utilisés pour le revêtement et/ou d'enrobage des substances actives pharmaceutiques ou des compositions pharmaceutiques.

Des méthodes chimiques et physiques sont utilisées pour la réticulation des polysaccharides [64].

Lors de la réticulation physique, la dissolution est empêchée par une interaction physique qui existe entre les différentes chaînes de polymère. Lors de la réticulation chimique des liaisons covalentes sont présentes entre les différentes chaînes du polymère.

I.6.2. La réticulation physique

Ces dernières années, il y a eu augmentation de l'intérêt de réticulation physique. La raison principale est que l'utilisation d'agents de réticulation est évitée. Ces agents peuvent non seulement affecter l'intégrité de substances destinées à être piégés par exemple des protéines, des cellules, mais ces agents sont souvent des composés toxiques qui doivent être enlevées ou extraites à partir du gel avant de pouvoir être appliquée. Dans la réticulation physique, les polysaccharides forment un réseau réticulé avec un contre-ion à la surface. Pour la réticulation physique des méthodes différentes ont été étudiées.

Cette réticulation peut se faire soit par chauffage/refroidissement de la solution de polymère, soit par réaction ionique ou soit par cristallisation [65].

I.6.3. La réticulation chimique

La réticulation chimique du polysaccharide est une méthode très polyvalente avec une bonne stabilité mécanique. Au cours de réticulation, les contre-ions diffusés dans l'agent de réticulation de polymère et réagit avec des polysaccharides formant soit des liaisons intermoléculaires ou intramoléculaires. Les facteurs qui affectent la réticulation chimique sont la concentration de l'agent de réticulation et temps de réticulation. La forte concentration de l'agent de réticulation induit une réticulation rapide [66]. La Réticulation chimique est réalisée par des procédés suivants : par aldéhyde, par réaction dôaddition et par condensation.

La micro-encapsulation

II.1. Définitions

La micro encapsulation regroupe l'ensemble des technologies qui permettent la préparation de microparticules individualisées constituées d'un matériau enrobant contenant une matière active. Une des premières applications de la microencapsulation a été le papier autocopiant sans carbone. La micro-encapsulation permet aux principes actifs d'atteindre dans les meilleures conditions possibles les points cibles où leur efficacité sera maximale. Dans cette perspective de protection et d'aide à la vectorisation, la micro-encapsulation se présente comme une réponse à la fois logique et performante : elle consiste à encapsuler à l'intérieur d'une enveloppe le contenu que l'on souhaite protéger et dont on veut maitriser la libération (principe actif).

La micro-encapsulation, par son effet barrière, isole le produit actif du milieu environnant et le protège efficacement de tout facteur dégradant : radiation lumineuse ou thermique, agression chimique, incompatibilité avec d'autres produits [67].

II.2. Généralités sur la micro-encapsulation

II.2.1. Structure

La micro-encapsulation regroupe l'ensemble des techniques permettant l'obtention de particules dont la taille s'échelonne entre un micron et un millimètre contenant une substance active solide, liquide ou gazeuse. Les microparticules ainsi obtenues peuvent être classées en deux catégories selon leur microstructure (Figure II.1) :

- **Les microcapsules** sont des particules sphériques de type cî ur-couronne; le cî ur étant constitué de la substance active à encapsuler, et la couronne, enveloppe solide formée par l'agent encapsulant. Chaque microcapsule constitue un système réservoir proprement dit.
- **Les microsphères** sont constituées d'un réseau polymère dans lequel est dispersée la substance active à l'état moléculaire ou particulaire. Cette structure est dite système matriciel.

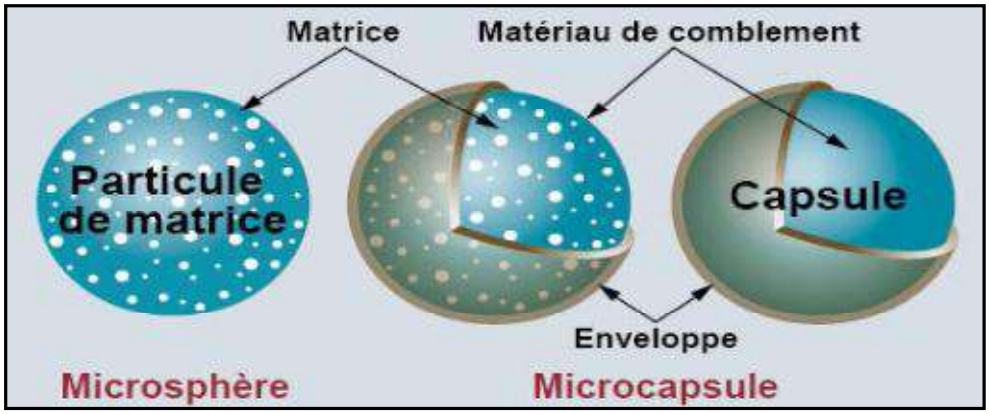


Figure II.1. Représentation schématique dûne microsphère et une microcapsule [68]

La plupart du temps les microparticules ont une forme sphérique ou ovoïde, mais il en existe de forme non régulière. La membrane protectrice des microparticules peut être formée d'une monocouche ou d'une multicouche quelle que soit leur microstructure.

II.2.2. Fonctions

La nature des produits encapsulés peut être hydrophile ou lipophile et avoir des propriétés diverses. On peut citer rapidement des propriétés anti-oxydantes, odorantes, colorantes, pharmacologiques. Les microparticules peuvent avoir différents rôles selon l'application pour laquelle elles sont conçues :

- Préserver un principe actif ou une substance du milieu extérieur lors de la fabrication d'un produit. La substance encapsulée peut alors sans dégradation subir divers procédés de fabrication comme des cuissons, des extrusions, des stérilisations...,
- Transformer un liquide en solide. En effet, lors de l'encapsulation d'un produit liquide, celui-ci est transformé en poudre de granulométrie plus ou moins fine ; on obtient alors un pseudo-solide,
- Faire varier la masse volumique d'un liquide en l'encapsulant. Ce faisant, on peut obtenir qu'un produit dense flotte ou bien qu'un produit léger coule,
- Diminuer la volatilité d'un produit possédant une forte tension de vapeur. Ceci est valable par exemple pour les arômes dans les préparations culinaires,
- Obtenir une diffusion contrôlée d'un produit actif. Ceci est surtout valable dans les formes pharmaceutiques, afin d'obtenir des médicaments à effet retard,
- Séparer deux produits incompatibles devant se trouver dans un même mélange. De cette façon, on peut faire coexister deux produits réactifs.

II.3. Nature des matériaux enrobant

Les polymères formant le matériau enrobant peuvent être dôorigine naturelle (gélatine, chitosane, alginate de sodium, agaroseé), hémi-synthétiques (dérivés de la celluloseé) ou synthétique comme les copolymères des acides lactique et glycolique couramment utilisés [68,69]. Selon le domaine dôapplication des microparticules, des propriétés de biocompatibilité et/ou de biodégradabilité seront requises. Les lipides (acides gras, alcools gras, glycérides, cholestérolé) seront plutôt utilisés sous forme solide, de même que les cires naturelles ou minérales. Dôautres matériaux tels que des stabilisants (tensioactifs, dispersants, anti-mottantsé) ou des cryo-protecteurs peuvent être ajoutés à la formulation des microparticules. Lôensemble des composés va intervenir dans le profil de libération de la matière active.

II.4. Modes d'action des microparticules

Les microparticules contiennent de manière très variable entre 1 et 90% en masse de matière active. Les taux dôencapsulation déterminés par chromatographie (HPLC) sont généralement plus élevés au sein des réservoirs formés par les microcapsules. Différents facteurs physico-chimiques tels que la charge électrique de surface, la mouillabilité, la porosité et le degré de gonflement des microparticules, ainsi que les polymères utilisés (caractérisés par analyse calorimétrique différentielle ou chromatographie dôexclusion stérique) peuvent influencer la libération du principe actif encapsulé. Lôétat physique de ce dernier est également un facteur à connaître. En effet, une dispersion moléculaire de matière active encapsulée ne se libérera pas de la même manière que des cristaux et nôaura pas non plus la même stabilité au sein du système.

Certaines particules fabriquées pour lôencapsulation de cellules, dôenzymes ou de bactéries sont destinées à garder leur contenu. Dôautres doivent le libérer de manière brutale comme dans le domaine des autocopiants en papeterie. Dans ce cas, la membrane doit être étanche et la libération se fera par éclatement ou fusion de la particule sous les effets respectifs de la pression ou de la température. Lorsque la libération de la matière active doit être prolongée, deux mécanismes principaux existent et peuvent cohabiter : diffusion passive et dégradation ou dissolution du matériau enrobant. Les cinétiques de libération obtenues par diffusion passive pour des microcapsules suivent logiquement les lois de Fick et sont généralement dôordre 0 ou 1. Dans ce dernier cas, la vitesse initiale de libération peut être soit accélérée, si beaucoup de matière active se trouve à la surface de la particule, soit retardée si au contraire, un temps minimum est nécessaire pour que la matière active imprègne la membrane de la microcapsule, étape indispensable à sa libération dans le milieu extérieur [70].

II.5. Mécanisme de libération

Il existe trois mécanismes primaires par lesquels les principes actifs peuvent être libérés d'un système de libération : diffusion, gonflement suivi d'une diffusion et dûne dégradation.

II.5.1. La libération par diffusion

La diffusion se produit quand un principe actif traverse le polymère qui forme le système de libération. La diffusion peut produire à l'échelle macroscopique à travers les pores dans la matrice ou à l'échelle moléculaire par le passage entre les chaines de polymères. Les exemples de systèmes de libération par diffusion sont montrés dans la figure II.2. Un polymère et un principe actif ont été mélangés pour former un système homogène, également désigné sous le nom d'un système de matrice. La diffusion se produit quand le principe actif passe de la matrice de polymère dans l'environnement externe. Comme le dégagement est continu, le taux diminue avec ce type de système puisque le principe actif a progressivement une distance plus longue à traverser et c'est pourquoi il a besoin d'un temps de diffusion plus long pour être libéré [71]. La diffusion se produit quand le principe actif passe de la matrice de polymère dans lôenvironnement externe.

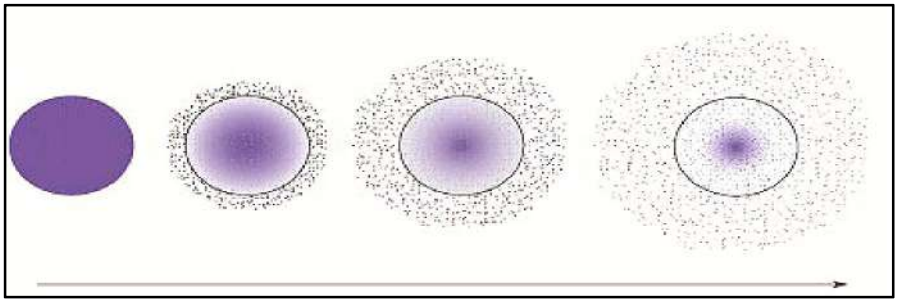


Figure II.2. Libération par diffusion [71]

II.5.2. Libération par gonflement suivi d'une diffusion

Il est également possible quûn système de libération soit conçu de sorte qu'il soit incapable de libérer son agent jusqu'à ce qu'il soit placé dans un environnement biologique approprié.

Les systèmes de libération contrôlée par gonflement sont initialement secs et quand ils sont placés dans le corps, ils absorberont l'eau ou autre fluides du corps et gonfleront. Ces systèmes permettent la diffusion du principe actif à travers le réseau gonflé dans l'environnement externe. Les exemples de ces systèmes sont montrés sur la figure II.3 pour les systèmes réservoir et matriciel respectivement. La plupart des matières utilisées pour ces systèmes sont les hydrogels qui absorbent de l'eau ou autres fluides sans être dissous [71].

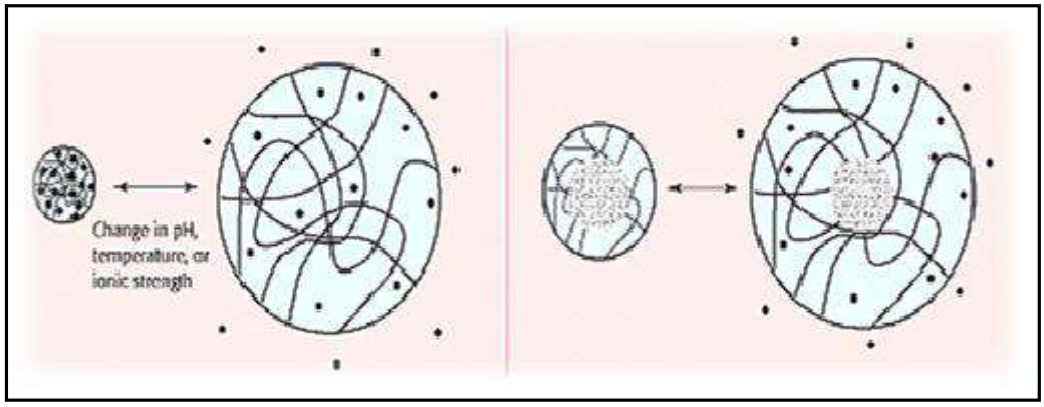


Figure II.3. Libération par gonflement suivi dûne diffusion [71]

II.5.3. 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 cas les produits de la dégradation entrent dans un processus métabolique [71].

La dégradation peut s'effectuer selon une hydrolyse en masse (la dégradation est uniforme dans toute la matrice polymère). Pour quelques polymères dégradables, notamment les polyanhydrides et les polyorthoesters, la dégradation se produit uniquement sur la surface des polymères, ayant pour résultat un taux de rejet proportionnel à la surface du système de la libération de principe actif.

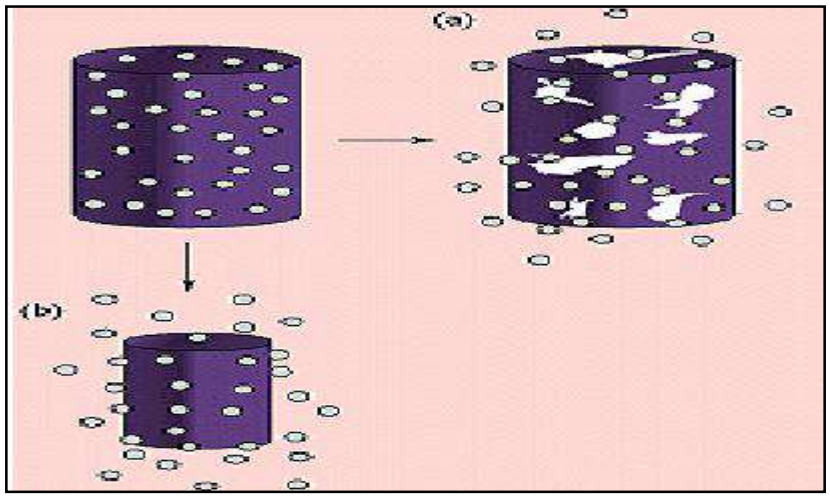


Figure II.4. Libération par dégradation [71]

II.6. Procédés de micro-encapsulation

Il existe de nombreuses méthodes [72] 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.

Les procédés de micro-encapsulation sont variés, et il est nécessaire de les classer pour faire un choix approprié lorsque l'on doit résoudre un problème de formulation dans ce domaine. Trois principaux types de procédés peuvent être distingués:

- Procédés physico-chimiques,
- Procédés mécaniques,
- Procédés chimiques.

II.6.1 Procédés physico-chimiques

Ils sont basés sur la maîtrise des variations de solubilité et de conditions de précipitation des agents enrobants. Il s'agit par exemple de la précipitation contrôlée d'un non solvant ou d'un polymère incompatible (coacervation simple), ou encore par variation de température et le pH de la solution (coacervation complexe). Ils peuvent être basés sur des changements d'état (fusion et solidification) des agents enrobants (gélification thermique d'émulsions).

II.6.1.1 Micro encapsulation en milieu dispersant liquide

- **Micro encapsulation par la coacervation simple**

Le procédé de coacervation consiste à abaisser la solubilité dôun polymère (coacervation simple) initialement solubilisé dans un solvant organique ou en milieu aqueux, en variant la température ou par ajout dôun électrolyte, dôun non-solvant ou dôun deuxième polymère (agent de coacervation) [72,73].

Il se formera deux phases liquides : lôune riche en polymère appelée coacervat et lôautre pauvre en polymère. Mais, lôencapsulation dôun principe actif ne sôopérera que dans des conditions strictes de coacervation pouvant être déterminées en établissant un diagramme ternaire. Sur ce diagramme faisant apparaître le solvant, le polymère et lôagent de coacervation, seule une surface déterminée appelée fenêtre de stabilité matérialise lôobtention de gouttelettes de coacervat suffisamment stables pour permettre lôencapsulation dôun principe actif. Dans les bonnes conditions dôencapsulation gouvernées par des tensions interfaciales optimales entre les différentes phases en présence, un principe actif dispersé dans la solution initiale de polymère se retrouvera au sein des gouttelettes de coacervat (Figure II.5)

De nombreux paramètres influencent la stabilité de ces gouttelettes qui ont tendance à être très collantes (type de polymère, concentration, vitesse dôagitation du système, vitesse dôajout et viscosité de lôagent de coacervation é). Ces dernières une fois obtenues sont durcies ou réticulées par un agent de solidification et les microparticules (sphères ou capsules) sont lavées,

filtrées ou centrifugées puis séchées. Ce procédé permet lôencapsulation de molécules hydrophiles et lipophiles.

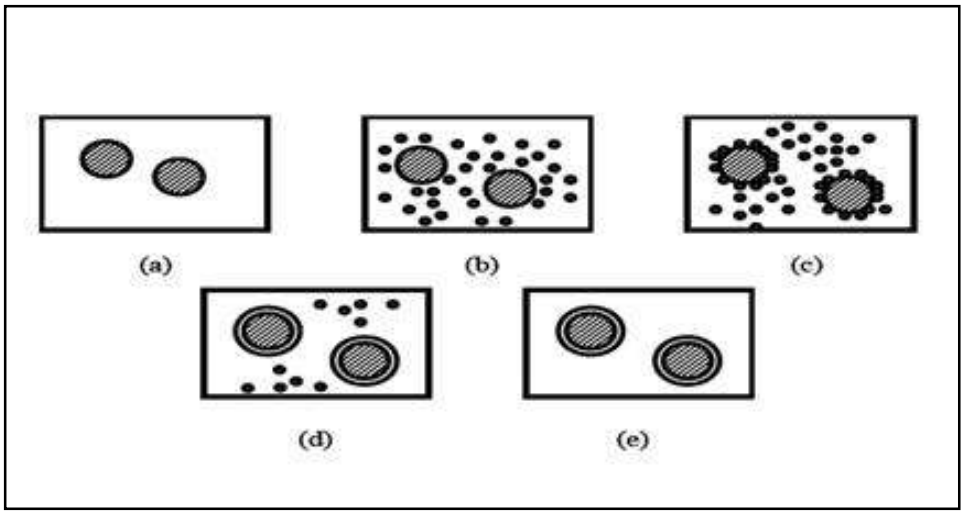


Figure II.5. Principe de la coacervation simple : dispersion du principe actif dans la solution de polymère (a), formation des gouttelettes de coacervat (b), dépôt du coacervat (c), fusion des gouttelettes de coacervat et formation dôun enrobage continu (d), solidification de lôenveloppe(e) [72,73].

- **Micro encapsulation par la coacervation complexe**

La coacervation est dite complexe lorsque la désolvatation simultanée de deux polymères de type polyélectrolytes hydrosolubles de charge opposée, est provoquée, suite à une modification du pH du milieu réactionnel et à lôattraction électrostatique induite des deux polymères. La macromolécule chargée positivement est le plus souvent la gélatine de type A qui ne se dissout dans lôeau quôà partir de 50°C et la molécule chargée négativement, un polysaccharide acide. Une fois le coacervat formé et déposé autour du principe actif lipophile (huiles végétales, minérales ou essentiellesé), la température est abaissée à 5°C afin dôobtenir une gélification de lôenrobage. La réticulation des microcapsules obtenues se fait par ajout de glutaraldéhyde ou dôacide tannique, ce qui permet de solidifier les particules [74].

II.6.1.2. Emulsion et évaporation-extraction de solvant

Ce procédé est basé sur lôévaporation de la phase interne dôune émulsion donnant lieu à la précipitation du polymère dôenrobage préalablement dissous dans cette phase, sous forme de microsphères. Les polymères généralement hydrophobes sont tout dôabord dissous dans un solvant organique peu miscible avec lôeau comme le dichlorométhane. Puis, le principe actif est dissous ou dispersé dans la solution de polymère. Le mélange est émulsifié dans un grand volume dôeau contenant des tensioactifs tels que lôalcool polyvinylique, afin dôobtenir une

émulsion huile-dans-eau. Lôévaporation du solvant après diffusion progressive dans la phase continue est réalisée sous pression atmosphérique ou pression réduite et sous agitation lente [75].

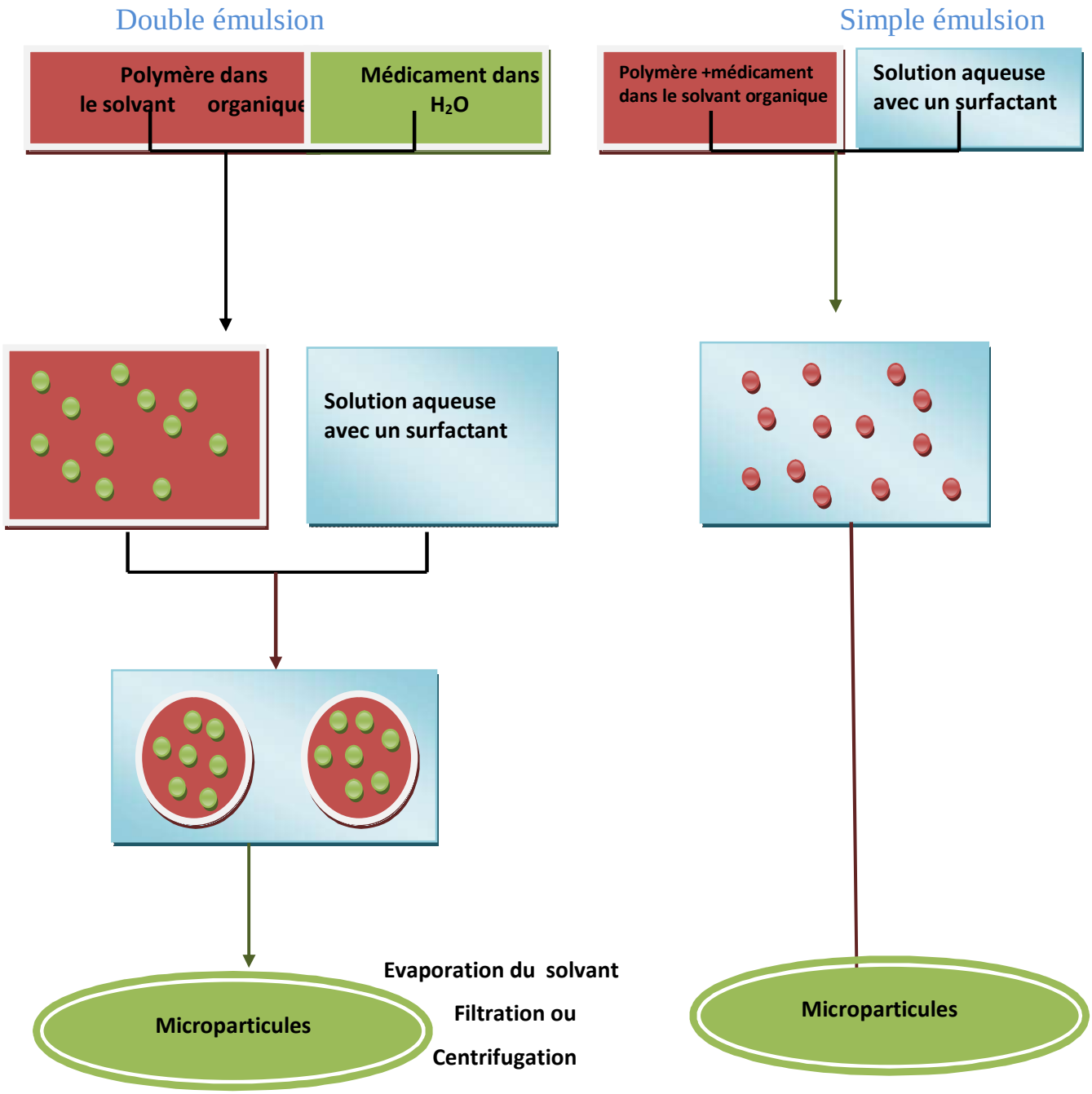


Figure II.6. Représentation simplifié du la micro encapsulation par émulsion et évaporation-extraction de solvant

Cette technique est à déconseiller si le principe actif est volatil ou possède une grande affinité pour la phase continue aqueuse. Lôextraction consiste, elle, à transférer lôémulsion dans un grand volume dôeau contenant ou non des surfactifs et permettant la diffusion rapide du

solvant. Après élimination du solvant, les particules sont lavées, collectées par filtration ou centrifugation puis séchées ou lyophilisées.

II.6.1.3. Micro-encapsulation par gélification de gouttes

- **Gélification thermique (hot melt)**

Le principe du premier procédé consiste à dissoudre ou disperser la matière active à encapsuler dans le matériau dœenrobage en fusion puis à émulsionner lœensemble dans une phase dispersante à une température supérieure à la température de fusion du matériau enrobant. On utilise en général, pour le matériau dœenrobage, des lipides de bas point de fusion (cire de Carnauba, alcool cétyliqueé). Le milieu est ensuite refroidi brutalement afin de solidifier les particules obtenues. Ce procédé permet la micro encapsulation de molécules hydrophiles et lipophiles si lœon choisit une phase dispersante pour laquelle ces molécules ont peu dœaffinité (huile de silicone et eau respectivement) [76].

II.6.2. Procédés chimiques

II.6.2.1. Polycondensation interfaciale

Ce procédé qui appartient aux procédés chimiques dœencapsulation consiste à faire réagir deux monomères, lœun dans la phase dispersée, lœautre dans la phase dispersante, afin dœobtenir une membrane de polymère à la surface des gouttelettes formées. Dans le cas dœun principe actif lipophile, la première étape consiste à préparer une solution contenant cette molécule et un premier monomère dans un solvant organique puis de former une émulsion de cette phase organique dans une phase aqueuse contenant un tensioactif. On ajoute ensuite dans cette phase aqueuse, le second monomère hydrosoluble afin dœinduire la réaction des deux monomères à lœinterface huile/eau où ils auront diffusés. Pour un principe actif hydrophile, on forme une émulsion inverse (eau/huile) dans un solvant de température dœébullition élevée, à partir dœune solution aqueuse contenant le principe actif et le monomère hydrosoluble. Puis le monomère organo-soluble est ajouté dans la phase dispersante.

La taille des microsphères obtenues est comprise entre 0,5 et 100 µm et dépend principalement de lœagitation du système, de la vitesse dœajout des deux monomères et de la cinétique de diffusion [77].

II.6.2.2. Polymérisation en milieu dispersé

Ces procédés permettent la formation de microparticules à partir de monomères synthétiques du type acrylique, vinylique ou cyanoacrylate dœalkyle. Ils mettent en jeu une phase de formation

des particules appelée nucléation suivie d'une phase de croissance donnant lieu à des particules de type matriciel. Deux mécanismes principaux sont à distinguer: la polymérisation en émulsion et la polymérisation en dispersion. Dans le premier cas, une émulsion des monomères en phase aqueuse est réalisée avant la polymérisation, le principe actif étant préalablement solubilisé ou dispersé dans les monomères. La réaction de polymérisation radicalaire ou anionique selon les monomères utilisés s'initie respectivement par l'ajout d'un amorceur ou par simple contact avec la phase aqueuse.

Dans le cas de la polymérisation en dispersion, la nucléation se fait en phase homogène, les monomères et la matière active étant initialement solubilisés dans la phase continue. La croissance des oligomères suite à la polymérisation amorcée par un initiateur, donne lieu à leur précipitation sous forme d'agrégats stabilisés par les tensioactifs présents dans la phase continue. Cette technique conduit à des particules de diamètre nettement supérieur à celui des particules obtenues par polymérisation en émulsion (respectivement 1 à 15 µm et 100 nm à 5µm) [78].

II.6.2.3 Extrusion

Le procédé de l'extrusion consiste à extruder au travers d'une aiguille de seringue ou d'une buse, une solution aqueuse de polymère dans laquelle la matière active est dissoute dispersée ou émulsionnée. Les gouttelettes formées sont réceptionnées dans une phase liquide dispersante pour se transformer, après réaction chimique, en particules de gel sphériques.

C'est le cas par exemple lorsque l'on utilise de l'alginate de sodium avec une phase dispersante de chlorure de calcium ou du chitosane et une solution réceptrice alcaline [78].

II.7. Propriétés d'encapsulation des microparticules

En fonction de l'application visée, les microparticules sont conçues pour libérer l'espèce, soit de manière déclenchée, soit de manière continue. Les systèmes à libération déclenchée sont généralement des microcapsules formées d'une membrane de faible perméabilité, qui vont libérer brutalement leur contenu par éclatement de cette membrane. La rupture est alors déclenchée, soit par une pression (mécanique ou osmotique), une variation de température, une variation de pH ou encore la dégradation enzymatique de la membrane. Les systèmes à libération continue sont majoritairement des microsphères. Les mécanismes mis en jeu sont, soit la diffusion de l'espèce à travers la matrice, soit la dégradation (érosion) ou dissolution de la matrice ou encore un couplage des deux mécanismes [79].

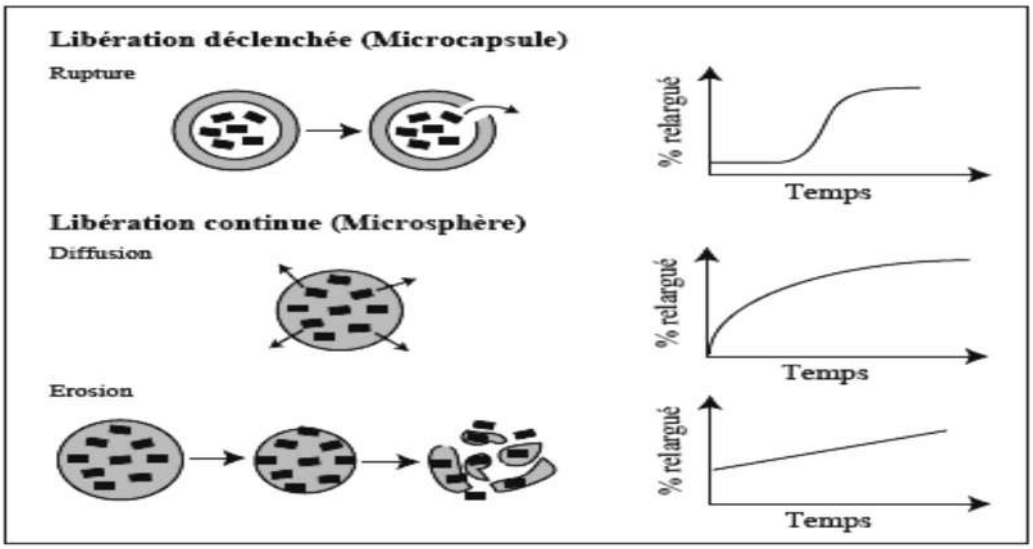


Figure II.7. Représentation schématique des différents modes de relargage des microparticules [79]

Les profils de la Figure II.7 donnent une allure générale des différents modes de relargage des microparticules [80]. Cependant, les cinétiques de libération de lœspèce encapsulée sont avant tout déterminées par les caractéristiques physicochimiques du système.

Ces caractéristiques physicochimiques sont fonction du type de polymère ou de lipide utilisé mais aussi du processus de fabrication. Plus de 200 types de formulations sont actuellement citées dans la littérature et chacune dœlles influencent lœarrangement de la microparticule mais aussi son taux dœencapsulation [81]. Défini comme le rapport entre la masse de matière active sur la masse totale de la microparticule, le taux dœencapsulation peut être élevé dans les microcapsules de lœordre de 85 à 90%. Dans le cas des microsphères, il reste relativement faible de lœordre de 20 à 35%.

Le lien établi, entre la particule et la molécule active, influence aussi sa cinétique de libération. La molécule active peut être insérée dans le système au cours du processus de fabrication ou après formation de la particule. Dans le premier cas, un couplage covalent entre la molécule et le polymère peut sœétablir. La molécule peut se trouver sous forme de solution solide ou dispersée au sein de la matrice. Dans le deuxième cas, après fabrication de la particule, la molécule active est adsorbée à sa surface. Elle peut alors rester à la surface ou diffuser vers la matrice et former une solution solide [80].

Les principaux paramètres qui gouvernent les propriétés dœencapsulation de ces systèmes sont :

- les paramètres externes tels que la température, le pH [81], la présence dœenzyme dans le milieu continu et lœhumidité,

- les paramètres intrinsèques à la phase interne tells que la solubilité de lôespèce, sa température dôébullition et de fusion,

- les paramètres intrinsèques à la matrice ou à la membrane tells que la taille de la particule [82] lôépaisseur de la membrane, la structure chimique du polymère, sa masse moléculairesa cristallinité et sa porosité.

Parmi les nombreux paramètres qui influencent les cinétiques de libération de microparticules, nous souhaitons décrire plus particulièrement lôinfluence de la porosité et des fractures de la matrice [83].

II.8. L'α-AMYLASE

LôŬ- amylase est une enzyme ubiquitaire, synthétisée dans tous les genres de la vie [84]. Elle appartient à la famille des glycosides hydrolases nommée GH13, regroupant maintenant plus de 1700 enzymes [85], contenant également les cyclodextrines glucanotransferases et les pullulanases [86]. Chez les mammifères, l'Ŭ -amylase est présente principalement dans les sécrétions salivaires et pancréatiques. Celle dôorigine microbienne (bactéries, moisissures et levures) est exocellulaire, exceptées certaines espèces comme *Bacillus subtilis* et *Pishia burtonii* [87,88]. L'Ŭ-amylase dôorigine végétale, animale ou microbienne, agit sur les polysaccharides (amidon, glycogène) et les oligosaccharides. Elle hydrolyse les liaisons glucosidiques (Ŭ-1,4) de lôamidon et des substrats relatifs [89].

Elle est définie par [90] :

* Nom codifié : EC 3.2.1.1

* Nom commun : Ŭ-amylase

* D'autres nom (s): glycogénase, Ŭ-amylase; endoamylase; Taka-amylase A, maxilase..

* Nom systématique: 1,4 ï alpha -D-glucane,4 glucano hydrolase

III.1. Introduction

La partie expérimentale a été réalisée au niveau du hall technologique de lôuniversité de Médéa au sein du laboratoire dôanalyse physico-chimique et le laboratoire thermodynamique, ainsi quôau niveau du laboratoire de recherche (LPT2R).

Certains essais ont été complétés au niveau de lôinstitut national spécialisé de la formation professionnelle (INSFP de Médéa) au sein des laboratoires de lôEnvironnement et contrôle de qualité.

Dans le contexte où s'inscrit notre travail, nous avons tenté d'atteindre l'objectif, qui consiste à appliquer le procédé de gélification d'un biopolymère modifié « CMKC » pour former des microsphères comportant un principe actif "lôenzyme alpha-amylase".

III.2. Carboxyméthylation du kappa-carraghénane

La modification chimique des polysaccharides est considérée comme une voie importante pour améliorer les propriétés du kappa-carraghénane (KC). Il faut noter que les tendances et les stratégies récentes de recherche sont orientées vers la fonctionnalisation de biopolymères pour obtenir des matériaux dotés de nouvelles fonctions. Dans ce sens, la carboxyméthylation est une méthode largement utilisée pour modifier le KC pour obtenir le CMKC. Ce dernier est caractérisé par :

- Détermination du degré de substitution,
- analyse infrarouge à transformée de Fourrier (FTIR),
- mesure de la Viscosité,
- étude de lôactivité antibactérienne,
- étude de la capacité dôadsorption et de rétention dôhumidité.

III.2.1. Matériel et réactifs

- **Matériel**

- Verrerie ;
- Agitateur magnétique avec une plaque chauffante (Pregetiazione Construzione Roma),
- Dispositif de filtration sous vide,
- Thermomètre (0 à 100^0C),
- Etuve (Mommet T°max =70°c),
- Mortier en porcelaine,
- Balance électronique (Ohaus).

- **Réactifs**

- Eau distillée,
- ə-Carraghenane (poudre),
- Acide monochloracétique,
- Propanol-2,
- Solution de NaOH (16N),
- Ethanol pur.

III.2.2. Mode opératoire

On a procédé selon les étapes suivantes pour la réalisation des expériences [91] :

1. Peser 05gr de ə-carraghénane (KC) et suspendre dans 100ml de propanol-2 à lôaide dôun agitateur magnétique pendant 30 minutes à température ambiante.

2. Prélever 05 ml dôune solution de NaOH à 16 N quôon ajoute au mélange précédent à raison de 01ml chaque 15 min sous agitation magnétique et à température ambiante.

3. Peser la masse correspondant dôacide monochloracétique et lôajouter au mélange réactionnel sous agitation magnétique pendant 20 min.

4. La quantité dôacide monochloroacétique est varié pour les cinq lots de KC modifiés de tel sorte à avoir un rapport molaire entre lôacide monochloroacétique et le KC (n_{MCA}/n_{KC}) variant de 1, 1.5, 2, 2.5 et 3.

5. Puis, le mélange réactionnel est chauffé à une température de 50°C pendant 04heures.

6. Après quatre heures de réaction à 50°C, le CMKC est obtenu sous forme de suspension dans le milieu réactionnel.

7. On extrait le CMKC par filtration sous vide et le résidu est lavé 03 fois avec un mélange de solvant (éthanol/eau à 80% (50ml) et puis avec de lôéthanol pur (50ml) par alternance).

8. Le CMKC est séché à 70°C pendant 24heures et pulvérisé dans un mortier.

9. Cinq lots ont été préparés et le calcul du rendement est calculé.

La modification de ə-carraghénane par carboxyméthylation est réalisée selon le schéma réactionnel décrit par la figure III.1.

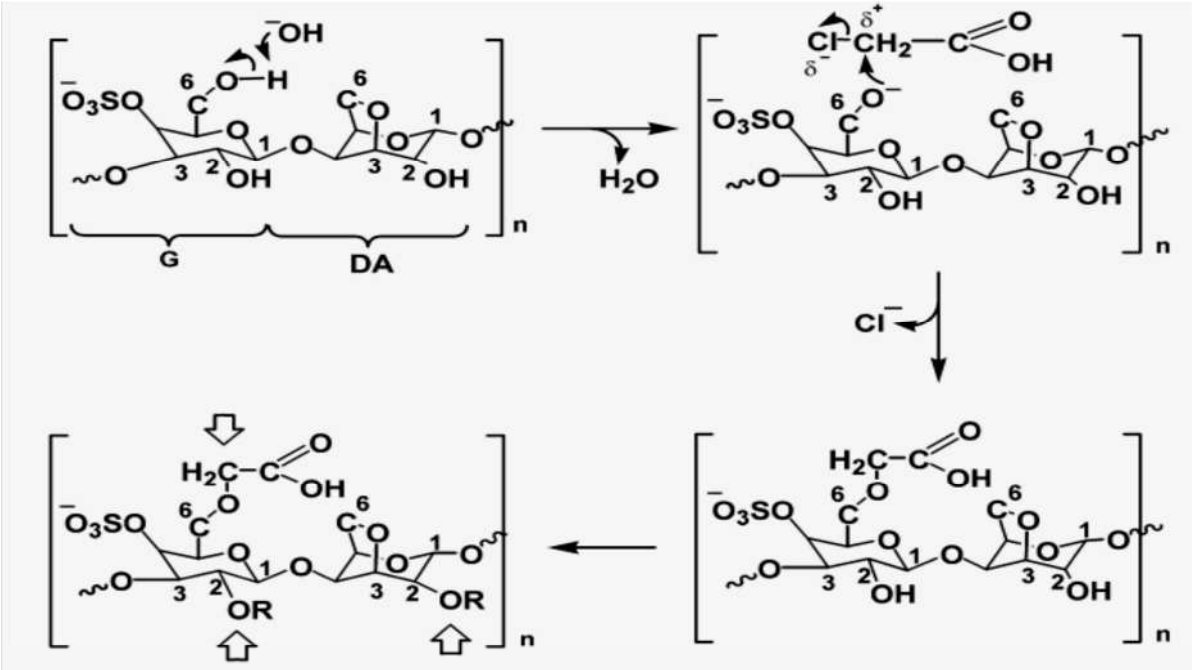


Figure III.1. Réaction de modification de ə-carraghénane par carboxyméthylation **[91]**
DA est le 3,6-anhydro-Ŭ-D-galactopyranose, G est ɓ-D-galactopyranose-4-sulfate. Nombres 1-6 montrent les numérotations de carbone. R = H ou CH_2 COOH, n = nombre d'unités répétitives; flèche : positions possibles pour carboxyméthylation.

III.3. Résultats et discussion

III.3.1. Calcul du rendement

Le rendement est calculé par rapport à la quantité de KC utilisé initialement pour la réaction de carboxymethylation. Cinq lots ont été préparés. Les résultats sont représentés dans le Tableau III.1 ainsi que dans la figure III.2.

Tableau III.1. Rendement de différents échantillons de KC

Lot N°	Masse initiale de KC (g)	Masse finale de CMKC (g)	Rendement (%)
01	5	3.63	72.6
02	5	2.99	59.8
03	5	3.82	76.4
04	5	2.66	53.2
05	5	3.08	61.6
Rendement Moyen			**64.72**

Le rendement de la carboxyméthylation de KC pour les 5 échantillons de KC est de lôordre de 53.2 à 76.4%. Lôéchantillon 3 possède le rendement le plus élève qui est de lôordre de 76.4%. Pour les autres échantillons, le rendement diminue à cause de la perte en poids au cours des différentes étapes de la carboxyméthylation surtout lôétape de la filtration (le produit traverse les mailles de filtre).

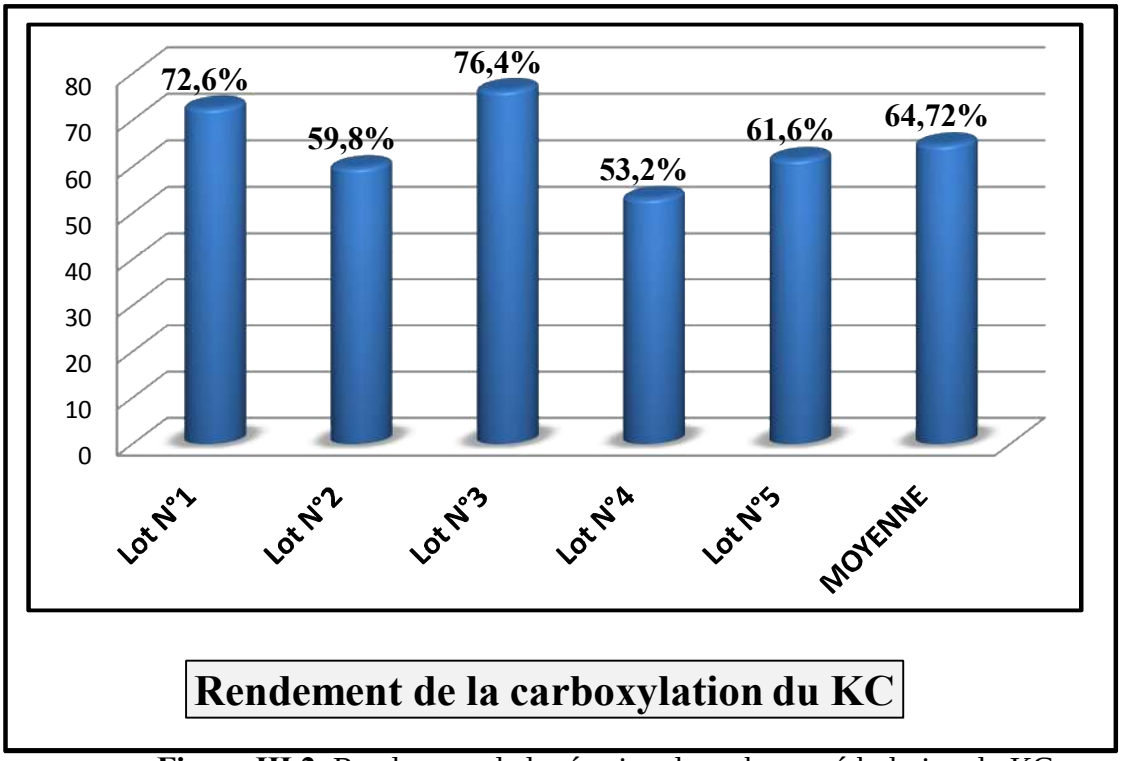


Figure III.2. Rendement de la réaction de carboxyméthylation du KC

III.3.2. Identification par FTIR

Pour cette analyse, on a utilisé un spectrophotomètre infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) 8400 Type Shimadzu (Japon). La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier ou FTIR (Fourier Transformed InfraRed spectroscopy) est basée sur l'absorption d'un rayonnement infrarouge par le matériau analysé. Elle permet lôanalyse des échantillons en phase solide, liquide ou gazeuse. La technique dôanalyse est basée sur un interféromètre de Michelson.

Lorsque la longueur d'onde apportée par un faisceau lumineux est voisine de l'énergie de vibration de la molécule, cette dernière va absorber le rayonnement et l'intensité de lumière réfléchie ou transmise diminuera. Le domaine infrarouge entre 4000 cm^{-1} et 400 cm^{-1} (2.5 ï 25 µm, 1.2 x 10^{13} à 1.2x10^{14} Hz) correspond au domaine d'énergie de vibration des molécules [92].

Lôanalyse est réalisée sur un échantillon de KC et deux échantillons de CMKC. Les résultats obtenus après analyse spectroscopique sont représentés dans les figures III.3, III.4 et III.5.

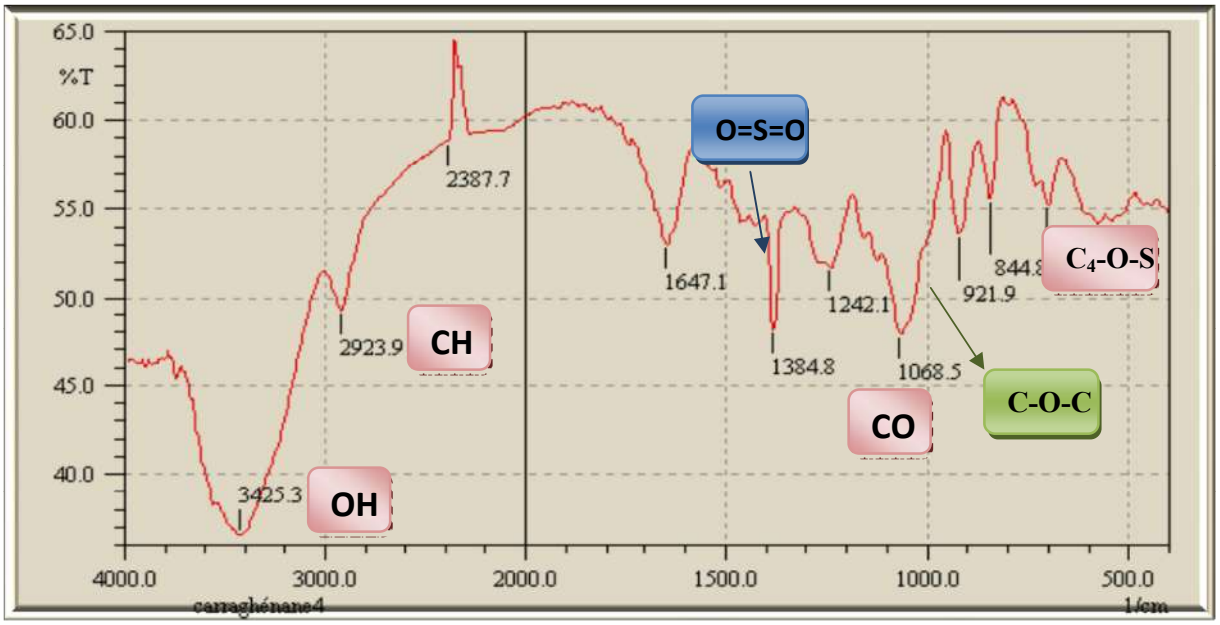


Figure III.3. Spectre FTIR de ə-Carraghenane

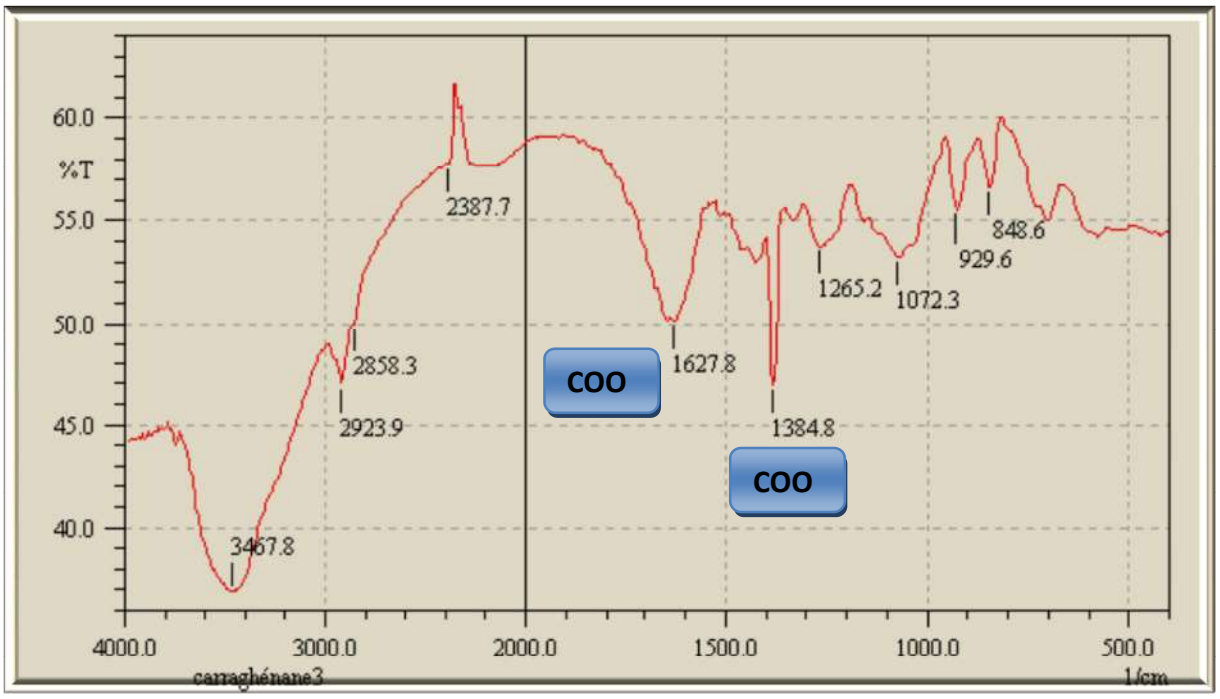


Figure III.4. Spectre FTIR de -ə-Carraghenane carboxyméthylé

Lôanalyse de la figure III.3 nous renseigne sur les caractéristiques de base de la molécule de KC.

* Les bandes 1260 cm^{-1} sont affectées à la vibration systématique la fonction « O=S= O », et les bandes 850 cm^{-1} sont affectées à lô élongation de la fonction « C_4-O-S ». Ces deux fonctions chimiques : SO_4 et C_4-O-S représentent la ß-D galactose respectivement.

* Les bandes 930 cm^{-1} prouvent lôexistence de « C-O-C » de 3,6 anhydro-D galactose.

* Il y a également affichage des bandes dôabsorbance à 1159cm^{-1} due à lô élongation des ponts « -O » et des bandes autour de 1070cm^{-1} , 2933 cm^{-1} et 3411cm^{-1} qui sont été liées à lô élongation des groupements « C-O ; CH ;OH » respectivement.

Lôanalyse du spectre FTIR de CMKC (Figure III.4) montre que lôintensité de chaque bande dôabsorption courante pour la quantité de groupes fonctionnels a considérablement changée. En comparant les spectres des trois figures, on constate que :

* Lôintensité du pic autour de 1325cm^{-1} du spectre FTIR du CMKC augmente dôune façon considérable ce qui prouve que la quantité dô élongation de groupement « C-O » du galactose augmente.

* La bande typique dôabsorption autour de 1624 cm^{-1} correspond à la vibration asymétrique de « -COO » et autour de 1424 cm^{-1} correspond au vibration symétrique de « -COO ». ce qui confirme lôintroduction des groupements carboxymethyl dans la structure du KC.

III.3.3. Degré de substitution (DS)

Le degré de substitution (DS), qui est le nombre moyen de groupes fonctionnels introduits dans le polymère, détermine principalement les propriétés des dérivés polysaccharides y compris les produits carboxyméthylés. La détermination exacte du DS et le modèle de fonctionnalisation sont des conditions préalables à l'optimisation des conditions de la réaction.

Les méthodes classiques pour déterminer le DS de polysaccharide sont très similaires. Elles utilisent l'acidité du groupe carboxyméthyle, cô est à dire la conversion de la forme sel à la forme d'acide libre [93].

La forme acide des carboxyméthyl polysaccharides, susceptible d'être obtenu par un traitement de la forme sel de sodium du polymère dispersé dans de l'éthanol avec du chlorure d'hydrogène concentrée, peut être titré avec une solution d'hydroxyde de sodium de molarité connue [94].

Le DS est calculé par la formule suivante [95] :

$$DS = \frac{162.A}{10000 - 80.A} \quad \text{(III.1)}$$

$$A = \frac{(V_2 - V_1) \cdot C_{NaOH} \cdot 100}{m_{CMKC}} \quad \text{(III.2)}$$

Avec: $\mathbf{V_2}$**:** volume de NaOH consommé par le titrage du blanc (V_2=47.5ml).

$\mathbf{V_1}$**:** volume de NaOH consommé par le titrage des échantillons.

$\mathbf{C_{NaOH}}$**:** concentration de NaOH ($\mathbf{C_{NaOH}}$=0.1mol/l).

$\mathbf{m_{CMKC}}$**:** masse de carboxyméthyl kappa-carraghénane (m_{CMKC}=0.2g).

Les résultats des mesures pour chaque échantillon sont rassemblés dans le Tableau III.2.

Tableau III.2. Présentation des résultats de DS pour KC et CMKC

N° Lot	Lot N°1	Lot N°2	Lot N°3	Lot N°4	Lot N°5	Lot KC
n_{MCA}/ n_{KC}	1	1.5	2	2.5	3	-
m_{MCA} (g)	1.23	1.84	2.45	3.10	3.70	-
V_{NaOH} (ml)	44	44.5	45	44.75	44.7	43
A	0.5	0.75	1	1.38	0.85	0.0
DS	0.2	0.307	0.418	0.6	0.351	0.0

On remarque dôaprès les résultats présentés que la valeur du degré de substitution (DS) de ə-Carraghénane est nul, alors que pour le CMKC elle prend différentes valeurs pour les cinq lots obtenus. On peut conclure que le ə-Carraghénane ne possède pas de groupements acides mais le CMKC possède cette fonction carboxylique.

Les résultats du Tableau III.2 sont représentés sur la figure III.6. On remarque que le DS est de 0.2 quand le rapport n_{MCA}/n_{KC} est égal à 1.0, puis le DS augmente pour atteindre 0.307. Pour n_{MCA}/n_{KC} est égal à 1.5 et il est de lôordre de 0.418 pour n_{MCA}/n_{KC} égal à 2.0. Il atteint un maximum de 0.6 pour un rapport de n_{MCA}/n_{KC} égal à 2.5. Quand le rapport n_{MCA}/n_{KC} atteint 3.0, le degré de substitution diminue pour atteindre 0.351. Cela peut être expliqué par le fait que le DS est fortement influencée par le rapport n_{MCA}/n_{KC} et par conséquent par la quantité dôacide monochloacétique introduit dans le milieu réactionnel, étant donné que les autres paramètres de la réaction de carboxymethylation sont constants pour les cinq lots de KC modifiés. Comme le montre la figure III.6, le DS augmente avec lôaugmentation du rapport n_{MCA}/n_{KC}, induisant ainsi la

formation de CMKC qui augmente jusqu'à atteindre un rapport de n_{MCA}/n_{KC} égal à 2.5. A des valeurs de n_{MCA}/n_{KC} supérieure (> 2.5), le DS diminue.

Cela peut être expliqué par le fait que pendant le processus de carboxymethylation, la quantité de NaOH utilisé sert à lôalcalinié du milieu mais aussi comme agent de gonflement facilitant la diffusion et la pénétration de lôacide monochloacétique dans la particule de KC. Quand le rapport n_{MCA}/n_{KC} dépasse la quantité de NaOH du milieu qui reste inchangé pendant toutes les réactions de modification, le degré de substitution diminue. Donc, plus la quantité de lôacide monochloroacétique augmente, moins la quantité de NaOH réagira avec le KC, cela veut dire que un rapport n_{MCA}/n_{KC} trop important (>2.5) conduit à un faible DS.

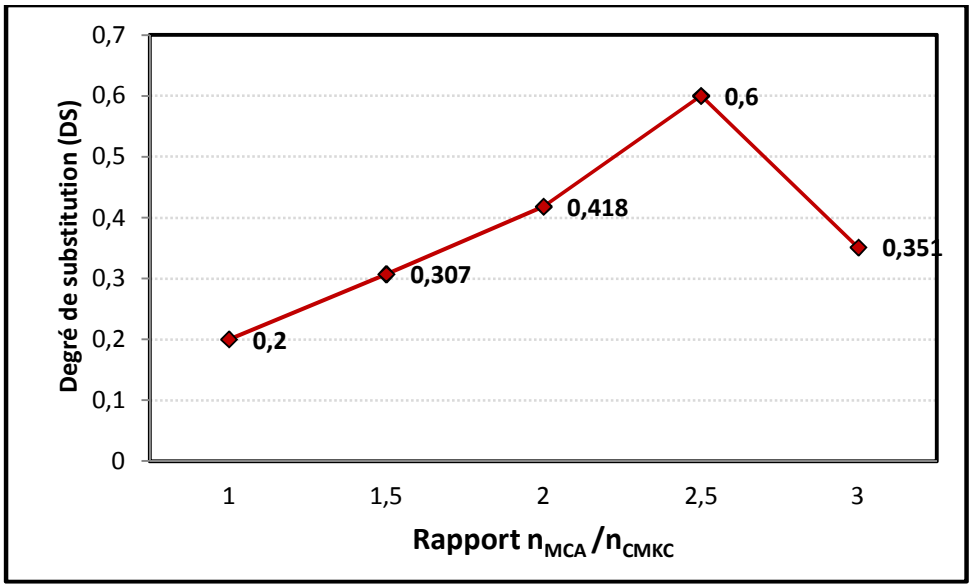
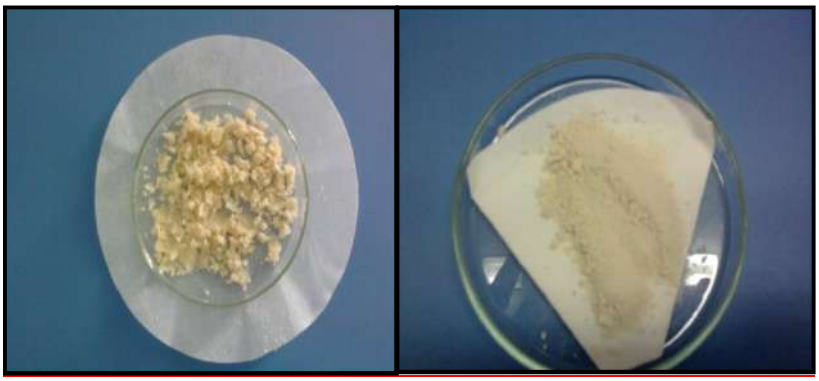


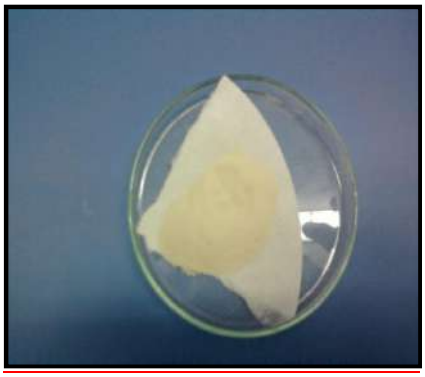
Figure III.5. Degré de substitution du CMKC en fonction du rapport n_{MCA}/n_{KC}

III.3.4. Aspect organoleptique de la poudre CMKC

Après pulvérisation, on obtient une poudre de couleur jaunâtre, sans odeur caractéristique avec un aspect semi cristallin comme le montre la figure III.6.



A B



C

Figure III.6. Aspect du biopolymere modifié (CMKC)

A :avant sechage ;**B** :avant pulvérisation ;**C** : après pulvérisation.

III.3.5. Caractérisation de la poudre de CMKC

III.3.5.1. Densité vrac

Pour évaluer la densité vrac des biopolymères avant et après modification, les biopolymères (KC, CMKC) sont séchés jusqu'à poids constants, puis transférés dans une éprouvette graduée de 10ml préalablement pesée (W_1), jusquôau trait de jauge puis lôéprouvette avec la poudre est pesé (W_2). La densité vrac (d_0) des biopolymères est calculée selon lôéquation (III.3) **[96]**.

$$d_0 = \frac{W_2 - W_1}{V} \qquad \text{(III.3)}$$

III.3.2. Densité réelle

Pour évaluer la densité réelle, on pèse 0.35g de chacun du KC et du CMKC, séchés jusqu'à poids constant (W_0), puis placé dans une éprouvette graduée de 10ml de poids connu à 20°C. On ajoute à chaque biopolymére 8ml de cyclohexane, et le mélange est conservé r à 20°C pendant 24h. Par la suite lôéprouvette est repesée (W). Les densités réelles du KC et CMKC sont calculées selon lôéquation (III.4) **[96]**.

$$\rho = \frac{\rho_s}{\rho_s(W - W_0)/\rho_s W_0} \qquad \text{(III.4)}$$

Où W est le poids total du polymère et le solvant, W_0 est le poids du polymère seul, et ρ_s est la densité du solvant ($\rho_s = 0.778 g/cm^3$).

Les résultats sont représentés dans le Tableau III.3.

Tableau III.3. Résultats de mesure de densité en vrac et densité réelle

Produits	KC	$CMKC_1$	$CMKC_2$	$CMKC_3$	$CMKC_4$	$CMKC_5$
Densité Vrac	0.57	0.59	0.62	0.68	0.73	0.59
Densité réelle	1.02	0.89	0.73	0.70	0.67	0.69
pH (Sol à 1%)	9.30	8.26	8.09	7.94	7,20	8.11
DS	0	0.2	0.307	0.418	0.6	0.351

Dôaprès les résultats obtenus et montionnés dans le tableau III.3, on remarque que la densité vrac augmente avec lôaugmentation de DS, contrairement a la densité réelle qui diminue avec lôaugmentation de DS. Le pH est diminue (tend vers la zone acide) quand le DS augmente a raison de lôaugmentation des fonctions acides au niveau moléculaire.

III.3.5.3. Etude de l'activité antibactérienne de CMKC

Lôétude de lôactivité antibactérienne a été réalisée par la méthode dite : Méthode de diffusion sur gélose (méthode de disque). Pour cela, on a mené des tests microbiologiques par diffusion du CMKC en milieu solide. Lôopération consiste à déterminer le diamètre dôinhibition des souches bactériennes : *Staphylococus aureus* et *Escherichia Coli.*

Des morceaux de papier absorbant, sous forme de disques, sont imbibés de solutions dont on veut vérifier leur capacité antimicrobienne. Chaque papier est placé dans une boite Pétri contenant le milieu de culture et une souche bactérienne spécifique *(Staphylococus aureus* ou *Escherichia*

Coli). Après un temps d'incubation de 24h, nous obtenons des zones d'inhibition pour lesquelles nous mesurerons le diamètre d'inhibition [97], comme le montre la figure III.8.



Figure III.7. Méthode de diffusion en gélose [98]

Les résultats peuvent être interprétés et exploités comme décrit dans la figure III.9.

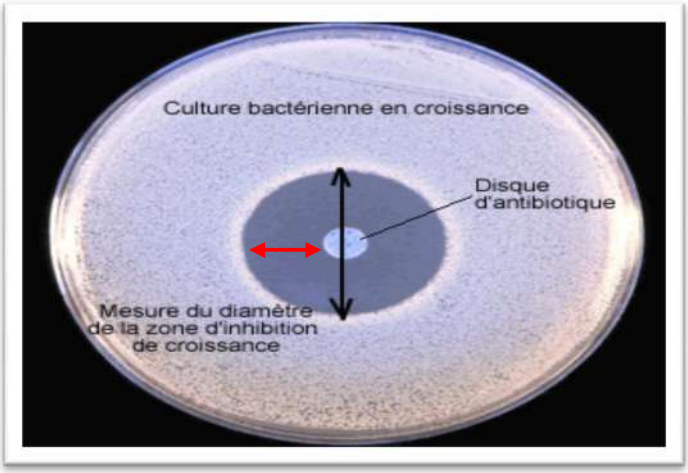
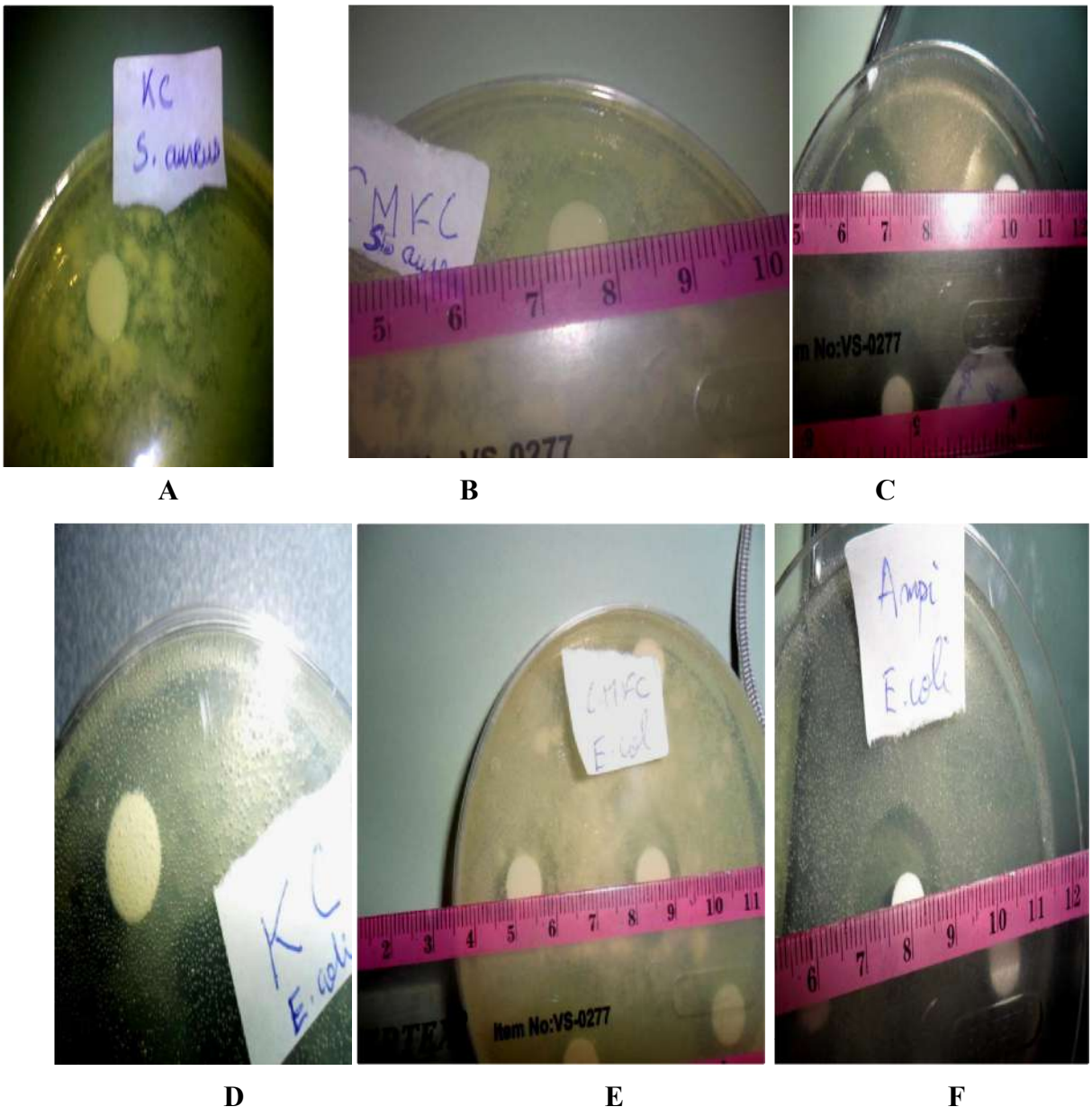


Figure III.8. Représentation de la zone d'inhibition (flèche en rouge) [98]

Les résultats après incubation sont montrés dans la figure III.9.



A **B** **C**

D **E** **F**

Figure III.9. Résultats de la zone dôinhibition pour KC et CMKC.
A : zone dôinhibition du KC sur *S.aureus* ;
B : zone dôinhibition du CMKC sur *S.aureus* ;
C : zone dôinhibition de lôampicilline sur *S.aureus* ;
D : zone dôinhibition du KC sur E. coli ;
E : zone dôinhibition du CMKC sur E. coli ;
F : zone dôinhibition de lôampicilline sur E. coli.

Les résultats de mesure des zones dôinhibition sont illustrés dans le Tableau III.4.

Tableau III.4. Résultats de l'activité antibactérienne de KC et CMKC.

Echantillons	Dimension de la zone d'inhibition (mm)	
	Staphylococcus aureus	***Escherichia Coli***
KC	0	0
CMKC	3,4	3,8
Ampicilline	9,2	7

Le CMKC possède la une activité antibactérienne par rapport aux zones d'inhibition de l'ordre de 3.4 mm et de 3.8 mm.

D'après les résultats obtenus, on peut conclure que le KC ne possède aucune activité antibactérienne ni contre ***Staphylococus aureus ou Escherichia Coli*** mais après carboxymethylation cette activité est clairement observée contre les deux souches.

Le KC ne possède pas de groupements carboxyméthyles alors que le CMKC possède ces groupements. On peut donc conclure que l'introduction de groupes carboxyméthyles fait générer une activité antibactérienne efficace au ə-carraghénane.

III.3.5.4. Capacité d'absorption et de rétention de l'humidité

La capacité d'absorption et de rétention de l'humidité de KC et de CMKC est mesurée selon la méthode reportée par Matsumura, Cheng, Minami, Yochikawa et Karyone [99].

Cette méthode repose sur le calcul de gain ou de perte de poids des poudres après humidification ou dessiccation selon des méthodes appropriées ; la différence du poids renseigne sur la quantité d'humidité absorbée ou perdue [99].

La capacité d'absorption d'humidité est évaluée par le calcul de pourcentage de diminution de poids des échantillons humidifiées avec du Sulfate d'ammonium Rα (équation III.5) [99].

$$\% = \frac{\text{[illegible]}}{\text{[illegible]}} \text{[illegible]} \qquad \text{(III.5)}$$

La capacité de rétention d'humidité est évaluée par le calcul du pourcentage d'eau résiduel des échantillons humidifiés Rh [99].

$$\text{[illegible]} = \frac{\text{[illegible]}}{\text{[illegible]}} \text{[illegible]} \qquad \text{(III.6)}$$

Les résultats seront comparés avec celles de l'acide hyaluronique [99]. Les résultats de calcul de la capacité d'absorption et de rétention d'humidité par le KC, et le CMKC sont représentés dans le Tableau III.5.

Tableau III.5. Résultats de la capacité d'absorption et de rétention d'humidité

Echantillons	*Rα %*		*Rh %*
	Rα (81%)	*Rα (32 %)*	
KC	6,30	2,98	13,83
CMKC1	31,02	10,73	30,83
CMKC2	39,11	14,17	45,70
CMKC3	44,54	18,54	56,32
CMKC4	51,23	20,34	66,32
CMKC5	42,26	17,76	56,43
AH	53,3	22,12	68,20

- Comme l'indique les résultats du Tableau III.5, les deux échantillons de CMKC possèdent les meilleurs résultats de *Rh* et de *Rα* par rapport à celles de KC. Ce qui indique que l'introduction des groupements carboxyles améliore considérablement la capacité d'absorption et de rétention d'humidité. Il semble que, dans des conditions d'humidité relative (Rh 81%, Rh32%), les molécules d'eau sont accessibles à la surface des résidus (Galactosyle) et peuvent facilement développer des interactions et des liaisons hydrogène avec les chaines des molécules de CMKC.

- Tous les échantillons humides de CMKC libèrent lentement de l'eau dans des conditions sèches (en présence de gel de silice).
- La plupart des chaines moléculaires sont liées entre elles par des liaisons Hydrogène intermoléculaires pour former la structure de réseau. Ainsi, les molécules d'eau ont été introduites à l'intérieur du réseau plus facilement et le taux d'humidité du polymère est plus difficile à diffuser dans l'environnement.
- Bien que, les valeurs de R_h et $R_{Ŭ}$ de CMKC sont plus faible que l'acide hyaluronique, mais le dérivé carboxymethylé a le potentiel d'être utilisé comme excipient dans l'industrie pharmaceutiques et la libération prolongée et/ou contrôlée de principe actif.

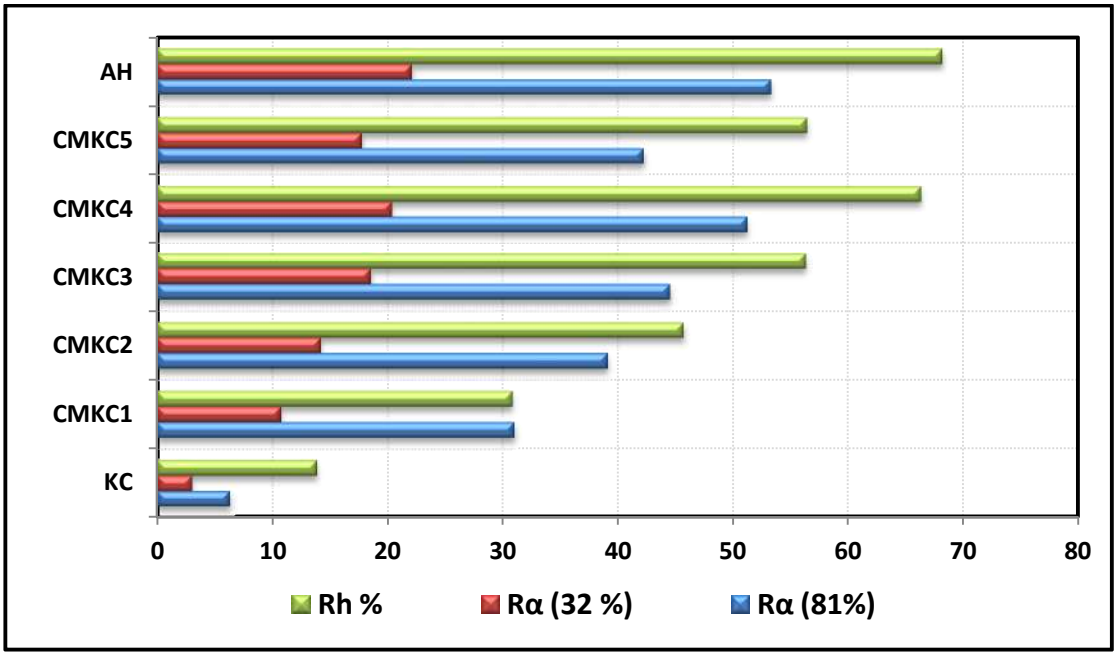


Figure III.10. Capacité dôabsorption et de rétention dôhumidité par le KC, et CMKC

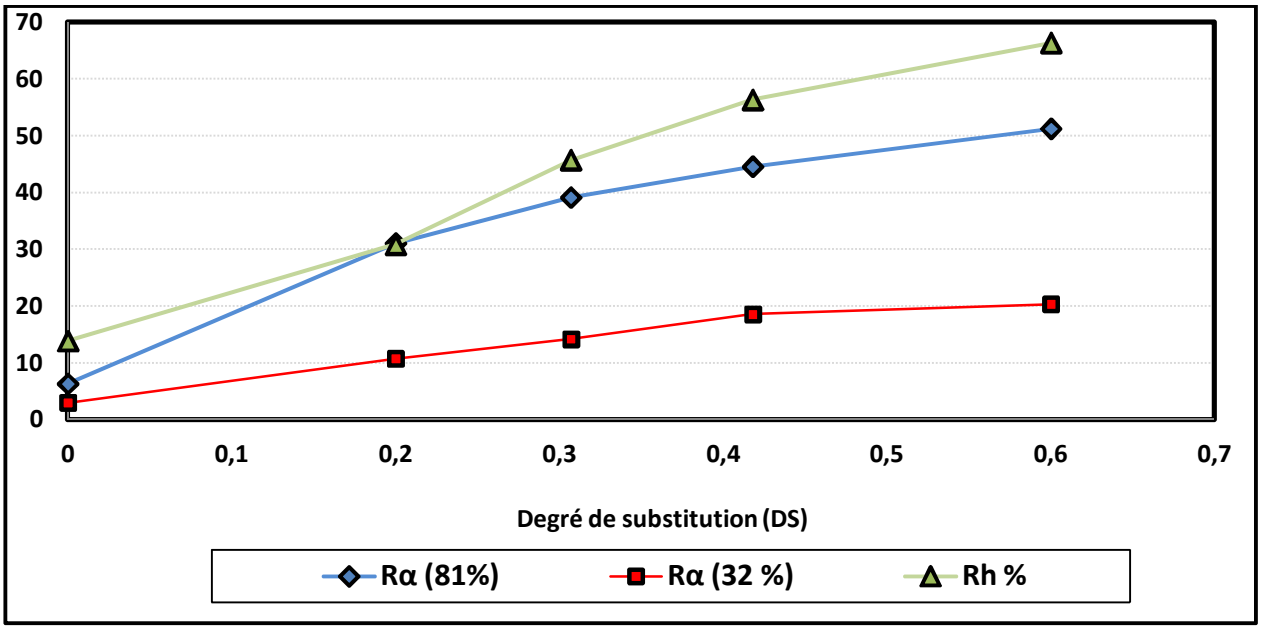


Figure III.11. Variation de la capacité dôabsorption et de rétention dôhumidité par le KC, et CMKC en fonction du degré de substitution du KC

On remarque que dans les trois cas de figures, les taux dôabsorption et de rétention de lôhumidité augmentent avec lôaugmentation du degré de substitution.

Lorsque la valeur de DS a augmenté de 0 à 0,6, les valeurs RŬ et Rh sont augmentées rapidement ou RŬ(81%) est devenu de lôordre de 51,23% et RŬ(32%) a atteint 20,34% tant que Rh=66,32%.

Ceci peut être expliqué par lôaugmentation du nombre des groupes carboxyméthyles, d'une part, des liaisons hydrogène entre l'eau et des groupes-COOH augmentent, tandis que, d'autre part, les liaisons hydrogène intermoléculaires entre les chaînes moléculaires CMKC augmentent en même temps, ce qui permet de lier de grandes quantités d'eau et de les conserver dans un réseau.

III.4. Formulation des beads à base de KC et CMKC

III.4.1. Encapsulation de l'alpha–amylase

Le KC et le CMKC sont utilisés comme matrices pour encapsuler lôenzyme alpha-amylase. Une étude comparative sera menée entre les performances de lôencapsulation avec KC et le CMKC. Le CMKC qui sera utilisé dans cette partie de lôétude sera le lot 4 ou le degré de substitution est le plus élevé (DS=0.6).

Le principe de ce processus consiste à faire tomber goutte à goutte la solution polymérique dans un bain où est réalisée la gélification des gouttes. Une solution de 2 à 5% de KC et CMKC sont chauffée pour être mélangée au matériel biologique à encapsuler, le mélange ainsi obtenu est extrudé goutte à goutte dans une solution de KCl à 0.75M [100]. Les beads obtenus ont été laissés dans la solution de KCl pendant 20 min, puis filtrés et lavés avec de lôeau distillée et enfin laissés sécher à lôair libre.

En général, les capsules formés sont sphériques et de taille homogène. Leur taille peut varier selon lôévolution de la technique de 100µm à 3000µm.

Plusieurs paramètres ont été optimisés dans le processus de formation des microsphères.

- Le choix de la température de dispersion des biopolyméres est fixé à 70^0C [101]. Sachant quôil est nécessaire de chauffer la solution de carraghénane pour sa solubilisation et mais aussi pour permettre son passage à travers lôorifice de seringue.

- La viscosité de la solution est conditionnée par la concentration en carraghénane et ne doit pas être trop élevée pour éviter le colmatage de lôorifice. Il ne faut pas non plus, quôelle soit trop faible car dans ce cas, il nôest pas possible dôobtenir des sphères. La concentration des carraghénane adaptée est de 2%.

- Le débit dôécoulement de la solution de biopolymères à travers la seringue influence non seulement la vitesse de formation des microbilles de gel mais aussi leur taille. En effet lorsque celui-ci diminue, il se forme des gouttes plus volumineuses à la sortie de lôorifice.

- Lôagitation lente de la solution de KCl est effectuée pour assurer un léger brassage de la solution et éviter que les microbilles de gel ne sôagrègent les unes aux autres par contact.

- La concentration de la solution saline quant à elle doit être suffisante pour provoquer la gélification du polymère. Dans la littérature le choix de la concentration saline est corrélé à celui du polymère, elle varie souvent entre 0,3 et 1M [102]. Dans notre cas, on lôa pris à 0.7M.

- La nature des ions présents dans la solution influence considérablement la gélification. Nous avons choisi le K^+ souvent présenté comme le gélifiant idéal pour le ə-carraghénane.

Lôutilisation de solution où le pH est supérieur au pKa des groupes acide carboxylique (~ 3.4-3.7), et la répulsion électrostatique fournie par des résidus chargés négativement de lôacide carboxylique peut empêcher la gélification correcte.

Donc lôutilisation de KCl (~ pH 2.8) qui est un pH bas (pH <3,5) est un facteur important pour la gélification correcte et l'encapsulation par le kappa-carraghénane carboxyméthylé [103].

La figure III.12 représente les formes des beads formés aves KC et CMKC avec et sans alpha-amylase.

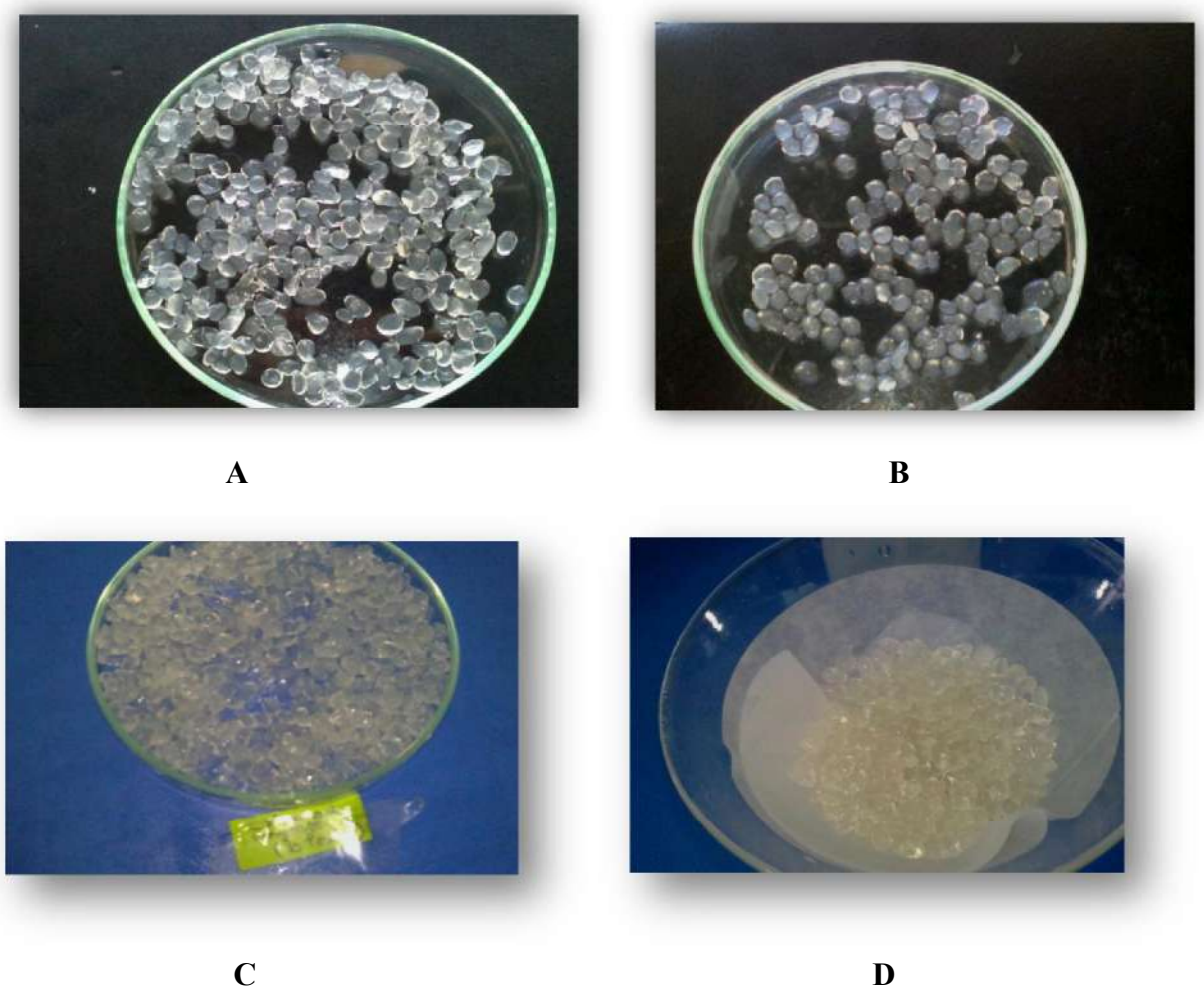
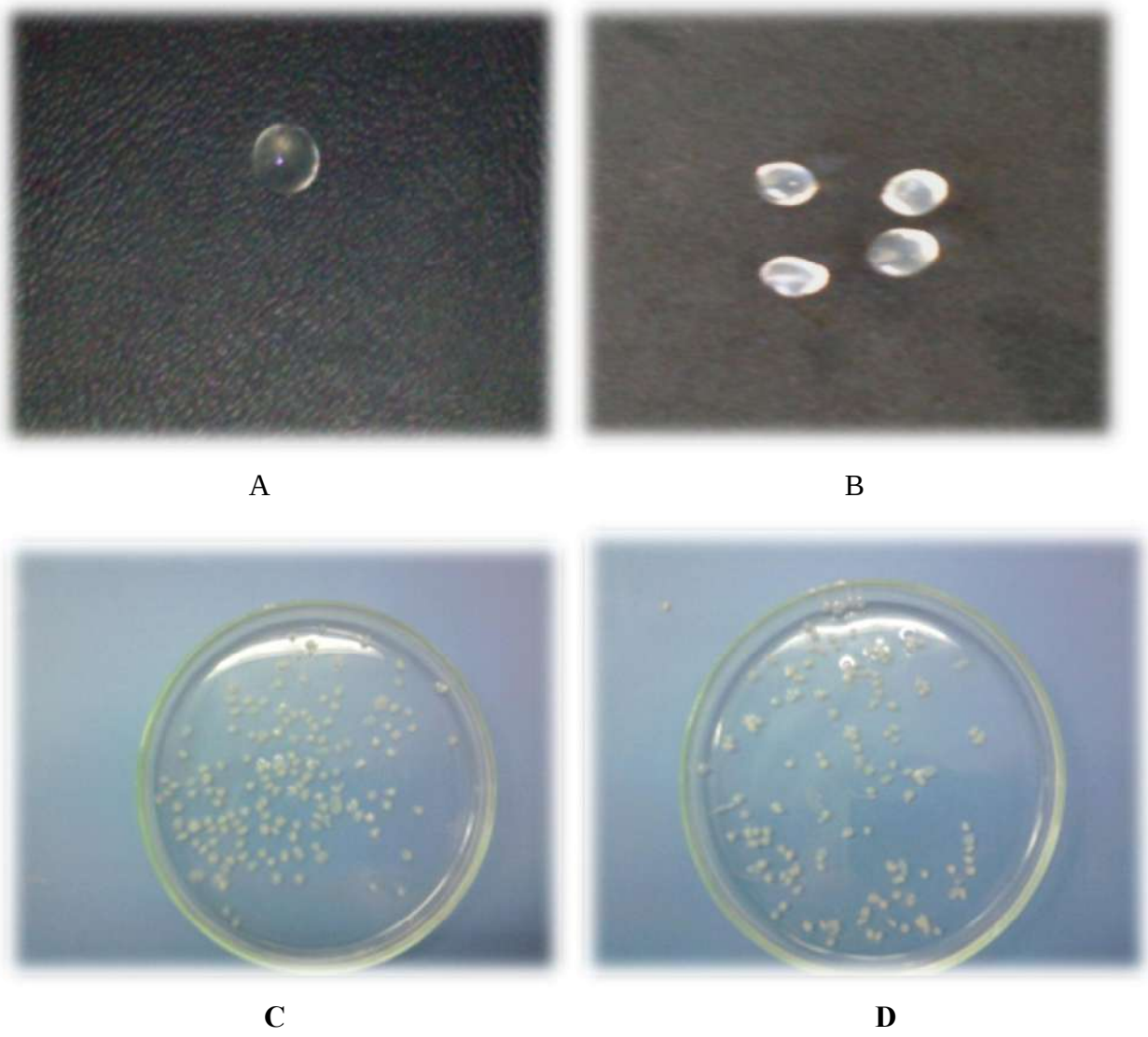


Figure III.12. Microcapsules après filtration : A :beads de CM KC vides , B :beads de CMKC chargés, C :beads de KC vides ,D :beads de CMKC chargés.

III.4.2. Caractérisation des capsules

III.4.2.1. Morphologie de capsules humides et sèches

Les perles obtenues ont une forme sphérique à l'état humide, mais après le séchage les beads sont dépourvus d'eau et s'allongent légèrement (Figure III.13). Dès qu'on les remet dans un milieu aqueux, les beads regonflent et reprennent leurs formes initiales.



A B

C D

Figure III.13. Structure des capsules chargées humides et séches de CMKC et KC.

A. Capsules humides de KC
B. Capsules humides de CMKC
C. Capsules seches de KC
D. Capsules seches de CMKC

III.4.2.2. Etude granulométrique des capsules

La taille des perles obtenues est mesurée par un micromètre. On a choisi au hasard trois (03) séries de capsules contenant 20 capsules chacune pour les deux types de biopolymère. Les résultats de mesures obtenus sont mentionnés dans le Tableau III.6.

Tableau III.6. Tailles des microcapsules humides de CMKC et de KC

	Microcapsule de KC			**Microcapsule de CMKC**			**La moyenne**	
	Série A	Série B	Série C	Série A	Série B	Série C	**KC**	**CMKC**
Longueur (mm)	3,00	3,03	3,10	3,08	3,05	3,04	**3 ,04**	**3 ,05**
Largeur (mm)	2,00	2,01	2,06	2,02	2,05	2,10	**2,02**	**2,05**

Lôanalyse des résultats montre quôil nôy a pas une différence de taille entre les capsules humides chargées de PA de KC et celles de CMKC.

La taille des capsules sèches pour les deux types de biopolymère (KC et CMKC) est de lôordre de 1mm.

III.4.2.3. Caractérisation par FTIR

Dans le but de confirmer la contenance du PA dans le réseau de carraghénane modifié ou non modifié, une analyse par FTIR a été effectuée pour les beads chargés.

Lôencapsulation du PA résulte dans lôapparition des nouvelles bandes IR caractéristiques du PA qui est lôalpha-amylase (Figures III.14, III.15 et III.16).

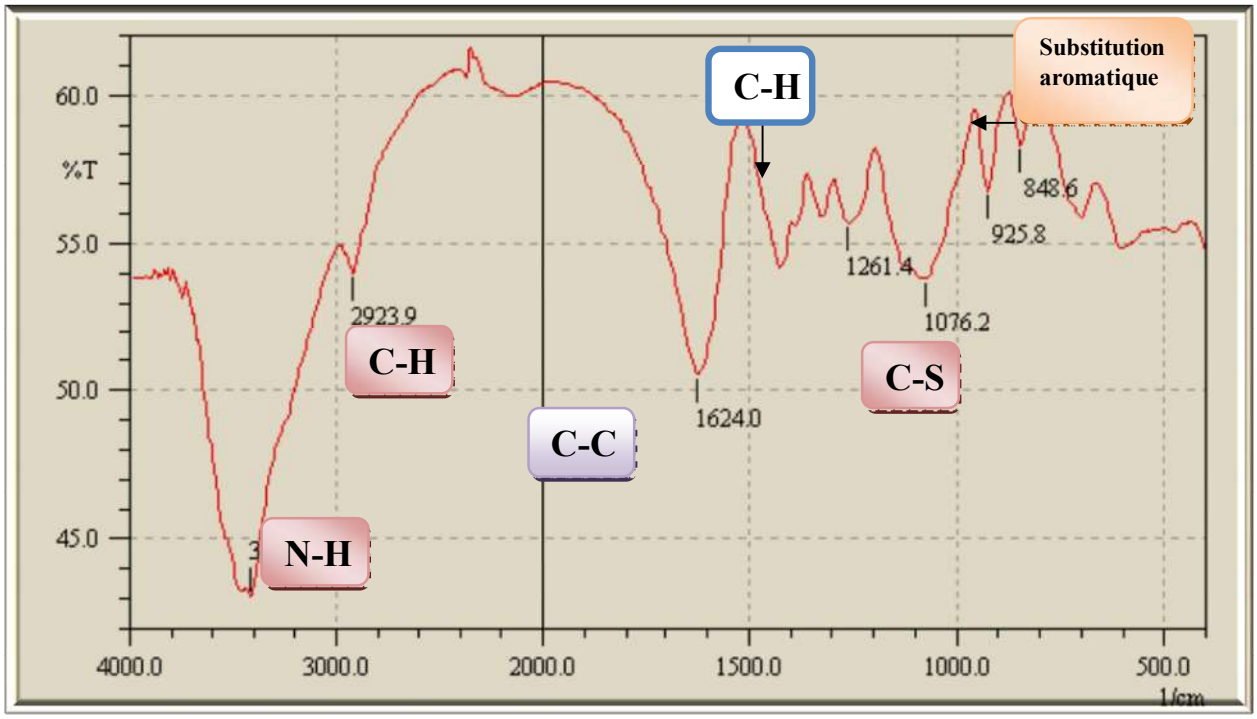


Figure III.14. Spectre FTIR de lâalpha-amylase

Amylase a également montré plusieurs pics distincts :

*Un pic dominant autour 3190 cm^{-1} due a lôélongation de N-H les amides N-substitués secondaires ;

*Des bandes moyennes à 1500-1650cm^{-1} due à C-C ;

*Les bandes à 2931 cm^{-1} sont dues à lôélongation de C-H ;

*Les bandes entre 1425 et 1340 cm^{-1} sont dues au déformation de C-H de la chaine alkyle des acides aminés ;

*Les pics entre 1050 et 1200 cm^{-1} avec les pics entre 400 et 450cm^{-1} sont dues a lôélongation des sulfides et disulfides.

*Les bandes autour 875cm^{-1} sont dues à la poly substitution aromatique en dehors de plan C-H des résidus aromatiques de tryptophane ou la tyrosine.

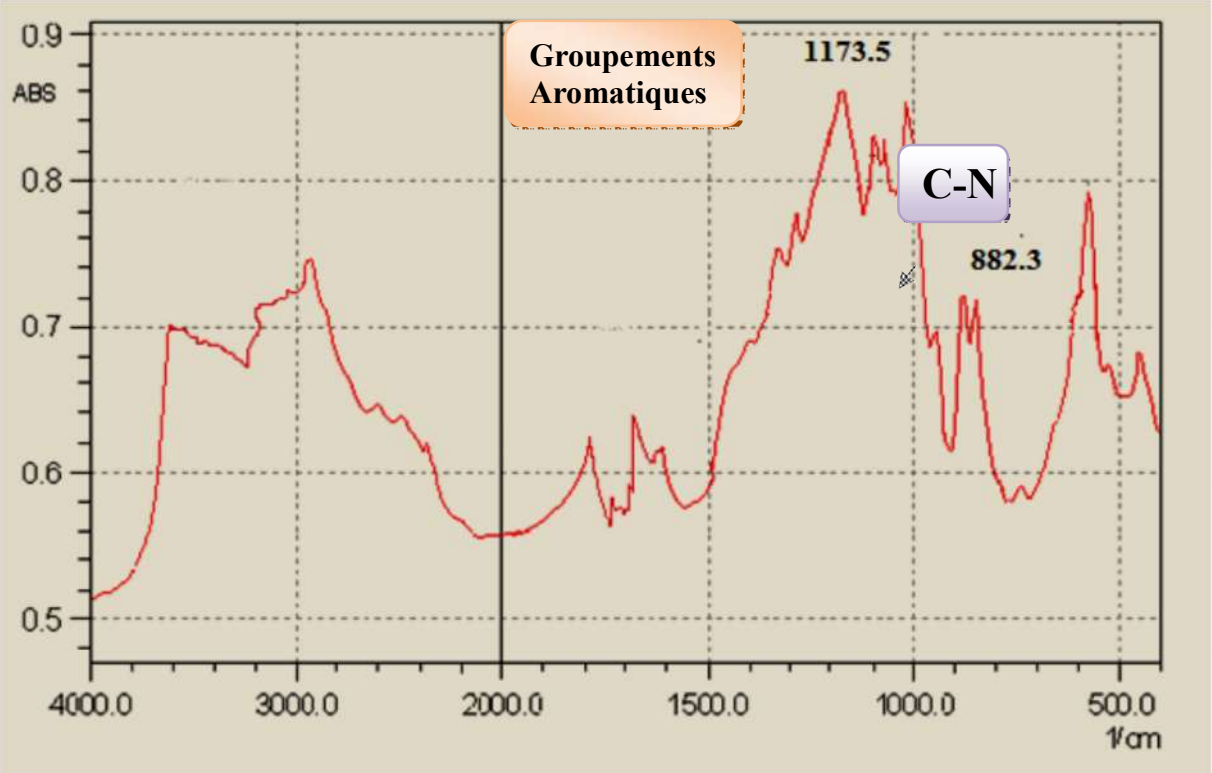


Figure III.15 : Spectre FTIR des beads de CMKC chargés

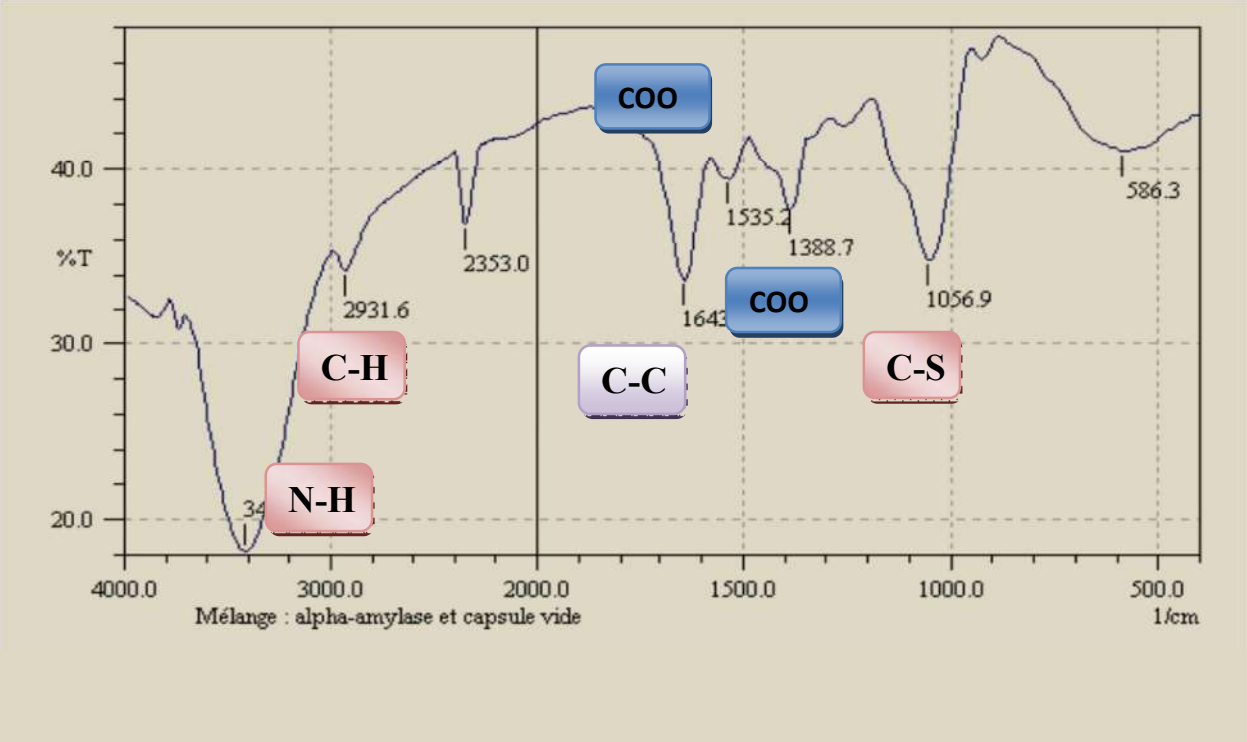


Figure III.16. Spectre FTIR de mélange alpha-amylase et capsules vides

Le spectre de la figure III.14 montre lôapparition de nouvelle bande 1172 ± 2 cm-1 assignée aux cycles aromatiques et une pic de 879.5± 3 cm-1 des liaisons C-N des groupements RRô-NH spécifiques à lôenzyme alpha amylase.

Après comparaison des spectres FTIR de KC, CMKC; beads de KC et CMKC chargés ; beads de KC et CMKC vierges (blanches ou dites encore vides) et de lôalpha amylase on a constaté quôaprès lôincorporation de lôalpha-amylase, le spectre des capsules vierges est similaire de celui des capsules chargées. Cependant, le mélange physique de lôŮ-amylase et de capsules blanches montrent les pics dus à la fois à lôŮ-amylase et au CMKC. Cela confirme lôencapsulation de lôŮ-amylase dans les capsules de KC et de CMKAC au niveau moléculaire.

III.4.3. Dosage de α-amylase par la spectrophotométrie UV/VIS

Le dosage de lô Ů-amylase a été effectué par **s**pectrophotométrie UV/VIS (WPA). La spectrométrie d'absorption moléculaire dans le domaine ultraviolet (UV), de 185 à 380 nm environ, et visible (VIS), de 380 à 800 nm environ, est une technique courante de contrôle et d'analyse de composés chimiques. Elle s'applique à des groupements d'atomes (ex : molécules, ions, polymères) qui absorbent le rayonnement électromagnétique dans le domaine UV-VIS.

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

$$\mathbf{E = h\ c\ /\ l} \qquad \text{(III.7)}$$

Avec : h est la constante de Planck et c la vitesse de la lumière.

Le retour au plus bas niveau d'énergie, l'état fondamental, se produit par perte d'énergie sous forme de chaleur ou, occasionnellement, par rémission de radiation (fluorescence ou phosphorescence). Les longueurs dôonde dôabsorption dôune molécule organique dépendent de lôénergie de liaison de ses différents électrons [104].

L'activité dextrinogénique est exprimée en unités arbitraires par la relation suivante [105] :

$$\text{[illegible]} = \frac{\text{[illegible]}}{\text{[illegible]}}\,\text{[illegible]} \qquad \text{(III.8)}$$

Où Ab est l'absorbance du complexe amidon-iode, en l'absence d'enzyme, E est la dilution d'enzyme et A, lôabsorbance.

Les meilleurs résultats ont été obtenus lorsque la solution d'enzyme est diluée de manière à rendre le rapport :

$$\text{[illegible]}\frac{\text{[illegible]}}{\text{[illegible]}} \mathbf{= (0{,}20 - 0{,}25).}$$

Lôabsorbance des 3 échantillons et le blanc est donné dans le Tableau III.7.

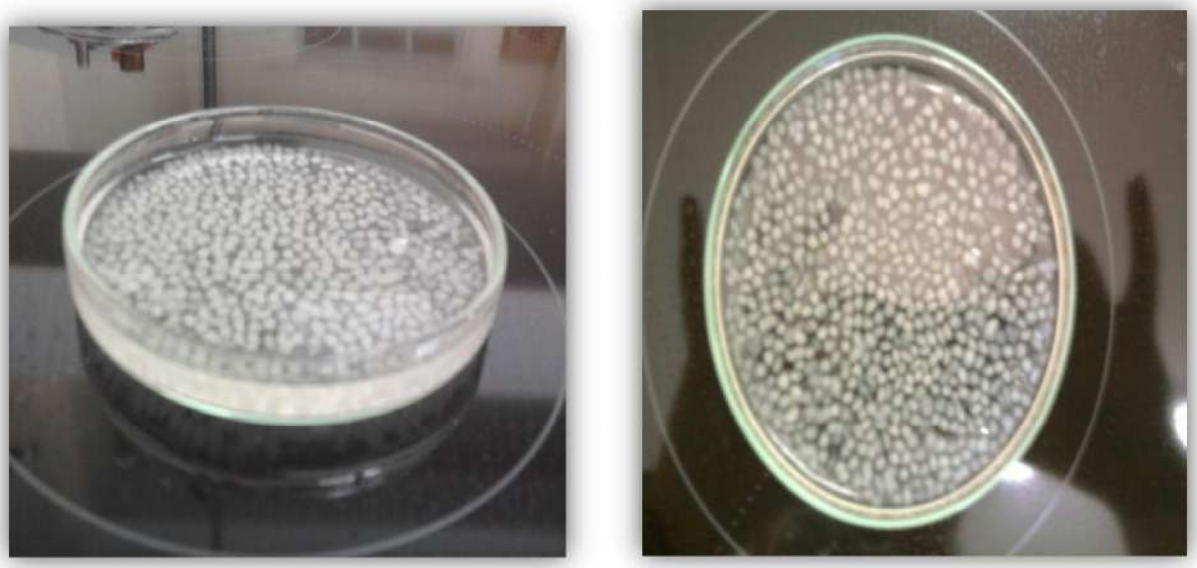
Tableau III.7: Résultats de dosage de lôabsorbance de lôalpha-amylase :

Echantillon	**Essai 1**	**Essai 2**	**Essai 3**	**Blanc A_b**
Absorbance (A)	0,0010	0,00091	0,00106	0,00130
$\frac{A_b - A}{A}$	0,3	0,43	0,22	0

Les résultats obtenus montre une bonne spécificité de la méthode de dosage de lôalpha-amylase par spectroscopie UV-VIS à des taux de dilution optimale de 1.04% (masse (g) PA/volume (ml) tampon 6.8).

III.4.4. Calcul du Taux d'encapsulation

La quantité dôenzyme alpha amylase introduite dans chaque bead est calculée par dosage spectrophotométrique UV-Vis [106].



A **B**

Figure III.17 : Remise en des beads chargés dans le SGF : A:beads de KC ;B : beads de CMKC.

Le rendement et le taux dôencapsulation ont été calculés par la formule Suivante [106] :

$$\text{Rendement d'encapsulation (\%)} = \frac{\text{Quantité réelle d'enzyme encapsulée dans les billes}}{\text{Quantité théorique d'enzyme introduite}} \times 100 \qquad \text{(III.9)}$$

Les résultats de calculs des taux dôencapsulation sont résumés dans le Tableau III.9 et représentés dans la figure III.18.

Tableau III.8. Calcul du taux dôencapsulation

Echantillons	KC			CMKC		
	Essai 1	Essai 2	Essai 3	Essai 1	Essai 2	Essai 3
Taux dôencapsulation (%)	49.38	51.34	52.76	67.34	78	68.56
Taux dôencapsulation moyen(%)	51.16			71.3		

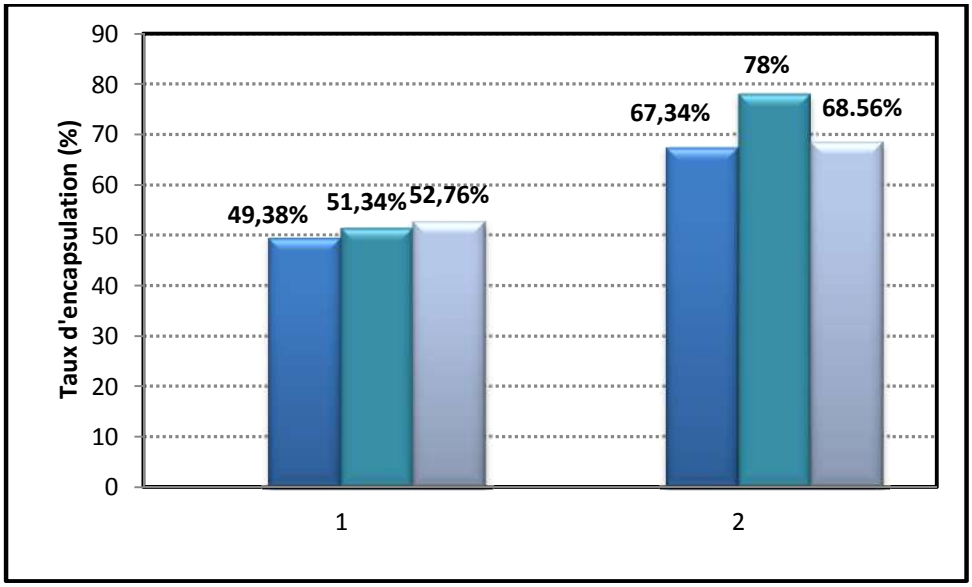


Figure III.18. Taux dôencapsulation des beads à base de KC et CMKC

Dôaprès les résultats du tableau III.8 et la figure III.18 représentant les taux d'encapsulation, il semble que les beads de CMKC donnent un meilleur taux d'encapsulation de l'ordre de 78%, par comparaison aux beads de KC où le taux dôencapsulation ne dépasse pas une moyenne de 51.16%.

Donc le taux dôencapsulation de lôenzyme dans le CMKC est supérieur à celui obtenu dans le KC, parce que le réseau polymérique de CMKC est supérieur à ce de KC.

III.4.5. Etude de la cinétique de libération de l'Alpha amylase à partir des beads

Cette partie est consacrée à étudier le profil de la cinétique de libération de lôAlpha amylase encapsulée dans des beads dans des conditions de température et de pH différentes. Cette étude a

pour but de voir si les beads formulés peuvent maintenir le PA dans ces conditions, c'est-à-dire la détermination de la quantité du PA libérée dans le temps et ceci pour les cas suivants :

- Beads séchés dans un milieu neutre (pH =7) et T = 37 °C ;
- Beads séchés dans un milieu acide (pH =2) et T = 37 °C.

Il faut noter que ces tests ont été effectués pour les beads de KC et CMKC. Les résultats établis des tests expérimentaux portés sur les beads préparés, déterminant la quantité libérée dôAlpha amylase dans le temps, sont récapitulés comme suit :

III.4.5.1. Libération dans un milieu neutre (pH =7)

Les résultats des profils de libération de lôAlpha amylase à travers des beads de KC et CMKC, obtenus dans un milieu pH=7 à 37°C ± 0.5 sont représentés sur la figure III.20.

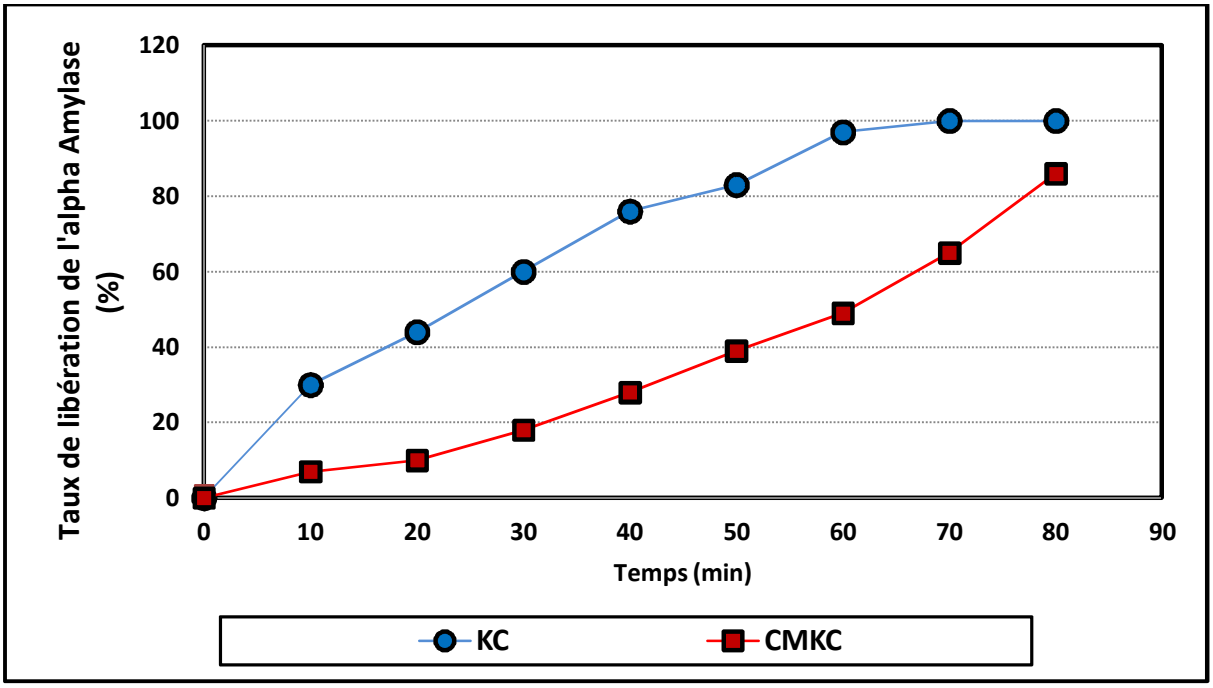


Figure III.19. Profils de libération de lôAlpha amylase à partir les beads de KC et CMKC à pH =7.

III.4.5.2. Libération dans un milieu acide (pH=2)

Les résultats des profils de libération de lôAlpha amylase à travers des beads de KC et CMKC, obtenus dans un milieu pH=2 à 37°C ± 0.5 sont représentés sur la figure III.20.

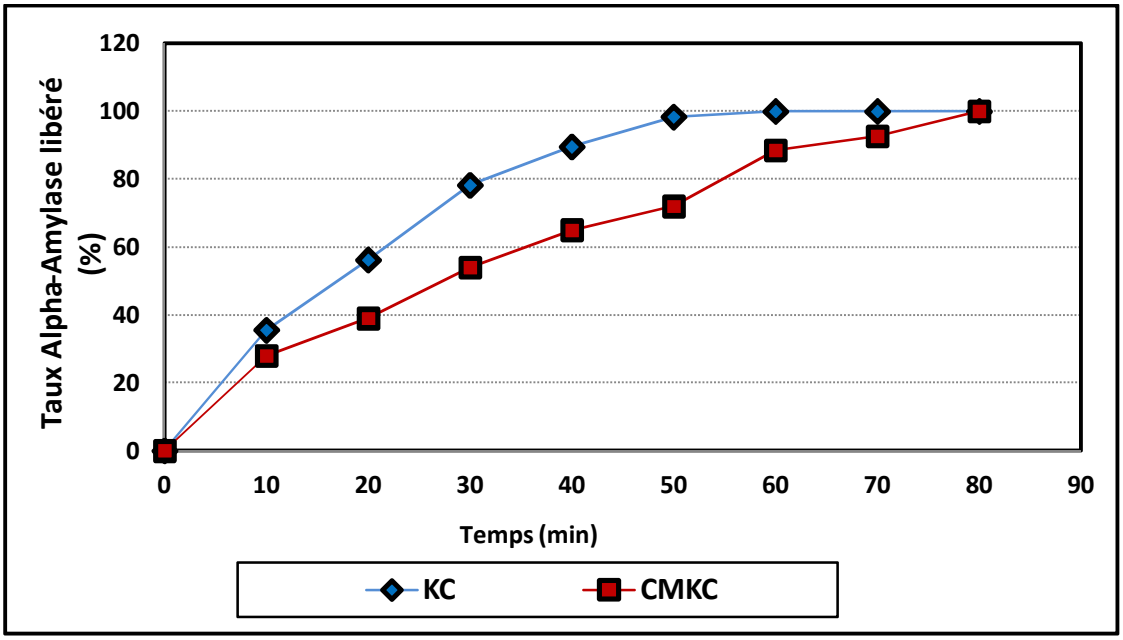


Figure III.20. Profils de libération de lôAlpha amylase à travers les beads de KC et CMKC à pH =2.

Dôaprès lôanalyse des deux figures représentant la libération de lôalpha amylase à partir des beads de KC et CMKC dans le milieu neutre (pH =07) et acide (pH=0 2) on peut constater :

- ***Pour le milieu neutre pH=07 :***
  - Le taux de libération de 50% de lôenzyme est atteint après 25min pour le KC et après 65min pour le CMKC.
  - Le taux de libération de 90% de lôenzyme est atteint après 60 min pour le KC et après 80 min pour le CMKC.

- ***Pour le milieu acide pH=02 :***

- 50% de lôenzyme est libérée avant les premières 20 min pour le KC est à 30 min pour le CMKC,
- 90% de lôenzyme est libérée pendent les premières 40 min pour le KC et 60min pour le CMKC

En milieu neutre la libération de PA pour les beads de KC,

- La libération est importante au début (pH=2 et pH=7), ceci est dû à la différence de concentration entre le milieu interne (les beads) et le milieu de dissolution
- Puis la libération est ralentie ce qui est expliqué par lôabaissement de la différence de concentration entre les deux milieux
- La vitesse de libération est élevée en milieu acide par rapport au milieu neutre

- Le pH a une influence sur le profil de libération et une libération accélérée est remarquée en milieu acide pour les deux polymères et dûne façon plus prononcée pour les beads à base de KC par rapport au CMKC
- Le pH 7 influence considérablement la libération de lênzyme encapsulés dans les deux biopolymères, et dûne façon considerable pour le CMKC. En effet les beads à base de CMKC présente un profile de libération prolongée, cela peut être interpréter par la présence des deux fonctions COO^- et SO^-_3
- En milieu, en milieu acide le gonflement des beads est accéléré et donc la libération de lênzyme est plus rapide, alors quên milieu neutre, les beads gonflent lentement et prennent plus le temps dêêtre avec le milieu extérieur et donc libèrent plus lentement lêalpha amylase encapsulé.

Les figures III.21 et III.22 donnent une comparaison des profils de libération de lêalpha amylase à partir des beads de CMKC dans les deux milieux étudiés.

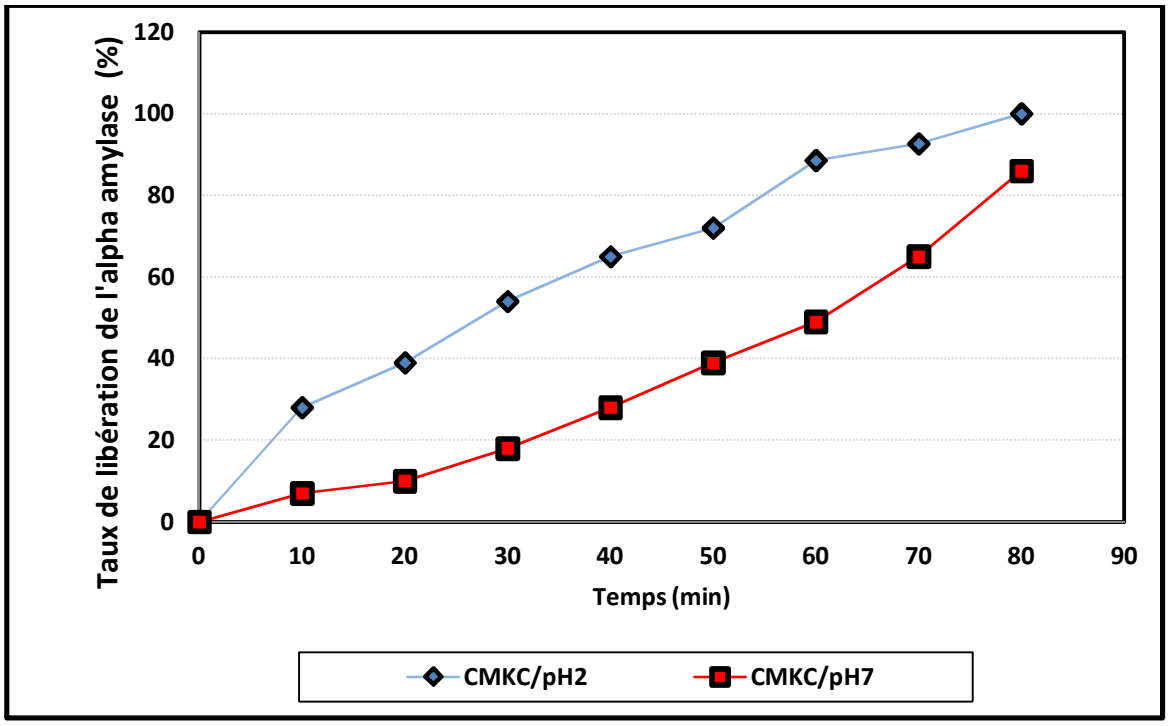


Figure III.21. Comparaison des profils de libération de lêalpha amylase à partir des beads de CMKC dans différents milieux.

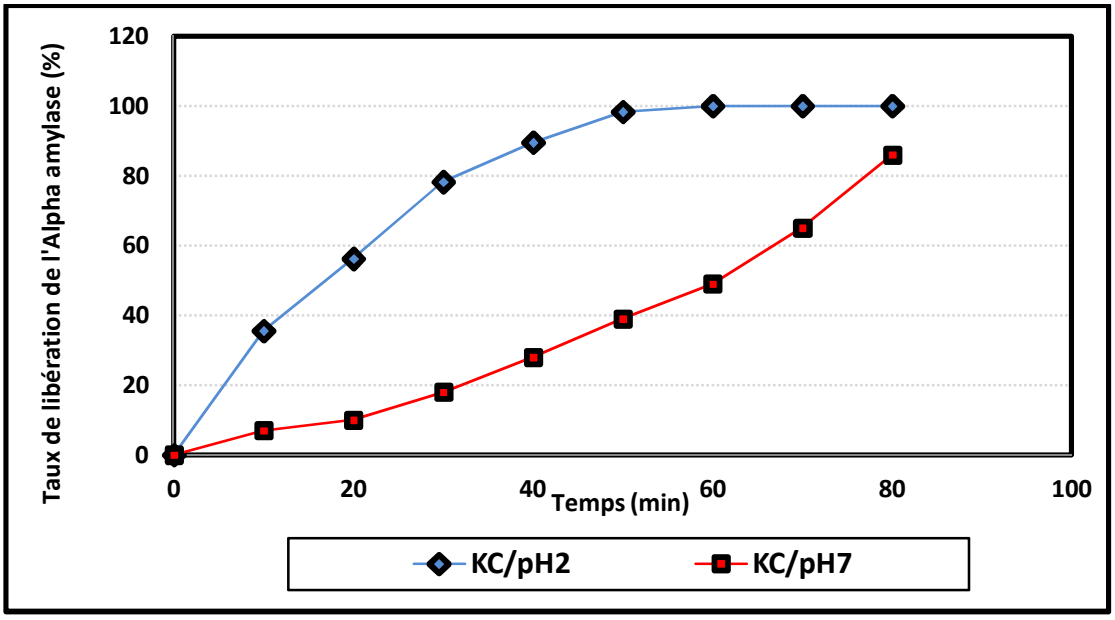


Figure III.22. Comparaison des profils de libération de lôalpha amylase à partir des beads de KC dans différents milieux.

Lôanalyse des résultats montre que :

- Pour le ***CMKC,*** la libération de 50% de PA est atteinte après 30min en milieu neutre et après 60min pour le milieu acide, de même la libération de 90% de PA est atteinte à 80min en milieu neutre et a 70 min en milieu acide
- Pour le KC, la libération de 50% de PA est atteinte avant les premières 20min en milieu acide et après 60min pour le milieu neutre de même la libération de 90% de PA est atteinte aprés 40min en milieu neutre et a 80 min en milieu acide.

Si on résume la comparaison des figures précédentes, on peut conclure que :

- Le pH a une influence sur le profil de libération dôune façon considérable :
  - pour le CMKC et à de faible valeur de pH (pH 2 de SGF), les groupes carboxyles sont protonés, et ne contribuent pas à promouvoir la formation de liaisons hydrogènes avec dôautres molécules du biopolymère, ce qui réduit le taux de gonflement global.
  - À un pH plus élevé (pH 7,4 de SIF), les groupes carboxyle sont déprotonés, ce qui augmente le nombre de liaison hydrogène et contribue à un taux de gonflement élevé.
  - Le taux de gonflement élevé ainsi que la présence de forces collectives de répulsion électrostatique entre les groupes acides ionisés, donc ralentissent la libération de lôenzyme Alpha amylase.

III.5. Conclusion

La modification du biopolymère KC a été réalisée sous certaines conditions optimales et les résultats ont montrés que le bio polymère modifié CMKC a été caractérisé par :

- Lôanalyse FTIR a confirmé la fixation des groupements carboxyles;
- Le DS optimal atteint est de 0.6 pour un rapport optimal n_{MCA}/n_{KC} égal à 2.5 et un volume de NaOH de 44.75 ml.
- Lôétude microbiologique du CMKC a montré que la carboxymethylation du KC confère une activité antibactérienne au biopolymère contrairement au KC non modifié qui ne montre aucune activité antibactérienne détectable.
- Le test de capacité dôabsorption et de rétention dôhumidité a montré que la capacité de la poudre de CMKC à absorbé et retenir lôhumidité est meilleure que celle obtenu par la poudre de KC non modifiée.

La formulation de capsules à beads à base de KC et CMKC encapsulant lôalpha amylase a été réalisée. Les beads obtenus ont été caractérisées par :

- FTIR qui a montré lôapparition de nouveaux pics dôalpha amylase sur les spectres des beads chargées confirmant lôencapsulation de lôenzyme.
- Le dosage de lôenzyme encapsulée par spectrophotométrie UV-VIS, identifiant et quantifiant lôenzyme encapsulée.
- Le calcul du taux dôencapsulation des beads a donné des résultats satisfaisant avec un taux optimal de 68%.
- Une étude de la cinétique de libération de lôenzyme dans différents milieux a indiqué la sensibilité du CMKC à la variation de pH et une libération plus lente de lôenzyme à partir des beads de CMKC.

A travers ce présent travail, nous avons étudié la faisabilité de la méthode de modification chimique dôun biopolymère, le kappa-carraghénane (KC) par une réaction de carboxyméthylation pour produire le carboxyméthyle kappa-carraghénane (CMKC) avec un taux de rendement moyen de lôordre de 64.72%. Le CMKC modifié a été caractérisé par différentes méthodes physico-chimiques et microbiologiques.

Dôaprès les résultats obtenus après la caractérisation du CMKC, on peut noter que lôintroduction de groupements carboxyliques dans la molécule de KC confère au CMKC de nouvelles propriétés dont:

- Un degré de substitution optimal de 0.6.
- Les spectres FTIR des essais de carboxyméthylation du KC montrent clairement la présence de groupements carboxyliques au sein de la molécule modifiée.
- Une meilleure propriété de solubilité dans lôeau par rapport au KC.
- une activité antibactérienne bien marquée à lôégard dôE.coli *et S.aureus*.
- une bonne capacité dôabsorption et de rétention de lôhumidité.

Afin de valoriser le CMKC, nous nous sommes intéressés lors de cette étude à son application dans la préparation des beads contenant un principe actif (alpha-amylase) dont le taux dôencapsulation avec CMKC est supérieur a celui obtenu par KC :

- Le CMKC présente des beads ayant un taux dôencapsulation en lôalpha-Amylase de 78% alors que le taux dôencapsulation des beads à base de KC nôatteint que 52.76%.
- La caractérisation des beads par FTIR fait apparaître de nouvelles fonctions, ce qui démontre lôincorporation de lôalpha-amylase an niveau moléculaire des le KC et le CMKC.
- Lôétude de la cinétique de libération de lôenzyme a mis en évidence une libération prolongée de lôenzyme à partir de beads de CMKC
- L'introduction de groupes carboxyliques au kappa-carraghénane confère au CMKC un comportement dépendant du pH,

Ainsi, le KC modifié peut trouver sa place dans la conception de systèmes d'administration de médicaments multi-particulaires, de même le CMKC peut être un substitut prometteur pour de nouvelles formes pharmaceutiques à libération prolongée et comme matériau de cicatrisation avec des propriétés uniques en raison de sa capacité dôabsorption et de rétention dôhumidité.

Ce travail est loin dôêtre fini et il serait intéressant de faire des analyses beaucoup plus poussées pour déterminer la structure exacte du polymère modifié.