



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE SAAD DAHLEB DE BLIDA 1

Faculté de médecine

Département de pharmacie

THESE DE DOCTORAT EN SCIENCES MEDICALES

Spécialité :

PHARMACIE GALENIQUE

Présentée par

M^{me} AYACHI NABILA

Thème

**Elaboration de microcapsules biodégradables en vue d'une
libération prolongée de principe actif hydrosoluble
appartenant à la famille des antihypertenseurs**

Composition du jury

Professeur GHARBI Abdelaziz	Président	Faculté de médecine de Blida
Professeur MOUSSAOUI Nassima	Membre	Faculté de médecine d'Oran
Professeur BOUDENDOUNA Abdelhakim	Membre	Faculté de médecine d'Alger
Professeur CHADER Henni	Membre	Faculté de médecine d'Alger

Directeur de thèse

Professeur RACHID DENINE

Faculté de Médecine d'Alger

BLIDA 2020

REMERCIEMENTS

A Monsieur le Professeur

Rachid Denine

Un grand merci,

*Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de diriger ma thèse,
d'avoir toujours été présent pour me conseiller, m'orienter
et de m'avoir laissé la liberté pour la réalisation de ce
travail.*

*Veuillez croire en ma profonde reconnaissance et ma plus
haute considération.*

A Monsieur le professeur

Gharbí Abdelaziz

Un grand merci,

*Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de présider le jury de
ma thèse,*

*Veillez croire en ma profonde reconnaissance et ma plus
haute considération*

A Madame le professeur

Moussaoui nassima

Un grand merci,

Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de faire partie du jury de ma thèse,

Veillez croire en ma profonde reconnaissance et ma plus haute considération

A Monsieur le professeur

Boudendouna Abdelhakim

Un grand merci,

Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de faire partie du jury de ma thèse,

Veillez croire en ma profonde reconnaissance et ma plus haute considération

A Monsieur le professeur

Chader Henni

Un grand merci,

Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de faire partie du jury de ma thèse,

Veillez croire en ma profonde reconnaissance et ma plus haute considération

*Ce travail de recherche a été réalisé en partie au centre de
recherche et de développement CRD Saïdal, et au
Laboratoire de Recherche en Analyses Fonctionnelles des
Procédés Chimiques de l'Université de Blida*

*Je tiens à exprimer mes sincères remerciements à tous ceux
qui m'ont encouragé et aidé dans l'apprentissage et ont
rendu cette expérience fructueuse.*

*Mes vifs remerciements s'adressent également à toute ma
famille et à la mémoire de mon père.*

RESUME

L'objectif de cette thèse s'articule autour de la formulation de microcapsules à libération prolongée à base d'un principe actif médicamenteux appartenant à la famille des anti-hypertenseurs qui est l'Acébutolol, dans un système matriciel issu de l'interaction électrostatique de biopolymères. Deux techniques ont été étudiées, la première repose sur le procédé de gélification ionotropique moyennant l'alginate de sodium, un polysaccharide connu pour ses propriétés de former un gel, en présence des ions divalents comme le calcium. La deuxième technique est basée quant à elle, sur le procédé de coacervation complexe entre un polysaccharide et une protéine. Le choix de ces biopolymères est justifié par leur caractère biodégradable, bien toléré par l'organisme vivant et formulés dans des conditions aqueuses ne faisant pas appel aux solvants organiques tout en garantissant une libération prolongée et une protection optimale de la substance active.

Les résultats obtenus ont démontré l'effet prolongé de la libération du principe actif à partir de telles matrices, et ce pour les deux types de formulations. L'étude des mélanges binaires alginate de sodium et gélatine sur le plan rhéologique, électrocinétique et granulométrique, a mis en évidence un pH optimale, situé entre 3.5 et 4, où les interactions sont à leur maximum pour des ratios (Pr :Ps) compris entre 3/1 et 4/1. L'étude des profils pharmacocinétiques avec la modélisation mathématique par le modèle de **Weibull**, (pour les premières formulations) et **Kross Meyer Peppas** (pour les deuxièmes formulations), a mis en évidence un mécanisme de libération de type diffusif, et dont la constante de libération est gouvernée essentiellement par la concentration en polymère et le ratio (Pr:Ps).

Mots clés : Acébutolol, libération prolongée, gélification ionotropique, coacervation complexe, rhéologie, profil pharmacocinétique.

ABSTRACT

The objective of this work was around the formulation of sustained-release microcapsules based on a medicinal active principle belonging to the family of anti-hyper-tensors which is *Acebutolol*, in a matrix system resulting from the electrostatic interaction of biopolymers. Two techniques were studied, the first based on the ionotropic gelling process using sodium alginate, a polysaccharide known for its properties of the old gel, in the presence of divalent ions such as calcium. The second technique is based on the process of complex coacervation between a polysaccharide and a protein. The choice of these biopolymers is justified by their biodegradable nature, well tolerated by the living organism and formulated under aqueous conditions which do not use organic solvents while guaranteeing prolonged release and optimal protection of the active substance.

The results obtained demonstrated the prolonged effect of the release of the active ingredient from such matrices, for both types of formulation. The study of the binary mixtures of sodium alginate and gelatin on the rheological, electrokinetic and granulometric level, highlighted an optimal pH of maximum interaction at ratios (Pr: Ps) between 3/1 and 4/1. The study of pharmacokinetic profiles with mathematical modeling by the Weibull model, (for the first formulations) and *Kross Meyer Peppas* (for the second formulations), indicated a release mechanism of the diffusion type, and whose constant of release is mainly governed by the polymer concentration and the ratio (Pr: Ps)

Key words: Protein, Polysaccharide, Prolonged release, Ionotropic gelation, coacervation complex, Rheology, pharmacokinetic profile.

ملخص

يدور الهدف من هذه الأطروحة حول صياغة كبسولات متناهية الصغر مستندة إلى مادة طبية ينتمي إلى عائلة مضادات فاعل لضغط الدموي الزائد التي هي **Acébutolol** ، في نظام مصفوفة ناتج عن التفاعل كهربياء من البوليمرات الحيوية. تمت دراسة أسلوبيين ، الأول يعتمد على عملية التجلط الأيونوتروبيك باستخدام ألجينات الصوديوم ، وهو عديد السكاريد المعروف بخصائصه المكونة للجيل ، في وجود أيونات ثنائية التكافؤ مثل الكالسيوم. تعتمد التقنية الثانية على عملية التعقيم المعقدة بين السكاريد والبروتين. هناك ما يبرر اختيار هذه البوليمرات الحيوية بطبيعتها القابلة للتحلل ، والتي يتحملها الكائن الحي بشكل جيد ويتم صياغتها في ظل ظروف مائية لا تتطلب المذيبات العضوية مع ضمان الإطلاق المطول والحماية المثالية للمادة الفعالة.

أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها التأثير المطول لإطلاق العنصر النشط من هذه المصفوفات ، لكلا النوعين من التركيب. أبرزت دراسة المخاليط الثنائية من ألجينات الصوديوم والجيلاتين على المستوى الريولوجي والكهربائي والحيوي ، درجة الحموضة المثلى للتفاعل الأقصى عند النسب (**Pr: Ps**) بين 1/3 و 1/4. كشفت دراسة التشكيلات الدوائية ذات النمذجة الرياضية لنموذج **Weibull** (للمستحضرات الأولى) و **Kross Meyer Peppas** (للتراكيبات الثانية) ، عن آلية إطلاق لنوع الانتشار ، وثابتة يحكم الإطلاق أساساً تركيز البوليمر والنسبة (**Pr: Ps**)

الكلمات المفتاحية : البروتين ، السكاريد ، الإفراج المطول ،
التجلط الأيوني ، التخليق المركب ، الملف الدوائي.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION.....	1
--------------------------	----------

PARTIE 1 : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I

CONTEXTE DE LIBERATION PROLONGEE ET FORMES

GALENIQUES A LIBERATION PROLONGEE

I.1 Formes galéniques à libération modifiée destinées à la voie orale.....	6
I.1.1. Notion de la libération modifiée/conventionnelle.....	6
1.1.2. Classification selon le mode de libération.....	7
I.2. Formes galéniques solides à libération prolongée destinée à la voie orale.....	10
I.2.1. Définition.....	10
I.2.2. Polymères responsables de la libération prolongée.....	10
I.3. Intérêts et limites des formes à libération prolongée	11
I.3.1. Avantages.....	11
I.3.2. Inconvénients.....	11
I.4. Mécanismes de libération de PA à partir des formes à libération prolongée.....	12
I.4.1 la dissolution.....	12
I.4.2 la diffusion.....	13

I.4.2.1. Systèmes hétérogènes.....	13
I.4.2.2. Systèmes homogènes.....	14
I.4.2.3. Systèmes réservoirs	14
I.4.2.4. Systèmes matriciels.....	16
I.4.3. Systèmes contrôlés chimiquement.....	18
▪ La bio-résorption et la biodégradation.....	18
▪ La bio-érosion	18
I.4.4 Systèmes contrôlés par le solvant.....	19
• Système osmotique.....	19
I.4.5. Les systèmes contrôlés par gonflement	21

CHAPITRE II

LA MICROENCAPSULATION

II.1. Généralité sur la microencapsulation.....	23
II.2. Historique	23
II.3. Définition de la microencapsulation.....	25
II.4. Structure interne des microcapsules.....	26
II.5. Les avantages de la microencapsulation.....	27
II.6. Mode de libération des principes actifs à partir des microcapsules.....	28
II.7. Les applications de la microencapsulation	29
II.8. Procédés de microencapsulation.....	31
II.8.1. Procédés physico-chimiques	32
II.8.2. Procédés chimiques	36
II.8.3. Procédés mécaniques.....	38
II.9. Principaux matériaux d'encapsulation.....	40

CHAPITRE III

LES INTERACTIONS PROTEINES POLYSACCHARIDES

III.1. Rappels sur les interactions protéines/polysaccharides	43
III.2. Comportement des mélanges protéines-polysaccharides.....	43
III.3. Natures des interactions protéines polysaccharides	45
III.4. Paramètres physico-chimiques influençant la formation des complexes protéines polysaccharides.....	46
III.4.1. Influence du pH.....	47
III.4.2. Influence de la force ionique.....	48
III.4.3. Influence de la densité de charge macromoléculaire.....	50
III.4.4. Influence de la masse moléculaire des biopolymères	50
III.4.5. Influence du ratio massique protéines polysaccharides.....	48
III.5. Biopolymères à l'étude	51
III.5.1. L'alginate de sodium	51
III.5.2. La gélatine	54
III.5.3 Chitine et chitosane	57

PARTIE 2 : PARTIE EXPERIMENTALE

CHAPITRE IV :

MATERIELS ET METHODES

Introduction et objectifs d'étude.....	63
IV. 1. Matériels d'étude.....	65
IV.1.1 Matières premières et réactifs	65
IV.1.2. Equipements	71
IV.2 Méthodes d'étude.....	77
IV.2.1Méthodes de préparation.....	77
IV.2.2 Méthodes de caractérisation.....	89

CHAPITRE V

RESULTATS ET DISCUSSION

V.1. Préparation des microcapsules par le procédé de complexation par les ions Calcium.....	112
V.1.1. Aspect macroscopique des microcapsules.....	112
V.1.2 Analyse microscopique et granulométrie	115
V.1.3. Caractérisation Morphologique au microscope électronique à balayage MEB.....	120
V.1.4. Le rendement d'encapsulation	122
V.1.5. Le taux d'encapsulation	123
V.1.6. Cinétique de Gonflement et d'érosion des microcapsules	124
V.I.7 Résultats de la caractérisation par spectroscopie à infrarouge.....	129
V.1.8. Résultats de l'étude de la cinétique de dissolution.....	133

V.II. Etude des mélanges binaires gélatine / Alginate de sodium.....	150
V.II.1. Variation de l'absorbance des mélanges Gélatine/Alginate de sodium à 600nm en fonction du pH et du ratio	150
V.II.2. Aspect microscopique	154
V.II.3. Observations macroscopiques des mélanges gélatine /alginate.....	154
V.II.4. Etude du potentiel électrophorétique (le potentiel zêta) obtenue dans le mélange... Gélatine / alginate de sodium	160
V.II.5. Caractérisation rhéologique des mélanges biopolymériques (Pr/Ps) à différents pH et différents ratios.....	164
V.II.6. Caractérisation granulométrique du mélange gélatine/ alginate de sodium.....	181
 V.III. Préparation des microcapsules par le procédé de coacervation complexe.....	 182
V.III.1. Le rendement et taux d'encapsulation.....	182
V.III.2. Aspect au microscope optique et MEB des essais.....	182
V.III.3. Cinétique de dissolution avec modélisation	186
V.III.4. Comportement viscoélastique des mélanges de polymères	191
V.III.5. Caractérisation par spectroscopie à infra-rouge.....	192
V.III.6. Modélisation en surface de réponse.....	194
 CONCLUSION	 207
Références Bibliographiques.....	211
Annexes.....	232

LISTE DES FIGURES

FIGURE	Page
PARTIE THEORIQUE	
CHAPITRE I	
Figure I.1 : Profil de libération des formes conventionnelles	7
Figure I.2 : Evaluation des concentrations plasmatiques en fonction du type de forme de libération administré par voie extravasculaire	9
Figure I.3 : profil différentiel de libération d'une forme rapide et une forme lente	11
Figure I.4 : Système avec alternance de principe actif et des couches de contrôle de dissolution	12
Figure I.5 : Système avec des couches différentes de contrôle de dissolution	13
Figure I.6 : Représentation des systèmes macro et microporeux	14
Figure I.7 : Schéma d'un dispositif réservoir	15
Figure I.8 : représentation schématique de la libération d'un PA dans un système matriciel par les mécanismes d'érosion et de diffusion	19
Figure I.9 : Représentation schématique du système osmotique	20
Figure I.10 : représentation schématique du système OROS pusch-pull	21
CHAPITRE II	
Figure II.1. Evolution du nombre d'articles scientifiques et de brevets publiés par année dans le domaine de la microencapsulation	25
Figure II.2 : Photographies obtenues par microscopie électronique à balayage	26
Figure II.3: Schématisation des différentes étapes d'un procédé de microencapsulation par Évaporation de solvant	35
Figure II.4 : Schéma de microencapsulation par gélification de gouttes	36
Figure II.5 : Schéma de microencapsulation par polycondensation	37
Figure II.6 schéma du procédé de polymérisation interfaciale	38
Figure II.7: Étape de formation d'un film d'enrobage par spray-coating sur des particules solides	40
CHAPITRE III	
Figure III.1 : Représentation schématique des différentes situations de mélange protéines polysaccharides en solution aqueuse	43
Figure III.2: Représentation schématique de différentes étapes de complexation entre protéines et polysaccharides de charges opposées en fonction du pH	48
Figure III.3 : Structure et composition de l'alginate : (a) monomères d'acides uroniques, (b) conformation des chaines et (c) distribution des blocs	52
Figure III.4 : Gélification de l'alginate par des ions calcium, selon de modèle "boite d'oeufs".	53
FigureIII.5 : Equilibre de charges au point isoélectrique	54
Figure III.6 : Structure chimique du chitosane	58
PARTIE EXPERIMENTALE	
CHAPITRE IV : MATERIELS ET METHODES	
Figure IV.1 : Alginate de sodium	68
FigureIV.2 : photo de la gélatine poudre	69
FigureIV.3 : Interaction de la lumière avec une particule	73
Figure IV.4 : Vue schématique de la double couche électrique	75

FigureIV.5 : Fonctionnement d'un spectrophotomètre à Infra-Rouge	76
Figure IV.6 : Procédé de gélification de gouttes d'alginate	78
FigureIV.7 : Gélification de l'alginate de sodium par les ions calcium	74
FigureIV.8 : schéma du procédé de fabrication des microcapsules par le procédé de gélification par les ions calcium	81
FigureIV.9 : schéma du protocole utilisé pour la préparation des microcapsules par coacervation	87
Figure IV.10 : Schéma explicatif du phénomène de perte linéaire de photons mesuré par la turbidité du milieu	89
Figure IV.11 : Représentation schématique d'une mesure rhéométrique en mode oscillatoire	92
Figure IV.12 : Schéma représentant un cisaillement d'un matériau entre deux plans	93
FigureIV.13 : Circuit des analyses rhéologiques	95
FigureIV.14 : Rhéogramme d'un fluide newtonien	96
Figure IV.15 : Rhéogramme d'un fluide de Bingham.	98
Figure IV.16: Rhéogramme d'un fluide de Casson	98
Figure IV.17 : Rhéogramme d'un fluide rhéofluidifiant	99
Figure IV.18 : Variation de la viscosité en fonction de la vitesse de déformation.	99
Figure IV.19: Rhéogramme d'un fluide rhéopaissant.	100
Figure IV.20 : Variation de la viscosité en fonction de la vitesse de déformation	100
FigureIV.21 : Test de viscoélasticité pour un essai type (C_p 2%, $ratio$ 3/1, pH 3.5)	102
Figure IV.22 : Courbe d'écoulement pour un essai type (C_p 2%, $ratio$ 3/1, pH 3.75)	102
Figure IV.23 : Récapitulatif des dilutions préparées pour le test de linéarité	108
CHAPITRE V : RESULTATS ET DISCUSSION	
Figure V.1: Gélification de l'alginate de sodium par les ions calcium	115
Figure V.2 : Aspect morphologique au microscope électronique à balayage de quelques Essais	121
FigureV.3 : Cinétique de gonflement et d'érosion des microcapsules Proportion Alg:gél 80/20	125
FigureV.4: Cinétique de gonflement et d'érosion des microcapsules Proportion Alg:gél 70/30	125
FigureV.5: Cinétique de gonflement et d'érosion des microcapsules Proportion Alg:gél 60/40	126
FigureV.6: Cinétique de gonflement et d'érosion des microcapsules Proportion Alg:gél 50/50	126
FigureV.7: Cinétique de gonflement et d'érosion des microcapsules Proportion Alg:gél 40/60	127
FigureV.8: Cinétique de gonflement et d'érosion des microcapsules Proportion Alg:gél 30/70	127
FigureV.9: Cinétique de gonflement et d'érosion des microcapsules Proportion Alg:gél 20/80	128

Figure V.10 : Spectre infrarouge de l'alginate de sodium matière première	131
Figure V.11 : Spectre infrarouge de l gélatine matière première	131
Figure V.12 : Spectre infrarouge du principe actif Acébutolol matière première	132
Figure V.13 : Spectre infrarouge des microcapsules gélifiées par les ions calcium	133
FigureV.14 : Profil de dissolution d'un essai type (Ratio Alg / géla70/30, PA/Poly :1/1)	135
FigureV.15 : Profil de dissolution d'un essai type (Ratio Alg : géla70/30 , PA/Poly :1/2)	135
FigureV.16 : Profil de dissolution d'un essai type (Ratio Alg : géla70/30, PA/Poly :1/3)	136
FigureV.17 : Profil de dissolution d'un essai type (Ratio Alg : géla30/70, PA/Poly :1/1)	136
FigureV.18 : Profil de dissolution d'un essai type (Ratio Alg : géla30/70 , PA/Poly :1/2)	136
FigureV.19 : Profil de dissolution d'un essai type (Ratio Alg : géla30/70 , PA/Poly :1/3)	137
Figure V.20 : Formation d'un gel d'alginate par les cations calcium formant un gel en boîte à œuf « egg –box »	138
Figure V.21 : Cinétique de dissolution selon le modèle d'ordre zéro pour l'essai 1	142
Figure V.22 : Cinétique de dissolution selon le modèle d'ordre 1 pour l'essai 1	143
Figure V.23 : Cinétique de dissolution selon le modèle de Weibull pour l'essai 1	143
Figure V.24 : Cinétique de dissolution selon le modèle de Weibull pour l'essai R40/60 1/1	145
Figure V.25 Cinétique de dissolution de l'essai R20/80 1/1 ajusté par le modèle de Weibull	146
Figure V.26 Cinétique de dissolution de l'essai R50/50 1/1 ajusté par le modèle de Weibull	146
Figure V.27 Cinétique de dissolution de l'essai R60/40 1/1 ajusté par le modèle de Weibull	147
Figure V.28 Cinétique de dissolution de l'essai R70/30 1/1 ajusté par le modèle de Weibull	147
Figure V.29 Cinétique de dissolution de l'essai R80/20 1/1 ajusté par le modèle de Weibull	148
Figure V.30 Cinétique de dissolution de l'essai R100/0 1/1 ajusté par le modèle de Weibull	148
Figure V31. Influence de la Variation du paramètre α de Weibull	149
FigureV.32 : Variation de l'absorbance en fonction du pH pour le ratio Pr : Ps Gélatine Alginate de sodium 1/1	151
Figure V.33 : Variation de l'absorbance en fonction du pH pour le ratio Pr : Ps Gélatine	151

Alginate de sodium 2/1	
Figure V.34 : Variation de l'absorbance en fonction du pH pour le ratio Pr : Ps Gélatine Alginate de sodium 3/1	152
Figure V.35 : Variation de l'absorbance en fonction du pH pour le ratio Pr : Ps Gélatine Alginate de sodium 4/1	152
Figure V.36 : observations microscopiques des différents essais à pH 2	154
Figure V.37: Photo microscopique des différents essais à pH 2.5	155
Figure V.38 : Photo microscopique des différents essais à pH 3	155
Figure V.39 : Photo microscopique des différents essais à pH 3.5	155
Figure V.40 : Photo microscopique des différents essais à pH 4	156
Figure V.41: observation visuelle des essais au ratio Pr : Ps Gélatine/ Alginate de sodium 1/1 à différents pH	157
Figure V.42 : observation visuelle des essais au ratio Pr : Ps Gélatine/ Alginate de sodium 2/1 à différents pH	158
Figure V.43 : observation visuelle des essais au ratio Pr : Ps Gélatine/ Alginate de sodium 3/1 à différents pH	158
Figure V.44: observation visuelle des essais au ratio Pr : Ps Gélatine/ Alginate de sodium 4/1 à différents pH	159
Figure V.45 : Résultats de mesure du potentiel zêta. (a) : pic du potentiel zêta, (b) : courbe d'atténuation	160
Figure V.46 : Variation du potentiel zêta en fonction du pH pour le ratio Pr : Ps Gélatine Alginate de sodium R1/1	161
Figure V.47 : Variation du potentiel zêta en fonction du pH pour le ratio Pr : Ps Gélatine Alginate de sodium R 2/1	162
Figure V.48: Variation du potentiel zêta en fonction du pH pour le ratio Pr : Ps Gélatine Alginate de sodium 3/1	162
Figure V.49 : Variation du potentiel zêta en fonction du pH pour le ratio Pr : Ps Gélatine Alginate de sodium 4/1	163
Figure V.50 : Test de viscoélasticité d'un essai type R3/1 pH 3.5 à 25°C	165
Figure V.51 Courbe de viscoélasticité d'un essai type R3/1 pH 3.5	165
Figure V.52 Courbe de viscoélasticité d'un essai type R3/1 pH 3.5	167
Figure V.53 : variation du module de conservation G' en fonction du pH pour le ratio 2/1	168

Figure V.54 : variation du module de conservation G' en fonction du pH pour le ratio 3/1	168
Figure V.55 : Variation du module de conservation G' en fonction du pH pour le ratio 4/1	169
Figure V.56 : Variation du module de conservation G' en fonction des ratios pour le pH 3	170
Figure V.57 : Variation du module de conservation G' en fonction des ratios pour le pH 3.5	170
Figure V.58 : Variation du module de conservation G' en fonction des ratios pour le pH 4	171
Figure V.59 : Courbe d'écoulement d'un essai type ratio 3/1 pH 6	172
Figure V.60 : Courbe d'écoulement d'un essai type R3/1 ajusté par le modèle de Carreau	174
Figure V.61 : Variation de la contrainte en fonction de la vitesse de cisaillement d'un essai type R3/1	174
Figure V.62: Variation de la viscosité de Carreau du ratio R3/1 en fonction du pH	178
Figure V.63: Variation de la viscosité de Carreau du ratio R4/1 en fonction du pH	179
Figure V.64 : Variation de la viscosité en fonction de la vitesse de cisaillement pour R3/1 à différents pH	180
Figure V.65 : Variation de la viscosité en fonction de la vitesse de cisaillement pour R4/1 à différents pH	180
Figure V.66 : Variation du diamètre moyen D32 en fonction du pH et à différents ratios	181
Figure V.67 : profil de dissolution d'un essai type de microencapsulation par coacervation (N°5)	186
Figure V.68 : Cinétique de dissolution d'un essai type n°1 ajusté par un modèle d'ordre zéro	189
Figure V.69 : Cinétique de dissolution d'un essai type n°1 ajusté par un modèle d'ordre un	189
Figure V.70 : Cinétique de dissolution d'un essai type n°1 ajusté par un modèle de Krossmeyer Peppas	190
Figure V.71 : Cinétique de dissolution d'un essai type n°1 ajusté par un modèle d'Higuchi	190
Figure V.72. : Cinétique de dissolution d'un essai type n°1 ajusté par un modèle de Weibull	191
Figure V.73. variation du module de perte et module de conservation pour essai N°4 en fonction de la déformation	192
Figure V.74.a: Spectre infrarouge des microcapsules obtenues par coacervation de la gélatine et alginate de sodium sans PA	193
Figure V.74.b: Spectre infrarouge des microcapsules obtenues par coacervation de la gélatine et alginate de sodium avec PA	
Figure V.75 Histogramme illustrant les indicateurs de qualité au sens statistique des réponses	196

Figure V.76 : Contours iso- K_{kp} en fonction de la variation simultanée des deux facteurs Con_{poly} et Ratio Gél/Alg	197
Figure V.77 Contours iso- K_{kp} en fonction de la variation simultanée des deux facteurs Con_{poly} et Ratio Gél/Alg à faible concentration de chitosane	198
Figure V.78 Contours iso- K_{kp} en fonction de la variation simultanée des deux facteurs Con_{poly} et Ratio Gél/Alg à forte concentration de chitosane	199
Figure V.79 Contours iso-Exp n en fonction de la variation simultanée des deux facteurs Con_{poly} et Ratio Gél/Alg	199
Figure V.80 Contours iso-Exp n en fonction de la variation simultanée des deux facteurs Con_{poly} et Ratio Gél/Alg	200
Figure V.81 Contours iso-Taux d'encapsulation en fonction de la variation simultanée des deux facteurs Con_{poly} et Ratio Gél/Alg	201
Figure V.82 Contours iso-Rend en fonction de la variation simultanée des deux facteurs Con_{poly} et Ratio Gél/Alg	202
Figure V.83: Représentation de la contribution de chaque terme des modèles de surface de réponse pour la réponse constante de vitesse K.	203
Figure V.84: Représentation de la contribution de chaque terme des modèles de surface de réponse pour la réponse de l'exposant n.	204
Figure V.85: Représentation de la contribution de chaque terme des modèles de surface de réponse pour la réponse module de conservation G'.	204
Figure V.86: Représentation de la contribution de chaque terme des modèles de surface de réponse pour le rendement.	205
Figure V.87: Représentation de la contribution de chaque terme des modèles de surface de réponse pour la réponse taux d'encapsulation	205

LISTE DES TABLEAUX

PARTIE THEORIQUE	
Tableaux	Page
Tableau I: Les différents domaines d'application de la microencapsulation	30
Tableau II : Classification des techniques d'encapsulation selon la nature du procédé	33
Tableau III : Matières utilisées dans les procédés de microencapsulation	41
Tableau IV: Différentes fractions en acides aminés entrant dans la composition de la gélatine	55
PARTIE EXPERIMENTALE	
Matériels et méthodes	
Tableau I : Résumé des caractéristiques physico-chimiques du principe actif	65
Tableau II : Propriétés physico-chimiques de l'alginate de sodium	69
Tableau III : Propriétés physico-chimiques de la gélatine	70
Tableau IV : Propriétés physico-chimiques du Chitosane	71
Tableau V: listes des équipements de préparation utilisés	71
Tableau VI : liste des équipements de caractérisation	72
Tableau VII: Matrice des essais de formulation des microcapsules par le procédé de gélification ionotropique	79
Tableau VIII : La matrice des essais des mélanges gélatine alginate de sodium.	83
Tableau IX : Matrice des essais de microcapsules préparées par le procédé de coacervation	86
Résultats et discussions	
Tableau I : Aspect macroscopique des microcapsules	112
Tableau II : Aspect microscopique des microcapsules	116
Tableau III : de résultats de l'analyse granulométrique en distribution et en cumulée	118
Tableau IV : Représentation des résultats du rendement d'encapsulation	122
Tableau V : Représentation des résultats du taux d'encapsulation	123
Tableau VI : Représentation des résultats de gonflement et d'érosion en fonction du temps	124
Tableau VII: Fréquences des principales bandes IR caractéristiques de l'alginate de sodium	129
Tableau VIII : Fréquences des principales bandes IR caractéristiques de la gélatine	130
Tableau IX : Fréquences des principales bandes IR caractéristiques du Pa Acébutolol	130
Tableau X : Résultats des pourcentages de dissolution des essais	134

Tableau XI: Résultat de l'Ajustement mathématique par des modèles de dissolution	140
Tableau XII: Résultats des paramètres statistiques du modèle de Weibull	144
Tableau XIII : Variation de l'absorbance en fonction du pH et du ratio protéine polysaccharide Pr: Ps Gélatine : Alginate de sodium	150
Tableau XIV : Variation du potentiel zêta en fonction du pH a différents ratios	161
Tableau XV : Résultats de G' et G'' en fonction du pH à différents ratios	166
Tableau XVI : Paramètres du modèle de Carreau caractéristique du comportement visqueux des mélanges protéine-polysaccharide pour le ratio R 1/1 à différent pH	175
Tableau XVII: Paramètres du modèle de Carreau caractéristique du comportement visqueux des mélanges protéine-polysaccharide pour le ratio R 2/1 à différent pH	175
Tableau XVIII : Paramètres du modèle de Carreau caractéristique du comportement visqueux des mélanges protéine-polysaccharide pour le ratio R 3/1 à différent pH	176
Tableau XIX : Paramètres du modèle de Carreau caractéristique du comportement visqueux des mélanges protéine-polysaccharide pour le ratio R 4/1 à différent pH	176
Tableau XX : Aspect microscopique des microparticules obtenues	183
Tableau XXI : Aspect microscopique MEB des microparticules obtenues	184
Tableau XXII : coefficients de détermination R_2 et paramètres des modèles de dissolutions	188
Tableau XXIII: Valeurs des réponses retenues des essais de la matrice d'expérience	195
Tableau XXIV : Coefficients des termes des différents modèles de surface de réponses	202

Liste des abréviations

PA	Principe actif
LP	Libération prolongée
USP	United States Pharmacopoeia
Ph.Eur	Pharmacopée européenne
pH	Potentiel hydrogène
μm	Micromètre
E/H	Eau/Huile
pH_{IE}	pH isoélectrique
pK_a	Constante d'acidité
P	Poids
Pr	Protéine
Ps	Polysaccharide
C	Concentration
λ	Longueur d'onde
σ (t)	Contrainte sinusoïdale
ω	Pulsation des oscillations
$\dot{\gamma}(\text{s}^{-1})$	Vitesse de cisaillement
γ (%)	Déformation
η_{app} (Pa.s)	Viscosité de cisaillement apparente
G' (Pa)	Module de conservation
G'' (Pa)	Module de perte
T°C	Température
T	Temps
FDA	<i>Food Drug Administration</i>
BCS	<i>Biopharmaceutic Classification Système</i>

Introduction générale

Introduction et problématique

L'idéal pour un galéniste est de parvenir à une formulation pharmaceutique de telle sorte qu'on puisse obtenir un début d'action rapide et de maintenir cette action aussi longtemps que possible, grâce à des concentrations sanguines en principes actifs, stables et au seuil de l'efficacité [1].

Cette mission ô combien complexe nécessite une parfaite connaissance et maîtrise des nouvelles formes pharmaceutiques avec tous ce que cela implique comme techniques et procédés de fabrication et de contrôle, orientés vers le prolongement et la modulation de libération du PA à partir de sa matrice, d'où le concept de libération prolongée.

La microencapsulation est une méthode très intéressante qui permet à la fois de protéger la matière encapsulée mais aussi de prolonger sa libération tout en assurant une stabilité optimale. Ces dernières années le recours à des polymères biodégradables en tant que véhicules médicamenteux a permis l'administration de microparticules chargées en principe actif pour une libération prolongée sous forme d'implant biodégradable sans avoir recours à les retirer une fois la substance médicamenteuse libérée. Aujourd'hui les microcapsules biodégradables constituent des systèmes thérapeutiques de choix qui ont fait l'objet de nombreuses études faisant application à des molécules pharmaceutiques variées tels les stéroïdes et les anticonceptionnels [2].

Néanmoins le défi des chercheurs est l'utilisation de ces microcapsules biodégradables dans le cas de principes actifs très fragiles de demi-vie plasmatique assez courte, ou dont la biodisponibilité par voie conventionnelle est faible, c'est le cas notamment de macromolécules biologiquement actives tels les peptides, les protéines, les antigènes ainsi que différentes molécules de nature hydrophile à l'exemple des molécules à activité cardiovasculaire comme les bêtabloquants. Lesdites molécules souffrent à la fois d'une faible demi-vie biologique et un coefficient d'extraction hépatique élevé [3].

La majorité des travaux de recherche effectués sur l'encapsulation des médicaments a porté sur les ingrédients liposolubles (faiblement solubles) et le peu d'études effectuées sur l'encapsulation dans le domaine pharmaceutique ont utilisé des matériaux non biodégradables nécessitant des solvants organiques souvent toxiques [4].

Les biopolymères tels que les polysaccharides et les protéines, largement disponibles dans la nature et en plus facilement biodégradables constituent une source intéressante de matériaux nécessaires à l'encapsulation des principes actifs médicamenteux hydrosolubles par la formation de complexe. Ce type de biopolymère en raison de leur charge (cationique ou anionique) permet de former des complexes sur une grande gamme de pH qui convient bien aux principes actifs hydrosolubles, généralement polaires ou chargés, qui seront donc attirés par l'un ou l'autre des biopolymères pendant le mécanisme de complexation [5].

Aujourd'hui la microencapsulation d'ingrédient pharmaceutique par les biopolymères, vise à comprendre certains aspects liés aux interactions entre biopolymères et l'utilisation de ce type d'interactions en vue de concevoir des microcapsules pour la libération prolongée ou contrôlée de principe actif hydrosoluble (à demi-vie plasmatique courte) et la compréhension des mécanismes mis en jeu [6].

Vu l'intérêt grandissant des substances médicamenteuses hydrosolubles administrables sous cette forme galénique, nous avons orienté notre étude vers le développement de microcapsules biodégradables à base de principe actif hydrosoluble appartenant à la famille des anti-hypertenseurs. La matrice d'encapsulation est issue du complexe formé entre biopolymères de type polysaccharides / protéines donc biodégradables, à travers la mise à profit des interactions électrostatiques en vue de générer un complexe polymérique pouvant maîtriser voire contrôler la libération de ce type de principe actif.

L'objectif de cette thèse s'articule autour de la formulation de microcapsules à libération prolongée à base d'un principe actif médicamenteux appartenant à la famille des anti-hypertenseurs dans un système matriciel issu de l'interaction électrostatique de biopolymères protéine et des polysaccharides, par la technique de coacervation complexe.

L'intérêt de cette matrice n'est plus à démontrer puisqu'il s'agit de matrice biodégradable à base de biopolymères bien tolérés par l'organisme vivant et formulée dans des conditions aqueuses ne faisant pas appel aux solvants organiques tout en garantissant une libération prolongée et une protection optimale de la substance active.

Pour notre étude, le choix de la substance médicamenteuse candidate Acébutolol est justifié par deux arguments essentiels :

- D'abord du fait qu'elle appartient aux médicaments antihypertenseurs (AHT) de la famille des bêtabloquants, prescrits généralement pour un traitement de longue durée (maladies chroniques), nécessitant une concentration plasmatique efficace soutenue. Néanmoins cette molécule est caractérisée par une cinétique d'élimination, par les voies biologiques, très rapide donc une demi-vie plasmatique assez courte. L'adaptation de telle molécule en forme à libération prolongée et soutenue constitue un véritable challenge dans la formulation galénique méritant d'être étudié.
- D'autre part et du point de vue chimique cette substance est caractérisée par sa grande hydro-solubilité ce qui rend aussi son adaptation en forme à libération soutenue ou prolongée très difficile en raison de sa grande diffusion à travers les matrices conventionnelles.

Ce manuscrit a été structuré comme suit :

Une partie étude bibliographique subdivisée en trois chapitres :

- **Le chapitre I** : consacré au rappel des formes à libération prolongée leur classification et les mécanismes de libération du PA mis en jeu.
- **Le chapitre II** : fait état de la microencapsulation son intérêt et application, ainsi que les méthodes de caractérisation.
- **Le chapitre III** : développe les types d'interactions entre les protéines et les polysaccharides et les divers facteurs influençant le mécanisme de coacervation.

Une partie travaux personnels qui comprend essentiellement deux chapitres :

- **Chapitre IV** : dédié aux matériels et méthodes des études expérimentales, dans lequel nous décrivons le matériel utilisé, la préparation des échantillons, les protocoles expérimentaux ainsi que les différentes techniques utilisées pour la caractérisation granulométrique, électrocinétique, rhéologique et biopharmaceutique des formulations préparées.
- **Chapitre V** : consacré aux résultats obtenus et leurs discussions selon la chronologie des étapes parcourues à savoir :
 - Microencapsulation par le premier procédé de gélification ionotropique : où on exposera les résultats des différentes caractérisations technologiques et biopharmaceutiques des microcapsules.
 - Étude des interactions issues des mélanges binaires gélatine-alginate de sodium lorsqu'ils sont en présence concomitante en solution aqueuse, en mettant en exergue les éventuelles interactions en faveur de la formation de complexes et par conséquent, nous identifierons les conditions optimales qui mènent à cette complexation, et ceci en exploitant diverses techniques de caractérisation rhéologique, spectroscopique et autres.
 - Microencapsulation par le deuxième procédé : la coacervation complexe, les microcapsules obtenues seront caractérisées et évaluées sur le plan physicochimique et biopharmaceutique.

Ce travail s'achève par une conclusion et ouvre des perspectives méritant d'être poursuivies et développées postérieurement.

Chapitre I :

Formes galéniques à libération prolongée : concept et mécanisme de libération

I. Formes galéniques à libération modifiée destinées à la voie orale

I.1. Notion de la libération modifiée/conventionnelle

Pour que le principe actif (PA) exerce de façon efficace son activité thérapeutique, il est nécessaire que sa concentration sanguine atteigne un taux suffisant pour un effet thérapeutique mais pas supérieur au seuil de toxicité. Cette fourchette de concentration sanguine est nommée « Zone thérapeutique » [7] (Figure I.1). Ainsi, pour satisfaire ces exigences d'absorption et de concentration sanguine, l'administration orale requiert certains critères telles que :

- La solubilité du PA dans le tube digestif
- L'absorption du PA à travers la barrière gastro-intestinale
- La distribution du PA à travers l'organisme jusqu'à sa cible.

La forme pharmaceutique est une présentation du PA qui peut néanmoins participer à son activité thérapeutique. Les systèmes d'administration des médicaments consistent en des formulations ou des technologies permettant au PA de satisfaire aux exigences citées précédemment et d'atteindre sa cible pour y exercer son action thérapeutique. Ces systèmes d'administration sont primordiaux pour une administration efficace, sûre et pratique.

Ainsi, pour améliorer l'efficacité des PA, des systèmes d'administration existent pour modifier et moduler leur solubilité, restreindre leur libération à un site spécifique, ou réduire leur dégradation indésirable dans l'estomac ou dans la circulation sanguine [8-10].

Les formes à libération conventionnelle (immédiate) sont des formes pour lesquelles la libération du principe actif n'a pas fait l'objet d'une modification délibérée résultante de la mise en œuvre d'une formulation particulière et/ou d'un procédé de fabrication spécial. Dans ce cas, le profil de dissolution du principe actif dépend essentiellement de ses propriétés intrinsèques.

Les formes à libération modifiée sont des formes pharmaceutiques préparées avec des excipients spéciaux ou par des procédés particuliers, ou les deux, visant à modifier la vitesse, le lieu où le moment de libération de la (ou des) substance(s) active(s). Ce sont des préparations dont la vitesse de libération du (ou des) principe(s) actif(s) est inférieure ou supérieure à celle qu'assurerait la forme à libération conventionnelle administrée par la même voie [11].

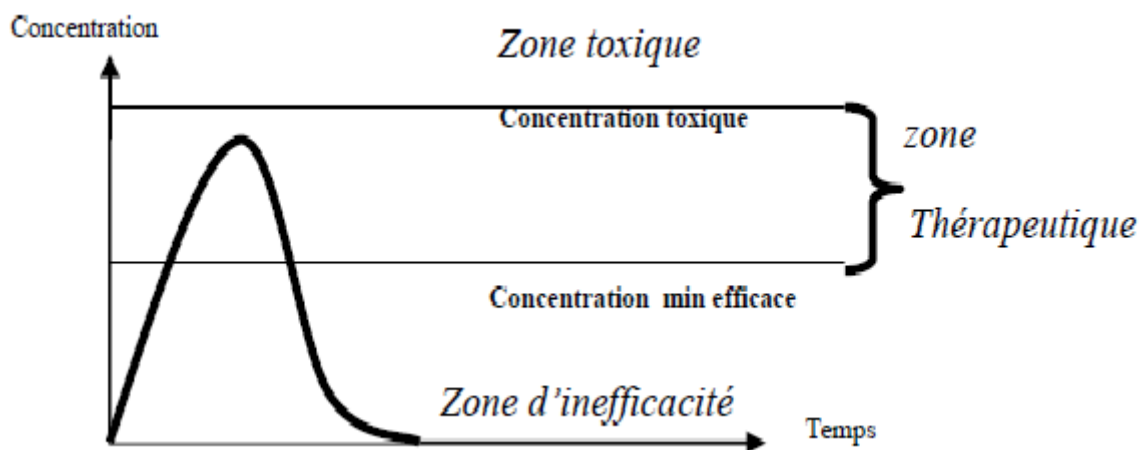


Figure I.1 : Profil de libération des formes conventionnelles [7]

I.1.2. Classification des formes galénique selon le mode de libération

La phase d'absorption des PA est intimement liée à la phase de libération de sa formulation galénique et de dissolution dans le milieu biologique correspondant au site d'administration. Ainsi la phase de libération et celle de dissolution sont les facteurs limitant de la phase d'absorption. Ces facteurs limitant sont les outils de la conception des formes à libération modifiée. La vitesse de libération du PA de la forme galénique peut être accélérée, retardée, prolongée et soutenue par rapport à la libération immédiate grâce à des formulations, des excipients ou des processus de fabrication différents.

Sous l'expression « forme à libération modifiée » (modified release dosage forms), on distingue les formes à libération retardée (delayed release dosage forms) qui retardent la libération et les formes à libération ralentie (extended release dosage forms) qui prolongent ou ralentissent la libération. Les formes à libération modifiée sont celles dont la vitesse de libération est modifiée par rapport à la vitesse de libération immédiate ou conventionnelle [14].

En plus des formes à libération immédiate, la classification des formes galéniques orales à libération modifiée, selon le mode de libération du PA à partir de sa matrice peut être présentée ci-dessous [3] (Figure I.2):

- Formes galéniques à libération prolongée
- Formes galéniques à libération retardée
- Formes galéniques à libération répétée
- Formes galéniques à libération accélérée
- Formes galéniques à libération soutenue

a) Formes à libération immédiate

Appelées aussi formes à libération conventionnelle, le PA ne subit aucune restriction limitant sa libération à partir de sa forme galénique (Figure I.2. Courbes 1 et 2 en cas de double dose) [12].

b) Formes à libération prolongée

Appelée aussi formes à libération progressive (continue). Elles libèrent d'abord une dose initiale de PA : DI, puis la libération est progressive. La concentration plasmatique efficace est maintenue beaucoup plus longtemps par rapport aux formes conventionnelles. La libération prolongée est le résultat d'une formulation particulière et/ou d'un procédé de fabrication spécial. Leur préparation, quelle que soit leur voie d'administration, exige tout d'abord une connaissance parfaite des paramètres physico-chimiques et pharmacocinétiques du ou des principes actifs (Figure I.2. Courbes 3) [12].

c) Formes à libération retardée

Appelée également forme à action différée, le début de la libération présente un temps de latence par rapport à la forme conventionnelle (figure I.2. courbe 4). La libération retardée est le résultat d'une formulation particulière ou un procédé de fabrication spécial [13].

d) Formes à libération répétée

Appelée aussi forme à libération fractionnée, dont les particules de principe actif sont séparées en plusieurs fractions de vitesse de dissolution différente. Elles permettent d'obtenir des concentrations plasmatiques décroissantes au cours du temps, mais toujours supérieure à la concentration minimale efficace pendant environ 12 heures (Figure I.2. courbe 5) [12].

e) Forme à libération accélérée

C'est un type particulier de forme à libération modifiée se caractérisant par une vitesse de libération du principe actif supérieure à celle qu'assurait la forme à libération conventionnelle administrée par la même Voie [12].

f) Forme à libération soutenue

Ces formes libèrent une dose initiale (DI) suffisante pour aboutir rapidement à la réponse pharmacologique désirée. Elles continuent à libérer ensuite le principe actif pour maintenir le niveau initial d'activité [12]. La figure I.2 résume les différents cas mentionnés précédemment sous forme de courbures.

Concentration
plasmatique

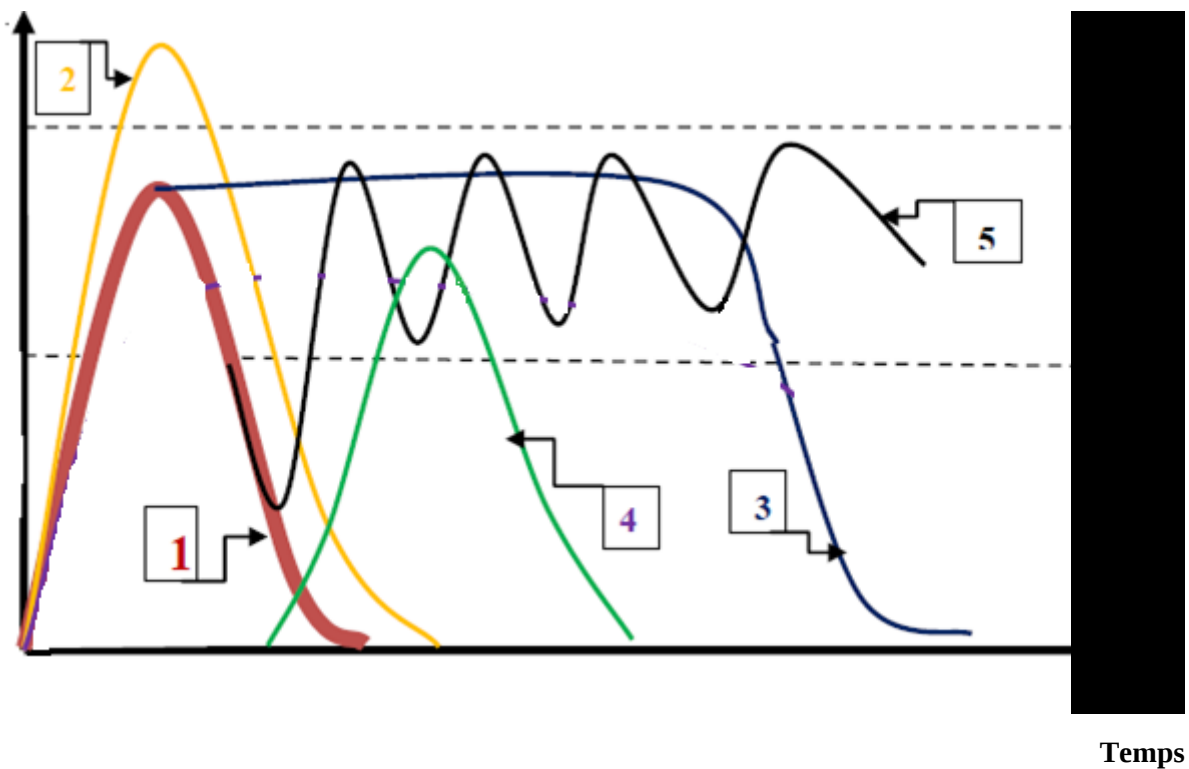


Figure I.2 : Evaluation des concentrations plasmatiques en fonction du type de forme de libération administré par voie extravasculaire [12]

I.2 Formes galéniques solides à libération prolongée destinées à la voie orale

I.2.1. Définition

Les formes à libération prolongée sont définies dans la pharmacopée européenne dans son glossaire, comme un type particulier de formes à libération modifiées se caractérisant par une vitesse de libération du ou des principes actifs inférieure à celle qu'assurait la forme à libération conventionnelle administrée par la même voie.

La libération prolongée d'un principe actif est celle pour laquelle la dose unitaire totale est retenue au sein d'un système contrôlant la vitesse de libération. La rétention du principe actif peut être faite par son inclusion dans un excipient insoluble dans les liquides de l'organisme qui forme ainsi une espèce de matrice à partir de laquelle le principe actif sera libéré lentement [3].

I.2.2. Polymères responsables de la libération prolongée

Pour la réalisation des formes médicamenteuses à libération prolongée, il est essentiel de faire appel à des matériaux de nature polymérique. Ces composées sont pour la plupart entièrement synthétiques, ce qui permet d'adapter leurs caractéristiques au but visé. Le rôle joué par le polymère varie en fonction du mécanisme de libération et de la forme médicamenteuse [15].

Indépendamment du mode de libération, trois grands groupes de polymères sont distingués :

- **Polymères hydrophobes**

Ces polymères se caractérisent essentiellement par leurs mauvaises mouillabilités qui peuvent restreindre le contact entre les formes médicamenteuses et les tissus environnants. En revanche, ces composés sont très inertes chimiquement ce qui les rend aptes à solubiliser certains principes actifs. On cite comme exemple de polymère dans ce cas, le polydiméthylsiloxane, le copolymère d'éthylène et d'acétate de vinyle, etc. [15].

- **Polymères hydrophiles**

Ce sont des polymères réticulés à gonflement limité. Une fois imbibés ils forment des hydrogels. Le réseau tridimensionnel qui constitue soit la membrane du système réservoir soit le support de la matrice, permet de contrôler la libération de la substance active. Les polymères utilisés sont, le polyacrylamide, les poly (méthacrylates d'hydroxy-2éthyle) [15].

- **Polymères biodégradables**

Ce sont les polymères qui assurent un système biodégradable ou résorbable, c'est-à-dire capable d'être scindés chimiquement et finalement d'être excrétés par les voies habituelles (urinaires, fécale, respiratoires). Cependant, ces termes recouvrent également des polymères subissant une perte de poids, mais qui n'aboutissent pas à des molécules suffisamment petites

pour être éliminées du corps. Ces polymères sont répartis en fonction de leurs mécanismes d'érosions, par rapport à leurs modes de solubilisations [15].

I.3. Intérêts et limites des formes à libération prolongée

I.3.1. Avantages

- Diminution de nombre de prise quotidienne d'où gain de temps en milieu hospitalier, simplification pour le malade, diminution de risque d'erreur dans l'application de la posologie, meilleure compliance chez le patient, Principe du « once a Day ».
- Maintien sur un temps prolongé de taux sanguins efficace pour des principes actifs de demi-vie relativement courte permettant, un traitement continu, la libération continuant pendant la période nocturne.
- Diminution voire suppression des effets secondaires indésirables, provoqués par de fortes concentrations de médicament libéré rapidement au lieu d'administration ou absorption [12].

Ces formes ont le mérite d'approcher, à défaut d'atteindre, un profil thérapeutique idéalisé et de contribuer grandement à l'efficacité du traitement, tel qu'il est illustré dans la (Figure I.3) suivante :

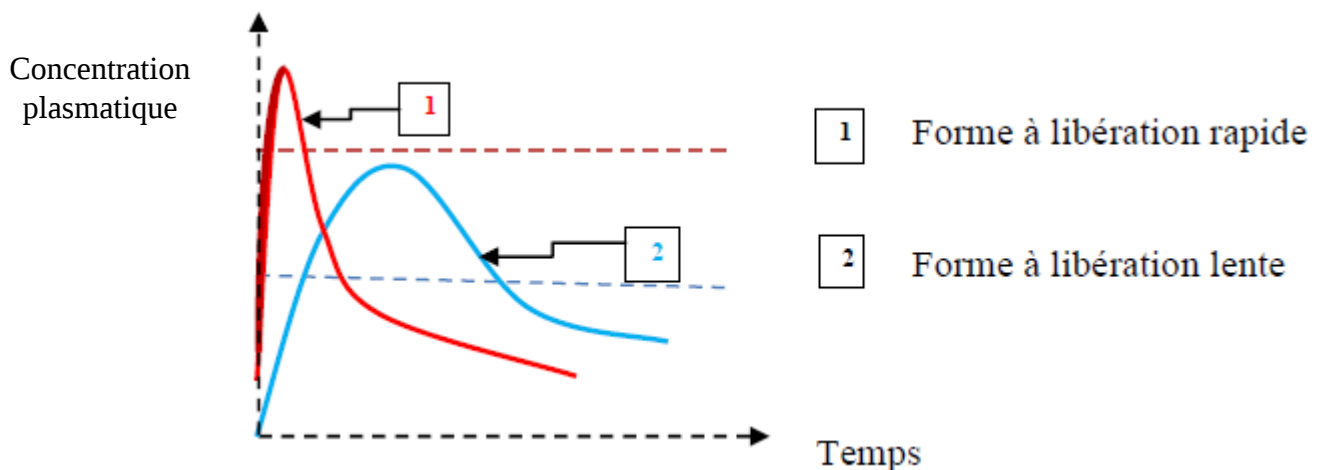


Figure I.3 : Profil différentiel de libération d'une forme rapide et une forme lente [12]

I.3.2. Inconvénients

- Risque d'accumulation en fonction de la vitesse d'élimination
- Impossibilité de maîtriser rapidement les accidents d'intolérance ou d'intoxication.
- Ils ne peuvent être broyés et croqués.
- Manque de reproductibilité en fonction de la vidange gastrique : importance de moment de prise [16].

I.4. Mécanismes de libération de PA à partir des formes à libération prolongée

I.4.1. La dissolution Le taux de dissolution est un facteur très important dans le contrôle de la libération d'un principe actif, donc la préparation des formes pharmaceutiques à libération prolongée a pu être réalisée en diminuant leur taux de dissolution. Les approches pour réaliser ceci, incluent la préparation des sels ou des dérivés appropriés, induisant la substance active d'un matériel ralentisseur de dissolution, ou incorporer le principe actif dans un comprimé enrobé à l'aide d'un agent d'enrobage à faible vitesse de dissolution [17].

Le processus de dissolution à l'équilibre est décrit par l'équation de Noyes-Whitney :

$$\frac{dc}{dt} = K_d A(C_s - C) = \frac{D}{h} A(C_s - C)$$

Tel que :

dc/dt : Taux de dissolution ;

K_d : constante du taux de dissolution ;

D : coefficient de diffusion ;

C_s : Solubilité du principe actif (en kg/m³) ;

C : Concentration en principe actif dissous dans le milieu à l'instant t (en kg/m³) ;

D/h : épaisseur de la couche de diffusion.

Il existe deux types de systèmes dont la libération est contrôlée par dissolution :

- Exemple de Type de perle simple avec une alternance de principe actif et des couches de contrôle de dissolution (Figure I.4) :

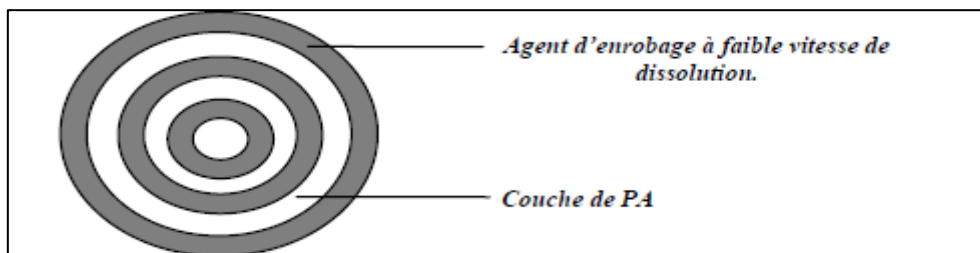


Figure I.4 : Système avec alternance de PA et des couches de contrôle de dissolution [17]

- Exemple Des perles contenant le PA avec des différentes épaisseurs de la couche de contrôle de dissolution (Figure I.5) :

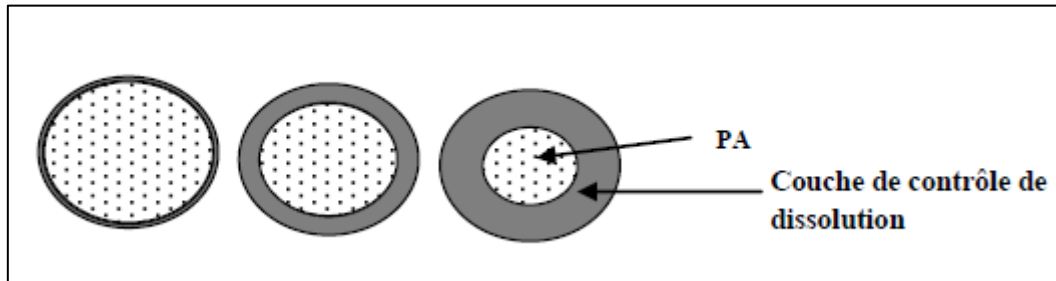


Figure I.5 : Système avec des couches différentes de contrôle de dissolution [17]

I.4.2. La diffusion : La diffusion est définie comme un processus de transfert de masse de molécules individuelles d'un soluté (principe actif) sous l'effet d'un mouvement brownien engendré par l'existence d'un gradient de concentration. Lorsqu'un composé se trouve à des concentrations différentes dans un milieu, il a tendance à diffuser. Cette diffusion a pour but de rendre uniforme la concentration en tout point du matériau. Deux systèmes sont invoqués pour expliquer le transfert par diffusion d'un soluté, ils sont classés selon la structure du polymère utilisé [15].

I.4.2.1. Systèmes hétérogènes

Ce sont des systèmes poreux, ils peuvent être macro poreux (diamètre des pores entre 0.1 et 1micron) ou microporeux (diamètre entre 10 et 50 nanomètre) [15].

▪ **Systèmes macroporeux**

Dont la taille moyenne des pores varie entre (0,1 - 1 µm), est assez élevée que celle du soluté, le transport dans ce cas se fait majoritairement dans le liquide remplissant les pores. Le coefficient de diffusion effectif (De) dans le milieu liquide remplissant l'espace vide est exprimé par l'équation :

$$De = Da \frac{\varepsilon k}{\tau}$$

Da : coefficient de diffusion en milieu aqueux

ε : porosité du système

K : affinité des solutés aux polymères

τ : la tortuosité du système

▪ **Systèmes microporeux**

Dans ce cas, la taille des pores varie de 50 à 200 Å et parfois jusqu'à 500 Å, comparables aux tailles des molécules de solutés diffusés (Figure I.6).

La diffusion s'exprime par l'équation suivante :

$$De = Da \frac{\varepsilon \gamma}{\tau}$$

Où γ est le rapport du diamètre de diffusion de soluté à la surface des pores.

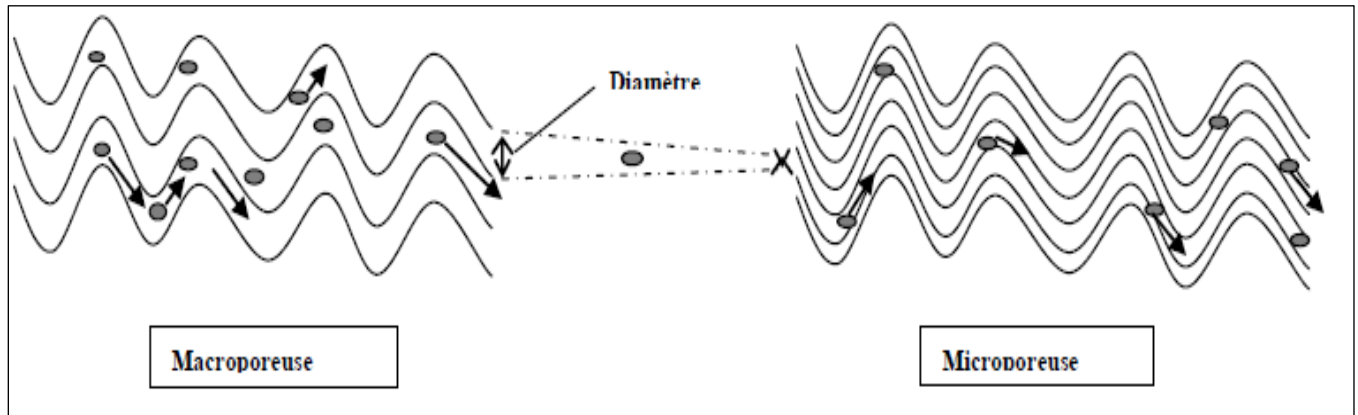


Figure I.6 : Représentation des systèmes macro et microporeux [15].

I.4.2.2. Systèmes homogènes

Ce sont des systèmes polymériques non poreux. Ils sont formés d'une phase continue, dans laquelle le principe actif est diffusé. Cette diffusion a lieu entre les espaces libres laissés entre les chaînes macromoléculaires du polymère. Deux grands groupes de systèmes non poreux se présentent :

- Les systèmes hydrophobes : réticulés ou non dans lesquels le soluté doit être soluble pour diffuser (mécanisme de diffusion par solubilisation).
- Les systèmes hydratés : essentiellement les hydrogels plus ou moins réticulés où la diffusion s'opère de manière préférentielle en fonction de la lipophilie du soluté (mécanisme poreux) dans le liquide interstitiel ou dans la trame polymérique (diffusion par solubilisation) [15].

I.4.2.3. Systèmes réservoirs

Les systèmes réservoirs ou systèmes à membranes, consistent en une barrière polymérique insoluble qui entoure un réservoir de principe actif. Le mécanisme de libération des formes enrobées dépend principalement du type de polymère étudié, et plus précisément de sa solubilité dans le tractus gastro-intestinal (Figure I.7) [18].

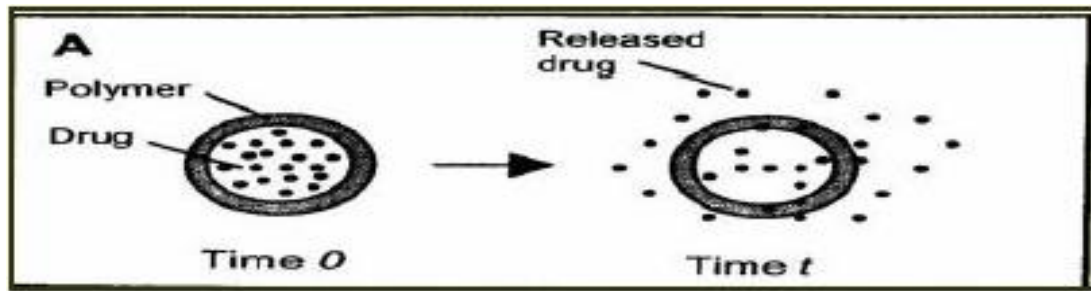


Figure I.7 : Schéma d'un dispositif réservoir [18].

Les étapes du processus de libération du principe actif à partir d'un système à membrane insoluble peuvent se résumer de la manière suivante : tout au long du tractus digestif, il y a :

- Pénétration du milieu de dissolution à travers la membrane,
- Dissolution du principe actif à l'intérieur de la forme galénique,
- Diffusion vers l'extérieur, à travers le film d'enrobage, du principe actif dissous [19-21].

La diffusion du PA est régie par la première loi de Fick selon l'équation suivante :

$$\frac{dQ}{dt} = \frac{D}{E} \times K \times S \times (C_s - C)$$

DQ/dt = Quantité de principe actif traversant la membrane par unité de temps (en kg/s),

D = Coefficient de diffusion du produit dans la membrane d'épaisseur E (D en m^2/s et E (m)),

K = Coefficient de partage du PA entre le film et le milieu, S = Surface de diffusion (en m^2),

C_s = Solubilité du principe actif (en kg/m^3),

C = Concentration en principe actif dissous dans le milieu à l'instant t (en kg/m^3).

Dans ce cas la diffusion est directement proportionnelle à l'épaisseur de la membrane et proportionnelle au coefficient de diffusion du PA à travers ladite membrane [22, 23].

- **Les systèmes réservoirs à activité constante**

Dans ces systèmes le gradient de concentration dans la membrane atteint un modèle constant avec le temps (temps théoriquement infini), donc la concentration en substance médicamenteuse dans le compartiment donneur demeure constant grâce à l'excès présent [23]. Le flux est dit maximal **J_{max}** :

$$J_{\max} = \frac{D K C_s}{L} = \frac{P C_s}{L} = D C_{sm}$$

CS : la solubilité dans le réservoir

C_{sm} : concentration de saturation dans la couche membranaire adjacente au principe actif. Le flux dans ce cas est constant et la cinétique de libération est d'ordre zéro.

- **Les systèmes réservoirs à activité non constante**

C'est un système qui est à l'origine conçu pour avoir une activité constante, mais cette activité diminue après une certaine heure due à l'épuisement du principe actif et à l'afflux continu de l'eau. Cette activité inconstante est due aussi aux conditions de saturation qui ne sont pas remplies [15].

Le flux de libération est proportionnel au gradient de concentration au temps T et il n'est pas constant :

$$\frac{dMt}{Sdt} = \frac{MDK}{ZV} e^{-\left(\frac{SDK}{ZV}t\right)}$$

$\frac{dMt}{Sdt}$: Quantité de principe actif libérée en fonction du temps t

V : volume du réservoir de la forme médicamenteuse

M : la dose de la substance médicamenteuse incorporé dans le système

I.4.2.4. Systèmes matriciels Les systèmes matriciels peuvent être définis comme étant des dispersions uniformes de principes actifs dans un support matriciel. La vitesse de dissolution du principe actif est influencée par la vitesse de pénétration de l'eau à travers la matrice. Alors que dans une forme réservoir c'est la membrane polymérique située à la surface du système qui va contrôler la libération, dans un système matriciel, c'est le polymère formant la matrice qui va constituer le système de contrôle [24]. La vitesse de libération à partir des systèmes matriciels est décrite par la deuxième loi de Fick :

$$\frac{dm}{dh} = C_o dh - \frac{Cs}{2}$$

dm: la variation de la quantité de principe actif libéré par unité de surface.

dh : la variation de l'épaisseur de la zone de la matrice épuisée par le PA.

C_0 : la quantité totale de PA.

C_S : la concentration de saturation du PA dans la matrice.

❖ Classifications des différents types de matrices

• Matrices hydrophiles

Les matrices hydrophiles sont composées de polymères capables de retenir le PA pendant un laps de temps prolongé en formant une gangue gélatineuse au contact du milieu de dissolution. La libération du principe actif peut être décomposée en deux étapes :

➤ Hydratation de la matrice :

Pénétration du milieu de dissolution dans le comprimé, avec libération simultanée d'une faible quantité du principe actif (dose initial) ; ensuite Gonflement de la gomme hydrophile par absorption d'eau et formation d'une barrière gélifier qui ralentira la vitesse de libération.

➤ Diffusion stationnaire

Pénétration du liquide dans les zones profondes du comprimé. Le liquide diffuse à travers la couche gélifié et dissout le principe actif. Diffusion du principe actif vers l'extérieure à travers la barrière gélifiée.

• Matrice inerte insoluble

Les matrices sont des substances thermoplastiques insolubles, elles forment après leur compression, un squelette poreux incluant le principe actif.

Au contact du milieu aqueux, la structure inerte de la matrice demeure inchangée et la libération du principe actif s'effectue par simple diffusion, soit à travers le réseau poreux, soit par les espaces intermoléculaires du système.

• Matrices lipophile

Elles sont également appelée matrice cireuses. Le principe actif est mis en suspension dans une matrice lipidique, dans laquelle il est emprisonné. La libération continue, se fait par deux mécanismes distincts mais généralement simultanés : érosion de la matrice et diffusion du principe actif [24-27].

I.4.3. Systèmes contrôlés chimiquement: Les systèmes biodégradables utilisent le plus souvent une technologie matricielle mais il existe aussi des systèmes réservoirs biodégradables comme les microcapsules. Dans le cas de matrices biodégradables, l'érosion a lieu au cours du temps, libérant au fur et à mesure le principe actif incorporé [15].

- **La bio-résorption et la biodégradation**

Correspond à la scission chimique ou enzymatique des chaînes polymériques en segments résorbables et éliminables par l'organisme vivant. Il existe trois mécanismes de dégradation des systèmes biodégradables :

- Mécanisme I : solubilisation par rupture des ponts intermédiaires :

Ce mode concerne les polymères hydrophiles rendus insolubles par réticulation, l'érosion est très lente et la libération a lieu par diffusion dans la matrice

- Mécanisme II : Solubilisation par hydrolyse, ionisation ou protonation des groupements latéraux :

Le polymère hydrophobe se solubilise par réaction d'un groupement latéral, les polymères rencontrés sont des polyélectrolytes faibles donc susceptibles de s'ioniser à partir d'une certaine valeur de pH et de se solubiliser.

- Mécanisme III : solubilisation par scission des chaînes polymériques en petites molécules éliminables : ce mécanisme intéresse les macromolécules dont les liaisons sont instables hydrolytiquement [15].

- **La bio-érosion**

Elle implique uniquement la réduction de masse des systèmes médicamenteux par la solubilisation du polymère par simple ionisation ou hydrolyse des groupements ou des ruptures enzymatiques dans le milieu de dissolution. Ce phénomène peut se produire dans les polymères hydrophiles où un gonflement a lieu, ainsi que dans les polymères hydrophobes [15]. Pour les systèmes bio-érodables on a deux types de cinétique :

- **Erosion homogène**

Le solvant pénètre dans le polymère et produit une dégradation de tout le polymère. La vitesse de dégradation est uniforme dans tout le dispositif selon les étapes suivantes :

- Hydratation.
- Baisse de la résistance mécanique.
- Perte de l'intégrité.
- Solubilisation.

La libération de principe actif à partir de ce système résulte d'une combinaison de deux mécanismes : l'érosion et la diffusion (Figure I. 8). La perméabilité du système augmente constamment dont la libération en tient compte [28].

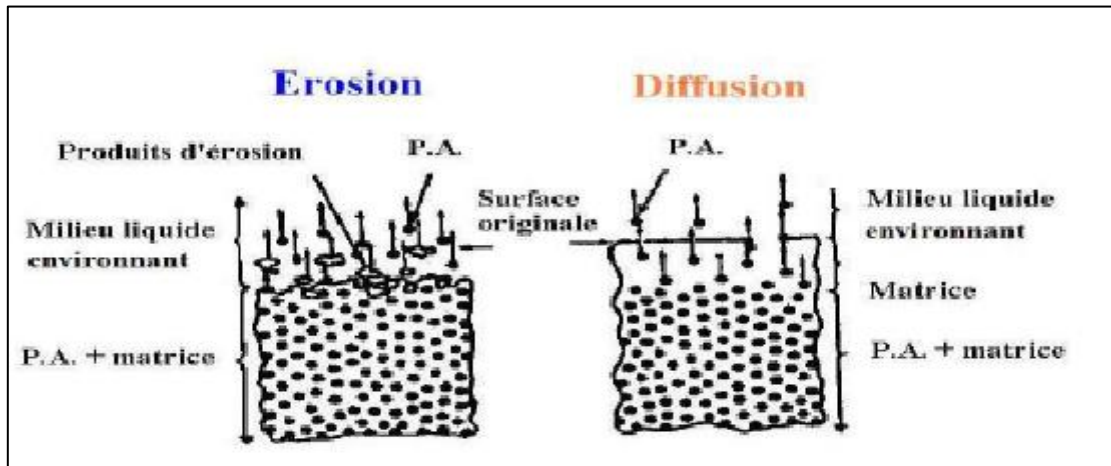


Figure I.8 : Représentation schématisée de la libération d'un PA dans un système matriciel par les mécanismes d'érosion et de diffusion [28].

➤ Erosion hétérogène

C'est le cas de matrice à base de polymère hydrophobe où la pénétration de l'eau ou le solvant est empêchée, et ainsi ce sont les liaisons labiles à la surface qui subissent une hydrolyse

$$\frac{Mt}{M_{\infty}} = 1 - \left[1 - \frac{k_0 t}{C_{\infty}} \right]^n$$

Où K_0 est une constante de dégradation de vitesse d'ordre pseudo-zéro, a , représente soit la demi-épaisseur du film, soit le rayon du cylindre ou de la sphère, et la valeur de l'indice n , caractérise la forme géométrique du système (1 pour le film, 2 pour le cylindre, 3 pour la sphère) [28].

I.4.4. Systèmes contrôlés par le solvant

. Système osmotique

Une forme galénique osmotiquement contrôlée se compose d'un noyau entouré par une membrane semi perméable avec des pores qui permet la libération du principe actif. (Figure I.9)

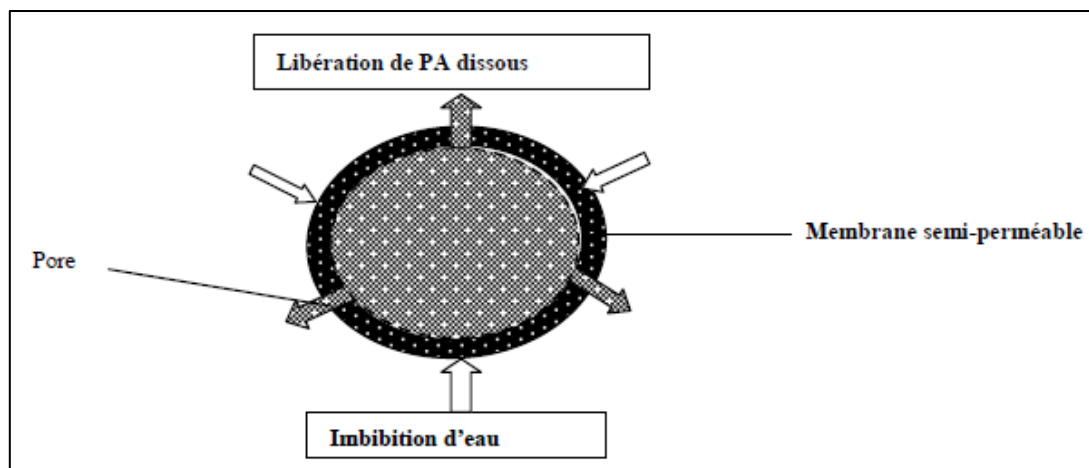


Figure I.9 : Représentation schématique du système osmotique [18]

Dans l'environnement aqueux de l'appareil gastro-intestinal, l'eau est pénétrée par osmose à travers la membrane semi-perméable dans le noyau du système à un taux limité par la composition et l'épaisseur de la membrane, cette pénétration d'eau permet la mise en solution ou la mise en suspension du principe actif et leur libération à travers les pores [20, 29].

- **Le système OROS (Oral Osmotic System)**

C'est un système basé sur la pression osmotique. Les comprimés sont constitués d'un noyau à deux compartiments (un compartiment avec le principe actif et un compartiment faisant office de « moteur osmotique »). Le noyau est entouré d'une membrane semi-perméable percée d'un orifice. La pénétration d'eau dans le noyau génère une pression osmotique permettant l'expulsion du principe actif à travers l'orifice de sortie à vitesse constante (Figure I.9) [15].

- **Le système OROS push-pull**

Le noyau du système se compose de deux couches séparées par une membrane flexible communiquant avec l'extérieur par un micro-orifice. La couche inférieure est faite de polymères et des agents osmotiques hydrophiles, tandis que la couche supérieure se compose de principe actif. Les agents osmotiques dessinent l'eau à l'intérieur par osmose, les polymères hydrophiles gonflent vers le haut, et une suspension de principe actif est produite dans la couche supérieure due à la basse solubilité du principe actif. La couche inférieure pousse le principe actif à travers l'orifice (Figure I.10) [15].

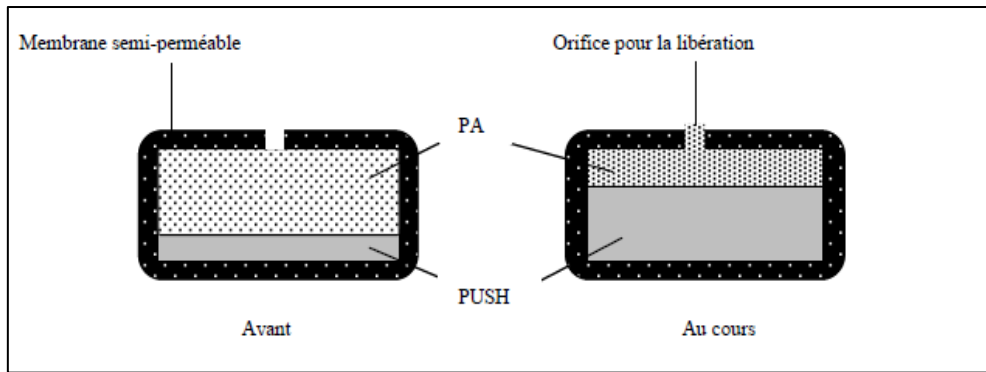


Figure I.10 : Représentation schématique du système OROS push-pull [15].

Le comprimé osmotique de push-pull est conçu pour des principes actifs avec une solubilité très basse mais peut être employé pour des principes actifs fortement hydrosolubles. La cinétique de libération est d'ordre zéro :

$$\frac{dmt}{dt} \times Z = \frac{S}{L} \times K \times \pi s \times C s a$$

Z : la période de libération.

πs : la pression osmotique.

$C s a$: solubilité aqueuse du PA.

II.1.5. Les systèmes contrôlés par gonflement : La libération de médicament est caractérisée par la formation d'une couche de gel sur la surface extérieure de la matrice. Le substrat s'hydrate très lentement et subit un gonflement limité obtenu soit par les cristallites qui empêchent la dissolution des zones amorphes soit par la réticulation du polymère. Le gonflement continuera jusqu'à ce qu'un nouvel équilibre soit atteint. Dans ce type de dispositif, la libération du principe actif est contrôlée par la vitesse de gonflement du polymère [15].

Chapitre II :

La Microencapsulation

II.1. Généralité sur la microencapsulation :

L'encapsulation est vectrice d'innovations de par ses avantages de protection et de libération contrôlée dans l'espace et dans le temps. En effet Chaque nature physico-chimique d'actif peut être encapsulée avec succès grâce à plusieurs techniques disponibles et la possibilité de sélectionner différents matériaux enrobants comme par exemple les phospholipides, les cires ou encore des biopolymères, comme les polysaccharides et les protéines. Différentes structures internes de microparticules sont réalisables avec des tailles qui peuvent être variables. Enfin, il est possible de choisir la forme physique finale des microparticules obtenues : solution diluée ou concentrée, ou encore forme sèche sont autant de possibilités à prendre en compte. Tous ces paramètres auront un impact sur la cinétique de libération des particules. Avoir le choix n'implique donc pas forcément que la réalisation est simple car chaque méthode et matériau utilisés mènent à nombre de problématiques référencées dans la littérature. Cette partie propose de faire un bref état de toutes les techniques de microencapsulation existantes [30].

II.2 Historique :

Les premières publications sur la micro-encapsulation et ses applications possibles dans le domaine pharmaceutique remontent à 1931. De 1931 à 1940, GREEN et son équipe à la NCR (*National Cash Register of America*), ont encapsulé des particules de pigments dans des polymères naturels (protéine/gélatine et polysaccharide/gomme arabique) par coacervation complexe. Cette stratégie, aussi utilisée pour la production de papier "carbone", permet la duplication d'un texte ou d'une figure sous l'effet d'une faible pression en encapsulant des colorants [31].

A la fin des années cinquante la technologie de la microencapsulation fut utilisée dans le domaine pharmaceutique pour les médicaments analgésiques à libération prolongée, ainsi que pour d'autres applications industrielles telles que les colles. Au cours des années qui suivirent, la microencapsulation devint un domaine de recherche dynamique tant au niveau académique qu'industriel pour l'encapsulation des PA, médicaux et non médicaux, comme des antibiotiques, vitamines, probiotiques et autres [32].

Dès le début des années 1970, le recours à des polymères biodégradables en tant que véhicules médicamenteux a permis l'administration de microparticules (microcapsules et microsphères) de taille supérieure au micromètre par voie parentérale. L'avantage de ces systèmes réside dans la possibilité de prolonger la délivrance de divers médicaments, d'une manière préprogrammée, sur plusieurs jours, semaines ou mois, par le biais d'une injection unique [33].

Ainsi le recours aux microparticules biodégradables en vue de l'administration parentérale de principes actifs médicamenteux a connu un succès considérable.

C'est le cas de YOLLES [34] en 1971 qui propose de prolonger la libération de cyclazocine par voie parentérale en l'incorporant dans un polymère biodégradable.

Rapidement des techniques traditionnelles de microencapsulation ont été reprises puis adaptées. En 1973, BOSWELL et al., [35], brevète des procédés de microencapsulation applicables à des polymères biodégradables. Puis d'autres études de microencapsulation apparaissent en 1976, tel que les études de WISE [36], qui nébulise une solution organique d'un dérivé quinazolé liposoluble et d'un copolymère des acides lactique et glycolique. MICHEL et al., [37], recourent quant à eux au lit d'air fluidisé pour enrober des particules de Chloramphénicol par un poly (acide lactique).

En 1979 l'équipe de BECK [38] propose une technique d'évaporation du solvant pour encapsuler la progestérone avec le poly (acide lactique). Ce procédé particulièrement favorable aux substances médicamenteuses liposolubles, devient rapidement très populaire et fût appliqué aux PA de plusieurs classes thérapeutiques (hormones stéroïdiennes, anesthésiques locaux, cytostatiques neuroleptiques etc.

Au cours des dernières années, la micro-encapsulation s'est considérablement développée à l'échelle industrielle. Les microparticules ont des applications très variées, elles sont utilisées pour la production de textiles parfumés et de produits cosmétiques, pour la protection des récoltes agricoles, dans l'agroalimentaire pour donner de nouvelles propriétés aux aliments (encapsulation d'arômes, colorants, épices), mais aussi dans les produits phytosanitaires et dans le domaine de la médecine et de la pharmacie [39-46].

Aujourd'hui, la microencapsulation est devenu un domaine de recherche dynamique tant au niveau académique qu'industriel comme le démontre le nombre croissant d'articles scientifiques et de brevets publiés (Figure II.1).

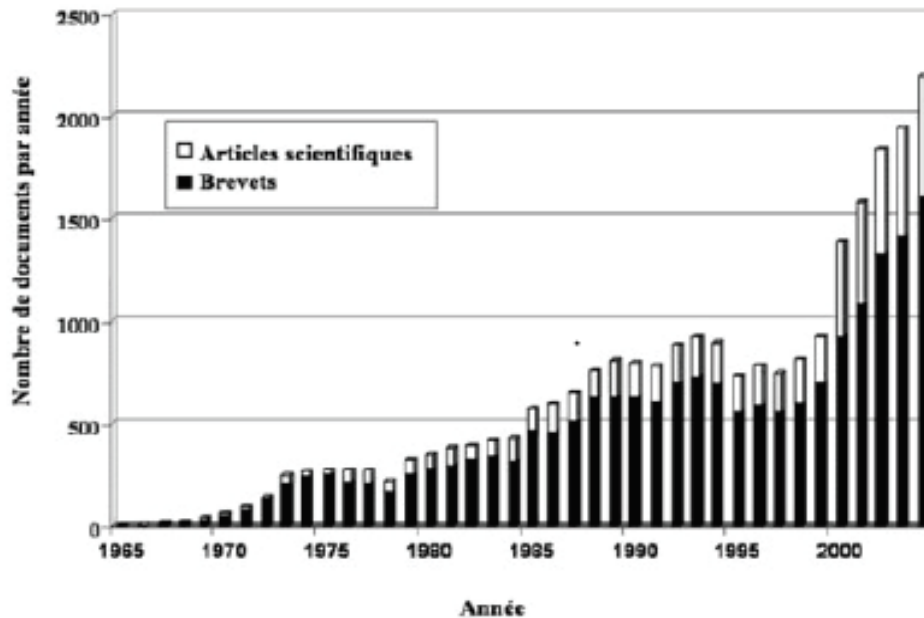


Figure II.1. Evolution du nombre d'articles scientifiques et de brevets publiés par année dans le domaine de la microencapsulation [32].

II.3. Définition de la microencapsulation :

La microencapsulation regroupe l'ensemble des technologies qui permettent la préparation de microparticules individualisées, constituées d'un matériau enrobant contenant une matière active. La matrice enrobante constitue une barrière permettant la protection du principe actif ainsi que le contrôle de sa libération [47].

- Les matériaux enrobant sont des polymères d'origine naturelle ou synthétique, ou des lipides.
- Les matières actives sont d'origines et de natures très variées : principes actifs pharmaceutiques, actifs cosmétiques, additifs alimentaires, produits phytosanitaires, essences parfumées, microorganismes, cellules, ou encore catalyseurs de réaction chimique etc. et de natures différentes liquide, solide ou gazeuse.

Le terme de microparticules est utilisé pour des tailles comprises entre $1\mu\text{m}$ et $1000\mu\text{m}$ et contiennent typiquement entre 5 et 90 % (en masse) de matière active d'après Benoit et al., 2013[47], et Thies [48], ils réduisent l'intervalle de définition des microparticules de $1\mu\text{m}$ à $500\mu\text{m}$. Dans tous les cas, les particules ayant un diamètre inférieur à $1\mu\text{m}$ appartiennent au domaine des nanoparticules.

II.4. Structure interne des microcapsules :

En général, l'encapsulation désigne indistinctement la préparation de capsules ou de sphères. A ce stade, il importe de faire la distinction entre les deux morphologies. Une capsule qui est caractérisée par sa structure cœur-couronne. La matière active (solide, liquide ou gazeuse) est confinée au cœur tandis que le matériau polymère constitue, autour, une membrane. La sphère, quant à elle, contient la matière active sous forme dispersée au sein d'une matrice polymère (Figure II.2). Il faut noter que la morphologie de la capsule minimise la quantité de matériel enrobant administré, par rapport à la structure de type sphère. (Figure II.2 a, b et c).

A ce titre il est évident de distinguer les deux systèmes auxquels peuvent appartenir les microcapsules, selon leur structure interne, en système réservoir et système matriciel (figure II.2)

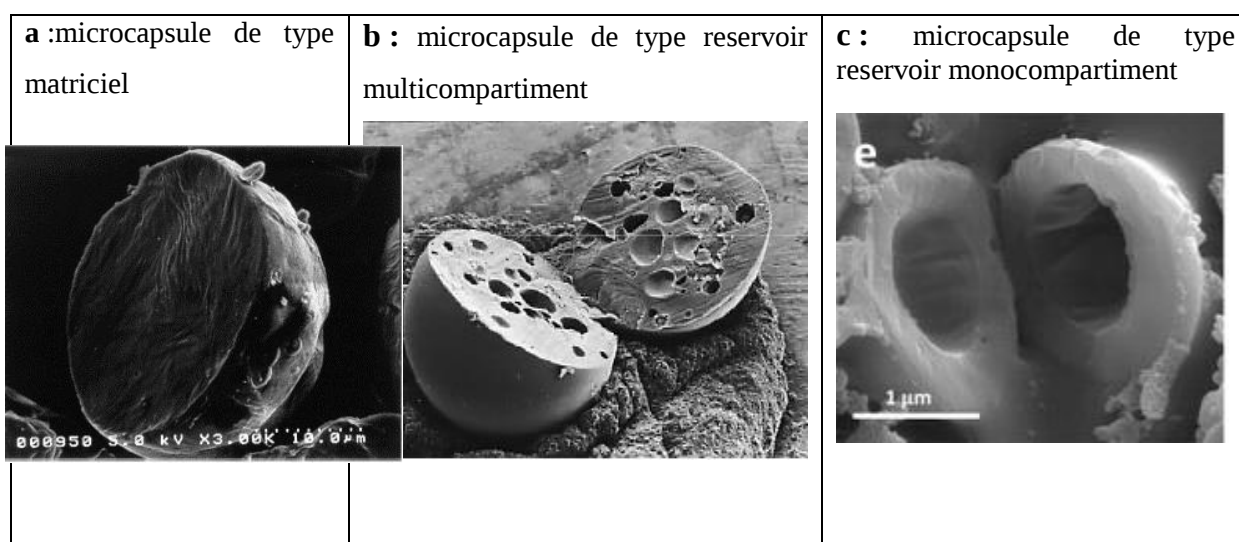


Figure II.2 : Photographies obtenues par microscopie électronique à balayage représentant des microparticules [30, 49, 50,51]

II.5. Les avantages de la micro-encapsulation :

La microencapsulation permet de protéger un principe actif de masquer son goût, de contrôler et cibler sa libération ou encore de le structurer [52,30] :

- **Protection de la substance encapsulée :**

La microencapsulation est un procédé de fabrication de particules fermées dans lesquelles le contenu a été enveloppé à l'intérieur d'un film. La microencapsulation permet non seulement d'éviter la pollution secondaire du contenu encapsulé, mais permet aussi une fonction d'isolation de matériaux fonctionnels sensibles à la lumière ou à l'oxygène d'un environnement extérieur, ce qui maintient le contenu encapsulé stable pour une durée de vie plus longue [53,54].

De nombreux composés actifs sont fragiles et doivent être protégés du milieu extérieur. L'encapsulation permet leur protection vis-à-vis des contraintes appliquées. Les vitamines E et C sont très souvent encapsulées car elles sont sensibles à la dégradation par contact avec la lumière, la chaleur ou encore l'oxygène, des chercheurs ont démontré que la microencapsulation par des liposomes permettaient de protéger les vitamines E et C contre la dénaturation notamment avant et après la pasteurisation du jus d'orange [55-58].

- **Contrôler la libération de la substance encapsulée :**

La microencapsulation permet le transfert de masse entre l'intérieur et l'extérieur d'une capsule via le contrôle des propriétés physiques et chimiques de la membrane. Normalement, il y a deux types de processus pour atteindre ce but : soit la diffusion à travers la membrane, soit l'éclatement de la membrane. Au niveau de la diffusion, le contrôle de la taille des pores de la membrane, l'épaisseur de la membrane, et le gradient de concentration des molécules spécifiques, permettent de contrôler la délivrance continue des principes encapsulés. Par exemple, un arôme encapsulé fonctionne beaucoup plus longtemps qu'un arôme libre du fait d'une diffusion lente et continue. Au niveau de l'éclatement de la membrane, toute la matière encapsulée est libérée en même temps [54].

Dans le domaine médical le traitement OncoLAR a permis la libération d'un agent anti-cancéreux progressif sur une période de 1 à 3 mois [59]. De même, Plosker et Brogden, 1994, [60] ont démontré que le médicament LupronDepot, traitant le cancer de la prostate, permet d'obtenir une libération contrôlée à un taux journalier de 2,8% pendant un mois après une administration sous-cutanée ou intramusculaire.

- **Possibilité d'encapsulation des produits d'origine liquide**

La micro-encapsulation permet de conditionner des produits liquides sous une forme solide. Ce processus facilite le transport des produits d'origine liquide, qui peuvent fuir ou s'évaporer du récipient. Pour chaque capsule, le dosage est contrôlé par le volume de la capsule. Les capsules pourront donc être apportées séparément selon le dosage dont on a besoin [54].

- **Masquage du goût ou libération du goût :**

La microencapsulation permet de masquer le goût amer de PA destiné à être administré dans la cavité buccale [54].

- **Séparer deux produits incompatibles :** ou plus devant se trouver dans le même mélange de façon à les faire coexister [54].

II.6. Mode de libération des principes actifs à partir des microcapsules

Dans le cas de la majorité des applications de la microencapsulation, les substances actives sont dans un premier temps maintenues et protégées dans le cœur des microcapsules durant une période de temps définie, et dans un second temps sont soit libérées progressivement à travers la membrane selon une certaine vitesse de libération, soit libérées massivement en une seule fois. Dans ce cas la libération est déclenchée par un procédé assurant une libération spécifique.

Ainsi la libération peut être obtenue de plusieurs façons, on distingue trois types de systèmes :

- Les systèmes à libération provoqués : le contenu de la capsule est obtenu après la rupture de la paroi sous l'effet d'une contrainte mécanique ou thermique ;
- Les systèmes à libération contrôlée et prolongée : la libération du produit actif est contrôlé soit par diffusion à travers la paroi (l'épaisseur et la porosité de la membrane influencent le temps de relargage) soit par la dégradation enzymatique ou chimique de la couche polymère qui devient poreuse et permet la diffusion à travers la paroi ;
- Les systèmes piégés dits micro-réacteurs sont constitués par des microcapsules qui ne relarguent pas leur contenu. La microencapsulation des enzymes ou des catalyseurs sont des exemples classiques de ce type de capsule. Celle-ci se présente sous forme d'un noyau d'adsorbat à l'intérieur duquel se trouve piégé l'enzyme ou le catalyseur. Le noyau est enrobé par une membrane polymère semi-perméable permettant les échanges avec les réactifs intervenant dans la réaction [61].

II.7. Les applications de la microencapsulation

Si les premières applications de la microencapsulation relevaient du domaine de la chimie (papier autocopiant sans carbone, film photographique...), les microparticules présentent un très large champ d'application puisqu' il va du domaine pharmaceutique au domaine alimentaire en passant par la cosmétique, la parfumerie, les produits phytosanitaires, la chimie, le domaine biomédical etc.

Dans le domaine pharmaceutique, des microcapsules contenant des médicaments sont utilisées par voie orale ou par injection interne dans le muscle. Les microcapsules sont principalement conçues pour contrôler la durée de la libération du principe actif. Les microcapsules sont véhiculées dans le corps. Puis par la dispersion et l'infiltration du médicament vers l'endroit ciblé, une concentration propre et une durée spécifique de la libération permettent de donner pleinement les effets du médicament [32].

On trouve désormais des applications de la microencapsulation dans de nombreux domaines industriels, listés dans le tableau ci-après (Tableau I), dans lequel sont également précisés des exemples de composés encapsulés.

Tableau I: Les différents domaines d'application de la microencapsulation [32], [61- 63]

Domaine industriel	Exemples de composés encapsulés
Pharmacie et médical	Antibiotiques, contraceptifs, enzymes, vaccins, bactéries, vitamines, minéraux, antigènes, anticorps...
Cosmétique	Parfums, huiles essentielles, antitranspirants, agents bronzants, Crèmes solaires, colorants capillaires, baumes démêlants, mousses à raser...
Alimentaire	Huiles essentielles, graisses, épices, arômes, vitamines, minéraux, colorants, enzymes, levures, microorganismes...
Agriculture	Herbicides, insecticides, engrais, répulsifs, hormones végétales...
Biotechnologie	Enzymes immobilisées, microorganismes, cellules vivantes, cellules artificielles, cultures tissulaires, composés nutritionnels.....
Chimie	Catalyseurs, enzymes, additifs pour plastiques, eau, plâtre et béton, inhibiteur de corrosion, retardateurs d'incendie, colorants et pigments, agents UV protecteurs, parfums, huiles essentielles, agents lubrifiants...
Détergents	Adoucissants, antistatiques, agents décolorants, agents moussants, silicones, cires, détachants...
Textile	Colorants, parfums, pigments, bactéricides, fongicides, répulsifs d'insectes, agents antistatiques, retardateurs d'incendie, agents imperméabilisants, adhésifs composés bioactifs médicaux, composés bioactifs cosmétiques.....
Graphismes et impression	Colorants, pigments, parfums, révélateurs, cristaux liquides, toners, composés photosensibles.....
Photographie	Halogénures d'argent, pigments, colorants, composés photopolymérisables, révélateurs pour photographies couleurs, plastifiants...
Electronique	Cristaux liquides, matériaux semi-conducteurs, adhésifs, agents de séchage, retardateurs de flammes, antistatiques...
Traitement des déchets	Microorganismes, substrats, détoxifiants, déchets liquides, déchets industriels à risques, déchets radioactifs...

II.8. Procédés de micro-encapsulation : Avant de procéder à une préparation de microcapsules, il faut tenir compte de certains critères liés aux objectifs tracés et aux spécifications du produit à obtenir :

- La taille moyenne et la largeur de distribution granulométrique ;
- La teneur en matière active ou taux d'encapsulation ;
- La forme finale : dispersion de microparticules en phase aqueuse ou en phase solvant, poudre sèche ;
- Les contraintes de stabilité au cours du stockage et au cours de la mise en œuvre ;
- La durée de conservation sans libération de matière active, ainsi que le milieu dans lequel les particules seront conservées ;
- Les conditions de libération et la cinétique de libération. Si l'on souhaite une libération déclenchée, il devra en particulier être précisé quel est le paramètre de déclenchement : pression ou cisaillement mécanique, variation de température, variation de pH, dégradation enzymatique. Pour une libération prolongée, la durée souhaitée de la période de libération sera une des données du problème ;
- Les contraintes réglementaires liées au domaine d'application et au mode d'administration qui sont prescrites dans les réglementations nationales et internationales (Pharmacopée Européenne ou USP par exemple, pour le domaine de la pharmacie) ;
- Les choix du procédé et de la formulation déterminent les caractéristiques finales des microparticules [64].

Plusieurs procédés permettant l'encapsulation de principes actifs sont disponibles. A chaque technique correspond un intervalle de tailles ainsi qu'un taux d'encapsulation et une structure interne différents. Il y a également diverses possibilités concernant la forme physique finale des microparticules qui peuvent être sous la forme de poudre ou de dispersion dans un liquide.

Les différentes méthodes de micro encapsulation peuvent être classifiées selon différents critères. Benoit et al. [47], proposent quatre manières différentes de classer les méthodes d'encapsulation :

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

La classification des techniques d'encapsulation disponibles la plus répandue s'intéresse principalement au principe même du procédé, catégorisé dans trois classes [61].

- **Procédés physico- chimiques**
- **Procédés mécaniques**
- **Procédés chimiques**

Les différentes méthodes d'encapsulation sont récapitulées dans le (Tableau II) présenté ci-dessous selon la dernière classification présentée précédemment.

II.8.1. Procédés physico-chimiques : Les procédés physico-chimiques sont basés sur la maîtrise:

- De la variation de solubilité et des conditions de précipitation des agents enrobant. Il s'agit, par exemple, de la précipitation contrôlée d'un polymère en solution, par ajout d'un non-solvant ou d'un polymère incompatible (coacervation simple), ou encore par variation de température et de pH de la solution (coacervation complexe).
 - De changements d'état (fusion et solidification) des agents enrobant (gélification thermique d'émulsions) [47].

Tableau II : Classification des techniques d'encapsulation selon la nature du procédé [47,62] .

Type de procédé	Moded'encapsulation	Gamme de tailles	Nature
Procédés physico-chimiques	Séparation de phases ou coacervation simple ou complexe	2–1200µm	Microcapsules Microsphères
	Evaporation-extraction de solvant	0,5–200µm	Microsphères
	Gélification thermique d'émulsions(hot melt)	20 –2000µm	Microsphères
	Gélification ionotrope	20–2000µm	Microsphères
Procédés chimiques	Polycondensation interfaciale	2–2000µm	Microcapsules
	Polymérisation interfaciale	2–2000µm	Microcapsules
	Polymérisation en milieu dispersé		Microsphères
Procédés mécaniques	Nébulisation/séchage (spray-drying)	1–200µm	Microsphères
	Gélification ou congélation de gouttes	200–800µm	Microsphères
	Enrobage en lit d'air fluidisé (spray-coating)	35 –5000µm	Microcapsules
	Extrusion/sphéronisation	≥ 200µm	Microsphères

II.8.1.1. La Coacervation :

Les techniques de coacervation s'appliquent à des solutions colloïdales de substances macromoléculaires ; le terme coacervation décrivant un changement de solubilité des solutions de colloïdes.

- La première étape consiste à disperser le produit à encapsuler dans une solution colloïdale. Puis on modifie la solubilité du colloïde. Il existe différentes façons de modifier la solubilité des substances macromoléculaires comme :

- La variation de pH
 - La variation de concentration
 - La variation de force ionique
 - La variation de température
 - L'addition d'un non-solvant
 - L'addition d'un polymère incompatible
- Les substances macromoléculaires devenant moins solubles se regroupent pour former des gouttelettes appelées coacervats. Ces gouttelettes riches en polymère se regroupent autour de la substance à encapsuler pour former un enrobage continu. Elles coalescent pour former un film solide continu. Puis, il y a renforcement de la membrane par réticulation du polymère.

Il est possible de mettre en œuvre la coacervation avec un seul colloïde, c'est la coacervation simple ou bien avec deux colloïdes, on parle alors de coacervation complexes. Cette technique permet d'encapsuler des produits lipophile ou hydrophile. Selon la nature du produit à encapsuler, on peut définir un procédé en choisissant judicieusement le polymère, le solvant et l'agent de coacervation [65-67].

II.8.1.2. Procédé d'évaporation et d'extraction de solvant :

La méthode de micro-encapsulation par évaporation de solvant repose sur l'évaporation de la phase interne d'une émulsion sous agitation. Les étapes sont résumées comme suit : Initialement, le matériau d'enrobage, généralement un polymère hydrophobe, est dissous dans un solvant organique volatil. La molécule active à encapsuler est alors soit dissoute, soit dispersée dans la solution organique. La phase organique est émulsionnée sous agitation dans une phase aqueuse, contenant un agent tensioactif. Une fois l'émulsion établie, le solvant organique diffuse progressivement dans la phase continue sous agitation pour s'évaporer, laissant le polymère précipiter sous forme de microsphères. Ce procédé permet la fabrication de microsphères de taille entre 0,5 et 200 μm , Le rendement de production peut aisément s'approcher de 100% (figure II. 3) [30, 68, 69].

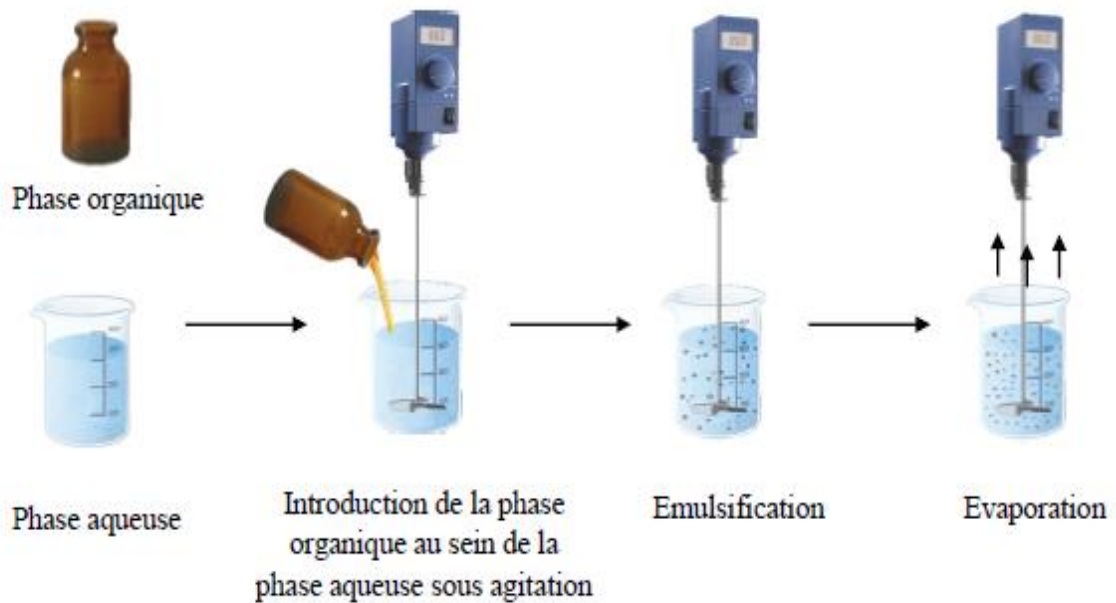


Figure II. 3 : Schématisation des différentes étapes d'un procédé de microencapsulation par évaporation de solvant [30]

II.8.1.3. Microencapsulation par gélification thermique :

Ce procédé, encore appelé *hot melt*, repose sur la fusion du matériau d'enrobage. La matière active à encapsuler est dissoute ou dispersée dans ce matériau fondu. L'ensemble est émulsionné dans une phase dispersante, dont la température est maintenue supérieure à la température de fusion (T_f) de l'enrobage et pour laquelle la matière active n'a aucune affinité : il s'agit d'eau distillée lorsque la substance à encapsuler est lipophile, et d'huile de silicone, par exemple, lorsqu'elle est hydrosoluble. La solidification des globules dispersés est obtenue en refroidissant brutalement le milieu. Comme de nombreuses substances actives sont thermolabiles, les matériaux supports généralement utilisés dans ce procédé de microencapsulation sont des lipides de bas point de fusion. Les particules obtenues sont ici des microsphères d'une taille pouvant aller généralement de 30 à 300 μm . La teneur en matière active est de l'ordre de 20 %. [47].

II.8.1.4 Microencapsulation par gélification ionotropique

La gélification ionotropique est basée sur la capacité de réticulation des polyélectrolytes en présence de certains ions pour former des hydrogels. Le cas le plus connu est celui de la gélification de l'alginate en présence d'ions Calcium. L'alginate est le polyanion le plus utilisé dans l'encapsulation. Les cations divalent et trivalent induisent une gélification par liaisons des groupements guluroniques de l'alginate. Les microsphères sont produites via une goutte à goutte d'une solution d'alginate et de principe actif dans une solution de Chlorure de Calcium formant ainsi un réseau tridimensionnel d'alginate ioniquement réticulé. La taille des microcapsules obtenues est relativement importante mais des tailles plus petites sont obtenues par des systèmes de pulvérisation (figure II.4) [70,71].

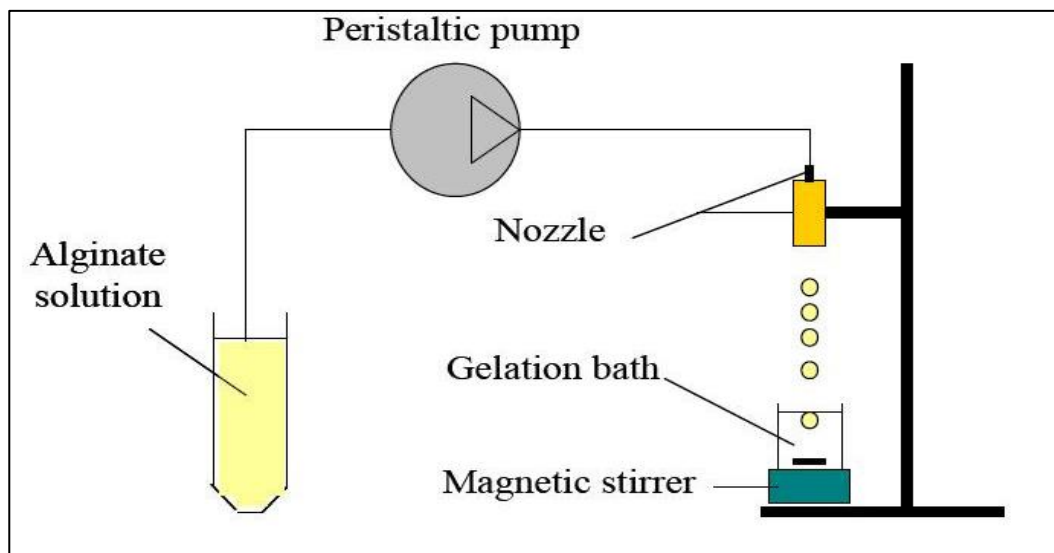


Figure II.4 : Schéma de microencapsulation par gélification de gouttes [70]

II.8.2. Procédés chimiques :

Contrairement aux deux autres classes de techniques qui utilisent des agents enrobant préformés tels que des polymères ou des lipides, les procédés d'encapsulation chimiques reposent sur la formation *in situ* du matériau enrobant. Les composés de base sont des Monomères [61].

II.8.2.1. Polycondensation interfaciale :

La polycondensation interfaciale met en jeu 2 monomères ayant des groupes fonctionnels complémentaires (A et B) chacun soluble dans une des phases d'un système diphasique. L'encapsulation de principes actifs peut être réalisée par cette méthode *via* un protocole en deux étapes. Dans un premier temps une émulsion est préparée, la phase dispersée contenant l'espèce à encapsuler ainsi qu'un monomère. Puis cette émulsion est diluée afin d'apporter le second monomère en phase continue. La réaction démarre alors à l'interface des gouttelettes. On obtient en fin de réaction une membrane à l'interface des gouttelettes qui renferment l'espèce à encapsulé (figure II.5) [61].

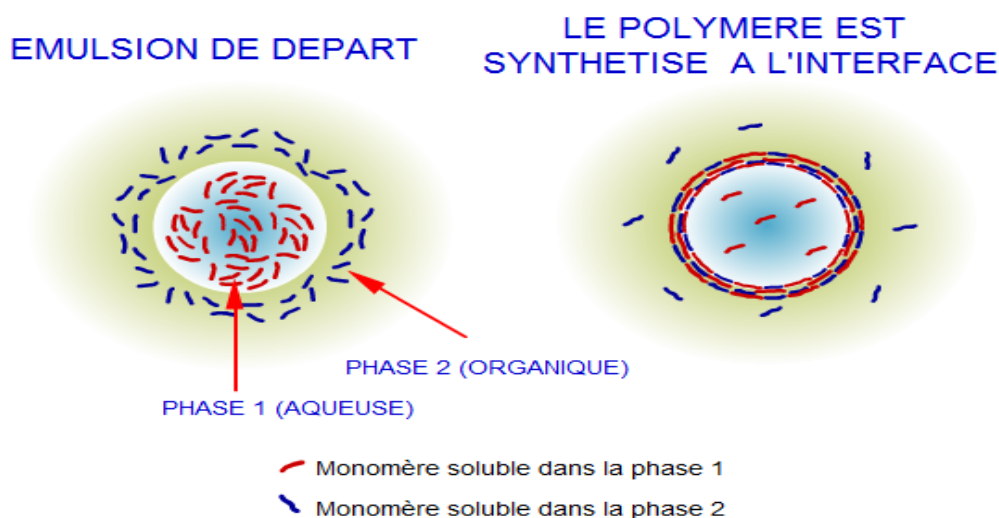


Figure II.5 : Schéma de microencapsulation par polycondensation [61]

Cette technique est très utilisée pour l'encapsulation de molécules biologiques telles que les protéines. En effet, en fonction des conditions de réalisation des capsules la membrane formée peut être semi-perméable permettant des échanges maîtrisés avec l'extérieur [72 ,73].

II.8.2.2. Polymérisation interfaciale :

Cette technique, combine une émulsion eau dans huile (E/H) ou huile dans eau (H/E) et une réaction chimique entre deux réactifs à l'interface de la phase dispersée. La phase dispersée contient un solvant, un principe actif et le monomère A. Elle peut être soit aqueuse, soit organique.

La phase continue est constituée d'un solvant et d'un monomère B. Le déroulement d'une polymérisation interfaciale appliquée à la formation de microparticules est schématisé à la figure II.6. Au départ l'émulsion se fait en l'absence du monomère B. Ce dernier n'est introduit qu'à partir du moment où l'émulsion est stabilisée. La réaction de polymérisation peut ensuite débuter [67].

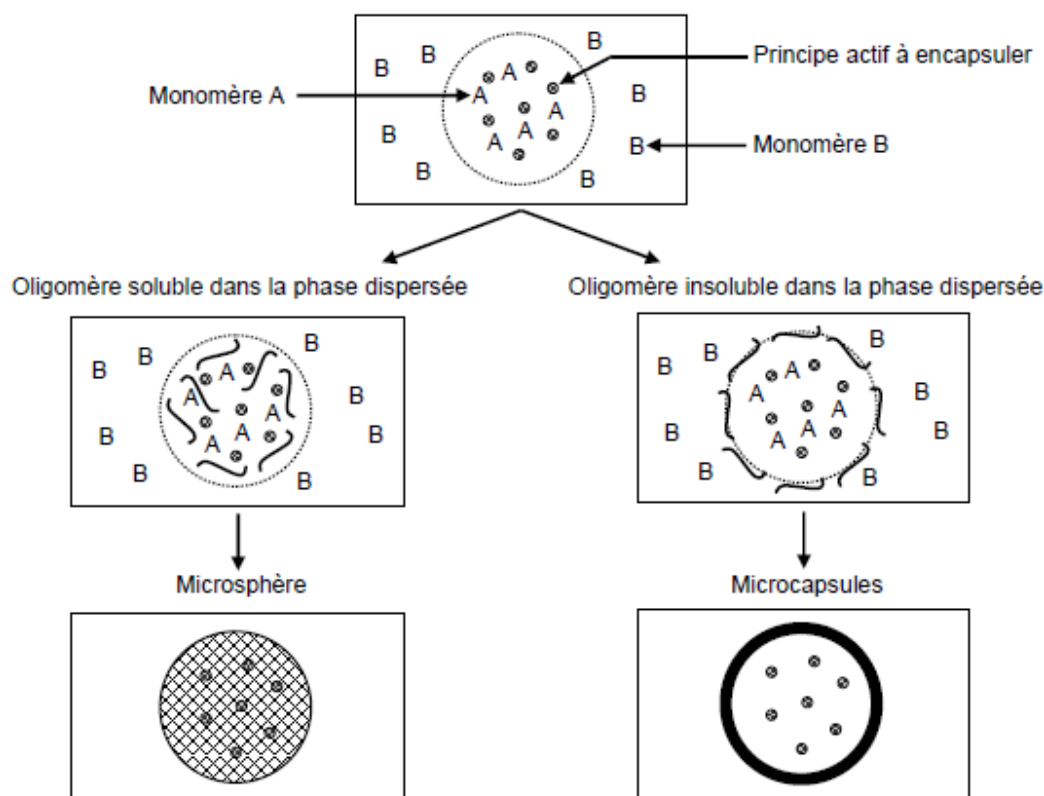


Figure II.6 : Schéma du procédé de polymérisation interfaciale [74,67]

II.8.3. Procédés mécaniques :

II.8.3.1. Procédé de nébulisation/séchage :

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

- Soit d'une solution de matière active et de matériau enrobant ;
- Soit d'une dispersion de particules solides de matière active dans une solution ou une émulsion de matériau enrobant ;
- Soit encore d'une émulsion de matière active dans une solution de matériau enrobant. Ce procédé comprend les 4 étapes séquentielles suivantes :
 - ✓ Nébulisation de la formulation liquide initiale pour former un aérosol ;
 - ✓ Mise en contact de l'aérosol avec un flux d'air, porté à une température contrôlée
 - ✓ Séchage rapide de l'aérosol pour former des microparticules solides ;
 - ✓ Séparation de la poudre de microparticules et de l'air contenant le solvant vaporisé.

Les microparticules obtenues par nébulisation-séchage (Le plus souvent des microsphères) sont d'une taille typiquement comprise entre environ 1 et 50 μm , pour un séchage à concourant. Le séchage à contre-courant permet d'obtenir des microparticules de taille moyenne plus élevée, comprise entre environ 50 et 200 μm . Le taux d'encapsulation est limité à environ 40 % (en masse) [47].

II.8.3.2. Procédé d'enrobage en lit fluidisé :

Le procédé d'enrobage en lit fluidisé s'applique exclusivement à des matières actives constituées de particules solides (granulés, cristaux). Des matières actives liquides peuvent néanmoins être encapsulées après absorption par des supports particuliers poreux. Le procédé permet de réaliser un enrobage continu de particules qui conduit donc à la production de microcapsules. Il comprend une séquence cyclique en trois temps :

- Fluidisation de la poudre de particules ;
- Pulvérisation du matériau enrobant sur les particules ;
- Séchage et filmification de l'enrobage.

Les formulations liquides qui sont pulvérisées sur les particules en mouvement dans le lit fluidisé sont des solutions ou des dispersions aqueuses ou organiques de polymères. Quand les gouttelettes de la formulation liquide pulvérisée rencontrent la surface des particules, il y a la formation du film d'enrobage qui s'effectue en plusieurs étapes successives :

- Contact microparticule-gouttelette ;
- Mouillage et étalement de la gouttelette sur la particule ;
- Séchage par évaporation du solvant et éventuellement pénétration dans la particule (figure II.7) [75].

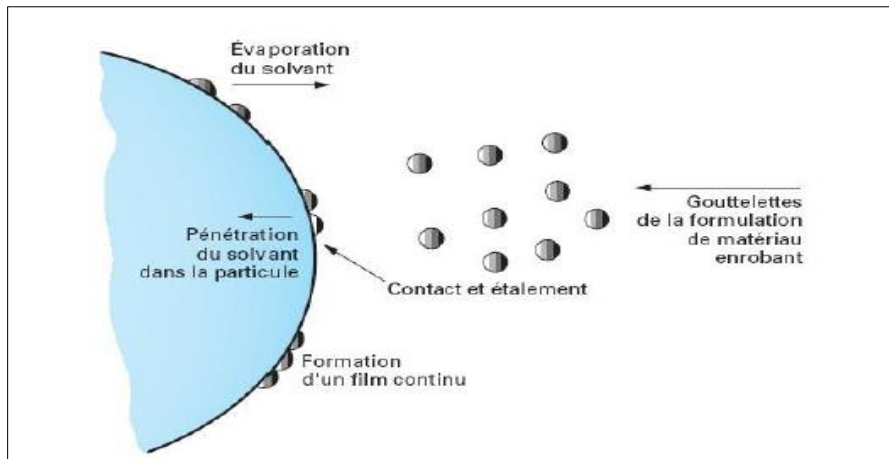


Figure II.7: Étape de formation d'un film d'enrobage par *spray-coating* sur des particules solides [47]

Les paramètres de procédé, qui doivent être maîtrisés et ajustés pour obtenir un tel enrobage, sont liés soit au séchage du film, soit à la pulvérisation de la formulation liquide. L'épaisseur des films d'enrobage déposés sur des particules en lit fluidisé est généralement comprise entre quelques micromètres et 20 μm . Le film devant être suffisamment épais pour masquer les défauts de surface. Le taux d'encapsulation est généralement élevé, compris entre 60 et 90 % (en masse) [75].

II.8.3.4. Extrusion-sphéronisation :

La technique d'extrusion-sphéronisation peut être utilisée pour l'encapsulation de poudres de matières actives dans des polymères thermoplastiques, dont la viscosité à l'état fluide permet de préparer des microcylindres homogènes et réguliers.

II.9. Principaux matériaux d'encapsulation : Les principaux matériaux enrobant utilisés dans les procédés sont récapitulés selon leurs origines, dans le tableau III.

Tableau III : Matières utilisées dans les procédés de microencapsulation [47]

Matériaux d'encapsulation	Procédés utilisables	Domaine d'application
Polymères d'origine naturelle		
Gélatine	Coacervation simple Coacervation complexe	Arôme, parfum, pharmacie, papeterie
Alginate de sodium	Coacervation complexe Gélification de gouttes	Biomédical, arôme, cosmétique, parfum, pharmacie
Chitosane	Coacervation complexe Gélification de gouttes Nébulisation Lit d'air fluidisé	Pharmacie (libération gastrique)
Amidon	Nébulisation, Extrusion	Alimentaire
Polymères cellulosiques		
EthylcelluloseHydroxypropylcelluloseHydroxypropylméthylcellulose Phtalate d'hydroxypropylméthylcellulose	Coacervation simple, Lit d'air fluidisé, Nébulisation, Extraction/évaporation de solvant	Pharmacie, biomédical
Polymères de synthèse.		
Copolymères acryliques et méthacryliques, PolyoléfinesCopolymères (acrylo-) vinyliques, (homo-) et (co-) polymères d'acides lactique et glycolique, Polycaprolactone	Lit d'air fluidisé, Nébulisation, Evaporation de solvant, Extrusion, Coacervation simple	Pharmacie Chimie, biomédical, phytosanitaire
Lipides et cires minérales		
Corps gras solides , Glycérides, Cires (d'abeille, de carnauba), Cires minérales	Congélation de gouttes, Hot-melt Lit d'air fluidisé	Cosmétique, chimie, pharmacie, vétérinaire, alimentaire, textile

Chapitre III :

Les interactions protéines polysaccharides

III.1. Rappels sur les interactions protéines/polysaccharides :

Les protéines et les polysaccharides sont des polymères d'origine naturelle, largement utilisés dans l'industrie alimentaire, notamment pour les émulsions et l'encapsulation. Ces polymères peuvent interagir par l'intermédiaire d'interactions attractives ou répulsives, et ainsi former des systèmes monophasiques ou biphasiques. Dans l'eau, le mélange de protéines et de polysaccharides peut conduire à quatre situations : la formation de complexes solubles, la coacervation ou précipitation, l'incompatibilité thermodynamique et la co-solubilité. [76-80].

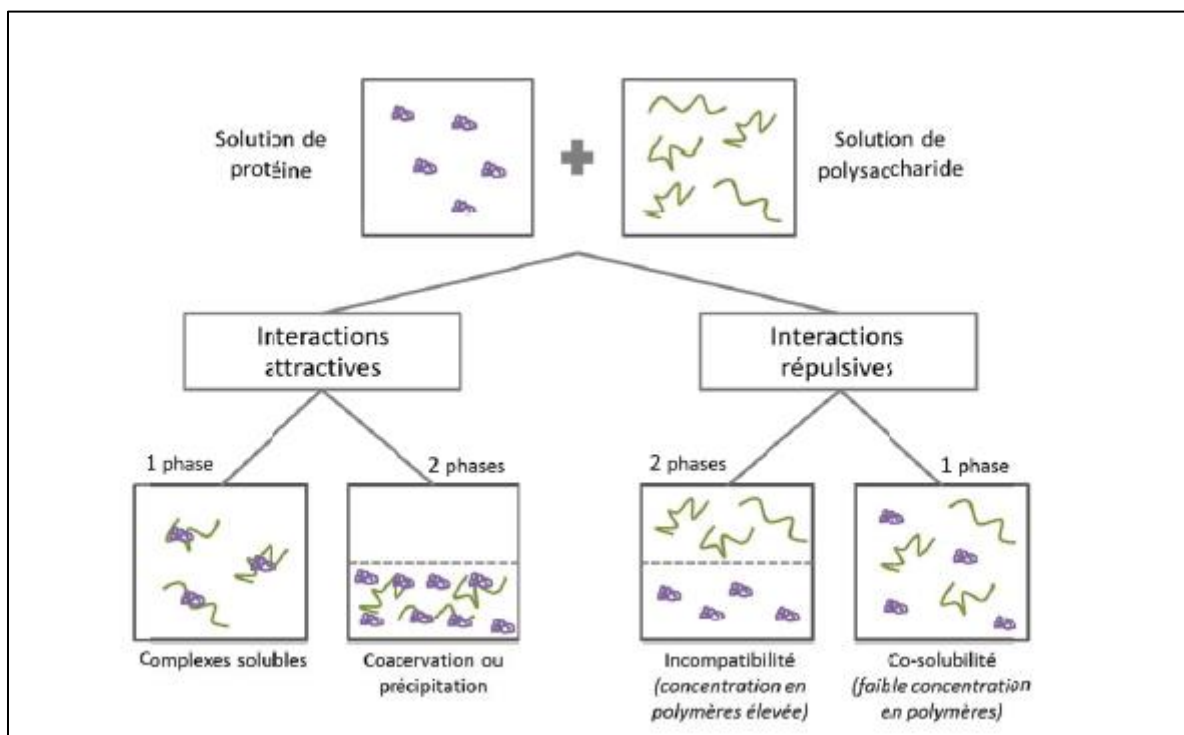


Figure III.1 : Représentation schématique des différentes situations de mélange protéines polysaccharides en solution aqueuse [80]

III.2. Comportement des mélanges protéines-polysaccharides

Schmitt et al.,1998 [82] ont montré que dans la plupart des cas, le mélange des biopolymères en solution est instable et une séparation de phase peut être obtenue selon deux cas distinct :

- Dans le cas où les interactions entre les deux biopolymères est de nature répulsive, ce qui donne lieu à un système à deux phases séparées, où chacune des phases est enrichie en l'un ou l'autre des polymères, dans ce cas il s'agit d'une incompatibilité thermodynamique entre les hydrocolloïdes en solution, appelé aussi séparation de phases ségrégative.

- Dans un autre cas, les interactions sont de nature attractive et le système donne lieu à deux phases, une concentrée, qui contient les deux macromolécules, et l'autre non. Ce cas est souvent appelé coacervation complexe ou séparation de phase associative. La coacervation complexe entre deux biopolymères est maintenant largement utilisé dans l'industrie alimentaire, cosmétique et pharmaceutique.

Le phénomène de coacervation est soit simple soit complexe, selon que le mélange contient un seul biopolymère ou plus, et c'est cette propriété qui est intéressante pour la microencapsulation [81].

III.2.1. Coacervation simple

Dans le cas de mélange d'un seul biopolymère avec un solvant incompatible, comme l'éthanol ou le polyéthylène glycol, ce dernier agit comme agent déshydratant et favorise les interactions biopolymère/biopolymère, donnant lieu à une séparation de phase. Khalil et al., 1968 [83], ont montré la spécificité de la structure en hélice de la gélatine pour la coacervation simple, à un pH isoélectrique et à faible force ionique. Cette configuration (en hélice) compacte est le résultat des forces attractives intermoléculaires dues à l'équilibre de charge atteint au pH isoélectrique. En s'éloignant du pH isoélectrique, les forces deviennent de nature répulsive permettant un dépliage partiel des molécules, ce qui favorise l'accessibilité du solvant pour le biopolymère et gêne le phénomène de coacervation.

III.2.2. Coacervation complexe

Dans ce cas, il s'agit d'un mélange de deux biopolymères (ou plus) en phase solvante. Si les deux biopolymères sont compatibles, par exemple deux molécules de charges opposées, ces derniers s'interagissent et se concentrent dans la phase pauvre en solvant (ou la phase concentrée), alors que le solvant occupe la phase pauvre en biopolymère. Ce phénomène de séparation de phase a été présenté pour la première fois par Bungenberg de Jong (1949) [84] Pour un système de gélatine et gomme d'acacia dont le principal mécanisme d'interaction est de nature électrostatique, relié à leur dépendance au pH et à la force ionique.

Plus généralement, les interactions impliquées entre deux biopolymères peuvent être répulsives et non spécifiques et provenir de l'effet d'interactions électrostatiques et/ou de volume exclu. Les interactions attractives peuvent être faibles ou fortes, spécifiques ou non spécifiques. Les liaisons covalentes sont spécifiques contrairement aux liaisons ioniques, aux forces de *van der Waals*, aux interactions hydrophobes et aux liaisons hydrogène. Il peut y avoir une interaction électrostatique entre des macromolécules d'une charge nette de même

signe par l'intermédiaire de zones portant des charges de signe opposé. Bien que les interactions électrostatiques soient majoritaires lors de la formation des complexes, des forces d'autres natures sont impliquées dans certains systèmes. Par exemple, la formation de complexes pectine/gélatine à un pH supérieur au pH_{IE} de la protéine et à une force ionique supérieure à 0,2 pouvait s'expliquer uniquement par la présence d'interactions électrostatiques. En fait, la présence d'une température critique de miscibilité (20°C) du système gélatine/pectine a permis de détecter la présence de liens hydrogène, favorisés à basse température. D'autre part, le traitement thermique des complexes protéine/polysaccharide a permis d'améliorer leur stabilité lors de variations de pH ou de force ionique, et cette amélioration a été associée à des interactions hydrophobes [85-88].

III.3. Natures des interactions protéines polysaccharides

III.3.1. Interactions électrostatiques

Les interactions électrostatiques peuvent être de type ion-ion, ion-dipôle ou dipôle-dipôle. Les dipôles peuvent être permanents ou induits. Les interactions ion-ion sont impliquées entre des molécules possédant une charge électrique permanente. Typiquement, deux types de complexe peuvent être formés par des interactions électrostatiques, le complexe soluble, obtenu lorsque le nombre des charges opposés de deux macromolécules sont différents, la charge résultant permet la solubilisation du complexe suite à son interaction avec le solvant. Cependant, si le nombre des charges opposés portés par les deux macromolécules sont égales, donc la charge totale du complexe est égale à zéro, le complexe sera insoluble [81].

Plusieurs travaux de recherches ont réalisé des complexes polysaccharides-protéines par des interactions électrostatique des charges opposés, on cite à titre d'exemple, le mélange des polysaccharides (anionique) et des protéines (cationique): tel que Osés et al., [89] qui ont étudié la gomme de mesquite-protéines de lactosérum, Farris et al., [90] ayant travaillé sur le couple pectine-gélatine, Parris et al., [91] qui ont étudié le mélange pectine/carboxy méthyl cellulose, le mélange caséinate /protéines de lactosérum étudié par Sabato et al., [92], Brindle et Krochta, [93] et Wang et al., [94], qui ont travaillé sur l'alginate de sodium-protéine de lactosérum/gélatine. Dans d'autres cas on pourra favoriser un mélange de polysaccharides (cationique) et de protéines (anionique), c'est l'exemple du chitosane-gélatine à un pH de 5,6-6,2 étudié par Pereda et al., [95] ; Cofré et al., [96] et Staroszczyk et al. [97].

III.3.2. Interactions non-électrostatique

- **Liaisons hydrogène**

Il s'agit d'une liaison de faible énergie entre un atome électronégatif (oxygène) et un autre atome électro négatif (groupement carboxylique). Par exemple, la formation de coacervats gélatine-pectine ou gélatine-alginate à pH entre 6 et 7,6 se fait à travers une liaison hydrogène [98,99]. Le complexe soluble entre ces deux macromolécules (gélatine et pectine/alginate) peut être formé sur une large plage de pH supérieurs à 4,8 (point isoélectrique de la gélatine). On peut citer aussi, la formation de complexes protéines de lactosérum et alginate [91], ou protéines de lactosérum-carboxy méthyl cellulose [100] à travers des liaisons hydrogène. La formation de liaisons hydrogène a été aussi rapporté par Pereda et al., [95] ; Cofré et al., [96] et Staroszczyk et al., [97], dans le cas de mélange chitosan-gélatine lors de la formation du complexe polyélectrolytique (pH du mélange entre 5,6 et 6,2).

- **Interactions hydrophobes**

Il s'agit d'une interaction de type dipôle-dipôle. Ce type d'interaction est essentiel pour l'amélioration de la stabilité thermique des biopolymères en mélange. Ce type d'interaction est réalisé dans des mélanges de type protéines-xanthane à pH égale à 3,7 [82] ou protéine-chitosane à pH 3 [101].

- **Liaisons covalentes**

Il s'agit d'une interaction entre les groupements amines des protéines et les groupements carboxyliques des polysaccharides pour former une liaison covalente de type amide, on cite à titre d'exemple le complexe β -lactoglobuline-dextran [102], protéine de lactosérum-amidon [103].

III.4. Paramètres physico-chimiques influençant la formation des complexes protéines polysaccharides

La complexation étant principalement suivie par des interactions électrostatiques entre les biopolymères lors de la formation des complexes macromoléculaires primaires, les paramètres physico-chimiques influençant ces interactions ont un effet important sur la séparation de phase. Nous distinguons des paramètres que nous qualifierons de physico-chimiques comme le pH, la force ionique, le ratio massique des macromolécules, la masse moléculaire des macromolécules, la densité de charge des macromolécules, la température, l'agitation et le temps d'agitation et la concentration totale en biopolymères [104, 105].

. III.4.1. Influence du pH

Le pH joue un rôle très important dans le processus de formation de complexes entre les protéines et les polysaccharides. En effet, le pH est responsable de l'ionisation des macromolécules afin que des interactions électrostatiques puissent s'effectuer. Plus précisément, le pH contrôle l'ionisation des groupements des chaînes latérales, des groupements aminés et carboxyliques des protéines et des groupements carboxyliques des polysaccharides [82]. Les complexes formés peuvent être solubles ou insolubles dépendamment du degré de neutralisation des charges opposées [106]. Des polymères fortement chargés, résultant de la variation du pH, auront une conformation modifiée qui les amènera à former des agrégats insolubles au détriment de la formation de complexes solubles [107]. En fait, pendant la formation de complexes entre protéine et polysaccharide anionique, la charge nette (négative) des molécules de polysaccharides diminue progressivement, avec la baisse du pH, pendant qu'elles s'attachent aux molécules de protéine chargées positivement [108]. La conséquence directe qui en découle est la diminution de la solubilité et de l'hygroscopicité de ces polymères et finalement la formation de complexes.

L'influence du pH sur la formation des complexes électrostatiques entre les macromolécules en solution aqueuse a été mise en évidence dès le début du siècle par Tiebackx [109]. Qui a pu démontrer macroscopiquement que la précipitation d'un mélange composé de gélatine (0,5% p/p) et de gomme d'acacia (2% p/p) était dépendante de la quantité et de la normalité de l'acide ajouté afin d'ajuster le pH.

Le maximum d'interactions apparaît à un point appelé point d'équivalence électrique (PEE) où la protéine et le polysaccharide possèdent des charges également opposées [110]. En prenant comme exemple le système β -lactoglobuline/ gomme d'Acacia, il a été montré que l'PEE se situait autour d'une valeur de pH de 4 [82]. Le rendement maximum de coacervats est obtenu pour un ratio protéine : polysaccharide (Pr : Ps) spécifique. À un pH et une force ionique donnés, le ratio massique Pr : Ps conditionne la neutralisation des charges entre les deux macromolécules [107, 86].

L'influence du pH est telle que des variations de l'ordre de 0,5 unités pH sont suffisantes pour que la formation de complexes soit réduite de manière significative [111]. Deux valeurs de pH, pH_c et pH₀, ont été identifiées et correspondent à des changements structuraux et morphologiques [112-114]. Déterminé par une légère augmentation de l'intensité lumineuse diffusée dans la dispersion, le pH critique, pH_c, correspond à la complexation primaire des macromolécules et la formation de complexes intrapolymériques. Le pH₀ fait référence à une

séparation de phase à l'échelle microscopique, conduisant à la formation de gouttelettes coacervées (Figure III.2). Le pH_0 , est déterminé par une augmentation significative de la turbidité du système.

Ainsi, la plupart des protéines alimentaires (pH_{IE} autour de 5) peuvent former des complexes avec les polysaccharides anioniques puisque les deux polymères porteraient des charges opposées. Cependant la tendance vers une formation de coacervation complexe insoluble est favorisée par de faibles concentrations de sel et par des valeurs de pH en dessous du pH_{IE} de la protéine [115]. Des travaux de compatibilité de l'albumine de l'œuf et de différents amidons ont montré qu'un optimum de complexes insolubles était obtenu en variant la quantité d'acide ajoutée [116].

III.4.2. Influence de la force ionique

Parmi les trois types d'équilibre qu'on trouve dans une solution binaire protéine/polysaccharide, la miscibilité est apparente généralement à des forces ioniques plus faibles que l'incompatibilité et la séparation de phases associative [117]. Le nombre d'ions présents dans un mélange de biopolymères est un facteur très important affectant le phénomène de complexation car il intervient dans les composantes entropiques et enthalpiques de l'énergie libre de mélange [85].

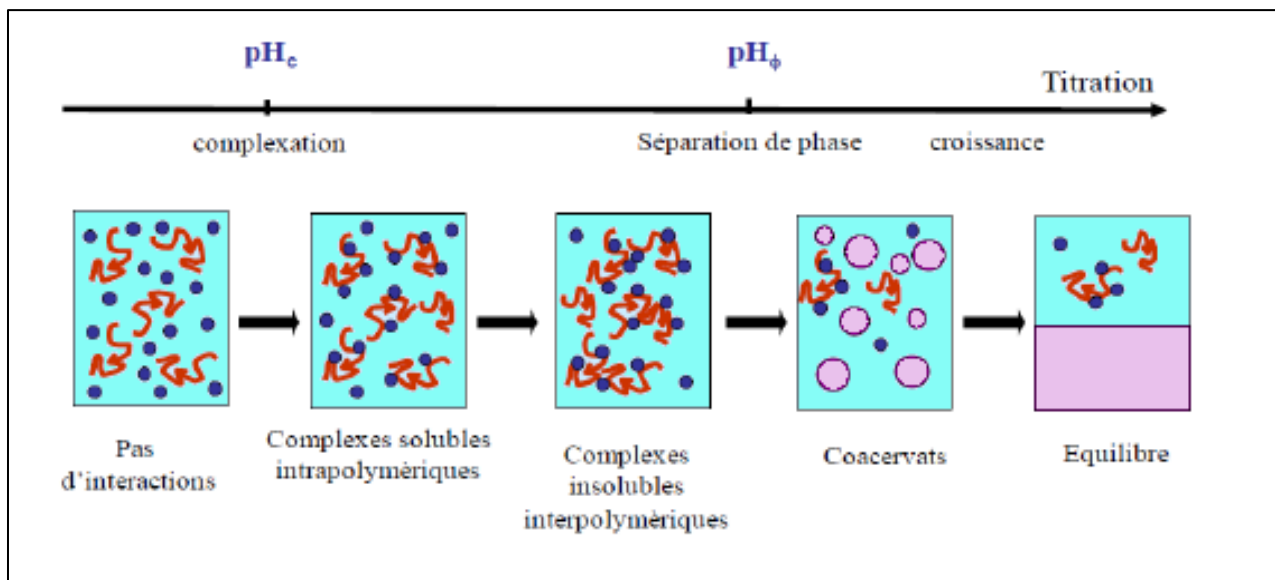


Figure III.2: Représentation schématique de différentes étapes de complexation entre protéines et polysaccharides de charges opposées en fonction du pH. Les cercles bleus représentent la protéine, les lignes courbes représentent le polysaccharide. pH_c : pH critique, pH_0 : pH de séparation de phase [118].

À faible force ionique, le nombre de charges présentes sur le biopolymère est suffisant pour qu'il y ait des interactions électrostatiques. La libération des contre-ions lors de la complexation entre les macromolécules favorise le gain entropique de mélange et l'énergie libre électrostatique. De fortes concentrations salines produisent un effet inverse, les ions présents entrant alors en compétition avec les macromolécules et l'attraction électrostatique entre les biopolymères est réduite à cause de la diminution de charge nette de ces derniers pouvant aller jusqu'à supprimer totalement la coacervation complexe [86]. Cet effet est plus prononcé en présence d'électrolytes ou d'ions de valence supérieure à un [107,119]. Cet effet spécifique de la force ionique, de même que le type d'ions présents, avaient été mis en évidence initialement par Bungenberg *de Jong*. [84] pour le système gélatine/gomme d'acacia. Ainsi, les ions divalents avaient pour effet de supprimer la coacervation complexe à des forces ioniques inférieures aux ions monovalents, cette suppression pouvant cependant être levée par dilution du mélange.

Des travaux similaires ont été aussi entrepris par Mattison et al., [112] et Schmitt et al., [116] qui ont montré que les ions divalents supprimaient la coacervation complexe à des concentrations ioniques plus faibles que les ions monovalents, mais que cette suppression pouvait être levée si la solution des ions divalents était diluée. Ceci démontrerait que l'effet ionique des ions divalents est plus fort que celui des ions monovalents.

Dans un système gélatine-polyélectrolyte, Bowman et al., [119] ont également mis en évidence une valeur critique de force ionique qui détermine la taille des particules formées. Ces auteurs expliquent la diminution de la taille des complexes à faible et forte force ionique par une solubilisation des complexes macromoléculaires du fait de l'excès de charges présentes dans la dispersion, interprétation reprise par Wang et al.,[120], pour expliquer le même phénomène dans un système composé de micelles anioniques et d'un polymère cationique.

Pour conclure, il faudrait rappeler que la force ionique a un effet sur le pH_c et le pH₀. La tendance générale est que pour un ratio protéine : polysaccharide donné, les pH évoluent généralement vers des valeurs plus acides afin de compenser les charges masquées par les ions ajoutés [121], cela veut dire que la densité de charge des protéines doit être augmentée afin d'atteindre le même niveau de neutralisation de charge entre les protéines et les polysaccharides. Par exemple la valeur du pH₀ diminue de 9 à 7 en ajoutant 200 mM de NaCl dans le système gélatine / κ -carraghénane à un ratio massique protéine : polysaccharide de 1:1 [122].

III.4.3. Influence de la densité de charge des macromolécules

La formation de complexes est principalement influencée par un autre facteur qui est la densité des charges qui se localise sur les macromolécules. La densité de charges des biopolymères peut être définie comme le nombre de charges par unité de longueur. De plus, la charge nette des complexes influence la solubilité de ceux-ci dans leur milieu. Par exemple, si un polymère possède un excès de charge par rapport à un deuxième polymère, les complexes formés auront tendance à interagir avec le solvant. Par contre si les charges des deux polymères sont nulles, à ce moment on aura formation de complexes qui seront insolubles. Ces complexes peuvent être à nouveau solubles par titration acide ou par ajout de sels [123].

III.4.4. Influence de la masse moléculaire des biopolymères

L'effet de la masse moléculaire des biopolymères sur la séparation de phase d'un système ternaire intervient au niveau du volume occupé par les molécules. Cette séparation de phase est obtenue plus facilement lorsque la masse moléculaire des biopolymères est grande. Toutefois, afin de tenir compte de l'influence de ce paramètre, deux cas limites sont proposés. Si la masse moléculaire des biopolymères est trop faible, l'interaction se fera plutôt par simple pontage ionique plutôt que par formation de complexes électrostatique intermoléculaires. Au contraire, si les masses moléculaires sont trop élevées, l'interaction conduira à la formation de précipités plutôt que de coacervats [124].

III.4.5. Influence du ratio massique protéine : polysaccharide

Le ratio massique protéine : polysaccharide (Pr : Ps) est un autre facteur influençant la charge nette et les propriétés des complexes obtenus. Il en résulte une influence sur la solubilité des complexes et plus particulièrement sur le phénomène de séparation de phase par coacervation complexe. En effet, à un pH et à une force ionique donnés, le ratio massique Pr : Ps va conditionner la neutralisation des charges entre les deux macromolécules [86]. Si les complexes sont de type stoechiométriques, c'est à dire que la neutralisation est obtenue pour des ratios de 1:1, tout ratio supérieur ou inférieur aura pour effet de solubiliser ces complexes et donc de diminuer la formation de coacervats [125].

Dans l'étude de la coacervation complexe entre la gélatine et la CarboxyMethylCellulose, Koh et Tucker [126], ont montré que le volume de la phase constituant le coacervat était maximum pour un ratio de mélange de 1:1, pour lequel la neutralisation des charges portées par les deux macromolécules est obtenue.

III.5. Biopolymères à l'étude :

III.5.1. L'alginate de sodium

a. Présentation :

Les polysaccharides sont des polymères carbohydrates constitués d'unités monosaccharides liées entre elles par des liaisons glycosidiques C-O-C. Leur structure peut être linéaire ou branchée. Ces macromolécules ont des propriétés distinctes qui dépendent de leur structure et peuvent être amorphes ou même insolubles dans l'eau. L'unité monomère dans la chaîne du polymère étant un cycle à 6 carbones, la formule générale des polysaccharides peut être représentée comme $(C_6H_{10}O_5)_n$ où n est compris entre 40 et 3000.

L'alginate est un polysaccharide naturel relativement abondant puisqu'il constitue le composant structurel des algues brunes marines (Phaeophyceae), représentant plus de 40% en masse sèche. Ces algues peuvent se trouver au bord des littoraux du monde entier. L'alginate est l'un des polysaccharides constituant la capsule entourant certaines bactéries, et peut également être produit par fermentation microbiologique. Néanmoins, les alginates commerciaux utilisés pour des applications industrielles sont la plupart du temps issus d'algues marines brunes. Les applications industrielles de l'alginate sont souvent liées à ses propriétés de rétention d'eau, son pouvoir viscosifiant, gélifiant ou encore stabilisant [127].

b. Historique de l'alginate

Le chimiste britannique E.C. Stanford fut le premier à caractériser l'alginate par la préparation de l'acide alginique à partir d'algues brunes dans un brevet daté du 12 Janvier 1881. Stanford réussit à préparer l'alginate par extraction de l'acide alginique des algues avec du carbonate de sodium puis précipitation à pH acide. Il pensait initialement que l'alginate contenait de l'azote et a beaucoup contribué à l'élucidation de la structure du polymère.

Dès 1926, les équipes indépendantes de Atsuki et Schmidt, ont travaillé sur la structure du polysaccharide et ont découvert la présence de l'acide uronique comme constituant de l'alginate.

Les années suivantes, différentes équipes s'accordent sur le fait que l'alginate est constitué d'acide D-mannuronique. En 1939, l'équipe de Hirst détermine la nature β 1,4 des liaisons entre des résidus d'acide mannuronique, à l'instar de la cellulose. Mais cette structure simple fut par la suite remise en cause par les travaux de Fisher et Dörfel en 1955, qui découvrent un

nouvel acide uronique présent dans le polymère : l'acide L-guluronique. À partir de ce moment-là, l'alginate fut considéré comme un copolymère composé de résidus α -L-guluronique et β -D-mannuronique. En fonction de la source dont est extrait l'alginate, sa composition exacte en acide uronique doit alors être examinée par des méthodes d'analyse chimiques. C'est d'ailleurs le travail auquel s'attellent Haug et son équipe en 1964. Suivent alors la découverte de l'alginate comme copolymère à bloc ainsi que la corrélation entre la structure des blocs et les propriétés chimiques du polymère [128].

c. Structure chimique

L'alginate fait partie de la famille des copolymères : il est composé des deux résidus α -L-guluronique et β -D-mannuronique liés en (1 $\rightarrow$ 4) (Figure III.3 (a) et (b)). Ainsi, les possibilités de composition et de séquence sont très larges et varient en fonction du type d'alginate. L'alginate peut être considéré comme un véritable copolymère à blocs composé de régions homopolymériques M et G (dénommées blocs M et blocs G), séparées par des séquences alternées de M et G (appelées blocs MG) (Figure III.3(c)). La quantité relative entre ces différentes séquences dépend de l'origine de l'alginate.

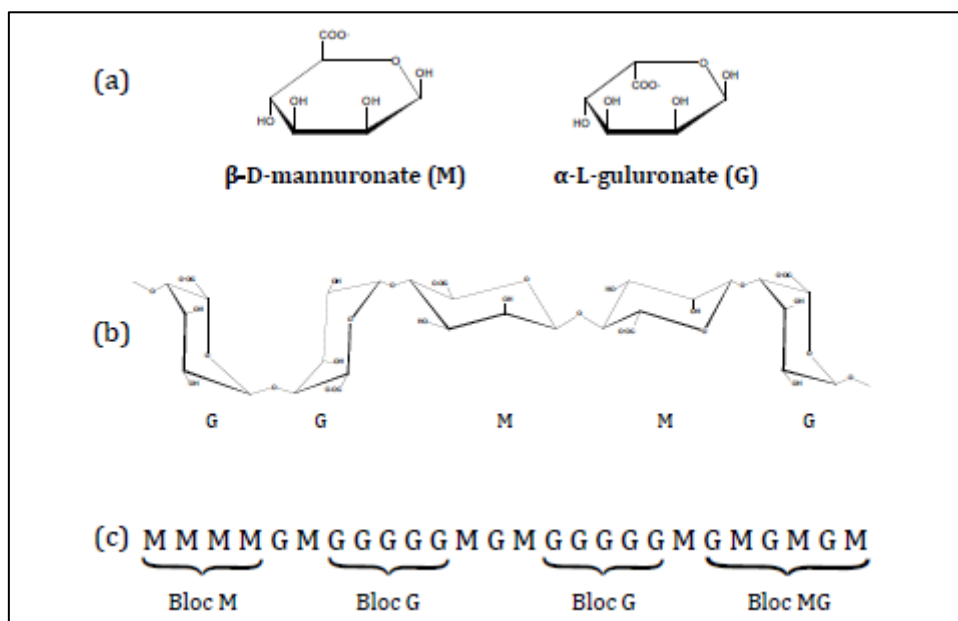


Figure III.3 – Structure et composition de l'alginate : **(a)** monomères d'acides uroniques, **(b)** conformation des chaînes et **(c)** distribution des blocs. [127]

d. Gélification

Les propriétés physiques de l'alginate ont été principalement découvertes dans les années 1960 et 1970. À la différence des autres polysaccharides gélifiants, la principale caractéristique de l'alginate est sa gélification avec des cations bivalents. De plus, sa transition sol-gel n'est pas influencée par un changement de température. Deux blocs G de deux chaînes de polymères adjacentes peuvent être réticulés par un cation bivalent (par exemple Ca^{2+} ou Ba^{2+}), par une interaction électrostatique entre les deux groupes carboxyliques COO^- du polysaccharide. Cette complexation non covalente donne lieu à la formation d'un réseau à trois dimensions, et donc d'un hydrogel physique. Lorsque deux brins de polymère sont face à face, la conformation des blocs G forment des cavités dans lesquelles viennent se loger les ions Ca^{2+} . Cette dimérisation des blocs G est communément appelée structure type "boîte d'œufs". Un schéma représentatif de la gélification des chaînes d'alginate est représenté dans la Figure III.4. La rigidité du gel obtenu dépend du ratio entre les blocs G et les blocs M contenus dans le polymère (ration G/M). De façon générale, les alginates composés d'un faible ratio G/M forment des gels plus mous et élastiques, alors que les alginates avec ratio G/M élevé donnent plutôt des gels durs et cassants [129].

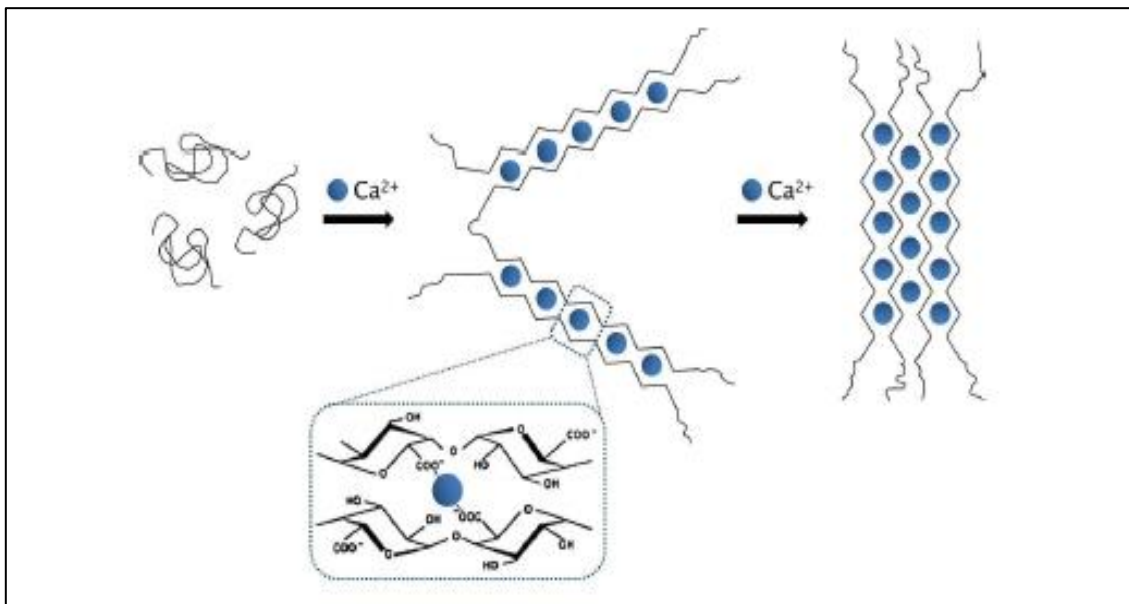


Figure III.4 Gélification de l'alginate par des ions calcium, selon de modèle "boîte d'œufs". Les blocs G de deux chaînes sont d'abord dimérisés par une liaison électrostatique avec un cation Ca^{2+} , puis ensuite polymérisés afin de former un gel dur [129].

III.5.2. La gélatine

La gélatine est une substance protéique pure. Elle est obtenue généralement par hydrolyse acide partielle (type A) ou hydrolyse alcaline partielle (type B) des fibres du collagène; Comme elle peut être constituée par un mélange des deux types. La gélatine peut couvrir une gamme de produits possédant des propriétés différentes [130-132].

A. Composition chimique de la gélatine

La gélatine contient un total de 18 acides aminés en différentes concentrations. La liaison de ces acides aminés forme des chaînes polypeptidiques. Chaque chaîne contient environ mille acides aminés. La structure globale de la gélatine est une molécule en forme de baguette se composant des structures hélicoïdales primaire, secondaire et tertiaire [104], (Tableau IV).

B. Le pH et le p*H_i* (pIE)

La mesure standardisée s'effectue sur des solutions à 6.67%. Toutes les solutions de gélatine ont un pH qui varie en fonction du traitement subi par les matières premières et qui est compris entre pH 4 et pH 6,5, donc légèrement acide.

La gélatine est un exemple de polymère amphotère, présentant des propriétés cationiques en milieu acide et des propriétés anioniques dans un environnement alcalin. Elle se caractérise donc par le point isoélectrique (pIE) qui joue sur son aptitude au mélange avec d'autres hydrocolloïdes, c'est à dire par le pH auquel elle est globalement neutre (autant de charges positives que négatives)[133]. A cette valeur de point isoélectrique, on a l'équilibre suivant (Figure III.5):

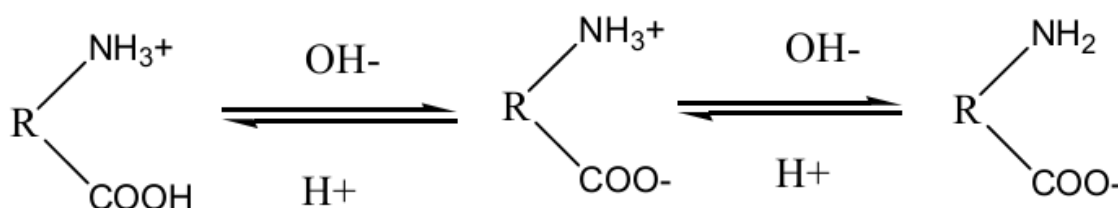
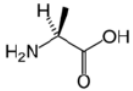
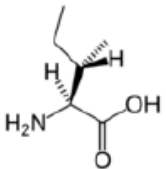
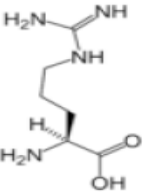
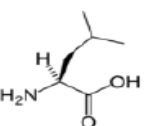
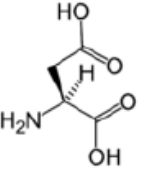
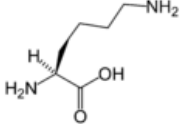
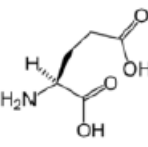
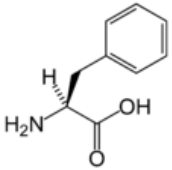
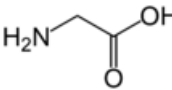
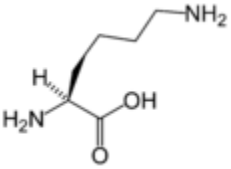
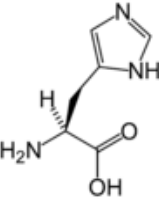
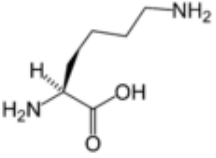
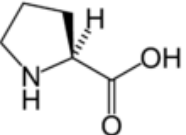
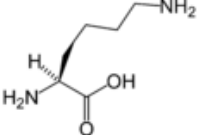
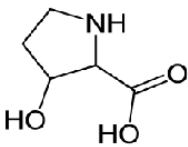
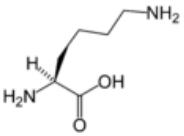
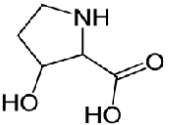
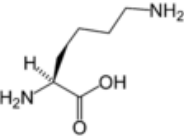


Figure III.5 : Equilibre de charges au point isoélectrique. [134]

Tableau IV : Différentes fractions en acides aminés entrant dans la composition de la gélatine. [133]

Teneur en acides aminés exprimé en g pour 100g de gélatine pure		Structures	Teneur en acides aminés exprimé en g pour 100g de gélatine pure		Structures
Alanine	11.3		Isoleucine	1.6	
Arginine	9.0		Leucine	3.5	
Acide aspartique	6.7		Lysine	4.4	
Acide glutamique	11.6		Phénylalanine	2.5	
Glycine	27.2		Sérine	3.7	
Histidine	0.7		Thréonine	2.4	
Proline	15.2		Tryptophane	0.0	
Hydroxyproline	13.3		Tyrosine	0.2	
Hydroxylisine	0.8		Valine	2.8	

C. Propriétés technologiques et caractéristiques de la gélatine

Le comportement physico-chimique de la gélatine est principalement déterminé par la séquence en acides aminés de la molécule, par sa structure spatiale, sa distribution en masses moléculaires, ainsi que par les conditions du milieu (pH, force ionique et la réaction avec d'autres composés) [135].

Les propriétés associées à la gélification sont principalement la formation du gel, la texturation, et l'effet épaississant. Ces propriétés sont reliées principalement à la viscosité, à la structure, à la masse moléculaire et à la température du système. Le refroidissement d'une solution de gélatine conduit à la formation d'un gel réversible. Cette réversibilité théoriquement illimitée du processus de gélification est de loin la plus importante propriété technologique de la gélatine. Parmi les critères les plus importants qui déterminent la qualité de la gélatine ; c'est le degré de bloom qui se trouve généralement entre 50 et 300. Il caractérise le filmogène et le pouvoir gélifiant de la gélatine (degré de bloom élevé implique pouvoir gélifiant élevé) [136]. Ce pouvoir dépend de la concentration et de la force intrinsèque de la gélatine qui a la capacité de former des gels thermoréversibles en fonction de la température [137].

Les propriétés de surface sont basées sur le fait que les chaînes latérales de la gélatine, comme celles de toutes les protéines, ont des groupements chargés et que certaines parties des séquences aminées de la molécule, contiennent des acides aminés hydrophiles ou hydrophobes. Les deux parties hydrophile et hydrophobe ont tendance à migrer vers la surface, ce qui réduit la tension superficielle de la solution aqueuse. Dans le même temps, la gélatine a plusieurs propriétés qui protègent et stabilisent la surface formée. Cette propriété multifonctionnelle de la gélatine est utilisée dans la production et la stabilisation des mousses et émulsions.

La gélatine forme des solutions colloïdales avec l'eau, solution dans laquelle le solvant est un liquide et le soluté un solide dispersé de manière homogène sous forme de très fines particules, la préparation étant soit un « sol », soit un gel. Elle est donc un « hydrocolloïde ». Ces hydrocolloïdes, sont souvent utilisés dans l'industrie alimentaire pour leurs fonctionnalités. Toutefois, un hydrocolloïde seul, est incapable de remplir, toutes les fonctions désirées, mais en comparaison avec celles d'autres hydrocolloïdes (alginates, carraghénanes, etc.), les fonctions de la gélatine sont beaucoup plus larges (pouvoir gélifiant, épaississant) [137].

III.5.3 Chitine et chitosane

La chitine a été découverte pour la première fois en 1811 par le Professeur Henri Braconnot, directeur du jardin botanique de Nancy. Un peu plus tard en 1859 fut la découverte du chitosane par Rouget en traitant la chitine avec la potasse et en examinant les différentes formes désacétylées obtenues. Le nom du chitosane a été proposé par Hoppe-Seyler en 1894.

Le chitosane est peu présent dans la biomasse, on le retrouve à l'état naturel dans la paroi cellulaire de certains champignons, de bactéries, levures et algues.

Chez les crabes et les crevettes, la chitine joue le rôle de composants structuraux qui renforcent et protègent les organismes. Idéalement, la chitine est un polysaccharide linéaire constitué d'unités répétitives β - (1-4) -2-acétamido-2-déoxy-d-glucopyranose où l'amine les groupes sont entièrement acétylés [138,139].

a. Structure chimique

Le chitosane est un copolymère linéaire flexible de 2-acétamido-2-déoxy- β -D-glucopyranose et 2-amino-2 -déoxy- β -D-glucopyranose liés en β (1-4). Ce polysaccharide est obtenu par N-déacétylation d'un des polymères naturels les plus abondants, la chitine, extraite des carapaces de crustacés tels que les crabes et les crevettes [140].

Le chitosane peut être transformé sous différentes formes dans des conditions beaucoup plus douces en raison de sa solubilité dans des solutions acides diluées, ce qui fait du chitosane un biopolymère plus attrayant pour diverses applications.

Le chitosane a trois types de groupes fonctionnels réactifs, un groupement amine en position C-2, deux groupements hydroxyles en positions C-3 et C-6 respectivement (Figure III.6). Grâce à ses groupements amines libres, ce composé possède des propriétés très intéressantes. Le chitosane, soluble dans les acides faibles, possède une charge positive alors que la plupart des polysaccharides sont chargés négativement [141,142].

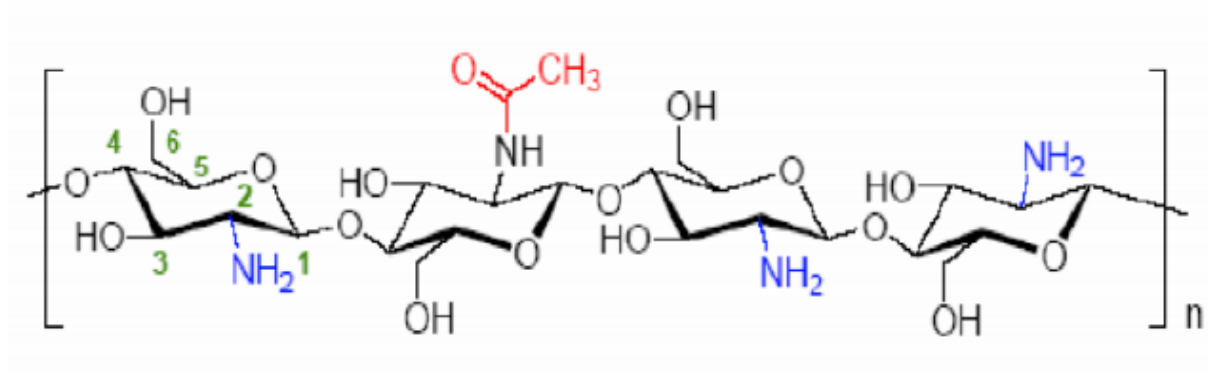


Figure III.6 : Structure chimique du chitosane [142].

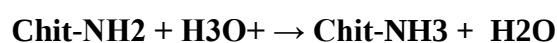
b. Propriétés du chitosane

• Degré de désacétylation

Le degré de désacétylation (DDA) est l'une des propriétés les plus importantes du chitosane. Au cours de ses dernières décennies, beaucoup de méthodes ont été développées pour la détermination du DD, à savoir la spectroscopie infrarouge [143,144], la spectroscopie U-V [145], la résonance magnétique nucléaire [146], la titration colloïdale et la potentiométrie [147]. Cependant, la méthode la plus simple reste la spectroscopie IR proposé par Khan et al. [148].

• Solubilité

En effet, le chitosane se dissout uniquement en milieu acide par protonation des groupes amine présents sur la macromolécule. L'équilibre suivant décrit l'état d'ionisation du polyélectrolyte en solution :



Le pKa du chitosane est approximativement égal à 6.3. Ainsi, lorsque le DDA est peu élevé, c'est-à dire lorsque les groupements amine sont en petite quantité, le chitosane est peu soluble. En général, on utilise du chitosane avec un DDA supérieur à 70 % pour avoir une grande partie soluble. Un chitosane qui a un DDA égal à 85%, ses chaines sont flexibles pour des pH supérieurs à 3 [149].

Plus le pH est bas, plus la viscosité est forte. La viscosité augmente également avec le DDA car plus le polymère est désacétylé, plus la proportion des groupements amine libres est importante et plus il est soluble. La viscosité augmente également avec la concentration et elle est en fonction de la Masse moléculaire des chaînes macromoléculaires. Comme pour les autres polysaccharides, la viscosité chute lorsque la température augmente [150].

Le chitosane est facilement soluble dans les solutions acides diluées à pH <6 mais insoluble dans l'eau et les solvants organiques. L'acide le plus couramment utilisé pour préparer une solution est l'acide acétique dilué. La valeur du pKa des groupes amine primaire du chitosane est approximativement 6.3; par conséquent, dans des conditions acides de pH inférieur 6, les groupes amine sont protonés, ce qui conduit à la répulsion entre les macromolécules chargées positivement des chaînes qui permettent aux molécules d'eau de diffuser et de solvater le polymère et le polymère chargé positivement devient soluble. Il est stable en milieu acide. La valeur du degré de désacétylation DDA influence fortement sa solubilité. La distribution des groupes N-acétyl sur la chaîne polymérique peut contrôler aussi la solubilité des solutions données [151].

- **Propriétés biologiques**

Le chitosane est biodégradable et biocompatible ; il présente un caractère antithrombogène et homostatique. Il montre des propriétés cicatrisantes remarquables. Il a également des propriétés inhibitrices sur la croissance de nombreux parasites et infections, de plus il a des propriétés immunologiques, anti tumorales, antibactériennes et antifongiques.

C'est un agent épaississant grâce à la liaison glycosidique β -(1 4), qui est un polymère semi-rigide. En particulier, la possibilité de formation de ponts hydrogène inter-chaînes augmente encore ses performances, allant jusqu'à un comportement de type gel physique faible [151,152].

- c. Application du chitosane**

Dans les années 1980, le chitosane a été évalué comme matrice pour une libération prolongée des granules et comprimés pour l'administration de principes actifs en les encapsulant dans le biopolymère qui permet de favoriser leur libération progressive et contrôlée [153-154]. On peut également combiner les propriétés de deux polymères comme les matrices composites chitosane/alginat [151].

En médecine, il permet l'accélération de la cicatrisation et de la guérison des blessures, le traitement des lésions épidermiques (chirurgie reconstructrice), la stimulation de la régénération des tissus (chirurgie plastique), il est utilisé en cancérologie comme matrice pour la régénération osseuse (substitut osseux, substitut de cartilage ou pour la reconstitution de la peau ou peau synthétique), de même il est utilisé en ingénierie tissulaire et en biologie cellulaire. Il est également employé pour la stimulation du système immunitaire, comme

pansement, agent anticoagulant, agent hémostatique, agent anti-infectieux, antibactérien, anti-tumeur [155].

Le chitosane peut être utilisé dans l'administration transdermique de médicaments. C'est un polymère mucoadhésif agent de libération prolongée [156].

En outre le chitosane a été largement utilisé dans des applications biomédicales. En ophtalmologie, il a été étudié en tant que matériau pour la fabrication de lentilles de contact en raison de sa capacité à former des films, de sa clarté optique et de sa stabilité mécanique. Dans la cicatrisation des plaies, une grande quantité de recherche a étudié l'utilisation de différentes formulations de chitosane pour la fermeture de plaies cutanées dans des modèles animaux [151].

Partie 2

Etude expérimentale

Chapitre IV :

Matériels et méthodes

Introduction et Objectifs

Les avancées technologiques en formulation galénique (formes à libération prolongée, contrôlée soutenue...) ont considérablement amélioré la prise en charge des maladies chroniques de façon générale et plus particulièrement les maladies cardiovasculaires, qui touchent une grande frange de population.

La microencapsulation est une technologie à laquelle a recours un grand nombre d'industries pharmaceutiques et autres, impliqué dans la fabrication de produits formulés ; Elle consiste à incorporer une ou plusieurs molécules dans des petites sphères creuses ou poreuses de taille micrométrique ; ces molécules sont alors protégées de l'environnement et peuvent être libérées hors de la microcapsule pendant un temps plus ou moins long et dans des conditions précises de pH, de température et autres ...

L'objectif de cette thèse s'articule autour de la formulation de microcapsules à libération prolongée à base d'un principe actif médicamenteux appartenant à la famille des anti-hypertenseurs dans un système matriciel par deux procédés différents : la gélification ionotropique et la coacervation complexe.

L'intérêt de ce type de matrices n'est plus à démontrer, puisqu'il s'agit de matrices biodégradables formulées dans des conditions aqueuses, ne faisant pas appel aux solvants organiques et à même de garantir une libération prolongée et une protection optimale de la substance active.

Les polymères choisis dans la formulation des microcapsules appartiennent à deux familles très connues et très répandues dans la nature, il s'agit pour la protéine de la gélatine et pour les polysaccharides l'alginate de sodium et le chitosane. Le choix de tels polymères est en effet justifié par plusieurs arguments :

- La nature polyélectrolyte des biopolymères et leurs charges opposées en milieu aqueux : l'alginate (un polysaccharide anionique), la gélatine (une protéine amphotère) et le chitosane (polysaccharide cationique) seront mis à profit pour favoriser la formation de complexe protéine- polysaccharides qui va servir à l'encapsulation du principe actif
- Ces polymères dits naturels présentent la propriété d'être biodégradables donc bien tolérés par l'organisme vivant, puisqu'ils seront éliminés sans risque de toxicité à court ou à long terme.
- L'inertie de ces biopolymères envers le principe actif en raison de la faible réactivité des groupements fonctionnels présents.

Dans notre expérimentation et en vue de prolonger la libération du principe actif, nous avons réalisé deux types de procédés de microencapsulation, présentés en deux parties :

- **Première partie :** ce sont des formulations basées sur le procédé de microencapsulation par gélification ionotropique des macromolécules de l'alginate de sodium, par les cations divalents du calcium pour former un réseau tridimensionnel entre l'alginate et les ions calcium de type Egg-box, emprisonnant à l'intérieur le principe actif. Vingt-quatre essais ont été réalisés en faisant varier le ratio polymère (alginate de sodium) copolymère (gélatine) et le ratio PA /Polymère. Lesquelles formulations ont été caractérisées du point de vue technologique et biopharmaceutique
- **Deuxième partie :** dans ce volet, un autre procédé est étudié, il s'agit du procédé de coacervation complexe entre l'alginate et la gélatine suivi d'un enrobage par le chitosane. Cette partie est subdivisée en deux étapes
 - Première étape : consacrée à l'étude des mélanges binaires ; pour bien élucider le mécanisme de coacervation mis en jeu, nous avons en premier lieu étudié les mélanges binaires gélatine-alginate de sodium à différents ratios et pH, que nous avons caractérisé sur le plan macroscopique et microscopique suivi par une étude structurale par des analyses rhéologiques et enfin des analyses granulométriques et électrocinétiques.
 - Deuxième étape : grâce à l'étude des mélanges binaires gélatine alginate, nous avons fait ressortir les paramètres optimaux de coacervation que nous avons pris en compte pour dresser un plan de formulation appuyé sur une méthodologie expérimentale rationnelle et planifiée, basée sur la méthode des plans d'expériences. Cette méthode permet de répondre à nos préoccupations tout en minimisant le nombre d'essais et en assurant une qualité certaine des résultats sur le plan prédictif.

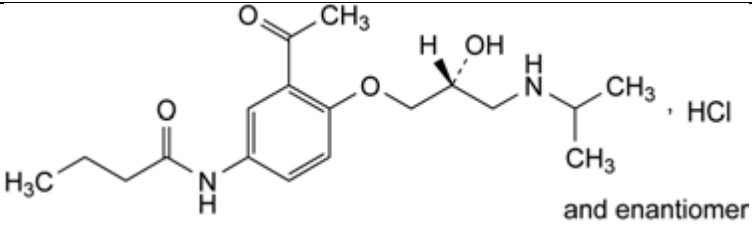
IV.1. Matériels :

IV.1.1. Matières premières

IV.1.1.1. Le principe actif : Acébutolol chlorhydrate

L'Acébutolol est un bêtabloquant utilisé comme antihypertenseur. Il est administré sous forme de chlorhydrate d'Acébutolol. Il est utilisé dans la prise en charge de l'angor, de l'hypertension artérielle et l'infarctus du myocarde. Les propriétés physico-chimiques sont résumées dans le (tableau IV.1) ci-après. Cette matière a été procurée par CRD Saidal.

Tableau I : Résumé des caractéristiques physico-chimiques du principe actif [13](Fiche technique fournisseur Polypharma).

Propriétés	Désignation
Catégorie	Petite molécule
Aspect	Poudre cristalline blanche ou sensiblement blanche
Famille pharmacologique	Beta bloquant sélectif
Formule chimique	$C_{18}H_{29}ClN_2O_4$
pH	7.4 a 37 c
Structure chimique	
Poids moléculaire	372.9 g/mole
Nom IUAP	<i>N</i> -[3-Acetyl-4-[(2 <i>RS</i>)-2-hydroxy-3-[(1-methylethyl)amino]propoxy]phenyl]butanamidehydrochloride.
Solubilité	facilement soluble dans l'eau et l'éthanol 96 ⁰ et très peu soluble dans l'acétone et le chlorure de méthylène
Teneur en principe actif*	99,0 à 101,0 pour cent de substance desséchée
Point de fusion	141 a 144 ⁰ C

*Titre renseigné par la fiche technique fournisseur

- **Classification biopharmaceutique :**

Le système de classification biopharmaceutique (BCS) permet de différencier les médicaments sur la base de leur solubilité et de leur perméabilité. Le BCS constitue un guide fourni par *l'agence américaine Food Drug Administration FDA* [157] pour la prédiction de l'absorption intestinale des médicaments. Selon cette classification, Acébutolol est une molécule de classe III, c'est-à-dire très soluble et faiblement perméable.

Il est à noter que :

- o Une substance médicamenteuse est considérée comme « **très soluble** » lorsque la plus forte dose clinique est soluble dans 250 ml ou moins de milieu aqueux, dans une gamme de pH de 1 à 7.5 à 37°C
- o Une substance médicamenteuse est considérée comme « **hautement perméable** » lorsque l'absorption (chez l'Homme) est supérieure à 90% de la dose administrée. La perméabilité peut être déterminée de plusieurs façons mais le plus souvent est effectuée à l'aide de la lignée Caco-2

- o **Propriétés pharmacologiques du principe actif.**

➤ **Famille pharmaco-thérapeutique :** Acébutolol est un bêtabloquant sélectif (code ATC : C07AB04). Il se caractérise par trois propriétés pharmacologiques :

- Activité bêtabloquante bêta-1 sélective,
- Effet anti arythmique,
- Pouvoir agoniste partiel (activité sympathomimétique intrinsèque modérée).

➤ **Indication en cardiologie :**

- o Hypertension artérielle.
- o Prophylaxie des crises d'angor d'effort.
- o Traitement de certains troubles du rythme : supraventriculaires (tachycardies, flutters et fibrillations auriculaires, tachycardies fonctionnelles) ou ventriculaires (extrasystole ventriculaire, tachycardies ventriculaires). [158, 159]

➤ **Propriétés pharmacocinétiques**

Après une administration par voie orale, l'Acébutolol est absorbé rapidement et presque en totalité par le tube digestif (90 %). Il présente une biodisponibilité de 40%. Le métabolite majoritaire est *l'Acétyl dérivative diacétolol* qui est un métabolite actif. Après une administration par voie orale 20 à 40 % de la dose est excrétée dans les urines en 24 heures, 9 à 12% de la dose reste inchangée et 12 à 24% sous forme de di acétol. Jusqu'à 60% de la dose est éliminée dans la matière fécale sous forme inchangée et sous forme de di acétol [159].

- **Concentration plasmatique**

Après une administration de dose unique de 400mg d'Acébutolol à 8 personnes le pic plasmatique moyen de concentration de 0.7mg/L, d'Acébutolol est atteint au bout de 2 heures et un pic plasmatique moyen de di acétol de 0.8mg/L, est atteint au bout de 4 heure après une administration orale chronique de 300mg d'Acébutolol chaque 6 à 8 heures à 6 personnes une concentration plasmatique moyenne de 0.51 à 1.23 mg/l d'Acébutolol est enregistrée[159-161].

- **Toxicité** : Une dose toxique d'Acébutolol est atteinte à une concentration sanguine de 34.7µg/ml.
- **Demi -vie plasmatique**: 6heures
- **Volume de distribution** : de 1 à 3 L/kg
- **Fixation aux protéines plasmatiques** : A un taux de 20%

➤ **Mode d'action et pharmacologie clinique de l'Acébutolol.**

Le chlorhydrate d'Acébutolol est un inhibiteur des récepteurs β -adrénergiques. Les études effectuées in vitro et in vivo chez l'animal montrent que le produit a un effet électif sur les récepteurs bêta1 situés principalement sur le muscle cardiaque. Cet effet électif n'est cependant pas absolu et, à fortes doses, l'Acébutolol inhibe les récepteurs bêta2 situés principalement dans les musculatures bronchique et vasculaire.

Ses effets périphériques consistent en une réduction de la fréquence cardiaque, surtout à l'effort, et une baisse de la tension artérielle chez les sujets hypertendus. Acébutolol et son métabolite tout aussi actif, le diacétolol, exercent une activité anti arythmique et possèdent également une activité agoniste partielle (ou activité sympathomimétique intrinsèque) [162,163].

IV.1.1.2 les bio polymères :

a. Choix des bio polymères :

Notre choix a été porté sur des bio polymères très abondants dans la nature et faisant appel à des procédés d'extraction bien maîtrisés, faciles et reproductibles ce qui rend leur disponibilité et leur coûts intéressants.

D'un autre côté, et du point de vue fonctionnel, leurs propriétés de former des complexes de nature électrostatique les rendent des candidats potentiels pour la formulation des microcapsules. Pour notre cas l'alginate qui est un polysaccharide anionique et la gélatine une protéine de charge positive forment sous certaines conditions (pH, force ionique, concentration et ratio) un complexes qu'on s'efforcera d'étudier et d'optimiser en vue de garantir une libération prolongée du PA encapsulé.

❖ Alginate de sodium

Description : La Pharmacopée Européenne 8^{ème} édition décrit l'acide alginique comme un mélange d'acides poly uroniques $[(C_6H_8O_6)_n]$ composé de résidus d'acide D-mannuronique et L glucuronic, et obtenu principalement à partir d'algues appartenant aux Phaeophyceae. Le poids moléculaire est généralement de 20 000 à 240 000 [156,13].

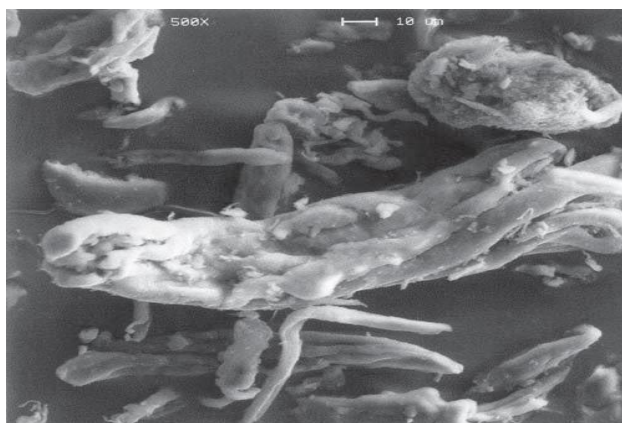


Figure IV.1 : Alginate de sodium [156].

Les propriétés de l'alginate de sodium sont renseignées dans le tableau II, cette matière a été fournie par SIGMA- Aldrich® USA

Tableau II : Propriétés physico-chimiques de l'alginate de sodium [156].

Désignation	Propriétés
Nom	Acide alginique, sel de sodium issu des algues brunes
Fournisseur	SIGMA –ALDRICH [®] USA
Grade *	Médium viscosité
Apparence	Poudre presque blanche ou marron jaunâtre
Solubilité	Insoluble dans l'éther, le chloroforme, l'éthanol (96%) les solvants organiques et les solutions acides (pH<3) Soluble dans l'eau (il forme une solution colloïdale)
Incompatibilité	- dérivés acridine, le cristal violet, l'acétate et le nitrate phényl mercurique, les sels de calcium, les métaux lourds et l'éthanol
Stabilité	Stable à : 3< pH<10 Si pH<3, l'acide alginique se précipite
Viscosité*	En solution à 2% dans l'eau et 25 ° c mesurée avec un viscosimètre Brookfield : ≥ 2000 cps
Conservation	Endroit fermé hermétiquement, sec et frais (produit hygroscopique) Ne doit pas être conservé dans un contenant en métal
Toxicité	Non toxique

**La viscosité est une spécificité de cette matière, elle est donnée par Sigma Aldrich*

❖ La gélatine :

La gélatine utilisée est la gélatine de type B, fournie gracieusement par CRD SAIDAL. Ses propriétés physico-chimiques sont renseignées dans le tableau III



Figure IV.2 : Photo de la gélatine poudre [156]

Tableau III : Propriétés physico-chimiques de la gélatine [156]

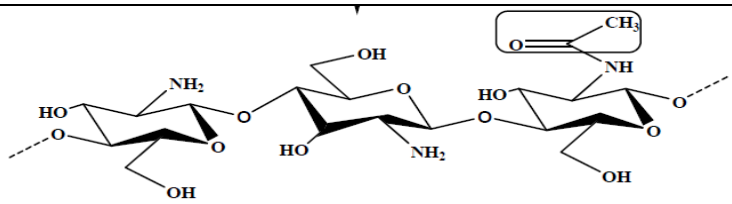
Désignation	Propriétés
Caractéristiques	Légèrement jaunâtre ou brun jaunâtre clair, solide, se manifestant habituellement sous forme de feuilles, de lambeaux, de granules ou de poudre translucides.
Solubilité	Pratiquement insoluble dans les solvants organiques, la gélatine gonfle dans l'eau froide et donne au chauffage une solution colloïdale qui, en refroidissant, forme un gel plus ou moins ferme.
pH	3,8 à 7,6 pour une solution de 1 pour cent dans l'eau exempte de CO ₂ à une température de 55° C
Conductivité	maximum 1 mS.cm ⁻¹ , déterminée pour une solution de 1.0 pour cent à 30 ± 1.0 °C.
Force de gel (Bloom value)	De 80 à 120 % de la valeur nominale. La force de gel exprime la masse en gramme nécessaire à produire une force lorsqu'elle est appliquée à un disque de 12.7mm de diamètre, est capable de faire une dépression de 4mm dans un gel ayant une concentration de 6.6% (m/m) et mûrit à 10°C
Conservation	A l'abri de la chaleur et l'humidité
Densité	1.32 g/cm ³
Point isoélectrique	4.7

❖ **Le chitosane :**

Le chitosane est un polysaccharide linéaire formé d'unités D-glucosamines liées entre elles par des liens glycosidiques et de N-acétyl-D-glucosamine. Le chitosane est dérivé de la chitine, le deuxième composant très abondant dans la nature après la cellulose. Elle est la composante principale d'exosquelette des arthropodes (crustacés) ou de l'endosquelette des céphalopodes (calamars), des cuticules des insectes.

Le chitosane utilisé provient d'une extraction à partir de l'exosquelette de crevettes rougeau niveau du laboratoire de recherche *Analyse fonctionnelles des procédés chimiques* du département de génie des procédés à l'université de Blida I selon une méthode décrite par la littérature [164].

Tableau IV : Propriétés physico-chimiques du Chitosane [156] [209]

Désignation	Propriétés
Non chimique	Poly-b-(1,4)-2-Amino-2-deoxy-D-glucose
Structure chimique	 The diagram shows the repeating unit of chitosan, a linear polysaccharide composed of 2-amino-2-deoxy-D-glucopyranose units linked by β(1→4) glycosidic bonds. Each glucose ring is in a chair conformation. The amino group at C2 is in the equatorial position. A callout box highlights the N-acetyl group (NH-C(=O)-CH₃) attached to the nitrogen at C2, indicating the degree of deacetylation.
Aspect	Le chitosane se présente sous forme de poudre blanche, blanche crémeuse
Solubilité	Insoluble dans l'eau, l'éthanol et les solutions de NaOH et soluble dans les solutions diluées d'acide acétique
Pka	6.2
Granulométrie D42	107µm
Degré de de-acétylation	93%
Poids moléculaire	250.21 KDa

IV.1.2. Equipements

a. Équipements de préparation : Les équipements de préparation utilisés sont présentés dans le tableau ci-après :

Tableau V: liste des équipements de préparation utilisés

Désignation de l'équipement	Marque	Spécifications
Agitateur magnétique et plaque chauffante	IKA WERK	A vitesse réglable et Température réglable
Agitateur à hélice	IKA RW 015/2	[200-2000 tr/mn]
HomogénéiseurUltraturax	POLYTRON PT 100	[200 /20 000 tr /mn]
Centrifugeuse	SIGMA 3-30K	De [1 à 15 000tr/mn] A Température réglable
Etuve	MEMERT	Température et ventilation réglables
Balance	OAHUS ADVENTURER ®	Poids max 120g Precision: d =0.0001g e =0.001g

b. Équipements de caractérisation

Les équipements de caractérisation physico-chimiques du complexe et des microcapsules sont présentés dans le tableau ci-après :

Tableau VI : liste des équipements de caractérisation

Désignation de l'équipement	Marque
Microscope optique	JENALUMAR
Spectrophotomètre UV-VIS	SHIMADZU UV –VIS 200 A 600 nm
Granulomètre Laser	MALVERN pilote par un logiciel MALVERN MASTER SIZER 2000 Détection micrométrique de 0,02 à 2000µm
Zétamètre	ZETACISER 2000 MALVERNE pilote par un logiciel MALVERN ZETASIZER 2000
Rhéomètre	MCR 302 (Anton PAAR PHYSICAGMBH GERMANY) Pilote par un logiciel RHEOPLUS US2000(Anton PAAR PHYSICAGMBH GERMANY)pour l'acquisition et le traitement des données expérimentales avec un système de mesure de type Plan/ Plan 25, rayon 10 mm et un gap de 1 mm , relié à un thermostat
Dissolutest	PHARMATEST PTWS 300 Avec des systèmes d'agitation de type palettes tournantes et huit bacs de capacité maximale 900ml
Spectrophotomètre à IR	FTIR PERKIN ELMER
Microscope Electronique à balayage MEB	QUANTA 650

❖ Principe de mesure et Spécifications techniques des équipements de caractérisation :

1. Le microscope : le microscope est un appareil optique muni de lentilles qui permet de grossir l'image et donc de voir de petits détails. Le principe est le suivant, la préparation est éclairée par une lampe, les molécules à observer vont interagir avec la lumière de plusieurs façons, soit en absorbant certaines longueurs d'onde de la lumière. C'est la microscopie en lumière directe. Soit en provoquant un déphasage des différents rayons lumineux. C'est la microscopie en contraste de phase ou encore en émettant de la lumière à une autre longueur d'onde que celle d'origine , c'est la microscopie à fluorescence[166].

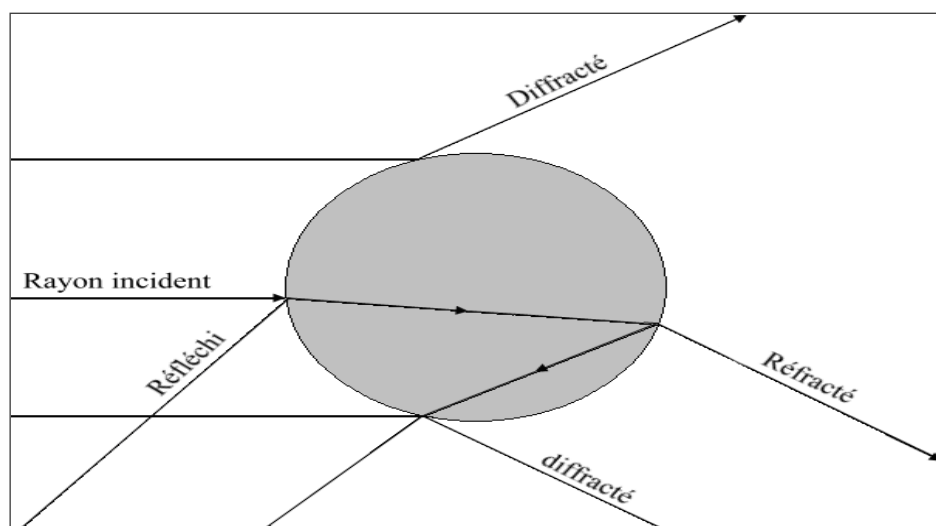
2. Le Spectrophotomètre à UV-Vis :

La spectroscopie d'absorption UV/Visible est l'une des méthodes d'analyse de la spectroscopie moléculaire. C'est l'une des plus utilisées. Elle permet de nombreuses déterminations quantitatives. Les applications analytiques de la spectrophotométrie d'absorption moléculaire UV-visible concernent les molécules en solution, elles peuvent être qualitatives ou (et) quantitatives. Dans les deux cas, elles font appel à la loi de Beer-Lambert qui établit la relation existante entre intensité transmise I et intensité incidente I_0 .

Pour notre cas cette technique a été utilisée pour quantifier le principe actif Acébutolol lors du dosage et lors des essais de dissolution et aussi pour mesurer la turbidité des mélanges polymériques [165].

3. Analyse granulométrique par granulométrie Laser :

L'analyse par le laser est basée sur l'analyse de la tache de diffraction d'un faisceau laser traversant une particule. C'est une technique qui permet la mesure de la taille des particules, ou plus exactement de leurs rayons, et de déterminer la fréquence statistique des différentes tailles de particules. Cette mesure est très rapide (quelques secondes), très fiable, et actuellement totalement automatisée [167] [168].



FigureIV.3 : Interaction de la lumière avec une particule [168]

4. Le rhéomètre :

La rhéologie est la science qui étudie le comportement mécanique des matériaux, c'est à dire les relations entre les déformations et les contraintes. La rhéologie a vécu un essor considérable ces dernières années : au carrefour des diverses branches de la mécanique, de la physique, et de la chimie. La rhéologie, en étudiant finement les relations entre contraintes et déformations au sein des matériaux, a permis de faire une bonne compréhension et description des écoulements, ainsi que l'analyse et l'établissement des lois de comportement des substances [169].

Les mesures sont effectuées sur un appareil de mesure MCR 302 PAAR PHYSICARHEOLAB relié à un thermostat où la température est réglable. Le viscosimètre est piloté par un micro-ordinateur utilisant le logiciel Software RHEOPLUS US 200. Le système de mesure utilisé est de type Plan/Plan Gap 1mm.

Le rhéomètre MCR 302 est utilisé en contrôle de qualité, il permet de faire l'enregistrement des courbes d'écoulement en régime stationnaire ainsi que la viscosité des fluides Newtoniens et des fluides non Newtoniens. Cependant il peut aussi effectuer des tests en régime non stationnaire et cela en mesurant la viscoélasticité des substances.

Il offre les caractéristiques spécifiques suivantes :

- Contrôle digital de la vitesse et du couple de rotation,
- Adaptation automatique des paramètres de contrôle durant le test,
- Affichage direct des valeurs mesurées et calculées : vitesse, couple de rotation, gradient de vitesse, contrainte de cisaillement, viscosité, température, temps

5. Le Zétamètre :

La mesure du potentiel zêta des solutions de polymères a été réalisée à l'aide d'un Zétamètre de marque « ZETASIZER 2000 » de MALVERN, relié à un microordinateur et piloté par un logiciel ZETASIZER 2000 ADVANCED. Le Zêtasizer utilise la méthode LDE (Laser Doppler Electrophorèses), appelé tout simplement l'électrophorèse. Cette méthode consiste à mesurer le mouvement des particules colloïdales lorsqu'elles sont soumises à un champ électrique.

▪ Le Potentiel zêta

Lorsqu'on applique un champ électrique dans une suspension contenant des particules chargées, les particules acquièrent une certaine mobilité dépendant de leur charge et de leur cortège ionique. Il existe alors, au sein de la double couche, un plan délimitant deux comportements d'ions différents. Les ions présentant une affinité spécifique pour la surface accompagnent la particule dans son mouvement, alors que les ions ayant une attirance plus faible se séparent progressivement de la surface. Ce plan, appelé plan de cisaillement, est défini à partir de considérations hydrodynamiques. Cependant, il est possible de le relier à la description chimique de la double couche. En effet, il est généralement très proche du plan délimitant la couche compacte de la couche diffuse, dit plan externe de Helmholtz (Figure IV.4). Le potentiel au plan de cisaillement est couramment noté potentiel zêta ou ζ [170].

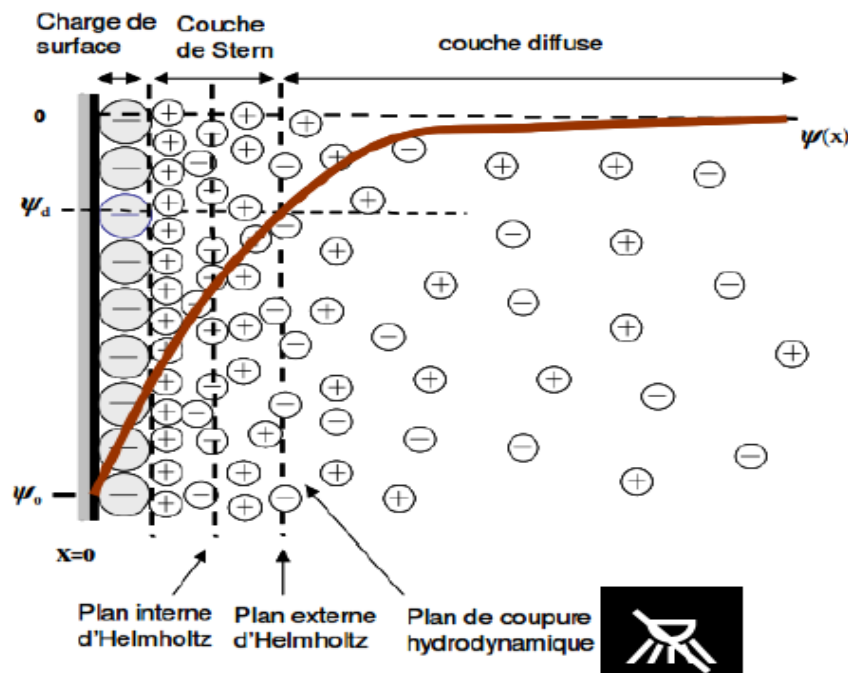


Figure IV.4 : Vue schématique de la double couche électrique [170]

Principe des mesures électrocinétiques

Le principe de mesure repose sur la mobilité électrophorétique des particules chargées en suspension dans un réservoir électrolytique. L'application d'un champ électrique entraîne les particules chargées vers l'électrode de charge opposée. C'est le phénomène d'électrophorèse. Simultanément à l'électrophorèse intervient le phénomène d'électro-osmose. Les parois de la cellule étant chargées, il en résulte, sous l'effet du champ électrique appliqué, un déplacement du fluide dans son ensemble, selon un profil parabolique [170].

6. Spectrophotomètre à infra-rouge :

Principe : La spectroscopie infrarouge est un moyen de diagnostic permettant de déterminer la nature des liaisons chimiques présentes dans une molécule. En effet, l'expérience montre que certaines fréquences de vibration, dites « fréquences de groupe », sont caractéristiques de la présence d'un groupement chimique dans la molécule étudiée.

La spectroscopie infrarouge est un très puissant moyen de caractérisation pour identifier des groupements moléculaires et obtenir de nombreuses informations sur leur conformation et leurs éventuelles interactions [171-173].

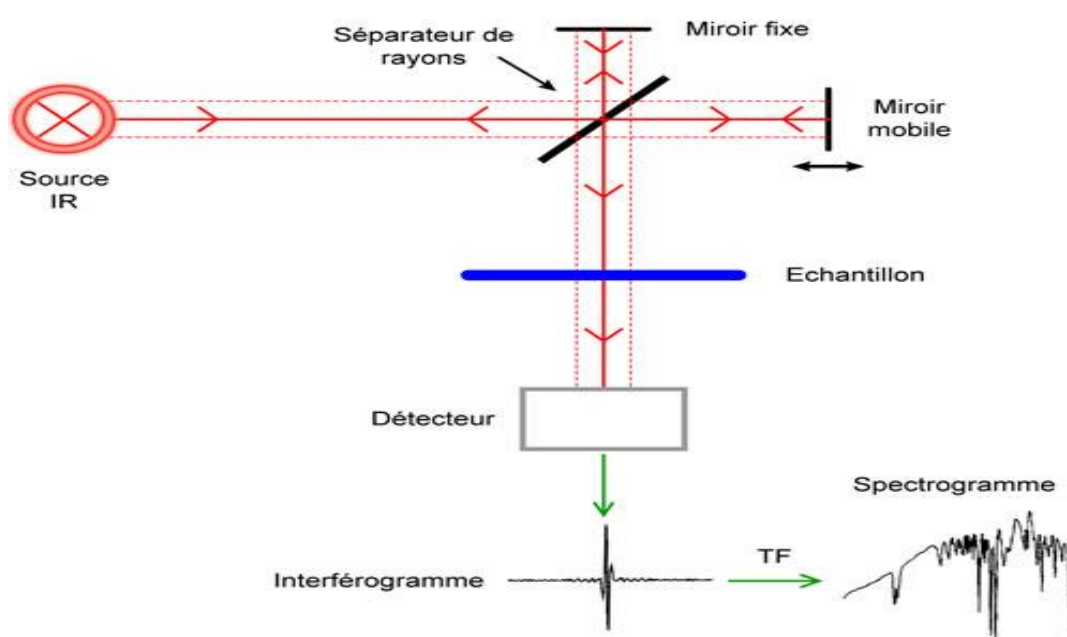


Figure IV.5 : Fonctionnement d'un spectrophotomètre à Infra-Rouge

Pour nos manipulations nous avons utilisé un spectrophotomètre PERKIN ELMER doté de la technique ATR (*Attenuated Total Reflectance*), qui est une technique en spectroscopie infrarouge, ou plus précisément spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR), permettant de déterminer les liaisons chimiques d'un échantillon. Elle est basée sur le principe optique de la réflectance, phénomène optique bien connu. Cette méthode ne nécessite que très peu de préparation de l'échantillon, et permet d'analyser aussi bien les liquides que les solides.

7. Le dissolutest :

Le PHARMATEST est un appareil qui se compose de Récipients cylindriques (7ou 8) muni d'un couvercle. L'appareil est muni d'un agitateur constitué d'une tige qui se termine par le mobile tournant, Un Bain d'eau avec thermostat ($37\pm 0.5^{\circ}\text{C}$). Cet appareil est destiné à la mise en œuvre de L'étude de la vitesse de dissolution des principes actifs à partir de formes galéniques sèches.

IV.2. Méthodes :

IV.2.1. Méthodes de préparation

Selon la littérature plusieurs procédés de préparation des microcapsules ont été mis en œuvre et étudiés pour l'encapsulation des principes actifs. Ils diffèrent selon les matériaux utilisés (type de polymères) et le mécanisme mis en jeu.

Pour notre cas nous avons étudié deux méthodes différentes :

- Le procédé de complexation par les ions calcium
- Le procédé de coacervation complexe de la gélatine et l'alginate de sodium dans les conditions optimales.

IV.2.1.A. Préparation des microcapsules par le procédé de complexation par les ions calcium :

Ce procédé, appelé aussi la méthode d'extrusion /gélification, est largement décrit dans la littérature par plusieurs auteurs qui l'ont utilisé comme une technique d'encapsulation de substances pharmaceutiques tel que Malayacet al en 2007 [174] l'ont utilisé pour l'encapsulation de furosémide et Paul de Vosa et al 2006 [175] , pour l'encapsulation de cellules pancréatiques ainsi que d'autre auteurs Manjanna et al 2010[176] pour l'aceclofenac, et Shammi Goyalt 2011[177] pour l'encapsulation de liposomes à base de prédnisolone .

D'autres application de la microencapsulation par ce procédé pour des ingrédients non pharmaceutiques en agroalimentaire ont été étudiées tels que les probiotiques [178,179], et en cosmétique et pour l'encapsulation d'huile essentielle [180].

❖ Principe :

Le procédé de préparation des microencapsules par complexation repose sur la propriété de gélification ionotrope de l'alginate de sodium en présence de sel de calcium le CaCl_2 . Le principe de la technique consiste en l'extrusion de la solution de biopolymères qui tombe goutte à goutte à travers un orifice (seringue hypodermique de diamètre intérieur $750\mu\text{m}$) dans un bain contenant le milieu séquestrant : la solution de CaCl_2 , conduisant à la gélification des gouttes ou à la formation d'une membrane autour de ces gouttes sphériques [181].

❖ Mécanisme de la réaction mise en jeu

L'alginate est un polysaccharide chargé négativement, il gélifie en présence d'ion divalent tel que le Ca^{2+} [1]. Le mécanisme proposé consiste en une transition conformationnelle des chaînes d'alginate après addition des cations multivalents à un sel d'alginate de sodium, les chaînes passent de l'état d'hélices flexibles à un état ordonné où deux chaînes sont associées. L'association de ses deux chaînes se fait par un mécanisme coopératif : la fixation d'un cation dans un bloc GG facilite la capture d'un second cation au sein du même bloc entre les deux chaînes impliquées ; ce mécanisme mène à la formation de zone de jonction au niveau de bloc GG, par la suite la gélification se poursuit par une agrégation des zones de jonction en domaine étendus [182] (Figures IV.6, 7).

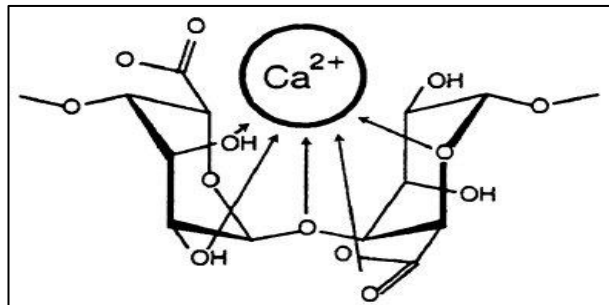


Figure IV.6 : liaisons covalentes des ions calcium avec les résidus poly-G d'alginate [181]

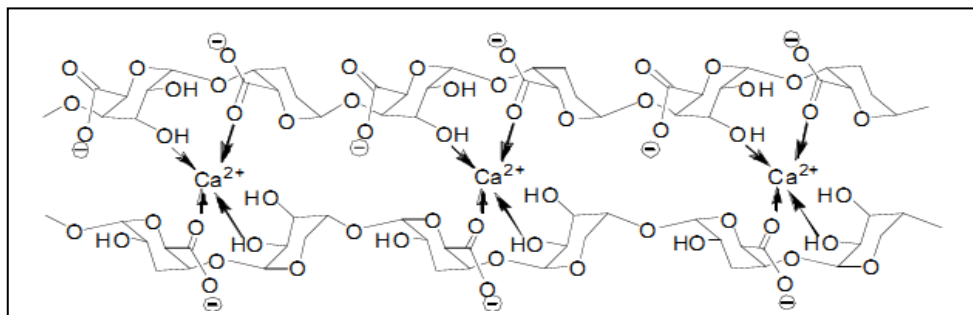


Figure IV.7 : Mécanisme de Gélification de l'alginate de sodium par les ions Calcium [182]

❖ **Matrice des essais :**

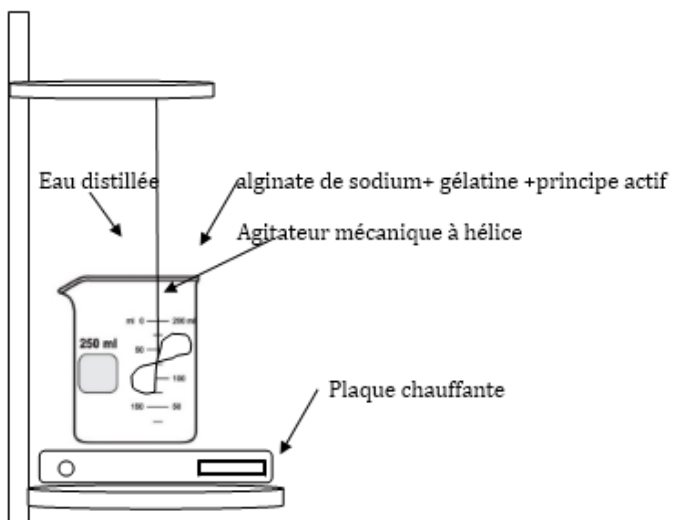
Les essais ont été réalisés en faisant varier les ratios de polymères (Alginate de sodium/gélatine) à : [(100/0), (80/20), (70/30), (60/40), (50/50), (40/60), (30/70), (20/80)] en fonction des ratios (PA / Taux de polymères) à [(1/1),(1/2),(1/3)]. La concentration totale en polymère étant figée à 2% (m/v), vingt-quatre essais ont été réalisés et sont présentés dans le Tableau VII, ci dessous :

Tableau VII : Matrice des essais de formulation des microcapsules par le procédé de gélification ionotropique

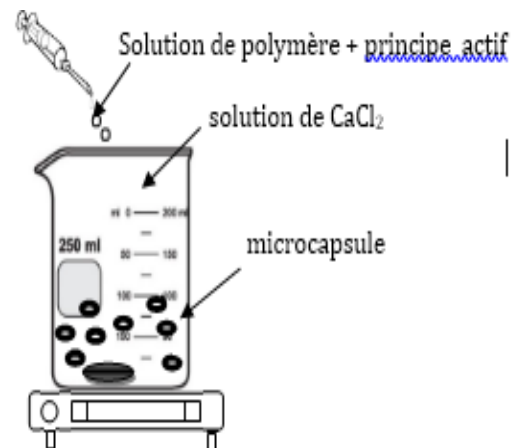
Numéro d'essai	Proportion Alginate/gélatine	Ratio (PA/Polymère)
1	100 /0	1/1
2		1/2
3		1/3
4	80/20	1/1
5		1/2
6		1/3
7	70/30	1/1
8		1/2
9		1/3
10	60/40	1/1
11		1/2
12		1/3
13	50/50	1/1
14		1/2
15		1/3
16	40/60	1/1
17		1/2
18		1/3
19	30/70	1/1
20		1/2
21		1/3
22	20/80	1/1
23		1/2
24		1/3

❖ Mode opératoire

- Les solutions d'alginate de sodium et de gélatine sont préparées séparément. On fait disperser l'alginate de sodium dans de l'eau purifiée sous agitation magnétique à froid jusqu'à l'obtention d'une solution colloïdale homogène. la solution de gélatine est obtenue quant à elle par dispersion à chaud (50°C) dans l'eau purifiée. On fait dégazer les deux solutions dans un bain à ultrasons pour éliminer les bulles d'air, puis on mélange les solutions de polymères et on fait dissoudre la quantité de principe actif nécessaire de façon à obtenir les ratios indiqués dans le tableau de la matrice des essais (TableauVII.)
- D'autre part on prépare des solutions de CaCl_2 à 5% qui va servir à la complexation de l'alginate.
- Les solutions de polymères et principe actif sont ajoutées goutte-à-goutte par l'intermédiaire d'une seringue hypodermique (diamètre intérieur 750 μm) dans une quantité de 250ml de la solution de l'agent gélifiant CaCl_2 , sous agitation magnétique ;
- Laisser les solutions sous agitation pendant 60 minutes pour que les sphères se solidifient,
- Filtrer et laver 3 fois avec de l'eau distillée, les microsphères obtenues. Puis les récupérer et les faire séchées à l'air à une température ambiante (Figure IV.8).



Etape 1 : préparation de la solution polymères/ PA



Etape 2 : Formation de microcapsules par Gélification avec les ions calcium



Etape 3 : récupération des microcapsules

FigureIV.8 : Schéma du protocole de fabrication des microcapsules par le procédé de gélification par les ions calcium

IV.2.1.b : Préparation des microcapsules par le procédé de coacervation Complexe : Gélatine et Alginate de sodium

Avant de procéder à la préparation des microcapsules par ce procédé de coacervation complexe nous avons en premier lieu, étudié les mélanges des deux biopolymères avec leurs interactions et les conditions de complexation.

1. Etude des mélanges binaires alginate gélatine :

Le but de cette première étape d'étude est de déterminer les conditions optimales de formation du complexe protéine- polysaccharides, pour notre cas la gélatine et l'alginate, et ce à travers l'étude du comportement des mélanges protéine polysaccharides dans diverses conditions de pH, de concentration et de ratio protéines polysaccharides , par la caractérisation rhéologique, Zetamétrie, microscopique et granulométrique. En effet plusieurs travaux dans la littérature ont étudié ce type de complexe afin d'élucider la nature et le comportement des complexes formés comme celui de Md. AbdurRazzakMoojoong et al[183] , qui ont mis en évidence les interactions aqueuses entre la gélatine de poisson et l'alginate ainsi que les travaux de Shinde and Nagarsenker, *et al.*[184] et dans les travaux de ZhanfengDongShinde and Nagarsenker[185].

Pour cela nous allons étudier quelques paramètres qui conditionnent la formation du complexe protéine /polysaccharide (gélatine/alginate de sodium) tel que le ratio et le pH du milieu et ce en faisant varier ces paramètres.

- **Matrice d'essai :**

Nous avons réalisé 40 essais en faisant varier les pH des solutions polymériques à (2 ; 2.5 ; 3, 3.5 ; 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 7) et les ratios protéine /polysaccharides (gélatine / alginate) à (1 :1, 2 :1 ; 3 :1 ; 4 :1) à une concentration globale de polymère de 2%, la matrice d'essai est représentée comme suit (Tableau VIII):

Tableau VIII : Matrice des essais des mélanges gélatine alginate de sodium.

Essai	Ratio (gélatine /alginate)	pH	Essai	Ratio (gélatine /alginate)	pH
1	1 :1	2	21	1 :1	4.5
2	2 :1		22	2 :1	
3	3:1		23	3:1	
4	4 :1		24	4 :1	
5	1 :1	2.5	25	1 :1	5
6	2 :1		26	2 :1	
7	3 :1		27	3 :1	
8	4 :1		28	4 :1	
9	1 :1	3	29	1 :1	5.5
10	2 :1		30	2 :1	
11	3 :1		31	3 :1	
12	4 :1		32	4 :1	
13	1 :1	3.5	33	1 :1	6
14	2 :1		34	2 :1	
15	3 :1		35	3 :1	
16	4 :1		36	4 :1	
17	1 :1	4	37	1 :1	7
18	2 :1		38	2 :1	
19	3 :1		39	3 :1	
20	4 :1		40	4 :1	

❖ Méthodes de préparation des mélanges gélatine / alginate de sodium :

Les mélanges de protéines et polysaccharides sont préparés en faisant disperser séparément l'alginate et la gélatine dans l'eau purifiée puis on mélange les deux solutions et on ajuste le pH à la valeur désirée.

La quantité calculée de gélatine est chauffée à une température de 50 C° dans un volume suffisant d'eau purifiée sous agitation magnétique jusqu'à dissolution parfaite. La solution d'alginate est préparée séparément par dispersion puis agitation dans de l'eau purifiée à température ambiante jusqu'à l'obtention d'une solution colloïdale homogène. Cette dernière

est additionnée sous agitation à la solution de gélatine à la proportion calculée pour atteindre le ratio désiré, puis on complète jusqu'au volume nécessaire avec l'eau purifiée.

L'ajustement de pH des solutions se fait avec l'acide acétique CH_3COOH (0.1N) et l'hydroxyde de sodium NaOH (1N), jusqu'à l'atteinte des différentes valeurs de pH (2 ; 2,5 ; 3 ; 3,5 ; 4,4.5,5,5.5,6,7) pour chaque ratio.

2. Préparation des microcapsules par coacervation complexe

❖ Principe de la technique :

La coacervation complexe est définie comme une séparation de phase liquide –liquide dans un système colloïdal induite par des interactions électrostatiques entre deux polymères de charges opposées. La phase la plus concentrée est le coacervat et l'autre phase est la solution d'équilibre. La desolvatation simultanée des deux poly électrolytes hydrosolubles portant des charges opposées est le plus souvent provoquée par une modification de pH du milieu aqueux le coacervat est ainsi formé par la précipitation de deux polymères de charges électriques opposées en interaction électrostatiques [79].

Plusieurs exemples de travaux ont étudié la coacervation complexe comme technique de microencapsulation moyennant plusieurs systèmes, à l'exemple du système gélatine/gomme d'acacia, étudié par Madanet *al.*1972 [186], Junyaprasert *et al.*2001[187], Lemetter *et al.*2009[188], Z.Dong *et al.*2011[189], Zhang *et al.*2012 [190], Lv *et al.*2012[191]. Les systèmes pectine/gélatine et alginate /gélatine étudié par Saravanan et Rao2010 [192], et le système alginate/chitosan étudié par Lucinda Silva *et al.* 2010 [193].

❖ Matrice des essais

➤ *Methodologie expérimentale*

La méthodologie expérimentale adoptée dans la formulation des microcapsules à base d'Acébutolol chlorhydrate par la technique de coacervation et enrobage repose sur la planification expérimentale moyennant le logiciel MODDE 6. Le recours à cette méthode des plans d'expériences permet d'obtenir des modèles prévisionnels des réponses étudiées, ainsi que les conditions optimales, et ce avec un minimum d'essais et un maximum de crédibilité.

➤ **Définition et rappel théorique sur de la méthodologie des plans d'expérience**

Il y a différentes manières de planifier une expérimentation. La plus intuitive est de faire varier un seul élément à la fois parmi d'autres qui restent fixes. Cette méthode sur laquelle sont basées tant de recherches, ne permet que d'étudier l'évolution du système par rapport à la variation de cet élément seul. L'apparition des « plans d'expériences » a révolutionné le planning des expériences, l'idée est qu'au lieu de faire varier un seul élément ou facteur à la fois, tous les facteurs varieront en même temps sur les bases de données statistiques qui nous garantissent précision et optimalité.

Un plan d'expérience est une planification de l'ensemble des expériences d'un problème multiparamétrique. Son objectif principal est de réduire au minimum le nombre d'essais expérimentaux par rapport à une approche classique, et d'en assurer une meilleure qualité de résultats, en plus il nous permet une modélisation mathématique à l'aide d'une simple régression linéaire multiple.

La méthode par la modélisation en surface de réponses (RSM) a été appliquée moyennant le logiciel MODDE 6.0. Il s'agit d'une étude fine de modélisation qui s'appuie sur un modèle polynomial du second ordre et tient compte des interactions entre les facteurs, dont l'écriture est :

$$y = a_0 + a_1 + a_1x_1 + a_2x_2 + a_3x_3 + a_{11}x_1 + a_{22}x_2 + a_{33}x_3 + a_{12}x_1x_2 + a_{13}x_1x_3 + a_{23}x_2x_3$$

Le plan d'expérience utilisé est un Composite à Face Centré, CCF, contenant 17 essais (Tableau IX) dont trois au centre du plan, pour la répétabilité. Où : y est la réponse et les variables centrées réduites du plan sont X_1, X_2, X_3 , qui sont comprises entre -1 et +1 qui représentent les variables de contrôles ou facteurs de formulation pour notre cas ils sont définis par facteurs étudiés. L'ordre de réalisation des essais est un ordre aléatoire randomisé proposé par le MODDE 6.

➤ **Définition des facteurs étudiés :**

Les facteurs de formulation étudiés ou variable de contrôle sont en nombre de trois :

F₁ : Cp Concentration *massique totale en polymères variant de [1% – 4%, poids /poids]*

F₂ : R Ratio *protéine-polysaccharide (gélatine/alginat de sodium) variant de [1 – 4]*

F₃ : Cx Concentration *massique en Chitosane variant de [0.1% – 1%, poids /poids]*

Les Facteurs figés (invariables) sont quant à eux représentés par :

Concentration du PA : Acébutolol chlorhydrate 1% [poids/poids]

Concentration du conservateur : Azide de sodium 0.03% [poids/poids]

Tableau IX : Matrice des essais de microcapsules préparées par le procédé de coacervation

N° d'expérience	Ordre des essais	F1 Cp Concentration%	F2 R Ratio	F3 Cx Concentration%
1	13	1	1	0.1
2	1	4	1	0.1
3	14	1	4	0.1
4	11	4	4	0.1
5	2	1	1	1
6	12	4	1	1
7	7	1	4	1
8	9	4	4	1
9	6	1	2.5	0.55
10	16	4	2.5	0.55
11	15	2.5	1	0.55
12	3	2.5	4	0.55
13	4	2.5	2.5	0.1
14	17	2.5	2.5	1
15	5	2.5	2.5	0.55
16	8	2.5	2.5	0.55
17	10	2.5	2.5	0.55

❖ Mode opératoire :

Dans le cadre de notre étude et pour l'encapsulation du principe actif Acébutolol, nous avons utilisé le procédé de double encapsulation par la technique de coacervation complexe à base d'un système gélatine et d'alginate. Le procédé repose sur la technique d'émulsification et réticulation suivi d'un enrobage par un polysaccharide cationique le chitosane. Cette technique est inspirée de la méthode *N. Devi* 2013[194] avec quelques modifications.

Les solutions polymériques (alginate- gélatine- principe actif) constituant la phase interne d'une émulsion de type eau dans l'huile e/h, ou H/L, sont dispersées dans une phase lipophile (huile de vaseline) puis la coacervation est déclenchée par abaissement de pH, une étape de réticulation par le formaldéhyde est réalisée pour durcir les microcapsules.

❖ **Mécanisme de la coacervation** : Le mécanisme de la coacervation peut être schématisé comme suit (figure IV.9)

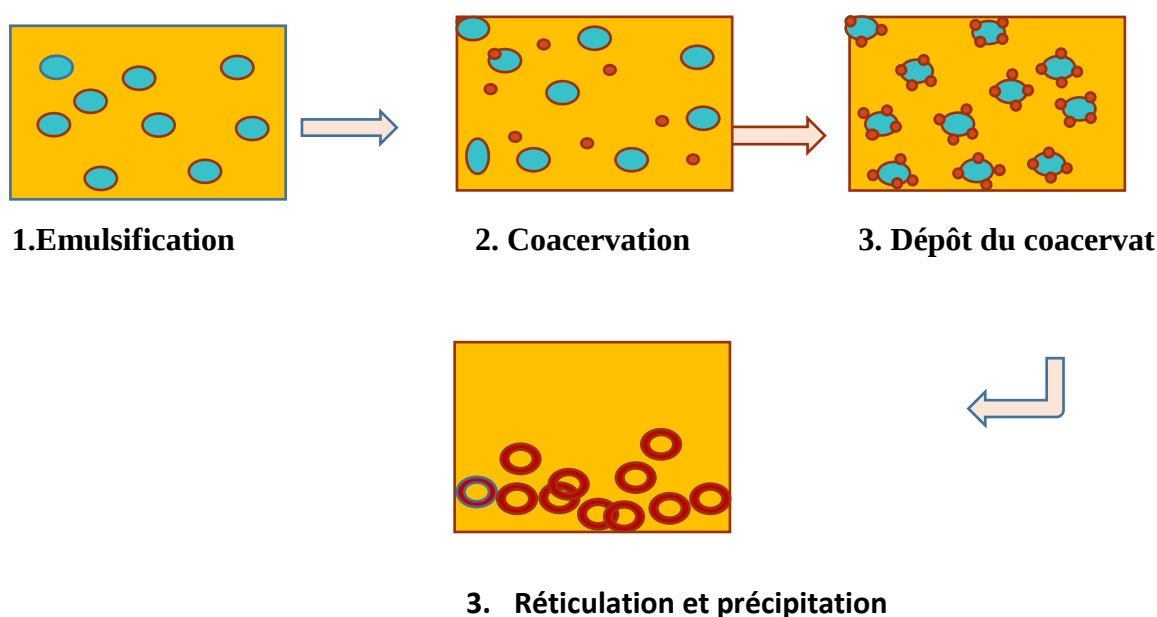


Figure IV.9 : Schéma du protocole utilisé pour la préparation des microcapsules par coacervation

➤ Préparation des solutions colloïdales de polymères ;

. L'alginate de sodium est dispersé par agitation magnétique à froid dans l'eau purifiée jusqu'à obtention d'une solution homogène (pendant 2 à 4 heures).

. La gélatine est dispersée à chaud (50°) sous agitation magnétique dans l'eau purifiée jusqu'à obtention d'une solution homogène (pendant 1 heure).

➤ **Mélange des deux solutions polymériques :**

Les deux solutions polymériques sont mélangées à température ambiante sous agitation magnétique modérée jusqu'à parfaite homogénéisation

➤ **Introduction du principe actif :**

Le principe actif Acébutolol est dissout dans le mélange polymérique à une concentration fixe pour tous les essais de l'ordre de **1%** [poids/poids]

Un agent conservateur antimicrobien (Azide de sodium) est additionné aux différents essais à une concentration de **0.02%** [poids/poids]

➤ **Préparation de la solution de chitosane :**

. Le chitosane est un polysaccharide qui nécessite un pH acide pour sa solubilité pour notre cas nous l'avons fait dissoudre dans une solution d'acide acétique à **1 N** sous agitation mécanique

➤ **Émulsification**

La solution de polymère et de principe actif est dispersée, à l'aide d'un homogénéiseur à 2000tr/mn dans une phase organique, pour notre cas l'huile de vaseline, en présence de 5ml de Tween 60, jusqu'à formation d'une émulsion homogène.

➤ **Ajustement du pH :**

Afin de favoriser l'interaction des deux polymères une solution d'acide acétique à **1N** est additionné progressivement jusqu'à atteindre un pH optimale d'interaction et de complexation situé entre 3 et 3,5. Expérimentalement cette complexation se traduit par une séparation de phase due à la sédimentation des coacervats de microcapsules au fond du bécher avec un surnagent complètement limpide. Le système est ensuite refroidi entre 5 et 8°C pour durcir les microparticules.

Le surnagent est ensuite éliminé et le culot est récupéré puis rincée à l'eau purifiée jusqu'à élimination de toute traces de phase organique.

➤ **Réticulation** La réticulation des microparticules a été obtenue par addition d'une certaine quantité de formaldéhyde à 37% et l'agitation est poursuivie pendant 30mn

➤ **Enrobage des microcapsules obtenus**

La solution de Chitosane est additionnée sous agitation magnétique modérée aux microcapsules formées, pendant 60 mn pour favoriser l'interaction du chitosane avec la surface des microparticules et former ainsi une couche d'enrobage polymérique.

➤ **Conservation**

Les échantillons sont rincés et stockés dans des flacons en verre ambré au réfrigérateur.

IV.2.2. Méthodes de caractérisation

IV.2.2.1. Méthodes de caractérisation des mélanges binaires (gélatine/ alginate)

➤ Observation macroscopique :

L'observation macroscopique a été faite visuellement ou l'échantillon est placé dans un contenant transparent (tube à essais), et observé à l'œil nu à intervalle de temps régulier.

➤ Observation microscopique :

L'échantillon constitué par le complexe natif, est mis entre la lame et lamelle et observé sous différents grossissements G : $\times 10$; $\times 12.5$; $\times 25$; et $\times 40$ en fonction de la qualité des images obtenues.

➤ Mesure de la turbidité :

La mesure de la turbidité du milieu correspond à la détermination de la quantité de photons « perdus » par unité de longueur lors du passage rectiligne de la lumière incidente à travers un échantillon turbide (Figure IV.10).

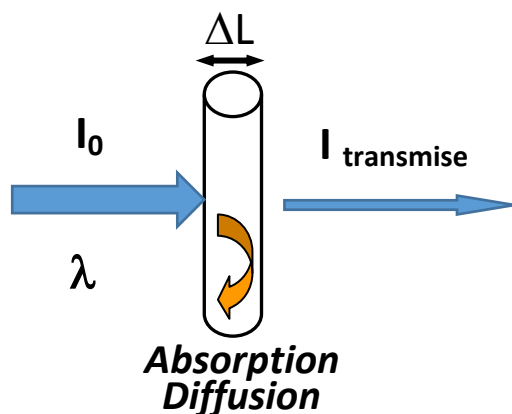


Figure IV.10 : Schéma explicatif du phénomène de perte linéaire de photons mesuré par la turbidité du milieu [170]

Les mesures de turbidité ont été effectuées avec un Spectrophotomètre UV–Visible SHIMADSU. Les cuves utilisées sont des cellules rectangulaires en quartz de trajet optique : $L = 1$ cm. La longueur d'onde de lecture a été choisie en réalisant un balayage dans la gamme 200 à 800 nm de façon à déterminer une région où le maximum d'absorption des deux polymères alginate et gélatine, soit le plus éloigné possible pour éviter l'absorption propre des polymères. À l'issue de ce balayage nous avons sélectionné la longueur d'onde λ de 600 nm.

Le calcul de la turbidité se fait selon la formule suivante :

$$\tau = \ln \left(\frac{I_0}{I_{tr}} \right) \cdot \frac{1}{\Delta L}$$

Avec I_0 : intensité incidente du laser

I_{tr} : intensité transmise correspondant à l'intensité mesurée par le détecteur spectrophotomètre sur l'angle solide ($0 ; \alpha$) avec α : angle d'acceptance de l'appareil, généralement inférieur à 3° .

ΔL : trajet optique de la radiation incidente dans l'échantillon turbide (cm).

La turbidité est en réalité calculée indirectement à partir des valeurs de transmittance (Tr) ou d'absorbance (Abs) du milieu qui sont les paramètres directement mesurables expérimentalement avec un spectrophotomètre :

$$Tr = \frac{I_{tr}}{I_0} = \frac{1}{\exp(Abs \cdot \ln 10)}$$

➤ Analyse granulométrique :

La voie utilisée dans l'analyse granulométrique est la voie liquide ou l'échantillon étudié est mis en suspension dans un fluide dans notre cas c'est l'eau purifiée qui circule à travers une cellule de verre à faces parallèles éclairée par un faisceau de lumière laser. Les résultats sont exprimés graphiquement et sous formes de tableau. Les paramètres granulométriques pris en compte pour l'interprétation étant le diamètre de particules en volume et en surface, sachant que le diamètre en volume est $D [4,3]$, et en surface $D [3,2]$.

➤ Mesure du potentiel zêta :

La détermination du potentiel zêta se fait par la mesure de la mobilité électrophorétique qui se fait à l'aide d'une cellule capillaire du Zêta mètre ou l'échantillon à analyser doit être limpide, c'est à dire très diluée afin d'assurer une mesure fiable de la mobilité électrophorétique. A partir de la mobilité électrophorétique le potentiel zêta est calculé par le logiciel selon le modèle de Henry.

➤ Analyse rhéologique :

La rhéologie est une branche de la physique qui étudie l'écoulement ou la déformation de la matière et en particulier des fluides complexes sous l'effet des contraintes qui leurs sont imposées.

Les méthodes rhéométrique ont été utilisées dans la détermination des propriétés mécaniques aux faibles et fortes déformations des solutions de mélange de polysaccharide/protéine à diverses concentrations des deux biopolymères.

L'étude rhéologique des solutions de polymères a été traitée expérimentalement selon deux types d'expériences :

- Une analyse de la viscoélasticité des solutions en régime linéaire
- Une analyse sous écoulement en dehors du régime linéaire.

• Analyse viscoélastique

Elle permet de déterminer les propriétés viscoélastiques d'un matériau (module de conservation G' et de perte G''). On impose, dans le cas d'un rhéomètre à déformation imposée, une déformation sinusoïdale $\gamma(t)$ et on mesure une contrainte sinusoïdale $\sigma(t)$ de la forme.

$$\gamma(t) = \gamma_0 \sin(\omega t)$$

$$\sigma(t) = \sigma_0 \sin(\omega t + \delta)$$

où ω est la pulsation des oscillations. δ représente le déphasage et est appelé angle de perte. δ est égal à 90° dans le cas d'un liquide purement visqueux ou à 0° pour un solide purement élastique. On peut réciproquement imposer, dans le cas d'un rhéomètre à contrainte imposée, une contrainte sinusoïdale et mesurer la déformation sinusoïdale résultante [169].

On définit les modules de conservation G' et de perte G'' , relatifs respectivement à l'élasticité et au caractère dissipatif de l'échantillon, comme étant :

$$G' = \frac{\sigma_0}{\gamma_0} \cos \delta$$

$$G'' = \frac{\sigma_0}{\gamma_0} \sin \delta$$

La tangente de perte est définie comme le rapport des dissipations sur le stockage d'énergie :

$$\tan \delta = \frac{G''}{G'}$$

Les polysaccharides et les protéines en solutions sont généralement viscoélastiques : ils ont un comportement intermédiaire entre le solide élastique et le liquide visqueux. Sous cisaillement, ils stockent une partie de l'énergie sous forme élastique, caractérisé par le module de conservation élastique G' , et en, dissipent une partie sous forme visqueuse, caractérisé par le module de perte G'' . Lorsque le cisaillement s'arrête, seule la contribution élastique de l'énergie est restituée de sorte qu'une partie des déformations de la configuration macromoléculaire persiste en solution.

Aussi, le test de la viscoélasticité des solutions en régime linéaire renseigne sur l'état structural de l'échantillon en évaluant notamment sa rigidité et le caractère de la solution.

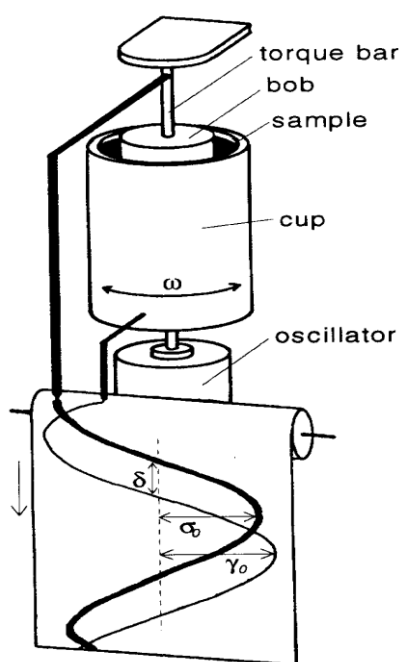


Figure IV.11 : Schéma d'une mesure rhéométrique en mode oscillatoire [169].

- **Analyse sous écoulement**

- 1. Les grandeurs en rhéologie :**

- ❖ **Contrainte de cisaillement (*shear stress*) σ :**

Par définition la contrainte de cisaillement est une force de contact qui s'exerce sur une facette par unité de surface

$$\sigma = \frac{dF}{dA}$$

σ s'exprime :

- en pascal ou en N / m² dans le système MKSA.

- en dyne / cm² dans le système CGS [169].

- ❖ **Déformation et vitesse de déformation :**

La déformation et la vitesse de déformation sont deux grandeurs cinématiques fondamentales en rhéologie, qui ont pour but de décrire le mouvement du matériau dans l'espace, au cours du temps, indépendamment des contraintes qui lui ont donné naissance.

La déformation se traduit par la modification des distances mutuelles des différents points du matériau soumis à l'action d'une force de contact [169].

$$\gamma = \frac{du(e, t)}{de}$$

$\dot{\gamma}$: s'exprime en s⁻¹ (l'inverse du temps).

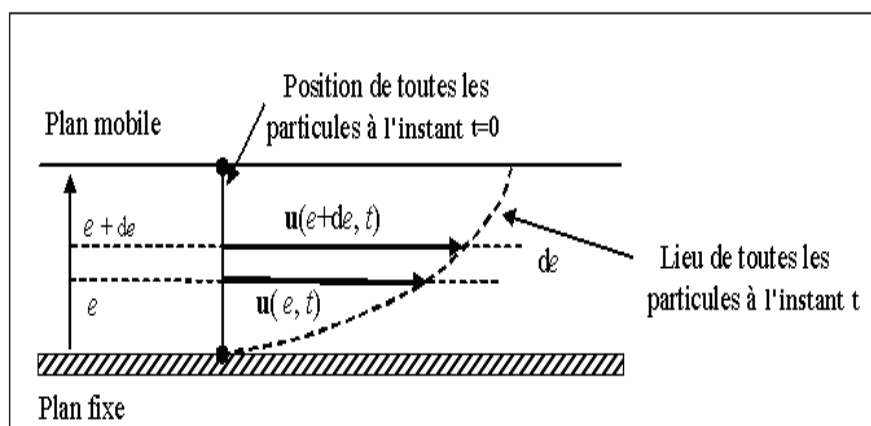


Figure IV.12 : Schéma représentant un cisaillement d'un matériau entre deux plans [169].

❖ La Viscosité

La viscosité est une grandeur physique qui joue un rôle essentiel en rhéologie, par fois sa connaissance suffit à caractériser de façon précise le comportement rhéologique du matériau. Elle caractérise l'aptitude d'un fluide à s'écouler.

Il est bien connu que lorsque l'on communique un mouvement à une partie d'un liquide, il se transmet graduellement au reste du liquide. La résistance du liquide à l'écoulement uniforme et sans turbulence est définie comme étant sa viscosité. D'une manière générale, on peut dire que la viscosité est due aux forces attractives qui s'exercent entre des éléments voisins, et s'opposent aux mouvements relatifs des uns par rapport aux autres. La viscosité tient une place importante dans l'étude hydrodynamique des solutions macromoléculaires. Elle est reconnue comme l'une des propriétés différenciant les composés macromoléculaires des autres molécules organiques [169].

Afin d'évaluer la perturbation liée aux particules, indépendamment du milieu dispersant, on définit habituellement :

❖ Viscosité absolue :

La viscosité absolue ou viscosité dynamique, c'est le coefficient de viscosité qui caractérise les fluides newtoniens. Elle ne dépend pas de la contrainte de cisaillement mais elle est fonction de la température et de la pression extérieure. Son unité est Pa.s dans le système MKSA. Elle est définie par la relation suivante [169]:

$$\eta = \frac{\tau}{\dot{\gamma}}$$

❖ Viscosité cinématique :

La viscosité cinématique présente un intérêt dès que la viscosité dépend de la densité (huiles), elle est utilisée dans les viscosimètres à orifice. Elle est exprimée par le rapport entre la viscosité dynamique et la masse volumique. Son unité est $\text{m}^2.\text{s}^{-1}$ [169] :

$$\nu = \frac{\eta}{\rho}$$

2. Equations rhéologiques d'état : Rhéogrammes

Tout système mécanique obéit à une équation fondamentale qui établit une relation entre les grandeurs cinématiques décrivant ce mouvement et les grandeurs dynamiques. Il existe en rhéologie une relation entre la déformation de cisaillement γ et la contrainte de cisaillement σ . C'est la relation qui dépend des propriétés et de la nature du matériau, cette relation s'écrit [169] :

$$\gamma = f(\sigma)$$

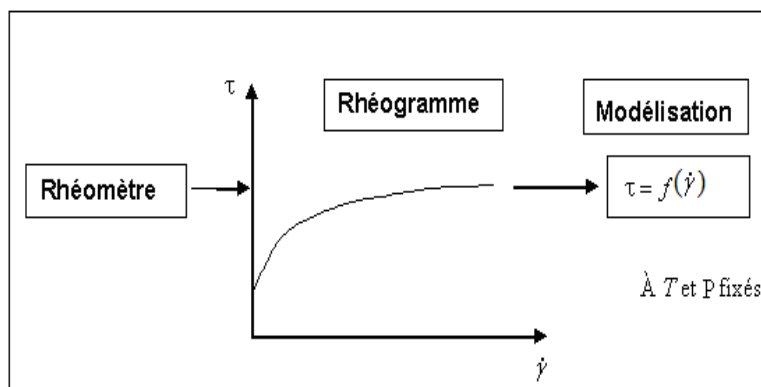
Cette équation ne dépend pas seulement de la nature et des propriétés des matériaux, elle dépend aussi de la température T et de la pression extérieure P . il serait donc plus correct d'écrire :

$$\gamma = f(\sigma, P, T)$$

Les courbes qui traduisent graphiquement l'équation rhéologique d'état sont appelées rhéogrammes. Le comportement d'un fluide peut être différent si on change la façon dont on le cisaille. Ces derniers peuvent exprimer les relations entre :

- ❖ La contrainte de cisaillement σ et la déformation de cisaillement γ .
- ❖ La contrainte de cisaillement σ et la vitesse de cisaillement $\dot{\gamma}$
- ❖ La déformation de cisaillement γ et le temps (expérience de fluage).
- ❖ La contrainte de cisaillement σ et le temps (expérience de relaxation) [169].

Toutes ces expériences sont données à T et P constantes Figure IV.13.



FigureIV.13 : Circuit des analyses rhéologiques. [169].

3. Différents types de fluide en rhéologie:

Selon leurs comportements rhéologiques les fluides sont classés en deux catégories principales

- Fluides indépendants du temps.
- Fluides dépendants du temps.

3.1 Les fluides indépendants du temps :

Ces fluides sont caractérisés par un comportement rhéologique indépendant de la durée d'application de la contrainte, Ils sont divisés en :

- Fluides newtoniens.
- Fluides non newtoniens.

a) Fluides newtoniens :

Les fluides newtoniens sont des liquides linéaires, dont la viscosité est indépendante de la contrainte appliquée, elle n'est fonction que de la température, la pression et la nature du fluide(FigureIV.14). Son équation rhéologique est [169]:

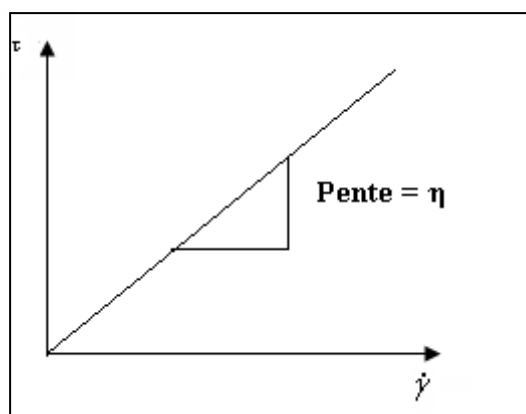
Avec :

$$\eta = \tau / \dot{\gamma}$$

σ : contrainte de cisaillement ;

η : viscosité absolue ;

- $\dot{\gamma}$: vitesse de déformation.



FigureIV.14: Rhéogramme d'un fluide newtonien [169].

b) Fluide non -newtoniens :

Un fluide non-newtonien, n'est plus caractérisé par la viscosité apparente mais par l'ensemble de ses rhéogrammes, son comportement rhéologique est lié à ses propriétés physico-chimiques, à la taille des particules à leur concentration dans la phase continue, à leur nature et à leur aptitude à la déformation.

Les fluides non-newtoniens sont classés en deux catégories principales [169].

b.1) Les fluides à contrainte seuil : (fluides plastiques)

Ces fluides sont caractérisés par un seuil d'écoulement τ_0 , où le fluide ne s'écoule qu'à partir de cette valeur, autrement dit lorsque le fluide est soumis à une contrainte très faible, sa viscosité est tellement forte qu'il ne peut pas s'écouler. Elle représente l'ordonnée à l'origine des rhéogrammes, plusieurs modèles sont utilisés pour décrire le comportement rhéologique des fluides plastiques [169] :

- **Le modèle de Bingham :**

Un fluide de Bingham a un comportement plastique idéal, il ne commence à s'écouler qu'à partir d'un seuil d'écoulement, pour des contraintes plus faible, il ne représente pas de déformation permanente, une fois le seuil d'écoulement dépassé, il se comportent comme un liquide newtonien[169].

L'équation rhéologique représentative est :

$$\begin{aligned} \tau &= \tau_0 + \eta_p \dot{\gamma} & \text{si } \tau > \tau_0 \\ \dot{\gamma} &= 0 & \text{si } \tau \leq \tau_0. \end{aligned}$$

Avec :

- τ : contrainte de cisaillement.
- τ_0 : contrainte seuil.
- η_p : viscosité plastique.
- $\dot{\gamma}$: vitesse de déformation.

La figure suivante (figure IV.15) représente le rhéogramme d'un fluide de Bingham :

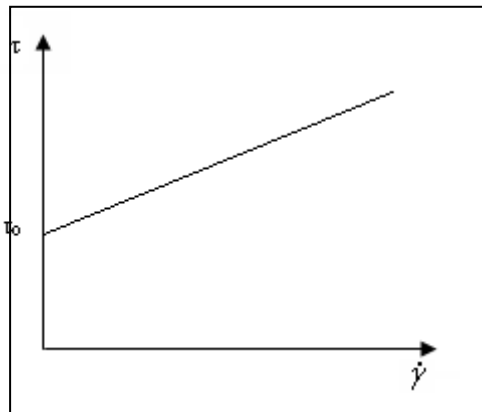


Figure IV.15 : Rhéogramme d'un fluide de Bingham. [169].

• **Le modèle de Casson :**

Les fluides de Casson ont un comportement plastique non idéal (fluidifiant) ils ont également un seuil d'écoulement, mais qui au-delà ne représentent pas un comportement newtonien, l'équation de Casson est définie par [169]:

$$\begin{aligned} \tau^{1/2} &= \tau_0^{1/2} + (\eta_p \dot{\gamma})^{1/2} & \text{si } \tau > \tau_0 \\ \dot{\gamma} &= 0 & \text{si } \tau \leq \tau_0 \end{aligned}$$

Le Rhéogramme d'un fluide de Casson est représenté dans la figure IV.16 suivante :

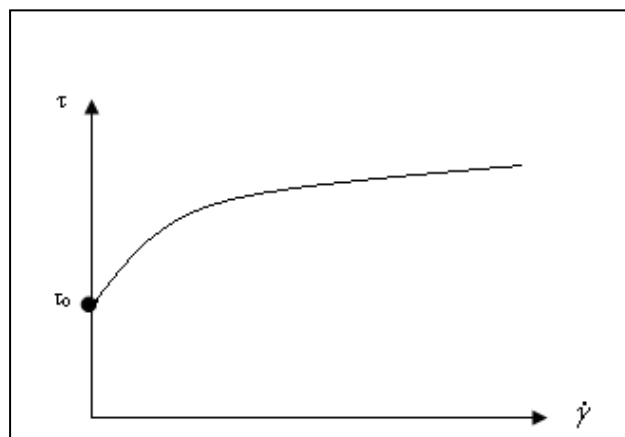


Figure IV.16: Rhéogramme d'un fluide de Casson [169].

- **Le modèle de Herschel-Bulkley :** Il est caractérisé par la relation :

$$\begin{aligned} \tau &= \tau_0 + k \dot{\gamma}^n & \text{si } \tau > \tau_0 \\ \dot{\gamma} &= 0 & \text{si } \tau \leq \tau_0 \end{aligned}$$

C'est un modèle à puissance avec un seuil d'écoulement τ_0 , et un exposant n qui représente l'indice de structure, lorsqu'il est inférieur à l'unité il représente un comportement plastique fluidifiant [169].

k : représente l'indice de consistance.

b.2) Les fluides sans contrainte seuil:

Leur comportement rhéologique diffère essentiellement de celui des fluides plastiques par le fait qu'ils ne représentent pas de contrainte seuil d'écoulement. Ils sont divisés en deux principales catégories :

* Fluides pseudo- plastiques ou rhéo-fluidifiants :

Lors de l'augmentation de la vitesse de déformation, la viscosité du fluide diminue progressivement ce qui est expliqué par l'augmentation du gradient de vitesse, où les particules s'orientent dans le sens de l'écoulement, permettant un meilleur glissement de ces dernières, ce qui provoque une diminution de la viscosité [169].

Les rhéogrammes représentant ce type de fluide sont indiqués dans les figures suivantes :

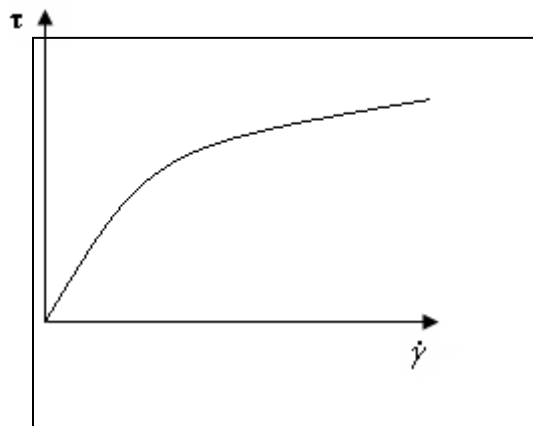


Figure IV.17 : Rhéogramme d'un fluide rhéofluidifiant. [169].

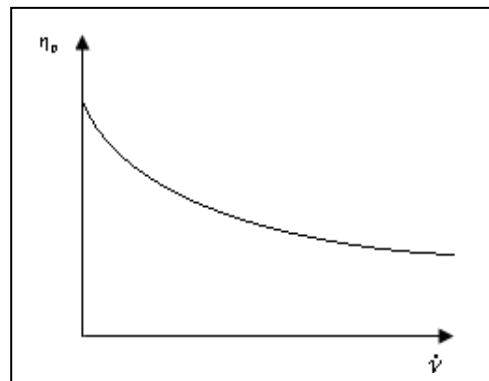


Figure IV.18 : Variation de la viscosité en fonction de la vitesse de déformation. [169]

*** Fluides rhéopaississants ou dilatants :**

A l'opposé des fluides rhéofluidifiants, lorsque la vitesse de déformation augmente la viscosité apparente augmente aussi, au repos les particules se repoussent mutuellement (alternativement), impliquant leur éloignement les unes des autres ce qui engendre une faiblesse de viscosité, mais susceptibles d'augmenter par agitation [169].

Les rhéogrammes représentant ce type de fluide sont indiqués dans les figures suivantes :

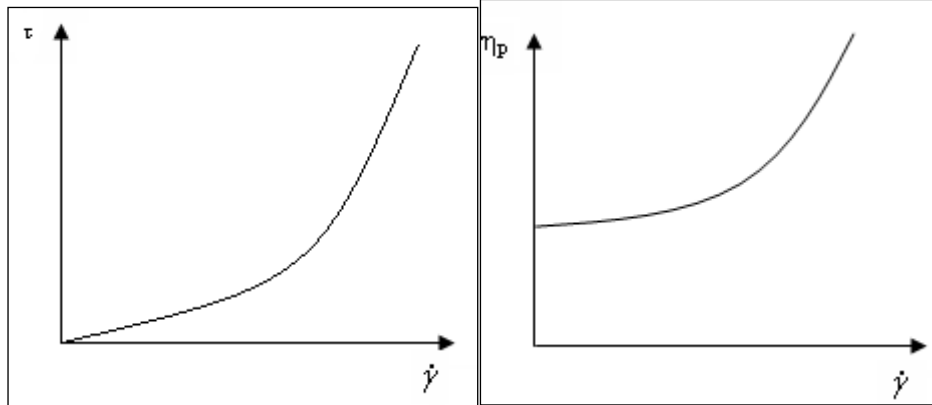


Figure IV.19: Rhéogramme d'un fluide rhéopaississant. [169]

Figure IV.20 : Variation de la viscosité En fonction de la vitesse de déformation. . [169]

Il existe plusieurs modèles caractérisant le comportement rhéologique de ces fluides, parmi les plus importants le modèle D'OSTWALD :

$$\tau = k \dot{\gamma}^n$$

Avec :

- k : indice de consistance
- n : indice de l'écoulement

Si :

- n<1 cas d'un fluide pseudo- plastique.
- n>1 cas d'un fluide dilatant

3.2 Les fluides dépendants du temps :

L'étude du comportement rhéologique de ces fluides est basée sur un paramètre important qui est "le temps ". Contrairement aux fluides précédents où les modifications de la structure interne ont été très rapides, ce qui fait que le temps n'intervient pas dans les équations d'écoulement, ces fluides ont des modifications de la structure interne lentes.

Ils ont été classés en deux catégories :

- Fluides thixotropes : un fluide est dit thixotrope si sa viscosité décroît dans le temps lorsqu'il est soumis à un cisaillement constant.
- Fluides rhéopexes : contrairement aux fluides thixotropes, ces fluides sont caractérisés par une augmentation de la viscosité avec le temps pour un cisaillement donné.
- Fluides viscoélastiques : il existe une autre catégorie de fluides qui possèdent aussi bien des propriétés élastiques que de viscosité c'est les fluides viscoélastiques où le comportement du solide élastique et celui du liquide visqueux coexistent simultanément. Le matériau sous contrainte se déforme d'abord de façon élastique, puis de façon plastique, puis de façon irréversible, mais avec un certain retard. Après la déformation, le solide ne reprend pas sa forme initiale, mais récupère seulement une partie de la déformation, là aussi avec retard. Ce dernier comportement est souvent observé pour les polymères [169].

C. Conditions expérimentales

- **Test de viscoélasticité**

Afin de déterminer les propriétés viscoélastiques des mélanges de bio polymères (protéine et polysaccharide), On a maintenu une fréquence constante 1Hz et on fait varier le pourcentage de déformation de 1 % à 1000 % en rampe logarithmique. On a prélevé ainsi des valeurs du module de conservation G' et des valeurs du module de perte G'' . La figure ci-dessous montre une courbe type (Cp 2%, ratio3/1, pH 3.5) issue de ce test pour un mélange de biopolymère.

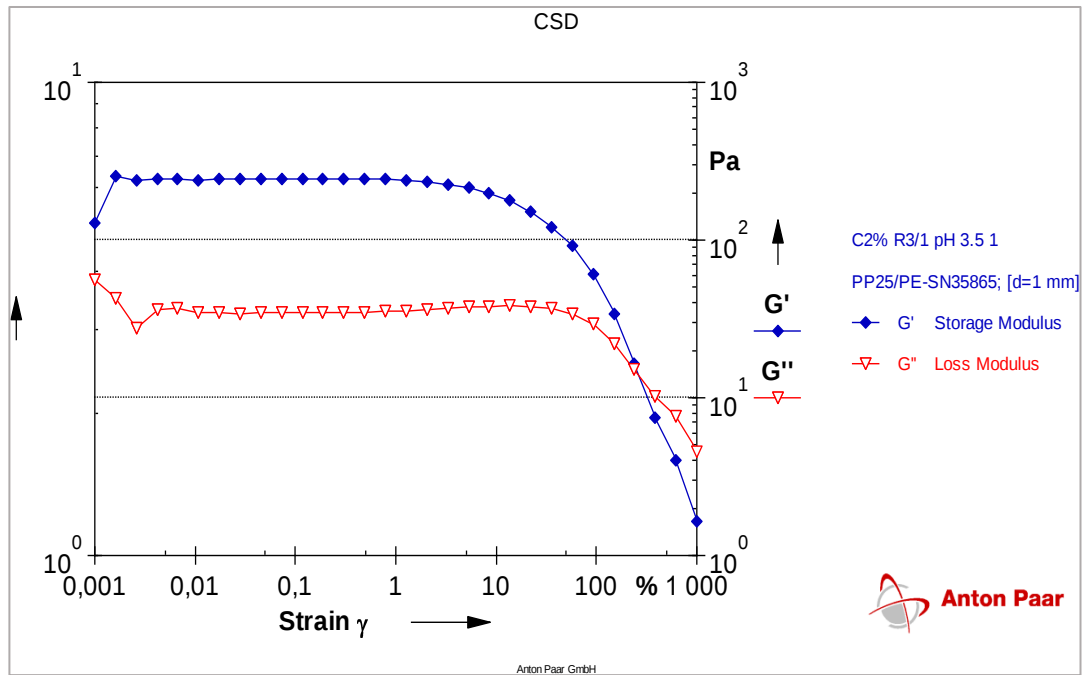


Figure IV.21 : Test de viscoélasticité pour un essai type (C_p 2%, ratio 3/1, pH 3.5)

- **Courbe d'écoulement :**

L'objectif de ce test est de caractériser le comportement rhéologique des mélanges de biopolymères, lorsqu'ils sont en écoulement variable. Pour cela, on fait varier la vitesse de cisaillement de 0.001 à 1000 s^{-1} , en rampe logarithmique. Le nombre de points de mesure est de 30 points, et le temps entre une mesure et une autre varie de 120 s à 2s en rampe logarithmique.

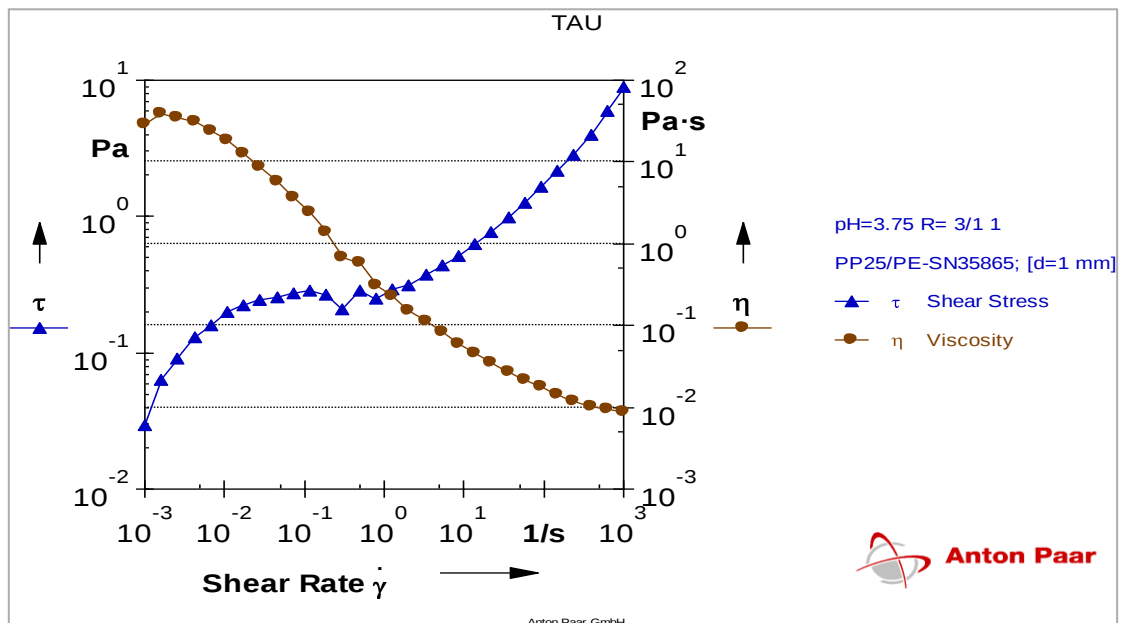


Figure IV.22 : Courbe d'écoulement pour un essai type (C_p 2%, ratio 3/1, pH 3.5)

IV.2.2.2. Méthodes de Caractérisation des microcapsules

Afin d'évaluer la qualité des microcapsules obtenues par les deux types de procédés gélification ionotropique et coacervation complexe, nous avons mené plusieurs caractérisations dont :

➤ Le rendement et le taux d'encapsulation

Le rendement représente la quantité de microcapsules récupérées à la fin du procédé après séchage des microcapsules. Il est calculé par rapport à la matière sèche (PA et biopolymères) selon la formule suivante :

$$\text{Rendement (\%)} = \frac{\text{Masse des microcapsules obtenue}}{\text{Poids théorique PA+poly}} * 100 * F_s$$

Tel que :

F_s =facteur de correction qui tient compte de l'humidité résiduelle des microcapsules

Le taux d'encapsulation est calculé par la formule :

$$\text{Taux d'encapsulation} = \frac{\text{Concentration obtenue en PA}}{\text{Concentration théorique en PA}} * 100.$$

➤ L'aspect microscopique au microscope optique et Microscope électronique à balayage :

Les microcapsules obtenues sont observées au microscope optique et au MEB sans préparation particulière de l'échantillon. La microscopie électronique à balayage est une technique capable de produire des images de haute résolution de la surface d'un échantillon en utilisant le principe des interactions électrons- matières qui permettent de reconstruire une image en trois dimensions de la surface d'un échantillon. À travers cette analyse nous pouvons non seulement évaluer la dimension des particules mais aussi apprécier leurs morphologies et leurs surfaces.

➤ **La caractérisation viscoélastique des mélanges de polymère**

Le test de viscoélasticité a été réalisé selon les mêmes conditions expérimentales désignées dans la partie étude des mélanges binaires (alginate de sodium et gélatine). On a maintenu une fréquence constante 1Hz et on fait varier le pourcentage de déformation de 1 % à 1000 % en rampe logarithmique. On a prélevé ainsi des valeurs du module de conservation G' et des valeurs du module de perte G'' .

➤ **La Caractérisation biopharmaceutique**

Test de dissolution

Les connaissances acquises sur les phénomènes de mise à disposition des substances actives, dans l'organisme, après leurs absorptions, ont progressivement conduit la pharmacie galénique à reconsidérer sa mission et à afficher de nouvelles prétentions. La maîtrise de la libération du principe actif à partir des formes pharmaceutiques et celle de la durée d'action des médicaments est l'un des premiers défis lui ayant été proposés. Il est clair, pour que la molécule atteigne la circulation générale et qu'elle y développe son activité, il faut qu'elle franchisse deux étapes importantes correspondant à deux facteurs limitant :

- La libération et la dissolution puis
- L'absorption

Le test de dissolution est une méthodologie expérimentale dans laquelle les propriétés de libération du principe actif à partir des formes galéniques solides à libération modifiée sont caractérisées, documentées et comparées.

L'essai de dissolution trouve son importance dans le contrôle d'une formulation mais aussi pour expliquer son comportement. Il est destiné à déterminer l'aptitude d'une forme galénique à laisser passer en solution, dans un milieu déterminé, le ou les principes actifs qu'elle contient selon un profile et une cinétique maîtrisée. Il permet ainsi la validation des choix à faire aux différents stades de développement de la forme médicamenteuse.

Dans L'USP 30^{ème} édition [195], seule la forme gélule du principe actif Acébutolol est monographiée ainsi que sa méthode de dissolution. En ce qui concerne nos formulations qui sont à base de matrice biopolymérique la méthode de dissolution nécessite une validation des paramètres physiques liés à l'équipement (milieu, vitesse, volume, ...) et aussi des paramètres

analytiques liés à la méthode de quantification du principe actif libéré et dissout (linéarité, spécificité, reproductibilité).

A cet effet, une mise au point d'un protocole de dissolution, dans le but d'une caractérisation biopharmaceutique d'une forme galénique à libération prolongée à base d'Acébutolol s'impose.

a. Choix des paramètres physiques de dissolution

• Choix de l'appareil de dissolution

L'essai de dissolution est réalisé avec un dissolutest type PHARMATEST à palettes tournantes décrit dans la Pharmacopée Européenne 6ème édition.

L'appareil utilisé est à 6 postes. Un poste supplémentaire est prévu pour conserver dans les conditions de l'essai le milieu de dissolution.

• Choix du milieu de dissolution

En règle générale, on utilise un milieu de dissolution aqueux. La composition du milieu est choisie en fonction des caractéristiques physico-chimiques de la (des) substance(s) active(s) dans les limites des conditions auxquelles la forme pharmaceutique est susceptible d'être exposée après son administration. Ceci s'applique notamment au pH et à la force ionique du milieu de dissolution. En raison de la forme prolongée de la libération du PA nous avons utilisé le :

- ✓ Le milieu tampon phosphate intestinal à pH 6,8
- ✓ Selon USP 30[195], Pour l'appareil à panier et à palette, les volumes du milieu de dissolution sont 500ml, 1000ml et 900ml comme volume standard. Pour notre cas le volume de 900ml est retenu avec une température de $37 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ (température physiologique).
- **Choix du système d'agitation** L'objectif de cette étude est de choisir l'appareil le plus approprié pour l'essai de dissolution ; selon la pharmacopée américaine (USP30 NF-25) l'appareil à palettes est recommandé pour les formes galéniques solides à libération prolongée.
- **Choix de la vitesse d'agitation** Selon USP 30[195] les vitesses recommandées sont 50, 75 et 100tpm. Pour étudier l'influence de la vitesse sur la cinétique, un essai de dissolution est réalisé sur une formulation de référence à 75tpm, 100rpm et 150tpm. La vitesse d'agitation remplace les mouvements péristaltiques de tractus digestif. La vitesse retenue est de 75 tpm.

- **Protocole de prélèvement :**

Selon la FDA (Food and Drug Administration) [157] , le protocole de prélèvement des formes à libération prolongée, demande à effectuer trois prélèvements au début à 1heure, 2heure et 4heure pour mettre en évidence le cas où il y aurait une libération prématurée du principe actif (dose dumping, burst effect) et ensuite un prélèvement tous les deux heures.

Selon l'USP30, pour les formes à libération soutenues, trois temps sont à préciser, un premier temps à 1 heure, à 2 heures, un temps intermédiaire, et puis un temps au moment où la dissolution sera complète.

Le protocole retenu pour notre étude comporte deux parties : une première partie regroupe plusieurs prélèvements au début à 20, 40, 60, 120, 240 minutes qui vont définir l'évolution du profil de la courbe au départ puis une deuxième partie, regroupant des prélèvements supplémentaires et espacés pour représenter le profil de libération.

A chaque temps, sont prélevés 5ml de solution, qui seront remplacés par le milieu de dissolution retenu. Donc on assiste à une dilution du milieu de dissolution suite aux prélèvements, qui doit être prise en compte dans les calculs.

Ensuite, effectuer une dilution de 1/50ème du milieu de dissolution prélevé, suivie d'un dosage par la méthode choisie (UV/Visible)

b. Choix des paramètres analytiques de dissolution

- **Choix de la méthode de dosage**

Il y a deux manières communes d'analyser les échantillons de l'essai de dissolution : la spectrophotométrie UV/Visible et HPLC. Notre choix s'est porté sur la méthode de dosage par spectrophotométrie Ultraviolet-Visible, car c'est une technique d'analyse rapide, économique, et ne demande pas des traitements préalables. Une méthode ne sera fiable, ni utilisable qu'après avoir été validée et pour cela elle doit répondre à certains critères décrits selon le rapport de commission SFSTP [196] de la façon suivante :

- Spécificité
- L'exactitude
- Linéarité
- Fidélité
- Stabilité

- **Optimisation de la longueur d'onde spécifique**

Typiquement, on observe le spectre UV de la substance active, en faisant un balayage de 200nm à 400nm, afin de déterminer la longueur d'onde optimale qui correspond à l'absorbance maximale.

Mode opératoire:

On Prépare une solution étalon de PA a une concentration de 0.555mg/ml dans l'eau distillée, on effectue une dilution de 1/50ème avec le même milieu de dissolution, puis on réalise un balayage de longueur d'onde de 200 à 400 nm. On prend la plus grande valeur d'absorbance qui correspond à la longueur d'onde optimale, elle est de 232nm.

- **Validation analytique de la méthode de dosage**

Les principales références de cette validation sont : le rapport de commission SFSTP pharma [196], fondé sur l'ICH et l'OMS. La validation de cette méthode de dosage a été effectuée sur le principe actif pour la vérification des critères suivants : linéarité, fidélité, exactitude et stabilité. Et sur la formule de référence et le principe actif pour le test de la spécificité.

✓ **La Spécificité**

Le test de la spécificité est réalisé sur les solutions préparées à partir de placebo et à partir du principe actif (étalon) et celle préparée à partir des formules de références (solution standard). Pour cela on prépare des solutions constituées d'excipients à partir d'un essai placebo, Suivie d'une dilution de 1/50ml dans de l'eau distillée. (Voir spectre en annexe)

Au vue du spectre obtenu nous constatons, qu'aucune interférence n'est constatée à la longueur d'onde 232nm qui est celle du principe actif. On peut conclure que les excipients n'interfèrent pas avec la substance active (substance a analysée) ce qui confirme que cette longueur d'onde est spécifique à l'Acébutolol.

✓ **La Linéarité** (méthode interne)

Une gamme d'étalons à différentes concentrations, été réalisé sur le principe actif, positionnée d'une façon régulière autour de 100%, tel que les concentrations théoriques soient : 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 110%, selon la figure IV.23 ci-dessous.

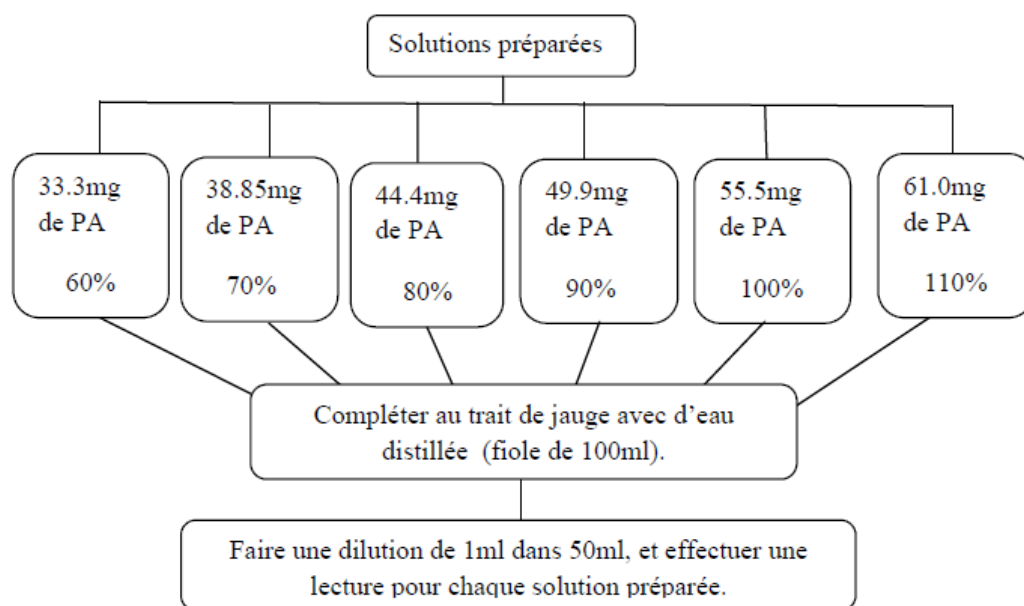


Figure IV.23 : Récapitulatif des dilutions préparées pour le test de linéarité

- ✓ **L'Exactitude** (méthode interne) L'exactitude de la méthode de dosage est évaluée en utilisant les résultats de la linéarité.
- ✓ **La Fidélité** (méthode interne) Effectuer 3 séries de pesées de concentration théorique (100%) sur la substance active (Acébutolol), et ce à raison d'une série par jour (en effectuent 7 lectures pour chaque série).
- ✓ **La Stabilité** (méthode interne) Effectuer sur la solution étalon à 100% des lectures par UV à des temps différents (une lecture par jour durant 04 jours).

- **Expression des résultats**

Le pourcentage de principe actif dissous est exprimé par la formule suivante :

$$X\% = \frac{DO\ éch}{DO\ éta} \times DO\ ét \times C\ ét \times V \times TPA \times 0,9022$$

DO échantillon : densité optique de l'échantillon.

DO étalon : densité optique de l'étalon.

C étalon : concentration de l'étalon (0.555mg/ml).

V:volume (900ml).

TPA : titre de PA..

Et **0.9022** est le facteur de conversion.

C. Ajustements Mathématiques Des Profils De Dissolution par des modèles de dissolution :

Plusieurs approches sont utilisées pour étudier la cinétique de libération de PA à partir d'une formulation à libération prolongée, elles sont classées en trois catégories :

- ✓ **Méthodes statistiques** (méthode d'analyse exploratoire des données, conception de mesures répétées, approche multivariée (ANOVA: analyse multivariée de la variance)
- ✓ **Méthodes dépendantes du modèle** (modèle d'ordre zéro, modèle de premier ordre, modèle de Higuchi, modèle Korsmeyer-Peppas, modèle de HixsonCrowell, modèle Baker-Lonsdale, modèle Weibull,, etc...)
- ✓ **Méthodes indépendantes du modèle** facteur de différence (f1), facteur de similarité (f2)].

Les méthodes dépendantes du modèle sont basées sur différentes fonctions mathématiques, qui décrivent le profil de dissolution. Une fois qu'une fonction appropriée a été sélectionnés, les profils de dissolution sont évalués en fonction des paramètres du modèle dérivé [197].

Afin de déterminer le modèle approprié de la cinétique de libération du médicament décrivant le profil de dissolution, nous avons étudié plusieurs modèles selon le module de régression non linéaire de **Statistica 8.0** avec des méthodes de quasi-newton, simplex et Hookjeeves pour minimiser les moindres carrés.

- **Modèle d'ordre zéro**

$$Q_t = K_0 \times t$$

Tel que : Q : pourcentage du PA dissout en fonction de temps

K_0 : constante de l'ordre zéro [

- **Modèle de premier ordre (Wagner)**

$$Q(\%) = 1 - e^{-Kt}$$

Tel que :

Q : pourcentage du PA dissout

K : constante du premier ordre

t : temps de libération du principe actif

- **Modèle d'Higuchi**

$$Q = k \times t^{1/2}$$

K : constante de libération du PA

t : temps de libération du principe actif

- **Modèle de Weibull**

$$\bullet \quad Qt = Q_{\infty} \left(1 - \exp^{-\frac{(t-T)^{\beta}}{\alpha}} \right)$$

m : fraction cumulé du PA dans la solution

t : temps pour lequel la fraction 62.32% est libérée

Ti : temps de latence

b : coefficient de la forme, généralement entre 1 et 1.2

a : échelle de temps du processus de dissolution

- **Modèle de KrossmeyerPeppas**

$$\frac{Qt}{Q0} = Kkp x t^n$$

Qt/Q0 : pourcentage du PA dissout /quantité initiale

K_{kp} : constante de vitesse krossmeyerPeppas

n : exposant traduisant le mécanisme de dissolution [197]

Chapitre V :

Résultats et discussions

Comme nous l'avons annoncé dans la partie matériels et méthodes, la préparation des microcapsules à base d'Acébutolol s'est faite selon deux procédés :

- Le procédé de complexation par les ions calcium
- Le procédé de coacervation complexe de la gélatine et l'alginate de sodium dans les conditions optimales prédéfinis dans la partie étude des mélanges binaires (le ratio protéine /polysaccharide et pH) enrobés par un troisième polymère le chitosane.

V.1. Préparation des microcapsules par le procédé de complexation par les ions calcium

V.1.1. Aspect macroscopique des microcapsules : Les photos macroscopiques des microcapsules obtenues par le procédé de gélification ionotrope sont représentées dans le tableau I ci-après :

Tableau I : Aspect macroscopique des microcapsules

N° d'essai	Proportion polymères Gélatine/Alginate	Aspect macroscopique
1	0/100 Ratio PA/Poly : 1/1	
4	20/80 Ratio PA/Poly : 1/1	

7	30/70 Ratio PA/Poly : 1/1	
10	40/60 Ratio PA/Poly : 1/1	
13	50/50 Ratio PA/Poly : 1/1	
16	60/40 Ratio PA/Poly : 1/1	

19	70/30 Ratio PA/Poly : 1/1	
22	80/20 Ratio PA/Poly : 1/1	

- **Observations et interprétations des résultats de l'aspect macroscopique**

D'après les illustrations prises sur les microparticules préparées par le protocole de gélification ionotrope, nous tirons les observations suivantes :

- ❖ Les microparticules obtenues ont une forme sphérique de couleur blanche et brillante, pour tous les essais (de **1** à **18**) à l'exception des **essais de 19 à 24** qui présentent un aspect un peu déformé et des contours non bien délimités. Ces 3 essais correspondent au ratio d'alginate de sodium/gélatine égale à 20/80.
- ❖ Pas d'influence du ratio alginate de sodium /gélatine sur la taille et la forme des microparticules formulées par ce protocole pour les essais de **1** à **21**, c'est-à-dire les essais des ratios alginate /gélatine allant de (100 /0) à (30/70)
- ❖ Pas d'influence du ratio Pa /Polymère sur la taille et la forme des microparticules formulées par ce protocole.

Ceci nous permet de déduire que les microcapsules présentent des aspects différents en fonction de leur composition qualitative. Un aspect de plus en plus régulier et une forme arrondie pour les microcapsules dont la proportion en alginate est importante (supérieur à (30/70), ceci s'explique par le mécanisme de complexation mis en jeu. En effet la gélification ionotrope comme son nom l'indique fait appel aux ions calcium fournis par le CaCl_2 .

Ces derniers sont retenus dans une « cage » et interagissent avec les fonctions carboxylates et les atomes d'oxygène des fonctions hydroxyles de l'alginate de sodium (figure V.1)

Donc il est clair que les microcapsules dont l'alginate est le polymère majoritaire présentent un aspect plus régulier et des formes sphériques à contour bien délimités.

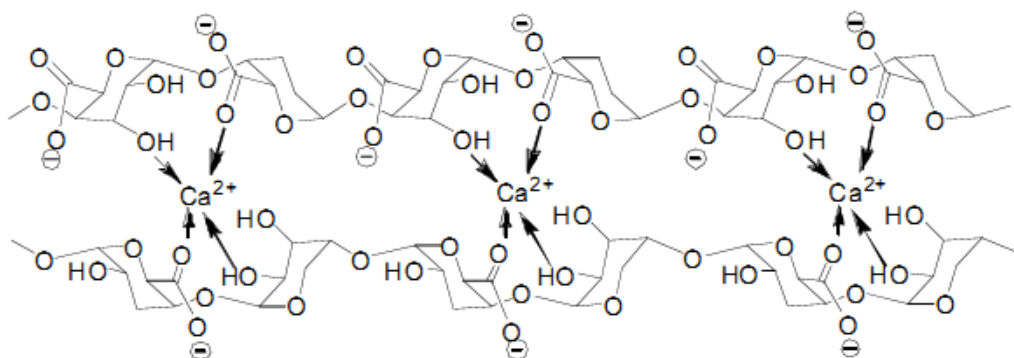


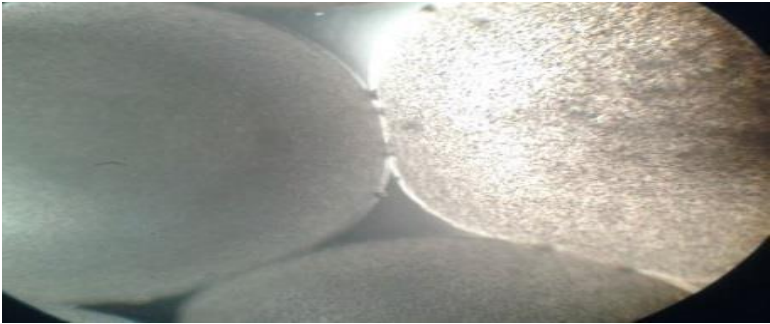
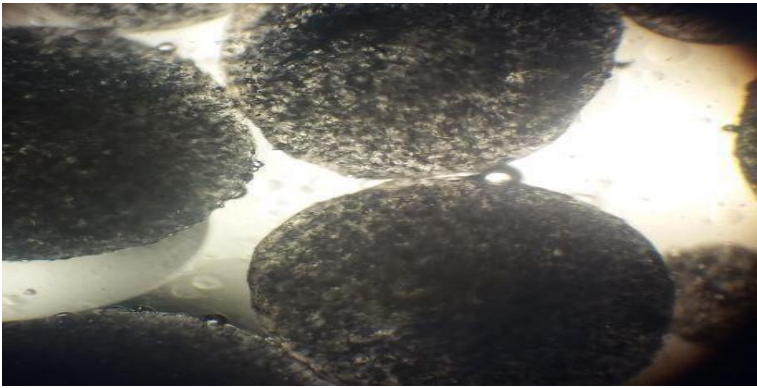
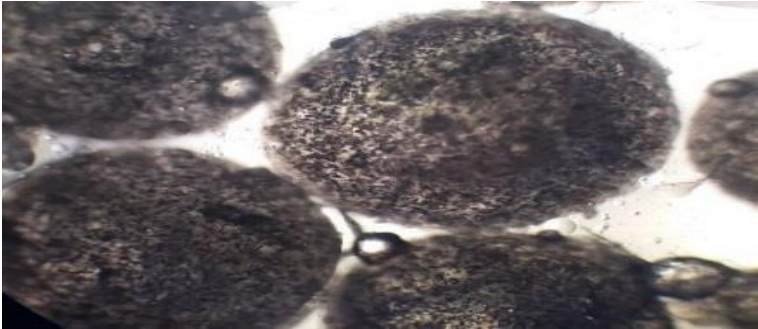
Figure V.1: Gélification de l'alginate de sodium par les ions calcium. [182]

V.1.2 Analyse microscopique et granulométrique :

Pour cette analyse nous avons étalée avec précaution sur une lame de verre, les microcapsules qui sont observées directement au microscope optique, avec un grossissement ($G \times 20$) muni d'échelle micrométrique, l'analyse est effectuée sur plus de 100 microcapsules pour chaque essais.

Les résultats de la caractérisation au microscope optique des microparticules préparées par le procédé de gélification ionotrope sont présentés dans le tableau II et III

Tableau II : Aspect microscopique des microcapsules

Numéro d'essai	Photo microscopique (Grossissement : GX20)
1	
4	
7	
10	

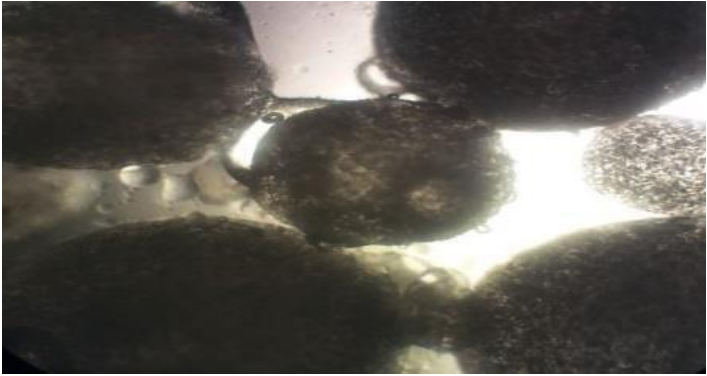
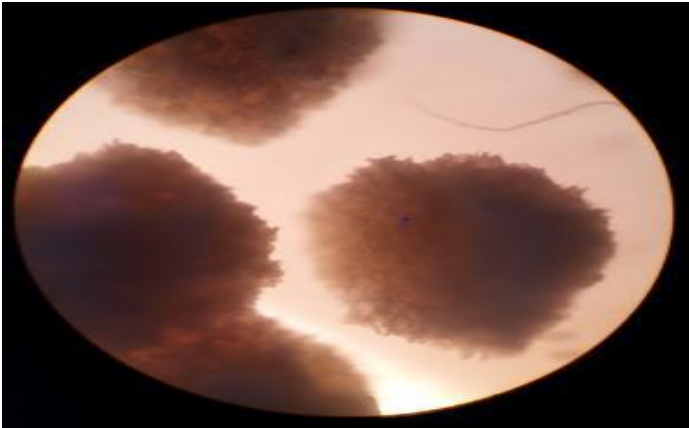
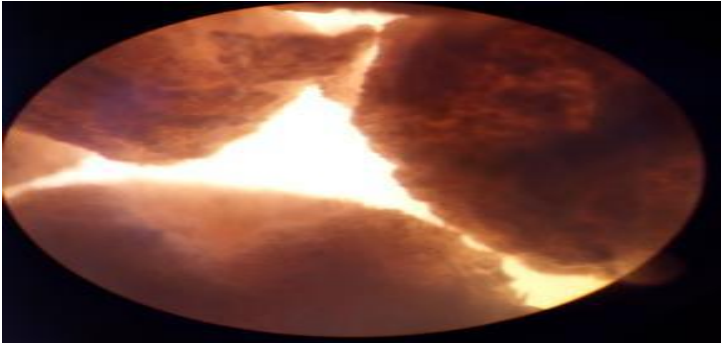
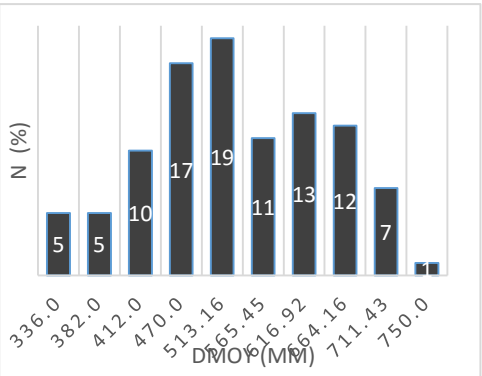
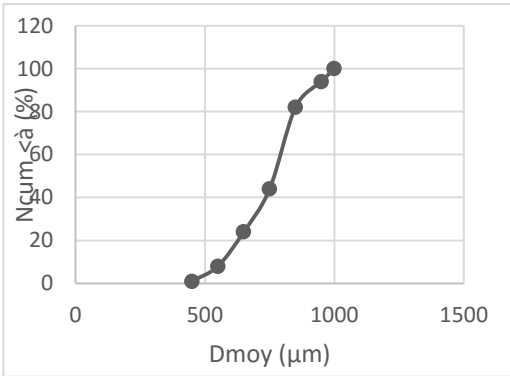
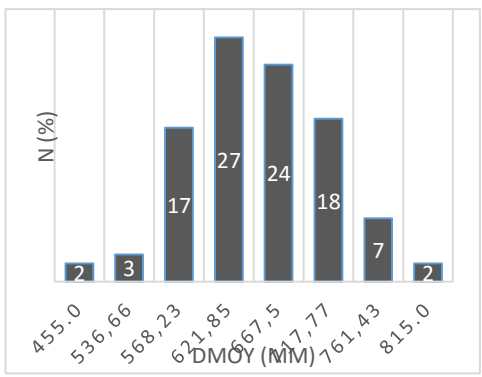
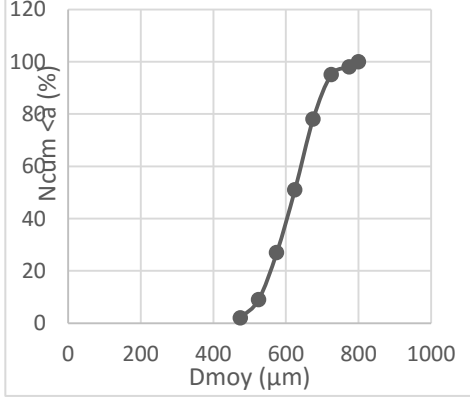
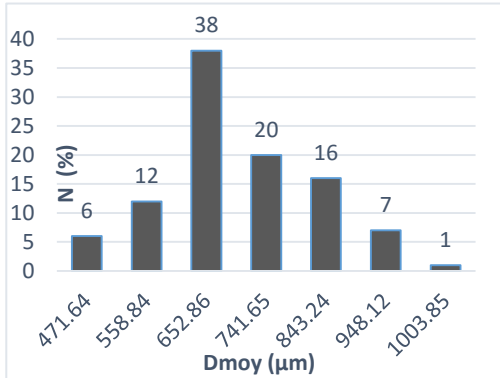
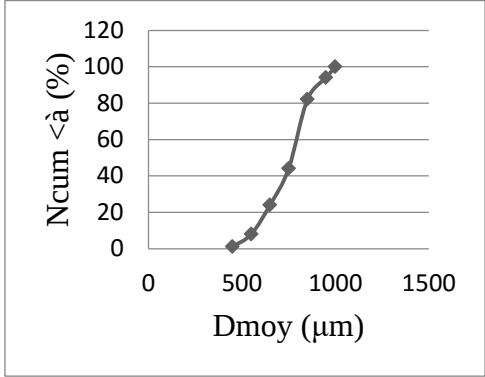
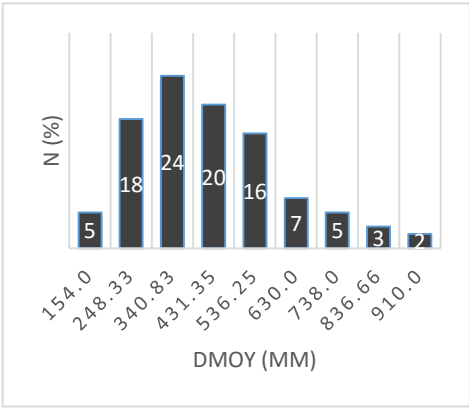
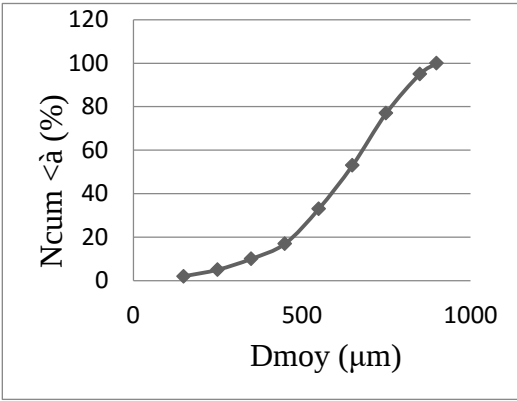
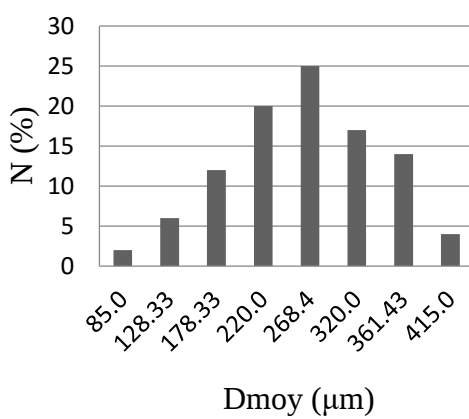
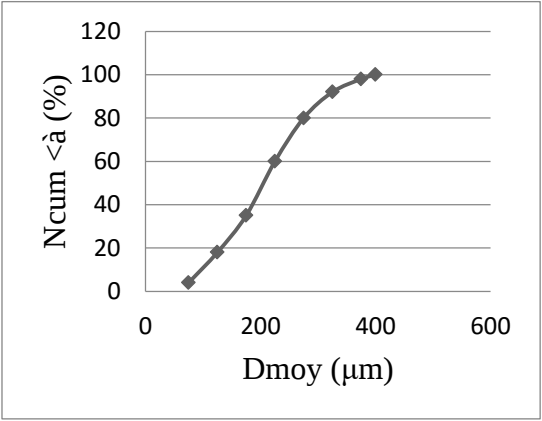
13	
16	
19	

Tableau III : Résultats de l'analyse granulométrique en distribution granulométrique et en fraction cumulée des microcapsules obtenues par essai

N°Essai	Courbes de Distribution du diamètre des capsules avec les fractiles (μm)	Courbe de distribution granulométrique en fraction cumulée
1	 $D_{10}=383.33, D_{50}=540.8, D_{90}=675$	
6	 $D_{10}=421.4, D_{50}=622.91, D_{90}=723$	
10	 $D_{10}=562.5, D_{50}=750, D_{90}=916.66$	

13	 D₁₀ =350, D₅₀ =635, D₉₀ =822.22	
16	 D₁₀ =96.42, D₅₀ =405, D₉₀ =508	

A l'aide du microscope optique, on remarque que :

- Les microparticules sont de forme sphérique et plus ou moins régulière, dissimulant la présence du PA dans les microparticules et cela pour l'ensemble des essais .
- Les microparticules formulées à base de forte proportion d'alginate de sodium (de ratio Alg /Gél compris entre 100/0 à 40/60) (Tableaux II) présentent un aspect plus régulier et homogène en raison de la viscosité de la solution d'alginate qui génère des gouttelettes plus uniformes et peu déformables sous l'action de la pesanteur.

En ce qui concerne les représentations graphiques de la distribution granulométrique du (Tableau III), on constate une distribution unimodale des microcapsules, c'est-à-dire, la présence d'une population majoritaire avec un diamètre moyen compris entre de 513.16 et 750.92 μm , avant le séchage. Cette taille serait plus petite après dessiccation et élimination de l'eau.

Les travaux de Mallikarjun Mugli [198] qui a formulé des microcapsules de salbutamol à base d'alginate de sodium et d'un autre copolymère la CMC, par la même technique de gélification ionotrope, a obtenus des répartitions granulométriques proche de nos résultats (70% des microcapsules ayant un diamètre moyen compris entre 710 et 355 μm et 26% ayant un diamètre compris entre 355 et 250 μm) .

Aussi les travaux de Thichanee Jiamrungraksa [179], la taille moyenne des microcapsules mesurée par un microscope optique variait de 753 à 905,3 μm en fonction de la concentration de l'alginate.

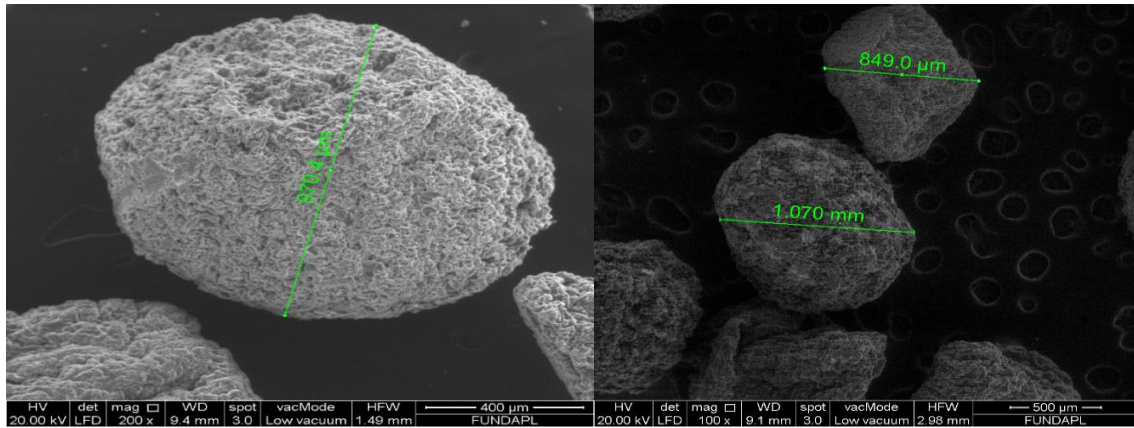
Des résultats semblables ont été obtenus aussi par Malayk. DAS [174] qui encapsulé le furosémide par la même technique et ayant obtenus des diamètres moyens compris entre 726 et 886 μm . D'autres travaux comme ceux de Raparla Rama Krishna [199] et les travaux de K. M. Manjanna [176], ont eu des résultats similaires.

V.1.3. Caractérisation Morphologique au microscope électronique à balayage MEB

Les observations au microscope optique à balayage permettent de visualiser la morphologie et la taille des microcapsules obtenues pour le procédé de gélification ionotrope. On voit clairement la forme proche de la sphère avec des tailles allant approximativement de 600 μm à 1.2 mm, Ceci confirme l'analyse granulométrique établie par la microscopie optique.

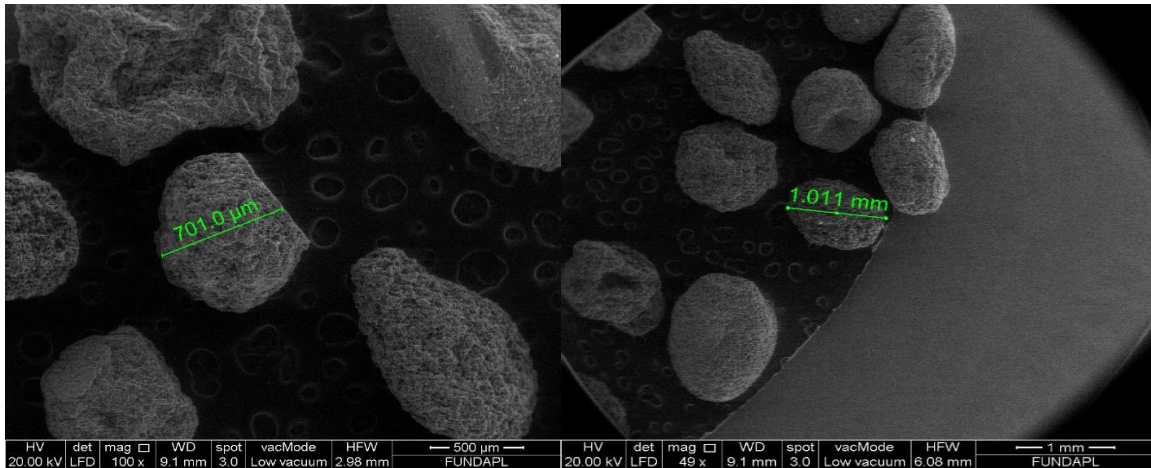
D'autre part nous visualisons à une échelle d'agrandissement plus importante (photos (e) et (f)) la surface réticulée des particules, résultant de la complexation de l'alginate par les ions calcium ainsi que la taille des pores situés à la surface des particules. La taille de ces derniers est comprise entre 5 et 14 μm , ceci peut avoir un impact direct sur la diffusion du principe actif lors de la dissolution.

Les figures ci-après (figure V.2.a,b,c,d,e,f) montrent des photos au MEB de quelques essais :



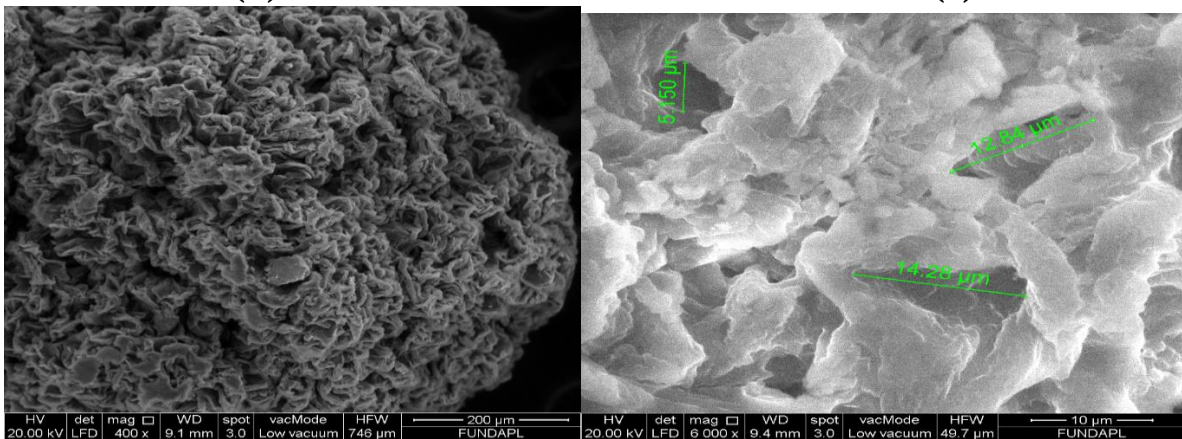
(a)

(b)



(c)

(d)



(e)

(f)

Figure V.2 : Aspect morphologique au microscope électronique à balayage de quelques Essais

V.1.4. Le rendement d'encapsulation : Les résultats du rendement sont représentés ci-après

Tableau IV : Représentation des résultats du rendement d'encapsulation

Proportion Alginate/Gélatine	Ratio PA/ polymères	Poids		Poids après dessiccation en (g)	Rendement d'encapsulation en %
		P.Théo	P.Exp		
100/0	1/1	10	12.50	9.08	90.80
	1/2	15	13.93	12.80	85.33
	1/3	20	18.21	17.02	85.06
80/20	1/1	10	12.01	10.1	101
	½	15	15.70	13.39	89.26
	1/3	20	16.02	15.46	77.30
70/30	1/1	10	13.98	10.05	100.05
	½	15	11.85	11.83	78.88
	1/3	20	18.89	17.34	91.97
60/40	1/1	10	10.84	8.89	88.90
	½	15	14.56	13.39	89.26
	1/3	20	16.89	15.81	79.05
50/50	1/1	10	12.48	10.91	109.10
	½	15	15.49	14.72	98.13
	1/3	20	18.92	18.54	92.70
60/40	1/1	10	12.79	10.29	102.9
	½	15	13.91	13.73	91.53
	1/3	20	18.48	17.94	89.7
70/30	1/1	10	12.54	10.17	101.70
	½	15	13.25	13.19	87.93
	1/3	20	16.56	16.18	80.90
80/20	1/1	10	10.35	9.03	90.30
	½	15	12.50	11.48	76.53
	1/3	20	14.72	14.20	71.00

Les résultats obtenus montrent clairement que les rendements d'encapsulation sont très élevés et dépassant même parfois 100% de la quantité initiale de matières sèches de départ. L'augmentation du poids des microcapsules à la fin du procédé serait due à la quantité d'ions calcium fixé sur l'alginate et retenue dans les microcapsules ce qui a provoqué ce gain massique.

V.1.5. Le taux d'encapsulation :

Les résultats du taux d'encapsulation de l'ensemble des essais sont présentés dans le tableau V

Tableau V : Représentation des résultats du taux d'encapsulation

Proportion Alg /gél	Ratio PA/PO L	Taux d'encapsulation %	Proportion Alg /gél	Ratio PA/POL	Taux d'encapsulation%
20/80	1/1	39,55	60/40	1/1	43,92
	1/2	37,39		1/2	43,64
	1/3	32,53		1/3	38,66
30/70	1/1	26,92	70/30	1/1	48,19
	1/2	37,98		1/2	46,63
	1/3	37,63		1/3	60,48
40/60	1/1	46,01	80/20	1/1	55,20
	1/2	36,31		1/2	67,75
	1/3	27,94		1/3	58,49
50/50	1/1	43,91	100	1/1	64,79
	1/2	46,79		1/2	51,73
	1/3	40,93		1/3	58,11

Le taux d'encapsulation en PA déterminé par la méthode de spectrophotométrie UV-Visible, varie de 26,92% à 67,75%, nous constatons que les taux d'encapsulation les plus intéressants sont obtenus pour des ratios d'alginate élevés ce qui laisse déduire que plus la quantité d'alginate est importante dans la matrice, plus la quantité de PA piégée est importante.

Au vu des résultats, les taux d'encapsulation obtenus sont acceptables en générales avec des taux d'encapsulation très intéressants enregistrés par la proportion des essais 80/20 (1/1, 1/2) ces taux importants peuvent être attribués à la concentration de l'alginate de sodium qui par complexation avec les ions calcium permet de retenir d'avantage une quantité importante de PA. Aussi nous constatons que la proportion du PA n'affecte pas le taux de PA encapsulé, pour les trois ratios de PA /Polymère, ce taux ne varie pas de façon significative.

V.1.6. Cinétique de Gonflement et d'érosion des microcapsules :

L'évolution du poids moyen des microcapsules en fonction du temps est représenté dans le tableau ci-après (Tableau V.6) puis nous traçons les figures représentant la cinétique de gonflement et d'érosion (figure : V. 3, V.4, V.5, V.6, V.7 V.8 et V.9)

Tableau VI : Représentation des résultats de gonflement et d'érosion en fonction du temps

Proportion Alg/gél	Ratio PA/Pol	1h	2h	3h	4h	5h	6h	7h	8h	9h	10h	11h	12h
80/20	1/1	1.52	1.75	1.89	1.95	1.97	1.98	2.00	2.00	1.83	1.26	1.20	1.05
	1/2	1.34	1.30	1.45	1.66	1.44	1.38	1.52	1.52	1.45	1.32	1.29	1.23
	1/3	1.26	1.32	1.31	1.29	1.41	1.35	1.26	1.47	1.25	1.20	1.20	0.88
70/30	1/1	1.29	1.29	1.30	1.35	1.21	1.34	1.35	1.34	1.31	1.18	1.12	1.07
	1/2	1.03	1.10	1.19	1.21	1.32	1.49	1.36	1.26	1.20	1.07	0.87	0.75
	1/3	1.03	1.39	1.41	1.46	1.50	1.61	1.48	1.56	1.39	1.36	1.24	1.04
60/40	1/1	1.05	1.28	1.31	1.48	1.26	1.26	1.54	1.49	1.17	1.07	1.05	1.08
	1/2	1.14	1.58	1.58	1.66	1.72	1.63	1.63	1.63	1.40	1.40	1.17	1.09
	1/3	1.23	1.49	1.68	1.66	1.66	1.51	1.51	1.57	1.50	1.50	1.38	1.29
50/50	1/1	1.05	1.29	1.41	1.10	0.81	0.81	0.81	0.88	0.87	0.82	0.80	0.77
	1/2	1.35	1.44	1.32	1.23	1.18	1.12	1.10	0.99	0.67	0.63	0.60	0.57
	1/3	1.52	1.53	1.50	1.44	1.20	1.01	0.90	1.00	1.00	0.63	0.51	0.50
40/60	1/1	1.18	1.22	1.10	1.10	1.03	1.00	0.83	0.79	0.69	0.69	0.63	0.60
	1/2	1.37	1.56	1.44	1.39	1.16	1.10	1.08	1.08	1.06	1.03	1.00	0.70
	1/3	1.41	1.60	1.44	1.39	1.06	1.00	0.97	0.99	0.85	0.85	0.82	0.72
30/70	1/1	1.07	1.23	1.15	1.07	0.62	0.62	0.62	0.73	0.73	0.57	0.55	0.50
	1/2	1.22	1.67	1.25	1.22	1.06	1.00	0.9	0.92	0.88	0.78	0.57	0.55
	1/3	1.46	1.52	1.40	1.36	1.17	1.17	1.17	0.99	0.88	0.80	0.79	0.62
20/80	1/1	1.21	1.24	1.17	1.13	0.92	0.90	0.86	0.65	0.60	0.61	0.46	0.44
	1/2	1.31	1.45	1.18	1.18	1.15	1.08	1.01	0.99	0.97	0.97	0.92	0.88
	1/3	1.48	1.52	1.41	1.31	1.16	1.07	1.04	0.94	0.84	0.83	0.53	0.52

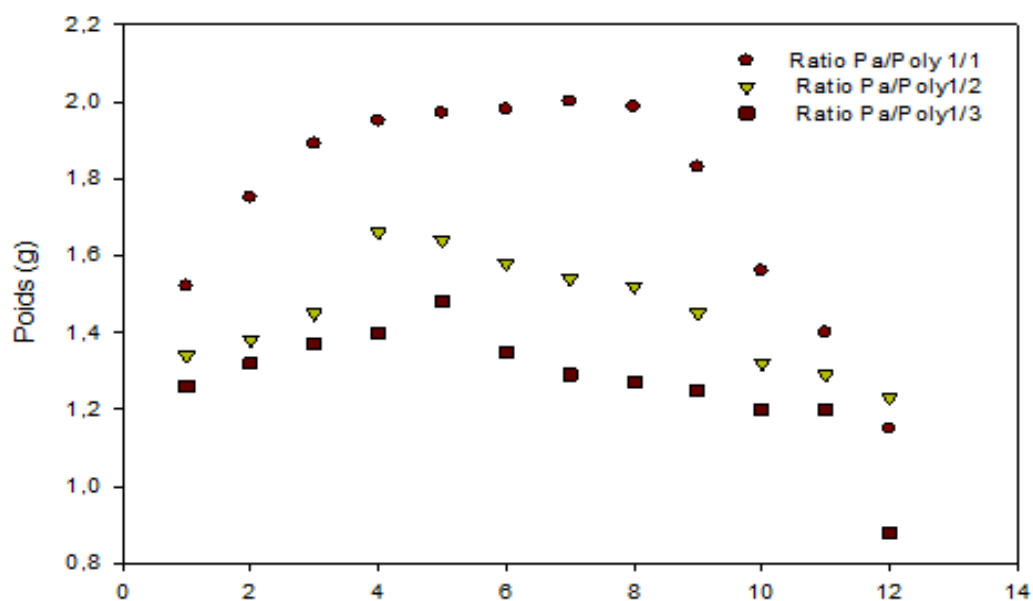


Figure V.3 : Cinétique de gonflement et d'érosion des microcapsules proportion Alg :gél 80/20

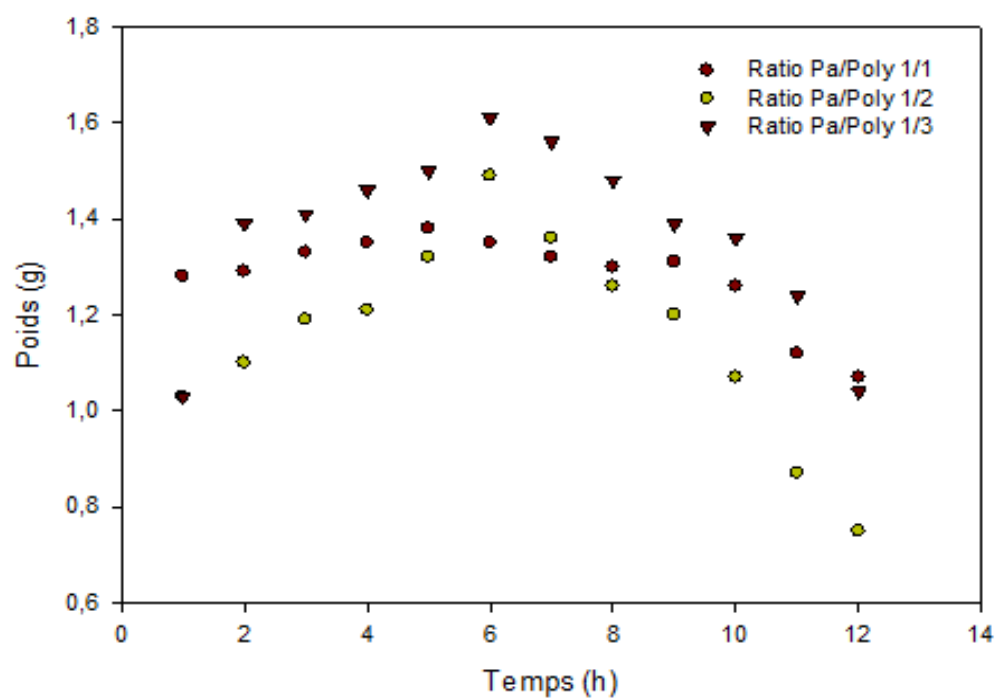


Figure V.4 : Cinétique de gonflement et d'érosion des microcapsules proportion Alg :gél 80/20

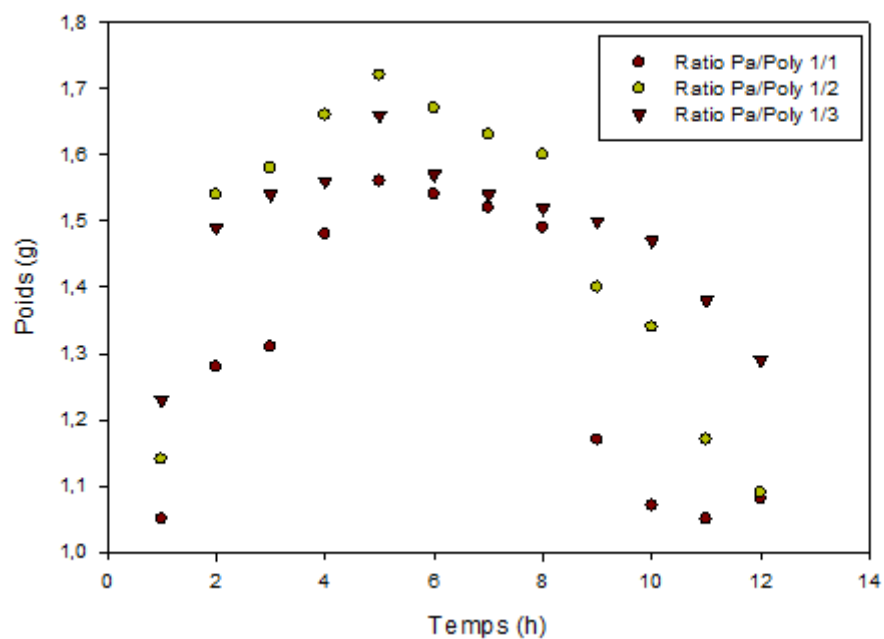


Figure V.5 : Cinétique de gonflement et d'érosion des microcapsules proportion Alg :gél 60/40

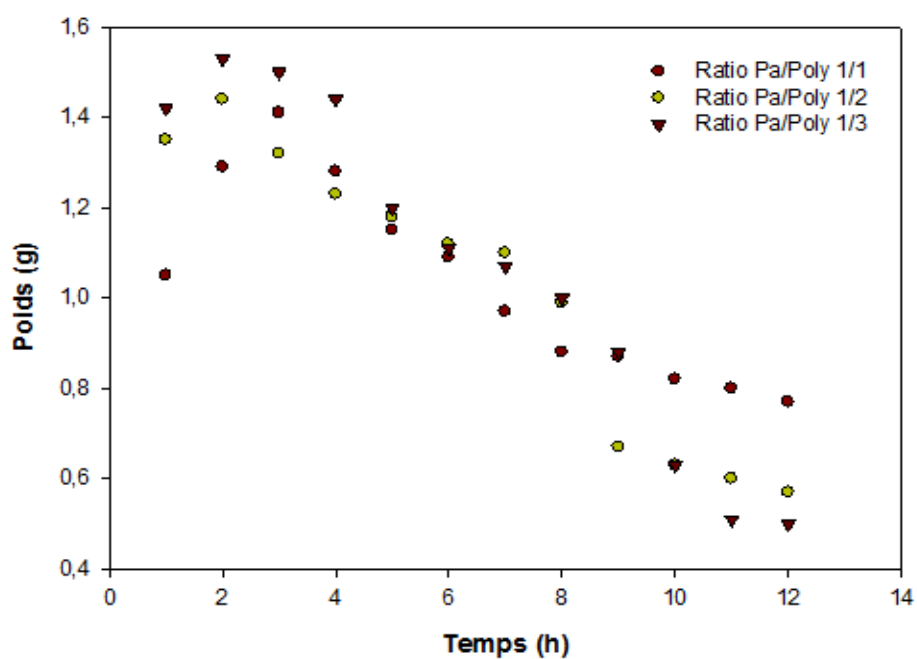


Figure V.6 : Cinétique de gonflement et d'érosion des microcapsules proportion Alg :gél 50/50

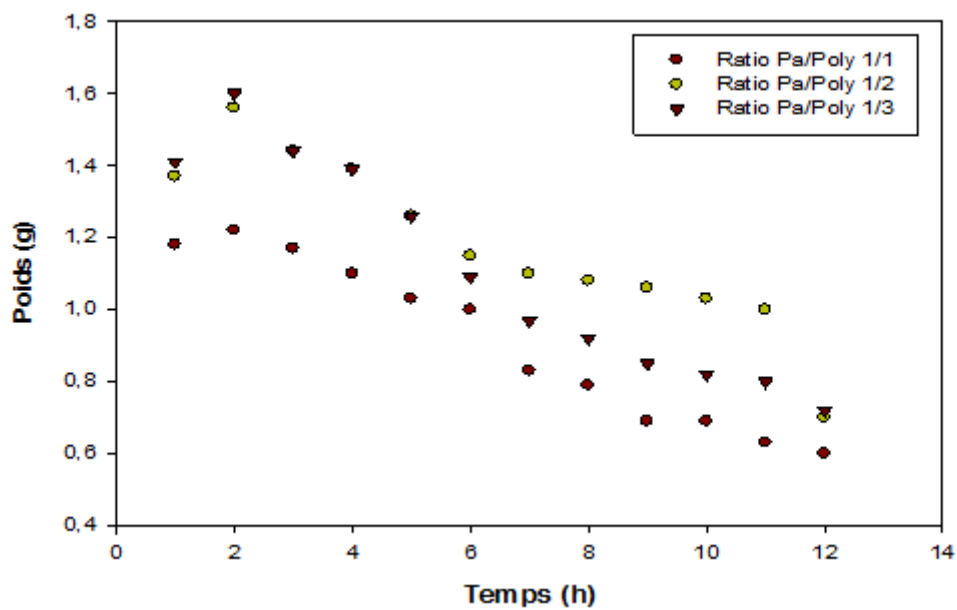


Figure V.7 : Cinétique de gonflement et d'érosion des microcapsules proportion Alg :gél 40/60

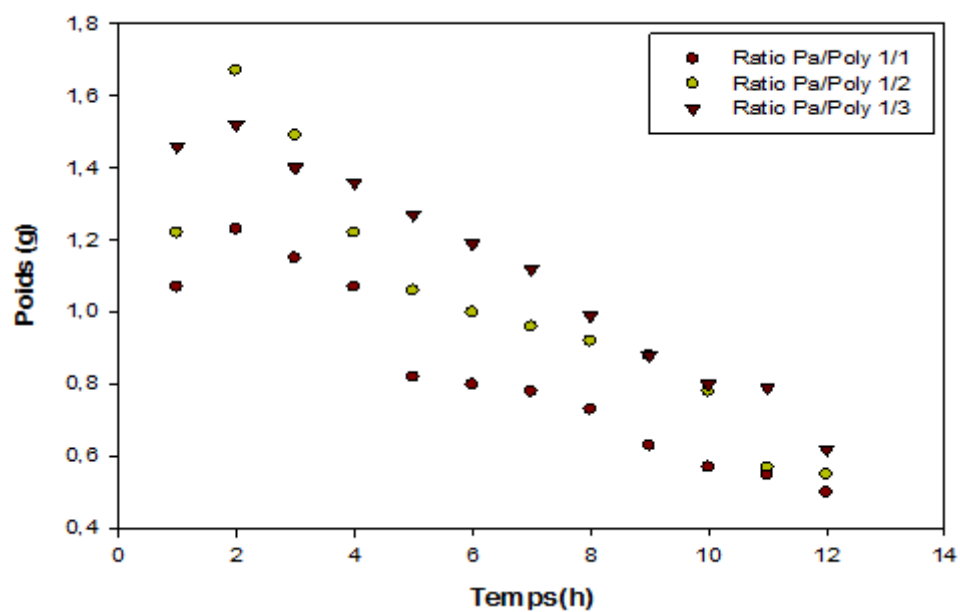


Figure V.8 : Cinétique de gonflement et d'érosion des microcapsules proportion Alg :gél 30/70

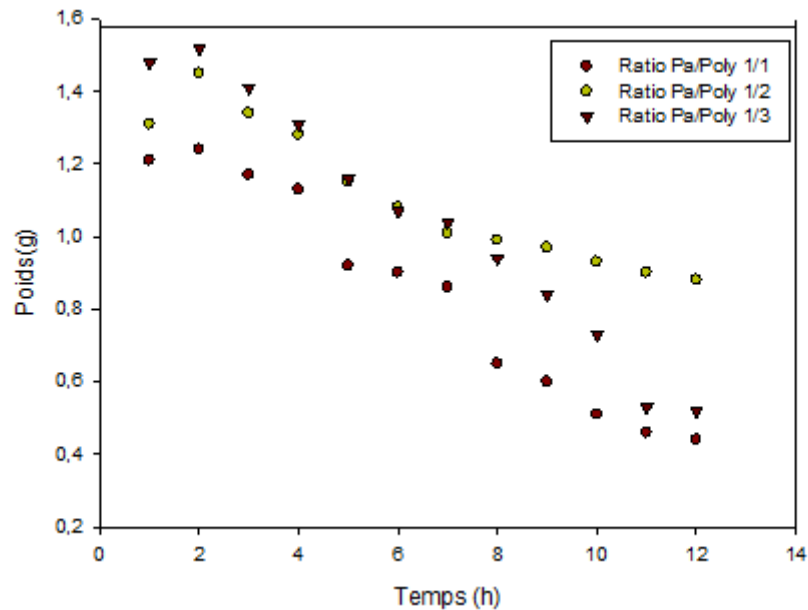


Figure V.9 : Cinétique de gonflement et d'érosion des microcapsules proportion Alg :gél 20/80

Au regard des résultats donnant l'évolution du poids des microcapsules dans le temps, on remarque que ce dernier augmente jusqu'à atteindre l'équilibre, puis on enregistre une certaine stabilité dans le poids, puis une régression du poids moyen.

À partir de ces figures on voit clairement deux groupes d'essai :

- Le premier groupe d'essai qui atteint un gonflement maximal au bout de 4 à 6 heures de temps et ce pour les ratios Alginate /Gélatine allant de 80/20 à 50/50
- Le deuxième groupe d'essai qui atteint un gonflement maximal au bout de 2 heures seulement.

Ceci nous laisse penser que plus l'alginate est en forte proportion dans la matrice plus le gonflement et l'érosion seront prolongés dans le temps.

Cette augmentation du poids des microcapsules correspond au phénomène de gonflement des microcapsules qui se traduit par un étalement des chaînes macromoléculaires constituant le réseau des matrices polymériques par adsorption des molécules d'eau, ce qui va conduire à l'ouverture des pores. Quant à la deuxième partie du graphe qui correspond à la partie descendante de l'évolution du poids celle-ci représente le phénomène d'érosion due à l'hydrolyse partielle des chaînes macromoléculaire constituant le réseau matriciel des microcapsules.

V.I.6 Résultats de la caractérisation par spectroscopie à infrarouge

Les tableaux VII, VIII, IX, montrent les fréquences enregistrées des spectres IR et les groupements fonctionnels des polymères et du principe actif.

Les figures V.10, V.11, V.12 donnent les spectres IR des matières premières utilisées (Alginate de sodium, gélatine et principe actif) et la figure V.13 montre le spectre IR des microparticules obtenues.

- **L'alginate de sodium**

A l'issue du spectre caractéristique (figure V.10) de l'alginate de sodium, on peut visualiser une large bande à 3436 cm^{-1} correspondant à l'élongation du groupement O-H et celle à 2163 cm^{-1} peut être attribuée à l'élongation du groupement C-H. Une autre bande caractéristique apparaît à 1623 cm^{-1} et elle est attribuée à l'élongation asymétrique du groupement carboxylate O-C-O confirmant la haute teneur en acide uronique du polysaccharide. L'absorption à 1406 cm^{-1} peut être due à la vibration de flexion C-OH avec la contribution de l'étirement symétrique du groupement carboxylate O-CO. La bande à 1058 cm^{-1} peut être également due à la vibration C-O.

Tableau VII: Fréquences des principales bandes IR caractéristiques de l'alginate de sodium

Fréquence cm^{-1}	Attribution des groupements fonctionnels
3436,91	-OH
2163,98	-C-H
1610 - 1406	-COO
1058	-CO

- **La gélatine**

La figure (V.11) illustre le spectre infrarouge de la gélatine native qui montre plusieurs bandes caractéristiques. La première région correspond aux vibrations de valence des OH et des NH qui apparaissent respectivement aux alentours de 3435 et 3326 cm^{-1} . La région qui s'étend entre ($3600\text{-}2300\text{ cm}^{-1}$) est l'amide A correspondant à l'élongation -NH couplée avec la liaison hydrogène.

Selon **(Centeno et al., (2004) [200]** il existe deux zones bien spécifiques : la première à environ 1655 cm⁻¹, représente le carbonyle C=O de l'amide primaire (l'amide I). la deuxième à 1554 cm⁻¹ de l'amide II correspond à l'élongation C-N et sa déformation dans le plan. D'autre part le pic à 1240 cm⁻¹ correspond à l'amide III qui est attribuée aux vibrations des groupements C-N et N-H de l'amide liée ou bien aux vibrations des groupements CH₂ de la glycine.

Tableau VIII. Fréquences des principales bandes IR caractéristiques de la gélatine

Fréquence cm ⁻¹	Attribution des groupements fonctionnels
3456,91 - 3477- 3554	Elongation –NH
1655	Elongation C=O
1554	Elongation C-N de l'amide

- **L'Acébutolol**

Les bandes caractéristiques de l'Acébutolol matière premières sont représenté dans la figure **(FigureV.12)**

Tableau IX : Fréquences des principales bandes IR caractéristiques de l'Acébutolol

Fréquence cm ⁻¹	Attribution des groupements fonctionnels
3284 cm ⁻¹	Elongation de O-H d'alcool secondaire, forte et large qui masque les vibrations de valence des liaisons N-H de l'amide et de l'amine secondaires
2960 cm ⁻¹	Elongation antisymétrique de CH ₃
1658	Elongation du C=O de la fonction cétone
1600-1450 cm ⁻¹	élongation de C=C aromatique, fortes et moyennes.

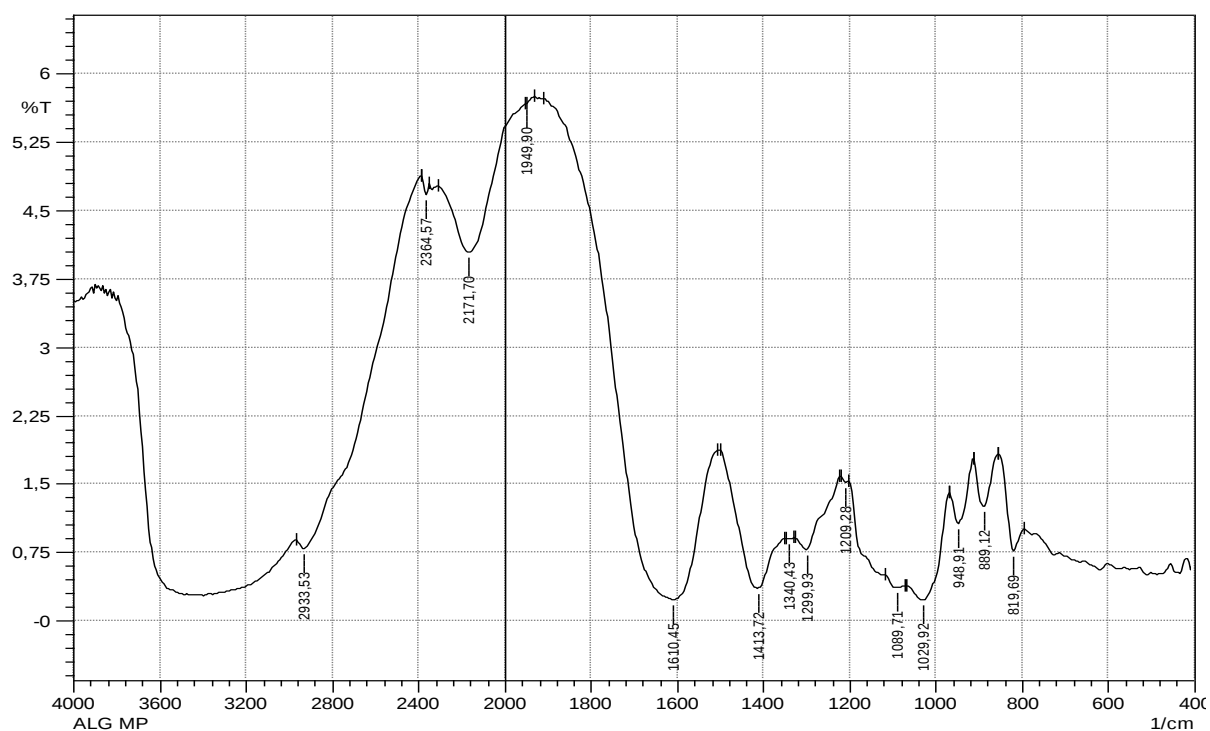


Figure V.10 : Spectre infrarouge de l'alginate de sodium matière première

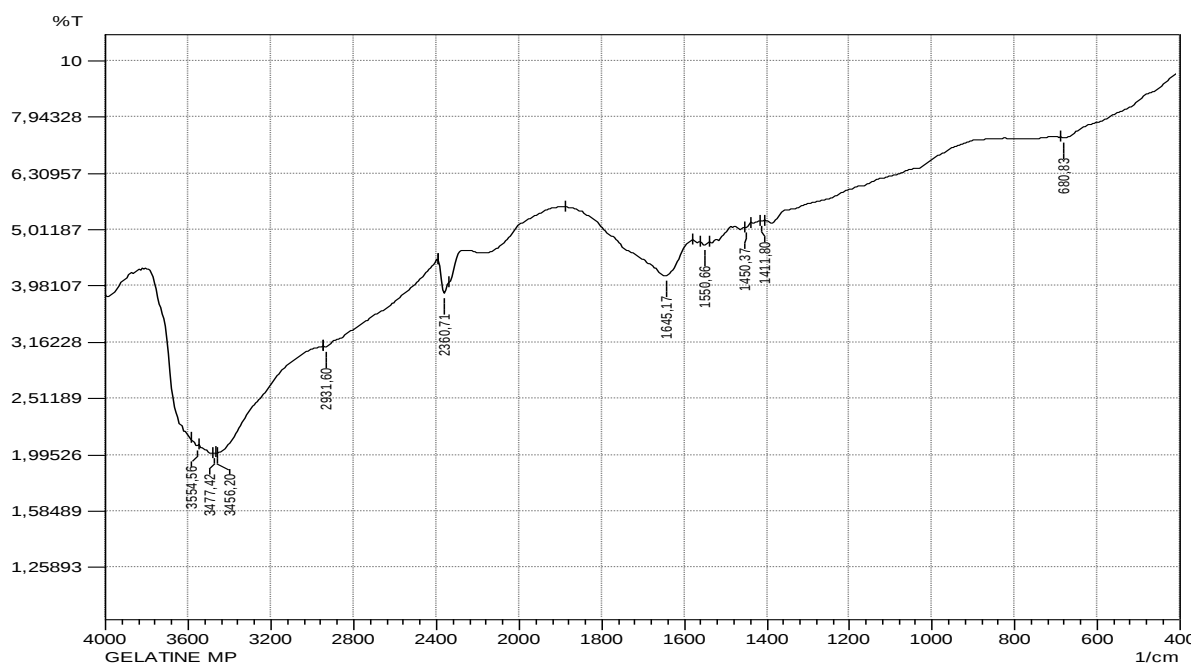


Figure V.11 : Spectre infrarouge de la gélatine matière première

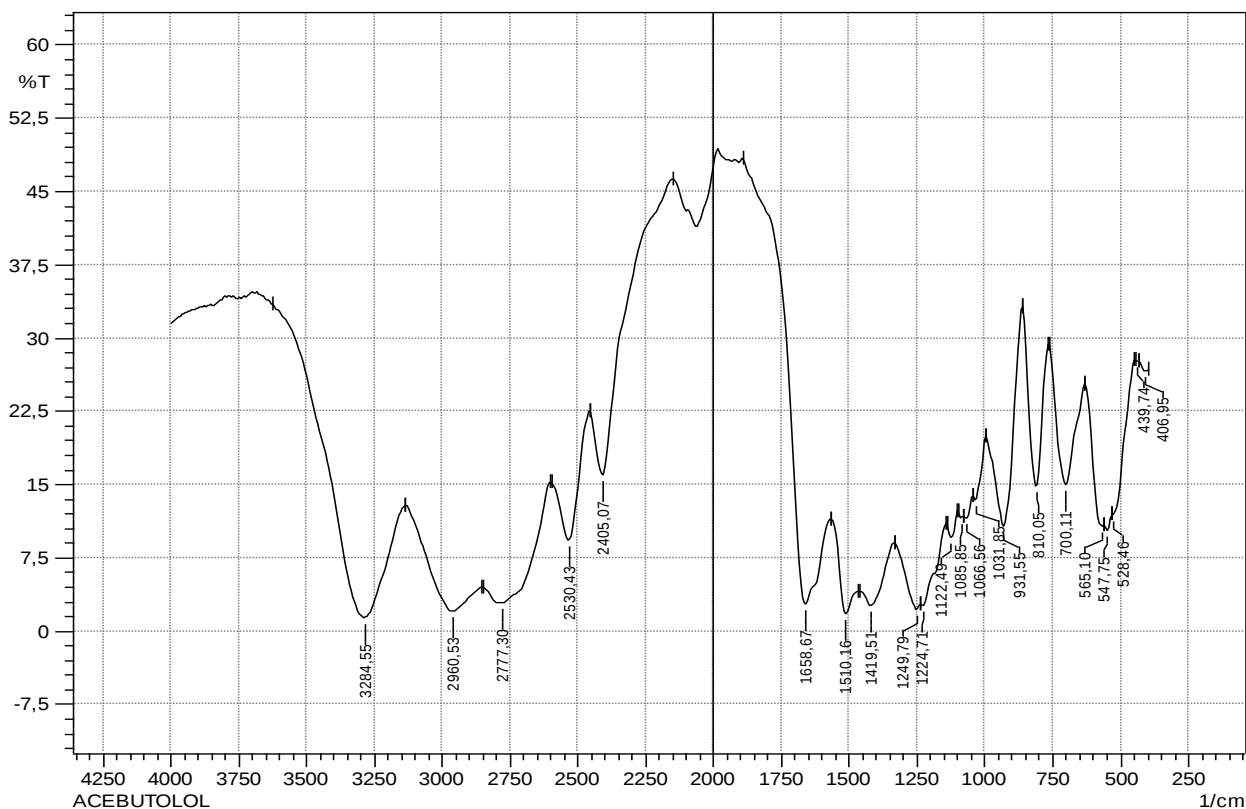


Figure V.12 : Spectre infrarouge du principe actif Acébutolol matière première

- **Spectre caractéristique du complexe ionotropique**

La réticulation de l'alginate de sodium par les ions calcium a entraîné un déplacement du nombre d'onde du pic du groupement carbonyle de 1610 cm^{-1} à 1618 et 1606 cm^{-1} , témoignant l'apparition de la liaison entre le groupement COO^- avec les ions calcium. Ce déplacement du nombre d'onde du groupement carboxyle est lié à la présence de nouvelles liaisons électrostatiques avec les ions calcium [201].

Quant au PA les pics majeurs de l'Acébutolol sont restés intacts ce qui explique d'une part la présence du principe actif dans les formulations et l'absence d'interactions avec les polymères d'autre part.

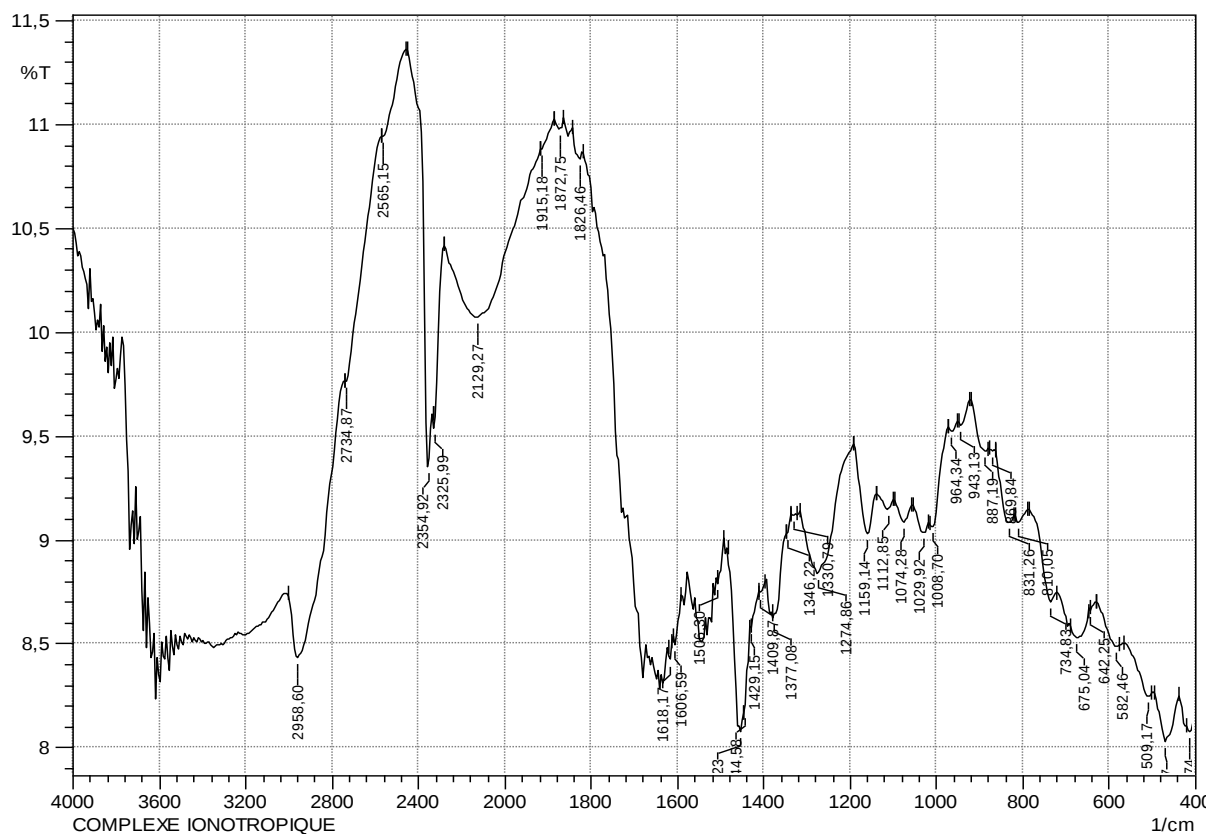


Figure V.13 : Spectre infrarouge des microcapsules obtenues par gélification ionotrope d'un essai type

V.1.8. Résultats de l'étude de la cinétique de dissolution

Afin de déterminer la vitesse de libération de l'Acébutolol à partir des microcapsules formulées, nous avons étudié la cinétique de dissolution en milieu physiologique simulé intestinal (tampon phosphate à pH 6,8) pendant 8 heures.

La quantité de principe actif libérée est dosée selon une méthode de spectroscopie UV-Visible validée présentée dans le chapitre (matériels et méthodes).

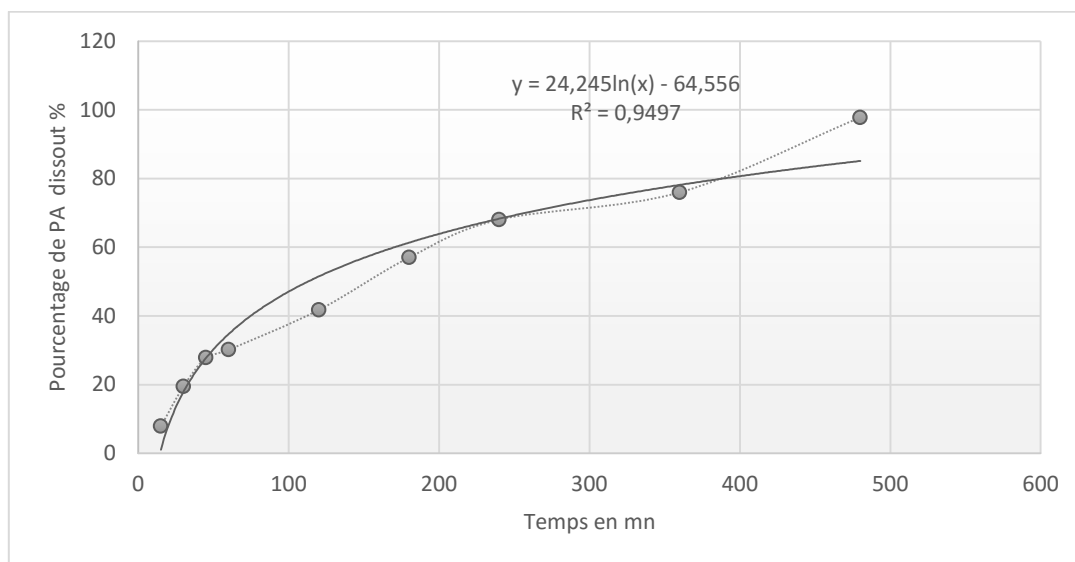
V.1.6.1 Résultats des profils de dissolution :

Les résultats exprimant le pourcentage de principe actif dissout en fonction du temps sont représentés dans le tableau X.

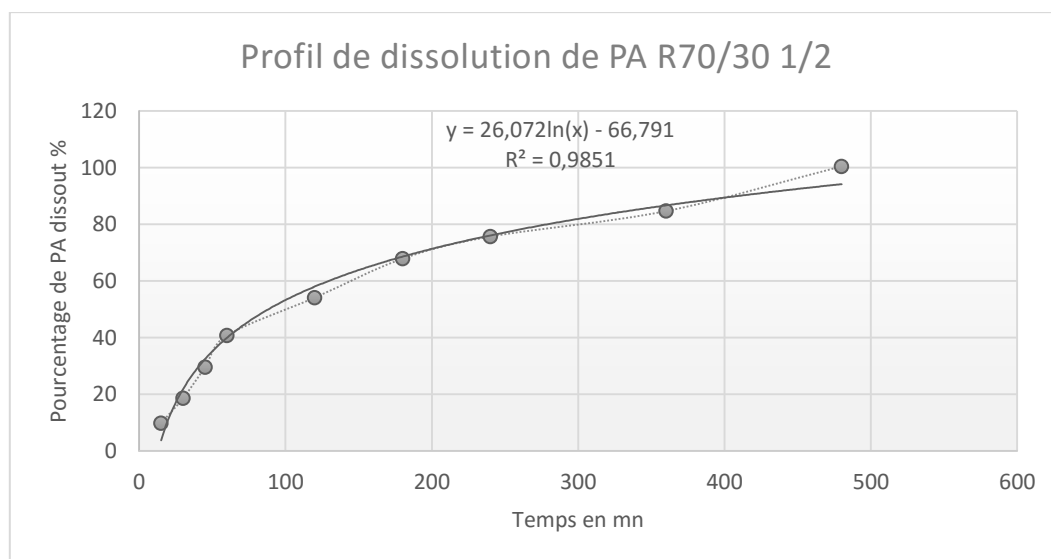
Tableau X : Résultats des cinétiques de dissolution des essais

Ratio ALG/GEL	Ratio PA/Poly	Pourcentage de dissolution en fonction du temps								
		15mn	30mn	45 mn	1H	2H	3H	4H	6H	8H
20/80	1/1	5.41	19.44	27.83	37,56	48,62	60,21	72,72	89.96	98,10
	½	7.99	22.86	31.07	41,88	52,41	68,80	83.14	93,29	99,08
	1/3	10.56	19.78	36.93	46,84	57,30	63,29	76.24	89,85	101,79
30/70	1/1	10.03	21.06	27.88	36,46	47,39	56,52	67,28	81.66	100,66
	½	9.54	15.89	29.21	53 ,46	65,67	75,45	81,4	91.08	100.04
	1/3	8.67	19.34	31.81	55,33	66,64	77,17	87,17	97.09	107,88
40/60	1/1	4.89	7.78	20.67	34,04	44,70	57,40	70,30	80.21	96,59
	½	5.43	10.03	23.89	59,81	67,53	76,68	86,33	93.43	100
	1/3	7.78	16.45	28.11	41,35	56,28	91,04	95,40	100.54	100.13
50/50	1/1	8.10	15.89	21.06	34,59	54,13	63,16	70.89	82.33	98.50
	½	9.55	19.43	28.01	35,71	59,81	71,04	85,4	93.78	70,031
	1/3	11.76	20.78	31.56	48,72	52,74	67.75	78.39	84.67	96,99
60/40	1/1	4.80	7.56	9.56	23 ,69	35,71	48,00	55,40	68.80	89.56
	½	3.89	6.90	10.67	29,24	30,60	50,78	60.78	79.06	104,16
	1/3	6.98	8.01	16.89	28,05	32,32	51,17	67,23	81.05	101.06
70/30	1/1	7.87	19.44	27.89	30,16	41,75	56,99	68,05	75.98	97,78
	½	9.87	18.67	29.55	40,82	54,13	67,87	75,67	84.66	100.44
	1/3	11.90	20.67	29.65	37,56	46,56	60,87	72,97	85.34	104.8
80/20	1/1	5.78	11.45	22.06	38,13	47,93	56,33	60.31	76.11	97,78
	½	10.80	17.44	29.53	40,16	51,75	63,11	70,91	85.31	100
	1/3	9.87	18.33	34.87	48,00	53,51	64,87	76,46	83.51	97,78
100	1/1	7.77	25.77	30.12	46,21	55,92	67,19	77,52	80.21	98,05
	½	4.80	26.88	37.03	50,69	64,17	74,57	80,90	90.70	103.09
	1/3	9.30	19.06	32.09	48,49	56,11	63,55	70,35	79.09	87,74

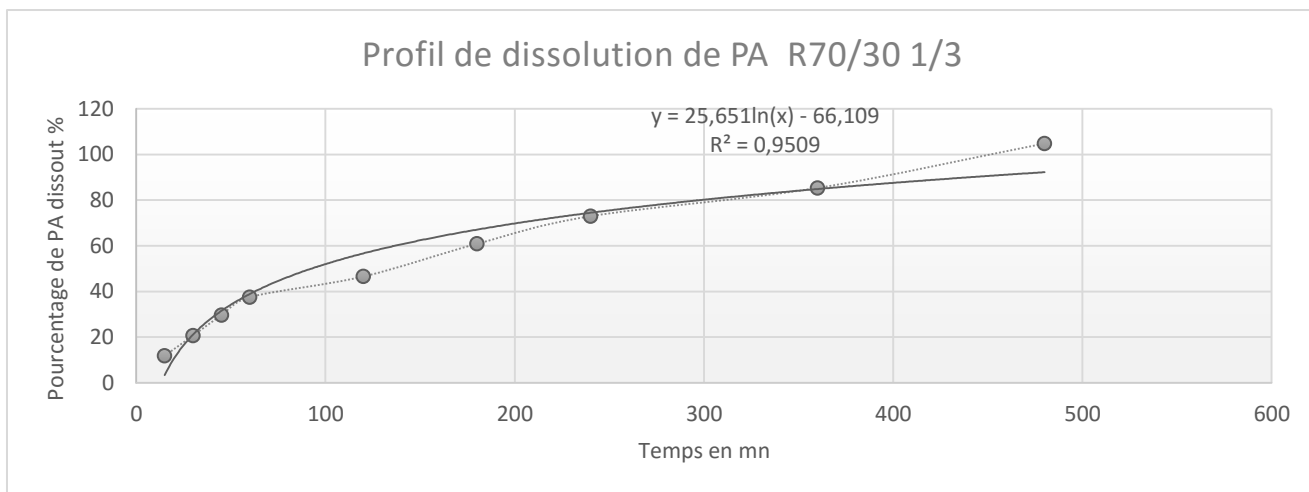
Les profils de dissolution obtenus d'essais type (ratio Alg /Gél :70/30) (figure V.14, figureV.15 et figure V.16) et (ratio Alg /Gél : 30/70) (figure V.17, figureV.18 et figure V.19) et à différents ratios de PA, en milieu tampon phosphate à pH 6.8 , sont représentés ci-après :



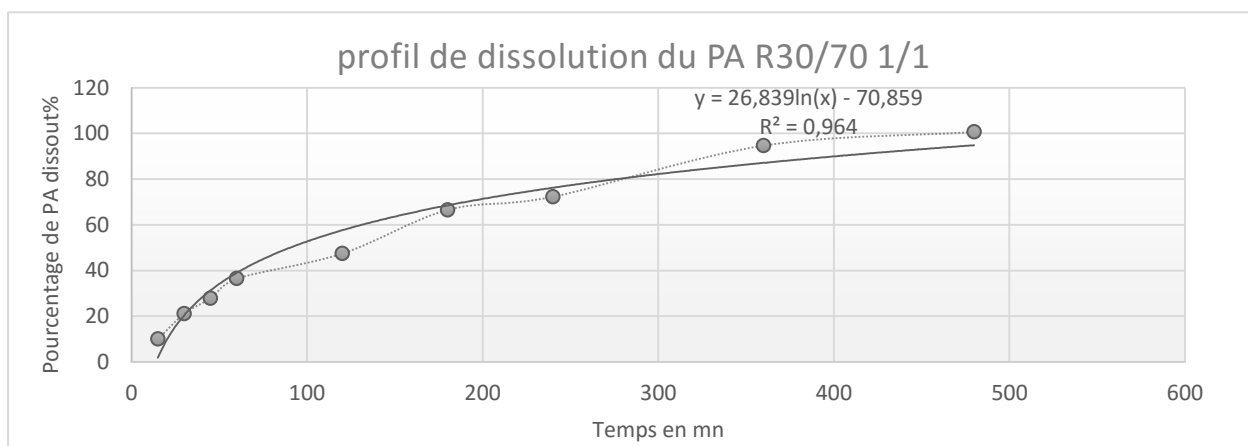
FigureV.14 : Profil de dissolution d'un essai type (Ratio Alg / gél 70/30, PA/Poly : 1/1)



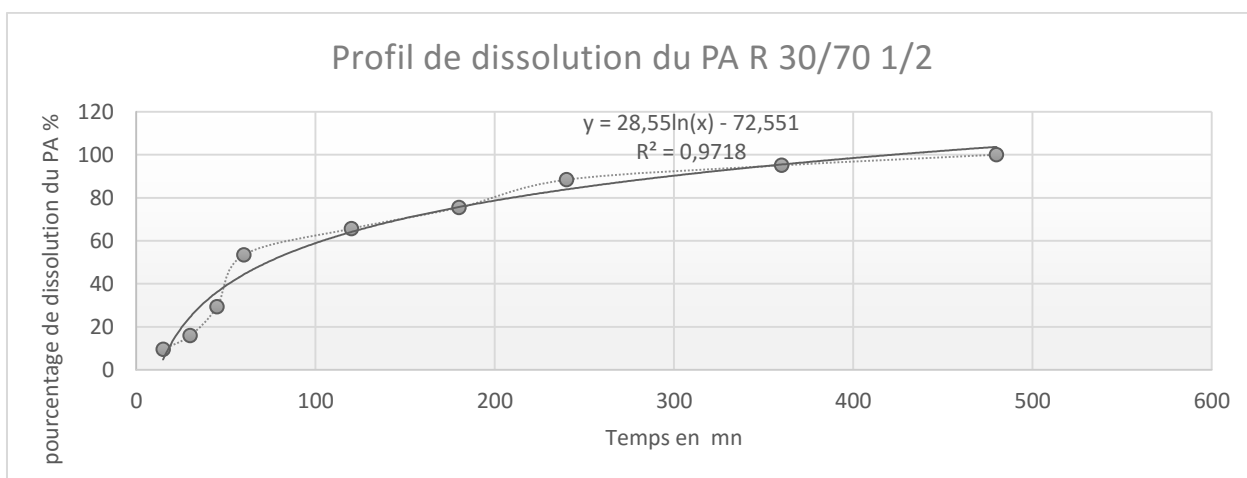
FigureV.15 : Profil de dissolution d'un essai type (Ratio Alg : gél 70/30 , PA/Poly :1/2)



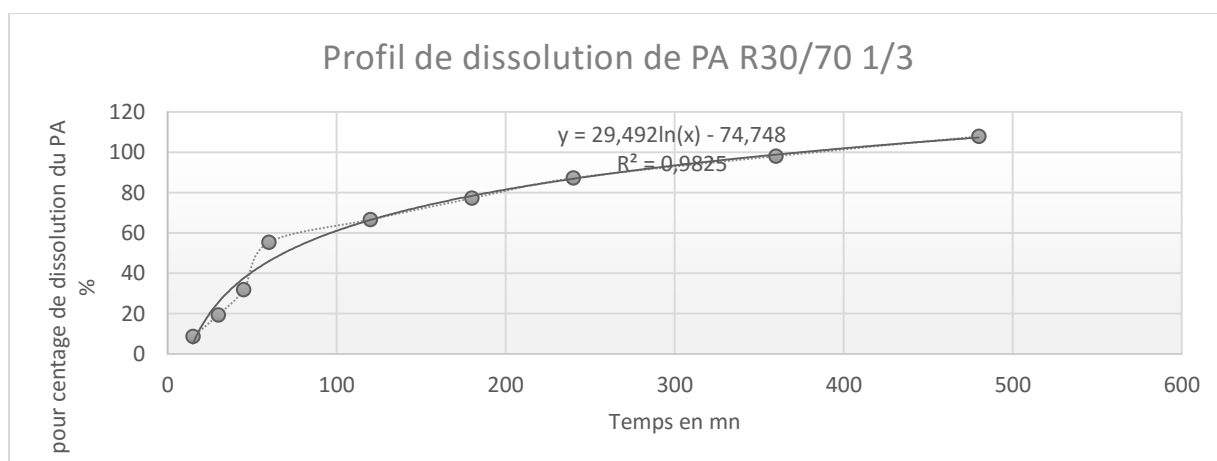
FigureV.16 : Profil de dissolution d'un essai type (Ratio Alg : géla70/30, PA/Poly :1/3)



FigureV.17 : Profil de dissolution d'un essai type (Ratio Alg : géla30/70, PA/Poly :1/1)



igureV.18 : Profil de dissolution d'un essai type (Ratio Alg : géla30/70 , PA/Poly :1/2)



FigureV.19 : Profil de dissolution d'un essai type (Ratio Alg : géla30/70 , PA/Poly :1/3)

A l'issue des profils de dissolution obtenus pour ce groupe d'essai, il apparaît clairement que le pourcentage de principe actif libéré évolue sur une échelle de temps prolongée dépassant les 2 heures ce qui traduit l'appartenance de ces formulations au formes à libération prolongée.

Les profils de dissolution obtenus des essais formulés démontrent pour l'ensemble des essais une première libération instantanée de l'ordre de 30 à 40% dans la première heure puis une libération prolongée jusqu'à l'atteinte d'un taux de 80% entre 4 et 6heures.

Ce profil de dissolution semble être relié à la cinétique de gonflement et d'érosion des microcapsules qui enregistre un taux maximal de gonflement aux alentours de 4 heures ce qui laisse supposer que nous sommes face à un mécanisme de dissolution relié à la diffusion suite à un gonflement des chaines macromoléculaires constituant les biopolymères : la gélatine et l'alginate de sodium.

Aussi, nous remarquons que le ratio polymérique alginate/ gélatine exerce une influence sur le prolongement de la libération du principe actif, plus ce ratio est grand, donc présence de l'alginate en forte proportion, plus la libération est ralentie. Par exemple pour le ratio Alg /Gél de 70/30, 80% de PA sont libérés entre 6 et 8 heures (figure V.14, V.15 et V.16). Alors que pour le ratio inverse c'est-à-dire le ratio Alg /Gél 30/70, ce même taux est atteint plutôt entre 4 et 6 heures. Ceci dit que cette influence n'est pas considérable, puisque nous enregistrons un effet de prolongation de la libération de principe actif qui ne dépasse pas une heure entre ces essais.

D'autre part le ratio du principe actif par rapport au polymère ne semble pas modifier de façon significative, le profil de dissolution du principe actif (figure V.19). Ceci pourrait s'expliquer d'une part par l'absence d'interaction entre le PA et les polymères constituant la matrice à savoir l'alginate et la gélatine, qui pourrait retenir le PA plus longtemps dans la matrice et aussi à la grande solubilité du principe actif d'autre part.

En termes d'allure de libération, nous remarquons une libération instantanée de la première heure traduisant un **burst-effet** relié probablement à la diffusion rapide du principe actif se trouvant au proche voisinage de la surface externe de la matrice.

Ce que nous pouvons conclure à partir des profils de dissolution de ce type de matrice, que les deux bio polymères (alginate et gélatine) n'interagissent pas entre eux dans ces conditions expérimentales et que la libération est plutôt commandée par la quantité d'alginate présente dans la matrice et donc la présence de gélatine ne présente aucun effet supplémentaire sur le retardement de la libération du PA. Pour ce groupe de formulation l'agent responsable de la complexation avec l'ions calcium est l'alginate de sodium par un mécanisme de de gélification ionotropique externe par les ions calcium qui diffuseront progressivement à l'intérieur de la matrice pour former une matrice gélifiée. [202-204], (Figure V.20)

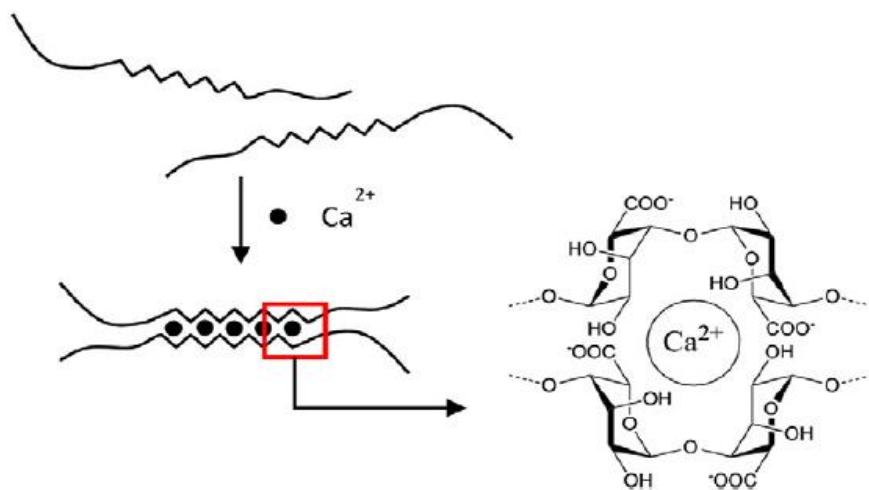


Figure V.20 : Formation d'un gel d'alginate par les cations calcium formant un gel en boîte à œuf « egg –box » [202]

Les résultats de Yellanki Shiva Kumar [205] pour des matrices à base d'alginate et gélatine par le procédé de gélification ionique par les ions calcium ont obtenus des profils de libération de type prolongé allant à 8H pour un taux de PA libéré de 80%

D'autres travaux B. Bindu Madhavi et al [206] sur la Venlafaxine ont obtenus des taux de dissolution de l'ordre de 80% de principe actif, au bout de 9 heures.

V.1.6.2 Ajustement mathématique des profils expérimentaux de dissolution :

Les résultats obtenus dans les essais de dissolution des formes pharmaceutiques sont souvent représentés sous forme de courbes où la fraction cumulée de principe actif dissoute ou libéré (Q_t / Q_0 , %) est exprimée en fonction du temps (t). L'application des modèles mathématiques facilite l'interprétation quantitative de ces résultats et la compréhension des mécanismes de libération du PA à partir de la forme pharmaceutique. Il existe plusieurs modèles théoriques et empiriques décrivant le profil de dissolution. Dans la plupart des cas, le processus de dissolution du PA est la résultante de plusieurs phénomènes (diffusion, gonflement, érosion)

Afin d'élucider les mécanismes contrôlant la libération du principe actif à partir de la matrice alginate/gélatine complexée par les ions calcium, nous avons procédé à l'ajustement mathématique des profils par des modèles sélectionnés à partir de la bibliographie. Plusieurs modèles ont été étudiés, le coefficient de détermination R^2 pour un essai type 1, a été représenté dans le tableau (Tableau XI).

Tableau XI: Résultat de l'Ajustement mathématique par des modèles de dissolution

Modèles	Ecriture des modèles	Paramètres caractéristiques	Moyenne des Coefficient de détermination R^2
Modèle de cinétique d'ordre zéro	$Q_t = Q_0 + k_0 t$	K_0 : constante de vitesse	0,70
Modèle de cinétique d'ordre un	$\ln Q_t = \ln Q_0 + K_1 t$ $Q(\%) = 1 - e^{-K t}$	K_1 : constante de vitesse	0,75
Modèle de Higuchi	$Q_t = K_h \sqrt{t}$	K_h : constante de vitesse de Higuchi	0,73
Modèle de Weibull	$Q_t = Q_0 \left(1 - \exp^{-\frac{(t-T)^\beta}{\alpha}} \right)$	α : facteur de temps β : paramètre de forme	0,998

Q_t : quantité cumulée en pourcentage de PA libéré

Q_0 : la masse de PA dans le véhicule au temps t zéro

Q_∞ : la quantité du PA au temps t infini

t : temps

Les courbes des profils de dissolution modélisés par les modèles ci-dessus pour un essai type 1 moyennant le logiciel (STATISTICA .8) et selon une estimation non linéaire, sont représentées dans les figures (Figure V.21, Figure : V.22 Figure : V.23)

A ce titre le modèle **d'ordre zéro** représente une vitesse de dissolution constante dans le temps. Ce phénomène est rencontré pour de nombreuses formes à libération prolongée où la quantité libérée en fonction du temps reste constante. Ce modèle est souvent adapté pour des formes transdermiques ou osmotiques, des systèmes matriciels avec un principe actif peu soluble. Elle représente une cinétique idéale pour atteindre une action thérapeutique prolongée et sans fluctuation dans le temps. [207,197, 208]

Pour le **modèle d'Ordre 1** : La fraction de dissolution est fonction du logarithme du temps, la vitesse de dissolution diminue en fonction du temps. Ce modèle est généralement observé avec une matrice poreuse pour un PA soluble dans l'eau. [207,197, 208]

Le modèle d'**Higuchi** est quant à lui connu, comme un modèle de diffusion. La dissolution suit la loi de Fick. La fraction de libération du PA évolue linéairement en fonction de la racine carrée du temps, ce phénomène est souvent rencontré pour les formes semi-solides et les matrices avec un PA soluble. [207,197, 208]

En ce qui concerne le modèle de **Weibull**, Il s'agit du modèle empirique 'historique' et le plus utilisé, probablement car il prend en compte le temps de latence souvent observé en début de dissolution. Ce modèle, ayant un paramètre d'échelle du temps et un paramètre de forme, est adapté pour presque tous les types de profils. [207,197,208]

A l'issue des modélisations mathématiques réalisées sur les essais, on constate que le meilleur coefficient de détermination (R^2) est obtenu pour le modèle de Weibull ($R^2 \approx 1$) et ce pour l'ensemble des essais, alors que ceux des modèles d'ordre zéro, un et celui d'Higuchi ne traduisent pas le mécanisme de libération du PA à travers les microcapsules obtenues et ce en raison du coefficient de détermination faible ($R < 0,8$).

En effet pour le modèle d'ordre zéro le coefficient de corrélation obtenu est de **0,71** ne semble pas représenter l'allure de libération puisque, ce modèle décrit les systèmes dont la vitesse de libération doit rester constante pendant toute la durée de libération jusqu'à épuisement totale du PA de son système.

D'autre part le modèle d'ordre un où la vitesse doit augmenter de façon exponentielle en fonction du temps les paramètres d'évaluation statistiques sont faibles avec un coefficient de détermination de **0,65**.

En ce qui concerne le modèle d'Higuchi , qui enregistre lui aussi un coefficient de détermination très faible (**0, 23**) , prévoit une libération linéaire de PA en fonction de la racine carrée du temps, particulièrement observée dans les systèmes réservoirs à gradient de concentration constant[207,197,208]

En conclusion de cette modélisation il est clair que le modèle de Weibull s'intègre bien aux profils expérimentaux avec un coefficient de détermination proche de 1 (tableau V.12) .Ce modèle dont l'écriture est :

$$Qt = Q_{\infty}(1 - \exp^{-\frac{(t-T)^{\beta}}{\alpha}})$$

Pour ce modèle Q_{∞} représente le pourcentage maximal de PA dissout pour un temps théorique infini. Le paramètre T représente le temps de latence avant le début du processus de dissolution, le paramètre α est un facteur caractéristique du temps du processus de libération du PA plus ce dernier diminue plus le profil est rapide, Le paramètre β est un paramètre qui renseigne sur la forme du profil de dissolution et aussi sur la valeur du pourcentage maximale libéré [209].

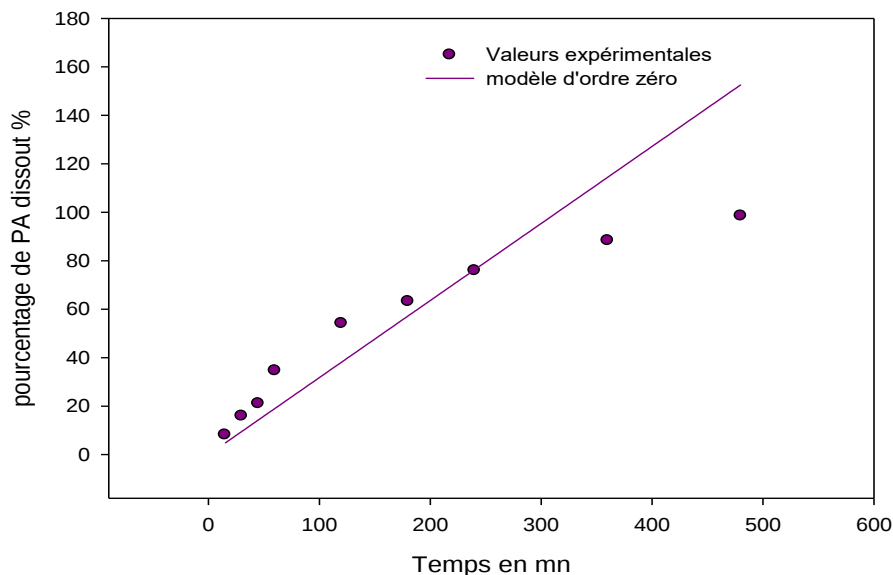


Figure V.21 : Cinétique de dissolution selon le modèle d'ordre zéro pour l'essai 1

Pofil de dissolution essai 1 modélisé par un modèle d'ordre 1

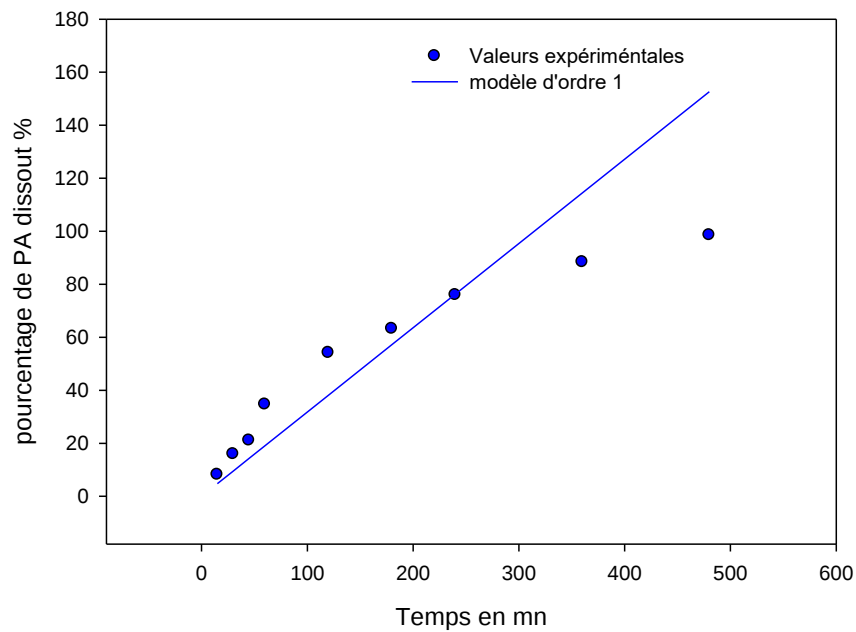


Figure V.22 : Cinétique de dissolution selon le modèle d'ordre 1 pour l'essai 1

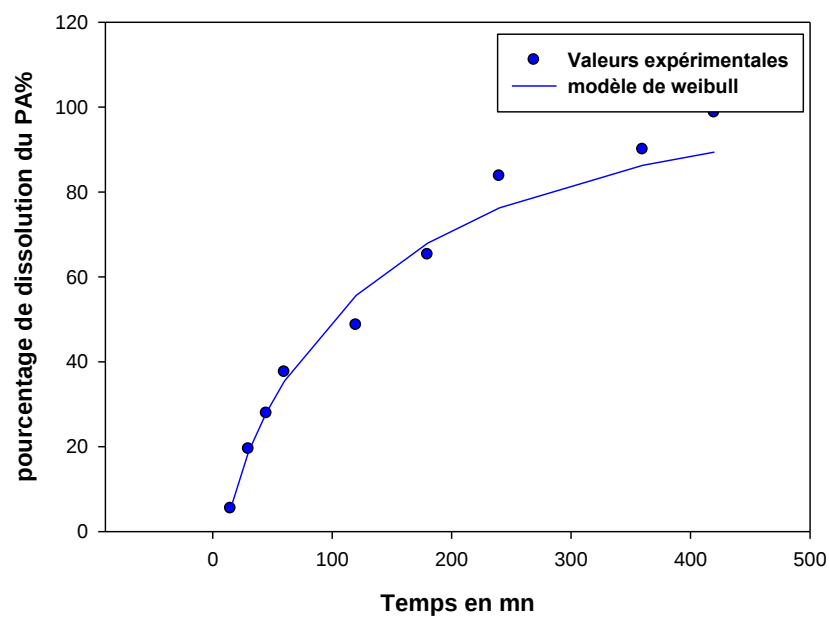


Figure V.23 : Cinétique de dissolution selon le modèle de Weibull pour l'essai 1

Tableau XII: Résultats des paramètres statistiques du modèle de Weibull

Ratio Alg /Gél Ratio PA/Pol	A (mn)	β	R^2	Ratio Alg /Gél	α (mn)	β	R^2
20/80 R1/1	64.38	0.76	0.999	60/40 R1/1	93.96	0.86	0.988
20/80 R1/2	66.39	0.74	0.978	60/40 R1/2	102.9	0.83	0.983
20/80 R1/3	61.36	0.86	0.980	60/40 R1/3	84.33	0.79	0.982
30/70 R1/1	63.69	0.82	0.998	70/30 R1/1	89.79	0.78	0.985
30/70 R1/2	59.32	0.81	0.987	70/30 R1/2	98.03	0.76	0.998
30/70 R1/3	60.10	0.92	0.98	70/30 R1/3	87.58	0.86	0.978
40/60 R1/1	63.81	0.84	0.988	80/20 R1/1	71.08	0.74	0.987
40/60 R1/2	56.78	0.68	0.979	80/20 R1/2	83.05	0.82	0.898
40/60 R1/3	49.97	0.55	0.988	80/20 R1/3	77.04	0.76	0.923
50/50 R1/1	79.54	0.79	0.998	100/0 R1/1	73.67	0.79	0.967
50/50 R1/1	72.23	0.89	0.998	100/0 R1/2	79.87	0.78	0.954
50/50 R1/1	65.83	0.76	0.987	100/0 R1/3	68.59	0.67	0.981

Ce tableau illustre les valeurs des paramètres du modèle de Weibull à savoir α et β ainsi que le coefficient de corrélation R^2 .

Au vue de ces valeurs on constate bien que le coefficient de détermination se rapproche de 1 et ce pour l'ensemble des essais.

Pour ce qui est du facteur α , on constate que celui-ci est d'autant plus important pour les ratios d'alginate de sodium dans la matrice sont élevés. Ce qui laisse conclure que la concentration d'alginate dans la matrice serait responsable de la libération prolongée du PA. Plus la valeur de ce facteur est importante plus la libération sera prolongée.

Le facteur β quant à lui donne une idée sur la forme de libération et le pourcentage de libération atteint. Celui-ci étant compris entre 0.5 et 1.

Nous représentons ci-après la cinétique de dissolution de quelques essais modélisés par le modèle de Weibull.

Profil de dissolution de PA R40/60 1/1 ajusté par le modèle de weibull

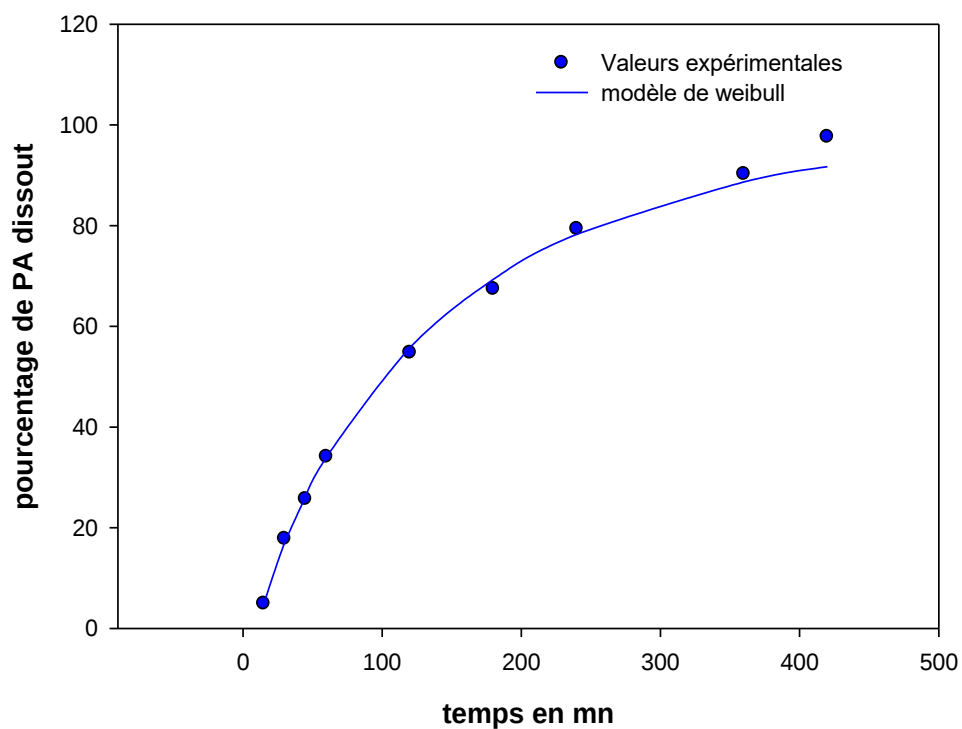


Figure V.24 : Cinétique de dissolution selon le modèle de Weibull pour l'essai R40/60 1/1

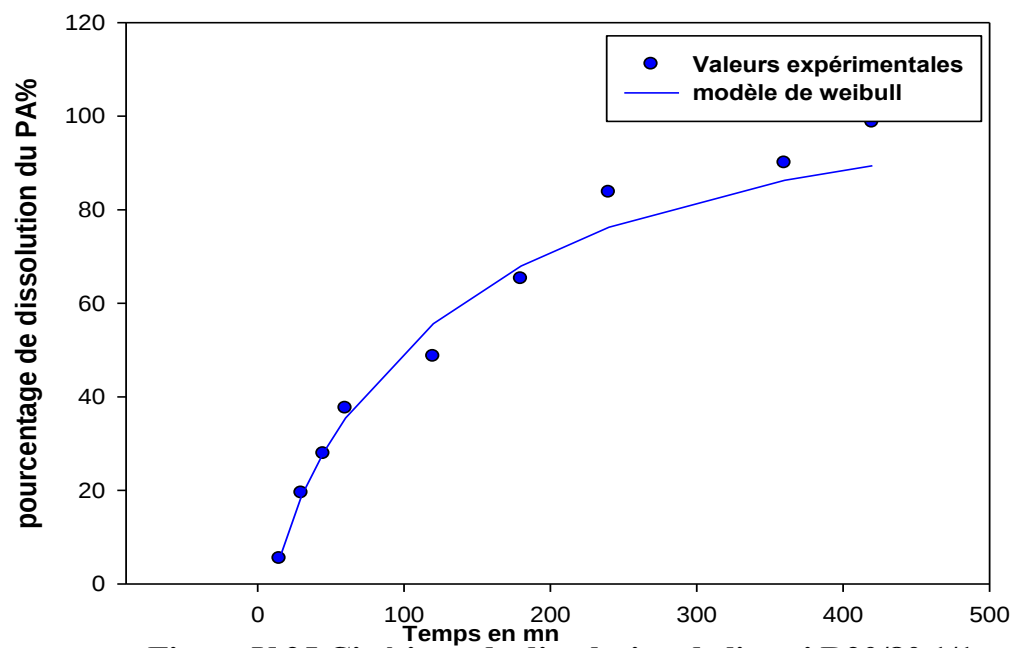


Figure V.25 Cinétique de dissolution de l'essai R20/80 1/1 ajusté par le modèle de Weibull

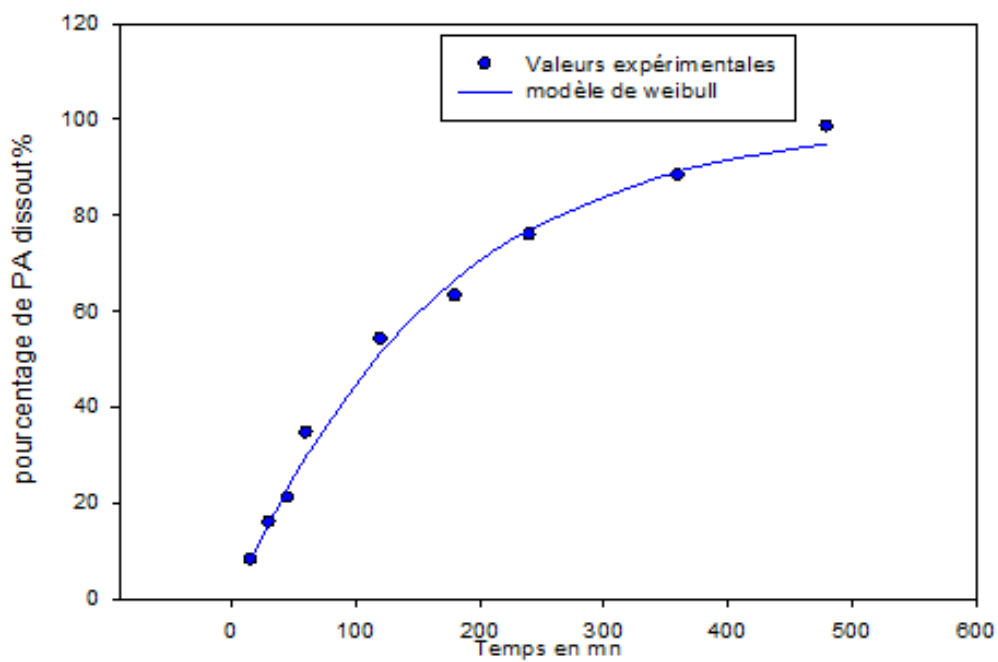


Figure V.26 : Cinétique de dissolution selon le modèle de Weibull pour l'essai R50/50 1/1

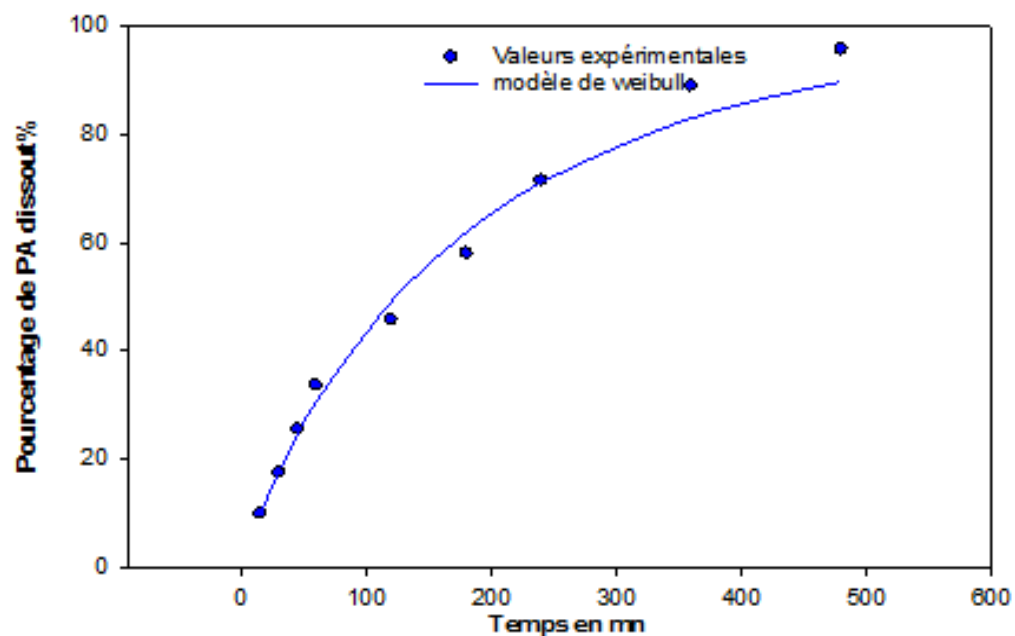


Figure V.27 : Cinétique de dissolution de l'essai R60/40 1/1 ajustée par le modèle de Weibull

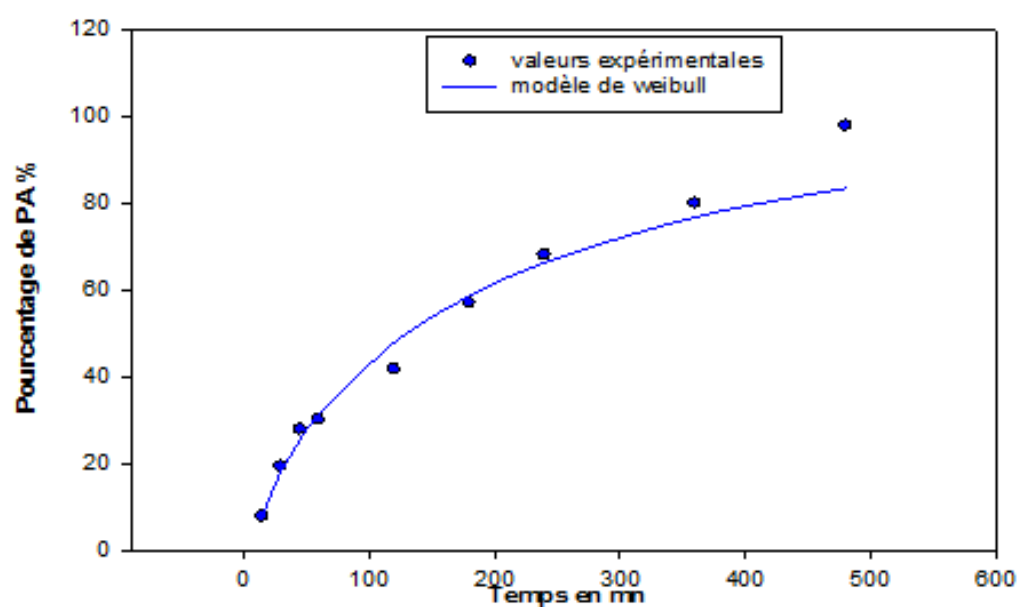


Figure V.28 : Cinétique de dissolution de l'essai R70/30 1/1 ajustée par le modèle de Weibull

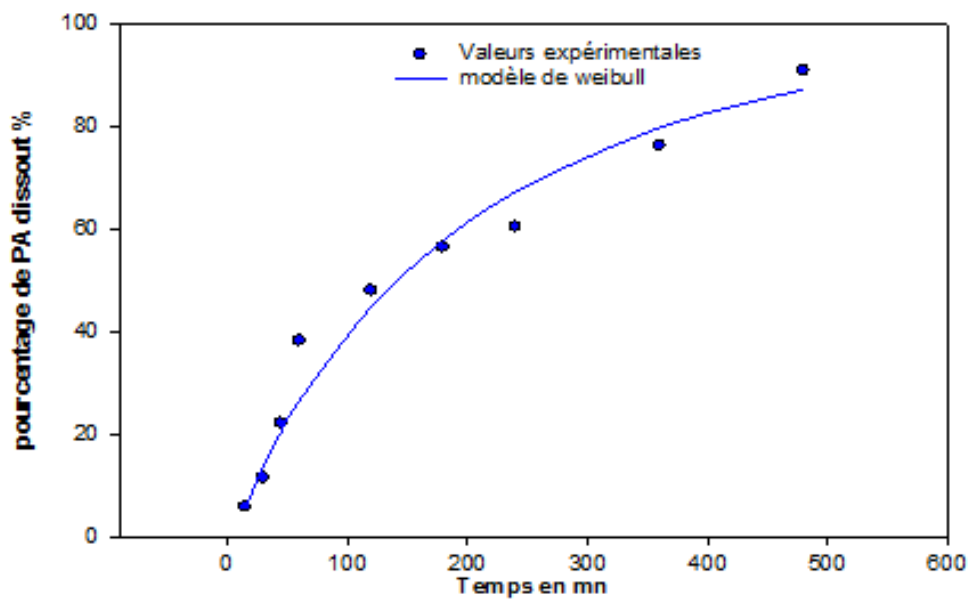


Figure V.29 : Cinétique de dissolusion de l'essai 80/20 1/1 ajusté par le modèle de Weibull

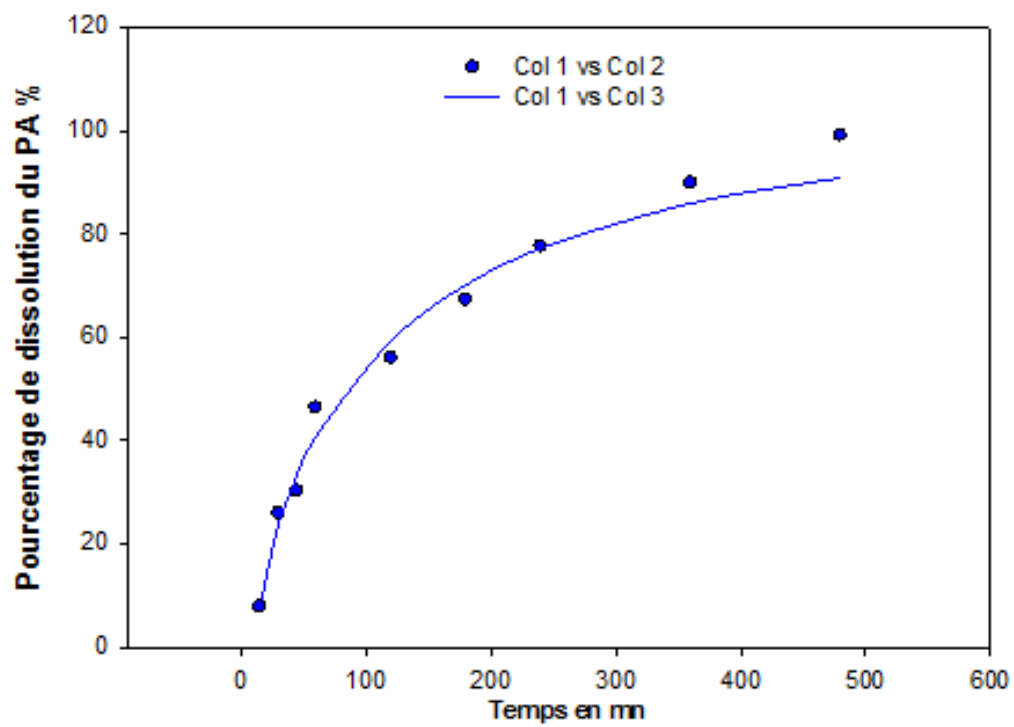


Figure V. 30 : Cinétique de dissolution de l'essai 100 1/1 ajusté par le modèle de Weibull

Afin d'illustrer l'impact de ces deux facteurs sur le profil de libération nous avons tracé des courbes simulant la variation de α pour une valeur fixe de β (Figure V.31)

On observe clairement le caractère exponentiel des courbes de dissolution ce qui est caractéristique du modèle de *Weibull* avec des profils de plus en plus prolongés pour des valeurs croissantes de α , qui est considéré comme un paramètre de l'échelle du temps.

Alors que pour le facteur β qui est un facteur de forme sa variation de 0.5 à 1, celui-ci impacte sur la forme de la courbe, plus il augmente plus la courbe devient exponentielle et le profil plus long.

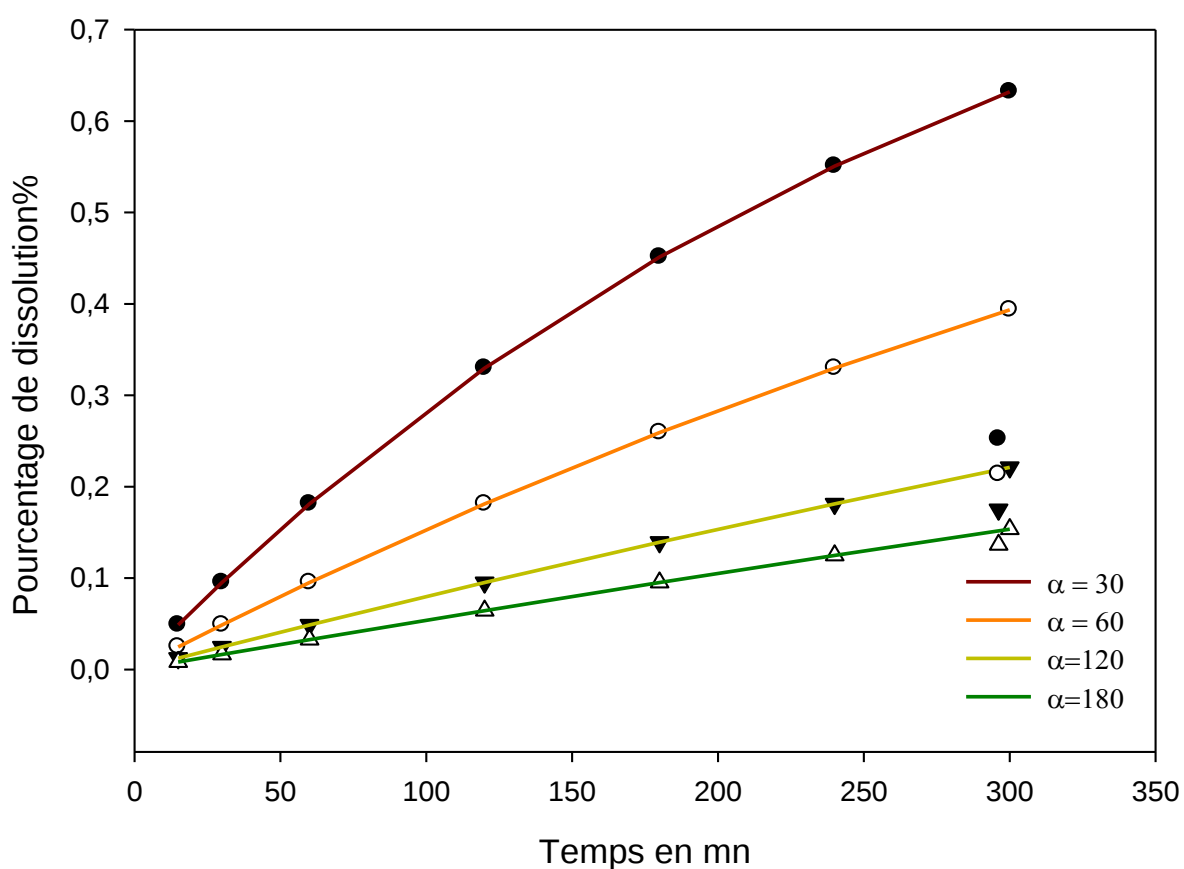


Figure V31. Influence de la Variation du paramètre α de Weibull

V.II. Etude des mélanges binaires gélatine / Alginate de sodium

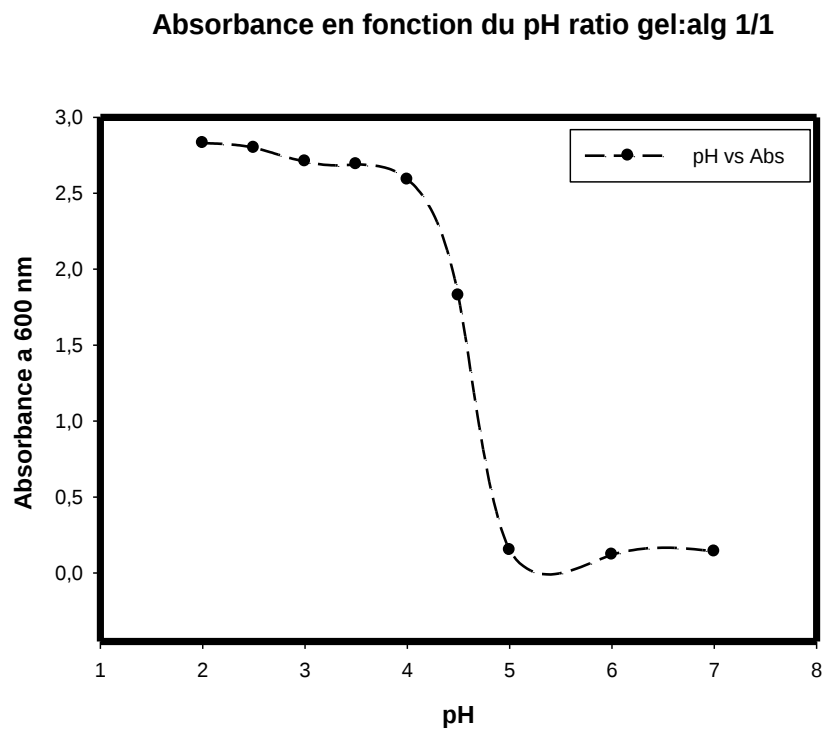
V.II.1. Variation de l'absorbance des mélanges Gélatine/Alginate de sodium à 600nm en fonction du pH et du ratio

L'influence du pH et du ratio protéine/ polysaccharide (Pr : Ps) sur l'interaction entre la gélatine et l'Alginate de sodium est étudiée à une concentration totale en biopolymères de 2%, en suivant l'absorbance des mélanges à 600 nm, qui traduit la turbidité des mélanges. La variation d'absorbance peut donc être uniquement corrélée à l'apparition de particules. Nous considérons également que pour une valeur de pH donnée, une variation maximale de l'absorbance du mélange est liée à la formation d'un nombre maximum de particules formées et donc un maximum d'interaction entre les deux macromolécules. [126]

Les résultats de variation d'absorbance à 600 nm obtenus pour le mélange gélatine/Alginate de sodium/eau à une concentration totale de polymère de 2 % , montrent que pour des ratios (Pr : Ps) compris entre 1 :1 et 4 :1, toutes les courbes présentent un maximum d'absorbance à pH 3,5, mis à part, les mélanges obtenus pour les ratios Pr : Ps de 1 :1, 2 :1 pour lesquels le maximum semble se situer à des valeurs de pH comprises entre 2 à 3,5 (Tableau XIII) (Figures V.32 et V.33).

Tableau XIII : Variation de l'absorbance en fonction du pH et du ratio protéine polysaccharide Pr: Ps Gélatine : Alginate de sodium

pH Abs	2	2,5	3	3,5	4	4,5	5	6	7	8
Ratio Pr :Ps 1/1	2,83	2,799	2,709	2,691	2,59	1,227	0,151	0,121	0,142	0,179
Ratio Pr :Ps 2/1	2,987	2,859	2,819	2,702	1,876	1,132	0,141	0,144	0,147	0,129
Ratio Pr :Ps 3/1	2,660	2,799	2,810	3,01	2,613	0,338	0,175	0,163	0,149	0,120
Ratio Pr :Ps 4/1	1,75	2,91	2,914	2,969	2,613	0,939	0,074	0,063	0,076	0,0620



FigureV.32 : Variation de l'absorbance en fonction du pH pour le ratio Pr : Ps Gélatine Alginate de sodium 1/1

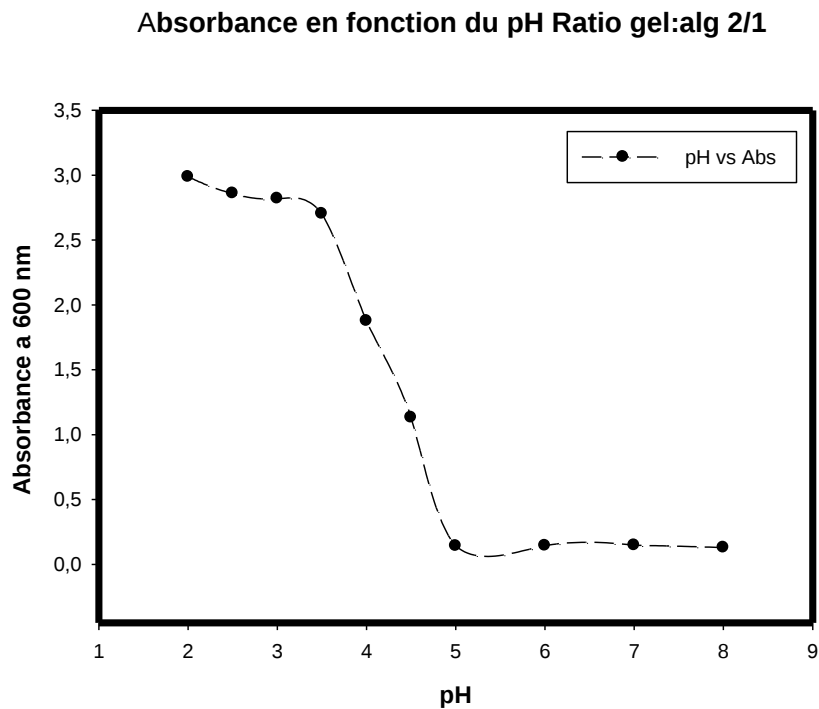


Figure V.33 : Variation de l'absorbance en fonction du pH pour le ratio Pr : Ps Gélatine Alginate de sodium 2/1

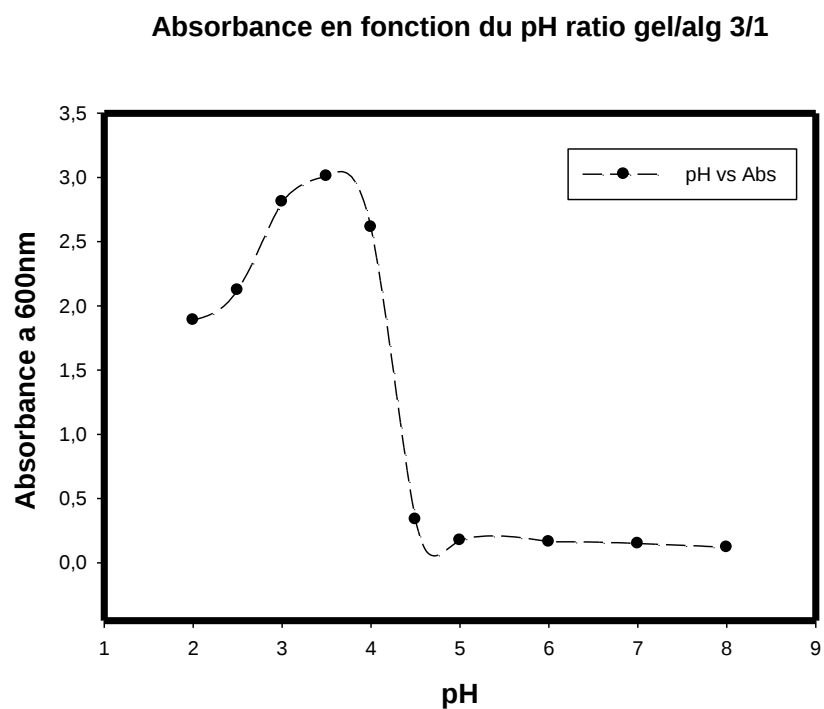


Figure V.34 : Variation de l'absorbance en fonction du pH pour le ratio Pr : Ps Gélatine Alginate de sodium 3/1

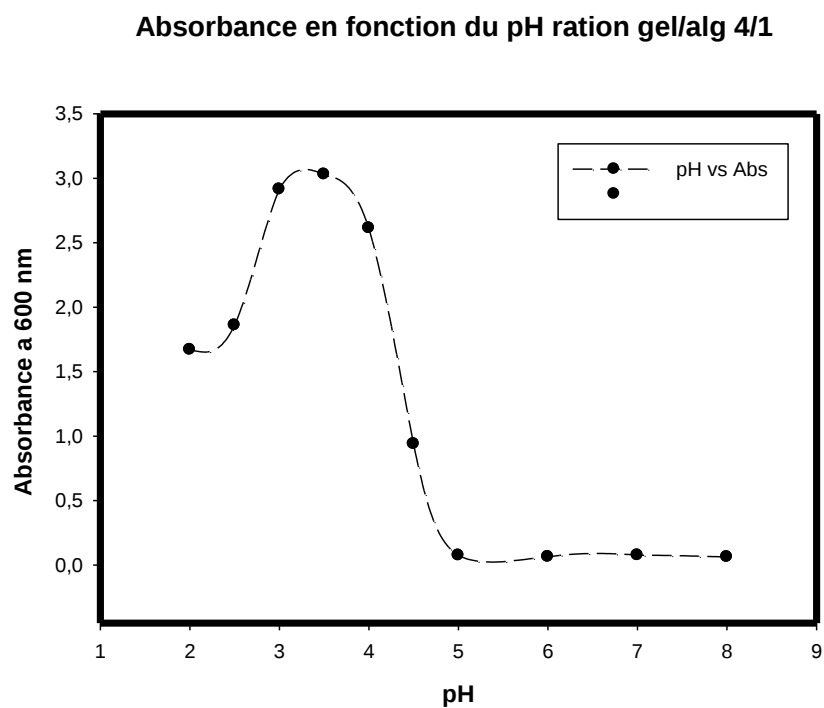


Figure V.35 : Variation de l'absorbance en fonction du pH pour le ratio Pr : Ps Gélatine Alginate de sodium 4/1

Les figures (V.32, et 33) donnant la variation de l'absorbance pour les ratios 1/1 et 2/1, présentent un maximum d'absorbance aux alentours du pH 2, alors que le maximum d'absorbance observé pour les ratios 3/1 et 4/1, (figures V.34, et 35) sont au pH de 3,5. En effet cette différence peut être attribuée au ratio des deux polymères, plus le ratio est important plus le pH correspondant au maximum d'absorbance est proche de 3.

A cette valeur de pH, les charges opposées de l'alginate de sodium chargé négativement et celles de la gélatine qui est chargée positivement se neutralisent et on assiste à la formation de complexes insoluble qui finissent par sédimenter et former un coacervat. Aux valeurs de pH éloignées de 3 à savoir (5,6 et 7) les deux polymères sont solubles et les valeurs de l'absorbances sont très faibles.

Ces résultats sont en accord avec les travaux déjà réalisés par Fang et al., [122], qui ont constaté qu'une séparation de phase est généralement observée pour un ratio massique Pr : Ps (3 : 1) et (4 :1) correspondant à la neutralisation des charges.

Des travaux réalisés par (Xia et Dubin, 1994) [86] ont pu aussi montrer que le ratio massique protéine : polysaccharide (Pr : Ps) a une très grande importance sur le phénomène de séparation de phase par coacervation complexe.

D'autre part, dans l'étude de la coacervation complexe entre la gélatine et la CMC, [126] ont montré que le volume de la phase constituant le coacervat était maximum pour un ratio de mélange de 1 : 1, pour lequel la neutralisation des charges portées par les deux macromolécules est obtenue. L'influence du ratio de mélange sur la formation de complexes a particulièrement bien été mise en évidence par Bowman *et al.*, 1997 [210] dans le cas d'un mélange entre de la gélatine et du poly (styrène sulfonate) de sodium.

Selon les travaux de Abdur Razzak Moojoong et al., 2016. [183] qui a étudié le complexe alginate de sodium et la gélatine de poisson, a signalé que la turbidité n'apparaissait pas à un pH supérieur à pH 5.1, quelle que soit le ratio gélatine/ alginate.

La turbidité a commencé à apparaître lorsque le pH a été réduit à une valeur limite, appelé $pH_{\phi 1}$, qui indique la formation de complexes insolubles entre les molécules de gélatine de poisson chargées positivement et les molécules d'alginate de sodium chargées négativement [211,212].

Lorsque le pH a encore été réduit à une autre valeur limite, noté pH_p , une séparation de phase macroscopique immédiate de gros agrégats est visibles, et provoque une variation importante

de la turbidité. Le mélange FG – AL a montré une turbidité maximale à FG: AL = 80:20 (rapport 4: 1) au pH 3,7 [212].

D'autre part Kruif, 2004 [213] a constaté que plus le ratio Gélatine / Alginate est élevé, plus de molécules de Gélatine étaient disponibles par molécule d'Alginate et donc des molécules de Gélatine, moins chargées positivement à un pH plus élevé sont engagées pour la formation de complexes insolubles neutre, ceci explique l'apparition de turbidité à des valeurs de pH plus acides pour les ratios gélatine / alginate plus faible

Il a été aussi démontré qu'à des valeurs de pH supérieur au **pHp** les phases préparées sont transparentes, dans lesquelles les molécules de biopolymères ont été dissoutes avec certains complexes Gélatine / Alginate solubles. Dans cette région monophasique, les attractions électrostatiques entre la Gélatine et l'Alginate ne sont pas suffisamment fortes pour former des complexes insolubles du fait de la déprotonation des molécules de Gélatine, mais ils peuvent avoir été suffisamment puissants pour former des complexes solubles [183].

V.II.2. Aspect microscopique :

Les observations microscopiques des mélanges Pr :PS Gélatine : Alginate de sodium à différents ratios et à différents pH sont données dans les photos ci-après :

▪ A pH =2 :

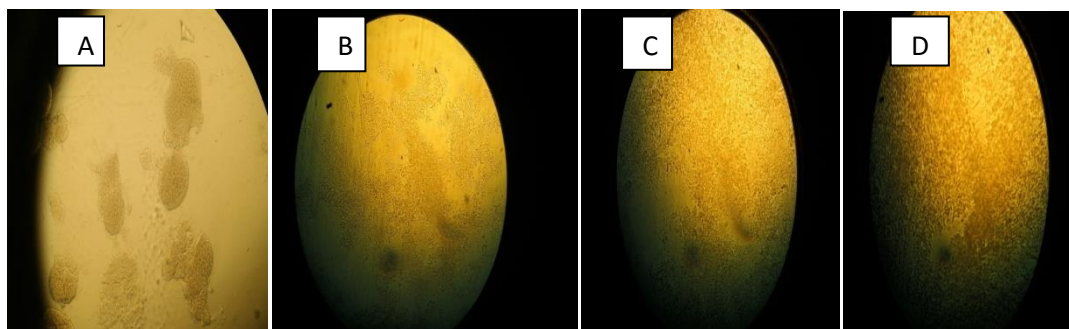


Figure V.36 : observations microscopiques des différents essais à pH 2 ; A (ratio 1 :1) ; B (ratio 2 :1) ; C (ratio 3 :1) ; D (ratio 4:1) ;(Grossissement : G X 25).

A pH=2.5 :

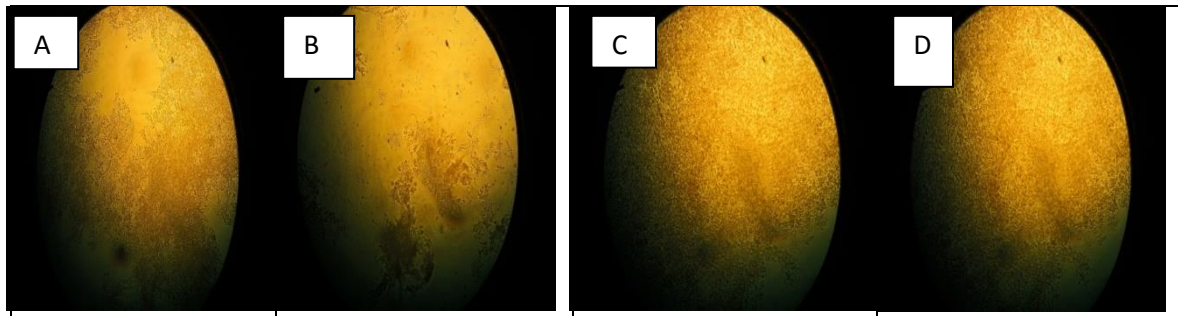


Figure V.37: Photo microscopique des différents essais à pH 2.5 ; A (ratio 1 :1) ; B (ratio 2 :1) ; C (ratio 3 :1) ; D (ratio 4:1) ;) (Grossissement : G X 25).

. Au vue de ces photos microscopiques on remarque qu'à pH 2 et pH 2,5, il y a présence d'agglomérats de macromolécules sous forme de complexes insoluble et ce pour les différents ratios de polymère. D'autre part on peut constater que plus le ratio Gélatine/Alginate de sodium augmente plus le complexe est dense.

.pH= 3 :

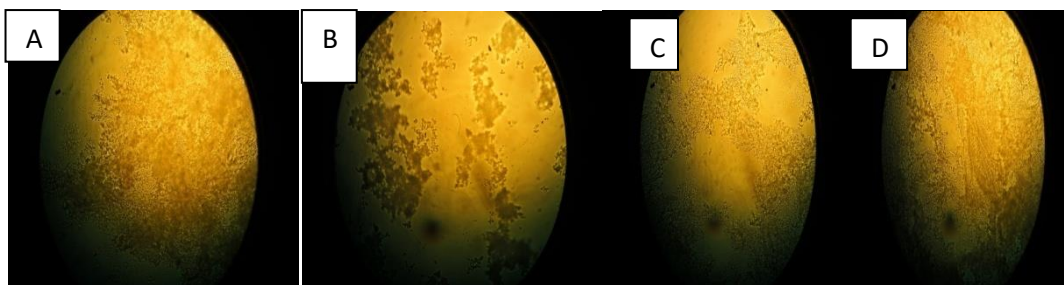


Figure V.38 : Photo microscopique des différents essais à pH 3 ; A (ratio 1 :1) ; B (ratio 2 :1) ; C (ratio 3 :1) ; D (ratio 3:1) ; (Grossissement : G X 25).

.pH=3.5 :

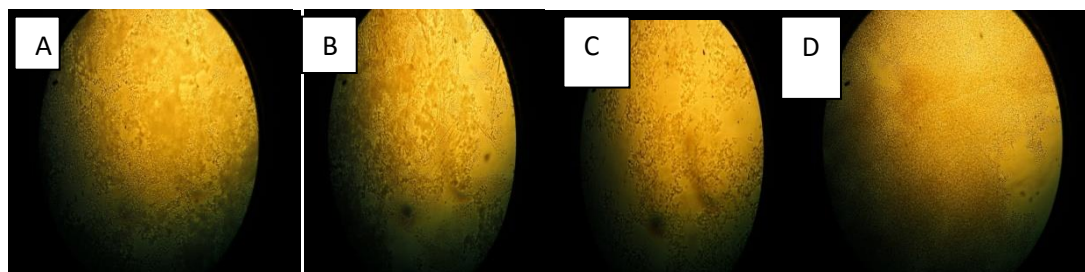


Figure V.39 : Photo microscopique des différents essais à pH 3.5 ; A (ratio 1 :1) ; B (ratio 2 :1) ; C (ratio 3 :1) ; D (ratio 4:1) ; (Grossissement : G X 25).

Les observations microscopiques des essais à pH 3 et 3.5 montre la présence d'agglomérats de macromolécules sous forme de complexes insoluble et ce pour les différents ratios de polymère. Aussi, on peut constater que plus le ratio gélatine/Alginate de sodium augmente plus le complexe est dense.

.pH=4.5 :

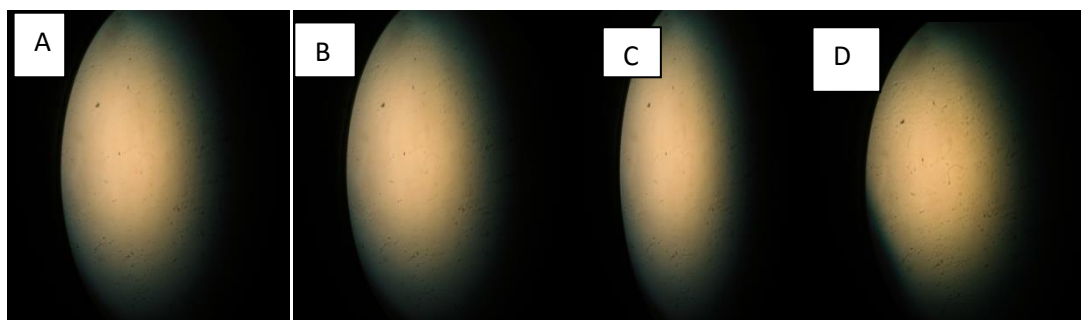


Figure V.40 : Photo microscopique des différents essais à pH 4 ; A (ratio 2 :1) ; B (ratio 3 :1) ; C (ratio 4 :1) ; D (ratio 5:1) ; (Grossissement : G X 25).

Les photos microscopiques des essais du pH 4.5, 5, 6,7, 8, mettent en évidence des solutions optiquement vide non résolues au microscope optique et ce pour les différents ratios de polymère. Ceci démontre la solubilité des biopolymères à ces valeurs de pH présentant un aspect macroscopique limpide.

Les photos microscopiques et macroscopiques des différentes solutions gélatine/alginate présentent des aspects différents en fonction des ratios et des pH. Pour les pH allant de 2 et 2.5, nous notons la présence de complexes insolubles avec un aspect visuel opaque et des agglomérats macromoléculaires au microscope.

Pour les pH de 3 et 3.5 nous signalons une séparation de phase avec un sédiment dense représentant le complexe insoluble et un surnageant limpide, la microscopie montre des agrégats macromoléculaires du complexe formé.

Ces résultats sont en accords avec les résultats de l'absorbance, pour lesquelles le maximum de turbidité est enregistré pour les ratio Pr :Ps de 3/1 et 4/1 avec un aspect microscopique démontrant la formation d'agglomérats insolubles et denses notamment pour les zones de pH de 3 ainsi que l'aspect macroscopique qui montre la formation d'un sédiment dense et un surnageant limpide, témoignant le maximum d'interaction entre les deux biopolymères avec neutralisation de leurs charges opposées.

V.I1.3. Observations macroscopiques des mélanges gélatine /alginate à différents ratios et différents pH

Nous avons observé visuellement les tubes contenant les mélanges gélatine/alginate de sodium à une concentration totale de polymères de 2%, ainsi qu'à différents pH. Ces observations visuelles ont été faites pour confirmer réellement que l'interaction maximale entre les deux biopolymères a eu lieu effectivement à pH 3 pour les ratios gélatine : alginate de sodium 3/1 et 4/1 avec séparation de phases.



Figure V.41: Observation visuelle des essais au ratio Pr : Ps Gélatine/ Alginate de sodium 1/1 à différents pH

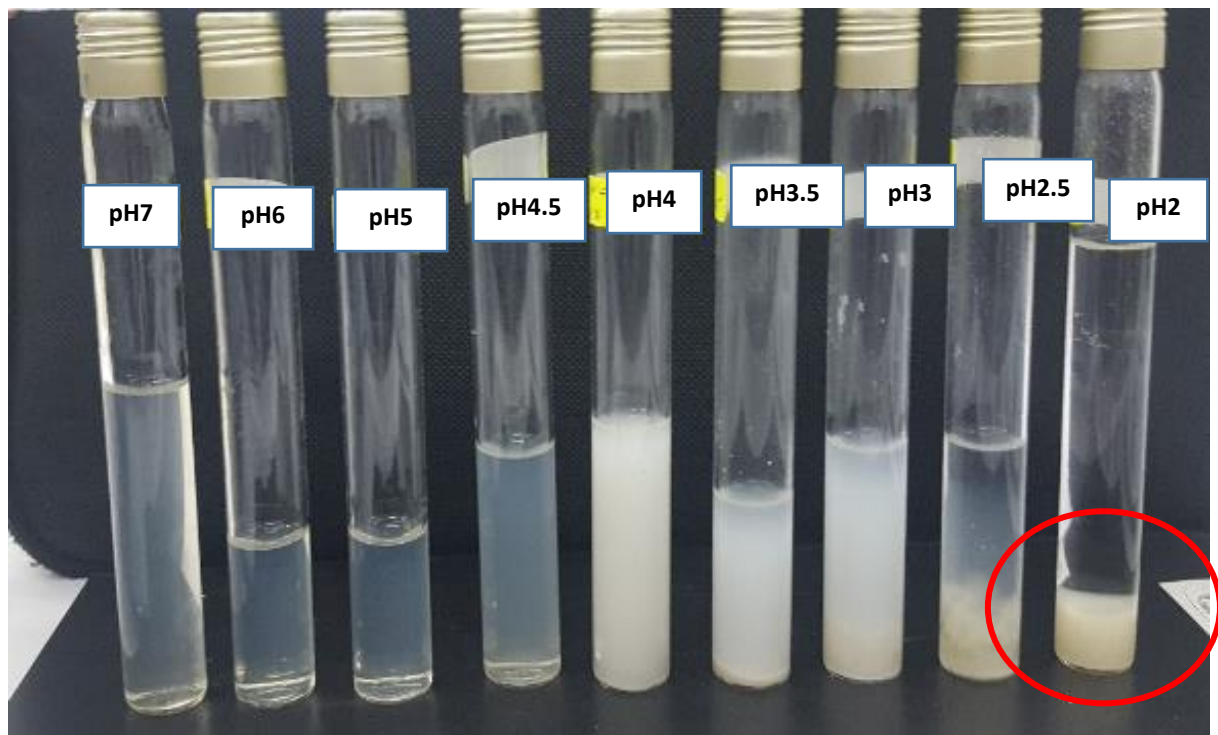


Figure V.42 : Observation visuelle des essais au ratio Pr : Ps Gélatine/ Alginate de sodium 2/1 à différents pH

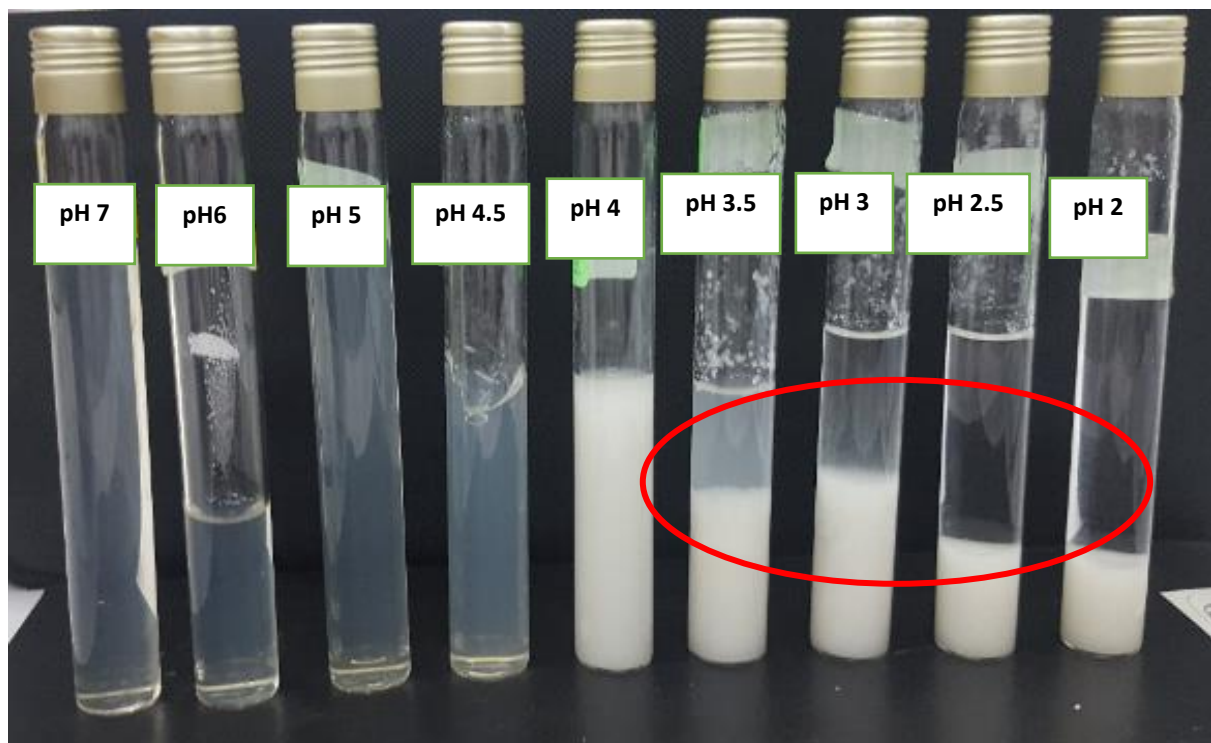


Figure V.43 : Observation visuelle des essais au ratio Pr : Ps Gélatine/ Alginate de sodium 3/1 à différents pH

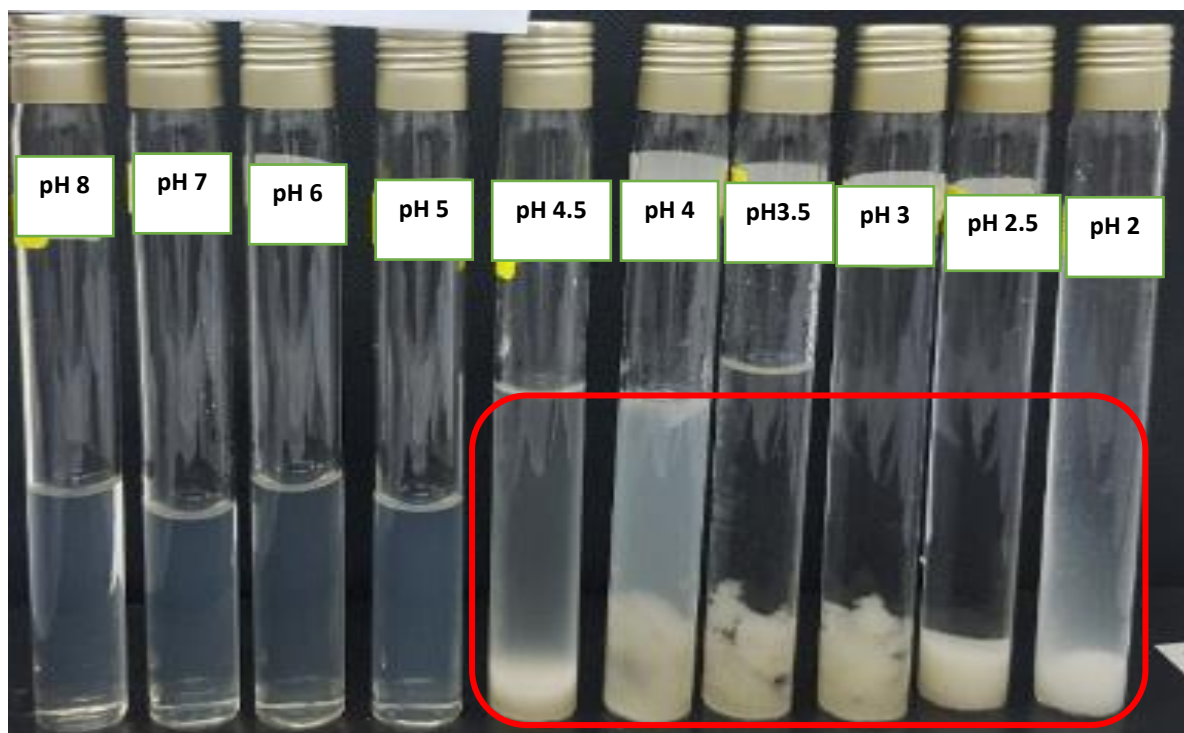


Figure V.44: Observation visuelle des essais au ratio Pr : Ps Gélatine/ Alginate de sodium 4/1 à différents pH

L'examen visuel des tubes à différents ratios Pr : Ps et à différents pH, atteste pour les ratios gélatine : alginate 1/1 et 2/1 une séparation de phase pour les valeurs de pH de 2 et 2,5 (Figure V.41 et V.42). La phase inférieure est constituée d'un semi-solide blanchâtre, surmontée d'un surnageant limpide témoignant la sédimentation de la totalité des polymères. Alors que pour les valeurs de pH supérieur à 2,5 aucune sédimentation n'est observée pour les deux ratios, ce qui nous amène à dire que pour ces ratios l'interaction maximale est obtenue à des valeurs de pH très basses de l'ordre de 2. Il est à noter qu'à ce pH l'alginate de sodium peut être hydrolysé en acide alginique [209].

D'autre part, pour des ratios plus importants à savoir les ratios 3/1 et 4/1 (Figure V.43 et V.44) La séparation de phase est observée à partir de valeurs de pH de 4.5 et 3.5 avec un sédiment dense et un surnageant limpide qui est le résultat d'interaction entre la gélatine et l'alginate où la totalité des macromolécules sont neutralisées, et rendues insolubles, finissent par sédimenter et former un coacervat solide.

Il est à noter que le pH de sédimentation est d'autant plus important que le ratio gélatine alginate est élevé (apparition de sédiment à pH 4.5 pour le ratio gélatine alginate 4/1 et de 3.5 pour le ratio 3/1), ceci a été déjà souligné par Kruif, et Yang [213, 214].

Ces résultats confirment ceux obtenus pour l'absorbance où nous avons vu que le maximum de turbidité, enregistré à ces valeurs de pH.

On remarque aussi que pour les valeurs de pH supérieur à 4.5, les mélanges sont caractérisés par un aspect transparent de la phase supérieure. Ceci indique la présence de particules solubles pour lesquelles les charges des deux biopolymères ne sont pas totalement neutralisées. La nature des interactions entre la gélatine et l'alginate, dans les complexes insolubles, est principalement électrostatique impliquant les charges opposées des biopolymères en solution aqueuse. La contribution des interactions non coulombiennes, telles que la liaison hydrogène ou les interactions hydrophobes, impliquées quant à eux dans les complexes solubles, a été étudiée. En examinant la variation de la turbidité pendant le titrage de l'acide à en présence d'urée, connue pour perturber les interactions des liaisons hydrogènes et les liaisons hydrophobes au sein du système montre que le profil de turbidité n'a pas été modifié de manière significative par l'ajout de l'urée, ce qui indique que la formation de complexes FG – AL insolubles n'a pas été empêchée par urée; c'est-à-dire que les interactions attractives entre les molécules FG et AL étaient principalement électrostatique [211].

V.II.4. Etude du potentiel électrophorétique (le potentiel zêta) obtenue dans le mélange gélatine/ alginate de sodium

La mesure de la mobilité électrophorétique (potentiel zêta) des colloïdes permet d'obtenir des informations quant à l'interaction entre la surface de ceux-ci et les molécules de solvant [215, 216] dans des conditions données de pH , de viscosité et de force ionique. La coacervation complexe étant majoritairement gouvernée par des interactions électrostatiques entre les macromolécules, la mesure du potentiel zêta doit nous permettre de définir les conditions optimales d'interaction entre les deux macromolécules en fonction du pH.

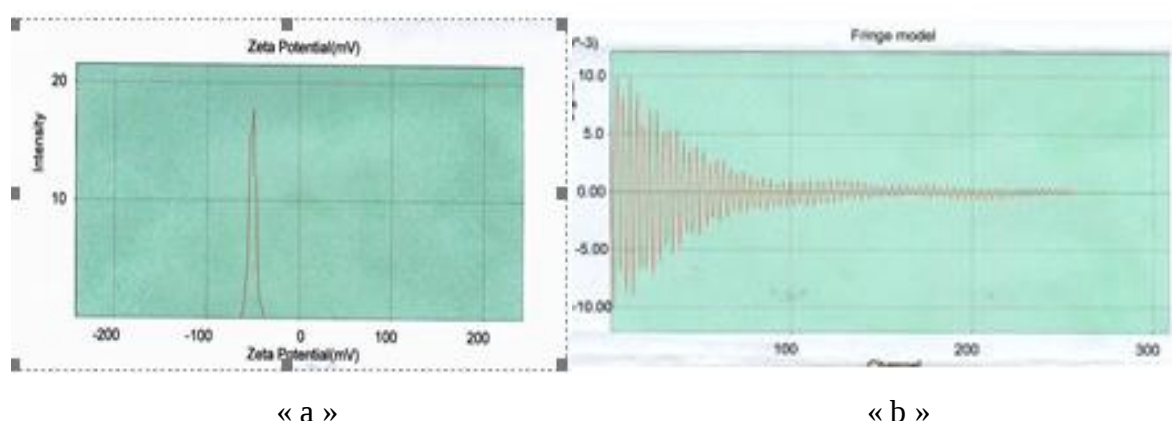
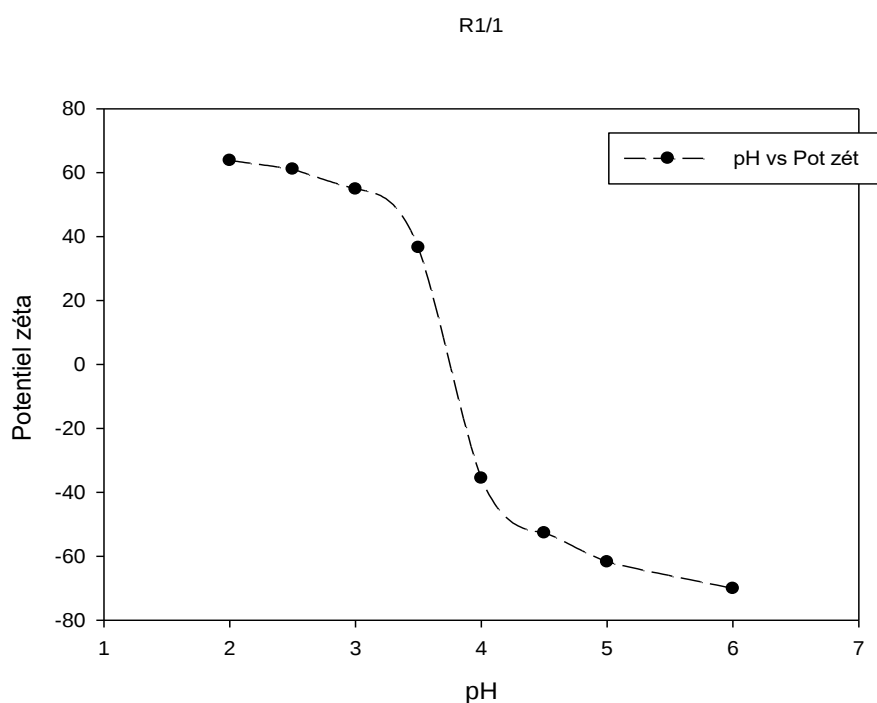


Figure V.45 : Résultats de mesure du potentiel zêta. (a) : pic du potentiel zêta, (b) : courbe d'atténuation

Tableau XIV : Variation du potentiel zêta en fonction du pH a différents ratios

pH Potentiel Zeta (mv)	2	2,5	3	3,5	4	4,5	5	6
Ratio 1/1	63,80	61,10	54,89	36,60	-35,6	- 52,70	-61,8	-70,1
Ratio 2/1	73,10	44,70	82,8	26,60	-48,6	- 56,70	-67,8	-78,6
Ratio 3/1	59,80	78,90	0,097	71,50	-39,90	-48,8	-59,7	-60,7
Ratio 4/1	76,8	37,3	48,47	93,90	-35,90	- 42,9	-56,9	-62,3



FigureV.46 : Variation du potentiel zêta en fonction du pH pour le ratio Pr : Ps Gélatine Alginate de sodium R1/1

R2/1

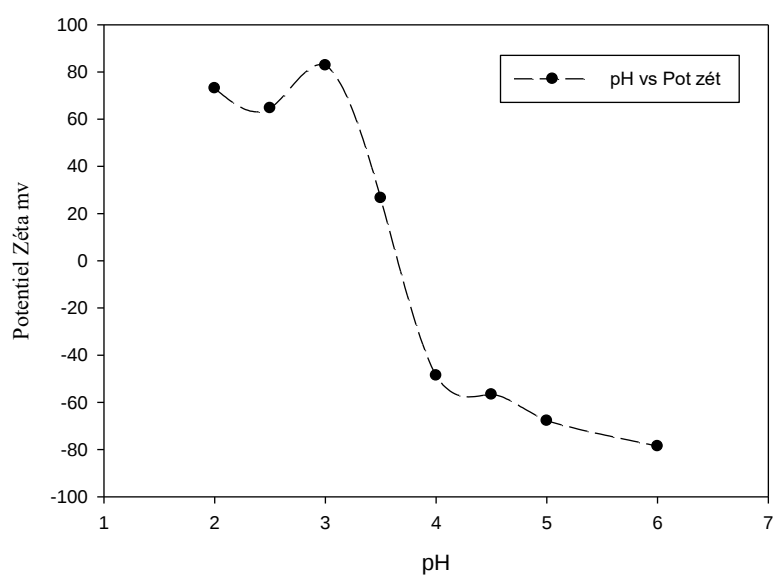


Figure V.47 : Variation du potentiel zéta en fonction du pH pour le ratio Pr : Ps Gélatine Alginate de sodium R 2/1

R3/1

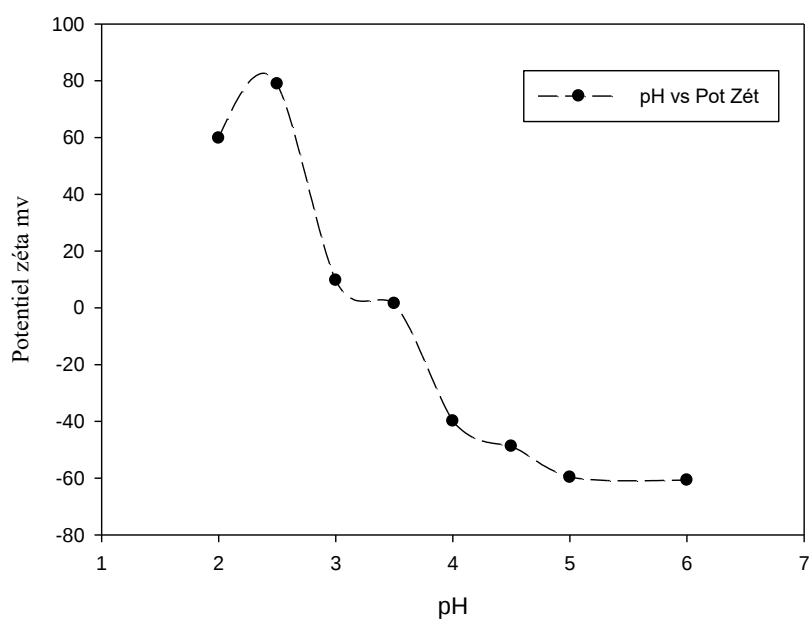


Figure V.48: Variation du potentiel zéta en fonction du pH pour le ratio Pr : Ps Gélatine Alginate de sodium 3/1

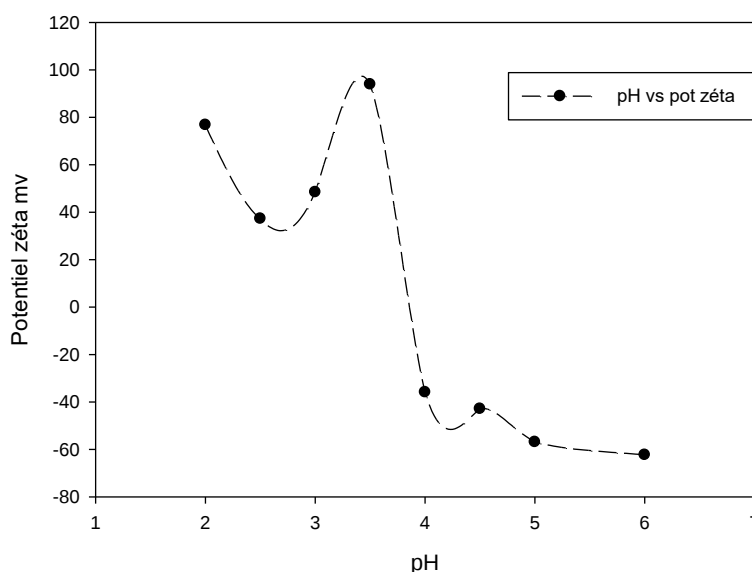


Figure V.49 : Variation du potentiel zéta en fonction du pH pour le ratio Pr : Ps Gélatine Alginate de sodium 4/1

Lorsqu'on suit l'évolution de la mobilité électrophorétique pour la dispersion gélatine/Alginate, on note une influence du ratio (Pr : Ps) sur l'allure des électrophérogrammes. Lorsque le ratio (Pr : Ps) est bas (1 : 1) et (2 : 1), il est intéressant de noter que l'interaction entre la gélatine et l'alginate n'est obtenue qu'à partir de valeur de pH réduite (2 pour le ratio 1/1 et 2.5 pour le ratio 2/1) cette interaction se traduit par le changement de charge globale du potentiel zéta, en fonction du pH.

Par contre, lorsque le ratio est en faveur de la protéine (3/1) et (4/1), leurs électrophérogrammes subissent des modifications importantes. Pour le ratio 4 /1, le changement de charge globale est obtenu à pH proche 4 et celui du ratio 3/1, l'inversion de charge a lieu à pH 3.5.

Le potentiel zéta des deux biopolymères augmente en fonction de la diminution du pH ceci est due d'une part à la protonation des groupements carboxyles et amines de la gélatine et de ceux aussi des groupement carboxyliques de l'alginate . Cette protonation se traduit par une augmentation de la valeur négative globale du potentiel zéta qui augmente progressivement et atteint des valeurs positives, à ce niveau les interactions entre des macromolécules de gélatine et d'alginate ont toujours lieu même si la charge des deux biopolymères est similaire.

Des résultats similaires ont été rapportés pour d'autres systèmes protéiques / polysaccharides, comme la β -lactoglobuline / chitosan étudié par Guzey & McClements, [217] et Chang-Sheng Wang pour le système gélatine et gomme xanthane [218].

V.II.5. Caractérisation rhéologique des mélanges biopolymériques (Pr/Ps) à différents pH et différents ratios :

La rhéologie est définie comme étant une discipline qui traite l'écoulement et/ou la déformation des fluides sous l'action de la contrainte. Son intérêt est rendu chaque jour plus évident par l'apparition de nombreuses substances au comportement complexe : pâtes, boues, émulsions, suspensions, dispersions.

La connaissance des propriétés et le comportement rhéologique des mélanges gélatine et alginate de sodium à différents pH, va nous renseigner sur la variation texturale et mécanique des polymères, en fonction du ratio et du pH et ce afin de comprendre l'origine des phénomènes à un niveau moléculaire.

A cet effet deux types d'expérimentation sont réalisées :

- **Analyse de la viscoélasticité en régime linéaire**

Ce test sert à renseigner sur l'état structural de l'échantillon en évaluant sa rigidité. Alors que la majorité des tests rhéologiques sont effectués en rotation, la viscoélasticité est effectuée en oscillation ; pour cela, on maintient une fréquence constante $\omega=10$ 1/s et on fait varier le pourcentage de déformation γ de 0.1% à 100 % en rampe logarithmique ; chaque seconde on prélève une valeur du module de conservation G' et une valeur du module de perte G'' , on prélève un nombre de points fixé à 30.

Les figures V.50 et V.51 représentent G' et G'' en fonction de la déformation d'un essai type. Dans tous le domaine de la courbe de viscoélasticité nous remarquons que le module de conservation est supérieur au module de perte $G' > G''$ ce qui confère à nos polymères le caractère « Gel ». Pour de faibles déformations, G' et G'' enregistrent un palier ce qui correspond au domaine de viscoélasticité linéaire. Au fur et à mesure que la déformation augmente, les deux modules accusent une chute. On peut dire que le matériau devient relativement plus dissipatif avec une rigidité plus faible tout en gardant le caractère gel.

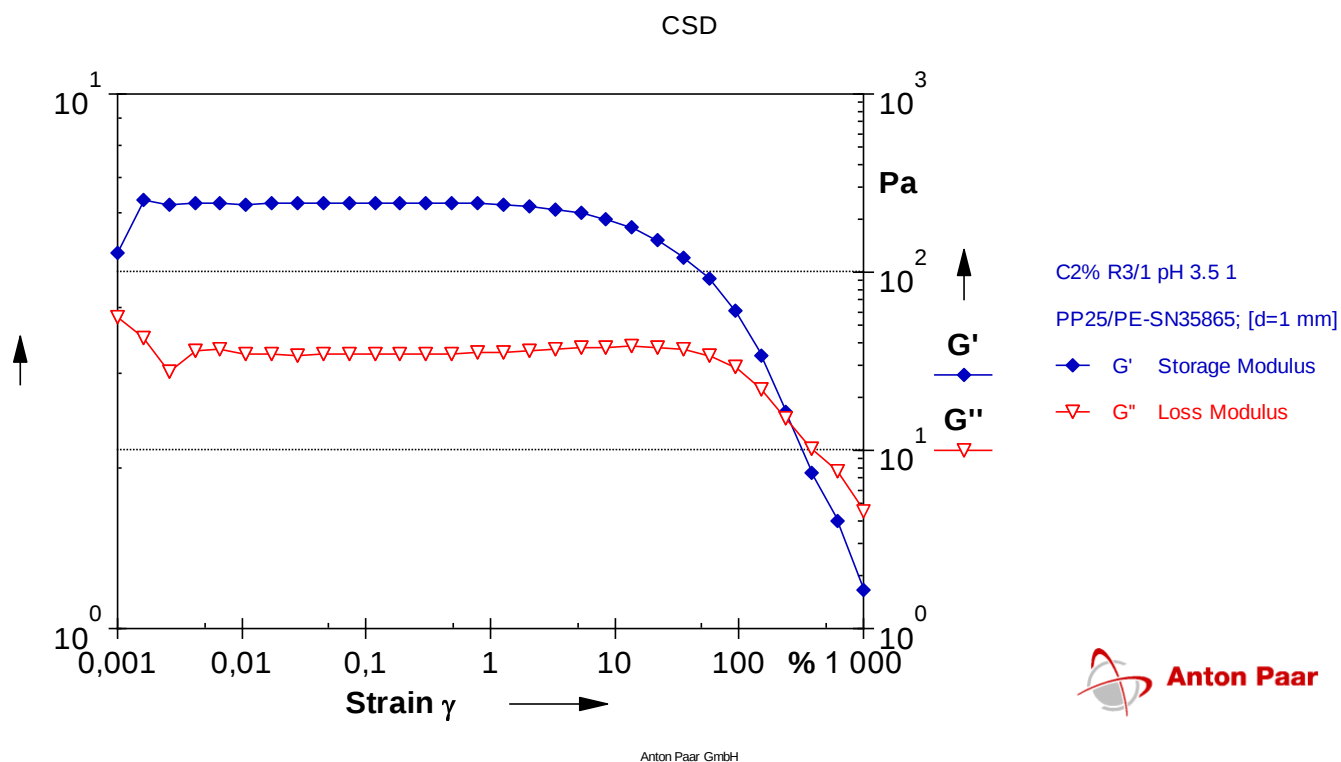


Figure V.50 : Test de viscoélasticité d'un essai type R3/1 pH 3.5 à 25°C

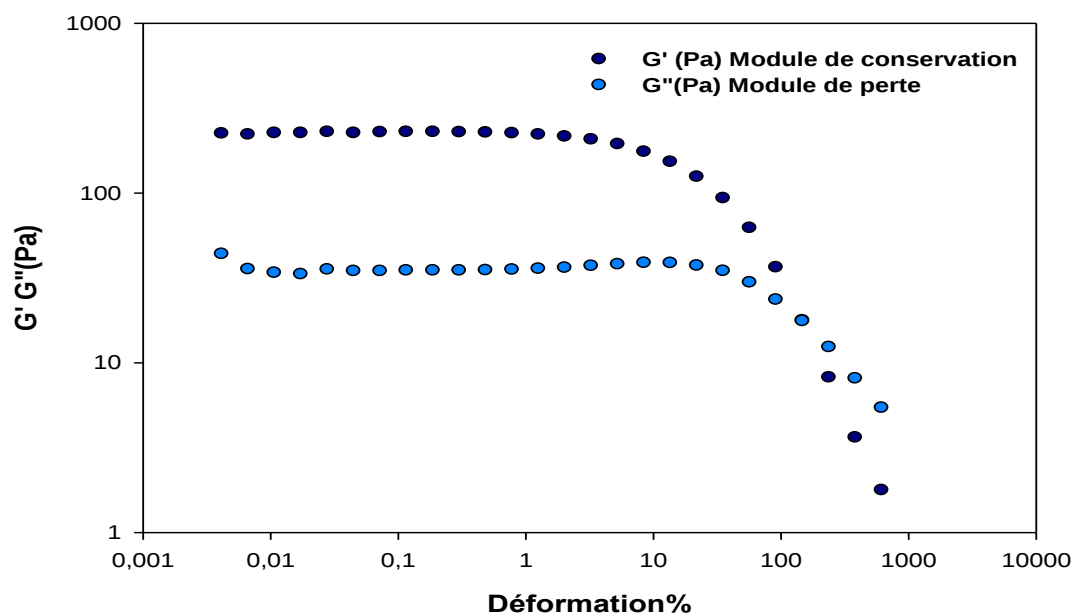


Figure V.51 : Courbe de viscoélasticité d'un essai type R3/1 pH 3.5

L'analyse du comportement viscoélastique a été réalisée à différent pH allant de 2 à 7 et à différents ratios de polymère (de 4/1, 3/1, 2/1 et 1/1). A l'issue de cette analyse, on a retenu les valeurs du module de conservation, G' exprimant la rigidité du système et le module de perte G'' représentant la composante visqueuse du gel (Tableau XV).

Tableau XV : Résultats de G' et G'' en fonction du pH à différents ratios

pH	RATIO R1/1		RATIO R2/1	
	module de conservation G'	module de perte G''	module de conservation G'	module de perte G''
7	2.08	3.52	0.601	2.73
6	29.1	10.6	0.532	1.97
5	11.8	12.0	3.59	5.08
4.5	7.29	7.75	0.438	0.528
4	2.34	1.75	1.24	0.98
3.5	0.187	0.23	36	10
3	0.81	0.94	162	18
2.5	21.7	4.31	138	88
2	79.4	8.84	116	83
pH	RATIO R3/1		RATIO R4/1	
	module de conservation G'	module de perte G''	module de conservation G'	module de perte G''
7	60.6	25	5.18	4.3
6	72.0	31.6	19.6	12.9
5	96.0	37.6	112	41.6
4.5	2.53	1.60	2.76	1.19
4	5.69	1.21	20500	3080
3.5	14500	34.6	15300	2260
3	12280	34.8	17100	2700
2.5	6200	2.89	11500	1760
2	1960	2.28	175	2.55

Afin d'analyser et comparer les résultats obtenus, nous avons procédé à la présentation des courbes du module de conservation pour les différents ratio et pH (figures : V.52, V.53,V.54,V.55)

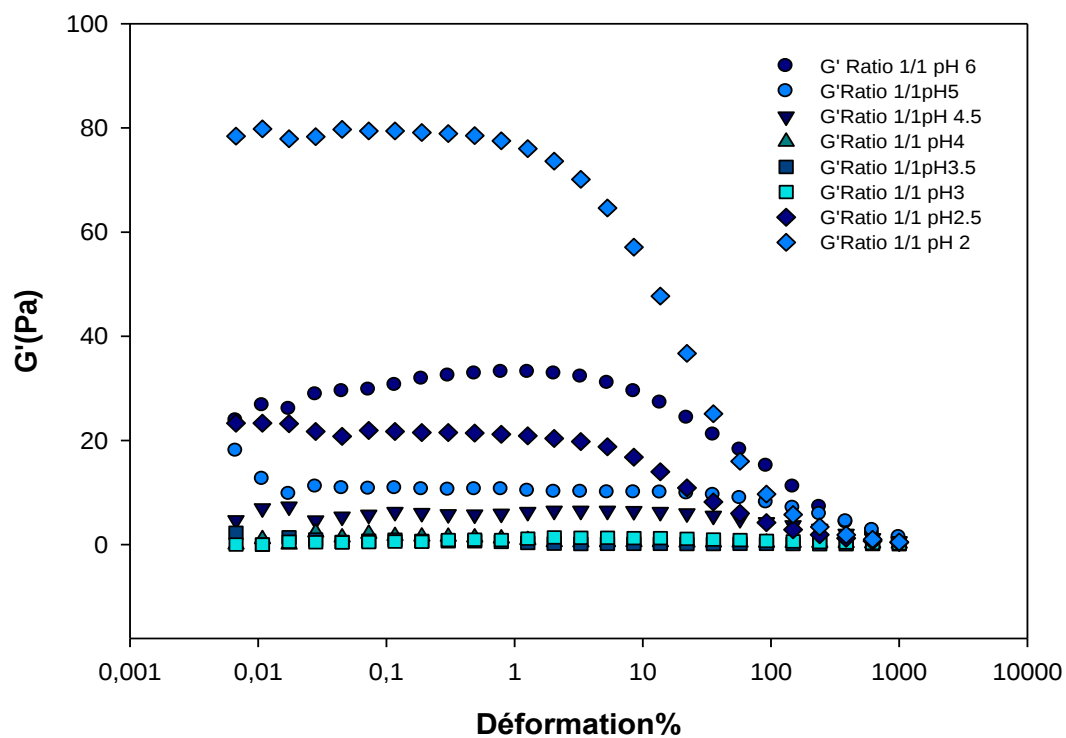


Figure V.52 : Courbe de viscoélasticité d'un essai type R3/1 pH 3.5

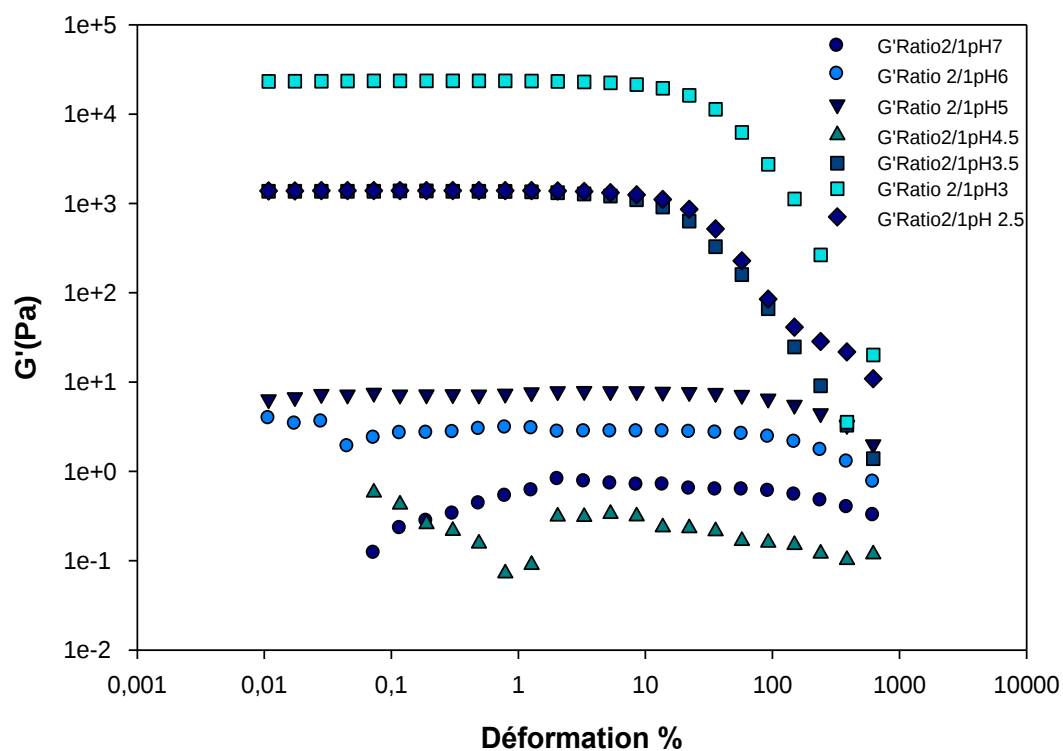


Figure V.53 : Variation du module de conservation G' en fonction du pH pour le ratio 2/1

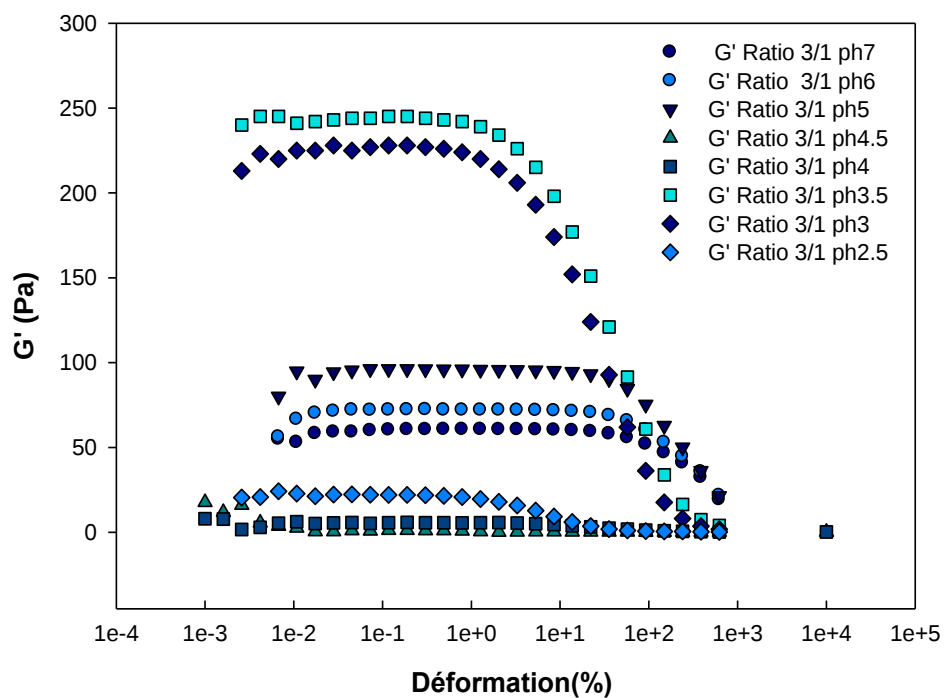


Figure V.54 : Variation du module de conservation G' en fonction du pH pour le ratio 3/1

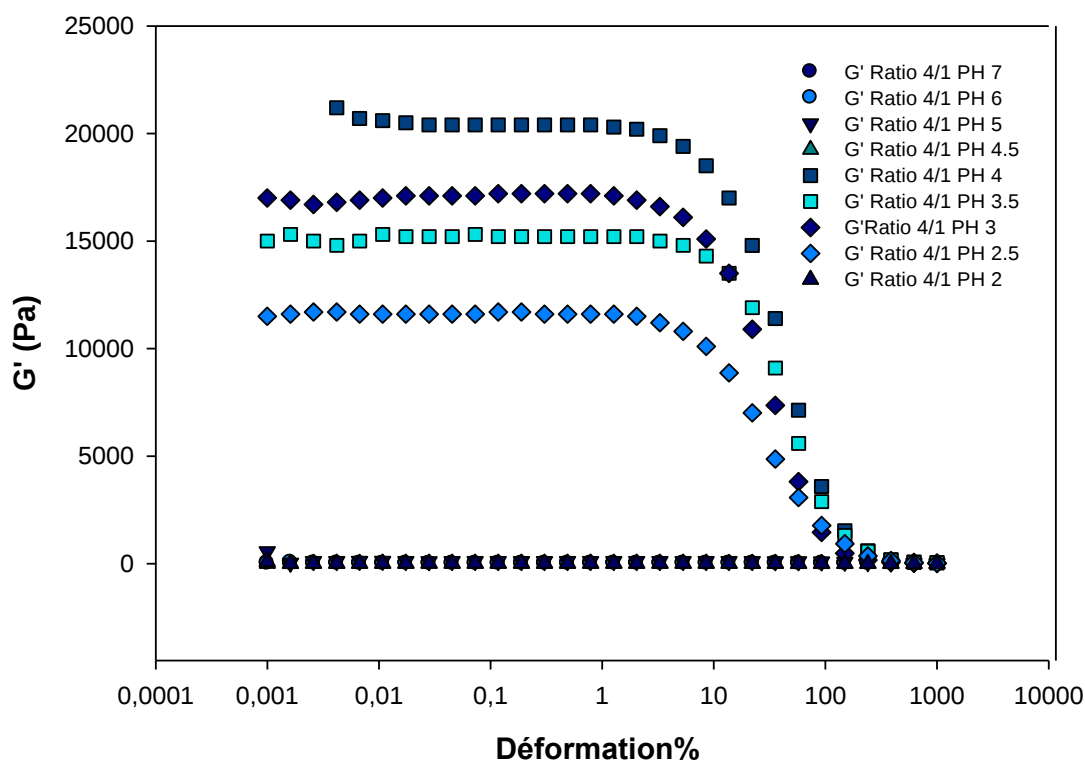


Figure V.55 : Variation du module de conservation G' en fonction du pH pour le ratio 4/1

Au vue de ces figures on remarque que le module de conservation G' enregistre des valeurs différentes en fonction du pH pour le même ratio.

On remarque par exemple pour le ratio 1/1, les valeurs maximales de G' sont enregistrées à pH égale à 2, où le gel est rigide et bien structuré. Alors que les valeurs maximales de G' pour le ratio 2/2, sont obtenues à pH égale à 3, suivi par le pH de 2.5, pour le ratio 3/1 ce pH est de 3.5 et enfin celui du ratio 4/1 il est de 4. Ceci est due au degrés de protonation de la gélatine plus celle-ci est en proportion importante, sa protonation est plus importante est donc les liaisons électrostatiques entre les groupements carboxyles de l'alginate et les groupements amines de la gélatine sont d'autant plus fortes et par conséquent le gel plus rigide.

Ces résultats sont en concordance avec les résultats de la turbidité pour lesquelles nous avons enregistré des valeurs maximales d'absorbance aux mêmes valeurs de pH soulignées.

Afin de comparer le module de conservation des différents ratios aux valeurs de pH critiques c'est-à-dire, là où nous avons constaté le maximum de turbidité tel que le pH 3, 3.5 et 4, nous avons tracé la variation du module de conservation en fonction du pH pour les différents ratios (Figure V.56, V57, V58).

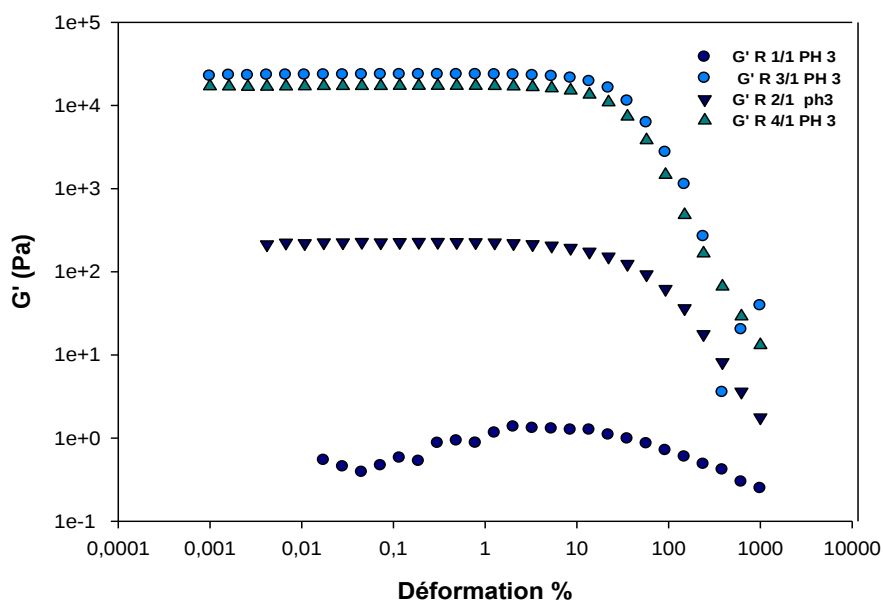


Figure V.56 : Variation du module de conservation G' en fonction des ratios pour le pH 3

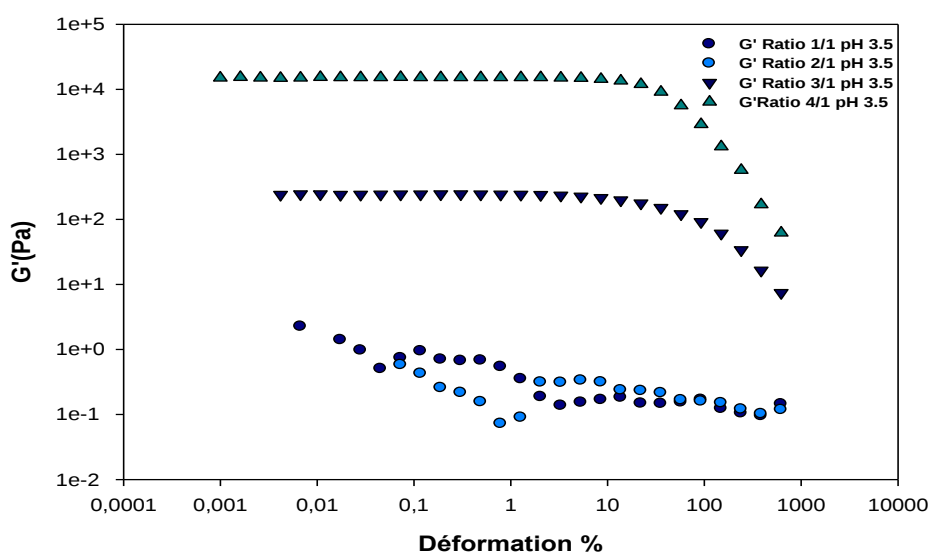


Figure V.57 : Variation du module de conservation G' en fonction des ratios pour le pH 3.5

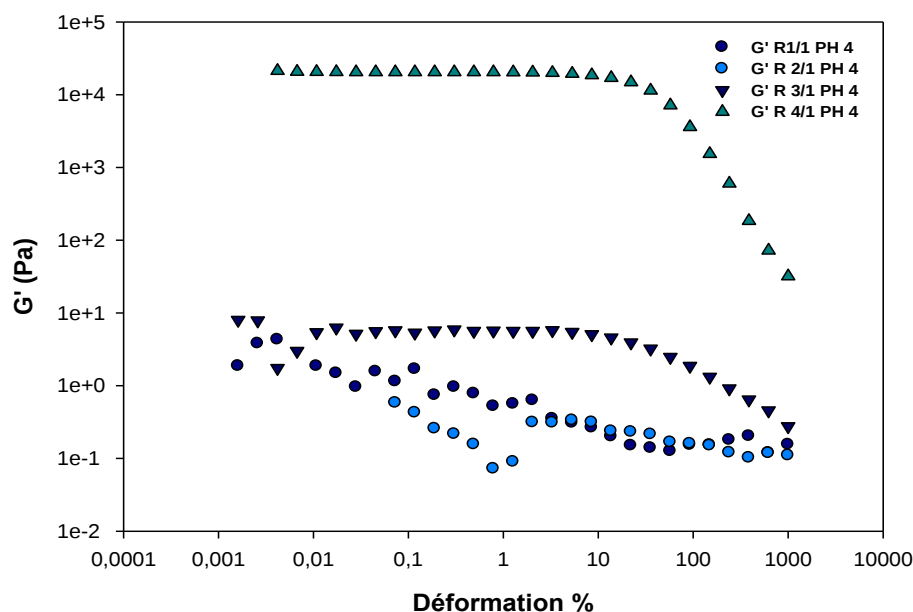


Figure V.58 : Variation du module de conservation G' en fonction des ratios pour le pH4

Les courbes représentées montrent clairement que les valeurs maximales du module de conservation G' sont obtenues pour les ratios 3/1 et 4/1 à pH 3 et 3.5 et Le ratio 4/1 à pH 4.

Dans ces conditions les interactions électrostatiques entre la gélatine et l'alginate, sont très importantes conduisant à un gel rigide qui est le coacervat.

Pour les ratios 2/1 et 1/1 on note que les valeurs maximales de G' sont obtenues pour des pH plus acide pH 2.5 et 2 respectivement et que pour ces pH le G' est beaucoup moins important que celui des ratios 3/1 et 4/1. Ceci peut être expliqué par l'hydrolyse de l'alginate à ce pH, ce qui va engendrer un affaiblissement des interactions électrolytiques entre la gélatine et l'alginate.

Des travaux similaires étudiant les mélanges protéines/polysaccharides ont démontré une modification significative des propriétés viscoélastiques en fonction du pH, notamment ceux confirmant que les interactions électrostatiques au niveau moléculaires induisent des changements des propriétés rhéologiques en générale et viscoélastiques en particulier avec des valeurs de modules de conservation G' supérieures, due essentiellement à la complexation entre la protéine et le polysaccharide. [219]. D'autre part les travaux de Weinbreck & Wientjes .2004, [220] rapportent que les coacervats (phase concentrée de protéines et de polysaccharides complexés) de protéines de lactosérum-gomme arabique, produits au pH

optimum de complexation (pH 4,0), démontrent une augmentation des paramètres rhéologiques viscoélastiques, de 45 fois comparativement au même système mixte à pH 7,0.

- **Analyse sous écoulement en dehors du régime linéaire ou Test d'écoulement**

La courbe d'écoulement d'un essai type (ratio 3/1 et pH 6) est présentée sur la **figure V.59**. Ces solutions enregistrent deux types de comportement, le premier newtonien enregistré à faible cisaillement et à fort cisaillement et un comportement rhéofluidifiant, à cisaillement intermédiaire, ce qui traduit le comportement structural des deux biopolymères.

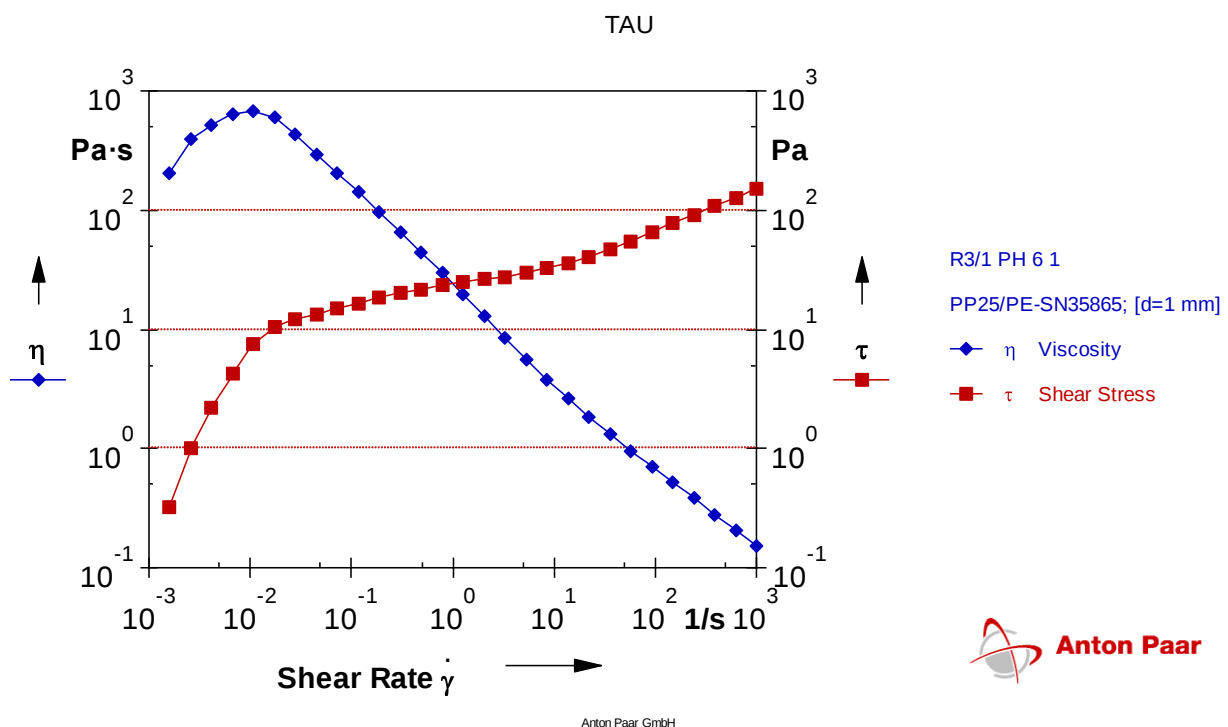


Figure V.59 : Courbe d'écoulement d'un essai type ratio 3/1 pH 6

A faible vitesse de cisaillement les liaisons physiques résistent à l'écoulement. Au fur et à mesure que la vitesse augmente, le cisaillement provoque des phénomènes de rupture des liens physiques entre les macromolécules qui subissent une déstructuration partielle qui dépend de l'intensité du cisaillement et qui se manifeste par leur dispersion. Lorsque le cisaillement est très fort, les macromolécules sont complètement dispersées et orientées suivant l'écoulement et leur résistance devient constante ainsi que la viscosité.

Beaucoup de modèles rhéologiques expriment la relation entre la viscosité apparente et la vitesse de cisaillement. Parmi les modèles qui décrivent le comportement structural associé à nos solutions, nous avons opté pour le modèle de Carreau dont l'écriture est :

$$\eta = \frac{\eta_0 - \eta_\infty}{1 + (K\dot{\gamma})^2} = \frac{1}{(1 + (K\dot{\gamma})^2)^p}$$

Où

η est la viscosité apparente (Pa.s),

$\dot{\gamma}$ est la vitesse de cisaillement (s^{-1}),

η_0 est la viscosité à faible vitesse de cisaillement (au repos) (Pa.s),

η_∞ est la viscosité estimée à vitesse de cisaillement infinie (Pa.s) ,

k est une constante caractéristique relative au temps de relaxation du polymère en solution,

p est un indice de structure.

Le modèle de Carreau nous a permis de décrire le comportement structural des mélanges avec un coefficient de corrélation élevé se rapprochant de 1 ($R^2 \approx 0.99$).

Les Figures V.60 V61, ci-après, montrent des courbes typiques d'écoulement des essais réalisés. Elles expriment la variation de la viscosité apparente et la contrainte en fonction de la vitesse de cisaillement. Son ajustement par le modèle structural de Carreau semble bien expliquer les deux régions newtoniennes et le comportement intermédiaire rhéofluidifiant pseudoplastique et ce pour l'ensemble des ratios réalisés R1/1 R2/1 R3/1 R4/1 et à différents pH. Les paramètres caractéristiques du modèle de Carreau pour les différents ratios et pH sont renseignés dans les tableaux XVI, XVII, XVIII, XIX.

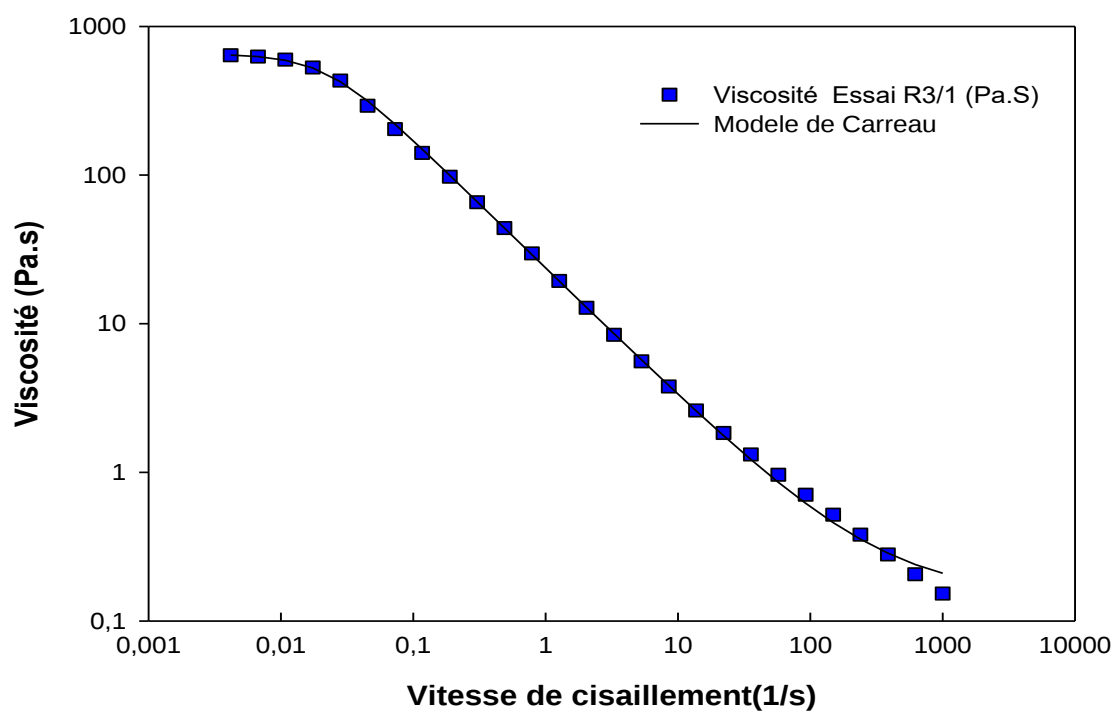


Figure V.60 : Courbe d'écoulement d'un essai type R3/1 ajusté par le modèle de carreau

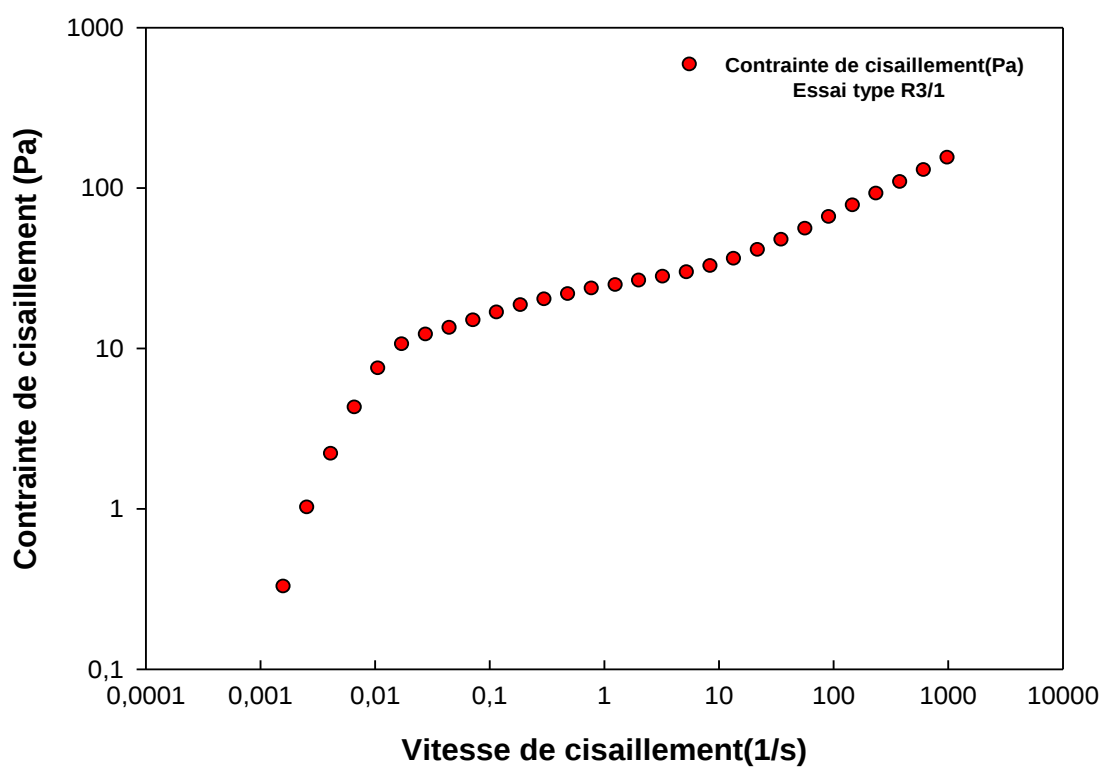


Figure V.61 : Variation de la contrainte en fonction de la vitesse de cisaillement d'un essai type R3/1

Tableau XVI : Paramètres du modèle de Carreau caractéristique du comportement visqueux des mélanges protéine-polysaccharide pour le ratio R 1/1 à différent pH

pH	Paramètres rhéologiques du modèle de carreau			
	η_0 (Pa.s)	η_∞ (Pa.s)	K	R ²
6	64.42	0.59	30.74	0.99
5	32.21	0.13	103	0.99
4.5	30.5	0.19	106	0.98
4	49.8	0.23	103	0.98
3.5	58.15	0.14	101	0.97
3	35.41	0.68	123	0.99
2.5	221	0.52	471	0.99
2	290	0.09	338	0.96

Tableau XVII: Paramètres du modèle de Carreau caractéristique du comportement visqueux des mélanges protéine-polysaccharide pour le ratio R 2/1 à différent pH

pH	Paramètres rhéologiques du modèle de carreau			
	η_0 (Pa.s)	η_∞ (Pa.s)	K	R ²
6	624	0.09	208	0.99
5	32.64	0.03	143	0.99
4.5	8017	0.017	298	0.99
4	3445	0.63	312	0.98
3.5	4300	0.143	104	0.99
3	6200	0.068	403.6	0.99
2.5	24600	0.022	374	0.99
2	20300	0.09	382	0.97

Tableau XVIII: Paramètres du modèle de Carreau caractéristique du comportement visqueux des mélanges protéine-polysaccharide pour le ratio R 3/1 à différent pH

pH	Paramètres rhéologiques du modèle de carreau			
	η_0 (Pa.s)	η_∞ (Pa.s)	K	R ²
7	286.5	0.07	55	0.99
6	639.35	0.09	50.94	0.99
5	142.21	0.03	143	0.99
4.5	35599	0.017	496	0.98
4	149758	0.63	363	0.98
3.5	402220	0.143	571	0.98
3	397262	0.068	553	0.99
2.5	34170	0.022 γ	451	0.98
2	32737	0.09	102	0.98

Tableau XIX: Paramètres du modèle de Carreau caractéristique du comportement visqueux des mélanges protéine-polysaccharide pour le ratio R 4/1 à différent pH

pH	Paramètres rhéologiques du modèle de Carreau			
	η_0 (Pa.s)	η_∞ (Pa.s)	K	R ²
7	919	0.07	59	0.99
6	122	0.09	52.94	0.99
5	320	0.03	207	0.99
4.5	122500	0.017	496	0.98
4	183670	0.63	633	0.98
3.5	274769	0.143	785	0.98
3	211200	0.068	998	0.99
2.5	45390	0.022	647	0.98
2	1547	0.09	272	0.99

- **Effet de pH et de ratio sur les paramètres du modèle de Carreau**

Nous constatons que les paramètres du modèle de Carreau montrent une variabilité en fonction du ratio et du pH. Les meilleurs paramètres rhéologiques sont obtenus pour le ratio protéine polysaccharide 3/1 et 4/1. Par exemple le paramètre de viscosité initiale η_0 qui traduit la rigidité du système au repos, enregistre des valeurs élevées pour le ratio 3/1 et 4/1 à pH 3.5 (402.220 et 274.769 Pa.s). Alors que pour les ratios 2/1 et 1/1 ce paramètre atteint des valeurs plus faibles et à pH plus bas 2 et 2.5. Il est à noter qu'à pH très bas, l'alginate de sodium se transforme en acide alginique qui précipite en raison de sa faible solubilité et qui serait incapable de former un complexe avec la gélatine[192].

Une augmentation de viscosité a été observée par Sánchez et al. [221] suite aux interactions attractives dans un mélange xanthane-gomme guar-protéines de soya. Ces auteurs suggèrent la formation d'un réseau et donc une augmentation de la taille des particules et la viscosité du système.

La formation et la caractérisation des gels multicomposants font toujours l'objet de nombreuses études. L'ajout d'un polysaccharide à un gel de protéines produit soit un effet de synergie ou un effet antagoniste sur les propriétés du gel résultant. Des effets antagonistes ont premièrement été identifiés lorsqu'une séparation de phases ségrégative excessive limite l'agrégation protéique ou plus spécifiquement la connexion inter-amas (inter-cluster) d'agrégats de protéines [222, 223]. Ces effets sont aussi identifiés en présence d'interactions attractives lors de la neutralisation des complexes formés (complexes insolubles)[224].

Les propriétés rhéologiques du coacervat ont été étudiées sur le système protéines du lactosérum/gomme d'acacia par Weinbreck et al. [220]. Les effets des interactions électrostatiques ont été observés en comparant la viscosité de mélanges de polymères de même concentration à pH 7, où il n'y a pas d'interactions, et à pH 4 où on observe du coacervat. Les résultats ont montré que le pH joue un rôle majeur dans la viscosité du coacervat et que le coacervat à pH 4 est très visqueux comparé à la solution à pH 7. La viscosité du coacervat peut être directement reliée à la force des interactions électrostatiques. [220]. Pour l'effet du ratio sur la complexation des deux biopolymères nous constatons des paramètres rhéologiques faibles pour les ratios 2/1 et 1/1 en raison des faibles interactions électrostatiques par insuffisance de concentration de protéine par rapport au polysaccharide, ces résultats concordent avec ceux de la viscoélasticité où nous avons démontré que les ratios 1/1 et 2/1 n'ont pas présenté des interactions remarquables pouvant conduire à un coacervat de structure rigide.

Les travaux N.Devi 2013 [194] ont eux aussi démontré par analyse de la turbidité et la mesure de la viscosité relative, qu'à de faibles ratios gélatine /alginate , les interactions sont à leur plus faible niveau et ne favorise pas la formation de coacervat les conditions optimales ont été enregistré pour un ratio(Pr :Ps) de 3.5 /1 et à pH de 3.75

D'autre part, yang et al 2012 [214] ont démontré que plus la concentration en gélatine est importante , elle nécessitera une charge moins positive donc un pH plus élevé pour une meilleure formation de complexes électrostatiques, ce qui explique pour le ratio 4/1 le pH de complexation est plus élevé que celui du ratio 3/1.

Pour le paramètre de consistance **K**, Ceci représente l'inverse du la vitesse de cisaillement $1/\dot{\gamma}_C$ c'est-à-dire la vitesse de cisaillement critique à partir de laquelle nous enregistrons un écoulement. Pour ce paramètre on constate que sa valeur est d'autant plus importante dans la zone de pH où la coacervation est maximale et ce pour les différents ratios.

Afin de comparer les paramètres rhéologiques des deux ratios pour lesquels nous avons constaté des résultats intéressants à savoir le ratio 3/1 et 4/1, nous avons présenté des histogrammes de variation de la viscosité initiale de carreau η_0 en fonction du pH (Figures V62 et V63).

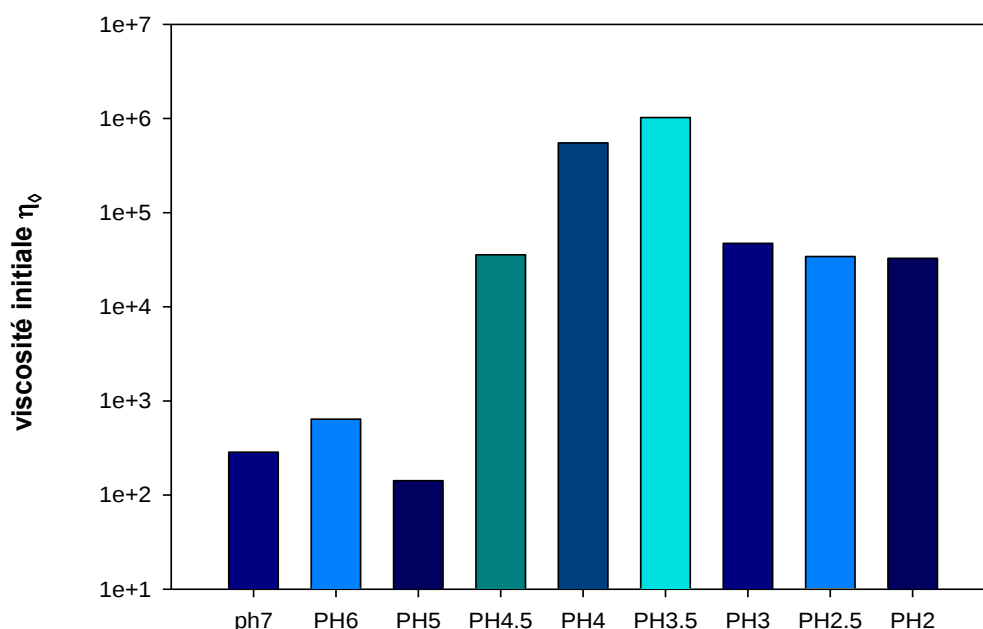
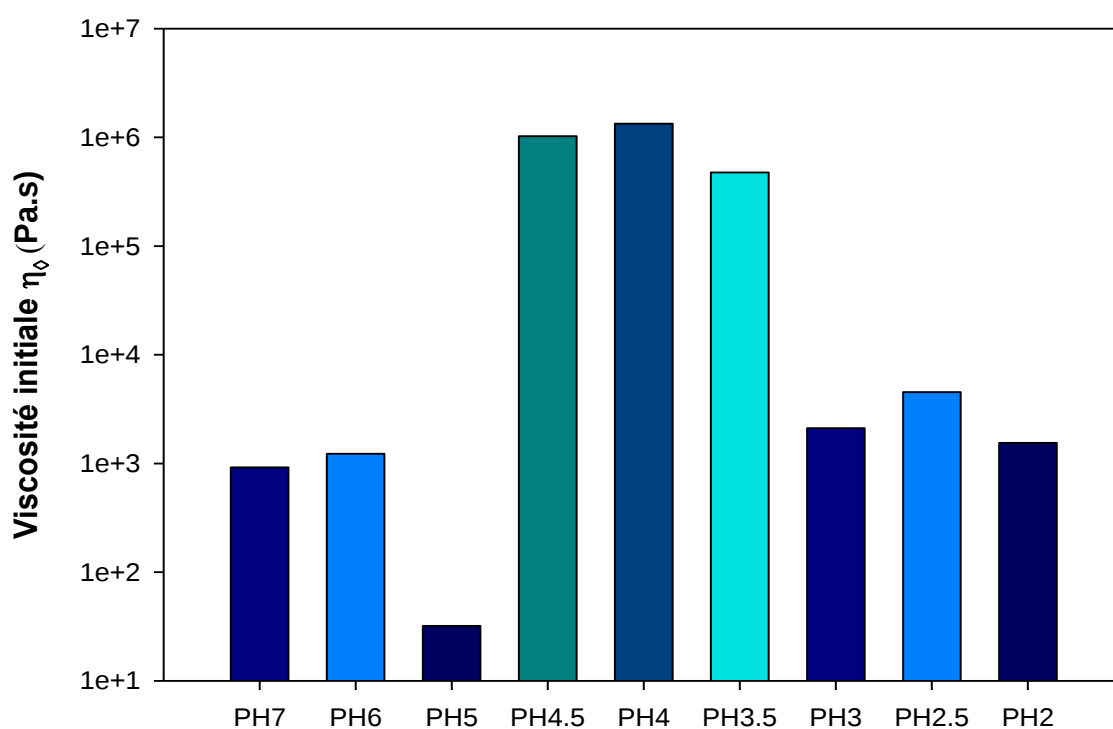


Figure V.62:Variation de la viscosité η_0 de Carreau du ratio R3/1 en fonction du pH



FigV.63 :Variation de la viscosité initiale deCarreau η_0 R4/1 en fonction du pH

L'observation des histogrammes donnant la variation de la viscosité initiale de carreau permet de définir la zone de pH pour laquelle la viscosité enregistre des valeurs maximales, se situant à 3.5 pour le ratio 3/1 et 4 pour le ratio 4/1 .En effet on remarque que la viscosité commence à augmenter à partir d'un pH égale à 4.5 , à ce niveau-là, les interactions commencent à avoir lieu en raison de la protonation de la gélatine, mais elles atteignent leurs maximales au pH sus indiqué c'est-à-dire 3.5 et 4 pour les ratios 3/1 et 4/1 respectivement . À pH plus bas nous constatons une réduction progressive de la viscosité en raison de la diminution des interactions dus à l'hydrolyse de l'alginate en acide alginique

D'autre part, nous avons tracé la variation des viscosités en fonction de la vitesse de cisaillement à différents pH et ce pour les ratios 3/1 et 4/1 (figure V.64 et V65). Ces figurent confortent les résultats précédents et mettent en évidence des valeurs de viscosité plus importantes enregistrées à pH 3, 3.5 et 4 pour le ratio 3/1 et à pH 3.5, 4 et 4.5 pour le ratio 4/1.

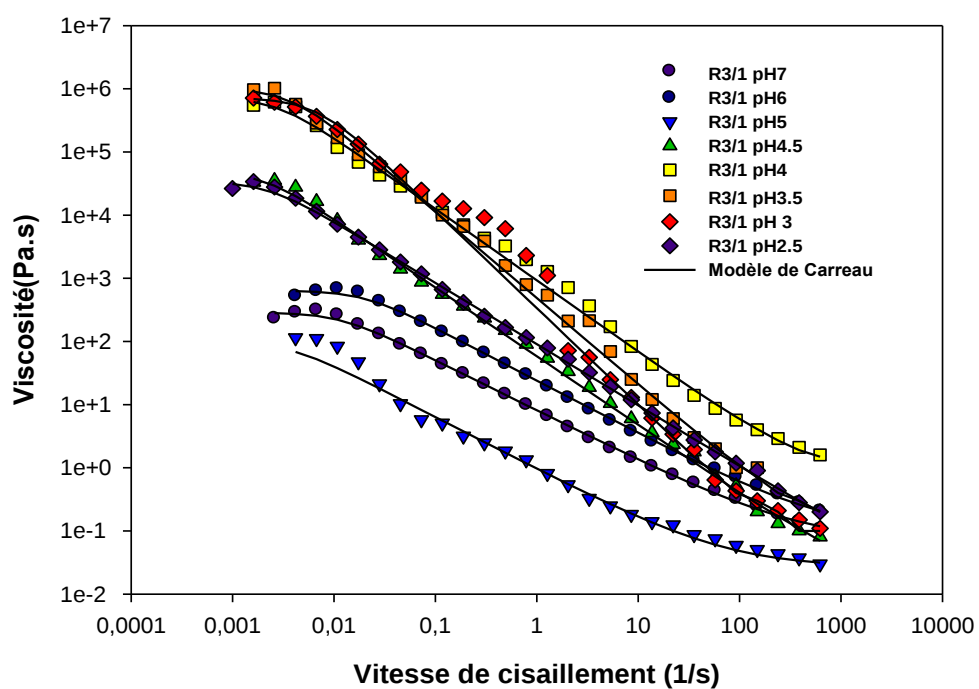


Figure V.64 : Variation de la viscosité en fonction de la vitesse de cisaillement pour R3/1 à différents pH

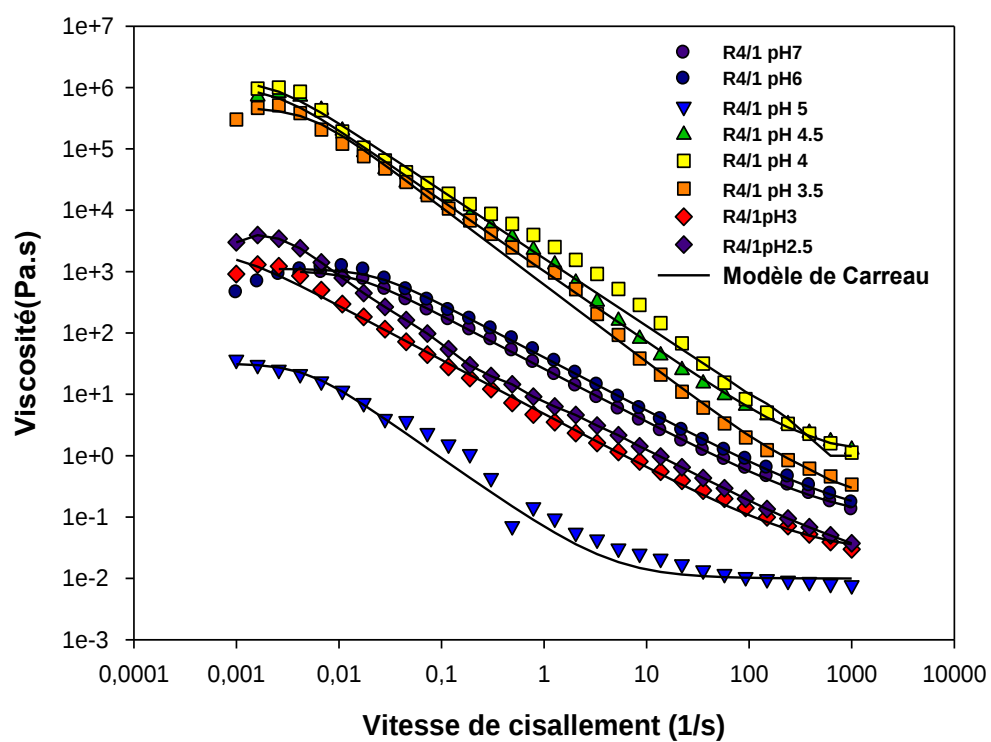


Figure V.65 : Variation de la viscosité en fonction de la vitesse de cisaillement pour R4/1 à différents pH

V.II.6. Caractérisation granulométrique du mélange gélatine/ alginate de sodium

L'analyse de la taille des particules par la technique de diffraction laser montre une large variation du diamètre moyen D32 en fonction du pH et du ratio gélatine /Alginate (Figure V.66). Des agrégats micrométriques de l'ordre de 40 μm commencent à apparaître pour le ratio gélatine / alginate R4/1 à partir d'un pH égale à 4.5, alors que pour les autres ratios ces agrégats sont plus petits à cette valeur de pH. Des tailles maximales d'agrégats sont visualisées à pH 3,5 pour les ratios 3/1 et 4/1 et à des pH plus bas 2.5 et 2 pour les ratios 2/1 et 1/1.

Ceci s'explique par les interactions électrostatiques attractives ayant lieu entre les groupements amines de la gélatine et les groupements carboxyliques de l'alginate ce qui a été expliqué par les travaux de P.R. Sarika et al [224], ayant étudié le complexe formé par la gélatine cationisée et un polysaccharide similaire la gomme arabique.

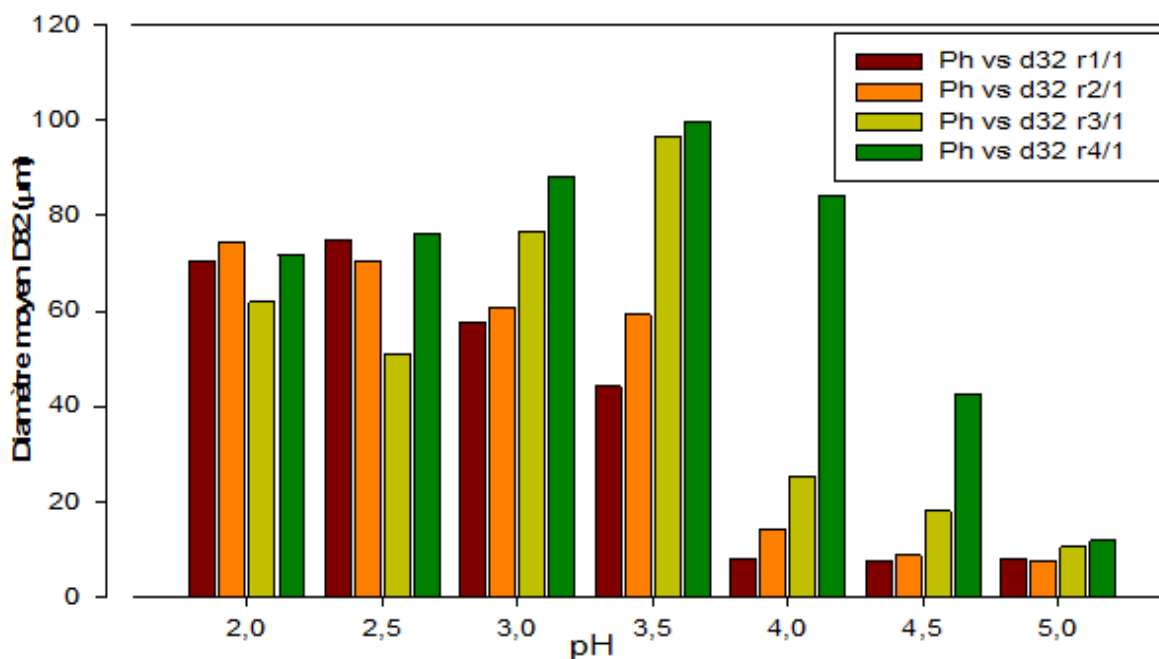


Figure V.66 : Variation du diamètre moyen en fonction du pH et à différents ratio

Les travaux de P.R. Sarika [192], sur le complexe Pectine-gélatine et alginate-gélatine ont obtenu des tailles granulométriques proches entre 94,6 et 82,3 μm pour des microcapsules non chargées en principe actifs (indométacine et diclofenac) et de l'ordre de 120,94 et 110,64 μm pour des microparticules chargées en PA .

V.III. Préparation des microcapsules par le procédé de coacervation complexe

Dans cette partie d'étude, nous rapportons la préparation des microcapsules par la technique de coacervation complexe de la gélatine avec l'alginate de sodium enrobées par un troisième polymère le chitosane, pour une administration prolongée d'un médicament antihypertenseur l'Acébutolol, par le procédé d'émulsification et réticulation par le formaldéhyde.

Le procédé de coacervation complexe fait appel au complexe de polyélectrolytes pouvant résulter d'un mélange de charge opposée de polyélectrolytes en solution aqueuse. En effet l'interaction électrostatique est une force motrice pour former un complexe entre le polycation et le polyanion. La formation du complexe polyélectrolyte dépendant de nombreux facteurs, notamment la masse moléculaire, la concentration en polymère, le rapport des deux polyélectrolytes en interaction, la force ionique et le pH de la solution et la température. Les conditions optimales pour la formation du coacervat (alginate de sodium / gélatine = 1/ 3 et 1/4 pH = 3,5 et 4) ont été évaluées et déduites à partir de la deuxième partie d'étude à savoir l'étude des mélanges binaires protéines/ polysaccharides, en déterminant la turbidité et la viscosité de carreau η_c , le potentiel zéta ζ à différents rapports de l'alginate de sodium à la gélatine et à différents pH.

Les microcapsules obtenues sont caractérisées par différentes techniques tel que la microscopie optique et le MEB, la spectroscopie à Infrarouge. Sur le plan libération de PA, une cinétique de dissolution a été réalisé en milieu tampon phosphate pH 6.8 afin d'évaluer les vitesses et les mécanismes de libération mis en jeu.

V.III.1 Le rendement et taux d'encapsulation

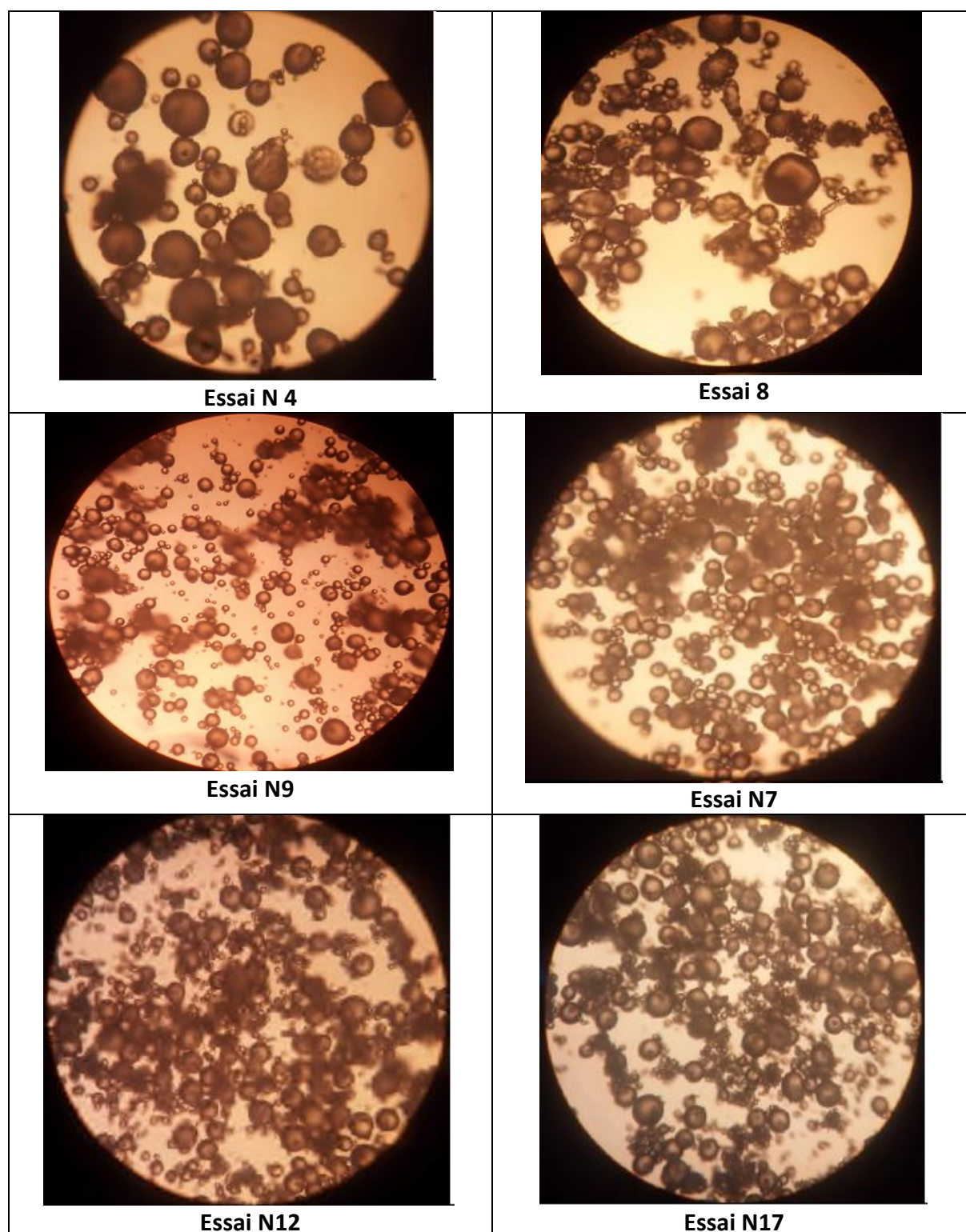
Le rendement et le taux d'encapsulation ont été calculés par les formules décrites en matériels et méthodes et sont présentés dans le **tableau XXIII** (page 196).

V.III.2. Aspect au microscope optique et Microscope électronique à balayage (MEB) des essais

a. Caractérisation par microscopie optique

Les particules formées lors de notre étude ont subi une caractérisation microscopique avec un grossissement (**G : X 10**). Les résultats sont présentés sur le **tableau XX**.

Tableau XX : Aspect microscopique des microparticules obtenues (G :X10)

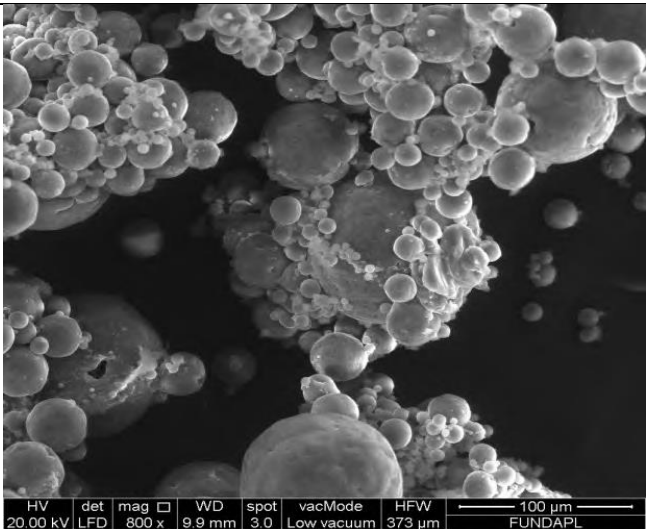
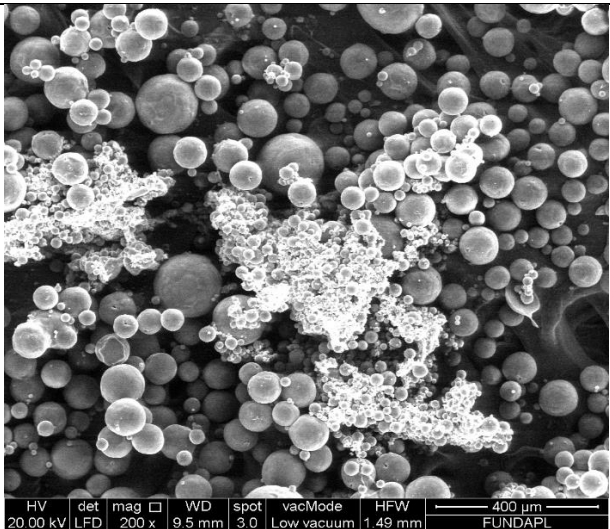
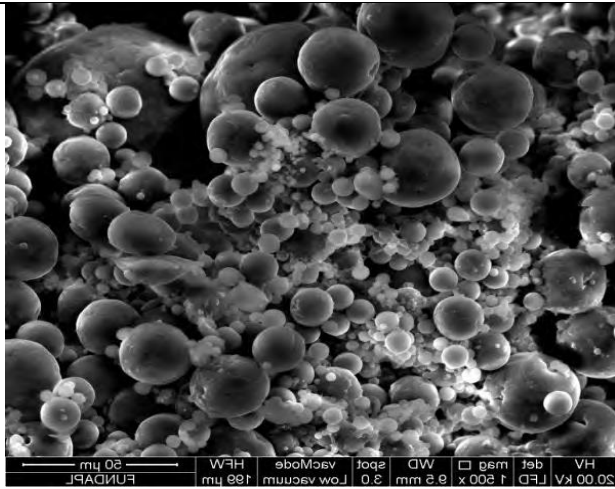
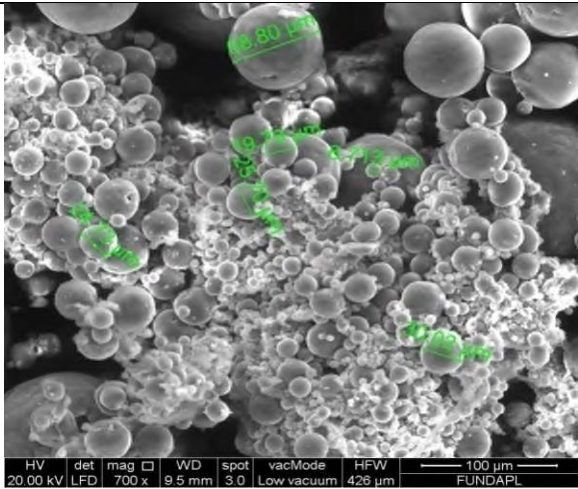


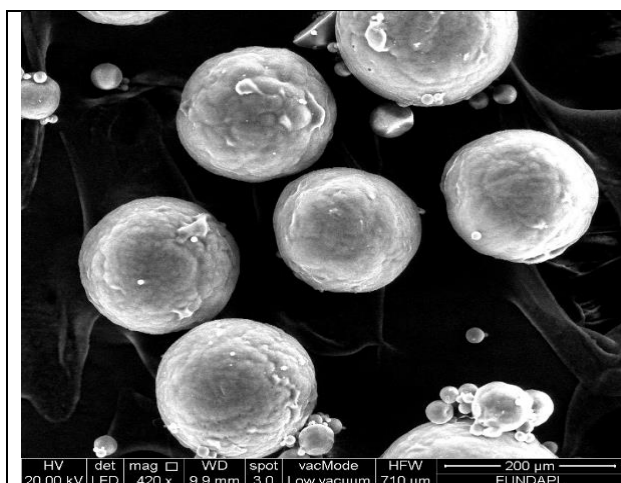
Les photos microscopiques mettent en évidence la Présence de microparticules sous forme Sphérique, de couleur blanchâtre et lisse, et de taille relativement différentes ; La taille des microparticules est d'autant plus régulière et augmente avec la concentration globale en polymère et aussi le ratio.

b. Caractérisation par microscopie électronique à balayage (MEB)

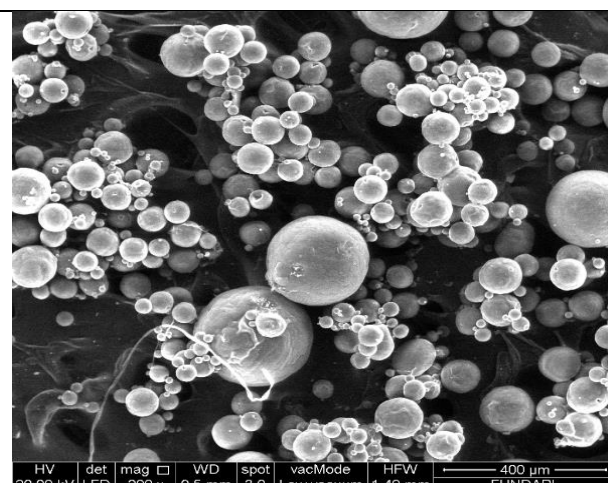
Afin de déterminer la morphologie (la forme et la taille) des particules formées lors de notre étude, nous avons réalisé une caractérisation par microscopie électronique à balayage (MEB). Les résultats obtenus sont présentés sur le **tableau XXI**. L’analyse MEB permet de visualiser la morphologie des microcapsules et la taille de celles-ci. Ces dernières sont sphériques avec une surface lisse pour l’ensemble des essais préparés.

Tableau XXI : Aspect microscopique MEB des microparticules obtenues

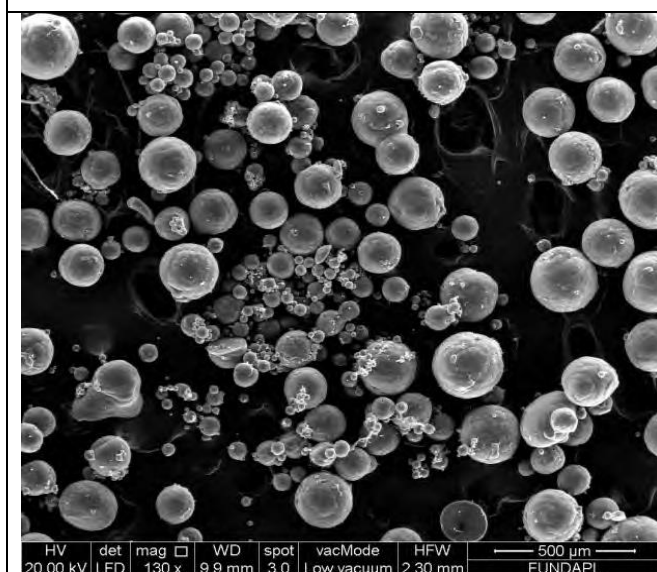
 Essai 12	 Essai 15
 Essai 7	 Essai 9



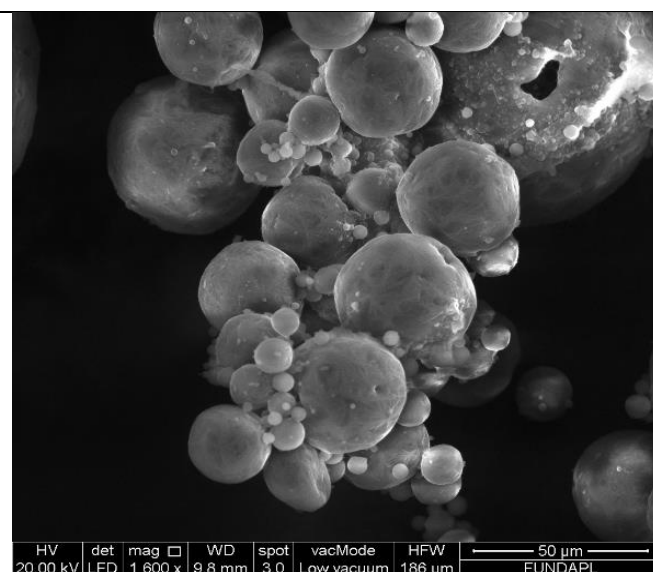
Essai 4



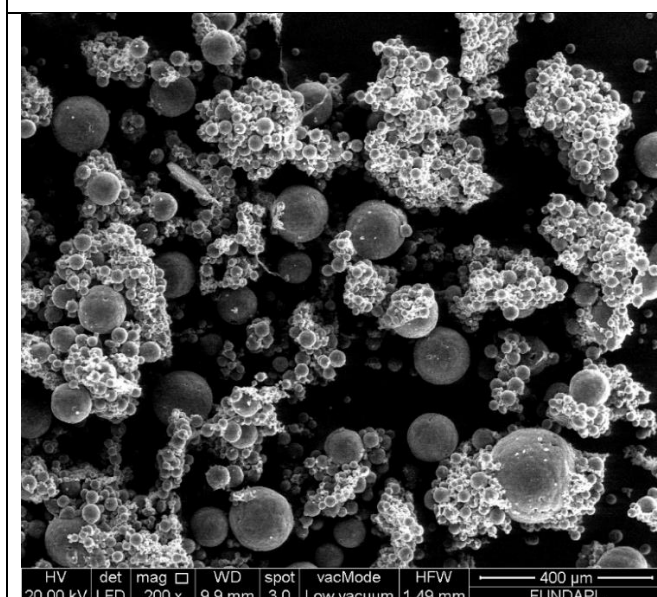
Essai 8



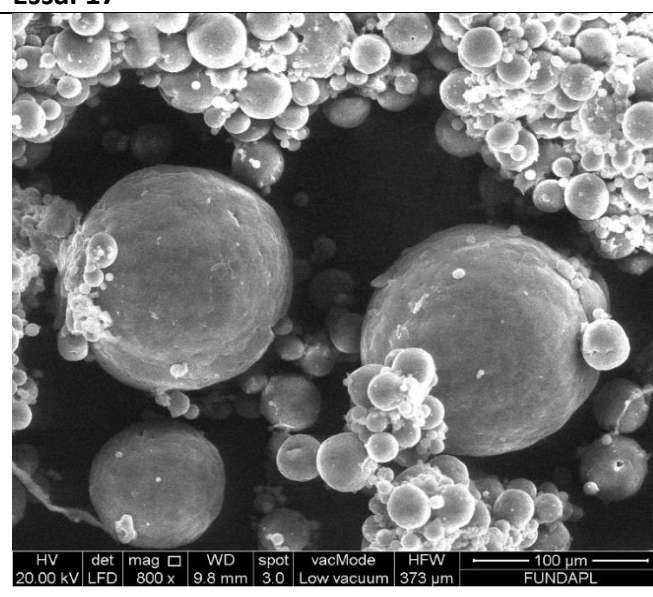
Essai 10



Essai 17



Essai 16



Essai 15

V.III.3. Cinétique de dissolution avec modélisation

La caractérisation des cinétiques de dissolution des différents essais à pH 6.8 (milieu intestinale simulé) a révélé un profil de libération de type libération prolongé (figure V.69)

Sur ce profil il apparait clairement que la quantité de PA libérée, évolue sur une échelle de temps et s'achève au bout de 8 heures. L'allure de la courbe est en forme d'hyperbole, ce qui laisse supposer un type de libération exponentiel et non pas linéaire.

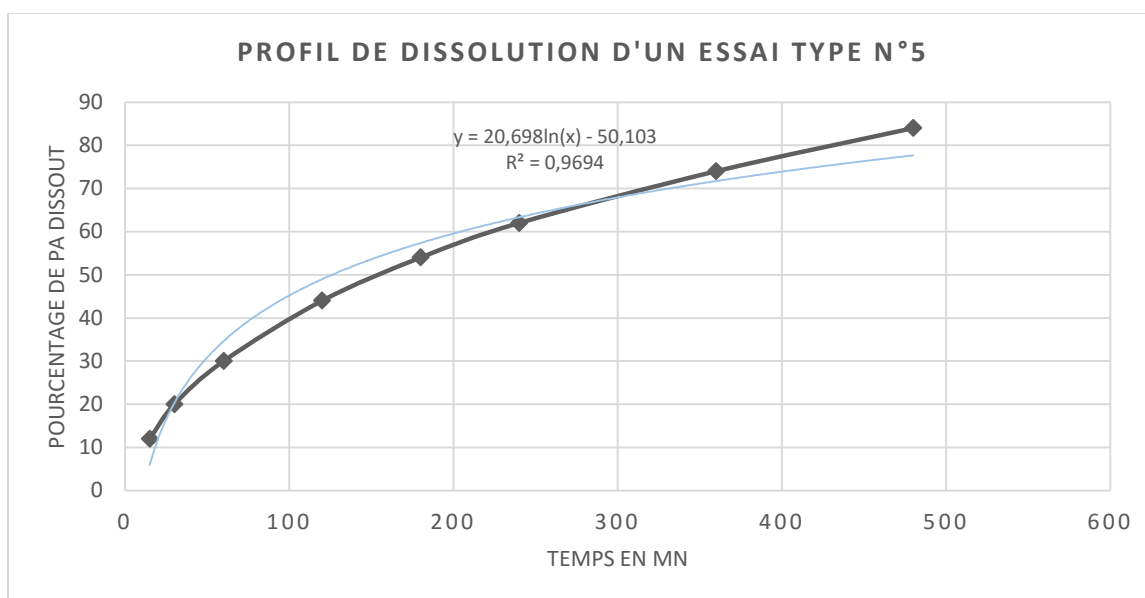


Figure V.67 : Profil de dissolution d'un essai type de microencapsulation par coacervation (N°5)

Afin d'élucider les mécanismes de libération du PA Acébutolol à partir des microcapsules formulées, nous allons procéder à l'ajustement mathématique par des modèles mathématiques de dissolution rapportés par la littérature.

Il existe un nombre non négligeable de modèles décrivant les cinétiques de libération d'un principe actif à partir de sa forme pharmaceutique. En effet les changements qualitatifs et quantitatifs dans une formulation peuvent altérer la libération in-vivo d'un principe actif et le développement d'outils mathématiques performant qui facilitent et réduisent les bio-études sont toujours désirés. A cet égard l'utilisation de technique in vitro pour prédire la bio-performance in-vivo peut être considérée comme une approche rationnelle dans le développement des formulations à libération prolongées [197,226].

En ce qui concerne notre étude plusieurs modèles de cinétique de dissolution ont été emprunté pour tenter d'expliquer les phénomènes et mécanismes de libération mis en jeu dont

- Le modèle d'ordre zéro :

$$Q_t = Q_0 + k_0 t.$$

Ce modèle définit un processus de libération constante du principe actif à partir de sa forme médicamenteuse ce qui traduit une vitesse constante tout au long de la durée de livraison du PA.

Où Q_t est la quantité de principe actif libérée, Q_0 est la quantité initiale de principe actif libérée et k_0 est la constante d'ordre zéro.

- Le modèle d'ordre 1 Ce modèle a été utilisé pour décrire l'absorption et ou l'élimination de certains médicaments il décrit la dissolution de PA pharmaceutique à partir de forme à libération prolongée contenant un actif soluble et une matrice poreuse.
- Le modèle d'Higuchi (simplifié) :

$$Q_t = K_h \times t^{1/2}$$

Il fut le premier modèle mathématique décrivant la libération d'un principe actif à partir d'une matrice il a été proposé initialement par Higuchi en 1961 conçu pour les systèmes plans ensuite il a été étendu aux différents système géométrique et poreux, il est s'applique à plusieurs formes pharmaceutiques à libération modifiée comme les systèmes transdermiques et les matrice à principe actif soluble .

Où Q_t est la quantité de principe actif libérée, et K_h est la constante de Higuchi

- Le modèle de Krosmeier Peppas et al 1983 ont déduit une relation simple qui décrit la libération de médicament à partir d'un polymère où il fait intégrer les données de 60% de libération de PA. Dans ce modèle la valeur de n caractérise le mécanisme de libération du médicament , lorsque n est inférieur à 0.45 il correspond à un mécanisme de diffusion fickienne , lorsque n est compris entre 0.45 et 0.89 le transport suit un mécanisme de diffusion non fickienne , lorsque n

est égale à 0.89 les transport est relaxant ou case II , lorsque n est supérieur à 0.89 les transport est dit super case II.

$$\bullet \frac{Q_t}{Q_0} = K_{kp} t^n$$

- **Qt/Q0** : pourcentage du PA dissout /quantité initiale
- K_{kp} : constante de vitesse krossmeyer Peppas
- n : exposant traduisant le mécanisme de dissolution

Après modélisation mathématique par les modèles cités dessus, moyennant le logiciel « **STATISTICA** » selon une estimation non linéaire basé sur une méthode de déplacement de la structure de HOOKE- JEEVES , nous avons obtenus les résultats en terme de coefficient de détermination (R^2) présentés dans le **tableau XXII** ainsi que les profils ajustés par ces modèles (**Figure V.70,71,72,73,74**) et ce pour un essai type N°1(les autres essais figurent en annexe).

Les modèles mathématiques les plus représentatifs sont les modèles de Weibull et celui de Krossmeyer peppas avec un coefficient (R^2) le plus proche de 1.

Tableau XXII : Coefficients de détermination R_2 et paramètres des modèles de dissolutions

Le modèle	Coefficient de détermination R^2	Paramètres caractéristiques des modèles
Modèle d'ordre zéro	0.91	$K_0= 0.185$
Modèle d'ordre un	0.88	$K_1=14$
Modèle de Higuchi	0.90	$K_h=2.97$
Modèle de Weibull	0.96	$a=0.24,$ $b=0.1$
Modèle de Cross Meyer Peppas	0.99	$K_{kp} = 1.6$ $n = 0.64$

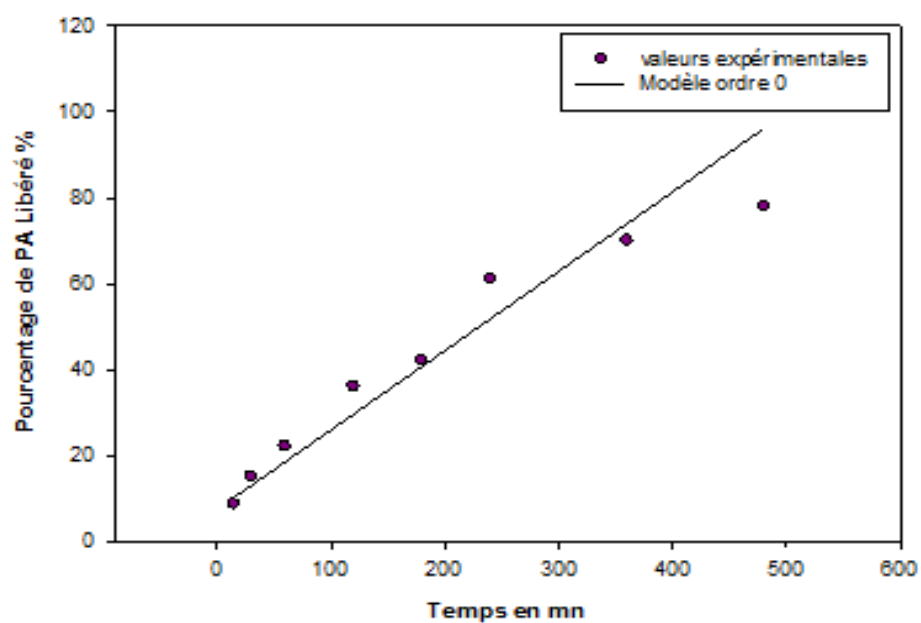


Figure V.68 : Cinétique de dissolution d'un essai type n°1 ajusté par un modèle d'ordre zéro

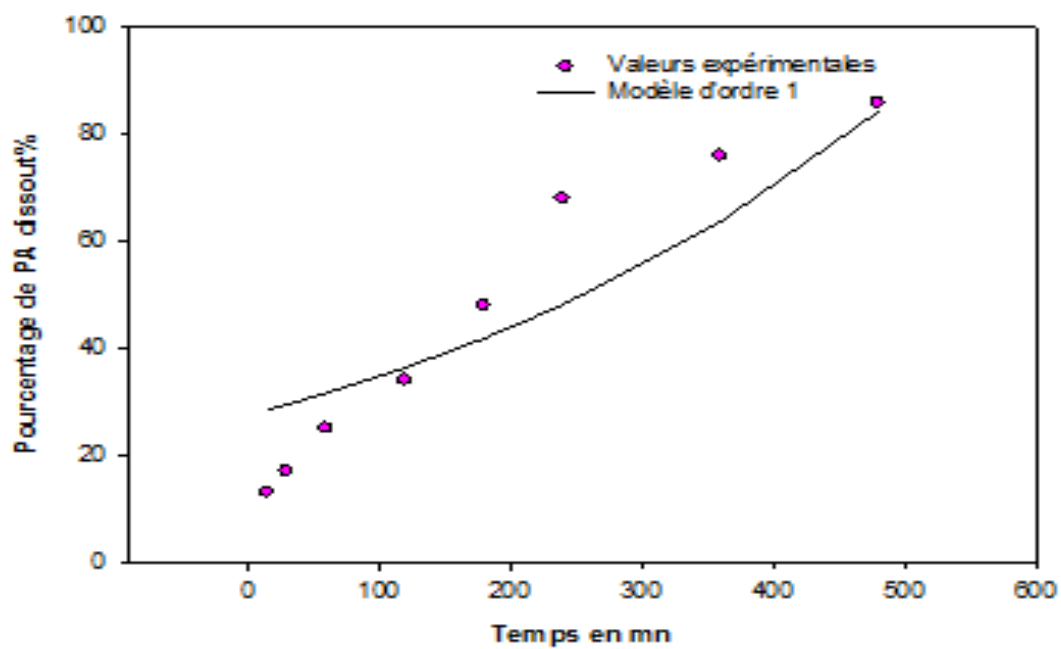


Figure V.69 : Cinétique de dissolution d'un essai type n°1 ajusté par un modèle d'ordre 1

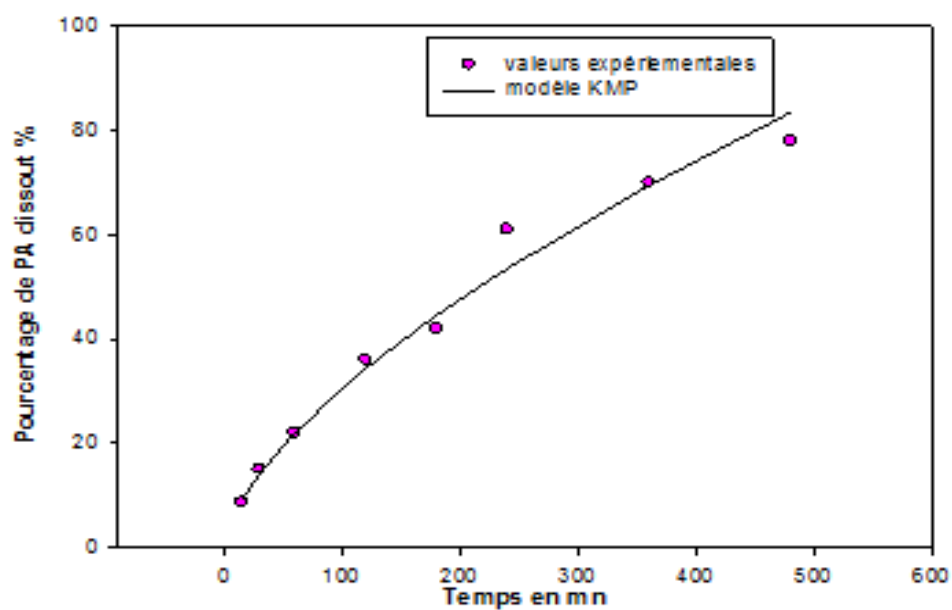


Figure V.70 : Cinétique de dissolution d'un essai type n°1 ajusté par le modèle de KrossMeyer Peppas

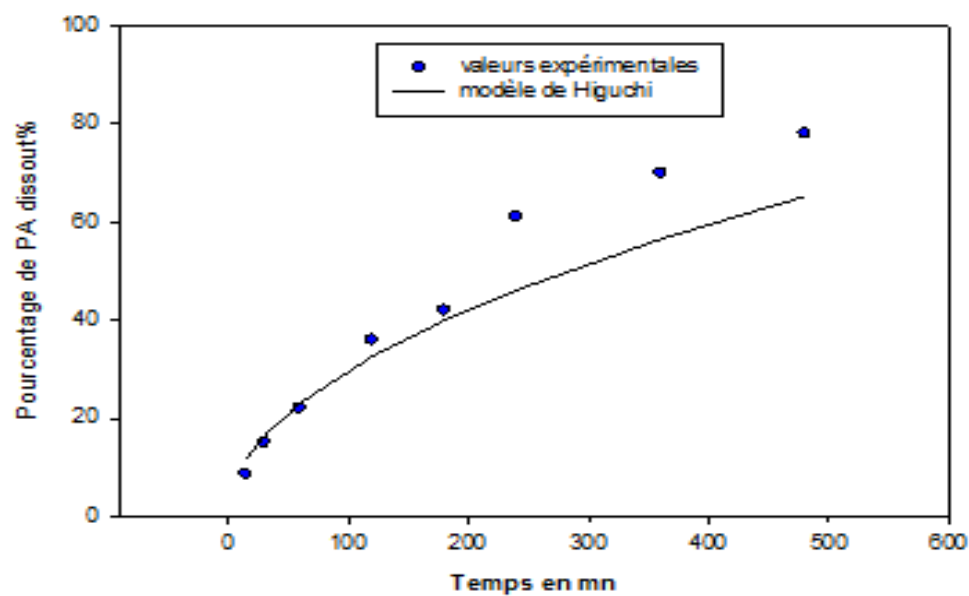


Figure V.71 : Cinétique de dissolution d'un essai type n°1 ajusté par un modèle de Higuchi

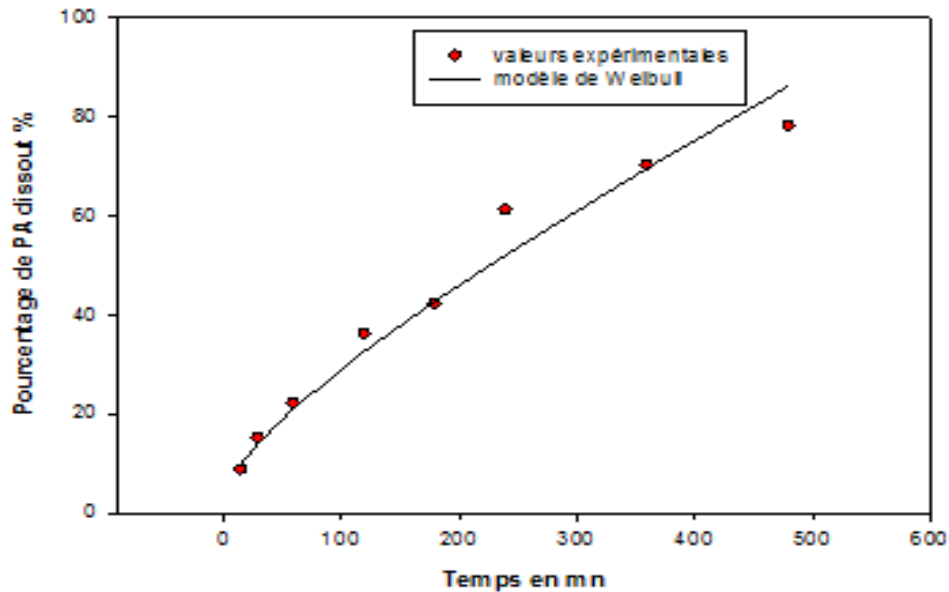


Figure V.72 : Cinétique de dissolution d'un essai type N° 1 ajusté par le modèle de Weibull

V.III.4. Comportement viscoélastique des mélanges de polymères

La Figure (figure V.73) illustre l'évolution des deux modules de conservation et de perte, G' et G'' , en fonction de la déformation, d'un des essais du mélange polymérique alginate de sodium et gélatine, du plan d'expériences. Dans le domaine où le gel se comporte comme un corps visco-élastique linéaire (LVE), auquel cas G' et G'' sont insensibles à la déformation (constants), on remarque que $G' > G''$. Donc, les gels exhibent le comportement d'un solide viscoélastique. En dehors du domaine du LVE, G' commence à diminuer pour intercepter G'' au point gel ($G' = G''$). Au-delà de ce point, G'' devient supérieur à G' , ce qui a pour conséquence une inversion du comportement rhéologique d'un solide viscoélastique à un liquide viscoélastique non linéaire avec un caractère plastique. Dans ce cas de figure, les déformations importantes ne sont plus récupérables totalement.

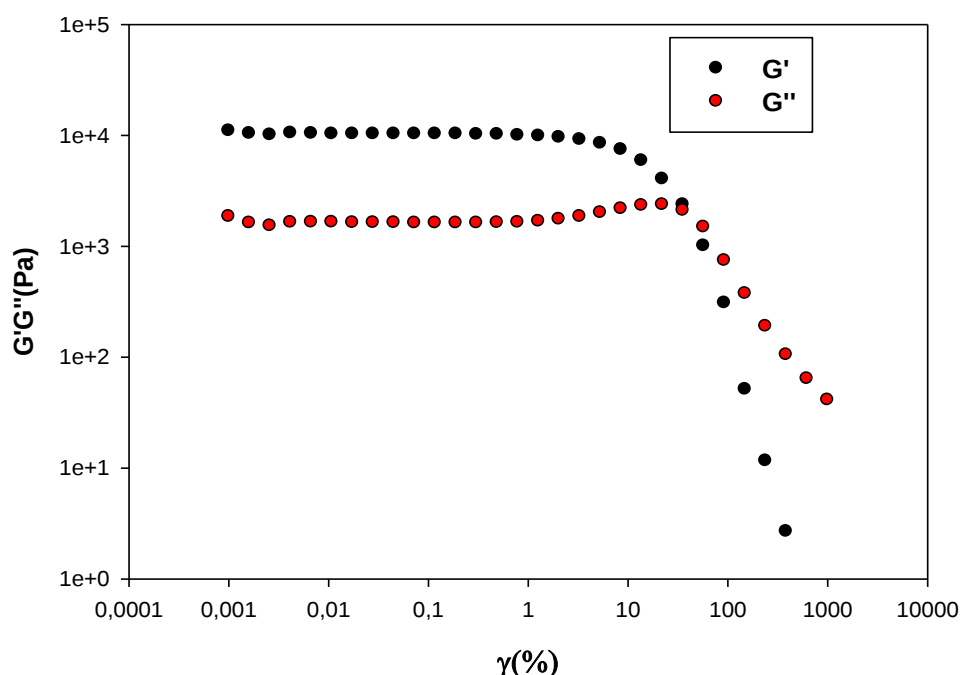


Figure V.73.variation du module de perte et module de conservation pour essai N°4 en fonction de la déformation

V.II.5 Caractérisation par spectroscopie à infrarouge des microcapsules

Les spectres infrarouges de l'alginate, de la gélatine et du principe actif sont présentés dans les figures V.10, V.11 et V.12 (page 133 et 134). Par rapport à ces spectres le spectre du coacervat de gélatine et d'alginate présente des caractéristiques similaires, il varie uniquement en intensité en raison de la concentration des composés utilisés dans les formulations

Dans le spectre de l'alginate nous avons identifié une bande à une valeur de longueur d'onde de 1610 cm^{-1} qui indique le groupement C=O. Dans le spectre de la gélatine il est possible d'observer une bande caractéristique du groupe amide à la longueur d'onde de 1545 cm^{-1} .

Les pics caractéristiques du principe actif sont retrouvés dans le spectre ce qui indique la présence du principe actif.

Selon Saravanan et Rao [192] et Santos et al [227], lors d'une coacervation complexe les groupes carboxyle dans le polysaccharide et les groupes amine de la protéine interagissent, formant un groupement amide qui apparait à une longueur d'onde environ de 1650 cm^{-1} , qui est observée dans la figure (Fig :V.74)

Devi et al [194] eux aussi ont observé la présence du groupement amide dans les microcapsules chargées en acide ascorbique obtenues par coacervation complexe de gélatine et l'alginate de sodium.

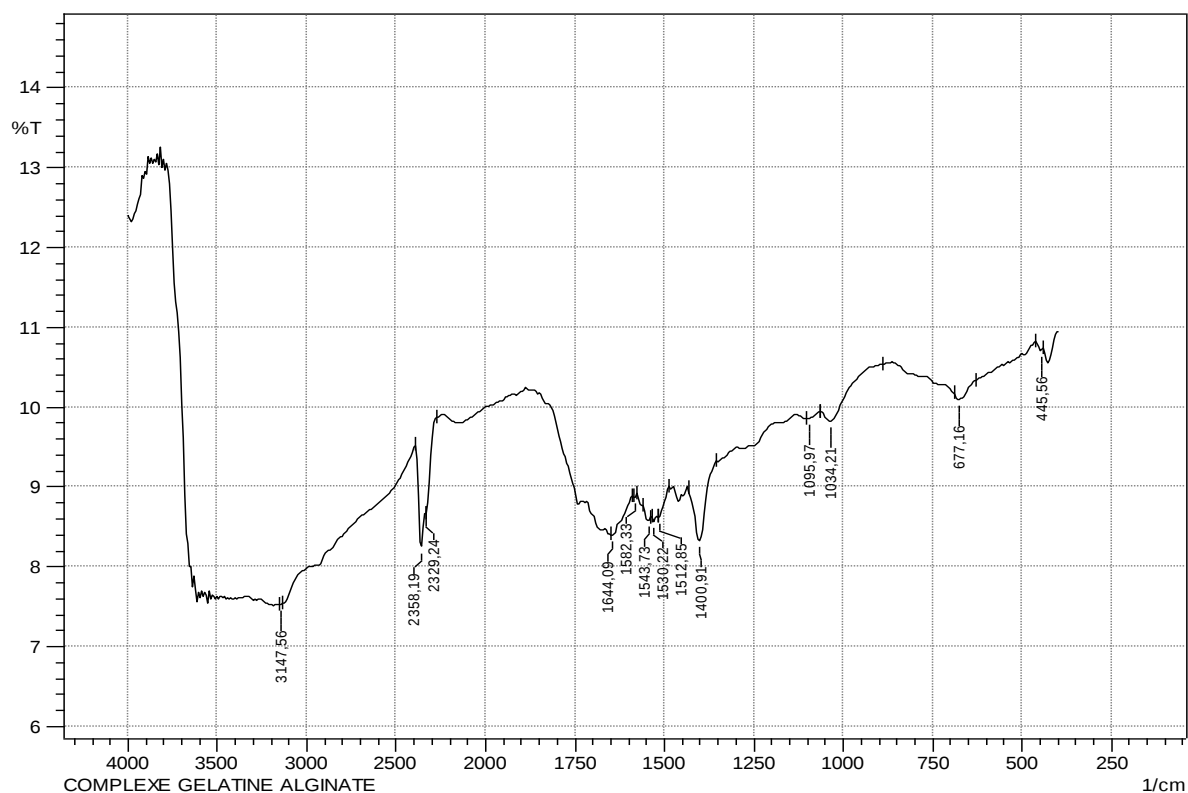


Figure V.74.a: Spectre infrarouge des microcapsules obtenues par coacervation de gélatine et alginate de sodium sans PA

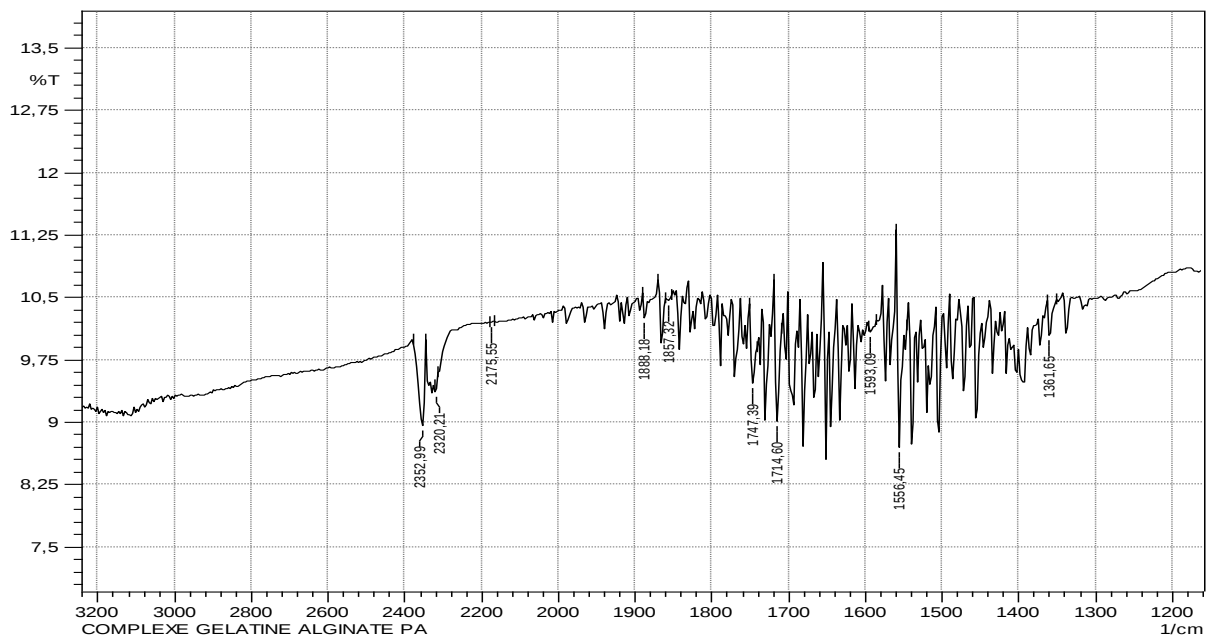


Figure V.74.b: Spectre infrarouge des microcapsules obtenues par coacervation et chargées en PA

V.III.6. Modélisation en surface de réponses

La modélisation en surface de réponses consiste en fait à calculer les coefficients des différents polynômes de réponses par la méthode PLS (Partial Least Square), en s'appuyant sur les résultats des différentes analyses effectuées sur les essais, qui sont les paramètres du modèle de dissolution ; les paramètres du test de viscoélasticité ainsi que les rendements et les taux d'encapsulation. Sur le **Tableau XXIII** sont consignées les valeurs de ces réponses en fonction du numéro des essais de la matrice d'expériences.

En termes de résultats de dissolution nous avons retenu les paramètres du modèle de Krossmeyer Peappas à savoir :

- La constante de vitesse K_{kh} qui traduit la vitesse de libération du PA à partir de la matrice plus celle-ci augmente plus la libération est rapide et inversement.
- L'exposant n qui traduit le mécanisme de libération (libération fickienne lorsque il est compris entre 0 et 0.45 et libération non fickienne lorsqu'il est compris entre 0,45 et 0,89)

Pour ce qui est de la caractérisation rhéologique, nous avons retenu les paramètres de viscoélasticité G' et G'' .

Tableau XXIII : Valeurs des réponses retenues des essais de la matrice d'expérience

N° D'exp	Paramètres du modèle de dissolution de Krossmeyer Peppas			Paramètres du test de viscoélasticité		Rendement %	Taux d'encapsulation %
	Constante de vitesse K	Exposant n	R ²	Module de conservation G' (Pa)	Module de perte G''(Pa)		
Essai 1	9,03	0,39	0 ,99	1,53	0,289	21,52	32,89
Essai 2	9,02	0,38	0 ,98	10,4	0,269	28,57	28,8
Essai 3	5,02	0,47	0 ,98	4500	721	32,5	60,01
Essai 4	2,46	0,57	0 ,98	3500	689	52,03	58,3
Essai 5	7,75	0,42	0 ,98	1,84	0,539	26,08	30,42
Essai 6	8,67	0,39	0 ,99	13,6	4,26	27,91	34,6
Essai 7	4,7	0,48	0 ,98	4450	532	33,56	55,8
Essai 8	1,6	0,64	0 ,99	4010	669	48,32	64,8
Essai 9	4,92	0,48	0 ,99	5840	922	59,4	62,9
Essai 10	2,07	0,6	0 ,99	9700	817	49,5	57,3
Essai 11	7,42	0,43	0 ,98	12,2	3,52	40,8	37,4
Essai 12	1,99	0,6	0 ,98	3850	765	51,05	57,8
Essai 13	2,88	0,56	0 ,98	204	34,9	51,56	60,4
Essai 14	2,9	0,55	0 ,99	225	28,9	39,27	59,2
Essai 15	2	0,62	0 ,99	6798	888	46	61,2
Essai 16	1,99	0,63	0 ,99	6440	634,7	48,67	58,5
Essai 17	2,25	0,61	0 ,99	7920	732	54,64	59,89

Afin d'évaluer la qualité des modèles de RSM au sens statistique, nous présentons le pourcentage des cinq indicateurs de qualité, à savoir le coefficient de prédiction Q_2 , le coefficient de détermination R_2 , la validité du modèle (Model Validity) et la reproductibilité. Il apparaît clairement que la qualité du modèle RSM des paramètres de réponses retenus, sont satisfaisant pour toutes les réponses à l'exception du modèle de validité pour la constante de vitesse, ce qui témoignent de la bonne qualité descriptive des modèles.

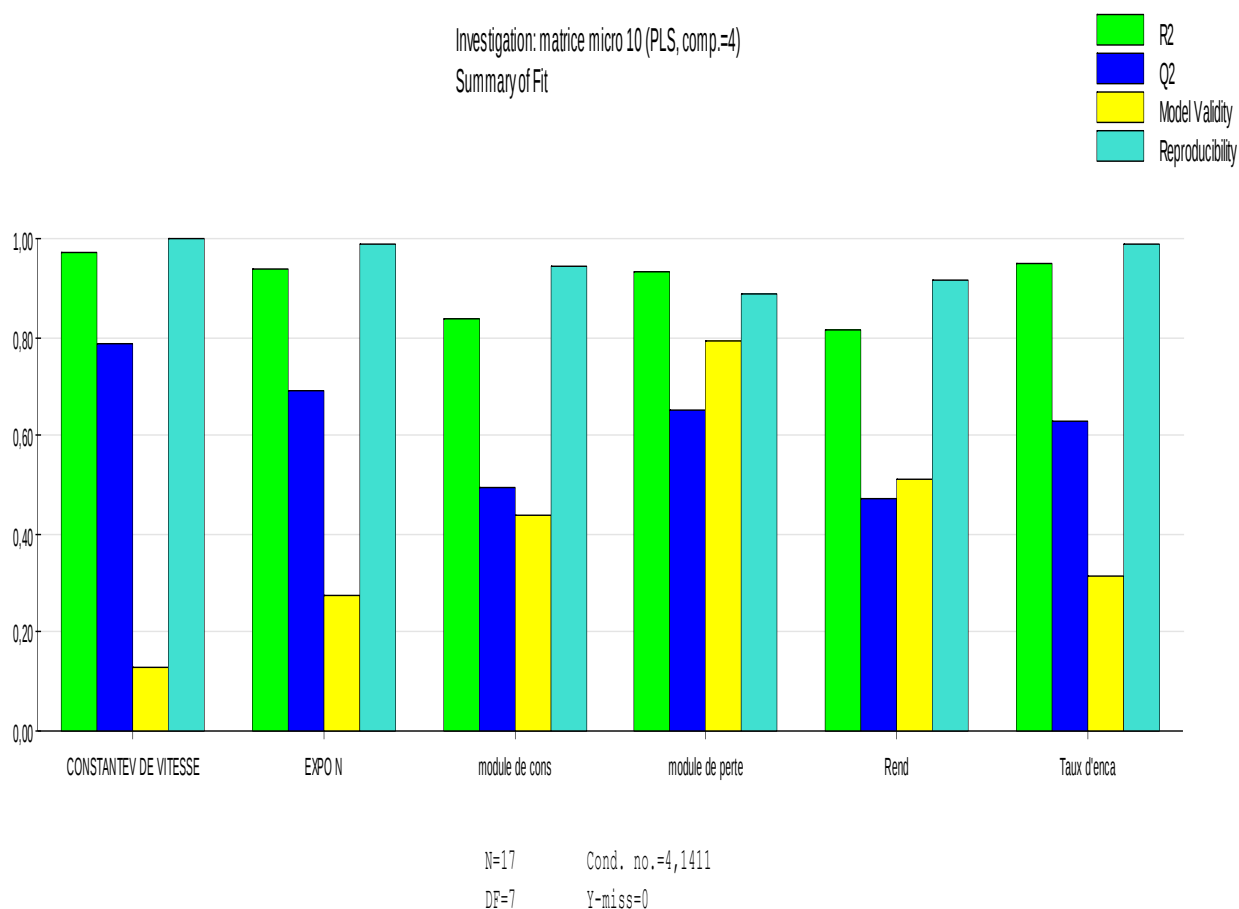


Figure V.75 Histogramme illustrant les indicateurs de qualité au sens statistique des réponses

❖ Les contours iso-réponses

On peut schématiser les contours iso- réponses en fonction de la variation simultanée des facteurs à savoir la concentration du polymère et le ratio en maintenant le troisième facteur la concentration du chitosane à sa valeur médiane.

a. La constante de vitesse K_{kp}

Nous représentons dans la **figure V.76**, le contour iso-constante de vitesse en fonction de la variation simultanée de deux facteurs le ratio Gélatine/Alginate et la concentration totale en polymère en fixant le troisième facteur concentration en chitosane à sa valeur médiane.

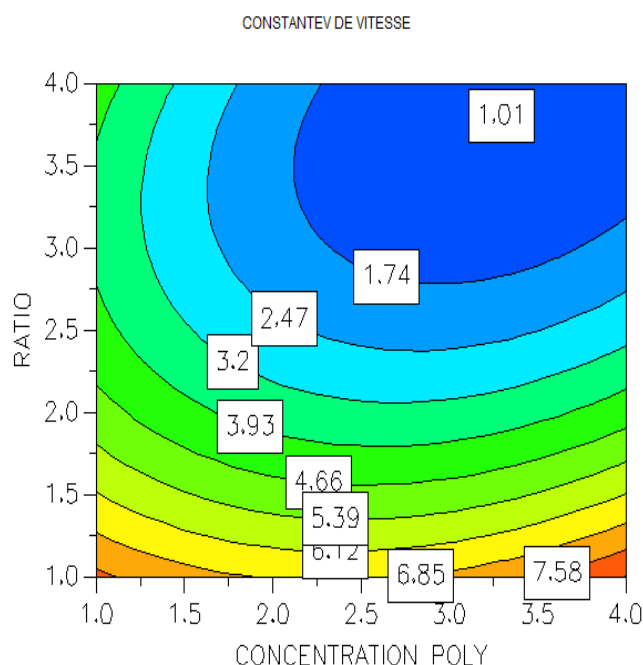


Figure V.76 : Contours iso- K_{kp} en fonction de la variation simultanée des deux facteurs **Con_{poly}** et **Ratio Gél/Alg**

A partir de cette **figure V.76**, On distingue clairement que le ratio Gélatine /Alginate gouverne la variation de la constante de vitesse K_{kp} . Plus le ratio est important plus la constante de vitesse diminue et donc la libération de PA à partir des microcapsules est ralentie, alors que pour des concentration importante en polymère avec de faible ratio, la vitesse de libération augmente ;Ceci nous amène à déduire que la diminution de la vitesse de libération nécessite une action conjuguée d'un ratio important et une concentration en polymère importante .

En effet à pH 3.5 (condition de l'expérimentation) la gélatine possède une charge positive nette après fixation d'ions H^+ [192], et serait favorable à une interaction électrostatique avec l'alginate de sodium et plus la quantité en gélatine est importante plus les interactions sont considérables et le réseau formé est plus rigide et compacte favorable à une libération de plus en plus ralentie.

Afin d'étudier l'effet de concentration du chitosane sur la vitesse de libération du PA, Nous avons présenté les contours iso-constante de vitesse Krossmeyer Peppas à faible et à haute concentration en chitosane (figure V.77 et figure V.78)

A partir de ces figures on peut remarquer qu'à de forte concentration de chitosane le gradient de vitesse atteint des valeurs plus réduite (**1.36**) comparé à celui enregistré pour une faible concentration de chitosane (**2.63**) ceci explique la contribution importante du chitosane dans le ralentissement de la libération du PA. Ceci peut être expliqué par l'interaction du chitosane avec l'alginate et la gélatine constituant une enveloppe externe capable de ralentir et contrôler la libération du PA. En effet les groupes ammonium du chitosane et les groupes carboxylate de l'alginate interagissent ioniquement pour former un complexe de nature polyélectrolytique, ce qui va réduire la porosité des gels formés et réduit par conséquent la diffusion des médicaments encapsulés [228].

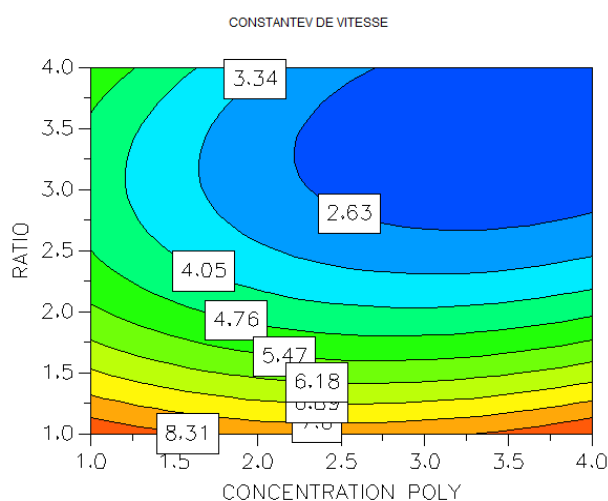


Figure V.77 Contours iso- K_{kp} en fonction de la variation simultanée des deux facteurs Con_{poly} et $Ratio\ Gél/Alg$ à faible concentration de chitosane

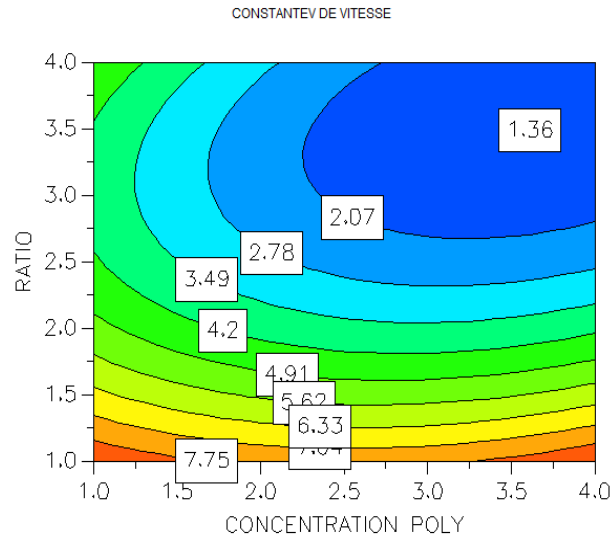


Figure V.78 Contours iso- K_{kp} en fonction de la variation simultanée des deux facteurs Con_{poly} et Ratio Gél/Alg à forte concentration de chitosane

b. L'exposant n du modèle de dissolution krossmeyer Peppas

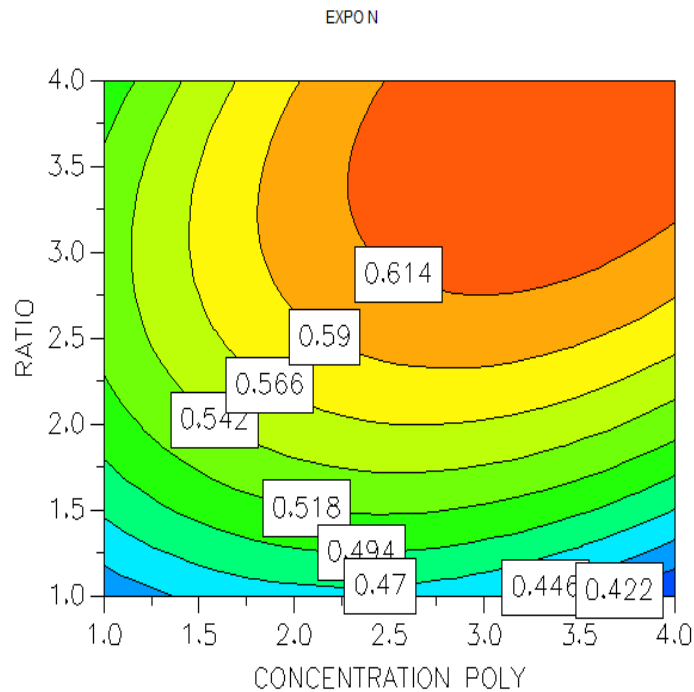


Figure V .79 Contours iso- $Exp\ n$ en fonction de la variation simultanée des deux facteurs Con_{poly} et Ratio Gél/Alg

Nous enregistrant les mêmes constatations émises plus haut, pour l'exposant n du modèle de dissolution Krossmeyer Peppas. Il apparaît clairement que sa valeur augmente avec l'accroissement du ratio mais en générale reste dans l'intervalle à 0.45 0.89 ou le mécanisme de libération est non fickien. Ceci nous amène à dire que la diffusion n'est pas le seul mécanisme qui régit la libération du PA. Par conséquent et en raison de la nature biopolymérique de la matrice qui peut subir une érosion en fonction du temps nous pouvons déduire que la libération du PA à partir des microcapsules est régit par deux mécanismes concomitant : la diffusion fickienne selon le gradient de concentration du PA et la bioérosion suite au gonflement des chaines macromoléculaires des polymères dans le milieu de dissolution.

C. Module de conservation G'

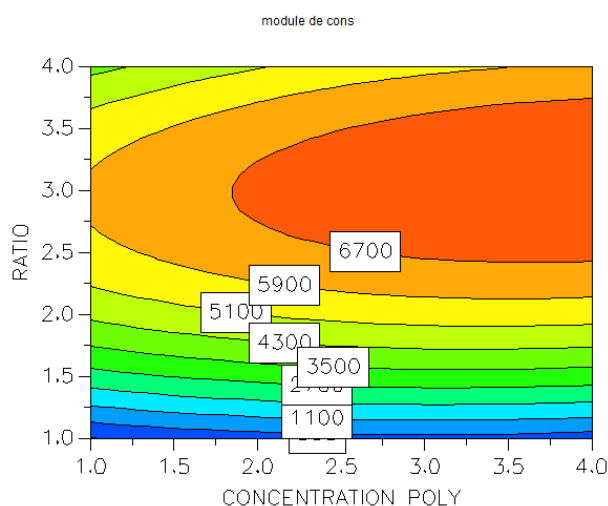


Figure V .80 Contours iso- G' en fonction de la variation simultanée des deux facteurs **Con_{poly}** et **Ratio Gél/Alg**

En ce qui concerne le module de conservation G' , il enregistre une augmentation quasiment verticale dans le sens de l'augmentation du ratio, à condition que la concentration totale en polymère dépasse 2%. Ceci explique que le paramètre ratio présente une grande influence sur la force du gel obtenu et donc par conséquent la rigidité du réseau formé par l'interaction de la gélatine et l'alginate de sodium, comme nous l'avons démontré dans la partie étude des mélanges gélatine alginate de sodium.

d. Taux d'encapsulation

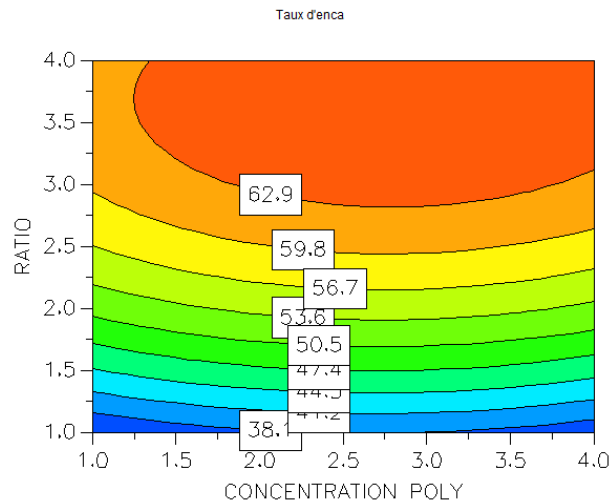


Figure V .81 Contours iso-Taux d'encapsulation en fonction de la variation simultanée des deux facteurs **Con_{poly}** et **Ratio Gél/Alg**

Dans la **figure V.81** qui représente les contours iso-taux d'encapsulation en fonction de la variation de la concentration en polymère et ratio, il est à signaler que le taux d'encapsulation dépend en grande partie du ratio gélatine /alginate de sodium puisque sa valeur augmente avec celle du ratio. Pour un ratio élevé le réseau formé devient de plus en plus rigide et compact avec un degré de réticulation important réduisant ainsi la taille des pores constituant l'espace inter et intra-moléculaire des chaînes polymériques et donc permettra d'emprisonner plus facilement le PA.

E. Rendement d'encapsulation

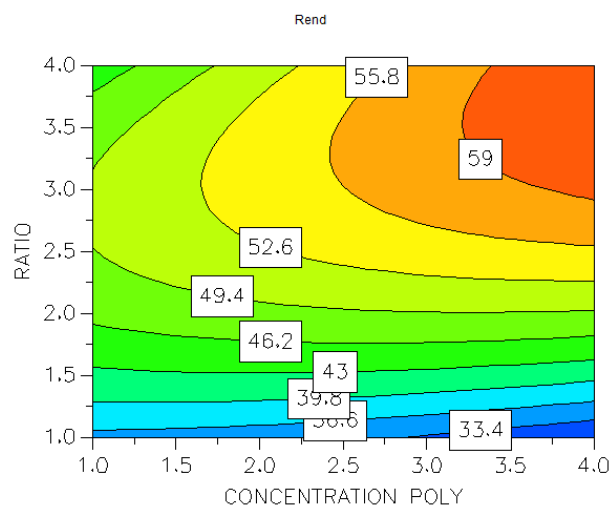


Figure V .82 Contours iso-Rend en fonction de la variation simultanée des deux facteurs **Con_{poly}** et **Ratio Gél/Alg**

En ce qui concerne le rendement d'encapsulation celui –ci semble être influencé par les deux facteurs à la fois, à savoir le ratio et la concentration en polymère. Ceci pourrai être expliqué par la formation d'un complexe gélatine alginate de sodium, moins réticulé apte à former des microcapsules pour des ratios faibles mais de réticulation insuffisante pour emprisonner le PA.

Une augmentation du degré de coacervation a été observée par Mc Mullen et al (1982) [229] et Geok-Lay Koh et al [230], avec l'augmentation de la concentration totale en polymère pour le système pectine-gélatine, expliqué par un effet de masse.

❖ Etude de l'effet des facteurs sur les réponses

○ Coefficients des termes des différents modèles de surfaces de réponses

Les valeurs des coefficients et leurs modèles respectifs sont représentés dans le tableau (XXIV).

Tableau XXIV : Coefficients des termes des différents modèles de surface de réponses

Coefficient du terme	C^{te} de vitesse K	Exposant n	Module de conservation G' (Pa)	Rendement %	Taux d'encapsulation
Cte	2.28	0.59	6636	53.36	60.30
C_{poly}	- 0.62	0.02	476	0.185	0.19
Ratio	- 2.05	0.05	2109	7.99	10.62
C_{chit}	- 0.20	0.009	87.74	1.31	0.05
C_{poly} * C_{poly}	0.57	- 0.02	- 238.40	- 2.19	- 0.40
Ratio * Ratio	1.45	- 0.03	- 2437	- 6.22	- 7.69
C_{chit} * C_{chit}	0.34	- 0.01	188.87	- 5.58	- 0.96
C_{poly} * Ratio	- 0.51	0.02	232.49	4.27	0.47
C_{poly} * C_{chit}	- 0.01	- 0.002	- 129.08	1.59	0.64
Ratio * C_{chit}	- 0.002	0.001	- 1.45	2.86	- 0.55

Au regard des valeurs de ces coefficients, qui, traduisent l'effet du terme associé, nous remarquons qu'elles ne sont pas du même ordre de grandeur et ce en raison de la valeur de chaque réponse. Aussi, pour bien illustrer la contribution de chaque terme par son degré d'effet, nous représentons les graphes associés à chaque réponse dans les figures (Fig. V.83, V.84, V.85, V.86, V.87)

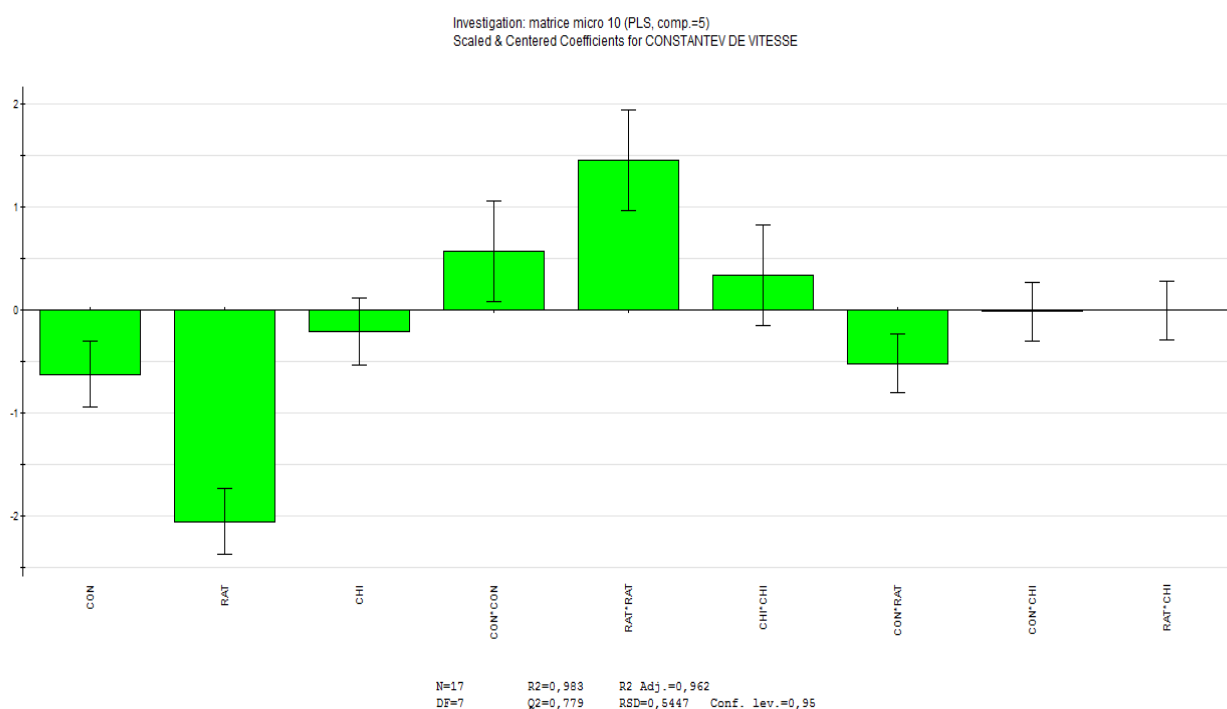


Figure V.83: Représentation de la contribution de chaque terme des modèles de surface de réponse pour la réponse constante de vitesse K.

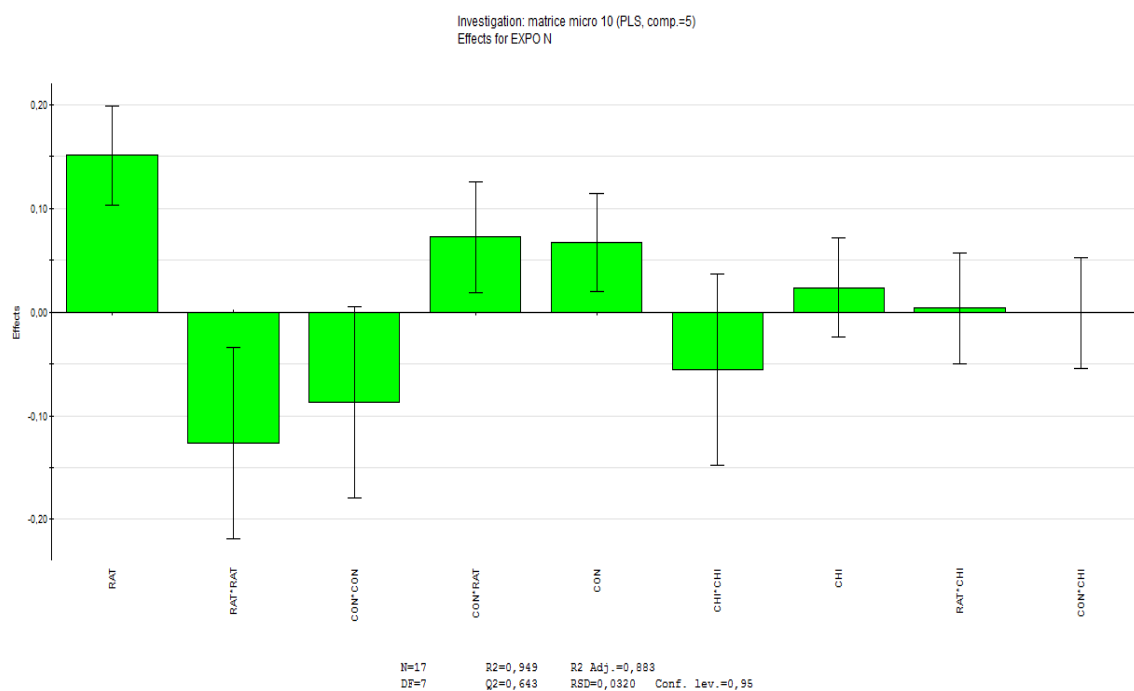


Figure V.84: Représentation de la contribution de chaque terme des modèles de surface de réponse pour la réponse de l'exposant n.

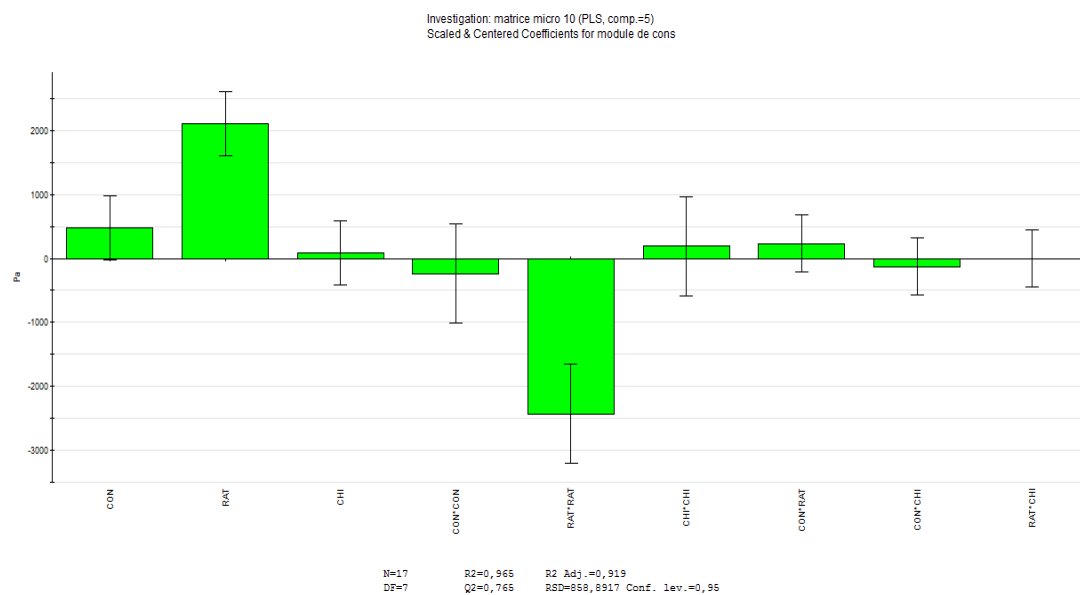


Figure V.85: Représentation de la contribution de chaque terme des modèles de surface de réponse pour la réponse module de conservation G'.

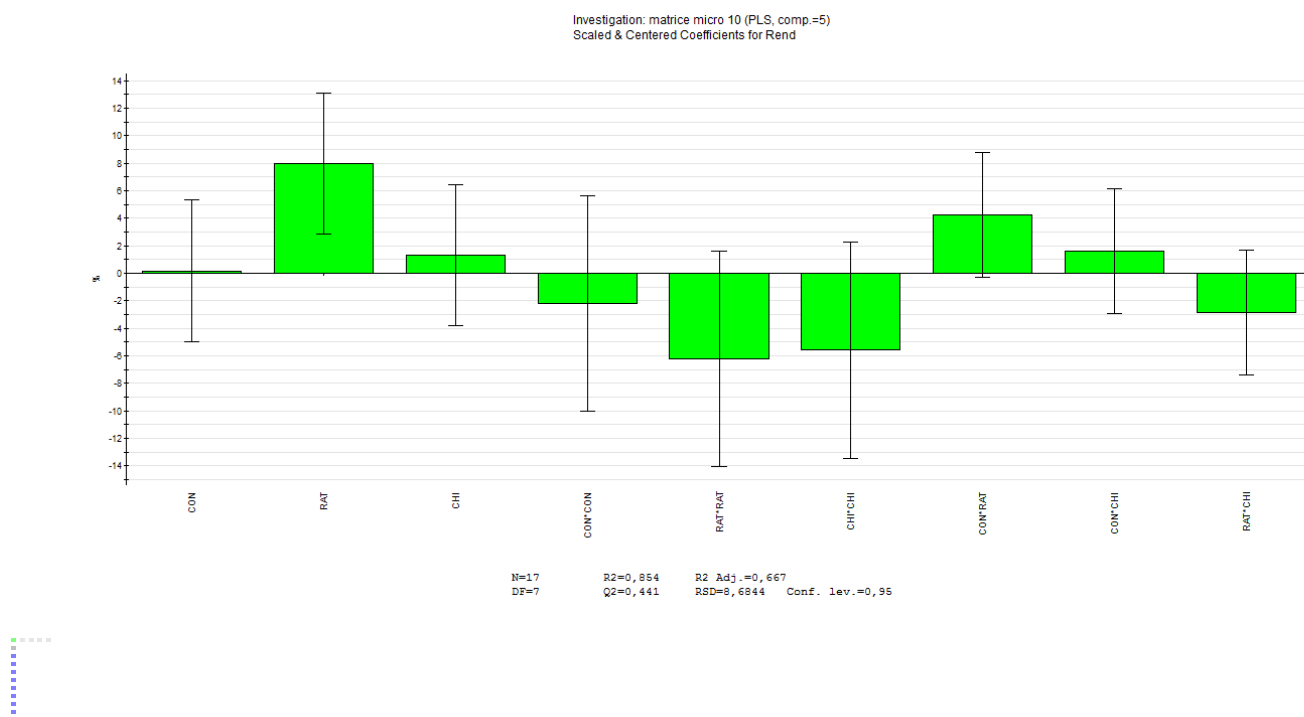


Figure V.86: Représentation de la contribution de chaque terme des modèles de surface de réponse pour le rendement.

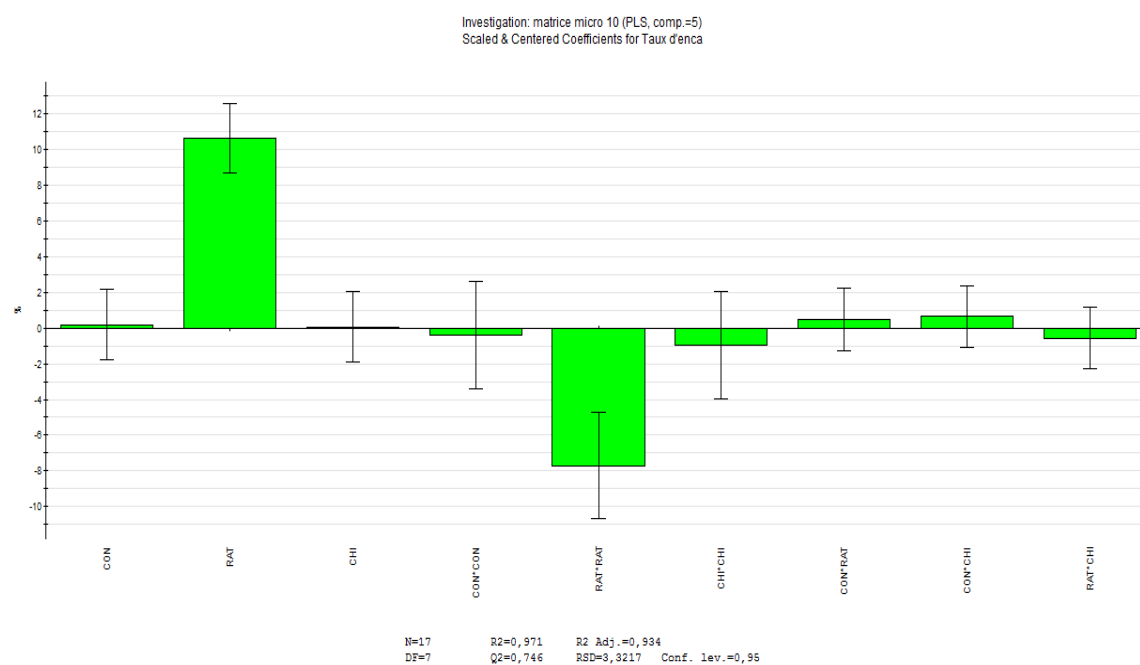


Figure V.87: Représentation de la contribution de chaque terme des modèles de surface de réponse pour la réponse taux d'encapsulation

Il apparait ainsi :

- Pour la constante de vitesse **K**, les deux facteurs : ratio Pr/Ps et concentration en polymères sont les plus influençant et leur effet est négatif c'est-à-dire plus ces facteurs augmentent en valeur plus la constante de vitesse est réduite et donc la libération du principe actif est ralentie .La même constatation est faite pour le facteur concentration en chitosan. Par ailleurs, leur interaction est synergique mais ne présente pas d'autant d'importance.
- Pour **G'** : les deux facteurs ont une contribution positive sur la rigidité du gel mais c'est celle du ratio qui prédomine. Leur effet est positif et leur interaction, moins importante, est synergique
- Pour le **taux d'encapsulation** et le **rendement** c'est le ratio Pr/Ps qui a l'effet positif le plus important dépassant largement ceux des autres facteurs et leurs interactions

Au vu de toutes ces constatations, nous concluons que les facteurs les plus influant sur les réponses étudiées sont la concentration en polymère et le ratio entre la gélatine et l'alginate de sodium ; En effet dans ces conditions la gélification des polymères exprimé par le module de conservation **G'** , est favorisé par une interaction de type électrostatique en raison du caractère anionique de l'alginate et cationique de la gélatine ce qui va former un réseau réticulé et enchevêtré, capable de retenir les molécule du PA et rendre ainsi sa libération prolongée dans le temps.

Conclusion

Conclusion générale

La recherche dans le domaine des systèmes pharmaceutiques à libération prolongée et contrôlée, est en plein essor et les systèmes qui seront développés dans le futur répondront de plus en plus à la demande d'une libération constante de principe actif sur de longues périodes de temps, pour un traitement prolongé chez les patients atteints de maladies chroniques.

L'objectif de cette thèse a été d'élaborer des microcapsules à base de biopolymères de type protéine - polysaccharides en vue d'une libération prolongée d'un principe actif anti-hypertenseur : l'Acébutolol.

La technique utilisée est la microencapsulation, qui est une méthode en pleine effervescence, et offre des solutions technologiques et industrielles, lorsqu'on a pour objectif de protéger le principe actif, améliorer sa présentation et surtout maîtriser son profil de libération. Cette technique a la particularité de donner la possibilité d'innover dans le procédé d'obtention des microcapsules, par les propriétés qu'ont les biopolymères à interagir entre eux, sous certaines conditions, afin de concevoir des systèmes thérapeutiques répondant aux attentes des galénistes en matière de développement pharmaceutique des formes à libération prolongée.

Pour atteindre notre objectif nous avons étudié deux types de procédés de microencapsulation, qui utilisent les mêmes matériaux polymériques à savoir une protéine qui est la gélatine et des polysaccharides comme l'alginate de sodium et le chitosane, mais avec des mécanismes réactionnels mis en jeu, complètement différents. Il s'agit en effet du procédé de gélification ionotrope par les ions calcium et la coacervation complexe.

Pour le premier procédé, où nous avons associé l'alginate de sodium et la gélatine, la complexation est obtenue par la fixation des cations divalents, le Ca^{2+} sur l'alginate de sodium pour former un réseau matriciel. Les microcapsules obtenues ont présenté une forme arrondie et une taille comprise entre 300 à 1000 μm , la libération du principe actif est de type prolongé étalé sur une durée allant de 4 à 6 heures. La vitesse de libération du PA à partir de ce type de matrice étant gouverné par la concentration de l'alginate de sodium (gélifié par les ions calcium), plus cette dernière est importante plus la libération est ralentie. Le mécanisme de libération a été déduit à partir de la modélisation mathématique des cinétiques de

dissolution moyennant le modèle de **Weibull**, traduisant une libération par diffusion du PA suite à une érosion de la matrice.

Le deuxième procédé étudié repose sur la coacervation complexe entre la gélatine et l'alginate de sodium, deux biopolymères de charge opposée, pouvant interagir sous certaines conditions pour former un complexe polymérique. Les conditions de coacervation ont été étudiées dans la partie réservée aux mélanges binaires gélatine et alginate de sodium, dans laquelle une étude de l'effet du ratio protéine/ polysaccharide (Rat Pr :Ps) et du pH, a été menée afin d'identifier la nature des interactions ayant lieu entre les deux biopolymères afin de situer les conditions optimales de formation du coacervat, et ce à travers l'exploitation des résultats de la caractérisation rhéologique, électrocinétique (Potentiel zéta ψ_z) et granulométrique, des mélanges.

En termes de caractérisations rhéologiques, les mélanges obtenus présentaient une viscosité initiale de *Carreau* 1000 fois supérieure dans la zone où on a observé la coacervation, témoignant une forte interaction entre l'alginate et la gélatine. Cette interaction serait de type électrostatique, faisant appel aux charges opposées des deux biopolymères. Ces résultats concordent avec ceux de la caractérisation granulométrique, où nous avons observé une nette augmentation du diamètre moyen (D_{42}), avec une diminution du potentiel électrocinétique traduisant la neutralisation des charges.

Les résultats ont montré une meilleure coacervation pour des ratios importants de la gélatine situés à 4/1 et 3/1 à des pH de 4, 3.5 et 3, qui sont en accord avec les travaux scientifiques menés par des auteurs dans ce domaine.

À partir des résultats obtenus dans la partie consacrée à l'étude des mélanges binaires, nous avons réalisé un deuxième groupe de formulation de microcapsules fondé sur le procédé de coacervation complexe, entre la gélatine et l'alginate de sodium moyennant le procédé d'émulsification suivi d'un enrobage par un autre polysaccharide qui est le chitosane.

Cette partie a été réalisée par la méthodologie de planification expérimentale moyennant le logiciel MODDE 6, qui présente l'avantage d'avoir un maximum de réponses précises pour un nombre réduit d'expériences.

La planification des essais a été exécutée suivant un plan d'expériences de type CCF qui avait comme objectif une modélisation en surfaces de réponses (RSM).

Les microcapsules obtenues étaient de taille plus réduites comparé au premier procédé, elles étaient comprises entre 5 à 80µm mais plus hétérogènes, selon les photos au microscope électronique à balayage.

La modélisation des cinétiques de dissolution par le modèle de Krossmeyer Peppas a montré une constante de vitesse de dissolution K_{kp} fortement dépendante de la concentration en polymère et du ratio, plus ces deux facteurs augmentent plus la constante de vitesse décroît en faveur d'une libération ralentie. Aussi, la concentration du chitosane présente un effet non négligeable sur la vitesse de libération, plus sa concentration est importante plus la vitesse de libération est faible expliquée par la complexation ayant lieu entre le chitosane et l'alginate de sodium contribuant ainsi à la modulation de la libération du principe actif.

Pour l'exposant n celui-ci est compris entre 0.45 et 0.80 ce qui traduit une libération obéissant à un mécanisme fickien, puisqu'il résulte de l'action conjuguée de la diffusion du PA et l'érosion ralentie de la matrice.

L'évaluation du comportement viscoélastique des gels constituant la matrice a révélé qu'ils exhibaient un comportement d'un solide viscoélastique, caractérisé par le module de conservation G' et le module de perte G'' lesquels paramètres sont dépendants de la concentration en polymères et le ratio.

Ce travail de formulation de microcapsules biodégradables est loin d'être achevé, il est donc souhaitable de le compléter, en tentant de l'approcher par d'autres techniques d'analyse, pour évaluer avec précision les interactions qui ont produit la matrice polymérique et aussi de tenter d'autres procédés.

Références bibliographiques

Partie synthèse bibliographique

CHAPIRE I

- [1] J-M. Aiache, J-Ph., Devisaguet, A.M.,Guyot-Hermann . «GALENICA BIOPHARMACIE 1982 »
- [2] Aftabrouchad, C.; Doelker, E. « Preparation methods for biodegradable microparticles loaded with water-soluble drugs». STP Pharma Science., Paris, V. 2, 1992
- [3] F. Falson-Rieg ,V. Faivre, F.Pirot. « Nouvelles formes médicamenteuse 2004 ».
- [4] J.P.Benoit , Benita . S, Puisieux.F. «Stability and release kinetics of drugs incorporated within microsphères». Elsevier Science Publishers B.V; 1983.
- [5] Langer R.S et Peppas N.A « Present and future applications of biomatériaux in controlled drug delivery systems » . Biomaterials 1981.
- [6] N. Devi , M. Sarmah, and al. « Encapsulation of active ingredients in polysaccharide–protein complex coacervates» Advanced in colloid and interface science 2017
- [7] R. Denine. « Cours de pharmacie galénique » Office des Publications Universitaires 2014
- [8] E. Gue, J. F. Willart, S. Muschert, F. and al « Accelerated ketoprofen release from polymeric matrices: importance of the homogeneity/heterogeneity of excipient distribution », Int. J. Pharm., vol. 457, no 1 Nov. 2013.
- [9] S. Krenzlin, F. Siepmann, D. Wils, and al « Non-coated multiparticulate matrix systems for colon targeting », Drug Dev. Ind.Pharm., mars 2011
- [10] Y. Karrouit, C. Neut, D. Wils, F. and al « Novel polymeric film coatings for colon targeting: Drug release from coated pellets », Eur. J. Pharm. Sci., vol. 37, No 3-4, Juin 2009
- [11] S. Gupta, A. Jain, M. Chakraborty, J. K. Sahni, J. Ali, et S. Dang, « Oral delivery of therapeutic proteins and peptides: a review on recent developments », Drug Deliv., vol. 20, No6, Août 2013
- [12] M.Vaubourdolle. « Médicaments », 3ème édition, Le Moniteur. Paris Tome4 2007
- [13] Pharmacopée européenne 8ème édition. 2013
- [14] A.Boudendouna, «Méthodologie de la formulation d’une forme orale solide à libération prolongée» thèse de doctorat de l’université de Toulouse.2010

- [15] P.Buri, F.Puisieux, E.Doelker, J-Pierre.Benoit. « Formes pharmaceutiques nouvelles: aspect technologique, biopharmaceutique et médica»l. Edition LAVOISIER .1985.
- [16] G.Montagnac . « Galénique Formes pharmaceutiques : Avantages et inconvénients des formes pharmaceutiques ».2011
- [17] Gilbert S. Banker . Christopher. T. Rhodes. « Modern pharmaceuticals ». 1990
- [18] Dressman JB, Palsson BO, Ozturk A, Ozturk S. « Mechanisms of Release from Coated Pellets». Journal of controlled release, 1994
- [19] Wagner K, PhD thesis, Freie University Berlin, Germany. « Aqueous polymer dispersions for extended release dosage forms». 2002.
- [20] Lecomte F, PhD thesis, Freie University Berlin, Germany. « pH- sensitive polymer blends used as coating materials in controlled drug delivery systems »2004.
- [21] Guo X, PhD thesis, University of Texas, Austin, USA. «Physicochemical and Mechanical Properties influencing the drug release from coated dosage forms». 1996.
- [22] Ozturk A, Ozturk S, Palsson B, Wheatley T, Dressman J. «Mechanism of release from pellets coated with an ethylcellulose-based film». Journal of Controlled Release. 1990.
- [23] Nesbitt RU, Mahjour M, Mills NL, Fawzi MB. « Effect of substrate on mass release from ethylcellulose latex coated pellets». Journal of Controlled Release. 1994
- [24] Lecomte F, Siepmann J, Walther M, MacRae RJ, Bodmeier R. « Polymer blends used for the aqueous coating of solid dosage forms: importance of the type of plasticizer». Journal of Controlled Release. 2004.
- [25] Buri, P., « Définition et classification des systèmes matriciels». S. T. P. Pharma 1987
- [26] R. Rao, K. V.; Devi, K. P., « Swelling controlled release systems: recent development and application. International Journal of Pharmaceutics 1988, 48, (1-3), 1-13.
- [27] Salomon, J.-L.; Doelker, E., « Formulation des comprimés à libération prolongée : Matrices inertes». Pharmaceutica Acta Helvetiae 1980.

[28] J-Goole. « Développement et évaluation de mini comprimés flottants à libération prolongés». Thèse de doctorat en sciences pharmaceutiques. Bruxelles : Université libre de Bruxelles (institut de pharmacie), 2008.

[29] CAPAN, Y., « Les formes pharmaceutiques orales solides à libération programmée», Sci. Techn. Pharm. 1984, Paris.

CHAPITRE II

[30] J.Bile « Microencapsulation d'agent antimicrobien pour le développement de conditionnements primaires fonctionnalisés» thèse de doctorat université de Claude Bernard Lyon France 2015

[31] T.C. Shami ,R. Dubey and K.U, « Microencapsulation Technology and Applications ».Defense Science Journal, Vol. 59, No. 1, 2009

[32] Vandamme, T., Denis Poncelet, Pascale Subra-Paternault.. La microencapsulation : des sciences aux technologies. Edition Lavoisier. 2007

[33] Tice. T.R, Cowsar, D.R « Biodegradable controlled release parenteral systèmes » PHAR. TECHNOL 1984

[34] Yolles. S, Eldridge. J.E,Woodland. J.H.R « Sustained delivery of drugs from polymer /Drug mixtures » Polymers news, 1971

[35] Boswell. G A, « Polylactide –drug mixtures» US PATENT 1973

[36] Wise. D. L , Mc Cormick G J. Willet. GP, et Anderson L.C « Sustained release of an antimalarial drug using copolymers of glycolic /lactic acid » Life science 1976

[37] Michel A-S, « Structured bioerodible drug delivery device » US PATENT 1976

[38] Beck L.R, Cowsar D.R, al « A new long acting injectable microcapsule système for the administration of progesterone » J.fertil .steril . 1979

[39] Rodrigues, S.N., Fernandes, I., Martins, I.M., Mata, V.G., Barreiro, F. «Microencapsulation de limonène pour des applications aux textiles». J.Ind Eng Chem 2008

[40] El-Zawahry, M.M., El-Shami, S. et El-Mallah, M.H. « Optimisation de process de séchage de la laine ayant un colorant réactif par microencapsulation dans des liposomes». J. Les pigments colorés, 2007

- [41] Bingham. G., Gunning, R.V., Gorman, K., Field, L.M. and Moores, G.D. « Synergie temporel par microencapsulation de piperonyl butoxide et α -cypermethrine pour la résistance des insecticides contre les ravageurs de culture ». *Pest Manag Sci*, 63, (276-281). 2007
- [42] Augustin, M.A. and Hemar , Y. «Nano- et micro-structure pour l'encapsulation des ingrédients des aliments ». *Chem Soc Rev*, 2009
- [43] Nordstierna , L., Abdalla, A.A., Masuda, M., Skarnemark, G. and Nydén, M. « Libération moléculaire des surfaces peintes : biocides libres et encapsulés». *Prog Org Coat*, 2010.
- [44] Scher. R, H.B., Rodson, M. et Lee, K.S. « Microencapsulation des pesticides par polymérisation interfaciales ». *Pestic Sci*, 54, 1998
- [45] Benita,S. , Hoffman, A. and Donbrow, M. « Microencapsulation de paracétamol utilisant la résine de polyacrylate, cinétique de libération du médicament et évaluation d'un modèle cinétique ». *J, Pharmacol*, 37, 1985
- [46] Sugamori , M.E. and Sefton, M.V. « Microencapsulation of pancreatic islets in a water insoluble polyacrylate ». *J.Asaio Trans*, 35, 1989
- [47] Benoit , J.P., Richard J., Venier-Julienne M.C., « Microencapsulation » *Techniques de l'ingénieur*, J2210, 2013
- [48] Thies, C. « Microencapsulation. Encyclopedia » *Pol. Sci. Eng.*, 9, (724–745).1987
- [49] Jeong J.C., Lee J., Cho K., « Effects of crystalline microstructure on drug release behavior of poly(ϵ -caprolactone) microspheres », *J.Control. Rel.*, 92, (249–258). 2003
- [50] Yang, Y.Y., Chung T.S., Ng N.P. « Morphology, drug distribution and in vitro release profiles of biodegradable polymeric microspheres containing protein fabricated by double emulsion solvent extraction/evaporation methods » *Biomaterials*, 22, (231–241). 2001
- [51] Sanna, V., Roggio A.M., Pala N., Marceddu S. Lubinu G., Mariani A., Sechi M. « Effect of chitosan concentration on PLGA microcapsules for controlled release and stability of resveratrol », *Int. J. Biol. Macromol.*, 72, (531–536). 2015
- [52] Poncelet D. « Microencapsulation: fundamentals, methods and applications ». *Surface chemistry in biomedical and environmental science*, Springer, Netherlands, (23–24). 2006

- [53] Peiyuan HE « Conception et réalisation d'un système microfluidique pour la production de gouttes calibrées et leur encapsulation » thèse de doctorat université de technologie de Compiègne 2009
- [54] Bernard F.G., Selim K., Inteaz A., et al. « Encapsulation in the food industry: a review». *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 50, (1999)
- [55] Duclairoir C et al. « α -Tocopherol encapsulation and in vitro release from wheat gliadinnanoparticles », *J. Microencapsulation*., 19. 2002
- [56] Yoo S.H et al, « Microencapsulation of α -tocopherol using sodium alginate and its controlled release properties » *Int. J. Biol. Macromol.*, 38. 2006.
- [57] Stevanović et al. « Fabrication, in vitro degradation and the release behaviours of poly(DL-lactide-co-glycolide) nanospheres containing ascorbic acid » *Colloids Surf. Biointerfaces*, 59, 2007.
- [58] Marsanasco et al. « Liposomes as vehicles for vitamins E and C: An alternative to fortify orange juice and offer vitamin C protection after heat treatment Food » *Res.Int.*, 44. 2011
- [59] Okada H. et al « One and three month release injectable microspheres of the LH-RH superagonist leuprorelin acetate » *Adv. Drug Del. Rev.* 1997
- [60] Plosker et Brogden Plosker G. L. « Leuprorelin. A review of its pharmacology and therapeutic use in prostatic cancer », *Drugs*, 48. 1994
- [61] Theron Félicie « Conception et mise en œuvre d'un procédé intensifié continu de microencapsulation par polycondensation interfaciale » thèse de doctorat de l'université de Toulouse 2009
- [62] Finch et Bodmeier, Wiley-VCH, Verlag GmbH & Co.KGaA Weinheim « Microencapsulation ». (2005)
- [63] Madene et al., « Flavour encapsulation and controlled release – a review », *International Journal of Food Science and Technology*, Vol. 41. 2006
- [64] Poshadri, A. et Kuna, A. « Technologie de microencapsulation: article de synthèse ». Centre de Recherche et de Poste Graduation, ANGER Université d'Agriculture, Hyderabad. 2010

- [65] Arshady R, « Microspheres and microcapsules, a survey of manufacturing Techniques Part II: Coacervation ». Polymer Engineering and science V.30, 1990
- [66] Chemtob C , « Microencapsulation par coacervation. Labo-Pharma-Probl Tech, V 32, 1984.
- [67] Stéphane Giroud Thèse de doctorat « microencapsulation de isocyanate et d'un phosphate d'ammonium» Université des sciences et technologie de LILLE 2002
- [68] O'Donnel P.B., McGinity J.W., « Preparation of microspheres by the solvent evaporation technique », Adv. Drug Deliv. Rev., 28, 1997
- [69] Li M., Rouaud O., Poncelet D. « Microencapsulation by solvent evaporation: State of the art for process engineering approaches », Int. J. Pharm., 363, 2008
- [70] Adeline Callet « Administration orale d'insuline par double encapsulation ; développement du système nanoparticulaire par coacervation complexe chitosane-insuline» thèse de doctorat université de Strasbourg 2010
- [71.] Burgess, D.J. and Hickey, A.J, « Microsphere technology and applications in encyclopedia of pharmaceutical Technology » . Inc : New York USA. 1994
- [72] Janssen L.J.J.M., Boersma A., Te Nijenhuis K. « Encapsulation by interfacial polycondensation : the influence of process conditions on wall permeability » J. Membr. Sci., 79, 1993
- [73] Monshipouri et Neufeld, « Activity and distribution of urease following microencapsulation within polyamide membranes, Enzyme » Microb. Technol, 13. 1991.
- [74] Arshady R, « Preparation of microspheres and microcapsules by interfacial polycondensation » journal of microencapsulation techniques 1988.
- [75] K.Bedie « microencapsulation de composés nutraceutiques dans des complexes protéines polysaccharides» thèse de doctorat 2008 Université de Laval

CHAPITRE III

- [76] Matalanis A., Jones O.G., McClements « Structured biopolymer based delivery systems » Food Hydrocolloids, 25(8). (2011).

- [77] Bouyer E., Mekhloufi G., LePotier I., duFoude Kerdaniel T., Grossiord J.L., « Stabilization mechanism of oil in water emulsions by lactoglobulin and gum Arabic » .Journal of Colloid and Interface Science. (2011).
- [78] Jones O., Decker E.A., McClements « Thermal analysis of lactoglobulin complexes with Pectins or carrageenan for production of stable biopolymer particles ». Food Hydrocolloids, 24, J. (2010).
- [79] Delphine ACH « Microencapsulation par coacervation complexe des protéines du Lactosérum et de la gomme d'acacia » Thèse de doctorat université de CLAUDE BERNARD LYON 2014
- [80] Mc Clements D.J « Non covalent interactions between proteins and polysaccharides » Biotechnology Advances, 24, (2006).
- [81] Benbetaib N. « Influence de traitements de réticulation sans solvant sur les propriétés de films à base de gélatine et chitosane encapsulant ou non des antioxydants naturels: caractérisations physico-chimiques et application » thèse de doctorat université de Bourgogne 2015
- [82] Schmitt, C., Sanchez, C., Desobry-Banon, S. & Hardy, « Structure and techno functional properties of protein-polysaccharide complexes: A review ». Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 38(8), 689–753. J. (1998).
- [83] Khalil, S.A.H., Nixon, J.R., and Carless, J.E. « Role of pH in the coacervation of the systems: gelatin-water-ethanol and gelatin water- sodium sulfate », Journal of Pharmaceutical and Pharmacology, 20, 215–225. (1968).
- [84] Bungenberg de Jong, H.G. « Morphology of coacervates ». Colloid science, 2, 335-432. Amsterdam, the Netherlands: Elsevier. (1949).
- [85] Tolstoguzov, V. B. « Protein-polysaccharide interactions ». Food Proteins and Their Applications, (1997)., New York: Marcel Dekker, Inc.
- [86] Xia, J. and Dubin, P.L. « Protein-polyelectrolyte complexes ». In : Dubin, P. L., Bock, J., Davis, R., Schulz, D. N., and Thies, C., Eds .Macromolecular Complexes in Chemistry and Biology. Berlin: Springer-Verlag, 247-271. (1994).

- [87] Samant, S.K., Singhal, R.S., Kulkarni, P.R. & Rege, D.V. « Protein-polysaccharide interactions: a new approach in food formulation». *International Journal of Food Science and Technology*, 28, (1993)
- [88] Chen, C.H., Wang, F.Y., Mao, C.F., Liao, W.T., Hsieh, C.D. « Studies of chitosan: II. Preparation and characterization of chitosan/poly(vinyl alcohol)/gelatin ternary blend films ». *International Journal of Biological Macromolecules*, 43, 37–42. (2008).
- [89] Ose's, J., Fabregat-Va'zquez, M., Pedroza-Islas, R., Toma' s, S. A., Cruz- Orea, A. & Mate', « Development and characterization of composite edible films based on whey protein isolate and mesquite gum». *Journal of Food Engineering*, 92,(2009).
- [90] Farris, S., Schaich, K.M., Liu, L.S., Cooke, P.H., Piergiovanni, L. & Yam, K.L. « Gelatin-pectin composite films from polyion-complex hydrogels. *Food Hydrocolloids* » 25, (2011).
- [91] Parris, N., Coffin, D.R., Joubran, R. F. & Pessen, H « Composition factors affecting the water vapor permeability and tensile properties of hydrophilic films». *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, .(1995).
- [92] Sabato, S., Nakamurakare, N. & Sobral, P.J. « Mechanical and thermal properties of irradiated films based on Tilapia (*Oreochromis niloticus*) proteins». *Radiation Physics and Chemistry*, 76. (2007).
- [93] Brindle, L.P. and Krochta, J.M. «.Physical Properties of Whey Protein–Hydroxypropylmethylcellulose Blend Edible Films». *Journal of food science*, 73(9),(2008).
- [94] Wang, Y and Padua, G.W. « Tensile Properties of Extruded Zein Sheets and Extrusion Blown Films». *Macromolecular Material Engineering*, 288, (2003).
- [95] Pereda, M., Ponce, A.G. Marcovich, N.E., Ruseckaite, R.A., Martucci, « Chitosan-gelatin composites and bi-layer films with potential antimicrobial activity». *Food Hydrocolloids*, 25 .(2011).
- [96] Cofré, D.C., Azócar, M.I., Páez, M., Enrione, J. & Matiacevich, S. «Influence of Glassy or Rubbery State on the Antimicrobial Activity of Chitosan-gelatin Films ». *Journal of Food Research*,1(4),(2012).

- [97] Staroszczyk, H., Sztuka, K., and al « Interactions of fish gelatin and chitosan in uncrosslinked and crosslinked with EDC films: FT-IR study». *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 117, (2014)
- [98] Nikolova, K., Panchev, I. & Sainova, S. « Optical characteristics of biopolymer films from pectin and gelatin ». *Journal of Optoelectronics and Advanced Materials*, 7,(2005).
- [99] Liu, L., Fishman, M. L. & Hicks, K.B. « Composite films from pectin and fish skin gelatin or soybean flour protein». *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(6), 2349-2355. (2007).
- [100] Su, J.F., Huang, Z., Yuan, X.Y., Wang, X.Y and Li, M. «Structure and properties of carboxymethyl cellulose/soy protein isolate blend edible films crosslinked by Maillard reactions ». *Carbohydrate Polymers*, 79. (2010).
- [101] Abugoch, L.E., Tapia, C., Villamán, M.C. and al « Characterizations of quinoa protein-chitosan blend edible films». *Food Hydrocolloids*, 25 (2011).
- [102] Dickinson, E. and Galazka, V. B. «Emulsion stabilization by ionic and covalent complexes of blactoglobulin with polysaccharides», *Food Hydrocolloids*, 5. (1991).
- [103] Hattori, M., Yang, W. & Takahashi, K. Functional Changes of carboxymethyl potato by starch by conjugation with whey proteins, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43. (1995).
- [104] BOUSBA-BAZID Sihem « Etudes spectrale et microscopique du système gélatine/carboxyméthylcellulose sodique en absence et en présence de NaCl, CaCl₂ et du glucose dans le domaine alimentaire » thèse de doctorat Université Ferhat Abbas de Sétif 2015
- [105] Wen, Y-p., and Dubin, P. L. « Potentiometric Studies of the Interaction of Bovine Serum Albumin and Poly (dimethyldiallylammonium chloride)». *Macromolecules*, 30, (1997).
- [106] Versic, R..J. (1988). « Flavor encapsulation-An overview». In *Flavor Encapsulation*, (Eds). S.J. Risch & G.A. Reineccius, pp. 1- 6. Washington, DC: American Chemical Society. *ACS Symposium Series*, nr. 370. Watano, S. 2001.

- [107] Burgess, D.J. « Practical analysis of complex coacervate systems ». *Journal of Colloid and Interface Science*, 140,(1990).
- [108] Benichou, A., Aserin, A., and Garti, N. « Protein-polysaccharide interactions for stabilization of food emulsions ». *Journal of Dispersion Science and Technology*, 23, 93-123. (2002).
- [109] Tiebackx, F. W. « Gleichzeitige Ausflockung zweier Kolloide». *Z. Chem. Ind. Kolloide*, 8, 198-201(1911).
- [110] Singh, O. N., and Burgess, G. J.. « Characterization of albumin-alginic acid complex coacervation». *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 41,(1989)
- [111] Schmitt, C., Sanchez, C., Thomas, F., and Hardy, J. « Complex coacervation between [beta]-lactoglobulin and acacia gum in aqueous medium». *Food Hydrocolloids*, 13. (1999).
- [112] Mattisson, K. W., Wang, Y., Grymonpré, K., and Dubin, P. L. «Micro- and macro-phase behavior in protein-polyelectrolyte systems ». *Macromol. Symp.*, 140, (1999).
- [113] Kaibara, K., Okazaki, T., Bohidar, H. B., and Dubin, P. L. « pH-Induced Coacervation in Complexes of Bovine Serum Albumin and Cationic Polyelectrolytes ». *Biomacromolecules*, 1. (2000b).
- [114] Mekhloufi, G., Sanchez, C., Renard, D., Guillemin, S., and Hardy, J. « pH-Induced Structural Transitions during Complexation and Coacervation of β -Lactoglobulin and Acacia Gum». *Langmuir*, 21, 386-394 (2005).
- [115] Dickinson, E. « Stability and rheological implications of electrostatic milk protein-polysaccharides interactions ». *Trends in food science and technology*, 9. (1998).
- [116] Schmitt, C « Etude de la coacervation complexe entre la β - lactoglobuline et la gomme d'acacia en solution aqueuse. » Thèse de Doctorat, Institut National Polytechnique de Lorraine, France. . (2000).
- [117] Dickinson, E. « Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed Systems ». *Food Hydrocolloids*, 17. (2003).
- [118] Aberkane, L., Jasniewski, J., Gaiani, C., Scher, J., and Sanchez, C. « Thermodynamic characterization of Acacia gum- β -lactoglobuline complex coacervation ». *Langmuir*, 26 (15), 8(2010).

- [119] Bowman, W. A., Rubinstein, M., and Tan, J. S. « Polyelectrolyte-Gelatin Complexation: Light Scattering Study ». *Macromolecules*, 30,(1997)..
- [120] Wang, Y., Kimura, K., Huang, Q., Dubin, P. L., and Jeager, W. « Effect of Salt on Polyelectrolyte-Micelle Coacervation ». *Macromolecules*, 32. (1999).
- [121] Grymonpré, K.R., Staggemeier, B.A., Dubin, P.L., and Mattison, K.W. « Identification by integrated computer modeling and light scattering studies of an electrostatic serum albumin-hyaluronic acid binding site ». *Biomacromolecules*, 2. (2001).
- [122] Fang, Y., Li, L., Inoue, C., Lundin, L., and Appelqvist, I. «Associative and segregative phase separations of gelatin/ κ - carrageenan aqueous mixtures». *Langmuir*, 22,(2006).
- [123] Mattison, K.W., Brittain, I.J., and Dubin, P.L. « Protein-Polyelectrolyte Phase Boundaries ». *Biotechnol. Prog.*, 11. (1995).
- [124] Veis, A., Bodor, E., and Mussell, S. « Molecular Weight Fractionation and the Self-Suppression of Complex Coacervation ». *Biopolymers*, 5, 37-59. (1967).
- [125] IJ Haug, KI Draget, O Smidsrød « Physical behaviour of fish gelatin- κ -carrageenan mixtures » Carbohydrate Polymers Volume 56, , Pages 11-19, 2004
- [126] Koh, G. L., and Tucker, I. G. « Characterization of sodium carboxymethylcellulose-gelatin complex coacervation by viscosity, turbidity and coacervate wet weight and volume measurements ». *J. Pharm. Pharmacol.*, 40. (1988a).
- [127] Leslie Rolland , École Doctorale de Chimie Physique et Chimie Analytique de Paris Centre « Propriétés physico-chimiques de capsules d’hydrogel à cœur liquide » thèse de doctorat de l’Université Pierre et Marie Curie. 2013
- [128] Stanford ECC “New substance obtained from some of the commoner species of marine algae”. *Chem News* 47 267–269. (1883 b),
- [129] Draget, K., Skjakbrak, G., and Smidsrod, O. « Alginic acid gels: the effect of alginate chemical composition and molecular weight ». *Carbohydrate Polymers*, 25(1) (1994).
- [130] A.G. Ward ‘The Science and Technology of Gelatine’, Academic press, London PP. 99, 159-207 (1977).

- [131] A. Le Hir « Pharmacie Galénique- Bonnes Pratiques de Fabrication des Médicaments » 8ème éd.. éd. Masson, Paris, PP.76- 78 (2001)
- [132] T. R. Keenan; « La Macromolécule de Gélatine », éd Ellipse, Paris, Chap. 16, PP. 92-111 (1998).
- [133] Karim, A., and Bhat R. « Gelatin alternatives for the food industry: recent developments, challenges and prospects », *Journal of Trends in food Science &Technologie*, V 19. (2008).
- [134] Merveille, C. N. D. «Etude structurale et rhéologique des systèmes mixtes caséinates/carraghénanes », Thèse de Doctorat de l'université du Maine (2011).
- [135] Rbii Khalil « Formation d'agrégats de hauts poids moléculaires dans la gélatine et comportement en solution aqueuse» thèse de doctorat Université de TOULOUSE 2010
- [136] C. Chène , « La Gélatine », J. de l'Adrianor, Agro-jonction N° 24, PP. 752-788 Septembre/Octobre (2000)
- [137] R. Schrieber and H. Gareis; « Gelatine Handbook: Theory and Industrial Practice ». éd Wiley-VCH Verlag &Co. KCaA, USA, PP.50-116 (2006)
- [138] Dupasquier, Florence.,« Hydrogels physiques de chitosane pour la régénération in vivo du tissu cutané après brûlures du troisième degré» Thèse de doctorat université de Claude Bernard Lyon 1 , 2013
- [139] Sangamesh, G., Kumbar, et al., « Natural and Synthetic Biomedical Polymers » Book (2014). Elsevier Science
- [140] Muzzarelli, A., Riccardo, « Chitin », Pergamon Press, Oxford, chap 2, (1977).
- [141] Pengju, L., Yongqiang, L., Ru, C., Xuan, W., et Baoyan, Z., « Studies on graft copolymerization of chitosan with acrylonitrile by the redox system, » *Polymer*, V.50, (2009), 5675-5680.
- [142]. Pillai, C.K.S., Paul, W., et Sharma, C.P., « Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation, » *Progress in Polymer Science*, V.34, (2009), 641-678.
- [143] Sannan, T., Kurita, K., Ogura, K., and Iwakaru, T., « Studies on chitin: 7. I.R. spectroscopic determination of degree of deacetylation, » *Polymer* V.19 (4), (1978).
- [144] Neugebauer, W. A., and Brzezinski, R., « Determination of the degree of N-acetylation of chitin–chitosan with picric acid, » *Carbohydrate Res* V.189, (1989).

- [145] Wang, W., Li, S., and Qin, W., "Colloid titration method to measure the amino concentration of chitosan, » *China Surf Detergent Cosmetics* V.2, (1989).
- [146] Louise Raymond, Frederick G. Morin and Robert H. Marchessault « Degree of deacetylation of chitosan using conductometric titration and solid-state NMR », *Carbohydrate Research*, 246, (1993) .
- [147]. Ke, H., and Chen, Q., « Potentiometric titration chitosan by linear method. *Chem Bull* », V.10, (1990), 44–46.
- [148]. Khan, T.A., Peh, K.K., et al., «Mechanical bioadhesive strenght and biological evaluation of chitosan films for wound dressing » ,*Journal of Pharmaceutical and Pharmaceutical Science*, V.3 (3), (2000), 3003-3371.
- [149] J-H Pa, T.L., Yu, « Light scattering study of chitosan in acetic acid aqueous solutions », *Macromolecular Chemistry and Physics*, V.202, (2001).
- [150] Berth, G., Dautzenberg, H., et Peter, M. G., « Physico-chemical characterization of chitosans varying in degree of acetylation » *Carbohydrate Polymers*, V.36, (1998).
- [151] Grégorio Crini., Pierre-Marie Badot., et Eric Guibal., « Chitine et chitosane du biopolymère à l'application, » (2007).
- [152] Liang, T.-W., Chen, Y.-l., Yen, Y.-H., Wang, S.-L., « The antitumor activity of the hydrolysates of chitinous materials hydrolyzed by crude enzyme from *Bacillus amyloliquefaciens* V656, » *Process Biochemistry*, V.42, (2007).
- [153] Shozo Miyazaki, Kuniaki Ishii, Tanekazu Nadai « The Use of Chitin and Chitosan as Drug Carriers » *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, V.29, (1981).
- [154] Y. Kawashima, T. Handa, A. Kasai, H. Takenaka, Y. Ando, « Novel method for the preparation of controlled-release Theophylline granules coated with a polyelectrolyte complex of sodium polyphosphate-chitosan, » V.74, (1985).
- [155] Entsar I. Rabea, Mohamed E.-T. Badawy, Christian V. Stevens, Guy Smagghe, and Walter Steurbaut « Chitosan as Antimicrobial Agent: Applications and Mode of Action » *Biomacromolecules American chemical society* V.4 N°6 (2003).

[156] Raymond, C. Rowe., Paul, J., Sheskey and Marian, E. Quinn., « Handbook of Pharmaceutical Excipients, » Sixth edition, (2009)

Partie pratique

[157] <https://fda.gov>. Biopharmaceutics-classification-bcs-guidance .2017

[158] Vidal 2017

[159] *CLARKE'S Analysis* Moffat, Anthony C; Osselton, M David; Widdop, Brian; Watts, Jo 4^{ème} Edition 2011

[160] Gulaid, A. A., James, I. M. and Kaye, C. M., « The Pharmacokinetics of acebutolol in man, following the oral administration of acebutolol as a single dose and during and after repeated oral dosing ». *Biopharm. Drug Dispos.*, 2, 103–114. 1981.

[161] Donald C.Harrison Peter, J.Meffin Roger, A.Winkle « Clinical pharmacokinetics of antiarrhythmic drugs » *J. Clin. Pharmacol.*, , 4, 519–522. 1977

[162] Ashton WL. « An open, multicentre study of acebutolol in hypertension ». *Curr Med Res Opin* 1976;4: 442-454].

[163] Ashton WL. « Acebutolol (400 mg) given as a single daily dose to hypertensive patients previously stabilized on 400 mg acebutolol daily in divided doses: an open multicentre study» . *Curr Med Res Opin* 1978; 5: 347-353.

[164] Tolaimate A., Desbrieres J., Rhazi M., Alagui A., (2003). « Contribution to the preparation of chitins and chitosans with controlled physico -chemical properties » . *Polym.*, 44: 7939- 7952.

[165] G. burgot. J. louis burgot. « Méthodes instrumentales d'analyse chimique et applications».8ème édition 2006.

[166] Marc Moreau, Directeur de recherche CNRS, UMR 5547, Université Paul Sabatier, Toulouse, « COURS : LE MICROSCOPE OPTIQUE : Principes » [https://trigenotoul.com /uploads / 2014/09 / Microscope-cours](https://trigenotoul.com/uploads/2014/09/Microscope-cours)

[167] Terry ALLEN, Nicole ROUX : « Application du laser à la granulométrie », *Technique de l'ingénieur* 10 oct. 1988

[168] J. Houri, B. DO,J.M .Bernadou, D.Pradeau et F.Guyon, « L'analyse granulométrique : ses caractéristiques et son intérêt dans l'industrie pharmaceutique » , *STP Pharma Pratiques* 2002

- [169] Guy Couarraze « Initiation à la rhéologie » 4^{ème} édition 2014, LAVOISIER
- [170] Hadjsadok. A, « Etude rhéologique et physicochimique des systèmes à structure complexe à base de caséinate de sodium » Thèse de doctorat en science et technologique 2009 Université de Blida1
- [171] W. Brügel. « An Introduction to Infrared Spectroscopy ». Methuen & Co. Ltd., 1962.
- [172] C. N. Banwell and E. M. MC Cash. « Fundamentals of Molecular Spectroscopy. McGraw Hill, 1994.
- [173] J. M. Brown. « Molecular Spectroscopy. » Oxford University Press, 1998
- [174] Malay K. Das and Prakash C. Senapati « Evaluation of furosemide-loaded alginate microspheres prepared by ionotropic external gelation technique » Acta Poloniae Pharmaceutica Drug Research, Vol. 64 No. 3 pp. 253-262, 2007
- [175] PAUL de Vosa et al « Alginate-based microcapsules for immunoisolation of pancreatic islets » Biomaterials 27 (2006) 5603–5617
- [176] M. Manjanna et al, « Calcium alginate cross-linked polymeric microbeads for oral sustained drug delivery in arthritis » Drug Discoveries & Therapeutics. 2010; 4(2):109-122.
- [177] Shammi Goyal & al , « Development of alginate gel beads-entrapped liposome for colon specific drug delivery of Prednisolone » Pharmacia Sinica, 2011, 2 (2): 31-38
- [178] Jennifer Burgain « Microencapsulation de bactéries probiotiques dans des matrices laitières: études des mécanismes de formation par une approche multi-échelle » Thèse de Doctorat Université de Lorraine 2013.
- [179] Thichanee Jiamrungraksa « Preparation and Characteristics of Galangal Essential Oil/Alginate Microcapsules » Journal of Metals, Materials and Minerals, Vol.20 No.2 pp.89-92, 2010
- [180] Chang, C.P. & Dobashi, T. « Preparation of alginate complex capsules containing eucalyptus essential oil and its controlled release ». Colloid. Surface. B. 32(3) : 257-262 (2003).
- [181] Emilie Vincent « les alginates et leurs applications en pharmacie et en ingénierie » Thèse de Doctorat, université Henri Pointcare Nancy 2010

- [182] Vincent Rocher « Synthèse et caractérisation de billes d'alginate magnétiques pour l'élimination de polluants organiques dans les effluents par séparation magnétique » Thèse de doctorat Université Pierre et Marie Curie Paris 2008
- [183] Md. Abdur Razzak Moojoong et al Kim Donghwa et Chung « Elucidation of aqueous interactions between fish gelatin and sodium alginate » v.148 . 181-196 *Carbohydrate Polymers* 2016
- [184] Shinde and Nagarsenker, *et al.* « Gélatine Sodium Alginate Complexe Coacervation » Indian Journal of Pharmaceutical Sciences 2009
- [185] Ujwala Shinde and Mangal Nagarsenker : « Microencapsulation de Eugenol par Complex Coacervation » Indian Journal of Pharmaceutical Sciences. 2011
- [186] Madan *et al.* « Factors inHuencing microeneapsulation of a waxy solid by complex coacervation » Journal of Pharmaceutical Science, 61, 1586-1588. 1972.
- [187] Junyaprasert *et al.* « Effect of process variables on the microencapsulation of vitamin A palmitate by gelatin-acacia coacervation » Drug Dev Ind Pharm. 27: 561-6.2001,
- [188] Lemetter *et al.* « Control of the Morphology and the Size of Complex Coacervate Microcapsules During Scale-up » AIChE Journal 55(6) :1487 - 1496 · June 2009
- [189] Dong Z, Ma Y, Hayat K, Jia C, Xia S, Zhang X. « Morphology and release profile of microcapsules encapsulating peppermint oil by complex coacervation ». J Food Eng;;104: 455–60, 2011
- [190] Zhang *et al.* « Expulsion of selenium/protein nanoparticles through vesicle-like structures by Saccharomyces cerevisiae under microaerophilic environment ». World J Microbiol Biotechnol 28(12):3381-6, 2012.
- [191] LvY., Simplified optimization for microcapsule preparation by complex coacervation based on the correlation between coacervates and the corresponding microcapsules, Journal of Food Engineering, 111, 225-233.2012
- [192] Saravanan et K. Panduranga Rao « Pectin–gelatin and alginate–gelatine complex coacervation for controlled drug delivery: Influence of anionic polysaccharides and drugs being encapsulatedon physicochemical properties of microcapsules » Carbohydrate Polymers 80 808–816, 2010.

- [193] Lucinda Silva *et al.*, « Alginate–chitosan systems: In vitro controlled release of triamcinolone and in vivo gastrointestinal transit » *Carbohydrate Polymers* 81(2): 260-268, June 2010
- [194] N.Devi *et al* 2013 « Smart porous microparticles based on gelatin/sodium alginate polyelectrolyte complex » *Journal of Food Engineering* 117 193–204(2013)
- [195] USP 30 NF-25 , 2014
- [196] Rapport de commission SFSTP pharma. Démarche statistique de la validation analytique dans le domaine pharmaceutique. Les technologies de laboratoire - n°1 - 2006
- [197] Suvakanta Dash, *et al* « Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems » *Acta Poloniae Pharmaceutica Drug Research*, Vol. 67 pp. 217-223, 2010

Chapitre V: Résultat et discussion

- [198] Mallikarjun Mugli *et al* « Studies on Microencapsulation of Salbutamol Sulphate » *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences* Volume 3 Issue 2 juin 2012
- [199] Raparla Rama Krishna « Preparation and evaluation of mucoadhesive microcapsules of glipizide formulated with gum kondagogu: In vitro and in vivo studies » *Acta Pharmaceutica Scientia* 52: 335-344 (2010)
- [200] Centeno A. C., Marcelo I. G., & *al* « Characterisation by FTIR of the effect of lead white on some properties of proteinaceous binding media », *Journal of the American Institute for Conservation*, 43, p. 139-150(2004)
- [201] K. M. Manjanna « Calcium alginate cross-linked polymeric microbeads for oral sustained drug delivery in arthritis » *Drug Discoveries & Therapeutics*. 2010; 4(2):109-122.
- [202] Jerome P. Paques *a, et al* « Preparation methods of alginate nanoparticles » *Advances in Colloid and Interface Science* 209 (2014) 163–171 *et*
- [203] Chan LW, Lee HY, Heng PWS. « Mechanisms of external and internal gelation and their impact on the functions of alginate as a coat and delivery system ». *Carbohydrate Polym* 63:176–87, 2006.

- [204] Quong D, Neufeld RJ, Skjåk-Bræk G, Poncelet D. « External versus internal source of calcium during the gelation of alginate beads for DNA encapsulation ». *Biotechnol Bioeng*; 57:438–46. 1998
- [205] Yellanki Shiva Kumar , Deb Sambit kumar , Goranti Sharada , Nerella Naveen kumar « formulation development of mucoadhesive microcapsules of metformin hydrochloride using natural and synthetic polymers and in vitro characterization » *International Journal of Drug Development & Research* | April-June | Vol. 2 | Issue 2 |2010
- [206] B. Bindu Madhavi « Formulation and evaluation of venlafaxine Hcl enclosed in alginate microbeads prepared by iontophoretic gellation method» *international journal of pharmaceutical research and development* 2006.
- [207] J. Siepmanna N.A. Peppas b «Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) » *Advanced Drug Delivery Reviews* 48 139–157 (2001)
- [208] **Maryam Jafari** «Mathematical Kinetic Modeling on Isoniazid Release from Dex-HEMA-PNIPA Am Nanogels » *Nanomed Res J* 1(2): 90-96, Autumn 2016
- [209] Belhadji L. « Design and characterization of calcium-free insitu gel formulation based on sodium alginate and chitosan » *Drug Development and Industrial Pharmacy* 2017
- [210] Bowman, W. A., Rubinstein, M., and Tan, J. S. « Polyelectrolyte-Gelatin Complexation: Light Scattering Study ». *Macromolecules*, 30, 3262-3270. (1997).
- [211] Hnin-Ei Thu Shiow-FernNg « Gelatine enhances drug dispersion in alginate bilayer film via the formation of crystalline microaggregates » *International Journal of Pharmaceutics* , Pages 99-106, 2013
- [212] V.Ducel « Evidence and characterization of complex coacervates containing plant proteins: application to the microencapsulation of oil droplets » *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 2004
- [213] DE KRUIF « Complex coacervates of whey proteins and anionic polysaccharides, and their use for encapsulation » *Journal of microencapsulation* 2004

- [214] Yang, Y., Anvari, M., Pan, C., and Chung, D. « Characterization of interactions between fish gelatin and gum arabic aqueous solution ». *Food Chemistry*, 135, 555-561. (2012).
- [215] Hunter, R. J. «Transport properties of suspensions » , (Eds), *Foundations of colloid science*, vol. 1, pp 494-536, New York : Oxford University Press. (1986).
- [216] Hattori, M., Numamoto, K-i., Kobayashi, K., & Takahashi, K. « Functional changes in β -Lactoglobulin by conjugation with cationic Saccharides ». *J. Agric. Food Chem.*, 48, 2050-2056. (2000).
- [217] Guzey, D., et McClements, D.J. « Characterization of [beta]-lactoglobulin-chitosan interactions in aqueous solutions: A calorimetry, light scattering, electrophoretic mobility and solubility study. *Food Hydrocolloids* » 20, 124-131. 2006
- [218] Chang-Sheng Wang « Synergistic gelation of gelatin B with xanthan gum » *Food Hydrocolloids* (2016)
- [219] Marie-Eve Bertrand « Etude des propriétés gélifiantes et viscosifiantes de systèmes mixtes isolat de protéines de lactosérum polysaccharides en conditions associatives » thèse de doctorat de l'Université de Laval Québec 2008
- [220] Weinbreck, F. & Wientjes, R.H.W. « Rheological properties of whey protein/gumArabic coacervates ». *Journal of Rheology*, 48(6), 1215-1228. (2004).
- [221] Sánchez et al. « Rheological properties of food gums as related to their water binding capacity and to soy protein interaction». *Lebensmittel-Wissenschaft*, 28, 380-385. (1995)
- [222] Sanchez, C., Schmitt, C., Babak, V.B. & Hardy, J. «Rheology of whey protein isolate-xanthan mixed solutions and gels. Effect of pH and xanthan concentration ». *Nahrung*, 41, 336-343. (1997).
- [223] Bertrand, M.-E. & Turgeon, S.L. « Improved gelling properties of whey protein isolate by addition of xanthan gum ». *Food Hydrocolloids*, 21, 159-166. (2007).

- [224] Cai, R. & Arntfield, S.D. «Thermal gelation in relation to binding of bovine serumalbumin-polysaccharide systems ». *Journal of Food Science*, 62(6), 1129-1134. (1997).
- [225] P.R. Sarika a, Anupama Pavithran b, Nirmala Rachel James a, *Food Hydrocolloids* 49 (2015) 176-182
- [226] Paulo Costa, José Manuel, Sousa Lobo , «Modeling and comparison of dissolution profiles » *European Journal sciences* 13 (2001)
- [227] Santos, M. G.; Bozza, F. T.; Thomazini, M.; Favaro-Trindade, C. S. « Microencapsulation of Xylitol by Double Emulsion Followed by Complex Coacervation » *Food Chemistry*, 171, 32–39, 2015
- [228] Cui-Yun Yua «Composite microparticle drug delivery systems based on chitosan, alginate and pectin with improved pH-sensitive» drug release property
- [229] McMullen, J. N. Newton, D. W., Becker, C. H. «Pectin-gelatincomplex concentrates I : Determinants of microglobulesize, morphology, and recovery as water-dispersible powders». *J.Pharm. Sci.* (1982)
- [230] Geok-Lay Koh et Ian G. Tucker «Characterization of Sodium Carboxymethylcellulose-Gelatin Complex Coacervation by Chemical Analysisof the Coacervate and Equilibrium Fluid Phases» *J. Pharm. Pharmacol.* 1988.

Annexes

Annexes 1

MICROENCAPSULATION PAR GELIFICATION IONOTROPIQUE

A. VALIDATION ANALYTIQUES DE LA METHODE DE DISSOLUTION

🚦 Résultats de la validation analytique de la méthode de dosage

Validation analytique de la méthode de dosage

Les principales références de cette validation sont : le rapport de commission SFSTP pharma et l'ICH et l'OMS. On a fait référence aux études faites par CRD. SAIDAL sur le générique de Sectral 200mg et 400mg « CARDITAL », dont le principe actif est l'Acébutolol pour la validation analytique. La validation de cette méthode de dosage a été effectuée sur le principe actif pour la vérification des critères suivants : linéarité, fidélité, exactitude et stabilité. Et sur les formulations de microcapsules pour le test de la spécificité.

1. La Spécificité

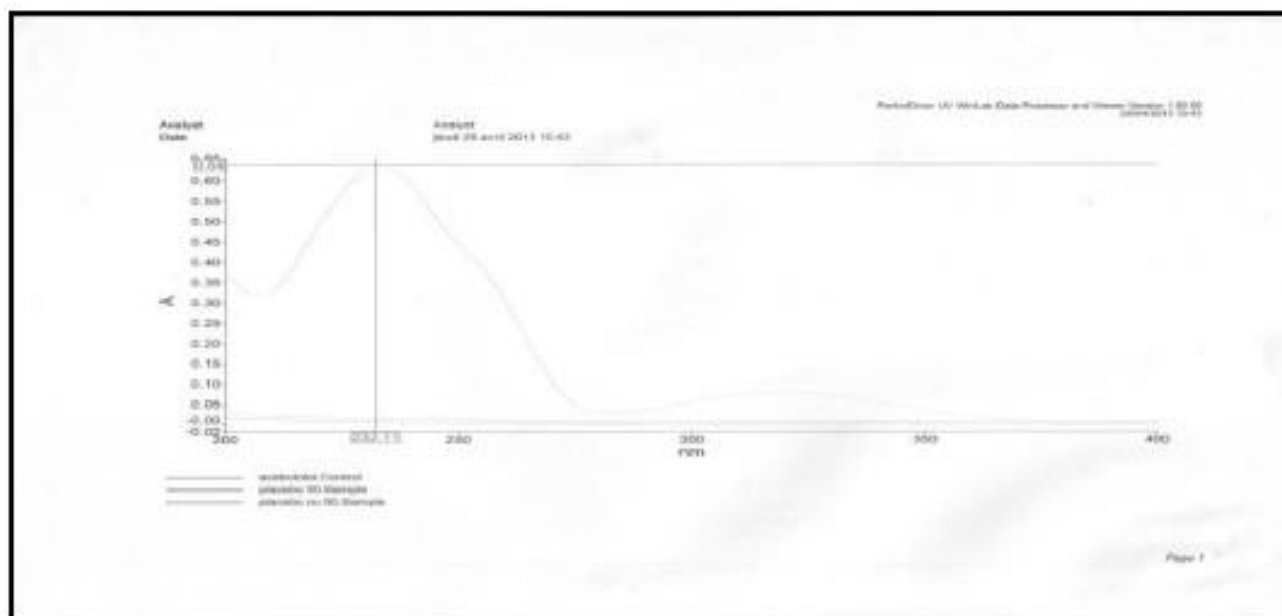


Fig A.1.Spectres UV du principe actif et des excipients

Au vue du spectre obtenu nous constatons, qu'aucune interférence n'est constatée à la longueur d'onde 232nm qui est celle du principe actif. On peut conclure que les excipients n'interfèrent pas avec la substance active (substance a analysée) ce qui confirme que cette longueur d'onde est spécifique à l'Acébutolol. Donc la méthode spectrophotométrie UV est retenue pour le dosage du produit acébutolol dans les microcapsules.

2. **La Linéarité** Les résultats des DO obtenus à différentes concentrations de PA sont représentés dans le tableau ci-après :

Tableau A.1. : Tableau représentatif des réponses de la densité optique des différentes solutions étalons de PA

Essai n° i/j	Concentration (mg/ml)	Réponse DO
1/1	0,3330	0,339
2/1	0,3330	0,338
3/1	0,3330	0,337
1/2	0,3885	0,39
2/2	0,3885	0,391
3/2	0,3885	0,398
1/3	0,4440	0,453
2/3	0,4440	0,453
3/3	0,4440	0,457
1/4	0,4990	0,497
2/4	0,4990	0,517
3/4	0,4990	0,518
1/5	0,5550	0,569
2/5	0,5550	0,569
3/5	0,5550	0,57
1/6	0,6100	0,616
2/6	0,6100	0,622
3/6	0,6100	0,6380

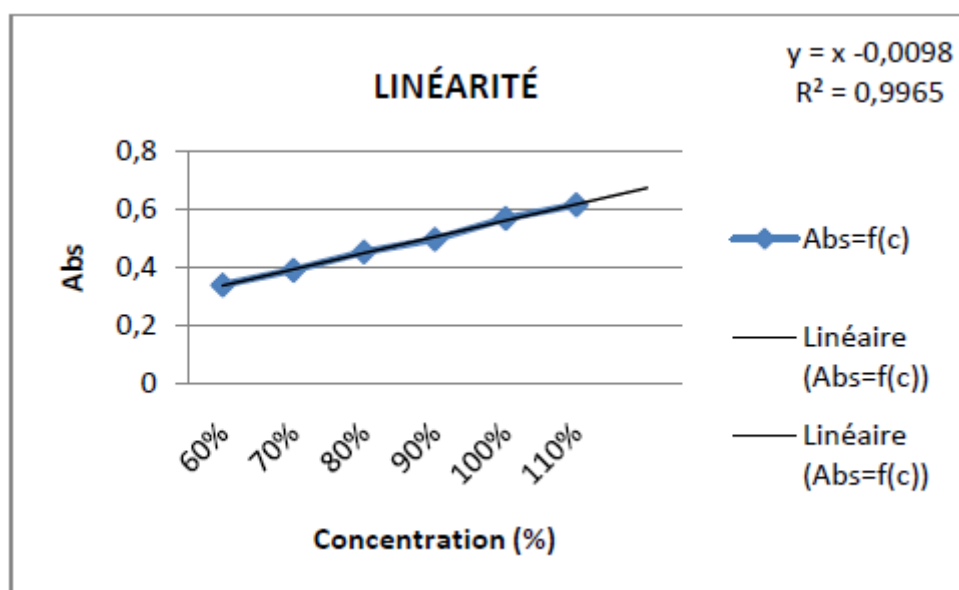


Figure A.2 : Représentation graphique de la linéarité

La linéarité de la méthode de dosage de l'Acébutolol est étudiée par une régression linéaire et obtenue par la méthode des moindres carrés. Les réponses obtenues aux différentes concentrations sont représentées ci-dessous :

Tableau A.2 : Tableau récapitulatif de la linéarité.

Pente (b)		1			
Ordonnée à l'origine (a)		-0,009867			
Coefficient de régression (r^2)		0,9965			
Comparaison de l'ordonnée à l'origine avec 0					
	t calculé	t théorique 5%	t théorique 1%	Condition	Conclusion
	1,33	2,12	2,92	$t < t_{th}$	Valide au risque 5%
Homogénéité des variances					
	C calculé	C théorique 5%	C théorique 1%	Condition	Conclusion
	0,48	0,62	0,72	$C < C_{th}$	Valide au risque 5%
Existence d'une pente					
	F ₁ calculé	F théorique 5%	F théorique 1%	Condition	Conclusion
	4563,72	4,49	8,53	$F_1 > F_{th}$	Valide au risque 1%
Validité de la droite de régression					
	F ₂ calculé	F théorique 5%	F théorique 1%	Condition	Conclusion
	0,12	3,26	5,41	$F_2 < F_{th}$	Valide au risque 5%

La comparaison de l'ordonnée à l'origine avec le zéro (0), est estimée par les calculs relative au test de Student. Tel que, $t_{\text{calculé}} < t_{\text{théorique 5\%}}$, ce qui explique que l'ordonnée à l'origine n'est pas significativement différente de zéro au risque 5%. L'analyse de l'homogénéité des variances à chaque concentration démontre que l'ensemble des variances des différents groupes peut être considéré comme homogène au risque 5%. Le test d'existence d'une pente significative, est évalué par les calculs relatifs au test de Fisher. $F1_{\text{calculé}}$ étant significatif, on conclut à l'existence d'une pente, une dépendance linéaire au seuil de probabilité de 99% ($F1_{\text{calculé}} > F_{\text{théorique 1\%}}$). La validité de la droite de régression est considéré comme valide au seuil de probabilité de 95% ($F2_{\text{calculé}} < F_{\text{théorique 5\%}}$). La valeur du coefficient de régression R^2 est de 0.997, d'où la valeur du coefficient de corrélation (r) est de 0.998. La sensibilité de la méthode donne une bonne linéarité avec un coefficient de corrélation voisin de 1, ce qui caractérise une bonne corrélation entre la concentration et l'absorbance.

3. L'Exactitude

Tableau A.3 : Homogénéité des variances

S^2_{max}	5.1178
Somme des variances	9.3717
C calculé	0.5461
C théorique 5%	0.62
C théorique 1%	0.72
Conclusion	Valide au risque 5%

L'analyse de l'homogénéité des variances à chaque concentration démontre que l'ensemble des variances des différents groupes peut être considéré comme homogène au risque 5%. Vu que cela est démontré par le test de Cochran ($C_{\text{calculé}} < C_{\text{théorique 5\%}}$).

Tableau A.4 : Test de validité des moyennes

	DDL	Sommes des carrés	variance	F₁ calculé	F₁ théorique 5%	F₁ théorique 1%	conclusion
Variation totale	17	23.73641	1.39626	0.64	3.11	5.06	Valide au risque 5%
Variation intra-groupe	12	18.74345	1.56195				
Variation intergroupe	5	4.99296	0.99859				

Par ailleurs, le test de validité des moyenne appliqué, démontre que la différence entre les moyennes n'est pas significative, F_1 calculé < F_1 théorique 5%.

Tableau A.5 : Estimation de recouvrement moyen

Recouvrement moyen(%)	99.5
Intervalle de confiance	98.91 - 100.09

Les limites de confiance sont comprises entre 60% et 110% pour l'ensemble des niveaux de concentration. Compte tenu des résultats obtenus, la procédure peut être considérée comme exacte sur tout l'intervalle de dosage prédéterminé.

4. La Fidélité

Tableau A.6 : Réponses en DO des solutions préparées

Essai (i/j)	Quantité introduite	Réponse
1/1	0,5550	0,57000
2/1	0,5550	0,57300
3/1	0,5550	0,57200
4/1	0,5550	0,56500
5/1	0,5550	0,58100
6/1	0,5550	0,58700
7/1	0,5550	0,58400
1/2	0,5550	0,58600
2/2	0,5550	0,58200
3/2	0,5550	0,568
4/2	0,5550	0,569
5/2	0,5550	0,57
6/2	0,5550	0,57000
7/2	0,5550	0,568
1/3	0,5550	0,54700
2/3	0,5550	0,551
3/3	0,5550	0,548
4/3	0,5550	0,55000
5/3	0,5550	0,549
6/3	0,5550	0,547
7/3	0,5550	0,546

Interprétation**Tableau A.7 : Homogénéité des variances**

$S^2_{\max}$	2.0179
Somme des variances	3.8340
C calculé	0.5263
k (nb essais)	3
n (nb répétitions par essai)	7
C théorique 5%	0.68
C théorique 1%	0.76
Conclusion	Valide au risque 5%

C calculé est inférieur à la valeur critique de la table au seuil de 1% et 5% ; l'ensemble des variances est considéré comme homogène.

Tableau A.8 : Variances de répétabilité, intergroupes et de reproductibilité

Variance de répétabilité	1,278015834
Variance intergroupes	7,558279109
Variance de reproductibilité	8,836294944
Moyenne générale	99,39130192
CV répétabilité	1,14%
CV reproductibilité	2,99%

CV Répétabilité et CV Reproductibilité sont inférieur à 5%.

5. La Stabilité

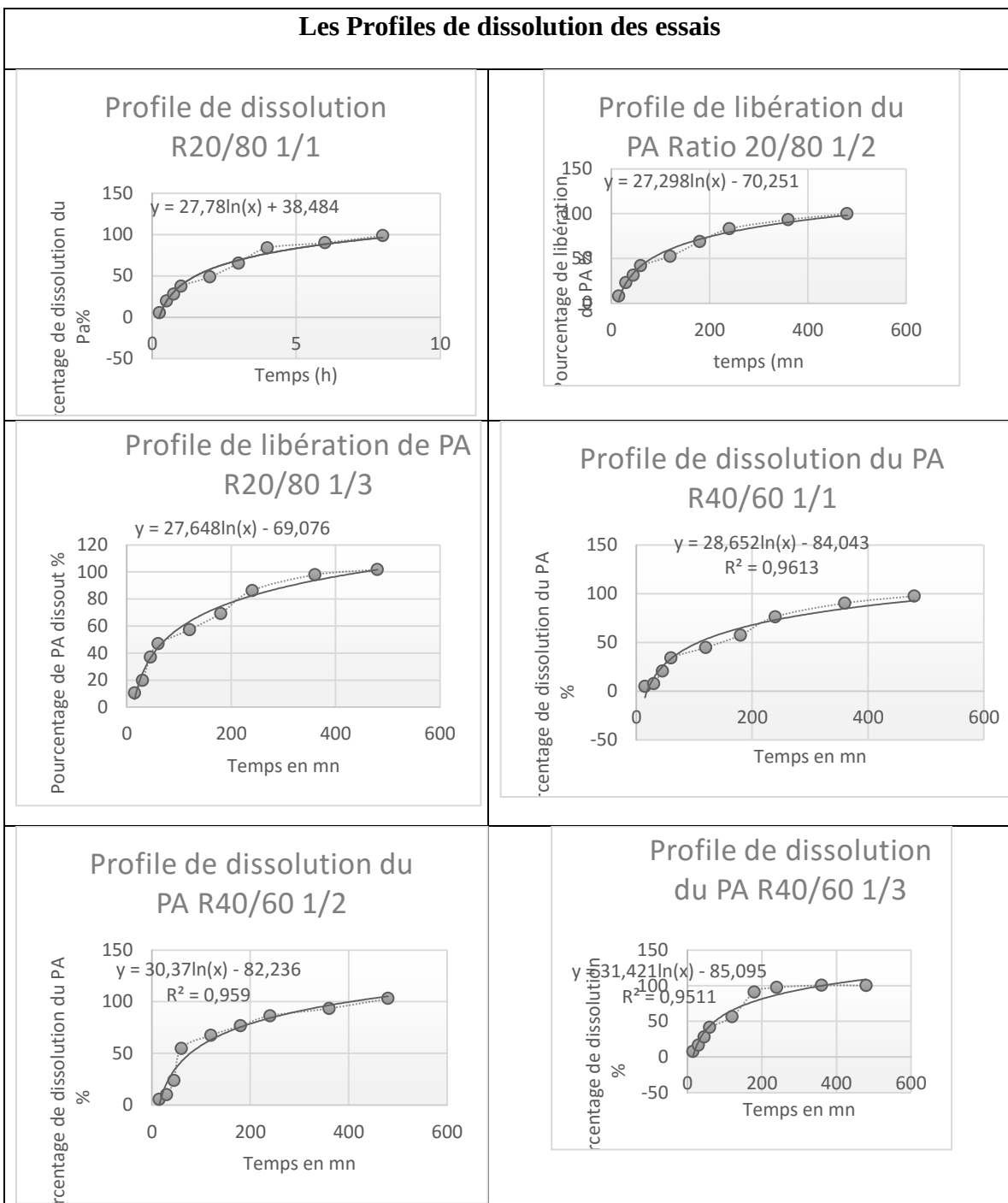
Tableau A.9 : Résultats de l'étude de stabilité du l'Acébutolol. T₀

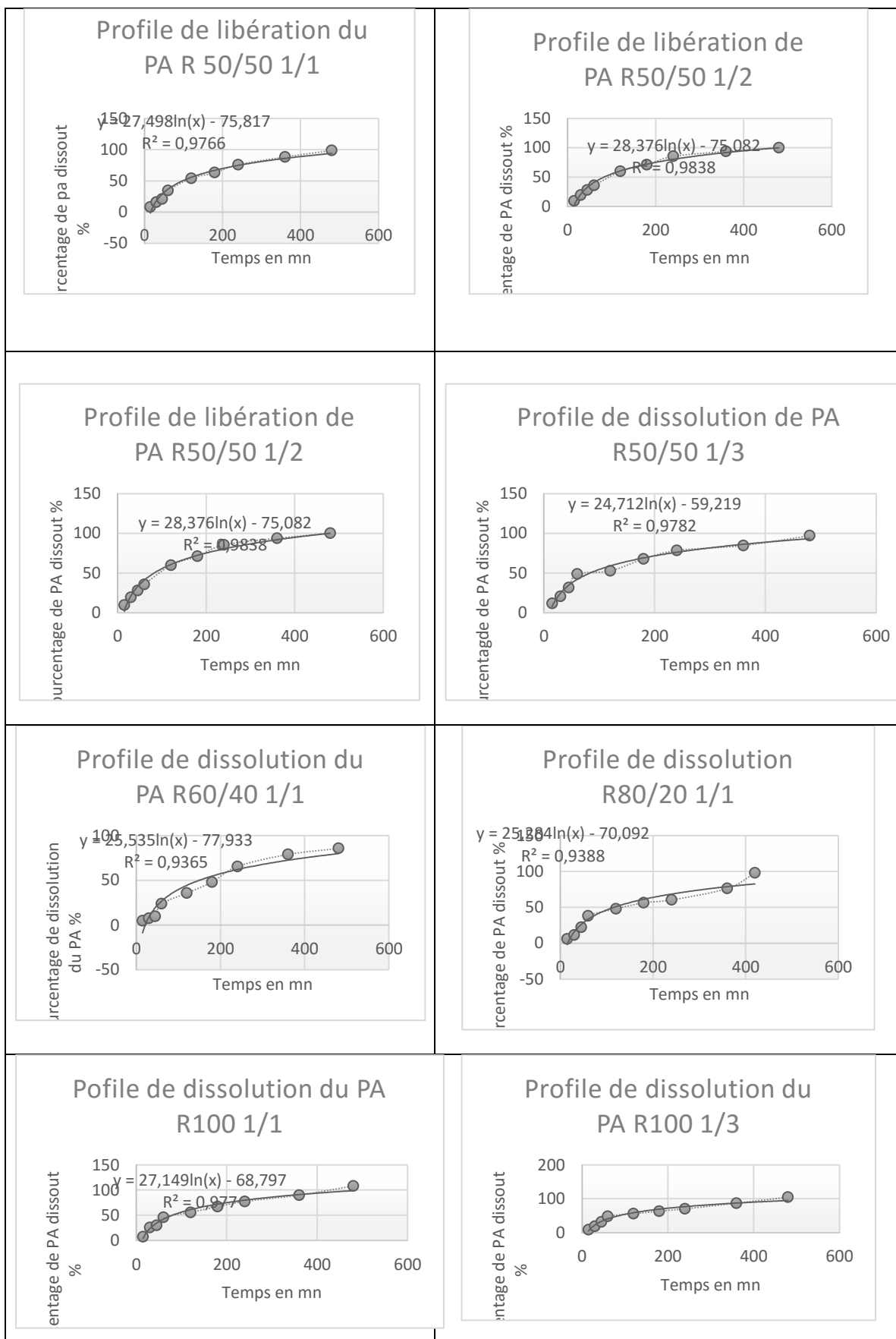
	T₀	T₁	T₂	T₃
Abs	0.570	0.569	0.560	0.561
%	100	99.82	98.24	98.42

Les rapports obtenus sont supérieurs à 98% donc l'Acébutolol est stable.

B. Résultats de la dissolution

Les Profiles de dissolution des essais



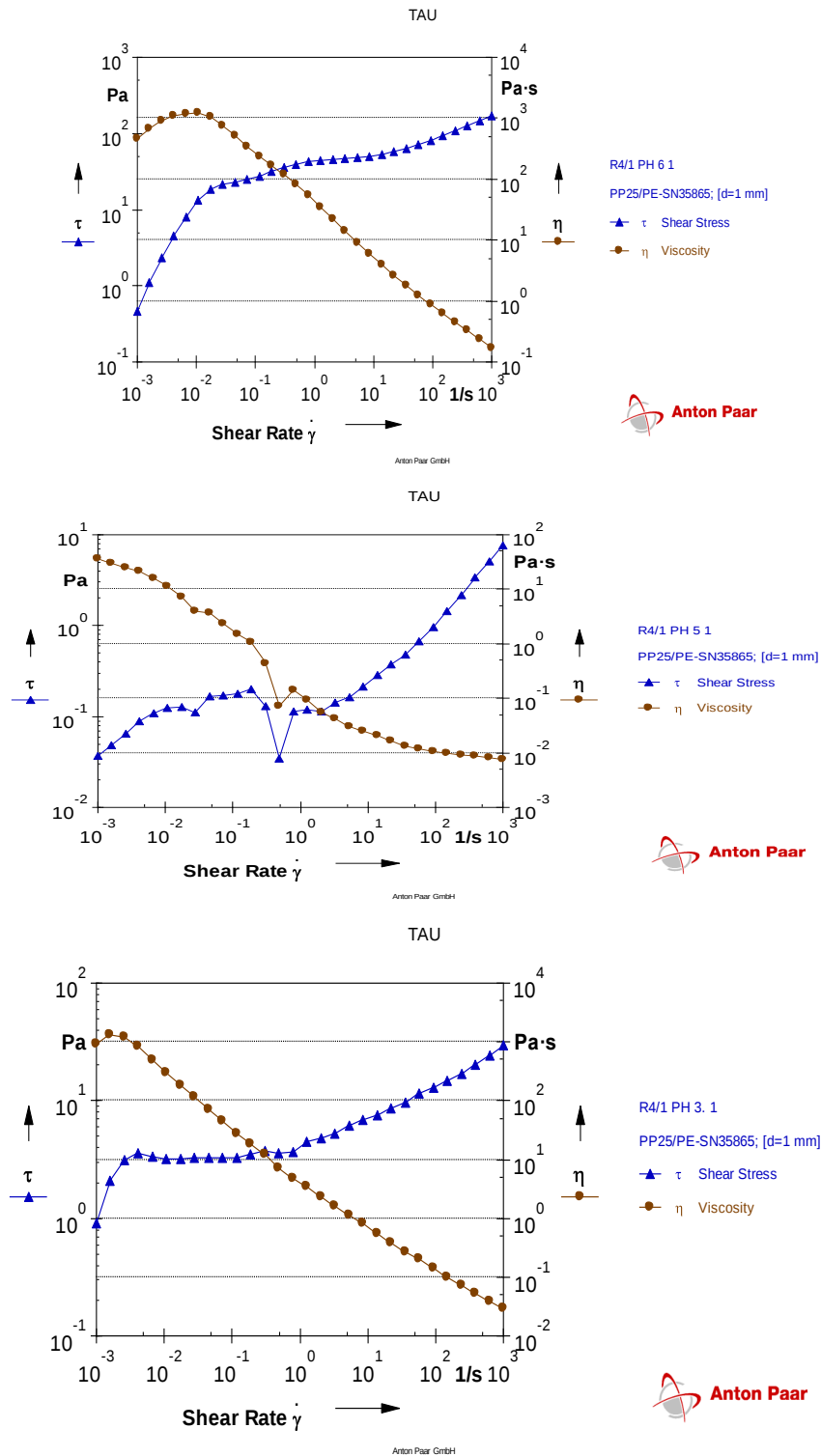


ANNEXE 2

Caractérisation des mélanges binaires

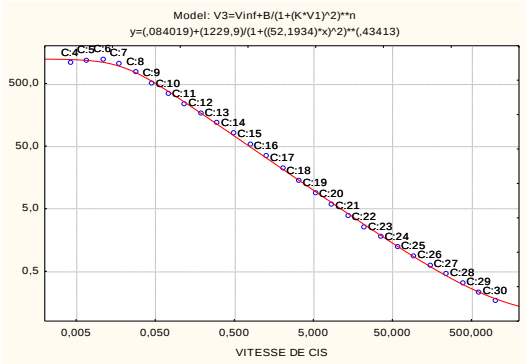
RHEOLOGIE DES MELANGES (quelques exemples de courbes)

COURBES D'ECOULEMENT

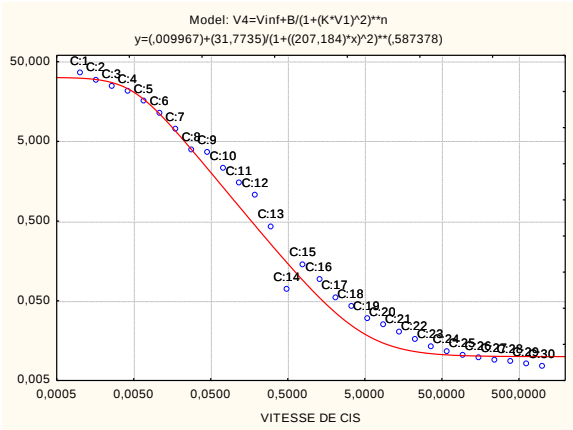


MODELISATION PAR STATISTICA POUR LE RATIO 4/1

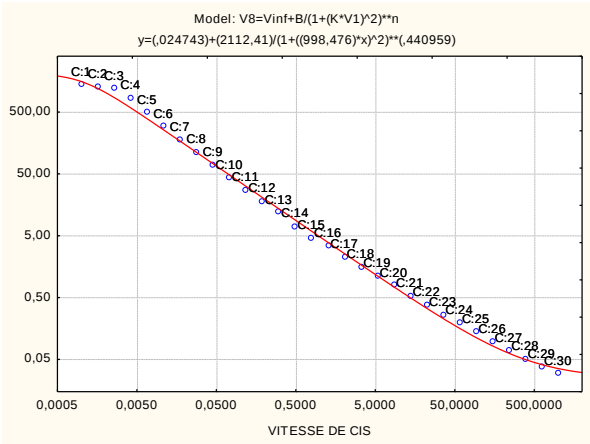
RATIO 4/1 PH6 R 0.99



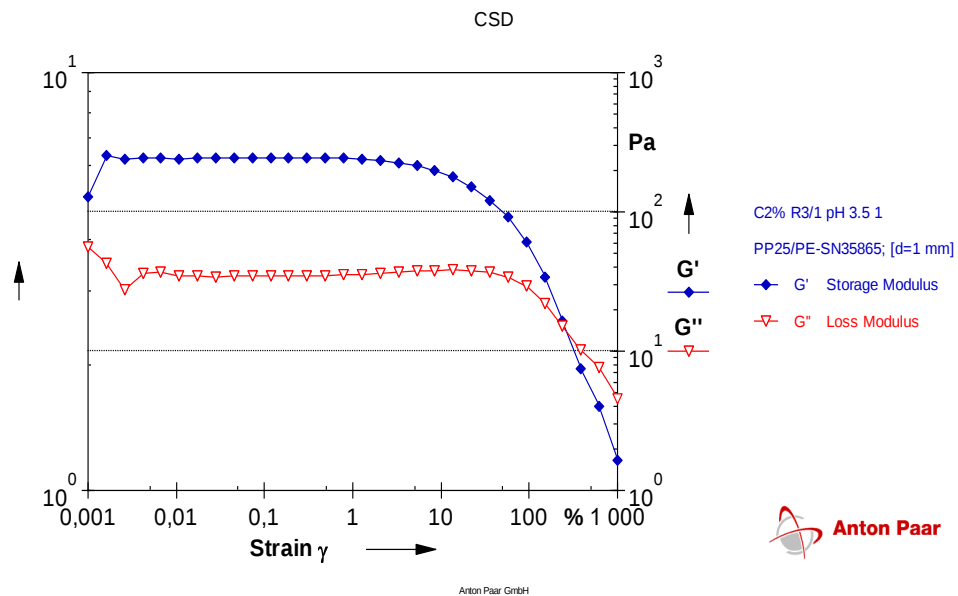
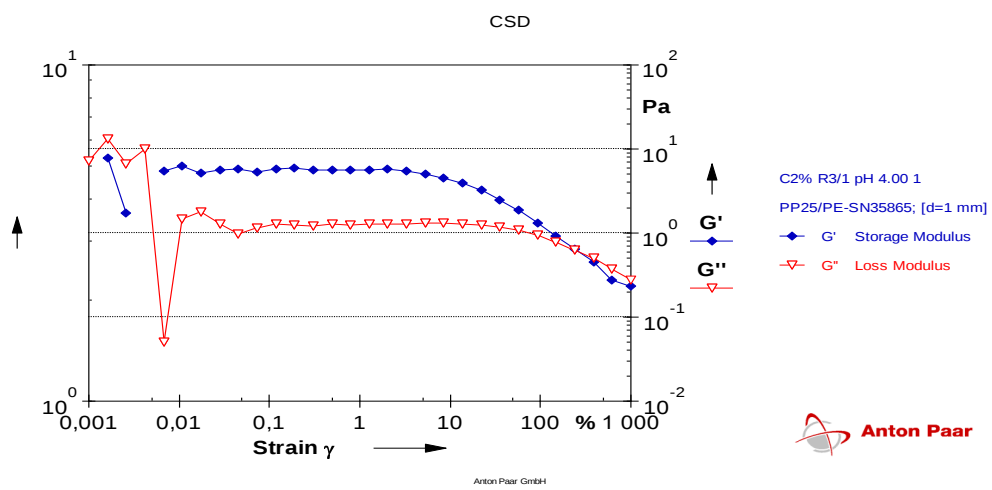
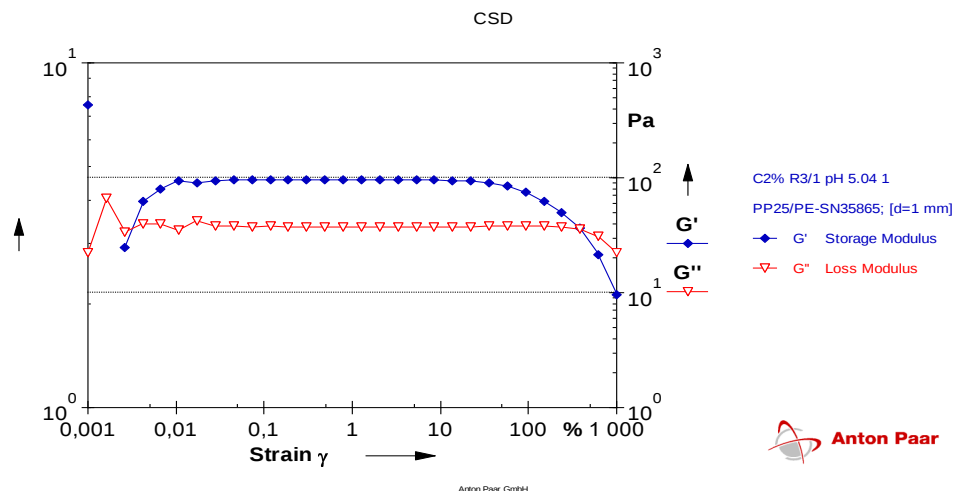
RATIO 4/1 PH5 R 0.992



RATIO 4/1 PH3 R 0.98



VISCOELASTICITE DES MELANGES RATIO 3/1



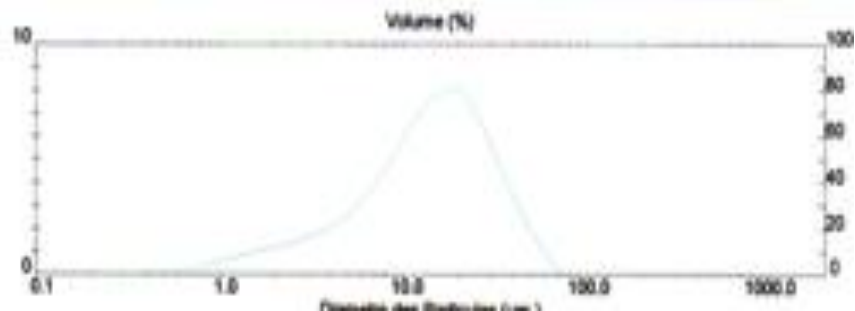
ANALYSE GRANULOMETRIQUE

(d'un essai type)



Rapport Tailles Malvern

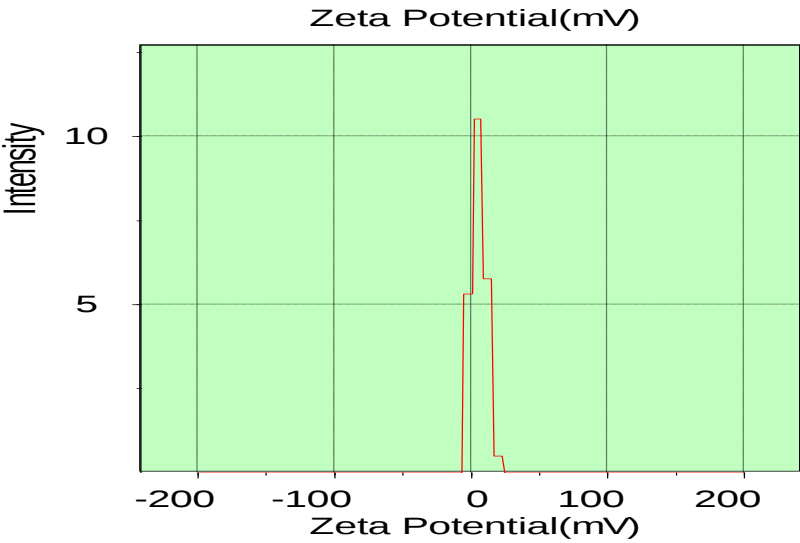
RESULTAT DE LA MESURE							
Type de Distribution: Volume	Concentration: 0.024 %Vol	Densité: 1.000 g / (ml cm	Specific S.A.: 0.7675 sq. m / l				
Diamètre: D [4,3] = 17.23 µm	D [4,0] = 3.33 µm	D [4,0] = 14.06 µm	D [4,0] = 34.61 µm				
	D [3,2] = 7.26 µm	Span = 2.140E+00	Uniformité = 0.815E+01				
Taille (µm)	Diff %	Taille (µm)	Percent%	Taille (µm)	Diff %	Taille (µm)	Percent%
0.05	0.00	0.06	0.00	6.63	3.69	7.72	24.95
0.06	0.00	0.07	0.00	7.72	4.69	9.00	29.64
0.07	0.00	0.08	0.00	9.00	5.57	10.49	35.21
0.08	0.00	0.09	0.00	10.49	6.44	12.21	41.66
0.09	0.00	0.11	0.00	12.21	7.26	14.23	48.88
0.11	0.00	0.13	0.00	14.23	7.71	16.57	56.56
0.13	0.00	0.15	0.00	16.57	7.95	19.21	64.52
0.15	0.00	0.17	0.00	19.21	8.00	22.49	72.51
0.17	0.00	0.20	0.00	22.49	7.30	26.30	79.71
0.20	0.00	0.23	0.00	26.30	6.13	30.53	85.85
0.23	0.00	0.27	0.00	30.53	4.94	35.56	90.79
0.27	0.00	0.31	0.00	35.56	3.74	41.43	94.53
0.31	0.00	0.36	0.00	41.43	2.63	48.27	97.16
0.36	0.00	0.42	0.00	48.27	1.68	56.23	98.84
0.42	0.07	0.49	0.10	56.23	0.95	65.51	99.79
0.49	0.12	0.58	0.23	65.51	0.21	76.32	100.00
0.58	0.19	0.67	0.41	76.32	0.00	88.91	100.00
0.67	0.28	0.78	0.69	88.91	0.00	103.56	100.00
0.78	0.41	0.91	1.10	103.56	0.00	120.67	100.00
0.91	0.54	1.06	1.64	120.67	0.00	140.58	100.00
1.06	0.69	1.24	2.32	140.58	0.00	163.77	100.00
1.24	0.81	1.44	3.13	163.77	0.00	190.60	100.00
1.44	0.93	1.68	4.07	190.60	0.00	222.28	100.00
1.68	1.06	1.95	5.13	222.28	0.00	258.95	100.00
1.95	1.20	2.28	6.33	258.95	0.00	301.68	100.00
2.28	1.35	2.65	7.67	301.68	0.00	351.46	100.00
2.65	1.52	3.09	9.19	351.46	0.00	409.45	100.00
3.09	1.72	3.60	10.91	409.45	0.00	477.91	100.00
3.60	1.96	4.19	12.87	477.91	0.00	555.71	100.00
4.19	2.27	4.86	15.15	555.71	0.00	647.41	100.00
4.86	2.69	5.69	17.83	647.41	0.00	754.23	100.00
5.69	3.23	6.63	21.06	754.23	0.00	878.67	100.00



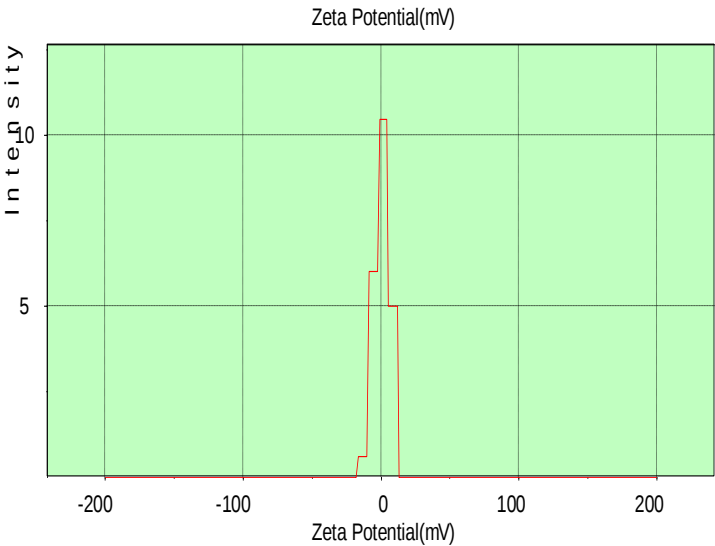
ZETAMETRIE de quelques mélanges binaire

Echantillon 1

Run	Pos.	KCps	Mob.	Zeta	Width	Time
1	50.0	456.4	0.243	5.3	2.7	12:40:22
2	50.0	196.1	0.242	5.2	2.7	12:42:36
Average		326.3	0.242	5.3	2.7	



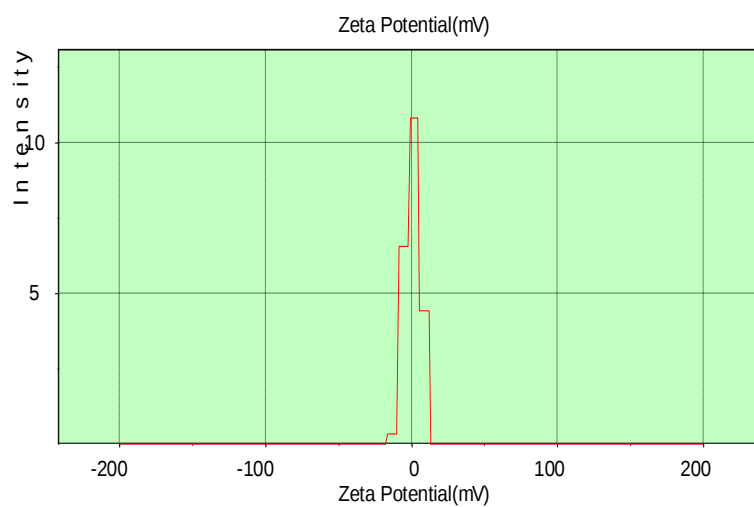
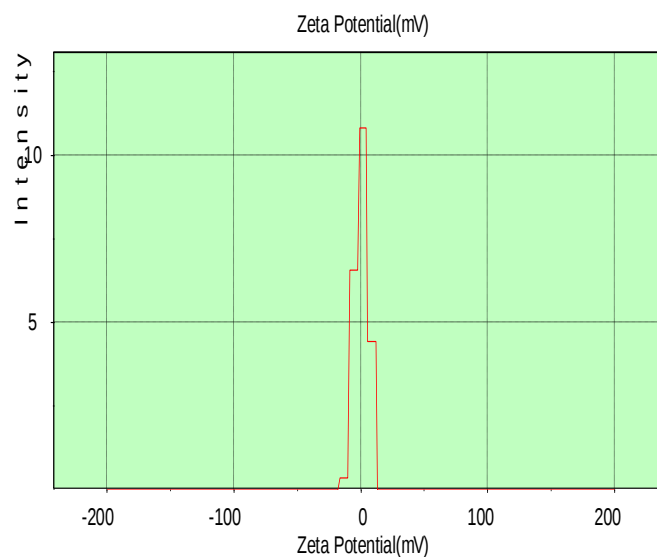
ECANTILLON 2



Run	Pos.	KCps	Mob.	Zeta	Width	Time
1	50.0	52.6	0.070	1.5	2.7	14:50:10
2	50.0	59.7	-0.215	-4.7	2.7	14:50:40
3	50.0	56.6	0.015	0.3	2.7	14:51:10
Average		56.3	-0.044	-0.9	2.7	
+/-		3.6	0.151	3.3	0.0	

Echantillon 3

Run	Pos.	KCps	Mob.	Zeta	Width	Time
1	50.0	62.6	-0.291	-6.3	2.7	14:57:16
2	50.0	65.8	-0.240	-5.2	2.7	14:57:46
3	50.0	71.6	0.025	0.5	2.7	14:58:17
Average		66.7	-0.169	-3.7	2.7	
+/-		4.5	0.170	3.7	0.0	



Echantillon 8

Run	Pos.	KCps	Mob.	Zeta	Width	Time
1	50.0	76.8	0.019	0.4	10.1	15:02:24
2	50.0	79.0	-0.307	-6.6	2.7	15:02:54
3	50.0	64.8	-0.010	-0.2	10.3	15:03:24
Average		73.6	-0.099	-2.1	7.7	
+/-		7.6	0.181	3.9	4.4	

ANNEXE 3

MATRICE DES ESSAIS (MODDE 6)

Exp No	Exp Name	Run Order	Incl/Excl	concentrapo	ratio	chi	disso
1	N1	12	Incl	1	1	0,1	
2	N2	14	Incl	4	1	0,1	
3	N3	6	Incl	1	4	0,1	
4	N4	11	Incl	4	4	0,1	
5	N5	16	Incl	1	1	1	
6	N6	15	Incl	4	1	1	
7	N7	13	Incl	1	4	1	
8	N8	1	Incl	4	4	1	
9	N9	2	Incl	1	2,5	0,55	
10	N10	8	Incl	4	2,5	0,55	
11	N11	7	Incl	2,5	1	0,55	
12	N12	10	Incl	2,5	4	0,55	
13	N13	3	Incl	2,5	2,5	0,1	
14	N14	5	Incl	2,5	2,5	1	
15	N15	9	Incl	2,5	2,5	0,55	
16	N16	4	Incl	2,5	2,5	0,55	
17	N17	17	Incl	2,5	2,5	0,55	